

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Кратасюк В.А.

_____ « ____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
03.03.02. Физика

Время-разрешенные характеристики флуоресценции одготриптофановых
белков различной структуры

Руководитель	_____	доцент, к.ф.-м.н.,	Е.В. Немцева
	подпись, дата		
Выпускник	_____		Д.Д. Зыкова
	подпись, дата		

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Время-разрешенные характеристики флуоресценции одготриптофановых белков различной структуры» содержит 51 страницу текстового документа, 4 таблицы, 17 рисунков, 5 формул, 30 использованных источников.

СВЕТЛЯКОВАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА, РИБОНУКЛЕАЗА, СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН, ДЕНАТУРАЦИЯ, СОБСТВЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ БЕЛКА, СЕРЕДИНА ПЕРЕХОДА, ВРЕМЯ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ.

Цель работы: анализ время-разрешенных характеристик флуоресценции одготриптофановых белков, различающихся первичной последовательностью и трехмерной структурой, и сопоставление полученных характеристик с локализацией триптофанов в белковой глобуле.

Актуальность исследования связана с необходимостью понимания механизмов формирования сигнала собственной люминесценции белков и развития методов флуоресцентной диагностики состояния биологических объектов.

В работе получены зависимости параметров стационарной и время-разрешенной флуоресценции одготриптофановых белков от концентрации мочевины. Проанализированы кривые перехода люциферазы *Luciola mingrelica*, рибонуклеазы T₁ из *Aspergillus oryzae* и сывороточного альбумина человека при денатурации мочевиной. Проведено вычисление молекулярной динамики структуры белков, проанализировано сходство и различия микроокружение триптофановых остатков в их составе.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. Флуоресценция белков как метод исследования их структуры (литературный обзор).....	7
1.1 Структура белков.....	7
1.1.1 Первичная структура белка.....	8
1.1.2 Вторичная структура белка.....	9
1.1.3 Третичная структура белка.....	12
1.1.4 Четвертичная структура белка.....	13
1.2 Собственная флуоресценция белков.....	13
1.3 Денатурация белков.....	18
1.4 Однотриптофановые белки.....	19
1.4.1 Светляковая люцифераза.....	20
1.4.2 Рибонуклеаза.....	22
1.4.3 Сывороточный альбумин человека.....	24
1.5 Время-разрешенная флуоресценция. Метод TCSPC.....	25
2. Материалы и методы.....	27
2.1 Материалы и оборудование.....	27
2.2. Методика эксперимента.....	28
2.3 Обработка результатов.....	28
3. Результаты и обсуждение.....	31
3.1 Спектры белков в ходе денатурации мочевиной.....	31
3.2. Анализ кривых перехода.....	31
3.3. Анализ кривых перехода, полученных по спектрам время-разрешенной флуоресценции и их сравнение для всех белков.....	31
3.4. Проведение молекулярной динамики и анализ микроокружения триптофанового остатка.....	31
3.5. Сравнение стабильности люциферазы светляков <i>Luciola mingrelica</i> и <i>Lampyris turkestanicus</i>	31
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	34
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	35

ВВЕДЕНИЕ

Основой многочисленных методов флуоресцентной спектроскопии белков является чувствительность фотофизических характеристик триптофанового аминокислотного остатка к изменению физико-химических свойств его микроокружения. Однако, интерпретация результатов, получаемых время-разрешенными методами спектроскопии, зачастую осложнена тем фактом, что спады флуоресценции триптофана носят не моноэкспоненциальный характер, и механизмы формирования регистрируемых компонент времени жизни флуоресценции белков и их спектральных вкладов всё еще не установлены окончательно. [15] Данная проблема проявляется наиболее ярко для многотриптофановых белков, в то время как исследование спектроскопических характеристик белков с единственным триптофаном может пролить свет на базовые механизмы формирования флуоресцентного сигнала.

Стабильность белка обуславливают такие параметры как химический состав раствора, рН среды, температура и любое изменение этих параметров влияет на стабильность связей и структуру молекулы белка в целом. Собственная флуоресценция белковой глобулы является чувствительным параметром к любым конформационным изменениям в структуре [13].

Целью настоящей работы является анализ время-разрешенных характеристик флуоресценции одотриптофановых белков, различающихся первичной последовательностью и трехмерной структурой, сопоставить полученные характеристики с локализацией триптофанов в белковой глобуле, сравнить стабильности одотриптофановых белков и провести сравнение характеристик люциферазы светляков *Luciola mingrelica* с гомологичной люциферазой *Lampyrus turkestanicus*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. измерить спектры флуоресценции и поглощения одотриптофановых белков в растворах с различным содержанием мочевины;
2. рассчитать термодинамические параметры перехода белков в денатурированное состояние по различным характеристикам флуоресценции;

3. проанализировать конформацию триптофанового остатка белков и их микроокружение;
4. сравнить время-разрешенные характеристики флуоресценции всех белков;
5. проанализировать степень гомологии люцифераз *Luciola mingrelica* и *Lumryris turkestanicus* и сравнить стабильности этих белков используя литературные данные.

1. Флуоресценция белков как метод исследования их структуры (литературный обзор)

1.1 Структура белков

В основе белка лежит полимер – состоящая от 100 до нескольких тысяч аминокислотных остатков полипептидная цепь, имеющая химически регулярный остов (главную цепь) и отходящие от нее боковые группы аминокислот (радикалы). Иногда в состав белка также входят компоненты других химических структур, такие как ионы металлов и органические простетические группы, которые могут быть вовлечены в формирование пространственной структуры белковой молекулы. [3, 6]

Важнейшей функцией белков является ферментативный катализ различного рода превращений внутри и вне клетки. Кроме того, структурные белки образуют защитные покровы, армируя мембраны, белки-регуляторы способны контролировать экспрессию генов, белки-рецепторы регулируют и обеспечивают восприятие межклеточных сигналов, передаваемых гормонами, белки иммунной системы специфически узнают и отличают «свои» и «чужие» молекулы друг от друга при клеточном взаимодействии, а также существуют белки, способные к передаче протонов и электронов через мембрану, обеспечивая процессы дыхания, выработки АТФ и др. [2, 8]

По строению и по способности растворяться в воде белки разделяют на две группы: глобулярные и фибриллярные.

Глобулярные белки растворимы в воде и разбавленных солевых растворах и обладают шарообразной формой молекулы. Компактная структура возникает при определенном сворачивании полипептидной цепи. В основе такой структуры лежит гидрофобное взаимодействие неполярных боковых цепей аминокислот. В глобулярных белках преобладает α -спирали. Одними из важнейших физико-химических свойств глобулярных белков являются их

способность к диффузии и денатурации, растворимость в растворах солей и амфотерность. [7, 8]

Фибриллярные белки практически нерастворимы в воде и солевых растворах, обладают волокнистой структурой, выполняют в основном структурную функцию, образуя микрофиламенты, фибриллы, волосы, шелк – защитные покровы. Полипептидные цепи таких белков расположены параллельно одна другой в форме длинных волокон. Важнейшие представители этой группы структурных белков – коллагены, кератины и эластины. В некоторых фибриллярных белках преобладает β -структура (фиброин шелка) [7, 8].

