

РОЛЬ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ В СТАБИЛИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

© Олеся В. Степаненко,¹ В. В. Верхуша,^{2,3} М. М. Шавловский,⁴ Т. Д. Алейникова,⁴
В. Н. Уверский,^{5,6} И. М. Кузнецова,¹ К. К. Туроверов¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия,

² Международный биотехнологический центр Московского государственного университета, Россия,

³ Медицинский научный центр Университета Колорадо, Денвер, США,

⁴ Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия,

⁵ Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино, Россия и

⁶ Университет штата Индианополис, Индиана, США;

¹ электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Для использования флуоресцентных белков (FPs) в качестве маркеров при изучении экспрессии генов, локализации и динамики белков в клетке большое значение имеет их стабильность. В работе выполнено сравнительное изучение стабильности флуоресцентных белков, имеющих различную четвертичную структуру: EGFP (мономер зеленого флуоресцентного белка, GFP), zFP506 (тетрамер GFP), mRFP1 и «dimer2» (соответственно мономер и димер красного флуоресцентного белка), DsRed1 (красный тетрамер). Характер зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации гуанидингидрохлорида (GdnHCl) для этих белков существенно различается. Показано, что тетрамер зеленого белка zFP506 обладает большей стабильностью по сравнению с мономером зеленого белка EGFP, димер красного белка «dimer 2» обладает меньшей стабильностью по сравнению с тетрамером DsRed1, однако стабильность мономера красного белка mRFP1 примерно такая же, как стабильность тетрамера DsRed1. Сделан вывод о том, что четвертичная структура не является единственным фактором, определяющим стабильность флуоресцентных белков.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, олигомеризация, стабильность белков, фолдинг белков.

Принятые сокращения: GdnHCl — гуанидингидрохлорид, КД — круговой дихроизм, FPs — флуоресцентные белки, GFP — зеленый флуоресцентный белок, CPs — хромопротеины, KFPs — «разжигаемые» белки.

Термин «флуоресцентные белки» или «GFP-подобные белки» используется для обозначения обширного класса белков, характерной особенностью которых является наличие у них уникального хромофора, образующегося в результате трехстадийной аутокаталитической циклизации трех аминокислотных остатков в положении 65—67 (Reid, Flynn, 1997), поглощающего и в большинстве случаев способного флуоресцировать в видимой области спектра. В зеленом флуоресцентном белке дикого типа из медузы *Aequorea Victoria* хромофор образован аминокислотами Ser 65, Trp 66 и Gly 67. Такая аминокислотная последовательность встречается и в других белках, но в них хромофор не образуется, что говорит о решающей роли пространственной структуры белка в образовании «зеленого хромофора» (Tsien, 1998). Все белки этого класса представляют собой цилиндр, образованный 11 β-листами (β-cap), в центре которого проходит α-спираль, содержащая хромофор. Для всех флуоресцентных белков дикого типа, выделенных из разных источников, консервативными являются только Trp 66 и Gly 67. При замене Trp 66 на Trp, Phe и His, выполненной методами генной инженерии, способность к образо-

ванию хромофора сохраняется, происходит лишь изменение его спектральных свойств. Считается, что замена Gly 67 на какую-либо другую аминокислоту невозможна, поскольку наличие в этом положении аминокислотного остатка с более массивным боковым радикалом должно препятствовать образованию хромофора (Tsien, 1998). Образование способного к флуоресценции хромофора требует некоторого времени после завершения формирования нативной структуры белка, которое принято называть временем его созревания.

Большой интерес к флуоресцентным белкам вызван их интенсивным использованием в клеточной биологии в качестве биологических маркеров для изучения динамики генной экспрессии и транспорта белков в живых клетках и тканях (Tsien, 1998; Zimmer, 2002). Сразу же после открытия первого флуоресцентного белка GFP начались генно-инженерные работы, направленные на улучшение свойств, существенных для более эффективного использования этих белков в молекулярной и клеточной биологии. К настоящему времени получено большое число мутантных форм FPs, обладающих более высоким квантовым выходом и более коротким временем

созревания, не склонных к олигомеризации и существенно различающихся по положению максимума спектра флуоресценции. Однако так и не удалось получить мутантную форму GFP, имеющую спектр флуоресценции с более длинноволновым максимумом, чем 529 нм, как у желтого флуоресцентного белка (Tsien, 1998).

Параллельно с генно-инженерными работами шел поиск новых флуоресцентных белков в других организмах. Были обнаружены белки, близкие к GFP из *A. victoria* по своим характеристикам, например GFP из *Renilla reniformis*, и белки с совершенно иными характеристиками. В частности, из *Heteractis crispa* и *Condylactis gigantea* (Gurskaya et al., 2001) были выделены GFP-подобные белки hcr1CP и scg1CP соответственно, имеющие в своем составе специфический хромофор, поглощающий в видимой области, но не флуоресцирующий (chromophore protein, CP). Из *Anemonia sulcata* (Lukyanov et al., 2000) был выделен белок asulCP, который флуоресцирует при облучении зеленым светом и флуоресценция которого тушится при облучении голубым светом. Флуоресцентные белки этого типа были названы «разжигаемыми» (kindling fluorescent proteins, KFPs).

Белки типов CP и KFP являются в настоящее время предметом интенсивных исследований. Показано, что ряд точечных мутаций в белках CP переводит их в ряд KFP, а возгорание флуоресценции белков типа KFP может происходить не только при облучении светом в определенной спектральной области, но также под воздействием изменения pH или при переводе белка в растворы с достаточно высоким содержанием денатуранта. Эти воздействия, по-видимому, недостаточны для разрушения структуры белка, но приводят к уменьшению его жесткости. Сенсацией стало выделение красного белка drFP583 из кораллов *Discosoma sp.* (в названии d — *Discosoma*, r—red, 583 — максимум флуоресценции, нм), в последствии получившего название DsRed (Matz et al., 1999). Поскольку в этой области спектра в значительно меньшей степени мешает собственная флуоресценция клеток, появление DsRed сулило существенное расширение возможностей использования флуоресцентных белков в биотехнологии и клеточной биологии.

Факторами, ограничивающими использование флуоресцентных белков в качестве маркеров в клеточной биологии, являются присущая этим белкам тенденция к олигомеризации, а также значительная продолжительность созревания некоторых из них. GFP дикого типа из *A. victoria* склонен к димеризации, GFP дикого типа из *R. reniformis* является димером, а красный флуоресцентный белок дикого типа DsRed из *Discosoma sp.* — тетрамером и имеет длительное время созревания (Baird et al., 2000). Недавним важнейшим достижением стало создание мономерного красного белка mRFP1 (Campbell et al., 2002), время созревания которого в 10 раз меньше, чем у тетрамера.

Известно, что мономер EGFP гораздо менее стабилен, чем тетрамер DsRed. В связи с этим возник вопрос о том, является ли олигомеризация необходимым условием стабильности FPs. С целью выяснения роли четвертичной структуры в стабилизации FPs в настоящей работе проведен сравнительный анализ нескольких FPs с различной степенью олигомеризации, а именно EGFP (зеленого мономера), zFP506 (зеленого тетрамера), mRFP1 (красного мономера), «dimer2» (красного димера) и DsRed1 (красного тетрамера).

Материал и методика

Конструирование плазмид. Плазмиды, кодирующие EGFP, zFP506, mRFP1, «dimer2» и DsRed1 FPs с концевыми полигистидиновыми метками, были сконструированы согласно описанной ранее методике (Verkhusha et al., 2001). Плазмиды использовали для трансфекции клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, США).

Получение и анализ рекомбинантных белков. Экспрессию флуоресцентных белков в *E. coli* индуцировали 1 mM IPTG (nacalai tesque, Япония). Нарращивание клеточной массы проводили в течение 24 ч при 37 °C. Белки очищали с помощью Ni-агарозы (Qiagen, США). Чистота образцов по данным SDS-электрофореза составляла не менее 95 %. Молекулярную массу выделенных белков контролировали с помощью SDS-электрофореза, используя набор стандартных белков (Bio-Rad, США) в качестве маркеров. Уровень pH 8.0 в растворах поддерживали 50 mM Трис-HCl-буфером.

Флуоресцентные измерения выполняли с использованием спектрофлуориметрической установки со стационарным возбуждением (Туроверов и др., 1998). Спектры поглощения измеряли с помощью спектрофотометра F-2500 (Hitachi, Япония). Флуоресценцию хромофоров зеленых и красных флуоресцентных белков возбуждали при длине волны 365 нм и регистрировали при 510 (EGFP и zFP506), 580 (DsRed1 и «dimer2») или 612 (mRFP1) нм. Триптофановую флуоресценцию возбуждали при длине волны 297 нм и регистрировали при длине волны, соответствующей максимуму интенсивности в спектре флуоресценции: 326 («dimer»), 320 (DsRed1), 337 (EGFP), 334 (mRFP1) или 330 (zFP506) нм. Измерения были выполнены при 23 °C.

