

УДК 577.112:577.322.7

О.В.Степаненко (5 курс, каф. БФ),
К.К.Туроверов, д.ф.-м.н., зам. директора (ИНЦ РАН)

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА РАЗВОРАЧИВАНИЯ DsRed ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГУАНИДИНГИДРОХЛОРИДА

Исключительный интерес к флуоресцентным белкам типа GFP (Green Fluorescent Protein) и DsRed (Red fluorescent protein from *Discosoma sp*) обусловлен тем, что эти белки в последнее время стали мощным инструментом клеточной биологии. Они широко используются как биологические маркеры, позволяющие проследить и изучать динамику генной экспрессии и белкового транспорта в живых клетках, тканях и трансгенных организмах. Полосы поглощения и флуоресценции этих белков в видимой области спектра обусловлены внутренним хромофором, возникающим в результате аутокаталитической циклизации трех аминокислотных остатков Ser65, Tyr66 и Gly67 (в случае GFP) и Gln66, Tyr67, Gly68 (в случае DsRed). Результаты рентгеноструктурного анализа DsRed свидетельствуют о том, что топология пространственной структуры GFP и мономера DsRed одинакова и имеет вид β -барреля. В тоже время DsRed, в отличие от GFP, представляет тетрамер. Это обстоятельство может значительно повлиять на стабильность белка, его устойчивость к действию денатурирующих агентов, таких как гуанидингидрохлорид (GdmCl) и мочевины. Вообще процессы сворачивания-разворачивания белков этого класса изучены очень мало. Остается не выясненным, происходит ли сворачивание (и разворачивание) этих белков по одностадийному механизму или на пути сворачивания образуются промежуточные состояния; чем объясняется низкая скорость этих процессов; являются ли процессы сворачивания-разворачивания обратимыми или нет.

В связи с этим задача работы состояла в исследовании процессов разворачивания DsRed под действием GdmCl и проведении сравнительного анализа устойчивости белков GFP и DsRed к воздействию этого денатурирующего агента.

Было установлено, что зеленая флуоресценция EGFP и, особенно, красная флуоресценция DsRed чрезвычайно устойчивы к денатурирующему действию GdmCl. Процессы разворачивания белков при воздействии GdmCl происходят столь медленно, что получение равновесной кривой зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации GdmCl представляют значительную трудность. Равновесная кривая может быть получена только путем экстраполяции кинетических зависимостей интенсивности денатурации, измеренных при различных концентрациях GdmCl.

Измеренные кинетические кривые показывают, что DsRed обладает значительно большей устойчивостью к действию GdmCl и для его денатурации требуются значительно большие концентрации денатурирующего агента, чем для денатурации GFP, который также обладает существенной устойчивостью.

Было показано, что DsRed устойчив к воздействию гуанидингидрохлорида в концентрации до 6 М, при дальнейшем увеличении концентрации GdmCl наблюдается резкий спад флуоресценции, что обусловлено кооперативной денатурацией белка.

Проведенные эксперименты не выявили промежуточных состояний при разворачивании белков EGFP и DsRed-1, то есть даже для DsRed-1, который является тетрамером, процесс денатурации осуществляется по принципу “все или ничего”. Это, возможно, связано с тем, что макромолекула DsRed стабилизирована за счет межсубъединичных контактов, а после их разрушения, которое происходит чрезвычайно медленно и при значительных концен-

трациях GdmCl, сами субъединицы распадаются очень быстро.