

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СЕНСОРЫ, СОЗДАННЫЕ НА ОСНОВЕ ЦВЕТНЫХ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

I. Сенсоры pH, ионов Cl^- , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}

© 2005 г. Н. Н. ЗУБОВА, А. П. САВИЦКИЙ

*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет*

I. Введение. II. GFP как флуоресцентный маркер в белках слияния. III. GFP как репортерный ген. IV. Методы, основанные на индуктивно-резонансном (Ферстеровском) переносе энергии (FRET). V. Внутриклеточные pH-сенсоры на основе GFP. VI. Сенсоры на основе GFP для определения галогенид-ионов. VII. Сенсоры на основе GFP для измерения концентраций ионов металлов. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Зеленый флуоресцирующий белок (GFP) используется в качестве прижизненного маркера, позволяющего исследовать многообразные процессы, происходящие внутри живых клеток и организмов, что ранее было практически невозможным. Этот белок кодируется одним геном, его хромофор образуется из трех аминокислотных остатков Ser65—Tyr66—Gly67 путем внутренней посттрансляционной автокаталитической циклизации, которая не требует каких бы то ни было кофакторов или субстратов [1—3]. Слияние GFP с другими белками обычно не влияет на активность, подвижность и локализацию этих

Принятые сокращения: BCECF — 2',7'-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбокси-флуоресцеин; CaM — кальмодулин; СККр — кальмодулин-связывающий пептид из CaM-зависимой протеинкиназы крысы (rat calmodulin dependent protein kinase); BRET — биохемилюминесцентный резонансный перенос энергии; (продолжение - см. сл. стр.)

Адрес для корреспонденции: apsavitsky@inbi.ras.ru

Работа поддержана грантом Программы президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии.

белков в клетке. Сообщалось о некоторой токсичности высоких концентраций GFP внутри клетки [4, 5], однако эти данные оспариваются в других публикациях [6]. Исключительно важна устойчивость GFP к различного рода протеазам и изменению pH, что позволяет ему длительное время сохраняться и накапливаться внутри клетки [1, 2, 7, 8]. Поскольку частотность использования кодонов в клетках различной природы различна, были созданы мутанты с оптимизированными кодонами для исследования клеток млекопитающих [9, 10], растений [11, 12], дрожжей [13] и грибов [14]. Высокое двухфотонное поглощение GFP позволяет использовать его в современных фотофизических методах, в частности в конфокальной микроскопии и ряде оптоэлектронных устройств [15].

В последние годы быстро растет число исследований с другими цветными белками, подобными GFP, но выделенными из кораллов [16–18]. Недостатком этих белков является ярко выраженная склонность к агрегации [19], которую, однако, можно преодолеть путем мутагенеза [20]. Опубликованы обзоры по применению GFP в технологии репортерных генов [21], в структурных и динамических исследованиях [22], для изучения динамики белков в живых клетках с использованием флуоресцентной микроскопии [23–26]. Успешно исследуется локализация белков в бактериях [27], растениях [28–30], эмбрионах мышей [31]. Белки слияния на основе GFP используются для поиска новых лекарств [32, 33], для детекции апоптоза [34]. Активно

(принятые сокращения, окончание) drFP583 (DsRed) – красный флуоресцирующий белок из *Discosoma* sp.; FRET – индуктивно-резонансный (Ферстеровский) перенос энергии; GFP – зеленый флуоресцирующий белок; BFP – голубой флуоресцирующий белок (Y66H); CFP – циановый флуоресцирующий белок (Y66W); YFP – желтоватый флуоресцирующий белок (T203Y); GFPuv – F99S/M153T/V163A мутант GFP; deGFPs – зеленые флуоресцирующие белки, которые обладают двойной эмиссией; deGFP1 – S65T/H148G/T203C мутант GFP; deGFP4 – S65T/C48S/H148C/T203C мутант GFP; EBFP – улучшенный голубой флуоресцирующий белок (F64L/S65T/Y66H/Y145F); ECFP – улучшенный циановый флуоресцирующий белок (F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A); EGFP (GFPmut1) – улучшенный зеленый флуоресцирующий белок (F64L/S65T); srEGFP – циклически переставленный вариант EGFP; EYFP – улучшенный желтоватый флуоресцирующий белок (S65G/S72A/T203Y); EYFP.1 – EYFP с дополнительными мутациями V68L/Q69K; deGFPs – стабилизированные формы GFP; M13 – кальмодулин-связывающий домен киназы легкой цепи миозина; scFv – одноцепочечный фрагмент вариабельных доменов антител; КД – круговой дихроизм; МТ – металлотионеин; SNARE – N-этилmaleимид-чувствительный белковый рецептор; ТnC – тропонин С; YC – желтый хамелеон (yellowameleon); MBTP – трансмембранный регулятор муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); HEK 293 – культура клеток, полученная путем трансформации клеток почки эмбриона человека.

развиваются исследования по применению GFP в клеточной биологии [35] в качестве живого маркера для изучения молекулярных и клеточных процессов в млекопитающих [36]. GFP посвящены отдельные тома в *Methods in Enzymology* [37] и *Methods in Cell Biology* [38], были выпущены CD-ромы с иллюстрациями применений GFP [39, 40]. Журнал *Trends in Cell Biology* начал публиковать серию обзорных статей по использованию GFP («Imaging biochemistry inside cells» [41], «Visualizing chromosome dynamics with GFP» [42], «Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy» [43]).

GFP уже находит многочисленные применения в промышленности, например, контроль за содержанием мясных бродильных лактобацилл в колбасах [44] и распространением бактерий, которые усваивают дизельное топливо в почвах [45]. Несколько компаний начали выращивание трансгенных флуоресцирующих домашних животных (мыши [46], кролики, обезьяны [47]), а также растений (елки и цветы [48, 49]).

Настоящий обзор посвящен рассмотрению молекулярных клеточных сенсоров, созданных на основе цветных флуоресцирующих белков.

II. GFP КАК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МАРКЕР В БЕЛКАХ СЛИЯНИЯ

Наиболее часто GFP применяется в качестве маркера методом генетического слияния с другими белками. Это позволяет наблюдать за локализацией и перемещением изучаемых белков в живых функционирующих клетках и выяснить их биологическую функцию [1, 23, 35, 50–54]. Белки слияния создаются с использованием стандартных генно-инженерных методов. Ген GFP присоединяют в одной рамке считывания к гену, кодирующему изучаемый белок. В большинстве случаев получаемый белок слияния сохраняет функцию изучаемого белка, маркер не влияет на локализацию или активность исследуемого белка, который при этом становится флуоресцирующим [23, 24]. Это свойство обусловлено тем, что сам белок GFP не содержит в своей последовательности каких-либо специфических сигналов внутриклеточной локализации. Кроме того, благодаря размеру и форме GFP, его устойчивости к варьированию величины pH и редокс потенциалов, его присоединение не является препятствием для локализации белков слияния в различных клеточных компартментах. В некоторых случаях может наблюдаться неспецифическая миграция GFP от клетки к клетке [55]. Косвенно можно маркировать даже специфические локусы хромосом. Это достигается с помощью вставки многочисленных копий Лас оператора, которые маркируются белками слияния GFP с

репрессором Lac промотора [56]. Белки слияния на основе GFP могут использоваться в любых живых системах — от вирусов до клеток млекопитающих [57–59].

В большинстве случаев белки слияния с GFP создаются путем присоединения изучаемого белка к N- или C-концу GFP. Длина полипептидного линкера может влиять на стабильность белков слияния на основе GFP [60, 61]. По данным рентгеноструктурного анализа, C- и N-концы GFP расположены недалеко друг от друга, поэтому GFP может быть вставлен внутрь последовательности изучаемого белка во внешние петли или участки между доменами [62, 63].

Амино- (остатки 1–10) и карбоксильный (остатки 229–238) концы GFP образуют свободно движущиеся цепи, выходящие из центра структуры β -бочонка [64]. Эти подвижные цепи выступают в роли естественных гибких линкеров при получении белков слияния. Это объясняет, почему даже при соединении белков безо всяких линкерных последовательностей, белок GFP не «чувствует» белка партнера и, соответственно, не влияет на его сворачивание.

Интересно, что сворачивание белков слияния с GFP во многих случаях предотвращает образование телец включения. В работе [65] методами флуоресцентной корреляционной спектроскопии и анизотропии флуоресценции с разрешением во времени была изучена вращательная динамика белка слияния на основе мутанта GFP (F64L/S65T), соединенного через линкер из трех аланинов с Fv фрагментом антитела против липополисахарида внешней клеточной стенки грамотрицательных бактерий *Ralstonia solanacearum*. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия использовалась для измерения коэффициентов диффузии самого GFP и в белке слияния с scFv. Измерения затухания анизотропии флуоресценции проводились для изучения вращательного движения GFP компонента в scFv-GFP. Полученное время вращательной корреляции белка слияния GFP с одноцепочечным антителом (15,8 нс) было слишком мало по сравнению с рассчитанным в приближении глобулярного вращения всей молекулы, которое должно превышать 20 нс. Время вращательной корреляции для одиночной молекулы GFP составило 10,6 нс. Полученный результат можно объяснить тем, что оба белка отделены друг от друга гибким шарниром, благодаря которому они могут свободно двигаться, не мешая друг другу. Это предположение было подтверждено созданной авторами структурной моделью белка слияния scFv-GFP [65], которая показала, что оба партнера в белке слияния ведут себя независимо, подобно тому, как они вели себя по одиночке. Конструкция scFv-GFP легко узнает свой антиген, поскольку не существует пространственных помех, и антигенсвязывающий участок полностью экспонирован в растворитель.

Исследование экспрессии белка может быть мощным инструментом для понимания его функций, при условии, что этот белок экспрессируется в физиологически значимых концентрациях. В работе [66] был разработан простой метод для измерения концентрации суперэкспрессированного белка в отдельных клетках и соотношения конкретных физиологических свойств с экспрессией белка, участвующего в поддержании кальциевого гомеостаза. Нейронный кальциевый гомеостаз обусловлен взаимодействием между компонентами, которое увеличивает или уменьшает уровень содержания кальция в цитоплазме. Измеряя флуоресценцию белка слияния нейрон-специфичного кальций-связывающего белка кальретинина и GFP в микрокапиллярах, была получена стандартная кривая флуоресценции GFP, которая позволила количественно определить концентрацию кальретинина в отдельных клетках, при этом было показано, что различные уровни экспрессии белка слияния коррелируют с функциональными различиями отклика клеток на кальций. Этот метод делает возможным количественно соотнести специфические внутриклеточные изменения уровня кальция с изменением количества белка, экзогенно экспрессированного в этой же клетке.

III. GFP КАК РЕПОРТЕРНЫЙ ГЕН

Ген GFP, находящийся под контролем определенного промотора, можно использовать для оценки уровня экспрессии других белков, ген которых находится под контролем того же промотора [21, 67]. Используемые в качестве репортеров для наблюдения за активностью гена и распределением белка внутри клеток β -галактозидаза, люцифераза светляков и бактериальная люцифераза требуют добавления внешних субстратов или кофакторов. Однако во многих случаях, как, например, в случае нематоды *Caenorhabditis elegans*, в котором кутикула препятствует доступу субстратов, ферменты-репортеры могут использоваться ограниченно.

Авторы одной из работ [67] показали, что гетерологичная экспрессия GFP в прокариотических (*E. coli*, под контролем T7 промотора) и эукариотических (*C. elegans*, под контролем *mec-7* промотора, который управляет формированием β -тубулина в механочувствительных нейронах) клетках, сопровождается появлением интенсивной зеленой флуоресценции, возбуждаемой синим светом. GFP может быть использован как прижизненный маркер, так что за клеточным ростом, развитием нейронных процессов и движением можно следить *in situ*, особенно в животных, ткани которых достаточно прозрачны (как у *C. elegans* и *Zebra fish* [67]).

В ряде случаев применение GFP в качестве генетического маркера несколько ограничено вследствие относительно низкой чувствительности метода. Дело в том, что в зеленой области спектра живые клетки обладают сильной собственной флуоресценцией, поэтому для получения сигнала флуоресценции, вдвое превышающего фоновый в клетке млекопитающих, требуется 1 мкМ GFP дикого типа [68]. EGFP с более высоким коэффициентом поглощения уменьшает предел обнаружения флуоресцирующего белка в 6–10 раз (0,1 мкМ GFP или 10^5 копий на типичную клетку объемом $1-2 \times 10^{-12}$ л). Таким образом, для детекции интегрального сигнала от клетки нужен достаточно сильный промотор, чтобы запустить достаточную для детектирования экспрессию GFP, особенно в клетках млекопитающих (например, промоторы из вирусов, таких как цитомегаловирус, SV40, длинный концевой повтор ВИЧ, или сильные экзогенные регуляторы, такие как тетрациклиновая система трансаактивации) [1]. Чувствительность детекции экспрессированного флуоресцирующего белка может резко увеличиться за счет его кластеризации, обусловленной сигналом внутриклеточной локализации. Например, кластер из 300–3000 молекул GFP, упакованных в центросоме, при микроскопическом наблюдении становится хорошо видимой зеленой точкой внутри клетки [1]. Совершенствование детектирующей техники позволяет дополнительно понизить число минимально детектируемых молекул GFP [35].

Медленное посттрансляционное образование хромофора и стабильность образующегося белка также ограничивают использование GFP для исследования быстрых транскрипционных процессов активации. Полупериод жизни EGFP, экспрессированного в цитоплазме клеток млекопитающих, превышает 24 часа. Такой уровень стабильности является преимуществом при решении многих прикладных задач, для которых желателен стабильный флуоресцентный сигнал от GFP. Однако это является серьезным недостатком при наблюдении за изменением экспрессии гена. При проведении анализов с использованием репортеров транскрипции предполагается, что изменения в уровне репортерного белка отражают изменения в уровне мРНК, вызванные или индукцией или подавлением контролирующего элемента, соединенного с репортерным геном. В частности, при индукции вслед за введением какого-либо эффектора (например, потенциального лекарства) реальный уровень репортерного белка может возрасти в меньшей степени, чем наблюдаемое увеличение созревшего белка из-за высокого базового уровня репортерного белка, уже накопившегося в клетке. Эти ограничения GFP как репортера транскрипции привели к разработке короткоживущих форм EGFP [32, 69], названных дестабилизированными EGFP (dEGFP). Дестабилизированные dEGFP

варианты были получены путем присоединения гена, кодирующего 422–461 аминокислотные остатки мышиной орнитиндекарбоксилазы (MODC), к С-концу гена EGFP. Этот домен MODC содержит аминокислотную последовательность, которая делает белок восприимчивым к быстрому протеолизу 26S протеосомой при экспрессии в клетках млекопитающих. Белок слияния EGFP-MODC_{422–461} (d2EGFP) имеет кажущийся полупериод жизни (время, за которое флуоресценция уменьшается в 2 раза) 2 часа в присутствии циклогексимида. Как было показано, это уменьшение флуоресценции, следующее за ингибированием синтеза белка, соотносится с аналогичным уменьшением уровня белка d2EGFP. Избирательным мутагенезом ключевой аминокислоты внутри участка MODC_{422–461} было получено два дополнительных мутанта с полупериодами жизни 1 ч (d1EGFP) и 4 ч (d4EGFP). В принципе, аналогичным способом можно создать дестабилизированные синий (EBFP), циановый (ECFP) и желтый (EYFP) варианты и, используя этот набор короткоживущих спектрально различных вариантов, анализировать разные сигнальные пути трансдукции в одной и той же клеточной линии. Однако не стоит забывать, что между экспрессией белка и детектированием флуоресценции проходит некоторое время, требуемое на посттрансляционное созревание хромофора GFP, поэтому использование дестабилизированных EGFP вариантов может быть проблематичным при наблюдении за очень быстрыми или кратковременными изменениями в экспрессии гена.

IV. МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНОМ (ФЕРСТЕРОВСКОМ) ПЕРЕНОСЕ ЭНЕРГИИ (FRET)

Индуктивно-резонансный перенос энергии (или Ферстеровский перенос энергии) — это безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения, происходящий между двумя флуорофорами, когда они находятся на малом расстоянии (<100 Å), и спектр излучения одного флуорофора (донора энергии) перекрывается со спектром поглощения другого флуорофора (акцептора энергии). Эффективность FRET зависит также от взаимной ориентации донора и акцептора. При благоприятных для FRET условиях возбуждение донора приводит к флуоресценции акцептора, при этом интенсивность флуоресценции донора уменьшается [70]. Спектры поглощения и флуоресценции большинства флуоресцирующих белков перекрываются, что делает их хорошими парами для FRET [1, 2]. Рассчитанные значения Ферстеровского радиуса (расстояния, при котором эффективность переноса составляет 50%) между разными комбинациями улучшенных вариантов GFP или DsRed варьируют в диапазоне от 10 до 56,4 Å [71].

Любое изменение расстояния или взаимной ориентации пары флуорофоров будет влиять на эффективность переноса энергии. Поэтому FRET является одним из наиболее эффективных методов для изучения белок-белковых взаимодействий *in vivo* и *in vitro* [1, 3, 24, 72, 73, 74]. Одним из главных достоинств метода является то, что флуоресценцию донора и акцептора можно измерять одновременно и об эффективности переноса можно судить по отношению интенсивностей флуоресценции при двух длинах волн, соответствующих излучению донора и акцептора. При таком методе сводятся на нет различия в абсолютной концентрации GFP. При этом не требуется дополнительной калибровки для каждого измерения. Калибровка, как правило, выполняется только один раз (*in vitro*), поэтому метод практически идеально подходит для анализа внутриклеточных процессов.

Измерение переноса энергии между вариантами GFP лежит также в основе ряда методик определения ионов кальция [75, 76], субстратов, используемых для оценки активности протеаз [77, 78] и киназ [8] *in vivo*. Так, например, в работе [78] для наблюдения в клетках Cos-7 за активацией специфических каспаз *in vitro* и *in vivo* во время инициации фазы выполнения запрограммированной смерти клеток были использованы флуоресцирующие субстраты, специфически расщепляемые каспазой-1 или каспазой-3. В случае *in vitro* экспериментов эти субстраты состояли из сайта узнавания из четырех аминокислот, YVAD для каспазы-1 и DEVD для каспазы-3, помещенного между синим флуоресцирующим белком (BFP) и зеленым флуоресцирующим белком (GFP). Для *in vivo* экспериментов YVAD и DEVD были помещены между циановым и желтым флуоресцирующими белками. Иногда GFP используется с другими партнерами, отличными от GFP-подобных белков [79].

Авторы одной из работ [80] продемонстрировали эффективность исследования FRET между мутантами GFP в белке слияния в качестве внутриклеточного индикатора NO. В этой работе для прямого изучения взаимодействия между металлотионеином (MT) и NO в живых клетках авторы получили белок слияния, состоящий из MT, расположенного между циановым (ECFP, донором) и желтым (EYFP, акцептором) мутантами GFP, присоединенными к N- и C-концу MT, соответственно. Металлотионеины — это внутриклеточные богатые цистеином металлсвязывающие белки с молекулярной массой от 6 до 7 кДа. При реакции с NO металлотионеин высвобождает цинк или кадмий. Полученный в результате белок слияния сохранил способность связывать ионы металлов. Добавление ЭДТА и хлорида натрия, вызывающее высвобождение металлов из MT и его разворачивание, приводило к уменьшению отношения интенсивностей флуоресценции при 535 нм (акцептор) и 480 нм (донор), $F_{535\text{нм}}/F_{480\text{нм}}$ от 1,8 до 1,1. Более

того, добавление Cu^{1+} к лизату клеток повышает эффективность FRET, что проявляется по увеличению $F_{535\text{нм}}/F_{480\text{нм}}$ от 1,8 до 2,2. Таким образом, конформационное изменение при высвобождении или связывании металла может быть прослежено с помощью Ферстеровского переноса энергии, который отражает изменения межмолекулярного расстояния и относительной ориентации флуорофоров в ECFP и EYFP [80] (рис. 1). Аналогичная картина наблюдалась при добавлении водного раствора NO к лизату клеток, содержащему белок слияния, когда соотношение $F_{535\text{нм}}/F_{480\text{нм}}$ уменьшилось от 1,8 до 1,4. Как было показано, NO не изменяет эффективность переноса энергии у свободной от металла формы белка слияния. Применение химерной конструкции на основе GFP обнаружило индуцированное NO конформационное изменение в MT, указывающее на высвобождение металла, таким образом, впервые было продемонстрировано высвобождение металла из MT в ответ на физиологические стимулы в интактных клетках.

Рис. 1. Пример типичного использования FRET для наблюдения за конформационными изменениями.

Связывание ионов металлов металлотионеином приводит к возникновению плотной упаковки химерной конструкции, в результате чего происходит перенос энергии между ECFP и EGFP. Высвобождение ионов металлов, наоборот, приводит к разворачиванию конструкции и, следовательно, уменьшению FRET [80].



Одним из наиболее важных достоинств метода FRET является пространственное (субмикронное) и временное (миллисекунды) разрешение. Наиболее существенным недостатком можно считать то обстоятельство, что перенос энергии наблюдается и в отсутствие каких-либо белковых взаимодействий, наличие этого фонового уровня сужает динамический диапазон измеряемых концентраций.

V. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ pH-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ GFP

Чувствительность флуоресценции к pH среды характерна для всего класса GFP белков. Это свойство было использовано для наблюдения за изменениями pH *in vivo* [81–89]. *In vitro* интенсивность флуоресценции при варьировании pH может изменяться более чем в 10 раз. Чувствительность GFP к pH может быть изменена введением точечных мутаций. Так, для различных мутантов GFP в работе [83] получены следующие

щие значения pK_a : 6,0 для F64L/S65T; 5,9 для S65T; 6,1 для Y66H; 4,8 для T203I, при этом коэффициенты Хилла во всех случаях были близки к 1, за исключением Y66H, для которого этот коэффициент равен 0,7. Установлено, что для S65T мутанта GFP в водном растворе в диапазоне pH 5–8 форма спектра флуоресценции, время жизни (2,8 нс) и спектры кругового дихроизма не зависят от pH, интенсивность флуоресценции обратимо реагирует на изменение pH менее, чем за 1 мс. На основе различных мутантов GFP созданы внутриклеточные pH-индикаторы, имеющие ряд преимуществ по сравнению с низкомолекулярными флуорофорами, обычно используемыми для измерения pH [82, 84]:

1) В отличие от химических индикаторов не требуется проникновение эфиров и гидролиз низкомолекулярных красителей. Можно измерять pH с малым фоновым сигналом и без вытекания индикатора из клеток в ходе экспериментов даже при 37 °C; отсутствует токсичность, связанная с применением химических индикаторов, и опасность повреждения, обусловленная инвазивным способом их введения.

2) GFP можно направить в определенные ткани, различные типы клеток (используя специфичные промоторы), органеллы или в конкретные клеточные домены путем слияния с сигналом внутриклеточной локализации. Это позволяет измерять pH в специфических внутриклеточных участках.

3) С помощью мутагенеза можно изменять такие свойства индикатора, как pK_a и динамический диапазон. В частности, менее чувствительные к изменению pH варианты GFP можно использовать в качестве партнеров для измерений pH по соотношению интенсивностей в двух максимумах флуоресценции. С этой точки зрения лучше было бы получить одиночный GFP белок с pH-зависимым сдвигом максимума возбуждения или флуоресценции.

4) Некоторые варианты GFP более устойчивы к фотообесцвечиванию, чем красители на основе флуоресцеина.

Поскольку для многих вариантов GFP единственной флуоресцирующей формой является депротонированная форма, то большинство индикаторов на основе GFP реагируют на изменения pH изменением амплитуды флуоресцентного сигнала. Применение таких индикаторов для количественного измерения pH зависит от различных факторов, связанных с колебаниями концентрации белка, изменением флуоресценции при взаимодействии с другими агентами, разной толщиной клеток, их движением, эффективностью источника возбуждения, условий оптической фокусировки и т.д.

Подобных недостатков лишены так называемые pH-луорины, в основе использования которых лежит измерение соотношения интенсивностей флуоресценции при разных длинах волн излучения («отно-

сительные сенсоры»). Варианты GFP, реагирующие на изменения pH изменением соотношения интенсивностей флуоресценции в двух максимумах, или излучения или возбуждения, могут быть получены путем простого мутагенеза. Это осуществлено для S65T/H148D, у которого в отличие от других мутантов GFP имеется два pH-зависимых пика возбуждения зеленой флуоресценции при 415 и 487 нм с четкой изобестической точкой при 430 нм. Это означает, что при изменении pH происходит увеличение интенсивности одного максимума возбуждения и одновременное уменьшение другого, при этом интенсивность возбуждения в изобестической точке не зависит от pH. Таким образом, измерение отношения флуоресценции при возбуждении 487 нм и возбуждении в изобестической точке (эта нормировка позволяет учесть наблюдаемые изменения интенсивности флуоресценции, не связанные с изменением pH) может быть достаточным для измерения pH *in vivo* [90]. Другим вариантом является создание искусственных конструкций путем слияния нескольких молекул GFP [86]. Созданы относительные pH-индикаторы на основе GFP, которые могут работать в режиме двух возбуждений и одной эмиссии, то есть при фиксированной длине волны регистрации флуоресценции измеряется интенсивность возбуждения при двух длинах волн. Однако использование таких индикаторов не очень удобно в случае широко распространенных методов, таких как проточная цитометрия и лазерная сканирующая микроскопия, в которых ограничены возможности выбора лазерного источника и/или скорости переключения двух длин волн. В этих установках более удобным является применение относительных pH-индикаторов, когда измеряется отношение интенсивностей в двух максимумах флуоресценции при одном и том же возбуждении. Такие индикаторы описаны в работе [88].

Один из вариантов GFP (GFPmut1 [91]), содержит две мутации (F64L/S65T). Флуоресценция GFPmut1 чувствительна к pH как *in vitro*, так и в intactных клетках [82]. В спектре флуоресценции GFPmut1 имеется максимум при 507–508 нм *in vitro*, как и в спектре GFP дикого типа. Однако спектр возбуждения флуоресценции GFPmut1 *in situ* существенно отличался от спектра, наблюдаемого *in vitro*: в спектре возбуждения GFPmut1 всегда присутствовал pH-чувствительный максимум при 400 нм в intactных клетках, который исчезал после лизиса клеток. Этот максимум соответствует максимуму в спектре GFP дикого типа, связанному с нейтральной протонированной формой нативного хромофора, и интенсивность возбуждаемой флуоресценции возрастает при защелачивании. В предварительных исследованиях клеток почечного эпителия, гетерологически экспрессирующих GFPmut1, авторы наблюдали обратимые изменения флуо-

ресценции при условиях, изменяющих внутриклеточный pH [82]. Путем прямого сравнения с методом, использующим BCECF (2',7'-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеин), показана достоверность данного флуориметрического метода. Оценка внутриклеточного pH с использованием GFPmut1 имеет ряд преимуществ по сравнению с методами, в которых используются химические флуорофоры (например, BCECF). Транзиторная экспрессия GFPmut1 была продолжительной и сильной, при этом максимальная флуоресценция появлялась в течение 24–36 часов после переноса гена и сохранялась, по крайней мере, в течение 3–5 дней. Таким образом, периодические измерения внутриклеточного pH легко выполнимы не только в стабильно трансфицированных клетках, но и в клетках, которые временно экспрессируют GFPmut1, обеспечивая возможность изучать изменения внутриклеточного pH в первичных клеточных культурах, где невозможна стабильная трансфекция. GFPmut1 полностью остается внутри интактных клеток, и колебания в экспрессии можно свести к минимуму путем селекции стабильно трансфицированных клонов. Таким образом, постоянное (однородное) введение флуорофора также достижимо и устраняет проблемы введения и утечки, с которыми сталкиваются при использовании чувствительных к pH химических хромофоров, таких как BCECF.

Для оценки pH внутри митохондриального матрикса был использован EYFP, поскольку он обладает самым высоким значением кажущегося pK_a среди трех изученных мутантов GFP (ECFP, EGFP, EYFP) [84]. В клетках HeLa значение pH в состоянии покоя составило $7,98 \pm 0,07$, а в кардиомиоцитах — $7,91 \pm 0,16$. Значение pH в состоянии покоя, определенное для эндоплазматического ретикулула, составило 7,45. В случае органелл с более низким pH, чем для комплекса Гольджи, более подходящим будет EGFP (кажущееся pK_a 6,15), поскольку EYFP (кажущееся pK_a 7,1) практически не флуоресцирует в этих условиях. И наоборот, EGFP нельзя считать хорошим индикатором для митохондриального матрикса, поскольку с этим индикатором вряд ли возможно детектировать изменения pH вблизи pH 8. Изменения флуоресценции внутри цитозоля и ядра клеток млекопитающих после любого изменения состава раствора (введение хлорида аммония, лактата, ионофоров) уравнивались в течение 1–4 минут.

Однако наиболее перспективными и точными являются относительные pH индикаторы на основе тандемного слияния двух вариантов GFP, один из которых менее чувствителен к pH (GFPuv [92]), чем другой (EGFP или EYFP). В работе [86] описаны два новых относительных pH-сенсора, названные GFpH и YFpH. Данные сенсоры могут работать как в режиме измерений при одной длине волны

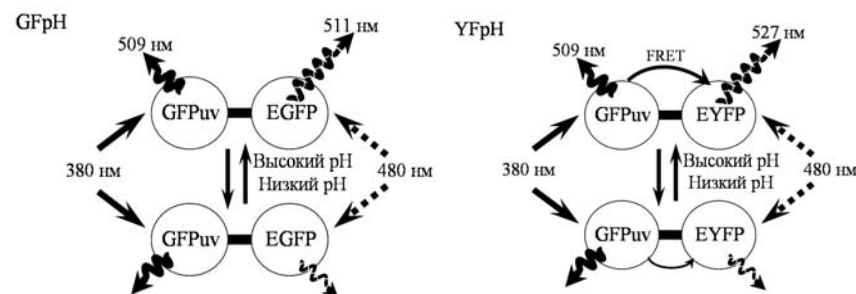


Рис. 2. Схематическое изображение созданных на основе GFP pH-индикаторов GFpH и YFpH, по данным работы [86].

Приведены максимумы возбуждения и излучения GFpH и YFpH, толщиной стрелок показана относительная интенсивность излучения.

флуоресценции, но при двух различных длинах волн возбуждения, так и при одной длине волны возбуждения, но с измерением сигналов флуоресценции при двух различных длинах волн (этот режим измерений основан на регистрации переноса энергии). Отношение сигналов флуоресценции GFpH и YFpH оказалось pH-зависимым (pK_a 6,1 и 6,8, соответственно) [86]. С помощью этих сенсоров, экспрессируемых в культивируемых клетках, авторы измерили и визуализировали изменения pH в цитозоле и ядре. Более того, связав GFpH с C-концом мембранного белка (α_{1b} адренергического рецептора), авторы визуализировали pH в окружении этого белка во время интернализации, вызванной эндоцитозом после стимуляции агонистом. Таким образом, описанный в данной работе метод позволяет исследователям наблюдать за транспортом функционального белка одновременно с измерением pH в окружении этого белка. Конструкции новых зондов [86] схематически показаны на рис. 2. В спектре излучения GFpH (EGFP-GFPuv), измеренном *in vitro*, имеются максимумы при 509 и 511 нм, соответствующие возбуждению при 380 и 480 нм, независимо от pH в диапазоне 5,0–8,5. Интенсивность флуоресценции в обоих максимумах возрастает при увеличении pH. Величины pK_a составили 5,6 для возбуждения при 380 нм и 6,2 для возбуждения при 480 нм. При этом отношение интенсивностей флуоресценции, возбуждаемой при 480 нм, к флуоресценции, возбуждаемой при 380 нм, представляет собой сигмовидную кривую в диапазоне pH 5,5–7,5 с кажущимся pK_a 6,2. Другой зонд, YFpH (EYFP-GFPuv) имеет максимум излучения 527 нм при возбуждении 480 нм, этот максимум излучения является производным от EYFP. Интенсивность флуоресценции, возбуждаемой при 480 нм, была pH-зависимой с pK_a 6,8. Интересно то, что в спектре флуоресценции при возбуждении 380 нм имелись две компоненты с

максимумами при 509 нм для рН в диапазоне 5,0–6,0 и при 527 нм в диапазоне рН 7,0–8,5, что соотносится со спектрами GFPuv и EYFP, соответственно. Это указывает на то, что EYFP возбуждается за счет индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET) от GFPuv, поскольку EYFP не возбуждается непосредственно ультрафиолетовым светом с длиной волны 380 нм. Максимум излучения при возбуждении при 380 нм сдвигался от 509 к 527 нм при изменении рН от 6,0 до 7,0, тогда как излучение при 520 нм практически не изменялось при варьировании рН в пределах 6,0–8,5: это свидетельствует о существовании индуктивно-резонансного переноса энергии, эффективность которого зависит от рН. Непосредственный контакт донора и акцептора в молекуле YFPn может существенно повысить эффективность такого переноса. Поэтому YFPn можно применять не только в качестве индикатора рН с двойным возбуждением, но и как индикатор рН с двойной эмиссией [86]. Отношение интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 480 нм, к интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 380 нм, измеренное при 520 нм (режим двойного возбуждения и одиночной эмиссии), зависит от рН. Эта зависимость представляет собой сигмоидную кривую в диапазоне рН 5,5–8,5. Аналогично отношение интенсивностей флуоресценции, измеренной при 510 и 525 нм, возбуждаемой светом с длиной волны 380 нм (режим одиночного возбуждения и двойной эмиссии), дает приблизительно такую же сигмоидную кривую в диапазоне рН 6,0–8,5. Для обоих случаев кажущееся значение pK_a составило 6,5. Эти рН-зависимые изменения отношений интенсивностей флуоресценции оказались обратимыми.

Таким образом, как индикатор YFPn применим для наблюдения за изменениями цитоплазматического рН в диапазоне рН между 6,5 и 8,0, а GFPn — для относительно более низкого диапазона значений рН между 6,0 и 7,5. Относительный метод с использованием одного зонда позволяет избежать проблем возможной несинхронной экспрессии двух отдельных зондов. Поскольку EYFP (составной компонент YFPn) обладает чувствительностью к хлорид-ионам [93], то предпочтительнее использовать GFPn в тех случаях, когда ожидаются существенные изменения в концентрации Cl^- . рНлуринины также обеспечивают возможность относительных измерений с использованием одного зонда [94], однако их улучшение в качестве индикаторов ограничено, поскольку они получены структурно-направленным комбинаторным мутагенезом. Зонды же, полученные слиянием двух GFP мутантов, можно улучшить простой заменой мутантов на более чувствительные к рН, обладающие более яркой флуоресценцией или большим динамическим диапазоном. Модификацией мутантов GFP можно получить YFPn, нечувствительные к Cl^- .

Единственным индивидуальным флуоресцирующим белком, обладающим двойной эмиссией, является «флуоресцирующий таймер» [95], индикатор на основе красного флуоресцирующего белка drFP583 (DsRed) из *Discosoma* sp., который использует зеленый флуоресцирующий интермедиат, временно образующийся в многостадийном процессе созревания красного флуоресцирующего продукта. В работе [88] описаны спектральные и структурные свойства нового класса индивидуальных флуоресцирующих белков, которые обладают двойной эмиссией (deGFPs), и на основе которых можно получить улучшенные относительные рН индикаторы. В результате замены 65 аминокислотного остатка в GFP дикого типа на треонин, а также 148 и/или 203 остатка на цистеин получены deGFPs белки, которые характеризуются значениями pK_a в диапазоне 6,8–8,0. Подробно описаны два мутанта: deGFP1 (S65T/H148G/T203C, $pK_a \sim 8,0$) и deGFP4 (S65T/C48S/H148C/T203C, $pK_a \sim 7,3$). Область флуоресценции этих мутантов смещается от зеленой части спектра (зеленая форма с максимумом при 515 нм) к синей (форма с максимумом при ~ 460 нм) при понижении рН. Синяя флуоресценция этих мутантов характеризуется низкой интенсивностью вследствие низкого квантового выхода. Уменьшение квантового выхода, как предполагают авторы, обусловлено уменьшением числа водородных связей между хромофором и его окружением, что способствует большей свободе колебаний и конформационных изменений и, соответственно, увеличению вероятности безызлучательной дезактивации возбужденных состояний [88]. Индикаторы deGFP1 и deGFP4 откликаются на изменения рН противоположными изменениями интенсивности голубой и зеленой флуоресценции в области физиологических значений pK_a . Как и для спектра поглощения, рН-зависимость каждого максимума флуоресценции очень точно описывается теоретической кривой, соответствующей титрованию одной группы:

$$I(pH) = C + \frac{D}{1 + 10^{(pK_a - pH)}},$$

где I — сигнал (поглощение или флуоресценция в максимуме), D — динамический диапазон, C — базовая линия.

Суммарные сведения о структуре и спектральных свойствах deGFP представлены в таблицах 1, 2.

Пригодность одного из вариантов (deGFP4) в качестве *in vivo* индикатора для измерения рН в клетках млекопитающих была подтверждена путем транзитной экспрессии в PS120 фибробластах, с использованием конфокальной и двухфотонной микроскопии [88]. Сравнение deGFP4 с коммерчески доступным рН-чувствительным красите-

Таблица 1.
Изменения в аминокислотной последовательности и
номенклатура вариантов deGFP* [88]

Название	Замены аминокислот
deGFP1	S65T/H148G/T203C
deGFP2	S65T/C48S/H148C
deGFP3	S65T/T203C
deGFP4	S65T/C48S/H148C/T203C

* — все варианты содержат замену Q80R, возникшую при первоначальном клонировании.

лем SHARF-1 в опытах с измерением pH в одних и тех же клетках показало, что они близки по динамическому диапазону изменения сигнала. Использование двухфотонного возбуждения, как было найдено, позволяет повысить отношение флуоресцентного сигнала deGFP4 к уровню фоновой собственной флуоресценции клеток по сравнению с обычной конфокальной микроскопией.

Чтобы прояснить природу возникновения двойной эмиссии были проанализированы кристаллические структуры deGFP1 при низких (5,5) и высоких (9,0) значениях pH [88]. Оказалось, что при низких pH в структуре отсутствует система водородных связей, которая обеспечивает быстрый перенос протона из возбужденного состояния нейтрального хромофора на подходящий акцептор; при этом наблюдается голубая флуоресценция, свойственная нейтральному хромофору. При высоких pH перераспределение основной цепи, индуцированное изменениями в объединенной системе водородных связей, позволяет протекать процессу переноса протона из возбужденного состояния нейтрального хромофора в объем растворителя через серин 147, поэтому излучение происходит из более низкого по энергии состояния хромофора, что и отражается в смещении спектра излучения в зеленую область. Кинетический анализ данных по динамике deGFP в возбужденном состоянии приведен в работе [96].

Регулирование pH внутри клеточных компартментов обеспечивает оптимальную среду для протекания многих клеточных процессов. Например, в митохондриях градиент pH во внутренней мембране является движущей силой синтеза АТФ. В сперматозоидах, по-видимому, способность оплодотворения яйцеклетки регулируется изменением клеточного pH. В работе [85] впервые сообщается об измерении pH внутри акросом. Авторы использовали pH зависимость флуоресценции EGFP для оценки pH внутри акросомы мышинных сперматозоидов. Среднее измеренное значение pH внутри акросомы соста-

Таблица 2.
Спектральные свойства вариантов deGFP* [88]

	H148G	deGFP1	deGFP2	deGFP3	deGFP4
$\lambda_{\text{полг.,A}}^a$ (нм)	397	400	398	396	400
ϵ_A^b ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	25000	28700	21700	26700	26900
$\lambda_{\text{полг.,B}}^a$ (нм)	492	504	496	508	509
ϵ_B/ϵ_A^b		1,91	1,76	1,72	1,89
ϵ_B^b ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	40500	54800	38200	45900	50800
$\lambda_{\text{эмис.,A}}^c$ (нм)	слабая	465, 513	461, 515	460, 512	461, 515
$\lambda_{\text{эмис.,B}}^c$ (нм)	512	516	517	518	518
Φ_{AL}^d		0,046	0,12	0,12	0,08
Φ_{AH}^d		0,16	0,34	0,19	0,15
Φ_B^d	0,43	0,49	0,55	0,57	0,27
pK_a^e	7,0	8,02(8)	7,25(5)	6,86(6)	7,37(9)
Отношение интенсивностей* (%)		12	7	13	20

* — коэффициенты молярного поглощения и квантовые выходы были измерены для полос поглощения А (УФ) и Б (видимая) при pH 5,5-6 и 9,0.

^a $\lambda_{\text{полг.}}$ — положение максимумов в спектре поглощения (нм) для полос А и Б.
^b ϵ_A и ϵ_B — коэффициенты молярного поглощения при 400 нм (полоса А) и 505 нм (полоса Б). ϵ_B был рассчитан из ϵ_A и отношения ϵ_B/ϵ_A . Для H148G ϵ_B был определен экспериментально из спектра поглощения.

^b Отношение коэффициентов молярного поглощения полосы Б к полосе А, определено экспериментально по производным кривым pH-титрования.

^c $\lambda_{\text{эмис.}}$ — положение максимумов в спектре флуоресценции, соответствующих возбуждению при длине волны максимума поглощения полос А и Б, соответственно.

^d Φ — квантовый выход флуоресценции. Значения приведены для флуоресценции при возбуждении 400 нм (pH 5,5-6,0 (Φ_{AL})) и pH 9,0 (Φ_{AH})) и для флуоресценции анионного хромофора (pH 9,0) при возбуждении 496 нм (Φ_B).

^e pK_a — кажущаяся центральная точка кривой pH-титрования хромофора; средние значения были определены из независимых титрований двух полос поглощения при 400 и 505 нм и двух полос излучения при 460 и 515 нм. Число в скобках — наблюдаемое стандартное отклонение в последней цифре среднего значения. Для H148G значение pK_a было определено из pH-зависимости полосы поглощения Б.

^{*} — отношение максимальной интенсивности флуоресценции при 460 нм к максимальной интенсивности флуоресценции при 515 нм.

вило $5,3 \pm 0,1$ сразу после образования сперматозоидов, это значение постепенно увеличивалось до $6,2 \pm 0,3$ в течение 120 минут инкубации в ТУН среде, пригодной для капаситации (приобретения сперматозоидами оплодотворяющей способности). Полученные данные позво-

ляют предполагать, что защелачивание акросомы во время инкубации, необходимой для капаситации сперматозоидов, может обеспечивать изменение содержимого акросомы для подготовки его к высвобождению во время акросомальной реакции. Была получена линия трансгенных мышей, в которых EGFP был направлен внутрь акросомы сперматозоидов с помощью сигнального пептида проакрозина и N-концевого пептида [97]. Поскольку EGFP исчезает сразу после акросомальной реакции, становится возможным наблюдать взаимосвязь между внутриакросомным значением pH и акросомальной реакцией неинвазивно и в реальном времени.

