

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В.А. Кратасюк

«____» ____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ связи характеристик время-разрешенной флуоресценции белков со
структурными свойствами микроокружения их триптофановых остатков

03.04.02 «Физика»
по программе 03.04.02.01 «Биофизика»

Научный руководитель _____ к. ф-м. н., доцент Е.В. Немцева

Выпускник _____ А.А. Никифоров

Рецензент _____ д. ф-м. н., г.н.с. Б.С. Мельник

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Анализ связи характеристик время-разрешенной флуоресценции белков со структурными свойствами микроокружения их триптофановых остатков» содержит 53 страницы текстового документа и 34 использованных источника.

Цель работы – определить структурно-динамические свойства триптофановых остатков карбоксиангидразы Б быка (ВСА II) и их окружения, влияющие на индивидуальный вклад этих остатков в характеристики время-разрешенной флуоресценции белка.

Проводился анализ структурно-динамических характеристик белка карбоксиангидразы Б быка. Было определено влияние микроокружение триптофанов данного белка на их вклад в общую флуоресценцию

Ключевые слова: ТРИПТОФАН, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, БИ-ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНЫЙ СПАД, КВАНТОВЫЙ ВЫХОД, МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА, ТУШЕНИЕ ФЛУОРСЦЕНЦИИ.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Фотофизические характеристики триптофана в растворе и в составе белков (литературный обзор).....	7
1.1 Флуоресценция	7
1.2 Тушение флуоресценции.....	8
1.3 Структура белков	11
1.3.1 Аминокислоты.....	12
1.3.2 Водное окружение	14
1.4 Собственная флуоресценция белков.....	15
1.4.1 π -система триптофана.....	16
1.4.2 Флуоресценция триптофана в растворе.....	17
1.4.3 Времена жизни и ротамеры	19
1.5 Квантовый выход и окружение триптофана в белке.....	22
2 Методы исследования.....	29
2.1 Объект исследования.....	29
2.2 Программные пакеты.....	29
2.3 Обработка данных.....	30
3 Результаты и обсуждение.....	32
3.2 Конформационные изомеры триптофанов ВСА ПОшибка! Закладка не определена	
3.3 Доступность триптофановых остатков ВСА II для молекул воды Ошибка! Закладка не определена	
3.4 Тушение боковыми группами аминокислот Ошибка! Закладка не определена	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	33
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	35

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 36

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные методы, применяемые для изучения клеточной биологии на молекулярном уровне, широко распространены и имеют все растущую популярность.

Три аминокислоты с ароматическими кольцами в боковой цепи – фенилаланин, тирозин и в особенности триптофан – играют ключевую роль в понимании поведения белков. Триптофан обладает самой большой π -системой среди них. Такие спектральные свойства триптофана как квантовый выход, время жизни и позиция максимума флуоресценции напрямую зависят от его локального окружения, что позволяет изучать структурно-динамические свойства белков методами флуоресцентной спектроскопии. К сожалению, взаимосвязь между спектроскопическими свойствами триптофана и особенностями его окружения – очень запутано и с трудом категорируется. Например, существует несколько гипотез, объясняющих не моно-экспоненциальный спад триптофановой флуоресценции. Также возникают сложности в определении роли элементов окружения в переносе электрона из возбужденного состояния триптофана. Наиболее четко эти трудности проявляются при анализе флуоресценции многотриптофановых белков. Каждый триптофан в этом случае может иметь уникальную пространственную конформацию и окружение.

Цель работы – определить структурно-динамические свойства триптофановых остатков карбоксиангидразы Б быка (ВСА II) и их окружения, влияющие на индивидуальный вклад этих остатков в характеристики времязарегистрированной флуоресценции белка.

В работе поставлены следующие задачи:

- 1) на основе трехмерной структуры белка ВСА II проанализировать:
 - конформацию триптофанов,
 - доступность триптофанов растворителю,
 - наличие аминокислот-тушителей,

- возможность безызлучательного переноса энергии возбуждения (FRET),
 - распределение электростатическое поле вокруг триптофанов.
- 2) сопоставить структурно-динамические свойства с экспериментальными данными по флуоресценции мутантных форм ВСА II с заменами триптофановых остатков.

1 Фотофизические характеристики триптофана в растворе и в составе белков (литературный обзор)

1.1 Флуоресценция

Люминесценция – это излучение света любого объекта, которое происходит из электронно-возбужденного состояния молекул. Люминесценция формально делится на две категории – флуоресценция и фосфоресценция – в зависимости от природы возбужденного состояния. При фосфоресценции испускание фотона происходит с задержкой. Если в возбужденном состоянии электрон спарен с электроном в основном состоянии с противоположным спином, то обратный переход в основное состояние разрешен по принципу Паули и происходит с испусканием фотона. Процесс испускания происходит со скоростью порядка 10^8 c^{-1} , так что типичное время жизни флуоресценции порядка 10 нс [1].

Флуоресценция обычно происходит от ароматических соединений. Процесс, который происходит между поглощением и излучением света, иллюстрируется диаграммой Яблонского (рис. 1). На диаграмме показано, что поглощенная энергия больше испускаемой. Флуоресценция обычно происходит при более низкой энергии и с большей длиной волны. Этот феномен называется Стоксов Сдвиг. Также длина волны испускания не зависит от длины волны возбуждения [1].

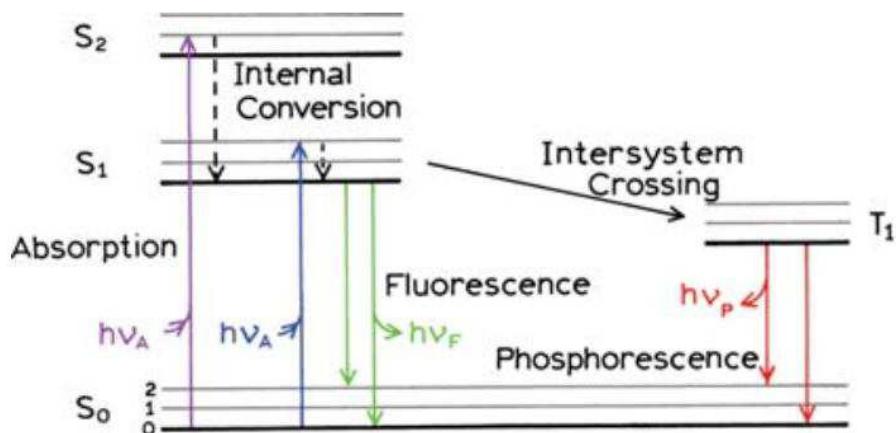


Рисунок 1 – Упрощенная форма диаграммы Яблонского [1].

Главными характеристиками флуоресценции флуорофора являются квантовый выход и время жизни флуоресценции. Квантовый выход – это отношение количества испущенных фотонов к количеству поглощенных фотонов. Время жизни определяется как среднее время пребывания молекулы в возбужденном состоянии [1]. Также важными характеристиками являются формы спектров излучения и поглощения и их максимумы.

1.2 Тушение флуоресценции

В широком смысле любой процесс, приводящий к уменьшению квантового выхода (Φ_f) флуоресценции называется тушением. Тушение является результатом молекулярных перестановок, переноса энергии, образования комплексов в основном состоянии и реакций в возбужденном состоянии [1].

$$\Phi_f = k_r / (k_r + k_{nr}) \quad (1)$$

где k_r – это константа скорости излучения, k_{nr} – это константа безызлучательной релаксации возбуждения [2]. Время жизни флуоресценции τ пропорционально квантовому выходу и записывается как

$$\tau = (k_r + k_{nr})^{-1} \quad (2)$$

Тушение разделяют на динамическое (тушение при столкновении) и статическое. При статическом тушении образуется не флуоресцирующий комплекс тушителя с флуорофором. В случае динамического тушения тушитель диффундирует к флуорофору во время жизни возбужденного состояния. При таком контакте флуорофор возвращается в основное состояние без излучения (Рисунок 2).

