

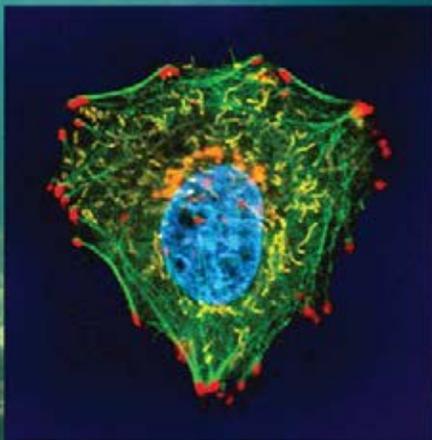
РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России



ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ:

природное разнообразие
и применение
в биомедицинских
исследованиях

Академик РАН Лукьянов С.А.



АКТОВАЯ РЕЧЬ

История открытия и природное разнообразие флуоресцентных белков

Биолюминесцентное свечение медузы *Aequorea victoria* (рис.1) было описано уже несколько веков назад. В 1961–1962 гг. американские ученые О. Шимомура, Ф. Джонсон и Ю. Сайга выделили из нее способный к свечению белок-люциферазу, названный экворин, и люциферин, который назвали целенторазином (от Coelenterata – кишечнополостные). Оказалось, однако, что выделенная люцифераза излучает синий свет с максимумом при 465 нм, тогда как сама медуза светится зеленым светом с максимумом при длине волны 508 нм. Выяснилось, что кроме экворина в фотогенных тканях медузы присутствует другой белок. Возбуждаясь под действием синего или ультрафиолетового излучения, этот белок испускает зеленый свет – флуоресцирует. За это свойство белок назвали зеленым флуоресцентным белком (GFP – от green fluorescent protein).

Ген GFP был клонирован в 1992 г в лаборатории В. Варда. Вскоре М. Chalfie с коллегами продемонстрировали, что GFP можно использовать для флуоресцентной окраски внутри живых организмов (рис.2). Было показано, что для получения флуоресценции достаточно ввести снабженный подходящим промотором ген GFP в клетки организма-хозяина.

Была определена структура белка. Оказалось, что молекула GFP укладывается в напоминающую бочку структуру, образованную 11 бета-слоями, внутри которых располагается альфа-спираль с хро-

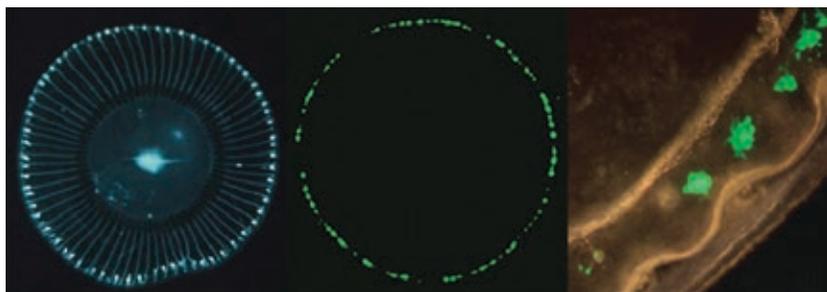


Рис. 1. Медуза *Aequorea aequorea* (*A. victoria*).

