



УДК 577.112.014:577.343

ВЫЯВЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА СПОСОБНОСТЬ К ОБРАТИМОЙ ФОТОКОНВЕРСИИ МОНОМЕРНОГО КРАСНОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА TagRFP

© 2010 г. Л. Чжан, Н. Г. Гурская, Е. Е. Копанцева, Н. Н. Мудрик,
Л. Л. Вагнер, К. А. Лукьянов[#], Д. М. Чудаков

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 02.06.2009 г. Принята к печати 30.09.2009 г.

Проведен направленный мутагенез мономерного красного флуоресцентного белка TagRFP и его вариантов с целью получения обратимо фотоактивируемых белков. Показано, что аминокислотные позиции 69, 148, 165, 179 и 181 (нумерация согласно зеленому флуоресцентному белку GFP) играют определяющую роль в проявлении свойств фотоактивируемости. Получен обратимо фотоактивируемый белок KFP-НС, обладающий флуоресценцией в красной области спектра, с максимумами возбуждения и эмиссии при 585 и 615 нм, соответственно. Показано, что интенсивность флуоресценции KFP-НС падает в 5–10 раз (за счет уменьшения квантового выхода флуоресценции) под воздействием зеленого света (530–560 нм) и затем возвращается к исходному уровню при облучении синим светом (450–490 нм) или после инкубации в темноте (время полувосстановления 30 мин).

Ключевые слова: красный флуоресцентный белок; мутагенез; фотоконверсия; флуоресцентное мечение.

ВВЕДЕНИЕ

Зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP) гидроидной медузы *Aequorea victoria* и его варианты широко используются для визуализации структур и процессов в живых системах. Использование флуоресцентных белков основано на их уникальных биохимических свойствах. GFP-подобные белки представляют собой единственную известную группу белков, способных формировать хромофорную группу самостоятельно, без участия внешних ферментов и кофакторов, за исключением молекулярного кислорода [1]. Образование хромофора происходит за счет циклизации и последующего окисления аминокислотных остатков внутри белка (Ser65-Тур66-Gly67 в GFP). Таким образом, ген GFP может быть экспрессирован практически в любом организме с образованием функционального (флуоресцентного) белка, и, следовательно, представляет собой полностью генетически кодируемую метку [2, 3].

Гомологи GFP, помимо гидроидных медуз (тип Cnidaria, класс Hydrozoa), были обнаружены еще в нескольких группах морских беспозвоночных: коралловых полипах (тип Cnidaria, класс Anthozoa) [4],

в некоторых видах планктонных рачков Copepoda (тип Arthropoda) [5] и в низших представителях типа Chordata – ланцетниках [6]. Представители GFP-подобных белков коралловых полипов имеют наиболее разнообразные спектральные свойства [7]. Были найдены белки, флуоресцирующие в голубой, зеленой, желтой и красной областях спектра, а также нефлуоресцентные хромобелки.

Отдельную спектральную группу составляют так называемые фотоактивируемые флуоресцентные белки (photoactivatable fluorescent proteins, PAFP), способные существенно увеличивать яркость флуоресценции в каком-либо районе видимого спектра под воздействием света определенной длины волны и интенсивности [8, 9]. Фотоактивация может происходить путем изменения спектральных характеристик PAFP, например, увеличения квантового выхода флуоресценции или молярного коэффициента поглощения при данной длине волны, а также смещения максимума возбуждения и/или эмиссии. Такие белки были найдены среди природных GFP-подобных белков, а также получены искусственно путем мутагенеза.

Можно выделить две основные группы PAFP, фотоконверсия которых имеет соответственно необратимый и обратимый характер. Для необратимо конвертируемых PAFP характерны фотохимические реакции, приводящие к изменению химической структуры хромофора или его непосредственного белкового окружения. Так, например, в белках PA-GFP (фотоактивируемый зеленый флуоресцентный белок [10]) и, вероятно, PS-CFP (фотопе-

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); KFP1 – разжигающийся флуоресцентный белок (kindling fluorescent protein); PA-GFP – фотоактивируемый зеленый флуоресцентный белок (photoactivatable green fluorescent protein); PS-CFP – фотопереключаемый голубой флуоресцентный белок (photoswitchable cyan fluorescent protein); PAFP – фотоактивируемые флуоресцентные белки (photoactivatable fluorescent proteins).

