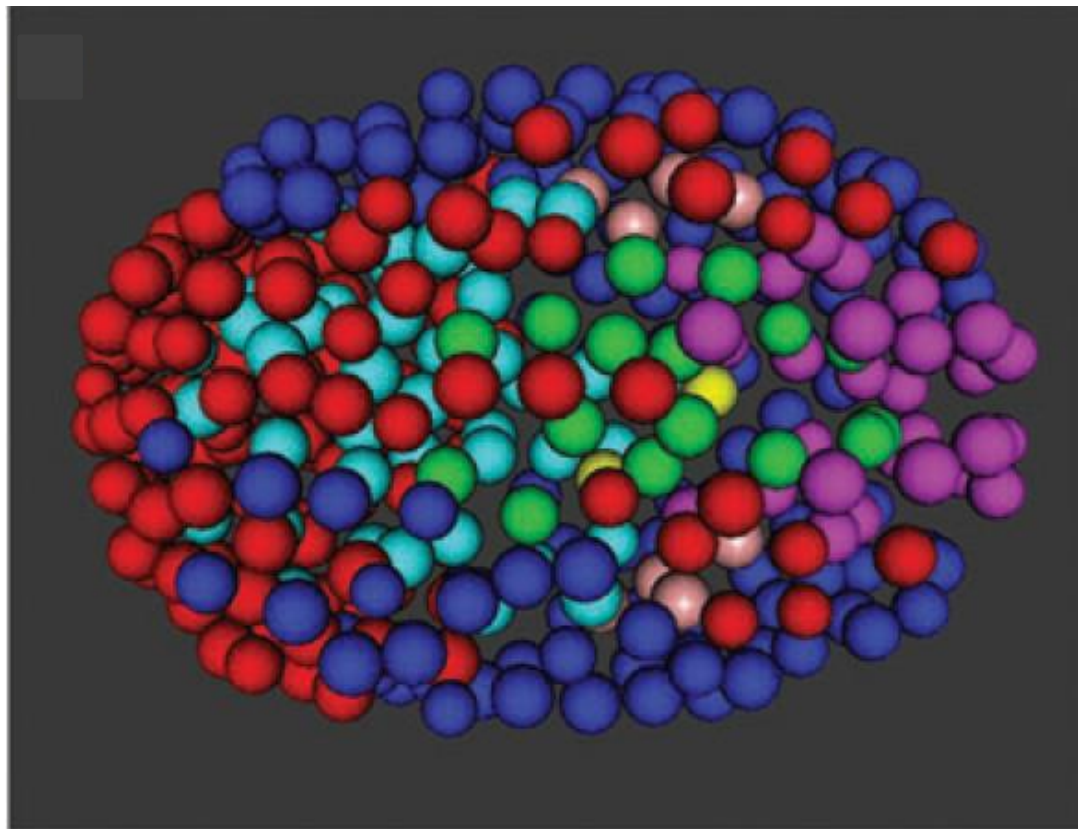


Основы генной инженерии и биотехнологии



Лекция 9

Рекомбинантные флуоресцирующие белки

Феномен биолюминесценции

Биолюминесценция – образование видимого света в результате химической реакции, протекающей в живом организме. Биолюминесценция чрезвычайно распространена: половина всех животных, 97% глубоководных обитателей.



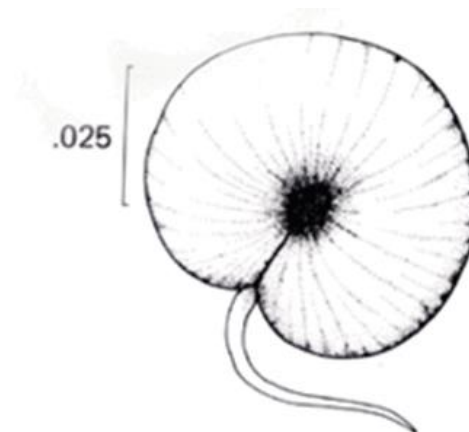
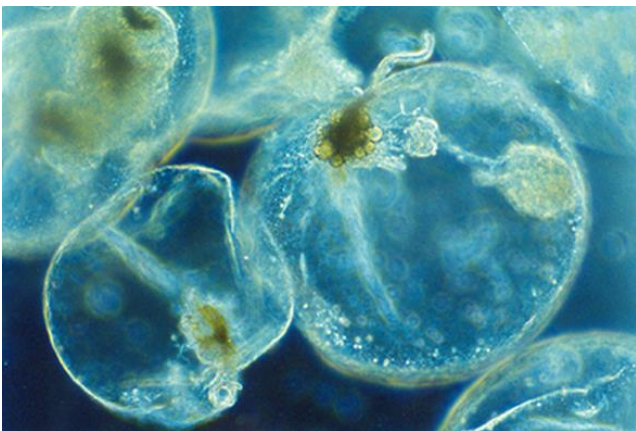
Функции:

Защита (отпугивание, привлечение хищников к хищникам)

Маскировка (скрытие темного силуэта)

Размножение (привлечение особей противоположного пола)

Свечение моря, обусловленное биOLUMИнесценцией динофлагеллят



Источником света
являются простейшие,
жгутиконосцы

Ночесветки
Noctiluca scintillans

Люциферины и люциферазы

Субстраты – люциферины

Ферменты (оксигеназы) – люциферазы

люциферин + O_2 (или H_2O_2) $\rightarrow$ оксилуциферин*

оксилуциферин* $\rightarrow$ оксилуциферин + $h\nu$

Процесс свечения: непрерывный или дискретный (<10 сек) - истощение субстрата. Запуск реакции: изменение значений pH в органелле, доступность O_2 ; или Ca^{2+}

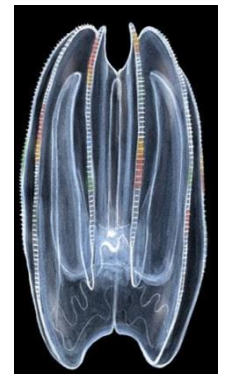
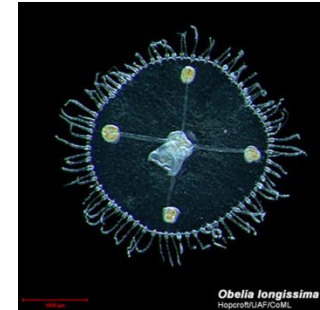
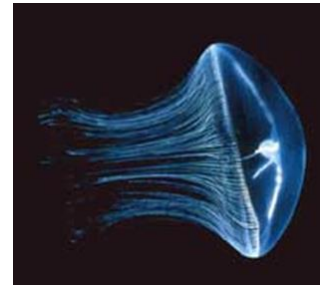
Примеры биолюминесцентных систем различных организмов

Организм (таксон)	Люциферин и другие кофакторы	λ_{max} nm
Бактерии (<i>фотобактерии; Vibrio</i>)	FMNH ₂ ; RCHO	495-500
Жгутиконосцы (<i>Gonyaulax; Pyrocystis</i>)	тетрапиррол; H ⁺	475
Стрекающие (<i>Aequorea; Obelia</i>)	колентеразин; Ca²⁺	460-490
Аннелиды (<i>Diplocardia</i>)	N-изовалерил-3-аминопропанал; H ₂ O ₂	500
Моллюски (<i>Latia</i>)	енолформат; терпен аром. альдегида	500
Насекомые (<i>Photinus; Photuris</i>)	(бензо)тиазол; АТФ; Mg ²⁺	465
Ракообразные (<i>Vargula; Cypridina</i>)	ядро имидазопиразина	560

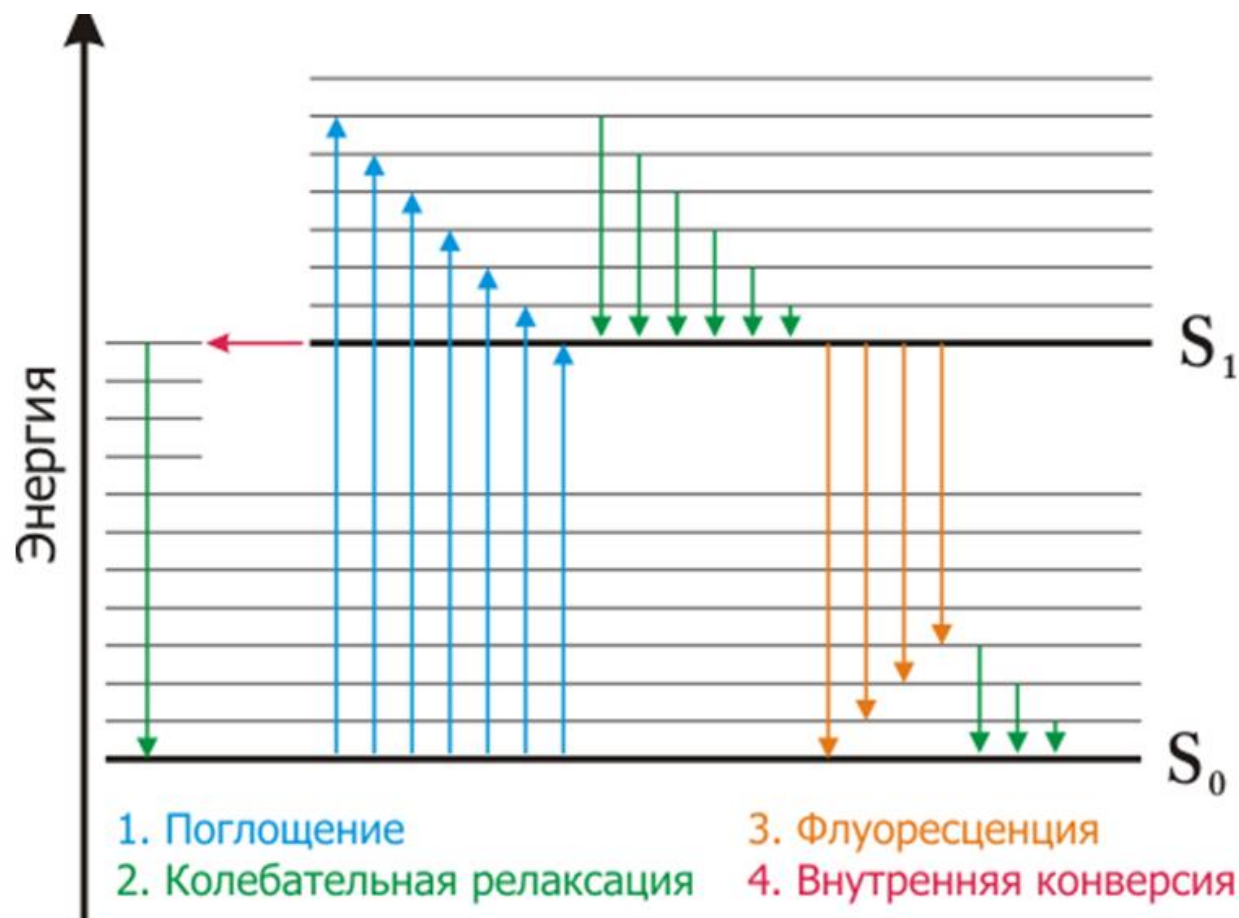
Некоторые охарактеризованные фотопротеины

- ❖ Талассиколлин (thalassicolin) - из радиолярий
- ❖ Экворин (aequorin) (из медуз)
- ❖ Митрокомин (mitrocomin), он же халистаурин (halistaurin) – из медузы
- ❖ Клитин (clytin), он же фиалидин (phialidin)
- ❖ Обелин (obelin) - из гидроидного полипа
- ❖ Мнемиопсин (mnemiopsin) – из морского ореха

Фотопротеины не осуществляют реакций типа «люциферин-люцифераза», но флуоресцируют после поглощения энергии возбуждения, например, света



Процесс поглощения и испускания света при флуоресценции – диаграмма Яблонского



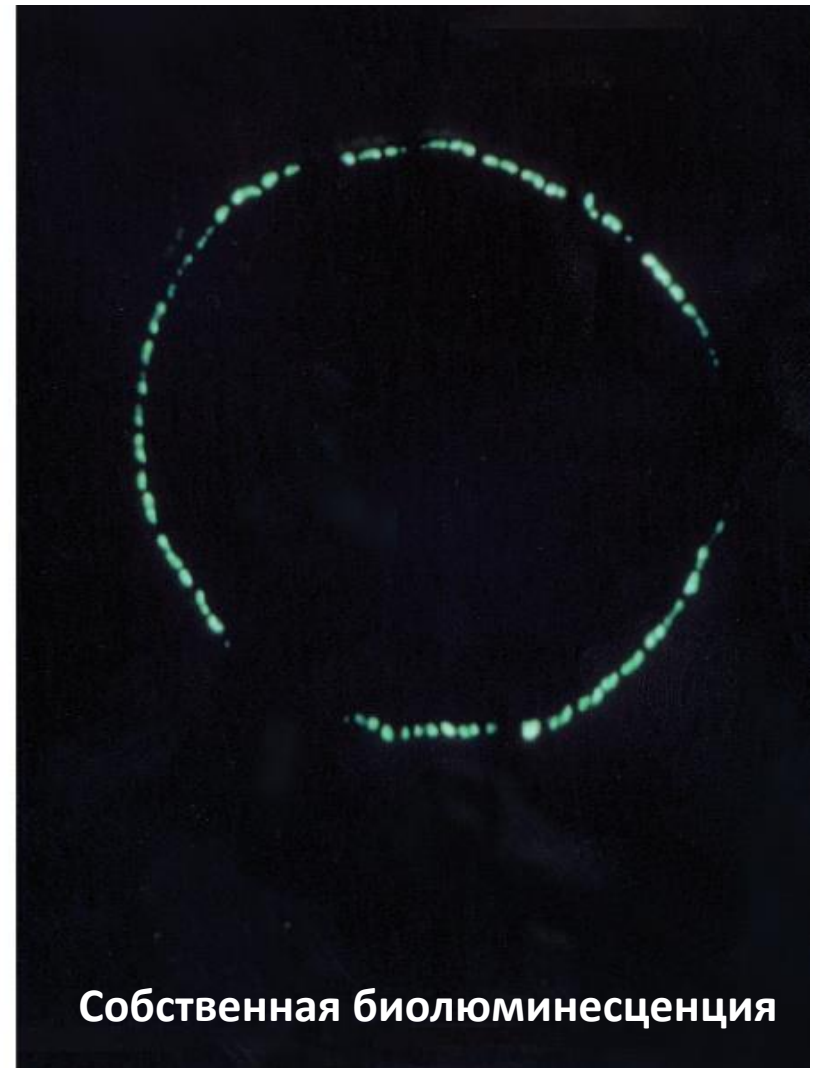
После поглощения света часть энергии расходуется при релаксации, а часть испускается в виде фотона определенной длины волны

Спектр излучения сдвинут относительно спектра поглощения в сторону длинных волн из-за рассеивания энергии

