

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАДИЙ ИХ ДЕНАТУРАЦИИ

Немцева Е.В.^{1,2}, Герасимова М.А.¹, Лашук О.О.¹, Карузина Н.Е.¹, Гульнов Д.В.¹, Мельник Б.С.³

¹ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

² Институт биофизики СО РАН ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ

³ Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Исследование посвящено поиску новых информативных параметров для экспериментального определения структурных перестроек белков. Для этого было проведено сравнение кривых перехода, получаемых по характеристикам собственной флуоресценции белков при стационарных (непрерывное возбуждение) и время-разрешенных условиях (импульсное наносекундное возбуждение). Исследована равновесная денатурация мочевиной двух белков – карбоксиангидразы Б быка и бактериальной люциферазы, содержащих по семь триптофановых остатков. Проанализирована зависимость от концентрации мочевины следующих параметров флуоресценции: сдвиг спектра испускания при стационарных условиях, времена жизни, вклад спектральных компонент, ассоциированных с определённым временем жизни. Получено, что в случае карбоксиангидразы характеристики стационарной флуоресценции не отражают стадийность процесса денатурации, в отличие от параметров время-разрешенной флуоресценции. Это может быть связано с тем, что промежуточные состояния данного белка образуются при близких значениях концентрации мочевины. Стадии денатурации бактериальной люциферазы значительно разнесены по концентрации денатурирующего агента, поэтому они находят отражение, как в стационарных спектрах флуоресценции, так и в изменениях времен жизни. Обсуждается связь наблюдаемых различий в параметрах флуоресценции белков с локализацией их триптофановых остатков и общим механизмом денатурации.

Ключевые слова: *собственная флуоресценция белков, равновесная денатурация, карбоксиангидраза Б, бактериальная люцифераза, время жизни флуоресценции, путь денатурации белка.*

ВВЕДЕНИЕ

Определение механизмов сворачивания/разворачивания биологических макромолекул по-прежнему является одной из актуальных проблем молекулярной биофизики. Для исследования конформационных переходов белков широко применяются методы флуоресцентной спектроскопии. Одной из причин является чувствительность внутренних флуорофоров белков – триптофановых остатков к изменению физико-химических характеристик микроокружения, в частности, полярности [1, 2]. Разворачивание белковых глобул, как правило, сопровождается батохромным смещением спектра флуоресценции, и зависимость параметров, описывающих положение и форму спектра испускания, от концентрации денатурирующего агента характеризует переход белка из одного состояния в другое. Однако, использование такого подхода для описания процесса разворачивания белка, в котором образуются дополнительные структурные формы, – отличные от нативного и денатурированного состояния, встречает ряд трудностей, например, связанных с зависимостью получаемых переходов от длины волны испускания, выбранной для расчета. Зачастую, по изменению стационарных спектров флуоресценции белков промежуточные стадии денатурации не видны. Дополнительными информативными параметрами люминесценции, не зависящими от длины волны испускания и концентрации флуорофоров, могут стать время-разрешенные характеристики, такие как времена жизни и ассоциированные с ними спектральные компоненты. Ограниченное использование данных характеристик в настоящее время, вероятно, объясняется, с одной стороны, определёнными техническими сложностями регистрации спадов флуоресценции в наносекундном масштабе, а с другой – сложностью интерпретации получаемых данных в отношении белков. В частности, известно, что флуоресценция триптофана, как в составе белков, так и в свободном состоянии в растворах, описывается двумя-тремя временами жизни [2-5].

Целью данного исследования являлось сравнение информативности методов стационарной и время-разрешенной спектроскопии для определения структурных переходов многотриптофановых белков в процессе равновесной денатурации на примере карбоксиангидразы Б и бактериальной люциферазы. Первый белок был выбран как хорошо изученный модельный объект, для которого установлена стадийность процесса разворачивания различными методами [6-8]. Денатурация бактериальной люциферазы исследована в гораздо меньшей степени, для близкого гомолога этого фермента была предложена трёхстадийная схема разворачивания [9, 10]. Оба исследованных белка содержат в своём составе по семь триптофановых остатков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили рекомбинантные белки: карбоксиангидраза Б быка (КАБ), полученная в группе спектроскопии белка Института белка РАН (г. Пушкино), и люцифераза бактерий (БЛ) *Photobacterium leiognathi*, произведенная в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск). Для проведения равновесной денатурации белки инкубировали в течение не менее 18 ч. в растворах мочевины с концентрацией от 0,5 до 7,5 М, после чего проводили измерения оптических характеристик.