1.1.1 Первичная структура белка

Известно четыре уровня структурной организации белковой глобулы, называемые первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурами.

Уникальность конформации каждого белка определяется его первичной структурой – индивидуальной для каждого белка последовательностью аминокислотных остатков в полипептиде, поддерживаемой ковалентными связями.

Информация о первичной структуре для каждого белка закодирована в геноме (цепи ДНК). В процессе синтеза белка информация, находящаяся в гене, сначала переписывается на мРНК, а затем, используя мРНК в качестве матрицы, на рибосоме происходит сборка первичной структуры белка. [1, 3, 14]

Зная особенности чередования аминокислотных звеньев в первичной последовательности белка, и сопоставляя их с пространственной структурой молекулы, можно определить фундаментальные закономерности в формировании трехмерной структуры белков. Эта задача имеет важное биологическое и медицинское значение, так как многие генетические заболевания – это результат неправильного формирования пространственной

укладки белковой цепи вследствие нарушения аминокислотной последовательности. [3]

1.1.2 Вторичная структура белка

Функциональные свойства белка определяются его конформацией, т.е. расположением полипептидной цепи в пространстве. Укладка полипептидного остова любого белка не является случайной, а напротив, она специфична и неизменна для структуры и функционирования конкретного белка. Вся нужная информация о формировании пространственной структуры белка заключена в его первичной последовательности. Однако, задача предсказания конформации белка на основе его первичной структуры не решена окончательно. [3, 6]

Вторичной структурой белка называют упорядоченную структуру аминокислотных остатков на участке полипептидной цепи, в которой все аминокислоты расположены определенным образом в пространстве по отношению друг к другу. Распространенными регулярными вторичными структурами белков являются α -спирали и β -структуры. В глобулярных белках доля вторичной структуры составляет 50-70% от общего количества остатков пептидной цепи. [6, 14]

В случае α -спирали пептидный остов закручен в виде спирали за счет водородных связей, которые ориентированы вдоль оси спирали. Эти связи появляются между атомами водорода, соединенными с электроотрицательными атомами кислорода и азота карбонильных и аминогрупп соответственно, которые находятся в пептидных группах через четыре аминокислотных остатка (рисунок 1). Максимально возможная стабильность этой структуры обеспечивается за счет большого количества таких связей. На один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка. [3]

Также на устойчивость α -спирали влияет взаимодействие между боковыми группами, находящимися на расстоянии трех-четырех аминокислотных остатков. Боковые группы, имеющие у каждой аминокислоты

свое строение, растворимость в воде и заряд, выступают из спирального остова наружу в разные стороны и не принимают участие в формировании водородных связей, но некоторые из таких радикалов нарушают формирование участков α -спирали. К таким радикалам относится пролин, атом азота которого входит в состав жесткого кольца, при этом делая невозможным вращение вокруг $-N-CH-$ связи. Помимо этого, у атома азота пролина, образующего пептидную связь с другой аминокислотой, нет атома водорода, в результате чего пролин не способен образовать водородную связь в данном месте пептидного остова, и структура α -спирали нарушается. В таком месте, обычно, появляется петля или изгиб. Также могут происходить механические нарушения в формировании α -спирали из-за близко расположенных объемных радикалов, таких как метионин, триптофан. [3, 6]

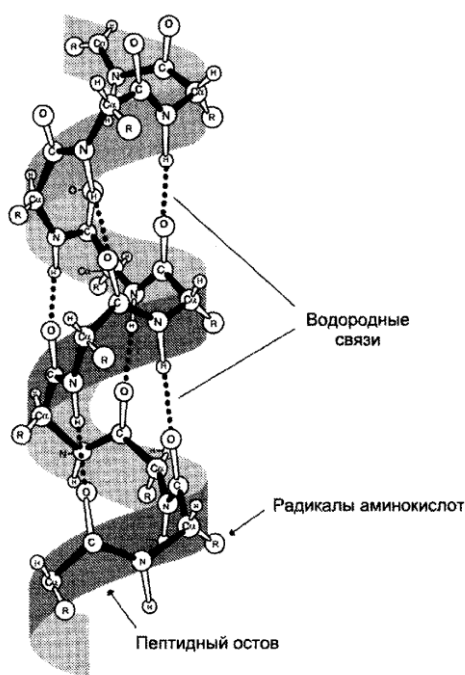


Рисунок 1. Пространственное строение α -спирали полипептидной цепи и водородных связей, участвующие в формировании этой структуры [2]

Помимо этого, для устойчивости α -спиральной структуры важно то, какие аминокислотные остатки расположены на концах спиральных сегментов. Каждая пептидная связь имеет небольшой электрический диполь, поэтому вся структура спирали представляет собой диполь, величина которого возрастает с

увеличением длины спирали за счет наличия большого числа водородных связей. Но четыре аминокислоты на каждом конце спирали не полностью вовлечены в образование водородных связей. Частичный положительный и отрицательный заряды диполя размещены на пептидной аминогруппе и карбонильной группе вблизи N- и C-концов соответственно. Поэтому на N-конце как правило располагаются отрицательно заряженные аминокислоты, способные нейтрализовать положительный заряд диполя. И наличие положительно заряженных аминокислотных остатков на этом конце будет оказывать дестабилизирующее действие. Для C-конца закономерности аналогичны, с точностью до противоположных знаков зарядов. [6]

Таким образом, для формирования конкретного участка спирали важно то, какие аминокислоты находятся на этом участке и в каком порядке они расположены. [6]

β -структуры – это структуры, которые формируются за счет образования большого количества водородных связей между атомами пептидных групп линейных областей одной полипептидной цепи. В этом случае остов полипептидной цепи образует зигзагообразную структуру. Боковые группы аминокислот таких структур выступают по обе стороны это зигзагообразной структуры, и водородные связи расположены перпендикулярно полипептидной цепи (рисунок 2). [6]

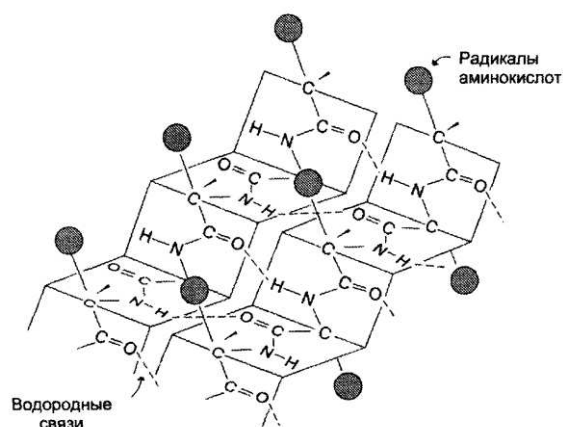


Рисунок 2. Вторичная структура белка в виде β -складчатого листа [2]

Содержание α -спиралей и β -структур в разных белках различно.

