



УДК 577.112.088.3

СПЕКТРАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА В ГИДРОИДНЫХ МЕДУЗАХ (Cnidaria, Hydrozoa)

© 2005 г. Ю. Г. Янушевич*, Д. А. Шагин*, А. Ф. Фрадков*, К. С. Шахбазов*, Е. В. Барсова*, Н. Г. Гурская*, Ю. А. Лабас**, М. В. Матц***, К. А. Лукьянов*, С. А. Лукьянов**

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шелякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклаухо-Маклая, 16/10;

**Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва;

***Лаборатория Уитней, Университет Флориды, Сент-Августин, Флорида, США

Поступила в редакцию 11.05.2004 г. Принята к печати 25.05.2004 г.

Из гидроидных медуз клонировали гены новых белков, являющихся гомологами хорошо известного зеленого флуоресцентного белка GFP медузы *Aequorea victoria*. Охарактеризованы два зеленых флуоресцентных белка из одной неидентифицированной антомедузы, желтый флуоресцентный белок из *Phialidium* sp., и нефлуоресцентный окрашенный белок из другой неидентифицированной антомедузы. Таким образом, показано широкое разнообразие GFP-подобных белков у организмов класса Hydrozoa как по их спектральным свойствам, так и по первичной структуре.

Ключевые слова: GFP; гидроидная медуза; желтый флуоресцентный белок; нефлуоресцентный окрашенный белок; флуоресцентное мечение.

ВВЕДЕНИЕ

Зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP) и его мутантные варианты получили известность благодаря их применению в клеточной и молекулярной биологии в качестве генетически кодируемых флуоресцентных меток [1]. Изучение этого уникального белкового семейства началось более 40 лет назад, после того как был выделен и охарактеризован GFP из гидроидной медузы *Aequorea aequorea* (синоним *A. victoria*) [2]. Показано, что в медузе GFP играет роль вторичного излучателя, преобразующего синий свет люминесценции белка экворина в зеленый свет. Впоследствии было охарактеризовано еще несколько сходных флуоресцентных белков из биолюминесцентных организмов класса Hydrozoa [3]. Все эти белки флуоресцируют в зеленой области спектра (максимум эмиссии при 497–509 нм). Впервые ген *gfp* был клонирован в 1992 г. [4]. Оказалось, что этот ген может быть успешно экспрессирован практически в любом организме благодаря уникальной способности GFP формировать флуорофор самостоятельно без участия внешних ферментов и кофакторов, за исключением необходимого для этого молекулярного кислорода [5]. Это свойство открыло широкие

перспективы использования GFP для прижизненного мечения клеток, клеточных органелл и белков [1].

В 1999 г. были открыты гомологи GFP в неболюминесцентных коралловых полипах класса Anthozoa [6]. GFP-подобные белки кораллов обладали широким спектральным разнообразием. Так, были клонированы кДНК, кодирующие голубые, зеленые, желтые и красные флуоресцентные белки [6], а также нефлуоресцентные цветные белки [7].

На сегодняшний день сложилась парадоксальная ситуация. Несмотря на то что GFP-подобные белки коралловых полипов открыты относительно недавно, уже подробно охарактеризовано более 100 белков с разнообразными спектральными свойствами из различных систематических групп внутри класса Anthozoa. В то же время спектральное и структурное разнообразие белков этого семейства в организмах класса Hydrozoa на протяжении более чем 40 лет остается практически неизученным. Кроме собственно GFP, недавно описаны два его очень близких гомолога из других видов рода *Aequorea*: *A. macrodactyla* и *A. coeruleescens* [8, 9].

В данной работе мы клонировали кДНК, кодирующие четыре новых GFP-подобных белка гидроидных медуз, включая два зеленых и один желтый флуоресцентные белки, а также один нефлу-

Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-70-56; эл. почта: luk@ibch.ru).