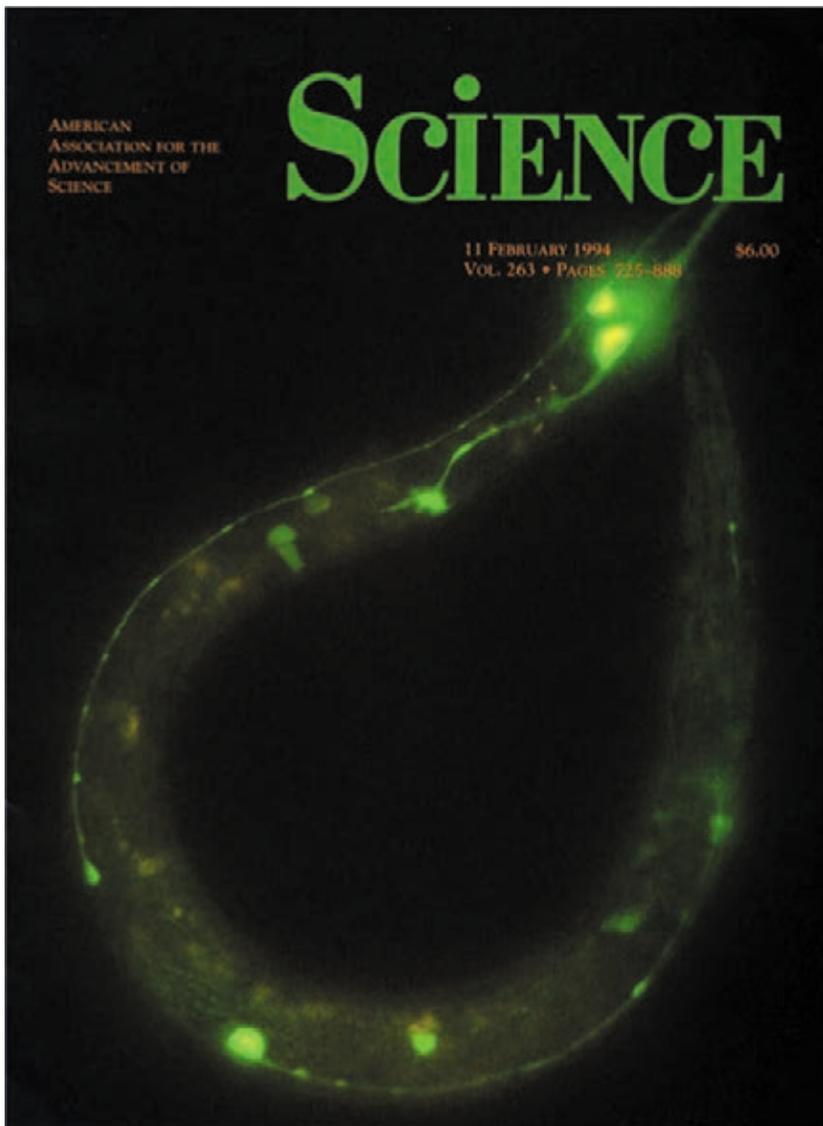


Рис. 2. Обложка журнала, в котором было опубликовано первое сообщение об использовании GFP в качестве генетически-кодируемой метки.

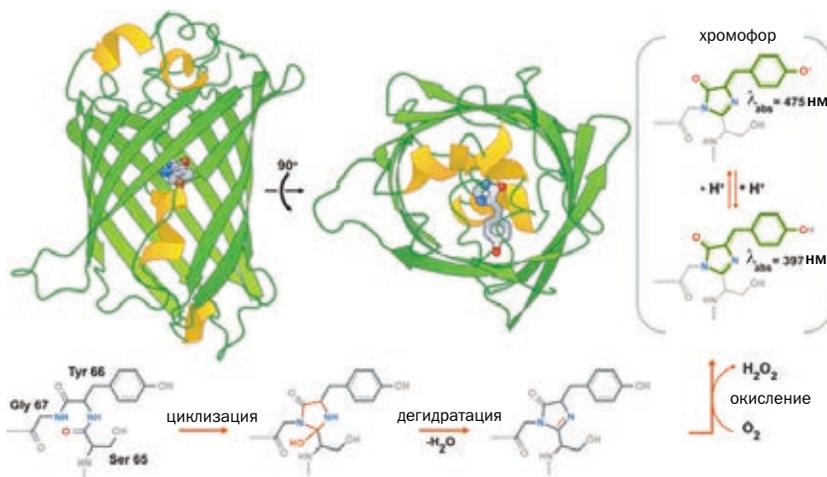


Рис. 3. Структур GFP и автокаталитическое формирование хромофора.

мофором (рис. 3). Хромофор формируется самой же полипептидной цепью в ходе автокаталитических реакций дегидрогенизации и окисления молекулярным кислородом остатка тирозина. Окисленный тирозин реагирует с другой аминокислотой в той же цепи – глицином. В результате возникает система так называемых сопряженных связей, способная к флуоресценции. Она поглощает «ультрафиолетовые» или «синие» фотоны и испускает в ответ фотоны с меньшей энергией, соответствующие сине-зеленому свету.

Вскоре GFP стал очень популярен как прижизненный генетически кодируемый маркер. К 2002 г. общее число работ с применением GFP превысило 9000. В 2008 году открытие GFP было отмечено Нобелевской премией.

После появления GFP возникло желание одновременно окрашивать сразу несколько структур или белков в клетке, следить за их взаимодействиями. Однако, хотя подобные GFP белки и были описаны у ряда гидроидов (*Aequorea*, *Obelia* и др.) и кораллов (морское перо *Renilla*), не было клонировано больше ни одного гена. К тому же все описанные белки были зелеными. Попытки создать мутанты GFP с измененными спектральными свойствами привели лишь к частичному успеху: были созданы более голубой и более желтый варианты, однако широкой панели цветов получить не удалось. Особый же интерес

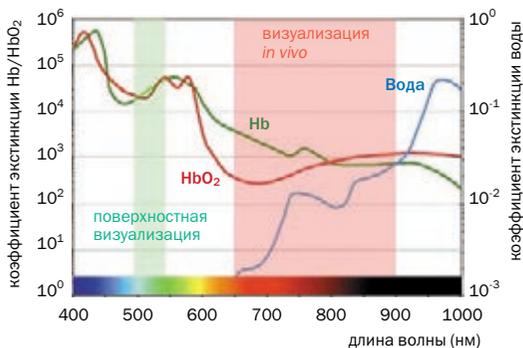


Рис. 4. Красный свет лучше проходит через ткани животных.

