

УДК 577.112:577.322.7

**О.В.Степаненко (5 курс, каф. БФ),
И.М.Кузнецова, к.б.н., с.н.с. (ИНЦ РАН)**

ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН ПО GLY67 НА ОБРАЗОВАНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА

GFP — зеленый флуоресцентный белок. Впервые белок GFP был выделен из медузы *Aequorea* Шимомурой и др. Большой интерес к белкам типа Green Fluorescent Protein (GFP), вызван тем, что они интенсивно используются в клеточной биологии в качестве биологических маркеров, которые позволяют проследить и изучать динамику генной экспрессии и белкового транспорта в живых клетках и тканях. Спектр флуоресценции имеет максимум на длине волны 508 нм — в зеленой области спектра.

GFP белки имеют выраженную β -складчатую структуру. Белок образован 11 β -листами, формирующими цилиндр (так называемый β -barrel). Зеленый хромофор (Cto 66) входит в состав α -спирали, которая расположена в центре этого цилиндра вдоль его оси.

Не смотря на то, что к настоящему моменту создано достаточно большое количество мутантных форм GFP, до сих пор считалось, что для образования зеленого хромофора необходимым условием является наличие в положении 67 глицина — остатка, имеющего минимальный размер бокового радикала.

Считалось также, что наличие в данном положении аминокислоты с большим радикалом будет препятствовать образованию зеленого хромофора.

Целью настоящей работы являлась проверка этого утверждения.

Для обеспечения данной работы были созданы штаммы бактерий *E. Coli*, предназначенные для экспрессии EGFP и его мутантных форм с аминокислотными заменами Gly67Ala и Gly67Val. Генно-инженерная работа была выполнена сотрудником центра Молекулярной медицины МГУ (Москва) В.В.Верхушей, а выделение и очистка белков — сотрудником ИЭМ СПб — М.М.Шавловским. Спектры флуоресценции EGFP и его мутантных форм имеют максимум флуоресценции при 510 и 513 нм, соответственно.

Измерения кинетики изменения интенсивности флуоресценции при денатурации белка гуанидинхлоридом для EGFP и его мутантной формы с заменой Gly67Ala показывают, что денатурация белков происходит очень медленно, значительно медленнее по сравнению с белками, имеющими α и α/β структуру, например, с актином. Сравнительный анализ кривых денатурации EGFP и его мутантной формы с заменой Gly67Ala свидетельствует о том, что мутантная форма является даже более устойчивой к действию GdmCl чем EGFP.

В ходе выполненных экспериментов обнаружено следующее:

- спектры флуоресценции EGFP и EGFP Gly67Ala близки; процесс денатурации EGFP и его мутантной формы с аминокислотной заменой Gly67Ala протекает довольно медленно, причем аминокислотная замена Gly67Ala не только не дестабилизирует структуру белка, но и делает белок даже более устойчивым действию денатурирующего агента;

- дальнейшее увеличение боковой цепи аминокислоты, находящейся в положении 67 (например, Gly67Val), приводит к нарушению образования хромофора и накоплению белка в телах включения.