

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В.А. Кратасюк
«___» _____ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 Физика

Анализ стадий денатурации карбоксиангидразы Б
методом флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением

Руководитель _____ с. н. с., к.ф.-м.н. Е.В. Немцева

Выпускник _____ Н.Е. Карузина

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Анализ стадий денатурации карбоксиангидразы Б методом флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением» содержит 31 страницу текстового документа, 12 рисунков, 7 формул, 2 таблицы, 25 использованных источников.

КАРБОКСИАНГИДРАЗА Б; ТРИПТОФАНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ;
ВРЕМЯ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ; СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ,
АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВРЕМЕНЕМ ЖИЗНИ; РАВНОВЕСНАЯ
ДЕНАТУРАЦИЯ

Цель работы: анализ изменения времен жизни триптофановой флуоресценции карбоксиангидразы Б с двойной мутацией Ala53Cys/Ala76Cys в ходе равновесной денатурации мочевиной.

Экспериментальное определение стадий сворачивания/разворачивания белковых макромолекул является актуальной проблемой молекулярной биофизики, не имеющей универсального решения для всех белков. В данной работе предлагается метод определения стадий денатурации белка с помощью время-разрешенной спектроскопии.

В работе проанализированы спектры стационарной флуоресценции и спады интенсивности флуоресценции, разрешенные в наносекундной шкале, для карбоксиангидразы Б с двойной мутацией. Определены середины переходов между различными состояниями белка на основе стационарных и время-разрешенных характеристик. Показано, что изменение времен жизни триптофановой флуоресценции при равновесной денатурации может нести информацию о переходных стадиях денатурации карбоксиангидразы, в то время как стационарные спектры не отражают многостадийность процесса.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Структура и спектрально-люминесцентные характеристики карбоксиангидразы Б (обзор литературы)	6
1.1 Первичная, вторичная, третичная структура ВСА II и выполняемая функция	6
1.2 Пути сворачивания/разворачивания ВСА II.....	7
1.3 Собственная люминесценция белков.....	9
1.4 Методы определения времен жизни флуоресценции	12
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	18
3.1 Спектры флуоресценции ВСА II с мутацией A53C/A76C при денатурации.....	18
3.2 Времена жизни флуоресценции ВСА II с мутацией A53C/A76C при денатурации.....	19
3.3 Спектры флуоресценции, ассоциированные с временами жизни, для ВСА II с мутацией A53C/A76C при денатурации	21
3.4 Сравнение характеристик дикого типа ВСА и мутантов L139A, A53C/A76C	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	26
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	28
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	29

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальное определение стадий сворачивания/разворачивания белковых макромолекул является проблемой, до сих пор не нашедшей универсального решения для всех белков. Считается, что метод равновесной денатурации в большинстве случаев не дает информации о промежуточных состояниях белков, разворачивание которых проходит в несколько стадий. Более того, до сих пор открыт вопрос, являются ли промежуточные состояния одними и теми же при равновесной денатурации и кинетических измерениях [1]. Перспективными методами регистрации состояния белковой глобулы являются, с нашей точки зрения, методы флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением.

Измерение спектра собственной флуоресценции белков можно использовать для различных целей. Во-первых, так можно получить ценную структурную информацию о белках, хотя эта информация локальная, поскольку отражает структуру и свойства ближайшего окружения белковых хромофоров. Во-вторых, используя изменения белковой флуоресценции, индуцируемые различными эффекторами, можно делать заключения о характере структурных изменений, вызванных этими эффекторами. В-третьих, некоторые параметры флуоресценции могут быть использованы для определения различных физических и физико-химических характеристик белков [2].

Методы флуоресцентной спектроскопии белков отличаются высокой чувствительностью к изменению структуры макромолекул. Однако необходимо отметить, что собственная флуоресценция белка не обязана быть чувствительной к любому событию в белке. Могут быть ситуации, когда ароматические аминокислотные остатки, которые дают люминесцентную информацию, локализованы в областях, структура и подвижность которых не затрагиваются событиями в других областях белка.

По спектральным параметрам флуоресценции при стационарном возбуждении, как правило, анализируют денатурацию белков в равновесных

условиях. Для определения скоростей отдельных стадий разворачивания белков, проходящих сложный путь денатурации, флуоресцентный метод используют, как правило, «точечно» – регистрируют изменение интенсивности при фиксированной длине волны. Для одного белка переходы, определяемые равновесным и кинетическим методом, как правило, не совпадают. Метод равновесной денатурации обычно считается непригодным для наблюдения отдельных этапов многостадийного процесса. При этом, время-разрешенная флуоресценция представляется перспективным методом, способным предоставить дополнительную информацию о промежуточных состояниях макромолекул, даже без кинетических измерений.

Целью настоящей работы является анализ изменения времен жизни триптофановой флуоресценции карбоксиангидразы Б с двойной мутацией Ala53Cys/Ala76Cys в ходе равновесной денатурации мочевиной.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. определить изменения характеристик стационарной и время-разрешенной флуоресценции карбоксиангидразы Б вследствие введения двойной мутации;

2. получить времена жизни флуоресценции карбоксиангидразы Б с двойной мутацией на разных стадиях денатурации и проанализировать видимые переходы между промежуточными состояниями белка;

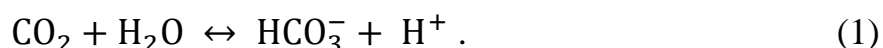
3. рассчитать спектральные компоненты, ассоциированные с временами жизни флуоресценции двойного мутанта карбоксиангидразы Б, на разных стадиях денатурации и проанализировать на их основании переходы между промежуточными состояниями белка.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №16-14-10115).

1 Структура и спектрально-люминесцентные характеристики карбоксиангидразы Б (обзор литературы)

1.1 Первичная, вторичная, третичная структура ВСА II и выполняемая функция

Карбоксиангидраза быка (ВСА II) – однодоменный белок с молекулярной массой 29 кДа, относится к цинксодержащим ферментам [3, 4]. ВСА II катализирует обратимую реакцию расщепления угольной кислоты до двуокиси углерода и воды:



Также карбоксиангидраза Б участвует в транспорте двуокиси углерода в организме.

Полипептидная цепь ВСА II состоит из 259-ти аминокислотных остатков.

Структура карбоангидразы быка была определена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.95 Å [5]. Установлено, что ВСА II имеет в структуре такой редкий элемент как C-концевой узел, аналогично наблюдаемому в карбоксиангидразе человека. Данный фермент содержит один ион цинка в активном центре, координированный с тремя гистидиновыми остатками и одной предполагаемой молекулой воды в тетраэдрической геометрии.

Активный центр ВСА II образует воронкообразный канал с внешним диаметром ~ 13 Å, который простирается от поверхности молекулы до центра, причем ион цинка расположен на дне канала на глубине ~ 10 Å от поверхности [5].

