



УДК 577.112.(012.6 + 088.52):593.6-117.62

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ЖЕЛТОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА zYFP538 (*Zoanthus* sp.) ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 1.8 Å

© 2007 г. Н. В. Плетнева<sup>\*,#</sup>, С. В. Плетнев<sup>3\*</sup>, Д. М. Чудаков<sup>\*</sup>, Т. В. Тихонова<sup>2\*</sup>, В. О. Попов<sup>2\*</sup>, В. И. Мартынов<sup>\*</sup>, А. Влодавер<sup>4\*</sup>, З. Даутер<sup>3\*</sup>, В. З. Плетнев<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

<sup>2\*</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва;

<sup>3\*</sup>Центр синхротронного излучения, Национальный институт рака, Аргонн, Иллинойс, США;

<sup>4\*</sup>Лаборатория макромолекулярной кристаллографии, Национальный институт рака, Фредерик, Мэриленд, США

Поступила в редакцию 18.01.2007 г. Принята к печати 22.01.2007 г.

Пространственная структура тетрамерной формы желтого флуоресцентного белка zYFP538 (zFP538) из морского полипа рода *Zoanthus* sp. установлена методом рентгеноструктурного анализа при разрешении 1.8 Å. Мономер zYFP538 имеет типичную для зеленых флуоресцентных белков (GFP) структуру, представляющую собой β-бочонок, сформированный из 11 антипараллельных β-сегментов и одной центральной α-спирали, содержащей хромофор. Аналогично TurboGFP в структуре zYFP538 обнаружена заполненная водой пора, ведущая к остатку Туг67 хромофора, которая, предположительно, обеспечивает доступ молекулярного кислорода, необходимого для созревания хромофора. В результате посттрансляционной модификации хромофоробразующей триады -Lys66-Туг67-Gly68- формируется трициклическая структура, состоящая из пятичленного имидазолинового цикла, фенольного кольца остатка Туг67 и дополнительного шестичленного тетрагидропиридинового цикла. Образование хромофора завершается фрагментацией основной цепи по связи C<sup>α</sup>-N остатка Lys66. Сделано предположение, что причиной, инициирующей переход от зеленой бициклической формы к желтой – трициклической, является энергетический конфликт между положительно заряженной боковой цепью остатка Lys66 хромофора с гидрофобным окружением из боковых цепей остатков Ile44, Leu46, Phe65, Leu204 и Leu219. Анализ стереохимии контактирующих поверхностей на интерфейсах тетрамера выявил группу ключевых консервативных остатков, ответственных за олигомеризацию. Наряду с другими остатками их следует учитывать при создании мономерных форм, используемых в качестве маркеров белков и клеточных органелл.

*Ключевые слова:* GFP-подобные белки, желтый флуоресцентный белок, *Zoanthus* sp., кристаллическая структура, структура хромофора, структура тетрамера, межсубъединичные интерфейсы.

### ВВЕДЕНИЕ

Представители семейства зеленого флуоресцентного белка (GFP, *M* 25–30 кДа) обладают уникальной способностью генерировать флуоресценцию в живых организмах. Они покрывают широкий диапазон цветов в спектре эмиссии – от цианового до красного ( $\lambda_{эм} = 442–645$  нм). GFP-подобные белки нашли широкое применение в молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии и некоторых медицинских областях в качестве инструментов для мечения белков, клеточных компартментов, клеток и тканей, в качестве маркеров, позволяющих следить *in vivo* за экспрессией белков, их локализацией, передвижениями и взаимодействиями. На их основе создаются

сенсоры для измерения pH, концентраций ионов Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, cAMP, активности клеточных киназ [1–7]. По сравнению с химически синтезируемыми флуорофорами, такие генетически кодируемые инструменты имеют ряд преимуществ. С помощью химерных конструкций можно помечать любой интересующий исследователя белок, а также направить флуоресцентный белок в любой клеточный компартмент. Использование тканеспецифичных промоторов позволяет окрасить интересующие ткани на определенной стадии развития.

Третичная структура флуоресцентных белков (ФБ) имеет форму β-бочонка, в центре которого располагается хромофор. Хромофор защищен от окружения, благодаря чему ФБ не фототоксичны и их свойства мало зависят от параметров среды, таких, например, как pH. Хромофор образуется в

<sup>#</sup>Автор для связи (тел.: (495) 330-7510; эл. почта: nadand@mail.ru).

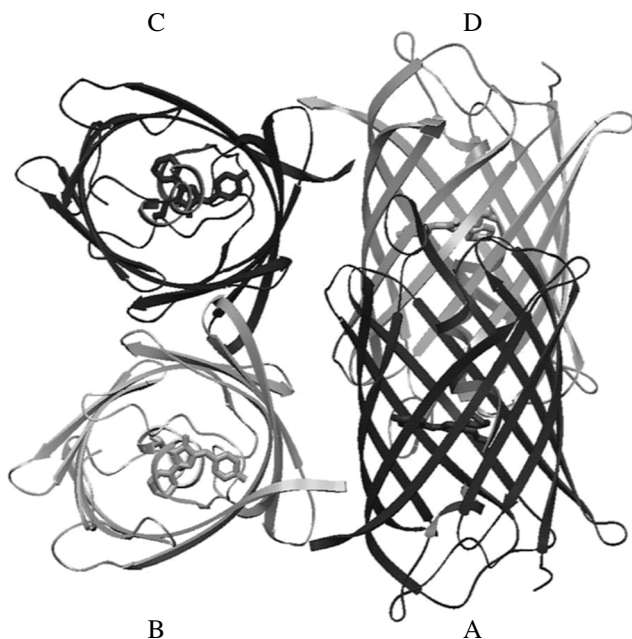


Рис. 1. Пространственная структура тетрамера zYFP538.

