

Белки, которые потрясли мир

Е. Богданова, Ю. Лабас*, А. Гордеева*, С. Лукьянов



Сергей Лукьянов,
5-й выпуск, школа № 57
(1980 г.), закончил кафедру
эмбриологии Биофака МГУ
(1985 г.), д.б.н., член-корр.
РАН, зав. лабораторией в
Институте биоорганической
химии РАН, luk@ibch.ru



Екатерина Богданова,
8-й выпуск (Микробоссы),
школа № 520 (1986 г.),
закончила кафедру
молекулярной биологии
Биофака МГУ (1993 г.),
к.б.н., научный сотрудник в
Институте биоорганической
химии РАН, katya@ibch.ru

Цвет и свет

Окружающие нас вещества способны поглощать и отражать свет. Ту часть спектра, которую вещество отражает, мы видим и воспринимаем как цвет. Например, всем известный хлорофилл поглощает красную и синюю части спектра, а отраженный им зеленый цвет определяет зеленую окраску листьев на деревьях.

Некоторые вещества способны не только поглощать, но испускать свой собственный свет. Это явление называется люминесценцией. Когда же люминесценцию производят вещества из живых организмов — биолюминесценцией.

Впервые биолюминесценция была описана в 1761 г. Тогда по приказу короля датский военный корабль вез из Копенгагена в Смирну научную экспедицию. Одним из ее участников был

*Юлий Александрович Лабас, к. б. н., ведущий научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и Анна Викторовна Гордеева, аспирантка того же института, — специалисты в биолюминесценции. Они не имеют отношения к биоклассу, но приняли участие в написании этой статьи.

зоолог Форскол. Однажды в начале марта, когда корабль плыл по Северному морю, пассажиры заметили в воде странное свечение. Причиной оказались небольшие, с крупную монету величиной, медузы, «способные светиться внутри». Форскол выловил несколько таких медуз и поместил их в ведро. Если медуз тревожили, они ярко светились зеленым фосфорическим светом. Форскол заспиртовал несколько экземпляров медуз и записал по-латыни в своем походном дневнике: «При раздражении и гибели светятся». С этой записи началась история исследований экворей (*Aequorea*), как позже назвали этот род медуз (от лат. «aqua» — вода, рисунок 1).

Медуза экворея далеко не единственный способный к биолюминесценции организм. Известны более тысячи биолюминесцентных видов. Это бактерии, динофлагелляты, радиолярии, грибы и подвижные многоклеточные животные разных типов — от беспозвоночных до рыб. Большинство светящихся существ — обитатели морских глубин, но есть среди них и наземные (отдельные виды грибов, земляных червей, улиток, многоножек и насекомых). Пресноводных биолюминесцентных видов по невыясненным еще причинам практически нет, кроме одной новозеландской улитки и нескольких видов бактерий.

Колонии бактерий, высшие грибы и некоторые другие организмы светятся непрерывно (статически). Такой свет привлекает животных, что способствует попаданию бактерий в нового хозяина и распространению спор грибов. Однако большинство биолюминесцентных организмов, включая медузу экворею, генерируют короткие (0,1–1,0 сек) световые вспышки в от-



Рисунок 1. Светящаяся в темноте медуза рода экворея.

вет на внешние раздражения. Эти вспышки чаще всего предназначаются для отпугивания хищников или быстро движущихся животных, способных механически повредить субтильный светящийся организм (медузу, гребневика и т.п.) при случайном столкновении. В других случаях свет используют для внутривидовой коммуникации — как сигнал, привлекающий особи другого пола (например, у светляков). У некоторых глубоководных рыб над ртом имеется подвижный отросток — «удилище», а на нем — световая приманка для жертвы. Другие рыбы используют свои светящиеся органы для освещения ближнего пространства и т.д.

Как появились биолюминесцентные системы

Еще Ч.Дарвин отметил, что происхождение биолюминесценции очень непросто объяснить теорией естественного отбора. Полезный эффект свечения всецело связан со зрительным восприятием животных; следовательно, оно должно быть хорошо заметным. Кроме того, если возникают световые вспышки, то они должны с момента своего появления быть приурочены ко вполне определенным поведенческим ситуациям, например сопровождать двигательную реакцию, вызванную приближением хищника. Иначе от свечения никакой пользы не будет. Здесь нет места постепенному переходу за счет отбора от сверхслабого свечения, свойственного всему живому, но выявляемого только приборными методами, к более яркому. Ведь ниже порога видимости не будет никакого отбора.

Следовательно, у некоторых несветящихся видов время от времени должны случайно возникать мутанты, ярко светящиеся непрерывно или при каких-то вполне определенных обстоятельствах, например при испуге (что повышает шансы на выживание). Только так может начаться процесс естественного отбора, приводящий к дальнейшему усовершенствованию биолюминесцентной системы.

