

Long-wave luminescence of aqueous solution of protein HSP70

Bukin M.¹, Bakulev V.², Lisachenko D.³

Длинноволновая люминесценция водного раствора белка БТШ70

Букина М. Н.¹, Бакулев В. М.², Лисаченко Д. А.³

¹Букина Мария Николаевна / *Bukina Maria* - кандидат физико-математических наук, доцент, кафедра общей физики-2;

²Бакулев Владимир Михайлович / *Bakulev Vladimir* - кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров;

³Лисаченко Дмитрий Андреевич / *Lisachenko Dmitry* - кандидат физико-математических наук, доцент, кафедра общей физики-2, физический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Аннотация: в данной работе описана длинноволновая люминесценция водного раствора белка БТШ70 с максимумом спектра испускания 440 нм. Получена зависимость интенсивности испускания люминесценции на длинах волн 340 нм (триптофан) и 440 нм (длинноволновая компонента) от концентрации БТШ70 в растворе. Обнаружено, что интенсивность триптофановой люминесценции возрастает прямо пропорционально концентрации, тогда как интенсивность длинноволновой люминесценции возрастает нелинейно. Показано, что наблюдаемая длинноволновая люминесценция БТШ70 в видимой области спектра является собственной люминесценцией белка и, вероятнее всего, обусловлена межмолекулярными взаимодействиями при больших концентрациях БТШ70.

Abstract: a long-wavelength luminescence of water solution of HSP70 protein with a 440 nm maximum in the emission spectrum is described. The dependence of the luminescence emission intensity at the wavelengths of 340 nm (tryptophan) and 440 nm (long-wavelength component) on HSP70 concentration in the solution is obtained. It is found that the intensity of tryptophan luminescence increases in direct proportion to the concentration, while the intensity of long-wavelength luminescence increases non-linearly. It is shown that the observed long-wavelength luminescence of HSP70 in the visible region of the spectrum is the intrinsic luminescence of protein and is most likely due to the intermolecular interactions at high concentrations of HSP70.

Ключевые слова: люминесценция, БТШ70, GFP.

Keywords: luminescence, HSP70, GFP.

УДК 57.043; 577.322.4

Введение

Изучение люминесценции биологически важных полимеров является актуальной задачей, поскольку позволяет изучать особенности их нативной структуры и является методом неразрушающего анализа. Спектры испускания и возбуждения люминесценции несут информацию о природе основного и первого возбужденного состояния, типе окружения люминофоров, особенностях пространственной структуры биополимера. В данной работе обсуждаются люминесцентные свойства белка БТШ70, важного молекулярного шаперона, который активно исследуется в последнее время [1, 2]. В предыдущих работах авторов [3, 4] показано, что интенсивная люминесценция водного раствора БТШ70 обусловлена испусканием двух ароматических аминокислот – тирозина и триптофана, причем спектр испускания люминесценции зависит от длины волны возбуждения. Люминесценция подавляющего большинства белков обусловлена входящими в их состав триптофанами, спектрально-люминесцентные свойства которых проявляют сильную зависимость от физико-химических свойств окружения. БТШ70 принадлежит к незначительному классу белков, в люминесценции которых проявляется две компоненты – не только от триптофана, но также от тирозина. В данной работе обсуждается обнаруженная авторами еще одна компонента люминесценции БТШ70 - длинноволновая люминесценция с максимумом 440 нм, спектр возбуждения которой находится в области ближнего ультрафиолета с максимумом 360 нм, т. е. за пределами поглощения ароматических кислот. Подобные длинноволновые полосы, лежащие в видимой области спектра, несколько лет назад были открыты для ряда флуоресцирующих белков, получивших название GFP [5]. Люминофор, ответственный за длинноволновую люминесценцию, является продуктом внутримолекулярной циклизации аминокислотных остатков белка и находится внутри компактной структуры, образованной β-листами [5]. Известно, что различные продукты фотохимических реакций триптофана также обладают люминесценцией в видимой области [6]. Такие соединения могут накапливаться при хранении растворов белков. В данной работе показано, что наблюдаемая длинноволновая люминесценция БТШ70 в видимой области спектра является собственной люминесценцией белка и, вероятнее всего, обусловлена межмолекулярными взаимодействиями при больших концентрациях БТШ70.