был в получении красных и дальне-красных флуоресцентных белков. Дело в том, что из-за характеристик поглощения света кожей и гемоглобином именно дальне-красное излучение лучше всего проникает сквозь ткани животных (рис. 4).

Прогресс в расширении цветовой палитры флуоресцентных белков тормозило сложившееся убеждение, что все GFP-подобные белки обязательно встроены в биолюминесцентные системы как преобразователи синего света. Мысль о том, что они могут функционировать совсем в иных качествах, выполняя совершенно другие функции, долго никому не приходила в голову.

В этот момент (лето 1998 года) в работу включилась наша исследовательская группа. Один из участников проекта Ю.А. Лабас обратил наше внимание на то, что у целого ряда неспособных к биолюминесценции коралловых полипов при освещении ультрафиолетом или голубым светом появляется яркая флуоресценция (рис.5).

Большинство ученых в то время полагали, что за флуоресценцию небиолюминесцентных коралловых полипов ответственны какие-то низкомолекулярные солнцезащитные «пигменты». Ю.А. Лабас же предположил, что коралловые полипы могут содержать гены GFP-подобных белков, функционирование которых не связано с работой биолюминесцентных систем.

Благодаря любезности московского аквариумиста А. Романько мы получили кусочки коралловых полипов разного цвета, выделили из них РНК и начали поиск последовательностей, подобных GFP.



Рис. 5. Флуоресценция и окраска неблюминесцентных коралловых полипов.

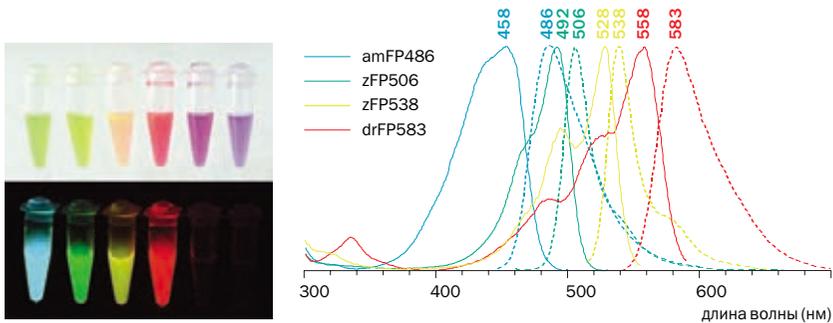


Рис. 6. GFP-подобные белки коралловых полипов.

Через три месяца у нас появилась коллекция GFP-подобных флуоресцентных белков с цветами от голубого до красного (рис. 6). Более того, оказалось, что нефлуоресцентная окраска коралловых полипов тоже определяется GFP-подобными белками.

В дальнейшем GFP-подобные белки были найдены у животных многих систематических групп, например, у планктонных рачков-копепод и ланцетников.

За счет мутагенеза новых природных белков палитра GFP-подобных меток была заметно расширена и сейчас включает варианты с эмиссией от 440 до 670 нм (рис. 7).

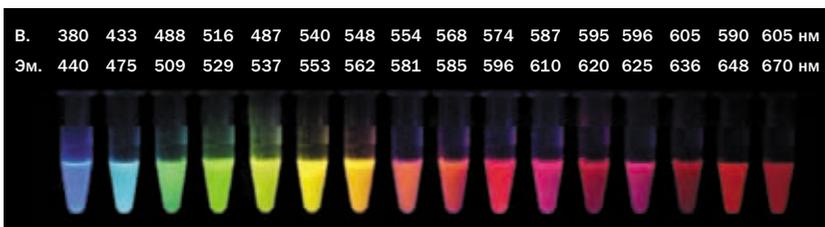


Рис. 7. Палитра GFP-подобных белков. В. – возбуждение; Эм. – эмиссия.

Использование флуоресцентных белков в экспериментальной биологии и биомедицине

Самый большой вклад флуоресцентные белки внесли в клеточную биологию. До открытия GFP учёные могли получать изображения мёртвых клеток, окрашенных искусственными красителями. GFP позволил наблюдать живую клетку в движении и развитии.

В результате открытия новых GFP-подобных белков появилась возможность окрашивать множество внутриклеточных структур одновременно (рис. 8).