Заметим в этой связи, что у многоклеточных животных обычно излучает свет не все тело, а только определенный тип клеток, так называемые фоточиты, сгруппированные обычно в специализированные органы свечения — фотофоры, которые у некоторых рыб и кальмаров устроены очень сложно. В ряде случаев эти органы светятся непрерывно из-за обитающих в них симбиотических светящихся бактерий. В прочих случаях свечение импульсное. Оно бывает внутриклеточным или секреторного типа. Послед-

нее возникает при смешении выбрасываемых из организма веществ, покрывающих его светящейся слизью или образующих в воде «световое облако».

Субстраты — люциферины и ферменты — люциферазы

Еще в 1885 г. французский ученый Дюбуа показал, что в биолюминесцентной реакции участвуют термостойкий субстрат, люциферин, и разрушающийся при нагревании фермент люцифераза. У разных организмов субстраты и ферменты, ответственные за биолюминесценцию, совершенно разные. Названия их чисто условные. Всего насчитывается больше 30 различных биохимических вариантов биолюминесценции, независимо возникших в ходе эволюции у различных организмов.

У некоторых светящихся организмов за свечение ответственны стойкие комплексы люциферина и люциферазы — фотопротеины. В таких комплексах люциферин временно или постоянно слит в одно целое с люциферазой.

Роль кислорода и антиоксидантное происхождение биолюминесцентных систем

Что же служит непосредственной причиной свечения?

Для свечения всегда необходим молекулярный (O_2) или атомарный кислород. У атома кислорода имеется несколько нестабильных возбужденных состояний. Переход атомов из возбужденного в устойчивое состояние сопровождается испусканием инфракрасных фотонов. Свечение же организмов обычно синее или зеленое. Это достигается суммированием энергий одновременного перехода из возбужденного состояния в основное двух или более атомов кислорода при одновременном разрыве $O-O$ и $C-C$ связей в так называемой диоксетановой перекиси. Диоксетановая перекись — нестойкое соединение. Она образуется и тут же распадается в процессе окисления субстрата — люциферина молекулярным кислородом или активными формами кислорода (АФК).

АФК — это анион с одним электроном на внешней орбите (супероксид), перекись водорода, синглетный кислород, крайне агрессивный окислитель — гидроксил-радикал и др. Они играют громадную роль в жизни организмов. Это «полуфабрикат» и «брак» дыхательных процессов, в которых нормальный конечный продукт — восстановленный кислород с четырьмя электро-

нами на внешней орбите в составе молекулы воды. Опасность АФК обусловлена их высокой способностью окислять «что попало» в живом организме: ДНК и РНК, белки и жиры и т.д.

Для защиты от АФК организмы вынуждены постоянно потреблять и синтезировать разнообразные вещества — антиоксиданты (витамины С и Е, каротиноиды и т.п.), а также ферменты, из которых главные — супероксиддисмутаза (преобразователь супероксида в перекись водорода) и каталаза (преобразует перекись водорода в воду).

Однако в умеренных количествах АФК нужны для жизнедеятельности и образуются посредством специальных ферментов (НАДФН-оксидазы и др.). АФК секретируются белыми кровяными тельцами для уничтожения микробов. Кроме того, они участвуют в регуляции клеточного деления, в запуске «запрограммированной смерти» клеток — апоптоза, в управлении тонусом кровеносных сосудов и во многих других жизненно важных процессах.

Мы специально затронули этот сложный вопрос, потому что работы последних лет показали: практически любой люциферин и многие люциферазы имели «добиоллюминесцентную» функцию защиты организма от АФК. Эти субстраты и ферменты продолжают выполнять такую функцию у ближайших несветящихся родичей биоллюминесцентных организмов. Достаточно оказалось одной малой «поломки» исходной (окислительной) реакции, чтобы в ходе ее появилось хорошо заметное свечение. Возник новый признак — биоллюминесценция. Его закрепил естественный отбор. Пока природой таких предполагаемых нами мутаций никто специально не занимался. Само их обнаружение — дело будущего.

Активируемые ионами кальция фотопро-теины

Вернемся, однако, к экворее. В 1961–1962 гг. американские ученые Джонсон и Шимомура выделили из нее способный к свечению белковый комплекс, состоящий из белка — люциферазы (названной экворин) и имидазолпиразинового производного — люциферина, который назвали целенторазинном (от *Coelenterata* — кишечнополостные). Оказалось, он светится в присутствии свободного кальция и некоторых других двух- или трехвалентных катионов (но не магния, который это свечение ослабляет). Позже нашли похожие белки в колониальных гидроидных полипах *Obelia longissima* и *O. geniculata*, гребневиках, радиоляриях. Белок из полипов обелий (*Obelia*) был назван обелин.