[#] Автор для связи (тел.: (495) 429-80-20; эл. почта: kluk@ibch.ru).

реключаемый голубой флуоресцентный белок [11]) происходит фотоиндуцированное декарбоксилирование боковой цепи остатка Glu222, что приводит к существенной перестройке системы водородных связей вокруг хромофора и его переходу из протонированного в депротонированное состояние [12, 13], сопровождающемуся сдвигом максимума возбуждения с 400 до 490–505 нм.

Для обратимо конвертируемых PAFP характерна возможность многократного повторения фотоконверсии. Первый белок такого типа – фотоактивируемый хромобелок asFP595 морского анемона *Aequorea victoria* – был описан в 2000 г. [14]. Облучение белка asFP595 интенсивным зеленым светом переводит его в красное флуоресцентное состояние за счет увеличения квантового выхода флуоресценции более чем в 100 раз. Через несколько секунд белок самопроизвольно возвращается в исходное состояние практически нефлуоресцентного хромобелка, после чего может быть вновь активирован. К быстрому возврату активированного белка asFP595 в темное состояние приводит также облучение его синим светом. Позже был получен мутант asFP595, названный KFP1 (Kindling Fluorescent Protein – разгорающийся флуоресцентный белок) [15, 16]. В целом, KFP1 демонстрирует тот же тип фотоконверсии, но обладает большим временем жизни флуоресцентного состояния. Недостатками KFP1, ограничивающими его практическое использование, являются его тетрамерная четвертичная структура и низкая яркость флуоресценции.

Было описано несколько обратимо конвертируемых PAFP (например, Dronpa [17], mTFP0.7 [18], rsFastLime [19] и др.), обладающих высокой интенсивностью флуоресценции в активированном состоянии и высоким динамическим диапазоном фотоконверсии (т.е. различием между яркостью флуоресценции в активированном и неактивированном состояниях). Недавно были опубликованы данные о первых мономерных красных PAFP [20], созданных путем мутагенеза белка mCherry [21].

Для некоторых обратимо конвертируемых PAFP был детально исследован механизм фотоконверсии, и во всех случаях показано, что фотоконверсия сопровождалась *цис-транс*-изомеризацией, а также сопутствующим протонированием-депротонированием хромофора [16, 18, 22, 23].

PAFP можно использовать для прицельного мечения клеток, отдельных органелл или пула белка с целью отслеживания их перемещения [9]. Кроме того, как необратимо, так и обратимо конвертируемые PAFP являются прекрасными метками для флуоресцентной микроскопии ультравысокого разрешения [20, 24–28], позволяющей достигать разрешения 20–50 нм, существенно превосходящего фундаментальный барьер разрешения световой микроскопии.

В данной работе мы изучили возможность придания способности к обратимой фотоконверсии белку TagRFP, который является на сегодняшний день са-

мым ярким мономерным красным флуоресцентным белком [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мутагенез

Для создания обратимо фотоактивируемого аналога красного флуоресцентного белка TagRFP мы провели его мутагенез методом случайного мутагенеза по ключевым позициям, 148 и 165 (здесь и далее нумерация по GFP, рис. 1), которые, согласно литературным данным по другим флуоресцентным белкам, должны в большой степени определять возможность *цис-транс*-изомеризации хромофора [16, 19, 22]. Была получена библиотека мутантных вариантов, несущих 20 возможных аминокислотных остатков в положениях 148 и 165 в различных сочетаниях (всего 400 возможных сочетаний), экспрессирующихся в *E. coli*. Визуальный скрининг около 5000 колоний этой библиотеки показал наличие красных флуоресцентных белков различной яркости, однако не было найдено ни одного фотоактивируемого варианта. Мы заключили, что какие-то аминокислотные остатки в окружении хромофора TagRFP мешают проявлению свойств фотоконверсии.