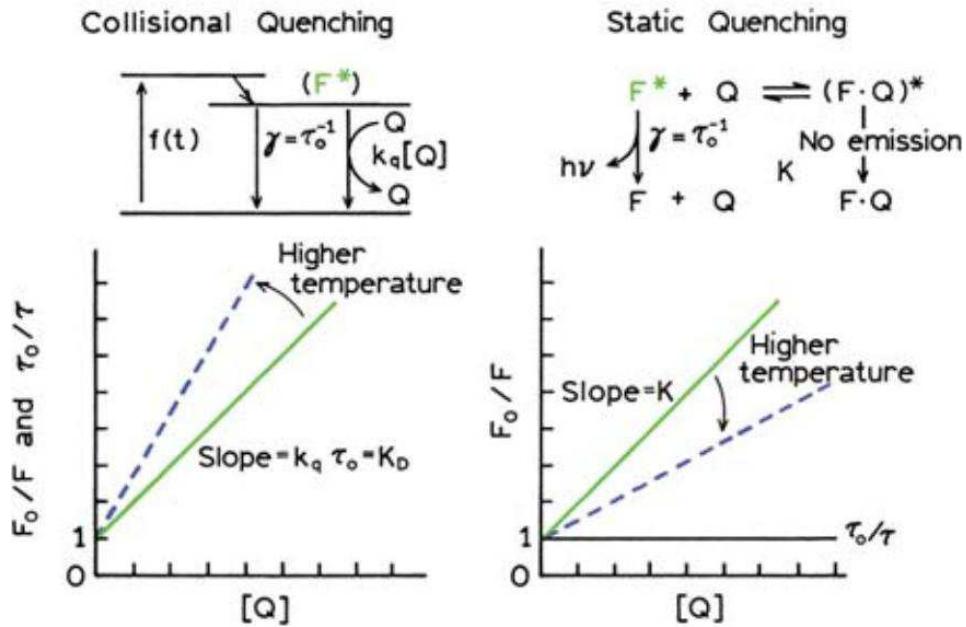


Рисунок 2 – Принципиальная схема динамического и статического тушения.

Динамическое тушение описывается уравнением:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (3)$$

здесь F_0 и F – это интенсивности без и с тушителем соответственно. k_q – это константа тушения (показатель его эффективности), $[Q]$ – концентрация тушителя [1].

По анализу одной только структуры белка нельзя точно определить происходит ли тушение его флуорофоров. Во-первых, присутствие почти любой аминокислоты возле флуорофора белка (например, триптофана), может влиять на величину квантового выхода. Во-вторых, потенциальные тушители могут тушить, а могут не тушить, в зависимости от электростатического потенциала, образованного окружением тушителя и триптофанового остатка. К тому же в разных условиях аминокислотные остатки существуют в разных формах. Так, например гистидиновый катион гораздо более сильный тушитель, чем его непротонированная форма [3].

Триптофан, который в основном и ответственен за флуоресценцию в белке, всегда «пре-тушен». Квантовый выход триптофанового остатка в белке находится в диапазоне от 0.35 до 0.01 (или даже меньше) [1,4]. Например, если триптофан находится в месте, где к белку присоединяется лиганд, то его флуоресценция может измениться в момент присоединения. Лиганд может увеличить флуоресценцию, частично или полностью убрав механизм тушения [4].

Выделяют два основных механизма статического тушения триптофановой флуоресценции. Первый – тушение при переносе электрона от возбужденного индольного кольца к близлежащей боковой цепи [2,5]. Второй – перенос протона на отрицательно заряженную часть индольного кольца [4]. Наиболее часто встречаемым механизмом тушения флуоресценции триптофана в белке – это перенос электрона [4].

Таблица 1 – Тушители триптофановой флуоресценции, работающие посредством переноса электрона [4]

Тушитель	
Дисульфидные связи	>1000
Акриламид	720
Гистидиновый катион (рН 5,3)	240
Цистеиновый анион (рН 10,4)	190
Нейтральный цистеин (рН = 7,6)	140
Нейтральная уксусная кислота	43
Нейтральная глутаминовая кислота (рН 4,5)	43
Нейтральная аспарагиновая кислота (рН 4,5)	43
Нейтральный С-концевой карбоксил	43
N-acetylasparagine	8.8
N-acetylglutamine	6.5
Амиды главной цепи	от ~0.1 до ~500
Нейтральный гистидин (рН > 6)	3.7

Таблица 2 – Процессы, которые включают перестройку электронной структуры индольного кольца триптофана в фото-возбужденном состоянии

Фотофизический процесс	Объяснение	Временная шкала (с)
Абсорбция	Оптическое возбуждение флуорофора	10^{-15}
Флуоресценция	Излучательная деактивация 1L_a состояния	10^{-8}
Внутренняя конверсия	Безызлучательная деактивация с 1L_b на 1L_a	10^{-14}
Межсистемный кроссинг	Релаксация до низкоуровневого триплетного состояния	10^{-8}
Тушение переносом электрона	Образование уровня для переноса заряда (СТ)	10^{-9}
Тушение переносом протона	Тушение принятием/отдачей протона	10^{-7}
Резонансный перенос энергии	Перенос энергии возбужденного состояния на акцептор	10^{-9}

1.3 Структура белков

Белки – это и молекулярные машины, и строительные блоки, и оружие живой клетки. При всем разнообразии, функционирование белков всегда базируется на высоко специфическом – как у ключа с замком (точнее: как у гибкого ключа с гибким замком) – взаимодействии белка с лигандом. Для такого взаимодействия белку необходимо обладать фиксированной пространственной структурой. Поэтому биологическая функция белков тесно связана с определенностью их трехмерных структур. Не только разрушение, но даже небольшие изменения этих структур часто ведут к утере или резкому изменению активности белков. Знание молекулярной трехмерной структуры белка необходимо для понимания его функционирования [6].

В основе белка лежит полимер – полипептидная цепь, состоящая из аминокислотных остатков. «Остаток» – это то, что осталось от свободной аминокислоты после ее встраивания в белковую цепь. Эта цепь имеет химически регулярный остов («главную цепь»), от которого отходят разнообразные боковые группы аминокислот – радикалы [6].

Нековалентные взаимодействия, поддерживающие пространственное строение белка, значительно слабее химических связей, фиксирующих последовательность мономеров. Эта последовательность (или первичная структура) создается в ходе матричного синтеза. Образованная первичная последовательность остатков сворачивается определенным образом с помощью нековалентных взаимодействий (Рисунок 3).

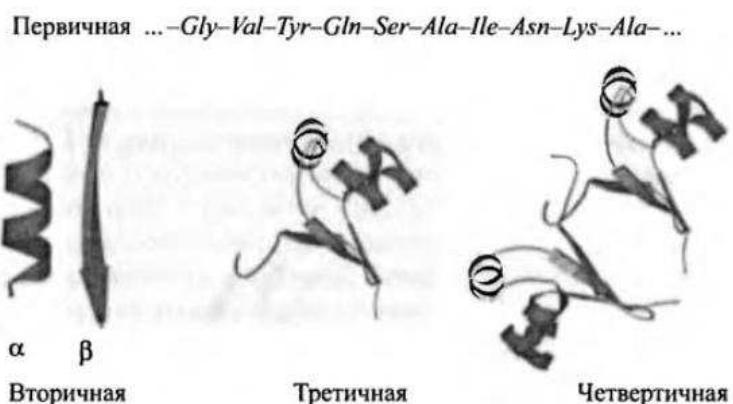


Рисунок 3 – Уровни организации белковой структуры: первичная структура (аминокислотная последовательность); вторичная структура (показаны α -спираль и один тяж β -структур); третичная структура – глобула, сложенная одной цепью; и четвертичная структура олигомерного, сложенного из нескольких цепей белка (в данном случае – димерного *cro*-репрессора) [6].

Образование трехмерной структуры белка *in vivo* происходит при биосинтезе или сразу после него. При подходящей температуре и рН аминокислотная последовательность сама определяет пространственную структуру белка, т.е. белок способен к самоорганизации. А структура уже определяет его функцию, т.е. с кем белок взаимодействует, и что при этом делает (Рисунок 3) [6].

1.3.1 Аминокислоты

Аминокислоты могут находиться в двух стерических формах: L и D, эти формы зеркально-симметричны. Природные белковые цепи сложены только из остатков L-аминокислот. D-аминокислотные остатки встречаются в пептидах. Они не кодируются при матричном синтезе, а синтезируются ферментами. Рацемизация спонтанно в белках почти не происходит.

Аминокислоты в белковой цепи связаны между собой пептидными связями между C и N атомами (Рисунок 4).