Во всех случаях оказалось, что светится комплекс люциферазы с перекисью предварительно присоединенного к ней и ею же окисленного люциферина (у всех вышеупомянутых организмов это целентеразин). В момент присоединения кальция к люциферазе пространственная структура (конформация) этого белка изменяется так, что он утрачивает связь с перекисью люциферина. Перекись при этом теряет стабильность и превращается в окисел, попутно отделяя CO_2 и испуская синий свет.

Яркость такого свечения достаточно велика. В связи с этим вскоре после выделения экворина родилась идея использовать этот белок и другие ему подобные (например, обелин) как индикаторы свободных ионов кальция во всевозможных клетках.

В 1967 г. английские ученые Эшли и Риджуэй с помощью стеклянного микроэлектрода впрыснули экворин в гигантское мышечное волокно морского желудя (сидячего морского ракообразного). Используемая установка позволяла одновременно регистрировать мембранный потенциал клетки, ее свечение, создаваемое впрыснутым экворинном, и натяжение. Так было обнаружено, что именно ионы кальция, цитоплазматическая концентрация которых повышается в 10 и более раз при электрическом раздражении клетки, запускают мышечное сокращение.

В дальнейшем сотни новых работ показали, что ионы кальция запускают самые разные клеточные процессы: мышечные и немускульные сокращения, выброс нейромедиаторов в синаптическую щель, всевозможные виды секреции и т.д. Были синтезированы новые флуоресцирующие индикаторы Ca^{2+} и других ионов, проникающие, в отличие от светящихся белков, сквозь клеточную мембрану. Однако начало этой новой эре положили, несомненно, светящиеся белки экворин и обелин.

Зеленый флуоресцентный белок GFP

Еще Джонсон и Шимомура, выделяя экворин, отметили, что экворея светится зеленым светом с максимумом интенсивности при длине волны 508 нм. Между тем выделенный экворин излучает синий свет с максимумом при 465 нм.

Оказалось, что кроме экворина в фотогенных тканях медузы присутствует другой белок. Возбуждаясь под действием синего или ультрафиолетового излучения, этот белок испускает зеленый свет — флуоресцирует. За это свойство белок назвали зеленым флуоресцентным белком (GFP — от green fluorescent protein, рисунок 2).

Флуоресцентные белки

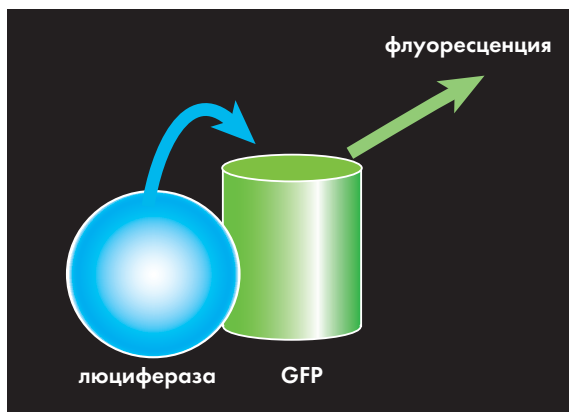


Рисунок 2. Зеленый флуоресцентный белок GFP — часть биолюминесцентной системы медузы *Aequorea victoria*. Синий свет экворина возбуждает GFP, и он продуцирует зеленую флуоресценцию.

Ген GFP был клонирован в 1992 г. Чуть позднее получили белок в виде кристалла. Оказалось, что молекула GFP укладывается в структуру, напоминающую бочку с одиннадцатью так называемыми бета-складками — завернутыми винтом вертикальными прутьями. «Дно» и «крышку» образуют альфа-спиральные участки того же самого белка. А внутри этой конструкции спрятана флуорофорная часть (хромофор).

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



Рисунок 3. Кристаллическая структура GFP: бочка, внутри которой образуется хромофор.

Но не только уникальная структура и способность к флуоресценции привлекли внимание исследователей. GFP оказался уникальным инструментом для прижизненного мечения клеток и клеточных структур. Введение гена GFP в клетки большинства организмов от бактерий до высших млекопитающих и растений приводило к тому, что клетки начинали светиться зеленым светом при облучении ультрафиолетом. Ведь для того, чтобы внутри молекулы GFP сформировался и начал светиться хромофор, не требуется никаких внешних добавок (кофакторов или субстратов), нужен только молекулярный кислород (рисунок 4).

Вскоре GFP стал чрезвычайно популярен как прижизненный маркер. К 2002 г. общее число работ с применением GFP как генетического маркера превысило 9000.