Для преодоления этой проблемы мутагенез по положениям 148 и 165 был проведен на основе белка-предшественника TagRFP, называемого NRM14, также обладающего мономерной структурой, но имеющего более низкую, чем у TagRFP яркость флуоресценции. Анализ аминокислотных позиций, различающих белки TagRFP и NRM14, показывает, что только для трех из них (позиции 69, 179 и 181) боковые цепи погружены внутрь белковой глобулы (рис. 1) и, следовательно, могут напрямую влиять на способность к обратимой фотоконверсии. Мы предполагаем, что в случае TagRFP более объемные остатки Arg69 и Phe181 (Lys69 и Leu181 в NRM14) могут мешать *цис-транс*-изомеризации хромофора, которая должна происходить при фотоконверсии. Интересно, что в фотоконвертируемом белке KFP1 в соответствующих позициях 69 и 181 стоят именно Lys и Leu.

При мутагенезе NRM14 было обнаружено два мутантных варианта, обладающих способностью к обратимой фотоконверсии. Один из них содержал замену S148C и проявлял фотоконверсию, аналогичную обратимой фотоактивации KFP1: интенсивность красной флуоресценции возрастала в 3–4 раза под воздействием зеленого света (530–560 нм) и затем возвращалась к исходному уровню при облучении синим светом (450–490 нм) или после инкубации в темноте. Второй мутантный белок, названный KFP-НС, содержал замены N148H и S165C (рис. 1) и проявлял свойства, обратные свойствам белка KFP1: исходно относительно высокая интенсивность красной флуоресценции падала в 10 раз под воздействием зеленого света (530–560 нм) и затем возвращалась к исходному уровню при облучении синим светом (450–490 нм) или после инкубации в темноте. Так как мутант KFP-НС проявлял большую яркость флуоресценции и больший динамиче-

