

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук,

Научный руководитель
доктор физико-математических наук,
профессор Фадеев В.В.

МОСКВА - 2016

Оглавление

| | |
|---|-----------|
| Введение | 5 |
| Глава 1. Фотофизические параметры сывороточных альбуминов в нативном состоянии, при связывании лигандов и денатурации (обзор литературы) | 10 |
| § 1.1 Альбумин. Особенности структуры молекулы и основные лиганды | 10 |
| 1.1.1 Структура молекулы альбумина | 12 |
| 1.1.2 Изменение структуры молекулы альбумина при патологических изменениях в организме человека | 13 |
| § 1.2 Фотофизические параметры молекул | 15 |
| 1.2.1 Электронные переходы в молекулах | 15 |
| 1.2.2 Электронные состояния ароматических соединений | 18 |
| § 1.3 Оптические методы исследования структуры белков | 23 |
| 1.3.1 Абсорбционные методы | 24 |
| 1.3.2 Флуоресцентные методы | 26 |
| Глава 2. Исследование фотофизических параметров альбумина в водном растворе для разработки метода регистрации конформационных изменений белка под действием анионного детергента | 31 |
| § 2.1 Изменение структуры альбумина при взаимодействии с детергентами | 31 |
| § 2.2 Диагностика конформационных изменений альбумина в присутствии детергента методом стационарной флуоресцентной спектроскопии | 32 |
| § 2.3 Диагностика конформационных изменений альбумина в присутствии детергента абсорбционными методами | 39 |
| § 2.4 Диагностика конформационных изменений альбумина в присутствии детергента с помощью время-разрешённой флуоресцентной спектроскопии | 41 |

- § 2.5 Структурные изменения молекулы альбумина при его анфолдинге, приводящие к усилению флуоресценции тирозиновых остатков 44
- § 2.6 Выводы по главе 2 46

Глава 3. Фотофизические параметры альбуминов в различных модельных системах 48

- § 3.1 Влияние связывания катионного детергента на собственную флуоресценцию альбуминов 49
- § 3.2 Влияние связывания ионов двухвалентных металлов на собственную флуоресценцию альбуминов 52
- 3.2.1 Влияние ионной силы на собственную флуоресценцию альбуминов 53
- 3.2.2 Влияние катионов свинца на собственную флуоресценцию альбумина 53
- § 3.3 Собственная флуоресценция альбумина в зависимости от рН раствора 57
- 3.3.1 Изменение структуры белка в зависимости от рН раствора 58
- 3.3.2 Изменение флуоресценции свободных ароматических аминокислот (триптофана и тирозина) в зависимости от рН раствора 61
- 3.3.3 Изменение собственной флуоресценции за счёт структурных переходов молекул сывороточных альбуминов в зависимости от рН раствора 63
- § 3.4 Собственная флуоресценция альбумина в присутствии этанола . 65
- 3.4.1 Изменение структуры альбумина в присутствии этанола . 66
- 3.4.2 Определение интермедиата БСА в водно-этанольном растворе по флуоресценции Нильского красного 68
- 3.4.3 Изменение оптических свойств альбумина в присутствии этанола 69
- § 3.5 Собственная флуоресценция альбумина при денатурации гидрохлоридом гуанидина 72
- 3.5.1 Изменение структуры альбумина под действием гидрохлорида гуанидина 73
- 3.5.2 Изменение оптических свойств альбумина под действием гидрохлорида гуанидина 75
- § 3.6 Выводы по главе 3 76

| | |
|--|------------|
| Глава 4. Тирозиновая флуоресценция как индикатор конформационных изменений альбумина в плазме крови | 79 |
| § 4.1 Концентрация жирных кислот в плазме крови | 79 |
| § 4.2 Тирозиновая флуоресценция плазмы крови | 80 |
| § 4.3 Оценка увеличения интенсивности тирозиновой флуоресценции альбумина при присоединении лигандов в сайты жирных кислот | 83 |
| § 4.4 Выводы по главе 4 | 86 |
| Заключение | 88 |
| Приложение | 91 |
| П.1 Оптические методы исследования структуры сложных органических соединений и их реализация в данной работе | 91 |
| П.1.1 Стационарная флуоресцентная спектроскопия | 91 |
| П.1.2 Время-разрешённая флуоресцентная спектроскопия | 98 |
| П.1.3 Абсорбционная спектроскопия | 100 |
| П.2 Приготовление образцов | 104 |
| Литература | 108 |

Введение

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 выявить 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**:

1. разработать методику определения вклада тирозиновых остатков в сигнал флуоресценции альбумина;
2. выявить изменения структуры белка, влияющие на его тирозиновую флуоресценцию; при этом выделить случаи, когда подобные структурные изменения не могут быть зарегистрированы по триптофановой флуоресценции;
3. 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 изменения 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.
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 структур-

ных 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 не 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, 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, независимого от уровня концентрации белков в плазме крови.

Достоверность полученных в работе результатов обеспечивается их сопоставлением с результатами независимых 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 на 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. В первой главе приводится обзор литературы, посвящённой структурным изменениям альбуминов при различных воздействиях и исследованиям этих изменений оптическими методами. Во второй главе описана методика определения фотофизических параметров белков и результаты её применения к системе альбумин - анионный детергент (SDS). В третьей главе приведены результаты комплексного исследования влияния различных соединений на собственную флуоресценцию альбумина. При этом для удобства восприятия в данной главе приводится краткий обзор имеющейся литературы по каждой из исследуемых систем. Четвёртая глава посвящена исследованию изменения структуры альбумина в реальной матрице - в плазме крови. В заключении данной работы подводятся итоги проведённого исследования и акцентируется внимание читателя на его основных результатах. 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. Работа написана на 121 странице и содержит 45 иллюстраций, 11 таблиц и 126 библиографических ссылок.

ГЛАВА 1

Фотофизические параметры сывороточных альбуминов в нативном состоянии, при связывании лигандов и денатурации (обзор литературы)

Данная глава посвящена основным свойствам и функциям альбумина в растворе и в плазме крови. В ней также рассмотрены основные работы в области исследования фотофизических параметров ароматических аминокислот (триптофана и тирозина) в растворе и в белках, а также их связь со структурными изменениями макромолекул. Актуализированы основные ограничения современных методов исследования конформации белков. В конце главы сформулирована цель диссертационной работы.

§ 1.1. Альбумин. Особенности структуры молекулы и основные лиганды

Сывороточные альбумины - глобулярные белки плазмы крови, выполняющие в организме ряд функций, среди которых можно выделить поддержание осмотического давления [1] и транспортировку большого количества лигандов (лекарств, жирных кислот (ЖК) и других метаболитов) [1–3]. Высокая способность альбумина связывать различные лиганды обусловлена наличием нескольких основных сайтов связывания, приведённых в таблице 3 в работе [4]. Являясь достаточно большой молекулой, альбумин не может проникать через мембраны клеток и сосудов, поэтому его транспортная функция заключается, скорее, не в адресной доставке лекарств, а в их аккумуляции: чем сильнее лекарство связывается с альбумином, тем дольше оно находится в крови в составе комплекса с белком [5]. Альбумины относятся к хорошо изученному типу белков, которые обычно используются в модельных исследованиях изменения конформации макромолекул при различных внешних воздействиях (изменении pH и температуры раствора, добавлении различных лигандов или денатурирующих агентов). Концентрация альбумина в плазме крови человека равна примерно 50 г/л, что по массовой концентрации составляет около 70% всех белков.

Связывание альбумином различных лигандов может быть охарактеризовано следующими параметрами, зависящими не только от типа лиганда, но и от наличия других веществ в растворе, а также от конформации белка:

- *числом сайтов* для лиганда (может меняться при наличии конкурирующего лиганда),
- *константой (-ами) связывания* в данный (-ые) сайт (-ы) связывания (может меняться при изменении конформации как в окрестности сайта, так и всего белка в целом).

Параметры связывания лигандов необходимы при разработке лекарств, методов лечения и диагностики заболеваний и могут быть определены по известным значениям концентрации лиганда и белка в связанном и в свободном состоянии.

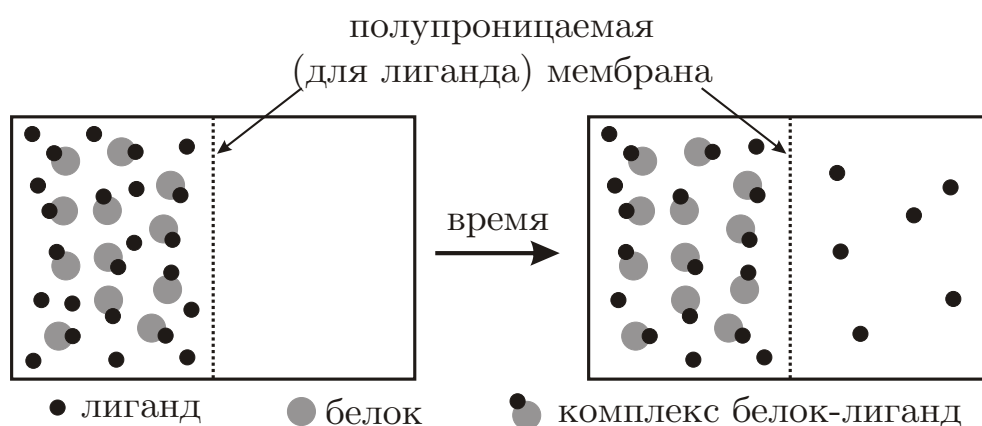


Рис. 1.1: Схема метода равновесного диализа для определения концентрации лиганда в свободном состоянии

Одним из прямых методов определения концентрации несвязанного лиганда является метод равновесного диализа [6], суть которого схематично изображена на рис. 1.1. Исследуемая смесь белка и лиганда помещается в одну из частей кюветы, разделённой полупроницаемой для молекул лиганда мембраной. При этом концентрации белка и лиганда подбираются так, чтобы весь белок был в комплексе с лигандом. С течением времени в обеих частях кюветы происходит выравнивание концентрации лиганда в свободном состоянии, т.к. белок не в состоянии пройти сквозь мембрану. По истечении времени, необходимого для такого выравнивания концентраций, определяется концентрация свободного лиганда в правой части кюветы

(рис. 1.1). Далее, по известным значениям концентрации белка и лиганда в исходной смеси можно определить концентрацию комплексов белок-лиганд, среднее число лигандов на один белок и эффективную константу связывания [5]. Аналогичным образом можно измерить концентрацию свободного лиганда методом ультрацентрифугирования и ультрафильтрации, в которых процесс разделения ускоряется за счёт прикладываемого давления.

1.1.1. Структура молекулы альбумина

Первичная последовательность сывороточного альбумина человека (САЧ) содержит 585 аминокислотных остатков, 75 % из которых полностью (по данным сравнения аминокислотных последовательностей белков [7]) соответствуют бычьему сывороточному альбумину (БСА). На основании этого считается, что указанные белки обладают сходной способностью к связыванию различных лигандов и их конформационные изменения под действием различных факторов также близки.

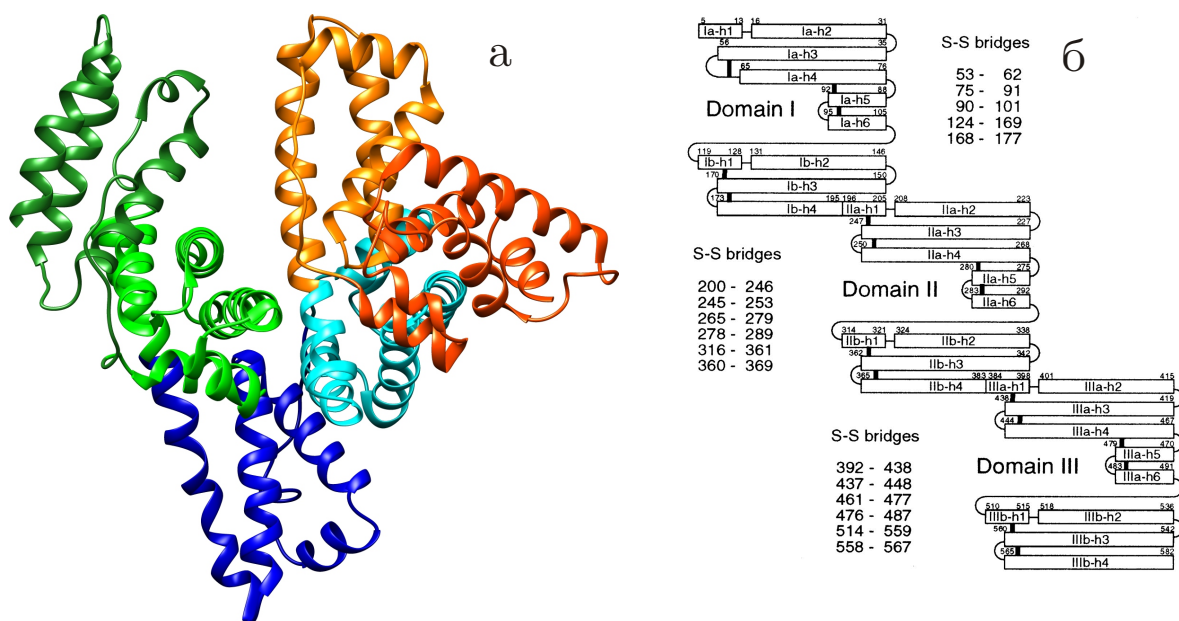


Рис. 1.2: (а) Трёхмерная структура САЧ с указанием доменов и субдоменов: Ia (красно-оранжевым), Ib (оранжевым), IIa (голубым), IIb (тёмно-синим), IIIa (салатовым), IIIb (тёмно-зелёным) по структуре pdb ID: 1A06 [8]. Рисунок построен при помощи программы USCF Chimera package [9]. (б) Расположение дисульфидных мостиков в структуре САЧ (по работе [8])

Одним из методов, который позволяет зарегистрировать структуру белков как в свободном состоянии, так и в комплексе с лигандами, является рентгеноструктурный анализ. Сравнение кристаллических структур для одного и того же белка, получаемых в разных условиях, данные о сохранении его активности в кристалле, а также результаты анализа белка в растворе методом ядерного магнитного резонанса позволяют считать, что структура белка в растворе и в кристалле практически совпадают, а отличия в основном заключаются в относительном положении некоторых подвижных частей молекулы [10]. На основании этого считается, что при физиологических условиях в водном растворе БСА и САЧ принимают форму, похожую на сердце (в англоязычной литературе - heart-like shape), которую можно описать как правильную треугольную призму (сторона основания - 8 нм, высота - 3 нм) с небольшой полостью (рис. 1.2 а) [8, 11].

В структуре альбуминов (рис. 1.2 а) принято выделять три гомологичных между собой домена, которые в свою очередь делятся на два субдомена (а и б). Структура белков стабилизирована 17 дисульфидными мостиками, образованными аминокислотными остатками цистеина (рис. 1.2 б). Помимо 34 цистеиновых остатков, задействованных в образовании дисульфидных мостиков, в структуре альбумина содержится некомпенсированный цистеиновый остаток в позиции Cys34, расположенный в субдомене Ia. Сравнение первичной структуры БСА и САЧ показывает, что основным отличием структуры домена I БСА и САЧ с точки зрения оптических свойств является наличие в БСА дополнительного триптофанового остатка в позиции Trp134.

1.1.2. Изменение структуры молекулы альбумина при патологических изменениях в организме человека

Изменение конформации альбумина в плазме крови может быть вызвано связыванием различных лигандов, агрегированием и химическими модификациями. Наиболее важными конформационными изменениями альбумина в плазме крови, с точки зрения транспортной функции, является его окисление в результате гликирования [12]. Гликированием называется химическая модификация альбумина, в результате неэнзиматического связывания глюкозы [13]. Такое связывание возможно, если уровень глюкозы в крови по отношению к концентрации естественных переносчиков глюкозы превышает норму. В результате гликирования может происходить:

- образование конечных продуктов гликирования (в англоязычной литературе - advanced glycation end-products) [13]. В этом случае белок, оставаясь в мономерном состоянии, модифицируется и уже не может связывать лиганды, а следовательно, выполнять транспортную функцию.
- окисление белка [4]. В этом случае параметры связывания меняются из-за изменения боковых радикалов аминокислотных остатков, которые формируют сайты связывания лиганда.
- образование агрегатов белка, в том числе и фибрилл [14]. Фибриллами называются нитевидные агрегаты белков, насыщенные бета-структурой и достигающие в длину нескольких микрометров [15, 16]. Такие агрегаты мешают белкам выполнять свои функции в организме, приводя к серьёзным заболеваниям [17].

Несмотря на многочисленные работы в области изучения альбуминов в растворе, лишь небольшое количество работ посвящено изучению структуры белка в реальных условиях - в плазме крови. Среди немногочисленных методов определения состояния альбумина в плазме крови можно выделить метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [18] и метод диагностики ишемической болезни сердца по связыванию альбумина с ионами кобальта [4].

Метод ЭПР, используемый для диагностики заболеваний (онкологии, сахарного диабета, атеросклероза и др.), основан на определении параметров связывания альбумином парамагнитной метки - модифицированной ЖК с неспаренным электроном (16-доксилстеариновой кислоты с присоединённым NO-радикалом) [19, 20]. В эксперименте определяется подвижность метки, эффективность её связывания с альбумином в плазме крови и её распределение по структуре молекулы белка, которые зависят от концентрации веществ, вырабатываемых при патологии и отсутствующих в норме [19]. Последний из указанных параметров (распределение метки по структуре белка) определяется за счёт измерения диполь-дипольного взаимодействия между присоединёнными метками и даёт информацию о конформации молекулы белка, которая сама по себе может являться индикатором патологического процесса в организме.

Метод диагностики ишемической болезни сердца по связыванию с альбумином ионов кобальта основан на том, что при данной болезни изме-

няется окружение N-конца альбумина, где располагается сайт связывания кобальта [21]. Указанное изменение структуры белка, биохимический механизм которого пока не ясен, приводит к снижению эффективности связывания металла, концентрация которого в свободном состоянии может быть зарегистрирована по цветной реакции.

§ 1.2. Фотофизические параметры молекул

В данном разделе рассматривается структура электронных переходов в молекулах и формулируются определения основных фотофизических параметров, используемых в работе. Сначала рассказывается об известной диаграмме Яблонского, с помощью которой можно описать переходы между энергетическими уровнями молекул и ввести фотофизические параметры. Затем приводится классификация электронных состояний ароматических аминокислот, основанная на теории Платта, после чего рассматриваются фотофизические свойства триптофана и тирозина, оптический отклик которых в белках исследуется в данной работе.

1.2.1. Электронные переходы в молекулах

Для описания переходов между энергетическими уровнями флуорофоров удобно воспользоваться диаграммой Яблонского (рис. 1.3 а), которая представляет собой схематическое изображение энергетических уровней молекул. Слева на диаграмме указана структура синглетных уровней (S_i), справа - триплетных (T_i). В результате поглощения света флуорофор может переходить в одно из возбуждённых состояний. При этом можно ввести первый фотофизический параметр - *сечение поглощения*.

Обычно рассматриваются следующие процессы, отражённые в диаграмме Яблонского (см. рис. 1.3 а), которые приводят к релаксации системы в основное состояние и происходят одновременно:

- *Флуоресценция* – энергия возбуждённого электронного состояния переходит в квант света, а флуорофор возвращается в основное за счёт взаимодействия дипольного момента перехода и нулевых флуктуаций электромагнитного поля.
- *Колебательная релаксация* – колебательная энергия возбуждённого состояния переходит в другие моды и/или передаётся ближайшему окружению.

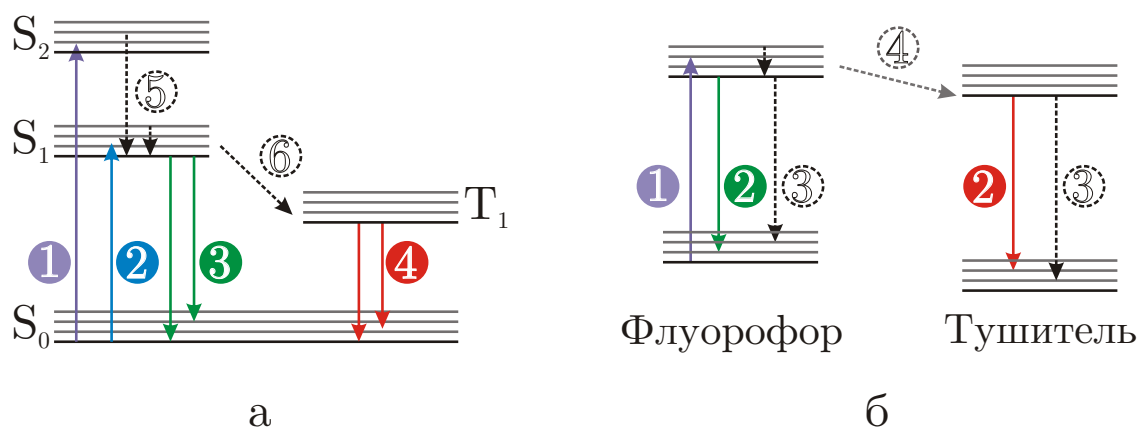


Рис. 1.3: (а) Классическая диаграмма Яблонского: (1), (2) - поглощение света, (3) - флуоресценция, (4) - фосфоресценция, (5) - внутренняя и (6) - интеркомбинационная конверсия. (б) Диаграмма Яблонского для супрамолекулярного комплекса флуорофор-тушитель: (1) - поглощение света, (2) - флуоресценция, (3) - внутренняя конверсия, (4) - перенос энергии по диполь-дипольному механизму

- *Релаксация растворителя* – энергия электронного состояния снижается за счёт перестройки молекул растворителя в ответ на изменение распределения плотности заряда хромофора в возбуждённом состоянии.
- *Внутренняя конверсия* – переход из одного возбуждённого состояния в другое (возбуждённое или основное) с меньшей энергией, обычно сопровождаемое изменением колебательной энергии.
- *Интеркомбинационная конверсия* – внутренняя конверсия, которая сопровождается изменением мультиплетности (например, переход из синглета в триплет). Обычно скорость таких переходов достаточно мала, что объясняется лишь частичным снятием запрета перехода по спину. Однако для органических молекул запрет может сниматься более эффективно при наличии в локальной окрестности флуорофора ионов тяжёлых металлов (эффект тяжёлого атома) [22, 23]

При рассмотрении молекул в растворе могут происходить процессы тушения флуоресценции, которые заключаются в переносе энергии возбуждённого состояния флуорофора на окружающие молекулы (тушители), в результате чего повышается вероятность её безызлучательного перехода в основное состояние. Подобные процессы также можно включить в диаграмму Яблонского, если рассматривать систему флуорофор-тушитель как

единый супрамолекулярный комплекс (рис. 1.3 б). При таком рассмотрении:

- *FRET* – резонансный перенос энергии по Фёрстеровскому (диполь-дипольному) механизму от флуорофора к тушителю - является вариантом внутренней конверсии.
- *Перенос электрона* на (или с) тушителя является внутренней конверсией в новое состояние (состояние с переносом заряда, СТ - charge transfer).
- *Формирование эксиплекса* является переходом супрамолекулярной системы в состояние, в котором энергия возбуждения относится к комплексу флуорофор-тушитель, стабильному только в возбуждённом состоянии, не образованному за счёт формирования ковалентных связей и характеризующемуся непосредственным контактом флуорофора и тушителя.

Одним из фотофизических параметров флуоресценции является *квантовый выход*, который отражает соотношение между скоростями излучательных и безызлучательных переходов в основное состояние:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + \sum_i k_i^q}, \quad (1.1)$$

где k_r - скорость радиационного перехода флуорофора в основное состояние, k_{nr} - скорость нерадиационного перехода флуорофора в основное состояние за счёт только внутримолекулярных процессов, несвязанных с окружением молекулы, а k_i^q - скорость процессов, которые рассматриваются в качестве тушения флуоресценции молекулы за счёт её окружения. Другими словами, квантовый выход флуоресценции равен отношению фотонов, излучённых флуорофором, к числу поглощённых. Обычно определяется относительное значение квантового выхода. При этом используется нормировка либо на сигнал от эталонного вещества (с известным квантовым квантовым выходом; тогда в результате можно говорить об измерении абсолютного значения данного фотофизического параметра), либо на сигнал от исследуемого вещества в нативном состоянии.

В случае облучения ансамбля флуорофоров короткими импульсами, за время между которыми система возвращается в основное состояние, интенсивность флуоресценции будет непостоянна и её уменьшение

может быть описано (в простейшем случае - для системы одинаковых флуорофоров) затухающей экспонентой с характерным *временем затухания флуоресценции* τ (или *временем жизни флуоресценции* по аналогии с fluorescence lifetime в англоязычной литературе):

$$\tau = (k_r + k_{nr} + \sum_i k_i^q)^{-1}, \quad (1.2)$$

которое является обратной величиной к сумме скоростей всех переходов из данного возбуждённого состояния в основное.