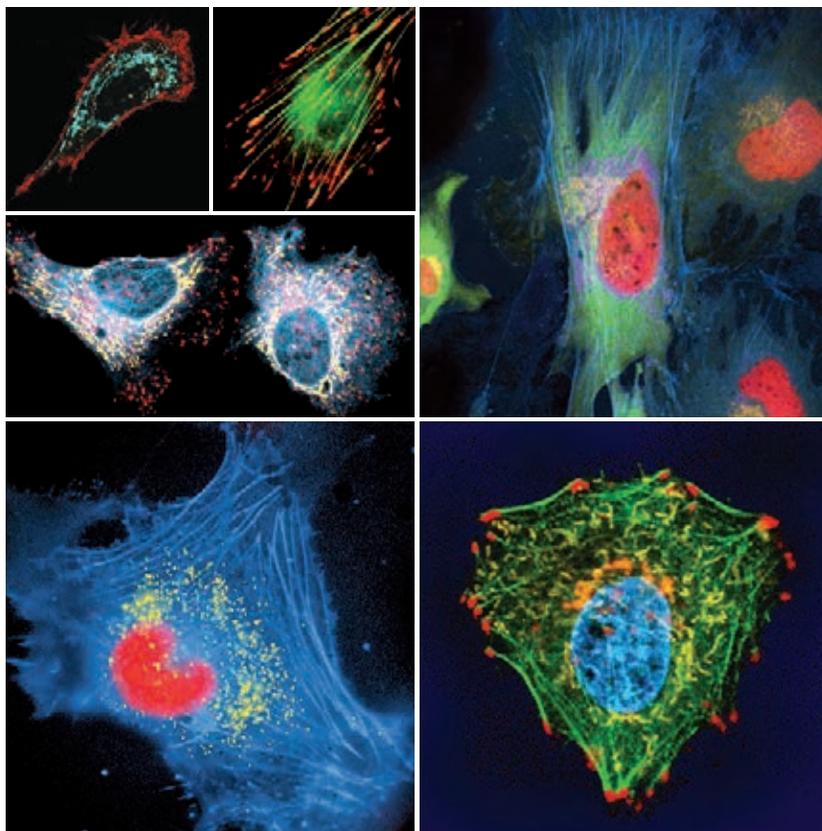


Рис. 8. Многоцветное мечение с помощью GFP-подобных флуоресцентных белков.

Благодаря появлению красных и дальне-красных меток стало удобнее наблюдать за биологическими процессами внутри целых организмов (рис. 9).

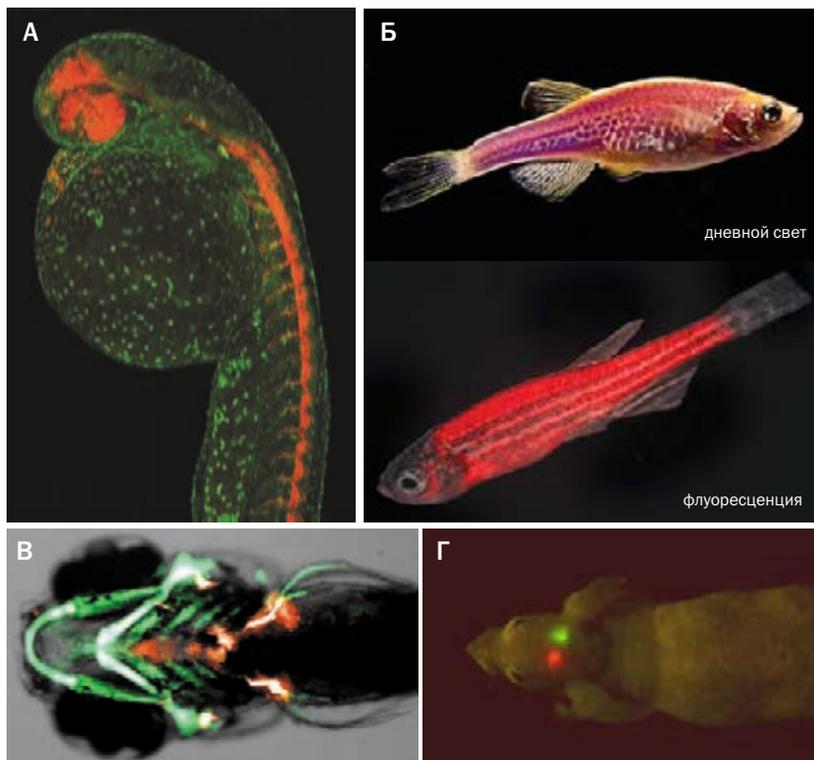


Рис. 9. Мечение внутри целых организмов с помощью флуоресцентных белков: А – эмбрион трансгенной рыбы *Danio rerio*, экспрессирующий дальне-красный флуоресцентный белок в нервной системе; Б – трансгенная рыба *Danio rerio*, экспрессирующая дальне-красный флуоресцентный белок в мышцах; В – трансгенная мышь, экспрессирующая зеленый белок в хрящевой и красный белок в костной ткани; Г – мышь с прививаемыми опухолями головного мозга, мечеными красным и зеленым флуоресцентными белками.