	10	20	30	40	50
GFP	MSKGEELFTGVVPII	VELDGDVNGHKFSV	SVEGEGDATYGKLT	LKFICTTGKLPVPWPT	
anm1GFP1	MT-T-QKKL-YKL----	D-QT-K-I---V----	T-VIEG-YV--E-EV-	IS-VS	
anm1GFP2	MA-Y-EKPL-YK---E---	D-Q--T-I---Q---	ST-RVEG-YV--K-EV-	IS-VS	
phiYFP	--S-AL--H-KI-YV--	ME-N-D--T--IR-K-Y---	SV--VDAQ-----	DV-----S-	
anm2CP	-EG-PA--QSDMTFKIFI-	-V--DQ--TIIAD-SSK	FPH-DFNVHAV-E-----	MS-KP	
	60	70	80	90	100
GFP	LVTTESYGVQCF	SRYPDHMKQHDFF	KSAMPEGYVQERT	IFFKDDGNFKTRAE	VKFEQDGT
anm1GFP1	-I-SL---AK--V---	NEIN..-----TF-S--	H--K--TYEN--VLE-A-	KITM-SGA	
anm1GFP2	-I-SL---GK--V---	NVIK..-----TF-T--	H--K--TYE---VLE-A-	K--TL-SGA	
phiYFP	--LT--A--AK-GFELK..	--Y--C-----	T-EG-VF-----	T--NGS	
anm2CP	ICHLIQ--EPF-AK--	NGIS..H-AQECF---	LTID--VR-EN--TMT	SHHTYELD-'TC	
	120	130	140	150	160
GFP	LVNRIELKGI	DFKEDGNILGHK	LEYNYNSHNVYI	MADKQKNGIKVNF	KTRHNIEDGSVQL..
anm1GFP1	I----NV--TG-DK--	HVCQKN--SSPP-T	IYVVP...EGE--R	IYRNIYPTK--HY	VV..
anm1GFP2	IY---SV--VG--K---	VCKKR--HSSPPQ	VSYYVVP...YGE-	R-CTA-STQTK--	GYVV..
phiYFP	VY--VK-N-QG--K--	HV--KN--E-FTP-	CL--WG-QANH-L-	SA---M-E-TGSK	EDFIV
anm2CP	VIS-ITVNC	DG-QP--P-MKDQ-	VDILPTEHMF..HGS-	AVRQLGY-GFTTA-	GLMM..
	180	190	200	210	220
GFP	ADHYQQNTPIGD.	GPVLLPDNHVLS	TQSALS	KDPNEKRDHMLLE	FVTAAGITHGMDELYK
anm1GFP1	--TQ-V-R--RAQ-T	SAI-TY-HIKSKVD--	T--E-NK--IIK-T	NCFDADFS	
anm1GFP2	--TR-V-R--KAE-K	SAI-KY--IKSKID--	T----RK--IIK-V	NV-S--DFS	
phiYFP	---T-M-----G.	---HV-EY-HITYH	VTVT---VTDH--N-	S-V-T-R-VDCR	KTYL
anm2CP	SHFDSKL-FN-S.	RAIKI-GP-FVTVI	IKQM--TSD----	VCQR-VTY-HSV	PRITSAI

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей GFP *A. victoria* и новых белков из гидроидных медуз (последовательности GFP, anm1GFP1, anm1GFP2, phiYFP и anm2CP взяты из GenBank M62653, AY485334, AY485335, AY485336 соответственно). Нумерация остатков соответствует последовательности GFP [4]. В последовательностях новых белков прочерками показаны аминокислотные остатки, совпадающие с остатками GFP. Разрывы, внесенные для выравнивания последовательностей, обозначены точками. Аминокислотные остатки, боковые цепи которых находятся внутри белковой глобулы, показаны на сером фоне.

