

Исследование люминесценции комплекса БТШ70-АТФ-Mg²⁺ и его тепловой денатурации

Букина М. Н., Бакулев В. М., Лисаченко Д. А.

¹Букина Мария Николаевна / *Bukina Maria Nikolaevna* – кандидат физико-математических наук, доцент;

²Бакулев Владимир Михайлович / *Bakulev Vladimir Mikhailovich* – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник;

³Лисаченко Дмитрий Андреевич / *Lisachenko Dmitry Andreevich* – кандидат физико-математических наук, доцент; Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Аннотация: исследованы спектрально-люминесцентные свойства водных растворов белка БТШ70 и комплекса БТШ70-АТФ-Mg²⁺, получена зависимость интенсивности испускания люминесценции от температуры. Обнаружено, что температура плавления комплекса БТШ70-АТФ-Mg²⁺ на 9°С выше, чем свободного БТШ70, и температурный диапазон, в котором происходит конформационный переход, более узкий. Показано, что образование комплекса с АТФ в присутствии ионов магния стабилизирует вторичную структуру БТШ70 и уменьшает внутримолекулярную подвижность макромолекулы белка.

Abstract: spectral luminescent properties of aqueous solutions of protein HSP70 and of HSP70-ATP-Mg²⁺ complex are studied, the dependence of the emission luminescence spectrum on temperature is obtained. It is found that the melting temperature of HSP70-ATP-Mg²⁺ complex is 9°C higher than that of free HSP70, and the temperature range in which the conformation transition occurs is more narrow. It is shown that the formation of a complex with ATP in the presence of Mg²⁺ ions stabilizes the secondary structure of HSP70 and decreases the intramolecular mobility of the protein macromolecule.

Ключевые слова: люминесценция, БТШ70, БТШ70-АТФ-Mg²⁺, тепловая денатурация.

Keywords: luminescence, HSP70, HSP70-ATP-Mg²⁺, thermal denaturation.

УДК 57.043; 577.322.4

Введение

Белки семейства БТШ70 активно изучаются в последнее время, т. к. выполняют множество важных функций в организме: участвуют в фолдинге белков, восстанавливают поврежденные белки после попадания клетки в стрессовое состояние, обладают иммуномодулирующими свойствами [1,2]. Все типы биологической активности БТШ70 опираются на АТФ-регулируемое связывание пептидов, обусловленное наличием двух основных функциональных доменов в нативном состоянии БТШ70. При этом N-концевой домен обладает АТФ-азной активностью, а СООН-терминальный домен связывается с полипептидами [3]. В состав макромолекулы БТШ70 входят люминесцирующие ароматические аминокислоты: фенилаланин (25 остатков), тирозин (15 остатков) и триптофан (2 остатка), что позволяет изучать особенности строения вторичной и третичной структуры полипептида спектрально-люминесцентным методом. В работе [4] показана успешность применения спектрально-люминесцентного метода для исследования тепловой денатурации водного раствора БТШ70. В данной работе спектрально-люминесцентным методом изучен комплекс БТШ70-АТФ-Mg²⁺. Известно, что в присутствии ионов Mg²⁺ АТФ связывается с определенными сайтами NH₂-концевого домена [3]. Обнаружено, что температура плавления такого комплекса на 9°С выше, чем свободного БТШ70, и температурный диапазон, в котором происходит конформационный переход, более узкий. Таким образом, образование комплекса с АТФ стабилизирует вторичную структуру БТШ70 и уменьшает динамическую внутримолекулярную подвижность макромолекулы белка.

Материалы и методика

В работе использовался высокоочищенный рекомбинантный человеческий белок БТШ70, наработанный с применением стандартной методики в ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов». Исследования проводились в водных буферных растворах (бидистиллированная вода, 0.05 М буфер трис-НСl, рН=6.5, АТФ 0.0025М, MgCl 0.05М) при концентрации БТШ70 0.5 мг/мл. Корректированные спектры испускания люминесценции растворов регистрировались на спектрофлуориметре Hitachi-850. Температурные исследования проводились на спектрофлуориметре LUMINA (Thermo Fisher Scientific) с использованием жидкостного термостата Thermo Scientific Naake Circulator ARCTIC SC 100-A10.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены спектры испускания люминесценции водного раствора БТШ70 (кривые 1, 2) и комплекса БТШ70-АТФ-Mg²⁺ в фосфатном буфере (кривые 3, 4) при двух длинах волн возбуждения (260 и 295 нм). Облучение длиной волны 260 нм находится в области поглощения всех трех ароматических аминокислот, тогда как при 295 нм поглощает только триптофан.