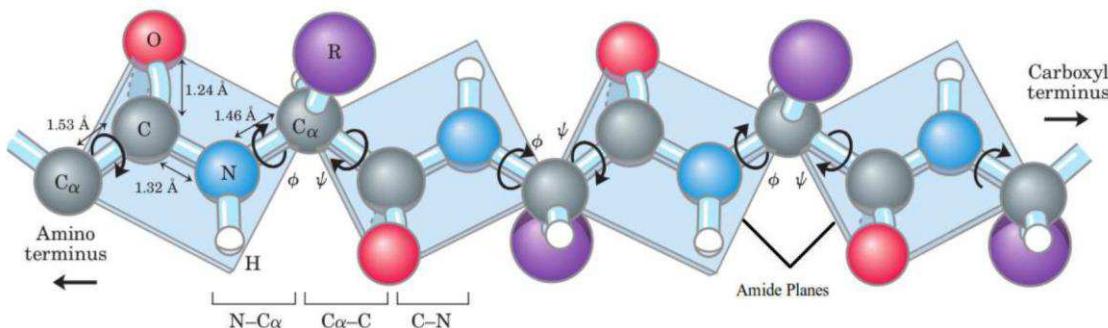


Рисунок 4 – Схематичное изображение участка цепи аминокислотных остатков с подписанными углами поворота [7].

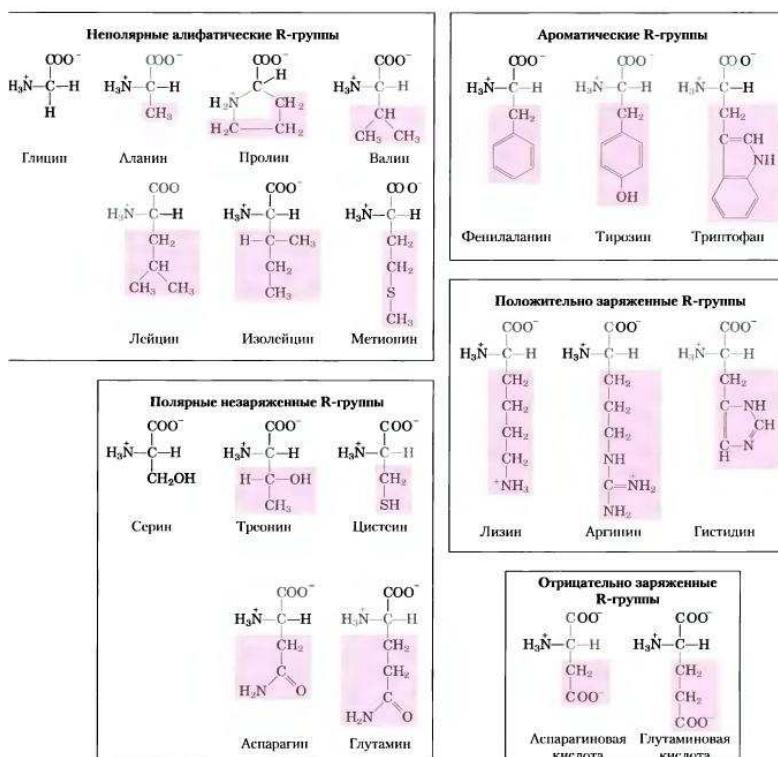


Рисунок 5 – Двадцать основных аминокислот, входящих в состав белков. Данные структурные формулы отражают состояние ионизации, в котором находится преобладающая часть молекул при pH 7,0. Розовым цветом выделены боковые группы [7].

Отдельно стоит упомянуть ароматические боковые группы. Такие группы в своем составе имеет фенилаланин, тирозин и триптофан. Это относительно неполярные и гидрофобные молекулы. Они все могут участвовать в гидрофобных взаимодействиях. Тирозин и триптофан – гораздо более полярные молекулы, чем фенилаланин, что связано с наличием у тирозина гидроксильной группы, а у триптофана – индольного кольца [7].

1.3.2 Водное окружение

Водородные связи образовываются не только между атомами воды. Они наблюдаются всегда, когда водород химически связан с одним электроотрицательным атомом и при этом приближается к другому электроотрицательному атому (рис. 6) [6].

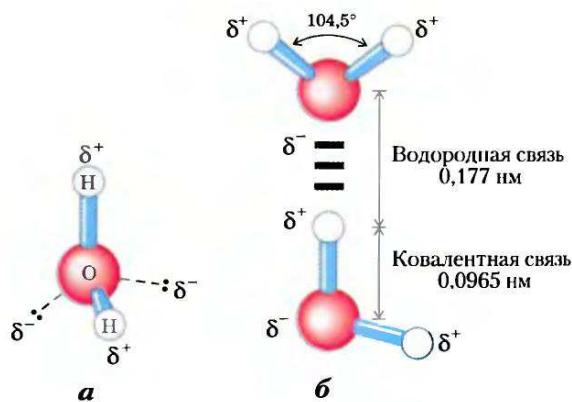


Рисунок 6 – Строение молекулы воды. а) Биполярная природа молекулы воды показана с помощью шаростержневой модели. Пунктирными линиями обозначены не связывающие орбитали. Электронные пары расположенные на внешних электронных орбиралях образуют вокруг атома кислорода неправильный тетраэдр. б) Две молекулы воды связаны водородной связью (обозначается черточками). Водородные связи длиннее и слабее, чем ковалентные связи [7].

Электронное облако при H-атоме – самое слабое, и оно сильно сминается при притяжении парциального положительного заряда H^+ к парциальному отрицательному заряду кислорода. У каждой H-связи есть один донор и один акцептор. При этом H почти всегда выступает донором только одной H-связи, а кислород может быть акцептором двух H-связей [6].

1.4 Собственная флуоресценция белков

Три аминокислоты: триптофан (Trp), фенилаланин (Phe) и тирозин (Tyr) – с ароматическими кольцами в составе боковых цепей (Рисунок 5) играют важную роль в анализе структуры и поведения белков [1,4,8–10]. Триптофан вызывает наибольший интерес среди всех трех (Рисунок 12). Он обладает самой большой π -системой, из-за чего его спектры поглощения и излучения больше всего сдвинуты в длинноволновую область (почти видимая часть спектра). Длина волны флуоресценции и/или интенсивность триптофана меняется в зависимости от функциональных процессов, в которых участвует белок [4].

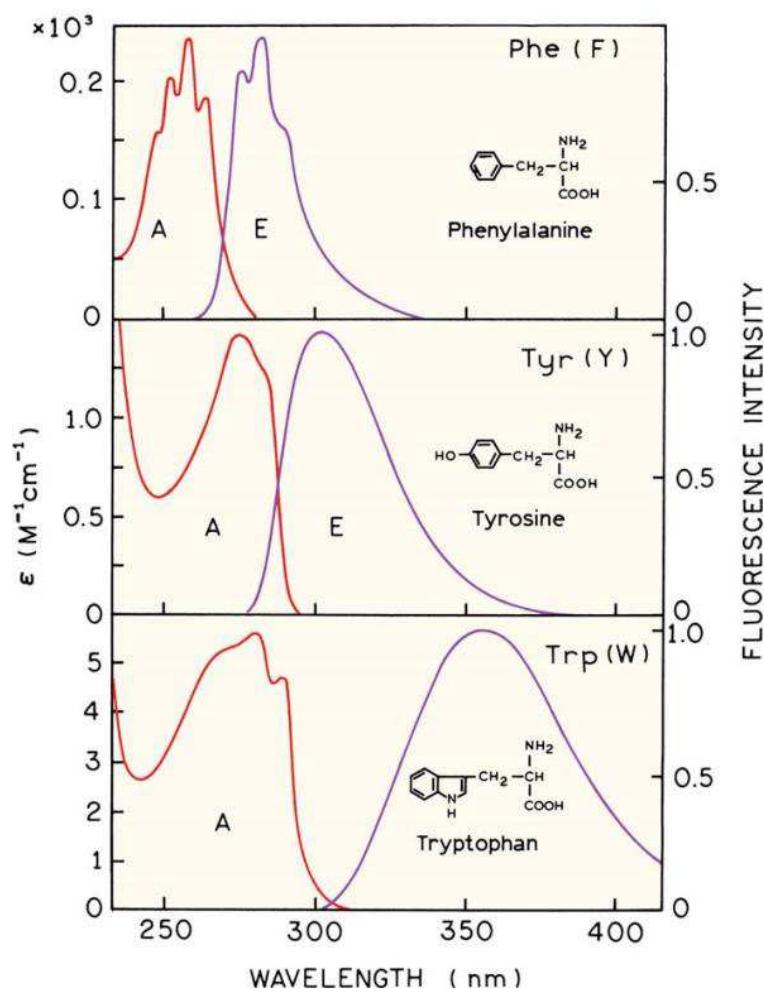


Рисунок 7 – Спектры поглощения (А) и испускания (Е) ароматических аминокислот при рН 7 в водном растворе.