Одним из важных применений GFP-подобных белков стало их использование в качестве прижизненных маркеров при скрининговых исследованиях лекарственных препаратов-кандидатов. Например, GFP-подобные белки можно использовать при анализе влияния различных факторов на рост прививаемой опухоли. Ген флуоресцентного белка вводят в культивируемые клетки опухоли. Флуоресцент-

ные клетки закалывают в мышь и наблюдают за ростом опухоли по изменению флуоресцентного сигнала.

Появились и принципиально новые возможности для слежения за биологическими процессами и воздействия на клетки.

Во-первых, были открыты фотоактивируемые и фотопереклю-чаемые флуоресцентные белки (ФФБ), меняющие спектральные ха-рактеристики под действием активирующего света (рис. 10).

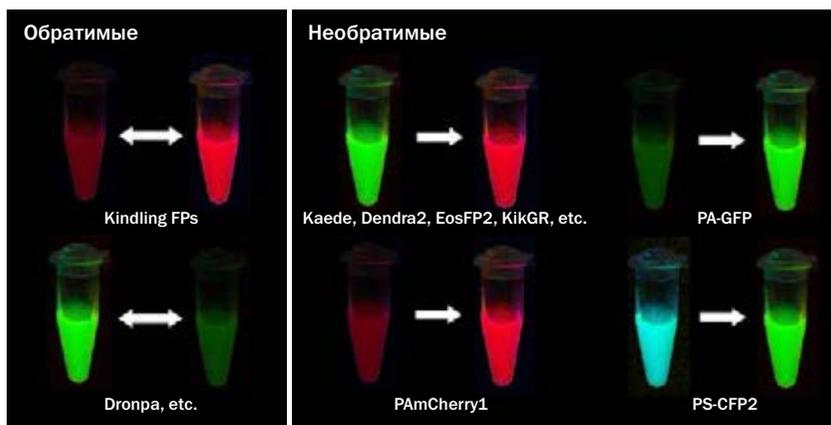


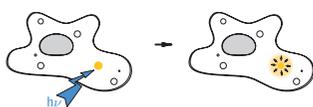
Рис. 10. Фотоактивируемые и фотопереключаемые флуоресцентные белки.

Было обнаружено два типа фотоконверсии: обратимая и необратимая. В случае необратимой фотоконверсии флуоресцентный белок активируется светом один раз. В данном случае происходит химическая реакция, которая приводит к изменению флуоресцентного белка и переводу его из одного спектрального состояния в другое. Например, первый фотоактивируемый флуоресцентный белок, который был описан в начале 2000-х годов, photoactivatable green fluorescent protein (PA-GFP) переводится из темного, невидимого состояния в ярко-зеленое облучением фиолетовым светом. При этом происходит декарбоксилирование одного из остатков глутамата внутри белка и выделение молекулы CO_2 . Естественно, такая фотоконверсия является необратимой, поскольку молекула CO_2 улетает. А белок переходит в ярко-зеленое состояние. В случае обратимо фотоконвертируемых белков можно много раз производить фотоконверсию

из одного состояния в другое и обратно. Соответственно, изменение спектральных характеристик связана не с фотохимическими реакциями, а с изомеризацией хромофора и его протонированием или депротонированием.

ФФБ позволяют пометить отдельную клетку, органеллу или ограниченное количество молекул белка в клетке и отслеживать их перемещения внутри живого объекта (рис. 11 - 12).

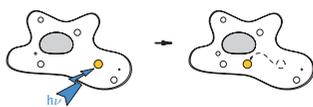
Наблюдение за белками



Отслеживаемые параметры:

- скорость и направление белкового транспорта
- коэффициент диффузии
- выявление мобильных и статических фракций
- скорость деградации

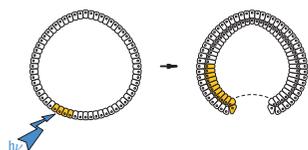
Наблюдение за клеточными органеллами



Отслеживаемые параметры:

- скорость и направление движения
- скорость обновления содержимого
- слияние и деление

Мониторинг миграции клеток



Отслеживаемые параметры:

- скорость и направление движения
- локализация
- скорость деления
- изменение формы и объема

Рис. 11. Исследования клеточной динамики с помощью фотоактивируемых белков. Сфокусированный луч света (синяя стрелка на схеме) используют для активации фотоактивируемого белка в интересующей области клетки, ткани или организма (оранжевый цвет). Динамику отмеченного объекта можно отслеживать с течением времени.

