Успехи биологической химии, т. 43, 2003, с. 163—224

СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗЕЛЕНОГО (GFP) И КРАСНОГО (drFP583) ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

© 2003 г.

Н. Н. ЗУБОВА, А. Ю. БУЛАВИНА, А. П. САВИЦКИЙ

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Физико-химические характеристики GFP: кристаллическая структура, формирование хромофора, олигомеризация GFP. III. Фотофизика и фотохимия GFP. Влияние pH на спектральные характеристики GFP. IV. Аналоги GFP: красный флуоресцирующий белок drFP583, структура хромофора, кристаллическая структура, олигомеризация и агрегация drFP583. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Зеленый флуоресцирующий белок (GFP) был открыт в 1961 году группой исследователей во главе с Шимомурой [1] при изучении ими биолюминесценции медузы *Aequorea victoria*.

Помещение медузы в разбавленный раствор хлорида калия в темноте вызывает зеленую биолюминесценцию ее световых органов. Аналогичное зеленое свечение обнаруживается и при облучении живой медузы ультрафиолетовым светом. Однако раствор, полученный при экстрагировании активного светящегося вещества медузы,

Принятые сокращения: ГБИ — 4-(п-гидроксибензилиден)имидазолид-5-он; GFP, DsRed — соответственно, зеленый и красный флуоресцирующие белки, BFP, YFP, CFP — соответственно, синий, желтый и циановый флуоресцирующие мутанты GFP из *Aequorea victoria*, EGFP, EYFP, ECFP — улучшенные зеленый, желтый и циановый, соответственно, флуоресцирующие мутанты GFP из *Aequorea victoria*, *A. victoria — Aequorea victoria*, *R. reniformis — Renilla reniformis*, *R. mullery — Renilla mullery*, *P. guernyi — Ptilosarcus guernyi*, *E. coli — Escherishia coli*, FRET — индуктивно-резонансный перенос энергии, SDS — додецилсульфат натрия, ИЭТ — изоэлектрическая точка, КД — круговой дихроизм.

Адрес для корреспонденции: e-mail: savitsky@inbi.ras.ru

испускает синий свет в отличие от зеленой люминесценции живых образцов. Очисткой данного экстракта был получен белок, способный излучать в темноте синий свет в присутствии ионов Ca^{2+}. Этот белок получил название акворин [1]. В процессе очистки акворина в экстракте медузы было отмечено наличие зеленого флуоресцирующего вещества. Хотя о присутствии этого вещества в световых органах *A. victoria* сообщалось еще в 1955 году [2], лишь в 1961 году впервые было установлено, что это вещество является белком [1, 3].

Первые измерения спектра люминесценции акворина и спектра флуоресценции зеленого белка были осуществлены вскоре после их открытия (табл. 1) [4]. Спектр люминесценции акворина широкий, с максимумом при 460 нм. Флуоресценция зеленого белка характеризуется узким спектром с максимумом при 508 нм. Очевидно, что световые органы медузы содержат и акворин и «зеленый белок», первый из которых испускает синий свет в присутствии Ca^{2+}, не требуя света (биолюминесценция), а второй флуоресцирует зеленым светом при освещении (флуоресценция). Зеленый белок позже был назван зеленым флуоресцирующим белком (GFP) [5].

Пик зеленой биолюминесценции живых тканей *A. victoria* находится вблизи максимума флуоресценции GFP, а синяя биолюминесценция чистого акворина характеризуется максимумом, близким к одному из максимумов спектра возбуждения GFP, следовательно, зеленый белок превращает синее излучение акворина в зеленое свечение живого организма. Морин и Гастингс [6] обнаружили аналогичный сдвиг цвета для родственных кишечнополостных *Obelia* (гидроид) и *Renilla* (морской огурец) и первыми предположили существование безызлучательного переноса энергии как механизма возбуждения GFP кишечнополостных *in vivo*.

В растворе между акворином и GFP из *A. victoria* переноса энергии не наблюдается. Однако при их соадсорбции на диэтиламиноэтил целлюлозных мембранах происходит эффективный перенос энергии. Это объясняется тем, что расстояние между молекулами акворина и молекулами GFP становится достаточно малым для протекания Ферстеровского переноса энергии [8]. В случае *Renilla*, биолюминесцентная система которого состоит из коэлентеразина (люциферина), люциферазы, GFP и кислорода, безызлучательный перенос энергии на GFP происходит даже в растворе [9]. Это указывает на то, что между молекулами люциферазы и GFP *Renilla* существует довольно сильное сродство, приводящее к сближению молекул, обеспечивающему безызлучательный перенос энергии. Несомненно, сродство между люциферазой *Renilla* и GFP *Renilla* намного больше, чем между акворином и GFP *A. victoria*.

Таблица 1

Физико-химические и спектральные характеристики цветных флуоресцирующих белков

Объект (источник)	Явление/условия	Поглощение (возбуждение флуоресценции)		Излучение		Молекулярный вес мономерной единицы белка, кДа	Ссылки
		$\lambda_{макс}$, нм	коэффициент экстинкции, $M^{-1}см^{-1}$	$\lambda_{макс}$, нм	квантовый выход		
1	2	3	4	5	6	7	8
Медуза *Aequorea victoria*	Зеленая биолюминесценция в разбавленном растворе KCl или при облучении УФ						[1]
Акворин (из *A.victoria*)	Синяя биолюминесценция в присутствии ионов Ca^{2+}			460		21,631*	[1, 4, 10]
GFP – зеленый флуоресцирующий белок (из *A.victoria*)	Зеленая флуоресценция	395–397 (pH 8) 475 (pH 12)	27600, 25000 14000, 11000	508–509 503	0,8	27 (26,884*)	[4, 5, 7] [10, 15] [33]
GFP зеленый флуоресцирующий белок (из морского огурца *Renilla reniformis*)	То же	498 (pH 8) 470 (плечо)	133000**	508	0,8	27	[7, 9]
S65T мутант GFP из *A.victoria*	То же	489 (pH 8) 394 (pH 4)	52000–58000	509–511 –***	0,64	26,898*	[7, 58] [61, 65]
EGFP – улучшенный зеленый флуоресцирующий белок (производное GFP, содержащее мутации S65T/F64L)	Зеленая флуоресценция. Улучшенная по сравнению с GFP эффективность сворачивания при более высокой температуре	488	55000–57000	507–509	0,60	26,864*	[7, 58]
YFP – желтые флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию T203Y)	Желтоватая флуоресценция (более длинноволновая по сравнению с GFP)	404 510	–	524 527	–	26,946*	[50]
EYFP – улучшенные желтые флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию T203Y и дополнительные мутации, например, S65G/V68L/S72A/T203Y	Желтоватая флуоресценция. Более подходящие физико-химические характеристики по сравнению с YFP	514 392	83400	527–528 –****	0,61	26,914*	[58] [61]

см. окончание табл. 1

окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
CFP – циановые флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию Y66W)	Сине-зеленая флуоресценция	436	–	476 – 485	–	26,907*	[33, 49] [52]
BFP – синие флуоресцирующие белки (производные GFP, содержащие мутацию Y66H)	Синяя флуоресценция	383 – 385	21000	442 – 450	0,24	26,858*	[33, 49] [58]
zFP506 (из кораллов рода *Zoanthus*)	Зеленая флуоресценция	496	35600	506	0,63	26,109*	[53, 73]
zFP538 (из кораллов рода *Zoanthus*)	Желтая флуоресценция	528	20200	538	0,42	26,160*	[73]
amFP486 (из кораллов *Anemonia majano*)	Сине-зеленая флуоресценция	453, 458	40000	486	0,24	25,363*	[53, 73]
dsFP483 (из кораллов *Discosoma striata*)	То же	443	23900	483	0,46	25,687*	[73]
cFP484 (из кораллов рода *Clavularia*)	То же	456	35300	484	0,48	30,447*	[73]
drFP583 (из красных кораллов рода *Discosoma*)	Красная флуоресценция, медленно развивающаяся из зеленой	558	22500	583	0,23	25,843*	[73]
			75000		0,7	28	[78]
		335		583			
		277		500			[81]
		487		500			
K83R мутант drFP583	Зеленая флуоресценция	480		499		25,871*	[78]
E57 (V105A/I161T/S197A мутант drFP583)	Более яркая красная флуоресценция, более быстрое и полное созревание белка в клетках *E.coli* по сравнению с нативным drFP583	558	–	583	–	25,787*	[88]
E57-NA (R2A/K5E/K9T мутант E57)	Аналогичные E57 спектральные свойства, меньшая склонность к агрегации по сравнению с drFP583 и E57	558	–	583	–	25,676*	[88]

* Приведена молекулярная масса, вычисленная на основании аминокислотной последовательности белка.
** Приведен коэффициент экстинкции для мономера, коэффициент экстинкции димерной формы, облигатной для белка, равен 266000.
*** По данным [61] при возбуждении 394 нм обнаруживается слабая флуоресценция, по данным [65] при возбуждении 370 нм обнаруживается слабая флуоресценция с маленьким пиком на 450 нм.
**** При возбуждении светом с длиной волны 392 нм наблюдаемая флуоресценция пренебрежимо мала [61].

Прендергаст и Манн [10] получили первую достоверную оценку молекулярной массы мономера GFP. Шимомура [1, 11] в 1979 году предложил структуру хромофора GFP, выделив из денатурированного GFP небольшой пептидный фрагмент, содержащий хромофор, и, сравнивая его с различными синтезируемыми модельными соединениями, установил структуру хромофора (4-(п-гидроксибензилиден)имидазолид-5-он, ГБИ).

Многие годы GFP изучался очень небольшой группой исследователей как белок, являющийся частью биолюминесцентной системы. Лишь в 1992 году была установлена его аминокислотная последовательность [12]. Решающий прорыв в практическом применении GFP произошел после того, как зеленый белок был клонирован [12] и было показано, что экспрессия гена GFP в других организмах также приводит к появлению флуоресцирующего белка [13, 14]. Следовательно, ген содержит всю информацию, необходимую для посттрансляционного синтеза хромофора, и в этом процессе не задействованы какие-либо специфические ферменты.

После этого открытия интерес к GFP чрезвычайно возрос, и в настоящее время GFP и его мутанты являются наиболее широко используемыми генетическими маркерами. Начиная с 1992 года, количество публикаций, в которых упоминается GFP, экспоненциально возрастает и в настоящее время приближается к 9000.

II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ GFP

Наиболее широко изучены физические свойства GFP из морских организмов *Renilla reniformis* и медузы *A. victoria*, в то время как о других более чем 20 видах GFP, встречающихся в природе, известно очень мало. Все известные GFP являются компактными глобулярными молекулами с массой мономера примерно 27 кДа. За исключением зеленого белка из *A. victoria*, который является мономером в разбавленном водном растворе и димером в концентрированном [10], все остальные GFP — стабильные, недиссоциирующие димеры, превращающиеся в мономер только при денатурации [9].

GFP из *A. victoria* и *Renilla* и многие мутанты рекомбинантного GFP дикого типа выделяются (с помощью ионообменной хроматографии или изоэлектрофокусирования) как семейство близкородственных изоформ с ИЭТ в диапазоне 4,6–5,4 [9]. Полноцепочечный рекомбинантный GFP дикого типа — это белок, состоящий из 238 аминокислот, на С-конце которого расположена последовательность His-Gly-Met-Asp-Glu-Tyr-Lys [12]. В отличие от самого белка, который очень устойчив к протеолизу, этот «хвост» довольно чувствителен

к действию карбоксипептидазы и неспецифических протеаз, что приводит к появлению большого числа изоформ при частичном протеолитическом расщеплении GFP.

Одним из замечательных свойств GFP является его высокая стабильность. На флуоресценцию GFP практически не оказывают влияние такие классические тушители, как акриламид, галогены и молекулярный кислород. Во многих отношениях очищенный GFP из *R. reniformis* более устойчив, чем GFP из *A. victoria*. Например, *R. reniformis* GFP стабилен в более широком диапазоне pH, чем GFP из *A. victoria*, и намного более устойчив в денатурирующих растворах, таких как 6 М мочевина, 1% додецилсульфат натрия и 6 М гуанидин гидрохлорид [15].

При нагревании *A. victoria* GFP до 76 °С (81,9 °С по данным [16]) и *R. reniformis* GFP до 70 °С интенсивность флуоресценции уменьшается в 2 раза. По мере повышения температуры параллельно с уменьшением интенсивности флуоресценции падает и сигнал в далекой УФ-области спектров кругового дихроизма (КД), что говорит о взаимосвязи флуоресценции и целостной вторичной и четвертичной структуры белка [17].

GFP из *Renilla mullery* и *Ptilosarcus guernyi* имеют аминокислотную последовательность только на 25,1% и 22,7% идентичную GFP из *A. victoria*. При этом они характеризуются такими же высокими температурами плавления (86,1 °С и 80,5 °С, соответственно) и имеют очень похожую на GFP из *A. victoria* вторичную структуру, как это следует из спектров КД [18].

В слабощелочных растворах (pH 8,0) максимум возбуждения для GFP из *A. victoria* и *R. reniformis* находится при 395 и 498 нм, а максимум флуоресценции при 509 и 508 нм, соответственно. В обоих случаях в спектрах возбуждения имеется плечо в районе 470 нм. GFP из *R. mullery* имеет максимумы возбуждения и флуоресценции при 498 и 509 нм, а *P. guernyi* при 501 и 511 нм, соответственно [18].

Флуоресценция зеленого белка из *Renilla* практически не изменяется в широком диапазоне pH — от 5,5 до 12,6. Между pH 4,5 и 5,5 она нестабильна и уменьшается во времени, особенно при повышенных температурах. Флуоресценция GFP из *Renilla* может сохраняться при pH 12,6 больше часа, но дальнейшее увеличение pH приводит к быстрой, но обратимой потере флуоресценции, вызванной денатурацией белка [19].

В случае GFP из *A. victoria* флуоресценция более чувствительна к изменению pH. В кислом растворе (pH 4–6) она уменьшается подобно GFP из *Renilla*, однако в щелочных условиях наблюдаются значительные отличия. Начиная с pH 10,0 и до 12,2, интенсивность флуо-

ресценции нативного GFP из *A. victoria* резко возрастает, при этом наблюдается большой сдвиг спектра поглощения и возбуждения. Максимум при 395 нм уменьшается по интенсивности, а плечо при 475 нм увеличивается в три раза [15]. Такой pH-зависимый сдвиг спектров поглощения и возбуждения в экстремально щелочном диапазоне pH может быть результатом ионизации Tyr66 в хромофоре и/или депротонирования Arg96, который стабилизирует енольную форму имидазолидона хромофора [20].

Флуоресценция GFP из *A. victoria* и *Renilla* быстро ($t_{1/2}$= 10 с) восстанавливается в нейтральном растворе (pH 8) после кислотной (pH 1) или щелочной (pH 13) денатурации вплоть до 80%. Однако при стоянии на воздухе денатурированный белок медленно окисляется, после чего восстановления флуоресценции не происходит [15].

При использовании умеренно концентрированных растворов протеаз (0,1 мг/мл) после 24-часового инкубирования в оптимальных условиях ни одна из известных протеаз не оказывает никакого эффекта на флуоресценцию GFP. Высокие концентрации (1 мг/мл) трипсина, химотрипсина, папаина, субтилизина, термолизина и панкреатина также не влияют на флуоресценцию GFP [17]. Выделение хромофорного гексапептида из GFP *A. victoria* путем обработки папаином требует предварительной термической денатурации белка, так как папаин не действует на нативный GFP [21].

Квантовый выход флуоресценции для GFP дикого типа из *R. reniformis* [9] и *A. victoria* равен 0,8 [8]. Молярные коэффициенты экстинкции для нативного белка и его распространенного S65T мутанта приведены в табл. 2.

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА GFP

В настоящее время банк данных Brookhaven Protein Data Bank включает 22 структуры GFP, его мутантов и двух аналогов GFP. Выделенные из кораллов и других морских животных аналогичные

Таблица 2.
Молярные коэффициенты экстинкции GFP.

Источник GFP	Олигомерная форма белка	Коэффициент экстинкции ($M^{-1}см^{-1}$) в расчете на мономер				Источник
		397 нм	475 нм	489 нм	498 нм	
Renilla	димер				133000	[9]
A. victoria	мономер	27600	14000			
	димер	30000	3000			[19]
S65T	мономер/димер			58000		[7]

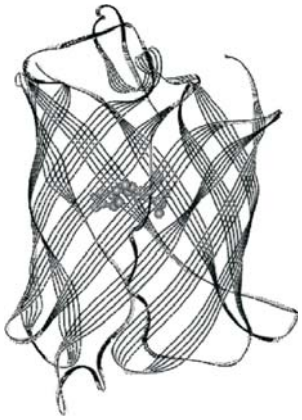


Рис. 1. Кристаллическая структура GFP [22].

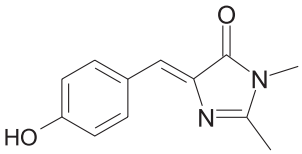


Рис. 2. Структура хромофора GFP.

GFP белки весьма разнообразны по спектрам поглощения и флуоресценции. Несмотря на это, все они очень близки по своей структуре.

Первыми, в 1996 году, были установлены структуры GFP из *A. victoria* [22] и его мутанта S65T [23]. Хотя GFP дикого типа и большинство последующих его мутантов были закристаллизованы в димерной форме, структуры некоторых мономерных белков также были установлены. GFP не является облигатным димером, и образование димера в сильной степени зависит от условий роста кристаллов [24]. GFP имеет уникальную структуру полого цилиндра, внешняя сторона которого образована одиннадцатью антипараллельными â-листами. Диаметр такого цилиндра составляет примерно 24 Å, а высота 42 Å. Хромофор находится внутри этой структуры и связан α-спиральными участками, проходящими вдоль оси цилиндра. Короткие фрагменты α-спиралей и петли образуют также крышки, закрывающие цилиндр сверху и снизу. Такая структура, характерная для цветных белков, была названа â-бочонком (рис. 1). Этот бочонок имеет правильную форму: 11 â-листов формируют почти бесшовную симметричную структуру, единственная нерегулярность которой наблюдается между двумя листами. Молекулы воды образуют пленку вокруг поверхности цилиндра; большое количество молекул воды находится и внутри него. Такой плотно сконструированный бочонок, по-видимому, служит для защиты хромофора, обеспечивая стабильность и устойчивость при нагревании и действии денатурирующих агентов.

Хромофор GFP, 4-(п-гидроксибензилиден)имидазолид-5-он (ГБИ, рис. 2), имеет цис-геометрию, он полностью расположен во внутренней полости цилиндра и занимает центральное положение. Эксперименты по удалению аминокислот показали, что для формирования флуоресцирующего хромофора требуется почти полная структура белка (остатки 2–234 [25] или 7–229 [26]), и лишь несколько С-концевых остатков могут быть удалены без потери флуоресценции. Образование хромофора является результатом внутримолекулярной

циклизации аминокислотных остатков Ser65-Tyr66-Gly67, что демонстрирует пример автокаталитической посттрансляционной модификации белка, протекающей без участия каких-либо кофакторов.

Структура β-бочонка защищает хромофор от тушения флуоресценции растворителем и молекулярным кислородом и, по-видимому, обеспечивает стабильность молекулы GFP. При денатурации молекул происходит полная потеря флуоресценции, которая, однако, восстанавливается до исходного значения при ренатурации структуры. Восстановление флуоресценции на 50% происходит за время от 24 с [27] до 5 мин [28]. Структура β-бочонка GFP устойчива к действию большинства протеаз, несмотря на присутствие возможных сайтов расщепления в незащищенных складках структуры. Вставка пентапептида IleGluGlyArgSer в позиции 157, 172 и 189 приводит к мутантам, чувствительным к действию протеаз [29].

В непосредственном окружении хромофора находится большое количество полярных остатков, которые наряду с иммобилизованными молекулами воды образуют сеть водородных связей вокруг хромофора. Особенно важными в окружении хромофора являются остатки Gln69, Arg96, His148, Thr203, Ser205 и Glu222. На рис. 3 показаны все ближние взаимодействия между хромофором и окружающим белком в GFP дикого типа и его S65T мутанте.

