

**ЖДАНОВА НАДЕЖДА ГРИГОРЬЕВНА**

**Связь фотофизических параметров  
тирозиновых остатков  
в сывороточных альбуминах  
с изменением структуры белка  
под влиянием лигандов и денатурации**

Специальность 01.04.05 – оптика

Автореферат диссертации  
на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре квантовой электроники физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,  
профессор  
**Фадеев Виктор Владимирович**

Официальные оппоненты: **Горелик Владимир Семенович**,  
доктор физико-математических наук,  
(Физический институт имени П.Н. Лебедева  
РАН), г. Москва,  
заведующий лабораторией

**Иванов Андрей Валентинович**,  
доктор физико-математических наук,  
(Российский онкологический научный центр  
имени Н.Н. Блохина РАМН), г. Москва,  
ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов

Защита состоится «12» октября 2016 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 5 (19 корпус НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М.В. Ломоносова), аудитория 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайтах:

[http://istina.msu.ru/media/dissertations/dissertation/3ef/1a9/22478462/Dissertation\\_Zhdanova.pdf](http://istina.msu.ru/media/dissertations/dissertation/3ef/1a9/22478462/Dissertation_Zhdanova.pdf);

[http://www.sinp.msu.ru/ru/system/files/dissertations/dissertaciya\\_zhdanova.pdf](http://www.sinp.msu.ru/ru/system/files/dissertations/dissertaciya_zhdanova.pdf).

Автореферат разослан «5» сентября 2016 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета Д 501.001.45,  
кандидат физико-математических наук

Вохник О.М.

## Общая характеристика работы

Диссертационная работа посвящена экспериментальному исследованию фотофизических параметров тирозиновых остатков в сывороточных альбуминах (на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА) и сывороточного альбумина человека (САЧ)) при связывании лигандов белком и его денатурации.

В качестве основных объектов исследований выбраны два близких по структуре белка (БСА и САЧ), выполняющих в организме транспортную функцию за счёт наличия в их структуре сайтов связывания различных лигандов. В данной работе лигандами называются сравнительно небольшие по размеру и молекулярной массе молекулы, которые могут присоединяться к макромолекуле белка и образовывать комплекс. Присоединение лигандов и другие внешние факторы могут привести к изменению структуры белка, что может отразиться на его функциональной активности и привести к нарушению обмена веществ и другим заболеваниям. Таким образом, разработка быстрой методики определения структурных изменений альбуминов достаточно актуальна с точки зрения медицины и фармакологии.

Наличие в аминокислотных последовательностях БСА и САЧ ароматических аминокислотных остатков (триптофана, тирозина и фенилаланина) позволяет использовать для характеристики структурных изменений указанных белков методы флуоресцентной спектроскопии, основными преимуществами которых является высокая чувствительность и экспрессность. Кроме того, фотофизические параметры указанных остатков, такие как, например, время затухания и форма спектра флуоресценции, чувствительны к их локальной окрестности, что позволяет выявить связь между оптическим откликом и структурными изменениями белков, а также установить физические механизмы, лежащие в её основе.

Обычно в исследованиях собственной флуоресценции альбуминов основное внимание уделяется триптофановой флуоресценции, что обуславливается высоким квантовым выходом данного остатка в белках, а также возможностью его селективного возбуждения, поскольку на длине волны более 295 нм поглощением остальных ароматических аминокислот можно пренебречь. Однако количество триптофановых остатков в белках обычно невелико (так, в САЧ имеется один триптофановый остаток, а в БСА - два), и не всегда структурные изменения белка затрагивают их локальную окрестность, а следовательно, не всегда проявляются в их оптическом отклике. Напротив, тирозиновые остатки распределены по структуре БСА и САЧ более равномерно, что делает флуоресценцию данного типа остатков более привлекательной для характеристики структурных изменений белков.

**Целью** данной диссертационной работы является определение влияния структурных изменений альбуминов на фотофизические параметры тирозиновых остатков и установление физических механизмов такого влияния. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- разработать методику определения вклада тирозиновых остатков в сигнал флуоресценции альбумина;
- выявить изменения структуры белка, влияющие на его тирозиную флуоресценцию; при этом выделить случаи, когда подобные структурные изменения не могут быть зарегистрированы по триптофановой флуоресценции;
- оценить чувствительность тирозиновой флуоресценции к конформационным изменениям альбумина в плазме крови.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Флуоресценция тирозиновых остатков в альбуминах возрастает при специфичном связывании анионного детергента (SDS), а также при денатурации белка (под действием гидрохлорида гуанидина, SDS, катионного детергента СТАВ, этанола). При этом происходит снятие тушения флуоресценции за счёт удаления функциональных групп соседних с тирозином аминокислотных остатков (т.е. за счёт изменения его непосредственной окрестности), а не обуславливается уменьшением эффективности переноса энергии по диполь-дипольному механизму на триптофановые остатки.
2. Кинетика собственной флуоресценции сывороточного альбумина человека (САЧ) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) в нативном состоянии, регистрируемая на длине волны 310 нм при возбуждении пикосекундными лазерными импульсами на длине волны 280 нм, описывается триэкспоненциальной зависимостью. При этом наименьшее время затухания флуоресценции является характеристикой тирозиновых остатков в указанных белках, а оставшиеся времена соответствуют временам дезактивации возбуждённого состояния триптофановых остатков. Данное утверждение справедливо для указанных белков и при добавлении анионного детергента (SDS), когда изменение времени затухания тирозиновой флуоресценции отражает взаимодействие между САЧ и SDS, что позволяет использовать данный фотофизический параметр тирозиновых остатков для характеристики изменения структуры альбуминов при связывании лигандов и денатурации.

3. Флуоресценция тирозиновых остатков альбумина позволяет зарегистрировать структурные изменения в домене I САЧ при специфичном связывании SDS и в домене III САЧ при денатурации гидрохлоридом гуанидина, которые не проявляются в триптофановой флуоресценции.
4. Усиление тирозиновой флуоресценции плазмы крови человека при добавлении анионного детергента (SDS) обусловлено только изменением собственной флуоресценции альбумина из-за его структурных перестроек при специфичном и неспецифичном связывании SDS, при этом изменение флуоресценции тирозиновых остатков других белков, в частности иммуноглобулина гамма (второго по концентрации белка плазмы крови), не обнаружено.