Вторичная структура ВСА II представлена четырьмя структурными элементами: две β-шпильки (41 – 84 и 187 – 212 а.о.), αβ-шпилька (151 – 184 а.о.) и β-лист, состоящий из трех β-стрендов (85 – 155 а.о.) (рис. 1). C-конец и N-конец цепи содержат неструктурированные участки 1 – 40 и 213 – 259 а.о. [6].

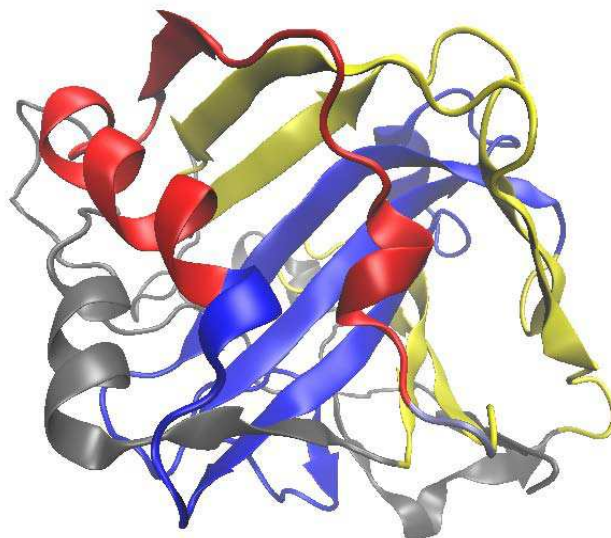


Рисунок 1 – Трехмерная структура карбоксиангидразы Б.

Разными цветами обозначены: β -шпилька (желтый), $\alpha\beta$ -шпилька (красный), β -лист (синий), неструктурированные участки (серый)

1.2 Пути сворачивания/разворачивания ВСА II

Кинетика рефолдинга карбоксиангидразы быка изучалась различными методами в широком временном диапазоне (от миллисекунд до часов) [7, 8].

Было показано, что рефолдинг ВСА II протекает в три этапа [7]. На первом этапе ($t_{1/2} \sim 0.03$ с) образуются гидрофобные кластеры и компактное состояние цепи. На втором этапе ($t_{1/2} \sim 140$ с) гидрофобные кластеры десольватируются и образуется жесткое гидрофобное ядро, как в нативном состоянии. На третьем этапе ($t_{1/2} \sim 600$ с) образуется активный нативный белок.

Первая стадия с $t_{1/2} \sim 0.03-0.04$ с связана с компактизацией белковой цепи, что было установлено по увеличению переноса энергии от триптофановых остатков на дансильные метки и увеличению иммобилизации спин-метки на белковой матрице. Вероятно, эти процессы отражают глобальные (а не локальные) изменения структуры белка так как:

- метки реагируют с многочисленными аминокислотными группами белка;
- степень маркировки была три метки на молекулу белка;

- карбоксиангидраза быка имеет семь триптофановых остатков, равномерно распределенных вдоль цепи.

Увеличение сродства к гидрофобному зонду, которое происходит одновременно с процессом компактизации, указывает на то, что на той же стадии образуются гидрофобные кластеры. Исследования методом кругового дихроизма (CD) при ручном перемешивании показали, что вторичная структура карбоангидразы восстанавливается менее чем за 100 секунд. Образование гидрофобных кластеров и компактного состояния на первой стадии рефолдинга (а также отсутствие других стадий в период до 100 с) предполагает наличие вторичной структуры уже в первом кинетическом промежутке. Вторым этапом с $t_{1/2} \sim 140 \pm 20$ с на три порядка медленнее первого. Он характеризуется десольвацией гидрофобных кластеров (десорбцией ранее связанного флуоресцентного зонда 1,8-ANS) и образованием жесткого гидрофобного ядра нативного типа. Результаты исследования методами ЯМР показали, что белок приобретает свою специфическую укладку на втором этапе. Время этого этапа близко к времени изомеризации цис-транс-пролина, и поэтому эта стадия может быть зависимой от пролина. Третий этап с $t_{1/2} \sim 600 \pm 100$ с характеризуется восстановлением ферментативной активности. Этот процесс слишком длинный, чтобы быть напрямую связанным с изомеризацией пролина. По мере формирования вторичной структуры и гидрофобного ядра нативного типа также на этом этапе приобретают свои нативные структуры петли и другие нерегулярные участки цепи, а поверхностные боковые группы становятся фиксированными [8].

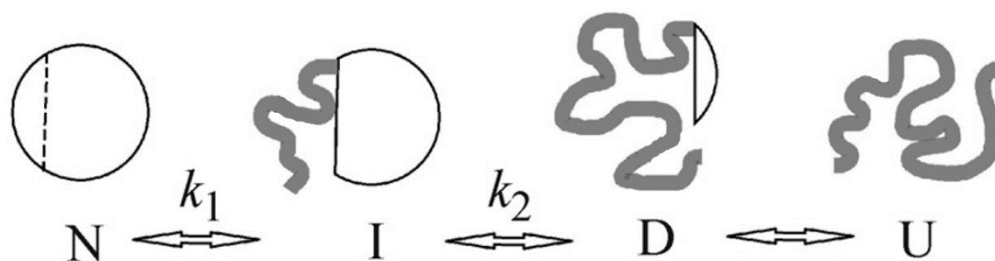


Рисунок 2 – Схематичное изображение последовательности состояний при разворачивании карбоксиангидразы Б, где N – нативное состояние белка, I, D – промежуточные состояния белка, U – денатурированное состояние [9]

С помощью введения направленных мутаций в полипептидную цепь ВСА II была исследована последовательность денатурации и ренатурации отдельных элементов структуры этого белка. Было получено, что N- и C-концевые участки полипептидной цепи данного белка разворачиваются первыми, а в районе аминокислот 86–124 и 188–211 разворачиваются самыми последними, а разворачивание структурных элементов в районе аминокислот 53–76 и 154–181 проходит как на первой, так и на вторую стадии разворачивания [9].

1.3 Собственная люминесценция белков

Излучение фотонов при переходе молекул из электронно-возбужденных в основное состояние называют люминесценцией. Различают два вида люминесценции – **флуоресценцию**, возникающую в результате излучательных переходов между возбужденными состояниями одинаковой мультиплетности, и **фосфоресценцию**, которая вызывается радиационными переходами между триплетными и синглетными уровнями [2].

Главными люминесцирующими группами в белках являются ароматические аминокислотные остатки триптофана, тирозина и фенилаланина (рис. 3).

