

УДК 577.7.577.112.

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ, ИЗМЕНЯЮЩИХ СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ВО ВРЕМЕНИ

**Ф.В. Субач¹, Е.С. Морозова^{1,2}, О.М. Субач¹, В.В. Верхуша¹,
Н.И. Буланкина², М.В. Гознага²**

¹ *Медицинский колледж им. А.Эйнштейна, 1300 Моррис Парк авеню, Нью-Йорк, 10461, США*

² *Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61077, Украина*

vverkhush@aecom.yu.edu, epersky@list.ru

Поступила в редакцию 29 апреля 2009 г.

Принята 22 июня 2009 г.

Путём направленного сайт-специфического и случайного мутагенеза мономерного красного флуоресцентного белка mCherry были созданы три мутантных белка, названных флуоресцентными таймерами (ФТ), которые, в отличие от исходного белка, изменяют со временем флуоресценцию с голубой на красную, и определены их первичные структуры. Выделенные мутантные белки отличаются друг от друга скоростями изменения спектров флуоресценции - большой (БФТ), средней (СФТ) и малой (МФТ). В сравнении с исходным mCherry БФТ содержит 5 аминокислотных замен. Среди них замены Лиз→Арг, Лей→Трп, Ала→Сер в позициях 69, 84 и 224 находятся внутри белковой молекулы, а Глу→Лиз, Сер→Тре в позициях 34 и 151 - на её внешней поверхности. В аминокислотной последовательности СФТ найдены 9 замен. Лиз→Арг, Лей→Трп, Мет→Илей, Лей→Мет в позициях 69, 84, 152 и 205 - внутренние, и Асп→Асп, Тре→Сер, Глн→Лиз, Тир→Цис, Арг→Гис в позициях 23, 43, 194, 221 и 227- внешние. МФТ имеет только 4 мутации, из которых три: Лиз→Арг, Лей→Трп, Ала→Вал в позициях 69, 84 и 179 находятся во внутреннем пространстве молекулы, а одна, в позиции 30, Глу→Вал - на её поверхности. Рассмотрена структурная роль найденных внешних и внутренних аминокислотных замен в формировании флуоресцентных особенностей БФТ, СФТ и МФТ, которые отличают их как от mCherry, так и друг от друга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флуоресцентный белок, мутагенез, хромофор, флуоресценция.

PECULIARITIES OF THE PRIME STRUCTURES OF THE RED FLUORESCENT PROTEINS THAT CHANGE THEIR FLUORESCENT SPECTRA WITH TIME

F.V. Subach, K.S. Morozova, O.M. Subach, V.V. Verkhusha, N.I. Bulankina, M.V. Goenaga

¹ *Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine,
1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA.*

² *Department of Biochemistry, V.N. Karazin Kharkiv National University,
4 Svobody square, Kharkiv 61077, Ukraine*

By the directed sight-specific and accidental mutagenesis of the red fluorescent protein mCherry 3 mutant proteins have been developed, named fluorescent timers (FT), which, in contrast to initial protein, change their fluorescence from blue to red. Their prime structures have been determined. Isolated mutant proteins differ one from another by the rate of the fluorescence spectra changes with the different rate: fast (FFT), Medium (MFT) and Slow (SFT). In comparison with initial mCherry FFT contain 5 amino acid replacements. Lys→Arg, Leu→Trp, Ala→Ser at 69, 84 & 224 positions are internal, and Glu→Lys, Ser→Thr at 34 and 151 positions are situated at the external surface of the protein. In the amino acid sequence of MFT there have been found 9 substitutions. Replacements Lys→Arg, Leu→Trp, Met→Ile, Leu→Met at 69, 84, 152 & 205 positions are internal, Asn→Asp, Thr→Ser, Gln→Lys, Tyr→Cys, Arg→His at 23, 43, 194, 221 & 227- external. SFT has only 4 replacements. Three of them Lys→Arg, Leu→Trp, Ala→Val at 69, 84 & 179 positions are in the inner space of molecule, Glu→Val at 30 position is at its surface. The structural roles of substitutions that have been found are discussed in relation with the fluorescent properties of FFT, MFT and SFT and their difference from the properties of mCherry and one from another.

KEY WORDS: fluorescent protein, mutagenesis, chromophore, fluorescence.

