

**Биофизические и структурные свойства красного флуоресцентного белка  
Katushka M1\_S2insVGED и его модифицированных неканоническими  
аминокислотами вариантов**

**Научный руководитель – Максимов Евгений Георгиевич**

*Прохоров И.А.<sup>1</sup>, Архипченко А.А.<sup>2</sup>, Шлыков М.А.<sup>3</sup>*

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия, *E-mail: privalbus@gmail.com*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биофизики, Москва, Россия, *E-mail: sashaarh2002@yandex.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет наук о материалах, Москва, Россия, *E-mail: ceshakov@gmail.com*

Флуоресцентные белки широко используются в биологии, однако многие аспекты их структурно-функциональной организации остаются малоизученными. Мы показали, что в некоторых условиях хромофор изучаемого нами перспективного красного флуоресцентного белка Katushka M1\_S2insVGED может фотоизомеризоваться. Для изучения механизма этого процесса мы ввели в его хромофор неканонические аминокислоты 3-йод- (IY) и 3-хлортирозин (CIY), которые модифицировали его конформационную подвижность и рК. Мы проанализировали рН-чувствительность полученных белков и параметры фотоконверсии, которая может быть использована для визуализации процессов, происходящих в компартментах клетки с низким значением рН.

Методом ПЦР-мутагенеза получали генетическую конструкцию, содержащую последовательность Katushka M1\_S2insVGED с заменой кодона тирозина хромофора на амбер-кодон TAG и С-концевым 6xHis. Белки экспрессировали в *E. coli*. Для экспрессии мутантных белков использовали ортогональную систему трансляции, состоящую из специфичных тРНК и АРСазы. Белки очищали с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Измеряли поглощение, стационарную и время-разрешённую флуоресценцию в различных условиях. Проводили кристаллизацию и рентгеноструктурный анализ препаратов белка.

Katushka M1\_S2insVGED с IY в хромофоре показал ряд отличий от белка дикого типа: батохромный сдвиг максимума поглощения хромофора на 8 нм; сокращенное время жизни флуоресценции (1350 пс против 2050 пс у белка дикого типа); увеличенная рН-стабильность; увеличенная доля «синей» и «зелёной» форм хромофора.

Katushka M1\_S2insVGED обладает фотоконверсией (из «жёлтой» формы в «красную»), наиболее эффективной при рН 4,5 и накачке 450 нм. Введение CIY в хромофор Katushka M1\_S2insVGED ограничивает способность к фотоконверсии. В результате структурных исследований показано, что фотоконверсия является цис-транс-изомеризацией хромофора.

Таким образом, Katushka M1\_S2insVGED обладает рН-зависимой фотоконверсией, сопровождающейся цис-транс-изомеризацией хромофора. Введение IY в хромофор приводит к снижению эффективности фотоконверсии, увеличению рН-стабильности, батохромному сдвигу максимума поглощения, уменьшению среднего времени жизни флуоресценции и увеличению выхода «синей» и «зелёной» форм хромофора.