Бактерии часто подвергаются различным воздействиям окружающей среды. Одним из наиболее интенсивно изучаемых откликов на стресс является способность бактерий выживать при низких pH, подстраивая их внутриклеточный pH в ответ на изменения внеклеточного pH. Авторы [87] продемонстрировали, что pH-чувствительный относительный индикатор — GFP, полученный введением специфических аминокислотных замен в хромофор [94] и изменяющий свой спектр поглощения (возбуждения) в соответствии с pH окружающей среды — может быть использован для измерения внутриклеточного pH как в грамположительных (*Lactococcus lactis*), так и в грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактериальных клетках. В клетках, экспрессирующих относительный индикатор GFP, измерение отношения интенсивностей флуоресценции при возбуждении 410 и 430 нм позволяет осуществлять быстрое и неинвазивное определение внутриклеточного pH. В согласии с предыдущими результатами, полученными для клеток млекопитающих [94], наблюдалась pH-независимая изобестическая точка при 430 нм. Чтобы сопоставить отношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении 410 и 430 нм с внутриклеточным pH, клетки, экспрессирующие GFP, были обработаны низином для изменения проницаемости мембраны, что позволило выровнять pH внутри и вне клетки. Таким образом, была получена калибровочная кривая зависимости отношения интенсивностей флуоресценции при возбуждении 410 и 430 нм от внутриклеточного pH в диапазоне 5,5–8,5 [87]. Изучение внутриклеточного pH в клетках *L. lactis* показало, что градиент pH (ΔpH = внутриклеточный pH минус внеклеточный pH) равен примерно 1,8 при внеклеточном pH 5,5. Повышение внеклеточного pH привело к уменьшению ΔpH , который в конечном итоге стал отрицательным при значении внеклеточного pH 8,5.

В работе [89] впервые была продемонстрирована динамика процессов экзоцитоза/эндоцитоза инсулин-секретирующих гранул в живых панкреатических β -клетках линии MIN6. Для этого авторы использовали pH-чувствительный pHлуорин на основе GFP [94], который

обладает яркой флуоресценцией при pH 7,4, но почти не флуоресцирует при pH 5,0. Для наблюдения за экзоцитозом инсулина (1) и за движением инсулин-секретирующих гранул (2) были созданы две химерные конструкции: 1) инсулин-pHлуорин, в которой pHлуорин, был прикреплен к C-концу человеческого пре-про-инсулина; 2) pHлуорин-фогрин (белок мембраны везикул phogrin), в которой pHлуорин был локализован на люминальной стороне везикулы. Это позволило отличить одиночные кислотные секреторные гранулы (созревшие инсулин-секретирующие гранулы поддерживают кислый pH 5,0–5,5) от нейтральных гранул, образующихся после слияния с цитоплазматической мембраной.

При стимуляции MIN6 клеток, экспрессирующих pHлуорин-фогрин, 50 мМ хлоридом калия быстро появлялись флуоресцирующие пятна, при этом отдельные пятнышки двигались и затем исчезали. Авторы приписали исчезновение флуоресцирующих пятен эндоцитозу инсулиновых гранул, за которым следует их повторное закисление. Обработка кислотой приводила к быстрому тушению флуоресценции в исследуемой системе. Рассчитанное среднее время между появлением (слияние) и исчезновением (эндоцитоз) составило 200 ± 15 секунд, при этом не наблюдалось фиксированного направления движения отдельных флуоресцирующих пятнышек по плазматической мембране.

В работе [98] описан экзоцитоз/эндоцитоз синаптических везикул с использованием того же метода: в качестве маркера везикул был использован pHлуорин, прикрепленный к VAMP-2 (SNARE белок, специфический для синаптических везикул).

VI. СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ GFP ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЛОГЕНИД-ИОНОВ

Хлорид является основным анионом в клеточных компартментах. Измерение транспорта хлорид-ионов через плазматические мембраны клеток важно для исследования механизмов секреции жидкостей, нейросинаптической проводимости и регулирования клеточного объема [99, 100]. Нарушение транспорта Cl^- связано с такими заболеваниями у человека, как муковисцидоз (дефицит трансмембранного регулятора муковисцидоза — МВТР), почечнокаменная болезнь (дефицит ClC5) и холера. Предполагается, что транспорт Cl^- через внутриклеточные везикулярные мембраны в эндосомальных и секреторных компартментах способствует везикулярному подкислению и регулирует клеточный трафик. Существующие Cl^- /галогенид индикаторы имеют ряд недостатков, связанных с необходимостью их введе-

ния в клетки, вытеканием из клеток, и отсутствием возможности легко направить их в исследуемые субклеточные органеллы. Альтернативой использованию вводимых извне индикаторов является использование эндогенно экспрессируемых хромофоров, таких как GFP. С помощью подходящих сигналов внутриклеточной локализации, разные варианты GFP были селективно направлены в многочисленные внутриклеточные сайты [101–106].

Флуоресценция YFP, наиболее длинноволновых вариантов GFP, содержащих замену Thr203→Tyr и дополнительные замены для улучшения яркости флуоресценции в живых клетках (S65G/V68L/S72A), зависит не только от pH, но и от концентрации некоторых анионов [93]. Значения pK_a , спектры поглощения и флуоресценции YFP зависят от концентрации галогенид- или нитрат-ионов. На основе YFP были созданы варианты, в которых pK_a хромофора изменяются в диапазоне 5,2–7,0 (YFP), 6,7–7,7 (YFP-N148Q) и 7,5–8,2 (YFP-N148G) при повышении концентрации хлорид-иона от 0 до 400 мМ [93]. Константа ионизации YFP не зависит от концентрации катионов металлов или других анионов, таких как одно- и двухвалентные фосфат, сульфат, карбонат, ацетат, глюконат или формиат. Эффект зависит от выбранного галогенид-иона, при этом самые большие значения pK_a для данных вариантов GFP наблюдались в случае фторид-иона. Наблюдается прямая пропорциональная зависимость pK_a от логарифма молярной концентрации галогенид-ионов. Данный эффект полностью обратим для всех галогенид-ионов. Авторы предположили, что галогенид-ион (или нитрат-ион) связывается около хромофора, электростатически ингибируя образование отрицательного заряда при депротонировании и, таким образом, повышая его pK_a . Поскольку протонированная форма хромофора не флуоресцирует в этих вариантах GFP, интенсивность флуоресценции может эффективно изменяться по мере изменения концентрации галогенид-иона (или нитрат-иона). Например, флуоресценция YFP уменьшается на 40% при pH 7,0 и на 60% при pH 6,4 при повышении концентрации хлорида от 0 до 150 мМ. Эти варианты YFP дают возможность определять концентрации хлорид-иона в цитоплазме или субклеточных органеллах живых клеток. С помощью флуоресцентного микроскопа об изменениях концентрации хлорид-иона можно судить в реальном времени и с разрешением в пространстве. Подобные репортеры могут быть полезны при изучении хлоридных каналов, как, например, трансмембранного регулятора муковисцидоза, который можно гетерологически экспрессировать в клеточных культурах, хлоридных насосах или других зависимых от потенциала хлоридных каналов. Эта задача осложнена тем фактом, что pH компартмента должен быть известен, но он может быть опреде-

лен некоторыми другими методами, например, с помощью индикаторных красителей или с помощью использования нечувствительных к хлориду вариантов GFP (голубой флуоресцирующий белок Y66H) в качестве pH индикатора. Поскольку нитрат-ион и хлорид-ион могут вызывать сходные эффекты, концентрация нитрата должна поддерживаться в течение эксперимента ниже 10 мМ.

В работе [99] был использован N148Q мутант YFP для создания внутриклеточного индикатора на галогенид-ионы. YFP-N148Q мутант был выбран потому, что он обладает относительно высокой чувствительностью к $[Cl^-]$ при цитоплазматическом pH. Флуоресцентное титрование YFP-N148Q показало, что pK_a в отсутствие Cl^- равно 7,14 и повышается до 7,86 в присутствии 150 мМ $[Cl^-]$. Увеличенное значение pK_a в присутствии Cl^- указывает на стабилизацию протонированной формы YFP-N148Q. При типичном для цитоплазмы значении pH 7,5 в присутствии Cl^- максимальное уменьшение флуоресценции составляет примерно 50% с $K_d=100$ мМ, при этом флуоресценция уменьшается на 10% при возрастании $[Cl^-]$ от 0 до 40 мМ. Интенсивность флуоресценции YFP-N148Q оказалась более чувствительной к I^- : максимальное падение флуоресценции составляет около 85% с $K_d=21$ мМ. Аналогичное титрование при pH 7,5 показало, что чувствительность флуоресценции YFP-N148Q ко многим анионам убывает в ряду: $F^- \sim ClO_4^- > I^- > SCN^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > \text{формиат} > \text{ацетат}$ [99]. Флуоресценция YFP-N148Q нечувствительна к сульфату, глюконату, фосфату и катионам. Селективность к анионам соотносится с лиотропным рядом: $ClO_3^- > I^- > SCN^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > \text{ацетат} > \text{сульфат} > F^-$ (ряд построен на основании энергии дегидратации ионов). Это позволяет предполагать, что более крупные ионы, имеющие более низкие энергии дегидратации, связываются более сильно в предполагаемом сайте связывания анионов. Аномально высокое связывание фторид-иона может быть результатом стерических эффектов.

Равновесное титрование, измерение флуоресценции с разрешением во времени, спектров кругового дихроизма, опыты с фотообесцвечиванием и кинетический анализ методом остановленной струи показали, что хлорид-ионы тушат флуоресценцию YFP-N148Q по статическому механизму (связывание в основном состоянии). Измерения флуоресценции с разрешением во времени показали, что время жизни возбужденного состояния равно 3,1 нс, причем оно не зависит от pH в диапазоне 6,0–8,0 и концентрации Cl^- -ионов в диапазоне 0–400 мМ. Измерение времени вращательной корреляции (13 нс) указывает на то, что хромофор в YFP-N148Q жестко зафиксирован в структуре β -бочонка. Эти результаты свидетельствуют о статическом механизме чувствительности флуоресценции YFP к хлорид-ионам, который

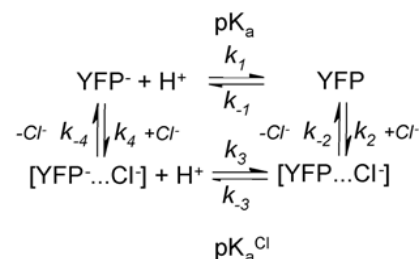


Рис. 3. Механизм взаимодействия YFP-N148Q с Cl^- , установленный из кинетических данных.

Константы скорости: $k_1 = 1,4 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$; $k_{-1} = 2,7 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$; $k_2 = 5,6 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$; $k_{-2} = 1,7 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$; $k_3 = 3,5 \times 10^6 \text{ c}^{-1}$; $k_{-3} = 2,3 \times 10^6 \text{ c}^{-1}$; $k_4 = 3,6 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$; $k_{-4} = 9,3 \times 10^6 \text{ c}^{-1}$. Относительная флуоресценция: $[\text{YFP}] = 1$; $[\text{YFP}^- \cdots \text{Cl}^-] = 0,3$; YFP и $[\text{YFP}^- \cdots \text{Cl}^- \text{H}^+] = 0$ [99].

обусловлен связыванием Cl^- с определенным участком в структуре белка. Данные абсорбционной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма (КД) также подтвердили предположение о механизме, основанном на связывании Cl^- . Параллельные изменения в поглощении и флуоресценции в зависимости от концентрации $[\text{Cl}^-]$ указывают на то, что Cl^- влияет на коэффициент молярного поглощения YFP-N148Q, а не на квантовый выход. Изменение формы спектров поглощения в присутствии хлорид-ионов также свидетельствует в пользу связывания Cl^- /YFP-N148Q в основном состоянии. КД анализ в видимой области указывает на то, что связывание аниона изменяет симметрию окружения хромофора. Кинетический анализ изменения флуоресценции методом остановленной струи показал, что флуоресценция YFP-N148Q в ответ на изменения pH и $[\text{Cl}^-]$ уменьшается по двухэкспоненциальному закону с временными константами, не превышающими 100 мс. Эти данные указывают на механизм связывания YFP-N148Q: Cl^- 1:1. Предложенная кинетическая модель состоит из четырех равновесных реакций, включающих протонирование YFP-N148Q и связывание хлорид-иона (рис. 3).

Эксперименты по фотообесцвечиванию YFP-N148Q такими тушителями триплетного состояния, как кислород, азид и Mn^{2+} , показали, что хромофор в YFP-N148Q не подвержен прямому воздействию тушителей из водной фазы. Эти данные совместно с биофизическим анализом показывают, что Cl^- влияет на флуоресценцию YFP-N148Q посредством связывания Cl^- в участке вблизи хромофора, где он изменяет электростатическое окружение и приводит к изменению кажущегося pK_a .

YFP-N148Q был экспрессирован в клетках млекопитающих (3Т3 фибробластах), чтобы проверить его пригодность в качестве клеточного индикатора Cl^- [99]. Как и для различных вариантов GFP, YFP-N148Q экспрессируется в цитоплазме и ядре с воднофазным окрашенным участком. Флуоресценция YFP-N148Q изменялась обратимо в ответ на изменения pH в отсутствие Cl^- с кажущимся значением pK_a

6,84, аналогично тому, что наблюдалось в водном растворе. Флуоресценция YFP-N148Q уменьшалась обратимо в ответ на изменения $[\text{Cl}^-]$ при pH 7,4, при этом 50% падение наблюдалось при $\sim 140 \text{ mM}$ $[\text{Cl}^-]$. Зависимость внутриклеточной флуоресценции YFP-N148Q от концентрации хлорид-ионов делает YFP-N148Q полезным в качестве чувствительного индикатора на галогенид-ионы для количественного измерения их транспорта в живых клетках. Флуоресценция YFP-N148Q изменяется быстро, обратимо и специфично по отношению к галогенид-ионам. Важным применением флуоресцирующих индикаторов на галогенид-ионы было их использование в функциональном анализе MBTR и мутациях MBTR, вызывающих муковисцидоз. MBTR выполняет функцию активируемого ц-АТФ канала, который эффективно проводит Cl^- , NO_3^- и I^- и в меньшей степени глюконат. Амплитуда изменения сигнала сравнима с изменением сигнала одного из лучших химических индикаторов на галогенид-ионы, LZQ [107]. В работе [99], благодаря высокой чувствительности и большой скорости изменения во времени флуоресценции YFP-N148Q, в ответ на внеклеточный обмен Cl^-/I^- оказалось возможным исследовать активируемый ц-АТФ транспорт хлорид-ионов через Cl^- -каналы MBTR в плазматической мембране.

Яркость флуоресценции YFP-N148Q и ее чувствительность к йодид-ионам наряду с возможностью нацеленной экспрессии делают этот индикатор чрезвычайно полезным для широкого класса прикладных задач биологии. Неинвазивное введение и прекрасная удерживаемость внутри клеток позволяют считать YFP-N148Q предпочтительным для многих исследований в сравнении с химическими индикаторами, такими как SPQ и LZQ. В качестве возможных направлений можно привести исследования муковисцидоза, главную роль в котором играет идентификация соединений, восстанавливающих нормальную проводимость галогенид-ионов в клетках, экспрессирующих ΔPhe^{508} MBTR, наиболее часто встречающуюся мутацию, вызывающую муковисцидоз. С этой целью можно было бы провести высокоэффективный скрининг библиотек соединений в клетках, экспрессирующих YFP-N148Q и ΔPhe^{508} MBTR. Аналогичным образом, используя в качестве клеток-хозяев экспрессирующие YFP-N148Q клетки, можно было бы эффективно просеять библиотеки экспрессируемых кДНК млекопитающих для поиска новых анионных каналов. Наконец, мутанты YFP перспективны для измерения концентрации галогенид-ионов и их транспорта в субклеточных органеллах.

Исчерпывающий анализ связывания галогенид-ионов с YFP был проведен в работе [108], в которой авторы проанализировали кристаллическую структуру YFP-N148Q мутанта в присутствии и отсутствие

Таблица 3.
Кажущиеся константы диссоциации ($K_{\text{каж}}$) для связывания
хлорид-иона с YFP и YFP-N148Q в зависимости от pH [108]

pH	$K_{\text{каж}}$ YFP (мМ)	$K_{\text{каж}}$ YFP-N148Q (мМ)
6,0	32,5	22,1
6,5	82,1	34,0
7,0	245	66,2
7,5	777	154,4 (23,2) ^a
8,0	$2,16 \times 10^3$	431

^a Значение в скобках — $K_{\text{каж}}$ для связывания йодид-иона с YFP-N148Q при pH 7,5.

галогенид-ионов, охарактеризовали связывание хлорид-иона в зависимости от pH и изучили специфичность YFP по отношению к различным анионам. Спектр поглощения YFP (S65G/V68L/S72A/T203Y) зависит от концентрации хлорид-ионов: при добавлении Cl^- полоса поглощения при 514 нм, соответствующая анионной форме хромофора, превращается в полосу поглощения с максимумом в районе 392 нм, соответствующую нейтральной форме хромофора, при этом наблюдается четкая изобестическая точка. Поскольку в YFP только анионная форма является флуоресцирующей, добавление хлорид-ионов приводит к обратимому уменьшению интенсивности флуоресценции, которое пропорционально уменьшению анионной полосы поглощения. Авторы определили кажущиеся константы связывания с Cl^- ($K_{\text{каж}}$) в зависимости от pH, обработав данные с использованием модели однотоочечного связывания (таблица 3).

YFP представляет собой великолепный индикатор на ионы хлора при низких pH, характерных для кислотных органелл, поскольку его $K_{\text{каж}}$ равна 32,5 мМ при pH 6,0 и 777 мМ при значениях pH 7,5, характерных для цитозоля [108]. Мутант YFP-N148Q более специфичен по отношению к хлорид-ионам и имеет $K_{\text{каж}} = 22,1$ мМ при pH 6,0 и 154 мМ при pH 7,5, аналогично результатам, полученным в работе [107]. Поэтому данный мутант предпочтителен в качестве зонда для измерения концентрации хлорид-ионов в низком миллимолярном диапазоне концентраций в области нейтральных значений pH. Связывание йодид-ионов происходит почти в 7 раз лучше по сравнению с хлорид-ионами: $K_{\text{каж}}$ для YFP-N148Q при pH 7,5 равна 23,2 мМ.

Кристаллическая структура YFP-N148Q, полученная в 100 мМ растворе йодида, содержит два связанных иона йода [108], один из которых погружен внутрь белка вблизи хромофора, а второй находится на поверхности белка вблизи Trp57 в районе крышки бочонка.

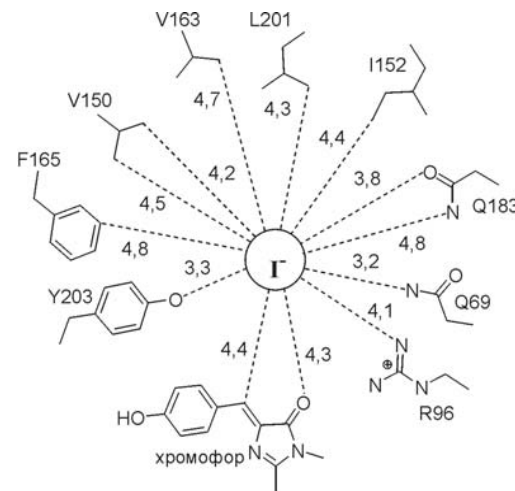


Рис. 4. Схематическое изображение всех остатков аминокислот, которые расположены в пределах 5 Å от йодид-иона, погруженного внутрь YFP-N148Q [108].

Погруженный внутрь йодид-ион расположен на расстоянии 4,3 Å от карбонильного атома кислорода гетероцикла хромофора, что объясняет наблюдаемую связь между связыванием аниона и значением pK_a . Это может быть объяснено с электростатической точки зрения. Йодид-ион, связываясь в YFP-N148Q на расстоянии ван-дер-ваальсова контакта с карбонильным кислородом хромофора, подавляет делокализацию фенолятного отрицательного заряда по структуре хромофора. Таким образом, анионное состояние хромофора дестабилизируется, и pK_a увеличивается. Структура, полученная в 200 мМ растворе хлорида, не содержит галогенид-ионов вообще [108]. Содержащая йодид-ион полость в YFP-N148Q амфифильна по природе. С одной стороны она состоит из полярных и заряженных групп (Tyr203, хромофор, Arg96, Gln69, Gln183), а с другой стороны, из гидрофобных остатков (Ile152, Leu201, Val163, Val150, Phe165) (рис. 4). Йодид — это довольно большой, мягкий ион, который легко поляризуется и, следовательно, хорошо подходит для взаимодействия с амфифильным окружением. В целом, йодид-связывающий сайт, обнаруженный в YFP-N148Q, обладает характеристиками, многие из которых обычно встречаются в сайтах связывания галогенид-ионов других белков [109, 110]. Ароматические участки остатков тирозина или триптофана могут быть вовлечены в дальнейшие полярные взаимодействия.