	10	20	30	40	50		
GFP	MSKGEELFTGVVPI	LVLELDGDVNGHKFS	VSGEGEGDATYGKLT	LKFI	CTT-GKLPVPWPT		
DsRed	MRSSKNVI	KEFMRFKVRMEGT	VNGHEFEI	EGEGEGRPYEGHNTV	KLKVTKGGPLPFAWDI		
KFP1	MASLLTETMPFKTTI	EGTVNGHCFKC	IGKGEGNPFEGTQEMK	IEVI	EGGGLPFAFHI		
TagRFP	MSELI	KENMHMKLYMEGT	VNNHFFKCTSE	EGEGKPYEGTQTMRI	KVVEGGPLPFAFDI		
NMR14	MSELI	KENMHMKLYMEGT	VNNHFFKCTSE	EGEGKPYEGTQTMRI	KVVEGGPLPFAFDI		
KFP-HC	MSELI	KENMHMKLYMEGT	VNNHFFKCTSE	EGEGKPYEGTQTMRI	KVVEGGPLPFAFDI		
	60	70	80	90	100	110	
GFP	LVTTFSYGVQCFSRY	PDHMKQHDFFK	SAMPEGYVQERTI	FFKDDGNYKTRAEVK	FEGDT		
DsRed	LSPQFQYGS	KVYVKHPADIP	---	DYKLSFPEGFKWER	VMMNFEDGGV	VTVTQDSSLQDGC	
KFP1	LSTSQMYGSKTFI	KYVSGIP	---	DYFKQSFPEGFTWERT	TTTYEDGGFLTAHQDTS	LDGDC	
TagRFP	LATSFMYGSRTFI	NHTQGI	---	DDFKQSFPEGFTWERV	TYEDGGVLTATQDTS	LQDGC	
NMR14	LATSFMYGSKTFI	NHTQGI	---	DDFKQSFPEGFTWERV	TTTYEDGGVLTATQDTS	LQDGC	
KFP-HC	LATSFMYGSKTFI	NHTQGI	---	DDFKQSFPEGFTWERV	TTTYEDGGVLTATQDTS	LQDGC	
	120	130	140	150	160	170	
GFP	LVNRIELKGI	DFKEDGNI	LGHKLEYN	NSHNVY	IMADKQKNGI	KVNFKIRHNI	EDGSVQL
DsRed	FIIYKVKFI	GVNFPDGP	VMMQKKT	M-GWEASTERLYP	---	RDGVLKGEI	HKALKLKDGGHYL
KFP1	LVYKVKI	LGNNFPADGP	VMMQNKV	G-RWEPATEI	IVYE	---	VDGVLRGQSLMALKCPGGRHLT
TagRFP	LIIYNVK	IRGVNFP	SNGPVMMQKKT	L-GWEANTEMLYP	---	ADGGLEGRSDMALKLVGGGHLI	
NMR14	LIIYNVK	IRGVNFP	SNGPVMMQKKT	L-GWEANTEMLYP	---	ADGGLEGRSDMALKLVGGGHLI	
KFP-HC	LIIYNVK	IRGVNFP	SNGPVMMQKKT	L-GWEANTEMLYP	---	ADGGLEGRSDMALKLVGGGHLI	
	180	190	200	210	220	230	
GFP	ADHYQQNTP	IGDG-PVLL	PDNHYLST	QSALS	KDPNEKR	DHMLLE	EFVTAAGITHGMDELYK
DsRed	VEFKSI	YMAKK---	PVQLPGY	YVDSKLDIT	SHNEDYT-	IVEQYERTEGRHHLFL	
KFP1	CHLHTTYRSKK	PASAL	KMPGFHFEDHRI	EIMEEVEK	GK-CYKQY	EAAVGRYCDAAAPSKLGHN	
TagRFP	CNFKTTYRSKK	PAKNL	KMPGVYVDHRLERI	KEADKET-	YVEQHEVA	VARYCDLPSKLGHKLN	
NMR14	<u>ANL</u> KTTYRSKK	PAKNL	KMPGVYVDHRLERI	KEADKET-	YVEQHEVA	VARYCDLPSKLGHKLN	
KFP-HC	<u>ANL</u> KTTYRSKK	PAKNL	KMPGVYVDHRLERI	KEADKET-	YVEQHEVA	VARYCDLPSKLGHKLN	

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей флуоресцентных белков. Нумерация остатков соответствует последовательности GFP. Разрывы, внесенные для выравнивания последовательностей, обозначены прочерками. Аминокислотные остатки, боковые цепи которых погружены в белковую глобулу, показаны на сером фоне. Аминокислотные остатки в положениях 65–67, образующие хромофорную группу, выделены прямоугольником. Замены в NMR14, отличающие его от TagRFP, подчеркнуты. Замены, характерные для KFP-НС, выделены жирным шрифтом и подчеркиванием.

ский диапазон фотоконверсии, мы охарактеризовали его более подробно (см. ниже).

Спектральные свойства KFP-НС

Выделенный белок KFP-НС обладал флуоресценцией в красной области спектра, с максимумами возбуждения и эмиссии при 585 и 615 нм, соответственно (рис. 2а). После облучения интенсивным зеленым светом интенсивность флуоресценции падала в 8–10 раз (рис. 2а). Кроме изменения интенсивности флуоресценции, происходило также некоторое изменение формы спектров возбуждения и эмиссии, что хорошо заметно при сравнении нормализованных спектров (рис. 2б). В “потушенном” состоянии основной пик возбуждения немного сдвигается в синюю область (максимум при 575 нм), а также появляется новый пик при 480 нм. Последний, вероятно, соответствует протонированному состоянию хромофора и определяет реактивацию “потушенного” белка KFP-НС. Максимум эмиссии также претерпевает гипсохромный сдвиг на 13 нм

(602 нм). Измерение спектров поглощения показало, что при тушении KFP-НС зеленым светом происходит сдвиг максимума с 575 до 565 нм с некоторым увеличением коэффициента молярного поглощения (рис. 2в). Поскольку яркость флуоресценции пропорциональна произведению коэффициента молярного поглощения и квантового выхода, то очевидно, что тушение KFP-НС объясняется уменьшением квантового выхода флуоресценции. В активированном состоянии KFP-НС обладал квантовым выходом флуоресценции 0.08 и коэффициентом молярного поглощения 72000 М⁻¹см⁻¹. После тушения KFP-НС зеленым светом, в темновых условиях белок медленно возвращался к исходному (флуоресцентному) состоянию с временем полувосстановления около 30 мин.