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Cary 5000i (Agilent Technologies). Для измерения флуоресценции использовали спектрометр Fluorolog 3-22 (Horiba Scientific) с приставкой для регистрации спада интенсивности флуоресценции методом счета фотонов с временной корреляцией. Стационарные спектры регистрировали при возбуждении ксеноновой лампой (длина волны 295 нм). Разрешенные во времени спады флуоресценции измеряли при возбуждении лазерным диодом NanoLED с максимумом длины волны излучения 296 нм и длительностью импульса <1,2 нс. Спады интенсивности флуоресценции снимали в диапазоне 305–410 нм с шагом 5 нм и разрешением 27 пс/канал.

Полученные спектры флуоресценции корректировали с учетом чувствительности прибора, объемного разведения, фонового сигнала растворителя и эффекта внутреннего фильтра.

Времена жизни определяли с помощью метода деконволюции [11], для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококоллоидное соединение Ludox. Обработку разрешенных во времени спадов флуоресценции проводили с помощью специальной программы DAS6 v.6.6 (Horiba Scientific) методом глобального анализа, суть которого заключается в одновременном описании всей совокупности спадов на разных длинах волн с подбором времен жизни и их вкладов на каждой длине волны [12]. Качество аппроксимации оценивали по статистическим критериям – взвешенным остаткам и χ^2 .

Спад интенсивности флуоресценции во времени описывали как сумму экспонент:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i),$$

где τ_i – время жизни; α_i – амплитудный коэффициент i -компоненты.

Вклад каждой временной компоненты в флуоресценцию на определенной длине волны рассчитывали как

$$f_i^\lambda = \frac{\alpha_i^\lambda \tau_i}{\sum_i \alpha_i^\lambda \tau_i}.$$

Общий спектральный вклад i -компоненты в интенсивность флуоресценции в стационарных условиях, A_i , определяли с помощью выражения:

$$A_i = \frac{\sum_{\lambda} I_{ss}^\lambda f_i^\lambda}{\sum_{\lambda} I_{ss}^\lambda} \cdot 100\%,$$

где I_{ss}^λ – стационарный спектр флуоресценции; f_i^λ – вклад i -компоненты времени жизни на длине волны λ .

Анализ и обработку результатов проводили с применением прикладных программ Microsoft Excel и Microcal Origin Pro 8.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были измерены спектры поглощения и флуоресценции модельных белков после инкубирования в растворах мочевины 0,5–7,5 М. Флуоресценцию при стационарных условиях регистрировали при возбуждении длиной волны 295 нм, следовательно, она была обусловлена вкладом только триптофановых остатков. Получено, что в нативном состоянии максимумы флуоресценции люциферазы и карбоксиангидразы располагаются при 333 нм и 338 нм, соответственно, и после разворачивания глобул батохромно смещаются до 345 нм (рис. 1А). По изменению отношения интенсивностей I_{325}/I_{390} также видно, что если в нативном состоянии форма спектра двух белков различается, то после денатурации триптофановые остатки обоих белков оказываются в сходном микроокружении (рис. 1Б), что выполняется и для других типов белков [13]. При этом для КАБ можно определить переход с серединой при $6,0 \pm 0,1$ М, а для БЛ наблюдается два перехода с серединами при $1,8 \pm 0,1$ и $4,1 \pm 0,1$ М (рис. 1Б).

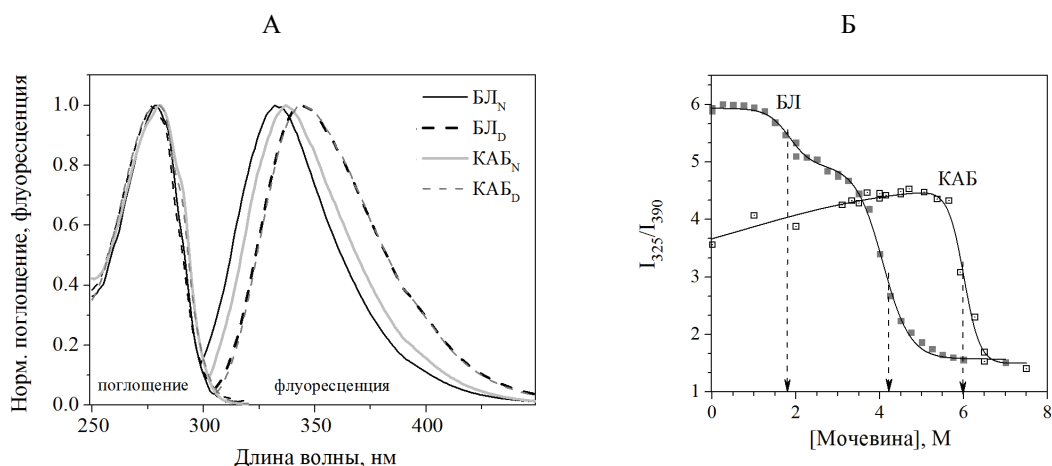


Рисунок 1. (А) Спектры поглощения и флуоресценции карбоксиангидразы и люциферазы в нативном (N) и денатурированном (D) состоянии; (Б) зависимость отношения интенсивностей при 325 и 390 нм для спектров стационарной флуоресценции белков от концентрации мочевины. Стрелками указаны середины переходов