оресцентный малиновый белок, и исследовали их спектральные свойства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование кДНК новых GFP-подобных белков

Три небольших (2–3 мм в диаметре) гидроидных медуз были собраны с помощью планктонной сети в прибрежной зоне Атлантического побережья Северной Флориды. Одна медуза была определена как *Phialidium* sp., две другие антормедузы остались неидентифицированными. Все три медузы обладали яркой зеленой флуоресценцией, обнаруженной с помощью флуоресцентного бинокля.

Для поиска флуоресцентных белков мы выбрали стратегию, основанную на создании и визуальном скрининге экспрессионных кДНК-клонотек в *Escherichia coli*. Для каждой клонотеки получено около 100 тыс. клонов. Скрининг проводили как с помощью флуоресцентного стереомикроскопа, так и невооруженным глазом. Флуоресцирующие или окрашенные колонии *E. coli* отбирали для сек-

венирования соответствующих плазмид. В клонотеке кДНК из медузы *Phialidium* мы идентифицировали два флуоресцентных клонотек, содержащих один и тот же желтый флуоресцентный белок, названный phiYFP. В другой клонотеке были найдены два разных зеленых флуоресцентных белка, названных нами anm1GFP1 и anm1GFP2. В третьей клонотеке не было найдено ни одного флуоресцентного белка. Вместо этого была обнаружена окрашенная колония *E. coli*, содержащая нефлуоресцентный малиновый белок anm2CP.

Сравнение аминокислотных последовательностей новых белков и GFP представлено на рис. 1. Наиболее близким гомологом GFP является phiYFP (50% идентичности), далее идут anm1GFP1 и anm1GFP2 (38 и 40% идентичности соответственно) и завершает список anm2CP (всего 24% идентичности с GFP).

Спектральные свойства anm1GFP1 и anm1GFP2

Оба новых зеленых флуоресцентных белка, anm1GFP1 и anm1GFP2, обладают спектрами поглощения и возбуждения с единственным пиком в синей области видимого спектра (рис. 2а, б).

В этом отношении они похожи на большинство зеленых флуоресцентных белков кораллов [7] и отличаются от GFP, спектры которого имеют два максимума поглощения/возбуждения: мажорный пик при 395 и минорный пик при 475 нм [2]. Два пика поглощения соответствуют в GFP разным состояниям хромофора, находящимся в динамическом равновесии. Протонированная (нейтральная) форма поглощает при 395, а депротонированная (анионная) форма – при 475 нм [10]. Путь миграции протона, необходимый для поддержания равновесия между этими формами, включает в себя боковые цепи остатков Ser205, Glu222 и Ser65 [10]. Вероятным объяснением отсутствия коротковолнового (около 395 нм) максимума поглощения в спектрах anm1GFP1 и anm1GFP2 является нарушение пути миграции протона из-за алифатического аминокислотного остатка в положении 205 (см. рис. 1).

Спектры двух новых зеленых флуоресцентных белков четко различаются. Так, anm1GFP1 имеет максимумы возбуждения и испускания при 475 и 495 нм соответственно (рис. 2а), а спектры anm1GFP2 немного сдвинуты в красную область и имеют пики при 490 и 504 нм (рис. 2б). Кроме того, пик эмиссии anm1GFP1 шире, чем у anm1GFP2 (полуширина пиков составляет у этих белков 33 и 23 нм соответственно).

Спектральные свойства phiYFP

Спектры возбуждения и испускания желтого флуоресцентного белка phiYFP имеют максимумы при 525 и 537 нм соответственно (рис. 2в). В GFP-подобных белках причиной спектрального сдвига в красную область может быть либо измененная химическая структура хромофорной группы, либо влияние белкового окружения хромофора [11, 12]. Простейшим способом выявления различия в структуре хромофоров является сравнение спектров поглощения белков, денатурированных в кислых и щелочных условиях, когда влияние белкового окружения отсутствует и спектр поглощения определяется только структурой хромофора. Препарат phiYFP, денатурированный в кислоте, имел максимум поглощения при 380, а в щелочи – при 450 нм. Такое поведение полностью соответствует хромофору GFP, следовательно, спектральные особенности phiYFP определяются влиянием белкового окружения на обычный “зеленый” хромофор.

