

УДК 577.512

Д.В.Усов (6 курс, каф. ЭФ), В.В.Исаев-Иванов, к.ф.-м.н., зам. дир. ОМРБ ПИЯФ РАН

АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МОНОМЕРОВ RESA БЕЛКОВ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С НУКЛЕОТИДНЫМИ КОФАКТОРАМИ

В реакции гомологической рекомбинации бактериальный белок ResA в комплексе с АДФ полимеризуется на одонитевой ДНК (онДНК), образуя пресинаптический комплекс ResA::Mg²⁺::АДФ::онДНК. Пресинаптический комплекс проявляет АДФазную активность и способен инициировать реакцию гомологичного спаривания и обмена нитями с двунитевой ДНК. В работе [3] была также показана АДФазная активность комплекса белка в высокой соли в отсутствие онДНК.

Цель исследования – изучение конформационных изменений мономеров бактериальных ResA белков из *E. coli* и *P. aeruginosa*, а также мутантного ResA белка (resA2278-5) при их взаимодействии с различными нуклеотидными кофакторами, обуславливающими образование пресинаптического комплекса. Исследовались спектры флюоресценции ResA белков, представляющие собой суперпозицию флюоресценции тирозиновых и триптофановых аминокислотных остатков этих белков.

Важно, что 5 тирозиновых остатков локализованы в основном домене белка, а 2 - в С-домене, где локализованы и 2 триптофановых аминокислотных остатка [4]. Тирозиновые остатки С-домена белка гасятся триптофановыми остатками за счет синглет-синглетного переноса энергии. В результате вся тирозиновая флюоресценция происходит за счет основного домена, а триптофановая – за счет С-домена. Для получения спектров флюоресценции тирозиновой и триптофановой составляющей снимали 4 спектра белка для каждого добавленного в систему кофактора - 2 спектра эмиссии от 285 до 450 нМ и от 305 до 450 нМ при возбуждающей длине волны $\lambda = 275$ нМ и $\lambda = 295$ нМ, соответственно, и 2 спектра возбуждения от 240 до 300 нМ и от 240 до 330 нМ при $\lambda = 305$ нМ и $\lambda = 350$ нМ соответственно. Спектры были получены для ResA белков из *E. coli* дикого и мутантного типа (resA2278-5), ResA белка из *P. aeruginosa* и их комплексов с АДФ и АДФ::AlF₄ (негидролизующий аналог АДФ). Подобная серия измерений была также проведена для ResA белка из *E. coli* в условиях 2 М NaCl.

Спектры белков разделялись на тирозиновую и триптофановую составляющие [1] (см. верхний рисунок). Отношение интегральных интенсивностей флюоресценции комплексов ResA белков с АДФ и АДФ::AlF₄ к интенсивности флюоресценции ResA::Mg²⁺ приведено в табл. 1.