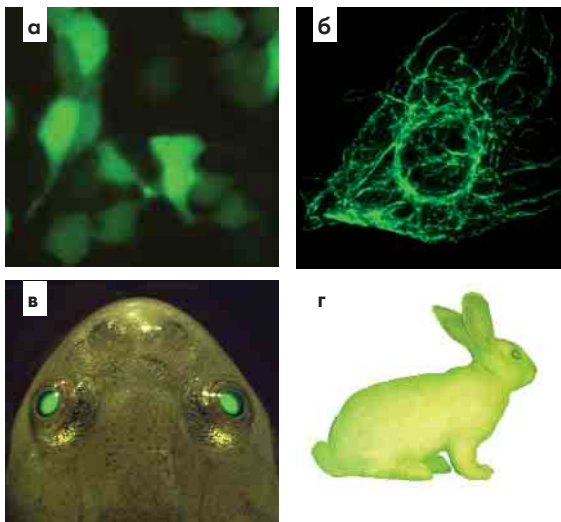


Рисунок 4. Мечение с помощью GFP. (а) — мечение клеток; (б) — белков; (в) — органов; (г) — тканей.

Разноцветные флуоресцентные белки

Вскоре после появления GFP возникло желание одновременно окрашивать сразу несколько структур или белков в клетке, следить за их взаимодействиями. Однако, хотя подобные GFP белки и были описаны у ряда светящихся представителей двух классов кишечнополостных животных — гидроидов (*Aequorea*, *Obelia* и др.) и кораллов (морское перо *Renilla*), не было клонировано больше ни одного гена. К тому же все описанные белки были зелеными.

Попытки создать мутанты GFP с измененными спектральными свойствами привели лишь к частичному успеху: были созданы слегка более голубой и слегка более желтый варианты, однако

одновременное их отслеживание в клетке было сопряжено с понятными трудностями — спектры этих белков отличались не настолько сильно, как хотелось.

Прогресс в расширении цветовой палитры тормозило сложившееся убеждение, что все GFP-подобные белки обязательно встроены в биолюминесцентные системы как преобразователи синего света. Мысль о том, что они могут функционировать совсем в иных качествах, выполняя совершенно другие функции, и при этом вовсе не обязательно быть «зелеными» и «флуоресцирующими», долго никому не приходила в голову.

Осенью 1998 г. в работу включилась наша исследовательская группа. Один из участников проекта и соавтор этой статьи Ю.А. Лабас обратил внимание, что классы кишечнополостных Hydrozoa и Anthozoa, у которых обнаружены GFP, разошлись еще в глубоком докембрии. Следовательно, весьма вероятно, что все эти организмы унаследовали GFP от общих неболюминесцентных предков. В то же время крупные подвижные животные с хорошо развитым зрением — рыбы, головоногие моллюски, высшие раки (т.е. потенциальные враги, а значит, и эволюционный повод обретения биолюминесценции) — появились не ранее кембрийского периода. Стало быть, у GFP-подобных белков, как и у других компонентов системы свечения (люциферин, люцифераза и т.д.), могли быть какие-то добиолюминесцентные функции. Тогда почему бы им ни сохраниться и по сей день?

В самом деле: у целого ряда несветящихся (не способных к биолюминесценции) коралловых полипов, живущих в морских аквариумах Московского зоопарка и у любителей, при освещении ультрафиолетом или голубым светом появляется яркая флуоресценция. У некоторых — это яркая зеленая флуоресценция, напоминающая флуоресценцию GFP экворей. Так, например, флуоресцируют кончики щупалец актинии *Anemonia majano*. У других коралловых полипов флуоресценция — желтая, оранжевая или ярко красная (рисунок 5).

Большинство ученых полагали в то время, что за флуоресценцию неболюминесцентных коралловых полипов ответственны какие-то низкомолекулярные солнцезащитные «пигменты». А вдруг это не так?

Сколь ни безумными казались эти мысли, мы начали поиск таких белков. Сначала выделили матричную РНК (мРНК) из ярко окрашенных участков тела шести разных видов мягких кораллов — в первую очередь из флуоресцирующих кончиков щупалец актинии *A. majano*. Потом



Рисунок 5. Флуоресценция и окраска неболюминесцентных коралловых полипов.

получили из мРНК кодирующую ДНК (кДНК) и попробовали «выловить» из нее молекулы, сходные по нуклеотидной последовательности с геном зеленого белка экворей. «Ловлю» осуществляли с помощью праймеров — синтезированных одноцепочечных кусочков этого гена, способных заякорить на себе комплементарную цепь ДНК. Для такой цели синтезировали участки в 20–25 нуклеотидов, интуитивно показавшиеся самыми консервативными в гене GFP из экворей *Aequorea victoria*. «Пойманный» ген пересадили в геном кишечной палочки. И она заблестала ярким зеленым цветом!