Протонированное состояние хромофора, его окружение и сеть водородных связей вокруг хромофора играют важную роль в фотофизике GFP.

ФОРМИРОВАНИЕ ХРОМОФОРА GFP

Наиболее интересным свойством GFP является то, что его хромофор формируется в результате редко наблюдаемой автокаталитической посттрансляционной циклизации определенного участка собственной аминокислотной последовательности белка. Как уже упоминалось выше, структура хромофора GFP была установлена Шимомурой в 1979 году [1, 11]. После обработки папаином денатурированного при нагревании GFP им был выделен небольшой пептидный фрагмент, содержащий хромофор. В результате сравнения синтезированного модельного соединения с хромофором GFP была предложена структура хромофора 4-(п-гидроксибензилиден)имидазолид-5-он (рис. 2), которая подтвердилась более поздними исследованиями, а также данными рентгеноструктурного анализа. Было установлено, что хромофор содержащий пептид, выделенный Шимомурой, является циклическим гексапептидом Phe64-Ser-Tyr-Gly-Val-Gln69 [21], три аминокислотных остатка которого, Ser65-Tyr66-Gly67,

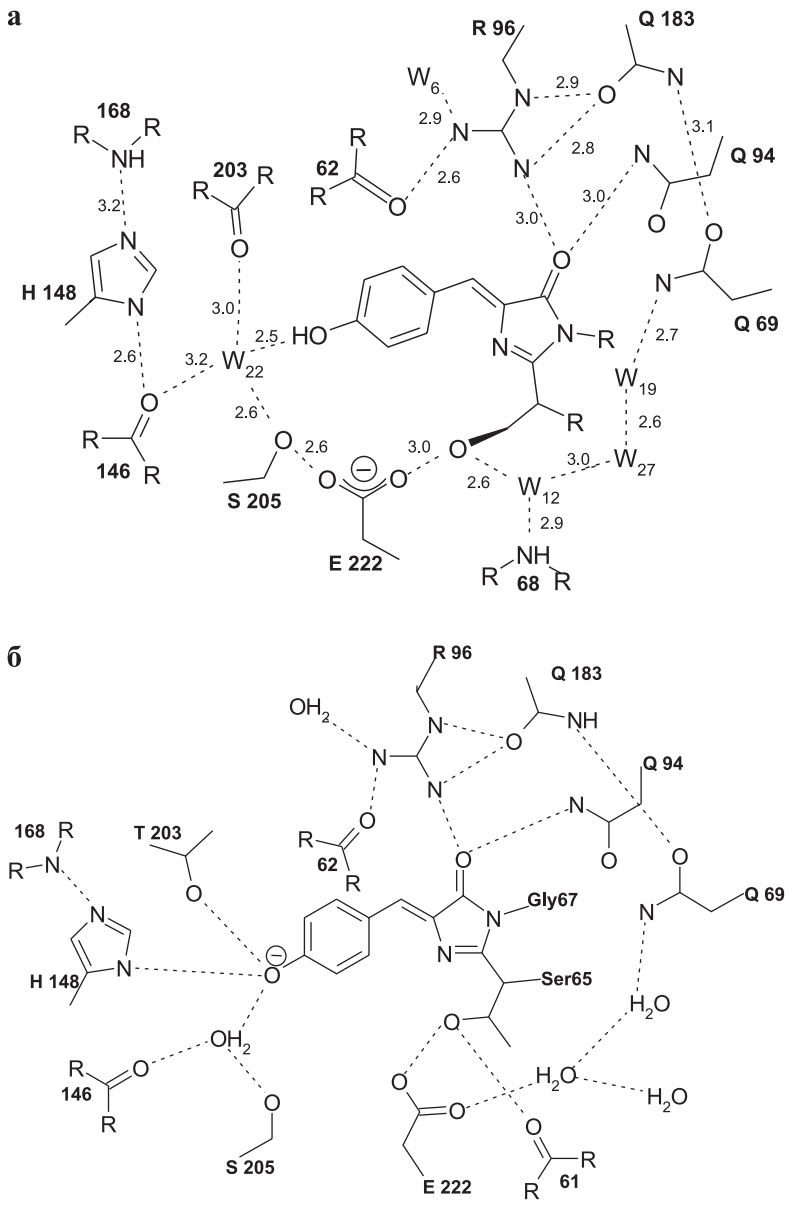


Рис. 3. Схематическая диаграмма взаимодействий между хромофором и его окружением в GFP дикого типа (а) [30] и S65T мутанте (б) [23]. Пунктирными линиями отмечены возможные водородные связи.

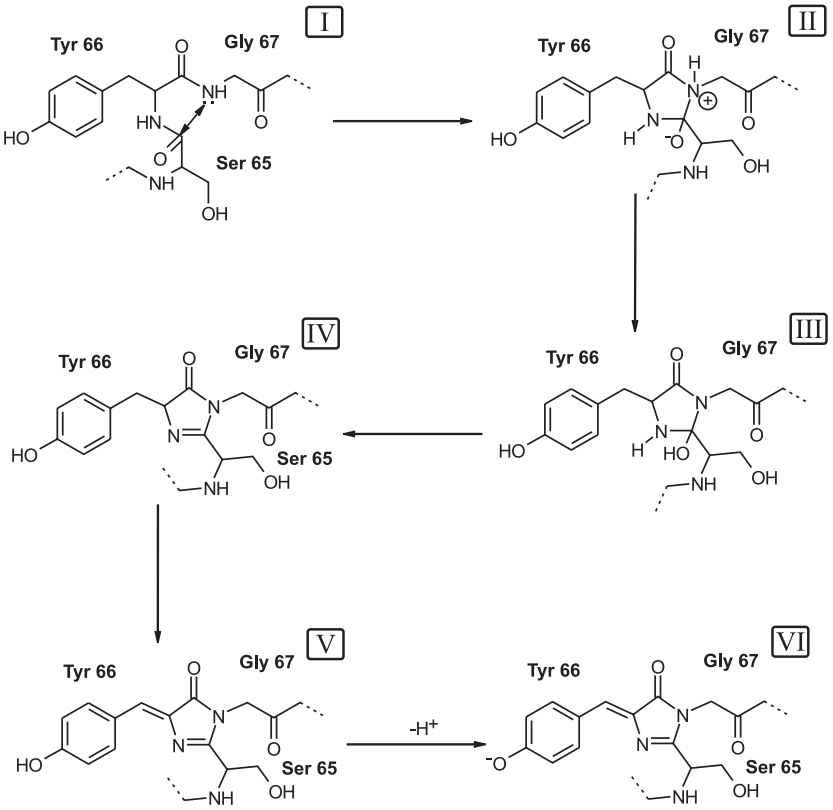


Рис. 4. Предполагаемый механизм формирования хромофора в зеленом флуоресцирующем белке [31].

участвуют во внутримолекулярной циклизации с образованием хромофора.

Детальный механизм формирования хромофора в GFP до сих пор неизвестен, но авторы [31, 32] предложили следующий механизм (рис. 4). Прежде всего GFP сворачивается и принимает почти нативную конформацию, затем посредством нуклеофильной атаки амидного азота глицина 67 на карбонильный атом углерода остатка 65 и последующей дегидратации образуется имидазолидон. Наконец, под действием молекулярного кислорода происходит дегидрирование α–β связи остатка 66, что приводит к сопряжению между ним и имидазолидоном. Только на этой стадии хромофор приобретает способность поглощать видимый свет и флуоресцировать. Данная схема

основана на следующих аргументах. (а) Для появления флуоресценции требуется атмосферный кислород [33]. (б) Флуоресценция GFP в анаэробных организмах возрастает по простому экспоненциальному закону после подачи воздуха и практически не зависит от концентрации самого GFP и клеточных кофакторов [33]. (в) Аналогичные имидазолидоны окисляются спонтанно [34]. (г) Предложенная циклизация аналогична известной тенденции последовательности Asn-Gly образовывать циклические имиды. Глицин несомненно является лучшим нуклеофилом в подобных циклизациях, поскольку создает минимальные стерические затруднения, кроме того, Gly67 сохраняется во всех флуоресцирующих мутантах GFP.

В работе [32] был впервые проведен анализ формирования хромофора *in vitro*. Авторы, исследуя восстановление флуоресценции денатурированного белка, содержащего восстановленный и окисленный хромофор, а также денатурированного белка из бактериальных телец включения, не содержащего хромофор, показали, что процесс формирования хромофора в S65T-GFP состоит из трех отдельных кинетических стадий. Стадия сворачивания белка происходит довольно медленно ($k_f = 2{,}44 \cdot 10^{-3} c^{-1}$, $t_{1/2} = 284$ с) и предшествует какой-либо модификации хромофора. Затем происходит циклизация трипептида хромофора ($k_c = 3{,}8 \cdot 10^{-3} c^{-1}$, $t_{1/2} = 180$ с). Скорость лимитирующей стадией является окисление циклического хромофора, проходящее с константой скорости $k_{ox} = 1{,}51 \cdot 10^{-4}$ c^{-1} (время полупревращения 76 мин). Скорость окисления значительно меняется для разных мутантов GFP. У мутанта S65T окисление происходит в пять раз быстрее, чем у GFP дикого типа [49]. Поскольку формирование хромофора *de novo* из очищенного денатурированного белка происходит как процесс первого порядка, был сделан вывод об автокаталитическом характере формирования хромофора [32].

Гипотеза об автокатализе была подтверждена результатами экспериментов по экспрессии GFP в различных организмах, которая также приводила к появлению зеленой флуоресценции [14]. Другое подтверждение было получено в результате полного химического синтеза белковой молекулы-предшественника GFP *A. victoria* [35], из которой в условиях рефолдинга образовался GFP, идентичный по спектральным свойствам нативному. Эти факты свидетельствуют о том, что вся необходимая информация для посттрансляционного синтеза хромофора содержится в самом гене GFP, и никаких специфических для определенного вида организмов ферментов не требуется.

После синтеза белка флуоресценция GFP появляется спустя временной промежуток от 90 минут до 4 часов [33]. Образование структуры â-бочонка и последующее образование хромофора в зна-

чительной степени зависит от температуры. Медуза *A. victoria* в природе встречается в холодных водах северо-западной части Тихого океана, поэтому зрелый белок наиболее эффективно образуется при температурах ниже 37 °С. Это ограничивает возможности использования GFP и стимулирует поиск мутантов с эффективным фолдингом при более высоких температурах. Неправильный фолдинг приводит к агрегации белка в виде телец включения, препятствуя образованию хромофора и развитию флуоресценции [36]. Кроме неправильного фолдинга и агрегации, образование хромофора GFP при 37 °С может быть неэффективным вследствие того, что карбонильный углерод Ser65 находится в недостаточной близости от амидного азота Gly67 для протекания автокаталитической циклизации [37].

Интересно отметить, что скорость фолдинга GFP дикого типа и мутантов различна в клетках млекопитающих и бактерий [38]. Поскольку наиболее вероятно, что фолдинг GFP происходит одинаковым образом во всех организмах, это различие связывают с действием шаперонов, ускоряющих фолдинг [39].

На основании вычислительных анализов гексапептида FSYGVQ [40] предположили, что посттрансляционное формирование хромофора происходит благодаря наличию низкоэнергетических конформаций, в которых внутримолекулярное расстояние между карбонильным углеродом Ser65 и амидным азотом Gly67 (рис. 4, I) очень мало. Авторы предположили также, что боковая цепь аргинина может образовывать водородную связь с карбонильным кислородом Ser65, активируя его карбонильный углерод для атаки неподеленной парой электронов амидного азота Gly67. Достаточная близость аргинина, а именно Arg96, была подтверждена данными по кристаллической структуре GFP. Однако это не является ключевым моментом, так как по имеющимся данным мутанты, не содержащие Arg96, тоже созревают [41].

Конформационный анализ методом молекулярной механики с использованием кристаллической структуры GFP дикого типа показал, что хромофор формирующие остатки несозревшего GFP предварительно плотно организованы так, что расстояние между карбонильным углеродом Ser65 и амидным азотом Gly67 составляет менее 2,9 Å. â-бочонок, образованный 11 â-листами, не только реализует такую плотную «упаковку», которая требуется для формирования хромофора, но и существенно ограничивает конформационную подвижность хромофор формирующей области. Таким образом, остатки сохраняются на нужных для протекания автокаталитической циклизации позициях [42].

Авторы [43] предложили альтернативный механизм формирования хромофора, в котором дегидрирование Tyr66 предшествует циклизации. Это предположение основано на расчетах функциональной плотности, показавших, что общепринятый механизм энергетически неблагоприятен и приводит к значительной эндотермичности процесса при образовании имидазолидонового кольца и требуемого промежуточного соединения. Альтернативный механизм является более вероятным с энергетической точки зрения, так как приводит к менее нестабильному интермедиату и энергиям реакции, близким к термонейтральным.

Несмотря на многочисленность исследований механизма образования хромофора, многие аспекты остаются до сих пор не выясненными. Неясны каталитическая и стерическая роль соседних с хромофор образующими остатков, влияние первичной структуры на скорость окисления, а также способы, посредством которых некоторые мутации увеличивают эффективность фолдинга. Изучение механизма образования хромофора помимо научного интереса имеет и практическое значение, поскольку медленное формирование хромофора ограничивает скорость получения данных об изменении экспрессии генов при использовании GFP в качестве репортера.

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ GFP

За исключением GFP из медузы *A. victoria*, зеленые флуоресцирующие белки, полученные из других организмов, образуют стабильные димерные комплексы в разбавленных растворах, которые диссоциируют только в денатурирующих условиях [28]. Димеризация GFP из *A. victoria* наблюдается только при высоких концентрациях белка в растворе и зависит от ионной силы [28] (константа димеризации оценивается как $1 \cdot 10^{-4}$ М). В зависимости от условий роста кристаллов GFP кристаллизуется в виде димера [22] или мономера [30]. В димерной структуре GFP поверхность взаимодействия двух мономеров образована как гидрофобными (Ala206, Leu221, Phe223), так и гидрофильными полярными аминокислотными остатками (Glu146, Asn144, Ser147, Arg168, Tyr200 и др.). Олигомеризация проявляется зависимостью формы спектра поглощения от концентрации белка. Для GFP из *A. victoria* наблюдается уменьшение максимального поглощения при 475 нм [44].

Димеризация GFP играет немаловажную роль в природе. Хемилюминесцирующий белок акворин, который является партнером GFP при индуктивно-резонансном переносе энергии в медузе *A. victoria*, связывается только с димерной формой GFP, а не с мономером. Вероятно, это является механизмом для более эффективного захвата энергии возбужденного состояния акворина [44].

III. ФОТОФИЗИКА И ФОТОХИМИЯ GFP

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

GFP дикого типа из медузы *A. victoria* имеет наиболее сложные спектры поглощения и возбуждения флуоресценции по сравнению с остальными GFP. Основной максимум спектра возбуждения для GFP из *A. victoria* расположен при 395 нм, он примерно в три раза более интенсивен, чем минорный максимум при 475 нм. В растворе возбуждение при 395 нм приводит к флуоресценции с максимумом 508 нм, тогда как возбуждение более длинноволновым светом (475 нм) дает максимум 503 нм [33]. Зависимость спектра флуоресценции от длины волны возбуждения показывает, что существует, по меньшей мере, две химически различные формы, которые до конца не приходят в равновесие за время жизни в возбужденном состоянии. При pH 10–11, когда белок находится на грани разворачивания, повышение pH приводит к увеличению поглощения при 475 нм и уменьшению максимума 395 нм. Было высказано предположение [31], что максимум 475 нм появляется за счет молекул GFP, содержащих депротонированный, или анионный, хромофор, тогда как максимум при 395 нм связан с поглощением GFP, содержащего протонированный, или нейтральный, хромофор. Последний же, предположительно, депротонируется в возбужденном состоянии, поскольку это характерно для фенолов.

Индуцированная светом ионизация может объяснить, почему возбуждение нейтрального хромофора дает флуоресценцию со спектром, смещенным за 500 нм, которая сходна, но не идентична флуоресценции при возбуждении анионного хромофора. Пикосекундная спектроскопия дает прямое доказательство подобного переноса протона в возбужденном состоянии [45, 46]. После освещения светом при 395 нм максимум флуоресценции сдвигается от 460 до 508 нм примерно через 10 пс (6 пс в 50% глицерине при 295 K по данным [46]). Это смещение может быть значительно замедлено при охлаждении до 77 K, повышении вязкости или замещении на дейтерий (то есть имеет место кинетический изотопный эффект), что строго доказывает перенос протона в возбужденном состоянии.

Во время таких циклов поглощения-флуоресценции перенос протона, возможно, обратим. Однако иногда протон не возвращается к хромофору — происходит фотоизомеризация хромофора в анионную форму. Так, при интенсивном УФ-облучении максимум поглощения и возбуждения нейтральной формы при 395 нм постепенно уменьшается, а максимум анионного хромофора при 470 нм возрастает [31, 45, 46]. Возможным механизмом [30] является перенос протона

посредством системы водородных связей через молекулу воды и Ser205 на карбоксильную группу Glu222. При этом боковая цепь Thr203 поворачивается, что приводит к стабилизации образующегося фенолят-иона (рис. 5). В кристаллической структуре мономерного GFP дикого типа Thr203 существует в двух конформациях: примерно 85% соответствует конформации, в которой гидроксильная группа треонина направлена от фенольного кислорода, а 15% соответствует конформации с OH-группой Thr203, направленной в его сторону [30]. Эта пропорция согласуется со спектральной оценкой отношения нейтральной и анионной форм хромофора в равновесии, которое составляет примерно 6 : 1 [45, 46].

В работе [47] было показано, что на самом деле основным процессом при фототрансформации нейтральной формы хромофора GFP в анионную является декарбоксилирование Glu222, происходящее путем переноса электрона с γ-карбоксильной группы Glu222 на хромофор GFP и последующего обратного переноса [$H^+ + e^-$] на оставшийся атом углерода боковой группы Glu222. Вывод о декарбоксилировании подтверждается сведениями по кристаллической структуре фотопродукта GFP, а также результатами масс-спектрометрического анализа, согласно которым фотопревращение приводит к уменьшению массы белка на 44 Да. Кроме того, флуоресцентные характеристики этого фотопродукта GFP аналогичны наблюдаемым при замене в нативном белке Glu222 на глицин [48].

Очень часто используется мутация S65T, которая приводит к ионизации хромофора, при этом максимум возбуждения при 395 нм, характерный для нейтральной формы хромофора белка дикого типа, уменьшается, а максимум при 470–475 нм, соответствующий возбуждению анионной формы, усиливается в 5–6 раз и сдвигается к 489–490 нм [49]. Замена Ser65 на некоторые алифатические аминокислоты, как, например, глицин, аланин, цистеин и лейцин, имеет приблизительно такой же эффект [49]. Возможным объяснением того, почему замещение Ser65 приводит к ионизации хромофора, является тот факт, что только Ser65 может выступать в качестве донора водородной связи для боковой цепи Glu222, приводя к ионизации ее карбоксильной группы, которая находится на расстоянии 3,7 Å от хромофора [23, 30]. Глицин, аланин и валин не могут образовывать водородную связь, а треонин и цистеин слишком большие, чтобы принять нужную конформацию в плотном внутреннем пространстве белка. Такие остатки в положении 65 вынуждают карбоксильную группу Glu222 оставаться нейтральной. В этом случае другие полярные группы в окружении хромофора способны вызвать его ионизацию до аниона, тогда как если Glu222 заряжена, то электростатическое

отталкивание препятствует ионизации хромофора. Эта гипотеза объясняет, почему замена Glu222 на глицин приводит к аналогичным спектральным изменениям [48].

Замена Thr203 на изолейцин значительно уменьшает максимум возбуждения при 475 нм, не затрагивая только коротковолновый максимум 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 виде нейтральной формы. Однако максимум флуоресценции все еще находится при 511 нм, так как возбужденное состояние остается достаточно кислотным, чтобы отщепить протон [33, 48].

