

Красные флуоресцентные белки и их свойства

К.Д.Петкевич, Е.Н.Ефременко, В.В.Верхуша, С.Д.Варфоломеев

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, факс (495) 939–3589

Медицинский колледж им. А.Эйнштейна

10461 Бронкс, Моррис Парк авеню, 1300, США, факс +1(718)430–8996

Охарактеризованы основные группы известных в настоящее время красных флуоресцентных белков: описана их структура, сворачивание и механизмы образования хромофора. Показаны основные области применения таких белков в качестве маркеров и сенсоров в клеточной и молекулярной биологии.
Библиография — 118 ссылок.

Оглавление

I. Введение	273
II. Физико-химические свойства красных флуоресцентных белков	274
III. Улучшенные мономерные красные флуоресцентные белки	277
IV. Фотоактивируемые и фотопереключаемые красные флуоресцентные белки	278
V. Структура флуоресцентных белков	280
VI. Фотофизика и фотохимия красных флуоресцентных белков	285
VII. Основные области применения красных флуоресцентных белков	286

I. Введение

Обычно предполагается, что все цветовое разнообразие живых организмов обусловлено хромопротеинами или низкомолекулярными пигментами. Как правило, хромопротеины содержат небольшую молекулу небелковой природы

К.Д.Петкевич. Аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Телефон (495)939–3170, e-mail: kpiatkev@aecom.yu.edu

Область научных интересов: флуоресцентные белки и их биологическое применение.

Е.Н.Ефременко. Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник той же кафедры. Телефон: (495)939–3170, e-mail: elena_efremenko@list.ru

Область научных интересов: генетически модифицированные белки и их характеристики.

В.В.Верхуша. Кандидат химических наук, профессор кафедры анатомии и структурной биологии Медицинского колледжа им. А.Эйнштейна. Телефон: +1(718)430–8591, e-mail: vladislav.verkhusha@einstein.yu.edu

Область научных интересов: флуоресцентные белки и их применение в биологии и микроскопии.

С.Д.Варфоломеев. Член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химической энзимологии химического факультета МГУ. Телефон: (495)939–3589, e-mail: sdvarf@sky.chph.ras.ru

Область научных интересов: генетически модифицированные белки и их характеристики.

Дата поступления 24 июля 2009 г.

или ион металла, которые отвечают за хромогенные свойства белка. Однако флуоресценция зеленого флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein, GFP), открытого в 1961 г. Симомурой с сотр.¹ при изучении биолуминесценции медузы *Aequorea victoria* из класса Hydrozoa, обусловлена взаимодействием внутренних аминокислотных остатков белка и не требует участия каких-либо кофакторов. Многие годы GFP изучался очень небольшой группой исследователей как белок, являющийся частью биолуминесцентной системы.² После клонирования гена GFP интерес к нему чрезвычайно возрос, и в настоящее время GFP, а также его мутанты являются наиболее широко используемыми генетическими маркерами различных процессов.^{3–5} В 2008 г. Нобелевской премии по химии были удостоены американские ученые Симомура, Чалфи и Тсьен за разработку и получение различных форм GFP.⁶ Очередным импульсом к развитию этого направления в биотехнологии послужило клонирование генов GFP-подобных белков, флуоресцирующих в желтой, оранжевой, красной и дальней красной областях спектра.⁷ На данный момент известны флуоресцентные белки всей цветовой гаммы (от голубого до дальнего красного), которые охватывают спектр от 424 до 655 нм. Наименее освещенными в литературе остаются GFP-подобные красные флуоресцентные белки, которым и посвящен данный обзор.

Красные флуоресцентные белки (Red Fluorescent Proteins, RFPs) имеют максимумы эмиссии флуоресценции, превышающие 560 нм. Все RFPs можно разделить на две большие группы: перманентно красные флуоресцентные белки и красные флуоресцентные белки, которые требуют УФ-излучения или видимого голубого света для образования красного

хромофора. Следует также упомянуть такие GFP-подобные белки, как хромопротеины (CPs), которые способны эффективно поглощать свет, однако при этом не флуоресцируют. Хромопротеины имеют один максимум поглощения при 560–610 нм, и длина волны этого максимума определяет цвет такого белка. Часто при созревании RFPs проходят через голубое или зеленое флуоресцентное состояние. Это свойство RFPs было использовано для создания так называемых флуоресцентных таймеров, которые на ранних стадиях созревания флуоресцируют в голубой или зеленой области спектра, а в полностью созревшем состоянии — в красной.

II. Физико-химические свойства красных флуоресцентных белков

1. Источники флуоресцентных белков и хромопротеинов

Предположение о том, что неблюминесцентные организмы, например кораллы, могут содержать GFP-подобные флуоресцентные белки, первым высказал Ю.А.Лабас. В 1999 г. из представителей класса Anthozoa было выделено и клонировано шесть новых флуоресцентных белков, один из которых (drFP583) значительно отличался от GFP по спектральным свойствам, демонстрируя флуоресценцию в красной области спектра.⁷ Данный белок, ген которого был оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, стал первым коммерчески доступным красным белком (RFP), названным DsRed. Этот белок также является первым RFP, который удалось выделить в мономерном состоянии, что далее позволило получить ряд мономерных RFPs с улучшенными свойствами.

В последующем большинство RFPs было выделено и клонировано из представителей класса Anthozoa, обитающих в Индо-Тихоокеанском бассейне. В кораллах подкласса Zoantharia было обнаружено множество белков с двухцветной флуоресценцией (красной и зеленой), а также белков, проявляющих свойства флуоресцентных таймеров, и нефлуоресцентных CPs.^{8–12} Оказалось, что замена всего лишь одной аминокислоты может приводить к заметному возрастанию квантового выхода флуоресценции.⁹ Руководствуясь данной стратегией, авторы работы¹¹ с использованием генно-инженерных методов на основе CPs, выделенных из *Heteractis crispa*, *Condylactis gigantea* и *Goniopora tenuidens*, получили флуоресцентные белки с максимумом флуоресценции, сдвинутым в дальнюю красную область (от 615 до 640 нм). Другие длинноволновые RFPs были получены на основе CPs, выделенных из голубых кораллов семейства *Actinaria*.¹³

Самым длинноволновым природным RFP, выделенным из представителей класса Anthozoa, является eqFP611, найденный в морской актинии *Entacmaea quadricolor*.¹⁴ Из этого же организма был выделен белок eqFP578,¹⁵ который в дальнейшем выполнил роль основы для получения мономерных RFPs с улучшенными свойствами.^{15, 16} Красный флуоресцентный белок дикого типа Kusabira-Orange с самой коротковолновой флуоресценцией был клонирован из коралла *Fungia concinna*.¹⁷

Красные флуоресцентные белки были найдены и в других классах организмов. Так, GFP-подобный хромопротеин anm2CP (см.¹⁸) из Anthomedusae (класс Hydrozoa) имеет спектр поглощения, форма и положение которого сходны с данными характеристиками CPs и RFPs из класса Anthozoa. Это сходство позволило целенаправленно ввести такие мута-

ции, которые привели к превращению anm2CP в RFPs, названные JRed и KillerRed. Эти белки являются единственными известными на сегодняшний день генетически кодируемыми фотосенсибилизаторами, которые могут быть синтезированы непосредственно в клетках-мишенях.^{19, 20} Однако попытка получить RFP на основе улучшенного GFP из *Aequorea victoria* оказалась неудачной.²¹

Красные флуоресцентные белки дикого типа, а также некоторые RFPs первого поколения, описанные выше, имеют ряд недостатков, сильно ограничивающих их применение: склонность к агрегации, образование тетрамеров, медленное и неполное созревание хромофора (табл. 1).

2. Агрегация

Многие GFP-подобные белки из Anthozoa, включая DsRed, проявляют склонность к образованию агрегатов как *in vivo*, так и *in vitro*.¹² Агрегация белков нежелательна при использовании их *in vivo* вследствие токсичного действия агрегатов на клетки.

Для предотвращения агрегации белка DsRed1 был использован сайт-специфический мутагенез, основанный на предположении о том, что в образовании агрегатов решающую роль играют положительно заряженные остатки, расположенные вблизи N-конца молекулы белка. Неагрегирующие мутанты DsRed1 предполагалось получить заменой остатков Arg и Lys на отрицательно заряженные или нейтральные остатки аминокислот. Для мутагенеза был выбран не дикий тип DsRed1, а его мутант E57 с тремя аминокислотными заменами: V105A, I161T и S197A. Этот мутант отличался более быстрым созреванием, его красная флуоресценция появлялась в два раза быстрее, чем у DsRed1 дикого типа.³⁷ Одним из результатов этой работы стало получение тройного мутанта E57-NA с заменами R2A, K5E и K9T, обеспечивающими минимальный уровень агрегации как *in vivo*, так и *in vitro*. Флуоресцентные характеристики E57-NA (интенсивность флуоресценции, максимумы спектров возбуждения и флуоресценции) оказались очень близки к аналогичным характеристикам исходного белка E57, что сделало перспективным дальнейшее использование мутанта E57-NA.¹²

3. Олигомеризация

В отличие от GFPs из представителей класса Hydrozoa, являющихся димерами, RFPs, полученные из класса Anthozoa, в разбавленных растворах образуют стабильные тетрамерные комплексы, которые диссоциируют только в жестких денатурирующих условиях.^{38, 39} Например, тетрамеризация DsRed наблюдается как при очень низких концентрациях белка в растворе *in vitro* (константа олигомеризации оценивается в 10^{-9} моль · л⁻¹),⁴⁰ так и в клетках *in vivo*.³⁸ Олигомеризация проявляется в зависимости формы спектра поглощения от концентрации белка.

Информация о трехмерной структуре белка DsRed1 и об аминокислотах, входящих в области взаимодействия, оказалась полезной при создании мутантных неолигомерных форм RFPs. Было установлено, что потеря способности образовывать тетрамеры может приводить к резкому уменьшению интенсивности флуоресценции и скорости созревания белков.^{26, 41} Для вариантов DsRed проблема олигомеризации была решена с помощью сайт-направленного мутагенеза.²⁶ Была создана мономерная мутантная форма DsRed1 — mRFP1, — которая содержала 33 замены:

Таблица 1. Свойства красных флуоресцентных белков.

Белок	Олигомерное состояние	$E_{x\max}$, нм	$E_{m\max}$, нм	ε , л · моль ⁻¹ · см ⁻¹	QY	pK _a	$\tau_{1/2}$ созревания при 30°C, ч	Фото-стабильность, с	Яр-кость ^a	Ссыл-ки
mBanana	Мономер	540	553	6 000	0.70	6.7	1.0	1.4	4	22
mKO	»	548	559	51 600	0.60	5.0	4.5	122	31	17
E2-Orange	Тетрамер	540	561	36 500	0.54	4.5	1.3	81	20	23
mOrange	Мономер	548	562	71 000	0.69	6.5	2.5	9	49	22
mKOk	»	551	563	105 000	0.61	4.2	1.8	—	64	24
mOrange2	»	549	565	58 000	0.60	6.5	4.5	228	35	25
tdRFP2	Димер	552	579	120 000	0.68	4.8	—	—	82	26
dTomato	»	554	581	138 000	0.69	4.7	1	64	95	22
DsRed	Тетрамер	558	583	75 000	0.79	4.7	10	326	59	7
TagRFP	Мономер	555	584	98 000	0.41	< 4.0	1.7	37	40	15
TagRFP-T	»	555	584	81 000	0.41	4.6	1.7	337	33	25
mTangerine	»	568	585	38 000	0.30	5.7	—	5.1	11	22
E2-Red/Green	Тетрамер	560	585	53 800	0.67	4.5	1.2	93	36	23
DsRed-Express	»	554	586	30 100	0.42	—	0.70	71	13	27
DsRed2	»	561	587	43 800	0.55	—	6.5	—	24	27
DsRedT3	»	560	587	49 500	0.59	—	1.3	—	29	27
DsRed-Max	»	560	589	48 000	0.41	—	1.2	9	20	28
DsRed-Express2	»	554	591	35 600	0.42	—	0.7	64	15	28
DsRed-Monomer	Мономер	557	592	27 300	0.14	—	1.3	15	4	29
mApple	»	568	592	75 000	0.49	6.5	0.5	4.8	37	25
mStrawberry	»	574	596	90 000	0.29	< 4.5	0.8	11	26	22
mRFPmars	»	585	602	32 600	0.25	—	—	—	8	30
mRFPruby	»	585	603	32 300	0.25	—	—	—	8	31
mRuby	»	558	605	112 000	0.35	5	2.8	179	39	32
mRFP1	Димер	584	607	50 000	0.25	4.5	< 1	8.7	13	26
mCherry	Мономер	587	610	72 000	0.22	< 4.5	0.25	135	16	22
KillerRed	»	585	610	45 000	0.25	—	—	—	11	20
JRed	»	584	610	44 000	0.20	5.0	Медленно	—	9	19
mKeima	»	440	620	14 400	0.24	6.5	—	—	3	33
mRaspberry	»	598	625	86 000	0.15	—	0.9	—	13	34
mKate2	»	588	633	62 500	0.40	5.4	< 0.33	118	25	35
tdKatushka2	Димер	588	633	132 500	0.37	5.4	< 0.33	144	50	35
Katushka	»	588	635	65 000	0.34	5.5	—	—	22	16
mKate	Мономер	588	635	31 500	0.28	6.2	1.25	71	9	16
t-HcRed	Димер	590	637	130 000	0.04	—	—	—	5	36
HcRed	Тетрамер	592	645	70 000	0.05	—	—	—	4	11
mPlum	Мономер	590	649	41 000	0.10	< 4.5	1.7	77	4	34
AQ143	Тетрамер	595	655	90 000	0.04	—	—	—	4	13

Примечание. Здесь и далее приняты следующие обозначения: $E_{x\max}$ — максимум возбуждения флуоресценции, $E_{m\max}$ — максимум эмиссии флуоресценции, ε — молярный коэффициент экстинкции, QY — квантовый выход флуоресценции. ^a Яркость флуоресцентного белка определяется как произведение квантового выхода на коэффициент молярной экстинкции, деленное на 1000.