Вскоре мы узнали от известного московского аквариумиста А.Романько, что в его морском аквариуме живет *Ricordia yuma* — удивительная дискосома (дисконидная актиния без щупалец), которая при синем освещении флуоресцирует ярким красно-оранжевым цветом (у других дискосом он сине-зеленый). Само собой разумеется, мы заподозрили, что и у этой дискосомы есть белок, подобный GFP. Далее дело пошло быстрее. Сравнивая последовательность GFP и нового белка из *A. majano*, легче было конструировать праймеры для поиска новых вариантов. И вот не прошло и трех месяцев, как в нашей

Флуоресцентные белки

коллекции появились не только зеленые, но и желтые и даже красные флуоресцентные белки.

Гены вновь открытых белков и GFP из *A. victoria* оказались гомологичными, но степень идентичности соответствующих им аминокислотных последовательностей не превышала 40%. Это, конечно, не так уж мало, если учесть, что ветви кораллов и гидроидов разделились примерно полмиллиарда лет назад! Однако вероятность поймать праймером фрагмент гена с полным совпадением нуклеотидов при первой попытке Михаила Матца (8-й выпуск биокласса) не превышала вероятность выигрыша в «Спортлото». Но — чудо. Иначе не скажешь. Одним словом, в самом начале охоты за генами белков, подобных зеленому флуоресцирующему, всем участникам сопутствовало фантастическое везение.

В дальнейшем работа стала почти рутинной. И вот ее сенсационный результат: за большинство флуоресцентных и даже обычных окрасок (а это все цвета радуги!) несветящихся видов кораллов ответственны вовсе не разнородные низкомолекулярные «пигменты» и их комплексы с белками, как полагали ранее, а своеобразные белки одного семейства с GFP. У них одинаковые или очень близкие молекулярная масса, число аминокислотных остатков (229–266) и, что куда важнее, их третичная структура. Та же самая бочкообразная молекула и, главное, сходным образом устроенный хромофор.

Но только ли у коралловых полипов окраска и флуоресценция определяются GFP-подобными молекулами? Ведь и многие медузы вовсе не способные к биолюминесценции обладают окраской или флуоресценцией. Чтобы ответить на этот вопрос, мы предприняли поиск окрашенных или флуоресцирующих веществ у разных медуз. В результате были клонированы гены

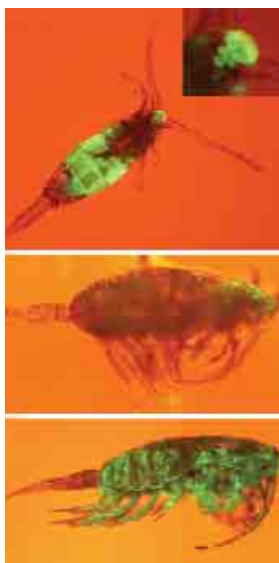


Рисунок 6. За флуоресценцию веслоногих рачков-копепод ответственны GFP-подобные белки.

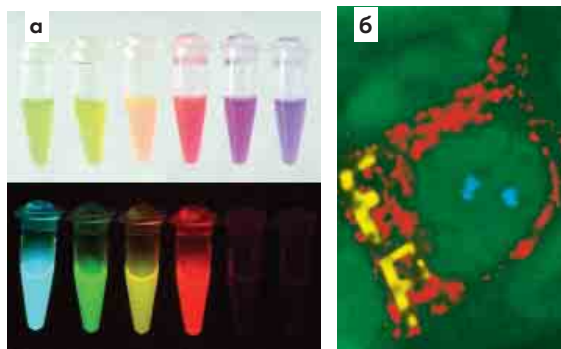


Рисунок 7. Разноцветные GFP-подобные белки коралловых полипов.

(а) — Коллекция очищенных рекомбинантных белков при обычном освещении (вверху) и их флуоресценция (внизу); (б) — многоцветное мечение клеточных структур с помощью разноцветных флуоресцентных белков: зеленый флуоресцентный белок окрашивает цитоплазму клеток; митохондрии окрашены с помощью необратимо активированного красного разжигающегося белка (о котором речь пойдет ниже), связанного с сигналом локализации в митохондриях; синий цвет получен за счет экспрессии химерного белка, состоящего из флуоресцентной метки и фибрилларина (белок, локализующийся в ядрышках). Буквы «FP» (желтый псевдоцвет) были получены путем обратимого разжигания флуоресценции красного разжигающегося белка (до его необратимой активации).

новых флуоресцентного желтого и нефлуоресцентного (окрашенного) красного белков. А вот синяя окраска края тела медузы корнерота, оказалось, не имеет никакого отношения к GFP. За нее ответственен комплекс белка уникальной структуры и неизвестного пока низкомолекулярного соединения.

Однако настоящей сенсацией стало клонирование генов GFP-подобных белков, ответственных за ярко-зеленую флуоресценцию небиолюминесцентных морских веслоногих рачков из семейства Pontellidae (рисунок 6).