Наиболее длинноволновые спектры имеют мутанты GFP, в которых имеется так называемое π-стэкинговое взаимодействие ароматического кольца и фенолят-аниона хромофора. Ароматическое кольцо появляется при замене 203 остатка на His, Trp, Phe и Tyr, при этом максимумы спектров возбуждения и флуоресценции сдвигаются в красную область, максимальный сдвиг до 20 нм наблюдается в случае Tyr203 [23, 50]. Эти мутанты были сконструированы на основе кристаллической структуры S65T GFP в расчете на то, что дополнительная поляризуемость окружения хромофора и π-π взаимодействие понизят энергию возбужденного состояния, приведя к увеличению длин волн возбуждения и флуоресценции. Реальная кристаллическая структура мутанта, содержащего Tyr203, подтверждает, что ароматическое кольцо тирозина находится рядом с хромофором и взаимодействует с ним [51]. Замена Gln69 на лизин (Q69K) дает дополнительный сдвиг на 1–2 нм, приводя к максимуму флуоресценции при 529 нм, самому длинноволновому из всех мутантов GFP. Такие мутанты были названы YFP (желтые флуоресцирующие белки) за их желтоватую окраску.

Замена Tyr66 на Trp приводит к образованию нового хромофора с индолом вместо фенола или фенолята [49, 52]. Максимумы возбуждения и флуоресценции находятся при 436 и 476 нм, это положение является промежуточным между положениями для нейтрального фенола и анионного фенолята в хромофоре. Такие мутанты были названы циановыми флуоресцирующими белками (CFP) из-за их сине-зеленой флуоресценции. Мутации, приводящие к замене Tyr66 на гистидин, дают еще более «синий» белок (BFP), максимумы возбуждения и флуоресценции которого расположены при 383 и 447 нм, соответственно [49]. Самые же коротковолновые спектры свойственны мутантам GFP, у которых в хромофоре вместо Tyr66 находится фенилаланин [31, 49]. Эти мутанты мало изучены, так как не нашли

практического применения из-за слишком коротковолнового возбуждения. Тем не менее, это доказывает, что любой ароматический остаток в положении 66 может сформировать хромофор.

Авторами [53] было показано, что на спектральные свойства зеленых и циановых белков существенно влияет природа аминокислотного остатка в положении 167. Так, например, аналогичные GFP циановые белки amFP486, dsFP483 и cFP484, выделенные из кораллов, характеризуются широким спектром флуоресценции с максимумом при 485 нм. Зеленые белки — zFP506 и EGFP (F64L/S65T мутант GFP) флуоресцируют в районе 505 нм и характеризуются узким максимумом в спектре флуоресценции. Сравнение же аминокислотной последовательности этих белков обнаруживает только одно значительное отличие между циановыми и зелеными флуоресцирующими белками. В положении 167 циановых белков расположены Ala или His, а в случае зеленых белков — Met или Ile. Согласно кристаллической структуре GFP [22, 23], Ile167 находится вблизи хромофора. Хорошо известно, что поляризуемость окружения флуорофора оказывает сильное влияние на ширину спектра флуоресценции: для более полярного окружения характерны более широкие максимумы флуоресценции. Можно рассматривать роль остатков в положении 167 и с точки зрения жесткости флуорофора: чем более плотное окружение, тем более узким должен быть спектр флуоресценции. На основании этого авторы [53] предположили, что объемные гидрофобные остатки (метионин и изолейцин) в положении 167 приводят к сужению спектра флуоресценции, тогда как более маленькие и полярные гистидин и аланин приводят к его уширению. Кроме того, маленький остаток аланина в amFP486 может высвобождать пространство для дополнительной молекулы воды, которая поляризует окружение хромофора. Методом точечных мутаций были созданы zFP506 – M167A,H и amFP486 – A167M,I, которые обнаружили спектральные характеристики, промежуточные между циановыми и зелеными (табл. 3). Это показывает, с одной стороны, важность положения 167, а с другой стороны говорит о том, что для возбуждения и флуоресценции циановых или зеленых белков существенны также и другие остатки.

Общая взаимосвязь структуры и спектров. Денатурированный GFP дикого типа в нейтральных и слабощелочных растворах имеет максимум поглощения при 384 нм, а в щелочных растворах — при 448 нм. Этому переходу соответствует pK 8,1 [54]. Такое соответствие с максимумами поглощения и возбуждения интактного белка впервые побудило приписать максимумы возбуждения 395 и 470 нм, соответственно, нейтральному и анионному хромофору нативного

Таблица 3.
Сравнение спектральных свойств zFP506, amFP486 и их мутантов [53]

Белок	Мутация	Максимум возбуждения, нм	Ширина полосы возбуждения, нм	Максимум излучения, нм	Ширина полосы излучения, нм
zFP506	дикий тип	494	41	506	23
	M167A	469	50	496	36
	M167H	469	53	497	36
amFP486	дикий тип	453	58	486	49
	A167M	473	47	495	34
	A167I	464	56	498	38

белка. Денатурированный GFP или протеолитический фрагмент, несущий хромофор, в основном не флуоресцируют, поскольку хромофор не защищен от тушения при столкновении с диполями молекул воды, парамагнитными молекулами кислорода или от цис-транс изомеризации [54, 55], которая, как было показано [56, 57], является главным каналом безызлучательной релаксации хромофора в растворе. Небольшое различие в длинах волн поглощения между денатурированным и интактным белком может объясняться структурированностью последнего. В частности, положительно заряженная боковая цепь Arg96 расположена довольно близко к карбонильной группе имидазолидона. Этот катион будет электростатически стабилизировать увеличенную электронную плотность на карбонильном кислороде в возбужденном состоянии хромофора. Такое электростатическое притяжение может объяснить большую часть красного сдвига в интактном белке по сравнению с денатурированным белком. И в самом деле, замена Arg96 на цистеин в S65T мутанте приводит к синему сдвигу максимума возбуждения от 489 до 472 нм и максимума флуоресценции от 511 до 503 нм, что подтверждает большую роль Arg96 в понижении энергии возбужденного состояния [58].

Влияние концентрации белка. При повышении концентрации GFP основной максимум возбуждения при 395 нм усиливается за счет уменьшения дополнительного максимума при 470 нм. Поскольку считается, что эти пики соответствуют нейтральной и анионной формам хромофора, то агрегация, по-видимому, ингибирует ионизацию флуорофора [59].

МОДЕЛЬ ФОТОИЗОМЕРИЗАЦИИ GFP, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ТРИ СОСТОЯНИЯ

На основе наблюдений, обсужденных выше, и факта, что Y66H мутант поглощает только при 384 нм, изменений в спектрах погло-

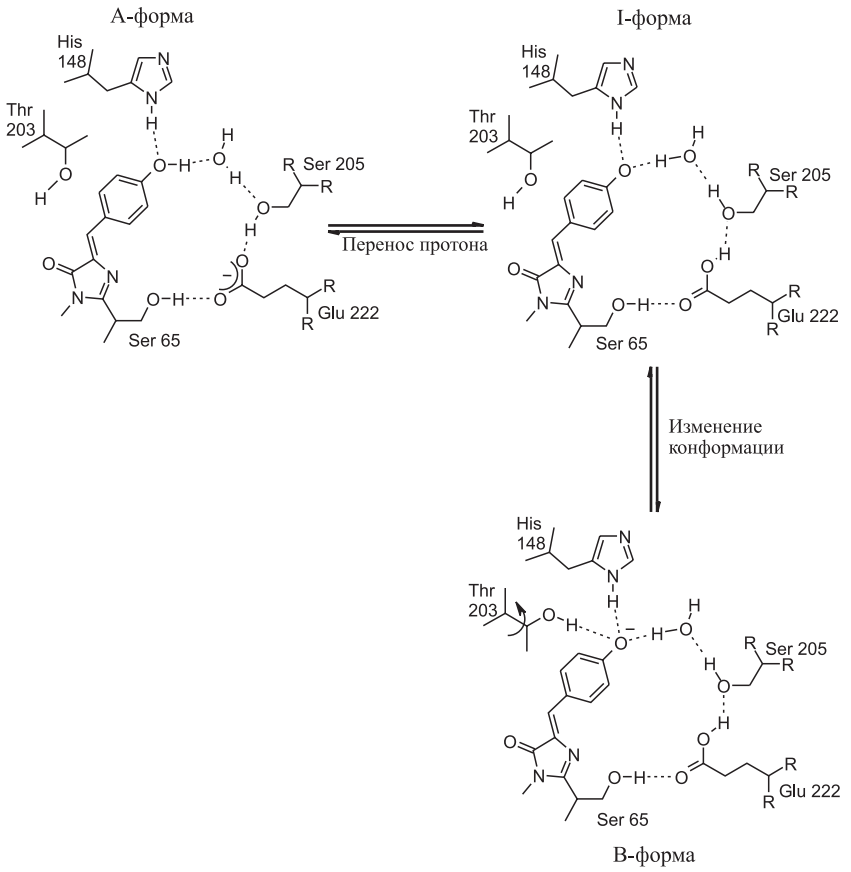


Рис. 5. Механизм фотоизомеризации GFP дикого типа [30]. Пояснения в тексте.

щения, которые сопровождают другие мутации, кристаллической структуры Y66H мутанта для фотоизомеризации GFP дикого типа был предложен следующий механизм [30, 45] (рис. 5). Нейтральная форма хромофора (A) может переходить в анионную форму (B) через промежуточное состояние (I). При переходе от нейтрального хромофора к заряженному хромофору фенольный протон Tyr66 перемещается посредством широкой системы водородных связей на карбоксильный кислород Glu222. Изменение формы A до формы I — это только изменение протонированного состояния, тогда как изменение формы I до формы B — это уже конформационное изменение, основные перестановки при котором происходят около Thr203. В работе [60] на основании изучения спектров поглощения и эффекта Старка

для GFP дикого типа, его S65T и Y66H (BFP) мутантов авторы показали, что возбуждение состояния A приводит к довольно малому перемещению заряда, в то время как дипольный момент возбужденного состояния B* значительно отличается от его основного состояния. При этом дипольные моменты возбужденных состояний A* и B* перпендикулярны друг другу. Поскольку электронные свойства A* и B* значительно отличаются друг от друга, то будет отличаться и белковое окружение, стабилизирующее каждую из форм. На основании того, что первоначально сформированный интермедиат структурно аналогичен A/A*, а по распределению электронной плотности больше похож на B/B*, авторы сделали вывод о необходимости реорганизации белкового окружения вокруг интермедиата прежде, чем он перейдет в форму B. Этот процесс, вероятно, включает движение многих остатков, как, например, было предложено в работе [30]. Дополнительное доказательство получено при анализе кристаллической структуры S65T мутанта, который показывает, что при низких pH отсутствует взаимодействие между боковой группой Thr203 и фенольным кислородом хромофора, в то время как при высоких pH эта группа поворачивается примерно на 100°, образуя водородную связь [61].

ПОВОРОТ ХРОМОФОРА В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ

При нейтральных или кислых pH денатурированный GFP дикого типа поглощает при 384 нм, а при щелочных pH — при 448 нм. При этом и денатурированный GFP [54], и хромофор содержащий гексапептидный фрагмент [21], и синтетические модельные соединения [55] практически не флуоресцируют или флуоресцируют с очень низким квантовым выходом (менее 0,0001 по данным [55]). Денатурированный GFP и гексапептидный фрагмент, однако, начинают сильно флуоресцировать при 77 K. По-видимому, замедление колебаний и вращений вокруг экзо-метиленовой двойной связи хромофора предотвращает уменьшение флуоресценции, происходящее за счет быстрой внутренней конверсии [56]. Благодаря такому замедлению квантовый выход флуоресценции GFP дикого типа очень высок и составляет 0,8.

Методы молекулярной механики и молекулярной динамики [57] показали, что GFP имеет довольно большую центральную полость, которая содержит хромофор. Однако ее форма не является комплементарной с планарным (плоским) хромофором. Белок вызывает некоторое напряжение в структуре хромофора, когда тот планарен, и только делокализацией π-электронов можно объяснить наличие в GFP именно планарного хромофора. Белковое окружение GFP дает

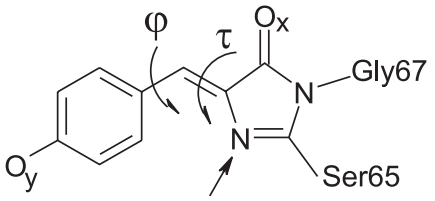


Рис. 6. 4-(п-гидроксибензилиден)-имидазолид-5-он (структура хромофора GFP).

Оу, Ох и N – возможные сайты протонирования. φ и τ – двугранные углы, которые могут изменяться в возбужденном состоянии [57].

хромофору некоторую свободу во вращении, особенно в направлении «hula-twist» (согласованное изменение углов τ и φ (рис. 6), приводящее к вращению в вертикальной плоскости, перпендикулярной плоскости рисунка, метенового мостика, расположенного между фенольным и имидазолидоновым кольцами хромофора) и по двугранному углу *φ*. Следовательно, возбужденное состояние, ответственное за флуоресценцию, может поворачиваться относительно основного состояния [57]. В случае GFP дикого типа вращение в направлении *τ* ограничено Phe165, в результате чего цис-транс фотоизомеризация, требующая поворота на 180°, не происходит. Однако можно ожидать, что замена Phe165 на меньшую по размеру аминокислоту будет способствовать дополнительному уменьшению флуоресценции именно за счет цис-транс фотоизомеризации [57].

МОДЕЛЬ ФОТОИЗОМЕРИЗАЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ЧЕТЫРЕ СОСТОЯНИЯ

Для объяснения коротко- и долгоживущих нефлуоресцирующих («темных») состояний GFP и каналов релаксации возбужденного состояния в основное авторы [62] использовали квантово-механические расчеты. На их основании была предложена новая модель фотоизомеризации, расширенная по сравнению с приведенной на рис. 5.

В этой модели добавлены цис-транс фотоизомеризация и цвиттер-ионная форма Z (O_y^-,NH^+,O_x). В некоторых из этих форм адиабатические потенциальные поверхности основного и возбужденного состояний проходят очень близко друг к другу, что может способствовать неадиабатическому переходу (NAC). Безызлучательный распад через NAC является предпочтительным для цвиттер-ионной формы. Возбужденные же состояния нейтральной (A*), промежуточной (I*) и анионной (B*) форм претерпевают минимальный безызлучательный распад через NAC. Изомеризация может проходить как посредством изменения двугранных углов *φ* и *τ*, так и посредством их согласованного изменения («hula-twist»). На основании этих данных авторы [62] предположили, что Z-форма является нефлуоресцирующей («темной»). Однако следует иметь в виду, что экспериментальных доказательств наличия цвиттер-ионной формы для хромофора GFP нет [63].

ФОТОДИНАМИКА ЖЕЛТОГО ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕГО БЕЛКА (YFP) И РОДСТВЕННЫХ Thr203 МУТАНТОВ

Как упоминалось ранее, на основе кристаллической структуры S65T были созданы желтые флуоресцирующие мутанты, в которых Thr203 заменен ароматическими аминокислотами [23, 51]. Кристаллическая структура EYFP (T203Y/S65T/V68L/S72A) [51] показывает, что Tyr203 и хромофор копланарны и между Tyr203 и Tyr66 (хромофором) существует π-стэкинг. В структуре имеется водородная связь между Glu222 и азотом хромофора, предполагая, что азот имидазолидонового кольца нейтрален, а боковая группа Glu222 протонирована [51]. YFP имеют самое длинноволновое поглощение (514–516 нм) и флуоресценцию (529 нм) среди всех известных на данный момент мутантов GFP. YFP при этом имеют более низкий квантовый выход флуоресценции (0,6–0,7) по сравнению с GFP (0,8), что может быть связано с некоторым увеличением конформационной свободы хромофора (изменение двугранных углов φ и τ), приводящей к более быстрой безызлучательной релаксации возбужденного состояния [56].

С помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии изучалась быстрая фотоиндуцированная динамика флуоресценции [64]. Было показано, что возбуждение желтых мутантов T203Y, T203F и, возможно, EGFP (F64L/S65T) при высоких pH приводит к сильно флуоресцирующему возбужденному состоянию, которое находится в равновесии с двумя «темными» состояниями, одно из которых – протонированный хромофор, а другое (не включающее в себя протонирование фенолята) может являться цвиттер-ионом в модели фотоизомеризации, состоящей из четырех состояний. Эти «темные» состояния приводят к уменьшению квантового выхода флуоресценции желтых мутантов.

ВЛИЯНИЕ pH НА СПЕКТРЫ GFP И ЕГО МУТАНТОВ

На поглощение и флуоресценцию GFP и многих его мутантов сильное влияние оказывает pH. Как уже упоминалось, интенсивность флуоресценции GFP из *A. victoria* примерно постоянна в диапазоне pH 6–10, а при смещении в более кислую область она уменьшается с pK около 4,5 [15, 17]. Несмотря на многочисленные работы в этой области, механизм такой pH-чувствительности не был установлен. Так, авторы [65] установили, что флуоресценция GFP очень чувствительна к pH *in vitro* и *in vivo* и эта чувствительность может быть изменена посредством различных мутаций. Поскольку флуоресцентный ответ GFP на изменения кислотности среды происходит быстро и обратимо, было предложено использование этого белка в качестве неинвазивного индикатора внутриклеточного pH в тех случаях, когда тра-

диционные синтетические pH-индикаторы не подходят. Таким образом, GFP и некоторые его мутанты были применены для мониторинга pH внутри митохондрий, комплекса Гольджи и цитозоля [65, 66].

Прежде чем использовать белки в живых системах, надо изучить зависимости их поведения от pH *in vitro*. С этой целью было исследовано несколько мутантов GFP, а именно: F64L/S65T (так называемый EGFP), S65T, Y66H и T203I [65]. В случае мутанта GFP-S65T форма спектров флуоресценции при изменении pH изменялась незначительно, хотя при понижении pH интенсивность в максимуме уменьшалась (рис. 7а), причем 50%-падение интенсивности флуоресценции наблюдалось при pH ~ 6. Чтобы проверить, будет ли pH-зависимым молярный коэффициент поглощения GFP-S65T, было проведено также спектрофотометрическое титрование. В спектрах поглощения при различных pH наблюдалось два максимума (рис. 7б). Поглощение при 490 нм, соответствующее максимуму возбуждения флуоресценции, при понижении pH уменьшалось параллельно с pH-профилем возбуждения флуоресценции. Второй максимум поглощения при ~ 390 нм возрастал при повышении кислотности среды, но возбуждение на этой длине волны не приводило к появлению флуоресценции в районе 510 нм. При дополнительном анализе (возбуждение 370 нм, флуоресценция 420–470 нм) наблюдался очень небольшой максимум флуоресценции при 450 нм.

Затем были проведены титрования остальных очищенных мутантных белков, с тем чтобы определить, изменяются ли pH-зависимые спектральные свойства при мутагенезе. Флуоресценция GFP-Y66H, как упоминалось, сдвинута в более коротковолновую область. Интенсивность в максимуме (~ 450 нм) понижается при уменьшении pH, причем 50%-падение наблюдается также при pH 6. В отличие от этого, в случае GFP-T203I интенсивность флуоресценции (~ 510 нм) уменьшается на 50% при pH ~ 5. В спектрах поглощения Y66H и T203I имеются одиночные максимумы, расположенные вблизи соответствующих максимумов возбуждения (~ 385 и ~ 400 нм, соответственно), при этом наблюдается параллельное pH-зависимое изменение поглощения и флуоресценции.