Анализ кривых затухания флуоресценции. Измерение кривых затухания флуоресценции проводили на импульсной спектрофлуориметрической установке (Туроверов и др., 1998). Анализ кинетических зависимостей флуоресценции проводили в мультиэкспоненциальном приближении:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i), \quad (1)$$

где α_i и τ_i — соответственно амплитуда и время жизни i -той компоненты ($\sum \alpha_i = 1$). Константы определяли методом наименьших квадратов, используя алгоритм, предложенный Маркуардтом (Marquardt, 1963).

Тушение флуоресценции. Для того чтобы получить информацию о доступности для растворителя триптофановых остатков и хромофора FPs, проводили эксперименты по тушению триптофановой флуоресценции и флуоресценции хромофора акриламидом. Растворы готовили в 50 mM Трис-HCl, pH 8.0. Концентрацию белков в исследуемых растворах выбирали таким образом, чтобы оптическая плотность при длине волны возбуждения не превышала 0.1. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 365 нм и регистрировали при 510 (EGFP и zFP506), 580 (DsRed1 и «dimer2») или 612 (mRFP1) нм. Триптофановую флуоресценцию возбуждали при длине волны 297 нм и регистрировали при длинах волн 326 («dimer2»), 320 (DsRed1), 337 (EGFP), 334 (mRFP1) или 330 (zFP506) нм. Каждый эксперимент был выполнен трижды. При обработке данных делали поправку на вклад в регистрируемое свечение растворителя. Оценку констант тушения проводили с использованием соотношения Штерн-Фольмера

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q], \quad (2)$$

где I_0 и I — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно, K_{SV} — константа тушения, $[Q]$ — концентрация тушителя. Бимолекулярная константа процесса столкновения флуоресцирующих молекул в возбужденном состоянии и молекул тушителя (k_q) была рассчитана с использованием соотношения (Lakowicz et al., 1983)

$$k_q = K_{SV}/\tau, \quad (3)$$

τ — среднее квадратичное время жизни флуоресценции в отсутствие тушителя.

Круговой дихроизм. Для регистрации спектров КД использовали спектрополяриметры AVIV 60DS (Lakewood, США) и J-810 (Jasco, Япония). Концентрации белка составляли 0.25 и 0.50 мг/мл при измерении спектров КД в дальней и ближней УФ-областях спектра соответственно. Для регистрации спектров КД в дальней УФ-области спектра использовали микрокюветы с длиной оптического пути 0.1 мм, измерения проводили в диапазоне длин волн от 250 до 190 нм с шагом 0.5 нм. Для регистрации спектров КД в видимой и ближней УФ-областях спектра использовали микрокюветы с длиной оптического пути 1.0 см, измерения проводили в диапазоне длин волн от 650 до 250 нм с шагом 1.0 нм. Каждый спектр КД регистрировали 5 раз и полученные данные усредняли. Спектры КД белков построены с учетом КД соответствующего буферного раствора.

Измерение равновесных кривых денатурации. Растворы белков инкубировали в присутствии различных концентраций гуанидингидрохлорида (GdnHCl) при 4 °C в течение периода времени, продолжительность которого была существенно разной для разных белков и зависела от концентрации денатуранта. В качестве денатуранта использовали GdnHCl (Nacalai tesque, Япония). Концентрацию GdnHCl в растворах определяли по показателю преломления (Pase, 1986) с помощью рефрактометра Аббе (ЛОМО, Россия). Все флуоресцентные измерения были выполнены в микрокюветках 101.016-QS 5 × 5 мм (Helma, Германия).

Результаты

Спектральные свойства мономерных и олигомерных флуоресцентных белков. Отличительной особенностью GFP-подобных белков является способность формировать хромофор *n*-гидроксibenзиден-имидазолидон (Cody et al., 1993) внутри белковой глобулы. Хромофор образуется в процессе реакции автокаталитической циклизации между остатками Ser-Tyr-Gly в положении 65—67 (нумерация аминокислот согласно GFP *Aequorea*). В других белках с подобной аминокислотной последовательностью хромофор не образуется. Это свидетельствует о том, что способность к формированию хромофора не определяется особыми свойствами данной пептидной последовательности и что в образовании хромофора решающую роль играет пространственная структура белка. Известно, что основные спектральные характеристики флуоресцентных белков, такие как положение и форма спектров поглощения и флуоресценции, зависят от особенностей микроокружения хромофора (Heim et al., 1994; Cubitt et al., 1995; Heim

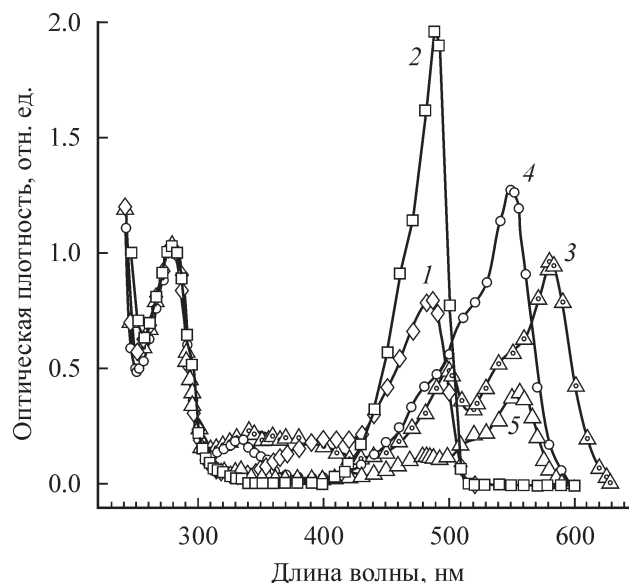


Рис. 1. Спектры поглощения флуоресцентных белков EGFP (1), zFP506 (2), mRFP1 (3), «dimer2» (4) и DsRed1 (5).

et al., 1995). Так как пять исследуемых нами белков различаются по своей аминокислотной последовательности, неудивительно, что спектральные свойства данных белков также различаются.

Спектры поглощения EGFP (зеленого мономера), zFP 506 (зеленого тетрамера), mRFP1 (красного мономера), «dimer2» (красного димера) и DsRed1 (красного тетрамера) представлены на рис. 1. Красные флуоресцентные белки имеют спектр поглощения с максимумами при длинах волн 548, 555 и 580 нм для «dimer2», DsRed1 и mRFP1 соответственно. Спектры поглощения красных FPs имеют довольно сложный вид. Все они содержат коротковолновую полосу поглощения с максимумом вблизи 334 нм; спектры DsRed1 и «dimer2» имеют два плеча при длинах волн 480—490 и 520 нм, в то время как спектр mRFP1 в дополнение к длинноволновому плечу при 550 нм содержит еще две полосы поглощения с максимумами около 500 и 380 нм (рис. 1). Спектры поглощения зеленых флуоресцентных белков имеют значительно более простую форму. Спектры EGFP и zFP506 имеют максимум поглощения при длинах волн 486 и 487 нм соответственно; в спектрах обоих белков присутствует плечо вблизи 460 нм, спектр EGFP имеет дополнительное плечо при 400 нм (рис. 1).

Вторичная и третичная структуры флуоресцентных белков. Спектры КД всех исследованных в этой работе белков в дальней УФ-области спектра практически полностью совпадают (данные не представлены). Поэтому можно считать, что вторичная структура всех пяти белков весьма сходна. Спектры КД в видимой и ближней УФ-областях спектра для зеленых флуоресцентных белков существенно различаются (рис. 2). Для всех флуоресцентных белков в видимой области спектра наблюдается небольшой отрицательный эффект Коттона, что хорошо согласуется с данными, полученными ранее (Visser et al., 2002).

Спектры флуоресценции и доступность хромофора молекулам растворителя. На рис. 3, а представлены спектры флуоресценции EGFP, zFP506, mRFP1, «dimer2» и DsRed1, которые были при-

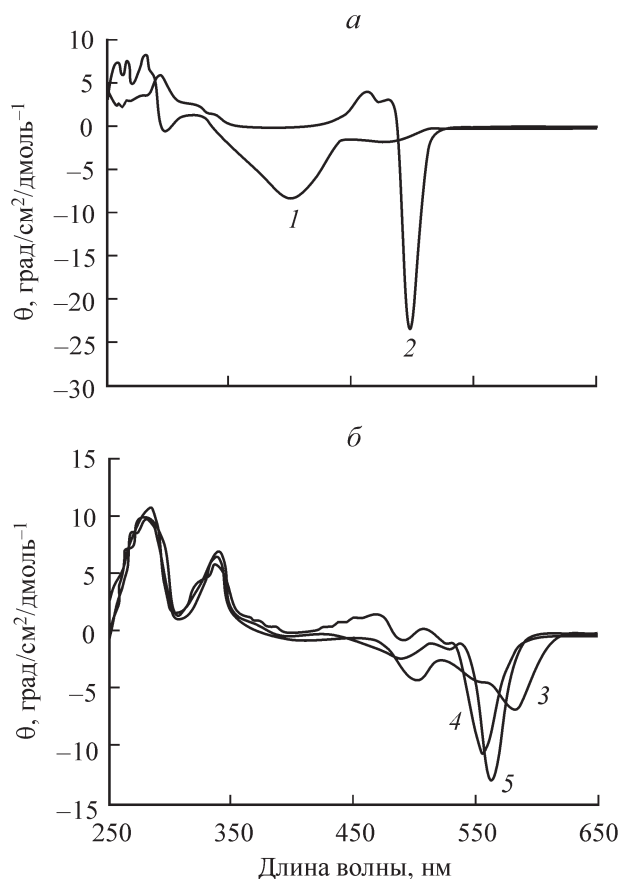


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма в видимой и ближней УФ-областях спектра зеленых (а) и красных (б) флуоресцентных белков.