результате автокаталитической посттрансляционной модификации трех аминокислотных остатков белковой молекулы -X-Tyr-Gly-, осуществляемой с помощью молекулярного кислорода без участия каких-либо кофакторов или ферментов [8]. В большинстве случаев посттрансляционная модификация завершается образованием стандартной “зеленой” формы, хромофор которой представляет собой планарную бициклическую систему сопряженных двойных связей, содержащую пятичленный имидазолиновый цикл и фенольное кольцо остатка Tyr [2, 4]. В ряде случаев, процесс на этой стадии не заканчивается. Происходит дополнительная модификация окислительного характера, часто с образованием ацилиминной связи у первого остатка хромофоробразующей триады, приводящая к расширению конъюгированной  $\pi$ -электронной системы хромофора и соответственно к сдвигу максимумов поглощения и эмиссии в длинноволновую область спектра. Таким образом происходит образование “желтых” и “красных” форм ФБ с диапазоном эмиссии от 528 до 590 нм [9–11]. Четвертичная структура большинства GFP-подобных белков дикого типа имеет тетрамерную организацию [4, 5].

В большинстве случаев, практическое применение ФБ требует создания мономерных мутантных вариантов, обладающих высоким квантовым выходом, высокой скоростью созревания хромофора и фотостабильностью. В этой связи, важно понять, каким образом особенности стереохимии белка определяют характеристики цветового

спектра, и установить ключевые остатки, ответственные за формирование структуры мономера и олигомеризацию белка. Знание механизма образования хромофора, его структуры и аминокислотного окружения позволяет с помощью мутагенеза создавать улучшенные варианты белков, удовлетворяющих требуемым критериям.

В настоящей работе представлены результаты рентгеноструктурного исследования желтого флуоресцентного белка zYFP538 ( $\lambda_{\text{возб}} = 525$  нм,  $\lambda_{\text{эм}} = 538$  нм; [12]) из морского полипа рода *Zoanthus* sp. при разрешении 1.8 Å (пространственная группа  $P2_12_12_1$ ). Работа является продолжением исследования другой кристаллической формы ( $P3_121$ ) этого белка при более низком разрешении 2.7 Å [9]. В связи с важностью создания мономерных форм ФБ для практического применения особое внимание в работе обращено на стереохимическую организацию межсубъединичных интерфейсов в тетрамерной структуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Структурная организация субъединицы

**Структура мономера.** Асимметричная часть кристаллической ячейки zYFP538 содержит один тетрамер. Высокое качество карты электронной плотности позволило однозначно вписать остатки 6–231 для всех четырех субъединиц (A, B, C, D). Средняя величина температурного  $B$ -фактора у субъединицы D на 3.5 Å выше, чем у остальных субъединиц, что коррелирует с ее сравнительно более низкой электронной плотностью. 502 молекулы воды с уровнем электронной плотности  $\rho \geq 2.0\sigma$  образуют сеть водородных связей с функциональными группами аминокислотных остатков тетрамера. Топология исследуемой структуры zYFP538 (пространственная группа  $P2_12_12_1$ ) при разрешении 1.8 Å похожа на определенную ранее для того же белка в другой кристаллической форме ( $P3_121$ ) при разрешении 2.7 Å [9] и характеризуется величиной среднеквадратичного отклонения RMSD, равной 0.44 Å, для всех эквивалентных  $C^\alpha$ -атомов.

Структура мономера zYFP538 имеет стандартную форму закрытого с торцов  $\beta$ -бочонка, сформированного из 11 антипараллельных  $\beta$ -сегментов и 1  $\alpha$ -спирали, в центре которой располагается хромофор (рис. 1). Подобно зеленому ФБ TurboGFP [13],  $\beta$ -бочонок zYFP538 обнаруживает наличие заполненной молекулами воды поры, ведущей к фенольному циклу остатка Tyr хромофора. Пора образована атомами основной цепи остатков Trp145, Glu146, Lys203, Leu204 и Ala147. Аналогичная пора присутствует у красного флуоресцентного белка zRFP574 из родственного вида

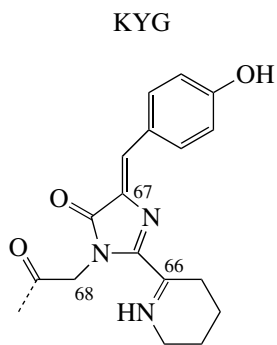


Рис. 2. Химическая формула хромофора zYFP538.

*Zoanthus* sp2 (PDB ID 2FL1; [11]). Авторы работы [13] предположили, что формирование такой поры в структуре ФБ связано с необходимостью обеспечения доступа кислорода при созревании хромофора.

**Структура хромофора.** Хромофор желтого флуоресцентного белка zYFP538 образуется из аминокислотной триады -Lys66-Tyr67-Gly68- и представляет собой планарную трициклическую систему сопряженных двойных связей (рис. 2, 3). Уникальность структуры состоит в том, что помимо пятичленного имидазолинового и фенольного (Tyr67) циклов, характерных для стандартной бициклической зеленой формы [2, 4], хромофор zYFP538 содержит дополнительный шестичленный тетрагидропириновый цикл. Фенольное кольцо остатка Tyr67, как и в зеленой форме, располагается в плоскости хромофора в *цис*-ориентации к связи C<sup>α</sup>-N (Tyr67). Такая кон-

формация характерна для большинства известных ФБ семейства GFP (но не “хромобелков”, характеризующихся чрезвычайно низким квантовым выходом флуоресценции) [14–16]. В структуре zYFP538 фенольное кольцо Tyr67 участвует в эффективном стэкинг-взаимодействии (на расстоянии ~3.7 Å) с параллельно расположенным имидазольным циклом остатка His202. Ближайшее стереохимическое окружение хромофора (рис. 4) предположительно включает основные каталитические остатки, участвующие прежде всего в формировании промежуточной бициклической структуры зеленой формы. К ним относят переменный остаток Ala63 и консервативные остатки Arg95 и Glu221 [8]. В соответствии с предложенным механизмом формирования хромофора [8, 17], положительно заряженная боковая цепь Arg95 создает повышенную кислотность атома N остатка Gly68 и/или атома C<sup>α</sup> остатка Tyr67, инициируя соответствующие реакции депротонирования. Атомы кислорода карбонильной группы Ala63 и карбоксильной группы боковой цепи остатка Glu221 предположительно служат в качестве акцепторов протонов одной или обеих реакций депротонирования. Депротонирование атома N остатка Gly68 способствует образованию пятичленного имидазолинового цикла путем нуклеофильной атаки его неподеленной электронной пары на карбонильный углерод остатка Lys66. Третий шестичленный гетероцикл, согласно гипотезе Ремингтона [9], формируется автокаталитически в результате реакции трансиминирования атома N<sup>ε</sup> боковой цепи остатка Lys66 с реакционноспособной ацилиминной связью C<sup>α</sup>=N переход-

