

Исследование фото-физических свойств реCOVERина при помощи флуорогенных красителей на основе хромофора GFP

Научный руководитель – Борщевский Валентин Иванович

Белюсов А.С.¹, Маслов И.В.²

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: belousov.as@phystech.edu*;

2 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail:*

ivan.v.maslov@phystech.edu

РеCOVERин — белок, принадлежащий к суперсемейству EF-hand Ca^{2+} -связывающих белков. РеCOVERин Ca^{2+} -зависимым образом регулирует активность родопсин-киназы GRK1, которая, в свою очередь, ингибирует родопсин в фоторецепторных клетках позвоночных, позволяя адаптироваться глазу к изменению интенсивности окружающего света.

Известно, что уникальный цистеин реCOVERина (С39) можно модифицировать флуоресцентным красителем Alexa647, изменения фотофизических свойств которого позволяет следить за конформационными изменениями в белке [1].

Для изучения конформационной динамики реCOVERина ранее применялось множество биофизических методов, в том числе методы ЯМР (именно благодаря ЯМР были получены трехмерные структуры миристоилирированного реCOVERина), рентгено-структурного анализа, поверхностного плазмонного резонанса и флуоресцентной микроскопии. Было показано, что реCOVERин взаимодействует с кальцием с помощью EF-hand 2 и 3, однако при мутации в EF-hand 3 оба домена теряют способность связывать ионы кальция. При связывании Ca^{2+} , белок высвобождает миристоильную группу, с помощью которой связывается с липидным бислоем при высокой концентрации кальция [2].

Целью данной работы является поиск флуоресцентных красителей, которые были бы пригодны для наблюдения конформационной динамики реCOVERина на уровне одиночных молекул, и изучение фото-физических свойств белка. Мы исследовали 4 красителя, основанные на хромофорном ядре GFP, которые так же как и Alexa647 присоединяются к цистеину в 39-ой позиции с помощью малеимид-тиолового взаимодействия [3]. Нами было подтверждено связывание реCOVERина с красителем, а затем у двух образцов из четырех были зафиксированы изменения фото-физических свойств (спектров поглощения и флуоресценции, интенсивности флуоресценции и времени жизни флуорофора) при добавлении к белку $CaCl_2$ и EGTA.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания РФ (соглашение №075-00337-20-03, проект FSMG -2020-0003), РФФИ (№20-34-70034).

Источники и литература

- 1) T. Gensch, K. E. Komolov, I. I. Benin, P. P. Philippov, and K. W. Koch, “ Ca^{2+} -dependent conformational changes in the neuronal Ca^{2+} -sensor recoverin probed by the fluorescent dye alexa647,” *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 66, no. 2, pp. 492–499, Feb. 2007, doi: 10.1002/prot.21231.
- 2) A. M. Alekseev et al., “Obtaining and characterization of EF-hand mutants of recoverin,” *FEBS Lett.*, vol. 440, no. 1–2, pp. 116–118, 1998, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01426-4.
- 3) A. Y. Smirnov et al., “Design of red-shifted and environment-sensitive fluorogens based on GFP chromophore core,” *Dye. Pigment.*, vol. 177, no. October 2019, p. 108258, 2020, doi: 10.1016/j.dyepig.2020.108258.