Время жизни возбужденного состояния – 10^{-11} - 10^{-6} с

Электронные состояния молекулы: S_0 - основное, S_1 - возбужденное

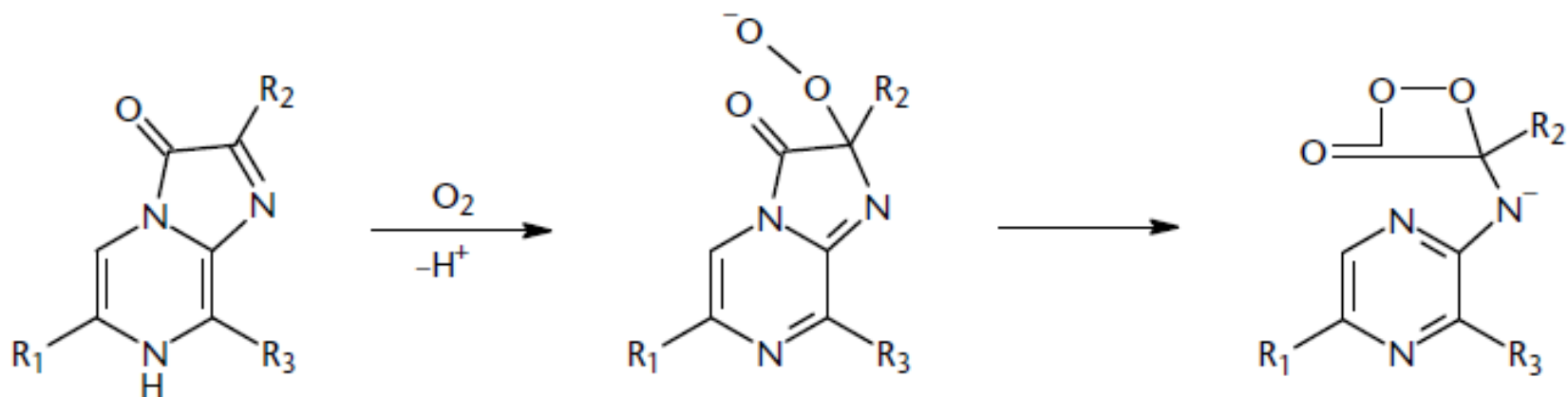
Система экворина и зеленого флуоресцирующего белка (GFP) медузы *Aequorea victoria*



Система экворина и зеленого флуоресцирующего белка (GFP)

- ❖ **Экворин** (aequorin) – Ca^{2+} –связывающий фотопротейн (189 а.о.)
- ❖ Состоит из апоэкворина (люцифераза), прочно связанного с **колентеразиновым** хромофором (люциферин) и молекулой O_2 (пероксилюциферин)
- ❖ В присутствии ионов **Ca^{2+}** (0,1-10 мкМ) происходит конформационная перестройка белка, сопровождаемая биолюминесценцией

Механизм реакции биолюминесценции у медузы



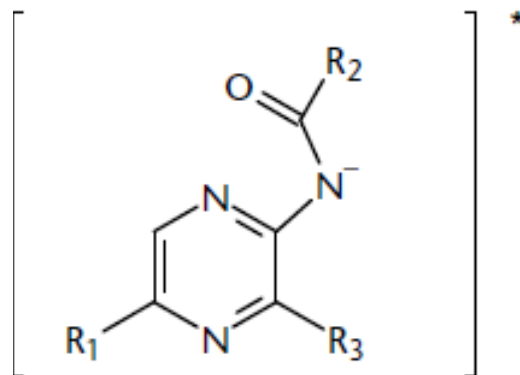
Колентеразин

R1 = R2 – phenyl, R3 – benzyl –
у медузы

Свободный метаболит

Имидазопиразиновое ядро
люциферина характерно
для большинства
исследованных морских
систем: коловратки,
моллюски, членистоногие,
некоторые рыбы, кальмары

Диоксетанон



$\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$

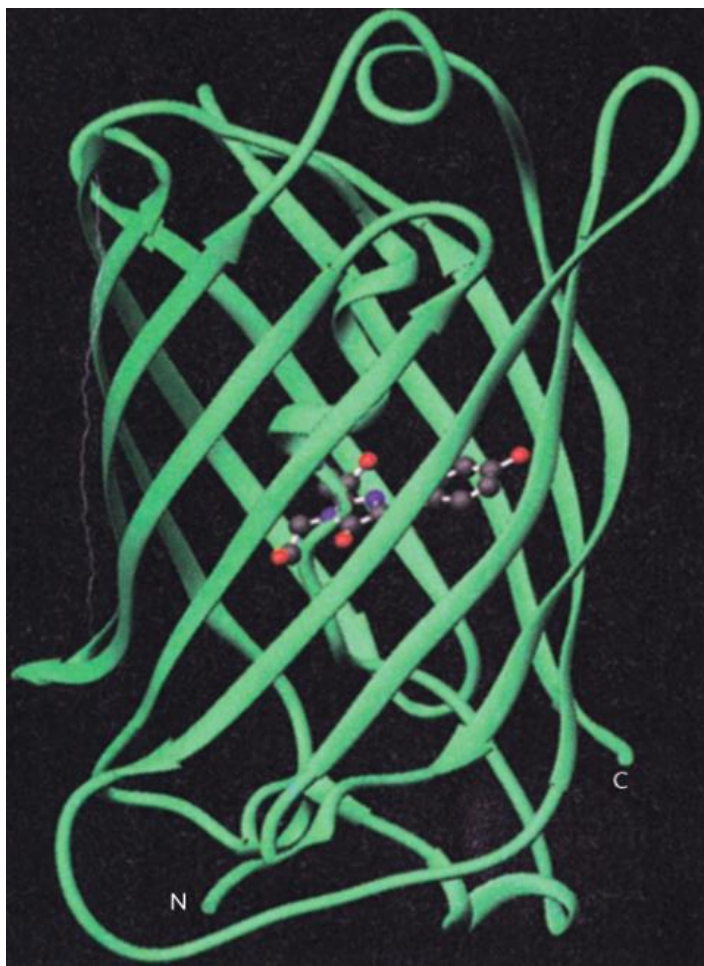
$-CO_2$

- ❖ Макроэргическое соединение,
- ❖ Спонтанный распад,
- ❖ Остается молекула в возбужденном состоянии

$h\nu$

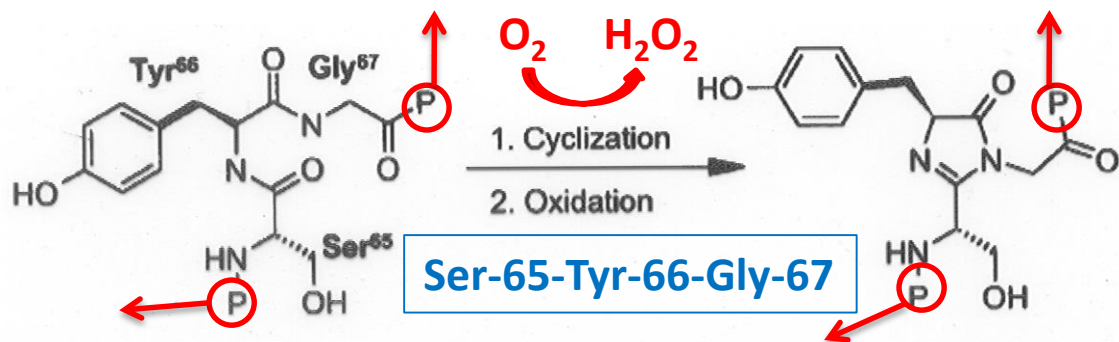
GFP

Пространственная структура GFP, механизм образования хромофора и свойства белка



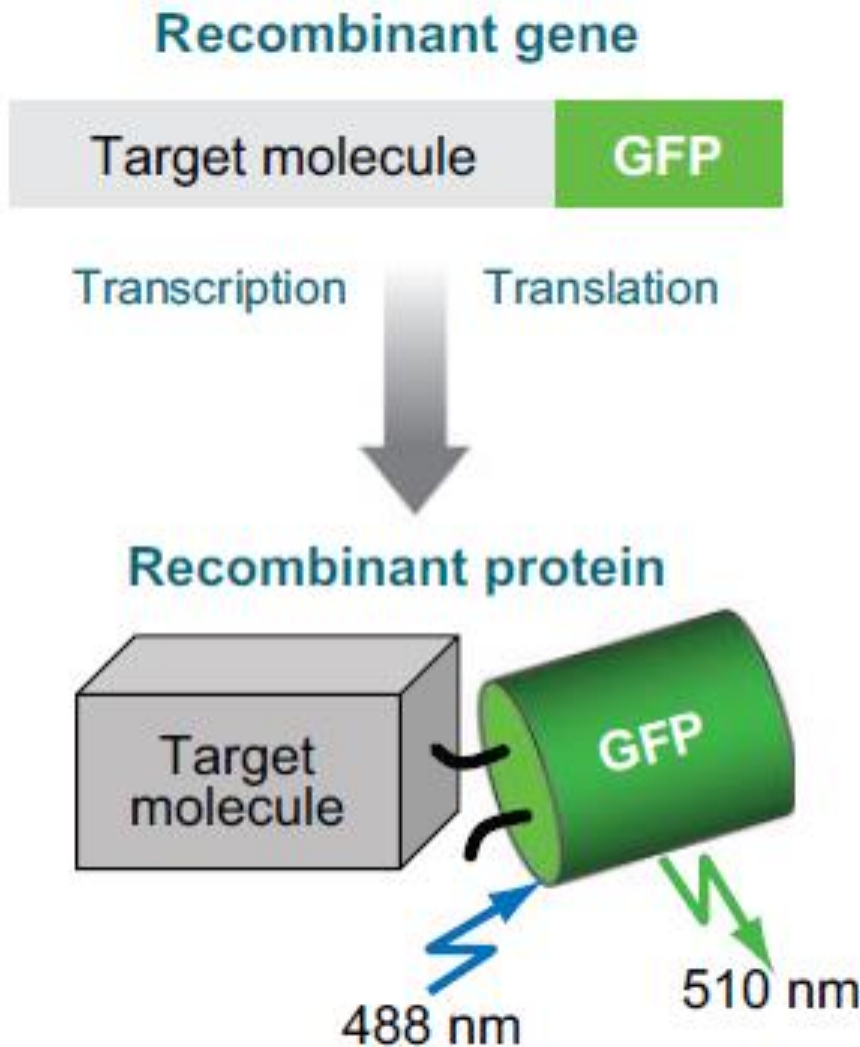
395 nm → 509 nm

N- и C-концы гибкие, бета-бочонок



- ❖ Полная функциональная независимость от дополнительных кофакторов (нужен только УФ)
- ❖ Малая токсичность для клеток
- ❖ Феноменальная стабильность (pH 5-12, устойчив к действию протеиназ и высокой т-ры до 65°, активен в 1% SDS, 6M хлористом гуанидине и препаратах, фиксированных формальдегидом)
- ❖ Мало обесцвечивается при флуоресцентной микроскопии
- ❖ Небольшой размер – минимальное влияние на подвижность гибридных белков в клетках

Использование GFP в качестве метки для рекомбинантных белков



Объединение последовательностей GFP и исследуемого белка на уровне генов позволяет следить за их внутриклеточной локализацией *in vivo* с помощью флуоресцентной микроскопии

При сверхэкспрессии GFP образующаяся перекись водорода при созревании хромофора может быть токсична для клетки

Свойства GFP и его производных

Мутант	Мутации	Возбуждение max. (nm)	Испускание max. (nm)	Квантовый выход
Дикий тип		395 (470)	509	0.77
EGFP	S65T	488	509	0.70
BFP	Y66H, Y145F	380	440	0.20
YFP	S65G, V68L, S72A, T203Y	513 (498)	527	0.63
CFP	T66W	433 (453)	475 (501)	0.24

Примечание. В скобках отмечены минорные максимумы поглощения

GFP WT – два максимума поглощения две формы хромофора – анионная и нейтрал.

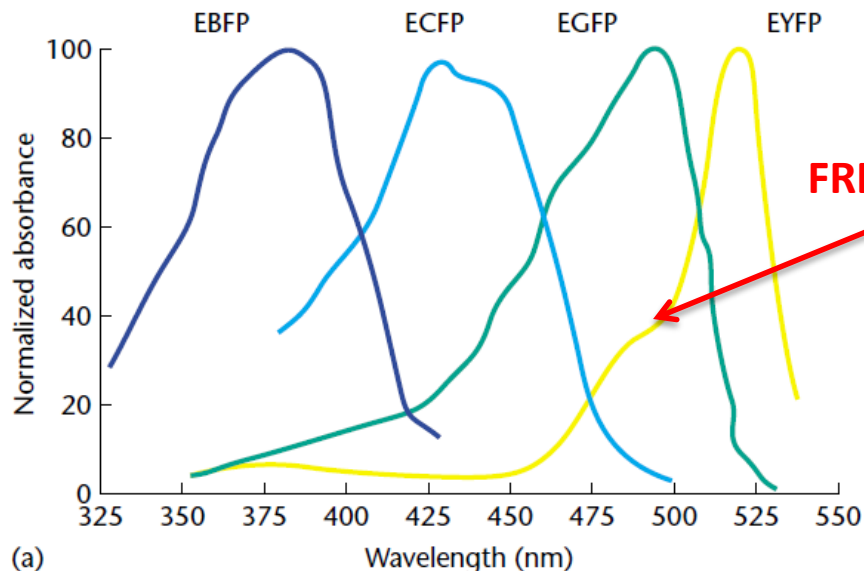
EGFP – enhanced - фолдинг при 37°C, выше флуоресценция *in vivo*, FITC-фильтры

d2EGFP – дестабилизированный GFP – время полужизни 2 ч. (EGFP – 24 ч.)

