

Выявление вклада отдельных триптофановых остатков во флуоресценцию карбоксиангидразы В быка

Научный руководитель – Немцева Елена Владимировна

Карузина Наталья Евгеньевна

Аспирант

Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Кафедра биофизики, Красноярск, Россия

E-mail: karuzina1994@gmail.com

Собственная флуоресценция белков, обусловленная возбуждением триптофановых остатков, является чувствительным индикатором внутренних перестроек структуры этих макромолекул. Понимание причины, определяющей изменение разных компонент времени жизни флуоресценции белка на различных стадиях его разворачивания, невозможно без выявления роли отдельных триптофановых остатков в формировании спектральных и динамических характеристик флуоресценции белка.

Цель исследования - определить вклад отдельных триптофановых остатков карбоксиангидразы быка в флуоресцентные характеристики белка на разных стадиях денатурации мочевиной.

В работе использовали: лиофилизированные препараты белка карбоксиангидразы быка (BCA II) (Институт белка РАН, г. Пущино), дикого типа и мутантных форм с одиночными заменами триптофановых остатков (W4F, W15F, W96F, W122F, W190F, W207F, W243F). Оптические характеристики определяли спектрофотометром Cary 5000 (Agilent Technologies, Australia) и спектрофлуориметром Fluorolog-3 (Horiba, Jobin Yvon, Франция), оснащенный модулем DeltaHub для регистрации кинетик затухания флуоресценции методом счета одиночных фотонов с временной корреляцией (TCSPC).

Ранее было установлено, что структурные перестройки BCA II в ходе разворачивания в растворах мочевины сопровождаются разнонаправленным изменением двух компонент времени жизни флуоресценции белка ($t_1 \approx 1,1$ и $t_2 \approx 5,6$ нс): первая увеличивается, а вторая уменьшается, при этом отражая две последовательные стадии денатурации [1]. В данной работе показано, что для регистрации структурного перехода BCAII с серединой около 6,4 М мочевины, определяемого по компоненте t_2 , критическим является наличие двух триптофановых остатков, лежащих на неструктурированных участках белка - W15 и W243. Триптофан W15 является донором энергии возбуждения для близлежащего W4, флуоресценция которого, вероятно, значительно затухает соседними аминокислотными остатками. Отсутствие W243 приводит к тому, что в отличие от дикого типа, компоненты времени жизни белка не изменяются в диапазоне 0-4 М мочевины. Вероятно, такой эффект наблюдается из-за экранированности W243 в среду и его существенный вклад в общую интенсивность флуоресценции белка в нативном состоянии. Замена W96F привела к отсутствию изменения только времени жизни t_2 в диапазоне 0-4 М мочевины, характерного для дикого типа. При концентрации мочевины >6 М, характеристики мутантных форм и дикого типа становятся идентичными, по причине попадания всех триптофанов в одинаковое окружение.

Источники и литература

- 1) Nemtseva E.V. et al. Experimental approach to study the effect of mutations on the protein folding pathway // PLoS ONE. 2019. V. 14. P. 1-17.