1.4.1 π -система триптофана

Флуоресценция триптофана до сих пор до конца не изучена. Трудности в её анализе происходят из-за природы пиррольно-бензольного кольца, благодаря которому два нижних возбужденных синглетных состояния (1L_a и 1L_b) оказываются практически вырожденными, чего не наблюдается у Phe и Tug, в которых они четко разделены.

Не стоит путать изменение постоянного дипольного момента молекулы в результате перехода в возбужденное состояние с моментом перехода. Дипольный момент перехода или просто момент перехода – это дипольный момент осциллирующей плотности заряда и мера электронного заряда, которая сдвигается во время возбуждения.

По сравнению с основным состоянием, в состоянии 1L_a электронная плотность сдвинута от пиррольного кольца к бензольному. Электронная плотность уменьшается на атомах NE1 и CG и увеличивается на атомах CE3, CZ2 и CD2. Ориентация электронного диполя почти не меняется (Рисунок 8).

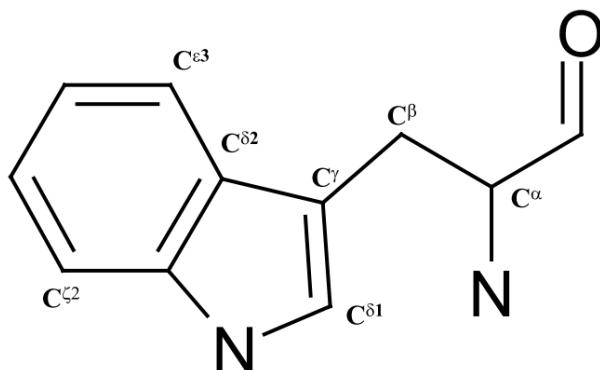


Рисунок 8 – Схематическая структура триптофана с индексами атомов [11].

Триптофан и его аналоги с индолевым кольцом могут давать сложные спектры анизотропии флуоресценции из-за двух возможных синглетных состояний. Анизотропия резко меняется в зависимости от длины волны возбуждения. «Плечо» при 290 нм получается из-за наличия перехода 1L_b (Рисунок 9) [1].

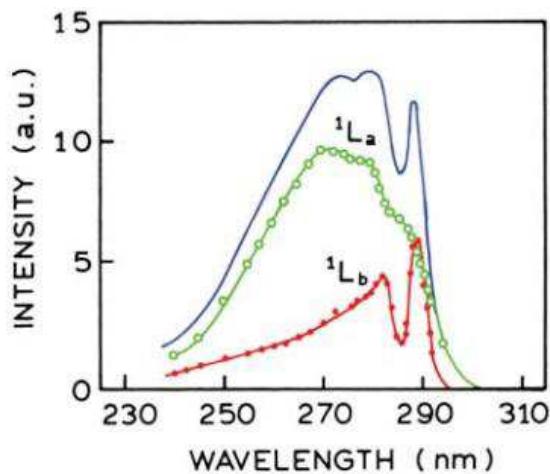


Рисунок 9 – Спектры поглощения состояний $^1\text{L}_a$ и $^1\text{L}_b$ [1,12].

1.4.2 Флуоресценция триптофана в растворе

Два первых возбужденный состояния $^1\text{L}_b$ (S_1) и $^1\text{L}_a$ (S_2) практически вырождены в вакууме и имеют перпендикулярные моменты перехода (Рисунок 10) [13]. Состояние $^1\text{L}_a$ имеет больший статический диполь – 6.12 Д, в то время как состоянию $^1\text{L}_b$ соответствует 1.55 Д. Поэтому, в полярном растворителе $^1\text{L}_a$ уже лежит ниже $^1\text{L}_b$, и флуоресценция триптофана в основном происходит из состояния $^1\text{L}_a$ (Рисунок 11) [4,13,14].

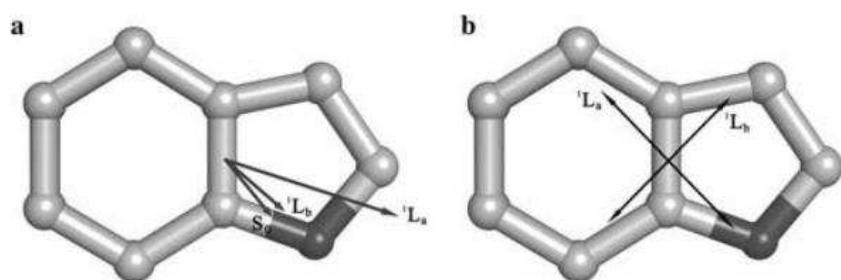


Рисунок 10 – Структура индольного кольца боковой цепи триптофана. Белым цветом выделены атомы углерода, черным выделен атом азота.

Перманентный дипольный момент индола в основном состоянии S_0 и два самых низких возбужденных состояния ($^1\text{L}_b$ и $^1\text{L}_a$) показаны как односторонние стрелки (а). Дипольные моменты перехода между основным и возбужденным состояниями показаны двунаправленными стрелками (б) [13].

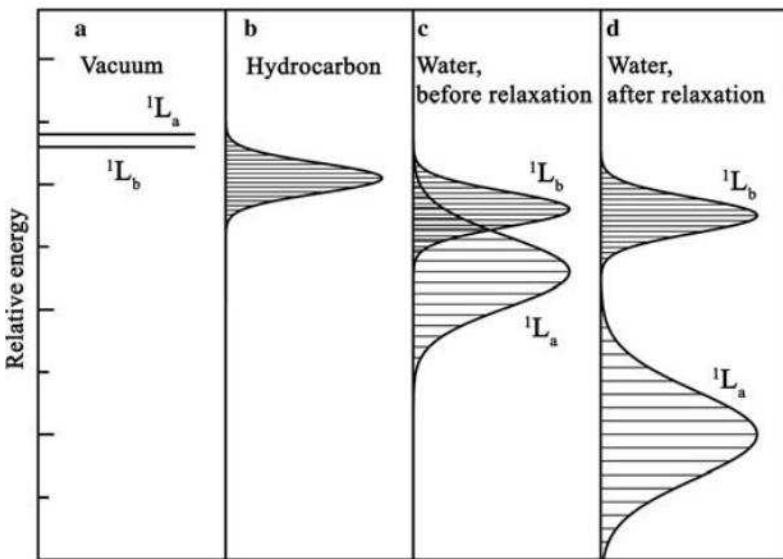


Рисунок 11 – Схематичное представление неоднородного уширения и относительных уровней энергии состояний $^1\text{L}_b$ и $^1\text{L}_a$ (а) в вакууме, (б) в неполярном растворителе, (с) в полярной воде при мгновенной аборбции и (д) в полярной воде при определенном времени сольватации [13].

Свободный триптофан в растворе ведет себя по-разному, в зависимости от характеристик этого раствора [15]. Когда триптофан растворен в этаноле (гидрофобно/фильтные условия), его излучение лучше всего описывается тремя временами жизни. Взаимодействие триптофана с этанолом, обладающим двойственной химической природой (гидрофобность группы CH_3 и гидрофильность группы OH), приводит к появлению третьего времени жизни флуоресценции, даже при низком содержании этанола (10%) [15].

Спад интенсивности флуоресценции триптофана в чисто гидрофобных условиях (CCl_4 или CHCl_3) лучше всего описывается двумя временами жизни. Хотя значение самого короткого времени и флюктуирует за счет слабого взаимодействия между триптофаном и молекулами растворителя, вклады двух времен жизни идентичны тем, которые получаются для триптофана, растворенного в воде (гидрофильтная среда). Это подтверждает тот факт, что в только гидрофобном или только гидрофильтном растворителе испускание триптофана происходит из двух популяций, сгенерированных в возбужденном состоянии, которые присущи самой структуре флуорофора, независимо от условий окружения [15].

1.4.3 Времена жизни и ротамеры

Спад флуоресценции некоторых флуорофоров в невзаимодействующий растворах описывается моно-экспоненциальной функцией. В случае же биомолекул даже с одним триптофановым остатком обычно наблюдается мульти-экспоненциальный спад [16]. Спад интенсивности флуоресценции триптофана в белке описывается функцией[16–18]:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t / \tau_i) \quad (4)$$

где α_i и τ_i – это амплитуда и время жизни компоненты i , а сумма α_i равна единице.