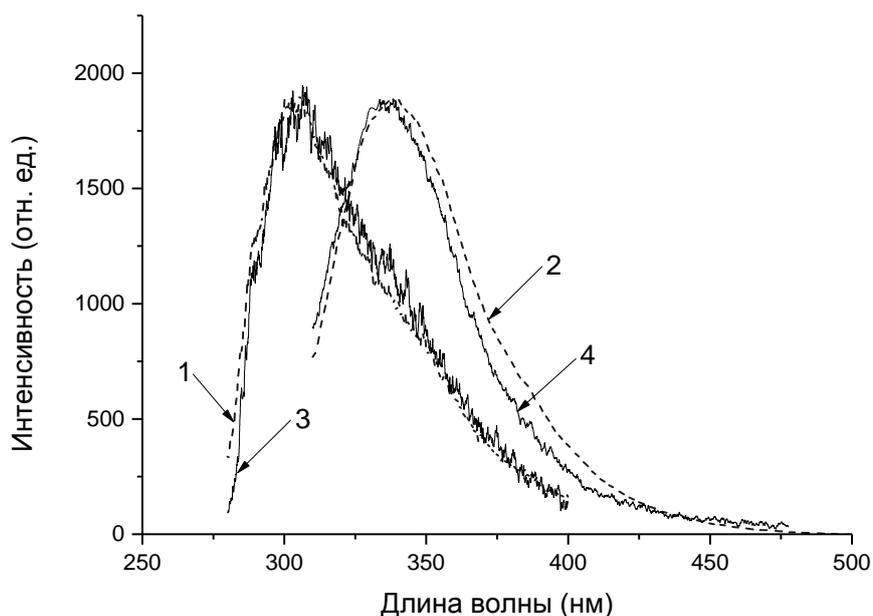


Рис. 1. Нормированные по максимуму интенсивности спектры люминесценции водного раствора БТШ70 (1, 2) и его комплекса с АТФ (3, 4) при $\lambda_{\text{возб}} = 260$ нм (1, 3) и $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм (2, 4)

Несмотря на значительное превышение количества фенилаланина над триптофаном и тирозином, вклад люминесценции этой аминокислоты ($\lambda_{\text{max}} = 282$ нм) в люминесценцию БТШ70 не наблюдается из-за более низкого коэффициента молярной экстинкции и низкого квантового выхода флуоресценции. Обычно квантовый выход флуоресценции тирозина в белке значительно меньше квантового выхода тирозина в растворе за счет усиления различных процессов диссипации энергии возбуждения в белке, в том числе и путем переноса энергии возбуждения на триптофан [5]. БТШ70 принадлежит к немногочисленному классу белков, в которых наблюдается люминесценция тирозина ($\lambda_{\text{max}} = 303$ нм) (рис. 1, спектр 1). Присоединение АТФ не меняет форму спектра люминесценции БТШ70 при $\lambda_{\text{возб}} = 260$ нм (рис. 1, спектр 3), несмотря на то, что поглощение АТФ при данной длине волны значительно больше поглощения ароматических аминокислот. Квантовый выход флуоресценции АТФ в воде при комнатной температуре очень низкий ($\approx 10^{-4}$ [6]), и отсутствие изменений в спектре БТШ70 при связывании с АТФ говорит о том, что квантовый выход флуоресценции АТФ при этом не увеличивается.