Например, при отслеживании белкового транспорта небольшой участок клетки, экспрессирующей целевой белок меченый ФФБ, освещают активирующим светом, который приводит к фотоконверсии ФФБ. Далее в этом месте появляется флуоресцентный сигнал и

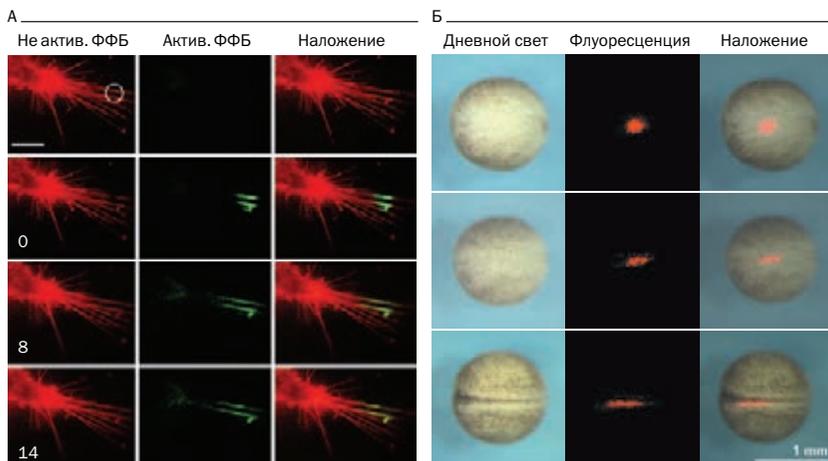


Рис. 12. Использование ФФБ для наблюдения за клеточной динамикой. А – Транспорт допаминового транспортера по филоподиям клетки. Цифрами показано время после активации (мин). Шкала, 10 мкм. Б – Клеточная миграция в ходе развития нервной пластинки *Xenopus laevis*.

мигрирует в другие части клетки. Таким образом, наблюдая за флуоресцентным сигналом, можно проследить, с какой скоростью и куда передвигается меченый белок.

ФФБ нашли свое применение и в новых технологиях сверхразрешающей световой микроскопии, позволившей обойти дифракционный барьер разрешения световой микроскопии и получать изображения внутриклеточных объектов с 10-нм разрешением.

Более ста лет назад был сформулирован закон, согласно которому разрешение оптической микроскопии не может быть выше определенного порога, который называется дифракционным барьером и равен примерно половине длины волны возбуждающего света. Если длина волны света 500 нм (это зеленый свет), значит, получаемое разрешение не превышает 250 нм. Таким образом, долгое время структуры, детали которых находятся ближе, чем 250 нм друг к другу, оказывалось невозможно различить.

В 2006 году была проделана работа, результаты которой были опубликованы в журнале Science. Было показано, что фотоактивируемые белки могут быть использованы для преодоления дифракци-

онного барьера разрешения световой микроскопии. В данном случае ученые наблюдали отдельные молекулы флуоресцентных белков, которые получали после фотоактивации. Надо сказать, что флуоресцентный сигнал от одной молекулы получается больше, чем те самые 200–250 нм, но, когда известно, что объектом является одна молекула, можно понять, где именно она находится, поставив маленькую точку в центр пятна.

Сегодня технологии сверхвысокого разрешения с использованием фотоактивируемых флуоресцентных меток состоят из повторяющихся циклов активации и гашения флуоресценции отдельных молекул и их пространственной локализации с точностью до нескольких нанометров. При возбуждении низкой мощностью лазера активации «включается» небольшой процент флуоресцентных меток, после локализации следует фотообесцвечивание активировавшихся молекул для удаления их из дальнейшего анализа. В результате становится возможным реконструкция изображения со сверхвысоким разрешением (рис. 13).

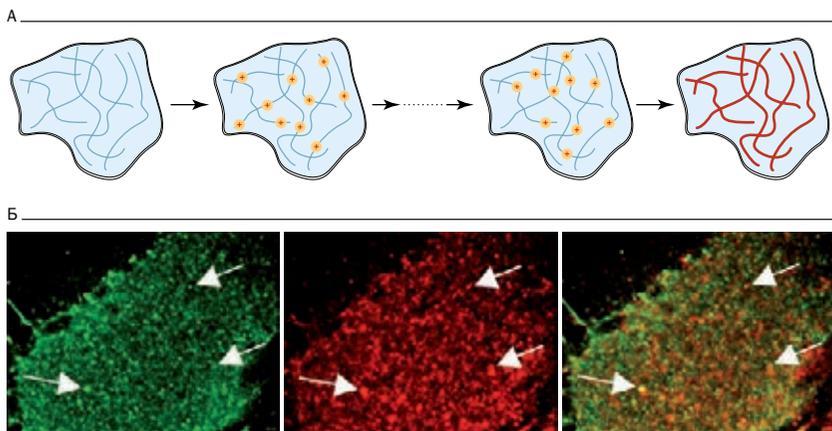


Рис. 13. Использование ФП для микроскопии сверхвысокого разрешения. А – Принцип микроскопии сверхвысокого разрешения, основанной на повторяющихся циклах активации, и гашения флуоресценции. Б – Использование фотоактивируемых белков в микроскопии сверхвысокого разрешения: клеточный белок VSVG помечен зеленым фотоактивируемым флуоресцентным белком, EGFR – красным. Стрелками указана колокализация молекул белков VSVG и EGFR.