**Научная новизна** диссертационной работы состоит в следующем:

1. Впервые исследовано изменение параметров флуоресценции тирозиновых остатков в триптофан содержащих белках, в том числе, зарегистрировано изменение времени её затухания под действием различных внешних факторов.
2. Впервые выявлены области молекулы альбумина, структурные изменения которых влияют на фотофизические параметры тирозиновых остатков.
3. Впервые показано, что для ряда модельных систем, содержащих альбумин, тирозиновая флуоресценция является индикатором структурных изменений, которые не могут быть зарегистрированы по изменению фотофизических параметров триптофановых остатков.
4. Впервые показано, что низкий квантовый выход флуоресценции тирозиновых остатков в альбуминах является следствием взаимодействия с функциональными группами их локального окружения, а обусловлен переносом энергии на триптофановые остатки по диполь-дипольному механизму.

**Научная и практическая значимость.** В ходе выполнения данной диссертационной работы была изучена зависимость флуоресцентных характеристик тирозиновых остатков в альбуминах для широкого круга систем, позволяющих моделировать специфичное и неспецифичное связывание альбуминов с лигандами, а также их денатурацию. Было показано, что флуоресцентные характеристики тирозиновых остатков зависят от их локальной окрестности, что расширяет возможности оптических методов исследования структуры белков за счёт рассмотрения вклада тирозиновых остатков в собственную флуоресценцию белков. Результаты, полученные в

данной работе показывают возможность разработки нового метода диагностики конформационных изменений белков, основанного на изменении фотофизических параметров тирозиновых остатков в белках при связывании с лигандами, не влияющем на флуоресценцию триптофана. Показано, что определение времени затухания тирозиновой флуоресценции в белке, содержащем триптофановые остатки, перспективно для создания нового метода диагностики патологии, не зависящего от уровня концентрации белков в плазме крови.

**Достоверность** полученных в работе результатов обеспечивается их сопоставлением с независимо полученными результатами других научных групп, опубликованными в рецензируемых журналах. Результаты, представленные в диссертации, получены на основе многократно повторенных экспериментов, проведённых на современном научном оборудовании с использованием современных методов обработки данных. Все используемые в экспериментах измерительные приборы были протестированы и откалиброваны, их инструментальная погрешность определялась независимо в ходе тестовых экспериментов с заведомо предсказуемыми результатами. Значительная часть экспериментальных результатов опубликована в рецензируемых журналах и представлена на российских и международных конференциях.

**Личный вклад автора.** Все полученные в работе результаты являются оригинальными и получены лично автором. Вклад автора заключался в проведении всех представленных в оригинальной части работы экспериментальных исследований, обработки полученных данных, приготовлении всех исследуемых образцов и написании программного кода для обработки данных.

**Публикации.** Основные результаты, полученные в данной работе, опубликованы в двух статьях в рецензируемых журналах и в трёх статьях в сборниках. Список опубликованных статей приведён в конце автореферата.

**Апробация работы.** Результаты работы представлены в 8 докладах на российских и международных конференциях, наиболее значимые из которых: ICONO LAT 2013 (Москва, Россия), Frontiers in Optics 2013 (Орландо, США), Saratov Fall Meeting 2015 (Саратов, Россия). Список основных опубликованных тезисов докладов приведён в конце автореферата.

**Структура диссертационной работы.** Диссертационная работа состоит из введения, четырёх глав, заключения, приложения и списка цитированной литературы. Для облегчения восприятия оригинальной части работы (Главы 2-4) все детали проведённых экспериментов, а также подробное описание методов исследования, используемых в работе, вынесены в приложение. Работа написана на 121 странице и содержит 45 иллюстраций, 11 таблиц и 126 библиографических ссылок.

## Содержание работы

Во **Введении** описывается актуальность диссертационной работы, формулируются цели и задачи работы, отмечается научная новизна и практическая значимость, приводятся выносимые на защиту положения, сведения о публикациях результатов работы, апробации и структуре диссертации.

**Глава 1** «*Фотофизические параметры сывороточных альбуминов в нативном состоянии, при связывании лигандов и денатурации (обзор литературы)*».

В начале главы приводятся основные сведения об альбуминах и их взаимодействии с лигандами. Далее рассматриваются основные работы в области исследования фотофизических параметров ароматических аминокислот (триптофана и тирозина) в растворе и в белках, а также связь этих параметров со структурными изменениями макромолекул. На основании проведённого анализа литературы актуализированы основные ограничения современных оптических методов исследования конформации белков.

Сывороточные альбумины являются основными белками плазмы крови, отвечающими за поддержание осмотического давления и выполняющие в организме транспортную функцию [1]. Одним из лигандов альбумина являются жирные кислоты (ЖК), причём за счёт ограниченной растворимости в воде в плазме крови ЖК присутствуют в комплексе с альбумином [2]. Различные патологические процессы могут приводить к изменению структуры альбумина в плазме крови, в результате чего белок перестаёт выполнять свои функции. Обычно в литературе описывается изучение конформации альбумина в модельных растворах, а результаты таких исследований обобщаются на случай плазмы крови. Среди немногочисленных методов определения состояния альбумина в плазме крови можно выделить метод диагностики сепсиса, онкологических и других заболеваний с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [3] и метод диагностики ишемической болезни сердца по связыванию альбумина с ионами кобальта [4].

В исследованиях модельных растворов альбумина активно используются оптические методы, среди которых значительное внимание уделяется флуоресцентному отклику как собственных флуорофоров белка, так и специальных лигандов (флуоресцентных зондов). Основным преимуществом использования зондов является возможность работы в диапазоне видимого излучения, однако введение в исследуемый образец дополнительных лигандов может затруднять интерпретацию получаемых результатов. Использование собственной флуоресценции, обусловленной наличием в структуре альбуминов ароматических аминокислотных остатков, снимает подобное ограничение.