Помимо α -спиралей и β -слоев есть участки, не имеющие правильной, периодической пространственной организации, их называют неструктурированными. Такие участки представлены кольцеобразными и петлеобразными структурами, но их конформация также обусловлена аминокислотной последовательностью белка.

1.1.3 Третичная структура белка

Третичная структура глобулярных белков представляет собой укладку в пространстве полипептидной цепи, содержащей α -спирали, β -структуры и неструктурированные участки. [2]

Дополнительно укладка скрученной полипептидной цепи фиксируется связями между боковыми цепями аминокислот. Существует несколько видов связей между боковыми цепями, участвующих в формировании третичной структуры белка. Например, ионные и водородные связи. Ионные связи возникают между положительно заряженными группами лизина и аргинина и отрицательно заряженными карбоксильными группами аспарагиновой и глутаминовой кислоты. Водородные связи возникают между гидрофильными незаряженными группами (-ОН, -CONH, SH-группы) и гидрофильными группами. Кроме того, возникают гидрофобные взаимодействия между гидрофобными радикалами аминокислот, стремящимися к объединению внутри глобулярной структуры растворимых в воде белков. Также есть дисульфидные связи между SH-группами двух молекул цистеина, при котором остатки этой аминокислоты сближаются и образуют прочную ковалентную связь, этим повышая стабильность третичной структуры, хотя эти связи не являются обязательными для правильной укладки молекулы в пространстве. Типы связей, возникающие при формировании третичной структуры белка, представлены на рисунке 3 [2, 3].

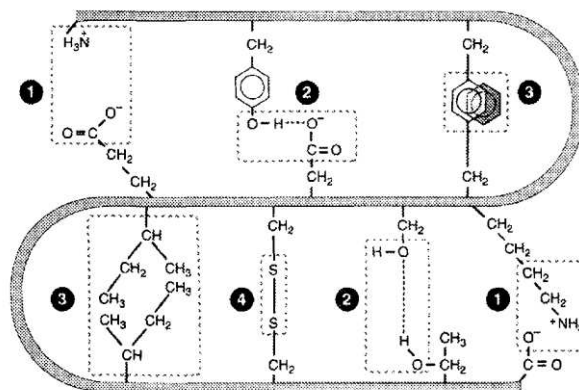


Рисунок 3. Типы связей, возникающие между радикалами аминокислот, участвующих в формировании третичной структуры белковой глобулы: 1 – ионные связи; 2 – водородные связи; 3 – гидрофобные связи; 4 – дисульфидные связи [3]

1.1.4 Четвертичная структура белка

После образования трехмерной структуры в белках происходит связывание нескольких пространственно-организованных полипептидных цепей, которые образуют так называемую, четвертичную структуру белка, или простыми словами, под четвертичной структурой понимается расположение друг относительно друга полипептидных цепей и их количество в пространстве. Объединение полипептидных цепей происходит за счет тех же взаимодействий, которые участвуют в формировании третичной структуры белка: ионных, водородных, гидрофобных.

1.2 Собственная флуоресценция белков

Флуоресценция белков является следствием наличия в их структуре трех аминокислотных остатков, которые могут давать вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию: тирозина (Tyr), триптофана (Trp) и фенилаланина (Phe). Флуоресценция белка зависит от количества этих аминокислотных остатков, их расположения в первичной последовательности, от способа укладки белка и от взаимодействий, возникающих в белке (например, перенос энергии с остатков

тирозина на триптофан). Обычно, флуоресценцию белков возбуждают в максимуме его поглощения (при 280 нм) или больших длинах волн. [5]

1.2.1 Триптофановая флуоресценция

При возбуждении на длине волны 280 нм в испускании большинства нативных белков преобладает флуоресценция триптофанового остатка, так как она является доминирующей из-за своего высокого квантового выхода, и на нее приходится примерно 90% всей флуоресценции белка. [5, 14]

Триптофан, находясь в водном растворе при комнатной температуре, имеет две полосы поглощения: у первой максимумы при 280 нм, с коэффициентом экстинкции $\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и 288 нм с $\epsilon_{288} = 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, плечом при 265 нм ($\epsilon_{265} = 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), у второй максимум при 220 нм с $\epsilon_{220} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (рисунок 4). [5]

Длинноволновая полоса триптофана, в области от 250 до 290 нм, состоит из двух электронных переходов: 1L_a и 1L_b . Доказано, что спектр триптофановой флуоресценции зависит от полярности растворителя, и при увеличении полярности может происходить батохромный сдвиг спектра поглощения триптофана. В практически полностью полярном окружении будет преобладать флуоресценция 1L_a состояния, а в неполярном 1L_b энергетическим состоянием. [19]

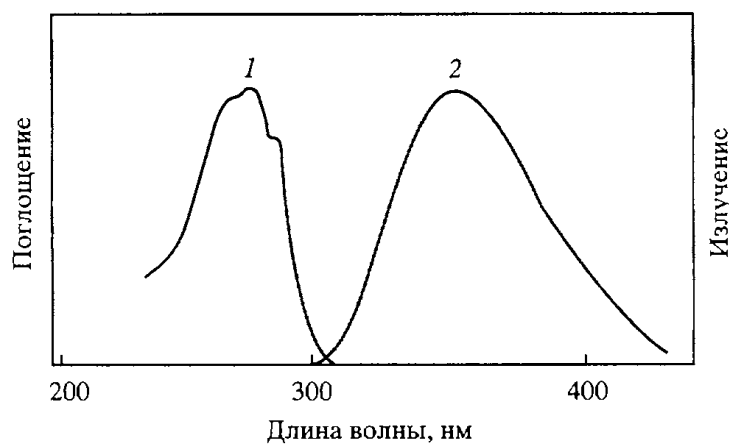


Рисунок 4. Спектры поглощения и флуоресценции триптофана в водном растворе при комнатной температуре. [5]

Положение максимума спектра флуоресценции остатков триптофана в белках, в различных условиях, лежит в пределах от 307 до 353 нм, что соответствует диапазону для пяти наиболее вероятных спектральных форм остатков триптофана по классификации Э.А. Бурштейна, согласно выдвинутой им модели дискретных состояний остатков триптофана в белках. [5]

1. Спектральная форма А. К данной спектральной форме принадлежат флуорофоры, расположенные в нейтральном гидрофобном окружении, не создающие эксиплексов с молекулами растворителя или соседними остатками аминокислот, с максимум спектра флуоресценции в области 308 нм.

2. Спектральная форма S. К данному спектральному классу относятся флуорофоры, находящиеся глубоко внутри белковой глобулы в подвижной полярной среде, относительно спектральной формы А и способные образовать эксиплекс 1:1 с полярной, находящейся рядом, белковой группой. Чистого спектрального класса S у белков не бывает, потому что в нем всегда есть вклад класса I. Спектр триптофановой флуоресценции данного класса обладает максимумом в области 316 нм.

