

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

Аннотация статьи
EFFICIENT ISOLATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TYPE III SECRETION
TRANSLOCATORS AND ASSEMBLY OF HETEROMERIC TRANSMEMBRANE PORES IN MODEL
MEMBRANES

Fabian B. Romano, Kyle C. Rossi, Christos G. Savva, Andreas Holzenburg, Eugenia M. Clerico, and Alejandro P. Heuck.
Biochemistry, 2011, 50(33), 7117-31

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРАНСЛОКАТОРОВ СЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ III ТИПА СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ПОР

Причиной развития многих инфекционных заболеваний является выведение секретируемых клеткой бактерии токсинов и эффекторов в цитозоль инфицированной клетки (транслокация). Многие грамотрицательные патогенные бактерии, в том числе *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* и *Pseudomonas*, имеют сложный и эффективный механизм секреции и транслокации, известный как секреторная система III типа. Функционирование секреторной системы III типа является одним из ключевых факторов вирулентности, в том числе для синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*. Причиной патогенности синегнойной палочки *P. aeruginosa* является выделение бактериальных белков в цитозоль клетки хозяина, что приводит к нарушениям в клеточном метаболизме. Секреторная система третьего типа состоит из более, чем двадцати белков, организованных в сложную надмолекулярную структуру (“молекулярный шприц”), состоящую из нескольких сегментов (секретон, игла, транслакон и др.). При этом остаётся малоисследованным механизм проникновения самих белков T3S через клеточную мембрану целевой клетки. Некоторые исследователи предполагают, что два белка транслокатора T3S, PopB и PopD, примыкающие к концу иглы T3S, образованной белком PcrV, проникают в клеточную мембрану инфицируемой клетки и формируют пору, через которую проникает игла секреторной системы, осуществляющая транслокацию эффекторов в целевую клетку.

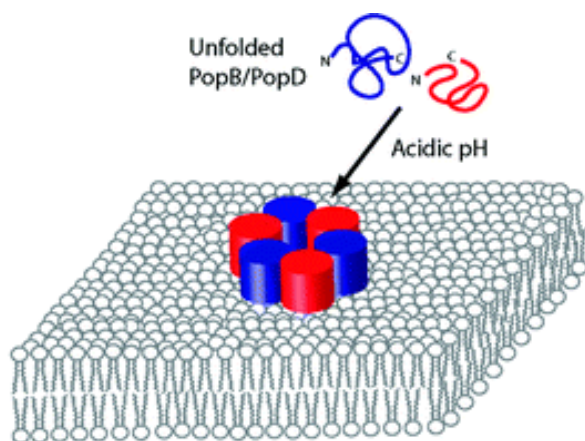


Рис. 1. Модель трансмембранной поры, образованной белками PopB и PopD.

Коллектив американских исследователей под руководством профессора Алехандро Хёка из Массачусетского университета взялся проверить эту гипотезу. Им удалось выделить PopB и PopD и исследовать их структуру и поведение на искусственной мембране. Исследователи использовали метод фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET) с измерением флуоресценции Bodipy-меченных белков на спектрофлуориметре ChronosFD (ISS, США), спектроскопию кругового дихроизма на спектрополяриметре Jasco J-715 (Jasco, Япония) и некоторые другие методы. Отличием

спектрофлуориметра ChronosFD является функция цифровой обработки сигналов в частотной области. Источник света работает 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. Полученные значения времени затухания флуоресценции позволяют провести вычисление эффективности FRET по уравнению, предложенном Ву и Брэндом.

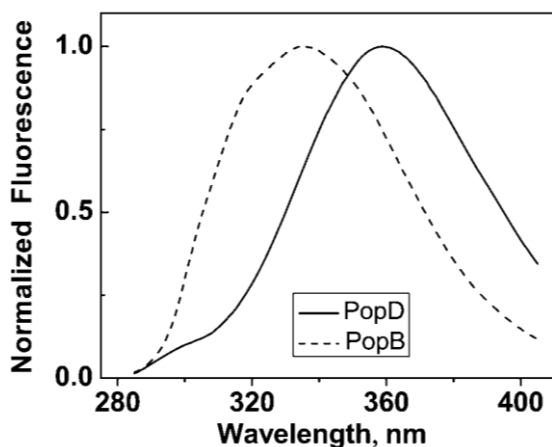


Рис. 2. Спектры эмиссии флуоресценции PopB и PopD в 20 мМ фосфатном растворе (pH 7,5) с добавлением 6 М мочевины ($\lambda_{EX} = 278$ нм). Общее содержание белка составляет 2,4 мкМ.

Исследователи установили, что PopB взаимодействует с PopD на поверхности клеточной мембраны с образованием пор. Показано, что наиболее стабильные трансмембранные поры образуются при pH <5,0, исследователи предполагают, что протонированные кислотные остатки боковых групп участвуют в связывании белка с клеточной мембраной и/или инсерции полипептидной цепи в мембрану. Исследователи уверены, что найденные ими закономерности могут быть использованы в дальнейших исследованиях известных и неизвестных пока механизмов секреторной системы третьего типа.

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