а — EGFP (1) и zFP506 (2); б — mRFP1 (3), «dimer2» (4) и DsRed1 (5).

ведены к единице в максимуме флуоресценции. Специфическая флуоресценция хромофора данных белков имеет максимум на длинах волн 506, 510, 584, 586 и 612 нм для zFP506, EGFP, «dimer2», DsRed1 и mRFP1 соответственно. Коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции zFP506 по сравнению со спектром EGFP, вероятнее всего, обусловлен меньшей доступностью хромофора zFP506 для молекул растворителя, что в свою очередь может быть следствием тетрамеризации zFP506. Олигомеризация красных флуоресцентных белков («dimer2» и DsRed1) также может вызывать увеличение изолированности хромофора от молекул растворителя. Обоснованность данного предположения была проверена методом тушения специфической флуоресценции хромофора акриламидом. Штерн-Фольмеровские зависимости (рис. 3, б) и рассчитанные константы тушения флуоресценции (табл. 1) свидетельствуют о низкой доступности хромофора для растворителя во всех исследованных белках. Тем не менее олигомеризация приводит к небольшому дополнительному уменьшению значений K_{SV} и k_q , что говорит о снижении доступности хромофора для молекул акриламида.

Особенности триптофановой флуоресценции. Дополнительная информация о доступности внутренних областей белков для растворителя может быть получена из анализа триптофановой флуоресценции. Положение спектров триптофановой флуоресценции FPs значительно различается (рис. 4, а). Действительно,

Таблица 1

Доступность хромофора и триптофановых остатков флуоресцентных белков для растворителя

Белок	Доступность хромофора		Доступность триптофановых остатков	
	K_{SV}, M^{-1}	$k_q \times 10^{-7}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	K_{SV}, M^{-1}	$k_q \times 10^{-8}, M^{-1} \cdot c^{-1}$
EGFP	0.071 ± 0.003	2.55 ± 0.12	2.70 ± 0.04	9.72 ± 0.13
zFP506	0.043 ± 0.001	1.17 ± 0.03	0.83 ± 0.01	2.29 ± 0.04
mRFP1	0	0	2.09 ± 0.02	11.93 ± 0.10
«dimer2»	0.021 ± 0.001	0.53 ± 0.03	0.97 ± 0.01	2.43 ± 0.18
DsRed1	0.002 ± 0.001	0.05 ± 0.04	0.257 ± 0.005	0.71 ± 0.01

спектр триптофановой флуоресценции zFP506 сдвинут в коротковолновую область по сравнению со спектром EGFP, в то время как красные флуоресцентные белки образуют следующую последовательность по положению

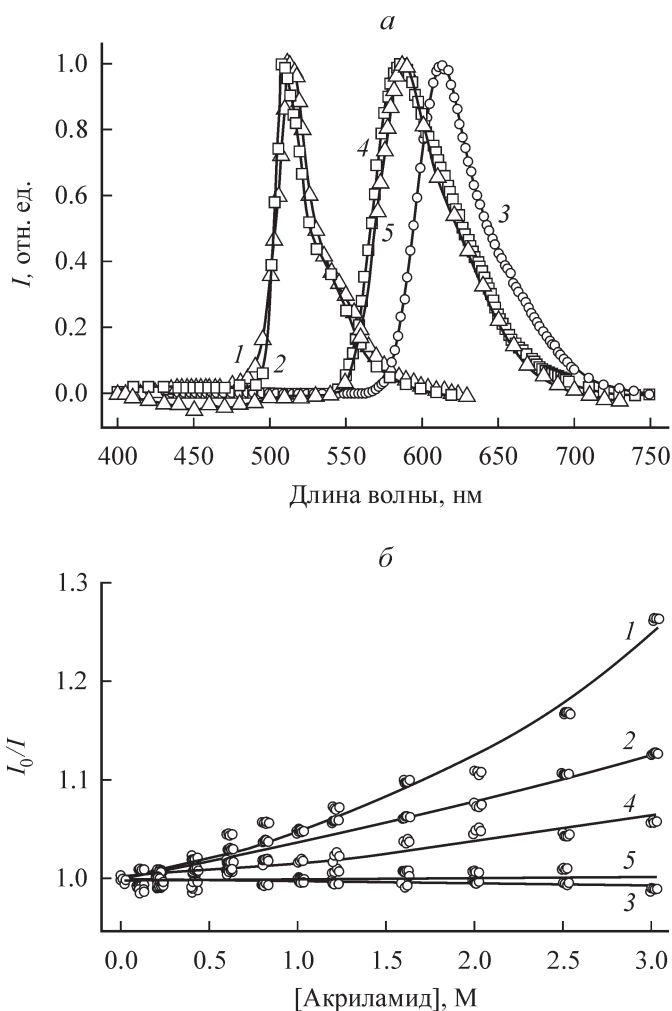


Рис. 3. Спектры флуоресценции (а) и доступность для растворителя хромофоров (б) FPs.

а — спектры флуоресценции, нормированные к единице в максимуме; б — Штерн-Фольмеровские зависимости тушения флуоресценции хромофора EGFP (1) и zFP506 (2); mRFP1 (3), «dimer2» (4) и DsRed1 (5) акриламидом. I и I_0 — интенсивности флуоресценции в присутствии тушителя и при его отсутствии соответственно. Длина волны возбуждения — 365 нм, длины волн регистрации — 510 (EGFP и zFP506), 584 («dimer2» и DsRed1) и 612 (mRFP1) нм.

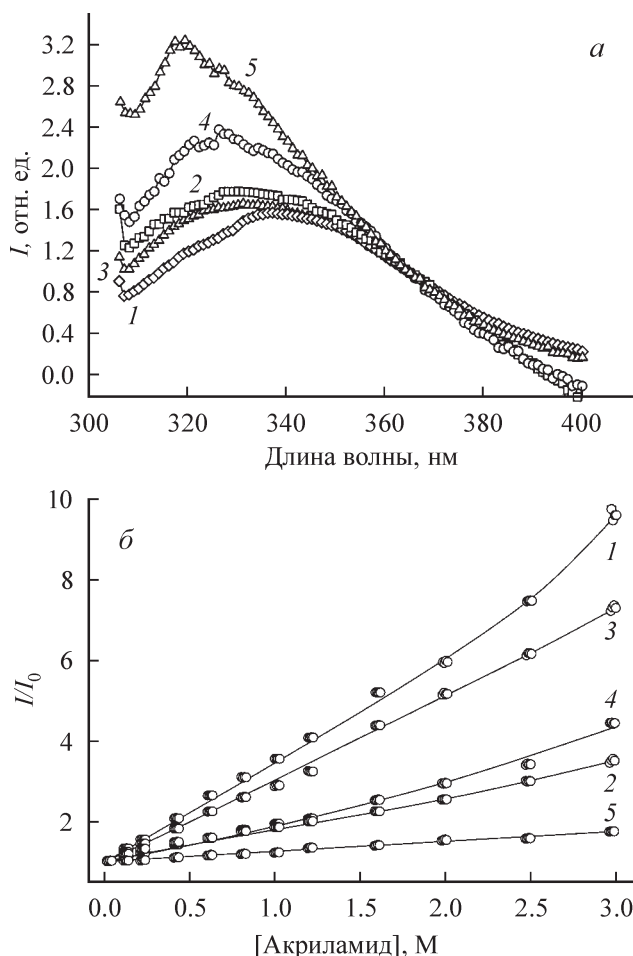


Рис. 4. Спектры флуоресценции (а) и доступность для растворителя триптофановых остатков (б) FPs.

а — спектры триптофановой флуоресценции, нормированные к единице при длине волны 365 нм; б — Штерн-Фольмеровские зависимости тушения триптофановой флуоресценции EGFP (1), zFP506 (2), mRFP1 (3), «dimer2» (4) и DsRed1 (5) акриламидом. I и I_0 — интенсивности флуоресценции в присутствии тушителя и при его отсутствии соответственно. Длина волны возбуждения — 297 нм, длины волн регистрации — 326 («dimer2»), 320 (DsRed1), 337 (EGFP), 334 (mRFP1) или 330 (zFP506) нм.