В нейтральных водных растворах спад интенсивности триптофана описывается суммой двух экспонент с временами спада около 3.1 и 0.5 нс [1].

Чаще всего не моноэкспоненциальность спада флуоресценции триптофана связывают с его возможностью находиться в различных пространственных конформациях (ротамерах), относительно $C_\alpha-C_\beta$ связи (Рисунок 13). Каждый из трёх конформеров ($g+$, $g-$, t) имеет две возможных конфигурации индольного кольца (перпендикулярную и анти-перпендикулярную), т.е. всего известно 6 ротамерных форм триптофана. И каждое слагаемое в мульти-экспоненциальной функции связывают с одной из разрешенных конформаций [16]. Однако сейчас ротамерная модель подвергается критике и пересмотру. Многие триптофаны, имеющие только одну конформацию, могут иметь 2 времени жизни флуоресценции [19].

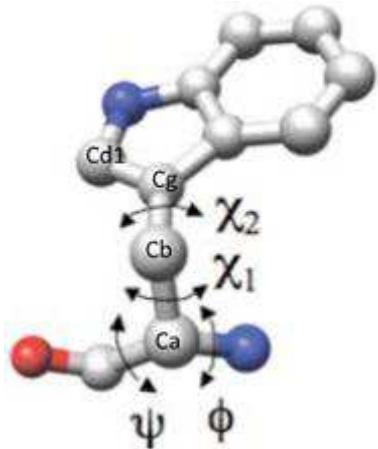


Рисунок 12 – Структура триптофана. Стрелками показаны углы поворота главной (ϕ, ψ) и боковой (χ_1, χ_2) цепей.

Принимать некоторую конформацию в белке триптофану позволяет (или не позволяет) его микроокружение, которое также влияет и на величину времен жизни [20].

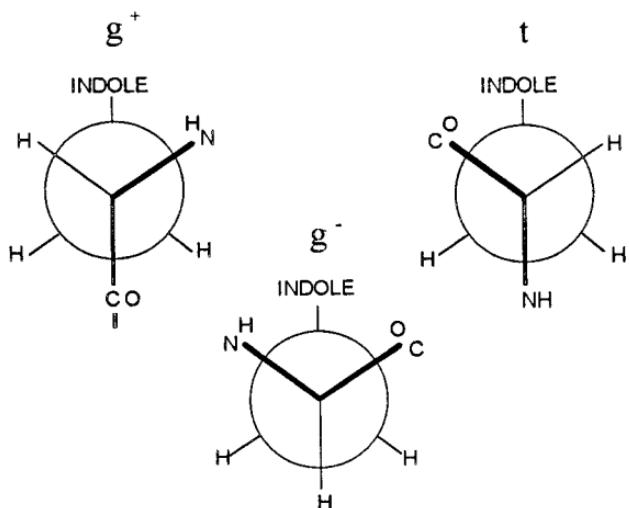


Рисунок 13 – χ_1 ротамеры триптофанового индольного кольца. Ньюмановские проекции показывают угол поворота индольного кольца относительно связи $C_\alpha-C_\beta$ [21].

Предположим, что имеется многоэкспоненциальный спад, причем он разный на разные длинах волн испускания. Тогда спад интенсивности описывается выражением [1]:

$$I(\lambda, t) = I(t) = \sum_i \alpha_i(\lambda) \exp(-t / \tau_i) \quad (5)$$

Здесь принимается, что значение времен жизни не зависят от длины волны регистрации спада. Тогда спектр каждой компоненты может быть рассчитан следующим образом [1]:

$$I_i(\lambda) = \frac{\alpha_i(\lambda) \tau_i I(\lambda)}{\sum_j \alpha_j(\lambda) \tau_j} \quad (6)$$

Такие спектры $I_i(\lambda)$ называются decay-associated spectra (DAS) (Рисунок 14). Они отображают спектр i -ой компоненты испускания с временем жизни τ_i [1].

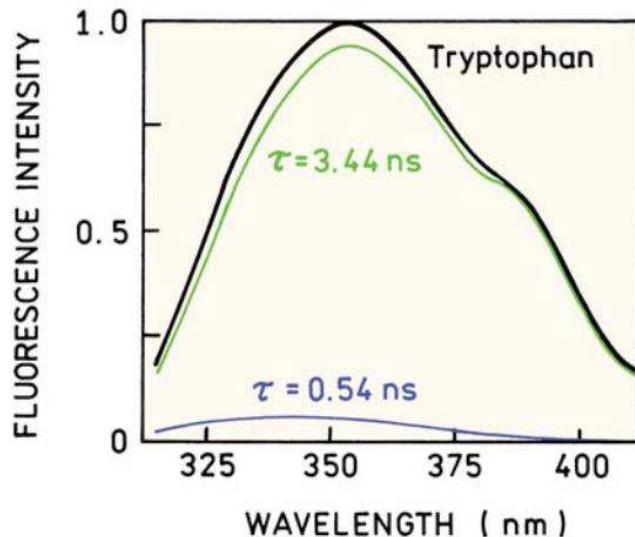


Рисунок 14 – Спектральное разрешение короткой и длинной компоненты спада флуоресценции триптофана [1].

Многоэкспоненциальные спады, измеренные при разных значениях длины волны испускания, используются для построения спектра испускания, характерного для компоненты с определенным временем жизни [1].

1.5 Квантовый выход и окружение триптофана в белке

Разница в спадах интенсивности триптофановой флуоресценции белков – это следствие особенностей их структуры и динамики. Из-за тушения и конформационной гибкости ${}^1\text{L}_\text{a}$ состояние триптофана в белке может иметь как минимум 2 времени жизни (500 пс и 3 нс) из-за переноса протона или электрона в возбужденном состоянии (Рисунок 15) [19].

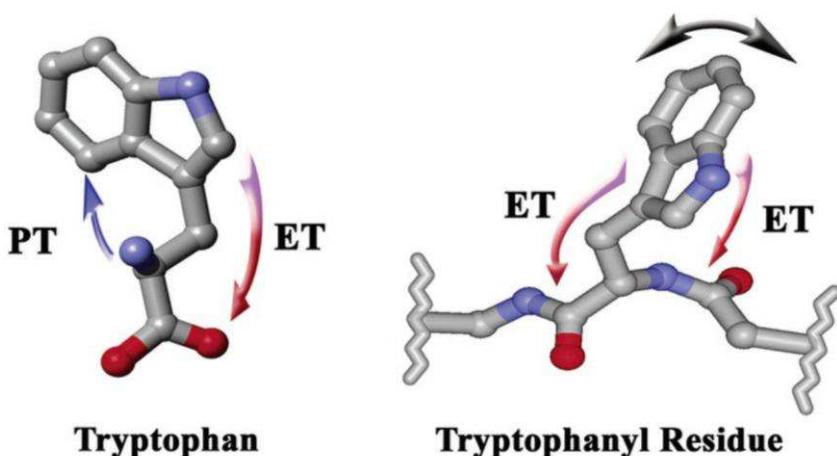


Рисунок 15 – Схема возможного переноса протона (PT) и электрона (ET) с/на индольное кольцо во время возбуждения. Вероятность такого переноса не постоянна из-за динамики белка.

Разнообразие и сила электрического поля биополимеров является ключом к их функции. Способность ферментов к быстрой смене определенных конформаций признается важной частью их катализитической активности [22,23].

Характеристики триптофановой флуоресценции несут в себе большое количество данных, которые коррелируют с динамикой белков [22]. Упорядоченное электростатическое окружение флуорофора вместе с амплитудой флуктуаций – это то, что определяет будет ли флуоресценция сильной или слабой, будет ли длина волны испускания сдвинута батохромно или гипсохромно [22]. Согласно последним представлениям, повсеместно наблюдаемый неэкспоненциальный спад флуоресценции триптофана есть

прямое следствие его чувствительности к электростатическому окружению [22].