3. Спектральная форма I. Это класс соответствует излучению индольного кольца хромофора, располагающегося внутри белка и образующего эксиплекс 2:1 с близкорасположенными полярными группами белка, с максимум спектра флуоресценции около 330 нм и шириной 48-50 нм.

4. Спектральная форма II. Спектральному классу соответствует излучению индольного хромофора на поверхности белка, который находится в контакте с молекулами связанной воды. Спектр класса бесструктурный, имеет максимум при 340 нм и ширину 53-55 нм.

5. Спектральная форма III. Остатки триптофана данного класса чаще встречаются в развернутых белках, и лишь иногда в нативных. В этом спектральном классе, также, как и классе II, остатки триптофана расположены на поверхности белковой глобулы и доступны для контакта с молекулами свободной воды, и спектры триптофановых остатков этого класса почти совпадают со спектром излучения свободного триптофана в воде. Имеет максимум при 352 нм с шириной 59-61 нм. [5]

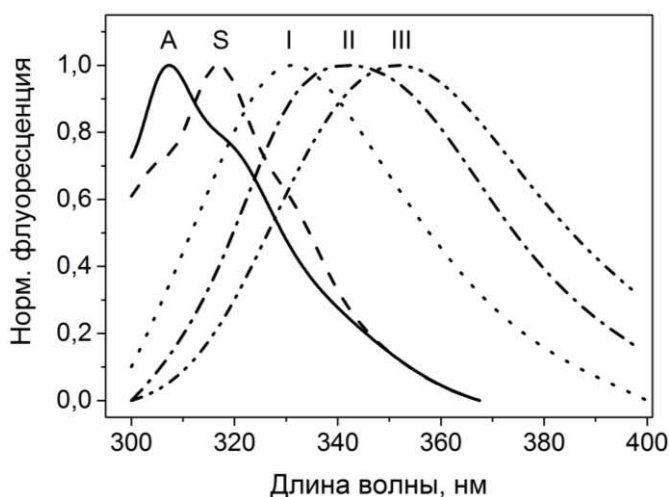


Рисунок 5. Нормированные спектры флуоресценции остатков триптофана, принадлежащих A, S, I, II, III классам. [5]

Малый вклад тирозинового излучения в спектры флуоресценции белков объясняется низким коэффициентом экстинкции тирозина, низким квантовым выходом и существованием переноса энергии возбуждения с остатков тирозина на остатки триптофана. Аналогично, отсутствие фенилаланинового вклада в спектры белков объясняется низким коэффициентом экстинкции фенилаланина и существованием переноса энергии возбуждения от остатков фенилаланина на остатки тирозина. [5, 9]

Метод собственной флуоресценции белка обычно очень хорошо подходит для исследования процессов перехода белка из нативного состояния в денатурированное, т.е. в процессе разворачивания белка. [5]

Спектральные свойства исследованных в данной работе белков определяются одним триптофановым остатком из двух возможных спектральных классов:

RNase T₁: Trp59 спектрального класса S;

Luciola mingrelica: Trp419 спектрального класса II;

HSA: Trp214 спектрального класса II.

1.2.2 Тушители триптофановой флуоресценции

Любого рода процессы, приводящие к снижению интенсивности флуоресценции вещества, являются процессами тушения флуоресценции. К тушению флуоресценции приводят много факторов, например, перенос энергии от донора к акцептору, перенос протона и электрона, образование эксиплексов и эксимеров, а также тушение может быть вызвано в результате столкновений с тяжелыми атомами. Основные механизмы тушения, функциональные группы белков, которые способны к подавлению триптофановой флуоресценции и потенциальные тушители представлены в Таблице 1. [12]

Для каждого из этих видов тушения необходимо столкновение (контакт) между возбужденной молекулой вещества и тушителем. Благодаря таким столкновениям можно определить доступность флуорофора для тушителей, т.е. локализацию флуорофоров внутри молекулы белка и мембраны, или определить скорости диффузии тушителей. [12]

Таблица 1 – Основные виды фотофизических процессов, приводящие к тушению флуоресценции вещества [12, 30, 25]

Процесс	$M^* + T \rightarrow \text{продукты}$	Тушитель триптофана в белке
Столкновение с тяжелым атомом или парамагнитными частицами	${}^1M^* + T \rightarrow M + T + \text{тепло}$ ${}^1D^* + A \rightarrow D^* = A^-$	I, Cs^+, Br $O_2, NO,$
Перенос электрона	${}^1A^* + D \rightarrow {}^1A^- + D^+$	Боковые цепи глутамина, аспарагина, глутаминовой и аспарагиновой кислоты
Образование эксимера	${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1(MM)^*$	
Образование эксиплекса	${}^1D^* + A \rightarrow {}^1(DA)^*$ ${}^1A^* + D \rightarrow {}^1(DA)^*$	Между триптофаном и OH- группой
Перенос протона	$AH^* + B \rightarrow (A^-)^* + BH^*$	Боковые цепи лизина и тирозина
Перенос энергии	$B^* + AH \rightarrow (BH^+)^* + A^-$ ${}^1D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^1A^*$ ${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1M + {}^1M^*$	Триптофан, лиганды белка

T – тушитель флуоресценции, M^* – возбужденная молекула вещества, D – молекула донора, A – молекула акцептора энергии возбуждения, B – невозбужденная молекула.

1.3 Денатурация белков

Специфическая для каждого белка структура возникла для реализации специфических функций определенного белка, и изменение условий, в которых находится стабильный белок, может повлиять на его структуру. Нарушение трехмерной структуры белка, которое влечет потерю его специфических функций, называется денатурацией, при которой не происходит разрыва пептидных связей, т.е. не нарушается первичная структура белка. Денатурированное состояние может соответствовать не полностью развернутой конформации белка. В большинстве случаев денатурированные белки находятся в частично развернутых состояниях, которые не до конца изучены. При денатурации белка происходит увеличение в размерах компактной

пространственной структуры нативного белка, из-за чего ионные, гидрофобные и водородные связи внутри белковой глобулы становятся доступны для денатурирующих агентов, и в итоге расщепляются связи, стабилизирующие конформацию белка. [3, 6]

Денатурация белка может быть вызвана различного рода воздействиями. Физическая денатурация может быть вызвана механическим воздействием, например, сильным перемешиванием или встряхиванием, которое приводит к соприкосновению белковых молекул с воздушной средой на поверхности раздела фаз и изменению конформации молекул белка, или физическим воздействием (нагревание, ультрафиолетовое, рентгеновское и радиоактивное излучение, обработка ультразвуком). Химическая денатурация достигается с помощью соединений, разрывающих водородные связи (растворами мочевины и гидрохлорида гуанидина при высоких концентрациях), обработкой кислотами и щелочами, а также при воздействии солями тяжёлых металлов (ртуть, медь, свинец и т.д.), когда происходит образование прочных связей с -SH группой, в результате чего изменяется конформация самого белка и его активность. Экстремальные значения pH и воздействие поверхностно-активных веществ изменяют суммарный заряд белка, что вызывает электростатическое отталкивание различных групп и разрыв некоторых водородных связей. Чувствительность отдельных белков к денатурирующим агентам различна. [3, 6]

1.4 Однотриптофановые белки

Знание об особенностях структуры и спектральных характеристиках однотриптофановых белков важно для понимания фундаментальной связи между первичной последовательностью полипептидов и стабильностью их структуры.