Объем внутренней полости в апо-структуре YFP-N148Q (55 Å³) существенно меньше размера этой полости после связывания йодид-иона (91 Å³). Таким образом, необходимы конформационные изменения внутри связывающего кармана, чтобы увеличить объем полости для связывания достаточно объемных галогенид-ионов. Самое боль-

шое движение наблюдается для Gln69, боковая амидная группа которого отклоняется на 2,6 Å. Боковые группы всех неполярных аминокислот внутри полости, Leu201, Ile152, Val150 и Val163, претерпевают движения, чтобы увеличить размер полости в присутствии йодид-иона. Ароматическое кольцо Phe165 поворачивается примерно на 25°. Гидроксильная группа фенола Tyr203 сдвигается на 0,6 Å по направлению к йодид-содержащей полости, вероятно, чтобы усилить водородную связь с галогенид-ионом. Эта водородная связь, по-видимому, имеет первостепенное значение для создания высокоаффинного галогенид-связывающего участка. Хромофор также сдвигается в сторону галогенида, улучшая ароматические взаимодействия с анионом. Таким образом, необходимы конформационные изменения в структуре белка, чтобы он смог вместить в себя объемные галогенид-ионы. Эти изменения могут быть достигнуты только в YFP вариантах, а не в GFP дикого типа, его S65T мутанте или других вариантах, отличных от YFP [108]. Рассчитанные с помощью зондов объемы полостей в приближении сферы составляют 21 Å³ в GFP дикого типа, 19 Å³ в S65T мутанте GFP, 16 Å³ в YFP и YFP-H148G. Полость в апо-структуре YFP-H148Q несколько больше (55 Å³) и расширяется по направлению к хромофору. По сравнению с YFP объем полости в YFP-H148Q увеличен за счет небольших движений атомов боковых цепей, выстилающих связывающий карман, и легкого движения самого хромофора. Многие из этих остатков претерпевают дальнейший сдвиг при связывании йодид-иона. Полости расположены в одном и том же месте для всех перечисленных вариантов GFP. GFP дикого типа и S65T-GFP не связывают галогенид-ионы, а все варианты YFP — связывают. Большой объем полости может быть отчасти ответственным за более прочное связывание йодида YFP-H148Q по сравнению с YFP. Данные по размеру полости согласуются с моделью, в которой только варианты YFP способны претерпевать необходимую для связывания анионов корректировку. Внутри ряда различных YFP размер полости в апо-белке влияет на относительную силу связывания. Введение мутации H148Q в YFP в отсутствие галогенид-ионов и связывание йодид-иона с YFP-H148Q приводят к структурным корректировкам β-тяжей 7 (остатки 143–154) и 8 (остатки 160–171).

Связывание аниона в полости, находящейся внутри белка, требует замещения взаимодействий между ионом и растворителем на взаимодействия между ионом и белком. Относительные энергии связывания одновалентных анионов с YFP (табл. 4) и YFP-H148Q [107] соотносятся с энергиями их гидратации, что указывает на важный вклад сил гидратации в связывание ионов. Многоатомные одновалентные анионы и йодид-ион обладают относительно слабыми энергиями гидратации, в то время как другие галогениды взаимодействуют более сильно с водой.

Таблица 4.
Связывание анионов с хромофором YFP в порядке
уменьшения силы взаимодействия [108]

Взаимодействующие анионы		K ₁ (мМ) ^a	K ₂ (мМ) ^a
Фторид	F ⁻	0,214 (0,009)	301 (64)
Тиоцианат	SCN ⁻	1,37 (0,02)	большой ^b
Перхлорат	ClO ₄ ⁻	1,46 (0,36)	175 (11)
Нитрит	NO ₂ ⁻	2,12 (0,40)	273 (200)
Йодид	I ⁻	2,46 (0,11)	325 (64)
Нитрат	NO ₃ ⁻	4,44 (0,25)	большой ^b
Хлорид	Cl ⁻	4,69 (0,17)	288 (40)
Формиат	HCOO ⁻	7,47 (0,004)	большой ^b
Бромид	Br ⁻	7,76 (1,00)	280 (126)
ТФК	CF ₃ COO ⁻	21,2 (3,7)	большой ^b

^a Значение в скобках — нижняя оценка стандартного отклонения, как определено Kaleidagraph™.

^b Данные константы связывания нельзя определить, поскольку они выходят за рамки измерений и, по-видимому, находятся в молярном диапазоне.

В случае YFP взаимодействие с белком, в целом, увеличивается при уменьшении энергии гидратации, за исключением лишь фторид-иона, которому, возможно, не надо быть полностью дегидратированным при связывании с белком ввиду его малого размера. Другим фактором, вносящим вклад в анионную селективность, может быть электростатическая конфигурация многоатомных анионов, таких как нитрит, перхлорат и тиоцианат, в которых делокализация отрицательного заряда на нескольких атомах может улучшить связывание благодаря координации с несколькими белковыми группами (гуанидиновая группа Arg96 и боковые цепи Gln69, Gln183 и Tyr203). Наконец, размер аниона также должен играть важную роль, потому что сайт связывания погружен внутрь белка. Таким образом, полученные данные подтверждают модель, в которой моноанионы связываются с одним и тем же участком, находящимся вблизи хромофора и Arg96, единственного положительного заряда в GFP, погруженного внутрь белка [108].

Результаты мутационного реверсивного анализа [108] показали, что обратная замена тирозина 203 на треонин, как в белке дикого типа, приводит к значительному уменьшению (примерно на 2 ккал/моль) энергии связывания галогенид-ионов (табл. 5). Это уменьшение находится в пределах энергии одной водородной связи. В структуре YFP-

Таблица 5.

Микроскопические константы диссоциации для связывания хлорида и йодида с YFPs и его ревертантами [108]

Вариант	Замены аминокислот	K_1 (мМ) ^a для Cl ⁻	K_1 (мМ) ^a для I ⁻	pK_a^b
YFP	S65G/V68L/S72A/T203Y	4,69 (0,17)	2,46 (0,11)	5,4
Ревертант 1	S65G/S72A/T203Y	13,2 (0,34)	3,04 (0,11)	5,8
YFP-N148Q	S65G/V68L/S72A/N148Q/T203Y	28,4 (5,1)	2,68 (0,11)	6,7
YFP-N148G	S65G/V68L/S72A/N148G/T203Y	82,8 (18,3)	15,73 (2,6)	7,5
Ревертант 2	S65G/V68L/S72A	153 (26)	117 (16)	6,4

^aЗначение в скобках — нижняя оценка стандартного отклонения, определенного Kaleidagraph™.

^bЗначение pK_a хромофора определено по поглощению в отсутствие взаимодействующих анионов, таких как хлорид (буфер содержит или Hepes или Pipes, 150 мМ глюконат).

N148Q со связанным йодид-ионом тирозин 203 образует водородную связь со связанным галогенид-ионом. По-видимому, фенольный диполь тирозина 203 ответственен не только за связывание аниона. Напряжение в белковой упаковке за счет введения объемной боковой цепи при замене T203Y может облегчить расширение белкового бочонка или другие конформационные изменения при связывании аниона, тогда как энергетические затраты на расширение или переупаковку белка могут быть слишком большими в случае GFP дикого типа или S65T мутанте GFP.

Сильная зависимость pK_a хромофора от связывания аниона может быть объяснена связанным равновесием, которое рассматривает взаимодействие между двумя различными лигандами: анионом, который связывается вблизи имидазolidонового конца вблизи аргинина 96, и протоном, который связывается в области фенольного конца хромофора. Данные кристаллографического анализа свидетельствуют в пользу одного сайта связывания для аниона и одного сайта связывания для протона [108]. На константу связывания аниона влияет количество связавшихся протонов и наоборот. Имеет место положительная кооперативность, поскольку связывание аниона облегчает связывание протона, повышая значение pK_a хромофора. В такой простой системе с одним сайтом связывания для каждого из двух лигандов можно определить микроскопические константы связывания, K_1 для связывания аниона, когда протон присутствует (низкие pH), и K_2 для связывания аниона, когда протон отсутствует (высокие pH). Значения констант можно определить из уравнения:

$$pK_a = \log \left\{ \frac{(K_1 + [Cl^-])}{K_1} \right\} - \log \left\{ \frac{(K_2 + [Cl^-])}{K_2} \right\} + pK_a^0,$$

где pK_a^0 представляет собой значение pK_a хромофора в отсутствие взаимодействующих ионов. Рассчитанные значения микроскопических констант для разных вариантов YFP суммированы в таблицах 4, 5.

Наиболее сильное связывание в исследованном ряду наблюдается для фторид-иона ($K_1 = 0,214$ мМ), а самое слабое — для трифторуксусной кислоты ($K_1 = 21,2$ мМ). Было найдено, что формиат также изменяет pK_a хромофора ($K_1 = 7,47$ мМ). Как и ожидалось, связывание аниона с депротонированным хромофором нежелательно: значения K_2 существенно больше, чем K_1 (табл. 4). Двухвалентные анионы, такие как фосфат и сульфат, и более крупные одновалентные анионы, такие как глюконат, Hepes, Pipes, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота и трихлоруксусная кислота, по-видимому, не взаимодействуют с YFP. Такие более мелкие одновалентные анионы, как фосфорная кислота, бикарбонат и ацетат, также не взаимодействуют.

Было бы весьма интересно создать зонды, высокоспецифичные к хлорид-ионам с прочным связыванием при физиологических значениях pH. Повышение pK_a хромофора для создания физиологически значимых зондов обычно приводит к потере энергии связывания (табл. 5). Поскольку хлорид-ион меньше и менее поляризуем, чем йодид, повышенная селективность может быть достигнута уменьшением объема связывающего сайта и введением большего потенциала для связывания посредством водородных связей. Одним из таких подходов может быть введение полярных остатков с более длинной боковой цепью в неполярную стену полости, как, например, замена валина 150 и 163 на глутамин, серин, треонин или аспарагин. Другим способом повысить аффинность может быть замена глутамина 69 на аспарагин, что сокращает необходимость структурных перестановок при связывании [108].

Низкая чувствительность флуоресценции YFP-N148Q к хлорид-ионам ($K_d > 100$ мМ) существенно ограничивает его применимость для измерений концентрации клеточного Cl⁻ и исследования его транспорта. Вследствие отрицательного внутреннего потенциала клеточной мембраны концентрация хлорид-ионов в цитоплазме обычно не превышает 40 мМ, и, хотя информация по этому вопросу отсутствует, вряд ли концентрация хлорид-ионов намного выше в органеллах эндосомальных и секреторных компартментов. Обмен NO₃⁻ на Cl⁻ является предпочтительным подходом к измерению транспорта галогенид-ионов, опосредованного регулятором муковисцидоза (MBTR), или муковисцидозным трансмембранным регулятором.

Однако чувствительность YFP-H148Q к Cl^- и NO_3^- мала. Поэтому возникает необходимость в более селективных индикаторах на галогенид-ионы, которые можно использовать для измерения концентрации хлорид-ионов внутри клеточных органелл и транспорта галогенидов через клеточные мембраны, особенно в контексте поиска лекарств путем высокоэффективного скрининга. Свойства индикаторов можно улучшить путем введения точечных мутаций. В работе [100] авторы создали библиотеки YFP-H148Q (S65G/V68L/S72A/T203Y/H148Q), в которых пары остатков в полости связывания галогенидов были подвергнуты случайному мутагенезу. Случайные мутации были введены в шести гидрофобных остатках, образующих сайт связывания галогенид-ионов в YFP-H148Q (Val 150 и Ile 152, Val 163 и Phe165, Leu 201 и Tug 203), чтобы попытаться модифицировать полярность и/или размер полости и, таким образом, аффинность связывания. Анализ 1536 клонов обнаружил мутанты с улучшенной чувствительностью к Cl^- , I^- и NO_3^- : мутант I152L имел K_d 2 мМ для йодид-иона и K_d 10 мМ для нитрат-иона, а мутант V163S имел K_d 40 мМ для хлорид-иона. Данные мутанты были охарактеризованы (табл. 6), а их пригодность для анализа *in vivo* была продемонстрирована в трансфицированных клетках 3Т3 фибробластов, экспрессирующих хлоридный канал муковисцидозного трансмембранного регулятора (человеческий MBTR дикого типа).

Константы диссоциации определялись из данных флуоресцентного титрования по уравнению

$$F = b - \frac{a[X^-]}{(K_d + [X^-])},$$

где $[X^-]$ — концентрация галогенида, $1 - a/b$ — доля уменьшения флуоресценции при высоких $[X^-]$.

Значения pK_a определялись по уравнению

$$F = A + \frac{B}{[1 + 10^{(pK_a - pH)n_H}]},$$

где n_H — коэффициент Хилла.

Для I152L pK_a равно 6,95 в отсутствие хлорид-ионов, при 75 мМ и 150 мМ $[\text{Cl}^-]$ значение pK_a составило 7,70 и 7,89, соответственно. Для V163S pK_a увеличилось от 7,27 при 0 мМ $[\text{Cl}^-]$ до 7,97 при 75 мМ $[\text{Cl}^-]$ и 8,8 при 150 мМ $[\text{Cl}^-]$.

Мутант I152L, который обладал лучшей чувствительностью к йодид- и нитрат-ионам, был введен в вектор экспрессии клеток млекопитающих, чтобы проверить его применимость для измерения анионного обмена в клетке. Кратковременная трансфекция 3Т3 фибробластов, экспрессирующих MBTR, сопровождалась появлением

Таблица 6.
Флуоресцентные свойства очищенных мутантов YFP [100]

	YFP-H148Q	YFP-H148Q V150T	YFP-H148Q I152L	YFP-H148Q V163S
Чувствительность к галогенид-ионам и pK_a^a				
K_{Cl} (мМ)	106	258	85	39
K_{Br} (мМ)	100	145	25	82
K_{NO_3} (мМ)	36	91	10	51
K_{I} (мМ)	11	11	1,9	62
K_{F} (мМ)	2,7	10	2,3	0,85
pK_a	6,70	7,55	6,92	7,23
Флуоресцентные свойства				
ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	71000	43500	52200	45300
Φ	0,59	0,63	0,60	0,59
$\tau_{\text{ф}}$ (нс)	3,1	2,9	2,8	3,4
Кинетика связывания хлорид-YFP				
$\tau_{\text{асс}}$ (мс)	286	190	54	1932
$\tau_{\text{дисс}}$ (мс)	280	237	55	2138

^a Аффинность к галогенид-ионам (K_d) и значения pK_a для очищенных мутантов YFP-H148Q были измерены. Приведены коэффициенты молярного поглощения (ϵ), квантовые выходы (Φ), наносекундные времена жизни флуоресценции ($\tau_{\text{ф}}$) и экспоненциальные константы времени для ассоциации ($\tau_{\text{асс}}$) и диссоциации ($\tau_{\text{дисс}}$) YFP- Cl^- .

клеток с яркой флуоресценцией цитоплазмы и ядра. Замена 20 мМ Cl^- на I^- привела к медленному падению флуоресценции, обусловленной базальной MBTR активностью, которая быстро увеличивалась при добавлении форсколина, активатора аденилатциклазы. Максимальное уменьшение флуоресценции ($53 \pm 2\%$) значительно превысило изменение, наблюдающееся при использовании YFP-H148Q ($<10\%$). Поскольку I152L мутант обладает значительной чувствительностью к нитрат-ионам, была изучена MBTR активность при использовании $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ протокола. Эти эксперименты также показали, что I152L мутант намного более чувствителен по сравнению с исходным YFP-H148Q. Замена 100 мМ Cl^- на NO_3^- в клетках, трансфицированных I152L мутантом YFP-H148Q, привела к уменьшению флуоресцентного сигнала на $53 \pm 4\%$ [100].

Таким образом, были обнаружены мутанты с существенно большей чувствительностью к йодид- и нитрат-ионам по сравнению с YFP-H148Q, что позволило измерить клеточный транспорт галогенидов путем $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ обмена или Cl^-/I^- обмена с использованием

низких концентраций йодид-иона. Ряд селективности мутантов I152L и V150T к галогенид-ионам совпадает с другими вариантами YFP. Значительное увеличение аффинности к йодид-ионам в I152L мутанте обусловлено, вероятно, стерическим эффектом — небольшое изменение в размере полости позволяет намного лучше вместить большой I^- -анион. Необычный ряд чувствительности мутанта V163S к галогенид-ионам (хлорид > нитрат > йодид > бромид), может быть объяснен более выраженным гидрофильным окружением в связывающем кармане. Относительно медленная кинетика связывания и диссоциации хлорид-иона свидетельствует об увеличении энергетического барьера, что согласуется с данными о конформационных изменениях в анион-связывающей полости. С точки зрения биологического применения, можно надеяться, что V163S позволит измерять концентрацию хлорид-ионов в органеллах эндосомальных и секреторных путей, в которых $[Cl^-]$, как предсказано, составляет ~25–40 мМ, что находится вблизи $K_d = 39$ мМ для V163S мутанта, и намного меньше, чем $K_d > 100$ мМ для YFP-N148Q. Другой интересной задачей может быть исследование регуляции концентрации хлорид-ионов при изменении pH, что потребует создания химерных индикаторов на основе GFP, в которых будут измеряться параллельно pH и $[Cl^-]$.

VII. СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ GFP ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

Ca^{2+} -СЕНСОРЫ

Концентрация ионов кальция (Ca^{2+}) является внутриклеточным сигналом, ответственным за контролирование многочисленных клеточных процессов. Клетки в состоянии покоя имеют концентрацию кальция 100 нМ, но при активации повышение его уровня может достигать 1000 нМ. Универсальность кальция в качестве внутриклеточного посредника определяется его огромной изменчивостью. Эта изменчивость возникает из-за использования клетками громадного набора сигнальных компонентов, которые могут быть смешаны и подобраны таким образом, чтобы создать широкий диапазон пространственных и временных сигналов, обеспечивающих разнообразие механизмов кальциевой сигнализации, различающихся по скорости, амплитуде и пространственно-временным соотношениям. Эта изменчивость используется для контроля процессов оплодотворения, размножения, развития, обучаемости и памяти, мышечного сокращения и секреции. При этом необходимо учитывать высокую токсичность кальция. Превышение его нормальных концентраций во времени и пространстве может привести к гибели клеток, как в результате некроза, так и путем апоптоза [111, 112].

Наиболее часто используются несколько методов контроля за внутриклеточным Ca^{2+} . Селективные Ca^{2+} -микроэлектроды дают возможность кумулятивных измерений потоков Ca^{2+} в ограниченном числе клеток. С другой стороны, концентрационную динамику внутриклеточного Ca^{2+} в больших популяциях клеток можно визуализировать с помощью флуоресцентных комплексонов [113] или фотобелка акворина [114]. Комплексоны легко визуализируются, но их трудно пометить для специфической клеточной локализации, и они постепенно вытекают из клеток, особенно при высоких температурах. Генетически закодированные индикаторы обеспечивают новые методы для мониторинга Ca^{2+} . Генетически экспрессированный акворин можно пометить для специфической клеточной локализации, но он требует введение кофактора коэлютеразина для излучения света, и его очень трудно визуализировать, поскольку его люминесценция намного слабее, чем флуоресценция.

В литературе сообщается о многочисленных применениях генетических индикаторов на кальций, созданных на основе GFP. Индикаторы на основе GFP имеют преимущество над чувствительными к Ca^{2+} флуоресцентными красителями (см. раздел о внутриклеточных pH сенсорах). Недостатки таких индикаторов связаны с необходимостью проведения трансфекции, недостаточно широким динамическим диапазоном измерений. Кроме того, лежащие в основе многих индикаторов кальций-чувствительные домены (например, кальмодулин и M13) могут проявлять свою собственную биологическую активность [1].

Конструкции GFP-сенсорных систем для определения Ca^{2+} можно классифицировать разными способами. По природе Ca^{2+} -чувствительного домена сенсоры делятся на три основные группы: на основе кальмодулина [75, 76, 115–120], на основе тропонина [121], на основе акворина [122]. По принципу действия их можно разделить на сенсоры, основанные на Ферстеровском переносе энергии, и на сенсоры, в основе которых лежит изменение флуоресценции одиночной молекулы циклически переставленного варианта GFP, происходящее в результате его конформационного изменения (табл. 7).