максимума триптофановой флуоресценции (от больших длин волн к меньшим): mRFP1 > «dimer2» > DsRes1. Другими словами, мономерные зеленый и красный флуоресцентные белки характеризуются более длинноволновым положением спектра триптофановой флуоресценции (по сравнению с олигомерными формами), что говорит о возможном уменьшении доступности триптофановых остатков для растворителя в результате олигомеризации белка. Это предположение было подтверждено экспериментами по тушению триптофановой флуоресценции акриламидом (рис. 4, б). Небольшие значения Штерн-Фольмеровской константы тушения и бимолекулярной константы скорости (табл. 1) свидетельствуют о низкой доступности триптофановых остатков, ответственных за флуоресценцию, молекулам тушителя во всех исследованных белках. Тем не менее сопоставление значений величин K_{SV} и k_q для zFP506, «dimer2» и DsRed1 позволяет заключить, что олигомеризация приводит к дополнительной экранировке триптофановых остатков от растворителя и уменьшению их доступности для молекул акриламида.

Кинетика денатурации под действием гуанидингидрохлорида. Регистрация кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции хромофора при денатурации белков GdnHCl высокой концентрации показала высокую устойчивость FPs к действию денатуранта (рис. 5, б). В то же время по устойчивости к денатурирующему действию GdnHCl исследованные FPs существенно различаются. Процесс разворачивания EGFP в присутствии GdnHCl высокой концентрации (4.0, 5.6 и 6.2 М) осуществляется за несколько минут (рис. 5, а). С другой стороны, инкубация zFP506 в присутствии 4.0 М GdnHCl не приводит к существенному уменьшению интенсивности флуоресценции за это время (рис. 5, б). При более высоких концентрациях денатуранта уменьшение интенсивности флуоресценции хромофора zFP506 происходит очень медленно. Интенсивность флуоресценции примерно через 90 ч после перевода белка в растворы 5.6 и 6.2 М GdnHCl составляет 46 и 26 % от начального значения соответственно.

Несколько неожиданные результаты были получены для серии красных FPs. Было показано, что mRFP1 обладает высокой устойчивостью к действию GdnHCl. Денатурация данного белка GdnHCl даже при высокой концентрации денатуранта занимает несколько часов

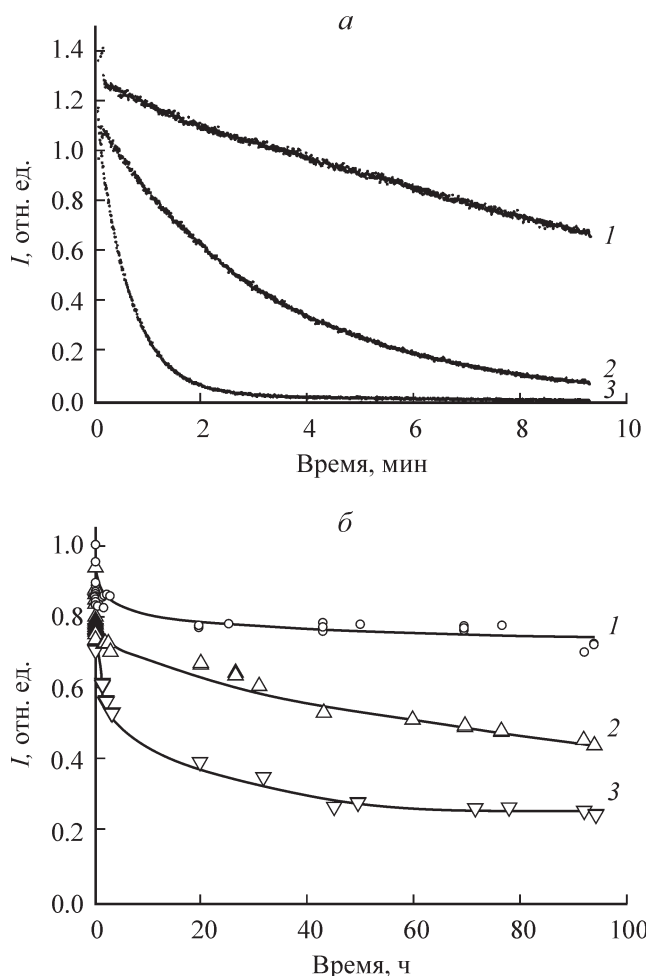


Рис. 5. Кинетика денатурации EGFP (а) и zFP506 (б) под действием GdnHCl

Конечная концентрация денатуранта в растворе (М): 4.0 (1), 5.6 (2), 6.5 (а, 3) или 6.2 (б, 3). Длина волны возбуждения 365 нм, длина волны регистрации 510 нм.

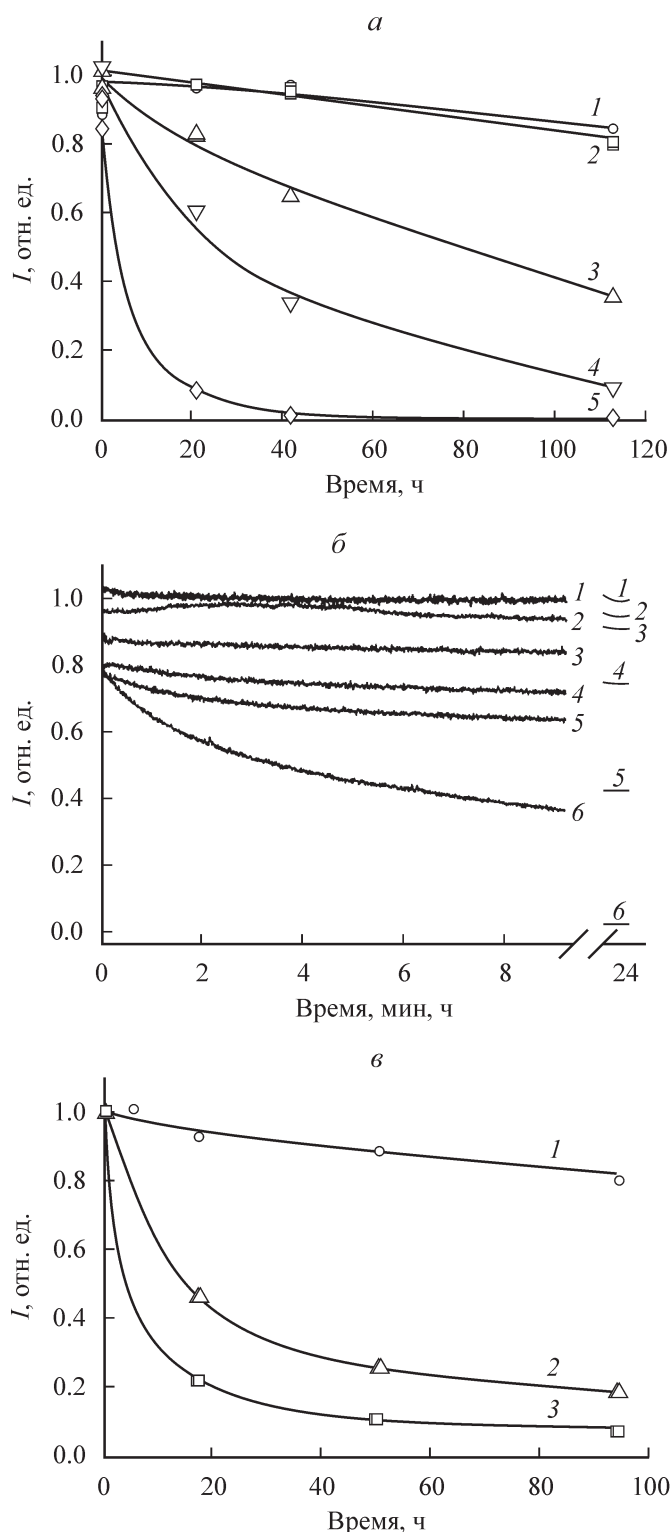


Рис. 6. Кинетика денатурации красных флуоресцентных белков mRFP1 (а), «dimer2» (б) и DsRed1 (в) под действием GdnHCl.

Конечные концентрации денатуранта в растворе (М): для mRFP1 (а) — 2.0 (1), 4.0 (2), 5.2 (3), 5.6 (4) или 6.5 (5); для «dimer2» (б) — 0 (1), 0.1 (2), 2.0 (3), 4.0 (4), 5.2 (5) или 6.5 (6); для DsRed1 (в) — 4.0 (1), 5.6 (2) или 6.5 (3). Длина волны возбуждения — 365 нм, длины волны регистрации — 612 (mRFP1), 584 («dimer2») или 580 (DsRed1) нм.

(рис. 6, а). В то же время «dimer2» обладает существенно более низкой стабильностью — интенсивность флуоресценции «dimer2» значительно уменьшается уже через не-

Таблица 2

Кинетика процесса денатурации флуоресцентных белков GdnHCl

[GdnHCl], М	$t_{1/2}$, ч				
	EGFP	zFP506	mRFP1	«dimer2»	DsRed1
4.0	0.30	—	112.0 (16 %)	116.00 (38 %)	142 (18 %)
4.2	—	93.0 (17 %)	—	—	—
5.2	—	—	—	10.00	—
5.6	0.05	67.0	25.0	—	15
6.2	—	4.5	—	—	—
6.5	0.01	—	3.5	0.06	4

Примечание. Для белков zFP506, mRFP1, «dimer2» и DsRed1 процесс денатурации в растворах GdnHCl с концентрацией 4.0—4.2 М происходит очень медленно. Поэтому вместо значения $t_{1/2}$, отвечающего 50%-ному уменьшению интенсивности флуоресценции, приведены время завершения эксперимента и в скобках — соответствующее уменьшение интенсивности флуоресценции, %.