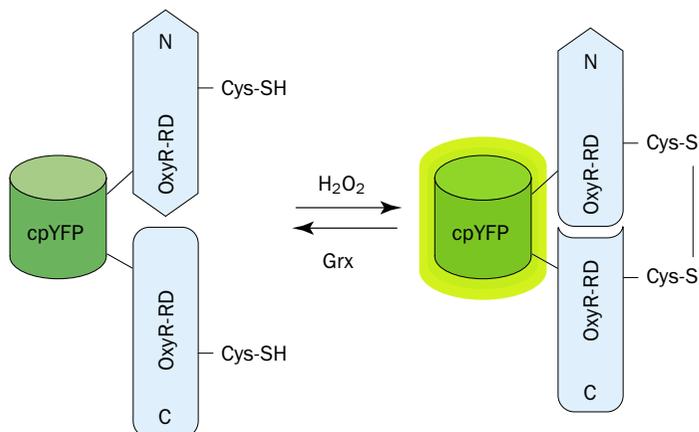


Рис. 14. Схема устройства биосенсора HyPer для регистрации внутриклеточных изменений концентрации пероксида водорода.

Во-вторых, были разработаны генетически-кодируемые флуоресцентные биосенсоры, позволяющие отслеживать внутриклеточные изменения концентраций важных сигнальных молекул, таких как ионы кальция, пероксид водорода, АТФ и т.д.

Один из таких биосенсоров, HyPer, позволяет проводить анализ изменений концентрации пероксида водорода – одной из основных активных форм кислорода, образующихся в клетке. В состав биосенсора входит GFP-подобный белок и чувствительный к пероксиду водорода домен транскрипционного фактора *E. coli* OxyR (OxyR-RD).

OxyR-RD способен селективно и обратимо взаимодействовать пероксидом водорода, меняя свою конформацию. В составе биосенсора HyPer две части OxyR-RD связаны с N- и C-концами флуоресцентного белка. При появлении H_2O_2 происходит образование дисульфидной связи в OxyR-RD и изменяется его конформация. Изменение конформации OxyR-RD приводит к изменению окружения хромофора флуоресцентного белка и изменению его спектральных характеристик (рис.14).

Спектр флуоресценции HyPer обладает двумя пиками возбуждения (420 и 500 нм) и одним пиком эмиссии на 516 нм. При появлении H_2O_2 происходит пропорциональное уменьшение интенсивности возбуждения флуоресценции при 420 нм и увеличение при 500 нм. Сигналом биосенсора, таким образом, является отношение интенсив-

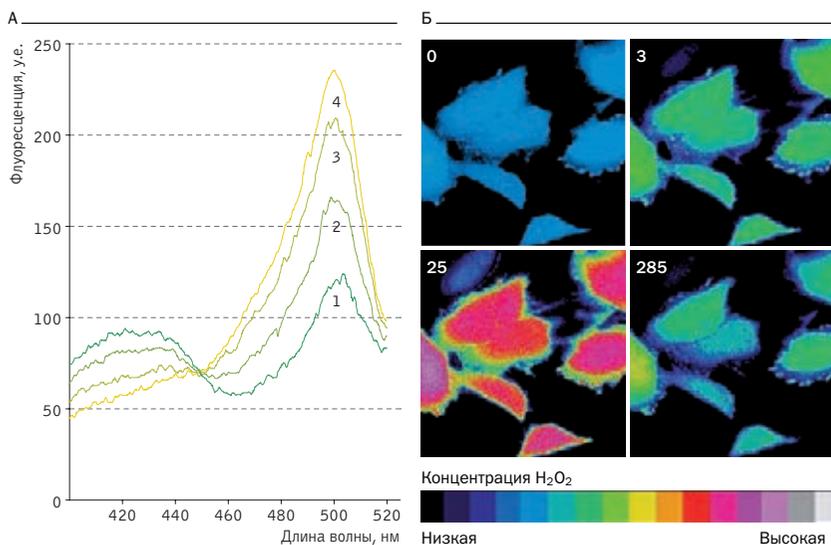


Рис. 15. Регистрация внутриклеточных изменений концентрации пероксида водорода с помощью HyPer. А – Изменение спектра возбуждения флуоресценции биосенсора в ответ на добавление H₂O₂: (1) спектр возбуждения в отсутствие H₂O₂; (2-4) после добавления 25 нМ, 100 нМ и 250 нМ H₂O₂, соответственно. Б – Регистрация колебаний концентрации H₂O₂ с помощью HyPer, экспрессированного в цитоплазме клеток HeLa. Серия конфокальных растровых изображений клеток после добавления в среду 180 мкМ H₂O₂. Цифрами показано время после добавления H₂O₂ (сек).