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРВИННОЇ СТРУКТУРИ ЧЕРВОНИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ БІЛКІВ, ЩО ЗМІНЮЮТЬ СПЕКТРИ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ З ЧАСОМ

**Ф.В. Субач¹, К.С. Морозова^{1,2}, О.М. Субач¹, В.В. Верхуша¹,
Н.І. Буланкіна², М.В. Гоєнага²**

¹ *Медицинський коледж ім. А. Ейнштейна, 1300 Моррис Парк авеню, Нью-Йорк, 10461, США*

² *Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, майдан Свободи 4, Харків, 61077, Україна*

За допомогою направленої сайт-специфічної та випадкової мутагенезу мономірного червоного флуоресцентного білка mCherry було створено три мутантних білка, названих флуоресцентними таймерами (ФТ), які, на відміну від вихідного білка, змінюють з часом флуоресценцію з блакитної на червону, та визначені їх первинні структури. Вилучені мутантні білки відрізняються один від одного швидкостями зміни спектрів флуоресценції - великою (ВФТ), середньою (СФТ) та малою (МФТ). У порівнянні з вихідним mCherry ВФТ має 5 амінокислотних заміщень. Серед них заміщення Ліз→Арг, Лей→Трп, Ала→Сер в позиціях 69, 84 і 224 знаходяться в середині білкової молекули, а Глу→Ліз, Сер→Тре в позиціях 34 та 151 - на її зовнішній поверхні. В амінокислотній послідовності СФТ знайдено 9 заміщень. Ліз→Арг, Лей→Трп, Мет→Ілей, Лей→Мет в позиціях 69, 84, 152 і 205 - внутрішні, а Асп→Асп, Тре→Сер, Глн→Ліз, Тир→Цис, Арг→Гіс в позиціях 23, 43, 194, 221 і 227- зовнішні. МФТ має тільки 4 мутації, з яких три: Ліз→Арг, Лей→Трп, Ала→Вал в позиціях 69, 84 та 179 знаходяться у внутрішньому просторі молекули і одна, в позиції 30, Глу→Вал - на її поверхні. Розглянута структурна роль знайдених зовнішніх та внутрішніх амінокислотних заміщень у формуванні флуоресцентних особливостей ВФТ, СФТ і МФТ, які відрізняють їх як від mCherry, так і один від одного.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: флуоресцентний білок, мутагенез, хромофор, флуоресценція.

Мономерные флуоресцентные белки (ФБ) с различными длинами волн флуоресценции стали незаменимым инструментом современной биологии при изучении локализации, динамики и взаимодействий внутриклеточных молекул [1]. Особенно ценными для визуализации хронологии и локализации молекулярных событий могут быть флуоресцентные таймеры (ФТ) [2-4], у которых длина волны флуоресценции изменяется во времени.

С помощью направленной искусственной молекулярной эволюции (чередование направленного и случайного мутагенезов, с использованием усовершенствованного метода селекции мутантов) на основе гена ФБ mCherry - мономерного варианта белка DsRed - были созданы три новых белка, т.н. флуоресцентные таймеры (ФТ) [5, 6].

Основной особенностью этих белков, изученной в работе [7], является их способность изменять во времени флуоресценцию с голубой на красную с различной скоростью (большой - БФТ, средней - СФТ и малой - МФТ).

Естественно, что неодинаковые скорости изменения спектра флуоресценции - «созревания» - БФТ, СФТ и МФТ определяются различиями их аминокислотного состава. Несомненно, определяющую роль в этом должны играть замены близких к хромофору аминокислотных остатков, хотя какое-то значение могут иметь замены и в более удаленных областях молекулы.

В данной работе исследованы различия первичной структуры всех трёх ФТ, определяющие их флуоресцентные свойства, как в ходе мутационного процесса, так и в окончательно отобранных вариантах БФТ, СФТ и МФТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала для мутагенеза использовали амплифицированный с применением ПЦР ген mCherry, который в дальнейшем был вставлен в бактериальный вектор pBAD/His-B (Invitrogen).

Направленный мутагенез проводили по нескольким позициям: 42 (Лей), 44 (Лей), 65 (Сер), 69 (Глн), 106 (Тир), 148 (Гис), 203 (Тре) и 224 (Вал). Нумерация

аминокислотных остатков приведена в соответствии с первичной структурой зелёного флуоресцентного белка - ЗФБ, (рис. 1а) [8].

