

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

Аннотация статьи

EXCITED-STATE LIFETIME STUDIES OF THE THREE TRYPTOPHAN RESIDUES IN THE N-LOBE OF HUMAN SERUM TRANSFERRIN

Nicholas G. James, Justin A. Ross, Anne B. Mason, David M. Jameson. Protein Science, 2010, 19, 99-110.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ВОЗБУЖДЁННОГО СОСТОЯНИЯ ТРЁХ ОСТАТКОВ ТРИПТОФАНА В N-КОНЦЕВОМ ДОМЕНЕ ТРАНСФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА

Триптофан является наименее часто встречающейся аминокислотой в белках, но при этом преимущественно присутствием триптофана обусловлена флуоресценция белков. Измерение флуоресценции триптофановых остатков используется для изучения структуры белка, межмолекулярных взаимодействий, динамики и процессов сворачивания – разворачивания белков ввиду высокой чувствительности различных параметров флуоресценции (спектра, квантового выхода, анизотропии флуоресценции и др.) к свойствам молекулярного окружения триптофановых остатков и их локализации в молекуле белка. Так, квантовый выход может уменьшаться более чем в 30 раз, а положение пика флуоресценции может изменяться на 50 нм. Сложный механизм затухания флуоресценции у белка, содержащего только один триптофановый остаток, затрудняет интерпретацию изменений в спектре и сравнительный анализ. Если в молекуле белка содержится несколько остатков триптофана, анализ кривых затухания может поставить исследователя в тупик.

В некоторых случаях исследователи используют мутантные формы белка, содержащие только один остаток триптофана. Этот метод работает не всегда, т.к. триптофан играет важную роль в стабилизации вторичной и третичной структуры белка, и замена аминокислоты в мутантном белке может привести к изменению конформации белка. Например, замена одного остатка триптофана из пяти в С-концевом домене трансферрина приводит к полной дестабилизации белка. Тем не менее, этот метод используется. Одним из биологических объектов, в исследовании, которого используется анализ флуоресценции триптофана, является трансферрин человека (hTF) — белок плазмы крови, осуществляющий транспорт ионов железа Fe^{3+} .

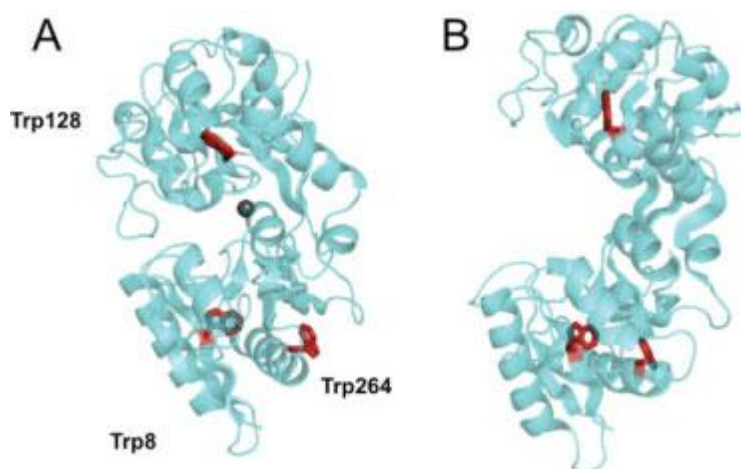


Рис. 1. Кристаллическая структура N-концевого домена hTF, связанного с ионом железа Fe^{3+} (A [PDB ID: 1A8E]) и свободного (B [PDB ID: 1BP5]). Три остатка триптофана выделены красным.

Исследователей в первую очередь интересуют механизмы связывания трансферрина с ионами железа и трансферриновым рецептором. Трансферрин состоит из одной полипептидной цепи, состоящей из 679 аминокислот. Одноцепочечная цепь формирует два домена, расположенные у N- и С-конца белка.

Каждый из доменов в свою очередь состоит из двух субдоменов (N_I/N_{II} и C_I/C_{II}). Между доменами расположена область, участвующая в связывании иона железа. В связывании иона железа участвуют четыре аминокислоты — Asp63, Trp95, Trp188 и His249, а также два кислородных лиганда из карбонат-иона.