сколько минут после перевода белка в раствор 6.5 М GdnHCl (рис. 6, б). С другой стороны, DsRed1 действительно является более устойчивым к действию GdnHCl по сравнению с mRFP1 (рис. 6, в). Таким образом, из трех исследуемых красных FPs «dimer2» является наименее стабильным. Кинетические зависимости изменения интенсивности флуоресценции FPs подчиняются моноэкспоненциальному закону с $t_{1/2}$ (время инкубации белка в присутствии соответствующей концентрации денатуранта, при котором интенсивность флуоресценции составляет 50 % от начального значения), уменьшающимся с увеличением концентрации GdnHCl. Кинетические параметры процессов денатурации FPs, полученные при обработке временных зависимостей интенсивности флуоресценции, представлены в табл. 2. Анализ полученных данных показал, что степень устойчивости FPs к действию GdnHCl изменяется в следующем порядке: zFP506 > DsRed1 > mRFP1 > «dimer2» > EGFP.

Квазистационарные зависимости. Сравнительное изучение устойчивости белков к денатурирующему действию GdnHCl, выполненное путем регистрации изменений собственной зеленой (рис. 7) или красной (рис. 8) флуоресценции, свидетельствует о том, что достижение равновесия при денатурации всех исследуемых здесь FPs является чрезвычайно медленным процессом.

Квазистационарные зависимости интенсивности флуоресценции белков от концентрации денатуранта были измерены многократно через различные промежутки времени после перевода белков в раствор GdnHCl заданной концентрации. Полученные данные были использованы для построения зависимости величины $C_{1/2}$ (концентрация денатуранта, при которой интенсивность флуоресценции составляет 50 % от начального значения) от времени, которая отображает кинетику достижения равновесия процесса денатурации. Исходя из этих зависимостей были рассчитаны константы скорости денатурации, значения которых составляют $(17.73 \pm 0.22) \cdot 10^{-6}$ и $(4.17 \pm 0.22) \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ для EGFP и zFP506, соответственно (рис. 7, в) и $(4.57 \pm 0.26) \cdot 10^{-6}$, $(3.89 \pm 0.19) \cdot 10^{-6}$ и $(9.59 \pm 0.76) \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ для mRFP1, «di-

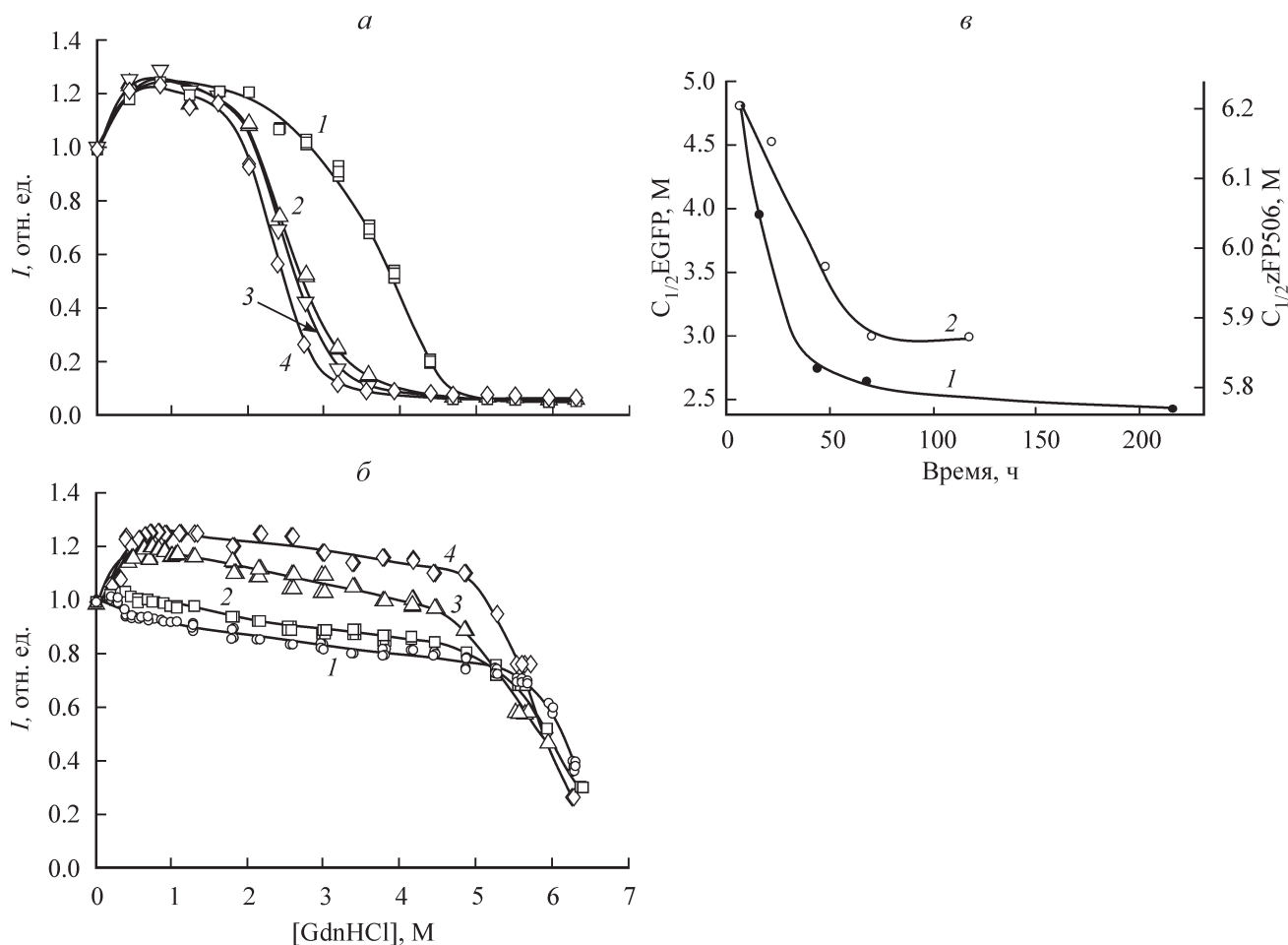


Рис. 7. Квазиравновесные кривые денатурации белков EGFP (а) и zFP506 (б) под действием GdnHCl.

Измерения для EGFP (а) проводили через 15 (1), 43 (2), 67 (3) и 216 (4) ч инкубации белка в присутствии определенной концентрации денатуранта; для zFP506 (б) — через 1 (1), 2 (2), 3 (3) и 5 (4) сут; в — кинетика достижения равновесия разворачивания как зависимость $C_{1/2}$ от времени инкубации для EGFP (1) и zFP506 (2).

mer2» и DsRed1 соответственно (рис. 8, з). Таким образом, время достижения равновесия для всех исследованных белков составляет несколько суток. Другим интересным наблюдением является то, что EGFP достигает равновесия быстрее, чем zFP506. Это свидетельствует о том, что данный процесс в значительной мере зависит от степени ассоциации белка. Процесс достижения равновесия для красных флуоресцентных белков, по-видимому, в меньшей степени определяется третичной структурой белка.

Стационарные кривые денатурации. Стационарные зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации денатуранта (рис. 9, а) дают дополнительное подтверждение существенного различия конформационной стабильности FPs. Так как достижение равновесия для всех флуоресцентных белков является очень медленным процессом, стационарные зависимости были измерены через 5—6 сут после перевода белка в раствор с соответствующей концентрацией GdnHCl. Характер зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации GdnHCl для FPs существенно различается. Для EGFP и zFP506 в области малых концентраций GdnHCl (от 0 до 0.4 М) наблюдается возрастание интенсивности флуоресценции приблизительно на 20 %. Для EGFP интенсивность флуоресценции сохраняется неизменной в области концентраций GdnHCl от 0.4 до 2.0 М, затем происходит резкое уменьшение интенсивности флуоресценции.

Для zFP506 монотонное уменьшение интенсивности флуоресценции вплоть до 5.6 М GdnHCl сменяется резким уменьшением при более высоких концентрациях GdnHCl. С другой стороны, действие денатуранта при малых концентрациях на красные FPs значительно отличается от аналогичного действия на зеленые FPs. В области концентраций GdnHCl от 0 до 0.4 М интенсивность флуоресценции DsRed1 увеличивается примерно на 10 %, интенсивность флуоресценции «dimer2» падает приблизительно на 10 %, а интенсивность флуоресценции mRFP1 остается неизменной в диапазоне концентраций GdnHCl от 0 до 4.8 М. При концентрации GdnHCl более 0.5 М стационарные зависимости интенсивности флуоресценции имеют обычный сигмоидальный характер (рис. 9, а).

