

ΣOS FP : une protéine fluorescente photoconvertible du vert au rouge

Virgile Adam¹, Dominique Bourgeois^{1,2}, Seán McSweeney², Mickaël Lelimosin²,
Monika Budayova-Spano³, Jörg Wiedenmann⁴, Karin Nienhaus⁴ & G. Ulrich Nienhaus⁴

¹ESRF, BP220, 6 rue Jules Horowitz, 38043 Grenoble Cedex, France

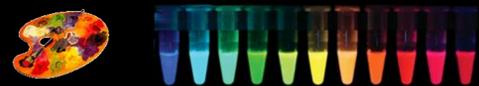
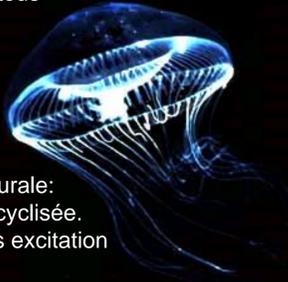
²IBS, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

³EMBL, 6 rue Jules Horowitz, 38043 Grenoble Cedex, France

⁴Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081 Ulm, Allemagne

1. CONTEXTE

L'émission de lumière par des animaux est un phénomène connu de tous (ex: lucioles) mais la compréhension de ce phénomène qualifié de **bioluminescence** chez certains animaux marins est récente. Cette fluorescence animale met en jeu des protéines dont la première à avoir été isolée chez la méduse *Aequorea victoria* (la Green Fluorescent Protein, **GFP**) n'a été clonée qu'en 1992 (par Prasher). Depuis, beaucoup d'autres protéines fluorescentes (FP) ont été découvertes ou ingénierées mais toutes ont la même topologie structurale: un tonneau-β entourant une triade d'acides aminés dont une glycine cyclisée. Cette triade, appelée **chromophore** est un puits à électrons qui, sous excitation lumineuse, émet une lumière décalée dans le rouge (fluorescence)



La véritable palette de lumières que constitue l'ensemble des protéines fluorescentes disponibles permet à la recherche biomédicale de marquer des compartiments cellulaires ou des protéines d'intérêt avec une large gamme de choix de couleur et des protéines toujours plus brillantes.

2. APPLICATIONS

La cytotoxicité de l'illumination UV souvent nécessaire pour exciter les protéines fluorescentes, l'affaiblissement de fluorescence au cours de cette illumination (photoblanchiment) ou la nécessité d'avoir des marqueurs biologiques fluorescents plus robustes et lumineux sont autant d'enjeux qui ont ouvert de nouvelles voies de recherche pour affiner notre compréhension de ces phénomènes et en améliorer les usages.

Ces efforts d'ingénierie moléculaire et de recherche de nouvelles sources fluorescentes aboutissent à la production d'une nouvelle génération de FP dites **photoactivables** comme la protéine **EosFP** [1] qui n'est pas seulement capable d'émettre de la lumière verte comme la GFP mais dont la fluorescence peut être changée en rouge. Ainsi par exemple, il est possible de marquer une cellule en vert grâce à EosFP et par irradiation laser, modifier la fluorescence en rouge dans une petite zone qui aura donc un contraste très différent de la couleur d'ensemble et dont on étudiera la dynamique en observant comment "voyage" cette couleur rouge au cours du temps (Fig. 1)