При непрерывном возбуждении интенсивность флуоресценции может быть выражена:

$$I(\lambda) = f(\lambda) \cdot \Phi \cdot \tau \cdot \sigma \cdot n = f(\lambda) \cdot k_r \cdot \sigma \cdot n, \quad (1.3)$$

где Φ - квантовый выход флуоресценции, k_r - скорость радиационного перехода, σ - сечение поглощения, τ - время затухания флуоресценции, n - концентрация флуорофоров, $f(\lambda)$ - *форма спектра* флуоресценции, которая в некоторых случаях может выступать в роли фотофизического параметра флуорофора и зависеть от его локального окружения.

1.2.2. Электронные состояния ароматических соединений

Впервые классификация состояний ароматических соединений, на которой основана классификация состояний ароматических аминокислот, с точки зрения квантовой механики была дана Джоном Платтом в статье 1949 года [24]. В данной статье вместо метода молекулярных орбиталей, который даёт лишь приближённые характеристики энергетических уровней линейных полиароматических углеводородов, был предложен метод орбиталей свободных электронов. Для расчёта энергии уровня и его классификации метод Платта рассматривает π -электрон как линейный ротатор в одномерном потенциальном поле атомов ароматического кольца.

Фотофизические свойства триптофана

Следуя классификации, предложенной Платтом [24], два нижних возбуждённых энергетических состояния триптофана называются 1L_a и 1L_b и характеризуются энергиями 4,73 эВ и 4,43 эВ, соответственно. Направления их дипольных моментов изображены на рис. 1.4. Разница энергий двух

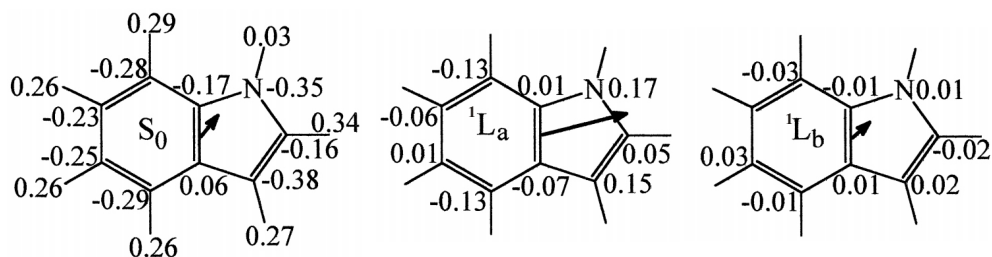


Рис. 1.4: Направления дипольных моментов для основного (S_0) и двух нижних возбуждённых (1L_a , 1L_b) энергетических состояния триптофана по работе [26]

нижних синглетных состояний 1L_a и 1L_b достаточно мала, поэтому данные состояния являются почти вырожденными [25].

При возбуждении на длине волны более 260 нм поглощение триптофана в основном обусловлено переходом в состояние 1L_a , поскольку переход в состояние 1L_b (нижнее валентное состояние) практически запрещён [26]. Всё же за счёт малой разницы между рассматриваемыми состояниями и за счёт взаимодействия их колебательной структуры состояние 1L_b может давать вклад в спектр поглощения [26]. Практически для всех белков и для свободного триптофана в растворе считается, что флуоресценция происходит из состояния 1L_a [25, 27–29].

Флуоресценция триптофана зависит от его локального окружения, причём одним из характерных фотофизических параметров для данной аминокислоты является форма спектра (или положение максимума λ_{MAX}). Экспериментально показано, что λ_{MAX} для триптофана в зависимости от окружения находится в диапазоне от 308 нм (для азурина) [31] до 360 нм (для свободного триптофана в растворе) [27]. Причиной такого изменения λ_{MAX} является величина проекции результирующего электрического поля в окрестности флуорофора на направление дипольного момента состояния 1L_a , которое в работах [25, 28, 29] было названо внутренним эффектом Штарка (рис. 1.5 а). Методами молекулярной динамики и квантовомеханических расчётов были определены λ_{MAX} для триптофана в различных белках с учётом электрического поля как от самого белка, так и от молекул растворителя. Приведённая на рис. 1.5 б корреляция расчётных и экспериментальных значений λ_{MAX} для триптофана показывает справедливость сделанных предположений о влиянии локальной окрестности на данный фотофизический параметр. В работе [30] были определены вклады электрического поля от растворителя и от белка в сдвиг λ_{MAX} трип-

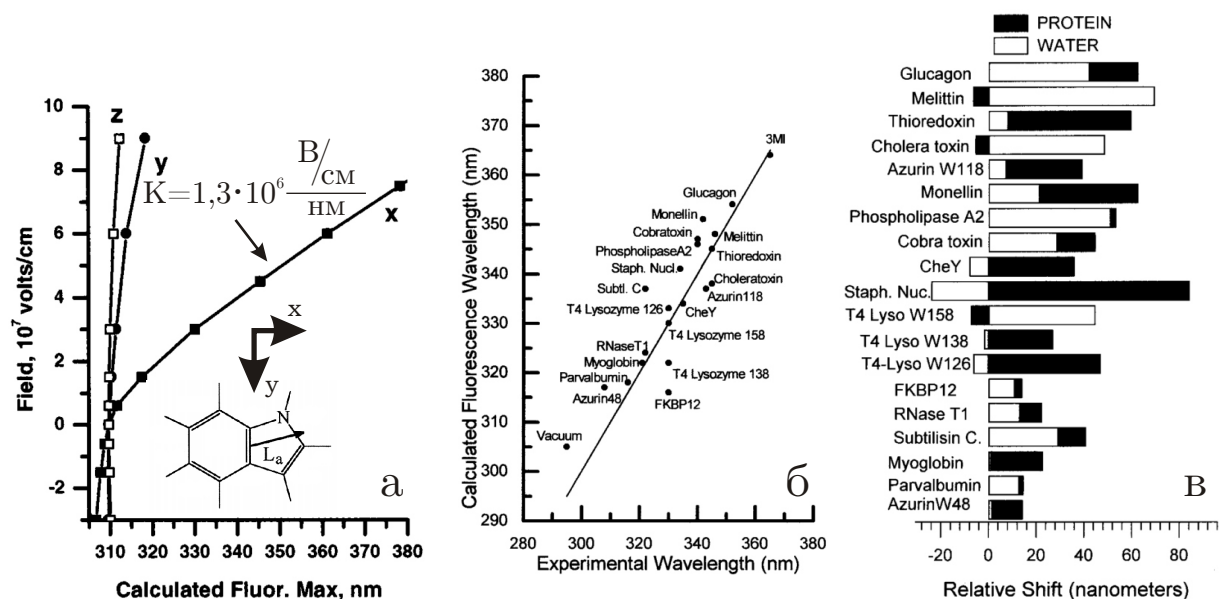


Рис. 1.5: (а) Зависимость положения максимума интенсивности флуоресценции триптофана в белках λ_{MAX} от величины проекции приложенного поля на оси молекулы по данным работы [25], при этом причина возникновения поля не конкретизировалась. (б) Корреляция между расчётными и экспериментально определёнными значениями λ_{MAX} для триптофана в белках по данным работы [30]. (в) Оценка вкладов в сдвиг λ_{MAX} электрического поля от растворителя и от белка по данным работы [30]

тофана, представленные на рис. 1.5 в. Из приведённого рисунка видно, что электрическое поле от белка и от растворителя может приводить как к коротковолновому, так и к длинноволновому сдвигу λ_{MAX} , поэтому в данной диссертационной работе сдвиг λ_{MAX} триптофана интерпретируется как изменение локального электрического поля, а не как увеличение (или уменьшение) доступности флуорофора растворителю.

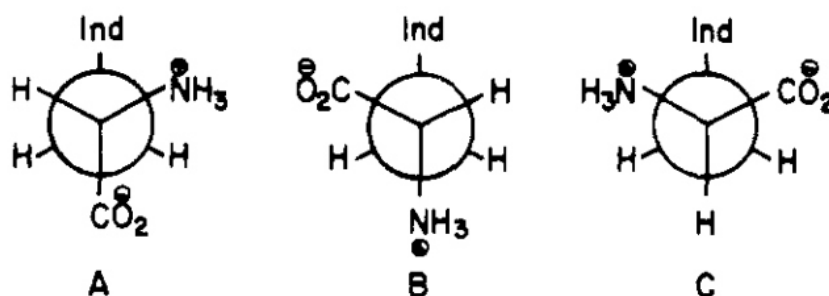


Рис. 1.6: Схематичное изображение ротамеров триптофана (А, В, С) по работе [32]

Другой особенностью флуоресценции триптофана является наличие двух времён затухания флуоресценции даже для случая свободной аминокислоты в водном растворе ($\tau_1 = 0,5$ нс, $\tau_2 = 3.1$ нс) [27]. В настоящее время имеются две основные модели, объясняющие мультиэкспоненциальный характер затухания триптофановой флуоресценции:

- *модель ротамеров.* Данная модель была введена в работе [32], в которой ротамерами называлась конфигурация молекулы триптофана, а именно взаимное расположение индольной и аланильной частей молекулы (рис. 1.6). Результаты экспериментов, где в качестве растворителя была использована тяжёлая вода, показывают, что меньшее время является характеристикой ротамера С, а большее - ротамеров А и В [32]. Методами молекулярной динамики было показано, что переход между ротамерами А и В возможен за время затухания флуоресценции, а время перехода в состояние С существенно его превышает [32]. Дальнейшее развитие модели ротамеров в работе [33] привело к расширению понятия ротамера на окружение триптофана.
- *модель переходов в возбуждённом состоянии.* Данная модель описана в работе [34] и подразумевает наличие двух возбуждённых состояний, которые могут переходить друг в друга и релаксировать в основное состояние с разными характерными скоростями релаксации. Рассмотрение такой модели показывает, что наблюдаемые времена затухания флуоресценции зависят от скорости обмена между возбуждёнными состояниями и от скоростей их релаксации.

Мультиэкспоненциальный характер затухания триптофановой флуоресценции сохраняется и в белках, причём ситуация усложняется для многотриптофановых белков за счёт различного окружения остатков. Однако обсуждение причин мультиэкспоненциального характера затухания флуоресценции выходит за рамки данной диссертационной работы.

В данной диссертационной работе основное внимание уделено флуоресценции тирозина, а для анализа времени затухания триптофановой флуоресценции использовалось среднее время, определённое с учётом амплитуд двух временных компонент (см. П.1.2). При таком усреднении причина биэкспоненциального характера затухания флуоресценции не важна.

Фотофизические свойства тирозина

Следуя классификации, предложенной Платтом [24], два нижних возбуждённых энергетических состояния тирозина называются 1L_a и 1L_b и характеризуются энергиями 5,8 эВ и 4,5 эВ, соответственно. Направления их дипольных моментов изображены на рис. 1.7 [27, 35, 36]. В отличие от триптофана, за счёт разницы энергий состояния 1L_a и 1L_b можно считать независимыми и невзаимодействующими.

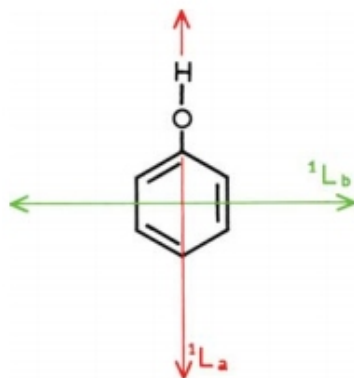


Рис. 1.7: Направления дипольных моментов для двух нижних возбуждённых энергетических состояний (1L_a и 1L_b) тирозина по работе [27]

При возбуждении на длине волны более 260 нм молекула тирозина переходит в состояние 1L_b . При этом флуоресценция тирозина представляет собой узкую неструктурированную полосу с максимумом в районе 303 нм (рис. 1.8) [35]. В данном возбуждённом состоянии тирозина может происходить ионизация молекулы (образование тирозината) за счёт изменения pK_a : в возбуждённом состоянии pK_a 4, в основном - pK_a 10,3 [27, 35]. Такая ионизация молекулы может происходить и при нейтральном pH в случае, если в растворе находятся сильные акцепторы протона, такие как, например, ацетат [27]. Образование тирозината можно зарегистрировать по изменению интенсивности и формы спектра флуоресценции (рис. 1.8), а также по появлению полосы поглощения в районе 300 нм.

Форма спектров флуоресценции тирозина практически не зависит от полярности растворителя, точнее, если сравнивать с аналогичными изменениями триптофана, то эффект для тирозина будет в 10 раз меньше [37]. Независимость от полярности растворителя с точки зрения время-разрешённой спектроскопии приводит к отсутствию компонентов кинетики

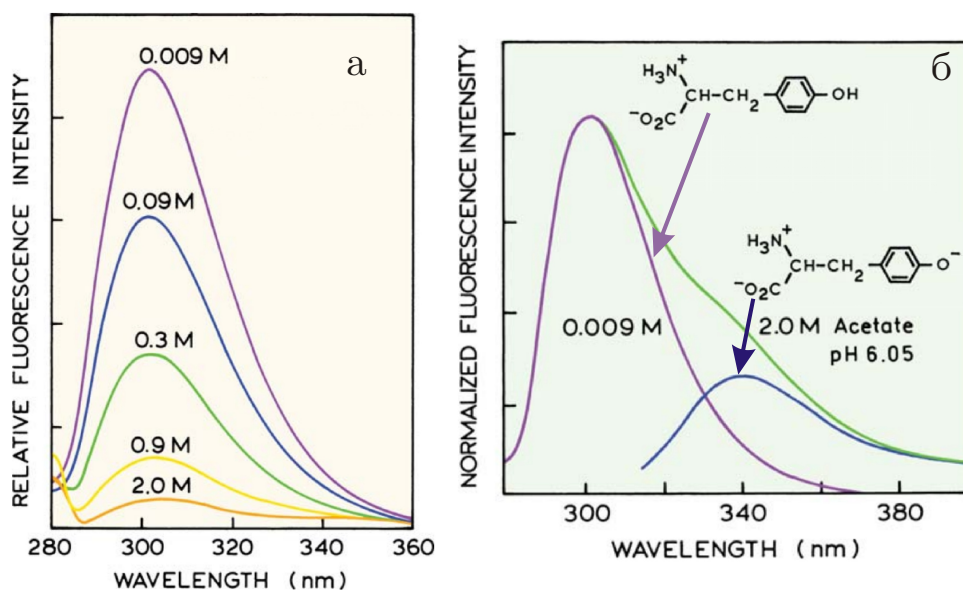


Рис. 1.8: Сравнение интенсивности (а) и формы (б) спектров флуоресценции тирозина и тирозината при увеличении концентрации акцепторов протона (концентрации ацетата) в растворе по работе [27]

флуоресценции, связанных с релаксацией растворителя, следовательно, к моноэкспоненциальному характеру кинетики флуоресценции.

Наличие в структуре белка нескольких тирозиновых остатков может приводить к появлению пары остатков, которые расположены достаточно близко для образования нового состояния, обусловленного π -стэкинг (в англоязычной литературе π -stacking) взаимодействием [38, 39]. В случае π -стэкинг взаимодействия вместо независимых возбуждённых состояний двух остатков появляется общее возбуждённое состояние за счёт взаимодействия π -электронов молекул, что приводит к изменению спектров поглощения и/или флуоресценции исследуемого объекта. Методами квантовой механики и молекулярной динамики в работе [39] для САЧ были рассчитаны вклады отдельных аминокислотных остатков (триптофана и тирозина) в спектры флуоресценции. На основании полученных данных в структуре САЧ авторами была выделена пара остатков Tyr134-Tyr157, которые участвуют в π -стэкинг взаимодействии.

§ 1.3. Оптические методы исследования структуры белков

Для изучения структуры молекул белка активно используются оптические методы, которые основаны на измерении фотофизических пара-

метров. В данном разделе приводится лишь общее описание оптических методов, позволяющих регистрировать конформационные изменения белков. Для тех методов, которые были реализованы в данной работе, более подробное описание дано в приложении.

Среди оптических методов можно выделить абсорбционные (которые по особенностям поглощения света макромолекулой и её лигандами позволяют исследовать её структуру) и флуоресцентные (которые по особенностям флуоресценции макромолекулы и её лигандов позволяют исследовать её структуру). Также стоит упомянуть методы, связанные с анализом рассеяния света компонентами раствора (например, спектроскопию комбинационного рассеяния, позволяющую исследовать колебательные спектры молекул). Однако эти методы никак не используются в данной диссертационной работе и поэтому не рассматриваются.

1.3.1. Абсорбционные методы

Поглощение белков в УФ области спектра обусловлено наличием в их структуре ароматических аминокислотных остатков (фенилаланина, тирозина и триптофана), спектры поглощения которых приведены на рис. П.7 а). Из рисунка видно, что спектры поглощения данных аминокислот достаточно сильно перекрываются, поэтому выделение вкладов каждой из них в результирующий спектр вряд ли возможно даже для случая их модельной смеси. В белках ситуация осложняется за счёт взаимодействия ароматических аминокислот с функциональными группами соседних остатков. Подобное взаимодействие приводит к сдвигу их спектров поглощения, которое в литературе получило название гипохромизма [40, 41]. Несмотря на указанные трудности, в работе [42] удалось на основании анализа второй и четвёртой производных спектров поглощения бинарных и тринарных растворов ароматических аминокислот определить состав растворов с высокой точностью, а дальнейшее развитие метода анализа чётных производных спектров поглощения [43–45] привело к выделению параметров, позволяющих также определять особенности окружения тирозиновых остатков в альбуминах. Данная методика была реализована и в настоящей диссертационной работе, о чём подробно написано в приложении (П.1.3).

Рассмотренные выше методы абсорбционной спектроскопии можно использовать в отсутствие агрегации белков в растворе, которая приводит к ослаблению интенсивности света, прошедшего через исследуемый обра-

зец, за счёт усиления рассеяния. Подобное усиление рассеяния проявляется в спектрах поглощения как увеличение оптической плотности раствора на всех длинах волн, по величине которого можно судить о мутности исследуемого раствора (подобная методика в англоязычной литературе получила название turbidity measurements).

Для растворов альбуминов характерно отсутствие значительного поглощения в диапазоне длин волн более 400 нм. Следовательно, если в эксперименте наблюдается увеличение оптической плотности в длинноволновой области спектра, то оно может служить индикатором образования агрегатов в растворе. Один из интересных примеров применения данного метода к анализу структурных изменений белков можно найти в работе [46]. На основании различия между значениями температуры раствора, соответствующими разрушению структуры белка и началу его агрегации, авторами [46] было показано, что для агрегации САЧ необходима начальная дестабилизация структуры белка. Метод анализа мутности раствора для выявления агрегации молекул белка также был реализован в данной диссертационной работе.

Среди методов, основанных на измерении характеристик поглощения света раствором белка, необходимо отметить метод кругового дихроизма. Данный метод непосредственно не был реализован в настоящей диссертационной работе, однако результаты его применения для анализа структурных изменений альбуминов, опубликованные в литературе, используются для интерпретации полученных данных.

Метод кругового дихроизма основан на различии поглощения раствором правой и левой круговой поляризации света. Для растворов белков подобное различие имеет место благодаря асимметрии пептидной связи.

При рассмотрении спектров кругового дихроизма выделяется несколько диапазонов длин волн, изменения в которых соответствуют определённым перестройкам структуры молекулы белка. Изменения спектра кругового дихроизма белка в дальнем УФ-диапазоне (190 - 250 нм) позволяют исследовать элементы вторичной структуры белка (долю альфа-спиралей, бета-структур и неупорядоченной части (в англоязычной литературе - random coil)) [47]. В ближнем УФ-диапазоне (250 - 340 нм), спектры кругового дихроизма дают информацию об изменении симметрии окружения в окрестности дисульфидных мостиков и остатков ароматических аминокислот [47]. Стоит отметить, что метод кругового дихроизма не может

дать точную локализацию структурных изменений белка, однако может использоваться для оценки процентного соотношения остатков, задействованных в формировании различных элементов вторичной структуры [48].

1.3.2. Флуоресцентные методы

Флуоресцентные методы исследования основаны на измерении параметров дезактивации возбуждённых состояний рассматриваемых систем флуорофоров. Для возбуждения флуоресценции исследуемых образцов используется либо непрерывный источник света (стационарная флуоресцентная спектроскопия, в англоязычной литературе *steady-state fluorescence spectroscopy*), либо импульсный (время-разрешённая флуоресцентная спектроскопия, в англоязычной литературе *time-resolved fluorescence spectroscopy*). В первом случае основными регистрируемыми фотофизическими параметрами являются форма спектра флуоресценции и сечение флуоресценции, под которым подразумевается произведение сечения поглощения на квантовый выход флуоресценции. Если сечение поглощения не меняется в процессе эксперимента, а чувствительность детектора откалибрована с использованием образца с известным квантовым выходом, то на основании результатов, полученных методом стационарной флуоресцентной, можно определить абсолютное значение квантового выхода флуоресценции. В случае исследования системы флуорофоров методом время-разрешённой спектроскопии в качестве детектора используется либо стробируемая ССД-матрица с регулируемым временем задержки относительно лазерного импульса, либо фотоэлектронный умножитель, совмещённый с платой для измерения время-коррелированного счёта фотонов (в англоязычной литературе *time-correlated single photon counting*). В данной диссертационной работе использовался второй вариант регистрации кинетики затухания флуоресценции. Более подробное описание используемых установок для детектирования флуоресценции исследуемых веществ приведено в приложении (П.1.1).

Описанные методики флуоресцентной спектроскопии для анализа структурных изменений белков могут быть применены как к специальным зондам (в англоязычной литературе встречаются термины *labels*, *dyes*, *probes* и др.), флуоресцентный отклик которых зависит от их встраивания в структуру белка, так и к флуорофорам, входящим в состав исследуемых белков. Рассмотрим особенности флуоресцентных зондов, в частности

Нильского красного (в англоязычной литературе Nile Red), которые обычно используются в литературе.

Флуоресцентные зонды можно разделить на две группы по типу связи с белком на (1) ковалентные, которые могут образовывать устойчивое соединение за счёт образования химической связи с боковыми частями аминокислотных остатков (например, лизина или некомпенсированного цистеина), и (2) нековалентные, образование комплекса белка с которыми в основном определяется электростатическими и/или гидрофобными взаимодействиями [49]. Основным преимуществом использования флуоресцентных зондов является возможность возбуждения и регистрации флуоресценции в длинноволновой области спектра, что позволяет избежать вклада сильного рэлеевского рассеяния при возможной агрегации, влияния других флуорофоров и фотодеградации образца [49]. Однако использование флуоресцентных зондов корректно, только если известно, что их связывание не влияет на структуру белка. Стоит отметить, что нековалентные зонды могут связываться в более, чем один сайт в структуре белка, что часто затрудняет интерпретацию получаемых данных.

В данной диссертационной работе для регистрации структурных изменений альбумина используется флуоресценция нековалентного зонда Нильского красного, структура которого приведена на рис. 1.9. Из-за наличия в структуре молекулы Нильского красного донора и акцептора электрона при возбуждении данный флуорофор может переходить в состояние с переносом заряда, обладающее низким квантовым выходом флуоресценции [49]. Такое состояние не является энергетически выгодным в неполярном окружении, поэтому данный зонд используется для изучения доступности гидрофобных полостей в белках [49–53], связывание в которые сопровождается резким усилением квантового выхода флуоресценции и достаточно сильным сдвигом максимума флуоресценции с ~ 655 нм до ~ 605 нм.

Помимо использования флуоресцентных зондов для исследования структуры белков используют сигнал собственной флуоресценции макромолекул, который определяется наличием в их структуре аминокислотных остатков триптофана, тирозина и фенилаланина [27]. При этом снимается один из основных недостатков флуоресцентных зондов - необходимость учёта влияния самих зондов на структуру исследуемого объекта.

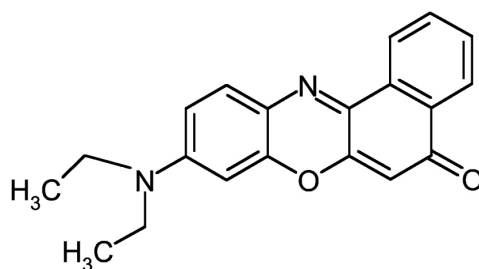


Рис. 1.9: Структура молекулы флуоресцентного зонда Нильского красного по работе [49]

В экспериментах по исследованию структуры белка под действием различных факторов обычно исследуется тушение флуоресценции триптофана, вызванное изменением локальной окрестности данного типа остатков (1.2.2). 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 (рис. П.7 а).

Основным недостатком такого подхода является неравномерное распределение триптофановых остатков по структуре белка. Так, в структуре БСА присутствуют два триптофановых остатка, а в структуре САЧ - только один (рис. 1.10). Подобное ограничение может быть снято за счёт рассмотрения флуоресцентного отклика других аминокислот, например, тирозина, распределение которого по структуре альбуминов более равномерно (рис. 1.10). Из рисунка 1.10 а видно, что некоторые сайты связывания основного лиганда альбумина (ЖК) находится на большем удалении от триптофановых остатков по сравнению с тирозиновыми.