Происхождение этого белка у организмов, столь неродственных кишечноротовым, пока остается загадкой.

Новые флуоресцентные белки и качественно новые возможности

Открыв цветные белки, мы получили возможность наблюдать в одном и том же объекте биосинтетическую активность сразу нескольких разных генов, различаемую по цветам флуоресценции (рисунок 7). Аналогично, появилась возможность наблюдать за развитием сразу нескольких клеточных клонов, вводя в них матричные РНК GFP-подобных белков разного цвета. Так, наш коллега А.Г. Зарайский инъецировал мРНК двух цветных белков в эмбрион шпорцевой

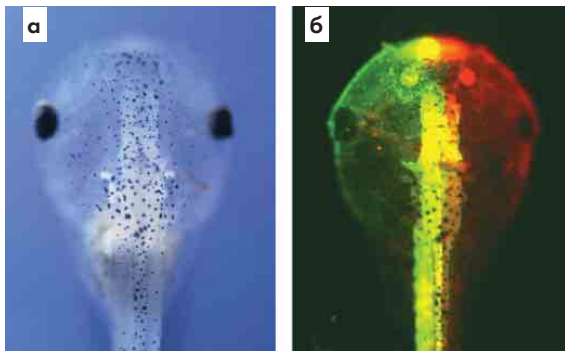


Рисунок 8. Головастики шпорцевой лягушки, экспрессирующие флуоресцентные белки из коралловых полипов.

На стадии восьми бластомеров синтетическая РНК, кодирующая два флуоресцентных белка, была заколота в два (правый и левый) дорсальные бластомеры эмбриона. Фотографии были сделаны через неделю на стадии головастика при: (а) — обычном освещении; (б) — под флуоресцентным бинокляром (компьютерное наложение фотографий зеленой и красной флуоресценции).

лягушки на стадии восьми бластомеров: красного (от *Ricordia yuma*) — в левый спинной зачаток и зеленого (от *A. majano*) — в правый. Левая половина выросшего головастика стала красной, а правая — зеленой. Их разделяла «желтая» полоса посередине тела, где смешивались цветные клетки (рисунок 8).

Однако одним лишь расширением цветовой палитры дело не ограничилось. С появлением новых флуоресцентных белков открылись принципиально новые возможности для слежения и манипуляции с живыми клетками и белками.

Флуоресцентный таймер

Оказалось, что некоторые флуоресцентные белки коралловых полипов (одни были найдены в природе, а другие получены путем введения точечных замен в последовательности природных белков) меняют цвет флуоресценции в течение времени. Первый такой белок, названный флуоресцентным таймером, сначала продуцировал зеленую флуоресценцию, которая постепенно, по мере созревания белка, заменялась на красную.

Это удивительное свойство позволяет отслеживать изменение экспрессии генов во времени. В клетке экспрессия различных генов регулируется специальными последовательностями ДНК — промоторами. Промоторы опознаются специальной группой клеточных белков — регуляторов транскрипции, — которые могут активировать или подавлять экспрессию гена. Известны промоторы, которые активированы всегда и во всех клетках, другие работают только в клетках определенного типа, третьи активируются лишь в определенный момент развития организма.

Если поместить последовательность ДНК, кодирующую белок-таймер, под промотор какого-нибудь гена, регуляцию экспрессии которого надо изучить, и ввести полученную конструкцию в клетку, то при активации промотора появится сначала только зеленая флуоресценция. Затем постепенно зеленая форма белка будет переходить в красную, и клетка станет желтой. Она будет желтой, пока будет работать промотор, однако вскоре после его инактивации, уровень зеленой флуоресценции начнет падать. Отслеживая уровень зеленой и красной флуоресценции в клетке можно рассчитать время начала и остановки работы промотора.

Фотоактивируемые и фотопереключаемые белки

Другое удивительное открытие касается флуоресцентных белков, которые меняют свои флуоресцентные свойства при облучении светом определенной длины волны. Первым был открыт разжигающийся красный белок из *Anemonia sulcata*.

При экспрессии этого белка в клетке он не флуоресцирует, а дает малиновую окраску. Однако при освещении зеленым светом белок разгорается и начинает светиться красным светом. Разжигание природного белка было обратимым, и флуоресценция быстро исчезала (рисунок 9а).

Чуть позднее мы получили мутантный белок, который был способен как к обратимому, так и необратимому разжиганию. Необратимо разожженный белок можно хранить в течение долгого времени — он сохраняет флуоресцентные свойства. На рисунке 9б показана пробирка с таким активированным белком, сфотографированная через год после того, как на него посветили зеленым светом.