3 в гидрофобной и 10 в гидрофильной областях взаимодействия, 3 в коротком N-концевом участке, 13 во внутренних областях β -бочонка (β -barrel) и 4 поверхностные замены, точное влияние которых на функцию и структуру белка неизвестно. Недостатками мутанта mRFP1 являлись присутствие фракции белка, содержащего «зеленый» хромофор, и его склонность к димеризации, что ограничивало применение данного белка в экспериментах с использованием индуктивно-резонансного (фёрстеровского) переноса энергии (FRET) и для многоцветной микроскопии. На основе mRFP1 были получены белки mRFPmars³⁰ и mRFPruby,³¹ гены которых оптимизированы для экспрессии в *Dictyostelium* и клетках млекопитающих соответственно.

Для получения улучшенных мономерных версий mRFP1 был использован случайный мутагенез в сочетании с высоко-

продуктивным методом селекции клеток на проточном цитофлуориметре (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).^{22, 34} Новые мономерные RFPs, названные mFruits, покрывали спектр флуоресценции в широком диапазоне (от 562 до 649 нм), а также обладали существенно улучшенными характеристиками созревания, яркости и фотостабильности по сравнению с исходным mRFP1. Среди флуоресцентных белков из серии mFruits наибольшей популярностью сегодня пользуется mCherry, так как он обладает оптимальным сочетанием яркости, времени созревания, фотостабильности и длины волны эмиссии флуоресценции.

Для преодоления агрегации гибридных белков, в состав которых входят флуоресцентные белки (FPs) из Anthozoa, были предложены другие подходы. Одним из них является ковалентная сшивка по типу «голова к хвосту» двух идентич-

ных копий FPs, в результате чего образуется tandemный димер, предотвращающий агрегацию меченого белка. Этот подход был успешно применен для белков HcRed1 (см.³⁶) и димерных мутантных форм DsRed1,^{22, 26} а также для Keima⁴² и Katushka2.³⁵ Наилучшие результаты по скорости формирования хромофора и конечной интенсивности его флуоресценции были получены для линкеров длиной 4 и 12 аминокислотных остатков для HcRed1 и димерных мутантных форм DsRed1, Keima и Katushka2 соответственно. Tandемные белки обычно обладают такими же спектральными характеристиками, как и исходные белки, однако могут сильно нарушать локализацию белка-мишени, с которым они соединены.

4. Созревание: фолдинг белка и образование хромофора

Созревание RFP происходит в две последовательные стадии: сворачивание белка и образование хромофора. Обычно внешние аминокислотные остатки ответственны за фолдинг белка, а внутренние — в большей степени за скорость и эффективность образования хромофора. Генно-инженерными методами было показано, что формирование тетрамеров является очень важным этапом при созревании RFPs.

Большинство RFPs, выделенных из представителей класса Anthozoa, в отличие от GFP из *Aequorea*, лучше созревают при 37°C, чем при комнатной температуре. Исключение составляют белки eqFP578 и eqFP611, созревание которых происходит при температуре ниже 30°C.^{14, 15, 41} Это различие может быть связано с температурой, характерной для жизни организмов, из которых были выделены соответствующие флуоресцентные белки.⁴³

Первые попытки ускорить созревание DsRed с помощью случайного и сайт-направленного мутагенеза оказались неудачными,³⁸ но были найдены мутации (K83M и Y120H), которые приводят к значительному сдвигу максимума флуоресценции в длинноволновую область (602 и 600 нм соответственно). В свою очередь, мутации V105A, S197T привели к получению флуоресцентного таймера E5, флуоресценция которого переходит из зеленой в красную с течением времени.⁴⁴ Дальнейший мутагенез гена DsRed позволил получить мутанты E5_{up} (V105A) и E57 (V105A, I161T, S197A) с улучшенными степенью и скоростью созревания хромофора соответственно,³⁷ а также нефлуоресцентный хромопротеин DsRed-NF.⁴⁵

Значительно уменьшить время созревания DsRed удалось авторам работы²⁷, которые после семи раундов случайного и сайт-направленного мутагенеза получили три мутанта (DsRedT1, DsRedT3 и DsRedT4) с периодом полусозревания от 0.7 до 1.3 ч. Было показано, что ключевую роль в скорости созревания хромофора играет замена N42Q, приводящая к возникновению связи с Q66, входящим в состав хромофора. Белок DsRedT1 стал коммерчески доступен под названием DsRed-Express (компания Clontech, USA). Недавно на основе DsRed-Express были разработаны улучшенные версии, названные DsRed-Express2, DsRed-Max,²⁸ E2-Orange и E2-Red/Green;²³ перечисленные белки обладают минимальной цитотоксичностью и высокой скоростью созревания, что делает их более привлекательными для экспрессии в трансгенных животных и стабильных клеточных линиях. Однако тетрамерное состояние данных белков не позволяет использовать их при создании химерных белков. Другим недостатком

этих белков является наличие у них зеленой флуоресценции, что затрудняет проведение многоцветной микроскопии. В качестве маркера локализации белков в клетках может быть использован DsRed-Monomer (или DsRed.M1) — мономерная версия белка DsRedT4.²⁹ При этом DsRed.M1 почти в 4 раза менее яркий белок, чем его предшественник DsRedT4. Белок DsRed.M1 по сравнению с DsRedT4 имеет 37 мутаций, из которых 31 внешняя.

Белки дикого типа eqFP578 и eqFP611 плохо сворачиваются при 37°C, что делает их непригодными для экспрессии в клетках млекопитающих. С помощью случайного мутагенеза была оптимизирована температура созревания данных белков. Для eqFP611 было найдено две аминокислотные замены (I57V и F102I), которые значительно улучшили созревание белка при 37°C. Для белка RFP630, содержащего мутацию N143S, были найдены другие замены (S171F и V184D), улучшающие его созревание. Возможно, это различие связано с тем, что белки eqFP611 и RFP630 содержат хромофор в *транс*- и *цис*-конфигурации соответственно (см. раздел V.2).⁴⁶ Аминокислотные замены R35G, L83F и S135P значительно улучшили скорость созревания и pH-стабильность белка eqFP578.¹⁵

5. Фотостабильность

Все флуоресцентные белки, как и низкомолекулярные флуоресцентные соединения, при длительном облучении возбуждающим светом подвергаются фотообесцвечиванию. Фотостабильность имеет большое значение для экспериментов, требующих длительной визуализации конкретной клетки или всего видимого поля. Скорость фотообесцвечивания сильно варьируется для разных флуоресцентных белков, причем даже белки с одинаковыми спектроскопическими характеристиками могут иметь достаточно разные времена фотообесцвечивания. Фотостабильность белка также сильно зависит от доступа кислорода к образцу: в присутствии кислорода фотообесцвечивание происходит значительно быстрее.²⁵

Наиболее универсальная методика измерения скорости фотообесцвечивания белков была предложена Тсьеном.⁴⁷ Фотостабильность белка измеряется в каплях водного раствора, находящихся в масле. Капли раствора белка, сопоставимые по размерам с живой клеткой, выжигаются под постоянным излучением с периодическим детектированием интенсивности флуоресценции для построения кривой фотообесцвечивания. Полученные данные нормируются на квантовый выход и коэффициент экстинкции белка, а также на спектры лампы и используемых фильтров. Полученный таким образом результат показывает, за какое время флуоресцентный белок теряет 50% первоначальной скорости эмиссии флуоресценции (1000 фотонов в 1 с). Данный анализ имеет ограничение на интенсивность используемого для фотообесцвечивания излучения, которое должно быть порядка 10 Вт·см⁻²; более интенсивное излучение приводит к проявлению нелинейных эффектов, которые трудно учесть при нормировке данных.

Сравнение периодов полубесцвечивания, определение которых было проведено данным методом, показало, что белки DsRed, TagRFP-T и mOrange2 наиболее фотостабильны (см. табл. 1). Очевидно, что при выборе флуоресцентного белка для конкретного эксперимента следует помнить, что фотостабильность белка сильно зависит от условий его биосинтеза и фотообесцвечивания.

III. Улучшенные мономерные красные флуоресцентные белки

Мономерные RFPs первого поколения (mFruits,^{22, 34} mKO,¹⁷ TagRFP,¹⁵ mKate¹⁶) могут успешно использоваться как маркеры локализации, динамики и взаимодействия белков. Однако невысокая яркость и низкая фотостабильность данных белков осложняет их применение. Недавно на основе этих белков была разработана целая серия флуоресцентных белков с улучшенными яркостью и фотостабильностью. Были также получены мономерные флуоресцентные таймеры (FTs) с разными периодами изменения флуоресценции с голубой на красную⁴⁸ (табл. 2). Отдельно следует упомянуть белок mKeima, который обладает самым большим стоксовым сдвигом (180 нм) среди всех флуоресцентных белков.³³ Красные флуоресцентные белки можно разделить на две группы по длине волны максимума эмиссии флуоресценции: красные флуоресцентные белки и дальне-красные флуоресцентные белки (см. табл. 1).

Таблица 2. Свойства мономерных флуоресцентных таймеров.⁴⁸

Белок	$E_{x\max}$, нм	$E_{m\max}$, нм	ϵ (см. ²)	QY	pK_a	$\tau_{1/2}$ созре- вания при 37°C, ч
Fast-FT	403	466	49 700	0.30	2.8	0.25
	583	606	75 300	0.09	4.1	7.1
Medium-FT	401	464	44 800	0.41	2.7	1.2
	579	600	73 100	0.08	4.7	3.9
Slow-FT	402	465	33 400	0.35	2.6	9.8
	583	604	84 200	0.05	4.6	28

^a В л · моль⁻¹ · см⁻¹.

1. Красные флуоресцентные белки

Белок mKO, являясь улучшенной мономерной версией флуоресцентного белка Kusabira-Orange,¹⁷ клонированного из коралла *Fungia concinna*, имеет высокие яркость и фотостабильность, что делает его привлекательным для использования в качестве маркеров локализации белков. Данный белок можно также использовать как акцептор в FRET-парах с циановыми флуоресцентными белками. Главным недостатком этого белка является медленное созревание при 37°C: период полусозревания ($\tau_{1/2}$) составляет 4.5 ч. Введением 7 мутаций удалось значительно улучшить яркость и время созревания mKO.⁴⁹ Улучшенная версия mKOk была успешно использована как FRET-акцептор.²⁴

Достаточно перспективным предшественником для получения серии мономерных RFPs оказался белок eqFP578. Основываясь на рентгеноструктурных данных его аналога eqFP611,^{41, 50} выделенного из того же организма, удалось определить ключевые позиции, ответственные за димеризацию белка. В результате нескольких раундов сайт-направленного мутагенеза по данным позициям был получен мономерный белок TagRFP.¹⁵ Помимо высоких яркости и скорости созревания TagRFP также отличался хорошей pH-стабильностью. Однако главным недостатком TagRFP была низкая фотостабильность.

Тсьену с соавт.²⁵ удалось значительно улучшить фотостабильность белков TagRFP и mOrange. Отбор наиболее ярких бактериальных колоний, содержащих мутантные белки TagRFP и mOrange, после нескольких часов их облуче-

ния интенсивным зелено-желтым светом позволил выделить фотостабильные клоны. Для TagRFP потребовалась всего одна мутация S158T, чтобы увеличить фотостабильность белка в 9 раз, при этом практически не изменились физико-химические характеристики белка. Однако три мутации (Q64H, F99Y и G196D) в mOrange, приведшие к 25-кратному возрастанию его фотостабильности, ухудшили яркость и увеличили время созревания белка. Фотостабильность mOrange2 оказалась практически нечувствительна к присутствию кислорода, в случае TagRFP-T фоточувствительность к кислороду сохранялась.²⁵

Для мономеризации белка RFP611 потребовалось всего две аминокислотных замены (122R и 194A).⁴⁶ Однако данные мутации привели к полной потере флуоресценции белка. В последующих раундах случайного и сайт-направленного мутагенеза было дополнительно введено 20 аминокислотных замен, которые восстановили флуоресценцию благодаря улучшению сворачивания белка и созревания хромофора, а замена 10 аминокислотных остатков на С-конце белка предотвратила локализацию в органеллах при биосинтезе в клетках млекопитающих. В итоге был получен мономерный белок mRuby, который может быть использован как эффективный маркер для визуализации пероксисом в животных клетках.³²

На основе красного хромопротеина, клонированного из коралла *Montipora sp.*, были получены флуоресцентные белки с большим стоксовым сдвигом, имеющие максимум возбуждения красной флуоресценции при 440 нм.^{33, 42} Сочетание флуоресцентных белков, имеющих одну длину волны возбуждения флуоресценции, но разные стоксовы сдвиги, может быть использовано для многоцветной двухфотонной микроскопии.⁵¹ На основе таких белков можно создать FRET-сенсоры с полным разделением эмиссионных пиков, что значительно упростит детектирование эффективности переноса энергии.

2. Дальне-красные флуоресцентные белки

Все больший интерес исследователи начинают проявлять к дальне-красным FPs, которые имеют большое преимущество перед остальными RFPs при визуализации сигнала в интактных тканях модельных животных,^{16, 35} а в перспективе могут найти применение и в медицинской практике. Дальне-красные FPs могут быть использованы для многоцветной визуализации живых клеток⁴⁷ и являются удобными маркерами для мечения белков даже в сильно автофлуоресцирующем окружении. Инфракрасные FPs, полученные на основе бактериальных фотохромов,⁵² составляют конкуренцию GFP-подобным дальне-красным FPs.

Целая серия ярких дальне-красных FPs была разработана на основе белка eqFP578. Случайный мутагенез гена eqFP578 привел к получению димерного дальне-красного FP, названного Katushka.¹⁶ Мономерная версия этого белка, названная mKate, может быть использована для визуализации структур в живых организмах, однако высокая pH-чувствительность и небольшая фотоактивация данного белка сильно затрудняют количественный анализ получаемых данных.