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 [56]. В белках она обычно проявляется при денатурации, при переходе упорядоченной вторичной структуры (альфа-спиралей и бета-листов) в неупорядоченную и при изменении третичной структуры [56–58], что проявляется в появлении в спектре собственной флуоресценции коротковолнового плеча с максимумом на 300–310 нм (рис. 1.11). Основным механизмом тушения тирозиновой флуоресценции в таких работах считается перенос энергии по диполь-дипольному (Фёрстеровскому) механизму с тирозиновых остатков на триптофановые,

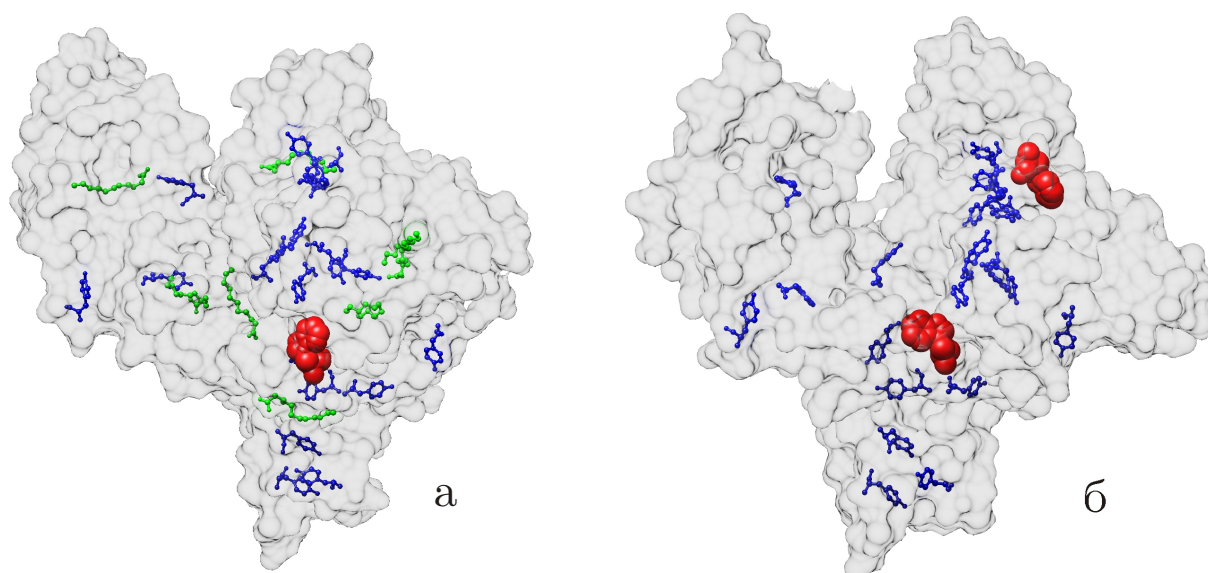


Рис. 1.10: Трёхмерная структура комплекса САЧ с ЖК (pdb ID: 1EF7 [54]) (а) и трёхмерная структура БСА (pdb ID:3V03 [55]) с обозначением лиганда (зелёным), а также тирозиновых (синим) и триптофановых (красным) остатков. Рисунок построен при помощи программы USCF Chimera package [9]

поскольку типичные значения радиуса Фёрстера для такого переноса составляют $\sim 10\text{-}18 \text{ \AA}$ и соответствуют среднему размеру молекул белка [35].

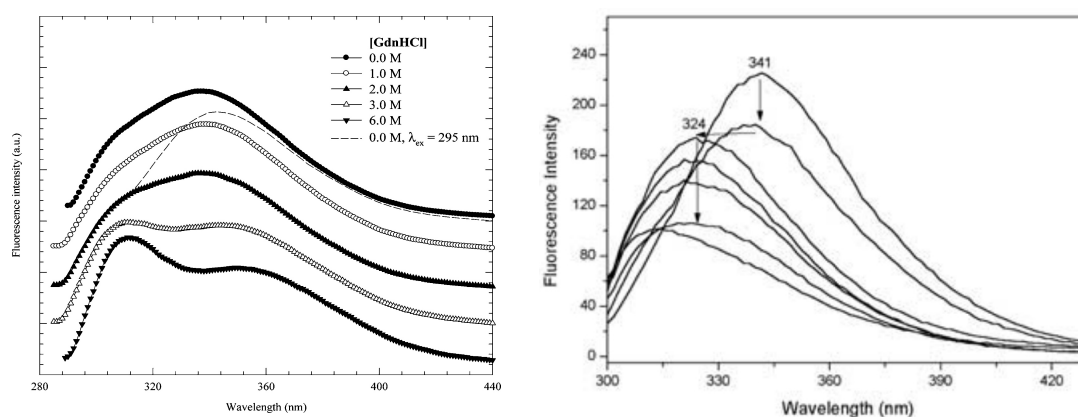


Рис. 1.11: Изменение формы спектра флуоресценции белка при денатурации для (а) САЧ при денатурации гидрохлоридом гуанидина [59] и (б) для БСА при денатурации детергентом SDS [60]. Длина волны возбуждения 280 нм

В то же время в исследованиях белков, не содержащих триптофановые остатки, флуоресценция тирозина также обладает малым по сравнению со свободным тирозином в растворе квантовым выходом, что связано с наличием тушения тирозиновой флуоресценции в белках за счёт

функциональных групп (например, карбоксильной и аминогруппы) соседних аминокислотных остатков [35, 56]. 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 переоценённой.

Таким образом, можно отметить, что до появления данной диссертационной работы тирозиновая флуоресценция рассматривалась лишь как качественный индикатор, позволяющий зарегистрировать только сильные перестройки структуры белков, видимые и по изменению фотофизических параметров триптофановых остатков. 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 данной главы. Далее описаны результаты применения оптических методов исследования структуры белка к системе альбумин-SDS. На основе полученных данных делается оценка применимости тирозиновой флуоресценции для определения структурных перестроек молекулы альбумина.

Основные результаты данной главы опубликованы в статье [61]

§ 2.1. Изменение структуры альбумина при взаимодействии с детергентами

Впервые модель комплекса белок-детергент, схематично изображённая на рис. 2.1, была предложена и аргументирована в статье [62]. При малой концентрации детергента связывание происходит в определённые сайты, которые также являются сайтами жирных кислот (ЖК) [63, 64], причём связывание происходит как за счёт электростатики, так и за счёт гидрофобных взаимодействий. Далее, при увеличении концентрации детергента оказывается возможным присоединение лиганда во второстепенные сайты, которые становятся доступными из-за разрыхления структуры белка на первой стадии. Связывание в такие многочисленные второстепенные сайты происходит преимущественно за счёт гидрофобных взаимодействий между белком и детергентом. При дальнейшем увеличении концентрации лиганда происходит образование мицеллоподобных агрегатов на скелете молекулы белка за счёт связывания новых молекул детергента с уже при-

соединёнными. В конце этой стадии наступает насыщение структуры белка лигандами, и при дальнейшем увеличении концентрации детергента происходит образование свободных мицелл в растворе. Структура белка при этом практически не меняется.

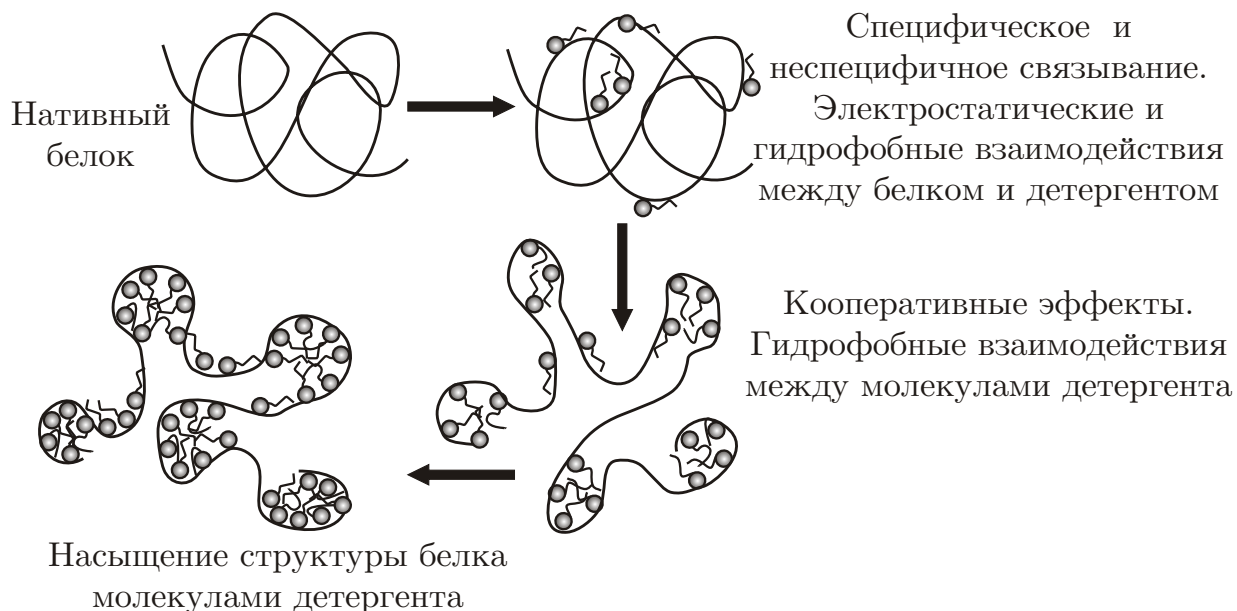


Рис. 2.1: Модель образования комплекса белок-детергент при изменении концентрации лиганда согласно работе [62]

§ 2.2. Диагностика конформационных изменений альбумина в присутствии детергента методом стационарной флуоресцентной спектроскопии

На рисунке 2.2 представлена зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции (при возбуждении на 295 нм) сывороточного альбумина человека (САЧ) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) (нормировка проведена с использованием значения, соответствующего $[SDS] = 0$, принятым за единицу). Обе зависимости являются четырёхстадийными для белков, что согласуется с литературными данными и моделью комплекса белок-детергент [62, 63].

Для малых концентраций детергента ($[SDS] < 9 \cdot 10^{-3}$ мМ) положение максимума флуоресценции триптофана и её интенсивность не меняются. На этом участке отношение молярных концентраций лиганда к белку мало (менее одного), поэтому связывание детергента практически отсутствует (данные не приведены).

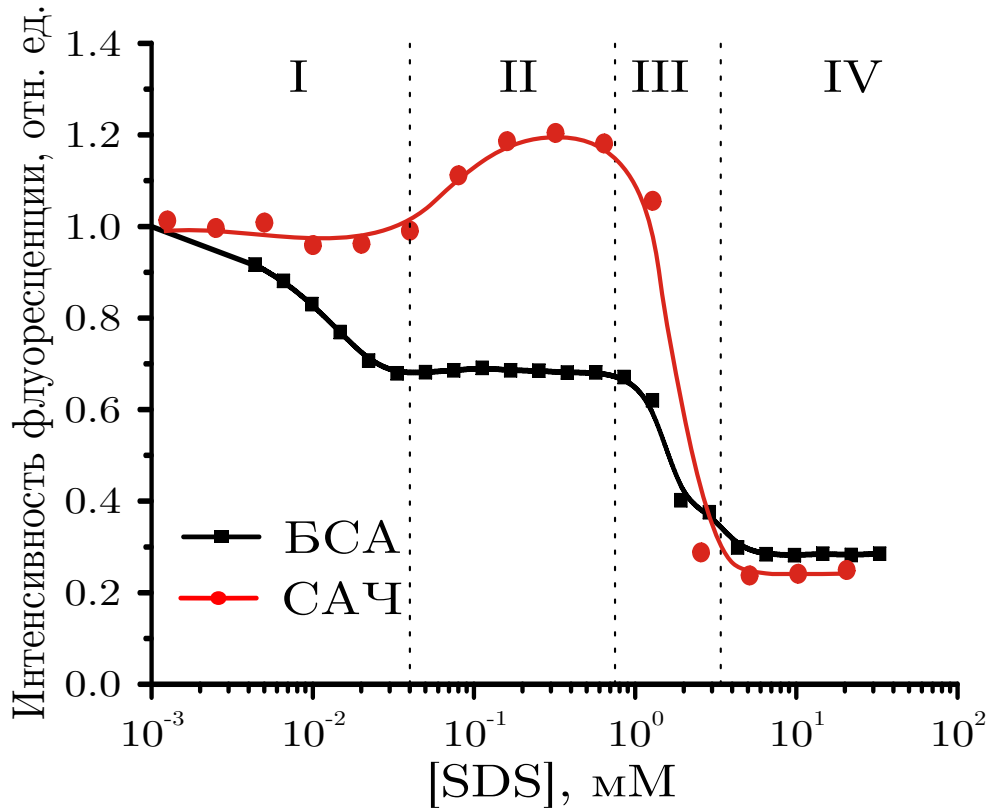


Рис. 2.2: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции триптофановых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 295 нм. Концентрация БСА - 4.7 мкМ. Концентрация САЧ - 4.1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ($[SDS]=0$)

При увеличении концентрации детергента (первая стадия, $[SDS] = 9 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-2}$ мМ) зависимость интенсивности флуоресценции в максимуме для рассматриваемых белков различается: интенсивность флуоресценции САЧ остаётся неизменной, в то время как интенсивность флуоресценции БСА уменьшается (до уровня 70% от её значения в отсутствии детергента). Такое отличие объясняется изменением окрестности дополнительного триптофанового остатка БСА в позиции 134 (Trp134) и в работах [63, 64] связывается с наличием в первом домене первичных сайтов связывания молекул детергента, которые отсутствуют в окрестности внутреннего триптофанового остатка, расположенного в домене II в позиции 214 (Trp214) для САЧ и 213 (Trp213) для БСА. Дополнительные исследования вторичной структуры данных белков подтверждают отсутствие серьёзных перестроек молекулы белка в данном диапазоне концентраций лиганда, а изменение триптофановой флуоресценции связывается с перестройкой тре-

тичной структуры белка при его связывании [63, 65, 66]. Подобная интерпретация связи между изменением фотофизических параметров и структурных изменений белка подтверждается также анализом структуры комплекса альбумина с миристиновой кислотой [54], которая по своим свойствам близка к SDS.

На следующей стадии ($[SDS] = 4 \cdot 10^{-2} - 0,7$ мМ) вновь наблюдается различие в зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции для гомологичных белков: для САЧ в этом диапазоне концентраций лиганда наблюдается увеличение сигнала (до 20% от её значения в отсутствие детергента), в то время как для БСА интенсивность флуоресценции триптофановых остатков практически не меняется. Рост интенсивности флуоресценции триптофана для САЧ в работе [63] объясняется снятием тушения флуоресценции Trp214 функциональными группами соседних с аминокислотных остатков, которое присутствует в нативной структуре. Аналогичное снятие тушения должно иметь место и для Trp213 в БСА, окрестность которого практически не отличается от Trp214 в САЧ. Неизменность интенсивности флуоресценции триптофана для БСА на рассматриваемом участке зависимости может быть связана с компенсацией вкладов тушения Trp134 и снятия тушения для Trp213.

При дальнейшем увеличении концентрации детергента в растворе ($[SDS] = 0,7$ мМ - 3 мМ) происходит образование мицеллоподобных агрегатов на скелете молекулы белка, что приводит к резкому падению флуоресценции для обоих белков (до уровня 25% от её значения в отсутствие детергента). Данная стадия связана с серьёзными изменениями структуры альбумина, которые подтверждаются различными методами непосредственного изучения структуры белка, такими как метод кругового дихроизма, метод малоуглового рассеяния рентеновского излучения и метод электронного парамагнитного резонанса [67–70]. Рассматриваемая стадия заканчивается насыщением структуры белка молекулами детергента, после которого (при $[SDS] > 3$ мМ) интенсивность флуоресценции САЧ и БСА не меняется.

Проведённое выше сравнение зависимости триптофановой флуоресценции гомологичных белков (БСА и САЧ) от концентрации детергента выявило существенное различие флуоресцентного отклика при низких концентрациях лиганда на первой стадии, когда на одну молекулу белка приходится порядка 1-10 молекул SDS. При рассмотрении только флуорес-

ценции триптофановых остатков подобное различие могло бы привести к ошибочному выводу о разном изменении структуры рассматриваемых белков при связывании детергента, что показывает ограниченность данного метода для анализа структурных перестроек белка. Эта ограниченность флуоресцентной методики исследования структурных изменений макромолекул, как уже упоминалось в первой главе настоящей работы, связана с малым количеством триптофановых остатков в аминокислотной последовательности белков. Рассмотрение флуоресценции тирозиновых остатков может снять подобное ограничение за счёт более равномерного распределения данных флуорофоров по структуре белка (рис. 1.10) и дать возможность зарегистрировать изменения его конформации вдали от триптофановых остатков.

Для определения вклада тирозиновых остатков в общий спектр флуоресценции белка, полученный при возбуждении на 280 нм (где возбуждаются и тирозиновые и триптофановые остатки), проводилась процедура разложения спектров, описанная подробно в приложении П.1.1. В основе этой процедуры лежит использование формы спектра триптофановой флуоресценции, полученной при возбуждении на длине волны 295 нм (где поглощением, а следовательно, и флуоресценцией тирозина можно пренебречь), а также утверждение о независимости формы спектров флуоресценции от длины волны возбуждения [27]. Пример такого разложения спектров приведён на рис. П.5.

Зависимость от концентрации детергента интенсивности тирозиновой флуоресценции, нормированной на значение, соответствующее $[SDS] = 0$, приведена на рис. 2.3 и совпадает для двух гомологичных белков, поэтому можно говорить, что предположение об одинаковом связывании детергента с этими белками справедливо. Данная зависимость также является четырёхстадийной, однако в отличие от триптофановой флуоресценции для тирозина наблюдается увеличение сигнала, что говорит о снятии тушения данных остатков, которое есть в исследуемых белках в нативном состоянии.

В дальнейшем в данной главе приводятся результаты экспериментов с БСА, т. к. изменение структуры этого белка можно регистрировать как по триптофановой, так и по тирозиновой флуоресценции. На рис. 2.4 а представлены зависимости от концентрации детергента интенсивности флуоресценции триптофановых остатков в максимуме для двух длин волн возбуждения (280 нм - синим и 295 нм - чёрным). Также на данном рисунке

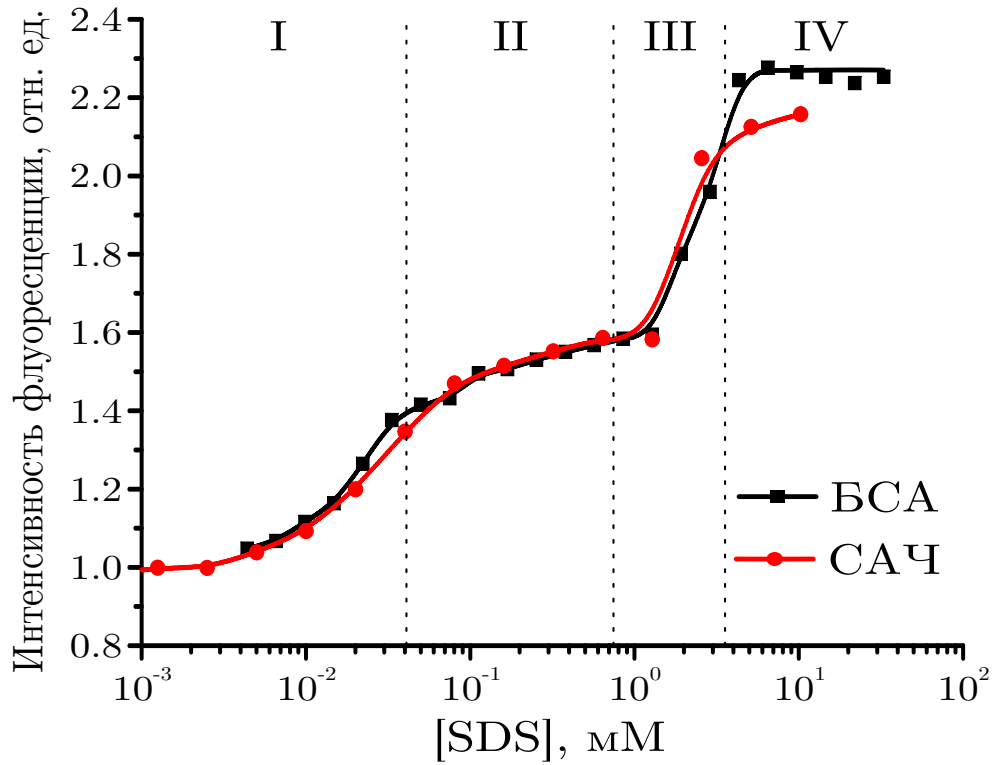


Рис. 2.3: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация БСА - 4.7 мкМ. Концентрация САЧ - 4.1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ($[SDS]=0$)

красным показана зависимость положения их максимума от концентрации лиганда. Сравнение зависимости максимума интенсивности триптофановых остатков для двух длин волн возбуждения позволяет выявить наличие переноса энергии с тирозиновых остатков, о чём будет рассказано ниже. Зависимость положения максимума интенсивности флуоресценции триптофановых остатков позволяет судить об изменении локального электрического поля в их окрестности (Глава 1) в результате изменения структуры белка под действием детергента. Перейдём теперь к сравнению между собой зависимости флуоресценции триптофановых (рис. 2.4 а) и тирозиновых (рис. 2.4 б) остатков в БСА от концентрации детергента.

Как было сказано выше, в диапазоне концентраций детергента, соответствующем первой стадии ($[SDS] = 9 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-2}$ мМ), лиганд встраивается в высокоэнергетичные сайты связывания в основном за счёт электростатического взаимодействия. Как видно из рис. 2.4, происходит тушение флуоресценции триптофана и усиление флуоресценции тирозина

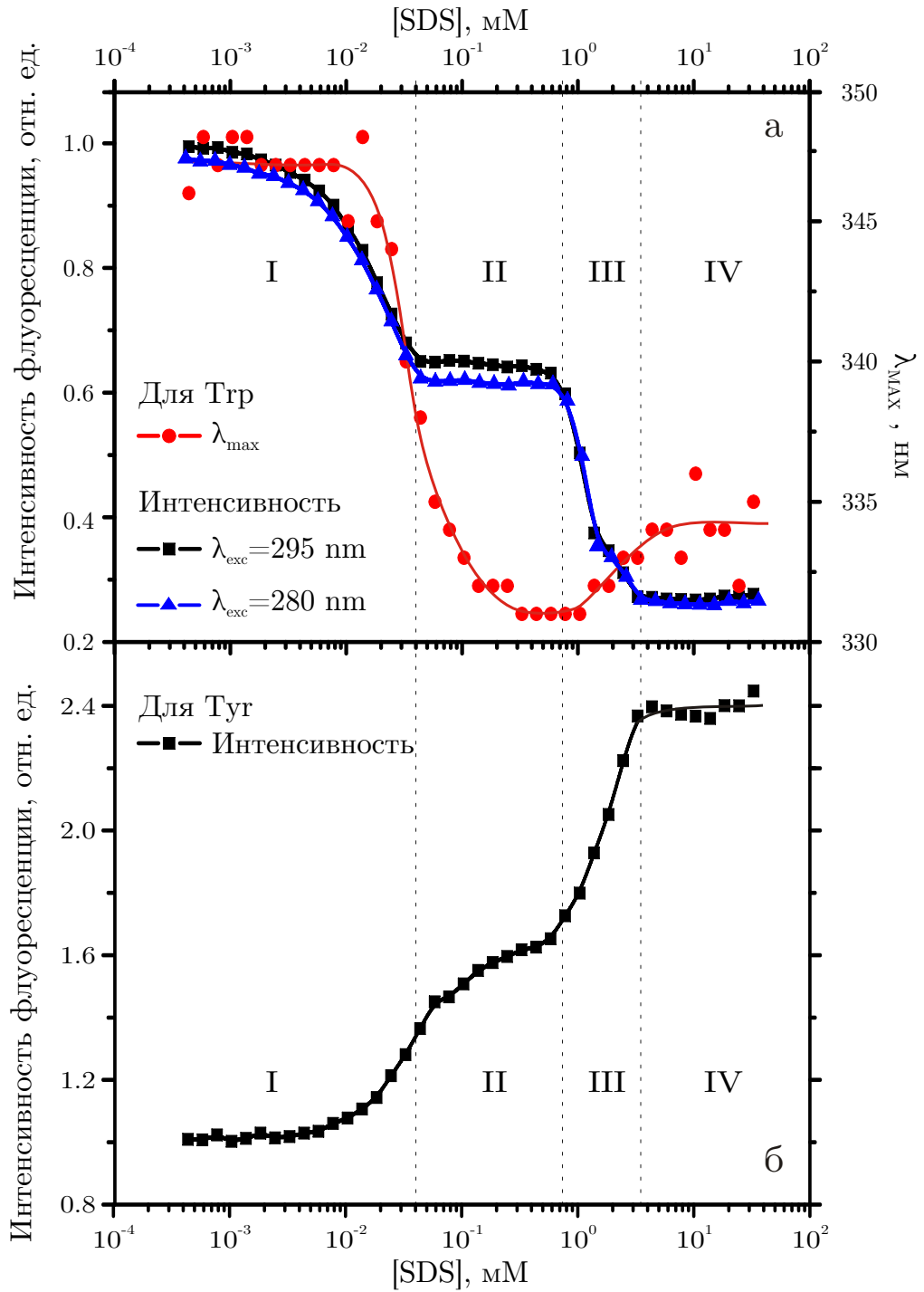


Рис. 2.4: (а) Зависимость от концентрации детергента положения (красным) и интенсивности максимума флуоресценции триптофановых остатков БСА при возбуждении на длине волны 295 нм (чёрным) и 280 нм (синим). (б) Зависимость от концентрации детергента интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков БСА в максимуме при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация БСА - 4.8 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ($[SDS]=0$)

в БСА, причём эффективность тушения триптофановой флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения. Следовательно, изменение структуры белка не приводит к уменьшению эффективности переноса энергии с тирозиновых остатков. Также на этом участке происходит изменение положения максимума флуоресценции триптофана, что говорит об уменьшении локального электрического поля в его окрестности [25], подтверждая гипотезу, что связывание лиганда по электростатическому механизму [64, 67, 69] приводит к перераспределению зарядов в окрестности индольной группы триптофана.