Большой интерес в изучении одотриптофановых белков представляет анализ промежуточных состояний, которые формируются при переходе из нативного состояния белка в развернутое.

В данной работе объектами исследования были три одотриптофановых белка, которые различаются структурой, функциями, флуоресцентными и время-разрешенными характеристиками.

1.4.1 Светляковая люцифераза

Люциферазы – ферменты, которые вырабатывают биолюминесцентные организмы (например, светляки, жуки-щелкуны, железнодорожные черви), которые могут производить свет в результате преобразования химической энергии в возбужденное состояние, что приводит к испусканию фотона в области видимого света.

Белки-люциферазы активно используются в разнообразных биоаналитических методах, и поэтому их стабильность и особенности сворачивания/разворачивания представляют практический интерес. На данный момент изучено несколько десятков ферментов из различных видов светляков и жуков, которые различаются стабильностью, активностью, спектрами биолюминесценции и аминокислотными последовательностями. [10]

Люцифераза светляков катализирует окисление люциферина (LH_2) кислородом в присутствии АТФ и Mg^{2+} с образованием электронно-возбужденного оксилуциферина, который возвращается в основное состояние, в результате чего происходит испускание квантов видимого света.

Схема реакций, катализируемых люциферазой светляков, показана на рисунке 6.

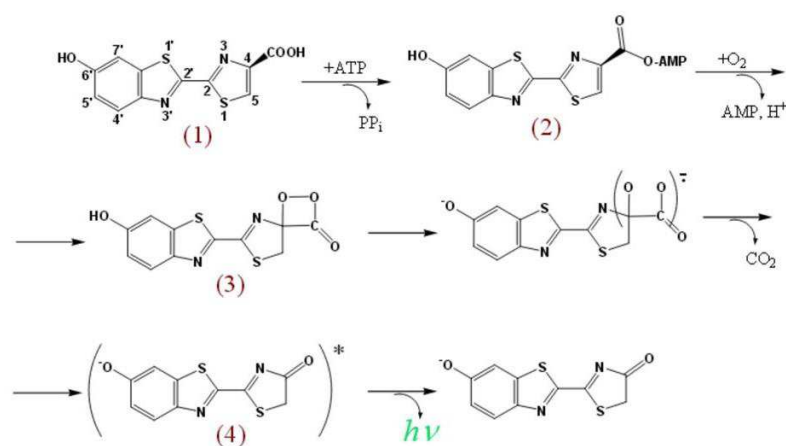


Рисунок 6. Схема реакций окисления люциферина в ходе реакции, катализируемой люциферазой светляков [11]

Реакция состоит из двух основных этапов – аденилирования и окисления. На первой стадии фермент связывается с субстратами – люциферин (1) и аденозин-5'-трифосфатом (АТФ). В таком тройном фермент-субстратном комплексе люциферин ковалентно взаимодействует с АТФ, и в результате образуются смешанный ангидрид карбоновой и фосфорной кислот – люциферил-аденилат (2) и пиррофосфат. После люциферил-аденилат окисляется кислородом воздуха, превращаясь в циклический пероксид – диоксетанон (3). Трансформация диоксетанона приводит к образованию бирадикала, в результате декарбоксилирования которого образуется продукт реакции – оксилуциферин (4) в синглетном электронно-возбужденном состоянии. Затем происходит инактивация электронно-возбужденного оксилуциферина, сопровождающееся излучением света. Помимо зеленого свечения у люцифераз наблюдается красное свечение, но только в определенных условиях. [11]

Люцифераза светляков состоит из двух доменов: большого N-домена и малого С-домена, соединенных подвижной неупорядоченной петлей.

Люцифераза светляков *Luciola mingrelica*, состоит из 548 аминокислотных остатков, более половины из которых полярные (рисунок 7). Белок содержит в первичной последовательности единственный остаток Trp в позиции 419, находящийся на неструктурированном участке, 27 остатков Phe и

19 остатков Туг. Общая форма молекулы близка к сферической. Молекулярная масса белка составляет 60,5 кДа. В молекуле люциферазы содержится восемь остатков цистеина, пять из которых являются неконсервативными (62, 86, 146, 164, 284), и три – консервативными (82, 260, 393). [4]

Вторичная структура *Luciola mingrelica* представлена α -спиралями и β -структурами (13 α -спиралей и 11 β -листов).

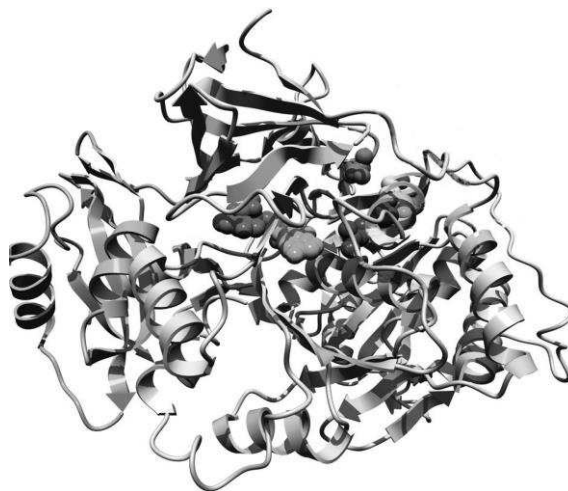


Рисунок 7. Структура *Luciola mingrelica* в комплексе с оксилуциферинном (LO) и АМФ [10]

1.4.2 Рибонуклеаза

К рибонуклеазам (RNase) относятся ферменты, которые катализируют эндонуклеолитическое расщепление РНК, проходящее в два этапа: (1) трансфосфорилирование с образованием 2', 3'-циклического фосфатного промежуточного соединения и (2) гидролиз промежуточного продукта до 3'-фосфата (рисунок 8). [17]

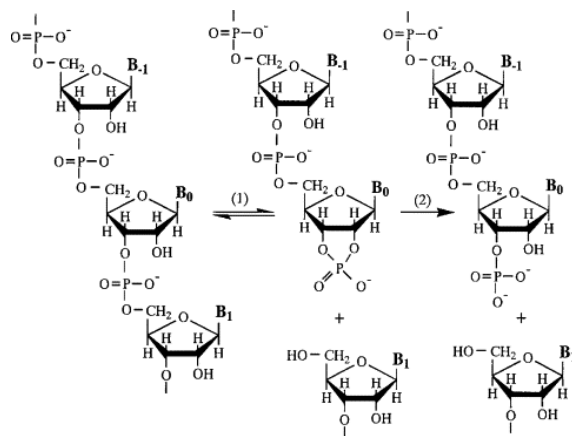


Рисунок 8. Реакции, катализируемые RNase T₁

Рибонуклеаза T₁ из плесневого гриба *Aspergillus oryzae* является αβ-белком, состоит из 104 аминокислотных остатков и имеет единственный триптофан в 59 позиции, располагающийся в активном центре фермента, на β-листе, в гидрофобной белковой среде, почти полностью защищенной от растворителя. Также рибонуклеаза содержит 4 остатка Phe и 9 остатков Tyr. трехмерная структура белка изображена на Рисунке 10. Молекулярная масса белка составляет 11,13 кДа.