В экспериментах, направленных на изучение изменений структуры белка под действием различных факторов, обычно анализируется тушение

флуоресценции триптофана, вызванное изменением локальной окрестности данного типа остатков. Триптофановые остатки в белках обладают наиболее длинноволновым поглощением, что даёт возможность их селективного возбуждения: при возбуждении на длине волны более 295 нм поглощением остальных ароматических аминокислотных остатков можно пренебречь [5]. Основным недостатком такого подхода является неравномерное распределение триптофановых остатков по структуре белка, которое может быть снято за счёт рассмотрения флуоресцентного отклика других аминокислот, например, тирозина, распределение аминокислотных остатков которого по структуре альбуминов более равномерно (рис. 1).

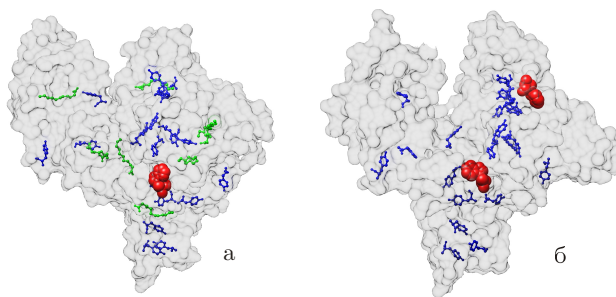


Рис. 1: Трёхмерная структура комплекса САЧ с ЖК (pdb ID: 1EF7 [6] (а) и трёхмерная структура БСА (pdb ID: 3V03 [7]) с обозначением лиганда (зелёным), а также тирозиновых (синим) и триптофановых (красным) остатков. Рисунок построен при помощи программы UCSF Chimera package [8]

Флуоресценция тирозиновых остатков достаточно часто упоминается в работах, посвящённых исследованию собственной флуоресценции белков. При исследовании белков в нативном состоянии, содержащих как тирозиновые, так и триптофановые остатки, было показано, что флуоресценция тирозиновых остатков практически не наблюдается [9] и проявляется при денатурации [10] в виде коротковолнового плеча в спектре собственной флуоресценции в районе 300-310 нм. Основным механизмом тушения тирозиновой флуоресценции в таких работах считается перенос энергии по диполь-дипольному (Фёрстеровскому) механизму с тирозиновых остатков на триптофановые. Оценка показывает, что типичные значения радиуса Фёрстера для такого переноса составляют  $\sim 10-18 \text{ \AA}$  и соответствуют среднему размеру молекул белка [11]. При денатурации структура белка разрушается, что приводит к значительному увеличению расстояния между донорами (тирозиновыми остатками) и акцепторами (триптофановыми остатками).

В то же время в исследованиях белков, не содержащих триптофановые остатки, флуоресценция тирозина также обладает малым по сравнению со



свободной аминокислотой в растворе квантовым выходом, что связано с наличием её тушения в белках за счёт функциональных групп (например, карбоксильной и аминогруппы) соседних аминокислотных остатков [11]. Данный факт указывает на то, что роль переноса энергии с тирозиновых остатков на триптофановые в тушении флуоресценции тирозина в белках в нативном состоянии может быть переоценена. Исследование возможностей использования тирозиновой флуоресценции как количественного индикатора изменения конформации триптофан содержащих белков и составило основу данной диссертационной работы.

**Глава 2** «Исследование фотофизических параметров альбумина в водном растворе для разработки метода регистрации конформационных изменений белка под действием анионного детергента».

Глава посвящена комплексному исследованию системы белок-детергент в водном растворе. В качестве детергента используется додецилсульфат натрия (SDS), модель взаимодействия молекул которого с альбумином, а также сопутствующие структурные изменения молекулы белка, описаны в начале главы. Далее приведены результаты применения оптических методов исследования структуры белка к системе альбумин-SDS. На основании полученных данных делается вывод, что фотофизические параметры тирозиновых остатков позволяют зарегистрировать структурные изменения молекулы альбумина, которые не проявляются в оптическом отклике триптофановых остатков.

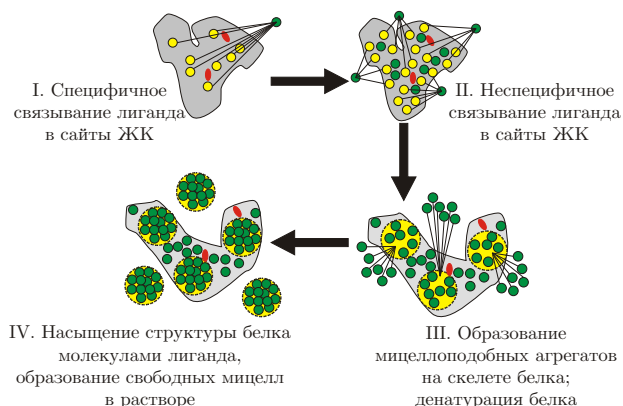


Рис. 2: Изменение структуры молекулы альбумина (БСА) при увеличении концентрации детергента SDS (молекула альбумина - серым, триптофановые остатки - красным, молекулы SDS - зелёным, а их сайты - жёлтым) по работе [12]

Добавление детергента SDS в раствор альбумина позволяет изучать конформационные изменения белка в широких пределах - от незначитель-

ных перестроек в результате связывания в специфичные сайты макромолекулы до её полной денатурации (рис. 2). В данной диссертационной работе использовались следующие фотофизические параметры альбумина:

- форма спектра и интенсивность флуоресценции триптофановых остатков. Данные параметры определялись при помощи регистрации спектров флуоресценции на длине волны 295 нм, где поглощением других аминокислотных остатков, а следовательно, и их флуоресценцией можно пренебречь. Зарегистрированное изменение формы спектров триптофановой флуоресценции является следствием изменения локального электрического поля в направлении длинной оси бокового радикала данного остатка [13] в результате связывания лигандов белком или его денатурации.
- интенсивность флуоресценции тирозиновых остатков. Данный параметр определялся при разложении спектров флуоресценции альбумина, полученных при возбуждении на длине волны 280 нм, с учётом формы спектра флуоресценции триптофановых остатков. Подробное описание методики разложения спектров можно найти в работах [12, 14] и в Приложении в данной диссертационной работе.
- времена затухания флуоресценции триптофановых остатков. Данные параметры определялись при анализе кинетик затухания флуоресценции для длины волны регистрации  $\lambda_{Trp} \sim 350$  нм при возбуждении пикосекундными лазерными импульсами на длине волны 280 нм. Было показано, что минимальная невязка для обработки кинетик флуоресценции при регистрации на длине волны  $\lambda_{Trp}$  достигалась при аппроксимации экспериментально полученных данных биэкспоненциальной зависимостью, характерной для триптофановых остатков.
- время затухания флуоресценции тирозиновых остатков. Данный параметр определялся при анализе кинетик затухания флуоресценции для длины волны регистрации  $\lambda_{Tyr} \sim 315$  нм при возбуждении пикосекундными лазерными импульсами на длине волны 280 нм. Было показано, что минимальная невязка для обработки кинетик флуоресценции при регистрации на длине волны  $\lambda_{Tyr}$  достигалась при аппроксимации экспериментально полученных данных триэкспоненциальной зависимостью. Зависимость двух больших времён от концентрации детергента совпала с таковой для триптофановых остатков, полученных при обработке кинетик при регистрации на длине волны  $\lambda_{Trp}$ , а наименьшее из полученных времён было отнесено к тирозиновым остаткам. Тем самым время затухания тирозиновой флуоресценции в триптофан содержащих белках было определено **впервые**.

