

**Круговой пермутант флуорогенного белка для создания биосенсоров****Научный руководитель – Белоусов Всеволод Владимирович****Смолярова Дарья Дмитриевна***Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия

*E-mail: dasha@smolyarova.ru*

С конца XX века стали набирать популярность генетически-кодируемые флуоресцентные белки (FP), позволяющие визуализировать различные внутриклеточные структуры и процессы (взаимодействия макромолекул, изменения активности промоторов, концентрации метаболитов и сигнальных молекул и т. д.) в режиме реального времени [1]. Различают две группы FP: с внутренним хромофором и с внешним [3]. К первой группе относится знаменитый GFP (*англ.* Green Fluorescent Protein) и его производные, у которых хромофор формируется с участием кислорода внутри бета-бочонка с молекулярной массой около 24 кДа. Несмотря на широкое применение, данная группа белков имеет свои недостатки: с помощью них нельзя проводить наблюдения в анаэробной среде и следить за быстрыми процессами, так как для формирования хромофора требуется время порядка десятков минут [1]. К группе FP с внешним хромофором относится Y-FAST (*англ.* Yellow Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag), который был создан на основе фоторецептора PYP (*англ.* Photoactive Yellow Protein) из бактерий *Halorhodospira halophila* с помощью направленной эволюции методом дрожжевого дисплея. Y-FAST способен обратимо связывать флуорогенные хромофоры с GFP-подобной структурой. Y-FAST лишен перечисленных недостатков GFP-подобных белков: он сравнительно небольшой (14 кДа), созревает за времена порядка секунд без участия кислорода, а его флуоресцентный сигнал может возобновляться за счет обратимого связывания хромофора. Эти свойства делают Y-FAST привлекательной флуоресцентной меткой для создания биосенсоров и микроскопии, в том числе субдифракционной.

Данная работа посвящена созданию кругового пермутанта Y-FAST с целью дальнейшего использования в качестве флуоресцентного ядра для биосенсоров. Для этого создали библиотеки мутантов Y-FAST с различными положениями круговой пермутации. Полученные библиотеки были отскринированы на предмет связывания с флуорогенным субстратом 4-гидроксипенцилиден-роданином (HBR) и были отобраны наиболее яркие версии, которые в дальнейшем были выделены при помощи металл-аффинной хроматографии. Были измерены константы связывания с субстратами HBR, 4-гидрокси-3-метилпенцилиден-роданином (HMBR). На основании этих данных был выбран наиболее удачный вариант.

**Источники и литература**

- 1) Chudakov, D. M. et al. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging // Trends in Biotechnology. 2005, №12. p. 605-613.
- 2) Plamont, A.-M. et al. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo // PNAS. 2016, №3. p. 497–502.
- 3) Sanford, L., Palmer, A. Recent Advances in Development of Genetically Encoded Fluorescent Sensors // Methods in Enzymology. 2017, p. 1-49.