При анализе кристаллической структуры mKate было установлено,⁵³ что хромофор в белке может находиться в двух конфигурациях: *цис* и *транс*. В то время как *цис*-конфигурация хромофора является флуоресцентной, белок с *транс*-хромофором является нефлуоресцирующим. *транс*-Конфигурация хромофора стабилизируется гидроксигруппой остатка Ser165 посредством образования водородной связи,

так же как в белке eqFP611 и хромопротеинах. Замена остатка Ser на гидрофобный Ala в позиции 165 привела к возрастанию яркости белка mKate почти в 2 раза и увеличению его pH-стабильности. С помощью случайного мутагенеза гена S165A_mKate были получены три мутации (V48A, M151T и K238R), значительно повысившие яркость и фотостабильность белка; новый белок был назван mKate2. Мутации V48A и K238R оказались ответственны за значительное увеличение скорости и степени созревания белка. Так, период полусозревания для mKate2 составил < 20 мин.³⁵

Возможно, для получения белков с максимумом эмиссии флуоресценции при длине волны больше 650 нм потребуются дополнительная посттрансляционная модификация для расширения сопряженной π -системы DsRed-подобного хромофора и сдвига пика поглощения в более длинноволновую область. Аминокислотные замены в микроокружении хромофора могут изменять стоков сдвиг флуоресцентных белков.

Для некоторых низкомолекулярных красителей положение максимума флуоресценции изменяется при возрастании полярности растворителя из-за разницы дипольных моментов основного и возбужденного состояний хромофора. Синтетические GFP-подобные хромофоры тоже обладают таким сольватохромным эффектом и изменяют положение максимума флуоресценции в зависимости от полярности растворителя. Однако в отличие от синтетических хромофоров большинство GFP-подобных белков имеют небольшой стоков сдвиг, что свидетельствует о наличии окружения хромофора, необходимого для предотвращения безызлучательной релаксации в основное состояние. Сверхбыстрая времязазевающая флуоресцентная спектроскопия показала изменение длины волны максимума флуоресценции для mPlum от 625 до 650 нм за 500 пс.⁵⁴ Эти наблюдения могут быть объяснены быстрой перегруппировкой аминокислотных остатков, взаимодействующих с хромофором. Из структуры белка было установлено, что окружение хромофора в mPlum является более гидрофобным, чем, например, в DsRed, а ключевую роль в сдвиге флуоресценции в дальнюю красную область играет остаток E16. Карбоксильная группа этого остатка глутаминовой кислоты образует водородную связь с атомом кислорода ацилиминной группы, что может приводить к увеличению области делокализации π -электронной плотности хромофора.

3. Флуоресцентные таймеры

Флуоресцентный таймер (FT) DsRed-E5 со временем меняет цвет флуоресценции с зеленой на красную. Однако DsRed-E5 не может считаться истинным FT, так как уменьшение интенсивности зеленой флуоресценции происходит из-за возрастания FRET между «зелеными» и «красными» субъединицами тетрамерного белка по мере созревания красного хромофора.

Недавно на основе белка mCherry была получена серия мономерных флуоресцентных таймеров, меняющих цвет флуоресценции с синего на красный с различной скоростью.⁴⁸ Для быстрого, среднего и медленного таймеров максимум синей флуоресценции при 37°C достигается за 0.25, 1.2 и 9.8 ч, а половина максимума красной флуоресценции — за 7.1, 3.9 и 28 ч соответственно. При созревании FT интенсивность синей флуоресценции после достижения максимума уменьшается практически до нуля. В широком интервале температур (от 16 до 45°C) переход белка из синей в красную формы является полным, скорость созревания каждой формы флуо-

ресцентного таймера зависит от температуры. Таким образом, по соотношению интенсивностей красной и синей флуоресценции всегда можно определить возраст FT. Все формы флуоресцентных таймеров являются pH-стабильными (см. табл. 2).

IV. Фотоактивируемые и фотоперекключаемые красные флуоресцентные белки

Недавно было разработано несколько так называемых фотоактивируемых флуоресцентных белков (PAFPs). Эти белки способны к существенному изменению флуоресцентных свойств при облучении их интенсивным светом определенной длины волны. Некоторые PAFPs переходят из нефлуоресцентного состояния во флуоресцентное под воздействием облучения (фотоактивация), в то время как другие только изменяют цвет флуоресценции при облучении светом (фотоперекключение). Созданные к настоящему времени фотоактивируемые красные флуоресцентные белки (PARFPs) могут быть разделены на четыре основные группы в соответствии с механизмом фотоактивации.

К первой группе относятся PARFPs, которые способны к необратимой фотоконверсии хромофора под действием УФ-света. В эту группу входят белки PAmRFP1 (см.⁵⁵) и недавно разработанный PAmCherry1.⁵⁶ Для белка PAmRFP1, сконструированного на основе mRFP1 с введением замен в положениях 148, 165 и 203, была установлена необратимая фотоактивация под действием УФ-облучения с длиной волны 340–380 нм в течение 25 мин. Белок PAmRFP1-1 (фотоактивируемая мутантная форма mRFP1, обладающая наилучшими характеристиками) изначально имеет слабую флуоресценцию в синей области спектра, а фотоактивация приводит к 70-кратному увеличению интенсивности красной флуоресценции. Однако активированная красная флуоресцентная форма является нестабильной: время жизни ($\tau_{1/2}$) составляет 9 ч при 37°C. Высокая фототоксичность активируемого света, а также низкая яркость и олигомерное состояние сильно ограничивают применение PAmRFP1. Кроме того, фотостабильность активированной формы PAmRFP1 несколько ниже, чем у его предшественника mRFP1.

Все недостатки, присущие белку PAmRFP1, были преодолены в мономерном фотоактивируемом белке PAmCherry1, который был абсолютно нефлуоресцентным в темном (неактивированном) состоянии, но легко активировался излучением с длиной волны 399 нм. Его активированная красная флуоресцентная форма была стабильной, переход в темное состояние не наблюдался по крайней мере в течение 24 ч, а контраст фотоактивации (отношение интенсивностей флуоресценции до и после активации) достигал 4000. Помимо этого белок PAmCherry1 обладал высокой скоростью созревания, а отсутствие дополнительных пиков в спектрах возбуждения и эмиссии флуоресценции позволило использовать его для многоцветной микроскопии высокого разрешения.⁵⁶

Фотоактивируемые белки второй группы способны к необратимому переходу из зеленой флуоресцентной формы в красную под действием УФ- или голубого света (действие более длинноволнового света не приводит к сколько-нибудь заметной фотоактивации). Для всех белков данной группы эффективность фотоактивации сильно зависит от pH среды. Белки данной группы имеют одинаковый хромогенный трипептид H—Y—G. Этот класс белков включает в себя белки из коралловых полипов: белок Kaede из *Trachyphyllia geoffroyi*,⁵⁷

белки mscvRFP, rfpRFP (см.⁷) и EosFP из *Lobophyllia hemprichii*, рекомбинантные формы tdEosFP, mEosFP,⁵⁸ mEos2 (см.⁵⁹) и IrisFP,⁶⁰ а также KikGR и mKikGR — мутантные формы белка KikG из *Favia fava*.^{61,62}

Белки дикого типа Kaede, mscvRFP и rfpRFP легко фотоактивируются светом с длиной волны 350–400 нм, но mscvRFP и rfpRFP проявляют еще и свойства флуоресцентных таймеров, постепенно переходя в красное флуоресцентное состояние без облучения УФ-светом.⁸ Белок Kaede таким свойством не обладает, что позволяет эффективно использовать его в качестве фотоактивируемого флуоресцентного маркера.⁵⁷ Контраст фотоактивации для Kaede составляет ~2000. Эффективное созревание Kaede при 37°C позволяет осуществлять его биосинтез в животных клетках.

Белок дикого типа EosFP, названный в честь богини утренней зари в греческой мифологии, на 84% гомологичен белку Kaede и при облучении светом с длиной волны 390 нм подвергается необратимой фотоконверсии из зеленой в красную флуоресцентную форму (максимумы флуоресценции при 516 и 581 нм соответственно).⁵⁸ Скорость фотоактивации EosFP возрастает при уменьшении pH, что свидетельствует о том, что именно протонированная форма хромофора подвергается фотоконверсии. Были разработаны тандем-димерная (tdEosFP) и мономерная (mEosFP) версии EosFP, которые имеют идентичные предшественнику спектральные и физико-химические характеристики. Белок mEosFP не созревает при 37°C, что сильно затрудняет его биосинтез в клетках млекопитающих. Недавно была получена улучшенная версия mEosFP, которая эффективно созревает при 37°C и может быть использована как маркер локализации многих белков.

Белок mEos2 — один из последних по времени получения. Его хромофор может существовать в двух флуоресцентных формах. Белок mEos2 сохраняет высокую яркость, контрастность фотоактивации и фотостабильность, которыми обладают его предшественники.⁵⁹

Отдельно следует отметить новый белок IrisFP, который был получен на основе EosFP введением одной мутации F173S и сочетает в себе свойства как фотоактивируемого, так и фотоперключаемого белка. УФ-Свет необратимо фотоактивирует переход белка IrisFP из зеленой в красную флуоресцентную форму, причем зеленая и красная флуоресцентные формы могут обратимо включаться и выключаться светом с длиной волны 440 и 561 нм соответственно.⁶⁰ Главным недостатком белка IrisFP остается его тетрамерное состояние.

С учетом структурных данных был проведен рациональный мутагенез зеленого флуоресцентного белка KikG, который не обладает свойствами фотоперключаемого белка, и отобраны мутанты, способные к фотоперключению при облучении их УФ-светом. На первой стадии рационального мутагенеза была введена мутация 65H для получения хромофора H—Y—G. После 30 раундов молекулярной эволюции был получен фотоактивируемый белок KikGR, имеющий 8 мутаций по сравнению со своим предшественником KikG. При облучении KikGR УФ-светом происходила фотоконверсия зеленой формы с максимумом флуоресценции при 517 нм в красную с максимумом флуоресценции при 593 нм.⁶¹ Дальнейшая оптимизация белка KikGR позволила получить его мономерную версию mKikGR, обладающую такими же физико-химическими свойствами.⁶² Эффективность фотоактивации белков KikGR и mKikGR сильно зависит от длины волны активирующего света (350–420 нм) и от pH среды, контраст их фотоактивации достигает 560. Данные белки

могут быть активированы мягким излучением инфракрасного лазера. Красная форма KikGR почти в 4 раза более фотостабильна, чем красная форма белка mEosFP, хотя имеет сложную кинетику фотообесцвечивания.

Третья группа PAFPs включает белок dendGFP из октокоралла *Dendronephthya* sp. и недавно созданный на его основе новый мономерный белок Dendra2.⁶³ Белки этой группы способны к необратимой фотоконверсии зеленого флуоресцентного состояния в красное под действием как ультрафиолетового, так и видимого синего света. При полной фотоконверсии белка Dendra2 светом с длиной волны 405 или 488 нм интенсивность красной флуоресценции с максимумом при 575 нм возрастает в 150–300 раз, а уровень зеленой флуоресценции с максимумом при 505 нм уменьшается в 15–20 раз. Белок Dendra2 представляет собой первый PAFP, который одновременно является мономерным, эффективно сворачивается при 37°C в бактериальных клетках и клетках животных и может быть фотоактивирован светом с длиной волны 488 нм, обладающим низкой фототоксичностью. Однако для фотоконверсии Dendra2 необходим свет большой интенсивности, свет низкой интенсивности с длиной волны 400–490 нм даже за длительное время не способен активировать красную форму данного белка. Это свойство позволяет, выбирая свет нужной интенсивности, возбуждать зеленую флуоресценцию без фотоконверсии белка и локально фотоактивировать зеленую форму. Красная форма белка Dendra2 по фотостабильности в 4 раза превосходит белок DsRed, что значительно упрощает проведение длительной визуализации белка.

Четвертая группа PAFPs включает белки KFP1, мутантную форму хромопротеина asFP595 из морской актинии *Anemonia sulcata*,^{64,65} rsCherry и rsCherryRev, полученные на основе белка mCherry.⁶⁶ Белки данной группы способны к фотоперключению из нефлуоресцентной формы во флуоресцентную и наоборот при облучении их светом определенной длины волны.

Белок дикого типа asFP595 эффективно поглощает свет (максимум поглощения при 568 нм), но не флуоресцирует. В ответ на облучение интенсивным зеленым светом белок становится флуоресцентным («разжигается») с максимумом поглощения при длине волны 575 нм и максимумом излучения при длине волны 595 нм.⁹ После прекращения облучения зеленым светом белок быстро переходит в начальное нефлуоресцентное состояние ($\tau_{1/2} < 10$ с). С другой стороны, тушение флуоресценции этого белка может быть осуществлено при облучении коротковолновым (голубым, ~450 нм) светом. Оба процесса («разжигание» и тушение) обратимы.^{64,65} Короткое время жизни флуоресцентного состояния препятствует использованию белка дикого типа asFP595 в качестве локально активируемой флуоресцентной метки белков и органелл *in vivo*. В связи с этим была создана мутантная форма asFP595, названная KFP1 (Kindling Fluorescent Protein, KFP), с большим временем жизни флуоресцентного состояния ($\tau_{1/2} \approx 50$ с). Белки KFP1 и asFP595 отличаются всего тремя аминокислотными заменами: мутация A148G увеличивает время жизни флуоресцентного состояния, K9T и K10E — предотвращают агрегацию белка. Белок KFP1, как и asFP595, переходит во флуоресцентное состояние при облучении интенсивным зеленым светом и тушится при облучении голубым светом. Скорость и степень обратимого «разжигания» и тушения зависят от интенсивности и длительности соответствующего облучения. При «разжигании» KFP1 имеет полосу поглощения с максимумом при длине волны 580 нм и максимумом полосы излучения при

длине волны 600 нм. Кроме того, облучение KFP1 зеленым светом еще большей интенсивности или в течение более продолжительного промежутка времени (или и то, и другое одновременно) вызывает необратимый переход белка во флуоресцентное состояние, при этом интенсивность флуоресценции возрастает по крайней мере в 30 раз по сравнению с необлученным белком. Флуоресценция необратимо активированного KFP1 устойчива по крайней мере в течение одного года.