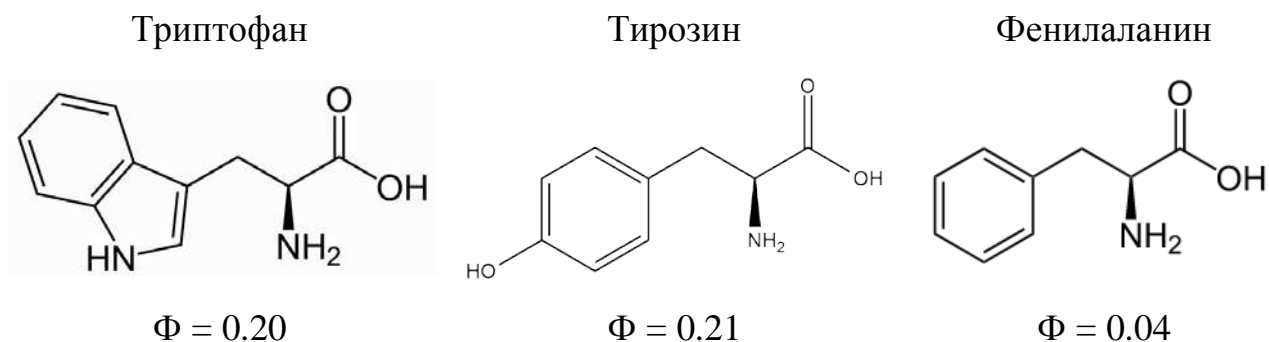


Рисунок 3 – Химическая структура ароматических аминокислотных остатков в составе белков и соответствующие квантовые выходы люминесценции в растворе (Φ) [10, 11, 12]

При возбуждении белков излучением с длиной волны от 295 до 305 нм флуоресцируют преимущественно остатки триптофана, так как спектры поглощения тирозина и фенилаланина лежат в более коротковолновой области [13]. Остатки триптофана в отличие от тирозина и фенилаланина чувствительны к окружающей среде, основной причиной этого являются существенное перераспределения электронной плотности в ассиметричном индольном кольце после перехода молекулы в возбужденное состояние [14]. Именно поэтому в подавляющем большинстве исследований собственной люминесценции белков речь идет как раз о спектральных характеристиках триптофановых остатков в составе этих макромолекул.

Всестороннее изучение формы спектров стационарной флуоресценции многочисленных белков, обладающих различной структурой, позволило проклассифицировать возможные состояния триптофановых остатков в белковой глобуле. Модель дискретных состояний остатков триптофана в белках, сформулированная Бурштейном с соавторами [15], утверждает, что существует минимум пять наиболее вероятных спектральных форм остатков триптофана. Характеристики спектральных классов триптофановых остатков приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Спектральные классы триптофановых остатков в составе белков [14]

Класс	Длина волны спектрального максимума (нм)	Доступность растворителю, у.е.	Плотность упаковки, у.е.
A	308	1.9	138.3
S	321-325	0.81.4	148.3±8.5
I	330-333	6.0±3.6	129.3±9.1
II	341-344	14.8±7.5	109.3±12.6
III	346-350	55.3±15.9	62.7±18.8

Класс А – триптофановые остатки находятся глубоко внутри белковой молекулы в нейтральном гидрофобном окружении, не образуют эксиплексы с растворителем или соседними группами белка.

Класс S представляет собой остатки триптофана, находящиеся внутри молекулы белка в более подвижной и полярной среде, чем класс А. В возбужденном состоянии может быть образован эксиплекс 1:1 с ближайшей полярной белковой группой.

Класс I – триптофановые остатки находятся внутри белковой молекулы, образуя эксиплекс 2:1 с ближайшими полярными группами белка.

Триптофановые остатки класса II и III локализованы на поверхности белка. Класс II контактирует с молекулами связанной воды, подвижность которых по сравнению с подвижностью молекул свободной воды низка. Очень многие белки содержат триптофановые остатки спектрального класса II. Остатки триптофана класса III контактируют с молекулами свободно релаксирующей воды. Спектр триптофановых остатков класса III почти совпадает со спектром излучения свободного триптофана в воде. Остатки триптофана спектрального класса III наиболее часто встречаются в развернутых белках и лишь иногда – в нативных. Благодаря локализации на поверхности белка, триптофановые остатки классов II и III легко доступны растворителю, ионам и молекулам внешних тушителей. В то же время, остатки триптофана

классов А, S и I локализованы внутри белковой структуры и плохо доступны воде, ионам и молекулам внешних тушителей [2, 14, 16].

Спектральные свойства карбоксиангидразы быка определяются семью триптофановыми остатками в положениях 4, 15, 96, 122, 190, 207 и 243. Триптофановые остатки в положениях 15, 96 и 207 относятся к спектральному классу S, в положениях 4 и 243 – могут быть отнесены как к классу I, так и к классу II, Trp122 – между I и S классами [17].

Времена жизни триптофановой флуоресценции белков находятся обычно в наносекундной области. При изучении индийскими учеными одготриптофановых белков в денатурированном и нативном состояниях было определено, что большинство из белков демонстрирует бимодальное или тримодальное распределение времен затухания. Множественные компоненты затухания авторы связывают с существованием различных ротомеров индольной группы в белках даже в состоянии случайного клубка [18].

1.4 Методы определения времен жизни флуоресценции

Существует два основных экспериментальных метода регистрации времени жизни флуоресценции: импульсный и фазово-модуляционный (или гармонический).

Фазово-модуляционный метод подразумевает возбуждение флуорофора светом, интенсивность которого модулирована по синусоидальному закону. Испускание – это вынужденный отклик на возбуждение, и поэтому испускание модулировано с той же круговой частотой. Из-за конечной величины времени жизни возбужденного состояния модулированное испускание отстает по фазе на угол ϕ относительно возбуждения. Далее испускание менее модулировано (демодулировано) по сравнению с возбуждением, т.е. относительная амплитуда переменной части испускания меньше для испускания, чем для возбуждения. Как фазовый угол, так и коэффициент демодуляции измеряют и используют для расчета модуляционного и фазового времени.

При измерении времени затухания флуоресценции **импульсным** методом флуорофор возбуждают бесконечно коротким импульсом света, что приводит к первоначальной заселенности возбужденного состояния флуорофора (N_0).

Скорость дезактивации первоначально возбужденных молекул равна

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\gamma + \kappa)N(t), \quad (2)$$

где $N(t)$ – число возбужденных молекул спустя время t после возбуждения;

γ – скорость испускания;

κ – константа скорости безызлучательного распада.

Подставляя начальное условие $N(t) = N_0$ при $t = 0$ и интегрируя уравнение (2), получаем

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau}, \quad (3)$$

где $\tau = (\gamma + \kappa)^{-1}$ – время жизни возбужденного состояния.

Следовательно, интенсивность флуоресценции $F(t)$, которая пропорциональна заселенности возбужденного состояния, затухает экспоненциально (рис. 4А).