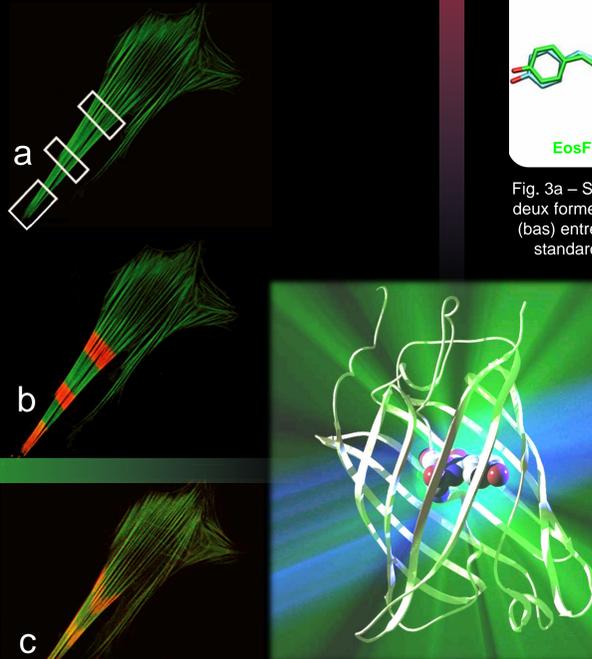


Fig. 1 – Filaments d'actine marqués in-vivo avec EosFP et dont la fluorescence verte est visualisée par illumination à 488 nm (a); Après 10 secondes d'irradiation à 400nm dans trois zones, la fluorescence rouge des zones irradiées est visualisée par illumination à 502 nm (b); Après 100 mn on peut voir comment croissent les filaments grâce au déplacement des zones rouges (c)

4. MICROSPECTROMETRIE

Le passage de la forme verte à la forme rouge de la protéine EosFP est appelée la **photoconversion**. Cette photoconversion est réalisée par irradiation lumineuse à environ 400 nm. D'après les données structurales et les études biochimiques, on suppose que lors de cette irradiation, la chaîne peptidique se brise entre les résidus 61 et 62, à proximité immédiate du chromophore.

Ce phénomène qui se produit naturellement dans l'organisme dont est issue EosFP (le corail *Lobophyllia hemprichii*) est réalisable en laboratoire grâce à l'installation microspectrophotométrique **CryoBench** de l'ESRF (Fig. 4) sur solution diluée de protéine ou même directement sous forme cristalline (Fig. 5)

Ce type d'expérience dans les cristaux nous permettent de corréler les observations cristallographiques directement sur les mêmes échantillons étudiés

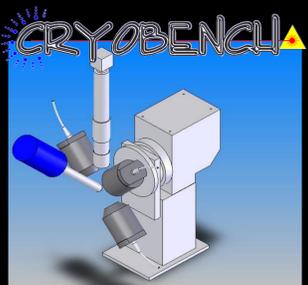


Fig. 4 – Schéma du microspectrophotomètre du laboratoire CryoBench (ESRF, Grenoble)

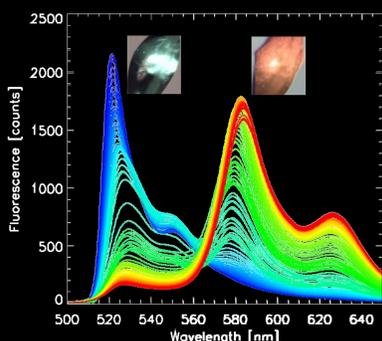


Fig. 5 – Spectres de fluorescence enregistrés au CryoBench sur un cristal de EosFP lors de la photoconversion de 516 nm à 580 nm et photos des cristaux à l'état initial et final de la réaction

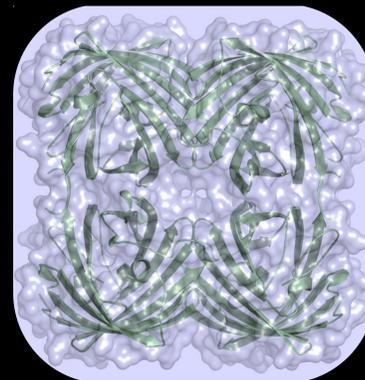


Fig. 2 – Structure générale du tétramère de la protéine EosFP

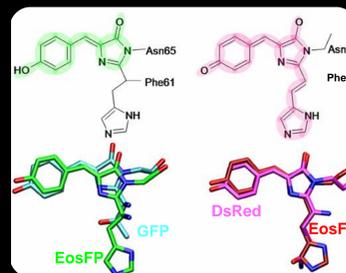


Fig. 3a – Schématisation du chromophore des deux formes de EosFP (haut) et superposition (bas) entre ces chromophores et ceux de FP standards verte (GFP) et rouge (DsRed)

3. CRISTALLOGRAPHIE

EosFP est un **tétramère** sous forme sauvage (Fig.2). Sa structure a été résolue par diffraction des rayons X [2] à la fois sous forme verte à 1.85Å et rouge à 2.0Å

La finesse et la puissance du rayonnement synchrotron de l'ESRF nous a déjà permis d'augmenter la résolution de la forme verte à 1.55Å et très probablement d'avoir bientôt une structure rouge à **très haute résolution**.