В этом отношении phiYFP представляет собой замечательный пример сходства природного белка и мутантных вариантов GFP, полученных искусственно. Во-первых, в положении 64 phiYFP содержит лейцин вместо фенилаланина, который присутствует в большинстве известных флуоресцентных белков. Показано, что замена F64L значительно ускоряет процесс созревания GFP [13].

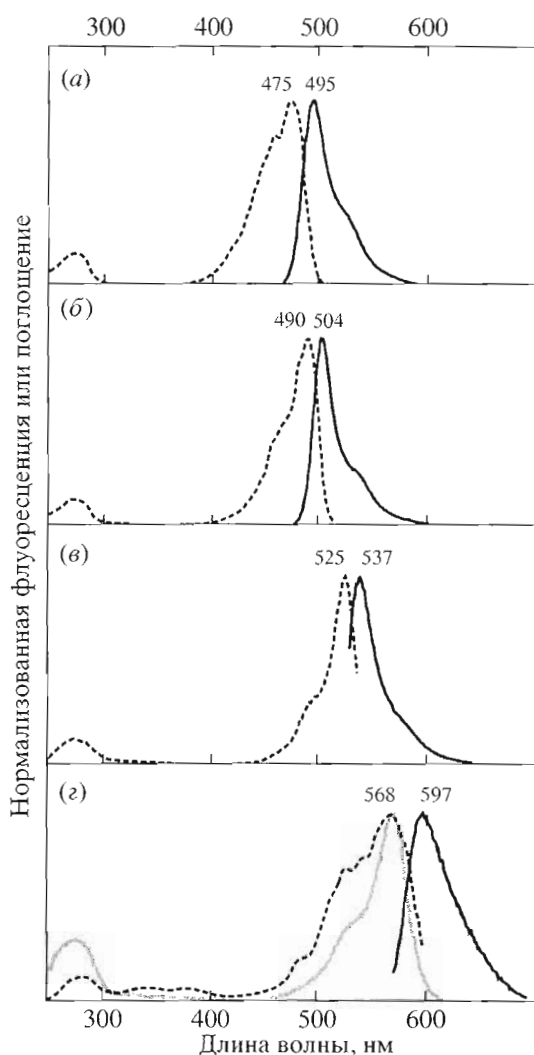


Рис. 2. Спектральные свойства новых флуоресцентных и окрашенных белков – anm1GFP1 (а); anm1GFP2 (б); phiYFP (в); anm2CP (г). Пунктирные линии – спектры возбуждения; сплошные – спектры эмиссии; серая толстая линия – спектр поглощения anm2CP.

Во-вторых, треонин в положении 65 в phiYFP “повторяет” мутацию S65T GFP, которая приводит к изменению его спектра поглощения: коротковолновый пик при 395 нм исчезает, а длинноволновый увеличивается и сдвигается с 475 к 488 нм [14]. Обе эти аминокислотные замены, F64L и S65T, присутствуют в коммерчески доступном белке EGFP (Enhanced GFP). В-третьих, введение тирозина вместо треонина (T203Y) в положение 203 GFP (в этом положении в белке phiYFP содержится именно тирозин) приводит к значительному сдвигу в красную область как спектра возбуждения, так и спектра эмиссии белка [15]. Таким образом, в коммерчески доступном желтом мутантном белке EYFP содержится ключевая замена T203Y. Вероятно, в phiYFP такие аминокислотные остатки, как Leu64, Thr65 и Tyr203, определяют его бы-

строе созревание, единственный пик поглощения/возбуждения и спектральный сдвиг в красную область относительно GFP.