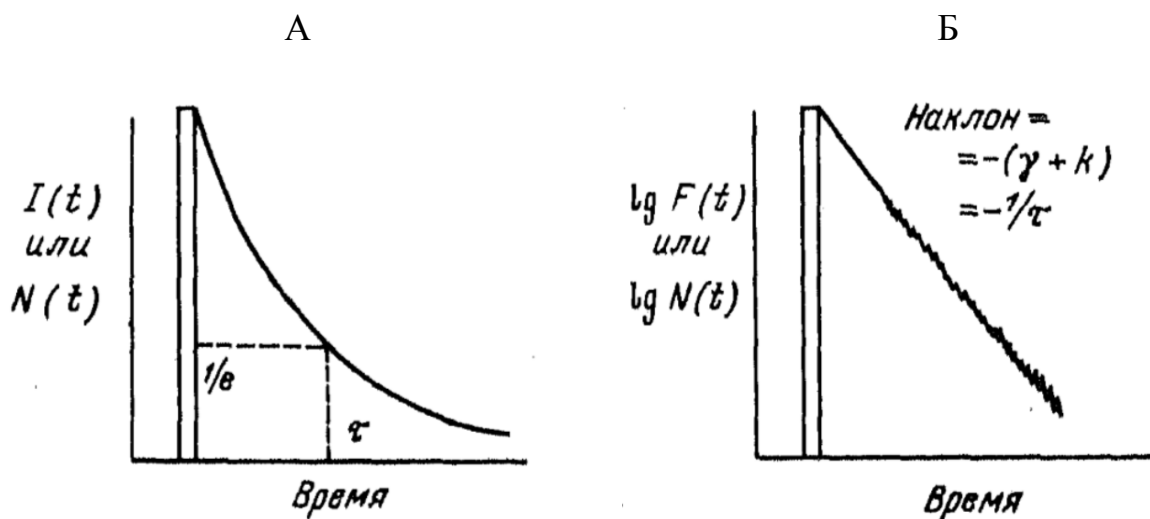


Рисунок 4 – Графическое изображение зависимостей в импульсных методах измерения времен жизни: А – экспоненциальное затухание заселенности возбужденного состояния,

Б – наклон зависимости $\lg F(t)$ от t [19]

Время затухания флуоресценции обычно приравнивают к времени, необходимому для уменьшения интенсивности в e раз по отношению к первоначальной величине, и оно равно $(\gamma + \kappa)^{-1}$. Иначе говоря, время жизни можно определить из наклона зависимости $\lg F(t)$ от t (рис. 4Б). Время жизни можно также рассматривать как средний промежуток времени, в течение которого молекула находится в возбужденном состоянии.

При измерении времен затухания флуоресценции импульсным методом необходимо количественно измерять затухания интенсивности флуоресценции с временным разрешением. Такие измерения трудны по нескольким причинам. Во-первых, возникают трудности, вызванные конечной длительностью импульса, но они могут быть сведены к минимуму при использовании пикосекундных импульсных лазеров.

Во-вторых, возникает сложность при измерении полной кинетики затухания при использовании только одного возбуждающего импульса. Чтобы обойти эту трудность, образец обычно возбуждают повторяющимися импульсами. При этом время между импульсами должно быть примерно в пять раз больше времени затухания для того, чтобы сигналы флуоресценции от двух последовательных импульсов не накладывались. При периодически повторяющихся импульсах затухание флуоресценции регистрируют либо стробоскопическим методом, либо методом счета фотонов [19, 20].

Стробоскопический метод представляет собой периодическое включение фотоумножителя на короткое время в течение затухания флуоресценции. Использование такого пульсирующего напряжения увеличивает коэффициент усиления ФЭУ на короткий период времени, когда происходит затухание флуоресценции, обычно 0.2 – 1 нс. Постепенное смещение времени подачи этого анализирующего импульса устроено так, что после каждого последовательного импульса регистрируются различные участки кривой затухания. При постоянной интенсивности, а также формы возбуждающего импульса можно получить полную кривую затухания флуоресценции во времени, если число стробирующих импульсов большое и каждый из них

регистрируется через разные промежутки времени после возбуждения.

Наиболее популярным методом, обеспечивающим временное разрешение, является счет фотонов. При использовании метода счета фотонов образец также возбуждают световым импульсом. Регистрирующая система измеряет время между этим импульсом и приходом первого фотона. Подбирается низкая скорость счета фотонов, например, чтобы на каждые 20 импульсов наблюдался лишь один фотон. Такая низкая скорость нужна для уверенности в том, что на каждый импульс, для которого фотон подсчитывают, приходится только один фотон. Если число фотонов на импульс больше, закон затухания искусственно сдвигается в сторону более коротких времен, потому что подсчитывается лишь первый из пришедших фотонов. [19, 21]

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован лиофилизированный препарат белка карбоксиангидразы быка с мутацией Ala53Cys/Ala76Cys (BCA_{53/76}), предоставленный Институтом белка РАН (Пушино). Растворы белка исследовали в Tris-HCl буфере (20 мМ, рН 8.2) производства Fluka. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически с использованием соотношения $D_{280} = 1.83$ для концентрации белка 1 мг/мл.

Равновесную денатурацию проводили инкубированием BCA_{53/76} (концентрация 0.17-0.18 мг/мл) в растворе мочевины определенной концентрации в течение не менее 20 часов при комнатной температуре.

Для измерения спектров поглощения был использован спектрофотометр Cary 5000 (Agilent Technologies, Australia). Для регистрации флуоресценции белка при стационарном и импульсном возбуждении использовали спектрофлуориметр Fluorolog-3 (Horiba, Jobin Yvon, Франция), оснащенный модулем для измерения спада интенсивности флуоресценции методом счета фотонов с временной корреляцией. Спектры флуоресценции регистрировали при стационарном возбуждении ксеноновой лампой (длина волны 295 нм). Разрешенные во времени спады флуоресценции регистрировали при возбуждении импульсным диодом NanoLED с максимумом длины волны излучения 296 нм и длительностью импульса 1.2 нс. Спады интенсивности флуоресценции снимали в диапазоне 305 – 417 нм с шагом 4 нм, разрешение составляло 27 пс/канал. Времена жизни выделяли с помощью метода деконволюции [22], для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококоллоидное соединение Ludox. В эксперименте использовали кварцевые кюветы сечением 10x10 мм, измерения проводили при фиксированной температуре 20°C.

Спектры флуоресценции были откорректированы с учетом эффекта внутреннего фильтра и фона растворителя. Наборы кривых спада

флуоресценции каждого образца при регистрации в диапазоне 305 – 417 нм были проанализированы методами глобального анализа [23].

Спад интенсивности флуоресценции во времени был описан, как сумма экспонент:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (4)$$

где τ_i – время жизни;

α_i – амплитудный коэффициент i -ой компоненты.