- положение 0-0 перехода фенольного кольца и параметр гетерогенности окружения тирозиновых остатков. Данные параметры определялись при анализе четвёртой производной спектров поглощения альбумина по методике, подробно описанной в работах [12, 15, 16] и в Приложении в данной диссертационной работе.

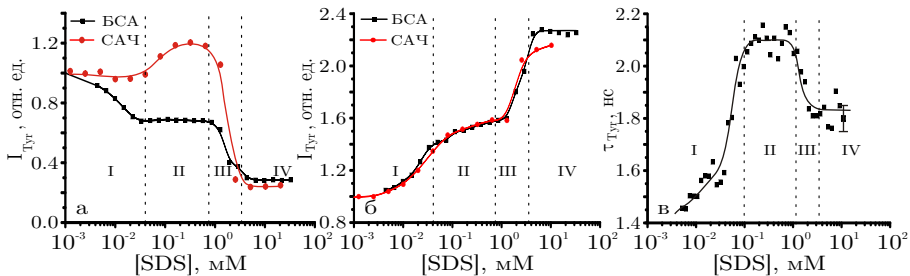


Рис. 3: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции триптофановых (а) и тирозиновых (б) остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным). Концентрация БСА - 4,7 мкМ, САЧ - 4,1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ( $[SDS] = 0$ ). (в) Зависимость от концентрации детергента времени затухания флуоресценции тирозиновых остатков в БСА при регистрации на длине волны  $\lambda_{Tyr} \sim 315$  нм. Концентрация БСА - 3,5 мкМ. Длина волны возбуждения 280 нм

В результате выполнения этой части исследований была поставлена методика определения фотофизических параметров тирозиновых остатков в альбумине - интенсивности и времени затухания флуоресценции, а также положения 0-0 перехода фенольного кольца и параметра гетерогенности окружения остатков, определяемых по четвёртой производной спектров поглощения. Показано, что несмотря на разное поведение зависимости от концентрации детергента интенсивности триптофановой флуоресценции для двух гомологичных белков (БСА и САЧ) (рис. 3 а), тирозиновая флуоресценция меняется одинаково (рис. 3 б), что является следствием сходных структурных изменений гомологичных белков при одинаковом внешнем воздействии. Для первого участка зависимости фотофизических параметров САЧ от концентрации детергента показано, что тирозиновая флуоресценция может давать дополнительную информацию о структурных изменениях белка под влиянием лигандов за счёт равномерного распределения данных остатков по структуре белка (рис. 1). Разнонаправленный характер зависимости времени жизни и интенсивности тирозиновых остатков на участке, соответствующем образованию мицеллоподобных агрегатов на скелете молекул белка (рис. 3 б и в), обусловлен изменением

сечения поглощения (гипохромизмом [17]) данных остатков при структурных перестройках молекулы белка. Совпадение зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции при возбуждении на двух длинах волн (280 нм и 295 нм) показывает, что эффективность переноса энергии по диполь-дипольному (Фёрстеровскому) механизму с тирозиновых остатков на триптофановые не меняется во всём диапазоне концентраций детергента.

**Глава 3 «Фотофизические параметры альбуминов в различных модельных системах»** посвящена результатам исследований, направленных на выявление механизмов изменения фотофизических параметров тирозиновых остатков в белках при различном внешнем воздействии:

- при добавлении в раствор белка катионного детергента (СТАВ) (исследование влияния знака заряда амфифильного соединения на параметры собственной флуоресценции альбуминов);
- при добавлении в раствор белка катионов свинца (исследование влияния связывания металла в субдомен Ia на параметры собственной флуоресценции альбуминов);
- при изменении pH раствора белка (исследование влияния величины поверхностного заряда белка на параметры его собственной флуоресценции);
- при добавлении в раствор белка этанола (исследование влияния полярности растворителя и перестроек в первой гидратационной сфере белка на параметры его собственной флуоресценции);
- при добавлении в раствор гидрохлорида гуанидина ( $GndHCl$ ) (исследование влияния последовательной денатурации доменов альбумина на параметры его собственной флуоресценции).

Результаты экспериментов по исследованию влияния связывания катионного детергента с молекулами сывороточных альбуминов (БСА и САЧ) и их сравнение с аналогичными результатами для анионного детергента показывают, что флуоресценция тирозиновых остатков в белках возрастает при денатурации, причём в данном случае заряд гидрофильной части детергента не важен. Однако на участках специфического и неспецифического связывания усиления тирозиновой флуоресценции не происходит для катионного детергента.

Связывание ионов металла в окрестности ароматических аминокислотных остатков может приводить к увеличению вероятности интеркомбинационной конверсии (т.е. перехода в триpletное состояние) за счёт эффекта тяжёлого атома [18]. При присоединении катионов металла к белку также

может происходить нейтрализация избыточного отрицательного заряда поверхности белка, в результате чего диполь-дипольным притяжением может сменить кулоновское отталкивание и привести к агрегации [19].