Глобальный анализ спадов флуоресценции в диапазоне 305-410 нм показал наличие трёх времён жизни, характеризующих флуоресценцию белков, τ_1 , τ_2 и τ_3 , со значениями около 5-6, 1-2 и $<0,3$ нс соответственно. Поскольку разрешение экспериментальной установки не позволяет с достаточной точностью регистрировать значение короткой компоненты τ_3 , а её вклад в флуоресценцию белков не превышает 10 %, данное время жизни было исключено из дальнейшего рассмотрения.

Обнаружено, что денатурация белков приводит к уменьшению времени жизни τ_1 как КАБ, так и БЛ, в то время как τ_2 изменяется по-разному (рис. 2А). Для карбоксиангидразы наблюдается увеличение τ_2 от 1,1 до 2,0 нс, а для люциферазы – лишь небольшое уменьшение от 2,1 до 1,8 нс. В случае люциферазы по изменению как τ_1 , так и τ_2 определяется два перехода с серединами около $1,1 \pm 0,1$ и $4,5 \pm 0,1$ М мочевины. То есть, оба времени жизни реагируют на одни и те же конформационные перестройки белка. В отличие от этого, времена жизни τ_1 и τ_2 карбоксиангидразы отражают разные переходы, с серединами при $6,4 \pm 0,1$ и $5,7 \pm 0,1$ М, соответственно (рис. 2А). Рассчитанные по временам жизни карбоксиангидразы середины переходов хорошо совпадают с данными о стадиях денатурации этого белка, полученными кинетическими методами [14].

Для карбоксиангидразы в ходе денатурации значительно изменяются не только значения времен жизни флуоресценции τ_i , но и их спектральные вклады A_i (рис. 2, Б, треугольные маркеры). Если в нативном состоянии 80% флуоресценции этого белка обусловлено компонентой с временем жизни τ_1 , то после потери структуры вклады τ_1 и τ_2 приблизительно выравниваются. Интересно, что для бактериальной люциферазы не наблюдается существенного перераспределения вкладов временных компонент в ходе денатурации (рис. 2Б, квадратные маркеры).

Модельные расчеты, основанные на анализе кристаллической структуры карбоксиангидразы (PDB: 1V9E) и люциферазы (PDB: 3FGC), позволяют определить физические параметры микроокружения триптофановых остатков и соотнести эти флуорофоры в составе белков с пятью возможными спектральными классами [15-17].

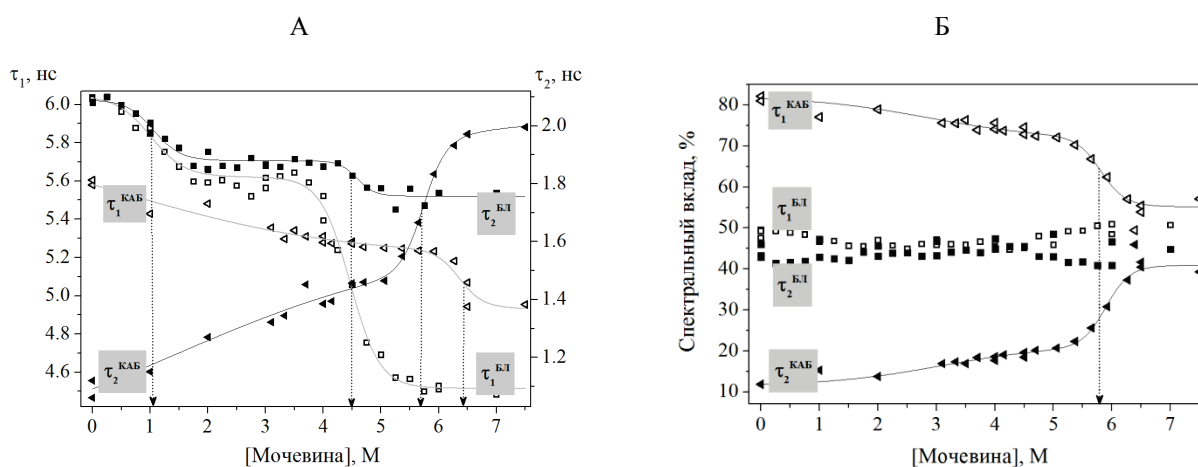


Рисунок 2. Зависимость компонент времени жизни флуоресценции (А) и их спектральных вкладов (Б) от концентрации мочевины: τ_1 (белые маркеры) и τ_2 (черные маркеры) для карбоксиангидразы (треугольные маркеры) и люциферазы (квадратные маркеры). Стрелками указаны середины переходов