Фотоконверсия KFP-НС в культуре клеток млекопитающих

Для демонстрации возможности использования KFP-НС для прижизненного мечения, кодирующая

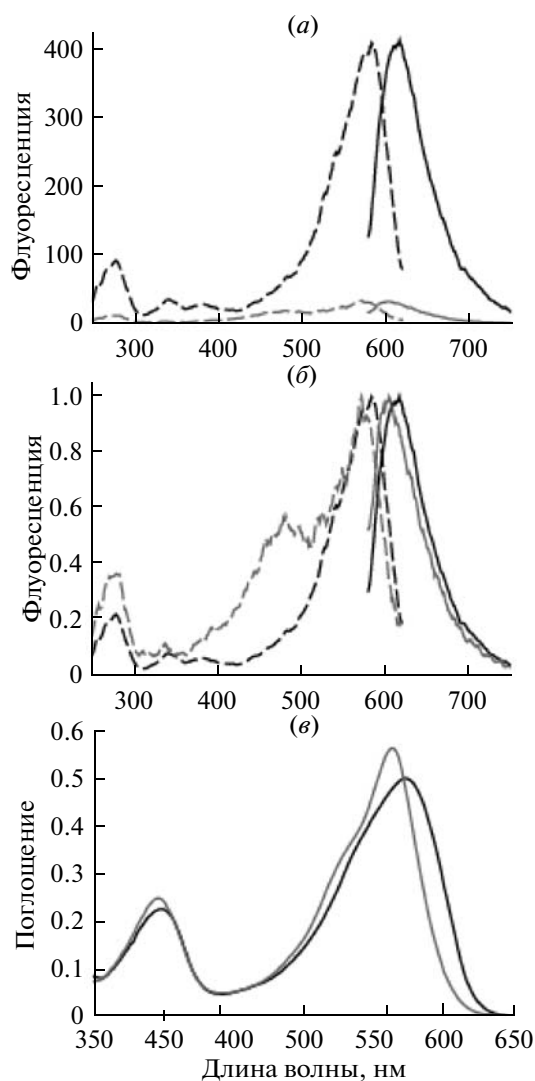


Рис. 2. Спектральные свойства белка KFP-НС. (а) Спектры возбуждения (штриховые линии) и эмиссии (сплошные линии) KFP-НС в исходном (черные линии) и потушенном (серые линии) состояниях. (б) Спектры из панели а, нормализованные на максимальное значение флуоресценции для каждой кривой. (в) Спектры поглощения KFP-НС в исходном (черная линия) и потушенном (серая линия) состояниях.

последовательность KFP-НС была клонирована в вектор для экспрессии в клетках млекопитающих. Была проведена временная трансфекция клеток линии Phoenix Eco (модификация широко используемой линии клеток эмбриональной почки человека HEK293). Флуоресцентная микроскопия показала наличие трансфицированных клеток с флуоресценцией в красной области спектра (рис. 3а). Интенсивность флуоресценции была низкой, но четко детектируемой. При наблюдении под флуоресцентным микроскопом интенсивность флуоресценции быстро падала, поскольку возбуждающий зеленый свет вызывал затухание флуоресценции белка KFP-НС. После кратковременного облучения синим светом

(набор фильтров для визуализации GFP) происходило восстановление красного сигнала. Путем варьирования яркости и продолжительности облучения зеленым и синим светом удалось подобрать условия для проведения многократных циклов тушения-активации белка KFP-НС без заметного необратимого фотообесцвечивания (рис. 3б). В ходе этих экспериментов выяснилось, что избыточное облучение именно синим, а не зеленым светом оказывает основное влияние на скорость необратимого фотообесцвечивания белка KFP-НС (не показано).