BFP – голубой флуоресцирующий белок – может возбуждать EGFP (FRET)

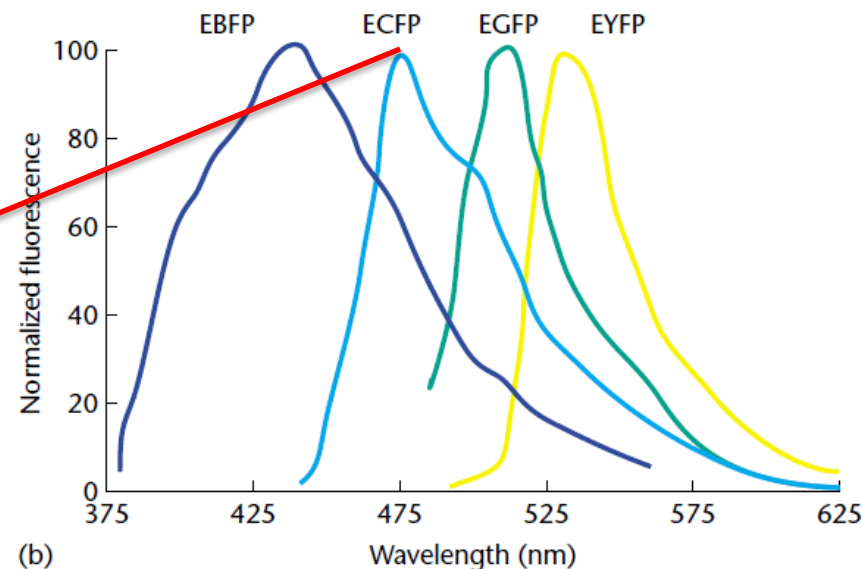
CFP – (циановый), **YFP** – (желтый) флуоресцирующие белки, также используются в системах FRET

Спектры поглощения и флуоресценции мутантных GFP



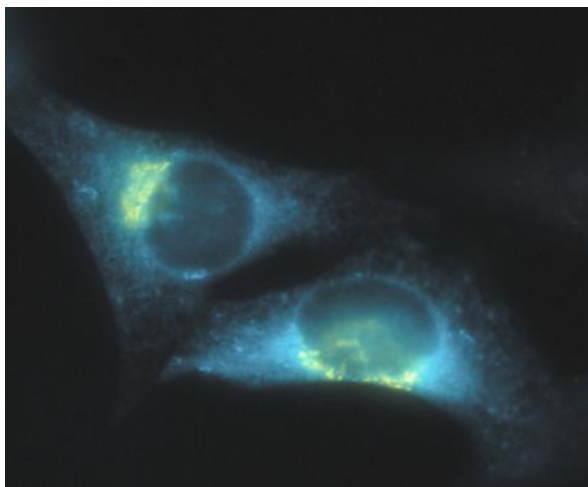
(a)

Спектры поглощения



(b)

Спектры флуоресценции



Двойное окрашивание клеток HeLa человека, экспрессирующих ECFP в эндоплазматическом ретикулуме, а EYFP – в аппарате Гольджи

После съемки при разных длинах волн и компьютерного псевдоокрашивания снимки накладывали друг на друга

Дестабилизированные производные GFP (dGFP)

При кинетических исследованиях экспрессии генов высокая стабильность GFP (время полужизни в клетках животных – 24 ч) является недостатком

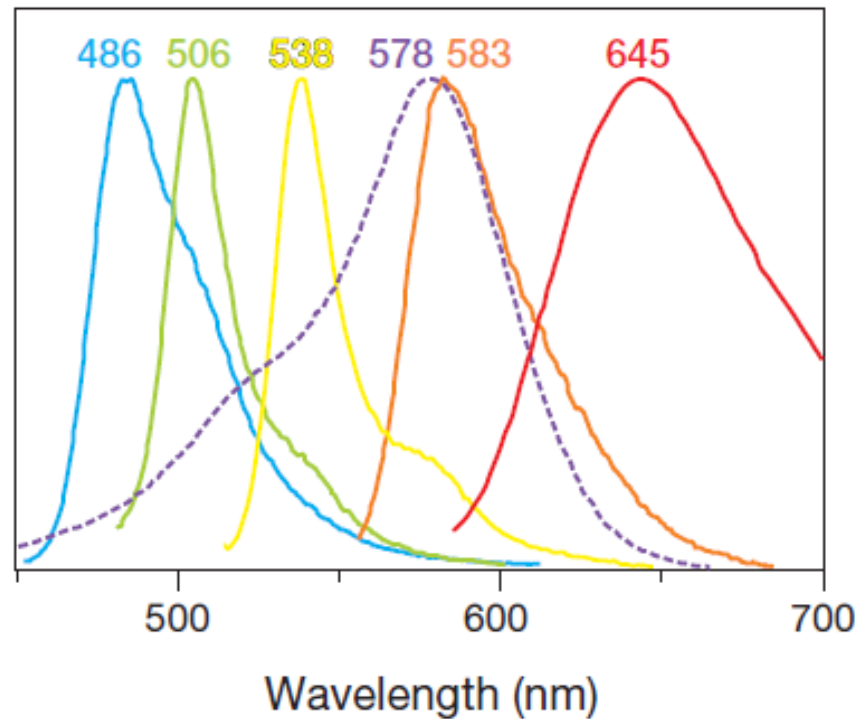
Понижение стабильности производят за счет введения домена мышинной орнитиндекарбоксилазы (а.о. 422-461), содержащего последовательность PEST – **сигнал деградации** белка – время полужизни – 2 ч.

Использование бактериального сигнала деградации белков дестабилизировало GFP в бактериальных клетках (в зависимости от штамма время полужизни составляло от 45 мин. до 2 ч).

Спектральное разнообразие GFP-подобных белков кораллов *Anthozoa*



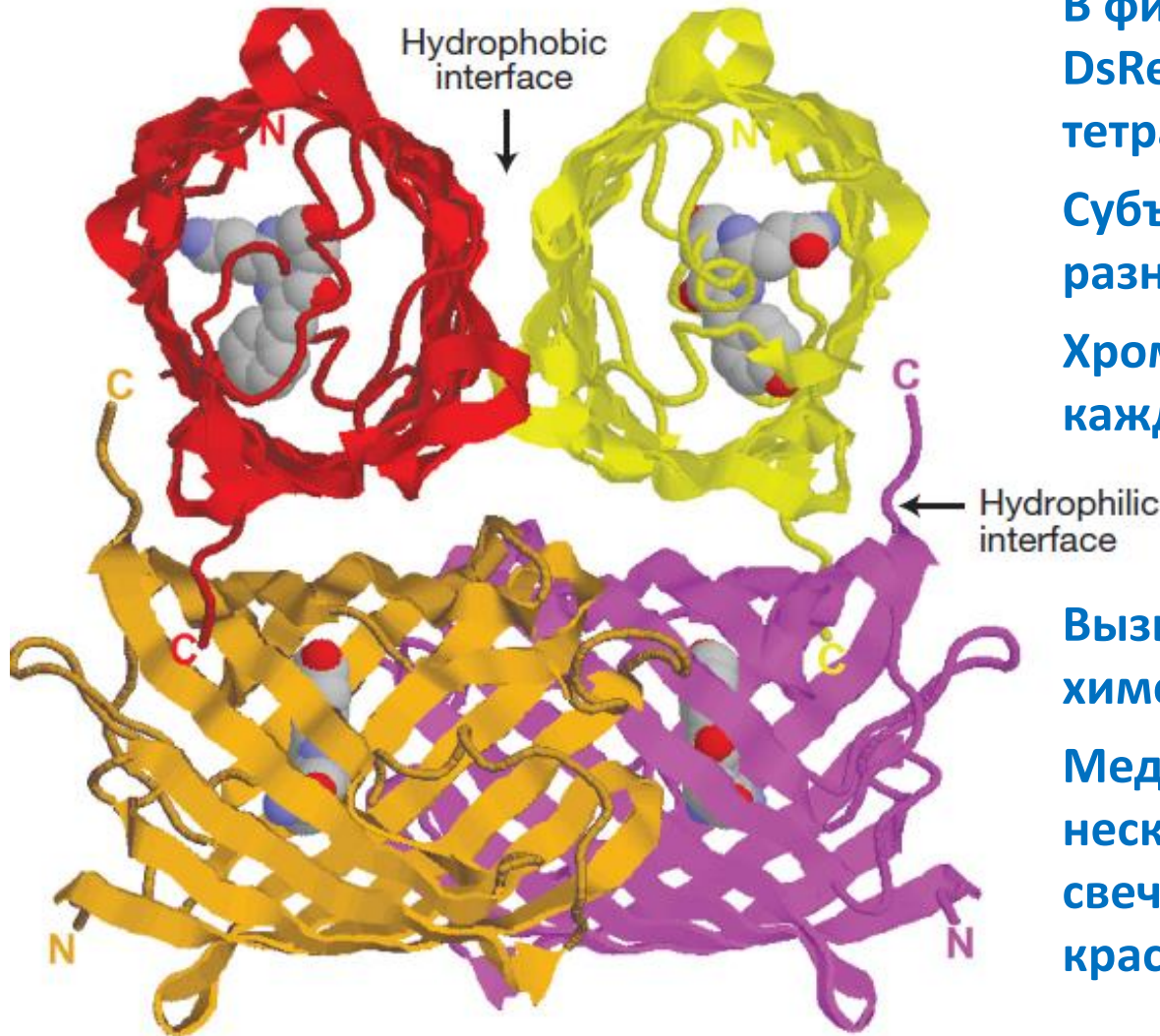
Слева направо: amajGFP (cyan FP), zoanGFP (green FP), zoanYFP (yellow FP), DsRed (red FP), asu1CP и hcriCP (CPs) - **хромопротеины**



Спектры испускания GFP-подобных белков. Пунктирной линией – спектр поглощения нефлуоресцирующего hcriCP

dsRed – в темноте – GFP, в УФ – быстрая конверсия хромофора

Пространственная структура GFP-подобного белка DsRed1



В физиологических условиях DsRed1 существует в виде тетрамера.

Субъединицы показаны разным цветом.

Хромофоры – в центре каждой субъединицы

Вызывает олигомеризацию химерных белков

Медленное созревание – несколько дней, с изменением свечения от зеленоватого до красного

Мономерные красные флуоресцирующие белки (mRFP)

HcRed – замена одного АК-остатка, димер с низким квантовым выходом

T1 – мутантный тетрамер с высокой скоростью созревания, дальнейшие мутации привели к образованию димера

mRFP1 – мономер с низкими квантовым выходом и стабильностью – 33 мутации в DsRed

mOrange, mKO, mStrawberry, mCherry, mKate – мономерные, полученные направленной эволюцией с великолепными физико-химическими свойствами

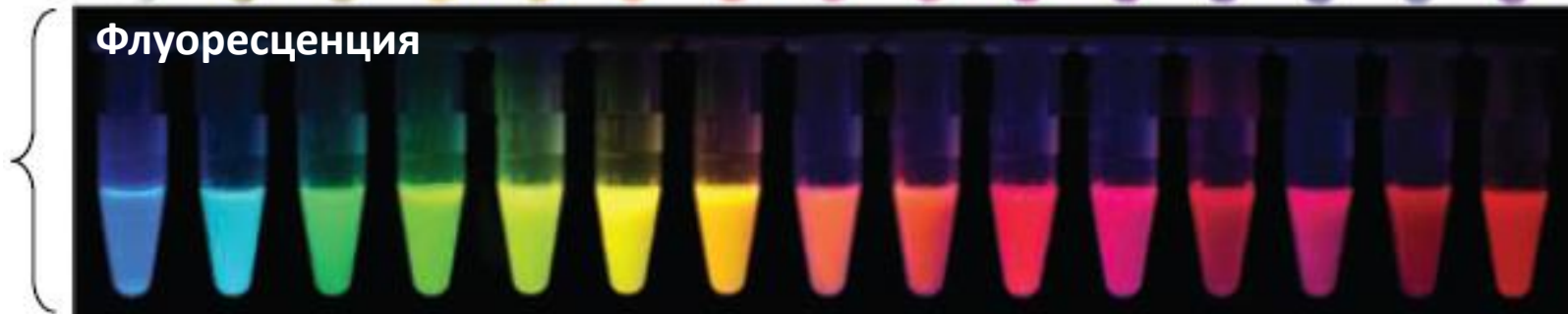
tdTomato – тандемный димер с очень яркой красной флуоресценцией, предотвращена олигомеризация

Рекомбинантные флуоресцирующие белки, очищенные из клеток *E. coli*

Белый свет



Флуоресценция



EBFP

ECFP

EGFP

Citrine

mHoneydew

mBanana

mOrange

tdTomato

mTangerine

mStrawberry

mCherry

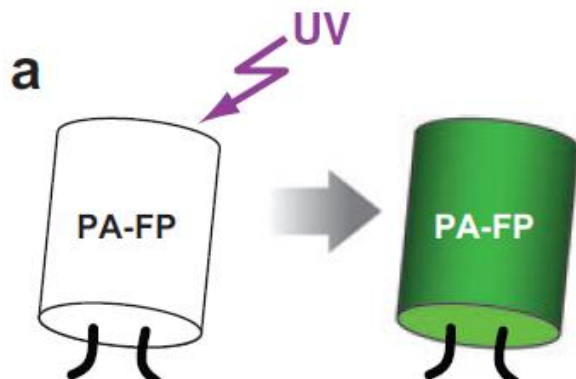
mGrape1

mRaspberry

mGrape2

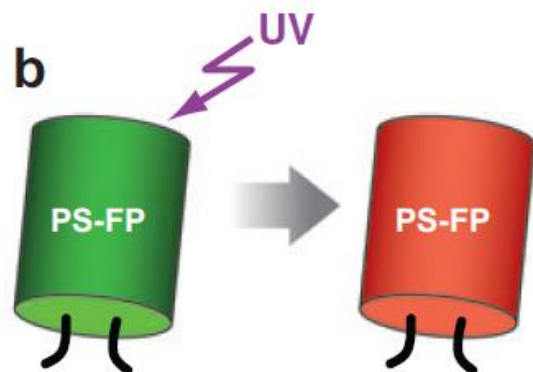
mPlum

Три класса фотоактивируемых/фотоконвертируемых флуоресцирующих белков



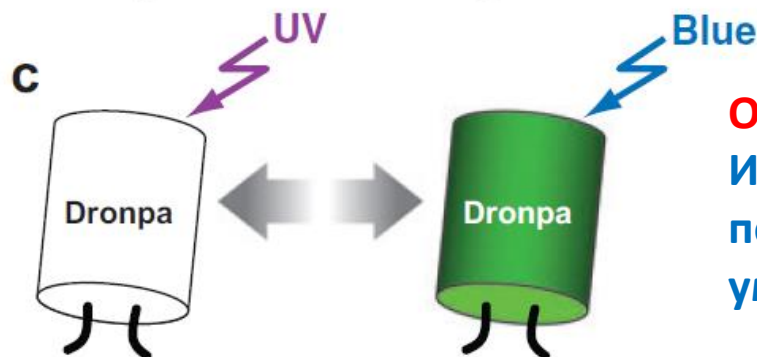
Необратимая фотоактивация

После облучения УФ-светом фотоактивируемый флуоресцирующий белок (PA-FP) усиливает свою флуоресценцию (возбуждение 488 нм -> 413 нм -> 488 нм, эмиссия при 515 нм возрастает в 100 раз)



Необратимая фотоконверсия (изменение цвета)

После облучения УФ-светом фотоконвертируемый FP (PS-FP) изменяет максимум в спектре флуоресценции с зеленого на красный (Kaede 2000-кратное увеличение зеленый/красный)



Обратимая фотоактивация (asFP595, Dronpa, KFP1)

Интенсивность флуоресценции обратимо повышается после УФ-облучения или уменьшается после облучения голубым светом