Так, для структуры люциферазы *Photobacterium leiognathi* установлено, что α Trp40 погружён в белковую глобулу (класс S), но его флуоресценция может быть затухана близлежащим α Cys170, либо полярными аминокислотами α Thr38, α Thr73, α Asn321, α Ser22 и α Thr323. Оказалось, что большая часть триптофановых остатков в составе люциферазы принадлежит спектральному классу I (α Trp182, α Trp194, β Trp182 и β Trp250). α Trp194 принадлежит классу II, т.е. экспонирован в связанную воду, а α Trp277 – классу III. [17] Сопоставление количества триптофановых остатков разных классов с характерными для них максимумами флуоресценции объясняет положение спектра испускания нативной люциферазы.

Другая картина наблюдается для карбоксиангидразы. Согласно расчетам, три триптофановых остатка КАБ (Trp15, Trp96 и Trp207) с большой вероятностью относятся к спектральному классу S и один (Trp190) – к классу I [14]. Это означает, что данные остатки глубоко погружены внутрь белковой глобулы. Trp122 может быть ассоциирован с классом S или I, Trp4 и Trp243 – с классами I или II. Таким образом, положение спектра стационарной флуоресценции карбоксиангидразы с максимумом при 338 нм может быть результатом того, что основной вклад в флуоресценцию вносят Trp4, Trp243, Trp190, в то время как остальные флуорофоры плотно упакованы внутри белковой глобулы и имеют низкий квантовый выход [1, 2, 18, 19]. Кроме того, наличие большого числа погруженных в гидрофобное окружение триптофанов у карбоксиангидразы, вероятно, делает более чувствительным к процессу денатурации такой параметр как τ_2 .

Как отмечалось выше, соотнесение регистрируемых параметров время-разрешенной флуоресценции белка с конкретными триптофановыми остатками в его составе значительно осложнено тем фактом, что каждый триптофановый остаток проявляет два-три времени флуоресценции [3, 4]. Таким образом, флуоресценция исследованных белков, содержащих по семь триптофанов, потенциально может содержать до 21 временной компоненты, которые разбиваются на три группы и регистрируются как τ_1 , τ_2 и τ_3 . В такой ситуации трудно говорить о свойствах индивидуального триптофанового остатка, а можно только предположить принадлежность характеристик отдельным группам триптофанов (например, внутренним или внешним).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования говорят о том, что характеристики время-разрешенной флуоресценции белков могут нести дополнительную информацию о стадийности структурных изменений этих макромолекул.

Так, в случае карбоксиангидразы B параметры стационарной флуоресценции показывают «усреднённый» переход и не отражают стадийность процесса денатурации, потому что промежуточные состояния белка образуются при близких концентрациях мочевины. При этом изменение времён жизни флуоресценции ясно указывает на наличие двух стадий, что подтверждается кинетическими методами.

Для бактериальной люциферазы стадии денатурации значительно разнесены по концентрации мочевины, поэтому они находят отражение, как в стационарных спектрах флуоресценции, так и в изменениях времен жизни.

Разница в трехмерной структуре исследованных белков проявляется в направлении изменения одной из временных компонент (~ 2 нс) и характере перераспределения спектральных вкладов в ходе денатурации. Это может быть связано с наличием большего количества глубоко погруженных в глобулу триптофановых остатков у карбоксиангидразы B по сравнению с бактериальной люциферазой.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (гранты № 6.7734.2017 и № 01201351504), а также РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки.