Индикаторы на основе кальмодулина с использованием FRET (хамелеоны)

Флуоресцентные белковые индикаторы на ионы кальция, «хамелеоны», были созданы с целью объединить преимущества молекулярного биологического нацеливания и флуоресцентного считывания информации [75]. Хамелеоны — это химерные белки, состоящие из голубого или цианового мутанта зеленого флуоресцирующего белка (GFP), кальций-связывающего белка кальмодулина (CaM), глицил-

Таблица 7.
Ca²⁺-сенсоры, созданные на основе различных вариантов GFP¹

Название	Конструкция сенсора ² (последовательность от N конца к C концу)	Сигнал на Ca ²⁺ (динамический диапазон)	Аффинность к Ca ²⁺ (коэфф. Хилла)	Комментарии	Ссылка
1	2	3	4	5	6
На основе кальмодулина (CaM)					
Cameleon	(BFP или CFP)-CaM-глициллициновый линкер-M13-(GFP или YFP)	Увеличение эффективности FRET от (BFP или CFP) к (GFP или YFP)	Модулируется мутациями в Са-связывающих петлях СаМ	BFP-самый темный и наиболее подвержен фотообесвечиванию, требует УФ-возбуждения	[75, 76]
YC (Yellow Cameleon)	ECFP-GFP-F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A/N164H)-CaM-глициллициновый линкер-M13-EYFP(GFP-S65G/S72A/T203Y)	Увеличение эффективности FRET от ECFP к EYFP (возбуждение около 430 нм, R _{exc} /R _{min} = 1,38/475 nm)	-/-	Сигнал растет с pH в физиологическом диапазоне (pK _{EYFP} 6,9)	[75]
YC2	-/- Интактный СаМ -/-	-/- R _{exc} /R _{min} = 1,6 <i>in vivo</i>	Высокая	-/- Для работы в области 0,1-10 мкМ [Ca ²⁺]	[75]
YC3	-/- СаМ-E104Q -/-	-/- R _{exc} /R _{min} = 1,7 <i>in vivo</i>	Низкая	-/- Для работы в области 1-400 мкМ [Ca ²⁺] (эндоплазматический ретикулум)	[75]
YC4	-/- СаМ-E31Q -/-	-/- R _{exc} /R _{min} = 1,4 <i>in vivo</i>			
YC2.1	-/- Интактный СаМ -/- EYFP-V68L/Q69K	-/- Возбуждение при 432 нм R _{exc} /R _{min} = 1,6-2,0 <i>in vivo</i> R _{exc} /R _{min} = 1,8-2,2 <i>in vitro</i>	K _d = 100 нМ (1,8) и 4,3 мкМ (0,6). Рабочий диапазон 0,01-100 мкМ [Ca ²⁺]	Уменьшена чувствительность к pH в физиологическом диапазоне за счет снижения pK _{EYFP} до 6,1	[76, 115]

см. продолжение табл. 7

1	2	3	4	5	6
YC3.1	-/- СаМ-E104Q -/- EYFP-V68L/Q69K	-/- Возбуждение при 432 нм R _{exc} /R _{min} = 1,6-2,0 <i>in vivo</i> R _{exc} /R _{min} = 1,8-2,2 <i>in vitro</i>	K _d = 1,5 мкМ (1,1) Рабочий диапазон 0,5-100 мкМ [Ca ²⁺]	Уменьшена чувствительность к pH в физиологическом диапазоне за счет снижения pK _{EYFP} до 6,1	[76]
Расщепленный YC2.1	Эквимоллярная смесь ECFP-СаМ и M13-EYFP-V68L/Q69K	-/- R _{exc} /R _{min} = 2,5 <i>in vivo</i> R _{exc} /R _{min} = 4 <i>in vitro</i>		-/- Подверженность кросс-реакциям со свободным СаМ и его партнерами. Часто наблюдается неравномерное распределение ECFP-СаМ и M13-EYFP-V68L/Q69K между ядром и цитозолем	[76]
FIP-CB _{8M}	RSGFP(GFP-F64M/S65G/Q69L) - TSSRRKWNKTGHAVRAIGRLSSTGA ³ -BFP(GFP-V66H)	Уменьшение эффективности FRET от GFP-Y66H к RSGFP (возбуждение при 380 нм, R _{exc} /R _{min} = 1,7/0,3 <i>in vitro</i>)	K _d = 0,4 нМ ⁴ . Рабочий диапазон 50 нМ - 1 мкМ [Ca ²⁺]	Система реагирует на кальций, связанный кальмодулином, а не на свободный кальций. Не чувствителен к pH в диапазоне 7,0-8,0	[123, 136]
YC6.1 (второе поколение cameleon)	ECFP-(N-CaM)-GG-CKKp-GG-(C-CaM)-EYFP	Возбуждение при 432 нм. Увеличение эффективности FRET (R _{exc} /R _{min} = 2,50/1,18 <i>in vivo</i>)	K _d = 110±6 нМ. Рабочий диапазон 0,05-1 мкМ [Ca ²⁺]	Увеличение динамического диапазона по сравнению с YC2.1 и YC3.1 за счет уменьшения на 20Å расстояния между донором (ECFP) и акцептором (EYFP) при связывании кальция	[115]
YC3.12	ECFP _{ΔC11} -(СаМ-E104Q)-глициллициновый линкер-M13-Venus ⁷	Возбуждение при 440 нм. Увеличение эффективности FRET (R _{exc} /R _{min} = 1,69/0,89 <i>in vivo</i>) R _{exc} /R _{min} = 1,8/0,87 <i>in vitro</i>	K _d = 1,5 мкМ	Индикатор с использованием особенно ярких вариантов YFP, быстрее созревает, слабо чувствителен к pH аналогично YC3.1	[116, 125]

см. продолжение табл. 7

продолжение табл. 7

1	2	3	4	5	6
YC3.60	-/- - cp173Venus^8	-/- $R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 8,06/1,37$ <i>in vivo</i> $R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 9,3/1,4$ <i>in vitro</i>	$K_{\text{с}} = 250$ нМ (1,7)		
YC2.60	-/- - Интактный CaM -/-	-/- Динамический диапазон такой же высокий, как для YC3.60	$K_{\text{с}} = 40$ нМ (2,4)		[116]
YC4.60	-/- - CaM-E31Q -/-	-/- Динамический диапазон составляет 64% от YC3.60	$K_{\text{с}} = 58$ нМ (1,7) и 14,4 мкМ (0,9)		
Camgargo-1	Состоит из циклически переставленного EYFP с вставкой CaM вместо Y145; EYFP(1-144)-GGT-CaM-EL-EYFP(146-238)	Увеличение амплитуды флуоресценции (около 510 нм) и возбуждения (около 490 нм) вплоть до 7 раз <i>in vitro</i> и до 8 раз <i>in vivo</i>	$K_{\text{с}} = 7$ мкМ (1,6) (при pH 7,5)		[117]
Camgargo-2	Получен из camgargo-1 заменой Q69M в EYFP	-/- Увеличение флуоресценции до 7 раз <i>in vitro</i> , до 6 раз <i>in vivo</i>	$K_{\text{с}} = 5,3 \pm 0,3$ мкМ (1,24)		[118]
YC2.3	ECFP-CaM-M13-Цитрин ⁹	Увеличение эффективности FRET от ECFP к цитрину (возбуждение около 430 нм, $R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 2$ <i>in vivo</i>)	Высокая, аналогично YC2 и YC2.1		
YC3.3	ECFP-(CaM-E104Q)-M13-Цитрин	$R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 1,6$ <i>in vitro</i> при pH 7,25	$K_{\text{с}} = 1,5$ мкМ, аналогично YC3 и YC3.1		[118]

см. продолжение табл. 7

продолжение табл. 7

1	2	3	4	5	6
YC3.2	Аналог YC3.1 с циклически переставленным ECFP: ECFP(145-238)-GGTGGG-ECFP(1-144)-CaM-E104Q)-GG-M13-EL-(EYFP-V68L/Q69K)	Увеличение эффективности FRET ($R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 1,15$)	Аналог YC3.1		[117]
G-CaMP	Состоит из циклически переставленного EGFР: M13-LE-EGFP(149-238)-GGTGGG-EGFP(1-144)-TR-CaM(2-148)	Увеличение амплитуды флуоресценции (509 нм) и возбуждения (489 нм) вплоть до 4,5 раз <i>in vitro</i>	$K_{\text{с}} = 235$ нМ (3,3) (при pH 7,5)		[119]
«Flash-pericam»	M13-SAG-EYFP(145-238)-GGSGG-EYFP(1-144)-GTG-(CaM-E104Q), где EYFP содержит мутации V68L/Q69K/V163A/S175G/Y203H ¹⁰	Увеличение интенсивности флуоресценции при возбуждении около 490 нм ($R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 8$ <i>in vitro</i>)	$K_{\text{с}} = 0,7$ мкМ (0,7)		[120]
«Ratiometric-pericam»	M13-SAG-EYFP(145-238)-VDGSGGTG-EYFP(2-144)-GT-(CaM-E104Q), где EYFP содержит мутации F64L/V68L/Q69K/V163A/S175G/H148D/Y203F	Увеличивается отношение возбуждения эмиссии при 494 нм к возбуждению при 415 нм ($R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 10$ <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>)	$K_{\text{с}} = 1,7$ мкМ (1,1) (определено по зависимости от Ca^{2+} соотношения возбуждений 494/415 нм)		[120]
«Inverse-pericam»	M13-SAG-EYFP(145-238)-VDGSGGTG-EYFP(2-144)-GT-(CaM-E104Q), где EYFP содержит мутации F64L/V68L/Q69K/V163A/S175G/H148T/Y203F	Уменьшение интенсивности флуоресценции при возбуждении около 500 нм ($R_{\text{наес}}/R_{\text{наес}} = 0,15$ <i>in vitro</i>)	$K_{\text{с}} = 0,2$ мкМ (1,0)		[120]

см. продолжение табл. 7

окончание табл. 7

1	2	3	4	5	6
«Split-reporter»	Получен из «Flash-reporter» разрезанием по GGSGG-линкеру. Два белка экспрессируются совместно	Появление флуоресценции при обратной ассоциации M13 и CaM		Иллюстрация того, что циклически переставленные варианты GFP могут использоваться для детектирования межмолекулярных взаимодействий. Не является достоверным Ca-сенсором, т.к. подвержен кросс-реакциям с CaM и CaM-связывающими белками клеток	[120]
На основе тропонина C (TnC)					
TN-L15 (или S-Troponin)	GFP-(csTnC-L15)-Цитрин, где csTnC-L15 – последовательность тропонина C из скелетной мышцы человека, в которой удалены 1-14 аминокислоты	Увеличение эффективности FRET от GFP к цитрину (возбуждение при 432 нм, $R_{528/476}^{exc}$). $R_{max}/R_{min}=2,4$ <i>in vitro</i> $R_{max}/R_{min}=2$ <i>in vivo</i> ¹³	$K_d^{Ca}=1,2$ мМ (определена в присутствии 1 мМ магния); $K_d^{Mg}=2,2$ мМ. Аффинность к Ca и Mg можно менять мутациями в TnC	Минимальное влияние системы клеточной регуляции белков. Улучшенные свойства субклеточного нацеливания по сравнению с YC. Чувствительны к ионам магния. В диапазоне pH 6,8-7,3 стабильны, но сигнал уменьшается при pH ниже 6,8	[121]
TN-humTnC (или C-Troponin)	GFP-humTnC-Цитрин, где humTnC – тропонин C из сердечной мышцы человека	-/- $R_{max}/R_{min}=2,2$ <i>in vitro</i> $R_{max}/R_{min}=1,7$ <i>in vivo</i>	$K_d^{Ca}=470$ нМ (определена в присутствии 1 мМ магния); $K_d^{Mg}=0,5$ мМ. -/-		
На основе акворина					
GFP-акворин биологические Ca ²⁺ -репортеры системы (pG _i A, где i=1-5 – число линкеров)	EGFP(GFP-F64L/S65T/V163A)-линкер из 5-50 аминокислот-акворин	Увеличение эффективности BRET (отношения эмиссии EGFP при 500 нм к эмиссии акворина при 450 нм)	G5A дает значительный сигнал над фоном уже при 38 нМ [Ca ²⁺]	Увеличение в 19-65 раз биологической активности после индукции кальцием благодаря стабилизации акворина в химерном белке с GFP. Большая чувствительность к кальцию по сравнению с одиночным акворинном	[122]

Примечания к табл. 7.

¹ Знак -/- означает повтор того, что было в предыдущем случае; $R_{528/476}^{nm}$ – отношение интенсивностей флуоресценции при 528 и 476 нм; R_{min} – сигнал (в случае FRET сигналом является отношение эмиссии акцептора к эмиссии донора при возбуждении донора) при нулевой концентрации кальция; R_{max} – сигнал при насыщающей концентрации кальция.

² В конструкции перечислены основные функциональные компоненты сенсора; последовательности, облегчающие выделение белка (His₆-последовательность), придающие сенсорам улучшенную экспрессию в клетках млекопитающих (Kozak последовательность) или внутриклеточную локализацию, не указаны ввиду большого их разнообразия. Для описания линкерных последовательностей использовано однобуквенное обозначение аминокислот.

³ По данным работы [115] для YC2.1 *in vivo* $R_{min}=1,17$, $R_{max}=1,66$.

⁴ По данным работы [115].

⁵ Жирным шрифтом выделена CaM-связывающая последовательность из птичьей киназы легкой цепи миозина гладкой мышцы (CaM-binding sequence from avian smooth muscle myosin light chain kinase).

⁶ K_d определена для связывания индикатора с комплексом (Ca²⁺)₄-кальмодулин.

⁷ Venus – более яркий и быстрее созревающий мутант YFP [125].

⁸ Cp173Venus – циклически переставленный вариант YFP Venus, в котором первоначальные N- и C-концы соединены линкером GGSGG, а новые концы введены в положении 173.

⁹ Цитрин (GFP-S65G/V68L/Q69M/S72A/T203Y) менее чувствительный к окружению вариант EYFP, в котором, благодаря замене Q69M, pK_a снижено до 5,7, нечувствителен к хлориду, в два раза более фотостабилен по сравнению с предыдущими вариантами EYFP, значительно лучше экспрессируется при 37 °C и в органеллах. Пик возбуждения при 516 нм, эмиссии при 529 нм, квантовый выход 0,76, коэффициент молярного поглощения $7,7 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ [118].

¹⁰ Для всех «перикамов» жирным шрифтом выделена ключевая замена в последовательности EYFP.

¹¹ Для всех «перикамов»: $\lambda_{полг.}$ – длина волны максимума в спектре поглощения, в скобках – коэффициент молярного поглощения в единицах 10³ M⁻¹cm⁻¹; $\lambda_{эмис.}$ – длина волны максимума в спектре излучения, в скобках – квантовый выход флуоресценции; данные свойства, а также K_d были измерены при pH 7,4.

¹² Для сравнения, максимально полученное изменение отношения $R_{max}/R_{min}=1,7$ для YC2.1 в данных условиях [121].

глицинового линкера, CaM-связывающего домена киназы легкой цепи миозина (пептид M13) и зеленого или желтого варианта GFP [75, 76]. Связывание ионов кальция с CaM инициирует внутримолекулярное связывание CaM и M13. Происходящий в результате этого переход от протяженной к более компактной конформации увеличивает эффективность индуктивно-резонансного переноса энергии от коротковолновых (BFP, CFP) к длинноволновым (GFP, YFP) вариантам GFP. Такие конструкции были названы хамелеонами, потому что они изменяют цвет в зависимости от окружения и имеют длинный

«язык» (M13), который втягивается внутрь и вытягивается наружу кальмодулинового рта [3]. Поскольку голубой мутант GFP оказался наименее ярким и наиболее легко обесцвечиваемым из всех белков GFP, и для возбуждения его флуоресценции необходимо ультрафиолетовое излучение, которое одновременно возбуждает собственную флуоресценцию клеток, исходные синий и зеленый мутанты были заменены на улучшенные циановый (ECFP – F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A/N164H мутант GFP) и желтый (EYFP – S65G/S72A/T203Y мутант GFP) флуоресцирующие белки, соответственно [75], чтобы получить «желтый хамелеон» (YC). Хамелеоны можно генетически маркировать сигналами внутриклеточной локализации и регистрировать с помощью микроскопии одно- или двухфотонного возбуждения. Аффинность YC к ионам кальция можно изменять посредством мутаций в Ca^{2+} -связывающей петле кальмодулина, поэтому они подразделяются на несколько групп в зависимости от состава их Ca^{2+} -чувствительного домена. Например, YC2 содержит интактный кальмодулин и поэтому обладает высокой аффинностью к кальцию. С другой стороны, YC3 и YC4 являются низкоаффинными индикаторами, потому что содержат мутации в Ca^{2+} -связывающих петлях кальмодулинового домена [75].

Однако первоначально сконструированные хамелеоны имели существенный недостаток: они были подвержены влиянию pH среды. Это было связано с тем, что акцептор в YC EYFP (S65G/S72A/T203Y мутант GFP) чувствителен к pH: уменьшение pH приводит к параллельному уменьшению и поглощения при 511 нм, и флуоресценции при 528 нм (кажущееся pK_a 6,9 и коэффициент Хилла 1,0). Поскольку донор ECFP намного менее чувствителен к pH [84], то эффективность переноса энергии (оцениваемая по отношению интенсивностей флуоресценции при 528 и 476 нм) увеличивается не только при возрастании концентрации кальция, но и при повышении pH в физиологическом диапазоне. Такая чувствительность к изменению pH означает, что измерения концентрации свободного кальция в цитозоле с помощью этих хамелеонов потребуют тщательной дополнительной проверки или фиксации значения pH в окружающей среде, чтобы откалибровать Ca^{2+} сигнал во избежание артефактов, связанных с pH. Более того, включение кальмодулина в индикатор естественным образом подразумевает, что он может взаимодействовать с эндогенными CaM-стимулированными процессами или CaM-связывающими белками. В работе [76] pH-чувствительность желтых хамелеонов (YC2) в нейтральной области была значительно уменьшена (pK_a 6,1), что было достигнуто введением мутаций V68L и Q69K в акцепторный EYFP. Полученные в результате новые хамелеоны (YC2.1 и YC3.1) поз-

воляют измерять концентрацию ионов кальция, несмотря на существенное цитозольное закисление, и дают примерно двукратное увеличение полезного сигнала (измеряемого по соотношению интенсивностей флуоресценции акцептора и донора, R) при изменении концентрации кальция от нулевой ($R_{\text{мин}}$) до насыщающей ($R_{\text{макс}}$). Для YC2.1 характерна двухфазная зависимость от концентрации кальция с кажущимися K_d 100 нМ и 4,3 мкМ и коэффициентами Хилла 1,8 и 0,6, соответственно. Зависимость для YC3.1 (отличается от YC2.1 заменой E104Q в CaM) однофазна (кажущаяся K_d 1,5 мкМ и коэффициент Хилла 1,1), следовательно, индикатор может применяться для количественной оценки более высоких концентраций кальция. Авторы [76] также показали, что в экспериментах *in vitro* при повышении концентрации ионов кальция кальмодулин и кальмодулин-связывающий пептид, соединенные вместе в хамелеон, преимущественно взаимодействуют друг с другом, а не со свободными кальмодулином и кальмодулин-зависимыми ферментами. Если же кальмодулин и M13 остаются разделенными, как в случае расщепленного хамелеона YC2.1, который состоял из эквимольного количества белков слияния ECFP-CaM и M13-EYFP(V68L/Q69K), то они полностью подвергаются кросс-реакциям со свободным кальмодулином и партнерами кальмодулина. В экспериментах *in vivo* в клетках HeLa динамический диапазон кальций-зависимого изменения отношения интенсивностей флуоресценции для YC составил 1,6–2,0, что достаточно близко, по мнению авторов, к значениям, полученным *in vitro* (1,8–2,2), и свидетельствует против того, что в живых клетках YC сильно взаимодействуют с эндогенным CaM. С другой стороны, расщепленные YC намного сильнее взаимодействуют с эндогенными белками, поскольку они дают 4-кратное увеличение отношения интенсивностей флуоресценции *in vitro* и лишь в лучшем случае 2,5-кратное увеличение отношения интенсивностей в клетках HeLa (при этом часто наблюдается неравномерное распределение ECFP-CaM и M13-EYFP(V68L/Q69K) между ядром и цитозолем). Поэтому расщепленные хамелеоны важны не как индикаторы кальция, а скорее как прототип неdestructивного детектирования и визуализации динамически модулируемой гетеродимеризации белков, что представляет огромный интерес для клеточной биологии и биохимии.

Похожие конструкции были созданы путем слияния BFP и GFP и короткого кальмодулин-связывающего пептида [123, 124]. Связывание с комплексом кальмодулин-кальций разделяет мутанты GFP друг от друга, что приводит к уменьшению эффективности резонансного переноса энергии (рис. 5). Эта система реагирует на кальций, связанный кальмодулином, а не на свободный Ca^{2+} .

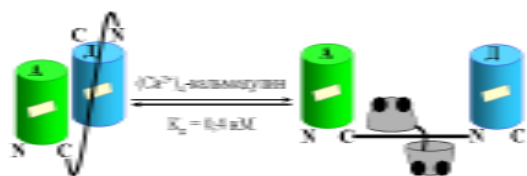


Рис. 5. Донорный GFP (Д) и акцепторный GFP (А) домены соединены линкерной последовательностью, содержащей CaM-связывающий домен.

Флуорофоры в GFP доменах представлены в виде светлых прямоугольников. Комплекс $(Ca^{2+})_4$ -CaM изображен в виде двух полусфер, соответствующих двум парам Ca^{2+} -связывающих доменов, соединенных гибкой центральной спиралью. Связанные с CaM ионы Ca^{2+} изображены в виде черных кружков [123].

Для того чтобы расширить динамический диапазон хамелеонов *in vivo* был создан желтый хамелеон YC6.1 (второе поколение семейства хамелеонов) на основе структуры кальмодулина в комплексе с кальмодулин-связывающим пептидом из CaM-зависимой протеинкиназы (СККр). У этого индикатора достигнуто двукратное увеличение динамического диапазона индуктивно-резонансного переноса энергии в пределах физиологически значимых концентраций кальция в цитоплазме — 0,05–1 мкМ. [115]. Структурный анализ комплекса CaM-СККр позволяет предположить, что кальмодулин-связывающий пептид СККр можно поместить в линкерной области между N- и C-концевыми доменами кальмодулина. Вариант YC6.1 был создан путем слияния CFP, N-концевого фрагмента кальмодулина (N-CaM), Gly-Gly, СККр, Gly-Gly, C-концевого фрагмента кальмодулина (C-CaM) и YFP (рис. 6). Данная конструкция возможна благодаря уникальному способу связывания кальмодулина СККр пептидом, который позволяет заменить линкер между доменами CaM на СККр без существенного влияния на конформацию CaM-СККр комплекса. В результате расстояния между CFP и YFP хромофорами, прикрепленными к N- и C-концам белка слияния CaM-СККр, уменьшается примерно на 20 Å по сравнению с ранними версиями хамелеонов, за счет чего и достигается увеличение динамического диапазона по сравнению с YC2.1 и YC3.1 [75, 76].

