

Исследование влияния котрансляционного введения неканонических аминокислот на функциональные свойства оранжевого каротиноидного белка

Научный руководитель – Максимов Евгений Георгиевич

Буханько Антонина Юрьевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биофизики, Москва, Россия

E-mail: tehnanana@mail.ru

Оранжевый каротиноидный белок (ОСР) - фотоактивный каротиноид-содержащий белок, осуществляющий процесс нефотохимического тушения возбужденных состояний пигментов светособирающих комплексов цианобактерий в условиях высокой интенсивности света. Положение каротиноида в структуре белка стабилизируется за счет образования двух водородных связей между кето-группой каротиноида и остатками Туг-201 и Трр-288. Под воздействием интенсивного света сине-зеленой области спектра ОСР переходит в физиологически-активную красную форму, при этом водородные связи между С-концевым доменом белка и молекулой кетокаротиноида разрушаются и домены диссоциируют, в следствии чего открывается сайт связывания со светособирающей антенной. Во время темновой адаптации белковая матрица ОСР самопроизвольно переходит в исходную конформацию. Для эффективной адаптации к быстрым изменениям интенсивности света цианобактерии используют регуляторный белок FRP (Fluorescence Recovery Protein), в присутствии которого релаксация красной формы ОСР ускоряется на два порядка.

На данный момент начальные стадии фотоцикла ОСР остаются мало изученными. Во многом это объясняется ограниченным набором возможностей для модификации сети водородных связей при использовании “классического” точечного мутагенеза. Большинство замен консервативных аминокислот в окружении каротиноида приводит к неправильному сворачиванию белка и потере фотоактивности. Данную проблему можно решить путем введения неканонических аминокислот, позволяющих произвести мутацию на атомарном уровне, не нарушающих общей структуры белка, но вносящих значительные изменения в сеть водородных связей.

В данной работе мы получили рекомбинантный белок ОСР с заменой Туг201 на неканоническую аминокислоту йодотирозин методом сайт-направленного мутагенеза с использованием ортогональной пары аминоксил-тРНК-синтазы и соответствующей ей тРНК. Йод является эффективным тушителем флуоресценции. Благодаря тому, что в С-концевом домене ОСР остаток Туг-201 расположен близко с остатком Трр-288, по изменению флуоресценции которого возможно исследование фотоцикла ОСР, нам удалось детектировать тушение флуоресценции триптофана атомом йода после фотоактивации методом коррелированного по времени единичного счета фотонов. В комбинации с данными, полученными методом время-разрешенной абсорбционной спектроскопии в режиме накачки-зондирования, полученная информация позволила нам лучше понять фотоцикл ОСР и подробнее охарактеризовать переходные формы фотоцикла ОСР. Также результаты данной работы позволяют сделать вывод о влиянии вставки неканонической аминокислоты на функциональные свойства ОСР, что дает новые возможности для использования метода сайт-направленного мутагенеза в исследованиях фотоактивных белков.