Вклад каждой временной компоненты в общее время жизни определяли с помощью следующего выражения:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i}. \quad (5)$$

Спектры, ассоциированные с конкретным временем жизни флуоресценции, рассчитывали по следующей формуле

$$I(\lambda, \tau_i) = I_{ss}(\lambda) f_i(\lambda), \quad (6)$$

где $I_{ss}(\lambda)$ – стационарный спектр флуоресценции;

$f_i(\lambda)$ – вклад i -ой компоненты времени жизни на длине волны λ [24].

Изменение формы и положения спектра стационарной флуоресценции белка анализировали по значению центра тяжести, вычисленного по формуле:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_i \lambda_i \cdot I_i}{\sum_i I_i}, \quad (7)$$

где I_i - интенсивность флуоресценции при длине волны λ_i .

S-образные кривые перехода белка в денатурированное состояние описывали с помощью программы Origin 7.0 (OriginLab), используя функцию Больцмана.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Спектры флуоресценции ВСА II с мутацией A53C/A76C при денатурации

Были получены спектры поглощения и флуоресценции ВСА_{53/76} после инкубации в присутствии мочевины 1 – 8.5 М.

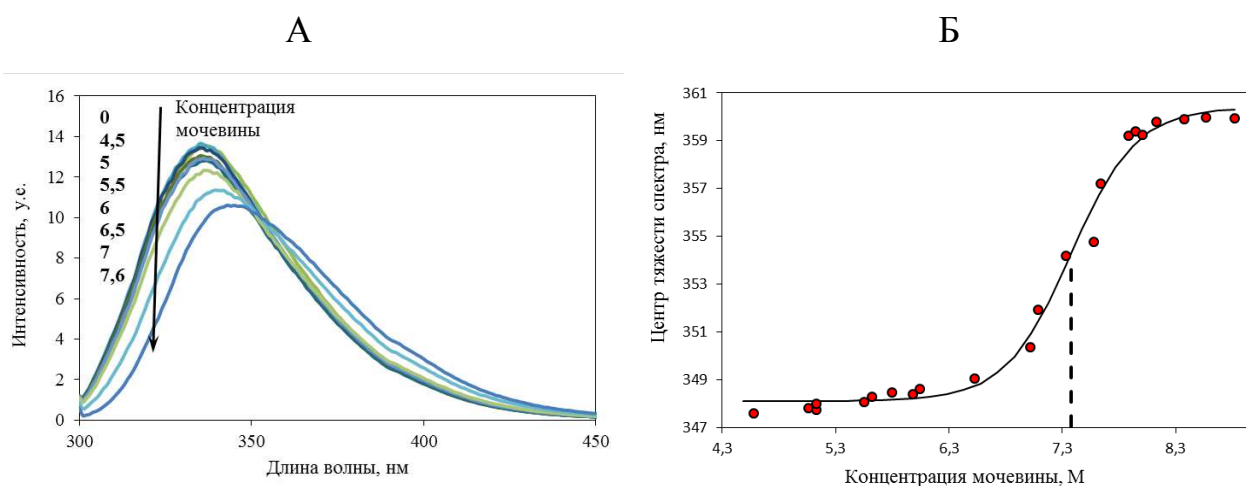


Рисунок 5 – Изменение формы спектра стационарной флуоресценции ВСА_{53/76} (А), и центра тяжести спектра (Б) в присутствии мочевины 1 – 8.5 М. Пунктирной линией указана середина перехода

Установлено, что с увеличением концентрации денатурирующего агента снижается интенсивность флуоресценции белка и наблюдается батохромный сдвиг максимума испускания (рис. 5А), что приводит к постепенному сдвигу центра тяжести спектра с 348 до 360 нм (рис. 5Б).

Согласно кривой перехода, построенной по изменению спектра флуоресценции при стационарном возбуждении, карбоксиангидраза Б денатурирует по принципу «все-или-ничего» (рис. 5Б), то есть, нет промежуточных состояний белка кроме нативного и денатурированного. Описание сигмоидной кривой даёт значение середины перехода 7.38 ± 0.04 М (рис. 5Б).

3.2 Времена жизни флуоресценции ВСА II с мутацией A53C/A76C при денатурации

Для получения дополнительной информации о стадиях денатурации были зарегистрированы спады интенсивности флуоресценции ВСА_{53/76} при наносекундном возбуждении в растворах с разной концентрацией мочевины. Примеры спадов флуоресценции белка в нативном и денатурированном состоянии приведены на рисунке 6.

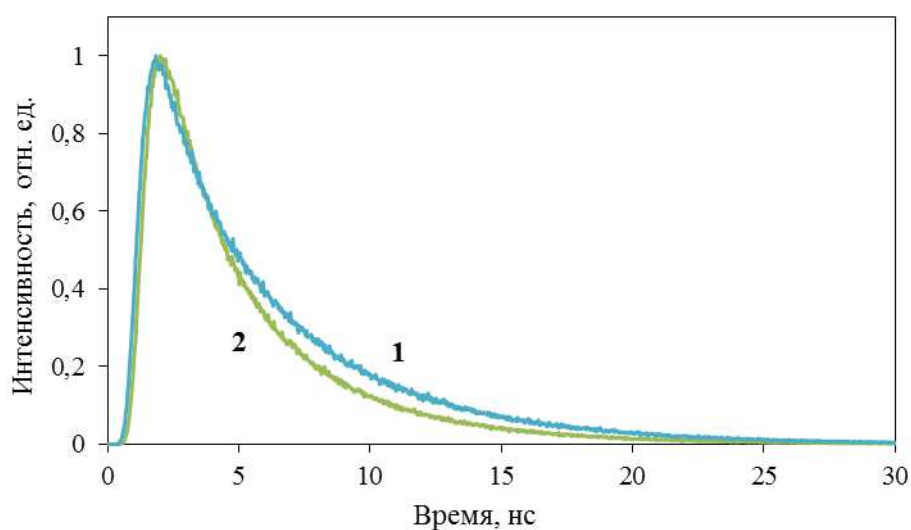


Рисунок 6 – Спады интенсивности флуоресценции при 350 нм для ВСА_{53/76} при импульсном возбуждении в буфере (1) и растворе мочевины 8.3 М (2)

На рисунке 6 можно видеть, что в денатурированном состоянии спад интенсивности флуоресценции ускоряется, и это означает, что денатурированное состояние белка характеризуется более коротким средним временем жизни флуоресценции.

На основе спадов были рассчитаны времена жизни триптофановой флуоресценции ВСА_{53/76}. Обработка набора из 29-ти спадов методом глобального анализа показала, что флуоресценция ВСА_{53/76} характеризуется тремя временами жизни: $\tau_1 = 5 - 5.4$ нс, $\tau_2 = 1.2 - 2$ нс и $\tau_3 \approx 0.2$ нс, но разрешающая способность установки позволяет нам анализировать только

первые два из них. Вариация τ_1 , τ_2 при денатурации белка показана на рисунке 7.