Результаты экспериментов по исследованию влияния связывания катионов свинца с молекулами БСА показывают, что относительный вклад тирозиновой флуоресценции БСА не изменяется при связывании катионов свинца, поэтому в данной части диссертационной работы основное внимание уделено триптофановой флуоресценции. Интенсивность триптофановой флуоресценции уменьшается при концентрациях катионов свинца, существенно превышающих предельно допустимые значения для человеческого организма ( $10^{-7}$  М), что не является физиологически релевантными условиями. Тушение флуоресценции также наблюдается и для свободного триптофана в растворе, агрегация которого под действием ионов тяжёлого металла не происходит. Одной из вероятных причин тушения триптофановой флуоресценции является не агрегация, а увеличение вероятности перехода флуорофора в нефлуоресцирующее возбуждённое состояние при взаимодействии с катионами свинца в результате спонтанной фотоионизации флуорофора [20, 21] и/или увеличения вероятности синглет-триплетной конверсии за счёт эффекта тяжёлого атома [18]. Было показано, что характерное время релаксации такого состояния находится в пределах от 1 мс до 0,1 с.

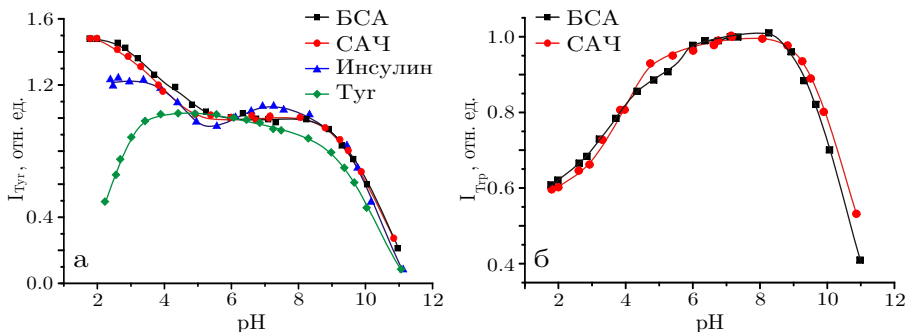


Рис. 4: (а) Зависимость от pH раствора флуоресценции свободного тирозина в растворе (зелёным) и тирозиновых остатков БСА (чёрным), САЧ (красным) и инсулина (синим). (б) Зависимость от pH раствора флуоресценции триптофановых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным). Длина волны возбуждения - 280 нм. Концентрация БСА - 4,5 мкМ, САЧ - 4,3 мкМ, инсулина - 15 мкМ, тирозина - 46 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего pH  $\sim 7$

При изменении pH раствора белка за счёт диссоциации боковых цепей аминокислотных остатков суммарный заряд его поверхности меняется

практически на 40 единиц заряда электрона [22]; при этом белок переходит между своими структурными изомерами [1], что проявляется в изменении его оптического отклика [23]. Было проведено сравнение зависимости интенсивности тирозиновой флуоресценции от pH раствора для трёх объектов - БСА, САЧ и инсулина (бестриптофанового гормона пептидной природы), результаты которого приведены на рис. 4 а. Одинаковое усиление флуоресценции тирозиновых остатков при значениях  $\text{pH} < 4,5$  объясняется снятием тушения флуоресценции за счёт соседних функциональных групп, которое присутствует в нативной структуре белка. Резкое уменьшение интенсивности тирозиновой (рис. 4 а) и триптофановой (рис. 4 б) флуоресценции при  $\text{pH} > 9,0$  объясняется депротонированием боковой цепи тирозиновых остатков. Сравнение полученного в данной работе изменения собственной флуоресценции САЧ с данными для его рекомбинантных доменов [23] показали, что рекомбинантные домены I и II позволяют моделировать структурные переходы в белке, а для структуры домена III (точнее для его оптического отклика), напротив, важно наличие остальных доменов.

Полярность растворителя может быть изменена добавлением в водный раствор спиртов, например, этанола. Известно, что в зависимости от концентрации этанола молекулы спирта могут связываться с белком [24, 25], изменять структуру водородных связей между белком и молекулами растворителя, вытеснять молекулы воды из первой гидратационной сферы [26], а также приводить к образованию интермедиата белка и вызывать его агрегацию [24].

В данной диссертационной работе было показано образование интермедиата белка (с помощью флуоресцентного зонда Нильского красного, рис. 5 а) и зарегистрирована его агрегация (по увеличению мутности раствора). Анализ приведённых в данной части результатов позволяет сделать вывод, что флуоресценция тирозиновых остатков чувствительна к изменению структуры альбумина при образовании интермедиата (для  $[\text{EtOH}] < 12\% \text{ (v/v)}$ ), которое не может быть зарегистрировано в БСА и САЧ по триптофановой флуоресценции (рис. 5 б), а следовательно, происходит вдали от триптофановых остатков, например, в домене III.

Для изучения влияния структурных перестроек домена III на флуоресценцию тирозиновых остатков в альбуминах в растворы исследуемых белков был добавлен гидрохлорид гуанидина ( $\text{GndHCl}$ ). Известно, что при увеличении концентрации  $\text{GndHCl}$  в растворе альбумина наблюдается последовательное разрушение структуры белка, причём наименьшей стабильностью обладает домен III [27]. Результаты, полученные в данной части диссертационной работы показывают, что флуоресценция тирозиновых остатков чувствительна к изменению структуры альбумина в домене III и позволяет регистрировать изменения структуры белка, которые не влияют на флуоресценцию триптофановых остатков БСА и САЧ. Из распределения

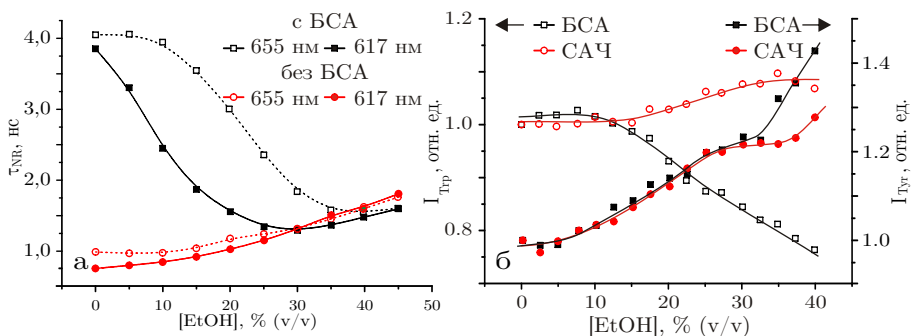


Рис. 5: (а) Зависимость от концентрации этанола времени затухания флуоресценции Нильского красного в присутствии (чёрным) и в отсутствии (красным) БСА. Длина волны возбуждения - 510 нм. Длина волны регистрации - 617 нм (заполненные символы) и 655 нм (незаполненные символы). Концентрация БСА - 15 мкМ, Нильского красного - 5,6 мкМ. (а) Зависимость от концентрации этанола интенсивности флуоресценции триптофановых (незаполненные символы) и тирозиновых (заполненные символы) остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным). Длина волны возбуждения 280 нм. Концентрация БСА - 4,7 мкМ, САЧ - 4,1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию этанола в растворе ( $[EtOH] = 0$ )