Данные, представленные на рис. 9, а, могут быть использованы для расчета термодинамических характеристик стабильности FPs в предположении, что процессы разворачивания изучаемых здесь белков осуществляются по двухстадийному механизму. Разность свободной энергии FPs в нативном и развернутом состояниях может быть определена из соотношения

$$\Delta G^{\circ}([\text{den}]) = -RT \ln K, \quad (4)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, K — константа равновесия, которая

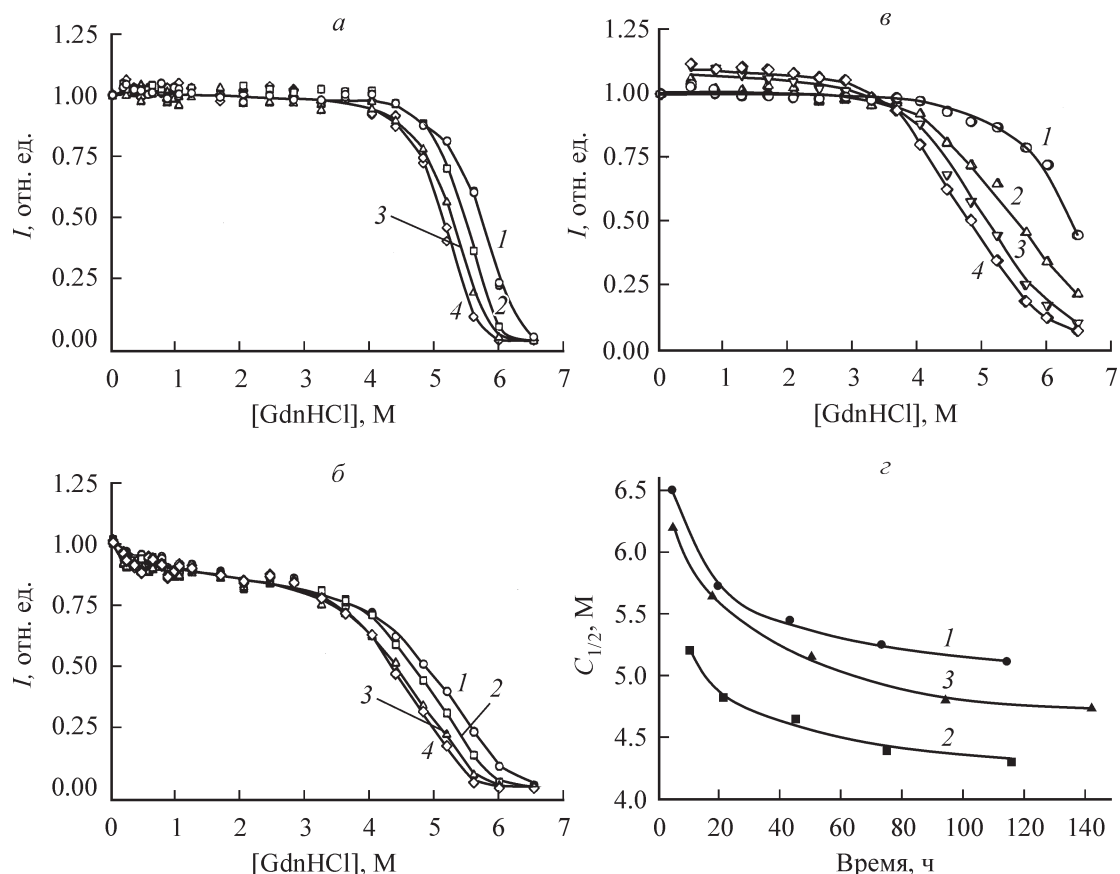


Рис. 8. Квазиравновесные кривые денатурации mRFP1 (а), «dimer2» (б) и DsRed1 (в) под действием GdnHCl.

Измерения для mRFP1 (а) и «dimer2» (б) проводили через 1 (1), 2 (2), 3 (3) и 5 (4) сут инкубации белка в присутствии определенной концентрации денатуранта; для DsRed1 (в) — через 5 (1), 24 (2), 56 (3) и 100 (4) ч инкубации белка в присутствии желаемой концентрации денатуранта. г — кинетика достижения равновесия разворачивания как зависимость $C_{1/2}$ от времени инкубации для mRFP1 (1), «dimer2» (2) и DsRed1 (3).

может быть рассчитана из экспериментальных данных с помощью соотношения (Tanford, 1968)

$$K = [(y)_N - (y)] / [(y) - (y)_D]. \quad (5)$$

Здесь (y) — наблюдаемое значение экстенсивной характеристики (например, интенсивности флуоресценции, или эллиптичности), используемой для изучения процессов денатурации, $(y)_N$ и $(y)_D$ — значения этой же характеристики для нативного и полностью развернутого состо-

яний соответственно при таких же условиях, при которых было измерено (y) .

Результаты такого анализа для mRFP1, «dimer2», DsRed1, EGFP и zFP506 свидетельствуют о том, что зависимость $\Delta G^\circ([den])$ от концентрации GdnHCl является линейной (рис. 9, б). На основании этих результатов, используя соотношение (Pace, 1986)

$$\Delta G^\circ([den]) = \Delta G^\circ([0]) - m[den], \quad (6)$$

провели оценку конформационной стабильности FPs в отсутствие денатуранта — $\Delta G^\circ([0])$. В приведенном выше соотношении $m = \partial(\Delta G^\circ([den]))/\partial[den]$ — тангенс угла наклона линейной зависимости $\Delta G^\circ([den])$ от концентрации денатуранта.

Результаты данного анализа для пяти FPs вместе с величинами $C_{1/2}$ представлены в табл. 3. Согласно этим данным, zFP506 является гораздо более стабильным, чем EGFP, в то время как у исследованных красных FPs величина конформационной стабильности изменяется согласно ряду «dimer2» < DsRed1 < mRFP1.

Обсуждение

Недавно было установлено, что DsRed1 обладает гораздо большей конформационной стабильностью, чем EGFP, как *in vitro*, так и *in vivo* (Verkhusha et al., 2003).

Т а б л и ц а 3

Термодинамические параметры процесса денатурации флуоресцентных белков GdnHCl

Белок	$\Delta G^\circ([0])$, ккал · моль ⁻¹	m , ккал · моль ⁻¹ · М ⁻¹	$C_{1/2}$, М
EGFP	5.2 ± 0.5	2.2 ± 0.2	2.3
zFP506	10.6 ± 0.8	1.8 ± 0.2	5.9
mRFP1	8.1 ± 0.7	1.6 ± 0.2	5.0
«dimer2»	4.6 ± 0.4	1.1 ± 0.1	4.1
DsRed1	5.1 ± 0.5	1.1 ± 0.1	4.5

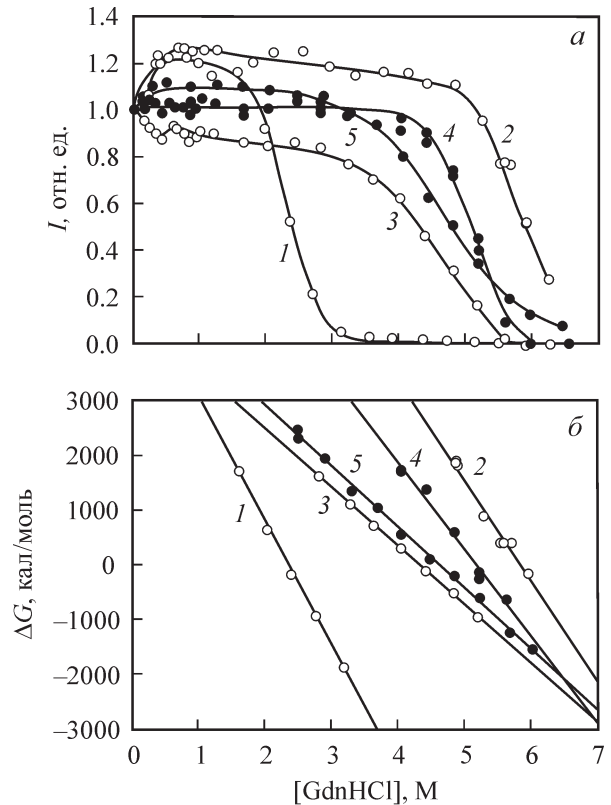
Примечание. Приведены значения $\Delta G^\circ([0])$ и m на 1 моль белка, М — концентрация GdnHCl.

Рис. 9. Стационарные кривые денатурации белков EGFP (1), zFP506 (2), «dimer2» (3), mRFP1 (4) и DsRed1 (5).

a — зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации денатуранта, измеренные через 9 сут инкубации в присутствии GdnHCl; *b* — зависимости изменения свободной энергии ΔG от концентрации GdnHCl.