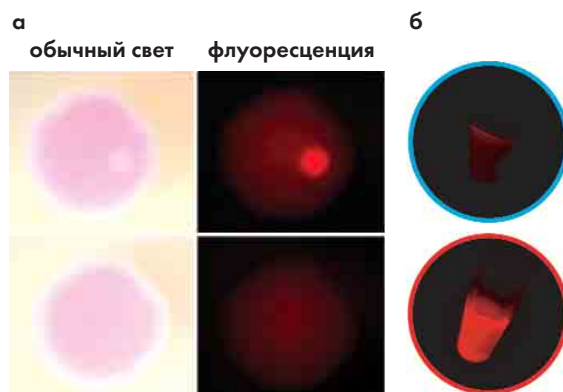


Рисунок 9. Разжигающийся красный белок.

(а) — Экспрессия в кишечной палочке. На верхней панели показана колония, участок которой был освещен зеленым светом. В нем видна яркая красная флуоресценция. На нижней панели — та же колония через 5 мин. Флуоресценция погасла. (б) — Необратимое разжигание. Вверху — неактивированный белок; внизу — через год после разжигания.

Флуоресцентные белки

Как оказалось, почти из любого флуоресцентного белка можно получить мутант, способный менять свои свойства при облучении. Вот только свойства у этих белков самые разные. Так из GFP и его ближайших гомологов из близких видов медуз, а также из GFP-подобных белков некоторых кораллов были получены фотопереключаемые производные.

При освещении светом определенной длины волны эти белки меняют цвет своей флуоресценции. К таким белкам относятся, например, PS-CFP — белок, меняющий цвет флуоресценции с голубого на зеленый под действие ультрафиолетового света, и Dendra — способный к фотоконверсии из зеленого в красный (рисунок 10).

Фотоактивируемые и фотопереключаемые белки стали очень популярными инструментами для отслеживания перемещения клеток, клеточных органелл и белков в системах *in vivo*. На рисунке 11 показано, как белок PS-CFP позволил проследить в режиме реального времени обмен содержимым между двумя клеточными эндосомами.

Известно что, при гетерогенной экспрессии допаминовый транспортер попадает в эндосомы. Для исследования того, могут ли эндосомы обмениваться своим содержимым, последовательность гена PS-CFP была пришта к последовательности, кодирующей допаминовый транспортер, и экспрессирована в эукариотической клеточной линии. Далее химерный белок был «перекрашен» в некоторых эндосомах. Теперь мы получили возможность наблюдать под флуоресцентным микроскопом за перекрашенными эндосомами и их взаимодействием с остальными эндосомами (другого цвета) внутри живой клетки.

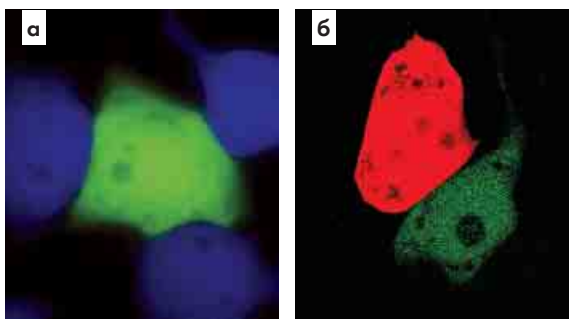


Рисунок 10. Белки, меняющие цвет флуоресценции при облучении.

(а) — белок PS-CFP, экспрессированный в клетках млекопитающих. В центральной клетке флуоресценция была изменена с помощью облучения ультрафиолетовым светом.

(б) — белок Dendra в клетках млекопитающих. Одна из клеток была облучена синим светом (она имеет красную флуоресценцию).

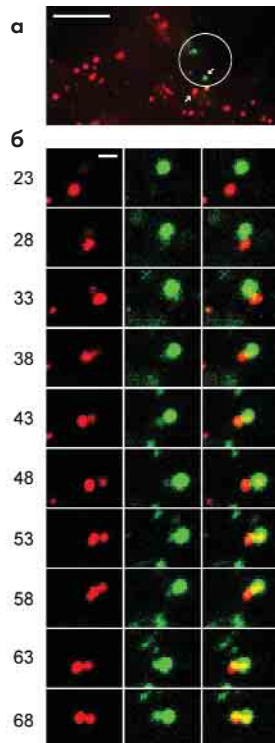


Рисунок 11. Обмен содержимым между двумя эндосомами в клетке.

(а) — PS-CFP был активирован с помощью при-цельного облучения в двух эндосомах (обведены). Шкала — 10 μm . Стрелками показаны эндосомы, за которыми велось наблюдение;

(б) — сигналы, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа в ECFP- и FITC-каналах (фильтры для слежения за голубой и зеленой флуоресценцией), показаны красным и зеленым псевдоцветом соответственно. В третьей колонке — результат наложения изображений, полученных в ECFP- и FITC-каналах. Слева указано время, прошедшее со времени активации PS-CFP (мин). Шкала — 1 μm .