При связывании с кальцием происходит изменение соотношения интенсивностей флуоресценции при 530 и 480 нм. YC6.1 связывается с кальцием с одной кажущейся K_d 110 ± 6 нМ и, следовательно, реагирует на изменения концентрации свободного кальция в диапазоне 0,05–1 мкМ более линейно, чем YC2.1 [115]. В нестимулированных эукариотических клетках концентрация свободных ионов кальция в цитоплазме составляет примерно 0,1 мкМ и повышается до 1 мкМ после стимуляции. Хотя YC2.1 перекрывает более широкий диапазон



Рис. 6. Схематическое изображение YC6.1 [115].

Диаграмма показывает, как конформация YC6.1 может изменяться от свободного от Ca^{2+} до насыщенного Ca^{2+} состояния. В насыщенном Ca^{2+} состоянии мутанты GFP расположены ближе друг к другу, что делает возможным эффективный перенос энергии возбуждения (FRET) от донора (ECFP) к акцептору (EYFP), регистрируемый по излучению акцептора при 535 нм.

(0,01–100 мкМ) концентраций свободного кальция по сравнению с YC6.1, изменение полезного сигнала YC2.1 распределено по всему этому диапазону, поэтому тангенс угла наклона в каждой точке калибровочной кривой меньше, чем в случае YC6.1. Следовательно, при исследованиях изменения концентрации кальция в узком диапазоне широкий динамический диапазон индикатора по $[Ca^{2+}]$ становится недостатком метода. В дополнение к этому, динамический диапазон YC6.1 в большей степени соответствует варьированию концентрации кальция в цитоплазме. Эффективность YC6.1 *in vivo* продемонстрирована в экспериментах со стимулированными гистамином клетками HeLa (в отсутствие сигнала клеточной локализации флуоресценция равномерно распределялась в цитоплазме и отсутствовала в ядре, из-за большой массы индикатора, 72,6 кДа). Соотношение флуоресценции при 530 и 480 нм изменялось от 1,18 в минимуме до 2,50 в максимуме для YC6.1. Аналогичные эксперименты с YC2.1 дают изменение отношения от 1,17 до 1,66.

Некоторые индикаторы с использованием особенно ярко флуоресцирующих и малочувствительных к окружению вариантов YFP, таких как цитрин [118] или Venus [125], были разработаны с целью достичь более эффективного и быстрого созревания при 37 °C. Например, желтые хамелеоны YC2.3 и YC3.3 [118] были получены путем вставки цитрина вместо EYFP в ранее описанные хамелеоны YC2 и YC3 [75] (табл. 7).

Поскольку оптимизация длины и последовательности линкера между CFP и YFP приводит только к незначительному увеличению Ca^{2+} -зависимого изменения сигнала, авторы [116] применили другой подход и оптимизировали относительную ориентацию двух хромофоров в желтом хамелеоне (YC) путем слияния YFP под разными углами. Для этого они использовали устойчивые к подкислению и эффективно созревающие циклически переставленные варианты YFP (срYFP) [117, 126]. Один из полученных срYFP, вставленный в YC, дает увеличение Ca^{2+} -зависимого изменения отношения эмиссии

YFP/CFP почти на 600%. Как в культуре клеток, так и в нервной системе трансгенных мышей, новые УС позволяют визуализировать динамику субклеточного Ca^{2+} с более хорошим пространственным и временным разрешением, чем ранее.

Циклическая перестановка была проведена на варианте YFP Venus [125] с использованием пентапептидного линкера GGSGG для соединения исходных N- и C-концов [116]. Новые концы были введены в экспонированные на поверхность петли β -бочонка (новые N-концы были введены в положения Thr-49, Gln-157, Asp173, Leu-195 и Ile-229). Использование полученных таким образом cpVenus и исходного Venus приводит к значительной вариации относительной пространственной ориентации YFP внутри УС комплекса, потому что Met-1, Thr-49, Gln-157, Asp173, Leu-195 и Ile-229 находятся на разных участках β -бочонка (Thr-49 и Asp173 расположены на противоположных концах β -бочонка) (рис. 7).

Из пяти исследованных cpVenus белков только при использовании cp173Venus (N-конец в положении Asp173) было отмечено существенное повышение эффективности Ca^{2+} -зависимого переноса энергии. В экспериментах *in vitro* только у УС3.60, созданного на основе cp173Venus, зарегистрировано увеличение отношения интенсивностей флуоресценции YFP/CFP в несколько раз при переходе от нулевой к насыщающей концентрации кальция ($R_{\text{мин}} = 1,4$, $R_{\text{макс}} = 9,3$). Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции ($\lambda = 530 \text{ нм} / \lambda = 480 \text{ нм}$) в УС3.60 от концентрации кальция описывается одной кажущейся K_d 0,25 мкМ и коэффициентом Хилла 1,7. Заменой мутированного в УС3.60 кальмодулина кальмодулином дикого типа был получен УС2.60, который имел практически однофазный отклик с кажущейся K_d 40 нМ и коэффициентом Хилла 2,4 [116]. При этом большой динамический диапазон, характерный для УС3.60 (560%), сохранился и в УС2.60. Чувствительность cpVenus белков к pH (pK_a 6,0) близка к чувствительности EYFP.1 (EYFP с мутациями V68L/Q69K) или Venus, следовательно, УС3.60 так же устойчив к pH, как и УС3.1 и УС3.12. Отношение эмиссии YFP/CFP не изменяется существенно в присутствии или отсутствии кальция в диапазоне физиологических pH, от 6,5 до 8,2.

В настоящее время создано большое количество флуоресцентных индикаторов на основе переноса энергии между CFP и YFP, в которых варьируются взаиморасположения хромофоров этих белков за счет циклической перестановки [127].

Индикаторы на основе акворина с использованием переноса энергии (GFP-акворин биоломинесцентные Ca^{2+} репортерные системы)

Для применения в отдельных клетках основанные на FRET хамелеоны должны присутствовать в достаточно высоких концентрациях,

чтобы эффекты могли быть отличимыми от фоновой собственной флуоресценции клеток и эффектов кальций-независимого переноса энергии. Наряду с хамелеонами существуют методы определения концентрации кальция с индикаторами на основе биоломинесцентного кальций-связывающего белка акворина. Активный акворин образуется в присутствии молекулярного кислорода из апоакворина и его люциферина, целентеразина.

Связывание Ca^{2+} акворином индуцирует конформационное изменение, приводящее к окислению целентеразина. Образующийся в ходе реакции целентерамид находится в возбужденном состоянии, поэтому при возвращении его в основное состояние испускается синий свет с максимумом при 470 нм [128]. Биоломинесцентные процессы не требуют возбуждения светом в отличие от флуоресцентных зондов или цветных белков, и, таким образом, регистрации сигнала не мешает собственная флуоресценция клеток. Кроме того, акворин не токсичен, не связывает другие двухвалентные катионы в физиологическом диапазоне концентраций и не взаимодействует с внутриклеточными Ca^{2+} буферными системами, даже при микроинъекциях в достаточно высоких концентрациях для получения интенсивного сигнала. Хотя акворин обеспечивает хорошее отношение сигнала к фону, сам сигнал очень трудно зарегистрировать, вследствие низкого квантового выхода свечения акворина. В медузе *Aequorea victoria* акворин объединен с GFP. После связывания Ca^{2+} , энергия возбужденного целентерамида переносится на GFP, в результате чего вместо синего света акворина испускается зеленый свет GFP. Подобный межмолекулярный безызлучательный перенос энергии весьма обычен для биоломинесценции и, как было показано, повышает квантовый выход биоломинесцентного процесса [129]. *In vitro* можно достигнуть усиления в 4–5 раз [130]. Авторы работы [122] решили использовать биохемилюминесцентный индуктивно-резонансный перенос энергии между GFP и акворином для создания чувствительных к кальцию биоломинесцентных репортерных систем, способных обнаруживать увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле на уровне одной клетки. Их целью была разработка двойного репортерного гена, объединяющего чувствительность к Ca^{2+} акворина и

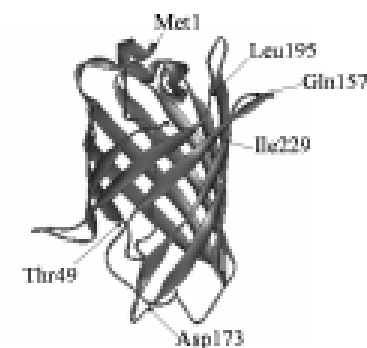


Рис. 7. Трехмерная структура GFP с указанными положениями исходного (Met-1) и новых N-концов (Thr-49, Gln-157, Asp-173, Leu-195, Ile-229) (по данным работы [116]).

интенсивную флуоресценцию GFP. Конструкции GFP-акворин были получены путем генетического слияния EGFP (содержащего мутации F64L/S65T, изменяющие спектр возбуждения GFP дикого типа и усиливающие интенсивность флуоресценции, а также V163A для улучшения сворачивания и созревания белка при 37 °C) и акворина через разные линкерные последовательности (5–50 аминокислот) со стороны 3'-конца EGFP. Все белки слияния проявили лучшую (в 19–65 раз) биолюминесцентную активность после индукции кальцием по сравнению с одиночным акворином. Когда EGFP и акворин соединены линкерами из 14 и более аминокислот, их диполи перехода не ограничены в свободе вращательной и колебательной релаксации и за время жизни в возбужденном состоянии принимают нужную для эффективного межмолекулярного резонансного переноса энергии конформацию. Кроме того, GFP стабилизирует апоакворин в химерном белке. В результате, квантовый выход свечения акворина оказывается выше. Эксперименты *in vitro* показали, что гибридные белки более чувствительны к кальцию (38 нМ) по сравнению с одиночным акворином (~1 мкМ). Белок слияния может быть детектирован с использованием классической эпифлуоресценции. С использованием этой GFP-акворин репортерной системы сигналы физиологических концентраций Ca^{2+} были визуализированы в отдельных клетках нейробластомы с помощью CCD камеры [122], а кроме того удалось зарегистрировать активности кальция в аксонах. Равномерное распределение наблюдается для всех конструкций GFP-акворин в клетках Neuro2A и в клетках COS-7.

Индикаторы на основе кальмодулина, вставленного в циклически переставленные молекулы GFP вместо Y145 (камгару)

Камгару создаются на основе циклически переставленных вариантов GFP. Исходные С- и N-концы GFP можно соединить пептидным линкером и искусственным путем создать новые концы в другом месте полипептидной цепи. Новые С- и N-концы можно ввести в нескольких разных местах, так, например, в молекуле EGFP это положения E142, Y143, Y145, H148, D155, H169, E172, D173, A227 и I229 [117]. К полученным в результате циклически переставленным вариантам GFP (срGFP) был успешно присоединен полноразмерный белок кальмодулин из *Xenopus* [117]. Таким образом, было показано, что GFP может оставаться флуоресцирующим, несмотря на разнообразие циклических перестановок и вставок чужеродных белков. Тем не менее, циклическая перестановка изменяет некоторые свойства исходного GFP, поэтому ее часто используют для получения более чувствительных к окружению вариантов GFP.

Так, в работе [117] было показано, что вставка кальмодулина в положение 145 срEGFP, срEGFP и срEYFP приводит к получению Ca^{2+} -чувствительных белков. Конструкция на основе срEYFP, камгару-1, оказалась наиболее чувствительной к кальцию и была использована для контроля за концентрацией Ca^{2+} в цитозоле в отдельных клетках млекопитающих. Стимулирование клеток HeLa гистамином привело примерно к 35% увеличению флуоресценции над базовой линией, добавка же иономицина в CaCl_2 среде привела к 8-кратному увеличению яркости, что достаточно хорошо согласуется с данными экспериментов *in vitro*. Этот тип зондов дает большие изменения флуоресценции по сравнению с Ca^{2+} зондами, основанными на FRET. При pH 7,5 свободный от кальция белок имеет главный максимум поглощения при 400 нм и небольшое плечо при 490 нм, что указывает на преимущественно протонированное состояние хромофора в YFP. При насыщении кальцием при том же pH преобладающим становится максимум при 490 нм, а пик при 400 нм уменьшается. Отсюда можно заключить, что связывание кальция с кальмодулином вызывает депротонирование хромофора [117]. В спектрах возбуждения как насыщенной кальцием формы, так и в отсутствие кальция наблюдается только один максимум при 490 нм, это согласуется с тем, что поглощающие при 400 нм протонированные формы EYFP не флуоресцируют [84], в отличие от многих циклически переставленных форм GFP, имеющих два максимума в спектре возбуждения [117]. Таким образом, при насыщении кальцием наблюдается просто увеличение амплитуды вплоть до 7 раз *in vitro* без каких-либо существенных сдвигов длины волны. Кривая титрования кальцием дает значение кажущейся K_d 7 мкМ с коэффициентом Хилла 1,6. Недостатком камгару является то, что они откликаются на изменения в эмиссии, вызванные изменением pK_a и, следовательно, являются чувствительными к pH. Поскольку связывание кальция способствует депротонированию хромофора при постоянном pH, кривые pH-титрования свободной и связанной с кальцием форм отличаются друг от друга, они имеют значения pK_a 10,1 и 8,9, соответственно.

Применительно к клеткам многие основанные на GFP зонды для определения кальция трудно использовать вследствие низкого отношения сигнала к шуму, что не позволяет получить хорошее пространственное и временное разрешение. В работе [119] авторы разработали высокоаффинный Ca^{2+} зонд, состоящий из одной молекулы циклически переставленного EGFP (срEGFP) (названный G-CaMP). Этот зонд был сконструирован следующим образом: N-конец срEGFP присоединили к фрагменту M13 киназы легкой цепи миозина, который является последовательностью-мишенью для кальмодулина (CaM),

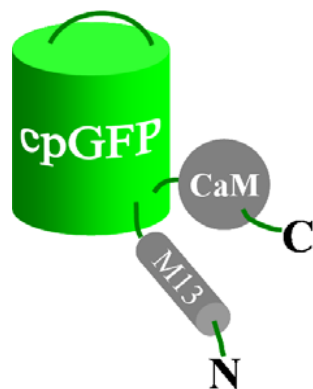


Рис. 8. Схематическая топология основанных на GFP Ca^{2+} зондов [119].

Исследования показали, что природа аминокислоты в положении 148 CaM влияет на чувствительность зонда к Ca^{2+} : кислотные (Asp, Glu) и гидроксильные (Ser, Thr, Tyr) боковые группы в положении 148 сохраняют чувствительность, тогда как основные боковые группы (Lys, Arg) приводят к утрате способности реагировать на Ca^{2+} . Авторы также установили, что остаток 147 имеет важное значение для Ca^{2+} -чувствительности [119]. Из всех проверенных в данной работе зондов был выбран вариант на основе cpEGFP149 (N-конец) — 144 (C-конец), обладающий наилучшим откликом на введение АТФ. Характеризация cpEGFP *in vitro* показала, что добавление кальция приводит к повышению интенсивности флуоресценции до 4,5 раз. Связывание кальция влияет на pH чувствительность cpEGFP: кажущееся значение pK_a в отсутствие ионов кальция равно 8,1, а при добавлении кальция оно уменьшается до 7,1. Данные по кинетике ассоциации, которая становится более быстрой при повышении концентрации кальция (временные константы уменьшались от 230 мс при 0,2 мкМ [Ca^{2+}] до 2,5 мс при 1 мкМ [Ca^{2+}]), указывают на то, что кинетика ассоциации cpEGFP достаточно быстра при высоких концентрациях кальция ($\tau < 10$ мс при [Ca^{2+}] > 500 нМ), чтобы считать этот зонд подходящим для определения концентрации внутриклеточного кальция в возбудимых клетках. Кинетика диссоциации ($\tau = 200$ мс) не зависит от концентрации Ca^{2+} . Кривая Ca^{2+} титрования G-CaMP представляет собой возрастающую однофазную кривую со значением кажущейся K_d 235 нМ и коэффициентом Хилла 3,3 (при концентрации белка 0,3 мкМ). Это значение кажущейся K_d почти в 30 раз ниже, чем у камгару-1 [117].

G-CaMP был проверен на клетках НЕК-293, а также мышечных волокнах, в которых концентрация внутриклеточного кальция быстро

а С-конец cpEGFP присоединили к кальмодулину (рис. 8). При связывании кальция с кальмодулином происходит конформационное изменение благодаря взаимодействию Ca^{2+} —CaM-M13, которое, в свою очередь, индуцирует конформационное изменение в cpEGFP, что приводит к изменению интенсивности флуоресценции. Было показано, что взаимодействие Ca^{2+} —CaM-M13 является внутримолекулярным, и cpEGFP функционирует как мономер. Авторы также получили зонд, состоящий из cpEGFP, к N-концу которого был прикреплен кальмодулин, а к С-концу был прикреплен M13, но этот зонд показал лишь незначительный отклик на Ca^{2+} [119].

повышается при деполяризации. Эксперименты показали, что внеклеточная электрическая стимуляция вызывает индуцированное деполяризацией локальное увеличение концентрации внутриклеточного кальция внутри ограниченного участка вблизи стимулирующего электрода, и за этим следует распространение волны кальция в соседние области. Карбохолин и кофеин, которые, как известно, увеличивают концентрацию внутриклеточного кальция в мышечных волокнах, также привели к существенному повышению флуоресценции. Кривая увеличения интенсивности флуоресценции во времени свидетельствовала о существовании первой быстрой и последующей медленной фаз увеличения внутриклеточной концентрации кальция, за которым последовало восстановление его уровня до исходного значения. Быстрая фаза длилась примерно 60 мс и концентрация кальция достигла своего максимального значения за 200 мс [119].

Главным преимуществом G-CaMP является высокий уровень сигнала по сравнению с фоном, что достигнуто благодаря более высокой аффинности. Хотя данный зонд чувствителен к pH и требует созревания при температурах ниже 37 °С, его отклик на Ca^{2+} достаточно большой и быстрый, что позволяет использовать его для изучения динамики Ca^{2+} в возбудимых клетках. С другой стороны, точное измерение концентрации кальция в микромолярном диапазоне лучше достигается с использованием камгару-1, благодаря его умеренной аффинности к ионам кальция и широкому динамическому диапазону [117].

Индикаторы на основе кальмодулина, вставленного в циклически переставленные молекулы EYFP, содержащие дополнительные мутации (перикамы)

В работе [120] описаны химерные белки, в которых циклически переставленный GFP (cpGFP) был присоединен к кальмодулину и его пептиду-мишени M13, которые были использованы для визуализации кальций-зависимых белок-белковых взаимодействий. Флуоресцирующие химерные белки, которые авторы называли «перикамы», обратимо изменяли спектральные свойства в зависимости от концентрации кальция, за счет взаимодействия между кальмодулином и M13. Путем мутаций нескольких аминокислот вблизи хромофора были получены три типа перикамов: флуоресценция «флэш-перикама» становилась ярче при добавлении кальция, у «инверсного перикама» она, наоборот, затухала, а у «относительного перикама» длина волны возбуждения изменялась в зависимости от концентрации кальция. Основные характеристики всех «перикамов» приведены в таблице 7.

Перикамы, экспрессированные в клетках HeLa, позволяют контролировать колебания Ca^{2+} в индивидуальных клетках после стимуляции гистамином и сравнить концентрации кальция в ядре и цитозоле

[120]. Визуализация Ca^{2+} с использованием «флэш-перикама» позволила детектировать свободное распространение ионов кальция сквозь оболочку ядра и изменение концентрации кальция в митохондриях. С использованием «относительных перикамов», имеющих соответствующие сигналы клеточной локализации, одновременно были измерены концентрации свободного кальция в ядре и митохондриях с хорошим пространственным разрешением, и было показано, что экстрамитохондриальные кратковременные изменения $[\text{Ca}^{2+}]$ вызывают быстрые изменения концентрации митохондриального Ca^{2+} . Авторы наблюдали субпопуляции отдельных митохондрий, в которых наблюдалось кратковременное повышение концентрации кальция, каждый подъем длился примерно 10 с. С использованием «расцепленного перикама», созданного путем удаления линкера в «флэш-перикаме», по ассоциации двух половинок GFP, которые не флуоресцируют по отдельности, в клетках HeLa наблюдалось обратимое кальций-зависимое взаимодействие.