Сравнение данных по флуоресценции и поглощению для S65T, которые изменяются одинаково в зависимости от pH, показывает, что падение флуоресценции при понижении pH связано с уменьшением молярного коэффициента поглощения, а не квантового выхода. Полученные pH-профили обрабатывались по следующему уравнению:

$$F = A + B/[1 + 10^{n_H(pK - pH)}],$$

где параметры pK — это pH, при котором наблюдается 50%-уменьшение максимальной интенсивности, а n_H — коэффициент Хилла, кото-

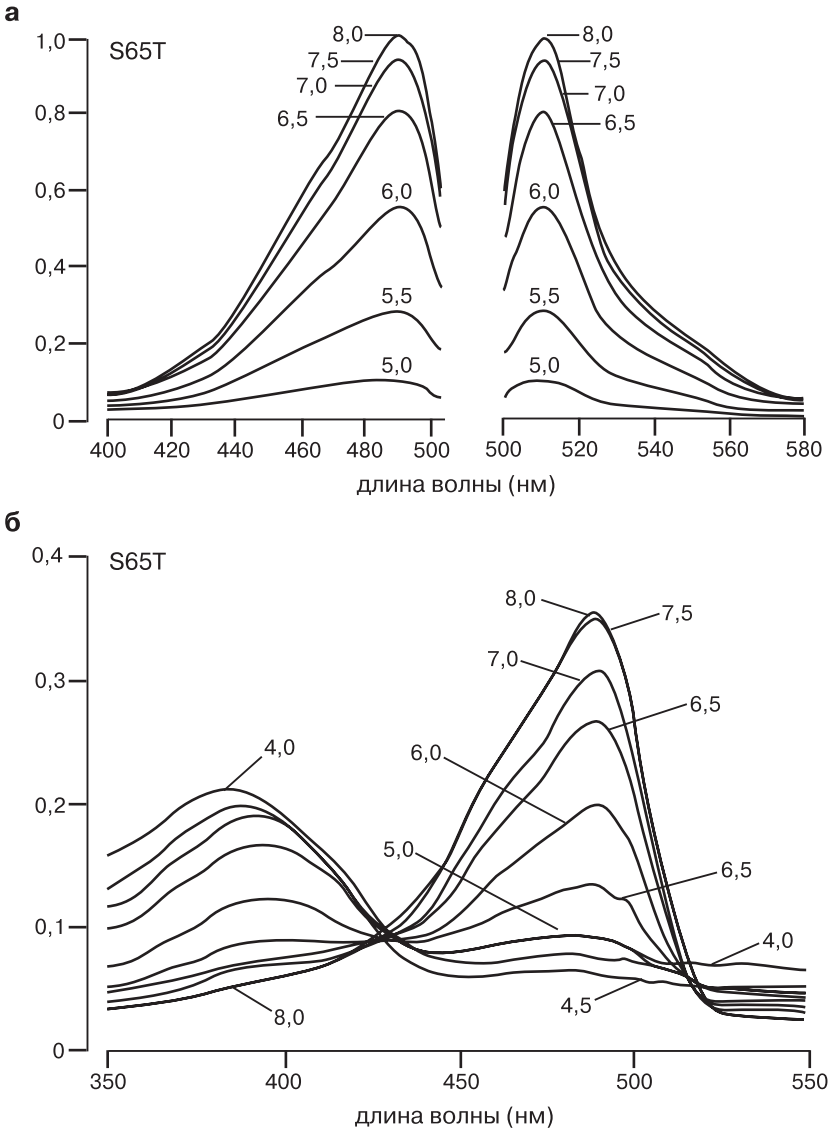


Рис. 7. Спектры возбуждения и флуоресценции (а) и спектры поглощения (б) S65T мутанта GFP [65].

рый пропорционален наклону графика зависимости интенсивности от pH в точке, где pH = pK. Параметры A и B связаны с базовой линией и находятся из экспериментальной кривой. Анализ pH-профиля флуоресценции S65T, который представляет собой обычную сигмоидную кривую с одной ступенькой, по этому уравнению дает pK = 5,91, а n_H= 0,92. Такая простая форма кривой титрования предполагает вовлечение только одного аминокислотного остатка в механизм pH-чувствительности белка.

Спектры флуоресценции и данные по кислотно-основному титрованию для GFP-S65T и GFP-F64L/S65T мутантов практически не отличаются друг от друга. Рассчитанные значения pK и n_H для GFP-F64L/S65T составили 5,98 и 0,97 соответственно. В случае же GFP-Y66H pK = 5,98, n_H= 0,65, а для GFP-T203I pK = 5,05, n_H = 0,91. Значение коэффициента Хилла для Y66H много меньше единицы, что свидетельствует об отрицательной кооперативности, предполагая вовлечение более чем одного остатка в процесс титрования. Эти результаты доказывают, что мутагенез может значительно изменять pH-зависимость GFP.

Дополнительные спектроскопические и кинетические исследования механизма pH-чувствительности GFP [65] показали, что GFP-S65T в широком диапазоне pH 5–10 имеет одно время жизни флуоресценции, равное примерно 2,8 нс. Это также подтверждает вывод о том, что pH влияет на молярный коэффициент поглощения, а не уменьшает квантовый выход. В диапазоне pH от 6,5 до ~ 5 изменение флуоресценции S65T полностью обратимо, однако при более низких значениях pH такая обратимость отсутствует. Для установления возможной причины этого использовался метод стоп-флоу (кинетика остановленной струи), который показал, что все изменения во флуоресценции S65T в диапазоне pH 6–7 проходят менее чем за 1 мс, свидетельствуя о протекании обычной реакции протонирования. Однако в более кислой области от pH 5 до 3 наблюдается дополнительный медленный процесс с периодом полупревращения $t_{1/2}$~ 1 с, что говорит о наличии конформационных изменений или денатурации белка. pH-чувствительность флуоресценции GFP при pH > 5 по всей вероятности является результатом протонирования-депротонирования остатков, входящих в состав хромофора или расположенных рядом с ним, поскольку флуоресцентный ответ GFP на изменение pH происходит быстро (< 1 мс) и обратимо, а время жизни в возбужденном состоянии, форма спектров флуоресценции, тушение акриламидом и спектры КД нечувствительны к pH > 5. При pH < 5 происходит разворачивание белка, так как флуоресценция GFP реагирует медленно и не полностью обратимо на изменение pH [65].

На основе кристаллографических и спектроскопических данных предполагается, что за pH-чувствительность GFP ответственно протонированное состояние фенольной группы хромофора. Хромофор в денатурированном GFP дикого типа имеет pH-зависимые спектральные характеристики благодаря ионизации фенольной группы Tyr66 [15]. Фенолятная форма хромофора имеет максимум поглощения при 448 нм, тогда как незаряженному фенолу соответствует пик поглощения при 384 нм. Для этого перехода pK 8,1. Основываясь на динамике возбужденного состояния GFP, было высказано предположение [45], что GFP дикого типа может существовать в одном из двух основных состояний, A и B, которые отличаются протонированным состоянием хромофора. Реакция переноса протона в возбужденном состоянии быстро переводит форму A в промежуточное состояние I, которое медленно превращается в форму B. Кристаллографические исследования подтверждают наличие двух конформаций в основном состоянии с различными спектральными свойствами [30]. В GFP мутантах с максимумом возбуждения ~ 390 нм фенол Tyr66 незаряжен (что соответствует состоянию A), тогда как в мутантах с максимумом возбуждения при 473 нм он находится в виде заряженного фенолят-иона (состояние B).

Предполагается, что в GFP pH смещает равновесие между основными состояниями A и B. При высоких pH фенолятная форма тирозина предпочтительна, таким образом, состояние B заселяется, при этом возбуждение и флуоресценция сдвигаются к ~ 471 и ~ 500 нм, соответственно. При низких pH становится более предпочтительной фенольная форма (то есть заселяется состояние A), поэтому поглощение сдвигается в область 390 нм. Отсутствие флуоресценции в районе 500 нм при возбуждении светом с длиной волны 390 нм связано или с тушением состояния I, или с невозможностью превращения его в состояние B. Более низкое значение pK ~ 6 для фенол-фенолятного перехода в нативном GFP по сравнению с денатурированным (pK 8,1), возможно, является следствием стабилизации фенолятной формы сетью водородных связей в свернутом белке [65].

Отличное от единицы значение коэффициента Хилла для флуоресцентного титрования Y66H предполагает, что на относительную стабильность двух состояний влияет более чем один титруемый остаток. Механизм pH-чувствительности этого мутанта, возможно, связан с замещением фенольного кислорода Tyr66 молекулой воды [67].

Были также изучены pH-зависимости некоторых мутантов GFP с целью создания внутриклеточных pH-индикаторов [66]. Объектами исследований стали EGFP (Enhanced GFP), ECFP (Enhanced CFP) и EYFP (Enhanced YFP). ECFP был получен из EGFP (F64L/S65T/

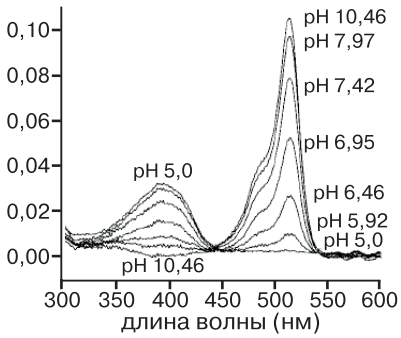


Рис. 8. Спектры поглощения EYFP (по оси абсцисс отложена длина волны в нм, по оси ординат — оптическая плотность) [66].

H231L) путем введения мутаций K26R/Y66W/N146I/M153T/V163A/N164H, а EYFP – путем замен S65G/S72A/T203Y (табл. 4). EYFP показал чувствительность спектров поглощения к pH (рис. 8): повышение кислотности среды приводит к уменьшению длинноволнового максимума поглощения при 514 нм и одновременному увеличению интенсивности коротковолнового максимума при 390 нм. Флуоресценция, которой соответствует максимум 529 нм, и максимум возбуждения (514 нм) уменьшаются при понижении pH, при этом не происходит компенсирующего возрастания возбуждения при 390 нм. Следовательно, форма, поглощающая при 390 нм, не флуоресцирует.

Флуоресценция EGFP также понижается при уменьшении pH. Падение интенсивности флуоресценции при увеличении кислотности среды в случае ECFP было меньше, чем для EGFP и EYFP. Изменения флуоресценции обратимы в диапазоне pH 5–8,5 для всех трех белков. Значения pK и n_H, полученные из анализа кривых титрования EGFP, ECFP и EYFP, приведены в табл. 4.

Было также изучено влияние мутагенеза на pH-чувствительность различных вариантов GFP [61]. Спектры поглощения и флуоресценции S65T и YFP показывают pH зависимость, согласующуюся с данными по родственным вариантам [65, 66]. Чтобы определить влияние определенных окружающих остатков на pK хромофора, авторы изучили ряд мутантов S65T и YFP. His148 связан прямой водородной связью с фенольным концом хромофора в структуре S65T при высо-

Таблица 4.

Значения pK и коэффициенты Хилла (n_H), полученные при анализе кривых титрования некоторых мутантов GFP [66]

Белок	pK	n_H
EGFP (F64L/S65T/H231L)	6,15	0,7
ECFP (F64L/S65T/H231L/K26R/Y66W/N146I/ M153T/V163A/N164H)	6,4	0,6
EYFP (F64L/S65T/H231L/S65G/S72A/T203Y)	7,1	1,1

Таблица 5.
Значения pK для некоторых мутантов GFP [61]

Мутант GFP	pK	
	по поглощению	по флуоресценции
S65T	5,95 ± 0,02	6,04 ± 0,01
S65T/H148D	7,95 ± 0,02	7,75 ± 0,02
YFP (T203Y/S65G/V68L/S72A)	7,00 ± 0,03	6,95 ± 0,03
YFP H148Q	7,58 ± 0,02	7,46 ± 0,03
YFP H148G	8,02 ± 0,01	7,93 ± 0,04
YFP E222Q	6,77 ± 0,02	6,95 ± 0,03

ком pH и в YFP и составляет барьер между хромофором и объемом растворителя (рис. 3). В GFP S65T His148 был заменен аспарагиновой кислотой, чтобы ввести потенциальный отрицательный заряд вблизи хромофора. В YFP His148 заменили на глутамин, чтобы устранить титруемую группу, и на глицин, чтобы сделать хромофор доступным растворителю. Кроме того, Glu222 была заменена Gln, поскольку боковая цепь Glu222 образует водородную связь с азотом гетероциклического кольца хромофора в YFP. Константы ионизации, определенные по поглощению и флуоресценции оказались практически совпадающими (табл. 5), свидетельствуя о том, что квантовый выход флуоресценции не зависит от pH. Во всех случаях зависимость интенсивности поглощения низкоэнергетической полосы от pH хорошо аппроксимируется теоретической кривой, описывающей титрование единственной группы.

S65T/H148D имеет почти на две единицы большее значение pK по сравнению с S65T (табл. 5), такой сдвиг, вероятно, объясняется близостью отрицательно заряженного остатка к гидроксильной группе хромофора. Изобестическая точка очень четко проявляется для YFP и YFP E222Q, однако не для мутантов YFP H148Q и H148G. Это указывает на то, что во втором случае одновременно протекают несколько процессов. Поэтому для YFP H148Q и H148G величины pK, приведенные в табл. 5, должны рассматриваться только как оценочные. Предполагается, что Gln148 может быть погружен в растворитель, так что хромофор только частично им защищен. Такая частичная экспозиция во внешний растворитель может объяснить более высокое значение pK для H148Q, близкое к значению для H148G, модель кристаллической структуры которого ясно показывает, что хромофор доступен растворителю [51].

Таким образом, pH-чувствительность флуоресцирующих белков варьирует в широком диапазоне при введении различных точечных мутаций.

ВЛИЯНИЕ pH НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ХРОМОПЕПТИДОВ GFP

Для понимания процессов, протекающих в цветных белках при изменении pH, важно знать, что происходит с самим хромофором и каково влияние белкового окружения на спектральные свойства хромофора. Исторически первым возник вопрос о природе хромофора GFP из *A. victoria* и GFP из *Renilla*, поскольку эти белки обладают разными спектральными свойствами и по-разному реагируют на изменение pH [15, 19]. Сущность этого вопроса заключалась в том, является ли такая разница в спектральных свойствах следствием белкового окружения одинаковых хромофоров, или в GFP из *A. victoria* и *Renilla* образуются разные по структуре хромофоры. В спектре поглощения нативного GFP из *Renilla* при pH 8 наблюдается интенсивный максимум при 498 нм ($\varepsilon = 2{,}7 \cdot 10^5$ $M^{-1}см^{-1}$) и колебательное плечо в районе 470 нм. Спектр же поглощения GFP из *A. victoria* при pH 8 значительно отличается: главный максимум расположен в более коротковолновой области при 393 нм, а минорный максимум — при 473 нм. Таким образом, максимум поглощения GFP из *A. victoria* более чем на 100 нм сдвинут в синюю область по сравнению с главной полосой поглощения GFP из *Renilla*. Несмотря на значительные различия как в спектрах поглощения, так и в аминокислотном составе и молекулярной массе, эти белки имеют очень похожие спектры флуоресценции (λ_{max} 509 нм при pH 8) и практически одинаковый квантовый выход, равный 0,8 [8, 9].

При денатурации оба белка теряют флуоресценцию. Независимо от метода денатурации результирующие комплексы белок–хромофор или пептид–хромофор практически бесцветны в разбавленной кислоте, но окрашены в ярко-желтый цвет в разбавленной щелочи. Хромофор стабилен и остается связанным с белком даже при диализе или гель-фильтрации денатурированного белка [54]. Спектрофотометрическое титрование денатурированного гуанидин гидрохлоридом GFP из *Renilla* и *A. victoria* показало идентичность их спектрофотометрических параметров (при pH 6,6 λ_{max} = 383–384 нм, при pH 10,8 λ_{max} = 447–448 нм; изобестическая точка при 405 нм, pK 8,1). Переход между двумя формами с максимумами поглощения 383 нм (при pH 6,6) и 447 нм (при pH 10,8) характеризуется одной четкой изобестической точкой при 405 нм, что предполагает наличие одной группы в денатурированном белке, которая может находиться в одной из двух протонированных форм и оказывает влияние на спектральные характеристики; pK для этой группы примерно равно 8,1. Анализ спектральных свойств пептидных фрагментов, полученных при обработке GFP проназой после предварительной денатурации при нагре-

вании, показал, что спектральные свойства обоих фрагментов одинаковы и совпадают с полученными для денатурированных гуанидин гидрохлоридом белков. Эти данные свидетельствуют в пользу химической идентичности структур хромофоров GFP из *Renilla* и GFP из *A. victoria* [54].

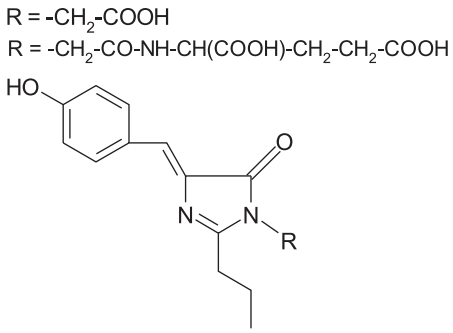


Рис. 9. Модельные синтетические хромофоры [21].

Предпринимались многочисленные попытки моделировать хромофор и исследовать его спектральные свойства без влияния на них белкового окружения. Для этого ряд авторов синтезировали различные модельные соединения и сравнивали их свойства со свойствами белков и выделенных из них хромопептидов.

Были рассмотрены два синтетических модельных хромофора (рис. 9), свойства которых сравнивали с хромофор содержащим гексапептидом, выделенным из GFP *A. victoria* при его расщеплении папаином [21]. Этот пептид имеет аналогичные описанным выше спектральные характеристики (максимум поглощения 380 нм при pH 4 и 445 нм при pH 11, изобестическая точка в районе 405 нм). Спектры поглощения модельных соединений оказались похожими, но не идентичными спектрам хромопептида. При pH 12 эти соединения имеют максимум поглощения при 430 нм, а в кислом растворе (pH 3–7,5) — при 370 нм, что достаточно сильно отличается от свойств пептида. В диапазоне pH 1–3 и нативный и синтетический хромофор имеют максимум поглощения вблизи 380 нм, однако в случае модельного соединения положение максимума pH-зависимо: он сдвигается в красную область при понижении pH. Только при pH 2 максимум поглощения модельного хромофора совпадает с нативным хромофором (380 нм), а при более высоких значениях pH он сдвинут по отношению к нему в синюю область.

Авторы [21] заключили, таким образом, что, основываясь только на простом сравнении спектральных характеристик модельного соединения и нативного хромофора, нельзя сделать вывод о структуре последнего.

Далее была предпринята попытка прояснить химический механизм возникновения флуоресценции в GFP, для чего авторы изучили свойства большого пептидного фрагмента GFP из *A. victoria*, содержащего хромофор, и синтетического соединения, моделирующего

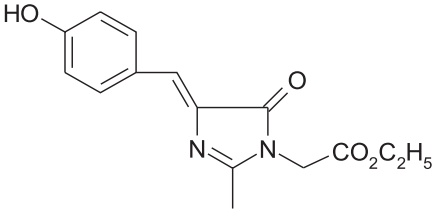


Рис. 10. Синтетический модельный хромофор [55].

хромофор (рис. 10). Исследуемый пептидный фрагмент состоит из шести аминокислотных остатков: Thr63-Phe64-Ser65-Tyr66-Gly67-Val68-Gln69. Его спектральное поведение аналогично поведению самого белка в растворах с экстремальными значениями pH (0,1 M HCl и 0,1 M NaOH), на основании чего был сделан вывод о неповрежденности ковалентной структуры хромофора при обработке белка протеазой, а также о том, что структуры хромофоров в пептиде и белке похожи [55]. Сходство структуры модельного соединения и хромофора GFP наблюдается при сравнении соответствующих спектров поглощения. За исключением поглощения, вызванного ароматическими аминокислотными остатками в гексапептиде GFP, максимумы поглощения и формы кривых для пептида и модельного соединения при низких и высоких pH хорошо соответствуют друг другу: 382 и 447 нм для пептида, 376 и 443 нм для модельного хромофора. Эти значения близки к полученным при таких же условиях максимумам поглощения нативного GFP (382 и 447 нм) [54].