Белок-киллер

Еще одним новым инструментом, представляющим интерес для исследователей, стал белок, способный под действием света производить АФК. Как правило, GFP-подобные белки не обладают таким свойством, ведь, возможно, одной из их функций была (и остается?) защита от АФК. Однако при проверке множества белков из нашей коллекции, как природных, так и мутантов, для одного было показано, что он становится токсичным для клеток при облучении светом определенной длины волны.

Мы использовали простой тест: гены, кодирующие флуоресцентные белки, вводили в кишечную палочку и освещали культуру светящихся бактерий светом разных длин волн. При этом измеряли количество живых бактерий до и после облучения.

Флуоресцентный мутант красного окрашенного белка из антомедузы, облучение которого в клетках бактерий приводило к их массовой гибели, получил название KillerRed (красный киллер). Проверка показала, что его индуцируемая светом токсичность действительно определяется продукцией АФК. Иными словами, найденный нами белок оказался *фотосенситайзером*. При облучении зеленым светом он терял способность флуоресцировать и начинал производить АФК.

Все ранее известные фотосенситайзеры (молекулы, облучение которых светом определенной длины волны приводит к выделению АФК) — химические соединения. Очевидно, что

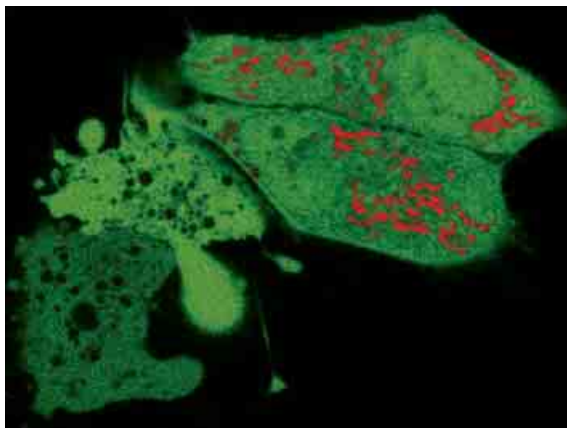


Рисунок 12. Направленное убийство клеток с помощью белка KillerRed, экспрессированного в митохондриях. Две нижние клетки были облучены зеленым светом. Это привело к обесцвечиванию белка KillerRed в митохондриях и клеточной смерти (сравните с двумя верхними клетками, которые не подвергались облучению).

возможности их введения в клетки и связывания с биологическими молекулами ограничены.

В отличие от химических аналогов, KillerRed является генетически кодируемым фотосенситайзером, его можно непосредственно экспрессировать в клетке. Можно также сконструировать молекулу ДНК, которая будет кодировать так называемый химерный белок, состоящий из молекулы KillerRed и любого клеточного белка-партнера.

Однако зачем это нужно? Существует такой подход к исследованию функции белков в клетке или роли клетки в организме: исследуемый объект инактивируется каким-либо образом, и исследователь наблюдает, к каким изменениям в системе приводит такая инактивация.

KillerRed позволяет направленно инактивировать клетки или белки прямо внутри живой сформированной системы. Достаточно просто посветить в нужное место. При этом может быть, например, инактивирован белок в какой-

либо части клетки или единственная клетка в организме (это важно, например, при выяснении клеточной судьбы в ходе развития).

На рисунке 12 показаны клетки, которые экспрессируют белок KillerRed, связанный с сигналом локализации в митохондриях. Две клетки наверху — необлученные. Митохондрии клеток обладают красной флуоресценцией за счет накопления в них белка KillerRed. Зеленый цвет цитоплазмы клеток определяется другим флуоресцентным белком-маркером, который позволяет следить за клетками после облучения зеленым светом (как вы помните, флуоресценция KillerRed при этом пропадает). Это видно на примере двух нижних клеток, которые подверглись направленному облучению. Красная флуоресценция отсутствует, а клетки имеют совершенно другую форму. Активация KillerRed в этих клетках увеличила продукцию АФК. А повышение концентрации АФК в митохондриях является сигналом для включения механизма апоптоза (программируемой клеточной смерти).

Заключение

Возможности применения флуоресцентных белков для исследования живых систем не ограничиваются приведенными выше примерами. Уже сегодня активно идет разработка биосенсоров, основанных на создании флуоресцентных белков, меняющих спектральные характеристики при взаимодействии с важными для жизни клетки веществами (например, Ca^{2+} , H_2O_2 , NO). Еще более захватывающие перспективы открываются при использовании фотоактивируемых белков для создания нового поколения световых микроскопов, с разрешающей способностью выше теоретического предела в $1/2$ длины волны. Но эти разработки еще слишком молоды, чтобы оценить их реальное значение для исследователей.