Собственная флуоресценция трансферрина обусловлена наличием трёх остатков триптофана — Trp8, Trp128 и Trp264. Связывание белка с ионом железа приводит к трёхкратному уменьшению интенсивности флуоресценции. Уменьшение интенсивности флуоресценции исследователями обычно объясняется переносом энергии от остатка триптофана к образованной ионом железа связи (фёрстеровский резонансный перенос энергии, FRET). Однако группа американских исследователей под руководством Николаса Джеймса из Вермонтского университета и Дэвида Джеймсона из Гавайского университета решила пересмотреть роль FRET в уменьшении флуоресценции трансферрина при связывании с ионом железа.

В своей работе учёные оценили вклад отдельных остатков триптофана, сравнивая спектры флуоресценции, квантовый выход и поляризацию N-концевого домена трансферрина и мутантных вариантов, содержащих только один или два остатка триптофана из трёх. Кроме того, было проведено измерение времени жизни флуоресценции каждого образца в присутствии и отсутствии ионов железа. На основе параметров времени жизни флуоресценции исследователями были вычислены значения эффективности переноса энергии с остатка триптофана на ион металла. Все измерения проводились на спектрофлуориметре с частотным разрешением ChronosFD (ISS, США). Отличительной чертой спектрофлуориметра ChronosFD является функция цифровой обработки сигналов в частотной области. Источник возбуждающего излучения работает с установленной пользователем модуляцией частоты сигнала. Сигнал эмиссии флуоресценции содержит основную частоту, повторяющую скорость работы лазера, и гармонические сигналы, отстающие по фазе. Встроенное программное обеспечение проводит математическую обработку полученного сигнала, определяя амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента, и вычисление времени жизни флуоресценции на основе полученных данных. Эта технология позволяет с высокой точностью определять время затухания флуоресценции в диапазоне 10^{-12} — 1 с в широкой области длин волн.

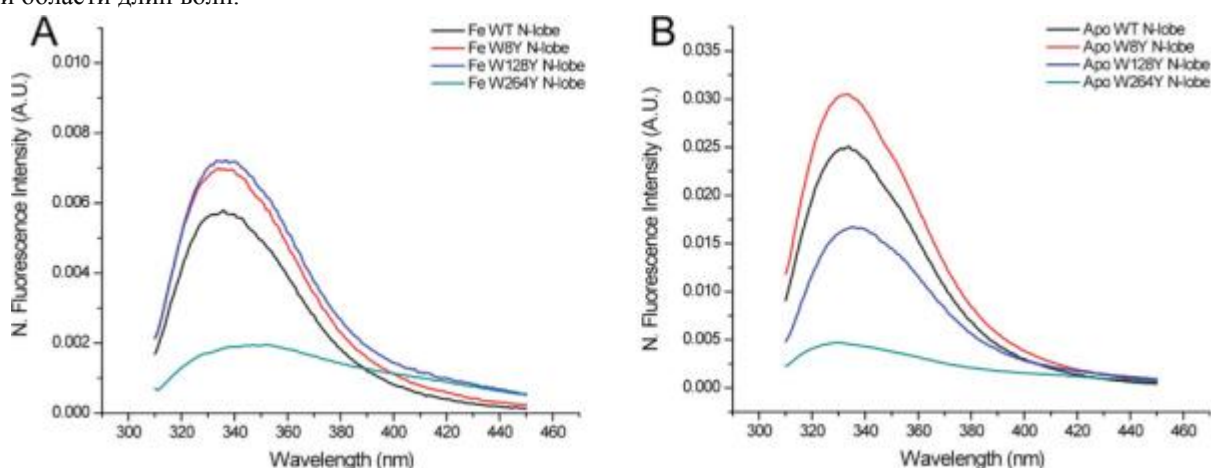


Рис. 2. Спектры эмиссии флуоресценции связанного с ионом железа (A) и свободного (B) трансферрина дикого типа (WT) и трёх точечных мутантных форм ($\lambda_{EX} = 300$ нм) в 100 мМ HEPES (pH 7,4).

Показано, что квантовый выход и время жизни флуоресценции двух остатков триптофана уменьшаются в присутствии ионов железа, но не пропорционально. Исследователи уверены, что на основе полученных ими данных можно сделать вывод, что фёрстеровский резонансный перенос энергии не является единственной причиной гашения флуоресценции триптофана в N-концевом домене трансферрина.

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