На следующей стадии зависимости ($[SDS] = 4 \cdot 10^{-2} - 0,7$ мМ) флуоресцентных характеристик БСА от концентрации детергента продолжается сдвиг максимума флуоресценции триптофана в коротковолновую часть спектра, что говорит о дополнительном уменьшении электрического поля, направленного в сторону пептидной связи вдоль длинной оси молекулы [25]. При этом не происходит изменения интенсивности флуоресценции триптофана, что позволяет предположить в качестве причины изменения поля удаление положительных зарядов от данного аминокислотного остатка при присоединении молекул детергента [66, 67, 69]. В отличие от триптофановой флуоресценции интенсивность флуоресценции тирозина характеризуется небольшим ростом (на 20% от её значения в отсутствии детергента), о возможных причинах которого будет рассказано в дальнейшем.

Резкое усиление флуоресценции тирозина (на 60% от её значения в отсутствии детергента) и тушение флуоресценции триптофана (на 35% от её значения в отсутствии детергента), сопровождающееся небольшим красным сдвигом (~ 3 нм), происходит при дальнейшем повышении концентрации детергента ($[SDS] = 0,7$ мМ - 3 мМ). Указанный диапазон концентраций SDS соответствует критической концентрации образования мицелл в используемом буфере, методика определения которой приведена в приложении (см. П.1.1). Столь значительное снятие тушения флуоресценции тирозина объясняется образованием мицеллоподобных агрегатов на скелете молекулы белка, которое вызывает серьёзные перестройки структуры альбумина. При этом возможно как уменьшение эффективности переноса энергии с тирозиновых остатков на триптофановые за счёт увеличения расстояния между ними [57, 71–78], так и непосредственное удаление из локальной окрестности тирозиновых остатков других тушителей - функциональных групп соседних аминокислотных остатков.

Согласно модели комплекса белок-детергент связывание SDS на этом участке происходит с высокой степенью кооперативности [67]. В работе [66] для системы альбумин-SDS с помощью модифицированного метода Штерна-Фольмера был определён коэффициент наклона графика тушения флуоресценции в дважды логарифмическом масштабе равным $n = 3.13$. Как упоминалось в первой главе данный параметр отражает степень кооперативности связывания, а не число присоединённых лигандов. Действительно, для системы альбумин-детергент на данном участке зависимости независимое измерение [63, 67] даёт значения числа занятых сайтов связывания близким к 100, что существенно превышает значение коэффициента наклона в модифицированном методе Штерна-Фольмера. Значение $n = 3.13$ является наибольшим из тех, которые удалось найти в литературе [79], что является указанием на уникально высокую степень кооперативности связывания из-за особенностей структуры выбранного лиганда.

Последний, заключительный, участок зависимости ($[SDS] > 3$ мМ) отражает насыщение структуры белка мицеллоподобными агрегатами и образование мицелл в растворе в свободном состоянии. При этом связывания детергента с белком не происходит, что следует из неизменности флуоресцентных параметров тирозиновых и триптофановых остатков в данном диапазоне концентраций лиганда.

§ 2.3. Диагностика конформационных изменений альбумина в присутствии детергента абсорбционными методами

В отличие от спектров флуоресценции спектры поглощения нельзя разложить на составляющие, соответствующие различным флуоресцентным остаткам. Основной причиной этого является сильное перекрытие полос поглощения спектров отдельных аминокислот в результате уширения из спектров поглощения при взаимодействии флуорофоров со своим локальным окружением [43, 44, 80]. Для получения информации об изменении окружения отдельных аминокислот по спектрам поглощения белка был использован метод анализа спектров поглощения по их четвёртой производной, впервые предложенный в работе [42]. Последующая разработка данного метода показала, что для исследования локальной окрестности тирозиновых остатков в белках можно использовать положение пика λ_2 , соответствующего 0-0 переходу фенольного кольца, и отношение $R = \frac{p_1}{p_2}$, характеризующее образование водородной связи тирозиновыми остатками

(рис. П.8). Описание алгоритма получения параметров, по которым можно определить изменение окрестности тирозиновых остатков, верификацию данного метода и ссылки на основные работы в этой области можно найти в приложении П.1.3.

Как видно из представленной на рис. 2.5 зависимости указанных параметров от концентрации детергента на начальных двух стадиях ($[\text{SDS}] = 9 \cdot 10^{-3} - 0,7 \text{ мМ}$), где наблюдается первоначальный рост флуоресценции тирозина, полярность окружения данных остатков не меняется за счёт связывания детергента, что исключает появление лиганда в их локальной окрестности. На третьей стадии ($[\text{SDS}] = 0,7 - 3 \text{ мМ}$) видны значительные изменения λ_2 и отношения R за счёт образования мицеллоподобных агрегатов на скелете альбумина. Подобное изменение параметров четвёртой производной спектров поглощения было приведено в работе [81], в которой данный факт связывался с увеличением полярности окружения тирозиновых остатков и формированием водородных связей их ОН-группами, что находится в соответствии с общепринятой моделью, рассмотренной в начале данной главы (§ 2.1).

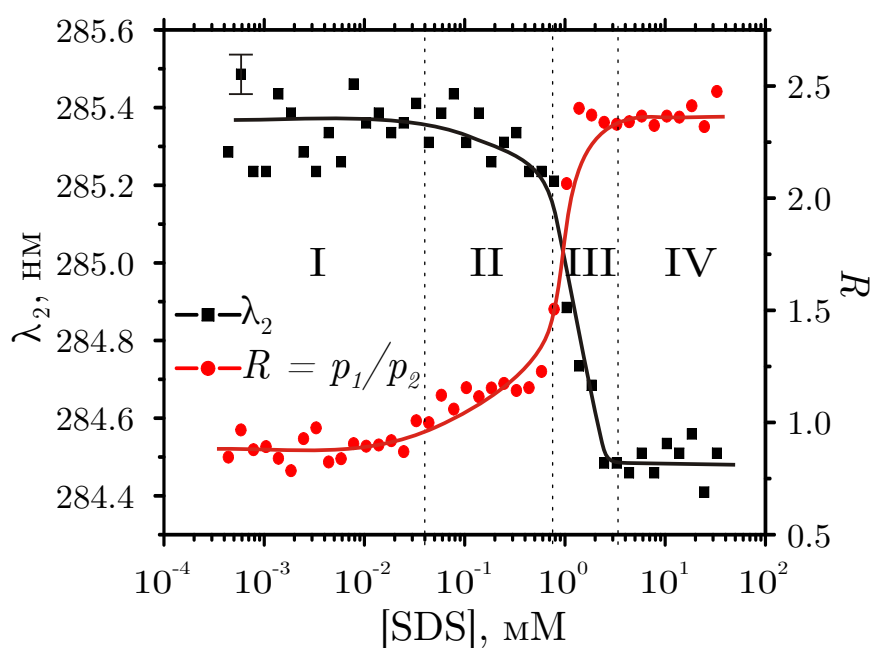


Рис. 2.5: Зависимость от концентрации детергента параметров четвёртой производной спектров поглощения БСА (λ_2 - чёрным, R - красным). Концентрация БСА - 4.8 мкМ

§ 2.4. Диагностика конформационных изменений альбумина в присутствии детергента с помощью время-разрешённой флуоресцентной спектроскопии

Для исследования временных параметров аминокислотных остатков (Tyr и Trp) использовалась установка, позволяющая измерять кинетику флуоресценции для разных длин волн регистрации с использованием время-коррелированного счёта фотонов. Для возбуждения флуоресценции использовался импульсный лазерный диод (с длиной волны излучения, равной 280 нм). Подробное описание данной установки, а также методов анализа кинетик флуоресценции дано в приложении (П.1.2).

Кинетика флуоресценции триптофановых остатков регистрировалась на длине волны $\lambda_{Trp} \sim 355$ нм, которая соответствует максимуму флуоресценции альбумина в нативном состоянии. Кроме того, данная длина волны достаточно удалена от максимума флуоресценции тирозина, поэтому можно считать, что затухание флуоресценции полностью обусловлено релаксацией триптофановых остатков. Минимальная невязка при анализе данных для регистрации на λ_{Trp} достигалась при аппроксимации кинетик флуоресценции биэкспоненциальной зависимостью. Наличие двух компонент в кинетике флуоресценции для триптофана в БСА часто объясняется разницей окружения остатков Trp134 и Trp213 [63, 64, 82, 83]. В то же время, как упоминалось в первой главе настоящей работы, кинетика затухания флуоресценции свободного триптофана в растворе также имеет биэкспоненциальный характер, что в работах [32–34, 66, 84, 85] объясняется наличием ротамеров. В указанных статьях ротамерами называются предопределённые в основном состоянии электронные конфигурации возбуждённого состояния молекулы триптофана, которые проявляются при флуоресценции. Такие конфигурации в основном связываются с ориентацией индольной и других групп относительно C-C-связей. Однако вопрос о биэкспоненциальном характере кинетики флуоресценции триптофана выходит за рамки данной работы поэтому для анализа влияния детергента на фотофизические параметры триптофана использовалось среднее время затухания флуоресценции $\langle \tau \rangle$, определяемое с учётом вкладов a_i компонент τ_i :

$$\langle \tau \rangle = \sum_i \tau_i a_i. \quad (2.1)$$

Зависимость данного параметра от концентрации детергента, представленная на рис. 2.6 а (чёрным), повторяет зависимость интенсивности флуоресценции для непрерывного возбуждения. Совпадение указанных зависимостей показывает, что тушение флуоресценции триптофановых остатков при связывании детергента происходит за счёт дополнительных нерадиационных каналов релаксации из возбуждённого состояния, что соответствует литературным данным [66].

Длина волны выбранного источника излучения находится в полосе поглощения как триптофановых, так и тирозиновых остатков, поэтому при регистрации кинетики флуоресценции в коротковолновой части спектра можно зарегистрировать вклад тирозиновых остатков. Каналы регистрации используемой установки, соответствующие коротковолновой части спектра, обладают более низкой чувствительностью детектора, чем длинноволновые. Поэтому для определения возможного вклада тирозиновых остатков анализировались кинетики флуоресценции БСА при регистрации на длине волны $\lambda_{Tyr} \sim 310$ нм, которая, с одной стороны, даёт возможность восстановления параметров затухания флуоресценции, а с другой стороны, находится в полосе флуоресценции тирозиновых остатков.

Кинетики флуоресценции при регистрации на длине волны λ_{Tyr} аппроксимировались триэкспоненциальными зависимостями, для которых невязка была меньше по сравнению с аппроксимацией биэкспоненциальной зависимостью. Зависимость от концентрации детергента двух больших времён затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 , полученных из анализа кинетик при регистрации на λ_{Tyr} , повторяют зависимость интенсивности флуоресценции триптофана для непрерывного возбуждения. На основании этого указанные компоненты были отнесены к триптофановым остаткам БСА. Зависимость среднего времени затухания флуоресценции триптофана $\langle\tau\rangle$ для регистрации на λ_{Tyr} , определённого по (2.1), представлена на рис. 2.6 а (красным). Сравнение зависимости $\langle\tau\rangle$ от концентрации детергента для двух длин волн регистрации (рис. 2.6 а) показывает небольшое завышение значений для регистрации на λ_{Tyr} . Возможная причина такого завышения заключается в появлении медленной компоненты для коротковолновой регистрации, которая является следствием уменьшения чувствительности детектора и уменьшения интенсивности сигнала от триптофановых остатков за счёт тушения их флуоресценции в результате присоединения детергента.

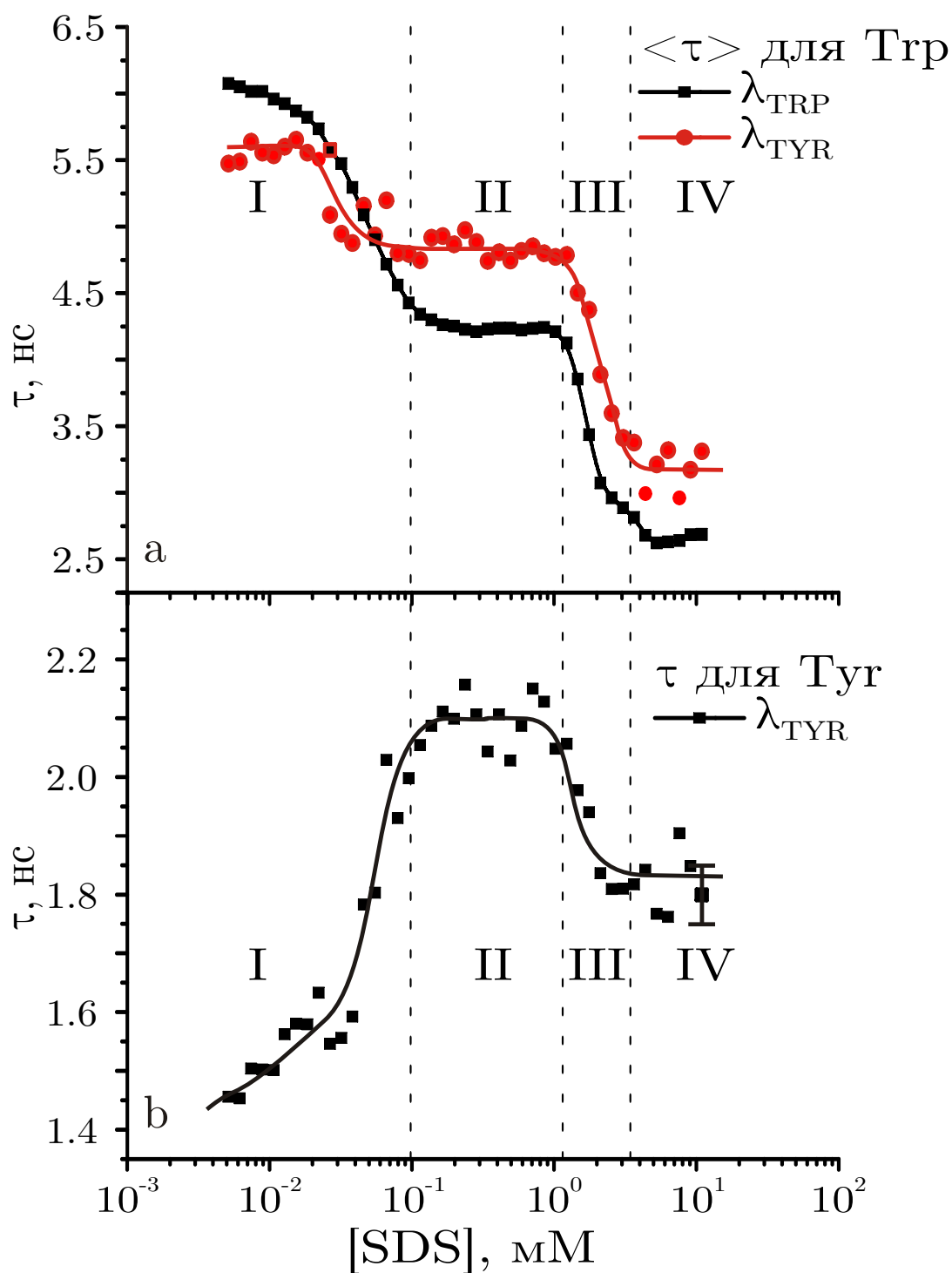


Рис. 2.6: (а) Зависимость от концентрации детергента среднего времени затухания флуоресценции триптофановых остатков БСА при регистрации сигнала на длине волны $\lambda_{Trp} \sim 355$ нм (чёрным) и $\lambda_{Tyr} \sim 310$ нм (красным). (б) Зависимость от концентрации детергента времени затухания флуоресценции тирозиновых остатков БСА при регистрации сигнала на длине волны $\lambda_{Tyr} \sim 310$ нм. Длина волны возбуждения 280 нм. Концентрация БСА - 3.5 мкМ

Зависимость от концентрации детергента меньшего времени τ_3 , восстановленного из кинетики затухания флуоресценции БСА при регистрации на λ_{Tyr} , (рис. 2.6 б) является немонотонной и может быть охарактеризована максимумом на втором участке. Такое отличие τ_3 от τ_1 и τ_2 позволяет заключить, что первый из указанных параметров соответствует времени затухания тирозиновых остатков в БСА. Кроме того, анализ кинетики затухания флуоресценции для области спектра, где флуоресценцией тирозиновых остатков можно пренебречь, показывает отсутствие компонент, характерное время которых увеличивается для концентрации детергента в диапазоне, соответствующем специфичному связыванию (первая стадия, рис. 2.6). Таким образом, в данной работе показано, что τ_3 является характеристикой затухания флуоресценции тирозиновых остатков. Другими словами, несмотря на перекрытие спектров флуоресценции в данной работе удалось выделить время затухания флуоресценции как триптофановых, так и тирозиновых остатков белка.

Анализ параметров четвёртой производной спектров поглощения показывает, что локальное окружение тирозиновых остатков (его гетерогенность и число водородных связей с ОН-группой тирозина) на первой стадии ($[SDS] = 9 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-2}$ мМ) не меняется. Также по литературным данным известно [66, 69, 70], что специфичное связывание молекул детергента не приводит к изменениям во вторичной структуре БСА, а вызывает только слабые перестройки его третичной структуры. В данной работе показано, что в диапазоне концентраций детергента $[SDS] = 9 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-2}$ мМ не происходит изменения гетерогенности окружения тирозиновых остатков в белке и числа водородных связей, образованных их ОН-группам (§ 2.3), но наблюдается схожее увеличение времени затухания и интенсивности флуоресценции данного типа остатков. Таким образом, выявлено, что флуоресцентные характеристики тирозиновых остатков в альбумине позволяют зарегистрировать слабые перестройки третичной структуры белка.

§ 2.5. Структурные изменения молекулы альбумина при его анфолдинге, приводящие к усилению флуоресценции тирозиновых остатков

Результаты, представленные в данной главе, показывают, что интенсивность флуоресценции тирозина возрастает при связывании лиганда и при денатурации белка, что находится в полном согласии с общепринятой

моделью взаимодействия в системе белок-детергент (§ 2.1). Было показано, что зависимость флуоресцентных параметров (интенсивности и времени затухания флуоресценции) тирозиновых остатков в БСА от концентрации детергента имеет четырёхстадийный характер, который отвечает различным режимам связывания лиганда (§ 2.1). На первом участке зависимостей, приведённых на рис. 2.4 б и 2.6 б, наблюдается увеличение интенсивности и времени затухания флуоресценции, что может быть следствием уменьшения эффективности переноса энергии с тирозиновых остатков на триптофановые. Для проверки этого предположения обратимся к сравнению интенсивности флуоресценции триптофановых остатков при возбуждении на двух длинах волн - 295 нм и 280 нм (рис. 2.4 а). В случае длинноволнового возбуждения перенос энергии не сказывается, т.к. поглощением тирозиновых остатков на данной длине волны можно пренебречь. В случае коротковолнового возбуждения поглощение тирозиновых остатков существенно, следовательно, уменьшение переноса энергии будет приводить к более сильному тушению флуоресценции триптофана. Как видно из рис. 2.4 а зависимость триптофановой флуоресценции от концентрации детергента не отличается для двух длин волн возбуждения, поэтому в рассматриваемой системе изменения переноса энергии не происходит, следовательно, усиление флуоресценции тирозиновых остатков происходит за счёт снятия других механизмов тушения.

Ещё одной особенностью полученных результатов является различие в ходе зависимости интенсивности и времени затухания флуоресценции тирозиновых остатков на третьей стадии ($[SDS] = 0,7 \text{ мМ} - 3 \text{ мМ}$), которая соответствует денатурации белка за счёт образования мицеллоподобных агрегатов на скелете макромолекулы. На данном участке зависимости наблюдается сильное изменение локальной окрестности тирозиновых остатков, которое проявляется в параметрах четвёртой производной спектров поглощения: длина волны, соответствующая поглощению при 0-0 переходе фенольного кольца сдвигается в коротковолновую часть спектра. Подобный сдвиг приводит к увеличению сечения поглощения тирозиновых остатков на длине волны 280 нм, за счёт чего рост интенсивности флуоресценции сопровождается уменьшением времени её затухания. В работах [40, 41] показано, что взаимодействие аминокислот в белках может привести к гипохромизму - изменению величины сечения поглощения аминокислотного остатка в белке по сравнению со свободной аминокислотой в растворе. Та-

ким образом, увеличение сечения поглощения тирозиновых остатков, которое можно зарегистрировать по четвёртой производной спектров поглощения, на третьем участке зависимости является следствием структурных изменений белка под действием детергента.

§ 2.6. Выводы по главе 2

В данной главе продемонстрирована возможность исследования конформационных изменений альбуминов при добавлении детергента с помощью оптического отклика тирозиновых остатков. 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 остатка, определяемых по четвёртой производной спектров поглощения. Показано, что несмотря на разное поведение зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции для двух гомологичных белков, тирозиновая флуоресценция меняется одинаково, что является следствием сходных структурных изменений гомологичных белков при одинаковом внешнем воздействии. Для первого участка зависимости фотофизических параметров сывороточного альбумина человека 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.

По итогам данной главы можно сделать следующие **выводы**:

1. Разработана и успешно применена процедура выделения вклада флуоресценции тирозиновых остатков в спектр альбумина, которая позволяет получить информацию о конформационных изменениях их локальной окрестности, не влияющих на фотофизические параметры триптофановых остатков.
2. *Впервые* определено время затухания тирозиновой флуоресценции в белке, содержащем триптофановые остатки, хотя в работе [59] говорится о невозможности такого определения.
3. Показано, что при специфичном связывании SDS альбумином увеличение тирозиновой флуоресценции не связано с уменьшением эф-

эффективности переноса энергии на триптофановые остатки по диполь-дипольному механизму, а является следствием снятия других механизмов тушения за счёт изменения окрестности тирозиновых остатков.

4. Показано, что усиление флуоресценции тирозиновых остатков при образовании мицеллоподобных агрегатов на скелете белка связано с гипохромизмом данных остатков, а не с уменьшением эффективности переноса энергии на триптофановые остатки по диполь-дипольному механизму.

ГЛАВА 3

Фотофизические параметры альбуминов в различных модельных системах

Глава посвящена результатам исследований, направленных на выявление физических механизмов изменения фотофизических параметров тирозиновых остатков в белках. На основании данных о сайтах связывания лигандов в структуре альбуминов (бычьего сывороточного альбумина (БСА) и сывороточного альбумина человека (САЧ)), расположения в указанных белках ароматических аминокислотных остатков (тирозина и триптофана), а также на основании результатов исследования системы альбумин-детергент (Глава 2) можно высказать следующие предположения о физических механизмах изменения параметров тирозиновой флуоресценции:

1. Изменение локальной окрестности тирозиновых остатков за счёт (1) системы водородных связей в растворе, (2) полярности окружения белка или (3) гидрофобных взаимодействий между лигандом и альбумином.
2. Изменение структуры белка в домене I и, возможно, в домене III.
3. Связывание лигандов, (1) схожих с жирными кислотами (ЖК), (2) заряженных или (3) связывающихся в любые сайты указанных в п.2 доменов.

Проверке этих предположений и конкретизации факторов, влияющих на флуоресцентные параметры тирозина и посвящается данная глава диссертационной работы. Здесь приводятся результаты исследования собственной флуоресценции альбуминов (БСА и САЧ) для различных внешних воздействий при связывании с лигандами (катионным детергентом, ионами двухвалентных металлов, этанолом) и денатурации (катионным детергентом, этанолом и гидрохлоридом гуанидина). Кроме того, описаны результаты сравнительного исследования влияния рН раствора на флуоресцентные параметры тирозина как в белках (для БСА, САЧ, инсулина), так и в свободном состоянии в растворе. При этом в каждом разделе сначала приводится

небольшой обзор литературы, в котором основное внимание уделяется выявлению структурных изменений белков в исследуемых системах, а затем описываются и анализируются результаты экспериментов, выполненных в рамках данной диссертационной работы.

§ 3.1. Влияние связывания катионного детергента на собственную флуоресценцию альбуминов

В предыдущей главе работы было показано, что специфичное, неспецифичное и кооперативное связывание альбумином молекул анионного детергента (SDS) приводит к усилению флуоресценции тирозиновых остатков. Для проверки влияния знака заряда амфифильного соединения при связывании с белком на интенсивность флуоресценции тирозиновых остатков был выбран катионный детергент цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ), структура которого приведена на рис. П.1 а.

