

Низкоаффинные взаимодействия пептидов для флуоресцентного мечения белков в живых клетках.

Научный руководитель – Мишин Александр Сергеевич

Перфилов Максим Михайлович

Аспирант

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

E-mail: sufrep@gmail.com

В настоящее время флуоресцентная микроскопия широко используется в биологии для визуализации различных клеточных структур и процессов. Среди разнообразия методов флуоресцентной микроскопии можно выделить локализационную микроскопию сверхвысокого разрешения, позволяющую получать изображения с разрешением 20-50 нм [1]. Для мечения клеточных структур в локализационной микроскопии часто используются белки слияния флуоресцентных белков с целевыми белками. Однако их использование сопряжено с рядом недостатков, в частности, фотообесцвечивание флуоресцентных меток и низкая плотность мечения. Одним из способов преодолеть данные недостатки может быть использование слабозаимодействующих с целевыми клеточными структурами меток [2].

В данной работе мы предлагаем новый метод мечения целевых белков, основанный на гетеродимеризации искусственных спиралей, состоящих из 3-4 повторяющихся гептад (К/Е-спираль). Метод предполагает коэкспрессию целевого белка, связанного с К-спиралью, и флуоресцентного белка, связанного с Е-спиралью. При этом взаимодействие К- и Е-спиралей должно обеспечивать колокализацию целевого и флуоресцентного белков. Прочность связывания таких гетеродимерных комплексов зависит от аминокислотного состава гептад и их количества.

На первом этапе работы был получен набор генетических конструкций, содержащих зелёный и красный флуоресцентные белки с К- и Е-спиралями. В качестве модельных систем для определения свойств гетеродимеризующихся спиралей были выбраны белки цитоскелета, H2B и кавеоллин. Взаимодействие К/Е-спиралей оценивалось по колокализации сигналов, один из которых имел чётко выраженную внутриклеточную локализацию (цитоскелетные волокна, хроматин, кавеолы), а второй не имел сигналов локализации. Помимо этого, измерялось время полувосстановления флуоресценции после фотообесцвечивания кавеолы или участка цитоскелетного волокна или ядра. Данная серия экспериментов позволила подобрать пары К/Е-спиралей, позволяющих, с одной стороны, специфично пометить клеточные структуры, а с другой - совершался достаточно быстрый (в секундной шкале) обмен белков в гетерокомплексах. Данные пары были успешно применены для визуализации цитоскелета в различных режимах: конфокальной микроскопии, микроскопии полного внутреннего отражения флуоресценции (TIRFM) и локализационной микроскопии.

Такая система мечения внутриклеточных структур открывает новые возможности в микроскопии сверхвысокого разрешения. Стабильность меток позволяет проводить длительную съёмку внутриклеточных структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного фонда (проект №16-14-10364).

Источники и литература

- 1) Клементьева Н.В., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А., Мишин А.С. Принципы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (обзор) // Соврем. Технол. Мед. 2016. No. 8. С. 130-140.
- 2) Kiuchi, T., Higuchi, M., Takamura, A., Maruoka, M., Watanabe, N. Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 743–746.