

EosFP : une protéine fluorescente photoconvertible du vert au rouge

Virgile Adam,¹ Dominique Bourgeois,^{1,2} Seán McSweeney,¹ Jörg Wiedenmann,³ Karin Nienhaus,³
and G. Ulrich Nienhaus,³
virgile.adam@esrf.fr

¹ESRF, BP220, 6 rue Jules Horowitz, 38043 Grenoble Cedex, France – ²LCCP-IBS, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France – ³Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081 Ulm, Germany

Depuis la découverte de la protéine fluorescente verte (GFP) en 1992 dans la méduse *Aequorea victoria*, de nombreux autres animaux (principalement marins) ayant la capacité d'émettre de la lumière ont été découverts. Les protéines fluorescentes (FPs) synthétisées par ces animaux ont permis de révolutionner la recherche en sciences du vivant, en particulier dans le domaine de l'imagerie cellulaire. En effet les FPs peuvent être employées comme marqueurs intracellulaires et être génétiquement fusionnées aux protéines d'intérêt afin d'en suivre la localisation et la dynamique dans la cellule. Ces dernières années, la technologie des protéines fluorescentes (FPs) s'est considérablement développée [1]. La « boîte à outils » des FPs a été largement élargie avec la découverte d'homologues de la GFP émettant de la fluorescence dans toutes les couleurs de l'arc-en-ciel.

Toutefois, l'optimisation des FPs nécessite encore de nombreux développements. Un effort d'ingénierie est nécessaire pour mettre au point des FPs possédant un meilleur rendement quantique, des spectres d'émission accordables à volonté et des spectres d'excitation centrés sur des longueurs d'onde éloignées de l'UV, donc moins dommageable pour les cellules. De plus les FPs doivent résister au photoblanchiment et être active sous forme monomérique. Notre travail, mené dans un environnement multidisciplinaire (biochimie, biophysique et biologie structurale) concerne la protéine fluorescente Eos (EosFP) issue du corail *Lobophyllia hemprichii*. Clonée dans *Escherichia coli*, cette protéine présente de superbes propriétés [2]. Elle est capable d'émettre une fluorescence verte très intense (128% de la brillance de l'EGFP) avec un pic maximal d'émission à 516 nm. Après irradiation à 390 nm, un clivage photo-induit de la chaîne principale, à proximité du chromophore, permet sa photoconversion en protéine fluorescente rouge avec un pic d'émission maximal à 581 nm. En combinant diffraction aux rayons X et spectroscopie d'absorption et de fluorescence en solution et *in crystallo*, nous étudions le mécanisme réactionnel de photoconversion de EosFP à l'échelle atomique. Ce travail s'inscrit dans une démarche d'ingénierie rationnelle visant à terme à améliorer les propriétés de fluorescence de la protéine pour des applications à l'imagerie cellulaire. Nous avons déjà obtenu la structure de la forme verte de EosFP à 1.55 Å de résolution et montré que le mécanisme de photoconversion reste opérationnel dans l'enzyme cristalline, bien qu'il soit susceptible d'être perturbé par le dommage radiatif dû aux rayons X.

[1] Tsien, R.Y. *Science* **2006**, *312*, 217-24.

[2] Wiedenmann, J; Ivanchenko, S; Oswald, F; Schmitt, F; Röcker, C; Salih, A; Spindler, K.D.; Nienhaus, G.U. *PNAS* **2004**, *101*, 15905.

[3] Nienhaus, K; Nienhaus, G.U.; Wiedenmann, J; Nar, H. *PNAS* **2005**, *102*, 9156.