тирозиновых остатков по структуре БСА и САЧ (рис. 1) видно, что в субдомене IIIб тирозиновые остатки отсутствуют. На основании этого можно конкретизировать, что при денатурации домена III альбумина тирозиновая флуоресценция позволяет зарегистрировать структурные изменения в субдомене IIIа.

**Глава 4 «Тирозиновая флуоресценция как индикатор конформационных изменений альбумина в плазме крови»** посвящена исследованию тирозиновой флуоресценции плазмы крови и её изменению при моделировании с помощью детергента SDS связывания жирных кислот (ЖК) альбумином. В данной главе приводятся основные сведения о концентрации ЖК в плазме крови в норме и при патологии, а также результаты экспериментов с плазмой крови и модельными растворами её основных белков (альбумина и иммуноглобулина гамма, IgG) (рис. 6). На основании приведённых результатов делается вывод, что увеличение интенсивности тирозиновой флуоресценции при добавлении анионного детергента (SDS) полностью определяется изменением вклада альбумина, вызванным перестройкой его структуры в результате специфичного и неспецифичного связывания с SDS (рис. 6 б). Далее, в главе приводится описание модели, с помощью которой была проведена оценка изменения сечения тирозиновой флуоресценции САЧ при специфичном связывании лиганда, близкого по

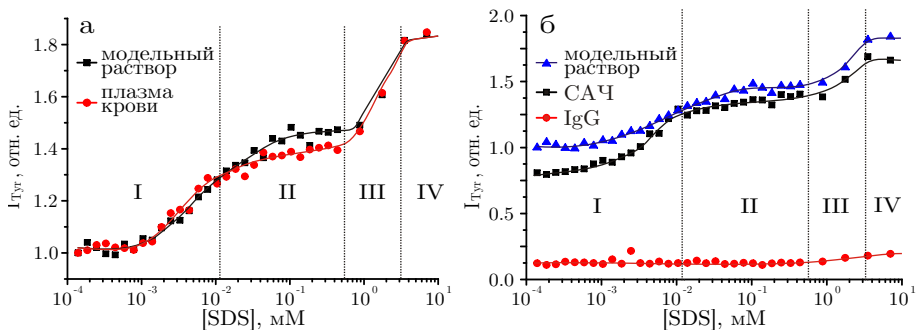


Рис. 6: (а) Зависимость от концентрации детергента интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков плазмы крови (красным) и модельной смеси её основных белков (чёрным). (б) Зависимость от концентрации детергента интенсивности флуоресценции САЧ (чёрным), IgG (красным) и их модельной смеси белков (синим). Длина волны возбуждения - 280 нм. Концентрация САЧ - 1,27 мкМ, IgG - 0,14 мкМ. Значения указанных интенсивности нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ( $[\text{SDS}] = 0$ )

своим свойствам к ЖК. Увеличение эффективного сечения флуоресценции тирозиновых остатков при присоединении одной молекулы SDS составляет  $(37 \pm 4)\%$ , что позволяет считать тирозиновую флуоресценцию достаточно чувствительным индикатором образования комплекса САЧ-ЖК в растворе.

**Приложение.** Для облегчения восприятия оригинальной части работы (Главы 2-4) все детали проведённых экспериментов, а также подробное описание методов исследования, используемых в работе, вынесены в приложение, которое можно найти непосредственно перед списком цитированной литературы.

**Заключение.** Исследования, проведённые в данной диссертационной работе, относятся к экспериментальному изучению вопроса о связи флуоресцентного отклика белков с их структурными изменениями, вызванными денатурацией, связыванием с лигандами или образованием интермедиатов. Особое внимание при этом было уделено флуоресценции тирозиновых остатков, которая, хотя обычно и не используется в подобного рода исследованиях, но даёт возможность зарегистрировать конформационные изменения, не проявляющиеся в триптофановой флуоресценции.

**Основные результаты,** полученные в работе, состоят в следующем:

1. Проведены экспериментальные исследования зависимости фотофизических параметров тирозиновых остатков в альбуминах при изменении структуры белка при специфичном и неспецифичном связывании



вании анионного детергента (SDS), моделирующего взаимодействие белка с основным классом его лигандов - жирными кислотами (ЖК). Показано, что в данном случае тирозиновая флуоресценция позволяет зарегистрировать изменение структуры домена I сывороточного альбумина человека (САЧ), которое не отражается на флуоресцентных характеристиках триптофанового остатка данного белка.

2. Проведены экспериментальные исследования зависимости фотофизических параметров тирозиновых остатков в альбуминах при изменении структуры белка при специфичном и неспецифичном связывании катионного детергента (СТАВ). Показано, что в данном случае тирозиновая флуоресценция не позволяет зарегистрировать изменение структуры САЧ. На основании подобного отличия от анионного детергента был сделан вывод, что при связывании амфифильных соединений для изменения интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков важен заряд лиганда. При этом усиление флуоресценции в случае анионного лиганда связано с изменением распределения зарядов в окрестности тирозиновых остатков.
3. Проведены экспериментальные исследования зависимости фотофизических параметров тирозиновых остатков при денатурации белка детергентами. Было показано, что резкое увеличение интенсивности тирозиновой флуоресценции для указанных структурных изменений не зависит от знака заряда денатурирующего агента, а обусловлено образованием мицеллоподобных агрегатов на скелете молекулы белка. Анализ спектров поглощения и кинетик флуоресценции белка показал, что усиление интенсивности тирозиновой флуоресценции не связано с уменьшением эффективности переноса энергии на триптофан по диполь-дипольному механизму, а обусловлено гипохромизмом тирозиновых остатков.
4. Проведены экспериментальные исследования влияния изменений в первой гидратационной сфере молекулы белка на флуоресценцию тирозиновых остатков. Показано, что перераспределение водородных связей между поверхностными аминокислотами и молекулами растворителя приводит к усилению флуоресценции тирозиновых остатков за счёт изменения их локальной окрестности, а именно, за счёт образования водородных связей с соседними функциональными группами.
5. Проведены экспериментальные исследования влияния последовательной денатурации доменов альбумина под действием гидрохлорида гуанидина. Показано, что при разрушении структуры белка снимается тушение тирозиновой флуоресценции за счёт удаления соседних с тирозиновыми остатками функциональных групп, причём такое