Исследования зависимости спектров модельного соединения от полярности растворителя показали, что с ее увеличением положение максимума поглощения, наблюдаемого при высоких pH, сдвигается в сторону коротких длин волн (443 нм в 2-пропаноле и 425 нм в воде), а положение максимума в кислом растворе практически не изменяется. Это может быть связано с лучшей стабилизацией в полярном растворителе основного фенолятного состояния по сравнению с возбужденным. Таким образом, спектральные характеристики чувствительны к микроокружению, особенно в случае анионной формы хромофора [55]. На основании этих данных можно сделать следующие выводы: химические структуры хромофора GFP и модельного соединения весьма сходны, если не идентичны, а микроокружение хромофора в GFP напоминает 2-пропанол, то есть оно неполярно [55]. Флуоресцентные свойства гексапептида GFP и модельного хромофора также аналогичны: при комнатной температуре флуоресценция не наблюдается в случае пептида и имеет очень низкий квантовый выход (<0,0001) в случае синтетического соединения во всех изученных водно-органических растворителях при любых pH. Однако при охлаждении до температуры жидкого азота оба соединения сильно флуоресцируют с максимумом в районе 435–437 нм в сильно

кислом растворе и в районе 475–490 нм в сильно щелочном, при этом их спектры похожи. Сравнение положения данных максимумов флуоресценции с характерным для нативного белка (509 нм) позволяет предполагать, что ответственным за излучение нативного белка является синглетное возбужденное состояние анионной формы хромофора [55]. Отсутствие флуоресценции хромопептида и модельного хромофора при комнатной температуре, наиболее вероятно, связано с конкуренцией между процессом цис-транс изомеризации экзо-метиленовой двойной связи в возбужденном состоянии и флуоресценцией [56, 57]. При 77 K такая изомеризация замедлена, и флуоресценция становится преобладающим процессом перехода из возбужденного состояния в основное.

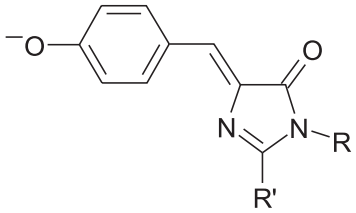


Рис. 11. Структура хромофора в газовой фазе, рассмотренная в [68], R = R' = CH_3.

Изучение хромофора GFP в растворе [55] показало, таким образом, чувствительность его спектральных характеристик к микроокружению, поэтому, чтобы понять истинные свойства несольватированного хромофора и оценить роль белка, был получен экспериментальный спектр поглощения аниона хромофора GFP в вакууме, или, более точно, в сильно разреженном газе [68]. В качестве хромофора было рассмотрено модельное соединение, приведенное на рис. 11, где группам R и R' соответствуют метильные группы (чтобы уловить сущность структуры хромофора GFP).

Спектр поглощения анионной формы хромофора в газовой фазе показал, что максимум полосы поглощения расположен при 479 нм, а время жизни аниона в возбужденном состоянии составило примерно 100 мс. Между полосой поглощения газообразного аниона (479 нм) и второй полосой поглощения белка (477 нм) наблюдается большое сходство. Это дало основание заключить, что действительное окружение хромофора внутри белка гораздо больше напоминает вакуум, нежели растворитель, и вторая полоса в спектре белка наблюдается действительно благодаря поглощению анионной формы хромофора [68]. Другими словами, распределение электронной плотности в хромофоре GFP из *A. victoria* соответствует таковому в газофазном анионе (рис. 11). Это, однако, не отрицает влияние белкового окружения на фотофизику хромофора. Основное (невозбужденное) состояние хромофора определяется его локальным окружением, а именно наличием доноров и акцепторов протона, что объясняет, почему фотофизические свойства хромофора могут значительно варьировать

у разных белков и их мутантов. Для спектров поглощения данного модельного хромофора (рис. 11) в воде свойственна сильная зависимость от pH, что свидетельствует о больших изменениях в делокализации электрона [68]. При pH < 1 максимум находится при 396 нм (что практически совпадает с основным максимумом поглощения нативного GFP в нейтральном растворе), при pH 7 максимум сдвигается до 370 нм, а при pH 13 — до 426 нм. При денатурации белка дикого типа в сильно щелочном растворе его максимум поглощения смещается от 477 нм до 448 нм [54], аналогично максимум поглощения модельного хромофора претерпевает сдвиг от 479 нм в газе до 426 нм в растворе щелочи. Таким образом, нативный белок обеспечивает близкое к вакууму окружение хромофора, тогда как при денатурации белка хромофор экспонируется в растворитель. Модельный хромофор при перенесении из вакуума в объем растворителя претерпевает все же больший синий сдвиг, чем хромофор GFP при денатурации белка. Это может быть связано с тем, что модельный хромофор в растворе сильнее экспонирован в растворитель, тогда как хромофор в денатурированном GFP все еще ковалентно связан с белком. На основании своей работы авторы [68] сделали вывод, что точное положение полосы поглощения анионной формы хромофора GFP почти полностью объясняется химическими свойствами самого хромофора, а не взаимодействием его с боковыми группами аминокислот белка.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТОНИРОВАННЫХ СОСТОЯНИЙ ХРОМОФОРА GFP

Многочисленные исследования показали, что на спектры поглощения и флуоресценции GFP существенно влияют возникновение протонированных состояний при возбуждении хромофора и полярность его окружения. Однако то, какие именно состояния ответственны за наблюдаемые спектральные свойства и что происходит с хромофором при изменении pH, до сих пор не выяснено. Во многих работах авторы предпринимали попытки прояснить эту ситуацию, пользуясь различными методами, например, с помощью квантово-химических расчетов [69, 70, 71], исследуя спектры комбинационного рассеяния света [63] и изучая кристаллическую структуру белка при различных pH [61].

Теоретические расчеты

В работе [70] были рассчитаны спектры поглощения возможных протонированных состояний модельного хромофора GFP в газовой фазе и в полярном растворе (этаноле), которые могут быть использованы для интерпретации экспериментально полученных спектров

интактных белков (рис. 12): анион $(O_Y,N,O_X)^-$, нейтральные формы (HO_Y,N,O_X) и (O_Y,N,HO_X), цвиттер-ион (O_Y^-,HN^+,O_X), катионы $(HO_Y,HN,O_X)^+$, $(O_Y,HN,HO_X)^+$ и $(HO_Y,N,HO_X)^+$ и дикатион $(HO_Y,HN,HO_X)^{2+}$ (фенольный атом кислорода O_Y, карбоксильный кислородный центр O_X и атом азота имидазолидонового кольца N являются возможными сайтами протонирования).

По данным [69] в первом синглетном возбужденном состоянии существует низкий активационный барьер вращения вокруг экзоциклической двойной C=C связи, и, следовательно, возможна цис-транс фотоизомеризация хромофора. Поэтому авторы [70] представили также расчеты для нескольких транс-конфигураций хромофора, чтобы оценить различие в спектральных свойствах цис- и транс-изомеров. Результаты этих расчетов предполагают отсутствие значительных вариаций экспериментальных спектров из-за фотоизомеризации хромофора. Сравнивая общие энергии цис- и транс- конфигураций аниона, можно заключить, что в этаноле (так же как и в газовой фазе) цис-изомер более стабилен (на 0,6 ккал/моль), чем транс-изомер. Аналогичные результаты были также получены для нейтральной формы (HO_Y,N,O_X) (в этом случае транс-изомер лежит выше по энергии на 1,1 ккал/моль). По этой причине при всех последующих расчетах рассматривалась только цис-конфигурация хромофора, показанная на рис. 12 [70].

В щелочных условиях хромофор существует, в основном, в виде сольватированного аниона $(O_Y,N,O_X)^-$. Согласно расчетам, несольватированный анион должен поглощать при 460 нм, тогда как в этаноле он поглощает при 434 нм. Этот результат согласуется с экспериментами [55], которые показали, что с увеличением полярности растворителя максимум поглощения сдвигается в область коротких длин волн. Максимум поглощения анионного хромофора в воде расположен при 428 нм [63], увеличение синего сдвига спектра

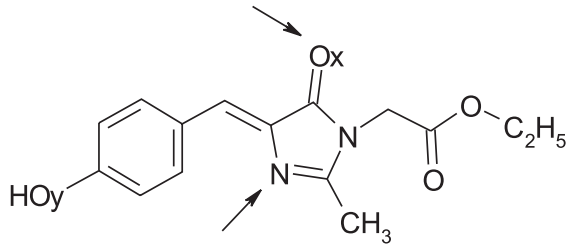


Рис. 12. Модельный хромофор (этил-4-(4-гидроксифенил)метилиден-2-метил-5-оксо-1-имидазолацетат), рассмотренный в [70], O_Y, N, O_X — возможные сайты протонирования.

поглощения соответствует более полярному окружению по сравнению с этанолом.

В нейтральных условиях предполагается, что хромофор находится в форме (HO_Y,N,O_X). Согласно расчетам, энергия поглощения (HO_Y,N,O_X) остается почти неизменной при сольватировании хромофора, что полностью согласуется с экспериментальными данными: в этаноле максимум поглощения наблюдаеся при 372 нм, в этиленгликоле при 374 нм, а в глицерине при 376 нм [70]. Кроме (HO_Y,N,O_X) заслуживают обсуждения два других протонированных состояния сольватированного хромофора: цвиттер-ион (O_Y^-,HN^+,O_X) и хиноидная форма (O_Y,N,HO_X). Согласно расчетам, наиболее стабильной формой в этанольном растворе является (HO_Y,N,O_X), тогда как для (O_Y^-,HN^+,O_X) и (O_Y,N,HO_X) уровни энергии расположены выше на 15,0 и 20,2 ккал/моль, соответственно. Следовательно, последние два состояния вряд ли могут быть обнаружены в этанольном растворе. Это подтверждается экспериментальными данными: титрование от анионной до нейтральной формы показывает хорошо определяемую изобестическую точку в районе 398 нм. Таким образом, можно предположить, что протонирование происходит только по одному центру хромофора.

Специфические электростатические взаимодействия хромофора с белковой матрицей GFP могут значительно изменить относительную стабильность протонированных состояний; с этой точки зрения представляют интерес спектральные свойства (O_Y^-,HN^+,O_X) и (O_Y,N,HO_X). По расчетам максимум возбуждения цвиттер-иона в этаноле должен быть расположен при 444 нм, тогда как у хиноидной формы — при 424 нм. Принимая во внимание тот факт, что положение экспериментального максимума (372 нм) сильно отличается от положения рассчитанных максимумов для цвиттер-ионной и хиноидной форм, но довольно близко к теоретически рассчитанному (362 нм) для (HO_Y,N,O_X), авторы [70] предположили, что при нейтральных условиях сольватированный хромофор GFP существует в виде (HO_Y,N,O_X). Следует отметить также, что согласно расчетам, и цвиттер-ионная (O_Y^-,HN^+,O_X) и хиноидная (O_Y,N,HO_X) формы претерпевают существенные сдвиги спектра поглощения при изменении полярности растворителя, а экспериментальные данные свидетельствуют о практическом отсутствии сольватохромного эффекта в нейтральных растворах. Таким образом, данные по относительной стабильности нейтральной формы, сравнение рассчитанных и измеренных энергий поглощения позволяют сделать вывод, что (HO_Y,N,O_X) отвечает за поглощение хромофора при нейтральных условиях [70].

Катионные формы хромофора. Принимая во внимание основность имидазольного кольца, можно ожидать, что в растворе в кислых условиях образуется катион $(HO_Y,HN,O_X)^+$ [55, 63, 71]. В связи с этим авторы [70] рассмотрели две дополнительные катионные структуры $(O_Y,HN,HO_X)^+$ и $(HO_Y,N,HO_X)^+$. При титровании из нейтральной в кислую область наблюдается хорошо определимая изобестическая точка в районе 384 нм. Следовательно, можно предположить, что в растворе образуется только одна катионная форма. Максимум поглощения катионной формы наблюдается при 406 нм. Расчеты предсказывают, что катион $(HO_Y,HN,O_X)^+$ должен характеризоваться самой низкой энергией, как в газовой фазе, так и в этаноле. Сольватированные катионы $(O_Y,HN,HO_X)^+$ и $(HO_Y,N,HO_X)^+$ лежат значительно выше по энергии (на 9,2 и 9,8 ккал/моль, соответственно) и, следовательно, не должны наблюдаться. На этом основании был сделан вывод, что за максимум поглощения при 406 нм отвечает катион $(HO_Y,HN,O_X)^+$. Дополнительным доказательством служит также обнаруженный для хромофора GFP сольватохромный эффект в кислом растворе, проявляющийся по синему сдвигу при повышении полярности растворителя. Аналогичный синий сдвиг предсказан для катиона $(HO_Y,HN,O_X)^+$, в то время как хиноидная форма $(O_Y,HN,HO_X)^+$ характеризуется красным сдвигом [70].

В то же время следует отметить, что рассчитанные и экспериментальные значения энергии поглощения (364 и 406 нм, соответственно) для $(HO_Y,HN,O_X)^+$ в этанольном растворе существенно различаются. Это, вероятно, обусловлено наличием сильной водородной связи между карбонильным кислородом O_X хромофора и протонированными молекулами этанола. Ранее было показано, что поглощение хромофора очень чувствительно к положению протонов внутримолекулярных водородных связей [72]. Поэтому сольватированный дикатион $(HO_Y,HN,HO_X)^{2+}$ можно рассматривать в качестве граничного случая этого специфического взаимодействия. Эта система соответствует ситуации, когда протон внутри сильной водородной связи [O_X····H^+····этанол] сдвинут к центру O_X хромофора. По расчетам максимум поглощения сольватированного дикатиона должен быть расположен при 413 нм [70], а спектр не очень чувствителен к окружению. Сравнивая рассчитанные энергии возбуждения для $(HO_Y,HN,O_X)^+$ и $(HO_Y,HN,HO_X)^{2+}$, 3,41 и 3,00 эВ, соответственно, с экспериментально найденным значением 3,05 эВ, авторы делают вывод, что центр O_X в хромофоре частично протонирован благодаря образованию сильных водородных связей с его окружением. На основании всех этих данных можно сделать вывод, что эффект сольватации оказывает сильное влияние на электронные спектры

хромофора GFP, приводя к красным или синим сдвигам поглощения для разных протонированных состояний хромофора [70].

Другими авторами также была предпринята попытка теоретического предсказания поведения хромофора GFP при изменении кислотности среды [71]. Чтобы понять структурную основу наблюдаемых спектров поглощения и флуоресценции GFP, были исследованы все возможные центры протонирования хромофора денатурированного GFP при различных pH методами расчетов *ab initio* и рассчитаны теоретические значения pK для всех возможных сайтов протонирования хромофора в денатурированных GFP.

Согласно расчетам, при pH выше 9,4 хромофор денатурированных GFP существует в анионной форме (6) (рис. 13). Расчеты спектра поглощения с использованием метода ZINDO показали, что в присутствии молекул воды максимум поглощения (6) должен располагаться при 456 нм. Эти результаты согласуются с сообщением, что денатурированный в присутствии гуанидина GFP *A. victoria* при pH 10,8 поглощает при 448 нм [54]. В диапазоне pH 1,1–9,4, согласно расчетам, хромофор существует главным образом в виде нейтральной фенольной формы (1) и цвиттер-ионной формы (3), которые находятся в равновесии. Расчеты спектров поглощения (1) и (3) методом ZINDO показали, что в присутствии молекул воды максимум поглощения при 398 нм должен принадлежать соединению (3). Этот результат также согласуется с тем, что денатурированный GFP при pH 6,6 поглощает в районе 384 нм. При pH 8,8 (среднее между pK 8,2 для (1) и pK 9,4 для (3)) в соответствии с расчетами замещенный хромофор существует в виде нейтральной фенольной формы (1), цвиттер-ионной формы (3) и анионной формы (6), и поглощает одинаково при 355 и 456 нм. При pH в диапазоне от -3,2 до 1,1 хромофор главным образом существует в виде катионной фенольной формы (5). При pH меньше, чем -3,2 хромофор существует в виде катионной хиноидной формы (4).

Таким образом, на основании изложенных данных хромофор денатурированного GFP в диапазоне pH от -3,2 до 9,4 существует в пяти различных протонированных состояниях: при pH выше 9,4 – в виде анионной формы (6), при pH в диапазоне от -3,2 до 1,1 – в виде катионной фенольной формы (5), а при pH ниже -3,2 – в виде катионной хиноидной формы (4) [71]. Результаты, приведенные здесь, показывают несостоятельность гипотезы о том, что за поглощение при 397 нм в интактном GFP ответственна катионная фенольная форма (5) [72]. Согласно предсказанным pK, катионная форма существует при pH 1,1 и ниже; при этих условиях белок может денатурировать, и только в том случае, если белковое окружение GFP приведет к зна-

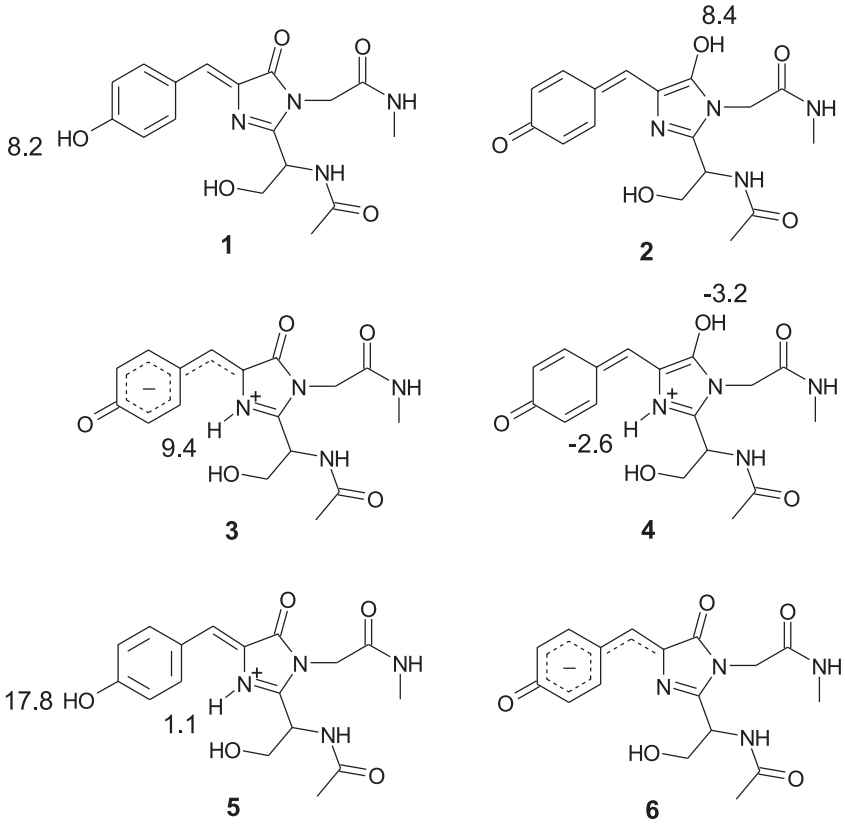


Рис. 13. Различные протонированные состояния замещенного хромофора GFP (цифры соответствуют рассчитанным значениям pK соответствующих групп) [71].

чительному увеличению pK атома азота имидазолидонового кольца хромофора, катионная фенольная форма (5) будет наблюдаться.

Очевидно, что различные методы расчета приводят к разным результатам, часто противоречащим друг другу. Поэтому более надежными являются экспериментально полученные данные, которые, в свою очередь, позволяют оценить достоверность теоретических расчетов.

Экспериментальные данные

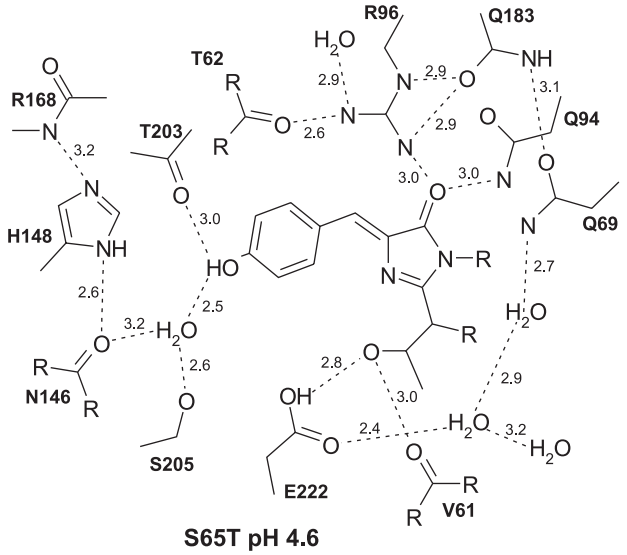
Для выяснения структурной основы зависимости свойств мутанта GFP S65T от pH были определены кристаллические структуры S65T при pH 8,0 и при pH 4,6 с разрешением 2,0 и 2,25 Å, соответственно.