Действительно, было показано, что денатурация DsRed1 осуществляется гораздо медленнее, чем денатурация EGFP, при воздействии таких агентов, как повышенная температура и GdnHCl. При этом достижение равновесия при денатурации обоих белков GdnHCl является чрезвычайно медленным процессом, занимающим 3 и 6 сут для EGFP и DsRed1 соответственно. *In vivo* была изучена устойчивость EGFP и DsRed1 к протеосомной деградации в клетках *Drosophila* S2, клетках почки человека HEK293 и в эмбрионах *Xeopus*. Было показано, что время жизни флуоресценции DsRed1 в культуральных клетках и эмбрионах в несколько раз больше времени жизни флуоресценции EGFP.

Известно, что третичная структура DsRed и EGFP одинакова и представляет собой β -бочонок. Сделано предположение о том, что основным фактором, определяющим различную стабильность этих белков, является то, что EGFP — мономер, в то время как DsRed — тетрамер. Определение пространственной структуры DsRed показало, что каждый мономер в тетрамере взаимодействует с двумя другими мономерами, площади областей взаимодействия составляют 10.4 и 13.6 nm^2 (Tersikh et al., 2000; Yanushevich et al., 2002). Природа взаимодействий в этих двух областях различна. Первая группа взаи-



модействий обусловлена преимущественно электростатическими контактами и водородными связями. В систему водородных связей включены также 14 молекул

	*	10	20	30	40	50																																																								
EGFP	M	V	S	K	G	E	E	L	F	T	G	V	V	P	I	L	V	E	L	D	G	D	V	N	G	H	K	F	S	V	S	G	E	G	E	G	D	A	T	Y	G	K	L	T	L	K	F	I	C	T	T	G	K	L	P	V	P	-	-	W	P	T
DsRed	M	V	R	S	S	K	N	V	I	K	E	F	M	R	F	K	V	R	M	E	G	T	V	N	G	H	E	F	E	I	E	G	E	G	E	G	R	P	Y	E	G	H	N	T	V	K	L	K	V	T	-	-	K	G	G	L	P	F	A	W	D	I
dimer2	M	V	A	S	S	E	D	V	I	K	E	F	M	R	F	K	V	R	M	E	G	S	V	N	G	H	E	F	E	I	E	G	E	G	E	G	R	P	Y	E	G	T	Q	A	K	L	K	V	T	-	-	K	G	G	L	P	F	A	W	D	I	
mRFP1	M	-	A	S	S	E	D	V	I	K	E	F	M	R	F	K	V	R	M	E	G	S	V	N	G	H	E	F	E	I	E	G	E	G	E	G	R	P	Y	E	G	T	Q	A	K	L	K	V	T	-	-	K	G	G	L	P	F	A	W	D	I	
zFP506	M	-	A	Q	S	K	H	G	L	T	K	E	M	T	K	Y	R	M	E	G	C	V	D	G	H	K	F	F	I	T	G	E	G	I	G	Y	P	F	K	G	K	Q	A	I	N	L	C	V	V	-	-	E	G	G	L	P	F	A	E	D	I	
	60	70	80	90	100	110																																																								
EGFP	L	V	T	T	L	T	Y	G	V	Q	C	F	S	R	Y	P	D	H	M	K	Q	H	D	F	F	K	S	A	M	P	E	G	Y	V	Q	E	R	I	F	F	K	D	D	G	N	Y	K	T	R	A	E	V	K	F	E	G	D	-	-	T		
DsRed	L	S	P	Q	F	Y	G	S	K	A	Y	V	K	H	P	A	D	I	P	-	-	D	Y	K	K	L	S	F	P	E	G	F	K	W	E	R	V	M	N	F	E	D	G	G	V	V	T	V	T	Q	D	S	S	L	Q	D	G	-	-	C		
dimer2	L	S	P	Q	F	Y	G	S	K	A	Y	V	K	H	P	A	D	I	P	-	-	D	Y	K	K	L	S	F	P	E	G	F	K	W	E	R	V	M	N	F	E	D	G	G	V	V	T	V	T	Q	D	S	S	L	Q	D	G	-	-	T		
mRFP1	L	S	P	Q	F	Y	G	S	K	A	Y	V	K	H	P	A	D	I	P	-	-	D	Y	L	K	L	S	F	P	E	G	F	K	W	E	R	V	M	N	F	E	D	G	G	V	V	T	V	T	Q	D	S	S	L	Q	D	G	E	-	-	T	
zFP506	L	S	A	A	F	N	Y	G	N	R	V	F	T	E	Y	P	Q	I	V	-	-	D	Y	F	K	N	S	C	P	A	G	Y	T	W	D	R	S	F	L	F	E	D	G	A	V	C	I	C	N	A	D	I	T	V	S	V	E	E	N	C		
	120	130	140	150	160	170																																																								
EGFP	L	V	N	R	I	E	L	K	G	I	D	F	K	E	D	G	N	I	L	G	H	K	L	E	Y	N	S	H	N	V	Y	T	M	A	D	K	Q	K	N	G	I	K	V	N	F	K	I	R	H	N	I	E	D	G	S	V	Q	L				
DsRed	F	I	Y	K	V	K	F	I	G	V	N	F	P	S	D	G	P	V	M	Q	-	K	K	T	M	G	W	E	A	S	T	E	R	L	Y	P	-	-	R	D	G	V	L	K	G	E	I	H	K	A	L	K	L	K	D	G	G	H	Y	L		
dimer2	L	I	Y	K	V	K	F	R	G	T	N	F	P	S	D	G	P	V	M	Q	-	K	K	T	M	G	W	E	A	S	T	E	R	L	Y	P	-	-	R	D	G	V	L	K	G	E	I	H	Q	A	L	K	L	K	D	G	G	H	Y	L		
mRFP1	F	I	Y	K	V	K	L	R	G	T	N	F	P	S	D	G	P	V	M	Q	-	K	K	T	M	G	W	E	A	S	T	E	R	M	Y	P	-	-	E	D	G	A	L	K	G	E	I	K	M	R	L	K	L	K	D	G	G	H	Y	D		
zFP506	M	Y	H	E	S	K	F	Y	G	V	N	F	P	A	D	G	P	V	M	K	-	K	M	T	D	N	W	E	P	S	C	E	K	I	I	P	V	P	K	Q	G	I	L	K	G	D	V	S	M	Y	L	L	K	D	G	G	R	L	R			
	180	190	200	210	220	230																																																								
EGFP	A	D	H	Y	Q	N	T	P	I	G	D	G	-	P	V	L	L	P	D	N	H	Y	L	S	T	Q	S	A	L	S	K	D	P	N	E	K	R	D	H	M	V	L	L	E	F	V	T	A	A	G	I	T	L	G	M	D	E	L	Y	K		
DsRed	V	E	F	K	S	I	Y	M	A	K	-	-	-	P	V	Q	L	P	G	Y	Y	V	D	S	K	L	D	I	T	S	H	N	E	D	Y	T	-	1	V	E	Q	Y	E	R	T	E	G	R	H	H	L	F	L									
dimer2	V	E	F	K	T	T	Y	M	A	K	-	-	-	P	V	Q	L	P	G	Y	Y	V	D	T	K	L	D	I	T	S	H	N	E	D	Y	T	-	1	V	E	Q	Y	E	R	S	E	G	R	H	H	L	F	L									
mRFP1	A	E	V	K	T	T	Y	M	A	K	-	-	-	P	V	Q	L	P	G	A	Y	K	T	D	I	K	L	D	I	T	S	H	N	E	D	Y	T	-	1	V	E	Q	Y	E	R	A	E	G	R	H	S	T	G	A								
zFP506	C	O	F	D	T	V	Y	K	A	K	S	V	-	-	P	R	K	M	P	D	W	H	F	I	Q	H	K	L	T	R	E	D	R	S	D	A	K	N	Q	K	W	H	L	T	E	H	A	I	A	S	G	S	A	L	P							

Рис. 10. Аминокислотные последовательности флуоресцентных белков EGFP из *Aequorea victoria*, DsRed из *Discosoma* sp., димерной и мономерной мутантных форм DsRed, «dimer2» и mRFP1 и zFP506 из *Zoanthus* sp.

Аминокислоты, боковые цепи которых образуют внутреннюю область β -бочонка, даны на светло-сером фоне. Аминокислотные остатки 65—67, участвующие в формировании хромофора, даны на темно-сером фоне. Области, ответственные за образование β -слоев, *подчеркнуты*. Нумерация остатков соответствует EGFP.