Изменение электронного состояния чувствительных к окружающей среде флуорофоров, сопровождающее испускание фотона, всегда связано с большим мгновенным изменением распределения электронного заряда. В растворе или белке существуют сильные кулоновские взаимодействия между электронами флуорофора и всеми атомами белка, из-за чего энергия испускаемого фотона будет зависеть от изменения позиций электронов в флуорофоре относительно электронов в белке. Квантово-механические вычисления предсказывают, что переход триптофана из основного состояния в ${}^1\text{L}_\text{a}$ включает значительное изменение постоянного дипольного момента из-за смещения электронной плотности на индоле от пирольного кольца к бензольному [22].

То же может быть сказано и о разнице в энергии между ${}^1\text{L}_\text{a}$ и состоянием с переносом заряда (СТ). Коэффициент тушения и сдвиг длины волн испускания вызваны тем же факторами, действующими на разные электронные состояния: длина волны определяется позицией зарядов, влияющих на разницу в электронной плотности между основным и флуоресцирующим состоянием; тушение определяется позицией зарядов, влияющих на разницу электронной плотности между флуоресцирующим состоянием и состоянием с переносом заряда (Рисунок 17) [22].

Наиболее распространенное состояние СТ, участвующее в уменьшении квантового выхода триптофана в белках, заключаются в переносе электрона от индольного кольца на один или два рядом расположенных амида на белковом остове [22].

В общем случае, квантовый выход может быть рассчитан по формуле:

$$\Phi_f = \left\langle k_r / (k_r + k_{nr} + k_{et,i(t)}) \right\rangle_{i,t} \quad (7)$$

где k_r это константа скорости излучательного перехода, k_{nr} – это константа скорости безызлучательных переходов, исключая перено электрона. Константа скорости переноса электрона, $k_{et,i(t)}$ включает зависимость от времени и возможность гетерогенности с индексом i , который указывает на i -ый «вид» [22].

Константа k_{nr} может быть расписана как

$$k_{nr} = k_{ISC} + k_{Sol} + k_{PT} + k_{FRET} \quad (8)$$

здесь k_{ISC} – это интеркомбинационная конверсия, k_{Sol} – тушение растворителем, k_{PT} – перенос протона в возбужденном состоянии [2]. Перечисленные виды тушения встречаются гораздо реже, чем тушение переносом электрона. Перенос протона практически никогда не наблюдается [22].

Фёстеровский резонансный перенос энергии (FRET) рассматривается только в случаях близкого расположения двух триптофанов в белке (перенос между парой Тир-Тир можно исключить на стадии эксперимента, выбрав определенную длину волны возбуждения, при которой будет наблюдаться флуоресценция только от триптофановых остатков).

Эффективность переноса между двумя хромофорами рассчитывают по формуле [24]:

$$\frac{I_0}{I} = e^{-\frac{2}{R_0^2} \left(\frac{1}{r_1^2} + \frac{1}{r_2^2} \right)} \quad (9)$$

R_0 – это радиус Фёстера для данной пары донор-акцептор (т.е. расстояние между геометрическими центрами индольных (фенольных) колец, на котором эффективность переноса составляет 50%). Для пары двух триптофанов в белке обычно принимают $R_0 = 7-8 \text{ \AA}$ [25].

ориентационных фактор, отражающий взаимную ориентацию моментов перехода донора и акцептора энергии (рис. 16).

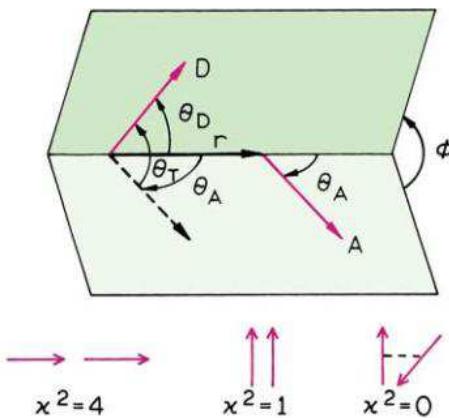


Рисунок 16 – Взаимная ориентация векторов момента переноса в возбужденном состоянии донора и акцептора [1].

В случае случайным образом расположенных доноров и акцепторов в растворе при комнатной температуре принимают равным 2/3 [1].

Соответствующие времена спада флуоресценции ($\tau_{f,i}$) рассчитываются как

$$\tau_{f,i} = (k_r + k_{nr} + k_{et,i(t)})^{-1} \quad (10)$$

Все разнообразие τ_{fi} и Φ_{fi} исходит от $k_{et,i}(t)$. Квантовый выход и время жизни триптофана в белке почти всегда диктуются разницей энергии между уровнями СТ и 1L_a (рис. 17). Это так по трем причинам: (1) только два ближайших амида являются значительными тушителями (2) СТ состояние амида почти всегда значительно выше по энергии чем 1L_a , и (3) их расположение способствует увеличению $k_{et,i}(t)$, и тушение происходит за очень короткие периоды резонанса. Другими словами ограничивающим фактором в тушении является скорость флюктуаций, которые создают резонанс. Причина, по которой в тушении преобладают два ближайших

амида, связана с большей электростатической стабилизацией на ~ 1 эВ из-за притяжения отрицательно заряженного амида и положительно заряженного индольного кольца [22].

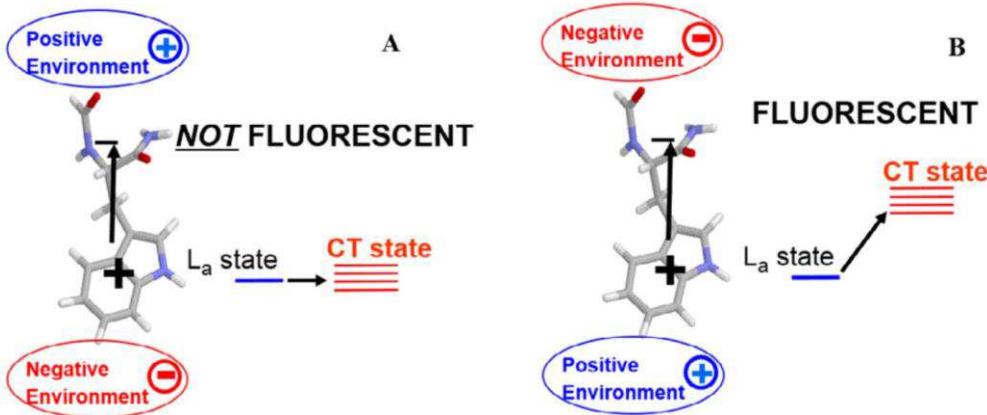


Рисунок 17 – Локализация зарядов окружания (обведены) определяет тушение переносом электрона амидом остова. Не обведенные заряды показывают диполи, созданные переносом электрона от индольного кольца на амид. В (А), заряды стабилизируют диполь СТ-состояния с переносом электрона в направлении положительного от отрицательного заряда. СТ состояние находится в резонансе с 1L_a состоянием, электронный перенос происходит быстро и флуоресценция слабая. В (Б), заряды расположены противоположно случаю А, сильно дестабилизируя СТ-состояние.

Возможность резонанса мала; тушение очень незначительно и флуоресценция сильная. Вода и другие полярные группы одинаково важны в обоих случаях [4].

По-другому это может быть интерпретировано в терминах электрического поля. Если на электрон действует поле, которое вынуждает его переместиться от индольного кольца к амиду, то перенос этого электрона затребует меньше энергии. Например, положительный заряд возле амида/карбоксильной группы триптофана и/или отрицательный заряд возле кольца триптофана создаст меньшую разницу энергии чем обратный случай (отрицательный заряд возле амида и/или положительный заряд возле кольца). Таким образом, водородная связь с кислородом амида триптофана (α -спираль, β -лист или молекулы воды) почти всегда уменьшает этот энергетический зазор. Хотя и водородные связи особенно эффективны, этот

принцип распространяется и на общий случай – на все окружающие атомы со значительным порционным зарядом. В особенности атомы кислорода карбонильной группы, карбоксильной группы и воды, расположенные близко к триптофановому кольцу, стабилизируют СТ-состояние [22].

Легко прийти к выводу, что ротамерные конфигурации триптофана могут влиять на энергетический зазор и, следовательно, на константу скорости переноса электрона на соседний амид. Но ротамерные вариации – это не единственный способ для достижения сближения энергетических состояний [22].

Два времени жизни триптофана в белке могут быть приписаны двум «видам» этого триптофана: вид «F» (far), при котором энергии $^1\text{L}_\text{a}$ и СТ слишком далеко друг от друга для эффективного тушения, и вид «C» (close), при котором энергии $^1\text{L}_\text{a}$ и СТ близки, и флуоресценция сильно затушена переносом электрона на амид. Их взаимосвязь представлена на схеме (Рисунок 18) [22].