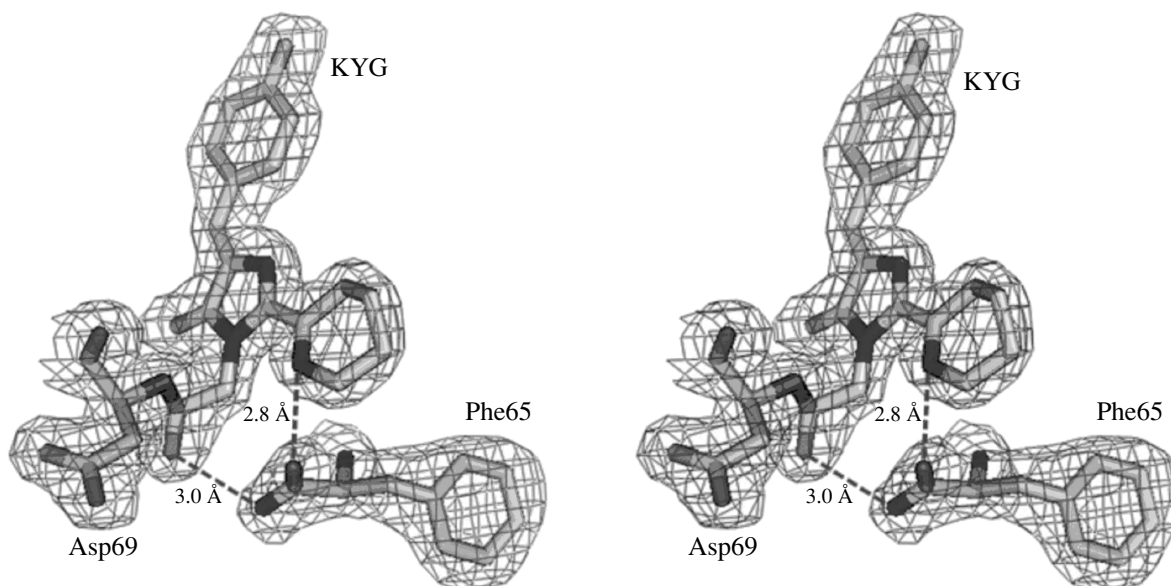


Рис. 3. Стереорепрезентация структуры хромофора в электронной плотности 2Fo-Fc ( $\rho \geq 1.0\sigma$ ).

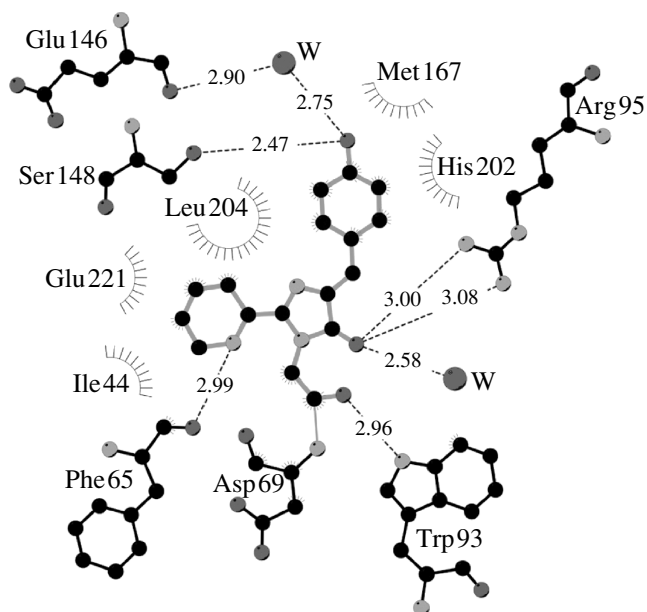


Рис. 4. Аминокислотное окружение хромофора. Н-связи ( $\leq 3.3$  Å) показаны прерывистыми линиями, ван-дер-ваальсовы контакты ( $\leq 3.9$  Å) – “ресничками”.

ного состояния хромофора в процессе его созревания. Эта реакция сопровождается разрывом основной цепи белка по связи  $C^{\alpha}$ -N остатка Lys66 с образованием концевой карбоксамидной группы у Phe65. При этом, амино- и карбонильная группы карбоксида располагаются на расстояниях водородной связи соответственно с карбонильной группой Glu68 (2.97 Å) и атомом  $N^{\zeta}$  гетероциклического кольца остатка Lys66 (2.82 Å), что свидетельствует о протонированной форме  $N^{\zeta}$ . Атомы  $C^{\alpha}$  и  $N^{\zeta}$  дополнительного гетероцикла хромофора принимают  $sp^2$ -гибридизацию и формируют кратную связь  $C^{\alpha}=N^{\zeta}$  ( $d = 1.33$  Å). Эта связь и две прилегающие к ней связи, в отличие от остальных связей гетероцикла, имеет планарное расположение. Связь  $C^{\alpha}=N^{\zeta}$  располагается в плоскости хромофора (торсионный угол  $\psi[C-C^{\alpha}] \sim 16^{\circ}$ ), что приводит к расширению конъюгированной системы сопряженных двойных связей и, как следствие, к сдвигу спектральных характеристик в длинноволновую область. При этом наблюдаемый батохромный сдвиг максимумов возбуждения и эмиссии по отношению к зеленому флуоресцентному белку из того же источника (*Zoanthus* sp.) составляет  $\sim 32$  нм [12].

Следует упомянуть, что в работе [18] рассматривались пять возможных структур хромофора zFP538. Четыре из них не противоречили данным ЯМР для хромопептидов, выделенных из zFP538. Менее вероятная, по мнению авторов, структура хромофора (V, рис. 3 [18]) противоречит данным

ЯМР для хромопептида, но совпадает со структурой, наблюдаемой в данной работе для кристаллического состояния зрелого белка. По-видимому, уникальная пространственная структура  $\beta$ -бочонка обеспечивает заданную последовательность реакций, приводящих к наблюдаемой структуре хромофора в зрелом белке.