На рис. 3.1 приведена зависимость от концентрации СТАВ интенсивности флуоресценции в максимуме для триптофановых остатков сывороточных альбуминов (БСА и САЧ). Так же, как и для SDS, рассматриваемая зависимость (рис. 3.1) имеет четырёхстадийный характер.

На малых концентрациях ($[\text{СТАВ}] < 2 \cdot 10^{-3}$ мМ) изменения интенсивности флуоресценции триптофановых остатков не происходит при отношении молярных концентраций лиганда к белку меньше 1. Отсутствие изменения интенсивности триптофановых остатков говорит о слабом связывании лиганда и/или о связывании детергента в сайты, расположенные вдали от триптофановых остатков в рассматриваемых белках.

При увеличении концентрации (первая стадия, $[\text{СТАВ}] = 2 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-2}$ мМ) зависимость интенсивности флуоресценции триптофановых остатков для гомологичных белков начинает различаться: наблюдается тушение и сдвиг положения максимума флуоресценции в коротковолновую область для БСА в то время, как указанные параметры не меняются для САЧ. Так же, как и для случая SDS, подобное различие в параметрах флуоресценции триптофановых остатков в гомологичных белках можно объяснить изменением окрестности только дополнительного триптофанового остатка в БСА (Trp134). Сдвиг максимума интенсивности в коротковолновую область спектра является следствием уменьшения локального электрического поля в окрестности триптофанового остатка при связывании лиганда по электростатическому механизму [25, 64, 67, 69], которое

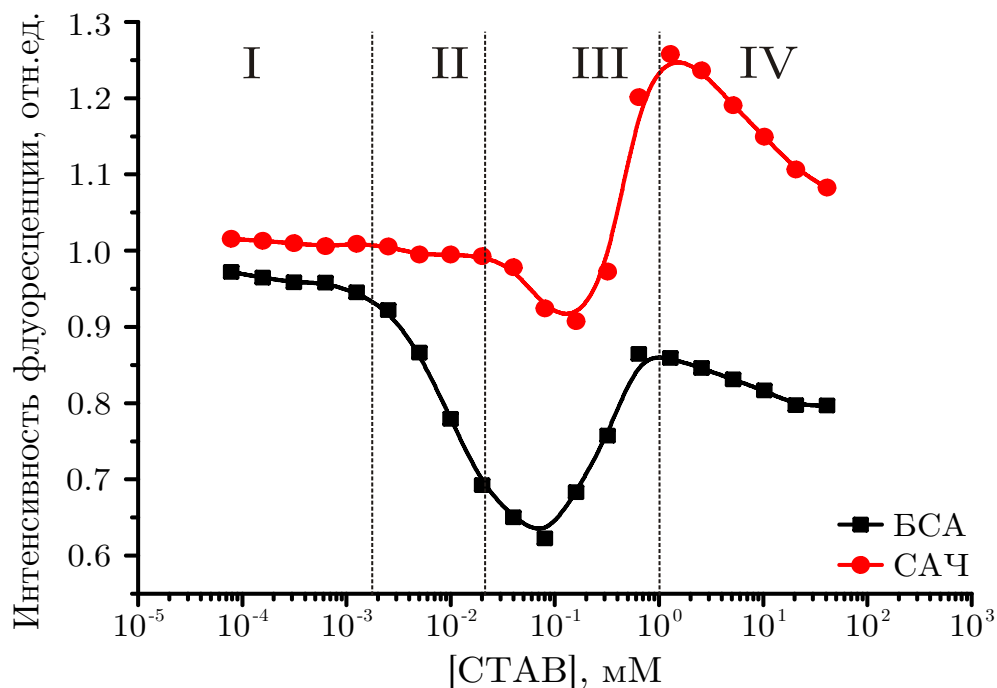


Рис. 3.1: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции триптофановых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 295 нм. Концентрация БСА - 4.1 мкМ. Концентрация САЧ - 4.1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ($[СТАВ]=0$)

приводит к перераспределению зарядов в окрестности индольной группы триптофана.

На следующей стадии ($[СТАВ] = 2 \cdot 10^{-2} - 0,1$ мМ) интенсивность флуоресценции триптофановых остатков как в БСА, так и в САЧ уменьшается, что сопровождается сдвигом максимума флуоресценции в коротковолновую область. На данной стадии неспецифичное связывание детергента затрагивает окрестность общего триптофанового остатка (Trp214 в САЧ и Trp213 в БСА). В конце данного участка зависимости положение максимума флуоресценции триптофановых остатков в БСА и САЧ одинаково (335 нм), что говорит о сходстве локальной окрестности как указанных остатков в белках, так и Trp134 в БСА в результате неспецифичного связывания лиганда. Из сравнения приведённых зависимостей также видно, что величина тушения флуоресценции для БСА за счёт специфичного и неспецифичного связывания детергента (на 38% от значения интенсивности в отсутствии детергента) почти в 4 раза превышает величину тушения для САЧ (на 10% от значения интенсивности в отсутствии детергента). Это означает, что свя-

зывание детергента в основном приводит к изменению структуры белков в первом домене.

При дальнейшем увеличении концентрации ($[СТАВ] = 0,1 - 0,7$ мМ) происходит восстановление интенсивности флуоресценции триптофана за счёт образования мицеллоподобных агрегатов на скелете молекул белков, что подтверждается данными измерения критической концентрации образования мицелл в используемом буфере (см. П.1.1). Стоит отметить, что в данном диапазоне концентраций наиболее сильные структурные изменения происходят в окрестности общего триптофанового остатка, что проявляется в увеличении интенсивности триптофановой флуоресценции для САЧ почти на 30% относительно её значения в отсутствие детергента. Дальнейшее тушение флуоресценции белков на стадии образования свободных мицелл в растворе связано с усилением рассеяния, а также со сдвигом спектра поглощения в более длинноволновую область, что видно из анализа спектров поглощения и их четвёртых производных.

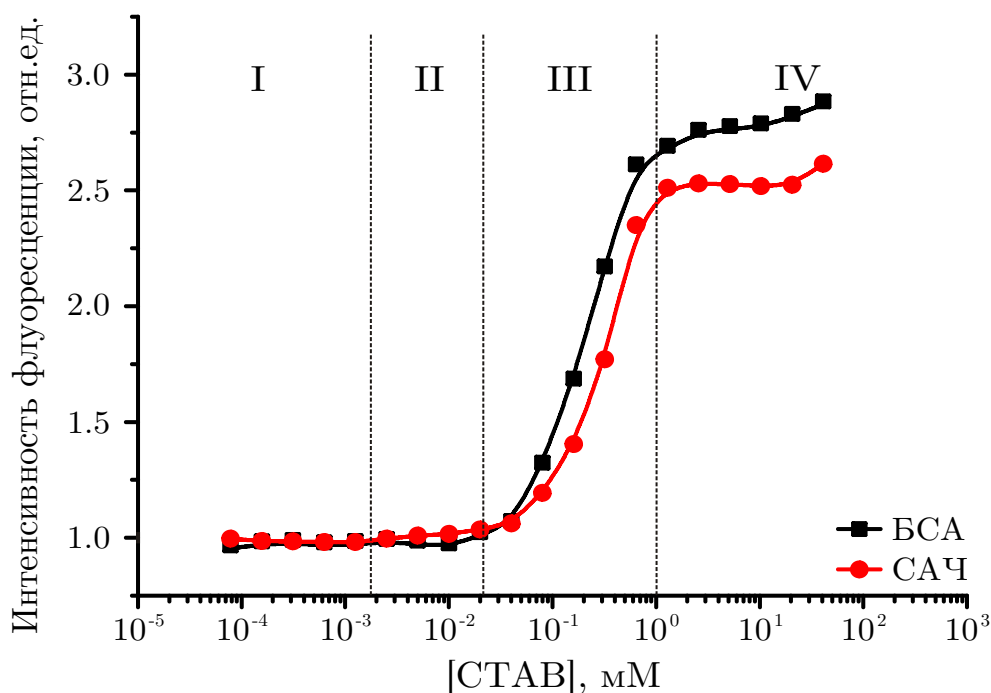


Рис. 3.2: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация БСА - 4.1 мкМ. Концентрация САЧ - 4.1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ($[СТАВ]=0$)

Рассмотрим теперь изменение интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков в БСА и САЧ при увеличении концентрации СТАВ в растворе (рис. 3.2). Из рисунка видно, что изменение интенсивности тирозиновых остатков одинаково в указанных белках. В отличие от SDS изменение интенсивности тирозиновой флуоресценции существенно только на стадии, соответствующей образованию мицеллоподобных агрегатов на скелете молекулы белка, которое происходит в основном за счёт гидрофобных взаимодействий. Отсутствие изменений интенсивности тирозиновой флуоресценции на участках специфичного и неспецифичного связывания говорит о влиянии заряда гидрофильной части молекулы на флуоресценцию тирозиновых остатков.

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 белка, причём в данном случае заряд гидрофильной части детергента не важен. Однако на участках специфичного и неспецифичного связывания усиления тирозиновой флуоресценции не происходит для катионного детергента. Связывание молекул детергента в сайты жирных кислот происходит так, что заряженная часть лиганда располагается ближе к поверхности белка [54]. Таким образом, усиление флуоресценции тирозиновых остатков происходит при связывании лигандов и денатурации белка, когда за счёт структурных изменений в их локальной окрестности происходит снятие тушения флуоресценции функциональными группами соседних аминокислотных остатков, а также, возможно, при увеличении отрицательного заряда на поверхности белка.

§ 3.2. Влияние связывания ионов двухвалентных металлов на собственную флуоресценцию альбуминов

В структуре альбумина есть несколько сайтов связывания двухвалентных металлов, один из которых располагается в домене I. В домене I также расположен дополнительный триптофановый остаток БСА в позиции Trp134, фотофизические параметры которого могут изменяться при присоединении катионов тяжёлых металлов за счёт эффекта тяжёлого атома [22, 23].

Известно, что при добавлении в раствор белка ионов металлов также может происходить агрегация макромолекул [46, 86–88]. При физиологическом рН (7,4) суммарный поверхностный заряд белка отрицательный [89], что приводит к появлению кулоновской силы отталкивания, препятствующей агрегации белка. За счёт связывания катионов металлов может происходить нейтрализация заряда на поверхности белка, в результате чего кулоновское отталкивание может смениться диполь-дипольным притяжением, которое и приводит к агрегации белка [86, 87].

В данном разделе исследовалось влияние ионов металлов на фотофизические параметры БСА на примере катионов свинца. Также было проведено сравнение изменения флуоресцентного отклика триптофана в белке и в свободном состоянии для разделения эффектов, связанных с агрегацией альбумина и эффектом тяжёлого атома.

3.2.1. Влияние ионной силы на собственную флуоресценцию альбуминов

При добавлении в раствор солей двухвалентных металлов меняется ионная сила раствора, что, в свою очередь, меняет электростатические свойства окружения белка и может отражаться на его собственной флуоресценции. Для оценки влияния ионной силы раствора на собственную флуоресценцию САЧ и БСА был проведён эксперимент, в котором для увеличения ионной силы использовался хлорид натрия (NaCl), поскольку известно, что ионы Na^+ и Cl^- не связываются с альбумином [90]. Диапазон изменения концентрации NaCl был выбран достаточно широким (0 - 500 мМ), однако ни тирозиновая, ни триптофановая флуоресценция не менялась в пределах погрешности эксперимента. Данный факт позволяет заключить, что возможное изменение параметров собственной флуоресценции альбумина при добавлении солей двухвалентных металлов будет обусловлено их взаимодействием с белком.

3.2.2. Влияние катионов свинца на собственную флуоресценцию альбумина

На рисунке 3.3 представлена зависимость интенсивности собственной флуоресценции БСА в растворе при добавлении катионов свинца. В данном эксперименте возбуждение флуоресценции производилось на длине волны 266 нм, что позволяет возбуждать все ароматические аминокислотные

остатки рассматриваемого белка. Несмотря на это, форма спектра флуоресценции БСА не меняется при увеличении концентрации катионов свинца вплоть до 300 мМ, что говорит о независимости относительных вкладов флуоресценции тирозина и фенилаланина от наличия в растворе катионов тяжёлых металлов, поэтому в дальнейшем анализировалась лишь триптофановая флуоресценция.

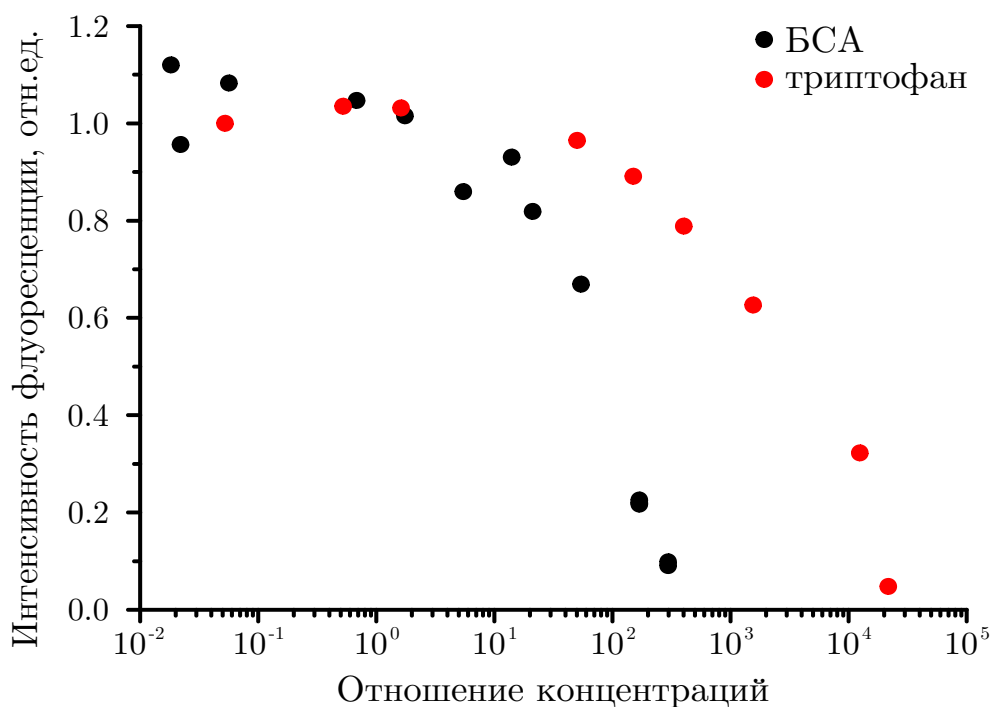


Рис. 3.3: Зависимость от отношения молярных концентраций катионов свинца и исследуемого объекта (БСА или триптофана) интенсивности максимума флуоресценции триптофановых остатков БСА (чёрным) и свободного триптофана в растворе (красным) при возбуждении на длине волны 266 нм. Концентрация БСА - 15 мкМ. Концентрация триптофана - 45 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию катионов свинца в растворе ($[Pb^{2+}]=0$)

Для выявления механизма тушения триптофановой флуоресценции БСА было проведено сравнение зависимости интенсивности флуоресценции для свободного триптофана в растворе и в составе белка, приведённое на рис. 3.3. Как и для БСА, для свободного триптофана в растворе наблюдается тушение флуоресценции. Измерения спектров поглощения для тех же образцов не выявили зависимости от концентрации ионов тяжёлого металла, что говорит о влиянии ионов свинца на характеристики процес-

сов дезактивации возбуждённого состояния. В литературе, посвящённой исследованию флуоресценции свободного триптофана в растворе, нет данных о возможной агрегации данной аминокислоты под действием тяжёлых металлов. Таким образом, можно сделать вывод, что тушение флуоресценции БСА при добавлении соли свинца является следствием взаимодействия ионов тяжёлого металла с триптофановыми остатками белка, а не его агрегации. Стоит отметить, что уменьшение интенсивности флуоресценции триптофана и БСА совпадает с изменением времени затухания флуоресценции, что также подтверждает гипотезу о влиянии ионов свинца на характеристики процессов дезактивации возбуждённого состояния.

Присоединение к молекуле белка катионов свинца может изменять параметры дезактивации возбуждённого состояния за счёт эффекта тяжёлого атома [22, 23]. Эффект тяжёлого атома проявляется в увеличении вероятности интеркомбинационной конверсии для флуорофора за счёт частичного снятия запрета по спине [22, 23]. Характерное время релаксации из триплетного состояния существенно превышает время затухания флуоресценции, что приводит к увеличению доли молекул в триплетном состоянии, а следовательно, к обеднению основного состояния. В данном разделе для регистрации эффекта тяжёлого атома было проведено сравнение зависимости интенсивности флуоресценции свободного триптофана и БСА при длительном облучении растворов лазерными импульсами на длине волны 266 нм с разной частотой повторения. Описание данной методики можно найти в приложении (П.1.1).

На рисунке 3.4 приведено сравнение зависимостей интенсивности флуоресценции при облучении лазерными импульсами с разной частотой повторения для свободного триптофана и БСА. Для всех приведённых на этом рисунке данных наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции за счёт взаимодействия лазерного излучения с веществом. Известно, что под действием излучения лазера может происходить:

- *спонтанная ионизация* из возбуждённого состояния [91, 92]. Для триптофана в растворе это процесс характеризуется временами порядка наносекунд и является обратимым с характерным временем рекомбинации 10^{-3} - 10^{-6} с. Оценка показывает, что в проведённых экспериментах на одну молекулу белка (или триптофана) приходится за секунду порядка 10 фотонов, что должно приводить к большому

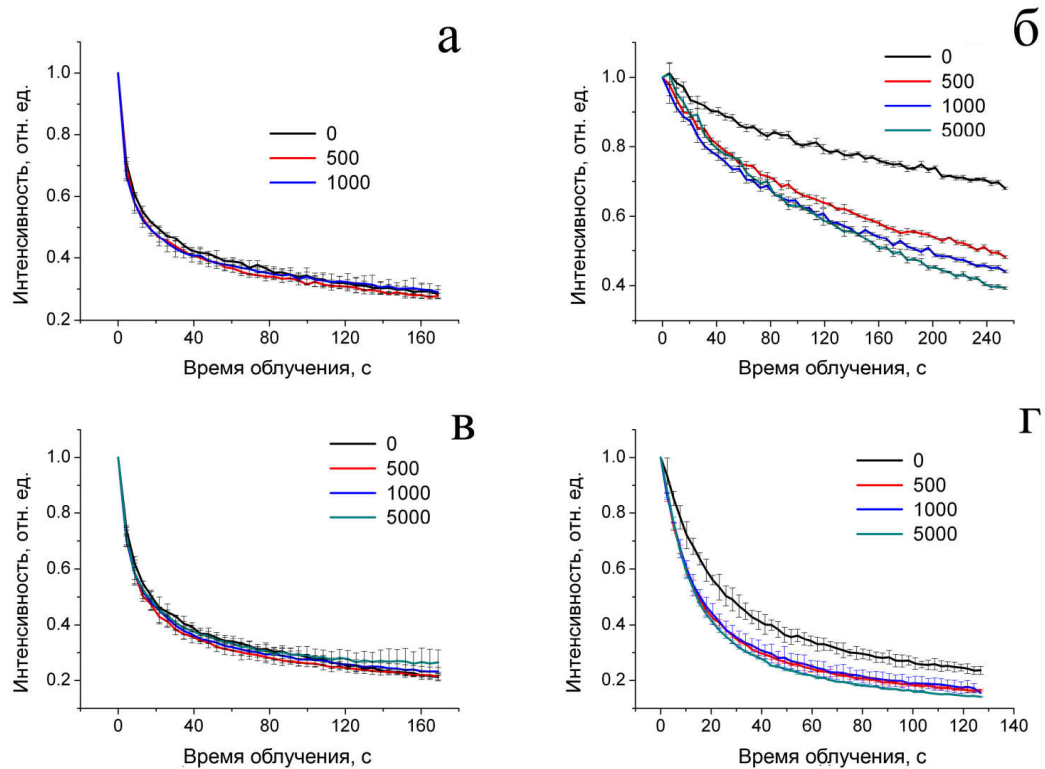


Рис. 3.4: Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для свободного триптофана в растворе (а, б) и для БСА (в, г) от времени облучения лазерными импульсами на длине волны 266 нм длительностью 10 нс и частотой повторения 10 Гц (а, в) и 1 кГц (б, г). Отношение молярных концентрации катионов свинца и БСА (или триптофана) приведено в легенде на графиках отношения концентраций катионов свинца и БСА (триптофана). Концентрация БСА - 15 мкМ. Концентрация триптофана - 45 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала в начале облучения

влиянию спонтанной ионизации на флуоресценцию исследуемых объектов.

- *двухступенчатая ионизация*, вызванная поглощением из возбуждённого состояния [92]. Данный эффект проявляется при высокой плотности потока фотонов лазерного излучения (более $10^{24} \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$, что существенно превышает характерные значения для использованных в данной работе источников излучения.
- *фотодеградация* образца, под которой подразумевается необратимое образование нелуоресцирующего фотопродукта [93].

Как видно из рис. 3.4 скорость уменьшения интенсивности флуоресценции при облучении импульсами с частотой следования 10 Гц не зависят от концентрации ионов свинца как для БСА, так и для свободного триптофана в растворе, что показывает наличие фотодеградации. Напротив, при облучении импульсами с частотой 1 кГц скорость уменьшения интенсивности флуоресценции зависит от концентрации ионов свинца. Данный факт позволяет предположить, что в рассматриваемой системе существует процесс безызлучательной дезактивации возбуждённого состояния флуорофоров с характерным временем в пределах от 1 мс до 0,1 с, который зависит от наличия в растворе ионов свинца.

Результаты, приведённые в данном разделе показывают, что тирозиновая флуоресценция БСА не изменяется при связывании катионов свинца, поэтому связывание металлов в плазме крови может быть зарегистрировано, только если оно изменяет связывание ЖК. В то же время изменения триптофановой флуоресценции БСА при добавлении ионов тяжёлого металла происходят при концентрациях, существенно превышающих предельно допустимые значения для человеческого организма (10^{-7} М), что не является физиологически релевантными условиями. Однако результаты описанного эксперимента интересны с точки зрения оптических свойств триптофана. Было показано наличие нефлуоресцирующего возбуждённого состояния характерным временем релаксации в пределах от 1 мс до 0,1 с, вероятность перехода в которое из первого возбуждённого синглетного состояния увеличивается при добавлении ионов свинца. Данная особенность является возможным следствием спонтанной фотоионизации флуорофора и увеличения вероятности синглет-триплетной конверсии за счёт эффекта тяжёлого атома.

§ 3.3. Собственная флуоресценция альбумина в зависимости от pH раствора

Для проверки влияния распределения зарядов поверхности белка на интенсивность флуоресценции тирозина был исследован набор образцов с различным значением pH. Известно, что при изменении pH раствора сильно меняется суммарный заряд поверхности белка (рис. 3.5, [89]) за счёт диссоциации боковых цепей аминокислотных остатков. Рассмотрим теперь изменения структуры белка при варьировании pH, которые являются обра-

тимыми, если время нахождения белка при экстремальных значениях pH минимально [1].

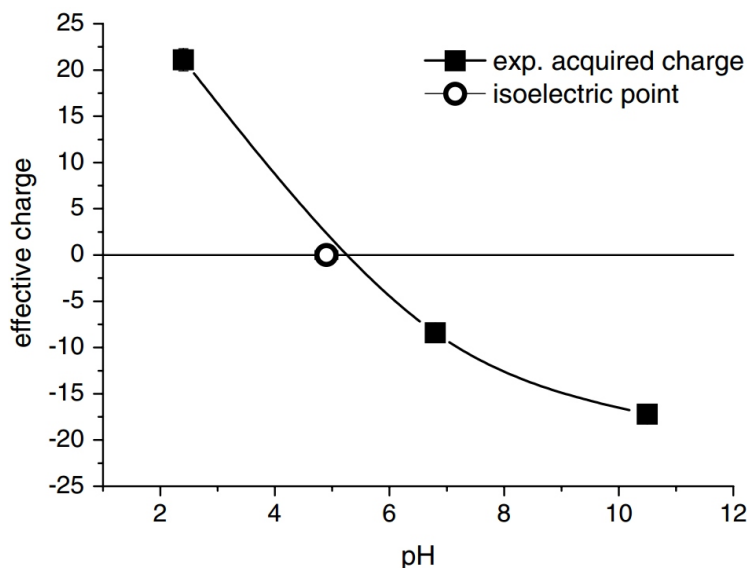


Рис. 3.5: Зависимость суммарного поверхностного заряда БСА от pH раствора (по данным работы [89])

3.3.1. Изменение структуры белка в зависимости от pH раствора

Как указывалось в первой главе настоящей работы, при значении pH раствора, равным 7,4, белок принимает нативную форму в виде правильной треугольной призмы с полостью (рис. 1.2 а), которая в контексте структурных изменений макромолекулы при варьировании pH раствора обозначается как N-форма (от английского "Normal") [1]. При изменении pH раствора белок претерпевает несколько структурных переходов, которые приведены в таблице 3.1 вместе со значениями pH, соответствующими середине этих переходов. Подробное исследование указанных структурных переходов альбумина было проведено в работе [47], где изучался САЧ и его рекомбинантные домены методами флуоресцентной спектроскопии и кругового дихроизма при изменении pH растворов в широких пределах (1,5 - 9,0). Стоит отметить, что в этой работе для анализа структурных изменений рекомбинантных доменов, в которых нет триптофановых остатков (домены I и III), была использована флуоресценция тирозиновых остатков. Ниже будет приведена зависимость флуоресценции тирозиновых остатков

| pH | Изменение структуры |
|------|---------------------|
| 2,7 | F → E |
| 4,3 | N → F |
| 8,0 | N → B |
| 10,0 | B → A |

Таблица 3.1: Значения pH, соответствующие середине перехода между различными конформациями альбумина (по работе [1]). Направление перехода дано в соответствии с изменением pH от физиологического значения

САЧ и БСА от pH растворов (рис. 3.11), а также их сравнение с данными по доменам альбумина (рис. 3.7), взятыми из работы [47].