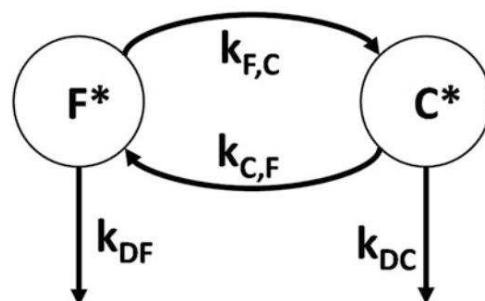


Рисунок 18 – Упрощенная схема, состоящая из медленного спада, большой разницы по энергии (F) и быстрого спада, малой разнице по энергии (C). Виды С и F меняются по константам k_{CF} ($\text{C} \rightarrow \text{F}$, медленно), k_{FC} ($\text{F} \rightarrow \text{C}$, быстро), k_{DC} (быстро) и k_{DF} (медленно).

Зависимость константы скорости переноса электрона k_{ET} от расстояния между донором и акцептором спорна [22]. Элемент спаривания электронов считается ответственным за уменьшения константы скорости при большей дистанции. Дистанция – это не всегда кратчайший путь через пространство,

который подразумевает туннелирование электрона. Чаще используются модели, в которых электрон проходит через структуру белка [26].

Однако для качественной оценки все же иногда используют формулу [27–29]:

$$k_{ET} = k_0 \exp \left[-\beta(R - R_0) \right] \quad (11)$$

здесь k_0 – константа переноса на дистанции R_0 (3 \AA) (радиус Ван-дер-Ваальса). фактор β описывает влияние среды между донором и акцептором. Он варьирует между 0.7 \AA^{-1} (через связи) и 2.8 \AA^{-1} (через пространство).

Помимо расстояния стоит также учитывать пространственную ориентацию тушителя относительно индольного кольца. Некоторые группы крайне быстро поглощают возбуждение индольного кольца ($\sim 10\text{--}100$ пс) относительно остальных. К таким «ультра-быстрым» тушителям относят карбонильную группу глутамина, глутаминовой кислоты и пептидной связи ($-\text{C=O}$), а также серу цистеина ($-\text{SH}$) и дисульфидные связи. Однако такое тушение происходит только при определенных условиях – расстояние между индолем и акцептором не превышает 3.5 \AA (исключение – дисульфидная связь, в этом случае расстояние может быть более 5 \AA), а тушитель ориентирован к бензольному кольцу [30].

По всей видимости скорость ультра-быстрого тушения и его эффективность в процентах коррелируют с расположением акцептора электрона относительно индольного кольца. Эффективность тушения зависит от ориентации карбонильной группы относительно бензольного кольца – для более эффективного тушения тушитель должен находиться «над» ним [30]. То есть стоит также учитывать каким образом тушитель ориентирован к индольному кольцу и с какой его частью тушитель может потенциально контактировать [30].

2 Методы исследования

2.1 Объект исследования

Исследуемые структуры:

- Белок карбоксиангидраза быка II (PDB: 1V9E) (рис. 19), ВСА II, и его мутанты с заменой триптофановых остатков: W4F, W15F, W96F, W122F, W190F, W207F, W243F.

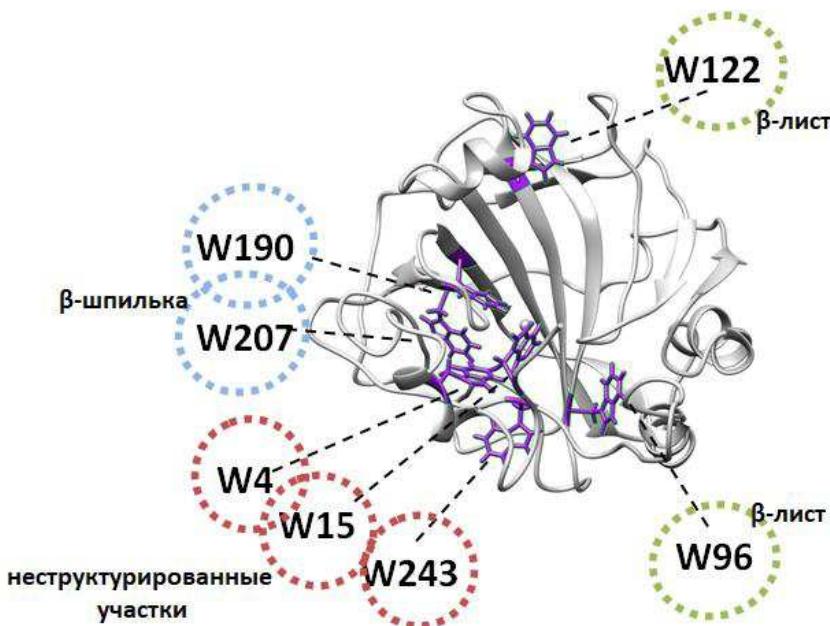


Рисунок 19 – PDB: 1V9E, Карбоксиангидраза быка II. Триптофановые остатки выделены фиолетовым цветом и подписаны. Также указано к какой вторичной структуре относится каждый из них.

2.2 Программные пакеты

В работе используются следующие программные пакеты:

- GROMACS – пакет моделирования физико-химических процессов в молекулярной динамике;
- VMD – пакет визуализации результатов вычисления молекулярной динамики;

- Chimera UCSF – пакет для моделирования мутантных форм белка и визуализации результатов вычисления молекулярной динамики;
- Swiss-PDB Viewer – пакет для моделирования мутантных форм белка.

Длительность проведения вычисления молекулярной динамики выбрана 30 нс.

2.3 Обработка данных

Расчет среднеквадратичной флюктуации C_α атомов белка от положения равновесия с течением времени:

$$\text{RMSF} = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (x_i(t_j) - \bar{x}_i)^2} \quad (12)$$

где T – общее количество шагов; x_i – координата i -ого атома в данный момент времени t_j ; \bar{x}_i – усредненная по времени координата i -ого атома.

Чем меньше значение RMSF для C_α атомов, тем меньше их подвижность и выше жесткость структуры фермента. RMSF рассчитывается по формуле:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (u_i - v_i)^2} \quad (13)$$

где i – номер аминокислотного остатка, u_i и v_i – значения координаты C_α -атома [31].

Радиус гирации отражает степень компактности белковой молекулы. Квадрат радиуса гирации рассчитывается как

$$R_{RG}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N m_i (r_i - r_{CM})^2}{\sum_{i=1}^N m_i} \quad (13)$$

где r_i – позиция атома с индексом i , m_i – масса атома с индексом i , r_{CM} – центр масс, N – количество атомов.

SASA (solvent accessible surface area) – величина площади поверхности флуорофора, доступная растворителю (для триптофана максимум – 264 Å). Может быть рассчитан как для всего белка, так и для его части [32].

Для расчета электростатического потенциала использовались серверы APBS и PDB2PQR [33,34].

3 Результаты и обсуждение

Изъято 16 страниц в связи с написанием публикации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных характеристик конформации триптофановых остатков и структурно-динамических свойств их микроокружения были сделаны следующие выводы относительно вкладов отдельных излучателей в люминесценцию белка.

Trp4 имеет самую большую поверхность, открытую для растворителя. К тому же возле атомов NE1 и O Trp4 почти постоянно находятся молекулы воды, которые могут образовывать водородные связи с этими атомами триптофана, перераспределяя его заряд в возбужденном состоянии, тем самым стабилизируя перенос электрона с индола на карбоксил.

Увеличение квантового выхода при замене Trp4 может объясняться резонансным переносом энергии Trp15→Trp4. Среднее расстояние между флуорофорами составляет 5.7 Å. Trp15, в свою очередь, имеет относительно малое значение τ_1 и большое значение τ_2 . Наличие двух компонент времени жизни может объясняться присутствием в растворе FRET-активных и FRET-неактивных молекул. Если перенос происходит, то время жизни имеет малое значение (τ_1), если нет, то большое (τ_2).

Trp96 не имеет выхода к воде, чьи молекулы могли бы стабилизировать перенос электрона и уменьшить квантовых выход. В его окружении (< 7.5 Å) есть только один слабый тушитель на значительном расстоянии (5 Å). Разница потенциалов в направлении бензол→пиррол указывает на то, что окружение триптофана также способствует увеличению квантового выхода.