Результаты исследований свидетельствуют о существовании обратимых изменений характера водородных связей внутри хромофора [61]. Данные рентгенограммы S65T при низком и высоком pH показывают структурные изменения, связанные с титрованием только фенольного гидроксила. При pH 8,0 боковая группа Thr203, так же как и His148, напрямую связана водородной связью с фенолятом хромофора. При понижении pH до 4,6, обе боковые группы Thr203 и имидазольного кольца His148 уходят от хромофора, и фенольный гидроксил связан водородной связью с карбонильным кислородом Thr203 и молекулой воды, что согласуется с протонированием фенольного конца хромофора в этом состоянии (рис. 14). Доказательства титрования второй группы хромофора, такой как азот имидазолидонового кольца, отсутствуют: в полости вблизи этого азота не наблюдается каких бы то ни было перестановок. В частности, карбоксилат Glu222 находится в одинаковом положении в структуре при pH 4,6 и при pH 8,0.

Представленные сведения согласуются со значением pK < 5 для азота имидазолидонового кольца. Это подтверждает выводы, сделанные в [55] на основе экспериментального изучения хромофора в растворе, но противоречит результатам теоретических расчетов, согласно которым этот азот протонирован [72]. Результаты кристаллографических исследований соответствуют модели, в которой основное состояние хромофора S65T определяется pH-зависимым равновесием между нейтральной и анионной формами, а азот гетероциклического кольца депротонирован. pK гетероциклического азота хромофора и pK соседней Glu222, по-видимому, подвергаются возмущению в S65T, для того чтобы поддержать нейтральность этих групп, в отличие от белка дикого типа, где Glu222, по-видимому, находится в виде аниона [30].

Для изучения структуры основного состояния хромофора GFP была использована спектроскопия комбинационного рассеяния света (рамановская спектроскопия), поскольку положение рамановских полос определяется исключительно структурой молекулы в основном состоянии, в отличие от спектральных характеристик поглощения и флуоресценции, которые определяют различия между уровнями энергии в основном и возбужденном состояниях [63]. В работе сопоставляются экспериментальные спектры с использованием возбуждения при 752 нм для GFP дикого типа и для мутанта S65T этого белка и по модельному хромофору, структура которого приведена на рис. 12.

Как обсуждалось выше, хромофор мутанта S65T в нейтральных растворах представляет собой анион, поэтому он был использован



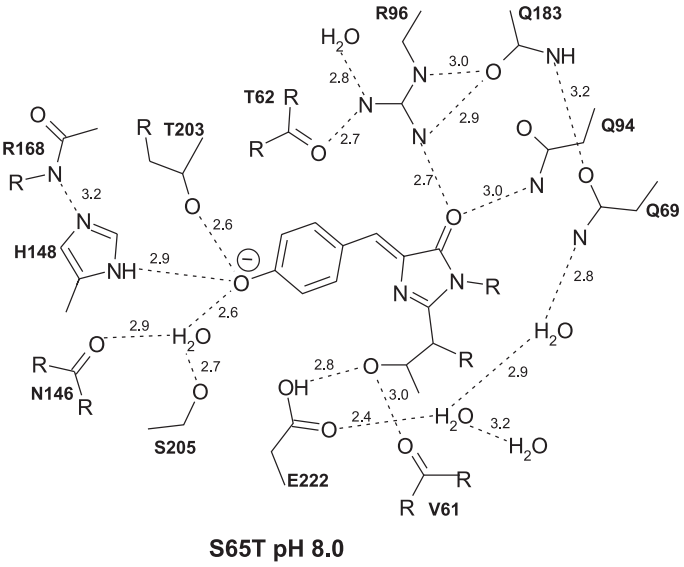


Рис. 14. Схематическая диаграмма, показывающая окружение хромофора в S65T при pH 4,6 и 8,0 [61].

для получения спектра комбинационного рассеяния света, характерного для анионной формы хромофора в полностью свернутом белке. Полосы комбинационного рассеяния катионной, нейтральной и анионной форм самого хромофора были заданы на основе спектров, полученных для модельного соединения.

В диапазоне pH 1–14 спектры поглощения выявляют 3 различные формы модельного хромофора, соответствующие различным протонированным состояниям. Эти три формы имеют характеристические максимумы поглощения при 393, 368 и 428 нм и соответствуют катионной, нейтральной и анионной формам модельного хромофора. Маловероятно, что спектр поглощения нейтральной формы с максимумом при 368 нм соответствует цвиттер-ионной форме, так как спектр поглощения и спектр комбинационного рассеяния света для 4-метокси-производного модельного хромофора практически идентичны 4-гидрокси-производному. Тот факт, что цвиттер-ионная форма недоступна для 4-метокси-производного и что значения pK не изменяются значительно при замещении фенольной группы, подтверждает, что цвиттер-ионная форма не присутствует в значительных количествах в модельном хромофоре [63].

Макроскопические pK 1,8 ± 0,1 и 8,2 ± 0,1, описывающие ионизацию модельного хромофора, были определены по данным спектрофотометрического титрования. Основываясь на предположении об отсутствии цвиттер-ионной формы, pK 1,8 было приписано азоту имидазолидонового кольца, pK 8,2 – фенольному кислороду. pK фенольного кислорода в модельном хромофоре очень близко к значению 8,1 для денатурированного белка дикого типа. Интересно, что максимум поглощения катионной формы модельного хромофора (393 нм) совпадает с максимумом поглощения нейтральной формы GFP дикого типа (395 нм) [33], что может означать важность этой формы для белков GFP.

Сравнение рамановских спектров для модельного хромофора с данными по GFP дикого типа и S65T мутанту показывает, что значительное большинство полос может быть с уверенностью отнесено к хромофору и лишь некоторые из них (меньше 1500 см$^{-1}$) появляются за счет белкового окружения. Рамановские спектры нейтральной и анионной форм модельного хромофора соотносятся очень хорошо со спектрами S65T при pH 5,0 и при pH 8,0, соответственно. Рамановский спектр GFP дикого типа похож на спектр нейтральной формы модельного хромофора и нейтральной формы S65T. Это показывает, что ни катионная, ни цвиттер-ионная формы хромофора не представлены в белках GFP [63].

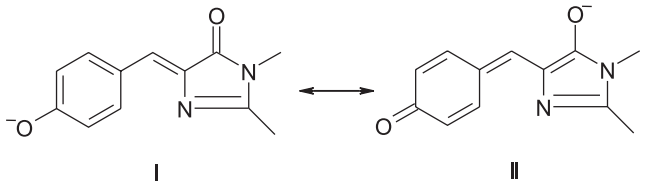


Рис. 15. Резонансные структуры модельного хромофора: I – бензоидная, II – хиноидная [63].

Сравнение рамановских спектров модельного хромофора в разных растворителях показало, что структура основного состояния анионной формы зависит от окружения, а нейтральной формы – нет [63]. Это связано, по мнению авторов, с наличием для анионной формы бензоидной (I) и хиноидной (II) резонансных структур (рис. 15).

Для нейтральной формы хромофора белковое окружение, по-видимому, оказывает меньшее влияние на структуру основного состояния, что подтверждается сходством соответствующих спектров комбинационного рассеяния света. Это наблюдение можно легко объяснить, поскольку в отличие от анионной формы резонансные структуры нейтральной формы хромофора не так легко доступны. На основе данных спектроскопии комбинационного рассеяния света можно сделать выводы о характере влияния белкового окружения на поглощение и флуоресценцию хромофоров. Ясно, что изменение структуры основного состояния должно приводить к изменению положения максимума поглощения, и этого можно достичь различными путями. Одним из важных факторов может служить водородная связь между карбонильным кислородом имидазолидона и гуанидиновой боковой группой Arg96. Усиление этой водородной связи приводит к смещению электронной плотности от карбонильного кислорода и стабилизирует образование частичного отрицательного заряда в этом положении, то есть стабилизирует хиноидную резонансную структуру II (рис. 15). Данные по кристаллической структуре нейтральной и анионной форм S65T мутанта [61] показывают уменьшение длины этой водородной связи с 3,0 до 2,7 Å при ионизации хромофора, что отчасти подтверждает более хиноидный характер анионной формы хромофора по сравнению с нейтральной.

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о существовании в нативных белках только нейтральной и ионной структур хромофора. Эти данные не подтверждают, а скорее опровергают наличие катионных и цвиттер-ионных форм хромофора в нативном белке, во всяком случае, в том диапазоне значений pH, в котором белок сохраняет свою структуру.

IV. АНАЛОГИ GFP. КРАСНЫЙ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЙ БЕЛОК drFP583

В настоящее время известно достаточно много цветных флуоресцирующих белков, гомологичных GFP из *A. victoria*. Так, в 1999 году было выделено и клонировано шесть новых флуоресцирующих белков [73], два из которых значительно отличались от GFP по спектральным свойствам, обнаруживая флуоресценцию в желтой и красной области спектра. Наиболее интересными из новых белков являются желтый (zFP538) и красный (drFP583) — белки, выделенные из кораллов рода *Zoanthus* и *Discosoma*, соответственно. Новые цветные белки имеют форму, аналогичную β-бочонку (впервые обнаруженную для GFP), что подтверждено рентгеноструктурными данными для drFP583 [74, 75]. Это послужило основой для сравнительного анализа структурных характеристик, важных для появления флуоресценции. Сравнение аминокислотного состава показало, что эти белки имеют только 20–30% общей с GFP последовательности. При этом структура бочонка из β-листов в целом одинакова, так как ключевые моменты вторичной структуры GFP сохраняются и для новых белков. Так, например, в высшей степени консервативны участки, образующие «дно» и «крышку» бочонка.

К настоящему времени красный белок, drFP583 (или DsRed) довольно хорошо изучен, поскольку он представляет особый интерес в связи со смещением спектров в длинноволновую область. Максимум флуоресценции этого белка смещен до 583 нм (для GFP это 509 нм, у известных мутантов GFP наибольшее значение 529 нм). Сильное смещение спектра флуоресценции в красную область уменьшает проблемы, связанные с существованием фоновой флуоресценции биологических тканей. По своим спектральным характеристикам drFP583 является хорошим акцептором при индуктивно-резонансном переносе энергии от донора GFP. Введение нового красного цвета флуоресценции в палитру уже используемых цветов (зеленого, желтого, голубого) расширяет возможности многоцветных измерений с использованием одновременно нескольких цветных белков в качестве флуоресцентных меток.

СТРУКТУРА ХРОМОФОРА drFP583

Выяснение структуры и механизма образования хромофора является одним из наиболее важных вопросов в изучении красного белка. drFP583 характеризуется сложной и медленной кинетикой созревания, которое проходит через промежуточное образование зеленого интермедиата с максимумами возбуждения и флуоресценции (475 и 500 нм, соответственно) [76] близкими к максимумам GFP. Развитие

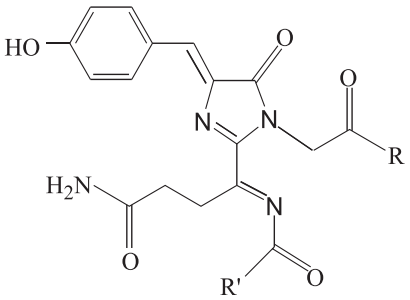


Рис. 16. Структура хромофора drFP583 [77].

красной флуоресценции в drFP583 происходит спустя несколько дней после синтеза белка, тогда как созревание GFP протекает за несколько часов [33]. На основании сопоставления первичных аминокислотных последовательностей drFP583 и GFP предположили, что структура ГБИ (рис. 2), составляющая хромофор GFP, также присутствует и в хромофоре красного белка [73]. Во внутримолекулярной циклизации в drFP583 также участвуют три аминокислотных остатка: Gln66, Tyr67 и Gly68 [73], соответствующими остатками в GFP являются Ser65, Tyr66 и Gly67. Остается невыясненным, что обеспечивает удивительное отличие спектральных свойств и значительный сдвиг в красную область флуоресценции и поглощения drFP583. Возможно, это совершенно иной механизм внутримолекулярной циклизации или дополнительные реакции, протекающие уже после образования общей для GFP и drFP583 структуры ГБИ.

На основании сравнительного анализа масс-спектров двух хромопептидов, выделенных из drFP583 дикого типа и его мутанта K83R, была предложена структура хромофора drFP583 (рис. 16) [77]. Мутант K83R в процессе созревания останавливается на стадии зеленого интермедиата [78], и для него предполагается структура хромофора, аналогичная структуре GFP (ГБИ) (рис. 2).

Было обнаружено, что часть молекул хромопептида, выделенного из drFP583 после обработки лизилэндопептидазой, имеет массу на 2 Да меньше по сравнению с пептидом, полученным из мутанта K83R в результате такой же обработки [77]. Предположили, что это уменьшение происходит за счет реакции дегидрирования связи C_α–N Gln66 с образованием ацилиминной группировки в положении 2 имидазолидона (рис. 17). Дополнительная стадия дегидрирования приводит к увеличению системы сопряженных π-связей 4-(п-гидроксибензилиден)имидазолид-5-она за счет включения в сопряжение двойной связи –C = N–.

Квантово-механические расчеты подтвердили, что увеличение системы сопряженных π-связей хромофора достаточно для сдвига в красную область поглощения и флуоресценции drFP583 [77].

Предложенный механизм образования хромофора (рис. 17) объясняет исчезновение красного сдвига drFP583 при денатурации. Спектр поглощения красного белка, денатурированного действием диметил-

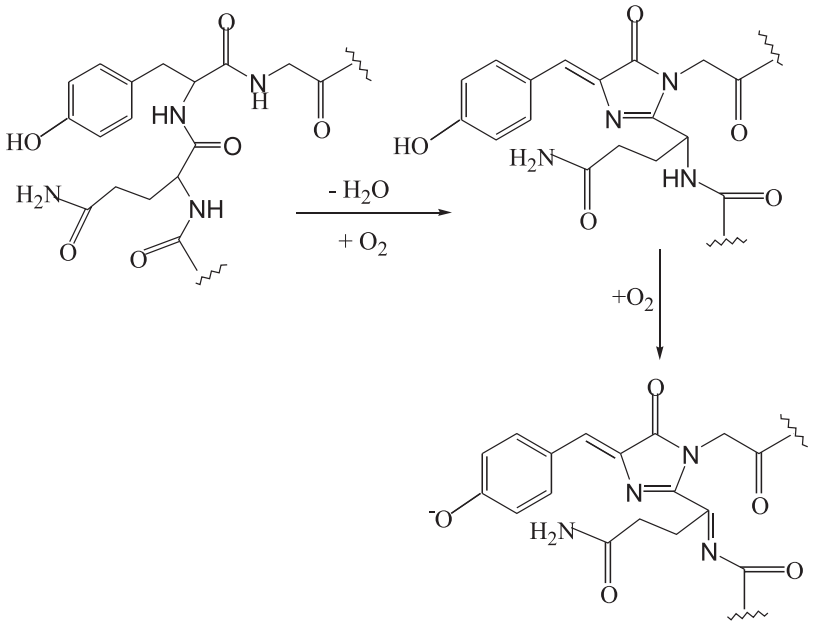


Рис. 17. Механизм образования хромофора drFP583 [77].

сульфоксида или сильнощелочным pH (выше 12), близок к спектру поглощения EGFP (мутант GFP F64L/S65T), денатурированного в таких же условиях [77]. Поскольку ацилимины очень неустойчивы к нуклеофильной атаке, то в условиях денатурации возможна атака растворителем двойной связи ацилимина. В случае щелочной денатурации это приводит к образованию карбиноламида, нарушающего сопряжение в хромофоре и приводящего к появлению характерного для GFP поглощения в видимой и УФ-области [77].

Наблюдаемое в более жестких условиях (кипячение, экстремальные значения pH) при проведении SDS-электрофореза расщепление полипептидной цепи drFP583 на 2 фрагмента объясняется разрывом связи между Phe65 и окисленным остатком Gln66, происходящим после гидратации ацилимина. В этих условиях ни для GFP, ни для зеленого мутанта красного белка K83R подобной фрагментации не наблюдалось. Данные SDS-электрофореза были подтверждены масс-спектрометрией [77].

Недавно были синтезированы и спектрально охарактеризованы две модели хромофора drFP583 (рис. 18) [79]. Получение модельных соединений и изучение их свойств содействует изучению хромофора в нативном белке, позволяет оценить влияние белкового окружения

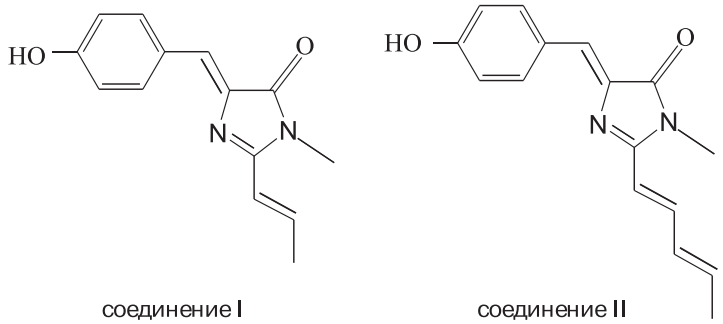


Рис. 18. Модели хромофора drFP583 [79].

на хромофор. Полученные синтетические модели хромофора, 4-(п-гидроксибензилиден)-1-метил-2-пропенилимидазолидон (соединение I рис. 18) и 4-(п-гидроксибензилиден)-1-метил-2-пента-1,3-диен-1-ил-имидазолидон (соединение II рис. 18) отличаются от реальной структуры хромофора drFP583 (рис. 16) олефиновыми заместителями в положении 2 имидазолидона вместо ацилиминной группировки. Оказалось, что эти соединения обладают детектируемой флуоресценцией при комнатной температуре с квантовым выходом $5 \cdot 10^{-4} - 8 \cdot 10^{-4}$ в воде и $2 \cdot 10^{-3} - 10^{-2}$ в хлороформе [79], тогда как модель хромофора GFP в этих условиях не флуоресцирует [80].

Незначительный квантовый выход модельных соединений по сравнению с хромофором в молекуле белка (0,23 [73] и 0,7 [78]) доказывает важную роль белкового окружения в предотвращении безызлучательной дезактивации хромофора в возбужденном состоянии. Из двух предложенных моделей анионная форма соединения II (рис. 18) наиболее подходит для изучения хромофора drFP583. Максимум возбуждения ее приходится на 482 нм, а максимум флуоресценции на 565 нм [79]. Эти характеристики в drFP583 составляют 558 и 583 нм, соответственно [73]. Близость максимумов флуоресценции указывает на то, что дополнительное сопряжение в соединении II по сравнению с хромофором GFP может в значительной степени объяснить красный сдвиг между drFP583 и GFP. Различие в стоксовом сдвиге для хромофора drFP583 и соединения II (25 и 83 нм, соответственно) объясняется меньшими энергетическими затратами на реорганизацию растворителя при возбуждении в белковом окружении.

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА drFP583

Кристаллическая структура drFP583 была определена и представлена двумя независимыми группами [74, 75]. Это тетрамер, состоящий из одинаковых мономерных субъединиц (рис. 19, сферами выде-

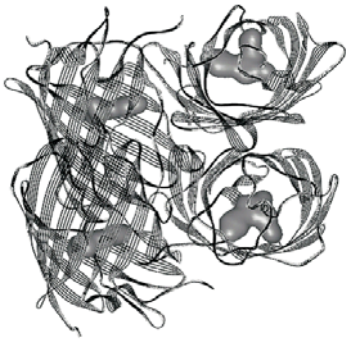


Рис. 19. Кристаллическая структура drFP583 [74, 75].