С помощью сайт-направленного мутагенеза хромопротеинов scigCP и hcrCP была создана целая серия «разжигаемых» флуоресцентных белков.⁶⁵ Все эти белки способны как к обратимой, так и к необратимой фотоконверсии из нефлуоресцентного во флуоресцентное состояние. Две мутантные формы hcrCP с единичными заменами N165A и N165G соответственно подвергаются фотоконверсии под действием синего света. Преимуществом этих мутантных форм по сравнению с другими KFPs является отсутствие фоновой фотоконверсии в процессе наблюдения флуоресценции при «разжигании» белков. «Разжигаемые» FPs в «разожженном» состоянии имеют максимумы флуоресценции в красной области спектра (длины волн возбуждения 580–590 нм, флуоресценции 600–630 нм). Однако пока все белки, созданные на основе хромопротеина asFP595, являются тетрамерами.

Первыми мономерными фотопереключаемыми флуоресцентными белками являются rsCherry и rsCherryRev, созданные на основе mCherry.⁶⁶ Белки rsCherry и rsCherryRev имеют противоположные направления фотопереключения, т.е. желтый свет (550 нм) активирует красную флуоресценцию rsCherry, а синий свет (450 нм) ее тушит, тогда как для

rsCherryRev желтый свет и синий свет вызывают противоположные действия. Времена релаксации ($\tau_{1/2}$) форм с максимальной красной флуоресценцией для rsCherry и rsCherryRev до равновесного состояния составляют 40 и 13 с соответственно. Более детальное изучение свойств rsCherry и rsCherryRev⁵⁶ показало, что большинство молекул этих белков, которые могут образовать хромофор, не способны фотоактивироваться, с чем связана в целом низкая яркость активированных ансамблей молекул белков. Другими недостатками белков rsCherry и rsCherryRev являются низкий контраст фотопереключения и остаточная флуоресценция в «выключенном» состоянии, что значительно ограничивает их применение для микроскопии с высоким разрешением. По всем ключевым параметрам данные белки значительно уступают своим конкурентам.

Основные физико-химические характеристики известных фотоактивируемых и фотопереключаемых белков суммированы в табл. 3.

V. Структура флуоресцентных белков

1. Кристаллическая структура флуоресцентных белков

Сравнение аминокислотных последовательностей первых выделенных RFPs с GFP показало, что несмотря на невысокую аминокислотную гомологию (~20–30%) третичная структура всех известных флуоресцентных белков является высококонсервативной и представляет собой так называемый β -бочонок. Однако в отличие от GFP, который при рассмотрении сверху имеет форму круга, мономер RFPs имеет овальную форму, что непосредственно влияет на

Таблица 3. Свойства фотоактивируемых и фотопереключаемых красных флуоресцентных белков.

Белок	Олигомерное состояние	$E_{x_{max}}$, нм	$E_{m_{max}}$, нм	ε , л · моль ⁻¹ · см ⁻¹	QY	pK _a	Фотостабильность, с	Ссылки
Dendra2	Мономер	490	507	45 000	0.50	6.6	45	63
		553	573	35 000	0.55	6.9	378	63
IrisFP	Тетрамер	488	516	52 200	0.43	—	—	60
		551	580	35 400	0.47	—	—	60
EosFP	»	506	516	72 000	0.70	5.7	58	58
		571	581	41 000	0.55	—	489	58
tdEosFP	Димер	506	516	84 000	0.66	5.7	47	67
		569	581	33 000	0.60	—	380	67
mEosFP	Мономер	505	516	67 200	0.64	—	—	58
		569	581	37 000	0.62	—	—	58
mEos2	»	506	519	56 000	0.84	5.6	42	59
		573	584	46 000	0.66	6.4	323	59
PA-mCherry1	»	404	—	6 500	—	—	18	56
		564	594	18 000	0.46	6.3	—	56
PAmRFP1-1 Kaede	Димер	578	605	10 000	—	4.4	—	55
		508	518	98 800	0.88	5.6	53	57
mKikGR	Мономер	572	580	60 400	0.33	5.6	386	57
		505	515	49 000	0.69	—	14	62
KikGR	Тетрамер	580	591	28 000	0.63	—	21	62
		507	517	28 200	0.7	4.2	—	61
KFP1	»	583	593	32 600	0.65	5.5	—	61
		570	600	123 000	< 0.001	—	—	64
rsCherryRev	Мономер	570	600	59 000	0.07	—	—	64
		572	608	85 000	0.0003	5.5	—	66
rsCherry	»	572	608	84 000	0.005	5.5	—	66
		572	610	81 000	0.009	6.0	—	66
		572	610	80 000	0.02	6.0	—	66

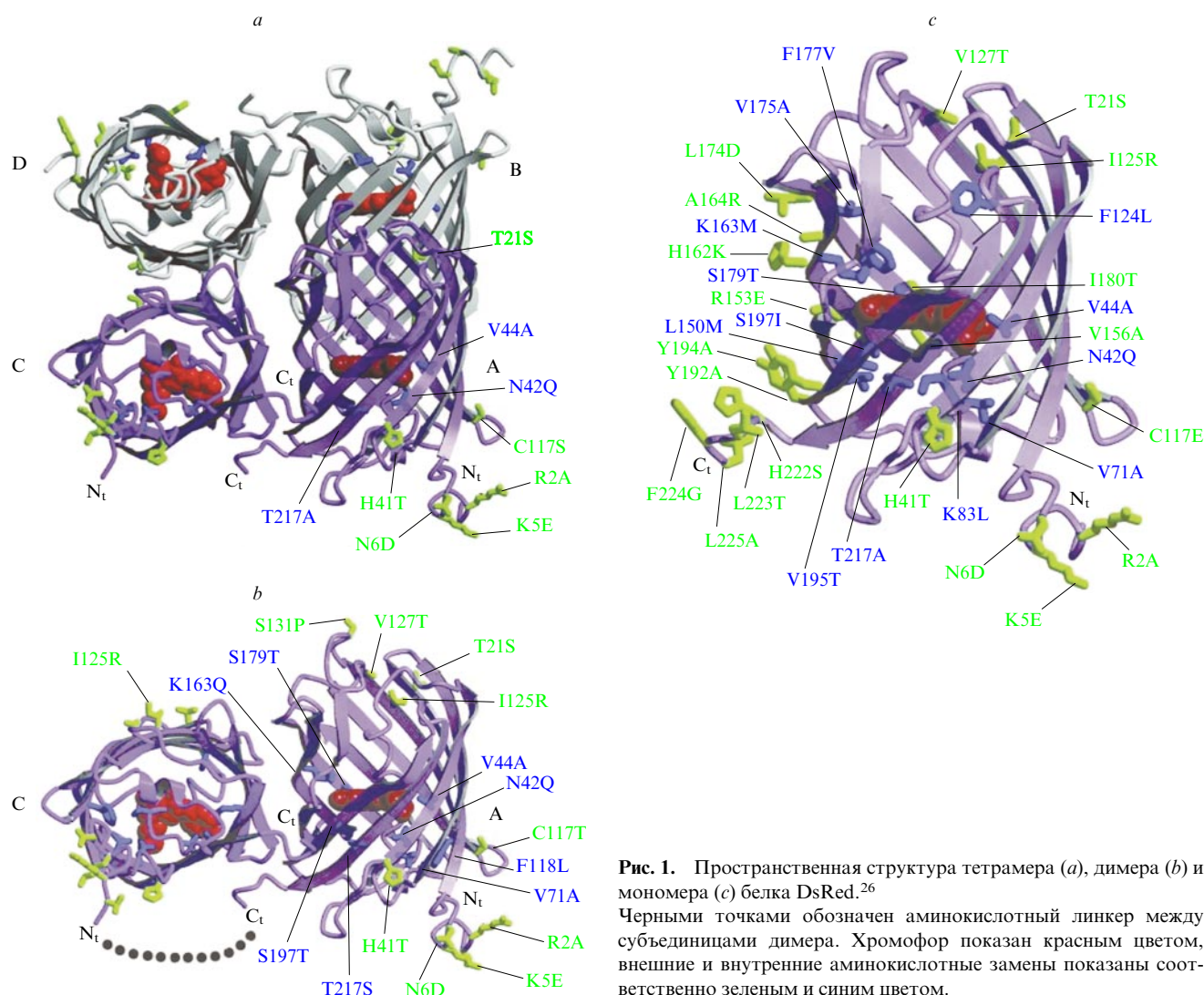


Рис. 1. Пространственная структура тетрамера (a), димера (b) и мономера (c) белка DsRed.²⁶ Черными точками обозначен аминокислотный линкер между субъединицами димера. Хромофор показан красным цветом, внешние и внутренние аминокислотные замены показаны соответственно зеленым и синим цветом.

микроокружение хромофора и, возможно, имеет значение при созревании белка. Внутри каждого β -бочонка диагонально протянута α -спираль, несущая хромофор. Хромофор располагается в центре внутренней полости β -бочонка, что было подтверждено рентгеноструктурными данными, полученными для первого RFP.^{68,69} Короткие α -спиральные участки, которые оказались в высшей степени консервативными, образуют «дно» и «крышку» каждого бочонка; N- и C-концы белка находятся вне β -бочонка, что значительно упрощает получение гибридных белков с участием RFPs. Мономерная субъединица имеет массу 25–30 кДа и состоит из 220–240 аминокислотных остатков, размер мономера составляет $42 \times 24 \text{ \AA}$.

В тетрамере мономерные субъединицы образуют две пары димеров, в которых мономеры ориентированы антипараллельно относительно друг друга; при этом хромофоры мономеров располагаются как зеркальные отражения по отношению друг к другу. Каждый мономер в тетрамере взаимодействует с двумя другими мономерами, образуя две области межсубъединичного взаимодействия — A/B (C/D) и A/C (B/D) (рис. 1). Взаимодействия в этих областях имеют разную природу. Гидрофобные взаимодействия области A/B обусловлены кластером плотно упакованных гидрофобных аминокислот, а A/C-область содержит много электростатических контактов и водородных связей между полярными

аминокислотами и молекулами воды, а также редкую структуру «зажим», образованную C-концевыми участками каждого мономера.^{68,69} Сравнение участков аминокислотных последовательностей, входящих в состав областей взаимодействия мономеров у различных FPs из Anthozoa, показало, что они существенно различаются у разных белков.^{8,50}

2. Структура и образование хромофора

Главной особенностью GFP-подобных флуоресцентных белков является то, что образование хромофора, ответственного за флуоресцентные свойства белка, осуществляется без участия каких-либо кофакторов или ферментов, но с участием молекулярного кислорода. В частности, изучение хромофора белка DsRed привело к появлению гипотезы о том, что RFPs содержат химически отличные от GFP поглощающие структуры.⁷ Действительно, значительный длинноволновый сдвиг спектра вряд ли можно объяснить только особенностями микроокружения хромофора. Однако образование красного хромофора происходит через стадию формирования зеленого GFP-подобного хромофора. Кроме того, химический синтез соединений, похожих по структуре на хромофор белка DsRed, показал, что введение дополнительной двойной связи в GFP-подобный хромофор приводит к заметному сдвигу спектра в красную область.⁷⁰

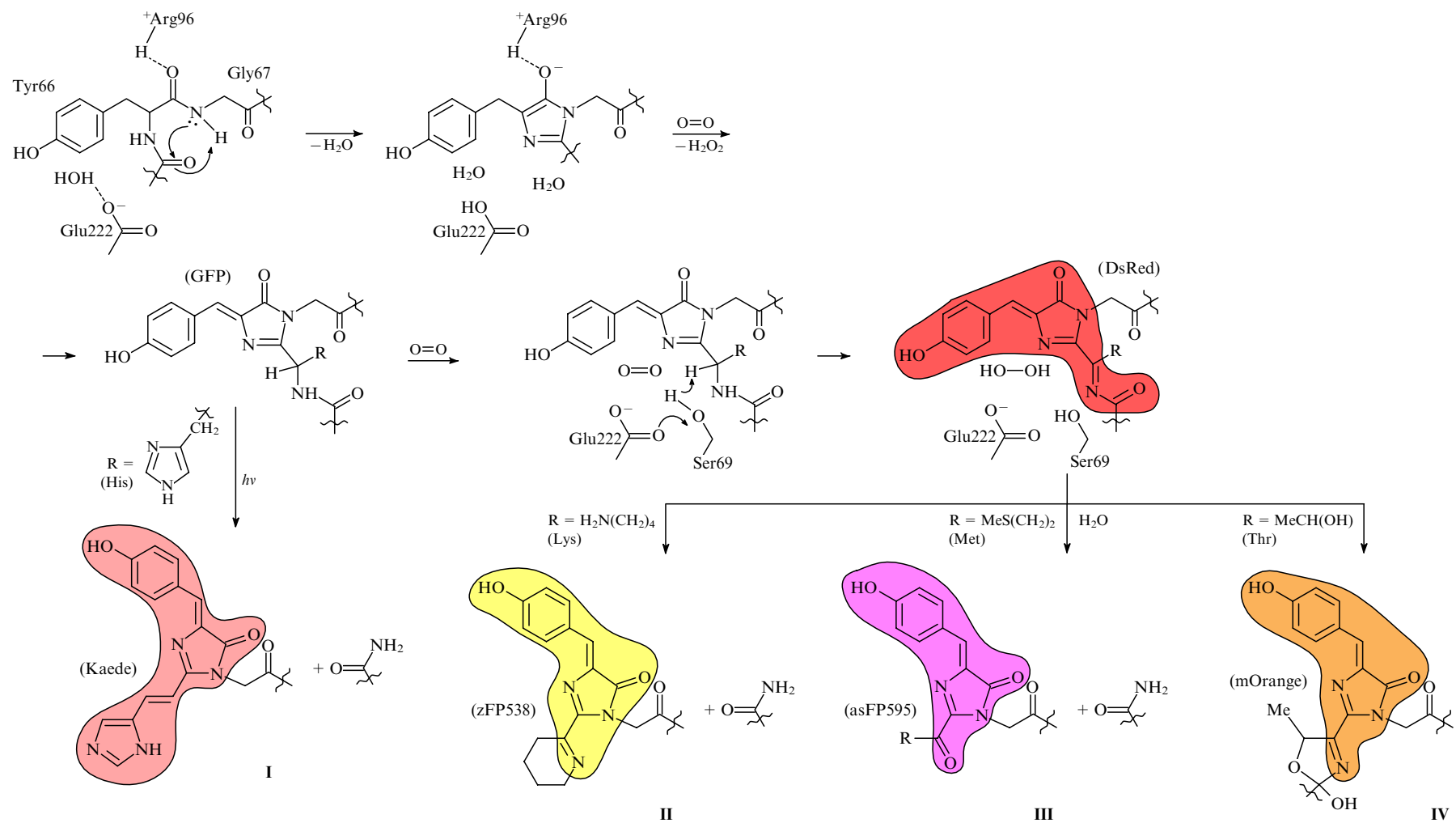


Рис. 2. Механизм образования и типы красного хромофора (см. текст).