Таким образом, белок KFP-НС может быть применен для флуоресцентного мечения в культуре клеток млекопитающих. Свойства обратимой фотоконверсии, вероятно, могут быть использованы для локального оптического мечения, а также для микроскопии ультравысокого разрешения. Выявленная взаимосвязь между структурой (аминокислотной последовательностью) и способностью к обратимой фотоконверсии у различных вариантов красного флуоресцентного белка TagRFP могут позволить в будущем разработать более яркие фотоконвертируемые красные флуоресцентные белки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, хлористый натрий, EDTA, нуклеотидтрифосфаты (Sigma, США); эндонуклеазы рестрикции (New England Biolabs, США); смесь полимераз для ПЦР Advantage KlenTaq (Clontech, США).

Направленный мутагенез проводили методом достройки перекрывающихся фрагментов, полученных амплификацией с праймерами, несущими мутацию [30]. Полученные мутантные последовательности клонировали в экспрессионный вектор pQE30 (Qiagen), используя эндонуклеазы рестрикции BamHI и HindIII. При экспрессии этой конструкции в *E. coli* полученные рекомбинантные белки имели дополнительную последовательность MRNNNNHGS на N-конце полипептидной цепи, которая позволяла быстро очищать эти белки с помощью металлоаффинной хроматографии.

Визуальный отбор флуоресцентных и фотопереключаемых клонов проводили с помощью флуоресцентного бинокля Olympus SZX12.

Для наработки флуоресцентных белков штаммы *E. coli*, несущие плазмиды, экспрессирующие рекомбинантные белки, выращивали при 37°C в объеме 50 мл до оптического поглощения около 0.6 ОЕ при 600 нм. После этого экспрессию индуцировали добавлением IPTG до концентрации 0.2 мМ. Далее культуру инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующий день клетки собирали центрифугированием (10 мин при 4000 g), ресуспендировали в 1 мл PBS и разрушали ультразвуком (3 раза по 20 с на льду) на приборе Sonic Dismembrator 60 (Fisher Scientific, США). После центрифугирования (10 мин при 10000 g) флуоресцентные белки выделяли из растворимой фракции с помощью металлоаффин-