В работе [120] циклической перестановке был подвергнут EYFP(V68L/Q69K) [76], в котором исходные C- и N-концы были соединены с помощью пентапептидного линкера GGSGG, новый N-конец был введен в положение Y145, а C-конец — в N144. Спектр поглощения srEYFP(V68L/Q69K) при pH 7,4 имеет главный максимум при 420 нм с небольшим плечом около 500 нм, в отличие от исходного непереставленного белка, главный пик которого находился при 514 нм. Этот синий сдвиг предполагает, что хромофор в srEYFP(V68L/Q69K) протонирован. Спектр возбуждения имеет два максимума при 417 и 506 нм, что напоминает спектр возбуждения GFP дикого типа. Поглощающие в области 420 нм протонированные формы srEYFP(V68L/Q69K) флуоресцируют в отличие от большинства YFP [1]. «Перикам» был создан путем слияния srEYFP(V68L/Q69K) с C-концом M13 через трипептидный SAG линкер и через GTG линкер с N-концом кальмодулина, содержащего E140Q мутацию в третьей кальций-связывающей петле. Важно отметить, что попытка поменять местами кальмодулин и M13, то есть присоединить кальмодулин к N-концу, а M13 к C-концу srEYFP, привела к получению химерного белка, не проявившего какой-либо чувствительности к кальцию [119, 120]. При возбуждении при 485 нм, после связывания с кальцием в спектре флуоресценции «перикама» регистрировался максимум при 520 нм, причем его флуоресценция была в три раза ярче, чем для свободного от кальция «перикама» (ни спектр поглощения, ни спектр флуоресценции srEYFP(V68L/Q69K) не были чувствительны к кальцию). Замена тирозина 203 на гистидин существенно увеличила динамический диапазон: у «флэш-перикама» наблюдается восьмикратное

увеличение флуоресценции в присутствии кальция. Для него было получено значение кажущейся K_d 0,7 мкМ с коэффициентом Хилла 0,7 (табл. 7). «Флэш-перикам» был создан как одноцветный индикатор внутриклеточного кальция и содержал две мутации, улучшающие сворачивание при 37°C (V163A/S175G). При насыщении кальцием максимум поглощения «флэш-перикама» при 490 нм увеличивается при одновременном уменьшении максимума при 400 нм. Можно предполагать, что ассоциация связанного с кальцием кальмодулина и пептида M13 вызывает ионизацию хромофора, сопровождающуюся сдвигом влево кривой pH-титрования. Более того, взаимодействие между кальмодулином и M13, по-видимому, может оказывать прямое пространственное влияние на хромофор и изменять его состояние ионизации или приводить к уменьшению вероятности безызлучательной релаксации возбуждения. Последнее весьма вероятно, поскольку связывание кальция «флэш-перикамом» увеличивает в несколько раз квантовый выход, а также и коэффициент молярного поглощения при 490 нм (табл. 7).

Варианты YFP, имеющие тирозин или гистидин в положении 203, содержат нефлуоресцирующие протонированные формы, поглощающие в области 400 нм [1]. В случае «флэш-перикама» флуоресценция также лишь слабо детектировалась при возбуждении в области 400 нм. С целью создания двухволнового (по возбуждению) относительного Ca^{2+} индикатора, в «флэш-перикам» был введен фенилаланин в положение 203 [120]. Линкеры и некоторые аминокислоты оказались критическими для оптимизации сворачивания белка и повышения чувствительности к кальцию. Так, «относительный перикам» был получен из «флэш-перикама» путем введения мутаций H203F/H148D/F64L, удалением глицина перед кальмодулином и заменой GGSGG линкера на VDGGSGGTG между исходными N- и C-концами. Связывание кальция способствует ионизации хромофора в «относительном перикаме», проявляющейся по кальций-зависимому изменению спектра поглощения (аналогично «флэш-перикаму») и смещению влево кривой pH титрования при связывании кальция. Однако, в отличие от «флэш-перикама», «относительный перикам» имеет спектр возбуждения с двумя максимумами при 415 и 494 нм, при этом отношение интенсивностей зеленой флуоресценции (511–517 нм), возбуждаемой в максимумах 415 и 494 нм, изменяется примерно в десять раз при переходе от насыщенной кальцием к свободной от кальция форме. Кривая зависимости отношения интенсивностей возбуждения (494 нм/415 нм) от концентрации кальция однофазна (кажущаяся константа диссоциации 1,7 мкМ и коэффициент Хилла 1,1) (табл. 7).

Путем случайного мутагенеза «относительного перикама» был обнаружен интересный мутант с заменой D148T, зеленая флуоресценция которого (513–515 нм) при связывании кальция, в противоположность «флэш-перикаму», уменьшалась на 85% (возбуждение флуоресценции при 500 нм). Этот перикам поэтому был назван «инверсным перикамом» [120]. Связывание кальция не влияет на состояние протонирования хромофора «инверсного перикама». «Инверсные перикамы» титруются примерно одинаково в отсутствие и в присутствии кальция, однако в ионизированном состоянии (при $\text{pH} > 8$) свободный от кальция белок флуоресцировал в 7 раз интенсивнее, чем после связывания кальция. На самом деле, квантовый выход при связывании кальция уменьшился на 30%. Авторы объясняют это в основном прямым влиянием связанных с кальцием структурных изменений на хромофор. «Инверсный перикам» имеет более высокую аффинность к кальцию по сравнению с «флэш-перикамом», значение кажущейся константы диссоциации для него равно 0,2 мкМ с коэффициентом Хилла 1,0 (табл. 7).

При трансфекции всех этих «перикамов» в клетки HeLa флуоресценция равномерно распределялась в цитозоле и ядерных компартментах, но отсутствовала в ядрышках, как и ожидается для 44-кДа белка, который не может проникать через ядрышковые поры [120]. По сравнению с одноволновыми индикаторами («флэш-перикам» и «инверсный перикам») «относительный перикам» позволяет количественно оценивать концентрацию кальция, сводя на нет артефакты, связанные с концентрацией индикатора и толщиной или движением клеток. Выгодным качеством «инверсного перикама» является то, что его свободная от кальция форма имеет большой коэффициент молярного поглощения ($59 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и высокий квантовый выход (0,64) при $\text{pH} 7,4$ (табл. 7). Таким образом, несмотря на затухание флуоресценции в присутствии кальция, использование «инверсного перикама» позволяет получать изображения кальция с достаточным отношением сигнала к шуму. Эффективность сворачивания «перикамов» при 37°C в клетках млекопитающих также является важным фактором их эффективности. Инверсный и относительный «перикамы» могут эффективно сворачиваться независимо от температуры, тогда как «флэш-перикам» лучше созревает при $28\text{--}30^\circ\text{C}$.

Сравнение перикамов с хамелеонами и камгару

По сравнению с хамелеонами, «относительный перикам» характеризует больший отклик на кальций. Наблюдаемое в клетках HeLa десятикратное отношение $R_{\text{макс}}/R_{\text{мин}}$ для «относительного перикама», согласующееся с изменением отношения возбуждения (494 нм/415 нм) *in vitro*, намного превышает двукратное отношение $R_{\text{макс}}/R_{\text{мин}}$ улуч-

шенного желтого хамелеона [76]. «Относительный перикам» также гарантирует достаточно высокое отношение сигнала к шуму, поскольку обладает относительно высоким коэффициентом молярного поглощения и высоким квантовым выходом, а также эффективно сворачивается при 37°C . Кроме того, «относительный перикам» можно легко направить в митохондрии, и регистрировать концентрацию кальция в одной митохондрии, что ранее не вполне удавалось при использовании хамелеонов. Камгару-1 [117], полученный путем вставки кальмодулина в центральный участок EYFP, становится в 7 раз более ярким при насыщении кальцием, подобно «флэш-перикаму». Однако из-за его низкой аффинности (K_d 7 мкМ) камгару не обеспечивает чувствительное детектирование индуцированных гистамином всплесков концентрации внутриклеточного кальция ($<2\text{--}3$ мкМ). В отличие от этого, «флэш-перикам» имеет достаточно высокую аффинность ($K_d = 0,7$ мкМ) к кальцию и, следовательно, способен чувствовать физиологические изменения внутриклеточной концентрации кальция. По аффинности «флэш-перикам» уступает G-CaMP ($K_d = 235$ нМ) [119], но превосходит его по увеличению сигнала в присутствии кальция.

Индикаторы на основе тропонина с использованием FRET (тропонены)

Относительные индикаторы на основе кальмодулина, «хамелеоны» [75, 76, 115], и разнообразные индикаторы, в которых кальмодулин вставлен непосредственно в молекулу флуоресцирующего белка [117–120], имеют ряд недостатков. Их динамический диапазон при экспрессии в трансгенных беспозвоночных более узок по сравнению с тем, который характерен для экспериментов *in vitro* с очищенными индикаторными белками. Невелика и их чувствительность к кальцию при нацеливании в определенные участки внутри клеток. Кальмодулин является универсальным сигнальным белком, участвующим в клеточном метаболизме и, таким образом, находится под строгим контролем, включающим участие многообразных кальмодулин-связывающих белков. Он активирует многочисленные киназы и фосфатазы, модулирует ионные каналы и сам по себе сильно фосфорилирован многочисленными серин/треонинкиназами и тирозинкиназами белков. Этим, возможно, обусловлены перечисленные выше недостатки индикаторов кальция на основе кальмодулина [121]. В работе [121] авторы решили использовать более специализированные связывающие кальций белки, на которые бы минимально влияла система клеточной регуляции белков. В данной работе были разработаны новые относительные кальциевые зонды на основе тропонина C (TnC) из скелетной мышцы цыпленка (csTnC) и сердечной мышцы человека

(humTnC). Тропонин С является специализированным кальций-связывающим белком, который не имеет других известных функций помимо регуляции мышечного сокращения. Эти индикаторы имеют изменение отношения вплоть до 140%, K_d в диапазоне от 300 нМ до 29 мкМ и улучшенные свойства субклеточного нацеливания по сравнению с хамелеонами. Авторы направили эти индикаторы в плазматическую мембрану НЕК293 клеток (субмембранные кальциевые домены играют ключевую роль в ряде биологических явлений) и первичные гиппокампальные нейроны. Было показано, что при продолжительной деполяризации уровни субмембранного кальция в гиппокампальных нейронах находятся в равновесии с уровнями кальция в объеме цитозоля, то есть не сохраняется постоянный градиент концентрации от мембраны по направлению к цитозолю. Подобные индикаторы, использующие специализированные чувствительные к кальцию белки, как ожидается, будут минимально взаимодействовать с клеточным биохимическим аппаратом.

Сенсорные конструкции были созданы с целью обеспечить высокую чувствительность индикаторов к кальцию (что было достигнуто введением мутаций в последовательность тропонина С), хорошую экспрессию в клетках млекопитающих (для чего была использована оптимизированная Kozak последовательность) и нацеливание в мембрану (для чего использовались разные якорные последовательности из 20 аминокислот). Во всех конструкциях фрагменты тропонина были помещены между циановым флуоресцирующим белком (CFP) в качестве донорного флуорофора и цитрином [118] в качестве акцепторного флуорофора. Связывание кальция тропонином С приводит к конформационному изменению белка и, таким образом, усилению индуктивно-резонансного переноса энергии от CFP к цитрину. Отношение эмиссии акцептора к эмиссии донора используется для измерения концентрации свободного кальция. Из всех полученных в данной работе конструкций максимальными изменениями спектров флуоресценции при добавлении кальция: 140% и 120% — характеризовались TN-L15 (полученная последовательным удалением 14 аминокислот с N-конца csTnC) и TN-humTnC, соответственно. Авторы [121] назвали эти индикаторы S-тропонеон ((S — skeletal) TN-L15) и C-тропонеон (C — cardiac) TN-humTnC). Недостатком тропонеонов является их чувствительность к магнию, поскольку C-концевой домен тропонина С имеет два высокоаффинных кальций-связывающих участка, которые также связывают магний. Кажущиеся константы диссоциации для кальция в присутствии 1 мМ магния равны 470 нМ для TN-humTnC и 1,2 мкМ для TN-L15. K_d для связывания магния составили 2,2 мМ для TN-L15 и 0,5 мМ для

TN-humTnC. Заменой ключевых остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот в участках связывания кальция в тропонине С были получены мутанты с различной аффинностью к кальцию и магнию. Отношение сигнала индикаторов в отсутствие и присутствии кальция является рН-зависимым. Отношение начинает падать при рН ниже 6,8, отражая рН-чувствительность CFP и цитрина. В физиологическом диапазоне колебаний цитозольного рН между рН 6,8–7,3 эти отношения были, на удивление, стабильными. рН-устойчивость является явным преимуществом зондов на основе тропонина С перед сенсорами на основе кальмодулина и одиночного GFP, поскольку этим зондам присуща чувствительность к изменениям рН и, следовательно, подверженность артефактам даже при экспрессии в цитозоле. Связывание кальция тропонином С, как считается, лимитируется диффузией ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), при этом соответствующее конформационное изменение происходит синхронно или с небольшой задержкой в тропонине С из сердечной мышцы. Поскольку обычно скорость связывания кальция сенсорами не представляет проблемы в экспериментах, а медленные скорости диссоциации являются главным препятствием при наблюдении за быстро изменяющимися сигналами, авторы измерили скорости диссоциации кальция, связанного с данными индикаторами. Эти скорости не зависели от концентрации кальция (что характерно для реакций первого порядка), значения временных констант составили 860 мс для TN-L15, 580 мс для TN-L15 D107A и 560 мс для TN-humTnC [121]. Для сравнения, желтый хамелеон YC2.3 показал значение τ 870 мс.

Полученные в данной работе индикаторы характеризовались хорошей экспрессией в цитозоле НЕК293 клеток, флуоресценция распределялась равномерно и гомогенно без признаков агрегации. Из-за своих размеров (69,7 кДа TN-L15 и 72,5 кДа TN-humTnC) эти белки не попадали в ядро. Для проверки функциональности индикаторов в живых клетках авторы исследовали отклик 293 клеток на карбохолин. В хорошем соответствии со свойствами индикаторов *in vitro* колебания свободного кальция в клетках, индуцированные карбохолином, легко детектировались повторяющимися циклами взаимных превращений интенсивности флуоресценции CFP и цитрина. Получение изображений оказалось динамическим и воспроизводимым. Максимальное изменение отношения в НЕК293 клетках составило 100% для TN-L15 и 70% для TN-humTnC. Для сравнения, максимально полученное изменение отношения для желтого хамелеона YC2.1 в данных условиях составило 70%. Авторы [121] создали ряд вариантов TN-L15, нацеленных в разные субклеточные мишени, и сравнили их эффективность с аналогичными хамелеонами на основе кальмодулина. Во всех

случаях TN-L15 сохранил активность, тогда как отличающиеся только кальций-связывающим компонентом зонды на основе кальмодулина значительно изменили свой динамический диапазон.

Успешные нацеливания индикаторов на кальций были достигнуты, например, для эндоплазматического ретикулума и ядра [75], комплекса Гольджи [118] или митохондрий [120]. Однако многие потенциально очень интересные нацеливания до сих пор не были осуществлены, несмотря на попытки. Так, например, очень интересно было бы направить индикаторы в кальциевые каналы, чтобы наблюдать за свободным кальцием прямо в порах канала, или направить их в активную зону пресинаптических терминалов, или просто использовать генетически закодированные индикаторы кальция в качестве сенсоров активности для наблюдения за активностью на уровне отдельных синапсов. Пока неизвестно, какой тип модификации ограничивает чувствительность к кальцию кальмодулинового компонента при многих нацеливаниях индикаторов. Это, возможно, посттрансляционная модификация, такая как фосфорилирование на пути к включению в мембрану, взаимодействие с кальмодулин-связывающими белками, которые локализованы в определенных частях клетки, или просто связывание эндогенного кальмодулина, который может присутствовать в очень высоких концентрациях под мембраной и особенно вблизи каналов и специализированных областей, таких как синапсы. Индикаторы на основе тропонина С, таким образом, могут дополнить существующие индикаторы на основе кальмодулина. Однако еще предстоит выяснить, решит ли трансгенная экспрессия индикаторов на основе тропонина С, особенно в клетках млекопитающих, некоторые проблемы, возникающие при использовании кальмодулина. Тропонин С из сердечной мышцы человека также является прямой мишенью для лекарств кальций-активизирующих агентов, которые модулируют кальций-связывающее поведение сердечного TnC и усиливают сокращение сердца человека. Таким образом, TN-humTnC также может стать полезным для создания простых методов анализа *in vitro*, для определения химических соединений или полипептидов, представляющих клинический интерес и действующих как кальций-активизирующие агенты.

Генетически закодированные индикаторы имеют огромный потенциал применения в нескольких областях науки о жизни — от высокоэффективного скрининга в клеточной биологии до нейрофизиологических прикладных задач. Они обеспечивают глубокое введение индикатора внутрь зрелой (сформировавшейся) живой ткани и, таким образом, дополняют новые методы микроскопии, такие как многофотонная микроскопия, которая стремится к неинвазивному

получению изображений физиологических процессов. Трансгенная экспрессия индикаторов на основе тропонина С может быть использована в разнообразных областях, с тем чтобы пролить свет на сайты действия лекарств внутри целых тканей, чтобы контролировать нейронную активность в интактном мозге.

СЕНСОРЫ НА ИОНЫ ЦИНКА И МЕДИ

GFP дикого типа имеет большое сродство к Cu(II), меньшее к Ni(II) и пренебрежимо слабо взаимодействует с Zn(II) и Co(II) [131]. Он содержит 10 остатков гистидина, пять из которых вовлечены во вторичную структуру и вряд ли связывают ионы металлов. His77, His81 и His231 — все находятся в пределах 7,5 Å друг от друга в кристаллической структуре GFP дикого типа (PDB код 1EMF) и, как предполагалось, являются возможным сайтом взаимодействия с металлом. Поскольку ионы металлов вблизи хромофора тушат флуоресценцию в зависимости от расстояния, в качестве потенциального сенсора на ионы металлов *in vivo* был создан мутант GFP, связывающий металл [132]. Для этого вариант GFP 10C (T203Y/S54G/V68L/S72A) подвергли дальнейшему мутагенезу. Так было получено два новых мутанта, в одном из которых сайт связывания металла состоит из двух остатков (S147H и Q204H), а в другом — из трех (S147H, S202D и Q204H). Оба связывающих металл варианта GFP обнаружили тушение флуоресценции при значительно более низких концентрациях мутанта по сравнению с 10C вариантом [132].

Цинковые металлопротеины влияют на синтез ДНК, полимеризацию микротрубочек, экспрессию генов, апоптоз и функционирование нервной и иммунной систем. Чтобы полностью понять функции Zn(II) в клетке и нейробиологии, нужны зонды, способные контролировать *in vivo* пространственное и временное распределения ионов металла. Биосенсоры на основе белков дополнили бы низкомолекулярные флуоресцирующие зонды на Zn(II), поскольку белки можно оптимизировать по селективности и аффинности, их можно вводить в клетки неинвазивно путем трансфекции и нацеливать в специфические ткани, органеллы и клеточные участки.

В EYFP был введен домен связывания цинка вместо тирозина 145, что привело к увеличению интенсивности флуоресценции почти в 1,7 раза без изменения в форме спектра при связывании Zn²⁺. Химерный белок на основе цинк-связывающего мотива, однако, имеет умеренное сродство к цинку (K_d около 0,4 мМ) [117]. Большое расстояние между двумя хромофорами является недостатком при использовании различно окрашенных вариантов GFP для исследования FRET. В попытке уменьшить расстояние между хромофорами цианового (CFP) и желтого (YFP) вариантов GFP в FRET-паре были созданы мутанты

CFP и YFP, содержащие сайты связывания цинка, которые бы скрепляли вместе CFP/YFP димер [133]. Сигнал переноса энергии между созданными таким образом циановым и желтым вариантами GFP увеличивался в 8–10 раз в присутствии двухвалентных ионов цинка. В качестве контроля использовалась FRET-пара CFP-YFP, соединенная линкером из 20 аминокислот [133].

В работе [134] авторы создали и описали структурную химию белкового биосенсора на ионы металлов на основе варианта голубого мутанта GFP (BFPms1), который предпочтительно связывает Zn(II) и Cu(II) с разными геометриями координации и различными спектральными свойствами. Таким образом, белковый биосенсор на Zn(II) представляет собой прототип, пригодный для дальнейшего усовершенствования с помощью направленного изменения структуры. Это позволит создавать металлопротеины с желаемыми физическими или биохимическими свойствами для фундаментальных и прикладных (в частности, медико-биологических) исследований.

Сайт связывания металла в BFPms1 [134] включает в себя хромофор BFP (Y66H), напоминающий дипиррольную единицу порфирина. Помимо этого в BFP были введены мутации для повышения квантового выхода флуоресценции (Y145H), растворимости (F64L/F99S/M153T/N163A), скорости формирования хромофора (S65T), а также для создания канала в β -бочонке (H148G), обеспечивающего лучшие параметры кинетики связывания металла. Полученный сайт связывания металла оказался специфичным к ионам меди (K_d 24 мкМ) и цинка (K_d 50 мкМ). Другие двухвалентные металлы из первого ряда переходных металлов (никель, кобальт, железо) не связывались при концентрациях металла вплоть до 2 мМ. Кроме того, оказалось, что Zn(II) и Cu(II) по-разному изменяют спектральные свойства хромофора. Связывание цинка увеличивает интенсивность флуоресценции в 2 раза, но не изменяет спектров поглощения. В отличие от этого, связывание меди тушит флуоресценцию и смещает максимум поглощения от 379 к 444 нм. Таким образом, BFPms1 обеспечивает основные качества для эффективного биосенсора на ионы цинка: хорошие фотофизические свойства, увеличение сигнала при связывании аналита и приемлемую специфичность. Дальнейшая оптимизация может позволить с помощью BFPms1 детектировать *in vivo* концентрации цинка, в диапазоне от субнанолярного уровня в цитоплазме до миллимолярного уровня в некоторых везикулах и высокого микромолярного уровня в сером веществе и нервных синапсах. Полученная с разрешением 1,44 Å структура BFPms1 со связанным цинком (PDB код 1KYS) показывает, что в белке цинк образует 5-координационное соединение в форме искаженной тригональной бипирамиды: ион металла связывается в трех местах с хромофором, с боковой группой глутаминовой кислоты 222 и молекулой воды (рис.

