

АННОТАЦИЯ

*научно-квалификационной работы Марынич Надежды Константиновны на тему
«Получение FRET-сенсора toxSAASoti-хромопротеин и его применение в современных
методах микроскопии»*

(06.06.01 Биологические науки, 1.5.4 Биохимия)

FRET-сенсоры на основе флуоресцентных белков применяются для детекции активности каспазы-3 и определения ранней стадии эффекторной фазы. Красный флуоресцентный белок-донор позволяет работать в области с наименьшим поглощением и автофлуоресценцией клеток млекопитающих, а использование хромобелков в качестве акцептора нивелирует побочную флуоресценцию. В настоящей работе получены мономерные акцептор Ultramarine и донор флуоресценции newtoxSAASoti для сенсора на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET).

Ранее в качестве акцептора применялся белок KFP. Однако он имеет ряд недостатков: подвержен возгоранию флуоресценции при интенсивном облучении светом с длиной волны 530 нм, необходимым для возбуждения флуоресценции донора, является тетрамером, что увеличивает размер сенсора и ограничивает места его возможной локализации в клетке. Также в настоящей работе обнаружено, что интенсивность флуоресценции KFP в присутствии ацетат ионов возрастает в 10 раз при pH 4. Поэтому был подобран новый не флуоресцирующий мономерный акцептор Ultramarine. Получен сенсор TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U), поскольку TagRFP имеет близкий максимум поглощения с красной формой SAASoti и уже использовался во FRET-сенсорах. Подтверждено мономерное состояние сенсора TR-23-U, а также продемонстрирован эффективный гидролиз сенсора каспазой-3 и нарушении FRET между белками.

Наиболее эффективно такого рода сенсор может быть использован для определения активности каспазы в живых клетках методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС). Метод ФКС позволяет анализировать олигомерное состояние белков, а следовательно, регистрировать расщепление FRET-сенсора, однако для него требуются концентрации белка порядка 10^{-9} М. Для контроля концентрации в качестве флуоресцентного донора был выбран бифотохромный белок SAASoti благодаря его свойству зелёно-красной фотоконверсии.

Для работы во всех компартментах клетки, в том числе имеющих окислительные условия получен бесцистеиновый вариант с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина – toxSAASoti. Для toxSAASoti характерна высокая скорость фотоконверсии, но низкая фотостабильность красной формы. Поэтому путем введения замены F97M был получен новый вариант с более стабильной красной формой, яркость которой превышала исходную почти в 8 раз. Путем варьирования аминокислотных остатков в положении 97 возможно получить более яркий или более стабильную красную форму, так были получены варианты F97L и F97V соответственно. Также на более эффективное созреванию в клетках млекопитающих влияют замены в положениях 74 и 125: получены варианты с заменами H74K, H74A, H125Y. Путем одновременного сайт-насыщающего мутагенеза по положениям 74, 97, 125 получен яркий и стабильный вариант с заменами H74K/F97M, названный newtoxSAASoti. Создан сенсор newtoxSAASoti-23-Ultramarine.