ностей возбуждения флуоресценции, которое не зависит от уровня экспрессии белка клетками (рис.15).

Наконец, еще одним новым инструментом, представляющим интерес для исследователей, стал белок-фотосенсибилизатор, способный под действием света определенной длины волны производить активные формы кислорода.

Белок, названный KillerRed, позволяет направленно инактивировать клетки или белки в системе *in vivo*. Облучение клеток, экспрессирующих KillerRed, в зависимости от внутриклеточной локализации фотосенсибилизатора может вызывать их гибель или приводить к временной остановке клеточных делений (рис. 16). Эти свойства KillerRed делают его уникальным инструментом для изучения роли отдельных клеточных популяций в процессах развития, регенерации и канцерогенеза.

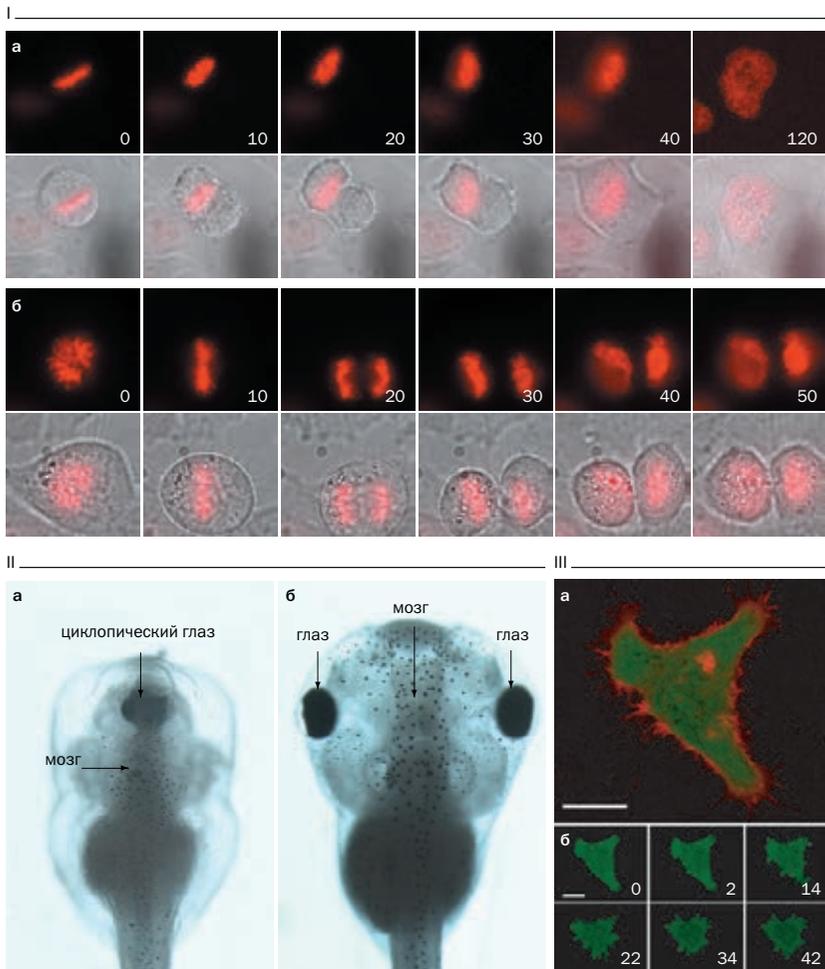


Рис. 16. Генетически кодируемый фотосенсибилизатор KillerRed. (I) – Остановка митотического деления клеток HeLa, экспрессирующих KillerRed, шитый с гистонем H2B. Цифрами показано время в мин. А – Клетка, подвергнутая облучению на стадии метафазы; Б – необлученная контрольная клетка.

(II) – Трансгенные головастики, экспрессирующие KillerRed, шитый с гистонем H2B, под контролем специфического для переднего мозга промотора *Xanf1*. А – головастик, подвергнутый облучению на стадии ранней нейрулы; (б) головастик, не подвергнутый облучению.

(III) – Светоиндуцируемое уничтожение клетки с помощью KillerRed. А – конфокальное изображение клетки, экспрессирующей KillerRed, локализованный на плазматической мембране (красная флуоресценция), и зеленый флуоресцентный белок в цитоплазме; (б) клетка после 10 мин облучения активирующим светом. Цифрами указано время после облучения, мин. Шкала, 10 мкм.

Подводя итог, можно сказать, что флуоресцентные белки стали за последние пятнадцать лет важнейшим инструментом исследования биологических процессов как в фундаментальной молекулярной биологии, так и в биомедицине, где они широко используются при скринингах лекарств-кандидатов и анализе эффективности применения молекулярных и клеточных технологий лечения.