Красные хромофоры делятся на два типа: DsRed-подобный хромофор⁷¹ и Kaede-подобный хромофор⁷² — по названию белков, в которых они впервые были обнаружены (рис. 2). Флуоресцентные белки с DsRed- или Kaede-подобными хромофорами могут быть легко различимы по форме спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции. Так, Kaede-подобный хромофор (I на рис. 2) имеет узкие пики с меньшим Stokes-сдвигом и характерное плечо при 630 нм в спектре флуоресценции. Кроме того, есть четкое отличие в спектрах RFPs разных типов в денатурирующих условиях. DsRed-Подобный хромофор гидролизует в 1 М NaOH с образованием зеленого хромофора, который имеет максимум поглощения при 445 нм.⁷¹ В свою очередь, флуоресцентные белки с Kaede-подобным хромофором в 1 М NaOH поглощают при 499 нм.⁷³

Лилово-голубые хромопротеины, которые характеризуются высокими коэффициентами молярной экстинкции, имеют другой хромофор (III на рис. 2), являющийся изомером DsRed-подобного красного хромофора.⁷⁴ Примеры спектров флуоресценции некоторых белков приведены на рис. 3.

Известны также три производных DsRed-подобного хромофора, причем каждый вариант представлен по крайней мере одним флуоресцентным белком.

«Разжигаемый» флуоресцентный белок KFP, который был первоначально описан как хромопротеин, выделенный из актинии *Anemonia sulcata*,⁹ имеет фрагментированный DsRed-подобный хромофор,⁷⁵ образующийся при автокаталитическом гидролизе ацилимина.⁷⁶

В желтом флуоресцентном белке zFP538 из *Zoanthus sp.*⁷ первый аминокислотный остаток трипептида хромофора (лизин) подвергается внутримолекулярной циклизации с образованием тетрагидропиридинового кольца, что приводит к формированию хромофора, состоящего из трех циклов (II на рис. 2).⁷⁷

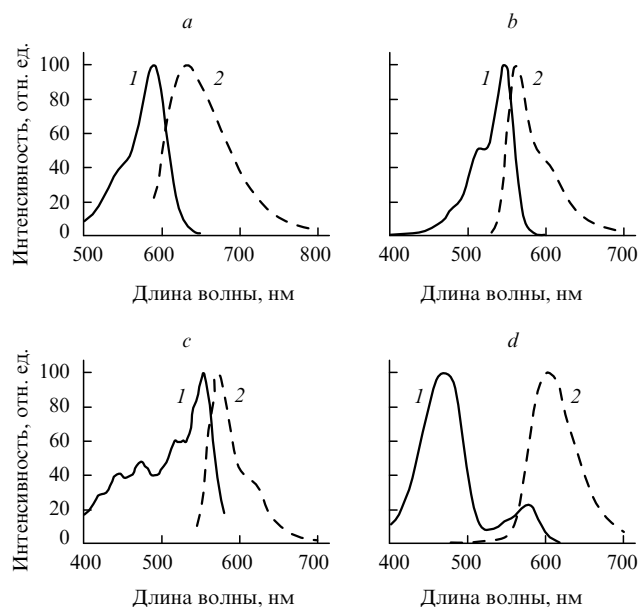


Рис. 3. Спектры возбуждения (поглощения) (1) и флуоресценции (2) некоторых красных флуоресцентных белков: mKate (a), mOrange (b), Dendra2 в активированном состоянии (c) и mKeima (d).

Третий тип DsRed-подобного хромофора (IV на рис. 2) был найден в белке mOrange,⁷⁸ а также в природном белке КО и его мономерных вариантах.⁷⁹ В данной группе белков боковая цепь остатка аминокислоты (треонина в случае mOrange либо цистеина в случае КО), входящего в состав хромофора, взаимодействует с карбонильным атомом углерода пептидной группы с образованием дигидрооксазольного цикла. До сих пор нет конкретного ответа на вопрос о том, как изменения в аминокислотной последовательности могут приводить к такому разнообразию структур хромофора.

Красный хромофор формируется в результате четырех последовательных автокаталитических реакций из трех аминокислотных остатков, входящих в состав внутренней α -спирали. На первой стадии происходит нуклеофильная атака карбонильного атома углерода атомом азота пептидной группы. После циклизации промежуточный продукт подвергается дегидрированию (отщепление атомов водорода происходит по связи $C_\alpha-C_\beta$ остатка Tyr66) под действием молекулярного кислорода, в результате чего возникает зеленый хромофор (4-(*n*-гидроксibenзилиден)-2-имидазолин-5-он). Последующее автокаталитическое окисление молекулярным кислородом приводит к расширению сопряженной π -системы благодаря образованию ацилиминной связи. Хотя подобная аминокислотная последовательность встречается и в других белках, но в них хромофор не образуется, что свидетельствует о решающей роли пространственной структуры белка в образовании зеленого хромофора.

Сравнение аминокислотных последовательностей больше, чем сотни известных флуоресцентных белков позволяет сделать вывод, что четыре аминокислотных остатка в них абсолютно консервативны. Это Tyr66 и Gly67 хромогенного трипептида, а также Arg96 и Glu222 (нумерация по GFP), которые входят в микроокружение хромофора. Остаток Arg96 находится в непосредственной близости от атома кислорода имидазолинона, а остаток Glu222 располагается ближе к хромофору в DsRed, чем в GFP. Очевидно, что атом азота остатка Gly67 является нуклеофилом на первой стадии циклизации хромофора, в то время как остатки Arg96 и Glu222 выполняют каталитическую функцию. На основании структуры мутанта по позиции 96 (R96A) с предциклизованным хромофором было показано, что при формировании третичной структуры белка хромогенные аминокислотные остатки располагаются максимально удобным образом для образования цикла.

Недавно была исследована роль остатков R96 и E222,^{80,81} и оказалось, что R96 является электростатическим катализатором, стабилизирующим енольный интермедиат на первой стадии образования хромофора. Замена данного остатка аргинина на любой другой аминокислотный остаток (кроме лизина) приводит к замедлению созревания белка до нескольких месяцев. Интересно, что утраченная функция созревания в мутанте R96A может быть восстановлена заменой Q183R.⁸⁰ Предполагается, что R96 стабилизирует енольную форму глицина в хромофоре, облегчая тем самым нуклеофильную атаку карбонильного атома углерода. Данная гипотеза подтверждается кристаллографическими данными для GFP и голубого FP (BFP).⁸² Восстановленные молекулы GFP и BFP, полученные в отсутствие кислорода, содержат енольную форму имидазолинонового цикла. Роль остатка Glu222 менее ясна, но экспериментальные данные свидетельствуют о том, что его анион осуществляет основной катализ, депротонируя амид Gly67.⁸¹

Практически ничего не известно об инициации и контроле реакции образования ацилиминной связи. Данная реакция обычно протекает медленно, результат ее нередко непредсказуем, поэтому она не всегда приводит к появлению желаемых продуктов. Было также показано, что образование ацилиминной связи является лимитирующей стадией при созревании красных хромофоров.⁴⁷ Эволюционное дерево указывает¹⁹ на то, что возникновение RFPs произошло относительно недавно и по нескольким независимым путям. Недавно в удивительно успешном эксперименте было синтезировано несколько генов протеинов-предшественников RFPs.⁸² Примечательно, что экспрессия данных генов привела к синтезу флуоресцентных белков с зеленой и красной эмиссией, максимумы которой совпадают с таковыми для GFPs и RFPs.⁸³

Два существенных факта ограничивают число возможных механизмов образования ацилиминной связи. Во-первых, появление интермедиатов, содержащих протонированный GFP-подобный хромофор, с синей флуоресценцией при созревании RFPs свидетельствует в пользу того, что анионная форма зеленого хромофора не способна к образованию ацилиминной связи.^{48, 84} Во-вторых, наличие дополнительной положительно заряженной боковой цепи оказывается необходимым условием для появления красной флуоресценции, но не достаточным, так как лизин или аргинин почти всегда присутствуют в хромогенном пентапептиде X–Y–G–X–K/R в пятой позиции. Например, в белке DsRed остаток K70 может быть замещен только на Arg,²¹ в противном случае созревание белка останавливается на стадии образования зеленого хромофора.

Рентгеноструктурные данные, полученные для белка DsRed,⁶⁸ позволили предположить, что для образования ацилиминной связи ключевую роль играют остатки E222 и S70. Критическим для формирования красного хромофора является взаимное расположение остатков E222 и Q66. Таким образом, остаток E222 вовлечен как в образование зеленого хромофора, так и в последующее его превращение в красный хромофор.

В молекуле белка DsRed с остатками E222, Q65 и S68 взаимодействует остаток N42, который определяет их «правильное» расположение. Возможно, это является причиной существенного увеличения зеленой флуоресценции, связанного с заменой остатка N42 в DsRed1.⁸⁵

В случае z2FP574 (RFP из *Zoanthus sp.* 2) для образования ацилиминной связи необходимо декарбоксилирование D66, являющегося первым аминокислотным остатком в хромогенном трипептиде DYG.^{86, 87} В результате последующего окисления образуется DsRed-подобный хромофор. Кинетика созревания z2FP574 и его мутантов показывает, что в отличие от остальных RFPs у этого белка образование красного хромофора происходит через анионную форму зеленого хромофора.⁸⁶

Обычно хромофор имеет плоское строение, хотя возможно отклонение от планарности. Как правило, хромофор состоит из двух ароматических колец и мостика между ними. Одним из ароматических колец является бензольное кольцо Y66, а другим — пятичленный гетероцикл. В случае белка Kaede хромофор содержит еще одну сопряженную ароматическую систему — имидазольный цикл. Хромофор может иметь *цис*- или *транс*-конфигурацию относительно двойной связи C α =C β между ароматическими системами (рис. 4). Для стабилизации *цис*-конфигурации важное значение имеет аминокислотный остаток в положении 148. Аминокислотные остатки, способные образовывать водородные связи, стабилизируют анионный *цис*-хромофор. Генно-инженерные

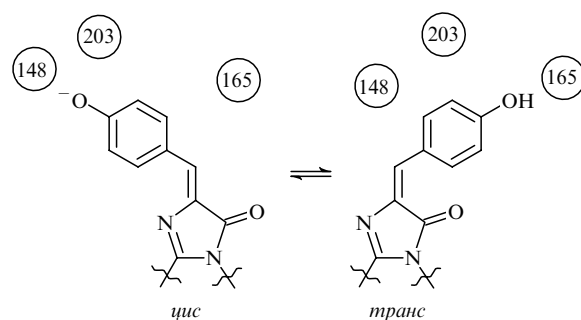


Рис. 4. Схема *цис*–*транс*-изомеризации хромофора при обратимом переходе.

Цифрами указаны аминокислотные остатки, взаимодействие с которыми стабилизирует хромофор в *цис*- или *транс*-конфигурации.

исследования подтвердили, что положение 148 является ключевым при взаимном переходе между флуоресцентными белками и хромопротеинами.^{9, 45} В стабилизации *транс*-конфигурации ключевую роль играет аминокислотный остаток в положении 165. Небольшие гидрофильные аминокислоты в этом положении стабилизируют *транс*-хромофор путем образования водородной связи с OH-группой остатка тирозина, в то время как гидрофобные аминокислоты дестабилизируют его.

Например, хромофор DsRed является планарным и содержит фенольный фрагмент тирозина в *цис*-конфигурации. Согласно данным рентгеноструктурного анализа и масс-спектрометрии высокого разрешения, большинство RFPs содержат DsRed-подобный хромофор в *цис*-конфигурации.^{74, 88–90} Однако все известные GFP-подобные хромопротеины (в отличие от DsRed) содержат непланарный DsRed-подобный хромофор в *транс*-конфигурации. Белок eqFP611 тоже содержит DsRed-подобный хромофор в *транс*-конфигурации,⁵⁰ однако в противоположность CPs имеет планарное строение, а в его мутанте RFP630, содержащем всего лишь одну аминокислотную замену N143S, хромофор имеет *цис*-конфигурацию.⁴⁶ Микроокружение хромофора в eqFP611 таково, что хромофор может принимать планарную *цис*- и *транс*-конфигурацию; таким образом, данный белок является первым примером GFP-подобного белка, который является флуоресцентным как с *цис*-, так и с *транс*-конфигурацией хромофора.