[изъят 1 рисунок]

Рисунок 7 – Вариация времен жизни τ_1 (А), τ_2 (Б) при денатурации.
Пунктирной линией указана середина перехода

По рисунку 7 видно, что по изменению значения времен жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 также можно построить кривые перехода. Середина перехода, вычисленная для τ_1 , составила 5.64 ± 0.26 М мочевины (рис. 7А). Изменение времени жизни флуоресценции τ_2 проявляет середину перехода при 6.81 ± 0.09 М мочевины (рис. 7Б). Получено, что середины переходов, рассчитанные по стационарной флуоресценции, отличаются от значений, рассчитанных по временам жизни (сравни рис. 5Б и 7). Аналогичные результаты были получены ранее для дикого типа карбоксиангидразы (BCA_{WT}) и мутанта L139A (BCA₁₃₉) [25].

Из кинетических измерений известно, что денатурация BCA_{WT} проходит через как минимум два промежуточных состояния (рис. 2) [9], что не отражается на кривых перехода, получаемых по стационарным характеристикам разными экспериментальными методами (спектр флуоресценции, круговой дихроизм и др.). Согласно нашим данным, по изменению времен жизни τ_1 и τ_2 возможно определить два дополнительных перехода, отличающихся от полученных по спектрам стационарной флуоресценции.

3.3 Спектры флуоресценции, ассоциированные с временами жизни, для ВСА II с мутацией A53C/A76C при денатурации

Глобальный анализ кривых затухания при разных длинах волн испускания в диапазоне 305 – 417 нм позволил не только рассчитать времена жизни флуоресценции, но и получить индивидуальные спектры испускания, характеризующиеся определенным временем жизни (decay associated spectra – DAS).

Анализ DAS показал, что в нативном состоянии наибольший вклад в суммарный спектр флуоресценции вносит компонента с большим временем жизни (τ_1) – 76% (рис. 8А). При денатурации происходит перераспределение вкладов таким образом, что вклады временных компонент τ_1 и τ_2 в суммарный спектр принимают значения 60% и 37% соответственно (рис. 8Б). Вклад короткоживущей компоненты ($\tau_3 \approx 0.2$ нс) в суммарный спектр флуоресценции мал как для нативного, так и денатурированного белка ($\leq 7\%$) (рис. 8).

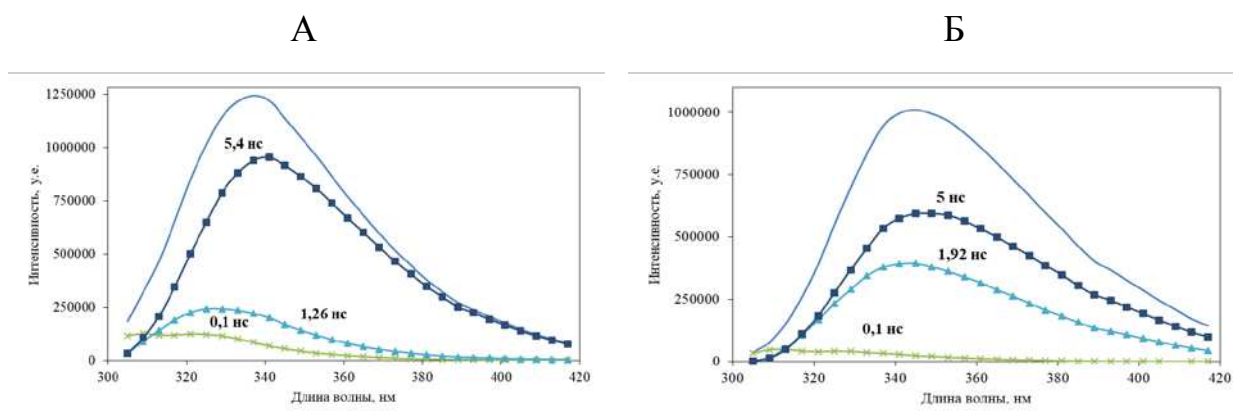


Рисунок 8 – Спектры, ассоциированные со временем жизни, для ВСА_{53/76} в нативном (А) и денатурированном (Б) состоянии. Сплошная линия – стационарный спектр, маркированные линии – спектры, ассоциированные с указанным временем жизни

Установлено, что при денатурации наблюдается батохромный сдвиг максимума DAS как для τ_1 , так и для τ_2 (рис. 9). Сдвиги составляют 8 и 16 нм

соответственно. Вслед за изменением значения времени жизни изменяется интенсивность DAS и, соответственно, его вклад в суммарный спектр (рис. 9).

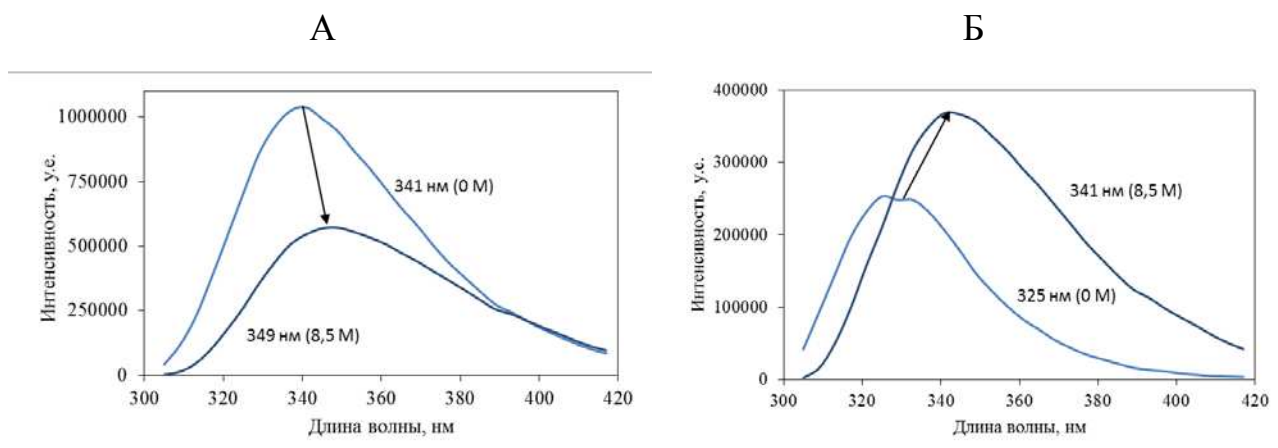


Рисунок 9 – Изменение положения и интенсивности спектров, ассоциированных с временем τ_1 (А) и τ_2 (Б)

Изменение формы и положения каждого DAS также можно охарактеризовать сдвигом центра тяжести спектра. Кривые перехода, построенные по изменению центра тяжести DAS для τ_1 и τ_2 , а также соответствующие середины перехода, отражены на рисунке 10.