Методика

В работе использовался высокоочищенный (содержание больше 98 %) рекомбинантный человеческий белок БТШ70, полученный с применением стандартной методики в ФГУП «Государственный научно-

исследовательский институт особо чистых биопрепаратов». Спектральные исследования препарата проводились в водных буферных растворах (бидистиллированная вода, 0,02 М фосфатный буфер, pH=7,3). Корректированные спектры испускания и возбуждения люминесценции регистрировались на спектрофлуориметре Hitachi-850.

Результаты и обсуждение

Заметное поглощение БТШ70, обусловленное, в основном, присутствием в белке ароматических остатков тирозина и триптофана, появляется при длинах волн короче 300 нм [3]. В зависимости от длины волны возбуждения в люминесценции БТШ70 проявляется или испускание тирозина ($\lambda_{\text{возб}} = 260$ нм, $\lambda_{\text{max}} = 303$ нм), или испускание триптофана ($\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм, $\lambda_{\text{max}} = 335$ нм) [3, 4]. При используемых в работе концентрациях белка в растворе от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл поглощение БТШ70 в видимом спектральном диапазоне (300-700 нм) не наблюдается, что является свидетельством спектральной чистоты используемого соединения. Как известно, чувствительность люминесцентного метода на несколько порядков выше спектрофотометрического метода [7]. Поэтому с целью проверки исследуемого белка на люминесцентную чистоту был проведен поиск следовой люминесценции также и при разных длинах волн возбуждения в ближнем ультрафиолетовом и видимом спектральных диапазонах. Оказалось, что при $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм в люминесценции выявляется широкая бесструктурная полоса с максимумом 440 нм. Дальнейшие исследования показали, что данный спектр не является примесным, а обусловлен собственной люминесценцией БТШ70.

На рис. 1 представлены нормированные по интенсивности максимума спектры испускания и возбуждения люминесценции водного раствора БТШ70. Как видно из рисунка, длинноволновая люминесценция (кривая 1) значительно сдвинута относительно люминесценции триптофана (кривая 2) в сторону больших длин волн. Интенсивность длинноволновой люминесценции примерно в 50 раз меньше, чем у люминесценции триптофана и тирозина. В спектре возбуждения (кривая 3) длинноволновой люминесценции наблюдаются две полосы с максимумами 360 и 280 нм. Первая полоса (максимум 360 нм) не наблюдается в спектре поглощения белка, что свидетельствует о малой концентрации данного люминофора и значительном квантовом выходе его флуоресценции. Тогда как вторая полоса (максимум 280 нм) полностью совпадает с первой полосой в спектре возбуждения триптофана (кривая 4), что в данном случае указывает на вероятную причинную связь обнаруженной длинноволновой люминесценции с триптофановыми остатками в БТШ70.

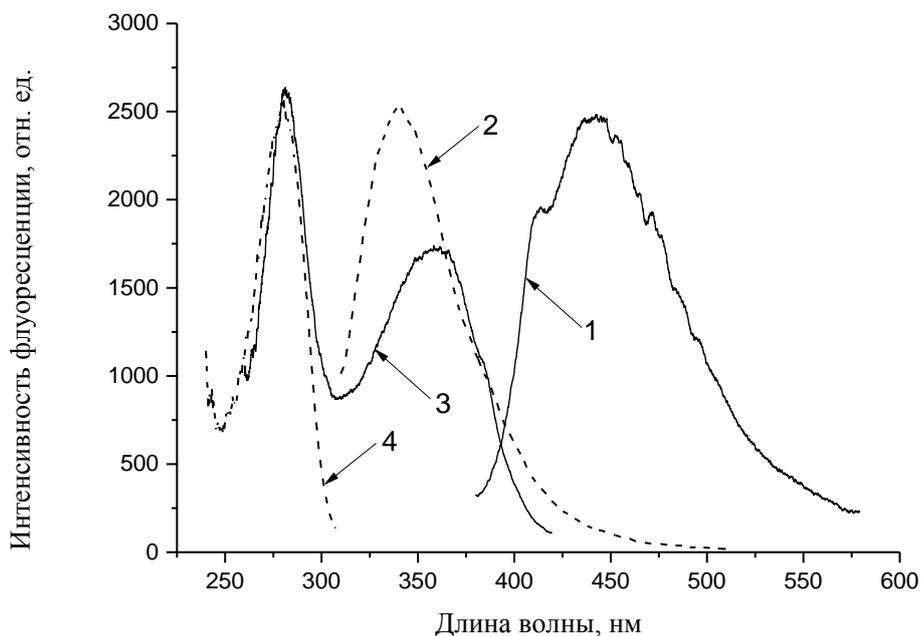
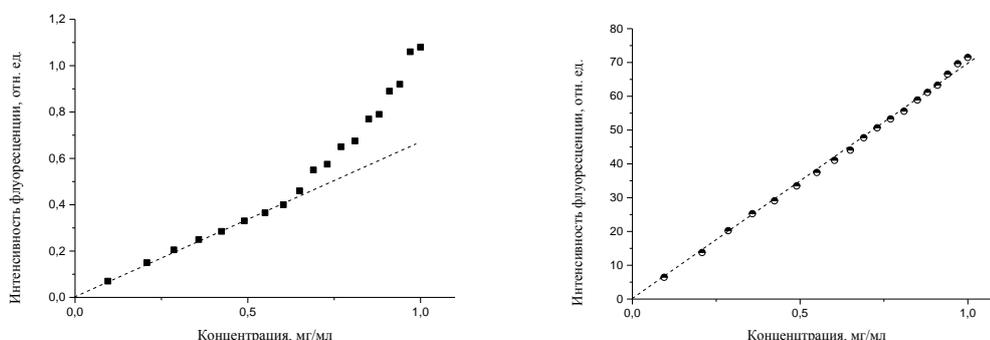