Искажение планарности как *цис*-, так и *транс*-хромофора может происходить относительно β -атома углерода (угол наклона, tilt, τ) и относительно связи C β –C γ (угол поворота, twist, ϕ) (рис. 5). На основе рентгеноструктурных данных

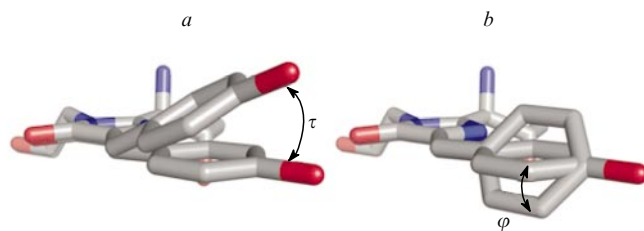


Рис. 5. Искажение планарности хромофора: углы наклона (tilt) (a) и поворота (twist) (b) для красного хромофора.⁸⁶

В обоих случаях показаны два разных положения одного и того же кольца.

была установлена четкая корреляция между квантовым выходом флуоресценции белка и планарностью его хромофора:⁷⁸ чем больше tilt- и twist-углы, тем ниже квантовый выход флуоресценции белков.

Спектральные свойства флуоресцентных белков зависят не только от конфигурации хромофора, но и от его заряда. Красный хромофор может находиться в нейтральной или анионной форме. Анионный DsRed-подобный хромофор поглощает свет при 570–590 нм, а флуоресцирует при 590–640 нм, в то время как нейтральная форма поглощает при 440–460 нм, а флуоресцирует при 470–490 нм. Очевидно, что RFPs содержат хромофор в анионной форме. По всей видимости, RFP mKeima с большим Stokesовым сдвигом составляет исключение из этого правила.³³ Максимум возбуждения флуоресценции для mKeima находится при 440 нм, что соответствует нейтральной форме красного хромофора, а максимум флуоресценции mKeima наблюдается при 620 нм. Данное явление можно объяснить переносом протона в возбужденном состоянии хромофора (excited-state proton transfer, ESPT). Явление ESPT достаточно хорошо описано для GFPs.⁹¹ Например, в белке Sapphire при возбуждении нейтральный хромофор поглощает синий свет и переходит в возбужденное состояние. В этом состоянии он теряет протон, образуя анионную форму, которая испускает уже зеленый свет,⁹² после чего хромофор опять возвращается в нейтральную форму. Равновесие между нейтральной и анионной формами хромофора осуществляется с участием сети водородных связей, в качестве акцептора протона обычно выступает боковая цепь глутаминовой или аспарагиновой кислоты. Подобный механизм, объясняющий большую величину Stokesового сдвига, реализуется и для белка mKeima, что было показано с помощью спектральных и структурных исследований.⁹³

VI. Фотофизика и фотохимия красных флуоресцентных белков

Наиболее разнообразна и интересна фотофизика и фотохимия фотоактивируемых и фотопереключаемых флуоресцентных белков.

Предполагаемый механизм фотоактивации белков PAmRFP1 и PAmCherry включает в себя две последовательные стадии. Первоначально происходит декарбоксилирование аминокислотного остатка E222, что инициирует перегруппировку водородных связей внутри β -бочонка, а затем — необратимая фотоконверсия красного хромофора из нейтральной в анионную форму под действием УФ-света.⁹⁴ Депротонирование остатка Y66 может также сопровождаться переходом хромофора из нефлуоресцентной *транс*-конфигурации во флуоресцентную *цис*-конфигурацию, которая стабилизируется аминокислотными остатками в положениях 148 и 167.⁵⁵

Точный механизм фотоактивации белка PAmRFP1 пока не установлен, но по ряду свойств активированного и неактивированного состояний PAmRFP1 можно судить о возможных изменениях в структуре белка при фотоактивации. Так, спектры поглощения денатурированного mRFP1 и неактивированного PAmRFP1 в 1 М кислоте одинаковы и характеризуются широким пиком с максимумом при 382 нм. Однако спектр денатурированного в щелочных условиях белка PAmRFP1 отличается от спектра mRFP1 и помимо пика при 450 нм включает пик при 330 нм, который, возможно, соответствует фотоактивируемым молекулам белка.

Другие RFPs способны к необратимой фотоконверсии из зеленой флуоресцентной формы в красную под действием УФ- или голубого света. Хромофор белков данной группы образован трипептидом H65–Y66–G67. Под действием УФ-света одинарная связь между атомами азота и углерода S_α остатка H65 нейтрального хромофора разрывается, и образуется двойная связь между атомами S_α и S_β остатка H65. Именно расширение системы сопряженных π -связей приводит к сдвигу спектра флуоресценции в красную область.⁹⁵ Для протекания реакции β -элиминирования по механизму E2 исключительно важную роль играет остаток H65. Показано, что замена данного аминокислотного остатка на любой другой лишает флуоресцентный белок способности к фотоактивации.^{58, 61}

Полученные с высоким разрешением кристаллические структуры зеленой и красной форм позволили уточнить механизм фотоконверсии для белков Kaede,⁹⁶ EosFP (см.⁶⁷) и IrisFP.⁶⁰ Механизм фотоактивации для всех белков данной группы оказался одинаковым. Остаток E222 играет каталитическую роль в процессе фотоактивации: его анион выступает в качестве акцептора протона в реакции β -элиминирования. Для фотоконверсии белка Kaede важное значение имеет также остаток Q38, образующий при участии молекулы воды водородную связь с остатком H65. Установлено, что обратимое фотопереключение зеленой и красной форм IrisFP происходит посредством *цис*–*транс*-изомеризации хромофора. Интересно отметить, что внутреннее окружение хромофора при фотоактивации практически не изменяется.

Хромофор белков dendGFP и Dendra образован аминокислотными остатками H62–Y63–G64. Гистидин в положении 62 характерен для группы Kaede-подобных фотоактивируемых белков. Однако ни один из белков этой группы не способен к фотоконверсии под действием синего света. Причины чувствительности белка Dendra к синему свету пока не выяснены. Сравнение аминокислотных остатков, входящих в микроокружение хромофора белков dendGFP/Dendra и Kaede, EosFP и KikGR, показало,⁶³ что в положении 116 в Dendra находится глутамин, тогда как в Kaede-подобных белках — аспарагин.⁶³ Анализ пространственной структуры белка EosFP подтвердил, что более длинная боковая цепь остатка Gln в этом положении может взаимодействовать с полипептидной цепочкой вблизи хромофоробразующего остатка H62.⁶⁷ Возможно, это взаимодействие способствует разрыву полипептидной цепи и образованию красного хромофора в ответ на облучение синим светом. Чтобы установить механизм фотоконверсии Dendra, необходимо дальнейшее исследование этого белка.

Для фотопереключаемых белков asFP595 и KFP1 была предложена модель, согласно которой переход из хромосостояния во флуоресцентное состояние связан с *цис*–*транс*-изомеризацией хромофора. В ряду флуоресцентных белков из класса Anthozoa остаток Ser148 является высококонсервативным, и замена A148S в asFP595 приводит к значительному увеличению квантового выхода флуоресценции белка.^{68, 69} С учетом этого было сделано предположение о сходной конфигурации хромофора asFP595 во флуоресцентном состоянии и хромофоров FPs из Anthozoa и GFP из *Aequorea*. Следовательно, если фотоконверсия связана с *цис*–*транс*-изомеризацией хромофора, остаток Y66 белка asFP595 в хромосостоянии должен взаимодействовать с остатком S165.

В белке DsRed1 реализации данной конфигурации пространственно препятствует остаток I165. Предполагается, что остаток S165 отвечает за стабилизацию хромофора

asFP595 в нефлуоресцентном состоянии, поскольку в других FPs в этом положении остаток серина не встречается. При этом существует вероятность перехода возбужденного хромофора во флуоресцентное состояние. Предложенная модель хорошо объясняет свойства белков KFP1 и asFP595, а также обратимый переход из хромосостояния во флуоресцентное состояние. Данная модель была подтверждена в результате получения кристаллических структур мутантов белка asFP595 как во флуоресцентном, так и в хромосостоянии.⁹⁷ Для установления структуры белка в активированном состоянии был выбран мутантный белок asFP595-A148S, имеющий большее время жизни флуоресцентного состояния. После облучения светом высокой интенсивности кристаллы были мгновенно заморожены, и затем получены карты электронной плотности с разным разрешением. Данные эксперименты показали, что сразу после интенсивного облучения хромофор находится в *цис*-конфигурации. Если облучение было кратковременным, то наблюдались две конфигурации хромофора. Следует отметить, что *цис*-конфигурация хромофора стабилизируется водородной связью между OH-группой тирозина хромофора и боковой цепью S148. Это может объяснять увеличение времени жизни активированного состояния белка asFP595-A148S по сравнению с KFP1 (A148G), в котором образования такой водородной связи не происходит. Дополнительно были проведены структурные исследования белка KFP1 в активированном состоянии. Карты электронной плотности для кристалла KFP1, полученного после облучения высокоинтенсивным светом с длиной волны 540 нм, неожиданно показали, что хромофор находится в *транс*-конфигурации и участвует в стэкинг-взаимодействии с H203. Таким образом, наблюдаемые структуры подобны структурам, полученным для неактивированного состояния белка KFP1,⁹⁸ за исключением степени планарности хромофора. Углы τ и ϕ для нефлуоресцентного состояния составляют 8.8° и 21°, а для активированного состояния — 1.2° и 13° соответственно. Дальнейшие структурные исследования белка KFP1 в активированном и неактивированном состояниях при температурах от –173 до 25°C показали, что активация возникает в результате движения остатка H197 до такого положения, когда становится возможным его стэкинг-взаимодействие с хромофором и увеличение планарности последнего.⁹⁹ Отметим, что для мутанта asFP595-A148S остаток S148 блокирует H203 в «стэкинге» с хромофором так, что положение остатка H203 не меняется при фотопереключении. Это может означать, что механизмы фотопереключения для мутантов A148G и A148S различны.

Описана⁹⁷ структура permanently флуоресцирующего мутанта asFP595-S158V с разрешением 1.7 Å. Независимо получена⁹⁹ структура мутанта asFP595-A148S/S165V. Установлено, что в обоих белках хромофор находится в *цис*-конфигурации и является планарным. В случае asFP595-A148S/S165V наблюдалась водородная связь между OH-группой тирозина хромофора и остатком S148, как и для asFP595-A148S.⁹⁷ Однако более детальное сравнение этих структур выявило большую разницу (до 3 Å) в положении хромофора внутри β -бочонка, что может быть вызвано взаимодействием остатка V165 с хромофором. Но это не объясняет механизма необратимой фотоактивации белка KFP1, который требует дальнейшего изучения.

Фотоиндуцируемая *цис*–*транс*-изомеризация хромофора характерна и для других RFPs.^{100, 101} С этим процессом могут быть связаны активация флуоресценции, быстрое фотообесцвечивание или изменение спектральных свойств

флуоресцентных белков при действии света определенной длины волны.^{16, 101} Таким образом, стабилизация хромофора в одной конфигурации может значительно повысить фотостабильность белка либо предотвратить нежелательные фотоактивационные процессы.

Совсем недавно была обнаружена способность многих permanently флуоресцирующих RFPs (mPlum, HcRed1, mKO, mKO2, mKate, Katushka, mOrange, mOrange2) к фотоконверсии при облучении светом определенной длины волны.^{102, 103} Например, белки Katushka, mKate и HcRed1 при облучении их светом с длинами волн 405, 561 и 750 нм соответственно переходят в зеленые флуоресцентные белки с практически полной потерей красной флуоресценции. Контраст фотоконверсии может достигать 82 как в растворе белка, так и при биосинтезе белка в животных клетках. Интересно отметить, что мутантные белки TagRFP и TagRFP-T, полученные из того же белка, что и mKate и Katushka, не обладают данным свойством.

При облучении белков mOrange и mOrange2 светом с длиной волны 488 нм максимум их флуоресценции сдвигался в дальнюю красную область (до 640 нм). В отличие от фотопереключаемых белков эффективность фотоконверсии RFPs практически не зависит от pH среды. Механизм фотоконверсии RFPs пока не установлен.

VII. Основные области применения красных флуоресцентных белков

Флуоресцентные белки являются универсальным инструментом и широко применяются для анализа различных биологических систем. Использование GFP-подобных белков при проведении исследований в области биохимии, биотехнологии и клеточной биологии не только позволило новым способом визуализировать динамические процессы, происходящие в клетках, но также ускорило развитие новых методов микроскопирования исследуемых объектов. Больше десятилетия зеленый флуоресцентный белок использовался как маркер, для получения различных гибридных белков, при изучении их внутриклеточной локализации и передвижения в клетке, а также для мечення живых клеток и целых организмов.¹⁰⁴ Для визуализации флуоресценции можно использовать стерео- или конфокальный микроскоп, в качестве источников возбуждающего излучения могут применяться как лампы высокой мощности, так и лазеры.^{105, 106} Недавно был предложен новый метод микроскопии, который позволяет получать изображения с разрешением ~10 нм, однако в этом случае могут использоваться только фотоактивируемые или фотопереключаемые флуоресцентные белки.¹⁰⁷ Получение мутантных форм RFPs расширило палитру белков с флуоресценцией разных цветов и сделало возможным осуществление многоцветной микроскопии. В последнее время удалось получить мутантные рекомбинантные красные GFP-подобные белки, отличающиеся от белков дикого типа стабильностью, величиной квантового выхода, характером спектров поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции, а также фотохимическими свойствами.