При увеличении pH раствора от нейтрального в сторону щелочных значений белок переходит в B-форму (от английского "Basic") [1]. В работе [47] было показано, что при N-B-переходе основные структурные изменения белка происходят в областях между доменами, что приводит к изменению положения доменов друг относительно друга. Анализ структуры альбумина [8] показывает, что в областях между доменами отсутствуют тирозиновые остатки, поэтому значительного изменения их флуоресценции в данном диапазоне pH, связанного с изменением взаимного расположения доменов, скорее всего, не происходит. С точки зрения электростатики молекулы, изменение pH раствора белка с 6,0 до 9,1 приводит к увеличению относительной диэлектрической проницаемости окрестности нескомпенсированного цистеинового остатка в позиции Cys34 (рис. 3.6) практически в два раза (с 12,8 до 23,3) [94]. Данный остаток Cys34 находится в начале полости, внутри которой располагается сайт ЖК, поэтому если в данном диапазоне pH будет увеличение интенсивности тирозиновых остатков, то оно может быть связано с изменением этого сайта.

При дальнейшем увеличении pH раствора или при хранении раствора белка при pH 9,0 и температуре 3°C, белок переходит в A-форму (от английского "Aged"). B-A-переход в последнем случае может быть предотвращён при помощи блокировки Cys34. Как было указано в первой главе (см. 1.2.2), в при pH > 9,0 может происходить депротонирование тирозиновых остатков (образование тирозината), что приводит к сильному тушению их флуоресценции. Для проверки вклада такого влияния pH раствора на флуоресцентные характеристики тирозиновых остатков были проведены

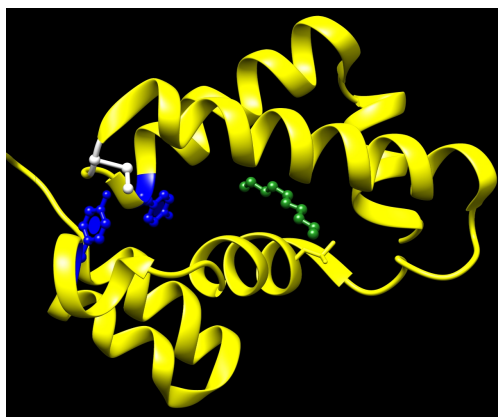


Рис. 3.6: Структура сайта ЖК в окрестности Cys34 в субдомене Ia для комплекса САЧ-лауриновая кислота pdb ID: 1E7F [54]. Синим показаны тирозиновые остатки, белым - некомпенсированный цистеиновый остаток Cys34, зелёным - молекула лиганда. Рисунок построен при помощи программы USCF Chimera package [9]

исследования флуоресценции как свободного тирозина в растворе, так и бестриптофанового гормона пептидной природы (инсулина).

При уменьшении pH раствора от нейтрального в сторону кислотных значений белок переходит в F-форму (от английского "Fast"), которая характеризуется наибольшей подвижностью в гелевом электрофорезе [1]. В работе [95] методом электронного спинового резонанса было показано, что при N-F-переходе происходит открытие полости в окрестности цистеинового остатка в позиции Cys34, внутри которой располагается один из сайтов связывания ЖК (рис. 3.6). Анализ структуры белка и его рекомбинантных доменов в работе [47] выявил, что наиболее сильные изменения происходят в домене III, что приводит к уменьшению флуоресценции тирозиновых остатков за счёт разрушения альфа-спиралей (рис. 3.7). Напротив, флуоресценция тирозиновых остатков домена I возрастает в рассматриваемом диапазоне pH, что связывается авторами [47] с уменьшением вероятности переноса протона с тирозиновых остатков в возбуждённом состоянии на близлежащие остатки, а также за счёт разрушения водородных связей.

При дальнейшем уменьшении pH раствора в сторону кислотных значений белок переходит в E-форму (от английского "Expanded"), которая характеризуется полным разворачиванием структуры белка [1]. Данный структурный переход приводит к усилению флуоресценции тирозиновых остатков в доменах I и III, которое связывается с денатурацией указанных доменов (рис. 3.7) [47].

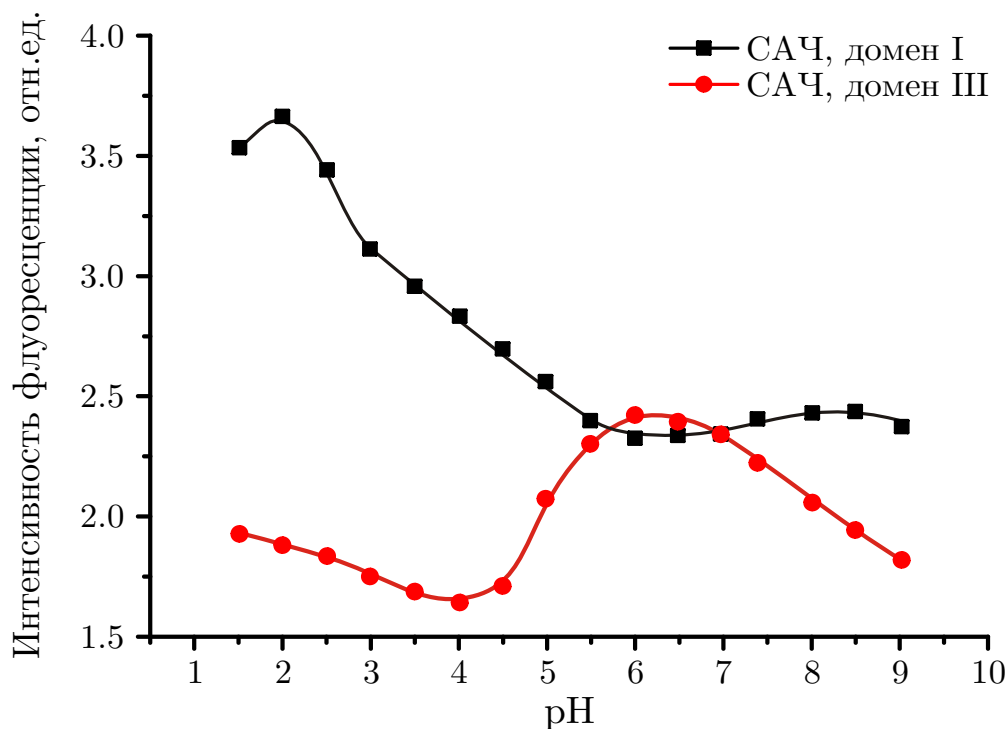


Рис. 3.7: Зависимость от pH интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков домена I (чёрным) и домена III (красным) САЧ при возбуждении на длине волны 280 нм по данным [47]

3.3.2. Изменение флуоресценции свободных ароматических аминокислот (триптофана и тирозина) в зависимости от pH раствора

Для исследования влияния pH растворов на собственную флуоресценцию триптофана и тирозина как в свободном состоянии в растворе, так и в составе сывороточных альбуминов (БСА и САЧ) и инсулина использовался универсальный буферный раствор, позволяющий менять pH раствора в широких пределах (см. П.2 и работу [96]).

На рис. 3.8 и 3.9 представлены зависимости от pH интенсивности флуоресценции тирозина и триптофана в растворе, которые совпадают с литературными данными [27, 97, 98]. Рассмотрим причины изменения интенсивности флуоресценции данных ароматических аминокислот в растворе и выделим механизмы изменения их интенсивности, которые сохраняются в белке.

Уменьшение интенсивности тирозина при $\text{pH} < 4,0$ связано с перераспределением протонов в окрестности ароматического кольца за счёт карбоксильной группы [98]. Указанное тушение флуоресценции тирозино-

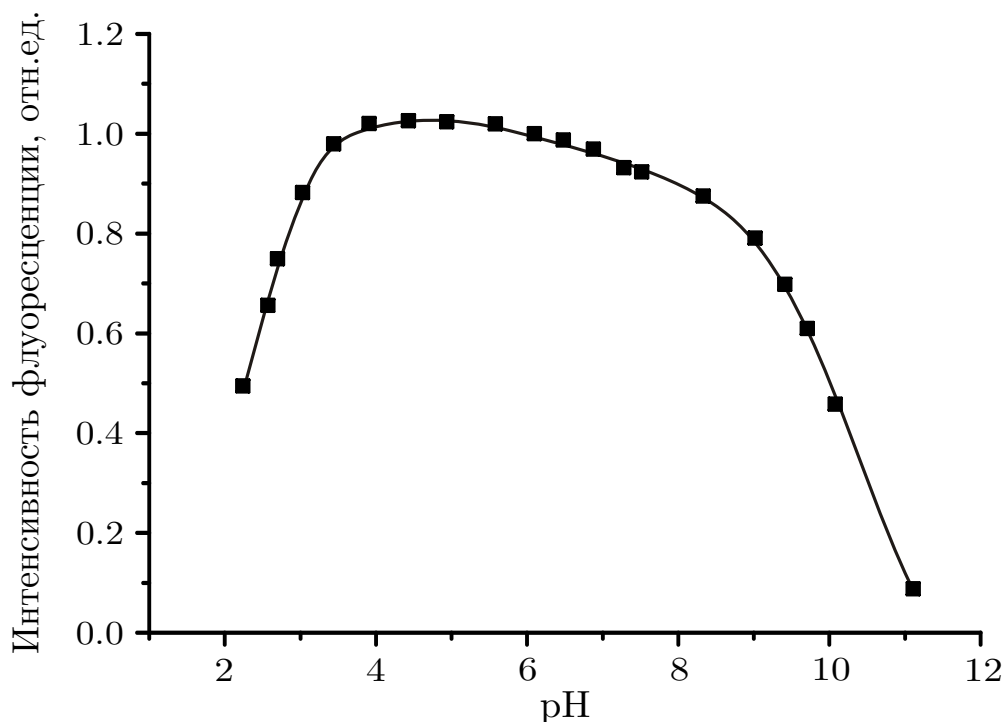


Рис. 3.8: Зависимость от pH интенсивности максимума флуоресценции тирозина в растворе при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация тирозина - 46 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего pH~7

вых остатков вряд ли будет проявляться в белке, поскольку данная группа входит в состав пептидной связи. При $\text{pH} > 8,5$ также наблюдается тушение тирозина в растворе, которое связано с образованием тирозината (депротонированием тирозина). В этом случае депротонирующаяся группа является свободной в белке, поэтому для альбуминов в данном диапазоне pH будет наблюдаться тушение флуоресценции (рис. 3.11).

Тушение флуоресценции триптофана при $\text{pH} < 4,0$ является внутримолекулярным и связано с переносом заряда на карбоксильную группу [27]. Данный механизм тушения сохраняется и в белках, причём в этом случае перенос заряда возможен на протонированные группы других остатков в окрестности триптофанового [47], поскольку карбоксильная группа данного остатка задействована в образовании пептидной связи. При $\text{pH} > 8,0$ для свободного триптофана в растворе наблюдается резкий рост флуоресценции, что вызвано нейтрализацией аминогруппы [27]. Рассматриваемые в данной работе белки содержат тирозиновые остатки, которые переходят в тирозинат при $\text{pH} > 8,5$. Спектр поглощения тирозината перекрывается со спектром флуоресценции триптофана, поэтому в белке в указанном диа-

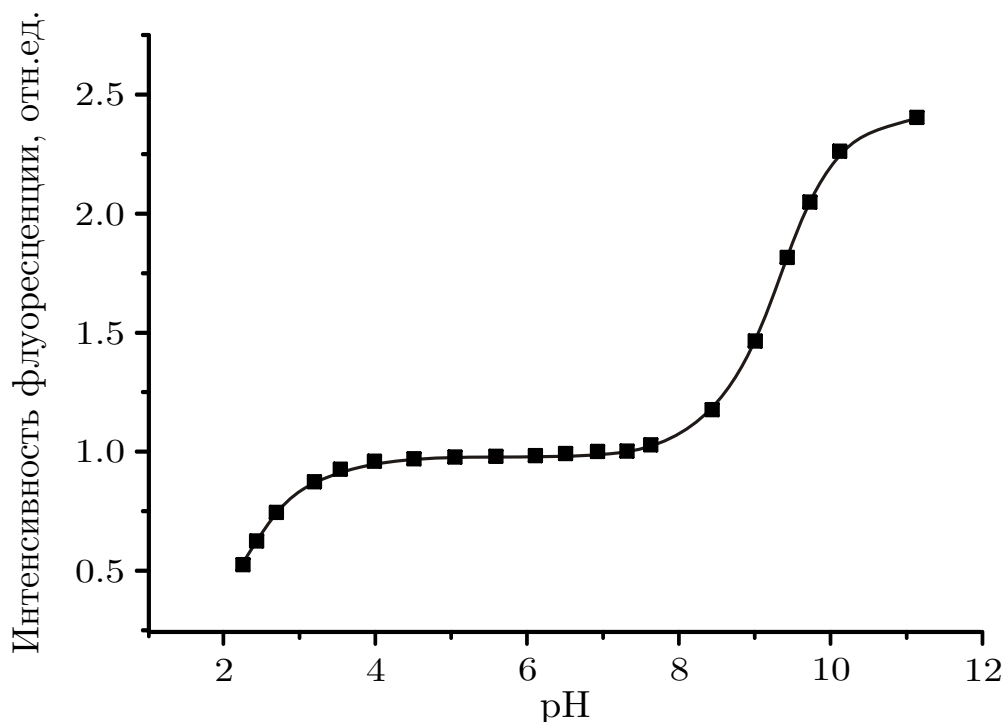


Рис. 3.9: Зависимость от pH интенсивности максимума флуоресценции триптофана в растворе при возбуждении на длине волны 295 нм. Концентрация триптофана - 16 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего pH~7

пазоне pH будет наблюдаться тушение флуоресценции за счёт переноса энергии по диполь-дипольному механизму.

3.3.3. Изменение собственной флуоресценции за счёт структурных переходов молекул сывороточных альбуминов в зависимости от pH раствора

На рис. 3.10 приведено сравнение зависимости интенсивности флуоресценции триптофановых остатков в альбуминах (БСА и САЧ) с литературными данными, взятыми из работы [47]. Из рисунка видно, что зависимости для БСА и САЧ, полученные в рамках данной диссертационной работы, совпадают друг с другом, но отличаются при малых значениях pH ($\text{pH} < 4,5$) от результатов работы [47]. Такое отличие является следствием взаимодействия белка с компонентами буферного раствора, используемого в эксперименте в работе [47], а именно образования водородной связи недиссоциированной уксусной кислоты с функциональными группами альбуминов. При $\text{pH} > 8,5$ наблюдается резкое падение интенсивности триптофановой флуоресценции, что является следствием переноса энергии на ти-

розинат. Наличие депротонированных тирозиновых остатков в белках проявляется также в спектрах поглощения в увеличении оптической плотности исследуемых растворов на длине волны 295 нм. Что касается положения максимума флуоресценции триптофановых остатков, то при изменении рН раствора в диапазоне от 2,0 до 11,0 максимальный сдвиг составляет не более 3 нм, несмотря на то, что поверхностный заряд белка в этом диапазоне меняется на 40 единиц заряда электрона (рис. 3.5). Данный факт объясняется тем, что поле, создаваемое поверхностным зарядом в окрестности триптофановых остатков, практически полностью компенсируется полем от растворителя.

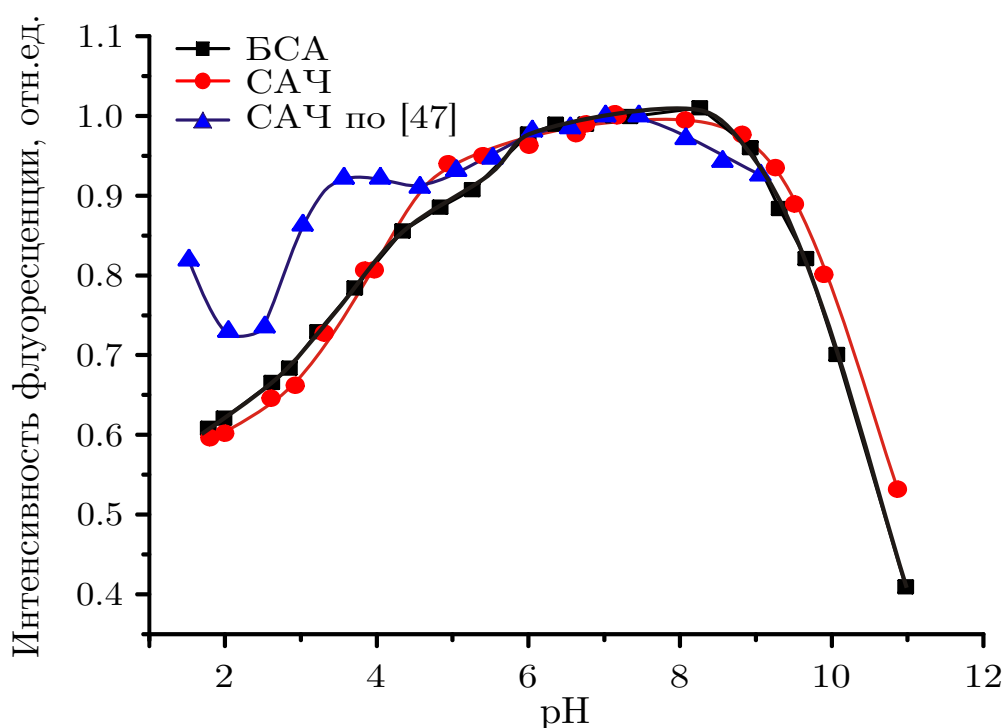


Рис. 3.10: Зависимость от рН интенсивности максимума флуоресценции триптофановых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) в растворе при возбуждении на длине волны 295 нм в сравнении с данными для САЧ (синим) по работе [47]. Концентрация БСА - 4,5 мкМ. Концентрация САЧ - 4,3 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего рН~7

На рис. 3.11 приведены зависимости интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков сывороточных альбуминов (БСА и САЧ) и инсулина от значения рН раствора. При высоких значениях рН ($\text{pH} > 8,5$) указанные зависимости совпадают между собой и с зависимостью для свободного тирозина в растворе (рис. 3.8). Данный факт подтверждает образование тирозината в белках. Совпадение зависимостей интенсивности тирозино-

вой флуоресценции при низких рН ($\text{pH} < 4,5$) для САЧ, БСА и инсулина, полученных в данной работе, говорит о сходном изменении их окрестности в рассматриваемых белках. Указанные зависимости интенсивности флуоресценции отличаются от зависимости для свободного тирозина в растворе, что исключает возможность влияния увеличения доступности тирозиновых остатков растворителю при N-F переходе. Отметим, что в данном диапазоне рН зависимость интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков для САЧ и БСА совпадает с зависимостью для рекомбинантного домена I, но отличается для рекомбинантного домена III (рис. 3.7). В указанном диапазоне рН происходит разрушение альфа-спиралей, причём наиболее серьёзные перестройки структуры происходят именно в домене III. Подобное различие зависимости интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков рекомбинантного домена III (результаты работы [47]), альбумина и свободного тирозина в растворе (результаты данной работы) ещё раз подтверждают тот факт, что при N-F-переходе структурные изменения не приводят к экспонированию тирозиновых остатков в растворитель, а усиление флуоресценции данных остатков связано с изменением их локальной окрестности и снятия тушения за счёт протонирования соседних аминокислотных остатков.

Результаты, приведённые в данном разделе показывают, что тирозиновая флуоресценция является индикатором конформационных изменений альбуминов при варьировании рН раствора. Было выявлено, что для трёх объектов (БСА, САЧ, инсулин) наблюдается одинаковое усиление флуоресценции тирозиновых остатков при значениях $\text{pH} < 4,5$, которое объясняется снятием тушения флуоресценции за счёт соседних функциональных групп. Сравнение полученного в данной работе изменения собственной флуоресценции САЧ с данными для его рекомбинантных доменов [47] показали, что рекомбинантные домены I и II позволяют моделировать структурные переходы в белке, а для структуры домена III, напротив, важно наличие остальных доменов.

§ 3.4. Собственная флуоресценция альбумина в присутствии этанола

Изменение полярности окружения белка можно моделировать добавлением в раствор различных спиртов, например, этанола. Рассмотрим, как

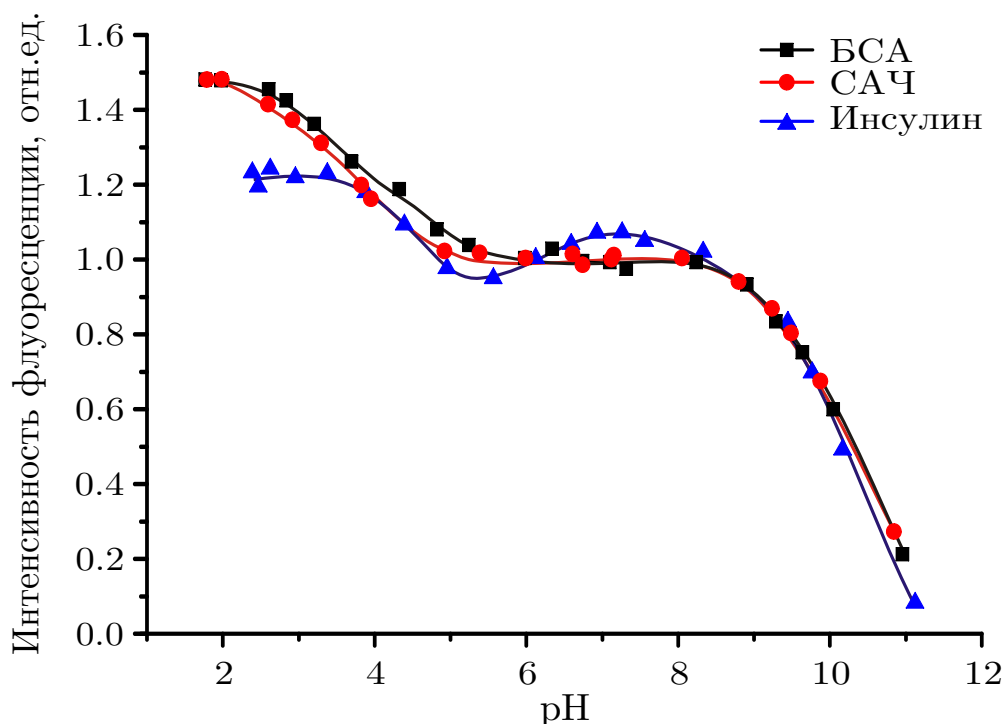


Рис. 3.11: Зависимость от pH интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков БСА (чёрным), САЧ (красным) и инсулина (синим) в растворе при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация БСА - 4,5 мкМ. Концентрация САЧ - 4,3 мкМ. Концентрация инсулина - 15 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего pH~7

присутствие в растворе белка этанола влияет на структурные и оптические свойства альбуминов.

3.4.1. Изменение структуры альбумина в присутствии этанола

Известно, что при добавлении в раствор белка этанола ($[EtOH] < 2\%$ (v/v), табл. 3.2) структура белка может изменяться как за счёт изменения сети водородных связей в первой гидратационной сфере [11, 99], так и за счёт связывания молекул этанола в сайты ЖК [11, 99–101]. При добавлении спирта в раствор белка в первой гидратационной сфере происходит замена молекул воды на молекулы спирта, которые могут образовывать водородные связи с боковыми группами аминокислотных остатков, в том числе и тирозиновых [99]. Что касается связывания молекул спирта с молекулой белка, то в работе [100] было показано, что связывание этанола происходит в три из пяти сайтов для ЖК, которые также являются сайтами для гидрофобной метки ANS.

| [EtOH], % (v/v) | Изменение структуры белка и его окружения |
|-----------------|--|
| 0 - 2 | Перестройка первой гидратационной сферы белка, связывание молекул спирта |
| 2 - 30 | Связывание молекул спирта, образование интермедиата белка |
| 30 - 60 | Образование белковых агрегатов в растворе |
| > 60 | Разрушение белковых агрегатов в растворе |

Таблица 3.2: Изменение структуры белка и его окружения в растворе при добавлении этанола по данным [11, 100]

На основании результатов, полученных при исследовании релаксации ядерного магнитного резонанса, авторами [100] делается вывод, что связывание этанола в сайты ЖК происходит за счёт метильной группы, а гидроксильная группа при этом обращена в сторону растворителя.