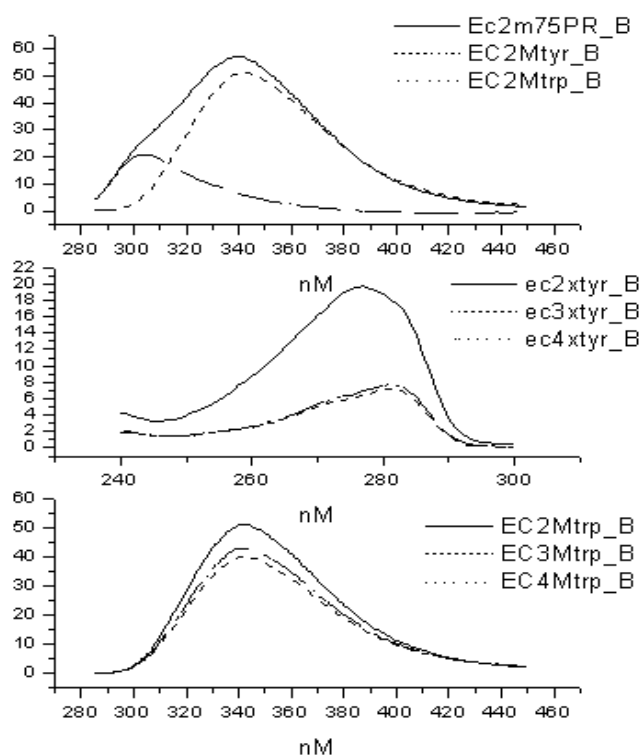


Рис. 1

Таблица 1

Эмиссия	Tyr EC	Tyr PA	Tyr MT	Tyr ECsalt	Trp EC	Trp PA	Trp MT	Trp ECsalt
RecA::Mg ²⁺ ::ADF	55%	56%	55%	66%	85%	78%	78%	64%
RecA::Mg ²⁺ ::ADF::AlF ₄	55%	56%	53%	57%	80%	73%	70%	53%

Образование комплекса белка с АДФ приводит к гашению и тирозиновой, и триптофановой флуоресценции, причем тирозиновой в большей степени. Результаты, полученные по АДФ, находятся в хорошем численном соответствии с ранее полученными результатами для *E. coli* белка [1]. Вероятным механизмом гашения флуоресценции является резонансный перенос энергии от тирозиновых и триптофановых остатков к АДФ, эффективность которого для тирозина существенно выше, чем для триптофана, за счет большего интеграла перекрытия для донор-акцептор пары тирозин-АДФ [1].

Добавление в систему AlF₄ приводит к слабому гашению триптофановой компоненты спектра эмиссии. Тирозиновая составляющая спектра практически не изменяется. Сравнение с результатами из [1] показывает, что ADF::AlF₄ в меньшей степени влияют на флуоресценцию, чем АТФγS. Возможно, это объясняется различием в структуре комплекса белка с двумя различными аналогами АИФ.

В условиях высокой ионной силы тирозиновая и триптофановая составляющие гасятся в равной мере в присутствии АДФ. Подобное отличие может указывать на конформационные изменения в белке при взаимодействии с АДФ в высокой соли, приводящие к уменьшению флуоресценции тирозиновых и триптофановых остатков за счет изменения параметров переноса энергии между ними и АДФ, либо за счет изменения окружения данных остатков. Образование комплекса с АДФ::AlF₄, близкого по структуре к пресинаптическому комплексу RecA::Mg::АТФ::онДНК [2], приводило к дополнительному гашению как тирозиновой, так и триптофановой составляющей флуоресценции.

Таблица 2

Возбуждение	Tyr EC	Tyr PA	Tyr MT	Tyr ECsalt	Trp EC	Trp PA	Trp MT	Trp ECsalt
RecA::Mg ²⁺ ::ADF	37%	46%	42%	46%	72%	82%	74%	54%
RecA::Mg ²⁺ ::ADF::AlF ₄	34%	43%	39%	39%	74%	69%	64%	49%

Анализ данных табл. 2 показывает изменения интегральной интенсивности флуоресценции тирозина и триптофана, аналогичные полученным на основании эмиссионных спектров, однако численные значения гашения интенсивности были больше. Это объясняется неоднородным гашением флуоресценции с максимумом в районе 260 нм, в то время как спектры эмиссии были получены для $\lambda_{ex} = 275$ нм [1]. В отличие от спектров эмиссии, наблюдалось слабое неоднородное гашение тирозиновой компоненты флуоресценции при образовании комплекса с АДФ::AlF₄ по сравнению с комплексом с АДФ, а также большой разброс значений для триптофановой составляющей для трех различных белков. Для установления различий между тремя исследуемыми белками необходимы дальнейшие измерения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Isaev-Ivanov V.V., Kozlov M.G., Baitin D.M., Masui R., Kuramitsu S. and Lanzov V.A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376, (2000),124-140.

2. D.V. Lebedev, D.M. Baitin, Yu.S. Kovalev, A.I. Kuklin, V.Kh. Shalguev, V.A. Lanzov, V.V. Isaev-Ivanov. XII International Conference on Selected Problems of Modern Physics, Dubna (2003).
3. B. F. Pugh and M. M. Cox. *J. Biol. Chem.*, 263, 1988, 76-83.
4. Eisinger, J. *Biochemistry* 8, 1969, 3902-3907.