**Остатки, ответственные за образование желтой формы.** Согласно данным мутагенеза [12], остаток Lys66 хромофоробразующей последовательности zYFP538 играет ключевую роль в появлении желтой флуоресценции. Два других остатка из ближайшего окружения хромофора, Asp69 и Glu64, лишь частично вовлечены в процесс перехода зеленой формы в желтую. Первый, возможно, играет каталитическую роль, а второй обеспечивает требуемую конформационную подвижность основной цепи. Важность этих остатков была подтверждена созданием мутантного варианта зеленого флуоресцентного белка из того же организма ( $\lambda_{эм} = 506$  нм) с тремя аминокислотными заменами Asn66Lys/Asn69Asp/Ala64Gly, который характеризуется желтой флуоресценцией при  $\lambda_{эм} = 537$  нм [12].

Пять молекул воды в окружении хромофора zYFP538 образуют сеть водородных связей, опосредующих взаимодействие хромофора с ближайшими аминокислотными остатками. Две молекулы воды образуют непосредственные связи с хромофором (показаны на рис. 4). Третья молекула воды образует прочные водородные связи с боковыми цепями Gln42 и Tyr16 и слабую водородную связь (3.3 Å) с карбонилем концевой карбоксамидной группы Phe65. Четвертая и пятая молекулы воды соединяют боковые цепи Arg70, Glu150, Tyr185 и Arg70, Glu221, Asp69 (N) соответственно.

Согласно принятой в настоящее время гипотезе [8], образование трехмерной архитектуры  $\beta$ -бочонка создает стерическое напряжение, которое приводит к сильному изгибу центральной  $\alpha$ -спирали, инициируя цепочку реакций образования хромофора. Помимо стерического фактора ряд остатков из ближайшего окружения хромофора формирует специфическое пространственное расположение функциональных групп, ускоряющее процесс созревания хромофора. После формирования зеленой бициклической формы отдельные остатки из ближайшего окружения хромофора могут инициировать продолжение посттрансляционной модификации.

Интересно, что в циановом ФБ amFP486 ( $\lambda_{эм} = 486$  нм) из *Anemonia majano* [19] с идентичной белку zYFP538 хромофоробразующей последовательностью -Lys-Tyr-Gly- хромофор имеет (в отличие от zYFP538) характерную для зеленой формы бициклическую структуру, и боковая цепь остат-

ка Lys не претерпевает никаких изменений при созревании хромофора. При общей идентичности аминокислотных последовательностей (49%) отличия в ближайшем окружении хромофоров этих белков заключаются лишь в двух аминокислотных заменах. В циановом белке amFP486 вместо характерных для желтого белка zYFP538 остатков Ile44 и Asp69 располагаются соответственно остатки Ser и Asn.

В структуре zYFP538 отрицательно заряженная боковая цепь остатка Asp69 образует водородные связи с боковыми цепями остатков Tyr91 и His122. Было показано, что этот остаток играет существенную роль в переходе зеленой формы в желтую [12]. Сравнение аминокислотных последовательностей и совмещение пространственных структур белков amFP486 и zYFP538 показали, что в незрелой форме zYFP538 положительно заряженная аминокислотная группа природной боковой цепи остатка Lys66 хромофоробразующей последовательности должна по аналогии располагаться в гидрофобном кармане, сформированном боковыми цепями остатков Ile44, Leu46, Phe65, Leu204 и Leu219. Мы полагаем, что такое расположение заряда в гидрофобном окружении приводит к острому энергетическому конфликту и является инициатором дополнительной посттрансляционной модификации, ведущей к образованию желтого хромофора. Силы, ответственные за инициацию процесса, по всей вероятности, имеют энталпийно-энтропийную природу аналогично силам, стабилизирующим гидрофобное ядро в белках с вытеснением воды [20]. В amFP486 боковая цепь остатка Ser, занимающего позицию 44 в гидрофобном кармане, образует водородную связь с интактной боковой цепью хромофоробразующего остатка Lys, частично нейтрализуя его заряд.

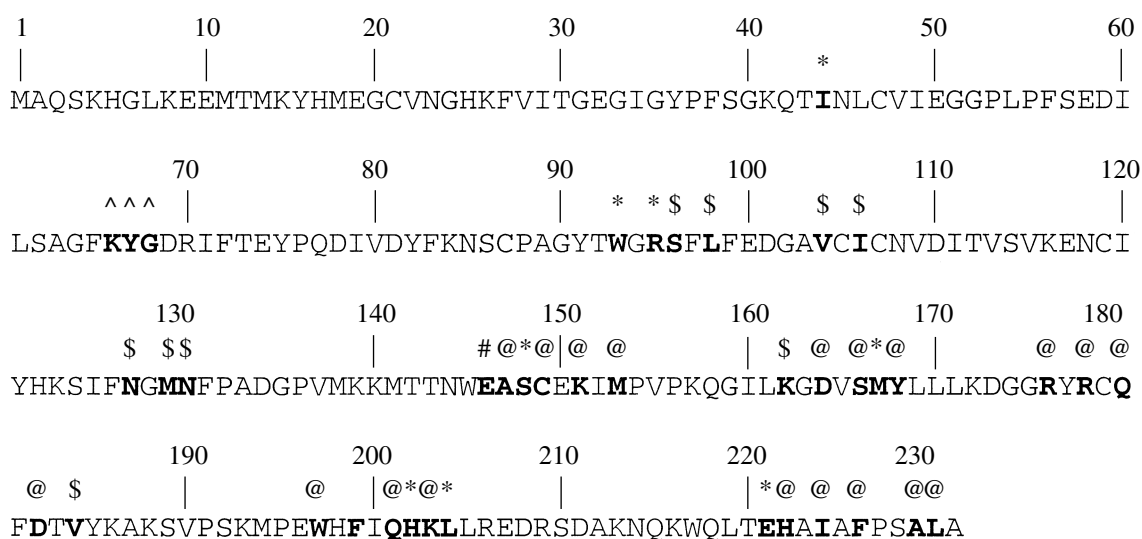
**Мутантные варианты.** Так как лишь два аминокислотных остатка, Ile44 и Asp69, отличаются окружением хромофора желтого белка zYFP538 от окружения хромофора цианового белка amFP486 (несущего “стандартный” зеленый хромофор), мы предположили, что именно конфликт Ile44 с Lys66 играет существенную роль в инициации формирования дополнительного шестичленного цикла. Для проверки этой гипотезы мы провели мутагенез белка zYFP538, заменив Ile в положении 44 на Ala. Действительно, занимающий существенно меньший объем аланин в положении 44 привел к существенно менее эффективному созреванию желтого хромофора. Спектры поглощения показали, что, если для полностью созревшего белка zYFP538 доминирует желтая форма (зеленая форма также всегда присутствует) [12], то для мутантного варианта zYFP538 Ile44Ala с небольшим перевесом доминирует уже зеленая форма хромофора. Стереохими-