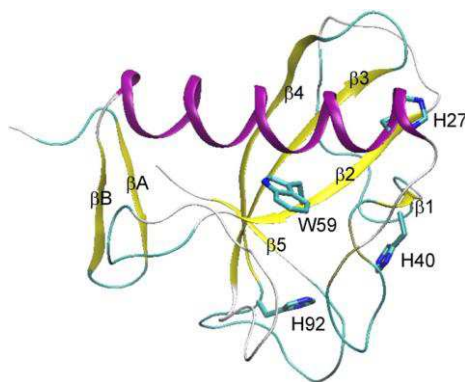


Рисунок 9. Трехмерная структура RNase T₁ (PDB: 9RNT) [17]

Кристаллическая структура RNase T₁ представлена двумя антипараллельными А-листом и В-листом, и одной α-спиралью. Лист А состоит из двух β-тяжей (βА и βВ). Лист В, состоящий из β1–β5 тяжей, сильно скручен и содержит активный центр фермента. Стабильность белка обусловлена плотным связыванием В-листа с α-спиралью. Дополнительная стабильность белковой глобулы обеспечивается наличием двух дисульфидных связей между

остатками цистеина (Cys2-Cys10 и Cys6-Cys103). Индольное кольцо Trp59 расположено между α -спиралью и петлями между листами β 1 и β 2- β 3. [17]

1.4.3 Сывороточный альбумин человека

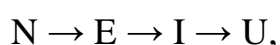
Альбумины – группа простых белков, которые содержатся в жидкостях и тканях организма животных и человека, основная функция которых в организме является регуляция коллоидно-осмотического давления крови.

Структура белка представлена тремя гомологичными доменами (I, II, III), которые собираются таким образом в пространстве, что образуют молекулу белка в форме сердца (рисунок 10). Первичная последовательность HSA состоит из 585 аминокислотных остатков с единственным триптофаном в позиции 214 в домене II. Белок имеет молекулярную массу около 67 кДа и содержит 17 дисульфидных связей. [22]



Рисунок 10. Трехмерная структура HSA [22]

Известно, что разворачивание этого белка проходит в несколько этапов. Сначала происходит переход нативной формы молекулы белка в расширенную форму, затем происходит переход из расширенной формы, в так называемое промежуточное состояние, где домен II развернут, а домен I при этом остается нетронутым. После чего белок переходит в итоговое развернутое состояние. [21]



где N – нативная форма белка, E – расширенная форма, I – промежуточное состояние, U – состояние, соответствующее развернутому белку.

1.5 Время-разрешенная флуоресценция. Метод TCSPC

Для определения и описания промежуточных состояний белков, которые образуются в результате перехода из нативного состояния в денатурированное, используют время-разрешенную и стационарную флуоресцентную спектроскопию.

Метод разрешенной во времени флуоресцентной спектроскопии позволяет получить более детальное представление о состоянии молекул, обладающих флуоресцирующими свойствами, а также данный метод можно применить для внутриклеточных исследований.

Одним из распространенных методов записи распределения фотонов и флуоресцентных изображений с высоким временным разрешением, является метод счета одиночных фотонов с временной корреляцией (TCSPC). В этом методе исследуемый образец возбуждается с помощью импульсного источника света (лазер). При этом вся оптика прибора и детектор настроены для обнаружения лишь одного фотона, когда работает импульсный источник, т.е. система регистрации измеряет время между возбужденным импульсом от источника света и приходом одного фотона на детектор. После чего, в ходе измерения строятся наборы кривых затухания флуоресценции, которые в итоге анализируются методом глобального анализа, суть которого заключается в описании всех спадов на разных длинах волн с помощью набора одних и тех же компонент времени жизни, но с разными вкладами. Схема установки для проведения данного метода представлена на рисунке 11.

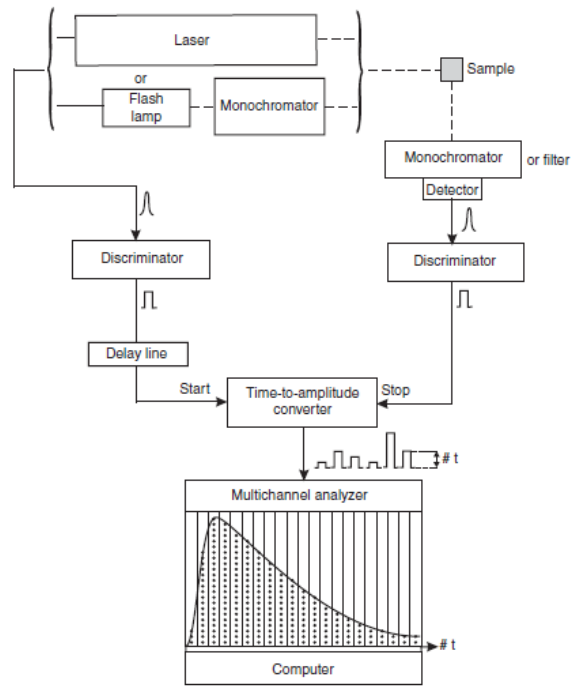


Рисунок 11. Схема установки однофотонного синхронизирующего флуориметра [24]

2. Материалы и методы

2.1 Материалы и оборудование

В работе были использованы белки: люцифераза светляка *Luciola mingrelica* («Люмтек», Россия), рибонуклеаза T₁ из *Aspergillus oryzae* (Sigma), сывороточный альбумин человека (HSA) (Sigma, USA). Для приготовления буфера использовали (гидроксиметил)аминометан (Tris) и уксусную кислоту (Sigma-Aldrich). Денатурацию белков проводили с помощью мочевины (Panreac).

Для регистрации спектров поглощения и флуоресценции белка использовали спектрофотометр Cary 5000 (Agilent Technologies, Australia) и спектрофлуориметр Fluorolog-3 (Horiba, JobinYvon, Франция) соответственно.

Спады флуоресценции при импульсном возбуждении были зарегистрированы методом счета одиночных фотонов с временной корреляцией с помощью модуля DeltaHub (Horiba, Jobin Yvon, Франция).

Для приготовления навесок реагентов были использованы лабораторные весы Ohaus Pioneer.

pH буферного раствора и растворов мочевины измеряли при помощи pH-метра Seven Compact (Mettler Toledo, Швейцария).

Концентрацию мочевины в растворе определяли с помощью рефрактометра ИРФ-454Б2М (КОМЗ, Россия).

Концентрация белков в кювете составляла около 0,2 мг/мл, её определяли спектрофотометрически с использованием значения коэффициента экстинкции на длине волны 280 нм (Таблица 2).