Триптофановые остатки в составе молекулы БТШ 70 расположены по одному в каждом функциональном концевом домене [7], поэтому спектр испускания БТШ70 с максимумом 335 нм при $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм (рис. 1, спектр 2) обусловлен только люминесценцией триптофана в гидрофобном неполярном окружении. При увеличении полярности среды максимум спектра люминесценции триптофана должен сдвигаться в длинноволновую сторону до 350 нм в водном растворе [5]. Взаимодействие АТФ с NH_2 -концевым доменом БТШ 70 приводит к незначительному гипсохромному сдвигу максимума спектра люминесценции триптофана на 3 нм (рис. 1, спектр 4). Такой же незначительный сдвиг наблюдался в люминесценции бактериального белка теплового шока DnaK при связывании с АТФ [8]. Т. о., можно полагать, что в комплексе БТШ70-АТФ- Mg^{2+} микроокружение триптофана становится чуть более гидрофобным, возможно, за счет стабилизации белковой глобулы.

Стабилизацию вторичной структуры БТШ70 при добавлении АТФ подтверждают полученные нами данные по тепловой денатурации БТШ70 и комплекса БТШ70-АТФ- Mg^{2+} , представленные на рис. 2 и рис. 3.

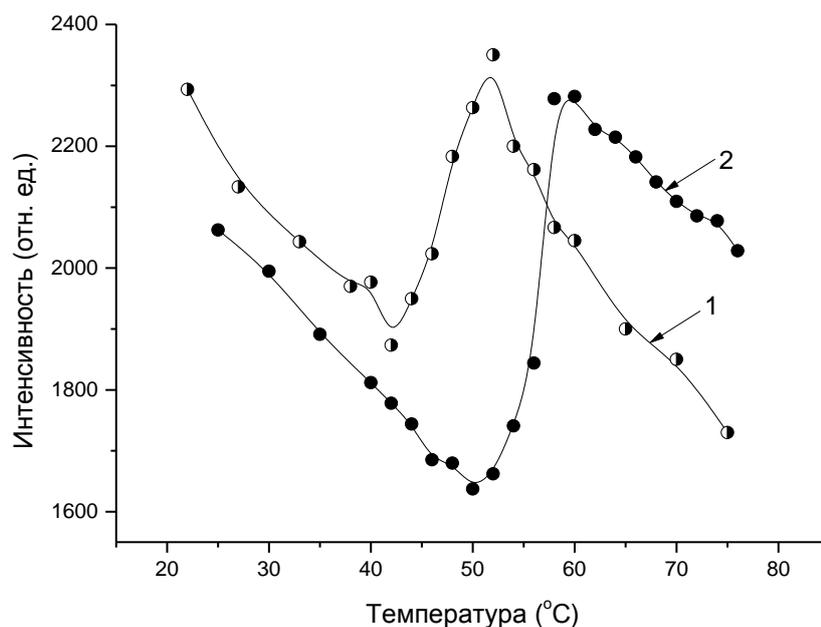


Рис. 2. Изменение интенсивности люминесценции водного раствора БТШ70 (1) и его комплекса с АТФ (2) при повышении температуры. $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег}} = 335 \text{ нм}$

На рис. 2 показаны зависимости интенсивности люминесценции БТШ70 и его комплекса с АТФ (возбуждение 295 нм, испускание 335 нм) от температуры. Видно, что при повышении температуры до 42°C интенсивность люминесценции БТШ70 (рис. 2, кривая 1) падает, что связано, очевидно, с увеличением эффективности безызлучательной деградации возбужденного состояния люминофора (температурное тушение). Далее, в диапазоне температур 42–52°C, интенсивность увеличивается. Известно [5], что для триптофана при переходе в полярное водное окружение кроме батохромного сдвига спектра наблюдается также и возрастание квантового выхода флуоресценции. Таким образом, можно заключить, что подобный ход кривой 1 на рис. 2 связан с изменением конформации макромолекулы белка, в результате которого микроокружение триптофанов меняется с гидрофобного на гидрофильное, т. е. происходит разворачивание макромолекулы (тепловая денатурация). При этом, как было показано в [4], денатурация БТШ70 необратима. При повышении температуры выше 52°C снова наблюдается уменьшение интенсивности люминесценции денатурированного белка за счет температурного тушения.

Как видно из рис. 2, добавление АТФ к БТШ70 приводит к значительному температурному сдвигу конформационного перехода. По нашему мнению, первая производная интенсивности по температуре (рис. 3) лучше подчеркивает различия в характере тепловой денатурации БТШ70 и его комплекса с АТФ.

