



ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»  
Россия, Москва, 123557,  
Большой Тишинский пер.38  
Тел: +7 (495) 605 3507, 605 3610  
Факс: +7 (495) 518 9452  
info@lab-test.ru, www.lab-test.ru



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

Аннотация статьи

CHAIN DYNAMICS OF NASCENT POLYPEPTIDES EMERGING FROM THE RIBOSOME  
*Jamie P. Ellis, Courtney K. Bakke, Robert N. Kirchdoerfer, Lisa M. Jungbauer, Silvia Cavagnero.*  
*ACS Chem. Biol., 2008, 3 (9), 555–566*

## ЦЕПНАЯ ДИНАМИКА ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ НА ВЫХОДЕ ИЗ РИБОСОМЫ ПОЛИПЕПТИДА

Для молекулярных биологов одной из малоисследованных тем остаётся фолдинг белка — процесс пространственной свёртки полипептидной цепи, принятия белком строго определенной формы, в которой он выполняет свои функции. Исследователи имеют пока мало информации о конформации полипептида на выходе из рибосомы, роли рибосомного туннеля в фолдинге белка, связи рибосомного туннеля и шаперонов. Изучение всех этих особенностей даёт представление о том, как те или иные этапы фолдинга белка влияют на его функциональную активность.

Существует особая группа белков, играющих важную роль в фолдинге многих других белков — шапероны, участвующие в укладке полипептидной цепочки. В *Escherichia coli* первым шапероном, который взаимодействует с полипептидной цепочкой на выходе из рибосомного канала, является триггер-фактор (TF), который вместе с рибосомным туннелем накладывает геометрические ограничения на конформацию синтезируемой полипептидной цепи, защищая её от неправильного сворачивания до завершения биосинтеза. Кроме триггер-фактора ещё одним важным шапероном является белок DnaK, который связывается с макромолекулой белка, поддерживая её в растянутой конформации. Активность DnaK модулируется регуляторным циклом, включающим нуклеотид-связывающие белки ко-шапероны DnaJ и GrpE. Хотя триггер-фактор и DnaK отличаются связывающими мотивами, оба шаперона проявляют сродство к неполярным и основным остаткам.

Группа американских исследователей, возглавляемая Кортни Бакке и Джэмми Эллис из Висконсинского университета в Мадисоне, провела исследование динамики образующихся на рибосоме полипептидов и белков в клетке *Escherichia coli* в присутствии триггер-фактора и DnaK. Их исследование основано на данных, полученных из анализа затухания поляризации (анизотропии) флуоресценции. Измерение поляризации флуоресценции в стационарном режиме давно используется для изучения роли шаперонов в свертке белков на выходе из рибосомного туннеля, т.к. данный метод позволяет наблюдать отдельно за свободными и связанными рибосомами. Но такая специфическая задача, как наблюдение за синтезируемой на рибосоме полипептидной цепью отдельно от всего комплекса, не может быть решена с помощью стационарных измерений поляризованной флуоресценции. Группа Кортни Бакке и Джэмми Эллис показала, что использование вместо измерений поляризации в стационарном режиме измерений с разрешением во времени позволяет наблюдать за процессами, протекающими на рибосоме.

Для измерений деполяризации флуоресценции исследователи использовали специальный инструмент — спектрофлуориметр с разрешением во времени Chronos (ISS, США). Отличием данного спектрофлуориметра является технология модуляции возбуждения флуоресценции с использованием различных источников света и детекторов и 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 с точностью до пикосекунд в широкой области длин волн — от 200 до 1700 нм. Наличие в приборе поляризаторов возбуждающего и

флуоресцентного излучения позволяет проводить измерения интенсивности флуоресцентного света, поляризованного в параллельной и перпендикулярной плоскостях, и определение поляризации флуоресценции. На основе полученных данных о деполаризации флуоресценции производится вычисление корреляционного времени вращения макромолекулы.