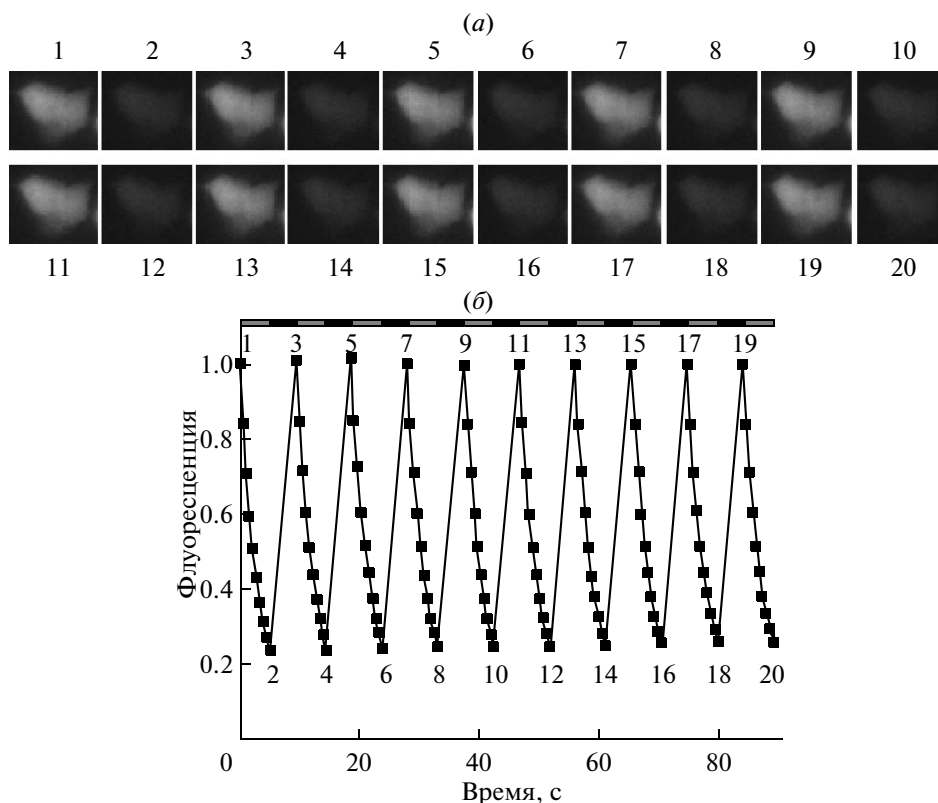


Рис. 3. Фотоконверсия KFP-НС в живых клетках млекопитающих. (а) Микрофотографии двух клеток линии Phoenix Eсо, содержащих KFP-НС, полученные с использованием наборов фильтров TX2 для визуализации флуоресценции в красной области спектра. Фотографии получены последовательно в указанном порядке, каждое нечетное изображение соответствует KFP-НС в активированном состоянии, каждое четное – в потушенном состоянии. Тушение KFP-НС осуществлялось облучением зеленым светом (набор фильтров TX2), активация – облучением синим светом (набор фильтров GFP). (б) Изменение интенсивности флуоресценции KFP-НС в клетках, показанных на панели а. Серые и черные прямоугольники над графиком обозначают интервалы облучения зеленым и синим светом, соответственно. Цифры соответствуют изображениям на панели а.

ного сорбента TALON (Clontech) согласно рекомендациям производителя. Элюцию с сорбента проводили PBS, содержащим 100 мМ EDTA. Степень очистки белков была не менее 90% по данным гелеэлектрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Спектральные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse и спектрофотометре Cary 100 (Varian, Австралия).

Для экспрессии в клетках млекопитающих кодирующая последовательность KFP-НС была клонирована в вектор EGFP-C1 (Clontech) под контроль раннего промотора цитомегаловируса вместо последовательности EGFP, с использованием эндонуклеазы рестрикции AgeI и BglII. Клетки Phoenix Eсо трансфицировались реагентом FuGene (Roche) и выращивались в среде DMEM (Invitrogen), содержащей 10% FBS (Sigma) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 48 ч.

Флуоресцентную микроскопию живых клеток млекопитающих проводили через 24–48 ч после трансфекции с помощью инвертированного микроскопа AF6000 (Leica, Германия), оснащенного объективом HCX PL APO lbd. BL 63x 1.4NA с масляной иммерсией, CCD-камерой Photometrics CoolSNAP