ческий анализ показал, что наблюдаемый эффект стабилизации зеленой формы лишь частично связан с уменьшением препятствий стерического характера. Ослабление энергетического конфликта заряда боковой цепи Lys66 с гидрофобным окружением скорее всего вызвано уменьшением свободной энергии вследствие уменьшения гидрофобности вышеупомянутого гидрофобного кармана. Ранее было показано, что к сходным результатам (доминированию зеленой формы хромофора) приводит мутагенез zYFP538 по второму важному остатку, Asp69Asn [12].

Для проверки совокупного вклада остатков Ile44 и Asp69 в созревание желтой формы zYFP538 мы получили его двойной мутант Ile44Ala, Asp69Asn. Одновременная замена этих двух остатков привела к полному нарушению формирования желтого хромофора, не затронув, в то же время, механизма формирования стандартного зеленого хромофора. Полученный мутантный белок характеризуется достаточно быстрым созреванием, яркой зеленой флуоресценцией ( $\lambda_{\text{возб}} = 496$  нм и  $\lambda_{\text{эм}} = 506$  нм) и единственным пиком поглощения при 492 нм. Пика поглощения при 528 нм, соответствующего желтой форме, не наблюдается даже через 72 ч инкубации белка.

Как уже отмечалось, в циановом флуоресцентном белке amFP486 в положении 44 находится остаток Ser, боковая цепь которого образует водородную связь с интактной боковой цепью остатка Lys66. Мы предположили, что мутагенез Ile44Ser белка zYFP538 приведет к сходному взаимодействию этих остатков и тем самым стабилизирует Lys66, препятствуя образованию дополнительного гетероцикла. Действительно, анализ свойств полученного мутантного варианта показал, что остаток Ser в положении 44 в еще большей степени, чем Ala, препятствует формированию желтой формы хромофора. Доминирует зеленая и, что особенно интересно, присутствует циановая форма, характеризующаяся поглощением при 465 нм. Представляется наиболее вероятным, что циановая форма мутантного ФБ zYFP538\_Ile44Ser соответствует хромофору, остаток Lys66 которого образует водородную связь с Ser44, аналогично хромофору белка amFP486. Таким образом, помимо собственно ключевого остатка Lys66, формирующего дополнительный гетероцикл хромофора, а также Gly64, обеспечивающего необходимую конформационную подвижность основной цепи, в ближайшем окружении хромофора zYFP538 есть еще два остатка – Ile44, Asp69, которые играют существенную роль в реакции формирования дополнительного шестичленного гетероцикла.

Другой пример сильного электростатического эффекта в ближайшем окружении хромофора



**Рис. 5.** Аминокислотная последовательность zYFP538. <sup>^</sup> Хромофоробразующая триада. Остатки, взаимодействующие с хромофором через Н-связи ( $\leq 3.3$  Å) и ван-дер-ваальсовы контакты ( $\leq 3.9$  Å) (\*) и через воду (#). Остатки, формирующие контактные поверхности интерфейсов ИФ1 (\$) и ИФ2 (@).

представляет красный ФБ zRFP574 из *Zoanthus sp2* [11]. В этом белке сближенные отрицательно заряженные боковые цепи остатка Asp66 хромофора и каталитического остатка Glu221 приводят к сильному электростатическому конфликту, который инициирует дополнительную цепь реакций посттрансляционной модификации с переходом зеленой формы в конечную – красную. Этот переход, наиболее вероятно, начинается с образования необычной *цис*-пептидной связи между остатками Phe65 и Asp66, сопровождаемого образованием ацилиминной связи  $C1^{\alpha}(66)=N$ , что характерно для большинства красных ФБ [21]. Последующее изменение гибридизации атома  $C1^{\alpha}(66)$  из  $sp^3$  в  $sp^2$  завершается декарбоксилированием боковой цепи Asp66.

Автокаталитическая трансформация хромофоробразующей триады в стандартную бициклическую зеленую форму хромофора предположительно оставляет не полностью сбалансированным заряд боковой цепи каталитического остатка Glu221. При этом Glu221 потенциально остается реакционно-активным для последующих дополнительных стадий посттрансляционной модификации в нативных условиях или под действием внешних факторов. Это является возможной причиной наблюдаемого декарбоксилирования остатка Glu221 (по нумерации zYFP538) при фотоактивации зеленого ФБ avGFP (*Aequorea victoria*) [22], а также разрыва основной цепи перед хромофором в asFP595 (*Anemonia sulcata*) [15, 23] и в EosFP (*Lobophyllia hemprichii*) [24] под воздействием УФ- или видимого света определенной длины

волны. При замене каталитического остатка Glu на Gln в EosFP фрагментации основной цепи не происходит [24].