При дальнейшем увеличении концентрации спирта (см. табл. 3.2) происходит образование интермедиата белка, который характеризуется увеличением доли альфа-спиралей и разрушением третичной структуры (в окрестности триптофановых остатков и дисульфидных мостиков). Наличие интермедиата в растворе в работе [11] было также показано сравнением изменения свободной энергии Гиббса при образовании предполагаемого интермедиата и химической денатурации белка (мочевинной и гидрохлоридом гуанидина): в состоянии интермедиата белок не является полностью денатурированным. В рассматриваемом диапазоне концентраций спирта также происходит связывание молекул этанола и белка как за счёт гидрофобных взаимодействий метильной группы, так и за счёт взаимодействия гидроксильной группы с боковыми радикалами аминокислотных остатков, поэтому наличие интермедиата может быть показано с помощью гидрофобного красителя (например, Нильского красного) (см. 3.4.2).

При концентрации спирта от 30 % (v/v) до 60 % (v/v) происходит преобразование внутримолекулярных бета-структур в межмолекулярные, что приводит к образованию белковых агрегатов в растворе [11]. Такое образование агрегатов в исследуемых в настоящей работе растворах было зарегистрировано по увеличению их мутности (увеличению их оптической плотности в длинноволновой области спектра для $\lambda > 450$ нм, где отсутствуют полосы поглощения компонентов образцов) при концентрации спирта $[\text{EtOH}]_{agg} = 40\%$ (v/v) и $[\text{EtOH}]_{agg} = 45\%$ (v/v) для САЧ и БСА, соответ-

ственно, поэтому в следующих частях раздела приведены результаты для $[\text{EtOH}] < [\text{EtOH}]_{agg}$.

3.4.2. Определение интермедиата БСА в водно-этанольном растворе по флуоресценции Нильского красного

На рис. 3.12 приведено сравнение времени затухания флуоресценции гидрофобного красителя Нильского красного (τ_{NR}) в водно-этанольном растворе в присутствии (красным) и в отсутствии БСА при регистрации на двух длинах волн (617 нм и 655 нм). Кинетики флуоресценции были получены с помощью установки, позволяющей регистрировать сигнал на нескольких длинах волн и подробно описанной в приложении (П.1.2). Для возбуждения флуоресценции использовался импульсный лазерный диод (длина волны излучения 510 нм). Видно, что при концентрации спирта $[\text{EtOH}] > 30\%$ (v/v) τ_{NR} не зависит от присутствия БСА в растворе. Данный факт указывает на наличие в растворе интермедиата белка, который не связывается с Нильским красным.

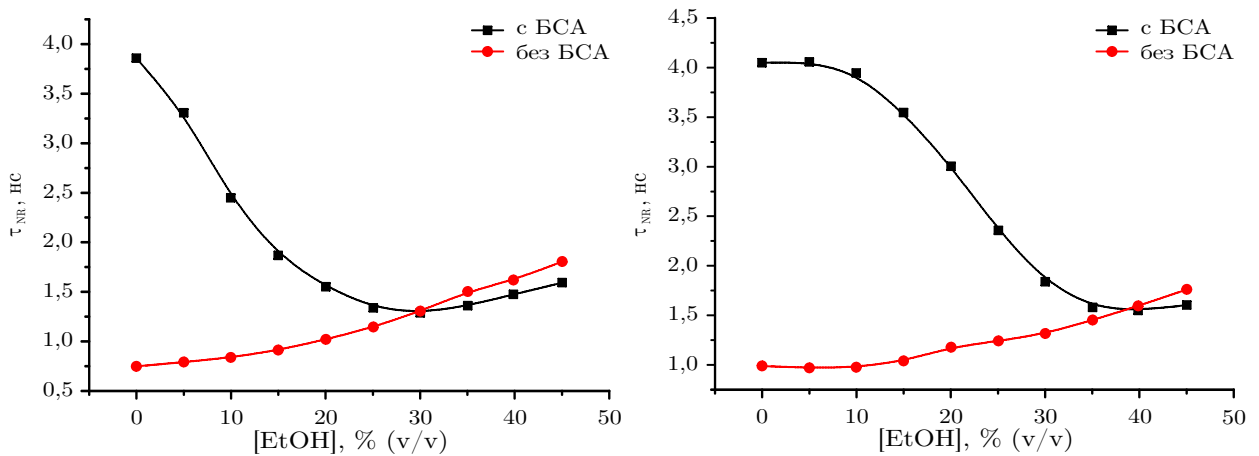


Рис. 3.12: Зависимость от концентрации этанола времени затухания флуоресценции Нильского красного в водно-этанольном растворе в присутствии (чёрным) и в отсутствии (красным) БСА. Регистрация сигнала осуществлялась на длине волны (а) 655 нм и (б) 617 нм при возбуждении на длине волны 510 нм. Концентрация БСА - 15 мкМ. Концентрация Нильского красного - 5,6 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию этанола в растворе ($[\text{EtOH}]=0$)

Сравнение зависимости τ_{NR} от концентрации этанола в отсутствие белка для коротковолновой и длинноволновой регистрации не выявляет отличий. Напротив, в присутствии БСА ход данных зависимостей от кон-

центрации спирта различается: для коротковолновой регистрации изменения τ_{NR} не происходит до концентрации $[\text{EtOH}] = 10\%$ (v/v) в то время как для длинноволновой регистрации τ_{NR} уменьшается в указанном диапазоне. Подобная зависимость τ_{NR} от длины волны регистрации является следствием наличия двух типов сайтов связывания Нильского красного, которые отличаются доступностью зонда по отношению к растворителю [50, 53]. Данный результат позволяет предположить, что при добавлении этанола на малых концентрациях ($[\text{EtOH}] < 10\%$ (v/v)) происходит изменение структуры более доступного растворителю ("длинноволнового") сайта гидрофобного зонда, которое обусловлено связыванием спирта.

3.4.3. Изменение оптических свойств альбумина в присутствии этанола

На рис. 3.13 приведена зависимость интенсивности флуоресценции триптофановых остатков БСА и САЧ от концентрации этанола. Для концентрации спирта $[\text{EtOH}] < 12\%$ (v/v) триптофановая флуоресценция не меняется (ни по интенсивности в максимуме ни по его положению) как для БСА, так и для САЧ. Как было показано в эксперименте с гидрофобным красителем Нильским красным, в данном диапазоне концентраций спирта происходит изменение структуры белка в окрестности более доступного растворителю сайта красителя. Отсутствие изменений триптофановой флуоресценции для БСА и САЧ говорит о том, что изменения структуры не затрагивают окрестность триптофановых остатков, а происходят в другой части молекулы, например, в домене III.

При концентрации спирта $[\text{EtOH}] > 12\%$ (v/v) зависимость интенсивности флуоресценции триптофановых остатков различается для гомологичных белков. Для БСА наблюдается уменьшение флуоресценции (на $\sim 25\%$ от её значения в отсутствии этанола), для САЧ, напротив, интенсивность флуоресценции растёт, но незначительно (на $\sim 10\%$ от её значения в отсутствии этанола). Увеличение флуоресценции для САЧ показывает, что при изменении структуры белка под действием этанола происходит снятие механизмов тушения, связанных с локальной окрестностью общего триптофана в белке. Сильное тушение флуоресценции БСА является следствием перестройки окрестности дополнительного триптофанового остатка Trp134, который характеризуется бóльшим сечением поглощения и време-

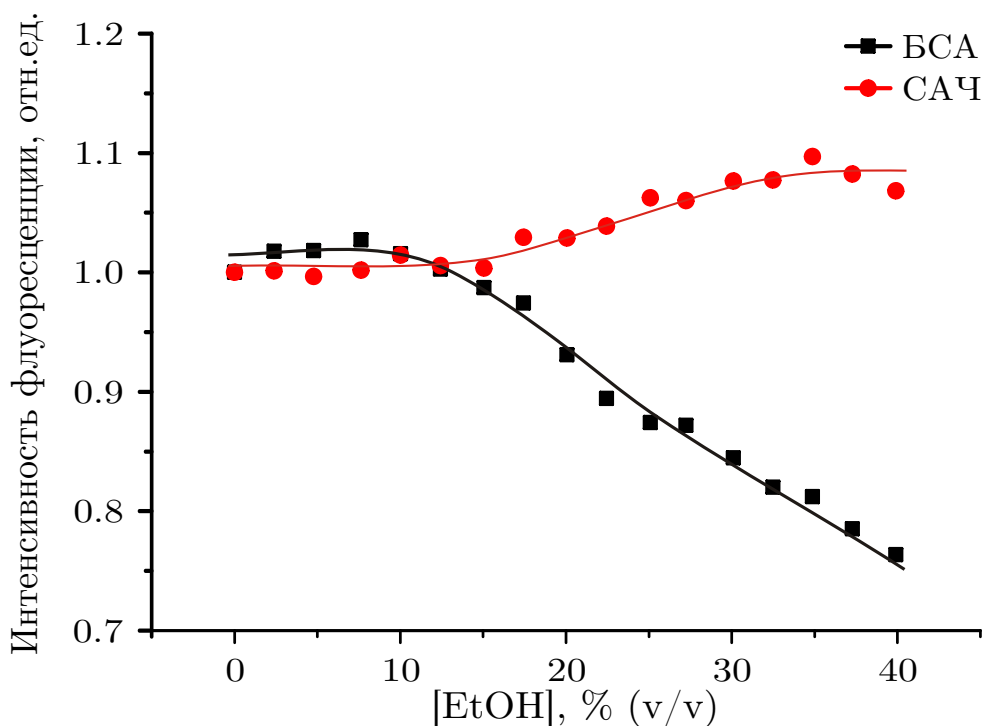


Рис. 3.13: Зависимость от концентрации этанола интенсивности максимума флуоресценции триптофановых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 295 нм. Концентрация БСА - 4.7 мкМ. Концентрация САЧ - 4.1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию этанола в растворе ($[\text{EtOH}] = 0$)

нем затухания флуоресценции [102], а значит, даёт бóльший вклад в интенсивность флуоресценции.

При концентрации спирта $[\text{EtOH}] > 12\%$ (v/v) положение максимума флуоресценции триптофановых остатков смещается в коротковолновую область спектра (на 10 нм и 5 нм для БСА и САЧ, соответственно) и становится близким для указанных белков при $[\text{EtOH}] > 30\%$ (v/v). Как было показано в разделе 3.4.2, для данной концентрации спирта в растворе белок находится в состоянии интермедиата. Совпадение положения максимума флуоресценции триптофановых остатков в БСА и САЧ говорит о совпадении электрического поля в окрестности триптофановых остатков, а сдвиг максимума в коротковолновую область - об уменьшении результирующего электрического поля в их окрестности, причём величина эффекта сильнее для БСА.

Добавление спирта в раствор белка влияет на относительную диэлектрическую проницаемость вне первой гидратационной сферы, изменение

которой можно простейшим образом оценить как:

$$\varepsilon_{eff} = c_{EtOH} * \varepsilon_{EtOH} + c_{H_2O} * \varepsilon_{H_2O}, \quad (3.1)$$

где ε и c - это диэлектрическая проницаемость и концентрация соответственно, а индексом обозначена среда ($EtOH$ - спирт, H_2O - вода, eff - их смесь) [103]. Принимая во внимание значения относительной диэлектрической проницаемости для чистых растворов ($\varepsilon_{EtOH} = 25,3$, $\varepsilon_{H_2O} = 78,3$), можно заключить, что диэлектрическая проницаемость раствора падает (на $\sim 25\%$), поэтому уменьшение поля за счёт изменения растворителя вне первой гидратационной сферы белка, где справедлива оценка 3.1, невозможно. Следовательно, изменение поля, проявляющееся в сдвиге положения максимума интенсивности флуоресценции триптофановых остатков, связано с изменением конформации белка и, возможно, с изменением первой гидратационной сферы белка. На основании сравнения изменения интенсивности флуоресценции триптофановых остатков, а также её положения максимума для БСА и САЧ можно сделать вывод, что переход белка из нативной формы в интермедиат сопровождается сильными перестройками в домене I.

На рис. 3.14 приведена зависимость интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков (БСА и САЧ) от концентрации этанола при образовании интермедиата, которая совпадает для указанных белков. Подобное совпадение зависимостей подтверждает предположение о сходных конформационных изменениях в гомологичных белках, несмотря на различие в поведении триптофановой флуоресценции. Увеличение интенсивности тирозиновой флуоресценции происходит и при низких концентрациях спирта (для $[EtOH] < 12\%$ (v/v)), когда триптофановая флуоресценция не меняется. Усиление интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков является следствием замены молекул воды на молекулы этанола в первой гидратационной сфере, а также за счёт связывания молекул спирта в сайты ЖК.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что флуоресценция тирозиновых остатков чувствительна к изменению структуры альбумина в домене III (для $[EtOH] < 12\%$ (v/v)), которое не может быть зарегистрировано по триптофановой флуоресценции. Однако данное предположение нуждается в проверке, результаты которой описаны в следующем разделе. Кроме того, как и для случая анионного детергента SDS (Глава 2), на примере воздействия этанола на структуру белка было пока-

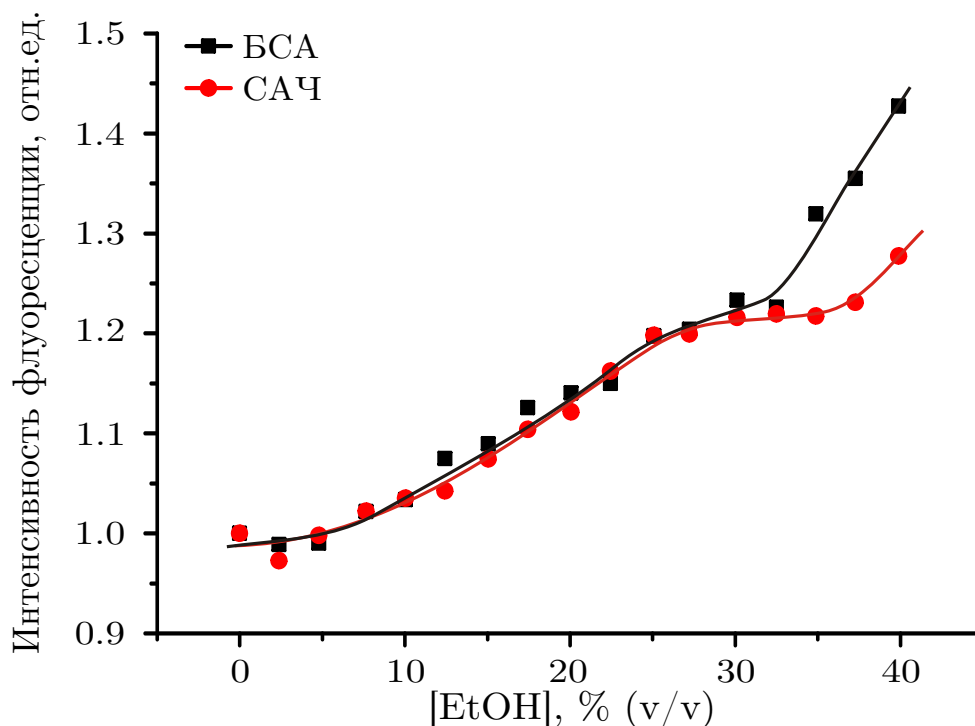


Рис. 3.14: Зависимость от концентрации этанола интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация БСА - 4.7 мкМ. Концентрация САЧ - 4.1 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию этанола в растворе ($[\text{EtOH}] = 0$)

зано, что тирозиновая флуоресценция более чувствительна к изменениям структуры белка в домене I САЧ, чем триптофановая.

§ 3.5. Собственная флуоресценция альбумина при денатурации гидрохлоридом гуанидина

Для оценки чувствительности тирозиновой флуоресценции к изменениям структуры белка в домене III были исследованы растворы альбуминов (БСА и САЧ) с различной концентрацией гидрохлорида гуанидина (GndHCl). Рассмотрим, как изменяется структура альбуминов при воздействии гидрохлорида гуанидина GndHCl в соответствии с основной работой по данной тематике [104].

| Домен | Лиганд |
|--------|-----------|
| I | Гемин |
| I и II | Билирубин |
| II | Хлороформ |
| III | Диазепам |

Таблица 3.3: Специфичные лиганды, используемые для исследования стабильности альбумина в работе [104]

| Домен | [GndHCl], М | ΔG_U , ккал/Моль |
|-----------|-------------|--------------------------|
| Домен III | 0,2 - 1,8 | 1,4 |
| Домен II | 1,8 - 3,4 | 4,4 |
| Домен I | 1,8 - 5,5 | 7,4 |

Таблица 3.4: Диапазон концентраций гидрохлорида гуанидина, при котором происходит разрушение структуры доменов САЧ, и значения энергии Гиббса ΔG_U , соответствующие данному разрушению структуры (по данным работы [104])

3.5.1. Изменение структуры альбумина под действием гидрохлорида гуанидина

При добавлении в раствор альбумина в качестве денатурирующего агента гидрохлорида гуанидина происходит последовательное изменение структуры доменов белка, схематично представленное на рис. 3.15, которое может быть зарегистрировано в случае использования нескольких специфичных лигандов. На основании данных по оптическому отклику лигандов, приведённых в таблице 3.3, в работе [104] было показано, что основные изменения в диапазоне концентраций $[GndHCl] < 1,8$ М происходят в домене III и приводят к формированию интермедиата альбумина в состоянии расплавленной глобулы (в англоязычной литературе molten globule like structure). На основании данных о связывании диазепама в домен III была определена стабильность данного домена (1,4 ккал/Моль, табл. 3.4). В этом же диапазоне концентраций изменяется положение доменов I и II друг относительно друга, которое можно зарегистрировать по связыванию билирубина (сайт расположен на границе раздела доменов), при этом структура самих доменов остаётся неизменной.

При концентрации гидрохлорида гуанидина $[GndHCl] > 1,2$ М начинает изменяться вторичная структура белка (данные спектроскопии кру-

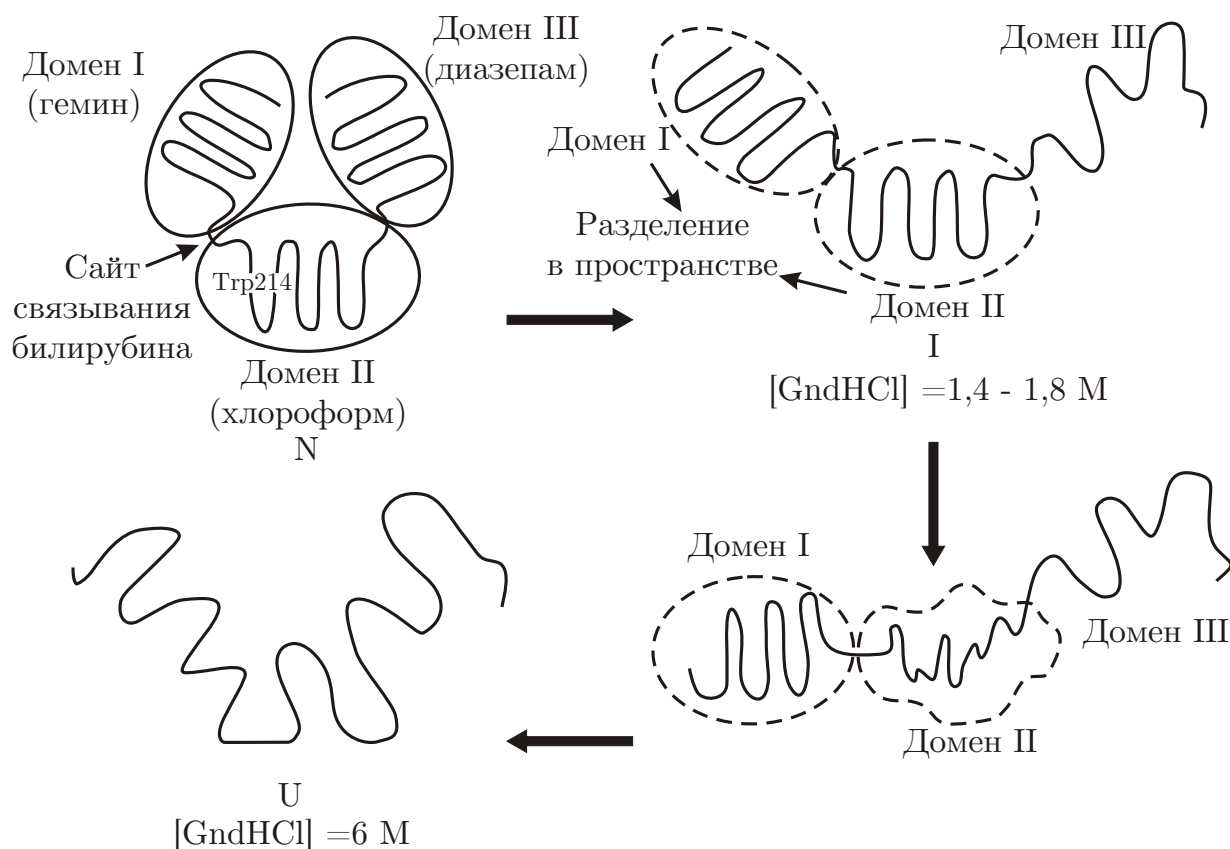


Рис. 3.15: Последовательное разрушение структуры доменов САЧ при денатурации гидрохлоридом гуанидина по данным работы [104]

гового дихроизма), окрестность триптофанового остатка (данные флуоресцентной спектроскопии) и связывание других лигандов (табл. 3.3) в результате конформационных изменений доменов I и II [104]. Так, уменьшение связывания специфичного для домена I лиганда (гемина) начинается при концентрации $[GndHCl] = 1,2 \text{ M}$, а домена II (хлороформа) - при концентрации $[GndHCl] = 1,8 \text{ M}$. На основании данных о связывании указанных лигандов была определена стабильность указанных доменов 7,4 ккал/Моль и 4,4 ккал/Моль для домена I и II, соответственно (табл. 3.4). Помимо изменения структуры внутри доменов I и II, происходит их разделение в пространстве при концентрации $[GndHCl] = 2,4 \text{ M}$, которое определяется потерей способности альбумина связывать билирубин. При концентрации гидрохлорида гуанидина $[GndHCl] > 6 \text{ M}$ наблюдается полная денатурация белка, которая характеризуется потерей вторичной структуры.

3.5.2. Изменение оптических свойств альбумина под действием гидрохлорида гуанидина

Денатурация альбумина гидрохлоридом гуанидина показывает, что триптофановая флуоресценция может давать ограниченную информацию об изменении структуры белка. На рис. 3.16 приведена зависимость интенсивности флуоресценции триптофановых остатков в БСА и САЧ при добавлении гидрохлорида гуанидина. Для САЧ в диапазоне концентраций денатурирующего агента, соответствующем разрушению домена III, флуоресценция триптофановых остатков не меняется, а для БСА при концентрации $[\text{GndHCl}] < 1.0 \text{ M}$ наблюдается максимум флуоресценции, что согласуется с литературными данными [59, 104–106]. Подобное различие для гомологичных белков является следствием незначительного увеличения доли альфа-структуры в локальной окрестности дополнительного триптофанового остатка БСА в позиции Trp134 [104].

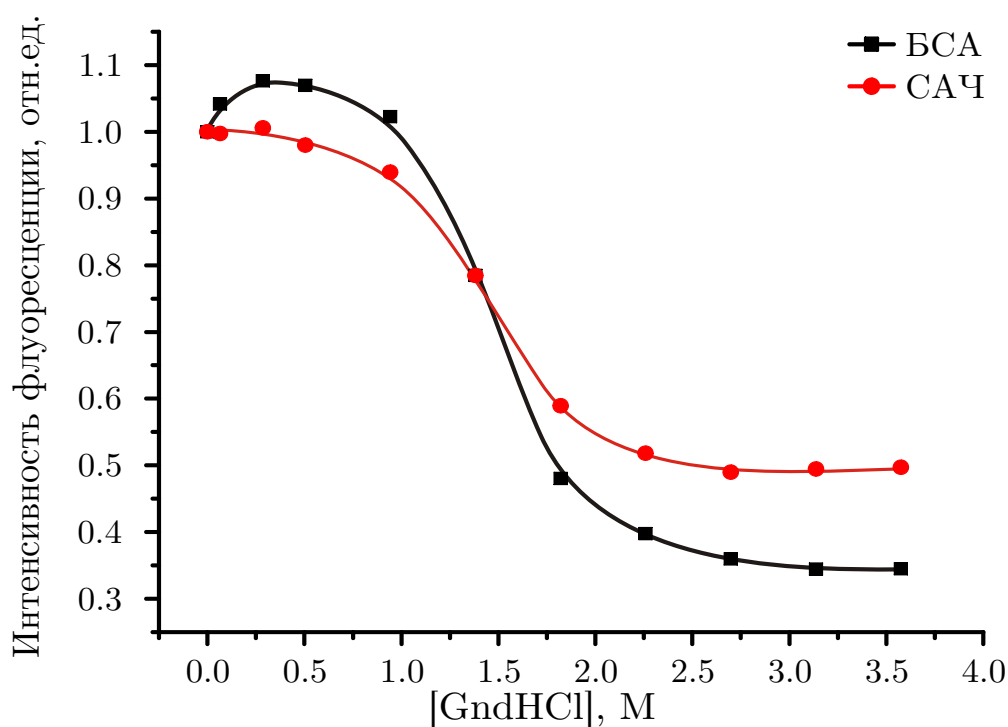


Рис. 3.16: Зависимость от концентрации гидрохлорида гуанидина интенсивности максимума флуоресценции триптофановых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 295 нм. Концентрация БСА - 4.0 мкМ. Концентрация САЧ - 4.3 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию гидрохлорида гуанидина в растворе ($[\text{GndHCl}]=0$)

В диапазоне концентраций $[\text{GndHCl}] = 1,0 - 3,0 \text{ M}$ происходит денатурация доменов I и II, которая проявляется в значительном тушении триптофановой флуоресценции (на 50 % и 60 % от её значения в отсутствии гидрохлорида гуанидина для САЧ и БСА соответственно). Данное тушение флуоресценции совпадает со сдвигом максимума её интенсивности в длинноволновую область спектра (на $\sim 10 \text{ nm}$), что говорит об усилении электростатического поля в окрестности триптофановых остатков белков за счёт их большей доступности растворителю.