Рис. 1. Нормированные по максимуму спектры испускания (кривая 1 - $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм; кривая 2 - $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм) и возбуждения (кривая 3 - $\lambda_{\text{рез}} = 440$ нм; кривая 4 - $\lambda_{\text{рез}} = 340$ нм) люминесценции водного раствора БТШ70 ($c = 0,5$ мг/мл)

С целью определения природы длинноволновой люминесценции были измерены концентрационные зависимости интенсивности. Результаты таких измерений представлены на рис. 2а. Для сравнения на рис. 2б представлены аналогичные зависимости для интенсивности люминесценции триптофана от концентрации белка в буферном растворе. Ход зависимостей очевидно различен. В случае триптофана – она хорошо

аппроксимируется прямой, что характерно для обычной концентрационной зависимости без комплексообразования – интенсивность люминесценции увеличивается прямо пропорционально концентрации растворенного люминофора. Для длинноволновой люминесценции (рис. 2а) – при больших концентрациях белка в растворе зависимость явно нелинейная. Рост интенсивности люминесценции значительно обгоняет увеличение концентрации белка, что, вероятнее всего, обусловлено появлением люминесцирующих агрегатов белковых молекул при больших концентрациях. При изменении концентрации белка форма спектра длинноволновой люминесценции не меняется. Этот факт, вероятнее всего, свидетельствует о том, что образуется только один тип люминесцирующих комплексов.



а) б)

Рис. 2. Зависимость интенсивности люминесценции водного раствора БТШ70 от концентрации: а) $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 340$ нм; б) $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 440$ нм

Таким образом, проведенные спектрально-люминесцентные исследования и изучение концентрационной зависимости интенсивности показали, что наблюдаемая длинноволновая люминесценция БТШ70 в видимой области спектра является собственной люминесценцией белка и, вероятнее всего, обусловлена межмолекулярными взаимодействиями при больших концентрациях БТШ70.

Литература

1. *Koyeli Mapa and all.* The Conformational Dynamics of the Mitochondrial Hsp70 Chaperone // *Molecular Cell.* 2010. V. 38. P. 89–100.
2. *Mayer M. P., Bukau B.* Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism // *Cell.Mol.Life Sci.* 2005. V. 62. № 6. P. 670–684.
3. *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.
4. *Букина М. Н., Бакулев В. М., Лисаченко Д. А.* Исследование люминесценции комплекса БТШ70-АТФ- Mg^{2+} и его тепловой денатурации // *Проблемы современной науки и образования.* 2016. № 2 (44). С. 6-10.
5. *Зубова Н. Н., Булавина А. Ю., Савицкий А. П.* Спектральные и физико-химические свойства зеленого (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков // *Успехи биологической химии.* 2003. Т. 43. С. 163-224.
6. *Truong T. B.* Charge transfer to a solvent state. Luminescence studies of tryptophanin aqueous 4.5M CaCl_2 solutions at 300 and 77 K // *J. Phys. Chem.* 1980, Vol. 84, pp. 960-964.
7. *Паркер С.* Фотолюминесценция растворов. // М.: Мир, 1972. С. 247.