*Нефлуоресцентный окрашенный белок гидромедузы *anm2CP**

Колонии *E. coli*, экспрессирующие ген *anm2CP*, обладали малиновой окраской и очень слабой красной флуоресценцией. Спектр поглощения очищенного белка имел максимум при 568 нм (рис. 2г). По форме и положению максимума спектр поглощения очень похож на спектры поглощения, характерные для окрашенных белков из класса Anthozoa [7]. Красная флуоресценция *anm2CP* (пик возбуждения и эмиссии при 568 и 597 нм соответственно) была очень слабой и могла быть достоверно определена только в концентрированном растворе белка (более чем 0.5 мг/мл).

Заключение

В настоящей работе показано широкое разнообразие GFP-подобных белков из видов класса Hydrozoa как по их спектральным свойствам, так и по первичной структуре. В дополнение к обычным зеленым флуоресцентным белкам (*anm1GFP1* и *anm1GFP2*) обнаружены также желтый флуоресцентный белок *phiYFP* и нефлуоресцентный окрашенный белок *anm2CP*. Таким образом, практически все спектральные варианты (за исключением красных флуоресцентных белков), характерные для GFP-подобных белков Anthozoa, были найдены и у представителей класса Hydrozoa. Возможно, красные флуоресцентные белки гидроидных медуз будут открыты в будущем.

Можно заключить, что организмы класса Hydrozoa представляют собой прекрасный источник флуоресцентных белков различных спектральных свойств, которые могут быть применены в качестве маркеров в молекулярной и клеточной биологии. С биологической точки зрения, наиболее неожиданным результатом работы стало обнаружение нефлуоресцентного окрашенного белка *anm2CP*. Его функция остается неясной. Нефлуоресцентный белок не может играть роль вторичного излучателя в биолюминесцентной системе как это описано для GFP [2, 3]. В отличие от коралловых полипов, у гидроидных медуз не найдено эндосимбиоза с одноклеточными водорослями, поэтому можно исключить функцию защиты эндосимбионтов от избыточного освещения, предложенную для GFP-подобных белков кораллов [16]. В качестве возможных функций *anm2CP* и других окрашенных белков медуз можно предположить создание предупреждающей или маскирующей окраски. Также окрашенные белки могут экранировать фоторецепторы, позволяя определять направление падающего света. Хотя

эта функция в большинстве животных выполняется меланинами, известны и исключения, например, паразитическая нематода *Mermis nigrescens* для затенения фоторецепторов использует гемоглобин [17].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, хлористый натрий, EDTA, нуклеозидтрифосфаты (Sigma, США); эндонуклеазы рестрикции (New England Biolabs, США); смесь полимераз для ПЦР Advantage KlenTaq (Clontech, США).

Суммарную РНК выделяли из гидроидных медуз, фиксированных в растворе RNAlater (Ambion, США), используя набор реактивов NucleoSpin RNA II (Clontech, США). Суммарную кДНК синтезировали и амплифицировали с помощью набора реактивов SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech) согласно протоколу производителя. Амплифицированную кДНК клонировали в экспрессионные векторы pQE80/81/82 (для трансляции во всех трех рамках считывания). Для этого эквимольную смесь векторов pQE80, pQE81 и pQE82 (Qiagen, США) обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *SmaI*, после чего проводили реакцию лигирования кДНК и векторной ДНК в присутствии *SmaI*. Далее проводили электротрансформацию клеток *E. coli*, и высевали трансформанты на чашки Петри со стандартным LB-агаром, содержащим ампициллин (2–5 тыс. клонов на чашку). Визуальный отбор флуоресцентных клонов проводили с помощью флуоресцентного бинокля Olympus SZX12. Вставки кДНК из отобранных клонов секвенировали, используя CEQ2000 DNA Analysis System (Beckman, США).

Полученные рекомбинантные белки имели дополнительную N-концевую последовательность MRNNNNHGS, что позволяло быстро очищать эти белки с помощью металлоаффинной хроматографии [18].