[изъят 1 рисунок]

Рисунок 10 – Изменение центра тяжести спектров, ассоциированных с временем жизни флуоресценции, для τ_1 (А) и τ_2 (Б). Пунктирной линией указана середина перехода

[изъята 1 страница]

наблюдается более быстрый спад интенсивности (рис. 11А). При этом в денатурированном состоянии спады совпадают (рис. 11Б).

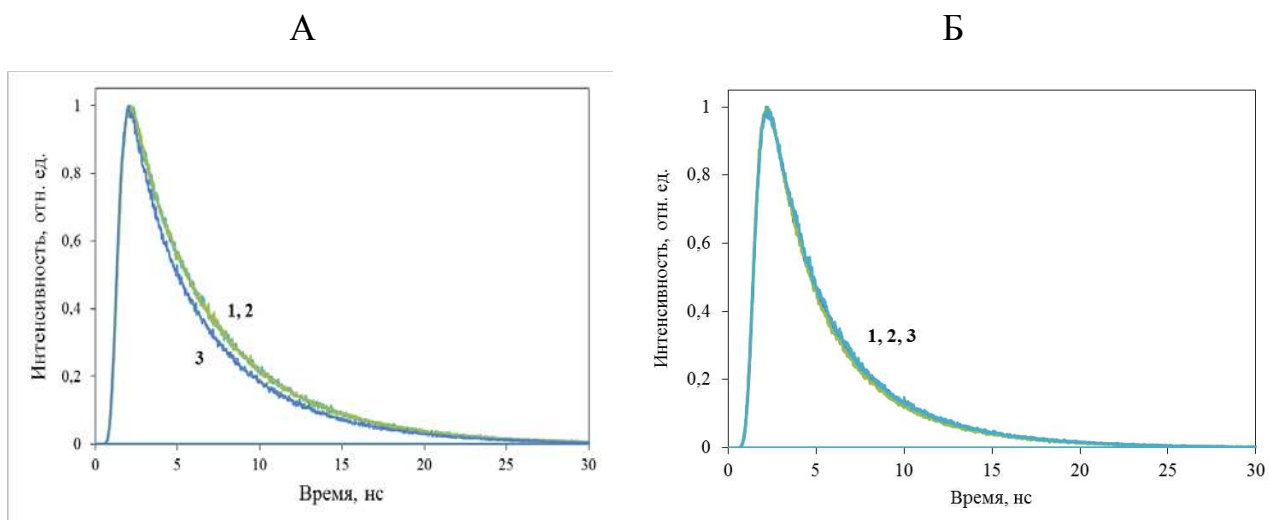


Рисунок 11 – Нормированные спады флуоресценции при 350 нм ВСА дикого типа (1) и мутантов L139A (2), A53C/A76C (3) в нативном (А) и денатурированном состоянии (Б)

Сравнение кривых перехода, построенных по спектрам флуоресценции при стационарном возбуждении, говорит о том, что три белка существенно различаются по стабильности при химической денатурации мочевиной (рис. 12).

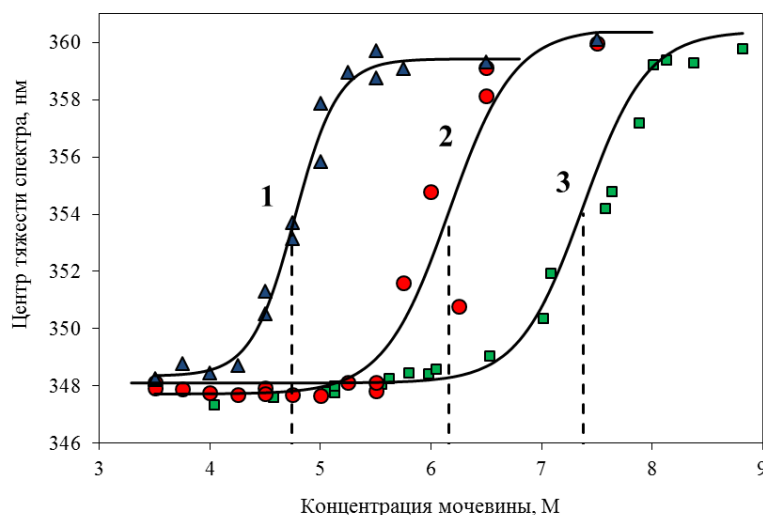


Рисунок 12 – Центр тяжести спектра флуоресценции для ВСА дикого типа (1) и мутантов L139A (2), A53C/A76C (3) при денатурации мочевиной. Пунктирной линией указана середина перехода

Поскольку середина перехода у мутантов ВСА₁₃₉ и ВСА_{53/76} сдвинуты по сравнению с диким типом на (– 1.41) и (+1.22) М, соответственно (рис. 12, таб. 2), то можно сделать вывод, что двойная мутация с введением дисульфидного мостика делает карбоксиангидразу Б более стабильной, в то время как одиночная мутация дестабилизирует ее.

Таблица 2 – Середина перехода для ВСА дикого типа и мутантов L139A, A53C/A76C при денатурации мочевиной

Белок	Середина перехода при денатурации мочевиной, определенная по разным параметрам, М		
	по $\langle \lambda \rangle$	по τ_1	по τ_2
ВСА _{53/76}	[данные изъяты]		
ВСА ₁₃₉			
ВСА _{WT}			

Интересно, что аналогично двум другим белкам, переходы, определенные по временам жизни флуоресценции ВСА_{53/76}, не совпадают с переходом по центру тяжести стационарного спектра (таб. 2). Но в отличие от дикого типа и одиночного мутанта, для ВСА_{53/76} оба перехода по временам жизни (τ_1 и τ_2) происходят раньше (при меньшей концентрации мочевины), чем переход по центру тяжести стационарного спектра.

Кроме того, сопоставление с имеющимися результатами кинетических измерений [9], которые, как считается, наиболее точно отражают стадийность процессов сворачивания/разворачивания белка, показывает хорошее соответствие найденных по τ_1 и τ_2 переходов с промежуточными стадиями денатурации карбоксиангидразы (рис. 2). Это соответствие было получено как для дикого типа ВСА II, так и для обоих мутантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продланное исследование направлено на поиск новых информативных параметров, позволяющих экспериментально наблюдать многостадийное сворачивание/разворачивание белковых макромолекул. Была исследована возможность использования в качестве таких новых параметров время-разрешенных характеристик собственной флуоресценции белка, таких как времена жизни флуоресценции и спектры, с ними ассоциированные.

Были изучены время-разрешенные характеристики карбоксангидразы быка с двойной мутацией Ala53Cys/Ala76Cys в условиях равновесной денатурации, а также определены времена жизни флуоресценции и проанализировано их изменение в зависимости от концентрации в растворе денатурирующего агента (мочевины).

На основании полученных в работе результатов были сделаны следующие выводы:

1. Двойная мутация с введением дисульфидного мостика на β -шпильке карбоксангидразы не изменяет характеристики стационарной флуоресценции белка, но укорачивает среднее время жизни флуоресценции.