Таблица 4

Степень гомологии аминокислотной последовательности между флуоресцентными белками, %

Белок/белок	EGFP	DsRed1	«dimer2»	mRFP1	zFP506
EGFP	100.0	24.2	25.6	25.3	23.9
DsRed1	24.2	100.0	92.4	86.9	43.6
«dimer2»	25.6	92.4	100.0	91.0	43.2
mRFP1	25.3	86.9	91.0	100.0	43.1
zFP506	23.9	43.6	43.2	43.1	100.0

воды. Вторую группу составляют гидрофобные связи между боковыми цепями, образующими кластер, из которого исключены молекулы растворителя. На периферии этой области гидрофобных контактов присутствуют водородные связи и солевые мостики. Подобная организация связей является типичной для многих высокоаффинных межбелковых взаимодействий. Интересной особенностью тетрамера DsRed является способность С-конца мономера из одного димера взаимодействовать с С-концом мономера другого димера, переплетаясь и образуя подобие «застежки» таким образом, что при этом некоторые объемные боковые цепи одного мономера (His 222 и Phe 224) располагаются в «карманах» другого мономера. Таким образом, подобная специфическая упаковка мономеров в тетрамер может служить объяснением чрезвычайно высокой конформационной стабильности DsRed (Verkhusha et al., 2003). Было показано, что GFP-подобные белки из других организмов класса Anthozoa, обладающие димерной организацией, также имеют повышенную устойчивость к воздействию денатурирующих агентов. GFP из *Renilla reniformis* теряет способность флуоресцировать под действием детергентов гораздо более медленно, чем GFP из *Aequorea* (Mizuno et al., 2001), GFP из *Renilla muelleri* плавится при большей температуре по сравнению с EGFP (Chalfie et al., 1994).

В настоящей работе был проведен систематический анализ серии зеленых и красных флуоресцентных белков с целью выяснения роли четвертичной структуры в стабилизации этих белков. В целом экспериментальные данные свидетельствуют о том, что стабильность флуоресцентных белков различается значительно. В группе зеленых FPs ассоциация действительно может рассматриваться в качестве важнейшего стабилизирующего фактора, так как было показано, что zFP506 обладает гораздо большей стабильностью по сравнению с EGFP. Об этом свидетельствуют большее значение величины $C_{1/2}$, в 2 раза большее значение величины $\Delta G^\circ([0])$ и гораздо большее значение времени, необходимого для достижения равновесия процесса денатурации для zFP506, по сравнению с EGFP (рис. 7, 9; табл. 3). Безусловно, прямое сравнение EGFP и zFP506 не является полностью обоснованным, в силу того что аминокислотные последовательности этих белков гомологичны всего лишь на 23.9% (рис. 10; табл. 4). Более того, отсутствие разрешенной пространственной структуры zFP506 делает невозможным выявление любых особенностей укладки полипептидной цепи в тетрамере. Вследствие этого анализ влияния других факторов помимо олигомеризационного статуса затруднен, и исследование останется незавершенным до тех пор, пока не будет выполнен анализ бо-

льшого числа белков с различными флуоресцентными свойствами, эволюционным происхождением и олигомеризационным статусом. В этом случае можно будет сделать вывод о том, какое влияние оказывает четвертичная структура на конформационную стабильность данного FP. Тем не менее, поскольку было показано, что zFP506 является наиболее стабильным из пяти изучаемых белков, и в силу отмеченной в публикациях высокой гомологии вторичной структуры различных FPs мы полагаем, что тетрамерная организация может существенно увеличивать стабильность данного белка.

С другой стороны, данные, полученные для красных FPs, не подтверждают этот вывод. Действительно, эти белки, имея относительно сходные аминокислотные последовательности (рис. 10; табл. 4), обладают примерно одинаковой конформационной стабильностью, при этом mRFP1 является наиболее стабильным из трех красных FPs при равновесных условиях, а DsRed имеет наиболее медленную кинетику достижения равновесия. Полученные данные в совокупности с данными о высокой скорости созревания mRFP1, которая более чем в 10 раз превышает скорость созревания DsRed1, позволяют считать mRFP1 ценным маркером для мечения отдельных молекул и органелл в живых клетках.

Кроме того, нами было показано существенное различие конформационной стабильности и параметров процесса денатурации для пар зеленого и красного мономера (EGFP и mRFP1) и зеленого и красного тетрамеров (zFP506 и DsRed1). Было показано, что EGFP обладает гораздо меньшей стабильностью по сравнению с mRFP1, в то время как zFP506 является наиболее стабильным из всех пяти исследованных нами белков (табл. 3; рис. 9). На основании полученных данных был сделан вывод о том, что четвертичная структура является важным, но не единственным фактором, определяющим стабильность флуоресцентного белка. Это говорит о том, что стабильность белка может быть значительно увеличена в результате введения соответствующим образом подобранных аминокислотных замен, при этом нет необходимости сохранять присущую многим FPs тетрамерную организацию. Последнее безусловно представляет интерес для создания новых флуоресцентных биомаркеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49290), INTAS (грант 2001-2347) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофеев А. В., Кузнецова И. М. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—817.
- Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 11 984—11 989.
- Campbell R. E., Tour O., Palmer A. E., Steinbach P. A., Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 7877—7882.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 263 : 802—805.
- Cody C. W., Prasher D. C., Westler W. M., Prendergast F. G., Ward W. W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromo-

phore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*. 32 : 1212—1218.

Cubitt A. B., Heim R., Adams S. R., Boyd A. E., Gross L. A., Tsien R. Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20 : 448—455.

Gurskaya N. G., Savitsky A. P., Yanushevich Y. G., Lukyanov S. A., Lukyanov K. A. 2001. Color transitions in coral's fluorescent proteins by site-directed mutagenesis. *BMC Biochem.* 2 : 6.

Heim R., Cubitt A. B., Tsien R. Y. 1995. Improved green fluorescence. *Nature*. 373 : 663—664.

Heim R., Prasher D. C., Tsien R. Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 91 : 12 501—12 504.

Lakowicz J. R. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. New York: Kluwer Acad. / Plenum Publ.

Lukyanov K. A., Fradkov A. F., Gurskaya N. G., Matz M. V., Labas Y. A., Savitsky A. P., Markelov M. L., Zaraisky A. G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S. A. 2000. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *J. Biol. Chem.* 275 : 25 879—25 882.

Marquardt D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of non linear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11 : 431—441.

Matz M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L., Lukyanov S. A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat. Biotechnol.* 17 : 969—973.

Mizuno H., Sawano A., Eli P., Hama H., Miyawaki A. 2001. Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*. 40 : 2502—2510.

Pace C. N. 1986. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in Enzymol.* 131 : 266—280.

Reid B. G., Flynn G. C. 1997. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*. 36 : 6786—6791.

Tanford C. 1968. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 23 : 121—282.

Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zaraisky A., Tan P., Kajava A. V., Zhao X., Lukyanov S., Matz M., Kim S., Weissman I., Siebert P. 2000. «Fluorescent timer»: protein that changes color with time. *Science*. 290 : 1585—1588.

Tsien R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67 : 509—544.

Verkhusha V. V., Kuznetsova I. M., Stepanenko O. V., Zaraisky A. G., Shavlovsky M. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 2003. High stability of *Discosoma* DsRed as compared to *Aequorea* EGFP. *Biochemistry*. 42 : 7879—7884.

Verkhusha V. V., Otsuna H., Awasaki T., Oda H., Tsukita S., Ito K. 2001. An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J. Biol. Chem.* 276 : 29 621—29 624.

Visser N. V., Hink M. A., Borst J. W., van der Krogt G. N., Visser A. J. 2002. Circular dichroism spectroscopy of fluorescent proteins. *FEBS Lett.* 521 : 31—35.

Yanushevich Y. G., Staroverov D. B., Savitsky A. P., Fradkov A. F., Gurskaya N. G., Bulina M. E., Lukyanov K. A., Lukyanov S. A. 2002. A strategy for the generation of non-aggregating mutants of *Anthozoa* fluorescent proteins. *FEBS Lett.* 511 : 11—14.

Zimmer M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 102 : 759—781.

Поступила 26 V 2005

THE ROLE OF QUARTEARNARY STRUCTURE IN FLUORESCENT PROTEIN STABILITY

Olesia V. Stepanenko,¹ V. V. Verkhusha,^{2, 3} M. M. Shavlovsky,⁴ T. D. Aleinikova,⁴
V. N. Uversky,^{5, 6} I. M. Kuznetsova,¹ K. K. Turoverov¹

¹ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia,

² Center for Molecular Medicine, Moscow State University, Russia,

³ University of Colorado Health Science Center, Denver, Colorado, USA,

⁴ Institute for Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg, Russia,

⁵ Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino, Russia,

and ⁶ University of Indianapolis, Indiana, USA;

¹ e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

The stability of fluorescent proteins (FPs) is of great importance for their use as reporters in studies of gene expression, protein dynamics and localization in cell. A comparative analysis of conformational stability of fluorescent proteins, having different association state was done. The list of studied proteins includes EGFP (monomer of green fluorescent protein, GFP), zFP506 (tetramer GFP), mRFP1 and «dimer2» (monomer and dimer of red fluorescent protein), DsRed1 (red tetramer). The character of fluorescence intensity changes induced by guanidine hydrochloride (GdnHCl) of these proteins differs significantly. Green tetramer zFP506 has been shown to be more stable than green monomer EGFP, red dimer «dimer2» has been shown to be less stable than red tetramer DsRed1, while red monomer mRFP1 has been shown to be practically as stable as tetramer DsRed1. It is concluded that the quaternary structure, being an important stabilizing factor, does not represent the only circumstance dictating the dramatic variations between fluorescent proteins in their conformational stability.

Key words: fluorescent proteins, oligomerization, protein stability, protein folding.