Для наработки флуоресцентных белков штаммы *E. coli*, несущие рекомбинантные плазмиды, выращивали при 37°C в объеме 50 мл до оптического поглощения около 0.6 O.E.₆₀₀. После этого экспрессию индуцировали добавлением IPTG до концентрации 0.2 мМ. Далее клетки инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующие сутки клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере А (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 100 мМ NaCl) и разрушали ультразвуком. После центрифугирования флуоресцентные белки выделяли из супернатанта с помощью металлоаффинного сорбента TALON (Clontech) согласно рекомендациям производителя. Элюцию с сорбента проводили буфером А, содержащим 100 мМ EDTA. Степень чистоты белков была не менее 90% по данным гель-электрофореза.

Спектральные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) и спектрофотометре DU-520 (Beckman).

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология", грантом Президента Российской Федерации МК-3835.2004.4 и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 02-04-49717).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lippincott-Schwartz J., Patterson G.H. // *Science*. 2003. V. 300. P. 87–91.
2. Johnson F.H., Shimomura O., Saiga Y., Gershman L.C., Reynolds G.T., Waters J.R. // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. V. 60. P. 85–104.
3. Chalfie M. // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 62. P. 651–656.
4. Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. // *Gene*. 1992. V. 111. P. 229–233.
5. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. // *Science*. 1994. V. 263. P. 802–805.
6. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 969–973.
7. Labas Y.A., Gurskaya N.G., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 4256–4261.
8. Xia N.S., Luo W.X., Zhang J., Xie X.Y., Yang H.J., Li S.W., Chen M., Ng M.H. // *Mar. Biotechnol.* 2002. V. 4. P. 155–162.
9. Gurskaya N.G., Fradkov A.F., Pounkova N.I., Staroverov D.B., Bulina M.E., Yanushevich Y.G., Labas Y.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Biochem. J.* 2003. V. 373. P. 403–408.
10. Brejc K., Sixma T.K., Kitts P.A., Kain S.R., Tsien R.Y., Ormo M., Remington S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 2306–2311.
11. Remington S.J. // *Methods Enzymol.* 2000. V. 305. P. 196–211.
12. Verkhusha V.V., Lukyanov K.A. // *Nat. Biotechnol.* 2004. P. 22. P. 289–296.
13. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. // *Gene*. 1996. V. 173. P. 33–38.
14. Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. // *Nature*. 1995. V. 373. P. 663–664.
15. Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. // *Science*. 1996. V. 273. P. 1392–1395.
16. Salih A., Larkum A., Cox G., Kuhl M., Hoegh-Guldberg O. // *Nature*. 2000. V. 408. P. 850–853.
17. Burr A.H., Hunt P., Wagar D.R., Dewilde S., Blaxter M.L., Vanfleteren J.R., Moens L. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 4810–4815.
18. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A. // *J. Chromatogr.* 1987. V. 411. P. 177–184.

Spectral Diversity among the Members of the Family of Green Fluorescent Protein in Hydroid Jellyfish (Cnidaria, Hydrozoa)

Yu. G. Yanushevich*, D. A. Shagin*, A. F. Fradkov*,
K. S. Shakhbazov*, E. V. Barsova*, N. G. Gurskaya*, Yu. A. Labas**,
M. V. Matz***, K. A. Lukyanov*, and S. A. Lukyanov#

Phone/fax: +7 (095) 330-7056; e-mail: luk@ibch.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*** Wittney Laboratory, University of Florida,
St. Augustin, Florida, USA

The cDNAs encoding the genes of new proteins homologous to the well-known Green Fluorescent Protein (GFP) from the hydroid jellyfish *Aequorea victoria* were cloned. Two green fluorescent proteins from one unidentified anthojellyfish, a yellow fluorescent protein from *Phialidium* sp., and a nonfluorescent chromoprotein from another unidentified anthojellyfish were characterized. Thus, a broad diversity of GFP-like proteins among the organisms of the class Hydrozoa in both spectral properties and primary structure was shown. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: fluorescent labeling, GFP, hydroid jellyfish, nonfluorescent colored protein, yellow fluorescent protein