Список литературы / References

1. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Springer Science, 2006.
2. Chen Y., Barkley M.D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, pp. 9976-9982.
3. Albani J.R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 1. Fluorescence lifetimes origin of tryptophan free in solution. *J. Fluoresc.*, 2014, vol. 24, pp. 93-104.
4. Albani J.R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: Fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins. *J. Fluoresc.*, 2014, vol. 24, pp. 105-117.
5. Engelborghs Y. The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins. *Spectrochim. Acta A.*, 2001, vol. 57, pp. 2255-2270.
6. Semisotnov G.V., Uversky V.N., Sokolovsky I.V., Gutin A.M., Razgulyaev O.I., Rodionova N.A. Two slow stages in refolding of bovine carbonic anhydrase B are due to proline isomerization. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 213, pp. 561-568.
7. Melnik B.S., Marchenkov V.V., Evdokimov S.R., Samatova E.N., Kotova N.V. Multy-state protein: Determination of carbonic anhydrase free-energy landscape. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, vol. 369, pp. 701-706.
8. Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Kutysenko V.P., Ebert B., Blanck J., Ptitsyn O.B. Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 224, pp. 9-13.
9. Inlow J.K., Baldwin T.O. Mutational analysis of the subunit interface of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase. *Biochemistry*, 2002, vol. 41, pp. 3906-3915.

10. Deeva A.A., Temlyakova E.A., Sorokin A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32, pp. 3053-3057.
11. Ameloot M., Hendrickx H. Extension of the performance of Laplace deconvolution in the analysis of fluorescence decay curves. *Biophys. J.*, 1983, vol. 44, pp. 27-38.
12. Beechem J.M., Gratton E., Ameloot M., Knutson J.R., Brand L. The global analysis of fluorescence intensity and anisotropy decay data: second-generation theory and programs *In Topics in fluorescence spectroscopy*, Springer, Boston, MA, 2002, pp. 241-305.
13. Nemtseva E.V., Lashchuk O.O., Gerasimova M.A. Similarity of decay-associated spectra for tryptophan fluorescence of proteins with different structures. *Biophysics*, 2016, vol. 61, pp. 193-199.
14. Nemtseva E.V., Lashchuk O.O., Gerasimova M.A., Melnik T.N., Nagibina G.S., Melnik B.S. Fluorescence lifetime components reveal kinetic intermediate states upon equilibrium denaturation of carbonic anhydrase II. *Methods and applications in fluorescence*, 2018, vol. 6, pp. 015006.
15. Reshetnyak Y.K., Koshevnik Y., Burstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys. J.*, 2001, vol. 81, pp. 1735-1758.
16. Shen C., Menon R., Das D. [et al.] The protein fluorescence and structural toolkit: Database and programs for the analysis of protein fluorescence and structural data. *Proteins*, 2008, vol. 71, pp. 1744-1754.
17. Deeva A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. Structural properties of tryptophan microenvironment in bacterial luciferase. *Luminesc.*, 2014, vol. 29, pp. 72-73.
18. Slyusareva E.A., Gerasimova M.A., Sizykh A.G., Gornostaev L.M. Spectral and fluorescent indication of the acid-base properties of biopolymer solutions. *Russ. Phys. J.*, 2011, vol. 54, pp. 485-492.
19. Tsuboi T., Penzkofer A., Slyusareva E., Sizykh A. Photoluminescence properties of fluorone dyes in bio-related films at low temperatures. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 2011, vol. 222, pp. 336-342.

APPLICATION OF THE TIME-RESOLVED FLUORESCENCE TO THE CHARACTERIZATION OF PROTEINS UNFOLDING PATHWAYS

Nemtseva E.V.^{1, 2}, Gerasimova M.A.¹, Lashchuk O.O.¹, Karuzina N.E.¹, Gulnov D.V.¹, Melnik B.S.³

¹ Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

² Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center 'Krasnoyarsk Science Center SB RAS'

Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³ Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Institutskaya st., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru

Abstract. The study contributes to the development of experimental methods capable of detecting the intermediate states of proteins upon equilibrium denaturation. The urea-induced transition curves of bovine carbonic anhydrase II and bacterial luciferase obtained from steady-state and time-resolved fluorescence were compared. The dependence of the following fluorescence parameters on the urea concentration was analyzed: the shift of the steady-state emission spectrum, the lifetimes, and the spectral contribution of the lifetime components. It was found that for carbonic anhydrase the steady-state fluorescence does not reflect the multi-stage denaturation, in contrast to the time-resolved fluorescence parameters. This can be due to the fact that the intermediate states of carbonic anhydrase are formed at close urea concentrations. For bacterial luciferase the transition midpoints of unfolding stages are significantly separated by urea concentration scale, so they can be seen both in steady-state fluorescence spectra and in lifetimes change. The observed differences in the fluorescence parameters of two proteins were discussed in terms of tryptophan residues location and the general mechanisms of unfolding pathways.

Key words: *intrinsic fluorescence of proteins, equilibrium denaturation, carbonic anhydrase II, bacterial luciferase, fluorescence lifetime, protein unfolding pathway.*