

## **Роль остатка в положении 96 в созревании хромофора и стабильности EGFP**

**Степаненко Олеся В., Красноруцкая Р.С., Верхуша В.В., Кузнецова И.М.,**

**Туроверов К.К**

*аспирант, студент, сотрудники*

*Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет, Санкт-Петербург, Россия; Медицинский колледж имени Альберта*

*Эйнштейна, Нью-Йорк, США*

*E-mail: [lvs@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:lvs@mail.cytspb.rssi.ru), [kkt@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:kkt@mail.cytspb.rssi.ru)*

Зеленый флуоресцентный белок (EGFP) принадлежит к обширному классу белков, характеризующихся наличием у них уникального хромофора, поглощающего и, в большинстве случаев, способного флуоресцировать в видимой области спектра. Большой интерес к флуоресцентным белкам (FPs), вызван их интенсивным использованием в клеточной биологии в качестве маркеров генной экспрессии и белкового транспорта в живых клетках и тканях. Несмотря на существенные различия в аминокислотном составе, все FPs представляют собой цилиндр из 11  $\beta$ -листов ( $\beta$ -can), в центре которого проходит  $\alpha$ -спираль, содержащая хромофор, образующийся в результате трехстадийной аутокаталитической циклизации трех аминокислотных остатков в положении 65-67. Хотя такая аминокислотная последовательность встречается и в других белках, в них хромофор не образуется, что говорит о решающей роли пространственной структуры белка в образовании хромофора. В работе методами триптофановой флуоресценции, флуоресценции хромофора и кругового дихроизма в дальней УФ-области спектра выполнено изучение влияния аминокислотных замен по остатку R96 (R96G, R96A, R96C, R96S) на структуру и стабильность белка.

Установлено, что замена R96G препятствует образованию нативного белка – весь мутантный белок EGFP R96G оказался локализованным в телах включения. Уровни экспрессии EGFP R96C и EGFP сравнимы, а белков EGFP R96S и EGFP R96A значительно ниже. Непосредственно после выделения все белки имели триптофановую флуоресценцию, характерную для нативных белков и выраженный спектр КД в дальней УФ-области спектра, сходный со спектром КД EGFP. Однако зеленая флуоресценция наблюдалась лишь в случае EGFP R96C, при этом интенсивность зеленой флуоресценции была в 5 раз меньше чем у EGFP. В случае замен R96S и R96A скорость образования хромофора существенно снижена. Растворы данных белков приобрели свечение в зеленой области спектра через пол года после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ . При этом спектры флуоресценции хромофора этих белков сдвинуты в более коротковолновую область и интенсивность их флуоресценции в максимуме примерно в 50 раз ниже по сравнению с EGFP. Таким образом, полученные данные подтверждают существенную каталитическую роль R96 в формировании зеленого хромофора. Построение Перреновских зависимостей для всех исследованных мутантных белков и EGFP показало, что они в значительной степени склонны к образованию крупных ассоциатов (агрегатов), что коррелирует с низкими константами динамического тушения триптофановых остатков, определенными из наклона зависимостей Штерн-Фольмера. По-видимому, при образовании агрегатов (ассоциатов) триптофановые остатки становятся менее доступными молекулам растворителя. Измерение кинетических и стационарных зависимостей изменения характеристик триптофановой флуоресценции и флуоресценции зеленого хромофора от концентрации гуанидингидрохлорида показало, что все исследуемые белки очень устойчивы к денатурирующим воздействиям, что характерно для белков, имеющих структуру типа " $\beta$ -бочонка". В тоже время, белки EGFP R96S и EGFP R96A значительно менее стабильны по сравнению с EGFP, в то время как стабильность EGFP R96C даже несколько выше стабильности EGFP.

Работа поддержана Программой МКБ РАН, Программой "Ведущие научные школы РФ" (НШ-9396,2006,4) и Фондом содействия отечественной науке (Степаненко Олеся В., 2007).