

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОМЕРОВ В БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИОМАРКЕРАХ

© 2021 г. О. В. Степаненко¹, *, О. В. Степаненко¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: sov@incras.ru

Поступила в редакцию 16.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 03.10.2020 г.

В настоящей работе мы проанализировали, как изменяется взаимодействие между мономерами в ближне-инфракрасных флуоресцентных биомаркерах iRFP713 и iRFP713/C15S/V256C при изменении сети водородных связей между хромофором и его белковым окружением в результате аминокислотной замены треонина в положении 204 на аланин (T204A) в микроокружении хромофора или при замене природного лиганда биливердина на фикоцианобилин. Обнаруженное ранее аллостерическое ингибирование ковалентного присоединения биливердина к мономеру iRFP713/C15S/V256C после ковалентного присоединения хромофора к другому мономеру белка существенно уменьшается при введении замены T204A. Аллостерического ингибирования ковалентного связывания фикоцианобилина с iRFP713/C15S/V256C не происходит, в отличие от связывания биливердина с этим белком. Напротив, замена биливердина на фикоцианобилин в iRFP713 приводит к усилению аллостерического ингибирования ковалентного связывания хромофора. Наши исследования свидетельствуют, что изменение внутримолекулярных связей между хромофором и остатками его микроокружения в биомаркерах, происходящее при замене хромофора или в результате аминокислотных замен, оказывает влияние на взаимодействие мономеров в биомаркере.

Ключевые слова: бактериальные фитохромы, флуоресцентные биомаркеры, аллостерическое взаимодействие

DOI: 10.31857/S0041377121010107

Предметом настоящего исследования являются димерные ближне-инфракрасные (NIR) биомаркеры, разработанные на основе бактериальных фитохромов – фотосенсорных белков, которые участвуют в свето-зависимой регуляции биологических процессов в клетках бактерий. NIR-биомаркеры состоят из двух доменов PAS (Per-ARNT-Sim) и GAF (cGMP PDE/ΔC/Eh1A), которые вместе образуют так называемый хромофор-связывающий домен полноразмерных фитохромов. В состав N-концевого участка домена PAS входит цистеиновый остаток, который необходим для ковалентной фиксации хромофора, а в домене GAF находится карман для встраивания тетрапиррольного хромофора (Rodríguez et al., 2017). Комплексы NIR-биомаркеров с их лигандом биливердином (BV) нашли широкое применение в качестве генетически-кодируемых меток для прижизненной визуализации молекулярных процессов с высоким разрешением в реальном масштабе времени, происходящих в отдельных клетках и в целом организме (Rodríguez et al., 2017).

Принятые сокращения: NIR-биомаркеры – ближне-инфракрасные флуоресцентные биомаркеры; BV – биливердин; PCB – фикоцианобилин; GdnHCl – гидрохлорид гуанидина.

В фитохромах при фотоконверсии происходит передача структурных изменений от тетрапиррольного хромофора к хромофор-связывающему домену и далее последовательно к остальным доменам белка (Takala et al., 2014; Burgie et al., 2016; von Horsten et al., 2016). Кроме того, домены фоторецепторов, аминокислоты которых не контактируют с тетрапирролом в хромофор-связывающем домене напрямую, также влияют на процесс изомеризации хромофора (Burgie et al., 2017). Считается, что подобная связь между доменами фоторецепторов расширяет возможности регуляции процессов фотоактивации и темновой релаксации этих белков (Gourinchas et al., 2018).

Наши исследования также выявили влияние мономеров в NIR-биомаркерах на структуру друг друга, которое определяет характер связывания хромофора с отдельными мономерами белка (Stepanenko et al., 2016, 2017). Этот эффект заключается в том, что ковалентное связывание BV с остатком Cys в одном из мономеров биомаркера аллостерически ингибирует формирование ковалентной связи между встроенным в карман белка хромофором и остатком Cys второго мономера биомаркера. Характер связывания хромофора в NIR-биомаркерах оказывает существенное влияние их фотофизические свойства, в частности