### Структура тетрамера

Биологическая единица zYFP538 представляет собой тетрамер (точечная симметрия 222), построенный из двух димеров, упакованных под  $\sim 90^\circ$  друг к другу (рис. 1). Каждый димер образован двумя антипараллельными мономерами. В тетрамере формируются два типа интерфейсов между контактирующими поверхностями мономерных субъединиц (рис. 5). Первый интерфейс (ИФ1) формируется между двумя мономерами внутри димера, второй (ИФ2) – между мономерами из двух разных димеров. Интерфейс ИФ1 характеризуется защищенной от водной среды контактной площадью  $\sim 490$  Å<sup>2</sup>. Он стабилизируется, главным образом, центральным гидрофобным кластером, образованным плотно упакованными боковыми цепями двух групп остатков L98, V104, I106, M129 и L98', V104', I106', M129', примыкающих к некристаллографической оси 2-го порядка. Дополнительный вклад в стабилизацию вносит также двойной набор водородных связей, связанных элементами кристаллографической симметрии A147(O)....K151(NZ) (2.89 Å), Q201(OE1)....A229(N) (2.93 Å), K203(NZ)....A231(OT) (3.00 Å) (обозначения атомов даны в соответствии с принятой номенклатурой Международного банка белковых структур (PDB)).

Интерфейс ИФ2 имеет более развитую контактирующую поверхность  $\sim 690 \text{ \AA}^2$ . Он стабилизирует сеть из шести водородных связей и десяти солевых мостиков, образованных боковыми цепями остатков двух идентичных групп, связанных осью симметрии 2-го порядка: A147(O)....K151(NZ) (2.89  $\text{\AA}$ ), Q201(OE1)....A229(N) (2.93  $\text{\AA}$ ), K203(NZ)....A231(OT) (3.00  $\text{\AA}$ ), E146(OE2)....K151(NZ) (2.76  $\text{\AA}$ ), D164(OD1)....R178(NH1) (3.55  $\text{\AA}$ ), D164(OD2)....R178(NH1) (3.07  $\text{\AA}$ ), D182(OD1)....R178(NH1) (2.83  $\text{\AA}$ ), D182(OD1)....R178(NH2) (2.96  $\text{\AA}$ ). Кроме того, боковые цепи близко расположенных остатков Cys149 обоих мономеров сближаются на расстояние  $\sim 3 \text{ \AA}$  в случае другой альтернативной ориентации, что указывает на потенциальную возможность образования дисульфидных связей в процессе олигомеризации. Интересно отметить, что стереохимическая композиция интерфейсов в структуре zYFP538 идентична таковой у красного ФБ zRFP574 из родственного организма *Zoanthus sp2* [11].

Отмеченные остатки на интерфейсах ИФ1 и ИФ2 представляют наиболее важную группу остатков, ответственных за олигомеризацию. Наряду с другими остатками, их следует учитывать при создании мономерных форм ФБ для практического применения в качестве маркеров белков и клеточных органелл. Следует ожидать, что частичная замена гидрофобных остатков центрального кластера ИФ1 на гидрофильные, совмещенная с мутациями Cys149Ser и Lys/Arg на Glu/Asp (или Glu/Asp на Lys/Arg) на ИФ2, приведет к разрушению интерфейсов. Общий аминокислотный состав на интерфейсах ИФ1 и ИФ2, а также остатки, формирующие ближайшее окружение хромофора, представлены на рис. 5. Интересно, что значительное число остатков из обеих групп расположено в первичной структуре последовательно в чередующемся порядке. Не исключено, что такое расположение имеет функциональную значимость, обеспечивая спектральные свойства белка дикого типа за счет тетрамерной организации.

Олигомеризация природных флуоресцентных белков представляет собой серьезную биотехнологическую проблему, существенно ограничивающую их применение в качестве маркеров белков и разработку генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. Несколько мономерных вариантов были сконструированы с использованием сочетания методов направленного и случайного мутагенеза [25–30]. Однако попытки вмешательства в стереохимию интерфейсов тетрамерной биологической единицы часто сопровождаются значительными изменениями спектральных характеристик, фотостабильности и кинетики созревания хромофора. Направление и масштаб этих изменений заранее предсказать трудно. Например, сконструированная на основе 33 мутаци-

онных замен мономерная форма DsRed обладает более низкими величинами молярного коэффициента поглощения, квантового выхода и фотостабильности, чем ее тетрамерный предшественник [25]. При конструировании мономерных вариантов с требуемыми характеристиками существенная проблема, по-видимому, возникает из-за остатков, ответственных за локальное формирование пространственной структуры. Их замена наряду с другими заменами может привести к непредсказуемым результатам, часто к потере флуоресцентных свойств.

Важный фундамент для успешной разработки мономерных вариантов ФБ с предпочтительными характеристиками создают исследования пространственных структур белков с высоким разрешением. Белок zYFP538 обладает уникальными спектральными характеристиками, и его мономерный вариант был бы широко востребован для технологий многоцветного мечения и резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Мы надеемся, что полученные в настоящей работе результаты окажутся полезными для понимания закономерностей формирования желтого хромофора zYFP538 и разработки его мономерного варианта.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Мутагенез, экспрессия и выделение.** Плазмида pQE30-zFP538 была трансформирована в штамм *Escherichia coli* JM109 (DE3). Белок экспрессировали на чашках Петри с LB-агаром инкубированием при  $37^\circ\text{C}$  в течение ночи. Чашки залили двумя слоями твердого LB-агара с добавлением 100 мг/мл ампициллина. Нижний слой дополнительно содержал 1 мМ IPTG. Временной процесс диффузии IPTG в верхний слой LB-агара обеспечивал заданную задержку индукции экспрессии. Клетки ресуспендировали в буфере pH 8.0, содержащем 20 мМ Трис, 100 мМ NaCl и разрушали с помощью ультразвука. Клеточную суспензию осветляли центрифугированием (15000 об/мин, 5 мин). Очистку белка из супернатанта производили методом металлоафинной хроматографии на колонке (Ni-NTA Agarose resin, Qiagen). Колонку промывали 10 колоночными объемами буфера 20 мМ Трис pH 8.0, 100 мМ NaCl. Белок смывали буфером 20 мМ Трис pH 8.0, 100 мМ NaCl, 50 мМ EDTA. Последнюю стадию очистки производили методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75 Hi-Load (16/60) в буфере pH 7.5 10 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 2.5 мМ EDTA.