Таблица 2 – Молярные коэффициенты экстинкции белков

Белок	FLucLm	RNase T ₁	HSA
$\epsilon_{280}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	30 490	11 068	35 340

2.2. Методика эксперимента

Был использован метод равновесной денатурации белка в растворах мочевины. Растворы белков исследовали в Tris-ацетатном буфере (50 мМ, рН 7,8). Белки инкубировали в растворах мочевины с концентрацией 0-9 М при комнатной температуре, после чего проводили измерение оптических параметров.

Эксперименты проводили с использованием кварцевых кювет сечением 10x10 и 10x2 мм и объемом 4 и 0,8 мл. Объем образца в кювете составлял 3150 мкл для экспериментов с люциферазой светляков и человеческим альбумином, и 600 мкл для эксперимента с рибонуклеазой.

Все измерения проводили при фиксированной температуре 20°C.

Спектры поглощения регистрировали в диапазоне 300 – 600 нм.

Спектры флуоресценции измеряли при возбуждении на длине волны 296 нм в диапазоне 300-450 нм. Спектральная ширина щелей составляла 5 нм. Коррекцию спектров проводили с учетом фона растворителя, эффекта внутреннего фильтра и чувствительности прибора.

Разрешенные во времени спектры флуоресценции снимали в диапазоне 305-419 нм, с шагом 4 нм и разрешением 27 пс/канал. Для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококолоидное вещество Ludox.

2.3 Обработка результатов

Анализ и обработку результатов эксперимента проводили с использованием программ Microsoft Excel и Microsoft Origin Pro 8.1.

По спадам флуоресценции вычисляли времена жизни флуоресценции и их амплитуды методом деконволюции с помощью специализированного приложения DAS6 (Horiba, JobinYvon, Франция). Набор спадов анализировали с помощью встроенной программы методом глобального анализа, подбирая

такие дискретные значения времени жизни, чтобы они описывали все зарегистрированные спады.

Вклады компонент времени жизни в общее время жизни флуоресценции определяли по формуле:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i}, \quad (1)$$

где τ_i - время жизни,

α_i - амплитудный коэффициент i -ой компоненты.

Спектры ассоциированные с временами жизни флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$I(\lambda, \tau_i) = I_{ss}(\lambda) f_i(\lambda), \quad (2)$$

где I_{ss} – стационарный спектр флуоресценции

$f_i(\lambda)$ – вклад i -ой компоненты времени жизни на длине волны λ .

Изменение положения и формы спектра флуоресценции всех белков при стационарном возбуждении анализировали по значению центра тяжести (GC), вычисленному по формуле:

$$GC = \frac{\sum_i \lambda_i \cdot I_i}{\sum_i I_i}, \quad (3)$$

где I_i - интенсивность флуоресценции при длине волны λ_i .

Кривые перехода белка (зависимость характеристики флуоресценции белка от концентрации мочевины) аппроксимировали, используя функцию Больцмана, по формуле:

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + \exp(\frac{x - x_0}{dx}))}, \quad (4)$$

где x – концентрация мочевины, y – значение параметра флуоресценции (центр тяжести спектра, отношение интенсивностей на длине волны 320 нм и 350 нм и др.), dx – ширина перехода, x_0 – середина перехода.

Изъято 15 страниц, в связи с обращением к авторским правам

3. Результаты и обсуждение

3.1 Спектры белков в ходе денатурации мочевиной

3.2. Анализ кривых перехода

3.3. Времена жизни флуоресценции и их вклады в нативном и денатурированном состоянии

3.4. Анализ кривых перехода, полученных по спектрам время-разрешенной флуоресценции и их сравнение для всех белков

3.5. Проведение молекулярной динамики и анализ микроокружения триптофанового остатка

3.6. Сравнение стабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и *Lampyris turkestanicus*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была изучена равновесная денатурация трех одготриптофановых белков: люциферазы светляков *Luciola mingrelica*, рибонуклеазы T₁ из *Aspergillus oryzae* и сывороточного альбумина человека.

Исследование было направлено на анализ разрешенных во времени характеристик флуоресценции трех одготриптофановых белков различной структуры. В работе были построены спектры флуоресценции и на их основе построены зависимости от концентрации мочевины таких параметров как отношение интенсивностей (I_{320}/I_{360}) и центр тяжести спектра (GC), которые отражают переход белка в денатурированное состояние. Также были изучены разрешенные во времени характеристики флуоресценции всех белков, получены времена жизни флуоресценции, построены спектры, ассоциированные с временами жизни и определены их вклады для всех белков. Также определены зависимости параметров времен жизни τ_1 и τ_2 и изменение положения спектральных компонент, ассоциированных с определенными временами жизни, на основе которых проведено их сравнение для всех белков.

Помимо вышеперечисленного, для объяснения происхождения двух основных компонент времени жизни флуоресценции, проанализирована пространственная структура исследованных белков. Было проведено вычисление молекулярной динамики структуры люциферазы, рибонуклеазы и сывороточного альбумина человека в явном растворителе.

На основании полученных в работе результатов были сделаны выводы:

1. Денатурация люциферазы светляков и рибонуклеазы T₁ сопровождается уменьшением компоненты времени жизни флуоресценции τ_1 (около 2,5 и 2,2 нс) и увеличением компоненты времени жизни τ_2 (около 6 и 3,9 нс); денатурация HSA сопровождается уменьшением обеих компонент времени жизни (7 и 2,3 нс).

2. По изменению таких параметров как центр тяжести и отношение интенсивностей спектров флуоресценции при стационарном возбуждении,

время жизни флуоресценции, центр тяжести спектров, ассоциированных с временем жизни, идентифицируется один структурный переход люциферазы светляков с серединой при 3,1-3,2 М, в то время как у рибонуклеазы и HSA по изменению компонент времени жизни регистрируются два разных перехода.

3. В окружении триптофанового остатка люциферазы присутствует тушитель – атом серы Cys393, что может быть причиной возрастания одного из времен жизни белка при денатурации. Вблизи триптофана рибонуклеазы присутствует только карбоксильная группа глутаминовой кислоты Glu58, которая может являться тушителем флуоресценции этого белка. Для триптофанового остатка HSA потенциальных тушителей не обнаружено.