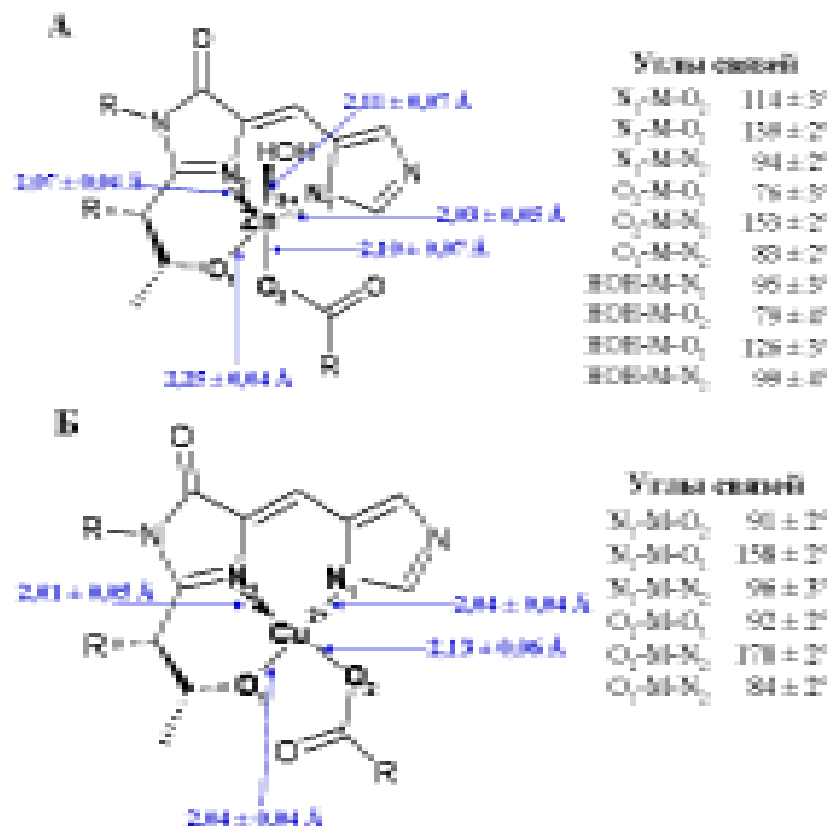


Рис. 9. Координационная геометрия BFPms1 с экспериментально определенными стандартными ошибками неопределенности для (А) Zn-связанной и (Б) Cu-связанной структур. Длины связей указаны стрелками [134].

9А). Плоскость треугольника, образованного атомами хромофора N₁ и O₁ и молекулой воды перпендикулярна плоскости хромофора. Угол H₂O-Zn-N₁, равный 95 ± 3°, — самое большое отклонение от идеальной геометрии тригональной бипирамиды (120°). Полученная с разрешением 1,50 Å структура BFPms1 со связанным ионом меди (PDB код 1KYR) показывает, что медь имеет геометрию плоского квадрата, аналогично металлизированным порфиринам, и проявляет искажение Яна-Теллера, которое выдвигает аксиальную молекулу воды из первичной координационной сферы (рис. 9Б). Геометрия лигандов Cu(II) не отклоняется слишком от плоского квадрата. Кристаллическая структура апо-формы BFPms1 с разрешением 1,35 Å (PDB код 1KYP) показывает, что в BFPms1 имеется канал, созданный мута-

цией H148G, который простирается через β -бочонок к погруженному внутрь белка хромофору. Несмотря на этот открытый канал, скорости включения металлов весьма низкие ($t_{1/2} > 4$ ч), по-видимому, вследствие электростатического отталкивания катиона металла большой положительно заряженной областью вблизи входа в канал. Структурные различия в геометрии сайта связывания металла вызваны природой металла, а не природой белковых лигандов. Белок подстраивается к связыванию цинка и меди главным образом путем различной перестройки глутаминовой кислоты 222, которая имеет несколько конформаций в апо-структуре BFPms1. Также происходит небольшой (12°) поворот имидазольного кольца хромофора, который лучше выравнивает атом N₁ хромофора для связывания меди. На основе анализа кристаллических структур белка в отсутствие металла и после связывания цинка или меди авторы [134] пришли к выводу о том, что связывание металла делает хромофор белка более жестким, связывая его в обособленную и более плоскую конформацию, что приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции при связывании цинка. Связывание меди также повышает жесткость структуры хромофора, но, поскольку она является d⁹ элементом, она тушит флуоресценцию, вероятно, по механизму переноса электрона.

Неинвазивные клинические методы визуализации экспрессии генов *in vivo*, позволяющие точно определить локализацию сайта экспрессии и количественную оценку уровня экспрессии генов, очень желательны для контроля проведения генной терапии. В работе [135] был предложен новый подход к визуализации экспрессии гена, использующий белки слияния на основе GFP как маркеры для визуализации клеток, ко-экспрессирующих интересующий ген. Чтобы придать GFP способность связывать обычно используемый в медицине изотоп технеция [^{99m}Tc], к нему были присоединены C-концевые пептиды, содержащие диглицилцистеиновые повторы, которые с высокой аффинностью связывают восстановленные оксосоединения [^{99m}Tc].

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, прижизненные (или живые, live colors) маркеры являются уникальными инструментами, которые позволяют в живой, постоянно меняющейся клетке отслеживать процессы, развивающиеся на очень быстрой временной шкале. При этом клетка практически не подвергается стрессовому воздействию при введении меченых соединений, а биохимические нарушения в клетке в целом минимальны. Это особенно важно в настоящее время в нейробиологии, где, как известно, молекулярные события, связанные с передачей сигнала, опосредованы изменением концентрации кальция и развиваются на временной шкале от десятых до сотых долей секунды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsien, R. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509–544.
2. Зубова, Н.Н., Булавина, А.Ю., Савицкий, А.П. (2003) *Успехи биологической химии*, **43**, 163–224.
3. Zimmer, M. (2002) *Chem. Rev.*, **102**(3), 759–781.
4. Hanazono, Y., Yu, J.M., Dunbar, C.E., and Emmons, R.V. (1997) *Hum. Gene Ther.*, **8**(11), 1313–1319.
5. Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., and Ke, N.J. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 712–717.
6. Wahlfors, J., Loimas, S., Pasanen, T., and Hakkarainen, T. (2001) *Histochem. Cell Biol.*, **115**, 59–65.
7. Ehrmann, M.A., Scheyhing, C.H., Vogel, R.F. (2001) *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**, 230–234.
8. Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols (Chalfie, M., and Kain, S., eds.) Wiley-Liss, New York, 1998, 385 p.
9. 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.
10. Yang, T.-T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P.A., Chen, Y.-H., Lybarger, L., Chervenak, R., Patterson, G.H., Piston, D.W., and Kain, S.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8212–8216.
11. Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, J. (1996) *Curr. Biol.*, **6**(3), 325–330.
12. Davis, S.J. and Vierstra, R.D. (1998) *Plant Mol. Biol.*, **36**(4), 521–528.
13. Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., and Falcow, S. (1997) *Microbiology*, **143**, 303–311.
14. Lorang, J.M., Tuori, R.P., Martinez, J.P., Sawyer, T.L., Redman, R.S., Rollins, J.A., Wolpert, T.J., Johnson, K.B., Rodriguez, R.J., Dickman, M.B., and Ciuffetti, L.M. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(5), 1987–1994.
15. Kirkpatrick, S.M., Naik, R.R., and Stone, M.O. (2001) *J. Phys. Chem. B.*, **105**(14), 2867–2873.
16. 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.
17. Lukyanov, K.A., Fradkov, A.F., Gurskaya, N.G., Matz, M.V., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Markelov, M.L., Zaraisky, A.G., Zhao, X., Fang, Y., Tan, W., and Lukyanov, S.A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 25879–25882.
18. Verkhusha, V.V., and Lukyanov, K.A. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 289–296.
19. Zubova, N.N., Korolenko, V.A., Astafyev, A.A., Petrukhin, A.N., Vinokurov, L.M., Sarkisov, O.M., and Savitsky, A.P. (2005) *Biochemistry*, **44**(10), 3982–3993.
20. 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.
21. Naylor, L.H. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **58**(5), 749–757.
22. Phillips, G.N. Jr. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**(6), 821–827.
23. Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., and Kenworthy, A. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**(6), 444–456.
24. Bastiaens, P.I., and Pepperkok, R. (2000) *Trends Biochem. Sci.*, **25**(12), 631–637.
25. Billinton, N., and Knight, A.W. (2001) *Anal. Biochem.*, **291**(2), 175–197.
26. Burd, C.G. (2000) *Meth. Enzymol.*, **327**, 61–69.
27. Phillips, G.J. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**(1), 9–18.
28. Hanson, M.R., and Köhler, R.H. (2001) *J. Exp. Bot.*, **52**(356), 529–539.
29. Stewart, C.N. Jr. (2001) *Plant Cell Rep.*, **20**(5), 376–382.
30. Leffell, S.M., Mabon, S.A., and Stewart, C.N. Jr. (1997) *Biotechniques*, **23**(5), 912–918.
31. Zernicka-Goetz, M., and Pines, J. (2001) *Methods*, **24**(1), 55–60.
32. Kain, S.R. (1999) *Drug Discov. Today*, **4**(7), 304–312.
33. Taylor, D.L., Woo, E.S., and Giuliano, K.A. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**(1), 75–81.
34. Shinbrot, E., Spencer, C., Natale, V., and Kain, S.R. (2000) *Meth. Enzymol.*, **327**, 513–522.
35. Misteli, T., and Spector, D.L. (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**(10), 961–964.

36. Ikawa, M., Yamada, S., Nakanishi, T., and Okabe, M. (1999) *Curr. Top. Dev. Biol.*, **44**, 1–20.
37. Green Fluorescent Protein (1999) in *Methods in Enzymology* (Conn, P.M., ed.) Academic Press, New York, **302**, pp. 11–449.
38. Green Fluorescent Protein (1999) in *Methods in Cell Biology* (Sullivan, K.F., and Kay, S.A., eds.) Academic Press, New York, **58**, pp. 1–367.
39. Matus, A. (1999) *Trends Cell Biol.*, **9**(2), 43.
40. Matus, A. (2001) *Trends Cell Biol.*, **11**(5), 183.
41. Wouters, F.S., Verveer, P.J., and Bastiaens, P.I. (2001) *Trends Cell Biol.*, **11**(5), 203–211.
42. Belmont, A.S. (2001) *Trends Cell Biol.*, **11**(6), 250–257.
43. Toomre, D., and Manstein, D.J. (2001) *Trends Cell Biol.*, **11**(7), 298–303.
44. Gory, L., Montel, M.C., and Zagorec, M. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.*, **194**(2), 127–133.
45. Dandie, C.E., Thomas, S.M., and McClure, N.C. (2001) *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**(1), 26–30.
46. Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997) *FEBS Lett.*, **407**(3), 313–319.
47. Chan, A.W., Chong, K.Y., Martinovich, C., Simerly, C., and Schatten, G. (2001) *Science*, **291**(5502), 309–312.
48. Mercuri, A., Sacchetti, A., De Benedetti, L., Schiva, T., and Alberti, S. (2001) *Plant Sci.*, **161**(5), 961–968.
49. Mercuri, A., Sacchetti, A., De Benedetti, L., Schiva, T., and Alberti, S. (2002) *Plant Sci.*, **162**(4), 647–654.
50. Haraguchi, T., Ding, D.Q., Yamamoto, A., Kaneda, T., Koujin, T., and Hirao, Y. (1999) *Cell Struct. Funct.*, **24**(5), 291–298.
51. McLean, A.J., Bevan, N., Rees, S., and Milligan, G. (1999) *Mol. Pharmacol.*, **56**(6), 1182–1191.
52. Walker, D., Htun, H., and Hager, G.L. (1999) *Methods*, **19**(3), 386–393.
53. Otsuki, M., Fukami, K., Kohno, T., Yokota, J., and Takenawa, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**(1), 97–103.
54. Zhu, H.Y., Yamada, H., Jiang, Y.M., Yamada, M., and Nishiyama, Y. (1999) *Arch. Virol.*, **144**(10), 1923–1935.
55. Wymer, C.L., Fernandez-Abalos, J.M., and Doonan, J.H. (2001) *Planta*, **212**(5–6), 692–695.
56. Straight, A.F., Marshall, W.F., Sedat, J.W., and Murray, A.W. (1997) *Science*, **277**(5325), 574–578.
57. Ward, B.M., and Moss, B. (2001) *J. Virol.*, **75**(10), 4802–4813.
58. Martinez-Torres, A., and Miledi, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**(4), 1947–1951.
59. Kanda, T., Sullivan, K.F., and Wahl, G.M. (1998) *Curr. Biol.*, **8**(7), 377–385.
60. Prescott, M., Nowakowski, S., Nagley, P., and Devendish, R.J. (1999) *Anal. Biochem.*, **273**(2), 305–307.
61. Akemann, W., Dinesh Raj, C., and Knöpfel, T. (2001) *Photochem. Photobiol.*, **74**(2), 356–363.
62. Siegel, M.S., and Isacoff, E.Y. (1997) *Neuron*, **19**(4), 735–741.
63. Biondi, R.M., Baehler, P.J., Raymond, C.D., and Véron, M. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**(21), 4946–4952.
64. Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Grosen, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996) *Science*, **273**(5280), 1392–1395.
65. Hink, M.A., Griep, R.A., Borst, J.W., van Hoek, A., Eppink, M.H.M., Schots, A., and Visser, A.J.W.G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**(23), 17556–17560.
66. Hack, N.J., Billups, B., Guthrie, P.B., Rogers, J.H., Muir, E.M., Parks, T.N., and Kater, S.B. (2000) *J. Neurosci. Methods*, **95**(2), 177–184.
67. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994) *Science*, **263**(5148), 802–805.
68. Niswender, K.D., Blackman, S.M., Rohde, L., Magnuson, M.A., and Piston, D.W. (1995) *J. Microsc.*, **180**(2), 109–116.
69. Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.-C., and Kain, S.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**(52), 34970–34975.
70. Дж. Лакович «Основы флуоресцентной спектроскопии». Пер. с англ. — М.: Мир, 1986, с. 306–313.
71. Patterson, G.H., Piston, D.W., and Barisas, B.G. (2000) *Anal. Biochem.*, **284**(2), 438–440.
72. Bastiaens, P.I.H., and Jovin, T.M. (1998) In *Cell biology: A laboratory*

- handbook (Celis, J.E., ed.) Academic Press, pp. 136–147.
73. Yan, Y., and Marriott, G. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 635–640.
74. Cubitt, A.B., Woollenweber, L.A., and Heim, R. (1999) *Methods Cell Biol.*, **58**, 19–30.
75. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997) *Nature*, **388**(6645), 882–887.
76. Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R.Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**(5), 2135–2140.
77. Heim, R., and Tsien, R.Y. (1996) *Curr. Biol.*, **6**(2), 178–182.
78. Mahajan, N.P., Harrison-Shostak, D.C., Michaux, J., and Herman, B. (1999) *Chem. Biol.*, **6**(6), 401–409.
79. Griffin, B.A., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (1998) *Science*, **281**(5374), 269–272.
80. Pearce, L.L., Gandle, R.E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A.J., McLaughlin, M.K., Pitt, B.R., and Levitan, E.S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**(1), 477–482.
81. Wachter, R.M., King, B.A., Heim, R., Kallio, K., Tsien, R.Y., Boxer, S.G., and Remington, S.J. (1997) *Biochemistry*, **36**(32), 9759–9765.
82. Robey, R.B., Ruiz, O., Santos, A.V.P., Ma, J., Kear, F., Wang, L.-J., Li, C.-J., Bernardo, A.A., and Arruda, J.A.L. (1998) *Biochemistry*, **37**(28), 9894–9901.
83. Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., and Verkman, A.S. (1998) *Biophys. J.*, **74**(3), 1591–1599.
84. Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G., and Tsien, R.Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**(12), 6803–6808.
85. Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K., and Okabe, M. (2001) *Dev. Biol.*, **237**(1), 222–231.
86. Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G., and Miyazaki, S. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**(2), 457–462.
87. Olsen, K.N., Budde, B.B., Siegmundfeldt, H., Björn Rechinger, K., Jakobsen, M., and Ingmer, H. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(8), 4145–4147.
88. Hanson, G.T., McAnaney, T.B., Park, E.S., Rendell, M.E.P., Yarbrough, D.K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S.G., Montrose, M.H., and Remington, S.J. (2002) *Biochemistry*, **41**(52), 15477–15488.
89. Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Katsuta, H., Ishida, H., and Nagamatsu, S. (2002) *Biochem. J.*, **363**(1), 73–80.
90. Elsliger, M.-A., Wachter, R.M., Hanson, G.T., Kallio, K., and Remington, S.J. (1999) *Biochemistry*, **38**(17), 5296–5301.
91. Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996) *Gene*, **173**(1), 33–38.
92. Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., and Stemmer, W.P.C. (1996) *Nat. Biotechnol.*, **14**(3), 315–319.
93. Wachter, R.M., and Remington, S.J. (1999) *Curr. Biol.*, **9**(17), 628–629.
94. Miesenböck, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998) *Nature*, **394**(6689), 192–195.
95. Tersikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zarsky, A., Tan, P., Kajava, A.V., Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., Weissman, I., and Siebert, P. (2000) *Science*, **290**(5496), 1585–1588.
96. McAnaney, T.B., Park, E.S., Hanson, G.T., Remington, S.J., and Boxer, S.G. (2002) *Biochemistry*, **41**(52), 15489–15494.
97. Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Parvinen, M., Baba, T., Nishimune, Y., and Okabe, M. (1999) *FEBS Lett.*, **449**(2–3), 277–283.
98. Sankaranarayanan, S., and Ryan, T.A. (2001) *Nat. Neurosci.*, **4**(2), 129–136.
99. Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R.M., Remington, S.J., and Verkman, A.S. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**(9), 6047–6050.
100. Galletta, L.J.V., Haggie, P.M., and Verkman, A.S. (2001) *FEBS Lett.*, **499**(3), 220–224.
101. De Giorgi, F., Ahmed, Z., Bastianutto, C., Marsault, R., Montero, M., Pizzo, P., Rossi, R., and Rizzuto, R. (1996) *Gene (Amst.)*, **173**(1), 113–117.
102. De Giorgi, F., Ahmed, Z., Bastianutto, C., Brini, M., Jouvaile, L. S., Marsault, R., Murgia, M., Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1999) *Methods Cell Biol.*, **58**, 75–85.

103. Rizzuto, R., Brini, M., De Giorgi, F., Rossi, R., Heim, R., Tsien, R.Y., and Pozzan, T. (1996) *Curr. Biol.* **6**(2), 183–188.
104. Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M., and Pozzan, T. (1995) *Curr. Biol.* **5**(6), 635–642.
105. Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M., and Lippincott-Schwartz, J. (1996) *Science*, **273**(5276), 797–801.
106. Miyawaki, A. (2003) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**(5), 591–596.
107. Jayaraman, S., Teitler, L., Skalski, B., and Verkman, A.S. (1999) *Am. J. Physiol.* **277**(5 Pt 1), 1008–1018.
108. Wachter, R.M., Yarbrough, D., Kallio, K., and Remington, S.J. (2000) *J. Mol. Biol.*, **301**(1), 157–171.
109. Feller, G., le Bussy, O., Houssier, C., and Gerday, C. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**(39), 23836–23841.
110. Wang, Z., Asenjo, A. B., and Oprrian, D.D. (1993) *Biochemistry*, **32**(9), 2125–2130.
111. Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**(1), 11–21.
112. Berridge, M.J. (1998) *Neuron*, **21**(1), 13–26.
113. Cobbold, P.H., and Rink, T.J. (1987) *Biochem. J.*, **248**(2), 313–328.
114. Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Alvarez, J., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**(17), 9896–9903.
115. Truong, K., Sawano, A., Mizuno, H., Hama, H., Tong, K.I., Mal, T.K., Miyawaki, A., and Ikura, M. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**(12), 1069–1073.
116. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Miyawaki, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(29), 10554–10559.
117. Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**(20), 11241–11246.
118. Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**(31), 29188–29194.
119. Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**(2), 137–141.
120. Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., and Miyawaki, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**(6), 3197–3202.
121. Heim, N., and Griesbeck, O. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**(14), 14280–14286.
122. Baubet, V., Le Mouellic, H., Campbell, A. K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P., and Brûlet, P. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**(13), 7260–7265.
123. Romoser, V.A., Hinkle, P.M., and Persechini, A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**(20), 13270–13274.
124. Persechini, A., Lynch, J.A., and Romoser, V.A. (1997) *Cell Calcium*, **22**(3), 209–216.
125. Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002) *Nat. Biotechnol.* **20**(1), 87–90.
126. Topell, S., Hennecke, J., and Glockshuber, R. (1999) *FEBS Lett.*, **457**(2), 283–289.
127. Miyawaki, A. (2003) *Dev. Cell.* **4**(3), 295–305.
128. Shimomura, O., and Johnson, F.H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**(6), 2611–2615.
129. Ward, W.W., and Cormier, M.J. (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 2289–2291.
130. Ward, W.W., and Cormier, M.J. (1978) *Photochem. Photobiol.* **27**, 389–396.
131. Li, Y., Agrawal, A., Sakon, J., and Beitle, R.R. (2001) *J. Chromatogr. A*, **909**(2), 183–190.
132. Richmond, T.A., Takahashi, T.T., Shimkhada, R., and Bernsdorf, J. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **268**(2), 462–465.
133. Jensen, K.K., Martini, L., and Schwartz, T.W. (2001) *Biochemistry*, **40**(4), 938–945.
134. Barondeau, D.P., Kassmann, C.J., Tainer, J.A., and Getzoff, E.D. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(14), 3522–3524.
135. Bogdanov, A. Jr., Simonova, M., and Weissleder, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1397**(1), 56–64.
136. Delagrave, S., Hawtin, R.E., Silva, C.M., Yang, M.M., and Youvan, D.C. (1995) *Biotechnology*, **13**(2), 151–154.