снятие тушения флуоресценции позволяет выявить структурные изменения в домене III, которые не могут быть зарегистрированы по триптофановой флуоресценции САЧ.

6. Проведены экспериментальные исследования влияния анионного детергента (SDS), моделирующего связывание альбумина и ЖК, на тирозиновую флуоресценцию плазмы крови, а также модельной смеси основных белков плазмы крови (альбумина и иммуноглобулина гамма). Показано, что изменение интенсивности тирозиновой флуоресценции плазмы крови при добавлении SDS полностью обусловлено структурными изменениями альбумина, связанными с образованием комплекса САЧ-SDS. Проведена оценка чувствительности тирозиновой флуоресценции к связыванию лигандов, близких к ЖК. Показано, что среднее увеличение сечения флуоресценции тирозиновых остатков при присоединении одного лиганда составляет 37%.

Таким образом, проведённое в рамках диссертационной работы исследование показывает, что тирозиновая флуоресценция является индикатором структурных изменений альбумина как в растворе, так и в плазме крови, причём в работе выделен ряд случаев, когда подобное изменение структуры невозможно зарегистрировать по триптофановой флуоресценции.

### Список публикаций по теме диссертации

1. (а) *И.А. Сергеева, Е.А. Ширшин, В.В. Гибизова, Г.П. Петрова, Н.Г. Жданова, С.А. Кургузенков, Е.А. Папиш, В.В. Фадеев* Влияние катионов свинца на флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе // *Оптика и спектроскопия*. - 2013. - т. 115, №. 2. - С. 22-27.  
(б) *I.A. Sergeeva, E.A. Shirshin, N.G. Zhdanova, V.V. Gibisova, G.P. Petrova, S.A. Kurguzenkov, and V.V. Fadeev* The effect of lead cations on the fluorescence characteristics of bovine serum albumin in aqueous solution // *Optics and Spectroscopy*. - 2013. - Vol. 115, no. 2. - Pp. 171-176.
2. *N.G. Zhdanova, E.A. Shirshin, E.G. Maksimov, I. M. Panchishin, A.M. Saletsky, and V.V. Fadeev* Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin // *Photochemical and Photobiological Sciences*. - 2015. - Vol. 14, no. 5. - Pp. 897-908.
3. *N. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, and V.V. Fadeev* Study of tyrosine to tryptophan energy transfer in human serum albumin in presence of surfactant via steady-state, nonlinear and time-resolved fluorescence techniques // *Frontiers in Optics, OSA Technical Digest*

(online) (Optical Society of America, 2013), paper FTu1D.4, 2013 - Орландо, США.

4. **N.G. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, V.V. Fadeev, A.A. Maskevich** On the possibility of indicating protein conformational changes via energy transfer between intrinsic fluorophores // In: *Nano-structures for Optics and Photonics*, B. Di Bartolo, J. Collins, L. Silvestri, eds. - Springer, 2015. - Pp. 475-476.
5. **N. Zhdanova, E. Shirshin, V. Fadeev, A. Priezhev** SDS-binding assay based on tyrosine fluorescence as a tool to determine binding properties of human serum albumin in blood plasma // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), p. 991713, 2016 - Саратов, Россия.

### Доклады на конференциях по теме диссертации

1. **N.G. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, A.I. Panchishin, V.V. Fadeev** Surfactant-induced changes in human serum albumin's structure as studied by laser fluorimetry // International OSA Network of Students IONS-13 – Zurich, Switzerland: 2013.
2. **Н.Г. Жданова** Внутримолекулярный перенос энергии в сывороточном альбумине как индикатор конформационных изменений //Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013», Секция «Физика» – Москва, Россия: 2013.
3. **Е.А. Ширшин, Н.Г. Жданова, Т.Н. Тихонова, В.В. Фадеев** «Диагностика структурных характеристик сывороточного альбумина человека с использованием лазерной флуоресцентной спектроскопии», Научная конференция «Ломоносовские чтения 2013» Секция «Физика», 15-24 апреля 2013 – Москва, Россия
4. **N.G. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, V.V. Fadeev** Tyrosine to tryptophan energy transfer in human serum albumin as an indicator of conformational changes // International Conference on Lasers, Applications, and Technologies (LAT-2013) –Moscow, Russia: 2013.
5. **N.G. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, V.V. Fadeev, A.A. Maskevich** On the possibility of indicating protein conformational changes via energy transfer between intrinsic fluorophores // 30th Course of NATO Advanced Study Institute: “Nano-structures for Optics and Photonics” – Erice, Italy: 2013.