Сайт-направленный мутагенез проводили методом, описанным в работе [31], с использованием праймеров, содержащих соответствующие точечные замены. Для экспрессии в бактериях

Экспериментальные рентгеновские данные и статистика кристаллографического уточнения zYFP538

Желтый флуоресцентный белок zYFP538

Экспериментальные параметры	
Пространственная группа	$P2_12_12_1$ ( $Z = 4$ )
Параметры ячейки, Å	$a = 87.4, b = 106.5, c = 115.7$
Тетрамер/асимм. Часть ячейки	1
Содержание воды, %	52.9
Температура, К	100
Длина волны, Å	1.00
Область разрешения, Å	30.0–1.8
Общее число измеренных рефлексов	338587
Число независимых рефлексов	92110
Свыше $2\sigma(I)/3\sigma(I)$	68889/62490
Избыточность	3.7 (2.1)*
$I/\sigma(I)$	11.9 (1.4)
$R_{merge}$	0.064 (0.491)*
Полнота набора	91.1 (53.1)*
Статистика уточнения	
Число неводородных атомов	
Белок	7171 [ $4 \times (6-231)$ остатки]
Вода	497
$R_{work}$	0.184 (99% данных, $F \geq 0$ )
$R_{free}$	0.240 (1% данных, $F \geq 0$ )
Средний $B$ -фактор/(RMSD) (Å <sup>2</sup> )	
Атомы белка	
основная цепь	30.0 (0.8)
боковая цепь	32.4 (2.3)
Хромофор	33.0 (4.0)
Вода	37.0
RMS-отклонение	
длины связей, Å	0.019
валентные углы, град	1.8
торсионные углы [период 360/ $n$ ] (град): $n = 1/2/3/4$	6.5/36.7/15.6/20.0
отклонение от планарности, Å	0.008
хиральные объемы, Å <sup>3</sup>	0.15
Статистика распределения $\phi$ - $\psi$ углов на карте Рамачандрана (%) (исключая остатки Gly/Pro)	
наиболее благоприятные области	93.6
дополнительные благоприятные области	6.2
допустимые благоприятные области	0.1

\* Величины в скобках приведены для последнего слоя разрешения 1.86–1.80 Å.

*E. coli* ПЦР-амплифицированный фрагмент, кодирующий флуоресцентный белок, клонировали в вектор pQE30 (Qiagen), используя сайты рестрикции BamHI/HindIII. Белки, несущие на N-конце полигистидиновый довесок (закодированный в используемом экспрессионном векторе pQE30), экспрессировали в бактериях *E. coli* (штамм XL1-Blue, Invitrogen). Бактериальные культуры центрифугировали, осадок ресуспендировали в буфере pH 7.4 20 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl и разрушали ультразвуком. Рекомбинантные белки очищали на металлоаффинной смоле TALON (Clontech).

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Beckman DU520 UV/VIS.

**Кристаллизация и определение структуры.** Кристаллы zYFP538 были получены методом диффузии через газообразное состояние в варианте висячей капли из раствора, содержащего 0.085 M Na-Нерес pH 7.5, 17% PEG 4000, 8.5% изопропанола, 15% глицерина. Пластинчатые кристаллы достигли своего максимального размера  $0.1 \times 0.2 \times 0.4$  мм<sup>3</sup> через три недели.

Сбор рентгеновских дифракционных данных производился с монокристаллов при температуре жидкого азота, 100 K, с использованием детектора MAR300 CCD на станции SER-CAT 22-ID (Advanced Photon Source, Аргонн, США). Обработка экспериментальных данных осуществлялась программным комплексом HKL2000 [32].

Структура zYFP538 была определена методом молекулярного замещения с помощью программы MOLREP [33] в составе комплекса CCP4 [34] с использованием в качестве модели координат кристаллической структуры zYFP538, установленной при разрешении 2.7 Å (PDB ID : 1XA9; [9]). Уточнение структуры проводилось с использованием программы REFMAC5 [35] попеременно с ручной коррекцией модели в электронной плотности по программе COOT [36]. Положение молекул воды в структуре было определено с помощью программы ARP/wARP [37]. Кристаллографические параметры и данные кристаллографического уточнения структуры представлены в таблице. Анализ геометрических параметров структуры проводился с помощью программы PROCHECK [38]. Рисунки были выполнены на основе программ SETOR [39], LIGPLOT/MBPLUS [40, 41], RYMOL [42] и ChemDraw [43].

Координаты атомов и экспериментальные структурные факторы депонированы в Банк белковых структур (Protein Data Bank) с идентификационным кодом 2OGR.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 06-04-48196, 07-04-00054), а также программы “Молекулярная и клеточная био-



логия" РАН, Д.М. Чудаков поддержан грантом Президента Российской Федерации МК-8236.2006.4 и фондом содействия отечественной науке.