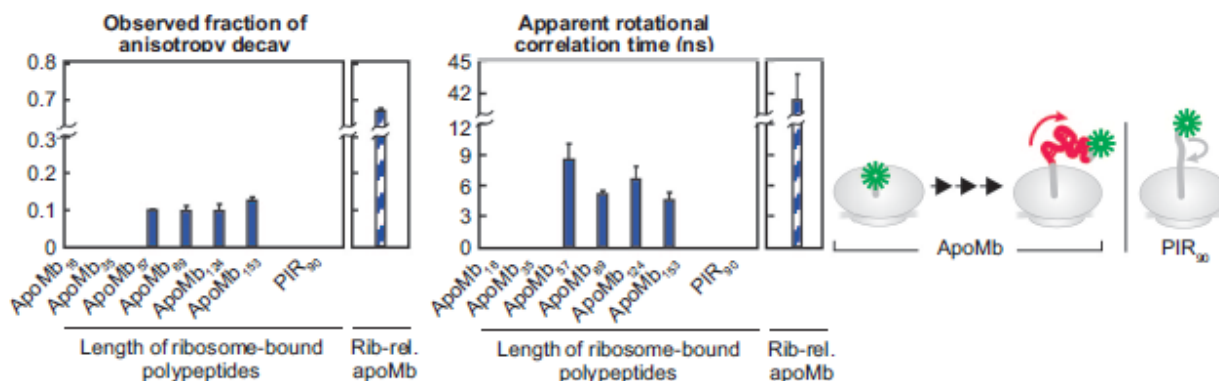


Рис. 1. Динамика деполаризации флуоресценции образующихся на рибосоме цепей apoMb и PIR<sub>90</sub> ( $\lambda_{EX} = 473$  нм,  $\lambda_{EM} = 510$  нм). Синтез был осуществлён на выделенных рибосомах *E. coli* дикого типа. Красным выделена предполагаемая укладка белка, зелёным — флуоресцентная метка BODIPY-FL.

Для проведения исследований роли шаперонов в пространственной укладке белка на выходе из рибосомы учёные использовали связанный с рибосомным комплексом белок апомиоглобин (apoMb) и изначально развёрнутый белок PIR<sub>90</sub>. Выбор апомиоглобина в качестве объекта исследований был основан на том, что особенности структуры и пространственной свёртки этого белка к настоящему времени хорошо исследованы. Для определения участков связывания шаперонов с белком исследователи использовали мутантные укороченные у С-конца фрагменты апомиоглобина. Все фрагменты содержали флуоресцентную метку в N-концевом фрагменте. Исследователи проводили измерение деполаризации флуоресценции в процессе синтеза белка на рибосоме в присутствии шаперонов TF и DnaK.

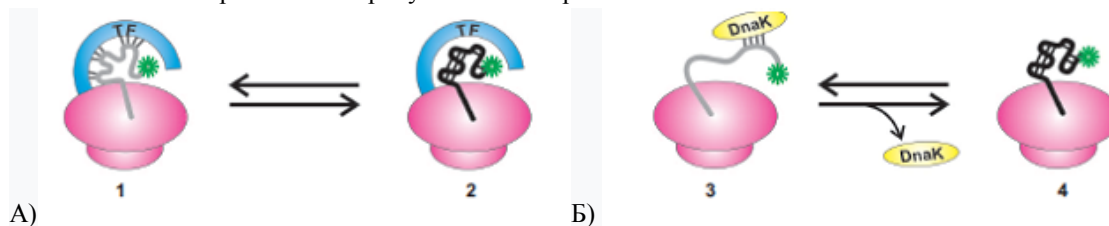


Рис. 2. Предложенные модели укладки на рибосоме формирующихся полипептидных цепей в присутствии TF (А) и DnaK (Б).

По мнению учёных, измерение деполаризации флуоресценции является мощным, надёжным и при этом простым инструментом для изучения процессов котрансляционной свёртки белка. Одна флуоресцентная метка позволяет проводить наблюдение сразу за несколькими процессами в рамках одного эксперимента. Полученные результаты показали независимое образование изгибов в полипептидной цепи белка на промежуточных и поздних стадиях выхода из рибосомы. Эти процессы наблюдались для полипептидной цепи, соответствующей глобулярному белку (apoMb), и не наблюдались для изначально развёрнутого контрольного белка PIR<sub>90</sub>. Эти данные позволяют предположить, что динамика полипептидной цепи на выходе из рибосомы определяется последовательностью и длиной образующейся цепи.

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