Перечисленные позиции выбраны на основании структуры mCherry [9] и данных об аминокислотных заменах, влияющих на скорость созревания мутантных вариантов DsRed [10-12]. Согласно структуре mCherry, остатки 42 (Глн) и 44 (Ала) расположены вблизи остатка 65 (Мет), а остатки 69 (Лиз), 148 (Сер) и 203 (Илей) близки к фенольному и/или имидазольному кольцам хромофора. Остаток 224 (Лиз) находится в непосредственной близости к остатку 203 (Илей) и, предположительно, косвенно влияет на положение хромофора (рис. 1 – б, в, г).

Случайный мутагенез выполняли с применением Quick Change Mutagenesis Kit (Stratagene) при условиях, приводящих к частоте мутаций до 16 на 1000 пар оснований. Смесь ДНК мутантов электропорировали в бактерии LMG194 (Invitrogen).

В полученных бактериальных библиотеках мутантов, клонированных под арабинозным промотором, искали ярко-голубые/некрасные клоны в разные промежутки времени после индукции синтеза белка (1, 4 и 24 часа для выявления клонов с большой, средней и малой скоростями формирования хромофора соответственно).

Затем наработку белка подавляли добавлением глюкозы, а отобранные клоны повторно скринировали на наличие яркокрасного/неголубого фенотипа по истечении 24 и 48 часов для нахождения клонов со средней и малой скоростями созревания соответственно.

После каждого цикла мутагенеза клоны отбирали для следующего цикла по таким критериям:

- А – по выраженному изменению флуоресценции с голубой на красную;
- Б - по самой яркой флуоресценции обеих форм;
- В - по времени перехода от голубой флуоресценции к красной;
- Г - по аминокислотным заменам на поверхности молекул ФБ, которые не приводят к их димеризации.

Отобранные наиболее яркие голубые/незелёные/некрасные бактериальные клетки содержали в богатой питательной среде SOC при 37⁰С, наносили их на нитроцеллюлозные мембраны, помещенные в чашки Петри со средой Лурия-Бертани (LB) с ампициллином и инкубировали в течение ночи при 37⁰С.

Затем мембраны переносили на питательную среду RM с ампициллином и индуктором экспрессии генов – арабинозой (0,2%).

После индукции синтеза белка в течение 1 часа для БФТ или 4 часов для СФТ проводили поиск самых ярких голубых/незелёных/некрасных колоний с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Leika MZ16F, снабженного набором соответствующих светофильтров. Для отбора МФТ требовалось дополнительно 20 часов.

Для очистки рекомбинантных белков клетки LMG194 выращивали в течение ночи и разбавляли до оптической плотности 1,0 при 600 нм, затем добавляли арабинозу (0,2%) для индукции синтеза белка и выращивали без доступа кислорода при 37⁰С в течение 1 часа. После этого белки очищали с помощью реактива В-Per (Pierce) и смолы Ni-NTA (Qiagen) в течение 15 мин. Очистку проводили при 4⁰С.

Мутантов с необходимыми свойствами ФТ отбирали из полученных бактериальных библиотек, используя проточную цитофлуориметрию и последующую флуоресцентную стереомикроскопию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования библиотек с сайт-направленными заменами в восьми вышеуказанных позициях были найдены два мутанта mCherry с таймерными свойствами. Один из них имел консервативную аминокислотную замену в 69 позиции (Лиз→Арг). Второй, помимо этого, имел замену в позиции 224 (Ала→Сер). Эти мутанты отличались от исходного mCherry наличием голубых форм.

Важность мутации в 69 положении, очевидно, связана с близостью этого остатка к хромофору, включающему трипептид –Сер-Илей-Гли- (66, 67 и 68 позиции, рис. 1а). Однако яркость голубой флуоресценции была очень низкой в случае замены Лиз→Арг в mCherry. Красные формы созревали медленнее, чем mCherry.

Другие мутации, найденные в анализируемых вариантах, не приводили к появлению таймерных фенотипов. Учитывая то, что у мутанта mCherry с двумя заменами - в 69 и 224 положениях (Лиз→Арг и Ала→Сер соответственно) голубая форма появлялась раньше, чем у mCherry с заменой лишь Лиз→Арг, первый вариант был использован в дальнейшем для случайного мутагенеза и поиска БФТ. Соответственно, второй мутант был выбран в качестве исходного гена для случайного мутагенеза и поисках СФТ и МФТ.