лены Gln66, Tyr67, Gly68, участвующие в циклизации, а также Phe65). Оказалось, что, несмотря на малую степень гомологии первичной структуры drFP583 и GFP (22%), мономерные субъединицы красного белка имеют структуру, идентичную GFP (рис. 1). Так же, как и GFP, мономеры drFP583 образованы 11 β-цепями, формирующими так называемый β-бочонок. Внутри каждого бочонка диагонально протянута α-спираль, несущая хромофор. Хромофор, «ядро» которого составляет структура 4-(п-гидроксибензилиден)-имидазолид-5-она (рис. 2), образованная остатками Gln66, Tyr67, Gly68 [73], располагается в центре внутренней полости бочонка. Короткие α-спиральные участки образуют «дно» и «крышку» каждого бочонка. Мономеры, формирующие тетрамер, обладают значительным сходством (среднеквадратичное отклонение C_α-атомов составляет 0,18 Å [74]). Отличие каждого мономера от структуры GFP характеризуется отклонением 1,9 Å [74]. Основные отличия наблюдаются в участках структуры, образующих петли на концах β-бочонка [75]. В структуре drFP583 эти участки короче и расположены плотнее. Ряд согласованных изменений в структуре приводит к тому, что остатки основной цепи 197–200 и 140–145 располагаются значительно ближе к хромофору. Изменение в положении боковых цепей может иметь важное влияние на окружение хромофора [75].

Молекула тетрамера drFP583 имеет форму широкой прямоугольной призмы (параметры $\approx 27 \cdot 34$ Å), составленной из плотно упакованных мономеров. В центре призмы имеется небольшая полость, в которой располагаются полярные остатки и молекулы растворителя [75]. В тетрамере drFP583 мономерные субъединицы образуют две пары димеров, в которых мономеры ориентированы антипараллельно друг относительно друга, при этом хромофоры мономеров располагаются, как зеркальные отражения по отношению друг к другу (рис. 19).

Каждый мономер в тетрамере взаимодействует с двумя другими мономерами, и эти взаимодействия имеют разную природу. Первую группу составляют гидрофобные связи между боковыми цепями, образующие кластер, из которого исключены молекулы растворителя. На периферии этой области гидрофобных контактов присутствуют водородные связи и солевые мостики. Подобная организация

связей является типичной для многих высокоаффинных межбелковых взаимодействий. Вторая группа состоит преимущественно из электростатических контактов и водородных связей. В систему водородных связей включено также 14 молекул воды. Основное участие в этой группе связей принимают Arg153, His162, His172, Leu172, Tyr190, Tyr194 [75]. Интересной особенностью тетрамера drFP583 является способность С-конца мономера из одного димера взаимодействовать с С-концом мономера другого димера, переплетаясь и образуя подобие «застежки» [74, 75]. При этом некоторые объемные боковые цепи одного мономера (His222, Phe224) располагаются в «карманах» другого мономера [75].

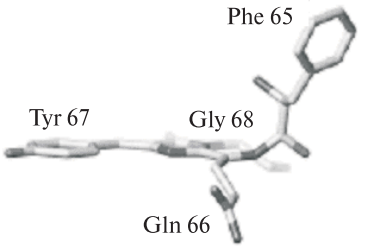


Рис. 20. Архитектура хромофора drFP583 с цис-пептидной связью между Gln66 и Phe65 [74].

Данные кристаллической структуры drFP583 позволили получить некоторые сведения о структуре хромофора. Предполагаемый механизм его образования [77] на первых стадиях аналогичен восстановительному механизму в GFP (рис. 4) [33, 44]: внутримолекулярная циклизация остатков Gln66, Tyr67, Gly68 с образованием кольца имидазолидона и последующее дегидрирование C_α–C_β связи Tyr66, создающее сопряжение между фенольным кольцом и имидазолидоном. Отличие заключается в реакции дегидрирования связи C_α–N остатка Gln66 с образованием ацилимина, которая увеличивает систему сопряженных π-связей (рис. 17). Однако бесспорных доказательств справедливости данного механизма пока не получено.

Из рентгеноструктурного анализа drFP583 было установлено также, что C_α-атом Gln66 располагается в одной плоскости с хромофором и имеет sp^2-гибридизацию [74, 75], тогда как в GFP соответствующий атом имеет геометрию тетраэдра и находится в sp^3-гибридизации [22, 23]. Это согласуется с образованием двойной связи между C_α-атомом и амидным азотом в положении 66 drFP583 и не противоречит предложенному [77] механизму.

Интересной особенностью структуры drFP583 является наличие редкой для белков цис-пептидной связи между Phe65 и Gln66 (рис. 20). Аналогичные позиции в GFP заняты обычной пептидной связью в транс-конфигурации [74]. Редкое появление цис-пептидных связей в природе (частота 0,03%) связано с тем, что при такой конфигурации возникает стерическое отталкивание между боковыми радикалами в полипептидной цепи. Вероятно, наличие структурных особеннос-

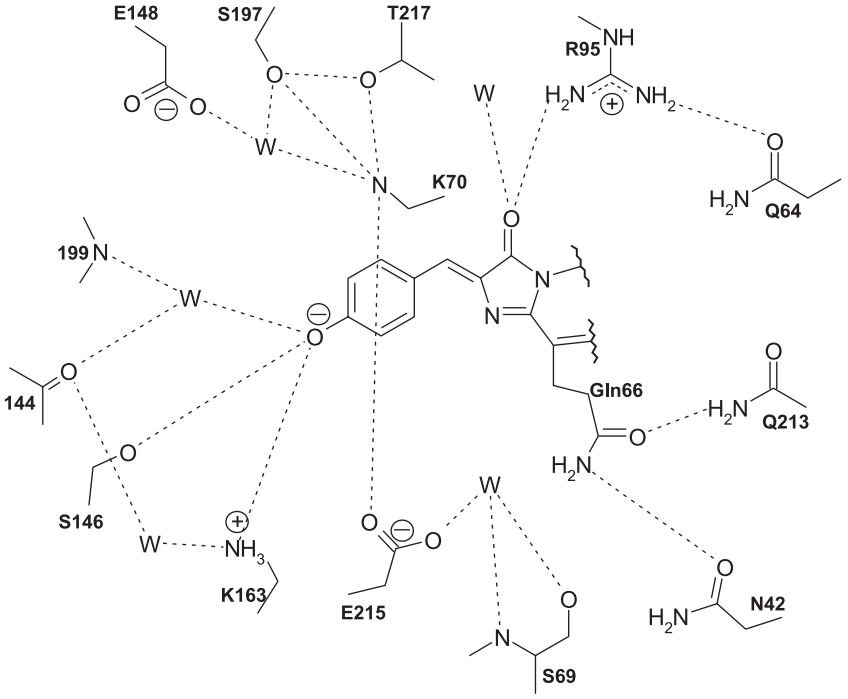


Рис. 21. Схема взаимодействий между хромофором и его окружением в drFP583 (возможные водородные связи обозначены штриховой линией) [75].

тей в drFP583 обеспечивает необходимую стабилизацию энергетически невыгодной цис-конфигурации. Изомеризация цис-связи может играть немаловажную роль в образовании хромофора и быть причиной длительного созревания drFP583 [74].

Окружение хромофора drFP583 демонстрирует более протяженную и сложную систему водородных связей и солевых мостиков (рис. 21) [74, 75]. По сравнению с GFP [23] хромофор drFP583 окружает большее число заряженных аминокислотных остатков (Lys70, Lys83, Ser146, Lys163, Glu215 и др.). Если для GFP установлено существование нейтральной (протонированной) и анионной (депротонированной) форм хромофора, то хромофор drFP583, вероятно, всегда находится в виде аниона. На это указывает образование солевого мостика фенольным кислородом Tyr67 с ε-NH_2-группой Lys163, а также ряд других связей, препятствующих нейтрализации хромофора. Экранирование хромофора за счет электростатических взаимодействий объясняет относительную нечувствительность флуоресценции drFP583 к понижению pH [78].

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ drFP583. ВЛИЯНИЕ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Рекомбинантный drFP583, экспрессированный в клетках *E. coli* имеет сложный спектр поглощения с максимумами при 277, 335, 487 и 558, а также плечом около 530 нм. Возбуждение на длине волны каждого из максимумов сопровождается излучением с максимумом 583 нм. Второй максимум в спектре флуоресценции, 500 нм, появляется только при возбуждении светом с длиной волны 277 или 487 нм [81]. Флуоресценция drFP583, в противоположность GFP, устойчива к фотовыцветанию [78] и нечувствительна к изменениям pH в широком диапазоне [82]. Значительное уменьшение интенсивности происходит только в условиях денатурации при pH 4,0–4,8, последующее повышение pH приводит к частичному возобновлению флуоресценции drFP583 [83]. У разных авторов данные о квантовом выходе и коэффициенте экстинкции сильно расходятся: 0,23, 22500 $см^{-1}М^{-1}$ [73] и 0,7, 75000 $см^{-1}М^{-1}$ [78], соответственно. Значения этих характеристик зависят от многих факторов (условия созревания и степень чистоты белка, стандарты для определения относительного квантового выхода, концентрация белка и компонентов буферной системы).

Одним из недостатков drFP583 является его медленное (в течение нескольких дней) созревание, проходящее через промежуточное образование формы с зеленой флуоресценцией [76]. Неполным созреванием и присутствием остаточных количеств формы с зеленой флуоресценцией объясняется появление второго максимума флуоресценции при 500 нм. Инкубация непосредственно белка или клеток *E. coli* при 37 ^{o}C ускоряет созревание drFP583, при этом происходит увеличение основного максимума при 583 нм и уменьшение максимума при 500 нм. Уменьшение зеленой флуоресценции до минимального значения занимает более 30 часов [81], причем ее полного исчезновения не происходит и за более длительный промежуток времени.

Многочисленные исследования drFP583 свидетельствуют о том, что значительное влияние на флуоресцентные свойства этого белка оказывает олигомерное состояние. Все большее количество экспериментальных данных указывает на его существование в виде тетрамера, устойчивого даже при низких концентрациях в растворе [78, 84]. Это отличает drFP583 от GFP, олигомеризация которого с образованием димера происходит только при высоких концентрациях и зависит от ионной силы [28].

Олигомерное состояние можно оценить при помощи так называемого «полунативного» электрофореза, в условиях которого тетрамер drFP583 не разрушается, а идет в геле как полоса соответ-

ствующей молекулярной массы [78]. Аналитическое ультрацентрифугирование показало, что в диапазоне концентраций от 10^{-8} М до 10^{-5} М drFP583 образует тетрамер, и при этом не исключается, что может происходить димеризация некоторой доли тетрамеров с образованием октамеров [78]. Оценка молекулярной массы методом гель-фильтрации также подтвердила существование олигомеров, полученное значение составило 75,6 кДа [81].

Другим свидетельством образования тетрамера drFP583 являются данные по кинетике затухания анизотропии флуоресценции после импульсного возбуждения. Изучение кинетики затухания анизотропии дает информацию о диффузионных движениях флуорофора, позволяет выявить количество вращательных процессов, приводящих к затуханию анизотропии. Затухание анизотропии для drFP583 при возбуждении светом с длиной волны 490 нм происходит по двухэкспоненциальному закону со значениями времен вращательной корреляции 53 нс и 211 пс [82]. Из расчета эффективного объема молекулы было сделано заключение, что медленная компонента 53 нс соответствует тетрамерной форме. Быстрая компонента затухания 211 пс может быть связана с переносом энергии между непараллельными хромофорами в тетрамере, а также с внутренним вращением хромофора внутри белковой оболочки, при этом первая причина представляется более вероятной [82].

Информативным методом для изучения внутри- и межмолекулярной динамики является флуоресцентная корреляционная спектроскопия. Метод позволяет рассчитать коэффициент диффузии молекулы. Выполненные для drFP583 расчеты указали на то, что молекулярные размеры в 3,6 раза больше, чем было предсказано для мономера [82].

В живых клетках на олигомеризацию может указывать индуктивно-резонансный перенос энергии, который, вероятно, происходит между промежуточной зеленой формой drFP583 и зрелой красной. В результате облучения drFP583 (после 24 часов созревания) в клетках *HeLa* оранжевым светом, который вызывает селективное обесцвечивание красной формы (акцептора энергии), наблюдалось усиление флуоресценции зеленой формы (донора) в 2,7–5,8 раз. Это соответствует эффективности переноса энергии 63–83% [78]. Наибольшее известное значение эффективности индуктивно-резонансного переноса для мутантов GFP составляет 68% [85]. При отсутствии взаимодействия между двумя формами выцветание красной формы не должно оказывать влияние на флуоресценцию зеленой.

Обычно глобулярные белки с массой больше 60 кДа не способны проникать через ядерные поры в клетках. Тетрамерные комплексы

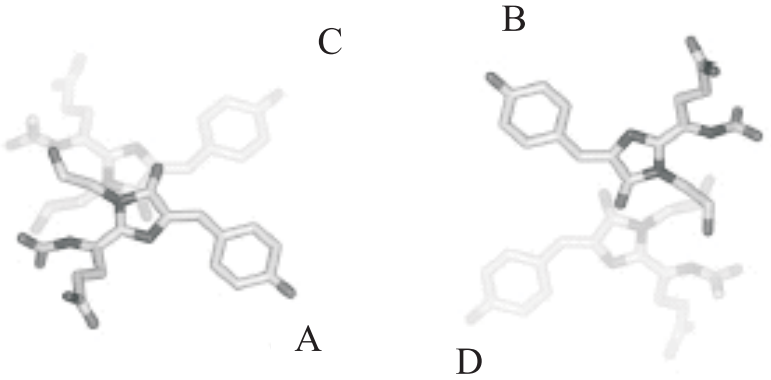


Рис. 22. Расположение хромофоров в кристаллической структуре тетрамера drFP583 [74].

drFP583 имеют молекулярную массу 108 кДа, однако при этом красная флуоресценция белка наблюдается как в цитоплазме, так и в ядре клеток *HeLa* [81]. Поскольку в клеточном экстракте основной формой является тетрамер, то существование равновесия между тетрамером и формами с меньшей молекулярной массой (димером, мономером), способными проникать в ядерные поры, маловероятно. Альтернативным объяснением может быть то, что тетрамер drFP583 не является глобулярным, а принимает соответствующую форму при прохождении через цилиндрические каналы в ядре диаметром около 9 нм. Предположения о такой особенности структуры были выдвинуты на основании исследований гидродинамического поведения drFP583. Влиянием формы, по-видимому, следует объяснять заниженное значение молекулярной массы (75,6 кДа) по данным гель-фильтрации [81].

О возможности переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму свидетельствуют данные о кристаллической структуре drFP583 [74, 75]. Четыре хромофора в структуре тетрамера образуют «антенно»-подобное прямоугольное расположение с параметрами ≈ 27–34 Å [75]. Расстояние между парами хромофоров составляет 22 Å (A–B, C–D), 38 Å (A–C, B–D) и 43 Å между диагонально расположенными хромофорами, угловая ориентация 21°, 47° и 41°, соответственно (рис. 22). Наилучшими партнерами для переноса энергии, вероятно, являются пары хромофоров A–B и C–D [74]. Эти выводы находятся в хорошем соответствии с результатами измерения кинетики затухания анизотропии, согласно которым угол между диполями хромофоров составляет 24° [82].

Существование индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET, fluorescence resonance energy transfer) между красной и зеленой формами в тетрамере drFP583 подтверждено изучением кинетики затухания флуоресценции при возбуждении на двух длинах волн. В зависимости от длины волны возбуждения затухание флуоресценции drFP583 описывается одной или несколькими экспонентами [86].

При возбуждении в области поглощения красной формы (543 или 578 нм), независимо от длин волн измеряемой флуоресценции (560–750 нм для возбуждения при 543 нм и 590–670 нм для возбуждения при 578 нм), затухание флуоресценции происходит по одноэкспоненциальному закону со временем жизни 3,6 нс. Возбуждение при 460 нм, в полосе поглощения зеленой формы (при измерении флуоресценции в диапазоне 500–650 нм), дает более сложный характер затухания, которое описывается четырьмя экспонентами. Значения времен жизни для этого случая составляют 3,6, 0,47, 0,12 и 0,03 нс. При длинах волн больше 560 нм основной вклад в затухание флуоресценции вносит компонента 3,6 нс, при этом с уменьшением длины волны ее доля уменьшается, приближаясь к нулю при 500 нм. Компонента с временем жизни 0,47 нс присутствует только в области излучения зеленого хромофора, и ее вклад достигает максимального значения 3% при 500 нм. Две быстрые компоненты, 0,12 нс и 0,03 нс, имеют максимальную долю при 500 нм (16% и 80%, соответственно), которая уменьшается до минимального значения при 650 нм [86].

Время жизни 3,6 нс, полученное при возбуждении в области поглощения как красной, так и зеленой форм, было приписано полностью красному тетрамеру. Существование индуктивно-резонансного переноса энергии между зеленой и красной формами объясняет поведение компонент 0,12 и 0,03 нс, которые являются доминирующими в области флуоресценции зеленой формы (500 нм) и минимальными в области красной формы (560 нм). Поскольку индуктивно-резонансный перенос энергии зависит от ориентации хромофоров, то компоненты 0,12 нс и 0,03 нс, вероятно, соответствуют по-разному ориентированным хромофорам, между которыми происходит перенос энергии (меньшее время 0,03 нс соответствует хромофорам, ориентированным более выгодным для переноса образом). Четвертая компонента в затухании флуоресценции, 0,47 нс, объясняется присутствием тетрамера, состоящего только из зеленых мономеров. Интересно отметить, что поскольку структура хромофора зеленой формы drFP583 предположительно является сходной со структурой GFP, то и время жизни флуоресценции следовало ожидать близким, около 3 нс. Сильное уменьшение до 0,47 нс может быть связано с появлением дополнительных каналов безызлучательной

дезактивации хромофора, вызванным уменьшением жесткости белковой структуры в зеленой форме drFP583 [86].

Существование зеленой формы, вносящей постоянный вклад во флуоресценцию drFP583, ставит задачу определения соотношения между красной и зеленой формами в тетрамере drFP583 и установления, является ли это соотношение случайным или детерминированным. Определение состава тетрамера необходимо для оценки мешающего влияния индуктивно-резонансного переноса энергии внутри отдельного тетрамера при использовании drFP583 в качестве FRET-партнера для других белков. Вопрос о стехиометрии тетрамера drFP583 был решен с использованием флуоресцентной спектроскопии на уровне отдельных молекул [87]. Исследования на уровне отдельных молекул (англ. термин – single molecule detection) позволяют получить сведения о фотофизических свойствах молекулярных систем без усреднения по популяции. Особенности, скрытые в ансамбле молекул, например, редкие флуктуации, так называемое «on–off» мерцание молекул, становятся доступными для изучения при переходе на уровень отдельных молекул. Флуоресценция отдельных тетрамеров, иммобилизованных в полиакриламидном геле, изучалась с использованием близкопольного сканирующего микроскопа (англ. – near-field scanning microscope) после возбуждения при двух длинах волн (488 нм, соответствующей возбуждению зеленой формы, и 568 нм, соответствующей возбуждению красной формы) [87]. Появление красной флуоресценции молекул при возбуждении светом с длиной волны 488 нм является непосредственным доказательством существования эффективного переноса энергии между мономерами внутри отдельного тетрамера. При этом оказалось, что фотодиссоциация одного из мономеров приводит к слабому тушению флуоресценции соседних. В 83% всех исследованных молекул было установлено присутствие как красной, так и зеленой форм в соотношении 1,2–1,5, соответственно (в предположении тетрамерной структуры молекулы). На рис. 23 представлена схема распределения двух форм в тетрамерных молекулах drFP583 [87] (темным цветом обозначены мономеры с красной флуоресценцией, светлым – с зеленой).

Как данные флуоресцентной корреляционной спектроскопии, так и данные по кинетике затухания анизотропии указывают на

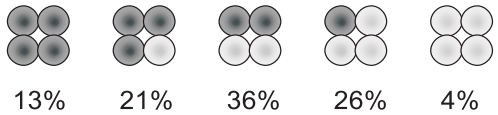


Рис. 23. Распределение красной и зеленой форм в тетрамере drFP583 [87].