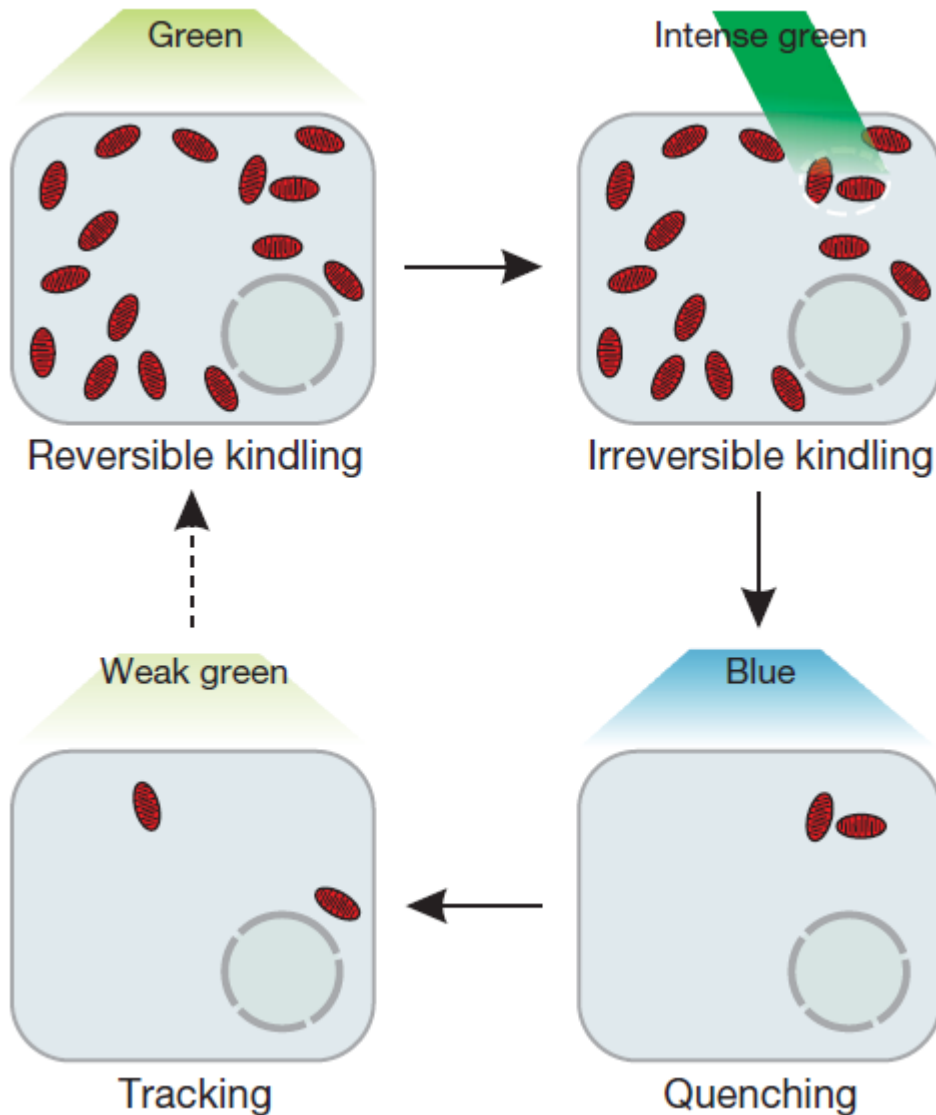
Три класса фотоактивируемых флуоресцирующих белков

PA-GFP (photoactivatable GFP) – замена Thr-203→His; облучение фиолетовым светом (~400 nm) приводит к >1000-кратному возрастанию флуоресценции в зеленой области при облучении голубым светом (~460-480 nm).

Kaede (*Trachyphyllia geoffroyi*) и **EosFP** – Облучение приводит к необратимому переключению с зеленой флуоресценции на красную.

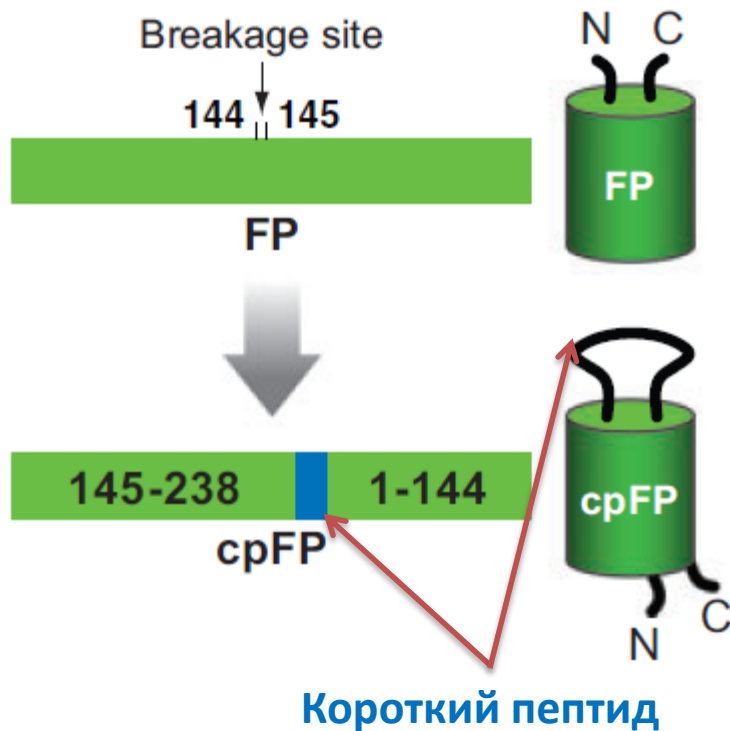
KFP1 (kindling fluorescent protein 1) – разгорающийся FP – пурпурный хромопротеин с макс. поглощения 570 nm (зеленый), интенсивное облучение зеленым светом приводит к необратимой фотоактивации (исп. 595 nm). Обратимую флуоресценцию тушат облучением при 450 nm (голубой) или она прекращается сама.

Использование разгорающегося FR KFP1

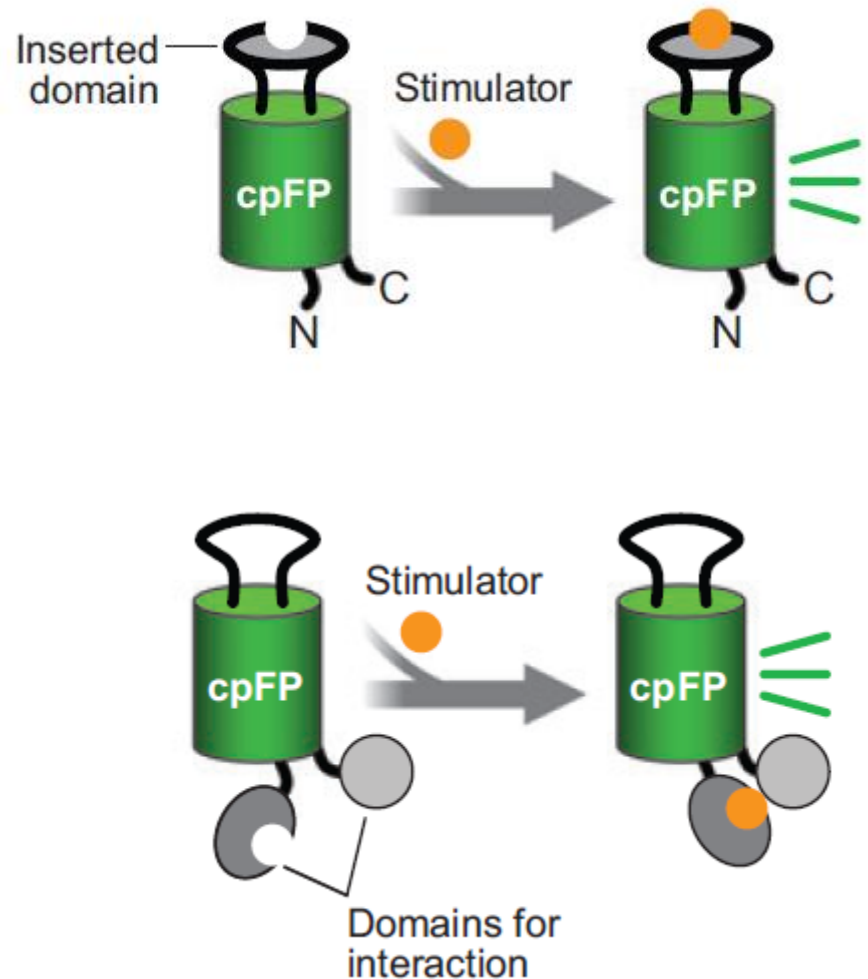


- ❖ Органеллы метят KFP1,
- ❖ Облучают слабым зеленым светом для обратимой активации KFP1
- ❖ Интенсивное облучение зеленым светом в ограниченной области клетки приводит к необратимой активации KFP1 в части органелл
- ❖ Голубое облучение гасит флуоресценцию всех белков, кроме необратимо активированных
- ❖ Наблюдают за органеллами

Флуоресцирующие белки с круговой пермутацией (cpFP)



cpFP более чувствителен к физиологическому окружению (pH, температура и т.п.)

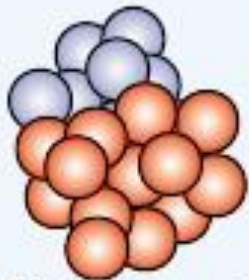


Кальмодулин и его партнер M13 + Ca^{2+}

FRET-система для исследования белок-белковых взаимодействий

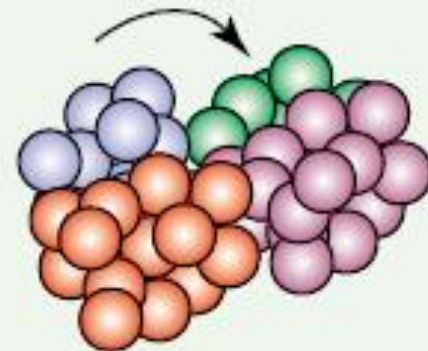
ECFP

EYFP

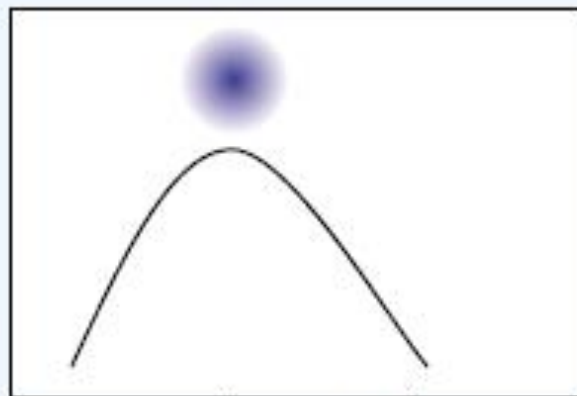


Protein 1

Protein 2



Light emission

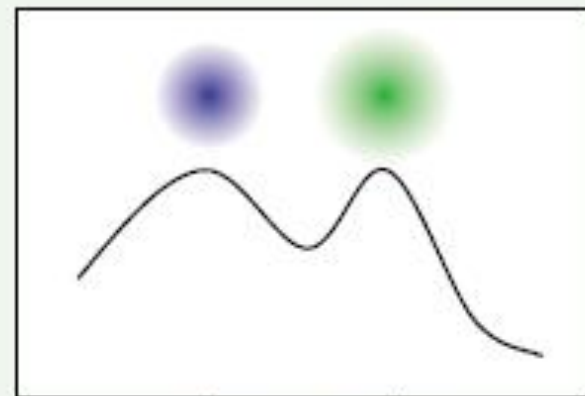


490

530

Wavelength (nm)

Light emission

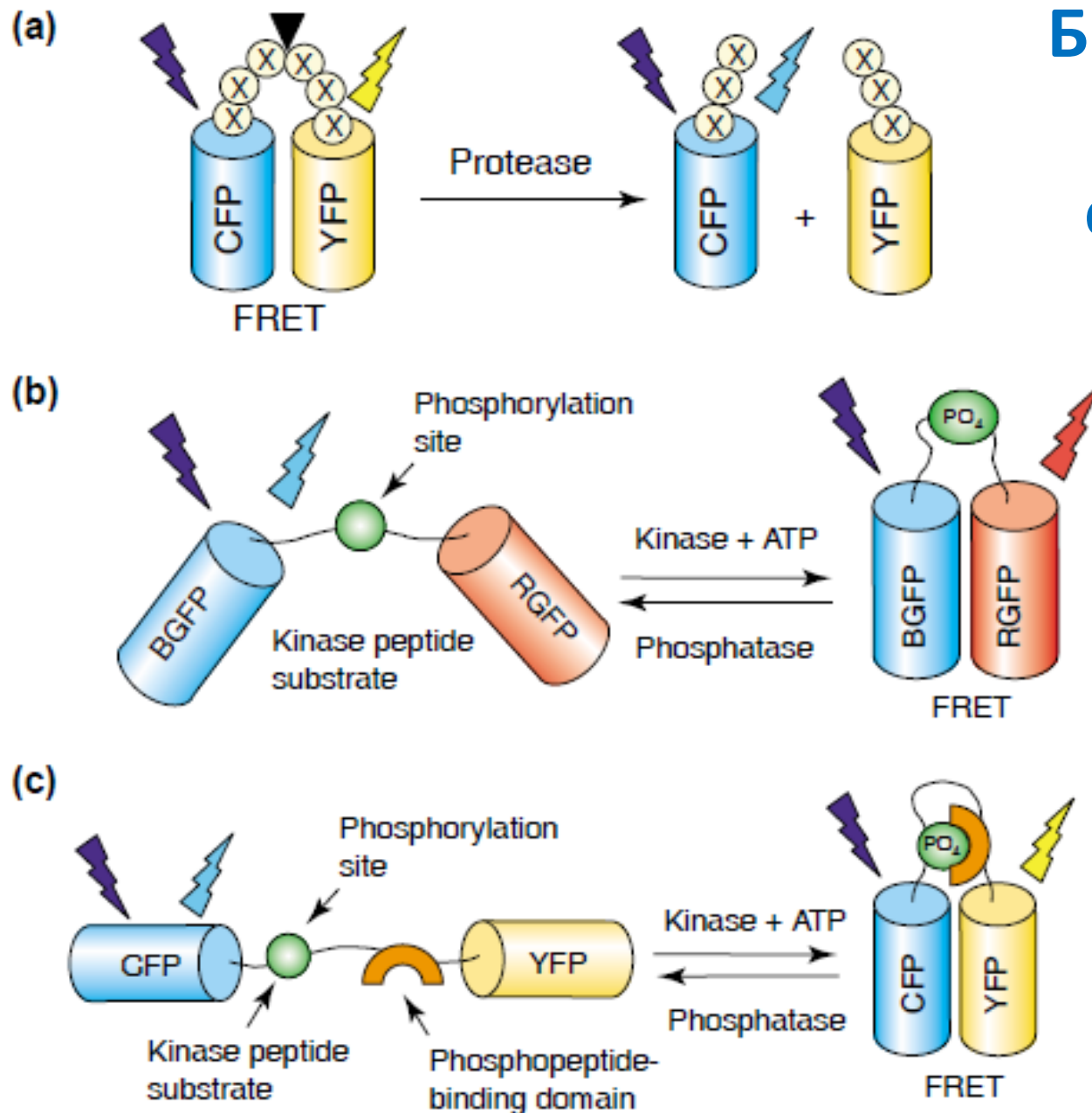


490

530

Wavelength (nm)