6. **N. Zhdanova, E.A. Shirshin, I.M. Panchishin, V.V. Fadeev** Study of Tyrosine to Tryptophan Energy Transfer in Human Serum Albumin in Presence of Surfactant via Steady-State, Nonlinear and Time-Resolved Fluorescence Techniques // *Frontiers in Optics – Orlando, USA: 2013.*
7. **N. Zhdanova, E. Shirshin, A. Priezzhev, V. Fadeev** SDS-binding as a tool to indicate albumin conformational changes in human blood plasma // *Advanced Laser Technologies – Faro, Portugal: 2015.*
8. **N. Zhdanova, E. Shirshin, A. Priezzhev** Albumin conformational changes in human blood plasma monitored by SDS-binding assay // *Saratov Fall Meeting, International Symposium “Optics and Biophotonics” – Saratov, Russia: 2015.*

## Список литературы

- [1] *Peters T.* Serum albumin // *Advances in protein chemistry.* — 1985. — Vol. 37. — Pp. 161–245.
- [2] *Cistola D. P., Small D. M.* Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance study. // *Journal of Clinical Investigation.* — 1991. — Vol. 87, no. 4. — Pp. 1431–1441.
- [3] *Muravsky V., Gurachevskaya T., Berezenko S., Schnurr K., Gurachevsky A.* Fatty acid binding sites of human and bovine albumins: Differences observed by spin probe ESR // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* — 2009. — Sep. — Vol. 74, no. 1. — Pp. 42–47.
- [4] *Fanali G., di Masi A., Trezza V., Marino M., Fasano M., Ascenzi P.* Human serum albumin: from bench to bedside // *Molecular Aspects of Medicine.* — 2012. — Vol. 33, no. 3. — Pp. 209–290.
- [5] *Fasman G. D., Sober H. A. et al.* Handbook of biochemistry and molecular biology. — CRC press Cleveland, 1977. — Vol. 1.
- [6] *Bhattacharya A. A., Grüne T., Curry S.* Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin // *Journal of molecular biology.* — 2000. — Vol. 303, no. 5. — Pp. 721–732.
- [7] *Majorek K. A., Porebski P. J., Dayal A., Zimmerman M. D., Jablonska K., Stewart A. J., Chruszcz M., Minor W.* Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins // *Molecular immunology.* — 2012. — Vol. 52, no. 3. — Pp. 174–182.

- [8] *Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // *Journal of computational chemistry*. — 2004. — Vol. 25, no. 13. — Pp. 1605–1612.
- [9] *Teale F.* The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution // *Biochemical Journal*. — 1960. — Vol. 76, no. 2. — P. 381.
- [10] *Steinhardt J., Krijn J., Leidy J. G.* Differences between bovine and human serum albumins: binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. // *Biochemistry*. — 1971. — oct. — Vol. 10, no. 22. — Pp. 4005–15.
- [11] *Ross J. A., Laws W. R., Rousslang K. W., Wyssbrod H. R.* Tyrosine fluorescence and phosphorescence from proteins and polypeptides // *Topics in fluorescence spectroscopy*. — Springer US, 2002. — Pp. 1–64.
- [12] *Zhdanova N. G., Shirshin E. A., Maksimov E. G., Panchishin I. M., Saletsky A. M., Fadeev V. V.* Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin // *Photochemical & Photobiological Sciences*. — 2015. — Vol. 14, no. 5. — Pp. 897–908.
- [13] *Callis P.* Predicting fluorescence lifetimes and spectra of biopolymers. // *Methods in enzymology*. — 2010. — Dec.. — Vol. 487. — Pp. 1–38.
- [14] *Eisenhawer M., Cattarinussi S., Kuhn A., Vogel H.* Fluorescence resonance energy transfer shows a close helix-helix distance in the transmembrane M13 procoat protein. // *Biochemistry*. — 2001. — oct. — Vol. 40, no. 41. — Pp. 12321–8.
- [15] *Bray M. R., Carriere A., Clarke A. J.* Quantification of tryptophan and tyrosine residues in proteins by fourth-derivative spectroscopy // *Analytical biochemistry*. — 1994. — Vol. 221, no. 2. — Pp. 278–284.
- [16] *Padrós E., Morros A., Mañosa J., Duñach M.* The state of tyrosine and phenylalanine residues in proteins analyzed by fourth-derivative spectrophotometry // *The FEBS Journal*. — 1982. — Vol. 122, no. 1. — Pp. 117–122.
- [17] *Vekshin N., Vincent M., Gallay J.* Tyrosine hypochromism and absence of tyrosine-tryptophan energy transfer in phospholipase A2 and ribonuclease T1 // *Chemical Physics*. — 1993. — apr. — Vol. 171, no. 1-2. — Pp. 231–236.
- [18] *Santos M. N. B.* External heavy-atom effect on fluorescence kinetics // *PhysChemComm*. — 2000. — Vol. 3, no. 5. — Pp. 18–23.

- [19] Petrova G. P., Petrusevich Y. M., Ten D. I. Formation of dipole complexes in protein solutions with low concentrations of heavy metal ions: diagnostics by the method of laser radiation scattering // *Quantum electronics*. — 2002. — Vol. 32, no. 10. — Pp. 897–901.
- [20] Sherin P. S., Snytnikova O. A., Tsentalovich Y. P. Tryptophan photoionization from prefluorescent and fluorescent states // *Chemical physics letters*. — 2004. — Vol. 391, no. 1. — Pp. 44–49.
- [21] Fadeev V. V., Shirshin E. A. Nonlinear laser fluorescence spectroscopy of natural organic compounds // *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods*. — Springer, 2013. — Pp. 1255–1288.
- [22] Böhme U., Scheler U. Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR // *Chemical Physics Letters*. — 2007. — Vol. 435, no. 4. — Pp. 342–345.
- [23] Dockal M., Carter D. C., Rüker F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275, no. 5. — Pp. 3042–3050.
- [24] Taboada P., Barbosa S., Castro E., Gutiérrez-Pichel M., Mosquera V. Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents // *Chemical Physics*. — 2007. — Vol. 340, no. 1–3. — Pp. 59–68.
- [25] Avdulov N. A., Chochina S. V., Daragan V. A., Schroeder F., Mayo K. H., Wood W. G. Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: a fluorescent and  $^{13}\text{C}$  NMR multiplet relaxation study // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35, no. 1. — Pp. 340–347.
- [26] Dwyer D., Bradley R. Chemical properties of alcohols and their protein binding sites // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. — 2000. — Vol. 57, no. 2. — Pp. 265–275.
- [27] Ahmad B., Ahmed M. Z., Haq S. K., Khan R. H. Guanidine hydrochloride denaturation of human serum albumin originates by local unfolding of some stable loops in domain III // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. — 2005. — Vol. 1750, no. 1. — Pp. 93–102.

Подписано в печать 07.07.2016

Формат 60x90 1/16

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Объём: усл. печ. л. 1,5

Тираж 100 экз. Заказ №3325.

Отдел полиграфии Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова  
119192 Москва, Ломоносовский проспект 27.