Дальнейший поиск ФТ с желательными свойствами состоял в осуществлении последовательных циклов случайного мутагенеза, с исследованием и отбором мутантных клонов проточной цитофлуориметрией и флуоресцентной стереомикроскопией.

Если не удавалось найти лучший вариант в следующем цикле мутагенеза, усовершенствование этого ФТ случайным мутагенезом в дальнейшем не проводили.

Ключевой мутацией, найденной в первом цикле случайного мутагенеза для всех таймерных фенотипов, являлась замена Лей→Трп в 84 положении. Варианты ФТ, содержащие эту аминокислотную замену, имели существенно более яркую голубую и красную флуоресценции.

Согласно структуре mCherry [9], остаток в положении 84 влияет на положение остатка 69. Так, замена Лиз→Лей в mCherry, по сравнению с исходным DsRed, приводит к смещению остатка Лиз (положение 69) на 2.7 Å. Известно, что мутация Лей→Трп в позиции 84 может привести к изменению положения Арг (позиция 69) также и в ФТ. Как было показано, именно аминокислотный остаток в положении 69 играет важную роль в формировании красного хромофора. У красных ФБ почти всегда в этом положении находятся остатки Лиз или Арг [11].

Для DsRed именно замена в 69 положении Лиз→Арг является единственной заменой, которая сохраняет формирование красного хромофора, и в то же время замедляет созревание, тогда как другие замены в этом положении приводят к формированию зелёных хромофоров [14]. Следовательно, у ФТ - производных mCherry, аминокислотные остатки Арг (положение 69) и Трп (положение 84) оказываются ключевыми, ответственными за замедленный переход от голубой флуоресценции к красной.

Количество циклов случайного мутагенеза составляло 4, 5 и 3 для БФТ, СФТ и МФТ соответственно. После нескольких циклов мутаций интенсивности флуоресценции обеих (голубой и красной) форм лучших ФТ вариантов увеличивались и выходили на плато

Другие мутации, в частности, замена Мет→Вал или Мет→Лей в позиции 18, приводили к незначительному уменьшению интенсивности красной формы. Это компенсировалось большим ростом интенсивности голубой флуоресценции. Аминокислотный остаток в положении 18 близок к хромофору (рис. 1- б, в, г) и

находится во внутренней области исследуемых белков, что может определять его влияние на интенсивность флуоресценции. Однако для скорости созревания, очевидно, не важно, произойдет ли эта замена на Вал или на Лей. И по степени гидрофобности, и по размеру оба заместителя близки и встречаются как у средней, так и у быстрой форм ФТ (рис 1а).

