

Применение спектрофлуориметра ChronosDFD с цифровой обработкой сигнала в частотной области (ISS, США) в биохимических исследованиях.

Аннотация статьи

STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC CHARACTERIZATION OF T4 LYSOZYME MUTANTS AND THE CONTRIBUTION OF INTERNAL CAVITIES TO PRESSURE DENATURATION

Nozomi Ando, Buz Barstow, Walter A. Baase, Andrew Fields, Brian W. Matthews, Sol M. Gruner. Biochemistry, 2008, 47, 11097–109

СТРУКТУРА И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ ЛИЗОЦИМА ФАГА T4 И ВКЛАД ВНУТРЕННЕЙ ПОЛОСТИ БЕЛКА В ДЕНАТУРАЦИЮ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДАВЛЕНИЯ

Растущий интерес к процессам стабилизации ненативных белков при различных условиях обусловлен тем, что исследования в этой области дают понимание того, как происходит формирование пространственной структуры белка, обеспечивающей его функциональные свойства. Широко известно, что ключевую роль в процессах свёртки белка играют гидрофобные взаимодействия. Гидрофобные взаимодействия зависят от температуры и давления. В то время как сила других взаимодействий уменьшается при увеличении температуры, сила гидрофобных взаимодействий наоборот увеличивается. Увеличение давления уменьшают гидрофобные взаимодействия. Предложены модели, описывающие зависимость гидрофобных взаимодействий от температуры. Однако причины, по которым гидрофобные взаимодействия уменьшаются при увеличении давления, остаются малоисследованными. В частности, для исследователей остаются неясными причины разницы в объёме между нативным и денатурированным белком.

Обусловлена ли денатурация белка под действием давления проникновением воды внутрь белковой глобулы? Как изменения в объёме белковой глобулы при денатурации белка коррелируют с изменениями объёма внутренней полости белка? Могут ли при заполнении внутренней полости белка сыграть свою роль другие механизмы денатурации? Что представляет собой денатурированный под действием давления белок? Дать ответы на все эти вопросы попробовала группа американских исследователей из Корнеллского и Орегонского университетов, исследуя денатурацию мутантных форм лизоцима из бактериофага T4.

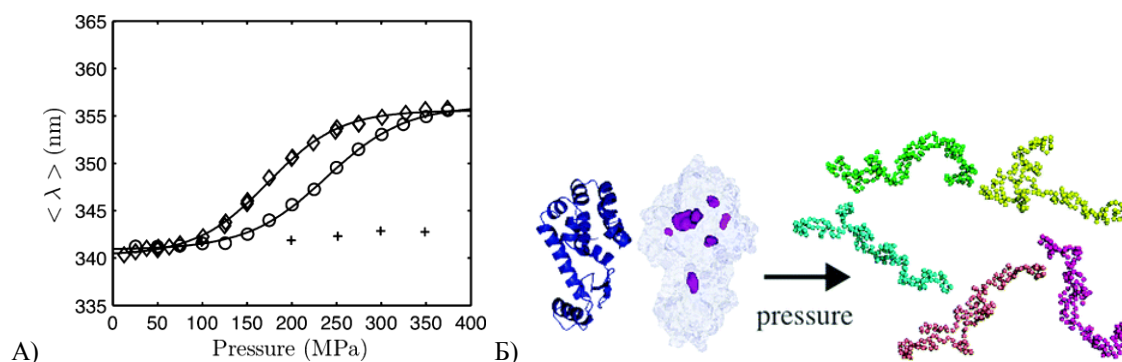


Рис. 1. А) Сдвиг максимума эмиссии флуоресценции лизоцима фага T4 дикого типа (+) и двух его мутантных форм — L99A (○) и L99G/E108V (◇) (50 мМ Трис-НСl с добавлением 20 мМ NaCl, рН 7,0). Б) Модель денатурации L99A при увеличении давления.

Одним из методов исследования изменений в структуре белка под действием давления, который был использован учёными, был флуоресцентный анализ, все измерения проводились на спектрофлуориметре Chronos (ISS, США). Отличием данного спектрофлуориметра являются технологии счёта фотонов и модуляции возбуждения флуоресценции с использованием различных источников света и детекторов с последующей цифровой обработкой сигнала. Источники работают с установленной

пользователем модуляцией частоты сигнала. Сигнал флуоресценции содержит основную частоту, повторяющую скорость работы лазера, и гармонические сигналы, отстающие по фазе. Математическая обработка полученного сигнала позволяет определить амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента. По разности фаз между флуоресценцией и возбуждением на заданной частоте и по отношению амплитуд происходит вычисление времени жизни флуоресценции. Данная технология позволяет с высокой точностью определять время затухания флуоресценции в диапазоне 10^{-12} — 1 с в широкой области длин волн.

Исследователями были получены зависимости сдвига пика флуоресценции от давления и кривые затухания флуоресценции для лизоцима фага T4 дикого типа и двух его мутантных форм — L99A и L99G/E108V — при различных значениях pH. На основе полученных данных учёными выдвинуто предположение, что в зависимости от свойств растворителя, в первую очередь pH, денатурированные под действием давления белки различаются между собой конформацией и степенью гидратации внутренней полости белка. По мнению исследователей, при увеличении давления происходит проникновение воды внутрь полости белка, что приводит к гидратации внутренней полости белка и нарушениям в его структуре. Учёными предложено несколько вариантов объяснения влияния pH на гидратацию внутренней полости при денатурации. По их мнению, проведённое ими исследование подчёркивает важность исследования роли воды в процессах свёртки белка и других биологических процессах.

Подготовил Алексей Шнитко
ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
тел.: +7 495 605 35 07
факс: +7 495 605 39 44
a.shnitko@lab-test.ru
www.lab-test.ru