Биологические сенсоры на основе FRET- систем

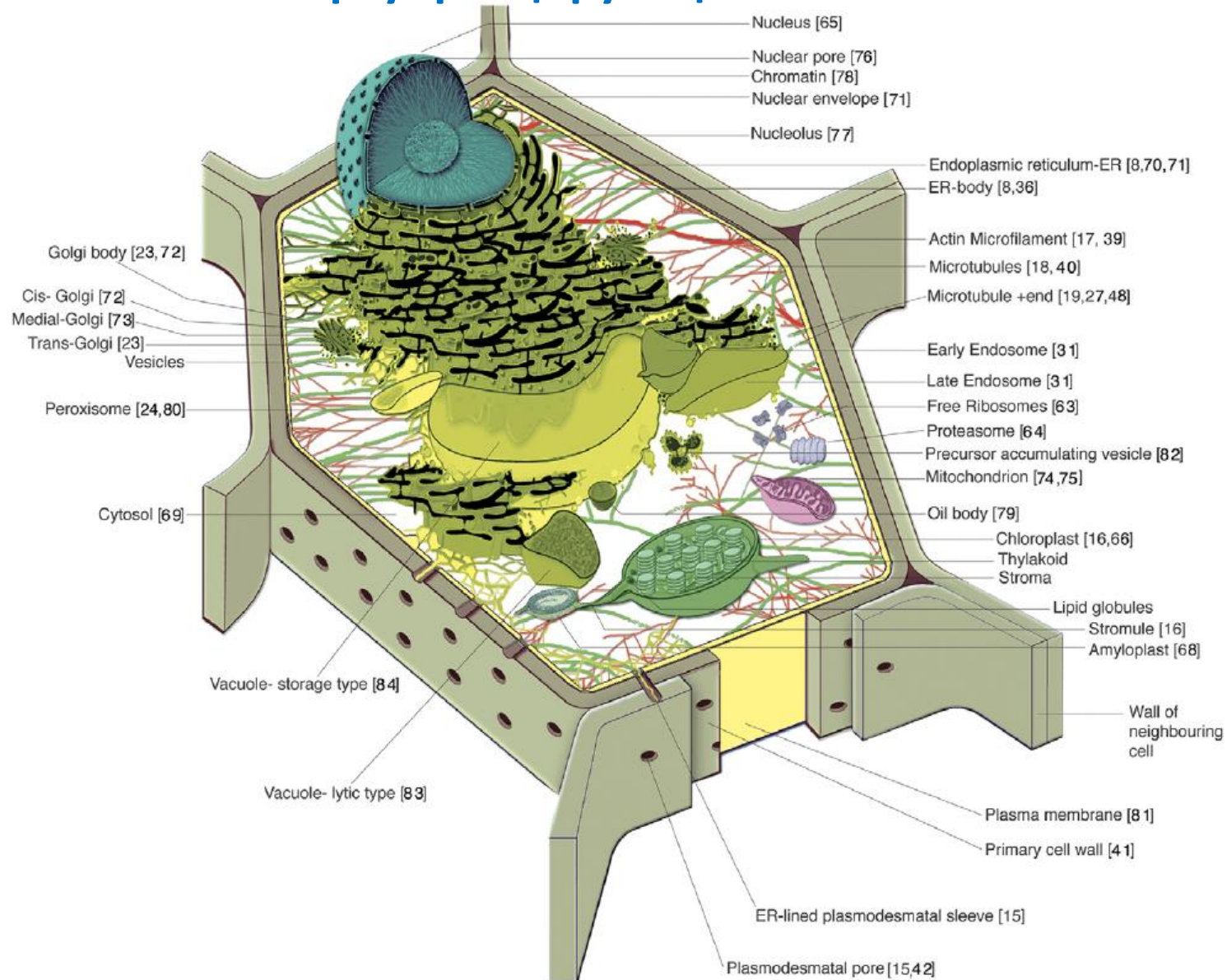


Флуоресцирующий белок **KillerRed**

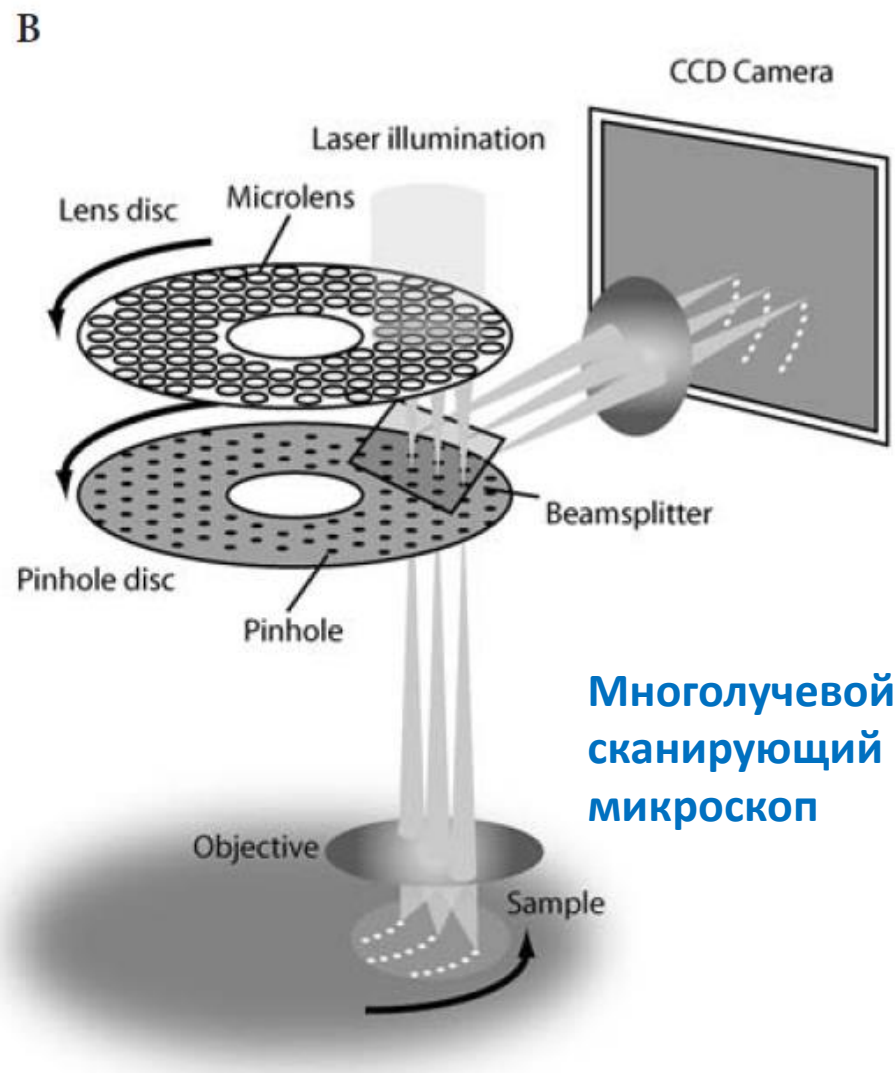
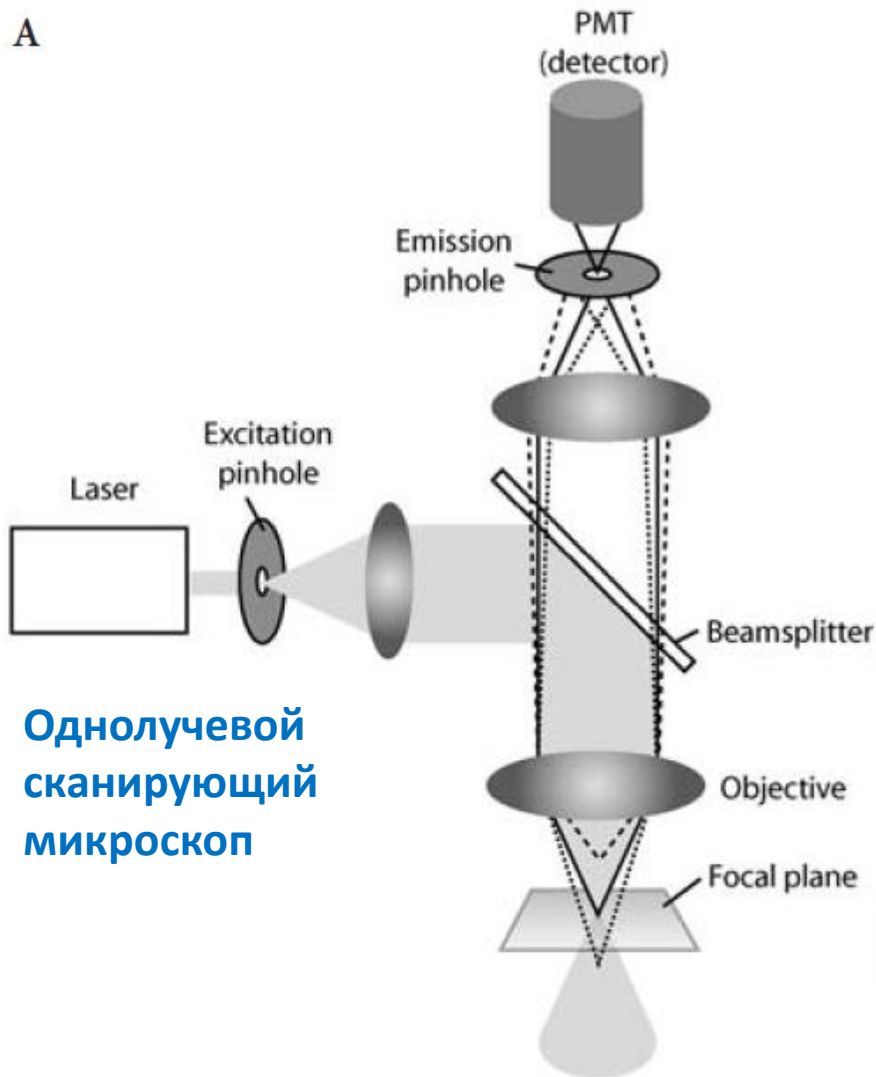
- ❖ Облучение GFP сопровождается образованием активных форм кислорода (ROS) – перекись водорода, синглетный кислород
- ❖ Димерный красный FP - возбуждение/флуоресценция 585/610 нм. Получен из anm2FP кораллов. Сильный фотосинтез ROS
- ❖ Фотоинаktivация молекул, соединенных с KillerRed

**Многоцветные зонды на основе
флуоресцирующих белков,
используемые для исследования
клеток *in vivo***

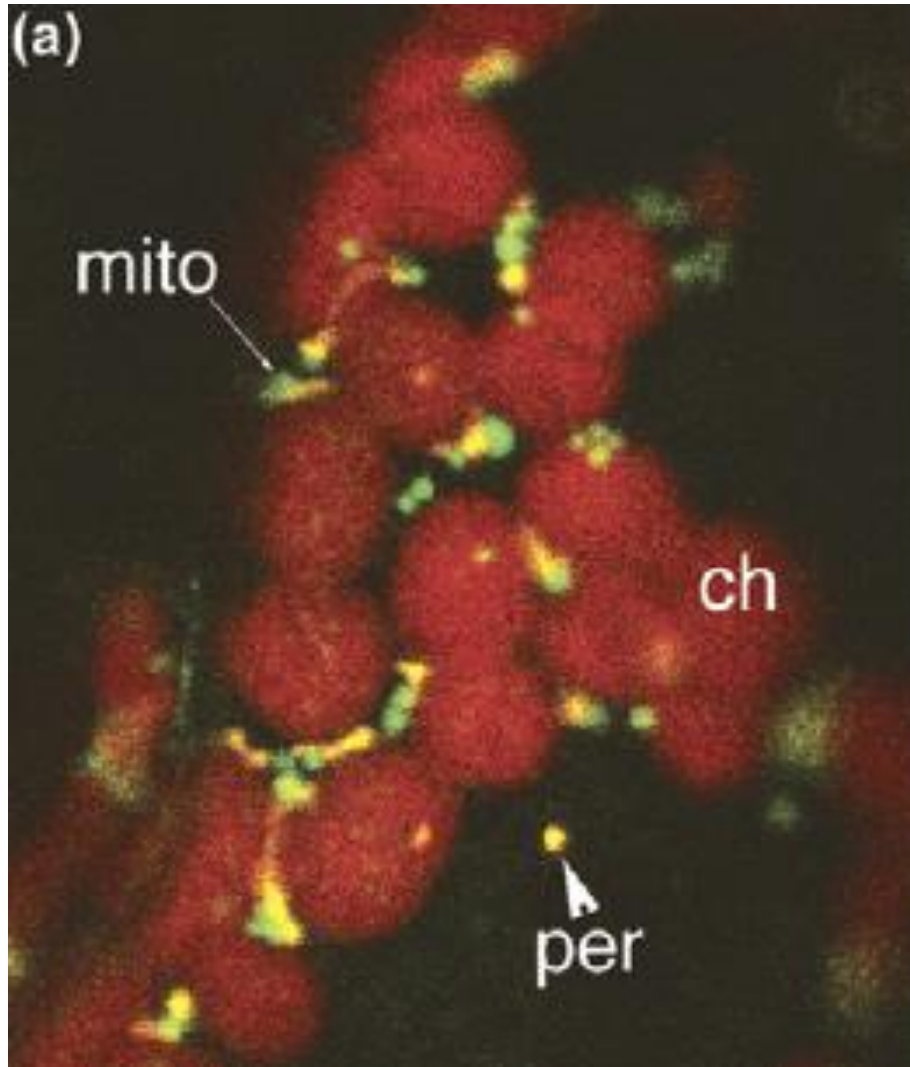
Объекты исследования клеток растений и помощью флуоресцирующих белков