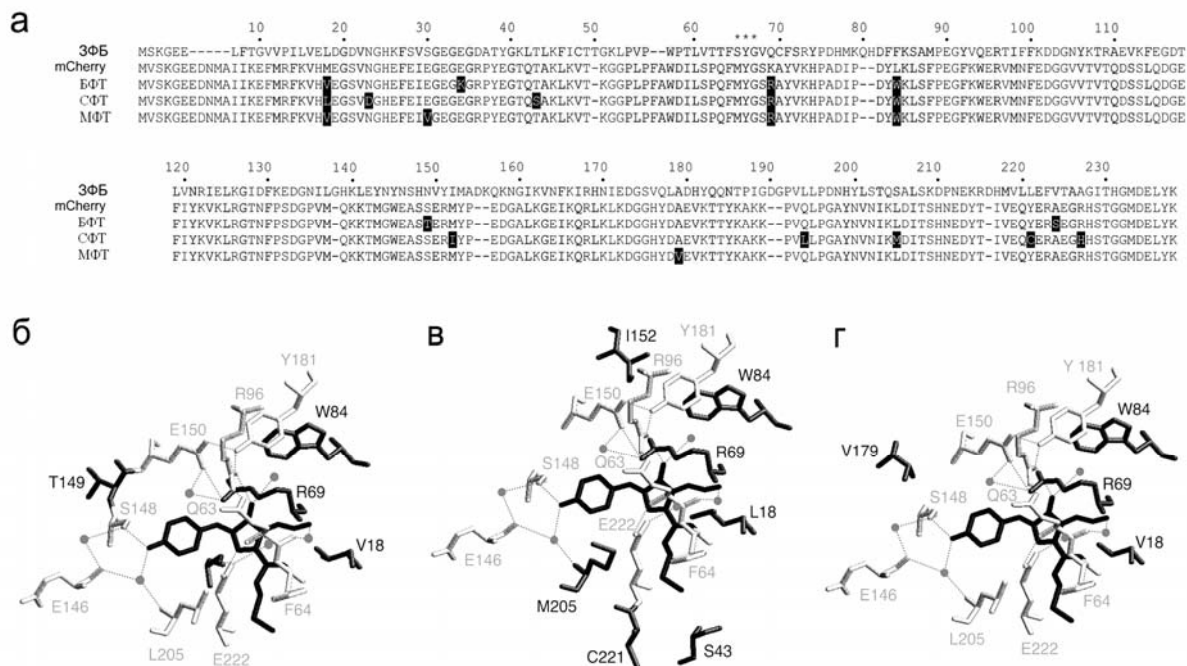


Рис. 1. Аминокислотные замены, преобразующие mCherry во флуоресцентные таймеры.

Названия аминокислотных остатков даны в виде стандартного однобуквенного кода.

а - Аминокислотные последовательности 3ФБ, mCherry, БФТ, СФТ и МФТ. Нумерация аминокислотных остатков приведена в соответствии с их последовательностью в 3ФБ. Аминокислотные остатки, расположенные внутри молекулы, изображены серым цветом. Остатки, формирующие хромофор, отмечены звездочками. Мутации ФТ относительно mCherry показаны чёрным цветом.

б, в, г - Аминокислотные остатки, расположенные в позициях, вблизи хромофора для БФТ, СФТ и МФТ соответственно. Расстояние от хромофора до изображённых аминокислотных остатков находится в пределах до 9.5Å. Хромофор показан чёрным, консервативные аминокислотные остатки - светло серым, и мутированные остатки - серым.

Молекулы воды представлены как серые сферы. Водородные связи показаны серым пунктиром.

На основании полученных результатов варианты с мутациями в позициях 69 и 84 были отобраны для следующего цикла случайного мутагенеза. Для того, чтобы мутанты с другими оптимизирующими заменами не были пропущены, найденные лучшие варианты БФТ, СФТ и МФТ дополнительно подвергали сайт-направленному мутагенезу по позициям 69, 84, 143, 179, 203 и 205. Однако лучшие варианты ФТ найдены не были.

Целый ряд аминокислотных замен, обнаруженных по сравнению с исходной формой DsRed, не сказался на скорости перехода от красной флуоресценции к голубой. Это касается, например, замены Асп→Асн в 23 положении. Нахождение этих остатков в наружной части белка и близкое их сходство согласуется с отсутствием влияния замены Асп→Асн на скорость созревания ФБ.

Аналогичная ситуация характерна и для мутации в 43 положении, состоящей в замене Сер→Тре при переходе от СФТ к МФТ. Эти аминокислотные остатки содержат одинаковые полярные ОН-группы в радикалах и расположены в наружной

части белков. В связи с этим, влияние данной замены на скорость их созревания не наблюдается. И у БФТ и у МФТ в этом положении находится Сер и лишь у СФТ – Тре.

Замена Лиз→Глу в позиции 34, при которой изменяется знак аминокислотного остатка, происходит в наружной области молекулы и в силу этого её влияние на скорость созревания ФТ маловероятно, ибо аминокислоты в этой позиции отвечают преимущественно за связь белка с окружающей его водной средой

Замена Глу→Вал в позиции 30, вероятно, может замедлить созревание мутанта и способствовать его превращению в МФТ, создав крупную гидрофобную пару с Илей в положении 29.

В структуре mCherry малый гидрофобный остаток Ала (положение 224) вступает в ван-дер-ваальсово взаимодействие с крупным гидрофобным остатком Илей (положение 203). В свою очередь, остаток Илей находится в непосредственной близости к хромофору [9]. Замена Ала→Сер в положении 224, наблюдаемая у БФТ, приводит к появлению в этой области полярной гидроксильной группы, что может повлиять на положение аминокислотного остатка Илей в позиции 203. Однако обратная замена - Сер→Ала, характерная для СФТ и МФТ, не дает оснований утверждать, что она имеет существенное значение для созревания обоих белков.