существование тетрамера в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-6} М [82]. Поскольку присутствие промежуточных форм (димера и мономера) не установлено, это дает основание полагать, что тетрамер является самым стабильным состоянием для drFP583 в растворе. Возможно, образование тетрамеров является необходимым для появления красной флуоресценции drFP583. Если для биологического применения drFP583 олигомеризация является осложняющим процессом и ее подавление было бы желательно, то в отношении влияния на спектральные свойства нет однозначного ответа. Выяснение взаимосвязи между флуоресцентными характеристиками и олигомеризацией drFP583 требует дальнейших исследований.

АГРЕГАЦИЯ drFP583

Исследования по изучению drFP583 выявили, что помимо тетрамеризации [78, 81] белок проявляет склонность к образованию агрегатов с большой молекулярной массой [78]. Олигомеризация и агрегация являются общими процессами для всех новых флуоресцирующих белков, полученных из кораллов *Anthozoa* [88], что можно объяснить высокой степенью гомологии между ними [73]. Олигомеризация является осложняющим фактором при использовании drFP583 как партнера для FRET, а также при получении химерных белков слияния (fusion proteins), однако она не оказывает мешающего влияния на применение drFP583 в качестве маркера генной экспрессии. Агрегация белка имеет более значительные последствия при использовании *in vivo* вследствие токсичного действия на клетки. Применение методов, основанных на FRET, изучение межбелковых взаимодействий, наблюдение за отдельными клеточными компартментами становятся невозможными в условиях агрегации белка.

Обычно агрегация drFP583 происходит при гетерологичной экспрессии drFP583 как в бактериальных, так и в эукариотических клетках. Агрегацию можно наблюдать по появлению больших флуоресцентных гранул белка внутри трансфецированных клеток. При этом происходит «размывание» флуоресцентной картины, делающее недоступным для наблюдения ядро клетки. *In vitro* агрегация проявляется частичным осаждением из буферных растворов очищенного белка [88]. Присутствие агрегатов можно наблюдать при помощи так называемого «полунативного» электрофореза, который представляет собой стандартный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли, но без прогревания образцов перед внесением в гель [78]. В этих условиях агрегированный белок остается на границе концентрирующего и разделяющего гелей, в то время как олигомеры мигрируют как полосы соответствующей молекулярной массы.

Причины агрегации белков в настоящее время мало изучены, и нет четких представлений о возможных механизмах образования агрегатов [89]. Выяснению механизма агрегации в значительной степени содействуют данные о кристаллической структуре drFP583 [74, 75]. Так как не было замечено влияния агрегации на флуоресцентные свойства, то предполагают, что агрегаты образуются зрелыми молекулами белка [88]. Выделяют две общие для всех белков возможные причины агрегации. Первая причина – это взаимодействие «липких» гидрофобных участков на поверхности молекулы [90]. Однако данные рентгеноструктурного анализа [74, 75] указывают на отсутствие четко выраженных гидрофобных областей на поверхности тетрамера drFP583, которые могут привести к существенному взаимодействию между молекулами. Вторая возможная причина агрегации – электростатические взаимодействия между положительно и отрицательно заряженными участками поверхности [91]. Расчеты электростатического потенциала тетрамера drFP583 показали, что поверхность белка заряжена отрицательно за исключением коротких участков вблизи N-конца каждого мономера, образованных группой положительно заряженных аминокислотных остатков [88]. 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 обусловливают стабильность подобной структуры [88].

Для решения проблемы агрегации drFP583 был использован подход сайт-специфического мутагенеза, основанный на предположении о решающей роли в образовании агрегатов положительно заряженных остатков вблизи N-конца молекулы. Неагрегирующие мутанты drFP583 предполагалось получить заменой остатков Arg и Lys на отрицательно заряженные или нейтральные остатки. Для мутагенеза был выбран не дикий тип drFP583, а его мутант E57 (V105A, I161T, S197A). [88]. Этот мутант отличается более быстрым созреванием, красная флуоресценция E57 появляется в два раза быстрее, чем для дикого типа drFP583 [76]. Одним из полученных в результате мутагенеза мутантов был тройной мутант E57 с заменами R2A, K5E, K9T (E57 – NA (nonaggregated)) [88]. Проверка мутанта как *in vivo*, так и *in vitro* показала минимальную степень агрегации. Кроме этого флуоресцентные характеристики E57 R2A, K5E, K9T (яркость, максимум возбуждения и эмиссии) оказались очень близкими к исходному белку E57, что делает его оптимальным для дальнейшего использования [88].

Снижение агрегации при замене от одного до трех положительных аминокислотных остатков в области N-конца на нейтральные или отрицательные было получено также и для других цветных белков из кораллов *Anthozoa* (zFP538, zFP506, amFP486) [88]. Это подтверждает предположение об электростатической природе взаимодействий, приводящих к агрегации в данных белках.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Зеленый флуоресцирующий белок (Green Fluorescent Protein, GFP) был открыт в начале 60-х годов [3], но количество работ по его изучению и применению скачкообразно возросло после клонирования гена в 1992 году [12] и демонстрации его гетерологической экспрессии в других организмах [13]. В 1999 году другое семейство окрашенных белков, включая красный белок *Discosoma Red* (*DsRed*), было клонировано из кораллов [73], а вслед за этим был открыт и первый GFP-подобный хромопротеин *asRed* из *Anemonia* [92]. Биологическая роль этих белков простирается от чисто сигнальной функции, как у GFP [6], до фотопротекции фотосинтетических симбиотов новых белков из кораллов [93].

Все эти белки (дикого типа и мутанты) могут быть использованы как великолепные многоцветные генные маркеры. Спектральный диапазон их флуоресценции простирается почти на 180 нм от голубого пика при 460 нм до 640 нм в красной области спектра. В последние годы эти белки превратились в наиболее часто используемые генетические маркеры в клеточной биологии [94], иммунологии [95], а также при изучении определенных инфекционных заболеваний человека [96] и в онкологии, а именно, *in situ* в контроле определенных клеточных линий мышей (nude) и их ответе на противоопухолевые препараты [97, 98]. Во всех этих областях применения красное излучение представляет особый интерес с точки зрения минимизации фонового сигнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shimomura, O.* (1998) in Green Fluorescent Protein. (Chalfie, M., and Kain, S., eds.) Wiley-Liss, New York, pp. 3–15.
2. *Davenport, D., and Nicol, J.A.C.* (1955) Proc. R. Soc. London, Ser. B, **144**, 399–411.
3. *Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y.* (1962) J. Cell. Comp. Physiol., **59**, 223–239.
4. *Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R.* (1962) J. Cell. Comp. Physiol., **60**, 85–104.

5. *Hastings, J.W., and Morin, J.G.* (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun., **37**, 493–498.
6. *Morin, J.G., and Hastings, J.W.* (1971) J. Cell. Physiol., **77**, 313–318.
7. *Ward, W.W.* (1998) in Green Fluorescent Protein. (Chalfie, M., and Kain, S., eds.) Wiley-Liss, New York, pp. 45–75.
8 *Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., and Winant, J.* (1974) Biochemistry, **13**, 2656–2662.
9. *Ward, W.W., and Cormier, M.J.* (1979) J. Biol. Chem., **254**, 781–788.
10. *Prendergast, F.G., and Mann, K.G.* (1978) Biochemistry, **17**, 3448–3453.
11. *Shimomura, O.* (1979) FEBS Lett., **104**, 220–222.
12. *Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J.* (1992) Gene, **111**, 229–233.
13. *Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C.* (1994) Science, **263**, 802–805.
14. *Inouye, S., and Tsuji, F.I.* (1994) FEBS Lett., **341**, 277–280.
15. *Ward, W.W., and Bokman, S.H.* (1982) Biochemistry, **21**, 4535–4540.
16. *Topell, S., Hennecke, J., and Glockshuber, R.* (1999) FEBS Lett., **457**, 283–289.
17. *Bokman, S.H., and Ward, W.W.* (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., **101**, 1372–1380.
18. *Peelle, B., Gururaja, T.L., Payan, D.G., and Anderson, D.C.* (2001) J. Protein Chemistry, **20**, 507–519.
19. *Ward, W.W.* (1981) in Bioluminescence and Chemiluminescence. Properties of the coelenterate green fluorescent proteins (DeLuca, M., and McElroy, D. W., eds.) Academic Press, New York, pp. 235–242.
20. *Youvan, D.C., and Michel-Beyerle, M.-E.* (1996) Nat. Biotechnol., **14**, 1219–1220.
21. *Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W.W.* (1993) Biochemistry, **32**, 1212–1218.
22. *Yang, F., Moss, L., and Phillips G.* (1996) Nat. Biotechnol., **14**, 1246–1251.
23. *Ormoe, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J.* (1996) Science, **273**, 1392–1395.
24. *Phillips, G.N. Jr.* (1997) Curr. Opin. Struct. Biol., **7**, 821–827.
25. *Dopf, J., and Horiagon, T.M.* (1996) Gene, **143**, 39–44.
26. *Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., and Kain, S.* (1997) J. Biol. Chem., **272**, 28545–28549.
27. *Makino, Y., Amada, K., Taguchi, H., and Yoshiba, M.* (1997) J. Biol. Chem., **272**, 12468–12474.
28. *Ward, W.W.* (1982) Biochemistry, **21**, 4535–4540.
29. *Chiang, C.F., Okou, D.T., Griffin, T.B., and Verret, C.R.* (2001) Arch. Biochem. Biophys., **394**, 229–235.
30. *Brejc, K., Sixma, T.K., Kitts, P.A., Kain, S.R., Tsien, R.Y., Ormö, M., and Remington, S.J.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 2306–2311.
31. *Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y.* (1995) Trends Biochem. Sci., **20**, 448–455.
32. *Reid, B.G., and Flynn, G.C.* (1997) Biochemistry, **36**, 6786–6791.
33. *Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 12501–12504.
34. *Kojima, S., Hirano, T., Niwa, H., Ohashi, M., Inouye, S., and Tsuji, F.I.* (1997) Tetrahedron Lett., **38**, 2875–2878.
35. *Nishiuchi, Y.I.T., Nishio, H., Body, G., and Kimura, T.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 13549–13554.
36. *Kane, J.F., and Harley, D.L.* (1988) Trends Biotechnol., **14**, 95–101.
37. *Palm, G.J., Zdanov, A., Gaitanaris, G.A., and Strauber, R.* (1997) Nat. Struct. Biol., **4**, 361–365.
38. *Sacchetti A., Capetti V., Marra P., Dell'Arciprete, R., El Sewedy, T.,*

Grescenzi C., and Alberti, S. (2001) J. Cell Biochem., **81,** 117–128.

39. *Sakikawa C., Taguchi H., Makino Y., and Yoshida M.* (1999) J. Biol. Chem., **274**, 21251–21256.
40. *Branchini, B.R., Lusins, J.O., and Zimmer, M.* (1997) J. Biomol. Struct. Dyn., **14**, 441–448.
41. *Remington, S.J.* (2000) in Methods in Enzymology, Academic Press Inc., San Diego, **305**, pp. 196–211.
42. *Branchini, B.R., Nemser, A.R., and Zimmer, M.* (1998) J. Am. Chem. Soc., **120**, 1–6.
43. *Siegbahn, P.E., Wirstam, M., and Zimmer, M.* (2001) Int. Quantum Chem., **81**, 169–186.
44. *Cubbit, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y.* (1995) TIBS, **20**, 448–455.
45. *Chattoray, M., King, B.A., Bublitz, G.U., and Boxer, S.G.,* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 8362–8367.
46. *Lossau, H., Kummer, A., Heinecke, R., Pöllinger-Dammer, F., Kompa, C., Bieser, G, Jonsson, T., Silva, C.M., Yang, M.M., Youvan, D.C., and Michel-Beyerle, M.-E.* (1996) Chemical Physics, **213**, 1–16.
47. *Thor, J.J., Gensch, T., Hellingwerf, K.J., and Johnson, L.N.* (2002) Nat. Struct. Biol., **9**, 37–41.
48. *Ehrig, T., O'Kane, D.J., and Prendergast, F.G.* (1995) FEBS Lett., **367**, 163–166.
49. *Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y.* (1995) Nature, **373**, 663–664.
50. *Kummer, A.D., Wiehler, J., Rehaber, H., Kompa, C., Steipe, B., and Michel-Beyerle, M.-E.* (2000) J. Phys. Chem., **104**, 4791–4798.
51. *Wachter, R.M., Elsliger, M., Kallio, K., Hanson, G.T., and Remington, S.J.* (1998) Structure, **6**, 1267–1277.
52. *Kojima, S., Ohkawa, H., Hirano, T., Maki, S., Niwa, H., Ohashi, M., Inouye, S., and Tsuji, F.I.* (1998) Tetrahedron Lett., **39**, 5239–5242.
53. *Gurskaya, N.G., Savitsky, A.P., Yanushevich, Y.G., Lukyanov, S.A., and Lukyanov, K.A.* (2001) BMC Biochemistry, **2**, N 6, http://www.biomedcentra1.com/1472-2091/2/6.
54. *Ward, W.W., Cody, C.W., Hart, R.C., and Cormier, M.J.* (1980) Photochem. Photobiol., 31, 611–615.
55. *Niwa, H., Inouye, S., Hirano, T., Matsuno, T., Kojima, S., Kubota, M., Ohashi, M., and Tsuji, F.I.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 13617–13622.
56. *Kummer, A.D., Kompa, C., Lossau, H., Pöllinger-Dammer, F., Michel-Beyerle, M.-E., Silva, C.M., Bylina, E.J., Coleman, W.J., Yang, M.M., and Youvan, D.C.* (1998) Chem. Phys., **237**, 183–193.
57. *Chen, M.C., Lambert, C.R., Urgitis, J.D., and Zimmer, M.* (2001) Chem. Phys., **270**, 157–164.
58. *Tsien, R.Y.* (1998) Annu. Rev. Biochem., **67**, 509–544.
59. *Ward, W.W., Prentice, H.J., Roth, A.F., Cody, C.W., and Reeves, S.C.* (1982) Photochem. Photobiol., **35**, 803–808.
60. *Bublitz, G., King, B.A., and Boxer, S.G.* (1998) J. Am. Chem. Soc., **120**, 9370–9371.
61. *Elsliger, M.A., Wachter, R.M., Hanson, G.T., Kallio, K., and Remington, S.J.* (1999) Biochemistry, **38**, 5296–5301.
62. *Weber, W., Helms, V., McCammon, J., and Langhoff, P.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 6177–6182.
63. *Bell, A.F., He, X., Wachter, R.M., and Tonge, P.J.* (2000) Biochemistry, **39**, 4423–4431.
64. *Schwille, P., Kummer, S., Heikal, A.A., Moerner, W.E., and Webb, W.W.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 151–156.
65. *Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., and Verkman, A.S.* (1998) Biophysical J., **74**, 1591–1599.
66. *Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G., and Tsien, R.Y.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 6803–6808.

67. *Palm, G.J., Zdanov, A., Gaitanaris, G.A., Stauber, R., Pavlakis, G.N., and Wlodawer, A.* (1997) Nat. Struct. Biol., **4**, 361–365.

68. *Nielsen, S.B., Lapierre, A., Anderson, J.U., Pedersen, U.V., Tomita, S., and Andersen, L.H.* (2001) Physical rev. lett., **87**, 22, 228102-1–228102-4.

69. *Voityuk, A.A., Michel-Beyerle, M.-E., Rцsch, N.* (1998) Chem. Phys. Lett., **296**, 269–276.

70. *Voityuk, A.A., Kummer, A.D., Michel-Beyerle, M.-E., and Rцsch, N.* (2001) Chemical Physics, **268**, 83–91.

71. *Yazal, J.E., Prendergast, F.G., Shaw, D.E., and Pang, Y.-P.* (2000) J. Am. Chem. Soc., **122**, 11411–11415.

72. *Voityuk, A.A., Michel-Beyerle, M.-E., and Rösch, N.* (1997) Chem. Phys. Lett., **272**, 162–167.

73. *Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., and Lukyanov, S.A.* (1999) Nat. Biotechnol., **17**, 969–973.

74. *Wall, M.A., Socolich, M., and Ranganathan, R.* (2000) Nat. Struct. Biol., **7**, 1133–1138.

75. *Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M.V., and Remington, S.J.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 462–467.

76. *Terskikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zaraisky, A., Tan, P., Kajava, A.V., Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., Weissman, I., and Siebert, P.* (2000) Science, **290**, 1585–1588.

77. *Gross, L.A., Baird, G.S., Hoffman, R.C., Baldridge, K.K., and Tsien, R.Y.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 11990–11995.

78. *Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 11984–11989.

79. *He, X., Bell, A.F., and Tonge, P.J.* (2002) Organic Lett., **4**, 1523–1526.

80. *McCapra, F., Razavi, Z., and Naery, A.P.* (1988) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 790–791.

81. *Mizuno, H., Sawano, A., Eli, P., Hama, H., and Miyawaki, A.* (2001) Biochemistry, **40**, 2502–2510.

82. *Heikal, A.A., Hess, S.T., Baird, G.S., and Tsien, R.Y.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 11996–12001.

83. *Vrzheshch, P.V., Akovbian, N.A., Varfolomeev, S.D., and Verkhusha, V.* (2000) FEBS Lett., **487**, 203–208.

84. *Jakobs, S., Subrumaniam, V., Schonle, A.J., Jovin, T.M., and Hell, S.W.* (2000) FEBS Lett., **479**, 131–135.

85. *Miyawaki, A., and Tsien, R.Y.* (2000) Methods Enzymol., **327**, 472–500.

86. *Cotlet, M., Hofkens, J., Habuchi, S., Dirix, G., Van Guyse, M., Michiels, J., Vanderleyden, J., and De Schryver, F.C.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 14398–14403.

87. *Garcia-Parajo, M.F., Koopman, M., van Dijk, E.M.H.P., Subrumaniam, V., and van Hulst, N.F.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 14392–14397.

88. *Yanushevich, Y.G., Staroverov, D.B., Savitsky, A.P., Fradkov, A.F., Gurskaya, N.G., Bulina, M.E., Lukyanov, K.A., and Lukyanov, S.A.* (2002) FEBS Lett., **511**, 11–14.

89. *Wetzel, R.* (1994) Trends Biotechnol., **12**, 193–198.

90. *Eaton, V.A., and Hofrichter, J.* (1990) Adv. Protein Chem., **40**, 63–279.

91. *Serina, L., Bucurenci, N., Gilles, A.M., Surewicz, W.K., Fabian, H., Mantsch, H.H., Takahashi, M., Petersen, I., Batelier, G., Barzu, O.* (1996) Biochemistry, **35**, 7003–7011.

92. *Lukyanov, K.A., Fradkov, A.F., Gurskaya, N.G., Matz, M.V., Labas, Yu.A., Savitsky, A.P., Markelov, M.L., Zaraisky, A.G., Zhao, X., Fang, Y., Tan, W., and Lukyanov, S.A.* (2000) J. Biol. Chem., **275**, 25879–25882.

93. *Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kьhl, M., and Hoegh-Guldberg, O.* (2000) Nature, **408**, 850–854.

94. *Gerdes, H.-H., and Kaether, C.* (1996) FEBS Lett., **389**, 44–47.

95. *Kawakami, N., Sakane, N., Nishizawa, F., Iwao, M., Fukada, S., Tsujikawa, K., Kohama, Y., Ikawa, M., Okabe, M., and Yamamoto, H.* (1999) Immunology Lett., **70**, 165–171.

96. *Valdivia, R.H., Hromockyj, A.E., Monack, D., Ramakrisnan, L., and Falkow, S.* (1996) Gene, **173**, 47–52.

97. *Fillmore, H.L., Shurm, J., Furqueron, P., Prabhu, S.S., Gillies, G.T., and Broaddus, W.C.* (1999) Cancer Lett., **141**, 9–19.

98. *Yang, M., Baranov, E., Jiang, P., Sun, F.-X., Li, X.-M., Li, L., Hasegawa, S., Bouvet, M., Al-Tuwaijri, M., Chishima, T., Shimad, H., Moossa, A.R., Penman, S., and Hoffman, R.M.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 1206–1211.