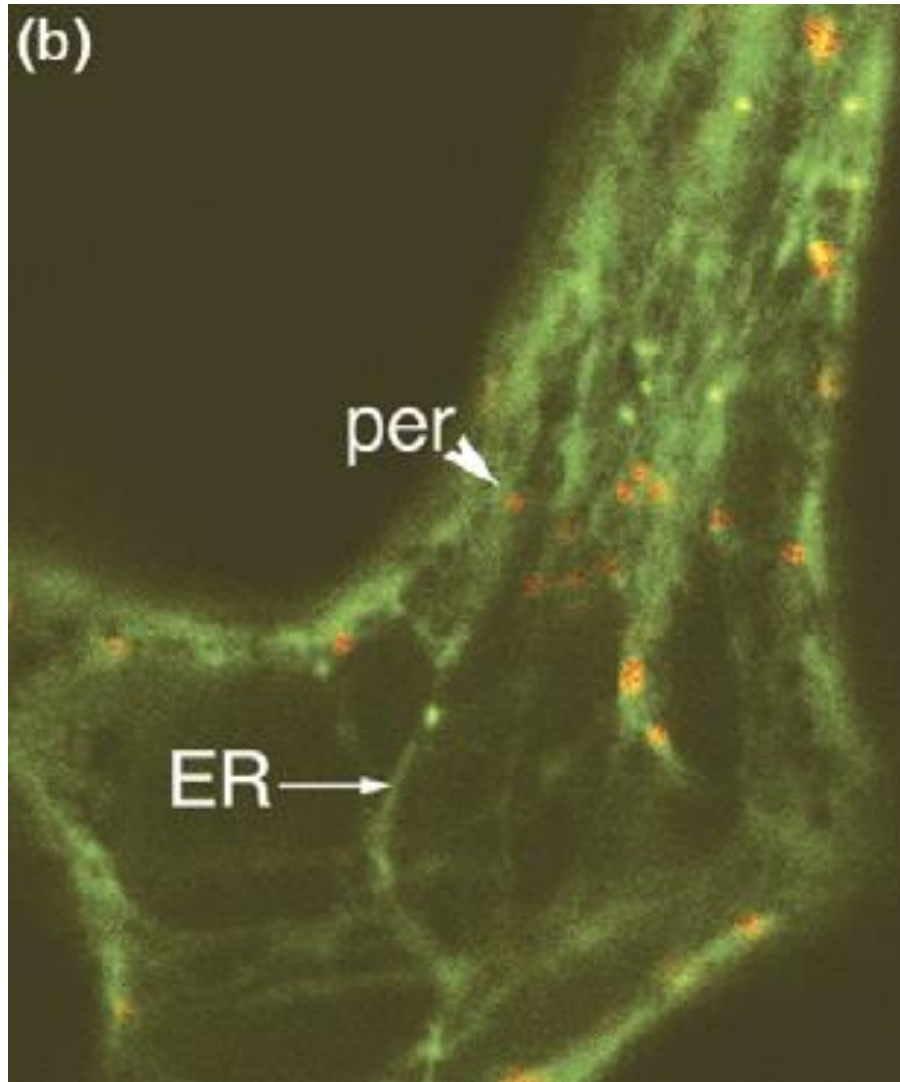
Устройство конфокального сканирующего микроскопа



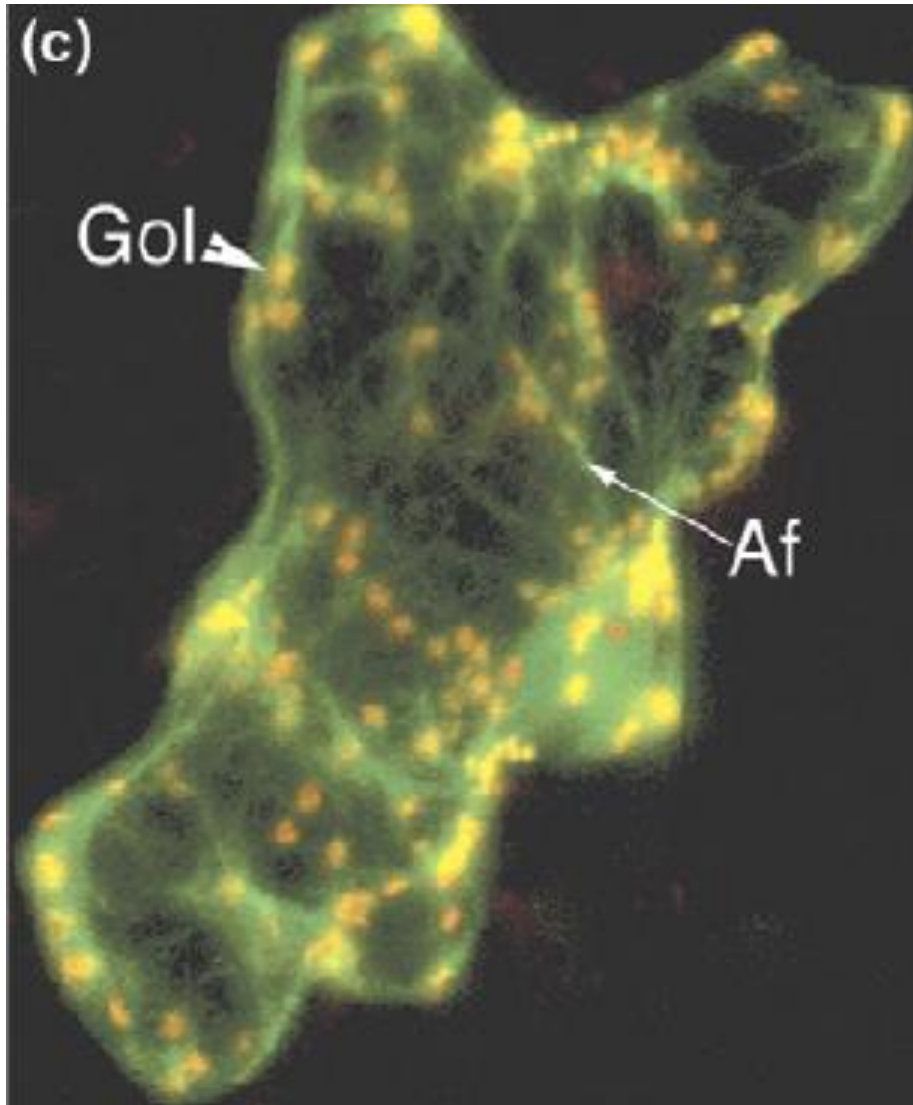
Хлоропласты, митохондрии и пероксисомы



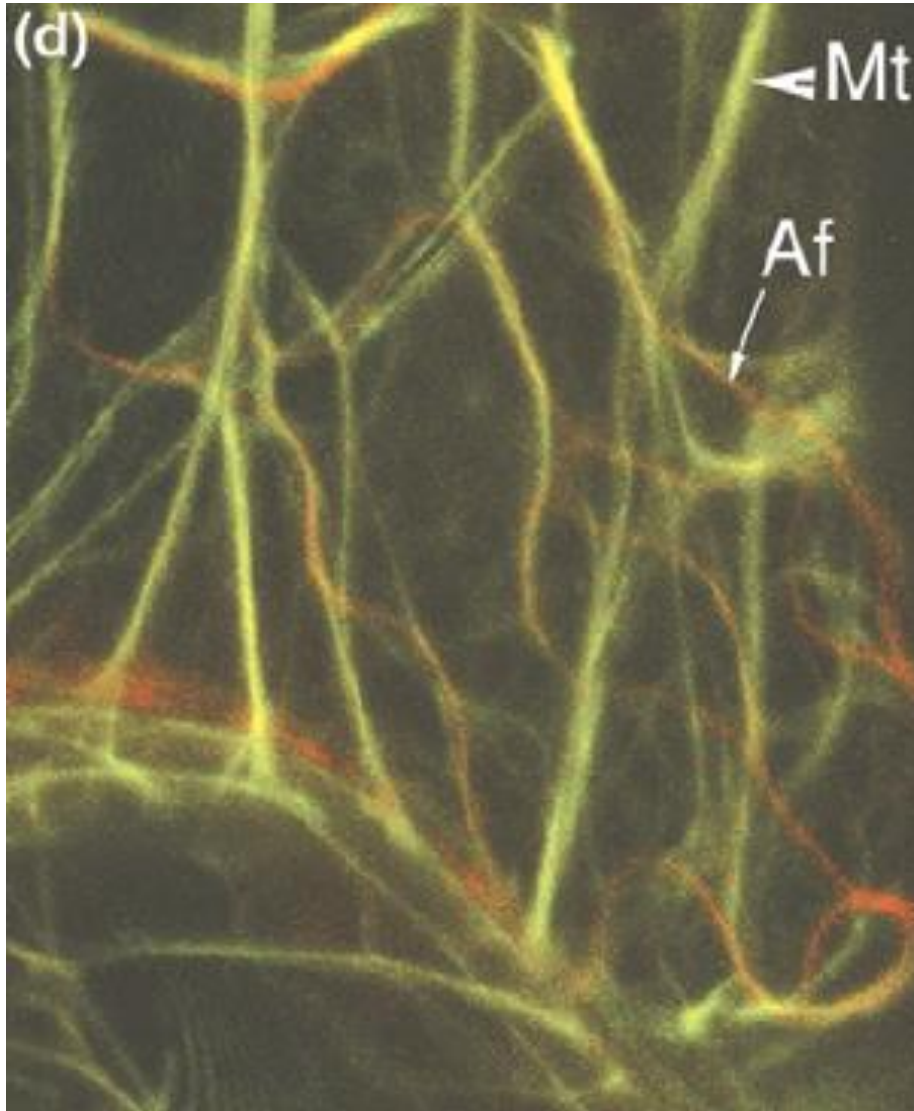
Эндоплазматический ретикулум и пероксисомы