4. Молекулярная динамика выявляет наличие у каждого белка только одного стабильного ротамера триптофана, а значит ротамерная гипотеза не может объяснять наличие двух времен жизни флуоресценции этих белков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

I_{320}/I_{360} – отношение интенсивности спектра излучения на длине волны 320 нм к 360 нм

GC – центр тяжести спектра

I_{320} – интенсивность при фиксированной длине волны

λ_{max} – максимум спектра флуоресценции

LN₂ – D-люциферин светляков

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

Trp – триптофан

FLuc Lm – люцифераза светляков *Luciola mingrelica*

Tyr – тирозин

Glu – глутаминовая кислота

COO- – карбоксильная группа аминокислоты

His – гистидин

Cys – цистеин

Phe – фенилаланин

LO – оксилуциферин

R-группы – группы радикалов

HSA – сывороточный человеческий альбумин

FLucLm – люцифераза светляков *Luciola mingrelica*

RNase T₁ – рибонуклеаза T₁

SASA – площадь поверхности, доступной для растворителя

RMSF – среднеквадратичное отклонение вокруг средней структуры атомов (подвижность атомов в структуре)

Lys – лизин

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедев С. И. Физиология растений / С. И. Лебедев – 3-е изд., М: – 1988 г – С. 544.
2. Северин Е. С., Алейникова, Е. С. Биологическая химия – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», – 2008. – С. 364.
3. Северин Е. С. – Биохимия, 2 изд - е., испр. - М: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – С. 784, с. ил.
4. Модестова, Ю. А Сайт-направленный мутагенез остатков цистеина в люциферазе светляков *Luciola mingrelica* / Ю. А. Модестова, Г. Ю. Ломакина, Н. Н. Угарова // Биохимия, – Т. 76, №10, – 2011, – С 1407-1415.
5. Пермяков, Е. А Метод собственной люминесценции белка / Е. А. Пермяков – М.: Наука, – 2003. – С. 189.
6. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера в 3 т. Т. 1 / пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, – 2011. – С. 694.
7. Александрова Е. В. Аминокислоты, пептиды, простые и сложные белки: особенности их химического состава, структуры, физико-химических свойств и функции: учеб.-метод. пособие для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной подготовки студентов – иностранных граждан мед. фак. / Е. В. Александрова, Н. В. Крисанова, С. В. Левич // Запорожье: ЗГМУ, – 2017. – С. 97.
8. Якубке Х.-Д., Ешкайт. Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки, пер. с нем. – М.: Мир, – 1985. – С. 456, с ил.
9. Немцева, Е. В. Оптическая спектроскопия биологических макромолекул – учебно-методическое пособие – Красноярск, ИПК СФУ, – 2009, – С. 52.
10. Угарова, Н. Н., Кокшаров М. И Генетическая инженерия люцифераз светляков. Взаимосвязь между структурой и термостабильностью ферментов / Н. Н. Угарова, М. И. Кокшаров // Физическая химия биопроцессов под редакцией член-корр. РАН С. Д. Варфоломеева М.: КРАСАНД, – 2014. – С. 800.

11. Кокшаров М. И. Модификация спектров биолюминесценции и термостабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* методами мутагенеза // дис. ... канд. хим. наук : 02.00.15 / Кокшаров Михаил Иванович, Москва, 2009, – 132 с.
12. Слюсарева, Е. А. Оптическая спектроскопия: сложные молекулы: учеб. пособие / Е. А. Слюсарева, М. А. Герасимова, Н. В. Слюсаренко. – Красноярск: СФУ, – 2018. – С. 116.
13. Карузина, Н. Е. Влияние мутаций на стадии разворачивания карбоксиангидразы Б: метод времён жизни собственной флуоресценции белка // Магистерская диссертация, СФУ, – 2019, – С. 47.
14. Финкельштейн А. В. Физика белка: Курс лекций: учебное пособие / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын – 3-е издание, испр. и доп. – М. : КДУ, – 2012. – С. 456, с цв. ил.
15. Немцева, Е. В. Сходство спектральных компонент с индивидуальным временем жизни для триптофановой флуоресценции белков разной сложности / Е. В. Немцева, О. О. Лащук, М. А. Герасимова // Биофизика. – 2016. – Т. 61. № 2. – С. 231–238.
16. Gryczynskia I. Conformation heterogeneity in proteins as an origin of heterogeneous fluorescence decays, illustrated by native and denatured ribonuclease T1 / I. Gryczynskia, M. Eftink b, J. Lakowicz // Biochimica et Biophysica Acta, – Vol. 954, – 1988, – P. 244-252.
17. Moors S. Tryptophan conformations associated with partial unfolding in ribonuclease T₁ / S. Moors, A. Jonckheer // Biophysical Journal, – 2009, – Vol. 97, – P. 1778-1786.
18. Solgi Z. Surface arginine saturation effect on unfolding reaction of firefly luciferase: A thermodynamic and kinetic perspective / Z. Solgi, K. Khalifeh, S. Hosseinkhani // Photochemistry and photobiology, – 2016, – P. 688–693.
19. Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. // New York, Springer Science, – 2006.

20. Protein Data Bank [сайт]: структура *Lampyrus turkestanicus* 4M46. – Режим доступа: <https://www.rcsb.org/>
21. Kulwinder F. Unfolding of acrylodan-labeled human serum albumin probed by steady-state and time-resolved fluorescence methods / J. D. Brennan, G. A. Baker, M. A. Doody, F. V. Bright // *Biophysical Journal*, Vol. 75, – 1998, – P. 1084–1096.
22. Albani J. R. Relation between human serum albumin structure and fluorescence decay parameters of tryptophan residue 214 / Jankeje, K., Amiri, M. // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, – 2017, – P. 1–19.
23. Van der Spoel D. GROMACS: fast, flexible, and free / van der Spoel D., Lindahl E., B. Hess B. // *Journal of Computational Chemistry*, – 2005, – Vol. 26, – P. 1701.
24. Valeur B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Second Edition / Bernard Valeur, Mário Nuno Berberan-Santos // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, – 2012.
25. Chen Y, Barkley MD. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins // *Biochemistry*, – 1998, – Vol. 37, – P. 9976-82.
26. González-Jiménez J. Urea-induced denaturation of human serum albumin labeled with acrylodan // *Journal of Protein Chemistry* 21, 2002, C 75–79.
27. Chao W. C. Probing water environment of Trp59 in ribonuclease T₁: insight of the structure–water network relationship / W. C. Chao, J. Y. Shen, J. S. Wang, H. C. Yang, K. Wee, P. T Chou // *The journal of physical chemistry B*, – 2015, – Vol. 119, – P. 2157-2167.
28. Mohan V. Region-Specific Double Denaturation of Human Serum Albumin: Combined Effects of Temperature and GnHCl on Structural and Dynamical Responses / Mohan V, Sengupta B, Acharyya A, Yadav R, Das N, Sen P. // *ACS Omega*, – 2018, – Vol. 3, – P. 10406-10417.
29. Lovell S-C The penultimate rotamer library / Word JM, Richardson JS, Richardson DC // *Proteins*, –2000, –Vol. 40, – P. 389-408.
30. Конев С. В Фотобиология. Изд. 2-е, перераб. и доп. / Конев С. В., Волоотовский И. Д. // Минск, – 1979.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
В.А. Кратасюк Кратасюк В.А.
«28» июня 20 21 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
03.03.02. Физика

Время-разрешенные характеристики флуоресценции одготриптофановых
белков различной структуры

Руководитель

Е.В. Немцева

доцент, к.ф.-м.н.,

Е.В. Немцева

подпись, дата
28.06.2021

Выпускник

Д.Д. Зыкова 28.06.2021

подпись, дата

Д.Д. Зыкова

Красноярск 2021