Авторы выражают огромную благодарность д.х.н Лукьянову К.А. (ИБХ РАН) за предоставление плазмиды pQE30-zFP538.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chalfie M., Kain S. // GFP Green Fluorescent Protein. Properties, Applications and Protocols. New York: Wiley-Liss., 1998. P. 385.
- Tsien R.Y. // Ann. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544.
- Haugwitz M., Dery O., Turpin P., Fang Y. // Genet. Eng. News. 2003. V. 23. P. 36–39.
- Зубова Н.Н., Булавина А.Ю., Савицкий А.П. // Успехи биол. химии. 2003. Т. 43. С. 163–224.
- Verkhusha V.V., Lukyanov K.K. // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 289–296.
- Зубова Н.Н., Савицкий А.П. // Успехи биол. химии. 2005. Т. 45. С. 1–66.
- Tallini Y.N., Ohkura M., Choi B.R., Ji G., Imoto K., Doran R., Lee J., Plan P., Wilson J., Xin H.B., Sanbe A., Gulick J., Mathai J., Robbins J., Salama G., Nakai J., Kotlikoff M.I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 4753–4758.
- Barondeau D.P., Putnam D.C., Kassmann C.J., Tainer J.A., Getzoff E.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 12111–12116.
- Remington S.J., Wachter R.M., Yarbrough D.K., Branchaud B., Anderson D.C., Kallio K., Lukyanov K.A. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 202–212.
- Barondeau D.P., Kassmann C.J., Tainer J.A., Getzoff E.D. // J. Am. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 4685–4693.
- Pletneva N., Pletnev S., Tikhonova T., Popov V., Martynov V., Pletnev V. // Acta Cryst. 2006. V. D62. P. 527–532.
- Gurskaya N.G., Savitsky A.P., Yanushevich Y.G., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // BMC Biochemistry. 2001. V. 2:6.
- Evdokimov A.G., Pokross M.E., Egorov N.S., Zaraisky A.G., Yampolsky I.V., Merzlyak E.M., Shkoporov A.N., Sander I., Lukyanov K.A., Chudakov D.M. // EMBO Rep. 2006. V. 7. P. 1006–1012.
- Chudakov D.M., Feofanov A.V., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 7215–7219.
- Andresen M., Wahl M. C., Stiel A. C., Grater F., Schaffer L. V., Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Grubmüller H., Hell S. W., Jakobs S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 13070–13074.
- Remington S.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2006. V. 16. P. 1–8.
- Wood T.I., Barondeau P., Hitomi C., Kassmann C.J., Tainer J.A., Getzoff E.D. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 16211–16220.
- Zagranichny V.E., Rudenko N.V., Gorokhovatsky A.Yu., Zakharov M.V., Shenkarev Z.O., Balashova T.A., Arseniev A.S. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 4764–4772.
- Henderson J.N., Remington S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 12712–12717.
- Vondrasek J., Bendova L., Klusak V., Hobza P. // J. Amer. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 2615–2619.
- Tubbs J.L., Tainer J.A., Getzoff E.D. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 9833–9840.
- van Thor J.J., Gensch T., Hellingwer K.J., Johnson L.N. // Nat. Struct. Biol. 2002. V. 9. P. 37–41.
- Quillin M.L., Anstrom D.M., Shu X., O'Leary S., Kallio K., Chudakov D.M., Remington S.J. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 5774–5787.
- Nienhaus K., Nienhaus G.U., Wiedenmann J., Nar H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 9156–9159.
- Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Stainbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 7877–7882.
- Karasawa S., Araki T., Yamamoto-Hino M., Miyawaki A. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 34167–34171.
- Karasawa S., Araki T., Nagai T., Mizuno H., Miyawaki A. // Biochem. J. 2004. V. 381. P. 307–312.
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. // Nature Biotechnol. 2004. V. 22. P. 1567–1572.
- Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. // Science. 2004. V. 306. P. 1370–1373.
- Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F., Schmitt F., Rucker C., Salih A., Spindler K.D., Nienhaus G.U. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 15905–15910.
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. // Gene. 1989. V. 77. P. 51–59.
- Otwinowski Z., Minor W. // Methods Enzymol. 1997. V. 276. P. 307–326.
- Vagin A., Teplyakov A. // J. Appl. Cryst. 1997. V. 30. P. 1022–1025.
- Collaborative Computational Project Number 4 // Acta Cryst. 1994. V. D50(Pt5) P. 760–763.
- Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Cryst. 1997. V. D53. P. 240–255.
- Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. 2004. V. D60. P. 2126–2132.
- Perrakis A., Sixma T.K., Wilson K.S., Lamzin V.S. // Acta Cryst. 1997. V. D53. P. 448–455.
- Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. P. 283–291.
- Evans S.V. // J. Mol. Graphics. 1993. V. 11. P. 134–138.
- Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. // Protein Eng. 1995. V. 8. P. 127–134.
- McDonald I.K., Thornton J.M. // J. Mol. Biol. 1994. V. 238. P. 777–793.
- DeLano W.L. // <http://www.pymol.org> 2002.
- Cambridge Soft Corporation. <http://www.camsoft.com>.

## Three-Dimensional Structure of Yellow Fluorescent Protein zYFP538 from *Zoanthus* sp. at the Resolution 1.8 Å

N. V. Pletneva<sup>a#</sup>, S. V. Pletnev<sup>c</sup>, D. M. Chudakov<sup>a</sup>, T. V. Tikhonova<sup>b</sup>, V. O. Popov<sup>b</sup>, V. I. Martynov<sup>a</sup>, A. Wlodawer<sup>d</sup>, Z. Dauter<sup>c</sup>, and V. Z. Pletnev<sup>a</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 330-7510; e-mail: nadand@mail.ru

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

<sup>b</sup> Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>c</sup> Synchrotron Radiation Research Section, Laboratory of Macromolecular Crystallography, National Cancer Institute, Argonne, IL 60439, USA

<sup>d</sup> Protein Structure Section, Laboratory of Macromolecular Crystallography, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA

The three-dimensional structure of yellow fluorescent proteins zYFP538 (zFP538) from the button polyp *Zoanthus* sp. was determined at a resolution of 1.8 Å by X-ray analysis. The monomer of zYFP538 adopts a structure characteristic of the green fluorescent protein (GFP) family, a  $\beta$ -barrel formed from 11 antiparallel  $\beta$  segments and one internal  $\alpha$  helix with a chromophore embedded into it. Like the TurboGFP, the  $\beta$ -barrel of zYFP538 contains a water-filled pore leading to the chromophore Tyr67 residue, which presumably provides access of molecular oxygen necessary for the maturation process. The post-translational modification of the chromophore-forming triad Lys66-Tyr67-Gly68 results in a tricyclic structure consisting of a five-membered imidazolinone ring, a phenol ring of the Tyr67 residue, and an additional six-membered tetrahydropyridine ring. The chromophore formation is completed by cleavage of the protein backbone at the C <sup>$\alpha$</sup> -N bond of Lys66. It was suggested that the energy conflict between the buried positive charge of the intact Lys66 side chain in the hydrophobic pocket formed by the Ile44, Leu46, Phe65, Leu204 and Leu219 side chains is the most probable trigger that induces the transformation of the bicyclic green form to the tricyclic yellow form. A stereochemical analysis of the contacting surfaces at the intratetramer interfaces helped reveal a group of conserved key residues responsible for the oligomerization. Along with others, these residues should be taken into account in designing monomeric forms suitable for practical application as markers of proteins and cell organelles. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* GFP-like proteins, crystal structure, chromophore structure, tetramer structure, intersubunit interfaces; yellow fluorescent protein, *Zoanthus* sp.