2. В ходе равновесной денатурации мочевиной наблюдается:

- уменьшение времени жизни флуоресценции τ_1 (5.4 нс), по изменению которого определяется переход с серединой при 5.64 ± 0.26 М;
- увеличение времени жизни флуоресценции τ_2 (1.26 нс), по изменению которого определяется переход с серединой при 6.81 ± 0.09 М.

3. Переходы, определяемые по изменению времен жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 , для карбоксангидразы с двойной мутацией Ala53Cys/Ala76Cys соответствуют характеристикам промежуточных стадий денатурации данного белка, полученным ранее кинетическими методами.

4. Сдвиги спектров, ассоциированных со временами жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 , не несут дополнительной информации по сравнению со

стационарными спектрами флуоресценции, поскольку середины переходов, получаемых по данным параметрам, совпадают.

В целом, результаты данного исследования подтверждают, что пути сворачивания/разворачивания белков в ходе кинетических измерений и при равновесной денатурации могут быть одни и те же, то есть проходить через одинаковый набор промежуточных состояний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BCA II – карбоксиангидраза Б

BCA_{53/76} – карбоксиангидраза Б с мутацией Ala53Cys/Ala76Cys

BCA₁₃₉ – карбоксиангидраза Б с мутацией Leu53Ala

BCA_{WT} – дикий тип карбоксиангидразы Б

DAS – спектры испускания, характеризующиеся определенным временем жизни, (decay associated spectra)

$\langle\lambda\rangle$ – центр тяжести спектра, нм

τ – время жизни флуоресценции, нс

Φ – квантовый выход флуоресценции

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Финкельштейн, А. В. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын – 3-е изд., испр. и доп. - М. : КДУ, 2012. – 456 с.
2. Пермяков, Е.А. Метод собственной люминесценции белка / Е.А. Пермяков. - М.: Наука, 2003. - 189 с.
3. Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase / Lindskog, S // *Pharmacol. Ther.* - 1997. – V. 74, №1. – С. 1 – 20.
4. Bijari, N. Spectroscopic and molecular modeling studies on binding of dorzolamide to bovine and human carbonic anhydrase II / N. Bijaria, S. Ghobadia, H. Mahdiunia, R. Khodarahmib, S. A. Ghadami // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2015. - №80. – С.189 – 199.
5. Saito, R. Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å / R. Saito, T. Sato, A. Ikai, N. Tanaka // *Acta Crystallographica.* – 2004. - № D60. – С. 792 – 795.
6. Protein Data Bank [сайт] : структура карбоксиангидразы B 1v9e. – Режим доступа: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
7. McCoy, L. F., Jr. Multiparameter kinetic study on the unfolding and refolding of bovine carbonic anhydrase B / L. F. McCoy, Jr., E. S. Rowe, K.-P. Wong // *Biochemistry.* – 1980. - №19. – С. 4738 – 4743.
8. Semisotnov, G. V. Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B / G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, V. P. Kutysenko, B. Ebert, J. Blanck, O. B. Ptitsyn // *FEBS.* – 1987. – V. 224, №1. – С. 9 – 13.
9. Мельник, Б.С. Подход, позволяющий определить последовательность разрушения структурных элементов белка при его разворачивании. Исследование карбоксиангидразы Б. / Б.С. Мельник, Г.С. Нагибина, А.С. Глухов, Т.Н. Мельник // *Биофизика.* – 2016. – Т. 61, №6. – С. 1098 – 1108.
10. Баренбойм, Г. М. Люминесценция биополимеров и клеток / Г.М. Баренбойм, А.Н. Доманский, К.К. Туроверов; Отв. ред. М.В. Волькенштейн; АН СССР. Ин-т цитологии. - М.-Л. : Наука, 1966. - 232 с.

11. Владимиров, Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков / Ю.А. Владимиров - М.: Наука, 1965. – 232 с.
12. Teale, F. W. J. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids / F. W. J. Teale, G. Weber // *Bioch.* – 1957. – V. 65. – С. 476 – 482.
13. Бенсассон, Р. Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз: применение в биохимии и медицинской химии / Р. Бенсассон, Э. Лэнд, Т. Траскот – пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 98 с.
14. PFAST: Protein Fluorescence and Structure Toolkit [электронный ресурс] : база данных о свойствах флуоресценции белка. – Режим доступа: <http://pfast.phys.uri.edu>.
15. Burstein, E. A. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules / E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, M. N. Ivkova // *Photochemistry and Photobiology.* – 1973. – V. 18. – С. 263 – 279.
16. Демченко, А. П. Люминесценция и динамика структуры белков / А. П. Демченко – Киев : Наук. думка, 1988. – 280 с.
17. Nemtseva, E. Fluorescence lifetime components reveal kinetic intermediate states upon equilibrium denaturation of carbonic anhydrase II / E. Nemtseva, O. Lashchuk, M. Gerasimova, T. Melnik, G. Nagibina, B. Melnik // submitted to *Methods and Applications in Fluorescence*.
18. Swaminathan, R. Similarity of fluorescence lifetime distributions for single tryptophan proteins in the random coil state / R. Swaminathan, G. Krishnamoorthy, N. Periasamy // *Biophysical Journal.* – 1994. – V. 67. – С. 2013 – 2023.
19. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович – пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
20. Тучин, В. В. Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / В.В. Тучин – пер. с англ. Под редакцией В.В. Тучина. - М: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 368 с.
21. Millar, D. P. Time-resolved fluorescence spectroscopy / D. P. Millar // *Current Opinion in Structural Biology.* - 1996. - №6. – С. 637 – 342.

22. Ameloot M. Extension of the performance of Laplace deconvolution in the analysis of fluorescence decay curves / M. Ameloot, H. Hendrickx // *Biophys. J.* – 1983. - № 44 (1). - С. 27 - 34.
23. Knutson, J. R. Simultaneous analysis of multiple fluorescence decay curves: A global approach / J. R. Knutson, J. M. Beechem, L. Brand // *Chem. Phys. Lett.* – 1983. - № 102 (6). – С. 501 – 507.
24. 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.
25. Лащук О.О., Герасимова М.А., Мельник Б.С., Немцева Е.В. Временные компоненты спектра собственной флуоресценции карбоксиангидразы Б на разных стадиях денатурации. Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. – АСТА NATURAE | спецвыпуск, Том 2 –2016.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В.А. Кратасюк

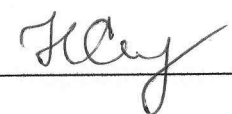
«20» июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 Физика

Анализ стадий денатурации карбоксиангидразы Б
методом флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением

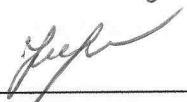
Руководитель



с. н. с., к.ф.-м.н.

Е.В. Немцева

Выпускник



Н.Е. Карузина

Красноярск 2017