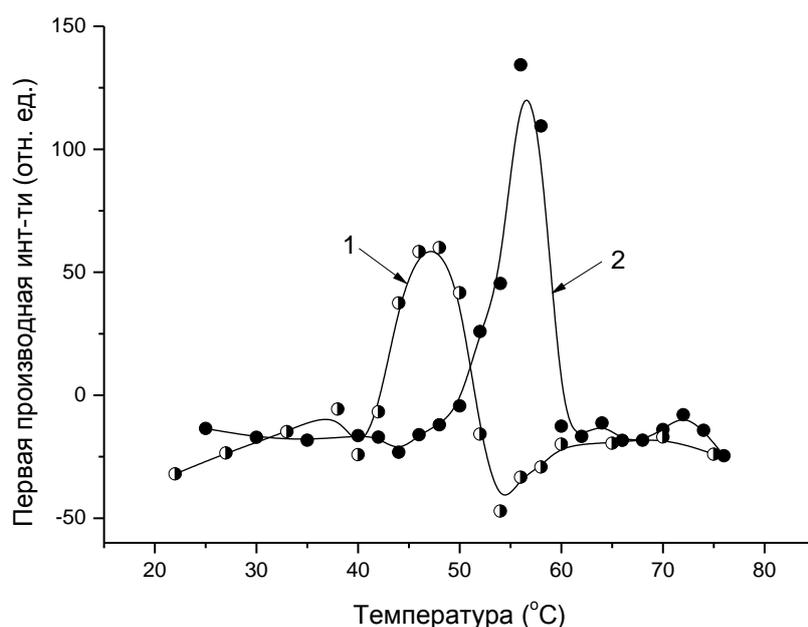


Рис. 3. Первая производная интенсивности люминесценции водного раствора БТШ70 (1) и его комплекса с АТФ (2) по температуре. Исходные данные приведены на рис. 2

Температура плавления комплекса, определенная по максимуму первой производной интенсивности перехода от температуры, на 9°C больше температуры плавления БТШ70 (Рис. 3). Наблюдается также большая высота и значительно меньшая полуширина пика первой производной комплекса по сравнению и пиком БТШ70, что говорит о более сильной кооперативности и более «тонкой настройке» вторичной структуры комплекса БТШ70-АТФ- Mg^{2+} .

Таким образом, показано, что связывание БТШ70 с АТФ в присутствии ионов Mg^{2+} слабо меняет форму спектров люминесценции, но приводит к стабилизации конформации белка и сдвигу температуры плавления приблизительно на 9°C .

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра «Оптические и лазерные исследования» научного парка СПбГУ.

Литература

1. Bukau B., Horwich, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines // Cell. 1998. V. 92. P. 351–366.
2. Srivastava P. K., Menoret A., Basu S., Binder R. J., McQuade K. L. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world // Immunity. 1998. V. 8. P. 657–665.
3. Mayer M. P., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism // Cell.Mol.Life Sci. 2005. V. 62. № 6. P. 670–684.
4. Букина М. Н., Бакулев В. М., Бармасов А. В., Жахов А. В., Иценко А. М. Спектрально-люминесцентные проявления изменения конформации белка БТШ70 в процессе тепловой денатурации // Оптика и Спектроскопия. 2015. Т. 118. № 6. С. 930–932.
5. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, NY.: Plenum Press, 1999. 954 p.
6. Kononov A. I., Bukina M. N. Luminescence excitation spectra reveal low-lying excited states in stacked adenine bases // J. Biom. Struct. Dyn. 2002. V. 20. P. 465–472.
7. Черников В. А., Гороховец Н. В., Савватеева Л. В., Северин С. Е. Функциональная характеристика доменов и междоменных взаимодействий в рекомбинантных белках HSP70 человека // Молекулярная биология. 2011. Т. 45. № 5. С. 903–913.
8. Vogel M., Mayer M. P., Bukau B. Allosteric Regulation of Hsp70 Chaperones Involves a Conserved Interdomain Linker // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 38705–38711.