HQ (США), наборами оптических фильтров GFP (фильтр возбуждающего света BP470/40, фильтр эмиссии BP525/50) и TX2 (фильтр возбуждающего света BP560/40, фильтр эмиссии BP645/75) и люминесцентной лампой 120W HXP (Osram). Для детекции флуоресценции в красной области спектра, а также для тушения KFP-НС использовали набор фильтров TX2; для активации потушенного KFP-НС использовали набор фильтров GFP.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана программами Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и “Поддержка инноваций и разработок” (грант 31-236), РФФИ (грант № 09-04-12235-офи_м), Федеральным агентством по образованию (грант П256), Федеральным агентством по науке и инновациям (грант 02.512.12.2053) и программой поддержки ведущих научных школ НШ-2395.2008.4. Д.М. Чудаков и К.А. Лукьянов поддержаны Фондом содействия отечественной науке, а также грантами Президента Российской Федерации МК-6119.2008.4 и МД-2780.2009.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pakhomov A.A., Martynov V.I. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 755–764.
2. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. // *Science.* 1994. V. 263. P. 802–805.
3. Tsien R.Y. // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 509–544.
4. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 969–973.
5. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. P. 841–850.
6. Deheyn D.D., Kubokawa K., McCarthy J.K., Murakami A., Porrachia M., Rouse G.W., Holland N.D. // *Biol. Bull.* 2007. V. 213. P. 95–100.
7. Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 605–613.
8. Чудаков Д.М., Лукьянов К.А. // *Биохимия.* 2003. Т. 68. С. 1166–1172.
9. Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Lukyanov S., Verkhusha V.V. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. V. 6. P. 885–891.
10. Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J. // *Science.* 2002. V. 13. P. 1873–1877.
11. Chudakov D.M., Verkhusha V.V., Staroverov D.B., Souslova E.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1435–1439.
12. van Thor J.J., Gensch T., Hellingwerf K.J., Johnson L.N. // *Nat. Struct. Biol.* 2002. V. 9. P. 37–41.
13. Henderson J.N., Gepshtein R., Heenan J.R., Kallio K., Huppert D., Remington S.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 4176–4177.
14. Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M.V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zaraisky A.G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S.A. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 25879–25882.
15. Chudakov D.M., Belousov V.V., Zaraisky A.G., Novoselov V.V., Staroverov D.B., Zorov D.B., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 191–194.
16. Chudakov D.M., Feofanov A.V., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 7215–7219.
17. Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. // *Science.* 2004. V. 306. P. 1370–1373.
18. Henderson J.N., Ai H.W., Campbell R.E., Remington S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 6672–6677.
19. Stiel A.C., Trowitzsch S., Weber G., Andresen M., Eggeling C., Hell S.W., Jakobs S., Wahl M.C. // *Biochem. J.* 2007. V. 402. P. 35–42.
20. Stiel A.C., Andresen M., Bock H., Hilbert M., Schilde J., Schönle A., Eggeling C., Egner A., Hell S.W., Jakobs S. // *Biophys. J.* 2008. V. 95. P. 2989–2997.
21. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1567–1572.
22. Andresen M., Wahl M.C., Stiel A.C., Gräter F., Schäfer 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.
23. Andresen M., Stiel A.C., Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Wahl M.C., Hell S.W., Jakobs S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 13005–13009.
24. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F. // *Science.* 2006. V. 313. P. 1642–1645.
25. Hofmann M., Eggeling C., Jakobs S., Hell S.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 17565–17569.
26. Schwentker M.A., Bock H., Hofmann M., Jakobs S., Bewersdorff J., Eggeling C., Hell S.W. // *Microsc. Res. Tech.* 2007. V. 70. P. 269–280.
27. Egner A., Geisler C., von Middendorff C., Bock H., Wenzel D., Medda R., Andresen M., Stiel A.C., Jakobs S., Eggeling C., Schönle A., Hell S.W. // *Biophys. J.* 2007. V. 93. P. 3285–3290.
28. Hell S.W. // *Science.* 2007. V. 316. P. 1153–1158.
29. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 555–557.
30. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. // *Gene.* 1989. V. 77. P. 51–59.

Identification of the Amino Acid Residues Responsible for the Reversible Photoconversion of the Monomeric Red Fluorescent TagRFP Protein

L. Zhang, N. G. Gurskaya, Y. E. Kopantseva, N. N. Mudrik, L. L. Vagner, K. A. Lukyanov[#], and D. M. Chudakov

[#]Phone: +7 (495) 429-8020; e-mail: kluk@ibch.ru
 Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The site-directed mutagenesis of the monomeric red fluorescent protein TagRFP and its variants was performed with the goal of generating reversibly photoactivatable fluorescent proteins. Amino acids at positions 69, 148, 165, 179, and 181 (enumeration according to the green fluorescent protein GFP) were shown to play a key role in the manifestation of the photoactivatable properties. A reversibly photoactivatable red fluorescent protein KFP-HC with excitation and emission maxima at 585 and 615 nm, respectively, was generated. The KFP-HC fluorescent intensity was decreased by 5–10 times under green light (530–560 nm) irradiation (due to the fall of the fluorescence quantum yield) and restored under irradiation with blue light (450–490 nm) or after incubation in the dark (time of half reconstruction of 30 min).

Key words: fluorescent labeling, mutagenesis; photoconversion, red fluorescent protein