La haute précision de ces structures nous permet d'avoir des informations détaillées sur le chromophore (Tyr-Gly-His) et ses changements après sa rupture (Fig. 3)

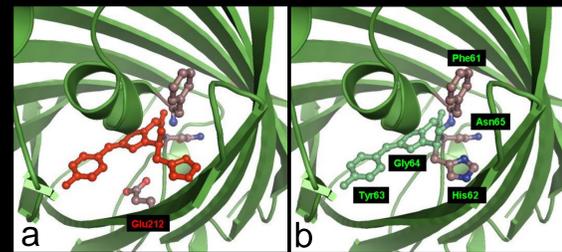
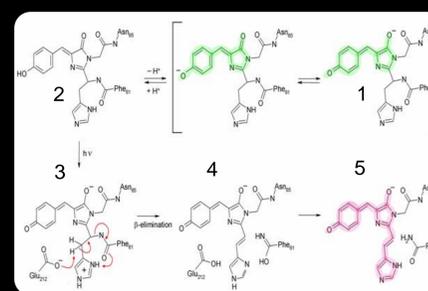


Fig.3b – Détails structuraux du chromophore de EosFP sous sa forme verte (a) et sous forme rouge après le clivage de la liaison entre F61 et H62 (b). La β-élimination mettrait en jeu la capture d'un proton de H62 par E212

5. A PROPOS DE LA REACTION

Le mécanisme proposé pour le clivage (Fig. 6) implique le passage par un état biprotonné instable de l'histidine 62 dont le retour à un état non chargé s'accompagne d'une β-élimination et d'un clivage concerté de liaison peptidique proche du chromophore.



Le système conjugué résultant délocalise plus les électrons et donc, l'émission lumineuse est moins énergétique (plus décalée dans le rouge).

Fig. 6 – Mécanisme supposé de la réaction de photoconversion vert → rouge de la protéine EosFP

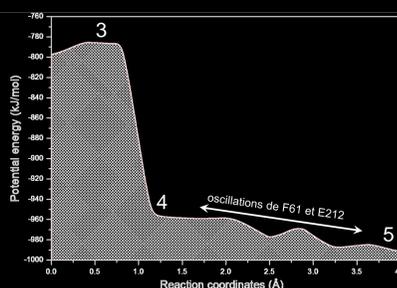


Fig. 7 – Diagramme énergétique de la réaction de β-élimination dans EosFP

Même si cette tendance forte au clivage par ce mécanisme n'est qu'une hypothèse, elle semble se vérifier par les premiers calculs de mécanique quantique effectués sur le chromophore et son environnement immédiat (Fig. 7)

Bien qu'il n'ait pas été possible pour le moment de simuler le chemin réactionnel de l'excitation des états 1 à 3 par QM, cela devrait l'être bientôt. Nous pensons que ces premières étapes mettent en jeu un état dit **ESPT** (Excited State Proton Transfer) comme on en trouve dans d'autres protéines fluorescentes.

6. OBJECTIFS

Pour tester nos hypothèses, nous avons entrepris des expériences de diffraction des rayons X sous illumination laser à basse température, où la photoconversion ne se produit pas, pour tenter de piéger un état intermédiaire potentiel. Egalement, puisque le mécanisme de photoconversion met très certainement en jeu un transfert de proton, nous sommes en train de faire pousser des cristaux deutériés de EosFP (Fig. 8) pour réaliser des expériences de diffraction des neutrons à l'ILL (Grenoble) très prochainement.

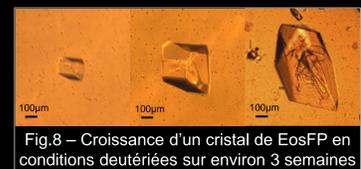


Fig.8 – Croissance d'un cristal de EosFP en conditions deutériées sur environ 3 semaines

Toutes ces informations devraient nous permettre de mieux comprendre les mystères d'un changement de couleur aussi impressionnant.