При замене Trp122 и Trp190 квантовый выход падает на 15%. Направление потенциального поля возле этих триптофанов указывает на то, что их окружение способствует флуоресценции. Вблизи Trp122 находится тушитель Asp71, который является причиной снижение квантового выхода от триптофана. Также у Trp122 одно из самых коротких расстояний между атомами СЕ3 и С, что может приводить к 2-м компонентам времени жизни.

Trp190 не имеет тушителей в своем окружении, однако же является донором FRET (Trp190→Trp207), из-за чего его квантовый выход может быть уменьшен. Хотя даже если такой перенос и имеет место, то эффективность, согласно теоретическим расчетам и эксперименту, невелика. Trp207 почти (или совсем) не излучает, т.к. над его индольным кольцом находится протонированное кольцо гистидина (акцептор электрона) и две глутаминовых кислоты (Glu105 и Glu116), которые также могут тушить флуоресценции триптофана.

В окружении Trp243 отсутствуют тушители, но есть атом O Gln102, который может способствовать стабилизации переноса электрона на карбоксил остова. Однако, потенциал на поверхности Trp243 указывает на большой квантовый выход (что видно из эксперимента). Молекулы воды не имеют постоянного доступа к атомам NE1 и O, чтобы также сильно влиять на стабилизацию переноса заряда. Однако их присутствие, вместе с атомом O Gln102 и малое расстояние между атомами CE3 и C приводит к наличию двух компонент времени жизни.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Trp/W – Триптофан

His/H – Гистидин

S=S – Дисульфидная связь

Cys – Цистеин

Asp/D – Аспарагиновая кислота

Asn/N – Аспарагин

Glu/E – Глутаминовая кислота

Gln/Q – Глутамин

FRET – Фёстеровский резонансный перенос энергии

СТ – Перенос заряда

ЕР/ЭП – Электростатический потенциал

1L_a и 1L_b – Два первых возбужденных состояния триптофана

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Baltimore: Springer, 2006.
2. Chen Y., Barkley M.D. Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins †. 1998. Vol. 2960, № 4. P. 9976–9982.
3. Gilst M. Van, Hudson B.S. Histidine-tryptophan interactions in T4 lysozyme□: pH dependence of fluorescence Anomalous ' // Biophys. Chem. 1996. Vol. 05, № 63. P. 17–25.
4. Callis P.R. Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation // J. Mol. Struct. Elsevier B.V., 2014. Vol. 1077. P. 22–29.
5. Chen Y. et al. The Peptide Bond Quenches Indole Fluorescence. 1996. Vol. 7863, № 16. P. 9271–9278.
6. Финкельштейн, А.В., Птицын О.Б. Физика белка. 4th ed. Москва: КДУ, 2012.
7. Нельсон, Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера□: в 3т. Т. 1 / ed. Почкаева Т.И. Т.Т.Е. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011.
8. Clegg R.M. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids // Methods Enzymol. 1992. Vol. 211, № С. P. 353–388.
9. Demchenko A.P. Ultraviolet spectroscopy of proteins // Biochemical Education. Springer-V. 1988. Vol. 16, № 2. 112 p.
10. WEBER G. Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in tyrosine, tryptophan and related compounds. // Biochem. J. 1960. Vol. 75, № 1952. P. 335–345.
11. Engelborghs Y. The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins // Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2001. Vol. 57, № 11. P. 2255–2270.
12. Weber G. Resolution o f the fluorescence excitation spectrum. 1977. Vol. 25, № 1966. P. 441–444.

13. Zhong D. HYDRATION DYNAMICS AND COUPLED WATER–PROTEIN FLUCTUATIONS PROBED BY INTRINSIC TRYPTOPHAN // Advances in Chemical Physics. 143rd ed. / ed. Rice S.A. WILEY, 2009. Vol. 143.
14. Beierlein F.R. et al. Simulating FRET from Tryptophan: Is the Rotamer Model Correct? // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128, № 15. P. 5142–5152.
15. Albani J.R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes part 1. Fluorescence lifetimes origin of tryptophan free in solution // J. Fluoresc. 2014. Vol. 24, № 1. P. 93–104.
16. Beechem J.M., Brand L. TIME-RESOLVED FLUORESCENCE IN PROTEINS // Annu. Rev. Biochem. 1985. Vol. 54. P. 43–71.
17. Szabo A.G., Rayner D.M. Fluorescence Decay of Tryptophan Conformers in Aqueous Solution1 // J. Am. Chem. Soc. 1980. P. 554–563.
18. Bajzer Z., Prendergast F.G. A Model for Multiexponential Tryptophan Fluorescence Intensity Decay in Proteins // Biophys. J. Elsevier, 1993. Vol. 65, № 6. P. 2313–2323.
19. Zhang L. et al. Femtosecond studies of tryptophan fluorescence dynamics in proteins: Local solvation and electronic quenching // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110, № 37. P. 18097–18103.
20. Grinvald A., Steinberg I.Z. The fluorescence decay of tryptophan residues in native and denatured proteins // BBA - Protein Struct. 1976. Vol. 427, № 2. P. 663–678.
21. Clayton A.H.A., Sawyer W.H. Tryptophan Rotamer Distributions in Amphipathic Peptides at a Lipid Surface // Biophys. J. Elsevier, 1999. Vol. 76, № 6. P. 3235–3242.
22. Callis P.R., Tusell J.R. MD + QM Correlations with Tryptophan Fluorescence Spectral Shifts and Lifetimes // Methods in Molecular Biology. New York: Springer, 2014. Vol. 1076. P. 171–215.
23. D-crystallin H. et al. Mechanism of the Highly Efficient Quenching of Tryptophan Fluorescence // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 38. P. 11552–11563.

24. Forster T. Transfer Mechanisms of Electronic Excitation Energy // Radiat. Res. Suppl. 1960. Vol. 2. P. 326–339.
25. Eisinger J., Feuer B., Lamola A.A. Intramolecular Singlet Excitation Transfer. Applications to Polypeptides // Biochemistry. 1969. Vol. 8, № 10. P. 3908–3915.
26. Prytkova T.R., Kurnikov I. V., Beratan D.N. Coupling Coherence Distinguishes Structure Sensitivity in Protein Electron Transfer // Science (80-.). 2008. Vol. 315, № 5812. P. 622–625.
27. Moors S. et al. How Do Rotameric Conformations Influence the Time-Resolved Fluorescence of Tryptophan in Proteins? A Perspective Based on Molecular Modeling and Quantum Chemistry // Curr. Protein Pept. Sci. 2008. Vol. 9, № 5. P. 427–446.
28. Adams P.D. et al. Intramolecular quenching of tryptophan fluorescence by the peptide bond in cyclic hexapeptides // J. Am. Chem. Soc. 2002. Vol. 124, № 31. P. 9278–9286.
29. Prokopowicz M. et al. Advanced spectroscopy and apbs modeling for determination of the role of his190 and trp103 in mouse thymidylate synthase interaction with selected dump analogues // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 5. P. 1–29.
30. Qiu W. et al. Ultrafast quenching of tryptophan fluorescence in proteins: Interresidue and intrahelical electron transfer // Chem. Phys. 2008. Vol. 350, № 1–3. P. 154–164.
31. Maiorov V.N., Crippen G.M. Size- independent comparison of protein three- dimensional structures // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 1995. Vol. 22, № 3. P. 273–283.
32. Eisenhaber F. et al. The Double Cubic Lattice Method: Efficient Approaches to Numerical Integration of Surface Area and Volume and to Dot Surface Contouring of Molecular Assemblies // J. Comput. Chem. 1995. Vol. 16, № 3. P. 273–284.
33. Baker N.A. et al. Electrostatics of nanosystems□: Application to

microtubules and the ribosome // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. Vol. 98, № 18. P. 10037–10041.

34. Dolinsky T.J. et al. PDB2PQR[□]: an automated pipeline for the setup of Poisson – Boltzmann electrostatics calculations // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32, № 2. P. 665–667.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Вячеслав В.А. Кратасюк

«17» июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ связи характеристик времени-разрешенной флуоресценции белков со
структурными свойствами микроокружения их триптофановых остатков

03.04.02 «Физика»
по программе 03.04.02.01 «Биофизика»

Научный руководитель Немцева Е.В. Немцева

Выпускник Никифоров А.А. Никифоров

Рецензент Мельник Б.С. Мельник

Красноярск 2021