Главными преимуществами GFP-подобных белков при их использовании являются высокая стабильность и способность к формированию хромофора без участия каких-либо кофакторов, но в присутствии молекулярного кислорода. Кроме того, N- и C-концы флуоресцентных белков доступны для создания гибридных белков, что позволяет осуществлять сшивку флуоресцентного белка с белком-мишенью. При этом FP редко оказывает влияние на функциональные харак-

теристики последнего. GFP-Подобные белки в большинстве случаев нетоксичны для клеток. Главное преимущество при использовании RFPs по сравнению с зелеными белками состоит в том, что уровень автофлуоресценции значительно ниже в «красном» диапазоне, и свет с большей длиной волны меньше рассеивается. Три главных вида объектов, для изучения которых используются флуоресцентные белки, — это клетки, органеллы и белки.^{95, 108}

1. Красные флуоресцентные белки как репортерные маркеры

Используя ген флуоресцентного белка (репортерный), находящийся под контролем промотора какого-либо конкретного гена, можно изучать экспрессию этого гена и уровень синтеза кодируемого им белка в живых клетках и тканях, регистрируя интенсивность флуоресценции. Олигомерное состояние синтезируемого флуоресцентного белка при использовании в качестве маркера экспрессии гена неважно. Медленное посттрансляционное созревание хромофора и стабильность образующегося FP являются главными ограничивающими факторами использования флуоресцентных белков для исследования быстрых транскрипционных процессов активации. С этой точки зрения наиболее удобны для использования в качестве репортерных маркеров экспрессии генов быстро созревающий белок DsRed-Express2 и его улучшенные версии E2-Orange и E2-Red/Green, а также дальне-красный белок Katushka2. Показано, что цитотоксичность белка DsRed-Express2 и его улучшенных версий для клеток млекопитающих сопоставима с таковой для EGFP (GFP с усиленной флуоресценцией), а фотостабильность значительно выше, чем у многих улучшенных RFPs.^{23, 28} Главное преимущество использования белка Katushka2 как репортера генной экспрессии заключается в обеспечиваемой им длинноволновой красной флуоресценции (максимум при 633 нм), что позволяет наблюдать экспрессию гена в целых организмах.³⁵

Наиболее часто флуоресцентные белки применяются в качестве маркеров при создании гибридных белков. Это позволяет наблюдать за локализацией, перемещением исследуемых белков, органелл и даже клеток в живых функционирующих организмах, а также изучать межбелковые взаимодействия и выяснять их биологическую функцию. При изучении локализации отдельных белков главными требованиями для флуоресцентного белка являются его мономерность и яркость флуоресценции. Склонность к олигомеризации флуоресцентного белка может сильно влиять на локализацию исследуемого белка, особенно если данный белок сам является олигомером. Немаловажным оказывается и эффективность созревания флуоресцентного белка, так как сворачивание гибридных белков во многих случаях предотвращает образование телец включения. Таким образом, для этих целей можно использовать флуоресцентные белки TagRFP, mCherry, mKate, mKO и др. Для мечения органелл и клеток олигомерное состояние используемых флуоресцентных белков не так важно. Однако при проведении двухфотонной микроскопии использование RFPs затруднительно из-за низкой эффективности возбуждения флуоресценции излучением стандартного титан-сапфирового лазера. В этом случае для многоцветной двухфотонной микроскопии может быть применен белок Keima и его мутантные версии, имеющие максимум длины волны возбуждения при 440 нм.⁵¹ В свою очередь, разработка новых мономерных фотопереключае-

мых белков позволила проводить микроскопию с очень высоким разрешением (~10 нм).⁹⁴

При изучении динамики передвижения меченых объектов важно использовать фотостабильные флуоресцентные белки, которые позволяют осуществлять длительное наблюдение за мечеными белками. Фотостабильность и отсутствие таких фотоиндуцируемых эффектов, как фотоактивация или фотопереключение, очень важны при проведении количественного анализа с их участием. В этом случае успешно могут быть использованы белки mOrange2, TagRFP-T, mKate2. При постоянном наблюдении за флуоресцентно меченным объектом с целью изучения его динамики фотоактивируемые белки позволяют значительно упростить эксперимент.^{109, 110} Использование фотопереключаемых белков дает возможность избежать проблем с фото-выгоранием и фототоксичностью белков. Применение мономерных фотоактивируемых белков позволяет проследить динамику даже отдельных белковых молекул в клетке.^{111, 112}

2. Методы, основанные на индуктивно-резонансном переносе энергии

Метод FRET является одним из наиболее эффективных методов изучения межбелковых взаимодействий *in vivo* и *in vitro*. В его основе лежит безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения, происходящий между двумя флуорофорами, причем спектр излучения одного флуорофора (донора энергии) перекрывается со спектром поглощения другого флуорофора (акцептора энергии). Эффективность FRET зависит от взаимной ориентации донора и акцептора, а также расстояния между ними.

Флуоресценцию донора и акцептора можно регистрировать одновременно, и об эффективности переноса можно судить по отношению интенсивностей флуоресценции при двух длинах волн, соответствующих излучению донора и акцептора, либо по возрастанию интенсивности флуоресценции после фотообесцвечивания акцептора. Эффективность FRET может быть рассчитана по интенсивности сигнала донора и акцептора до и после фотообесцвечивания. Другой метод определения эффективности FRET основан на измерении времени жизни флуоресценции донора. Данный метод требует меньшего количества измерений и является более быстрым, чем метод, основанный на измерении интенсивности флуоресценции, однако требует наличия более сложного оборудования.

К наиболее эффективным FRET-парам для общей микроскопии клетки относятся пары GFP/RFPs, которые обеспечивают минимальное перекрытие спектров эмиссии флуоресценции донора и акцептора, а также высокие фотостабильность и яркость флуоресценции.¹¹³ Пары GFP/mRFP1 (см.¹¹⁴) и GFP/mCherry (см.¹¹⁵) продемонстрировали более высокую эффективность FRET по сравнению с широко используемой парой CFP/YFP (циановый/желтый FP). При конструировании¹¹⁶ FRET-пар для проведения исследований конфигурационного изменения белка или взаимодействия нескольких белков успешно были использованы такие пары белков, как mKO и MiCy,¹⁷ mKOok и mUKG,²⁴ TagRFP и TagGFP,¹¹⁷ mKate2 и mCitrine.¹¹⁸

* * *

Белковая инженерия в сочетании с высокоэффективными методами селекции клонов позволила значительно увеличить цветовое разнообразие флуоресцентных белков, а

также улучшить такие их физико-химические свойства, как созревание, яркость флуоресценции, фотостабильность и др. Первые попытки улучшения RFPs дикого типа заключались в мономеризации, так как олигомерное состояние значительно ограничивало их применение. В дальнейшем проводилась оптимизация физико-химических свойств мономерных FP. Флуоресцентные белки стали незаменимыми маркерами при проведении исследований в области биохимии, биотехнологии и клеточной биологии. Использование FP не только позволило новыми способами визуализировать динамические процессы в клетках, но и ускорило развитие новых методов микроскопии. Важным этапом в развитии технологии применения флуоресцентных белков стала разработка фотоактивируемых и фотопереключаемых флуоресцентных белков, позволяющих проводить микроскопию клеточных структур с высоким разрешением и значительно упрощающих визуализацию динамических клеточных процессов.

Литература

- O.Shimomura, F.H.Johnson, Y.Saiga. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223 (1962)
- H.Morise, O.Shimomura, F.H.Johnson, J.Winant. *Biochemistry*, **13**, 2656 (1974)
- D.C.Prasher, V.K.Eckenrode, W.W.Ward, F.G.Predergast, M.J.Cormier. *Gene*, **111**, 229 (1992)
- M.Chalfie, Y.Tu, G.Euskirchen, W.W.Ward, D.C.Prasher. *Science*, **263**, 802 (1994)
- R.N.Day, M.W.Davidson. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2887 (2009)
- A.Miyawaki. *Cell*, **135**, 987 (2008)
- M.V.Matz, A.F.Fradkov, Y.A.Labas, A.P.Savitsky, A.G.Zaraisky, M.L.Markelov, S.A.Lukyanov. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 969 (1999)
- Y.A.Labas, N.G.Gurskaya, Y.G.Yanushevich, A.F.Fradkov, K.A.Lukyanov, S.A.Lukyanov, M.V.Matz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4256 (2002)
- K.A.Lukyanov, A.F.Fradkov, N.G.Gurskaya, M.V.Matz, Y.A.Labas, A.P.Savitsky, M.L.Markelov, A.G.Zaraisky, X.Zhao, Y.Fang. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25879 (2000)
- J.Wiedenmann, C.Elke, K.D.Spindler, W.Funke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14091 (2000)
- N.G.Gurskaya, A.F.Fradkov, A.Terskikh, M.V.Matz, Y.A.Labas, V.I.Martynov, Y.G.Yanushevich, K.A.Lukyanov, S.A.Lukyanov. *FEBS Lett.*, **507**, 16 (2001)
- Y.G.Yanushevich, D.B.Staroverov, A.P.Savitsky, A.F.Fradkov, N.G.Gurskaya, M.E.Bulina, K.A.Lukyanov, S.A.Lukyanov. *FEBS Lett.*, **511**, 11 (2002)
- M.A.Shkrob, Y.G.Yanushevich, D.M.Chudakov, N.G.Gurskaya, Y.A.Labas, S.Y.Poponov, N.N.Mudrik, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Biochem. J.*, **392**, 649 (2005)
- J.Wiedenmann, A.Schenk, C.Röcker, A.Girod, K.D.Spindler, G.U.Nienhaus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11646 (2002)
- E.M.Merzlyak, J.Goedhart, D.Shcherbo, M.E.Bulina, A.S.Shcheglov, A.F.Fradkov, A.Gaintzeva, K.A.Lukyanov, S.Lukyanov, T.W.J.Gadella, D.M.Chudakov. *Nat. Methods*, **4**, 555 (2007)
- D.Shcherbo, E.M.Merzlyak, T.V.Chepurnykh, A.F.Fradkov, G.V.Ermakova, E.A.Solovieva, K.A.Lukyanov, E.A.Bogdanova, A.G.Zaraisky, S.Lukyanov, D.M.Chudakov. *Nat. Methods*, **4**, 741 (2007)
- S.Karasawa, T.Araki, T.Nagai, H.Mizuno, A.Miyawaki. *Biochem. J.*, **381**, 307 (2004)
- Ю.Г.Янушевич, Д.А.Шагин, А.Ф.Фрадков, К.С.Шехбазов, Е.В.Барсова, Н.Г.Гурская, Ю.А.Лабас, М.В.Матц, К.А.Лукьянов, С.А.Лукьянов. *Биоорг. химия*, **31**, 49 (2005)
- D.A.Shagin, E.V.Barsova, Y.G.Yanushevich, A.F.Fradkov, K.A.Lukyanov, Y.A.Labas, T.N.Semenova, J.A.Ugalde, A.Meyers, J.M.Nunez, E.A.Widder, S.A.Lukyanov, M.V.Matz. *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 841 (2004)
- M.E.Bulina, D.M.Chudakov, O.V.Britanova, Y.G.Yanushevich, D.B.Staroverov, T.V.Chepurnykh, E.M.Merzlyak, M.A.Shkrob, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 95 (2006)
- A.S.Mishin, F.V.Subach, I.V.Yampolsky, W.King, K.A.Lukyanov, V.V.Verkhusha. *Biochemistry*, **47**, 4666 (2008)
- N.C.Shaner, R.E.Campbell, P.A.Steinbach, B.N.Giepmans, A.E.Palmer, R.Y.Tsien. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1567 (2004)
- R.L.Strack, D.Bhattacharyya, B.S.Glick, R.J.Keenan. *BMC Biotechnol.*, **9**, 32 (2009)
- H.Tsutsui, S.Karasawa, Y.Okamura, A.Miyawaki. *Nat. Methods*, **5**, 683 (2008)
- N.C.Shaner, M.Z.Lin, M.R.McKeown, P.A.Steinbach, K.L.Hazelwood, M.W.Davidson, R.Y.Tsien. *Nat. Methods*, **5**, 545 (2008)
- R.E.Campbell, O.Tour, A.E.Palmer, P.A.Steinbach, G.S.Baird, D.A.Zacharias, R.Y.Tsien. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7877 (2002)
- B.J.Bevis, B.S.Glick. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 83 (2002)
- R.L.Strack, D.E.Strongin, D.Bhattacharyya, W.Tao, A.Berman, H.E.Broxmeyer, R.J.Keenan, B.S.Glick. *Nat. Methods*, **5**, 955 (2008)
- D.E.Strongin, B.Bevis, N.Khuong, M.E.Downing, R.L.Strack, K.Sundaram, B.S.Glick, R.J.Keenan. *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**, 525 (2007)
- M.Fischer, I.Haase, E.Simmeth, G.Gerisch, A.Müller-Taubenberger. *FEBS Lett.*, **577**, 227 (2004)
- M.Fischer, I.Haase, S.Wiesner, A.Müller-Taubenberger. *FEBS Lett.*, **580**, 2495 (2006)
- S.Kredel, F.Oswald, K.Nienhaus, K.Deuschle, C.Röcker, M.Wolff, R.Heilker, G.U.Nienhaus, J.Wiedenmann. *PLoS ONE*, **4**, e4391 (2009)
- T.Kogure, S.Karasawa, T.Araki, K.Saito, M.Kinjo, A.Miyawaki. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 577 (2006)
- L.Wang, W.C.Jackson, P.A.Steinbach, R.Y.Tsien. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16745 (2004)
- D.Shcherbo, C.S.Murphy, G.V.Ermakova, E.A.Solovieva, T.V.Chepurnykh, A.S.Shcheglov, V.V.Verkhusha, V.Z.Pletnev, K.L.Hazelwood, P.M.Roche, S.Lukyanov, A.G.Zaraisky, M.W.Davidson, D.M.Chudakov. *Biochem. J.*, **418**, 567 (2009)
- A.F.Fradkov, V.V.Verkhusha, D.B.Staroverov, M.E.Bulina, Y.G.Yanushevich, V.I.Martynov, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Biochem. J.*, **368**, 17 (2002)
- A.V.Terskikh, A.F.Fradkov, A.G.Zaraisky, A.V.Kajava, B.Angres. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7633 (2002)
- G.S.Baird, D.A.Zacharias, R.Y.Tsien. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11984 (2000)
- P.V.Vrzheshch, N.A.Akovbian, S.D.Varfolomeyev, V.V.Verkhusha. *FEBS Lett.*, **487**, 203 (2000)
- A.A.Heikal, S.T.Hess, G.S.Baird, R.Y.Tsien, W.W.Webb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11996 (2000)
- J.Wiedenmann, B.Vallone, F.Renzi, K.Nienhaus, S.Ivanchenko, C.Röcker, G.U.Nienhaus. *J. Biomed. Opt.*, **10**, 14003 (2005)
- T.Kogure, H.Kawano, Y.Abe, A.Miyawaki. *Methods*, **45**, 223 (2008)
- H.Mizuno, A.Sawano, P.Eli, H.Hama, A.Miyawaki. *Biochemistry*, **40**, 2502 (2001)
- A.Terskikh, A.Fradkov, G.Ermakova, A.Zaraisky, P.Tan, A.V.Kajava, X.Zhao, S.Lukyanov, M.Matz, S.Kim, I.Weissman, P.Siebert. *Science*, **290**, 1585 (2000)
- M.E.Bulina, D.M.Chudakov, N.N.Mudrik, K.A.Lukyanov. *BMC Biochem.*, **3**, 7 (2002)
- S.Kredel, K.Nienhaus, F.Oswald, M.Wolff, S.Ivanchenko, F.Cymer, A.Jeromin, F.J.Michel, K.D.Spindler, R.Heilker, G.U.Nienhaus, J.Wiedenmann. *Chem. Biol.*, **15**, 224 (2008)