Известно, что в mCherry Лей (положение 205) образует несколько ван-дер-ваальсовых взаимодействий с Тир хромофора. Кроме того, остаток Мет (положение 152) формирует ван-дер-ваальсовы взаимодействия с Глу (положение 150) и Тир (положение 185), которые расположены в непосредственной близости к хромофору. Таким образом, мутации в положениях 152 (Мет→Илей) и 205 (Лей→Мет) у СФТ могут влиять на созревание красного хромофора. Однако, как в и предыдущем случае, наличие одинаковых остатков в этих позициях у БФТ и МФТ не позволяет считать эти мутации определяющими для скорости созревания ФБ.

Привлекает к себе внимание мутация в позиции 179, приводящая к замене во внутренней области белка малого неполярного остатка Ала на крупный гидрофобный Вал. Эта замена характерна для МФБ и с ней может быть связано затруднение его созревания по сравнению с БФТ и СФТ.

Остаток Ала в положении 179 в mCherry образует ван-дер-ваальсовы связи с внутренними остатками Мет (положение 98) и Ала (положение 100). Вероятно, при замене Ала→Вал возникают пространственные затруднения для таких взаимодействий, что и замедляет созревание ФТ. Такое влияние замены Ала→Вал в позиции 179 подобно замедлению созревания красного хромофора DsRed. [13] при замене Вал→Ала и также связано с влиянием на систему ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

ВЫВОДЫ

1. Определяющей заменой аминокислотного остатка в первичной структуре mCherry, которая приводит к появлению таймерных свойств у мутантов этого белка, является переход Вал→Лей в позиции 69.
2. Внутренние замены аминокислотных остатков ФТ играют более существенную роль в скорости их созревания, чем замены на поверхности молекулы.
3. Различия в таймерных свойствах БФТ, СФТ и МФТ определяются свойствами аминокислотных остатков в положениях 69, 84 и 179.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shaner N.C., Patterson G.H., Davidson M.W. Advances in fluorescent protein technology // J. Cell Sci.– 2007. –V. 120. – P. 4247-4260.

2. Miyawaki A., Karasawa S. Memorizing spatiotemporal patterns // *Nat. Chem. Biol.* – 2007. – V. 3. – P. 598-601.
3. Terskikh A. "Fluorescent timer": protein that changes color with time // *Science.* – 2000. – V. 290. – P. 1585-1588.
4. Mirabella R., Franken C., van der Krogt G.N., Bisseling T., Geurts R. Use of the fluorescent timer DsRed-E5 as reporter to monitor dynamics of gene activity in plants // *Plant Physiol.* –2004. – V. 135. –P. 1879-1887.
5. Verkhusha V.V., Chudakov D.M., Gurskaya N.G., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins // *Chem. Biol.* – 2004.– V. 11. – P. 845-854.
6. Subach F.V., Subach O.M., Gundorov I.S., Morozova K.S., Piatkevich K.D., Cuervo A.M., Verkhusha V.V. Monomeric fluorescent timers that change the color from blue to red // *Nat. Chem. Biol.* – 2009. – V. 5:2. – P. 118-126.
7. Субач Ф.В., Морозова Е.С., Верхуша В.В., Перский Е.Э. Спектральные характеристики красных флуоресцентных белков, изменяющих спектр флуоресценции во времени // *Біофізичний Вісник* – 2009. – №. 22 (1) – С. 116-122.
8. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction // *Gene* –1989. – V. 77. –P. 51-59.
9. Shu X., Shaner N.C., Yarbrough C.A., Tsien R.Y., Remington S.J. Novel chromophores and buried charges control color in mFruits // *Biochemistry* –2006. – V. 45. – P. 9639-9647.
10. Bevis B.J., Glick B.S. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed) // *Nat. Biotechnol.* –2002. – V. 20. –P. 83-87.
11. Remington S.J. Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics // *Curr Opin Struct Biol.* – 2006. – V. 16. –P. 714-721.
12. Reid B.G., Flynn G.C. Chromophore formation in green fluorescent protein // *Biochemistry* – 1997. – V. 36. – P. 6786-6791.
13. Yarbrough D., Wachter R.M., Kallio K., Matz M.V., Remington S.J. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2001. – V. 98. – P. 462-467.