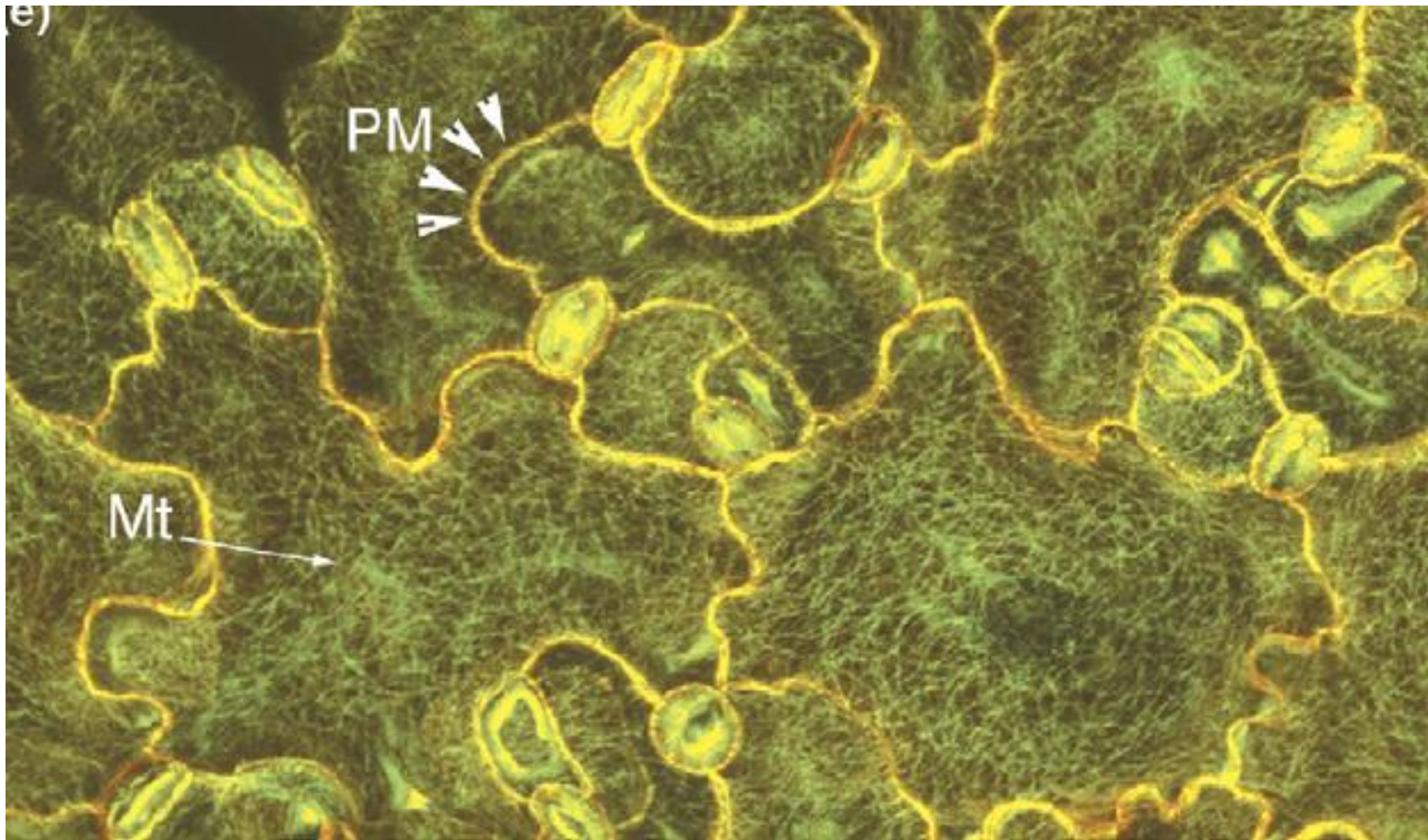
Аппарат Гольджи и микрофиламенты актина



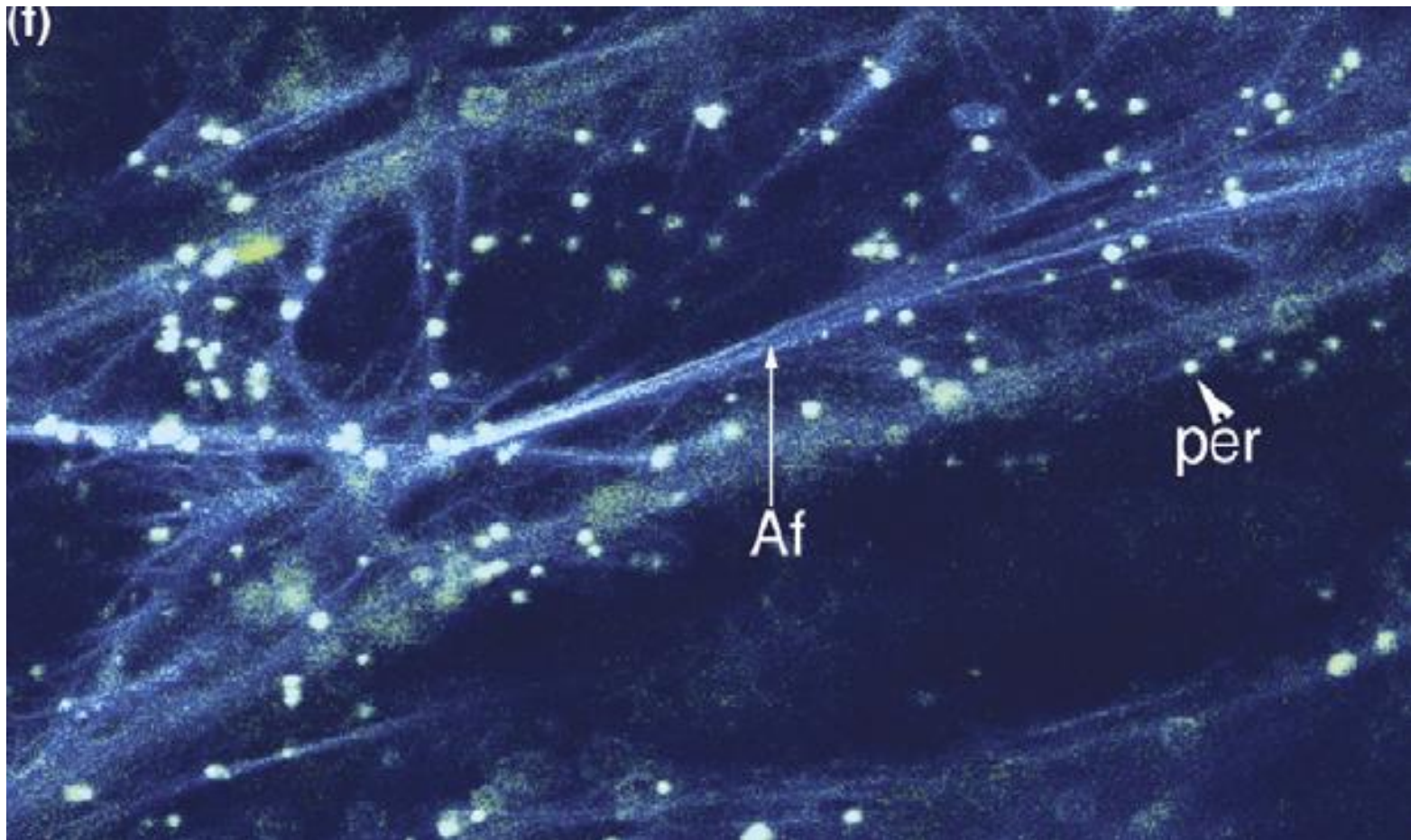
F-Актин и микротрубочки



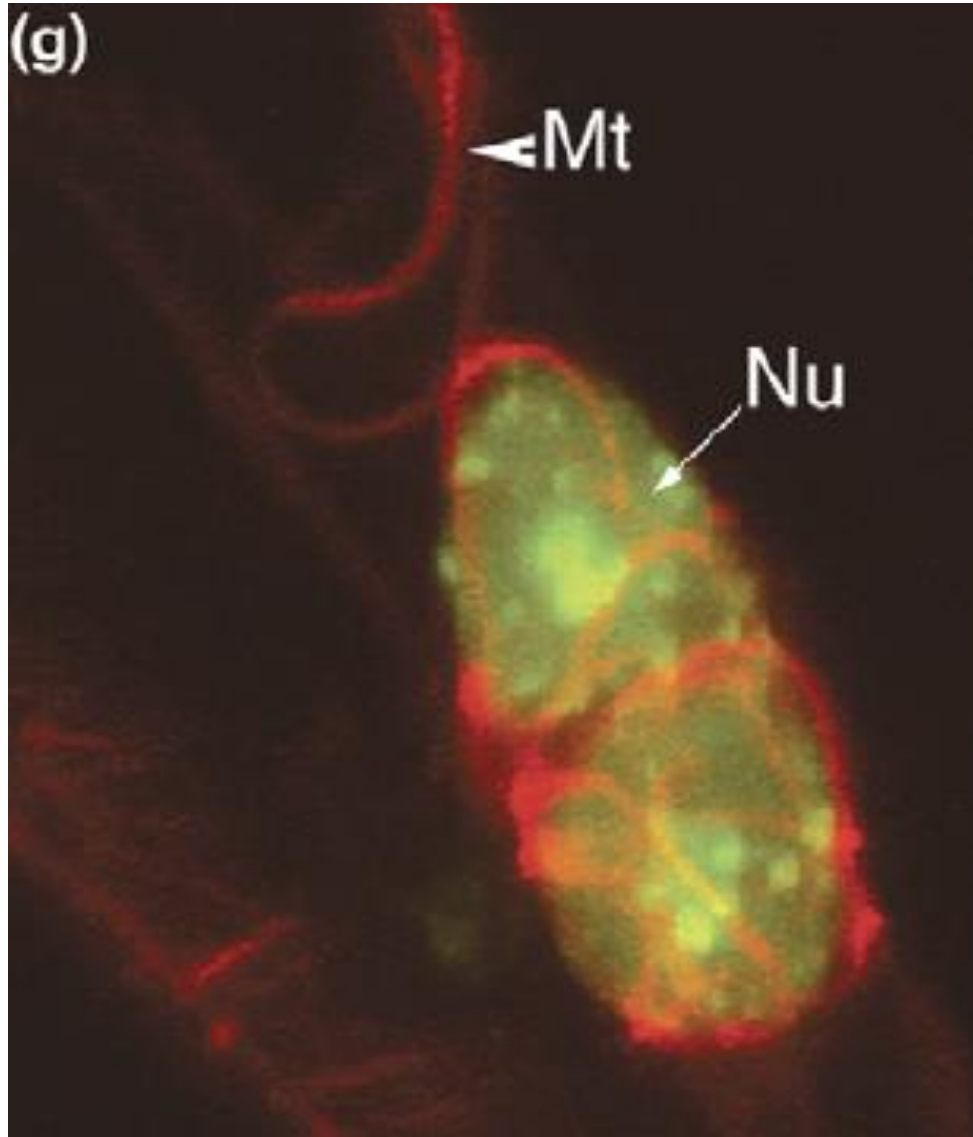
Плазматическая мембрана и микротрубочки



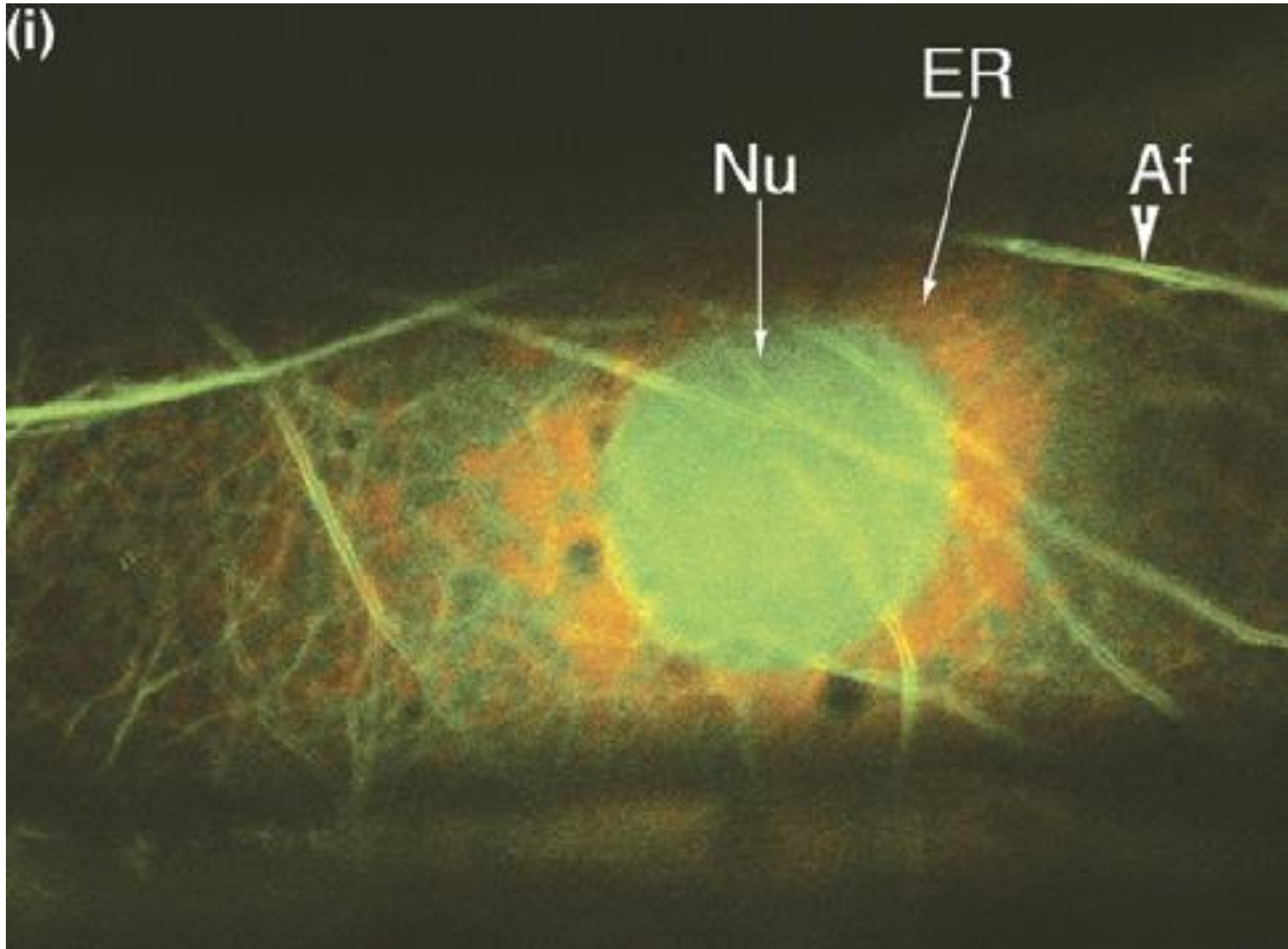
Пероксисомы и F-актин



Микротрубочки, взаимодействующие с интерфазным ядром

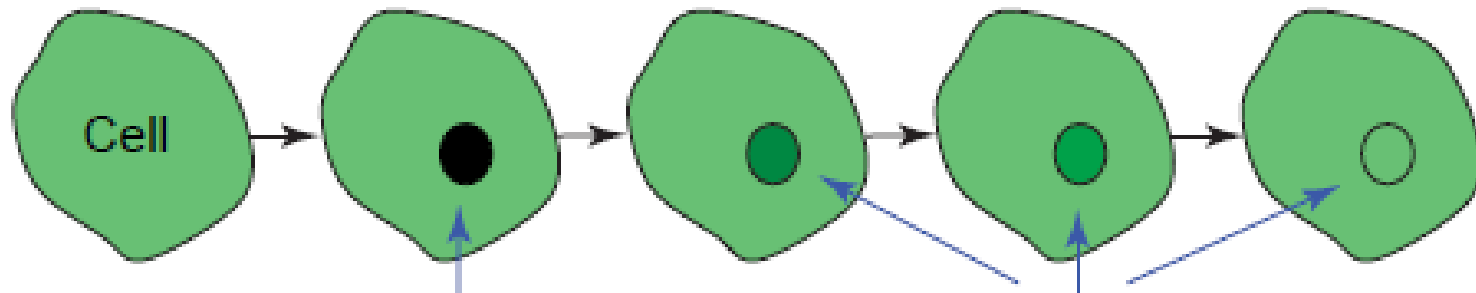


Интерфазное ядро, эндоплазматический ретикулум и F-актин



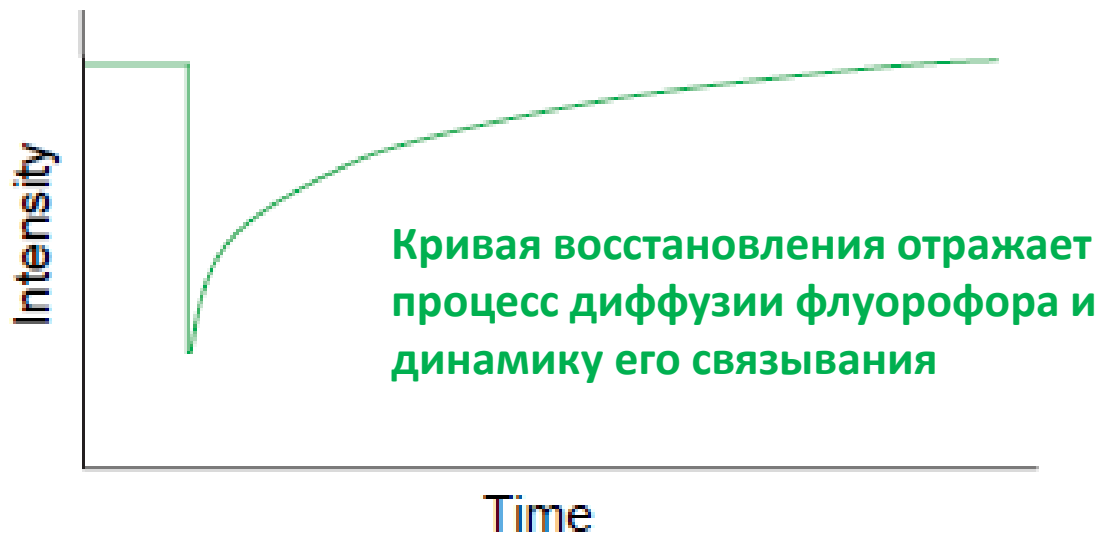
Флуоресцирующие белки в исследованиях динамики межмолекулярных взаимодействий

Восстановление флуоресценции после обесцвечивания светом



Обесцвечивание
лазером

Восстановление
флуоресценции



Интенсивное
облучение
светом
разрушает
флуорофор

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Основные факторы, влияющие на скорость восстановления флуоресценции после обесцвечивания светом

- ❖ Скорость диффузии и/или транспорта макромолекулы в наблюдаемой области клетки – молекулярное сито (коэффициенты диффузии)
- ❖ Наличие специфических взаимодействий между макромолекулами в наблюдаемой области

Наличие взаимодействий обнаруживают при сравнении скоростей восстановления с участием свободного GFP или химерного белка

Скорость восстановления флуоресценции после обесцвечивания слабо зависит от молекулярной массы диффундирующего белка

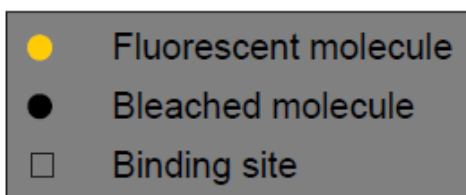
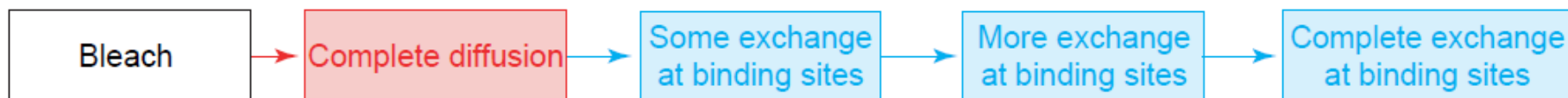
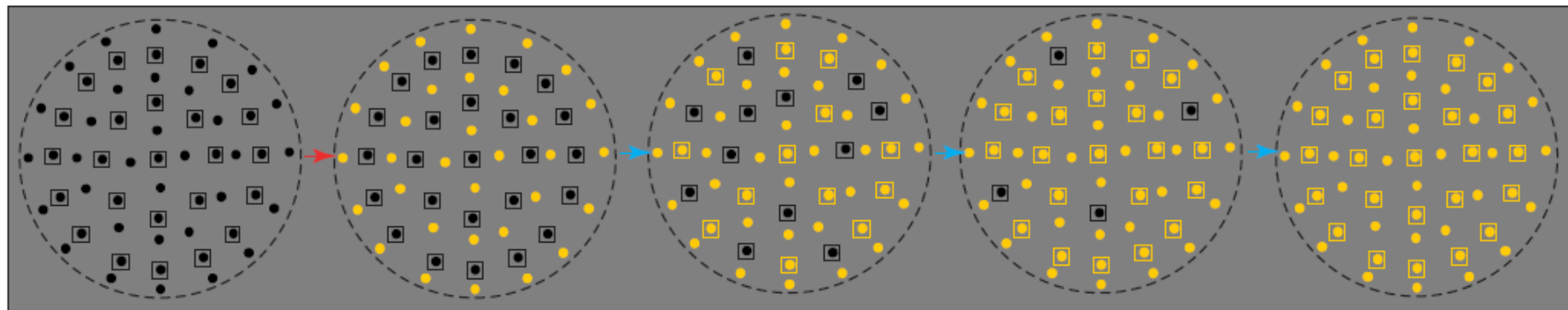
Mass (kDa)	Half-time for FRAP recovery (s) ^a	
	Cytoplasmic or nuclear	Transmembrane
27	0.011	0.020
100	0.017	0.023
500	0.030	0.028
1000	0.037	0.031
100 000	0.173	0.096

a – Время, необходимое для восстановления интенсивности флуоресценции до 50% от исходной.