47. N.C.Shaner, P.A.Steinbach, R.Y.Tsien. *Nat. Methods*, **2**, 905 (2005)
48. F.V.Subach, O.M.Subach, I.S.Gundorov, K.S.Morozova, K.D.Piatkevich, A.M.Cuervo, V.V.Verkhusha. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 118 (2009)
49. A.Sakaue-Sawano, H.Kurokawa, T.Morimura, A.Hanyu, H.Hama, H.Osawa, S.Kashiwagi, K.Fukami, T.Miyata, H.Miyoshi, T.Imamura, M.Ogawa, H.Masai, A.Miyawaki. *Cell*, **132**, 487 (2008)
50. J.Petersen, P.G.Wilmann, T.Beddoe, A.J.Oakley, R.J.Devenish, M.Prescott, J.Rossjohn. *J. Biol. Chem.*, **278**, 44626 (2003)
51. H.Kawano, T.Kogure, Y.Abe, H.Mizuno, A.Miyawaki. *Nat. Methods*, **5**, 373 (2008)
52. X.Shu, A.Royant, M.Z.Lin, T.A.Aguilera, V.Lev-Ram, P.A.Steinbach, R.Y.Tsien. *Science*, **324**, 804 (2009)
53. S.Pletnev, D.Shcherbo, D.M.Chudakov, N.Pletneva, E.M.Merzlyak, A.Wlodawer, Z.Dauter, V.Pletnev. *J. Biol. Chem.*, **283**, 28980 (2008)
54. X.Shu, L.Wang, L.Colip, K.Kallio, S.J.Remington. *Protein Sci.*, **18**, 460 (2009)
55. V.V.Verkhusha, A.Sorkin. *Chem. Biol.*, **12**, 279 (2005)
56. F.V.Subach, G.H.Patterson, S.Manley, J.M.Gillette, J.Lippincott-Schwartz, V.V.Verkhusha. *Nat. Methods*, **6**, 153 (2009)
57. R.Ando, H.Hama, M.Yamamoto-Hino, H.Mizuno, A.Miyawaki. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12651 (2002)
58. J.Wiedenmann, S.Ivanchenko, F.Oswald, F.Schmitt, C.Röcker, A.Salih, K.D.Spindler, G.U.Nienhaus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15905 (2004)
59. S.A.McKinney, C.S.Murphy, K.L.Hazelwood, M.W.Davidson, L.L.Looger. *Nat. Methods*, **6**, 131 (2009)
60. V.Adam, M.Lelimousin, S.Boehme, G.Desfonds, K.Nienhaus, M.J.Field, J.Wiedenmann, S.McSweeney, G.U.Nienhaus, D.Bourgeois. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18343 (2008)
61. H.Tsutsui, S.Karasawa, H.Shimizu, N.Nukina, A.Miyawaki. *EMBO*, **6**, 233 (2005)
62. S.Habuchi, H.Tsutsui, A.B.Kochaniak, A.Miyawaki, A.M.van Oijen. *PLoS ONE*, **3**, e3944 (2008)
63. N.G.Gurskaya, V.V.Verkhusha, A.S.Shcheglov, D.B.Staroverov, T.V.Chepurnykh, A.F.Fradkov, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 461 (2006)
64. D.M.Chudakov, A.V.Feofanov, N.N.Mudrik, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *J. Biol. Chem.*, **278**, 7215 (2003)
65. D.M.Chudakov, V.V.Belousov, A.G.Zaraisky, V.V.Novoselov, D.B.Staroverov, D.B.Zorov, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 191 (2003)
66. A.C.Stiel, M.Andresen, H.Bock, M.Hilbert, J.Schilde, A.Schönle, C.Eggeling, A.Egner, S.W.Hell, S.Jakobs. *Biophys. J.*, **95**, 2989 (2008)
67. K.Nienhaus, G.U.Nienhaus, J.Wiedenmann, H.Nar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9156 (2005)
68. M.A.Wall, M.Socolich, R.Ranganathan. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1133 (2000)
69. D.Yarbrough, R.M.Wachter, K.Kallio, M.V.Matz, S.J.Remington. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 462 (2001)
70. X.He, A.F.Bell, P.J.Tonge. *Org. Lett.*, **4**, 1523 (2002)
71. L.A.Gross, G.S.Baird, R.C.Hoffman, K.K.Baldrige, R.Y.Tsien. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11990 (2000)
72. H.Mizuno, T.K.Mal, K.I.Tong, R.Ando, T.Furuta, M.Ikura, A.Miyawaki. *Mol. Cell*, **12**, 1051 (2003)
73. F.Oswald, F.Schmitt, A.Leutenegger, S.Ivanchenko, C.D'Angelo, A.Salih, S.Maslakova, M.Bulina, R.Schirmbeck, G.U.Nienhaus, M.V.Matz, J.Wiedenmann. *FEBS J.*, **274**, 1102 (2007)
74. M.Prescott, M.Ling, T.Beddoe, A.J.Oakley, S.Dove, O.Hoegh-Guldberg, R.J.Devenish, J.Rossjohn. *Structure*, **11**, 275 (2003)
75. M.L.Quillin, D.M.Anstrom, X.Shu, S.O'Leary, K.Kallio, D.M.Chudakov, S.J.Remington. *Biochemistry*, **44**, 5774 (2005)
76. I.V.Yampolsky, S.J.Remington, V.I.Martynov, V.K.Potapov, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Biochemistry*, **44**, 5788 (2005)
77. S.J.Remington, R.M.Wachter, D.K.Yarbrough, B.Branchaud, D.C.Anderson, K.Kallio, K.A.Lukyanov. *Biochemistry*, **44**, 202 (2005)
78. X.Shu, N.C.Shaner, C.A.Yarbrough, R.Y.Tsien, S.J.Remington. *Biochemistry*, **45**, 9639 (2006)
79. A.Kikuchi, E.Fukumura, S.Karasawa, H.Mizuno, A.Miyawaki, Y.Shiro. *Biochemistry*, **47**, 11573 (2008)
80. T.I.Wood, D.P.Barondeau, C.Hitomi, C.J.Kassmann, J.A.Tainer, E.D.Getzoff. *Biochemistry*, **44**, 16211 (2005)
81. J.A.Sniegowski, J.W.Lappe, H.N.Patel, H.A.Huffman, R.M.Wachter. *J. Biol. Chem.*, **280**, 26248 (2005)
82. D.P.Barondeau, J.A.Tainer, E.D.Getzoff. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3166 (2006)
83. J.A.Ugalde, B.S.Chang, M.V.Matz. *Science*, **305**, 1433 (2004)
84. V.V.Verkhusha, D.M.Chudakov, N.G.Gurskaya, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Chem. Biol.*, **11**, 845 (2004)
85. J.Wiehler, J.von Hummel, B.Steipe. *FEBS Lett.*, **487**, 384 (2001)
86. A.A.Pakhomov, V.I.Martynov. *Biochemistry*, **46**, 11528 (2007)
87. N.Pletneva, V.Pletnev, T.Tikhonova, A.A.Pakhomov, V.Popov, V.I.Martynov, A.Wlodawer, Z.Dauter, S.Pletnev. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, **63**, 1082 (2007)
88. M.C.Chan, S.Karasawa, H.Mizuno, I.Bosanac, D.Ho, G.G.Privé, A.Miyawaki, M.Ikura. *J. Biol. Chem.*, **281**, 37813 (2006)
89. V.I.Martynov, B.I.Maksimov, N.Y.Martynova, A.A.Pakhomov, N.G.Gurskaya, S.A.Lukyanov. *J. Biol. Chem.*, **278**, 46288 (2003)
90. A.A.Pakhomov, N.V.Pletneva, T.A.Balashova, V.I.Martynov. *Biochemistry*, **45**, 7256 (2006)
91. X.Shu, P.Leiderman, R.Gepshtein, N.R.Smith, K.Kallio, D.Huppert, S.J.Remington. *Protein Sci.*, **16**, 2703 (2007)
92. K.Brejč, T.K.Sixma, P.A.Kitts, S.R.Kain, R.Y.Tsien, M.Ormö, S.J.Remington. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2306 (1997)
93. S.Violot, P.Carpentier, L.Blanchoin, D.Bourgeois. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10356 (2009)
94. T.J.Gould, V.V.Verkhusha, S.T.Hess. *Nat. Protoc.*, **4**, 291 (2009)
95. K.A.Lukyanov, D.M.Chudakov, S.Lukyanov, V.V.Verkhusha. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 885 (2005)
96. I.Hayashi, H.Mizuno, K.I.Tong, T.Furuta, F.Tanaka, M.Yoshimura, A.Miyawaki, M.Ikura. *J. Mol. Biol.*, **372**, 918 (2007)
97. M.Andresen, M.C.Wahl, A.C.Stiel, F.Gräter, L.V.Schäfer, S.Trowitzsch, G.Weber, C.Eggeling, H.Grubmüller, S.W.Hell, S.Jakobs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13070 (2005)
98. P.G.Wilmann, J.Petersen, R.J.Devenish, M.Prescott, J.Rossjohn. *J. Biol. Chem.*, **280**, 2401 (2005)
99. J.N.Henderson, S.J.Remington. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12712 (2005)
100. D.C.Loos, S.Habuchi, C.Flors, J.Hotta, J.Wiedenmann, G.U.Nienhaus, J.Hofkens. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6270 (2006)
101. K.Nienhaus, H.Nar, R.Heilker, J.Wiedenmann, G.U.Nienhaus. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12578 (2008)
102. G.J.Kremers, K.L.Hazelwood, C.S.Murphy, M.W.Davidson, D.W.Piston. *Nat. Methods*, **6**, 355 (2009)
103. J.Goedhart, J.E.M.Vermeer, M.J.W.Adjobo-Hermans, L.van Weeren, T.W.J.Gadella Jr. *PLoS ONE*, **2**, e1011 (2007)
104. R.M.Hoffman. *Methods Cell Biol.*, **85**, 485 (2008)
105. W.R.Zipfel, R.M.Williams, W.W.Webb. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1369 (2003)
106. J.M.Girkin, S.Poland, A.J.Wright. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 106 (2009)
107. T.J.Gould, M.S.Gunewardene, M.V.Gudheti, V.V.Verkhusha, S.R.Yin, J.A.Gosse, S.T.Hess. *Nat. Methods*, **5**, 1027 (2008)
108. D.M.Chudakov, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Trends Biotechnol.*, **23**, 605 (2005)
109. D.M.Chudakov, K.A.Lukyanov. *Biochemistry*, **68**, 952 (2003)

110. D.Kedrin, B.Gligorijevic, J.Wyckoff, V.V.Verkhusha, J.Condeelis, J.E.Segall, J.van Rheenen. *Nat. Methods*, **5**, 1019 (2008)
111. D.M.Chudakov, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Biotechniques*, **42**, 553 (2007)
112. D.M.Chudakov, S.Lukyanov, K.A.Lukyanov. *Nat. Protoc.*, **2**, 2024 (2007)
113. K.I.Anderson, J.Sanderson, S.Gerwig, J.Peychl. *Cytometry*, **69**, 920 (2006)
114. M.Peter, S.M.Ameer-Beg, M.K.Hughes, M.D.Keppler, S.Prag, M.Marsh, B.Vojnovic, T.Ng. *Biophys. J.*, **88**, 1224 (2005)
115. M.Tramier, M.Zahid, J.C.Mével, M.J.Masse, M.Coppey-Moisán. *Microsc. Res. Tech.*, **69**, 933 (2006)
116. D.W.Piston, G.J.Kremers. *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 407 (2007)
117. D.Shcherbo, E.A.Souslova, J.Goedhart, T.V.Chepurnykh, A.Gaintzeva, I.I.Shemyakina, T.W.Gadella, S.Lukyanov, D.M.Chudakov. *BMC Biotechnol.*, **9**, 24 (2009)
118. H.Mutoh, A.Perron, D.Dimitrov, Y.Iwamoto, W.Akemann, D.M.Chudakov, T.Knöpfel. *PLoS ONE*, **4**, e4555 (2009)

RED FLUORESCENT PROTEINS AND THEIR PROPERTIES

K.D.Piatkevich, E.N.Efremenko, V.V.Verkhusha, S.D.Varfolomeev

Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)939–0998

Albert Einstein College of Medicine

1300, Morris Park Avenue, 10461 Bronx, NY, USA, Fax +1(718)430–8996

The main groups of currently known red fluorescent proteins are characterized: their structure, folding and mechanisms of chromophore formation are discussed. The key applications of these proteins as markers and sensors in the cell and molecular biology are demonstrated.

Bibliography — 118 references.

Received 24th July 2009