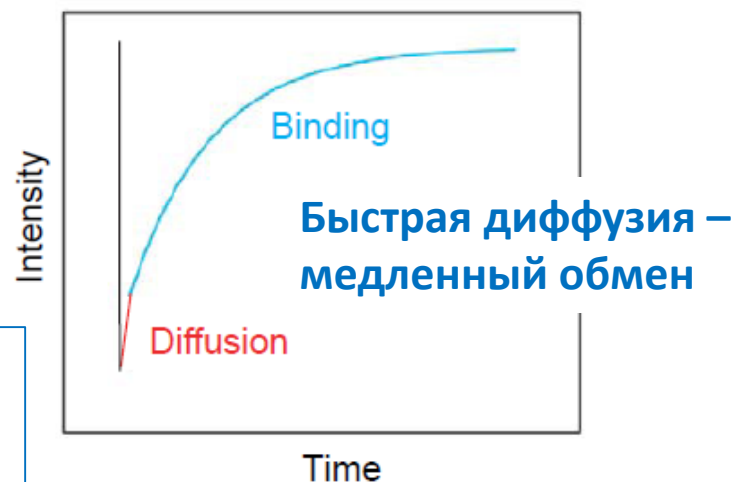
Расчеты для пятна диаметром 1 мкм

**При обнаружении взаимодействий
исследуют относительный вклад
диффузии и связывания в
восстановление флуоресценции**

Восстановление флуоресценции независимое от диффузии



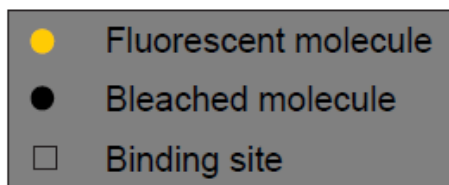
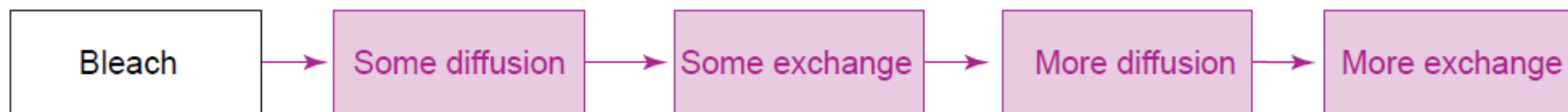
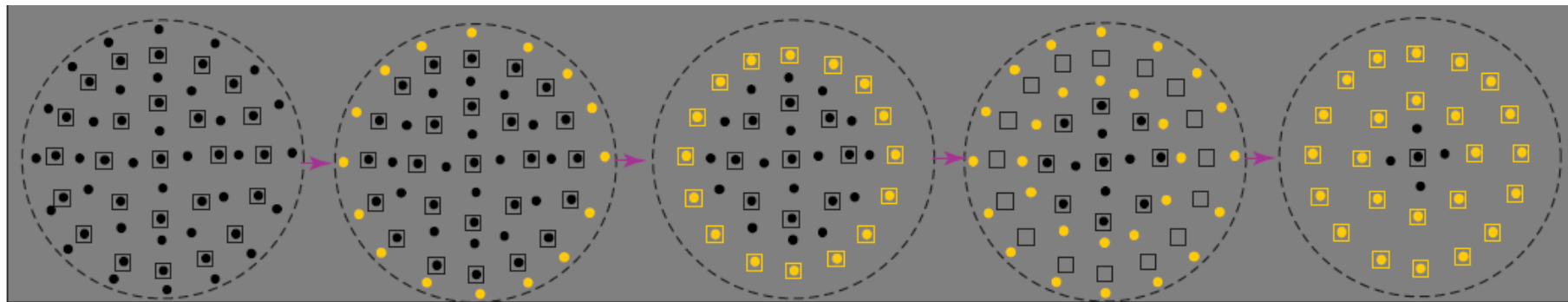
После обесцвечивания пятно быстро заполняется диффундирующими молекулами, которые далее **медленно обмениваются** с обесцвеченными лигандами на рецепторах. **Двухфазная кривая**.



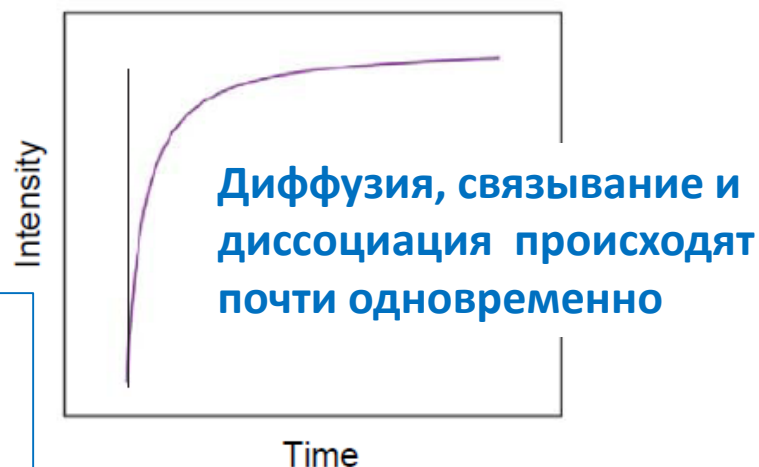
Наличие «плеч» на кривой связывания говорило бы о гетерогенности центров связывания

Двухфазная кривая связывания характерна, в частности, для ДНК-связывающих белков, отражающая неспецифическое и специфическое связывание

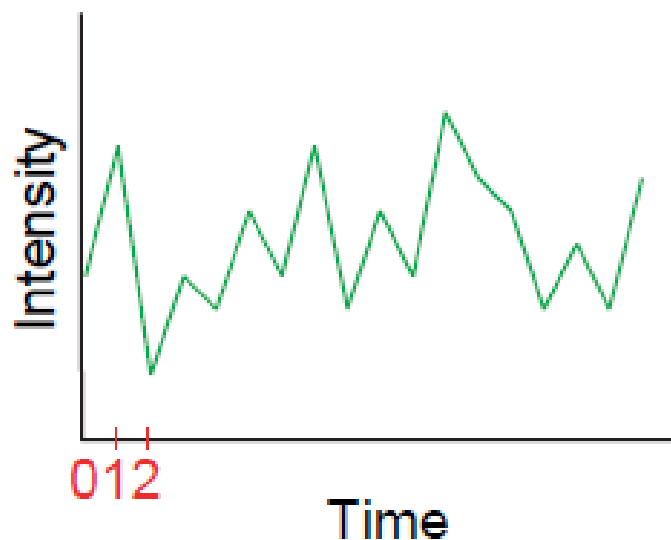
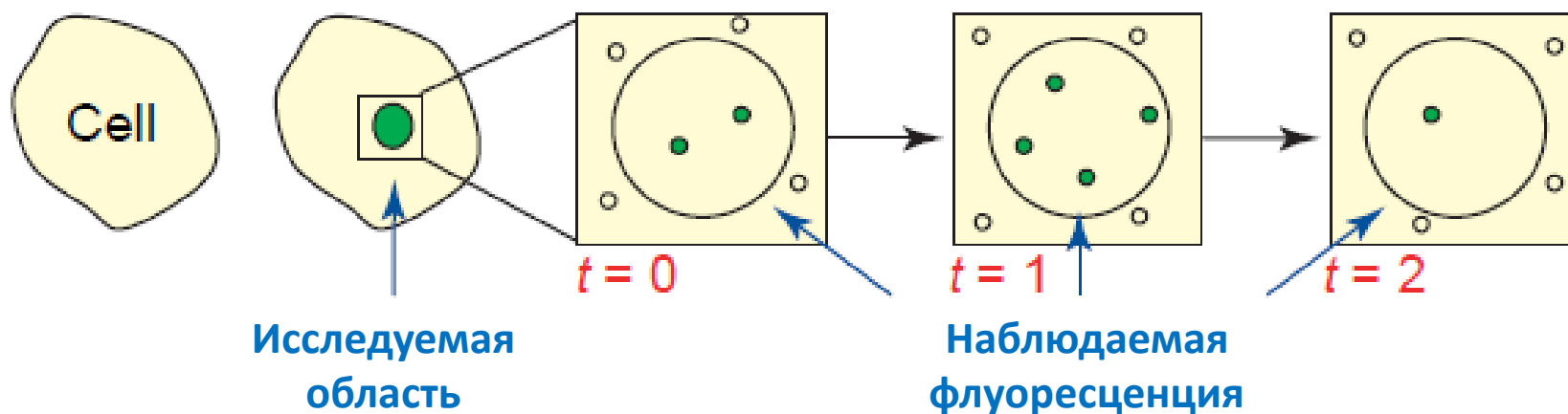
Восстановление флуоресценции, сопряженное с диффузией



После обесцвечивания пятно быстро заполняется диффундирующими молекулами, которые далее **быстро обмениваются** с обесцвеченными лигандами на рецепторах. **Однофазная кривая**.



Флуоресцентная корреляционная спектроскопия

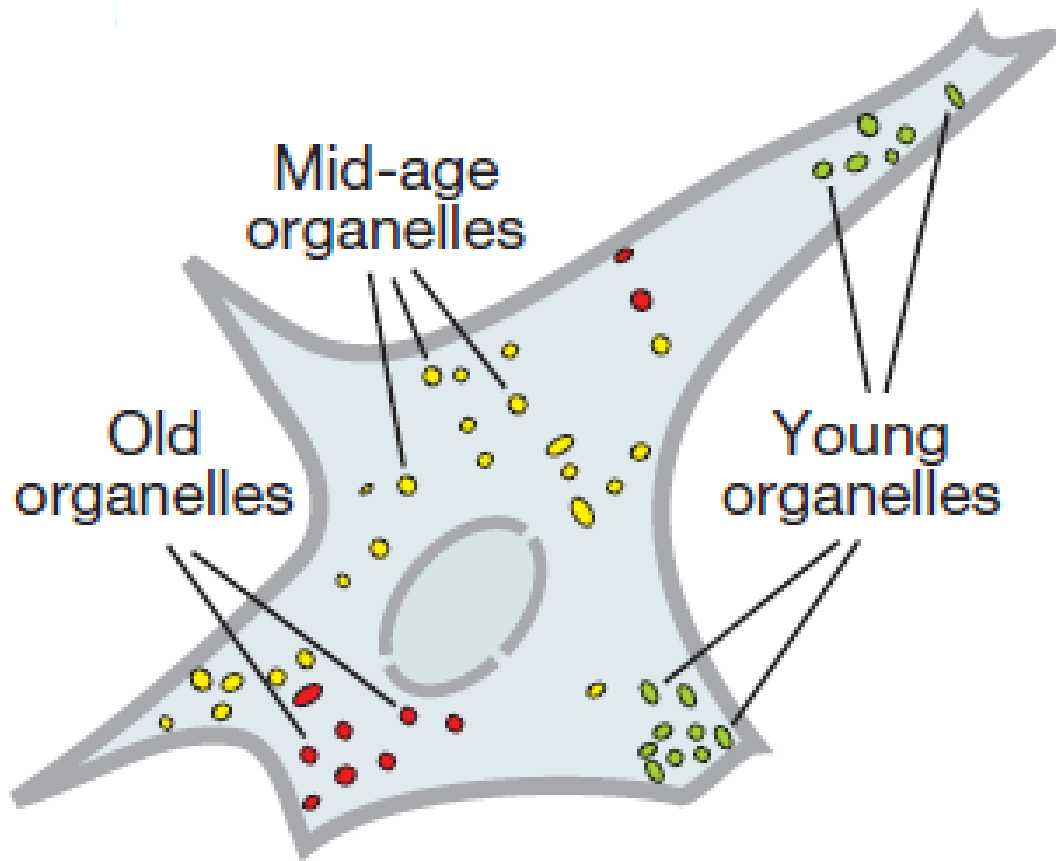


Флуктуации отражают диффузию флуорофора, его связывание и другие динамические процессы, происходящие в исследуемой области клетки

Чем короче время флуктуации – тем подвижнее молекула

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

Флуоресцентный таймер



В процессе созревания хромофора мутантный GFP-подобный белок DsRed E5 медленно изменяет спектр флуоресценции с зеленого на красный.

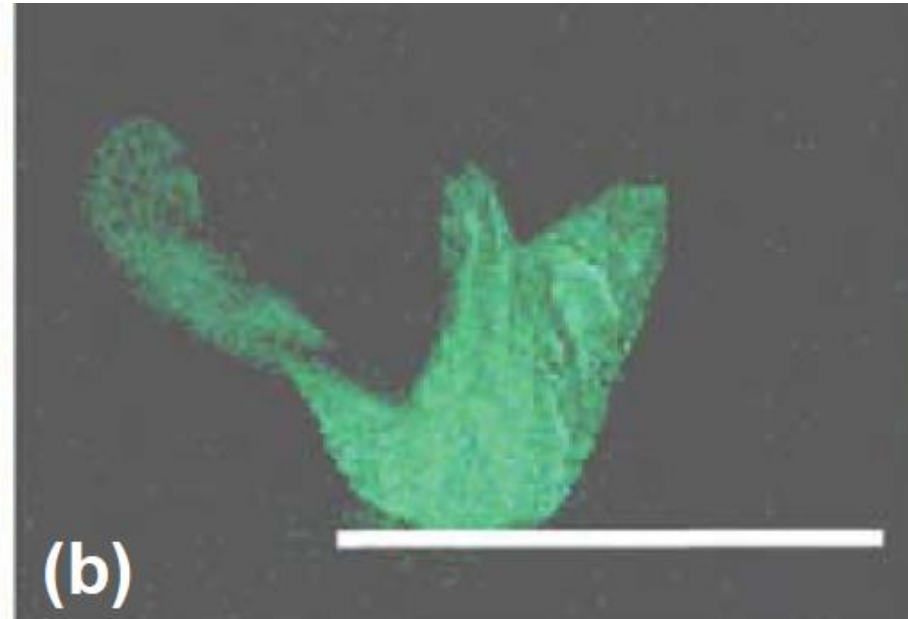
Экспрессия химерного DsRed E5 с сигнальной последовательностью, направляющей белок в органеллы

Ген под индуцируемым промотором.

Побег регенерируемого трансгенного растения, экспрессирующего EGFP



Белый свет



Голубой свет

Экспрессия GFP, интегрированного в X-хромосому



Демонстрация случайной инактивации X-хромосомы у самок