На рис. **3.17** представлена зависимость интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков БСА и САЧ при добавлении гидрохлорида гуанидина. В диапазоне концентраций денатурирующего агента, соответствующем разрушению домена III, происходит резкое увеличение интенсивности тирозиновых остатков, которое является следствием снятия тушения за счёт изменения локальной окрестности тирозиновых остатков в домене III. По данным рентгено-структурного анализа [8, 55] в субдомene IIIb тирозиновых остатков нет, поэтому тирозиновая флуоресценция белка изменяется в ответ на структурную перестройку субдомена IIIa.

При увеличении концентрации GndHCl в растворе альбумина происходит последовательное разрушение доменов белка (табл. 3.4 и рис. 3.15), которое может быть зарегистрировано по изменению параметров связывания лигандов, указанных в таблице 3.3. В работе [104] было показано, что наибольшей стабильностью при денатурации GndHCl обладает домен I, а наименьшей - домен III.

На основании описанных в данной части диссертационной работы результатов можно сделать вывод, что флуоресценция тирозиновых остатков чувствительна к изменению структуры альбумина в субдомene IIIa и позволяет зарегистрировать изменения структуры белка, которые не влияют на флуоресценцию триптофановых остатков БСА и САЧ.

§ 3.6. Выводы по главе 3

По итогам данной главы возможно сделать следующие выводы:

1. Тирозиновая флуоресценция альбумина не изменяется при специфичном и неспецифичном связывании катионного детергента, что объясняется влиянием положительного заряда амфифильного соединения, а является индикатором структурных изменений белка при связы-

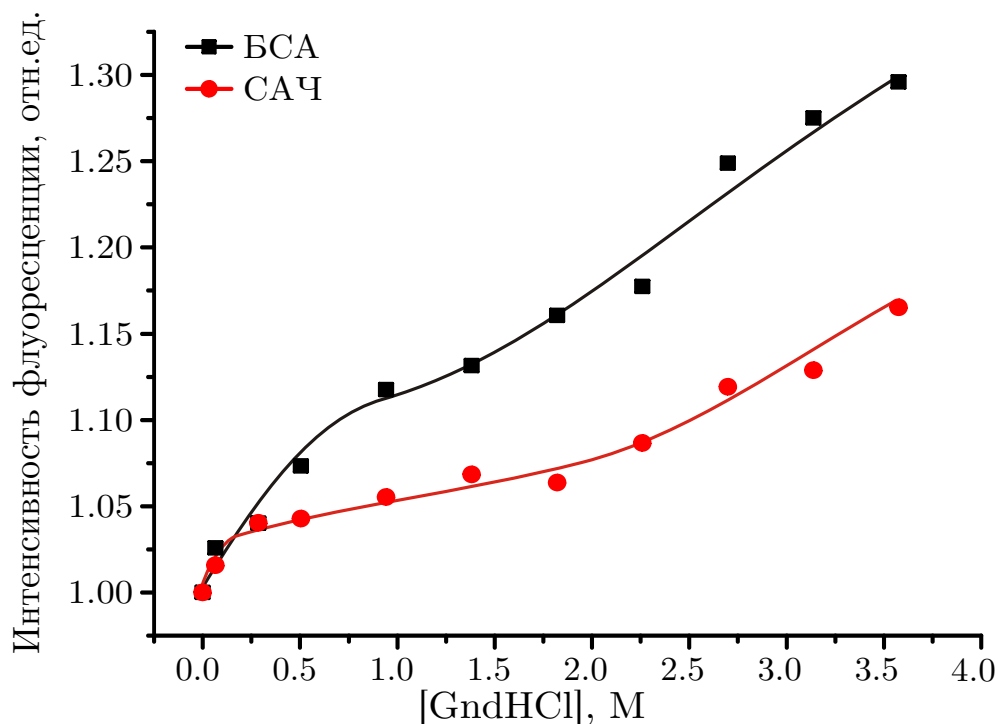


Рис. 3.17: Зависимость от концентрации гидрохлорида гуанидина интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков БСА (чёрным) и САЧ (красным) при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация БСА - 4.0 мкМ. Концентрация САЧ - 4.3 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию гидрохлорида гуанидина в растворе ($[GndHCl]=0$)

вании отрицательно заряженных амфифильных соединений, взаимодействие которых с белком моделирует образование комплекса альбумин - ЖК.

2. Тирозиновая флуоресценция альбумина не изменяется при изменении ионной силы раствора за счёт увеличения концентрации NaCl в исследуемых образцах, а также при связывании белком катионов свинца. При этом наблюдается тушение триптофановой флуоресценции, связанное с образованием не флуоресцирующего состояния с характерным временем релаксации в пределах от 1 мс до 0,1 с, которое является следствием увеличения синглет-триплетной конверсии за счёт эффекта тяжёлого атома.
3. Тирозиновая флуоресценция альбумина является индикатором изменения его структуры в домене I и III при связывании лигандов, близких к ЖК, и денатурации, которые не влияют на флуоресценцию триптофановых остатков в САЧ. При этом усиление флуоресцен-

ции тирозиновых остатков связано, прежде всего, с изменением локальной окрестности тирозиновых остатков, а не с уменьшением эффективности переноса энергии на триптофановые остатки по диполь-дипольному механизму из-за увеличения расстояния между донором (тирозином) и акцептором (триптофаном).

4. Тирозиновая флуоресценция альбумина является индикатором изменения первой гидратационной сферы макромолекулы, которые связаны с перераспределением водородных связей между поверхностными аминокислотами и молекулами растворителя.

ГЛАВА 4

Тирозиновая флуоресценция как индикатор конформационных изменений альбумина в плазме крови

В предыдущих главах было показано, что тирозиновая флуоресценция является индикатором специфичного связывания лигандов, близких к жирным кислотами (ЖК), а также денатурации белка и изменения его окружения. В данной главе приводятся основные сведения о концентрации ЖК в плазме крови в норме и при патологии, а также приводятся результаты экспериментов с плазмой крови и модельными растворами основных белков плазмы крови. 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. Далее, в главе приводится оценка чувствительности тирозиновой флуоресценции при присоединении лиганда, близкого по своим свойствам к ЖК, на основании которой делается вывод о возможности использования тирозиновой флуоресценции для регистрации структурных изменений САЧ в плазме крови.

Основные результаты данной главы опубликованы в статье [107]

§ 4.1. Концентрация жирных кислот в плазме крови

Жирные кислоты (ЖК) (точнее их анионная форма) являются основными лигандами сывороточного альбумина человека (САЧ) в плазме крови [108], причём их связывание используется для диагностики заболеваний [19, 20]. ЖК практически нерастворимы в воде, однако их концентрация в плазме крови достаточно велика за счёт образования комплекса с САЧ [109]. В норме на одну молекулу САЧ приходится от 0.1 до 2 молекул ЖК, но это отношение молярных концентраций может достигать и 6 при сильной физической нагрузке, голодании или заболеваниях [108–110].

По данным рентгеноструктурного анализа выявлено, что в САЧ имеется от шести до девяти сайтов связывания ЖК (в зависимости от типа ЖК), при этом некоторые из этих сайтов совпадают с основными сайтами для лекарств, которые в англоязычной литературе принято обозначать за Sudlow I и Sudlow II [54, 111, 112]. Кроме того, в работах [76, 108] на примере кетопрофена и варфарина было показано, что связывание ЖК может удалённо модифицировать другие сайты в структуре белка. Таким образом, увеличение комплексов ЖК-САЧ и увеличение числа молекул ЖК, присоединённых к САЧ, в плазме крови может привести к потере альбумином своей функциональной активности, поэтому разработка методики определения заполненности сайтов ЖК в структуре альбумина является актуальной задачей.

Обычно в экспериментах по связыванию ЖК с альбумином используют стоковые растворы ЖК в этаноле или других растворителях. В Главе 3 было показано, что добавление в раствор САЧ этанола приводит к структурным изменениям белка, что затрудняет интерпретацию и анализ получаемых результатов. Методами флуоресцентной спектроскопии в работе [64] было показано, что анионный детергент (SDS) может моделировать взаимодействие САЧ с ЖК при концентрациях детергента, соответствующих специфичному связыванию, поэтому в данной части работы SDS используется для моделирования влияния ЖК в плазме крови на её собственную флуоресценцию. В работе [113] было показано, что триптофановая флуоресценция плазмы крови не позволяет регистрировать патологические процессы в организме. В предыдущих главах было показано, что такое ограничение может быть связано с наличием только одного триптофанового остатка в структуре САЧ и может быть снято за счёт анализа тирозиновой флуоресценции. В данной части работы ставилась задача определить, может ли тирозиновая флуоресценция быть индикатором связывания ЖК в плазме крови, а также на примере SDS необходимо было оценить, как сильно меняется тирозиновая флуоресценция при присоединении лигандов, близких по своим свойствам к ЖК.

§ 4.2. Тирозиновая флуоресценция плазмы крови

На рисунке 4.1 представлено сравнение зависимости от концентрации анионного детергента (SDS) интенсивности тирозиновой флуоресценции при возбуждении на длине волны 280 нм для плазмы крови здорово-

го донора и для модельной смеси основных белков плазмы крови человека (сывороточного альбумина человека (САЧ) и иммуноглобулина гамма (IgG)). В модельном растворе концентрация указанных белков соответствует рассматриваемому образцу плазмы крови человека. Концентрация САЧ и IgG в плазме крови человека была определена независимой специализированной медицинской лабораторией.

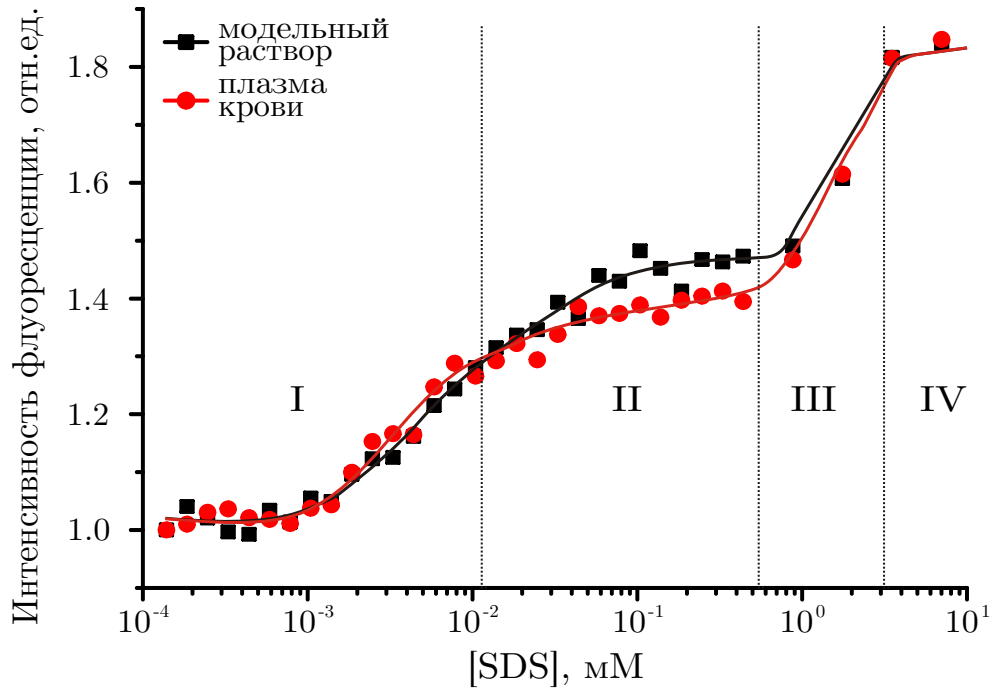


Рис. 4.1: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков белков плазмы крови (красным) и модельной смеси белков (чёрным) при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация САЧ - 1.27 мкМ. Концентрация IgG - 0.14 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала для плазмы крови, соответствующего отсутствию детергента в растворе ($[SDS]=0$)

Приведённые на рисунке 4.1 зависимости совпадают в пределах погрешности эксперимента. Данный факт позволяет заключить, что тирозиновая флуоресценция плазмы крови определяется, прежде всего, вкладом САЧ и IgG, а вклад остальных компонентов плазмы крови незначителен. Как для плазмы крови человека, так и для искусственной плазмы, при увеличении концентрации SDS наблюдается рост тирозиновой флуоресценции, причём зависимость является четырёхстадийной. В Главе 2 настоящей работы было показано, что для САЧ такая зависимость также является четырёхстадийной и объясняется разными режимами взаимодействия с лигандом, которые описаны в разделе § 2.1.

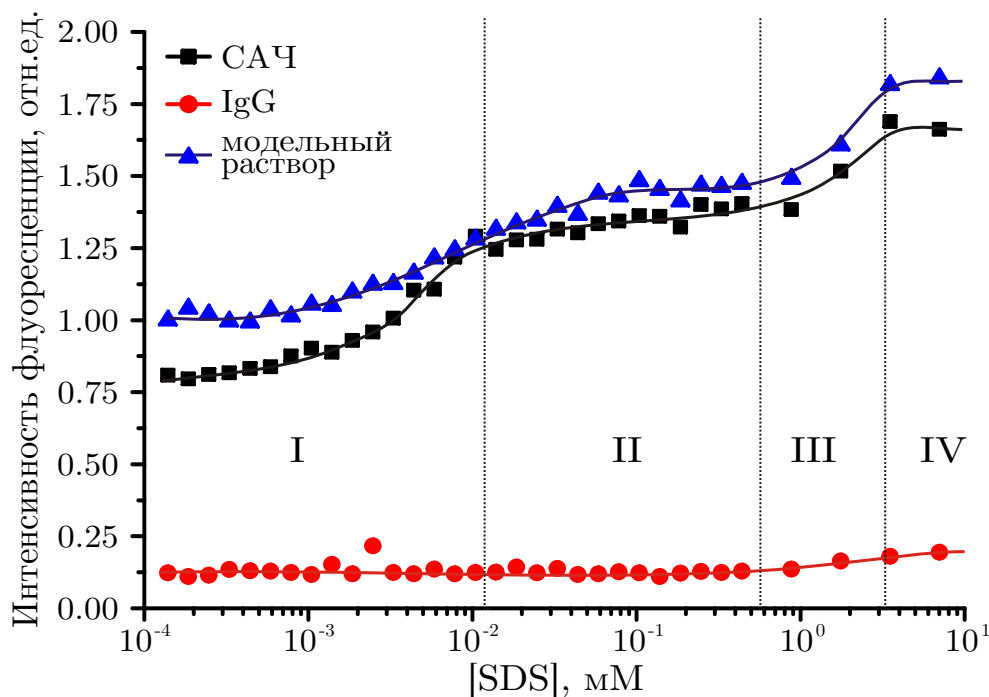


Рис. 4.2: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков САЧ (чёрным), IgG (красным) и их модельной смеси (синим) при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрация САЧ - 1,27 мкМ. Концентрация IgG - 0,14 мкМ. Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала для модельной смеси, соответствующего отсутствию детергента в растворе ([SDS]=0)

Для того, чтобы выявить, влияет ли присутствие IgG в плазме крови и в модельном растворе на связывание альбумина с SDS, была измерена зависимость тирозиновой флуоресценции компонентов смеси в отдельности. Сравнение зависимостей тирозиновой флуоресценции от концентрации SDS для растворов САЧ, IgG и их модельной смеси представлена на рис. 4.2.

Из рисунка 4.2 видно, что рост интенсивности тирозиновой флуоресценции полностью обуславливается взаимодействием САЧ с SDS, причём влияние IgG может сказываться только при больших концентрациях детергента, когда происходит денатурация белков. При концентрации, соответствующей специфичному и неспецифичному связыванию, SDS моделирует связывание ЖК с альбуминов в растворе, а наличие IgG не влияет на интенсивность тирозиновой флуоресценции. Данный факт позволяет предположить, что тирозиновая флуоресценция плазмы крови является индикатором состояния альбумина. Подтверждением этого предположения могут быть результаты исследования плазмы крови большого числа пациентов (для набора статистики) с независимым определением уровня ЖК в об-

разцах, однако подобное исследование выходит за рамки данной диссертационной работы.

§ 4.3. Оценка увеличения интенсивности тирозиновой флуоресценции альбумина при присоединении лигандов в сайты жирных кислот

На рис. 4.3 представлены зависимости тирозиновой флуоресценции для четырёх различных концентраций САЧ от концентрации SDS в диапазоне, соответствующем специфичному связыванию детергента в сайты ЖК. Рассмотрим ключевые особенности этих зависимостей.

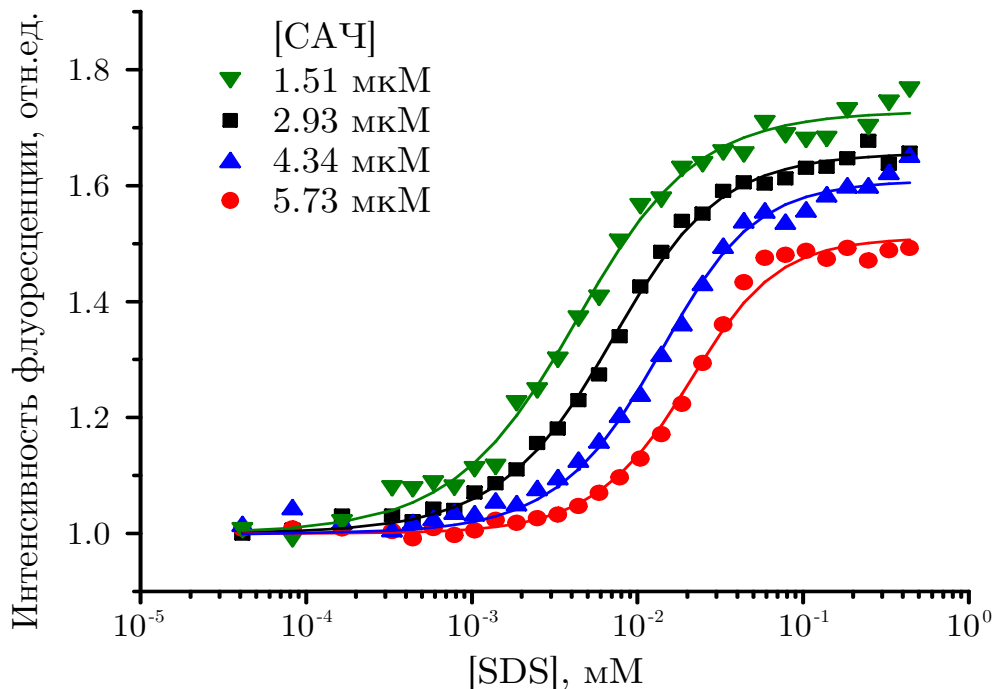


Рис. 4.3: Зависимость от концентрации детергента интенсивности максимума флуоресценции тирозиновых остатков САЧ (символы) на участке специфичного взаимодействия между белком и лигандом. Линией показана аппроксимация экспериментально полученных данных по модели, описанной в тексте. Длина волны возбуждения - 280 нм. Концентрации САЧ: 1,51 мкМ (зелёным), 2,93 мкМ (чёрным), 4,34 мкМ (синим), 5,73 мкМ (красным). Значения указанных интенсивностей нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию детергента в растворе ($[SDS]=0$)

Из рис. 4.3 видно, что зависимость интенсивности тирозиновой флуоресценции от концентрации SDS может быть описана тремя параметрами: (i) положением точки перегиба, (ii) наклоном зависимости в точке перегиба

и (iii) уровнем финального плато. При уменьшении концентрации САЧ точка перегиба зависимости тирозиновой флуоресценции от концентрации SDS сдвигается в сторону более низких концентраций. Согласно простейшей модели образования комплексов в стехиометрии 1:1, концентрация лиганда, соответствующая точке перегиба, является обратной величиной к кажущейся константе ассоциации. Таким образом, при уменьшении концентрации белка кажущаяся константа образования комплекса белок-детергент увеличивается. При уменьшении концентрации белка увеличивается уровень финального плато, который соответствует интенсивности флуоресценции комплексов белок-SDS в начале неспецифического связывания. Как было показано в третьей главе настоящей работы, усиление интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков в альбумине является следствием снятия тушения за счёт удаления функциональных групп из локальной окрестности тирозиновых остатков. Таким образом, увеличение уровня финального плато может говорить о зависимости стехиометрии финального комплекса (на котором заканчивается специфичное связывание) от концентрации САЧ: чем ниже концентрация САЧ, тем большее число молекул детергента может присоединиться к молекуле белка. Для того, чтобы провести численную оценку влияния связывания детергента в сайты ЖК, была проведена совместная аппроксимация, позволяющая определить увеличение сечения флуоресценции тирозиновых остатков при присоединении одной молекулы SDS. Под сечением флуоресценции в данной работе понимается произведение сечения поглощения тирозиновых остатков на их квантовый выход, причём вместо 18 разных тирозиновых остатков рассматривается некий эффективный флуорофор.

Для совместной аппроксимации зависимостей, приведённых на рис. 4.3, и определения изменения сечения флуоресценции тирозиновых остатков при присоединении одной молекулы SDS была использована модель, основанная на следующих предположениях. При каждой фиксированной концентрации компонентов в исследуемом растворе присутствуют: (1) комплексы альбумина с n лигандами, САЧ-(SDS) $_n$, (2) альбумин в свободном состоянии, (3) SDS в свободном состоянии. Модель не учитывает последовательное присоединение лигандов, а рассматривает единовременное образование комплекса с n лигандами, таким образом, образование интермедиатов исключается из рассмотрения. Данное предположение существенно ограничивает применимость модели и в случае, если число лиган-

дов в комплексе будет значительно превышать единицу, модель окажется неверной. Далее, в модели предполагается, что сечение флуоресценции тирозиновых остатков Q_b зависит линейно от числа присоединённых лигандов n :

$$Q_b = \beta \cdot n, \quad (4.1)$$

где β - варьируемый параметр, подлежащий определению при совместной аппроксимации полученных для разной концентрации САЧ зависимостей интенсивности тирозиновой флуоресценции от концентрации детергента. Физический смысл данного параметра заключается в среднем увеличении сечения флуоресценции тирозиновых остатков после присоединения одной молекулы лиганда. В модели предполагается, что параметр β не зависит от концентрации белка.

Решение прямой задачи - определение интенсивности тирозиновой флуоресценции I_{TYR} при заданных полных концентрациях веществ - требует расчёта концентраций альбумина (P_{free}) и детергента (L_{free}) в свободном состоянии, а также концентрации комплекса $(SDS)_n$ (C) по известным параметрам сайтов связывания (их числа n и константы реакции K). Другими словами, требуется решение следующей системы уравнений:

$$P_{total} = P_{free} + C, \quad (4.2a)$$

$$L_{total} = L_{free} + L_{bound}, \quad (4.2b)$$

$$L_{bound} = n \cdot C, \quad (4.2c)$$

$$K = \frac{C}{P_{free} \cdot L_{free}^n}, \quad (4.2d)$$

где L и P - концентрации лиганда и белка, соответственно, а индексы обозначают свободное (*free*) и связанное (*bound*) состояния, а также полную концентрацию веществ в растворе (*total*).

На основании решения системы уравнений (4.2) и выражения для сечения флуоресценции Q_b (4.1), можно определить интенсивность флуоресценции тирозина I_{TYR} :

$$I_{TYR} = \frac{P_{free}}{P_{total}} + Q_b \cdot \frac{P_{bound}}{P_{total}} = \frac{P_{free}}{P_{total}} + \beta \cdot n \cdot \frac{P_{bound}}{P_{total}}, \quad (4.3)$$

где интенсивность тирозиновой флуоресценции белка в отсутствие детергента принята за единицу.

В результате решения обратной задачи на основании полученных для различной концентрации альбумина кривых тирозирования белка детергентом

| [HSA], μM | K , 10^6 M^{-1} | n |
|----------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1,51 | $1,3 \pm 0,3$ | $1,25 \pm 0,04$ |
| 2,93 | $0,59 \pm 0,13$ | $1,21 \pm 0,04$ |
| 4,43 | $0,20 \pm 0,04$ | $1,19 \pm 0,04$ |
| 5,73 | $0,089 \pm 0,015$ | $1,12 \pm 0,03$ |

Таблица 4.1: Параметры связывания (константа реакции K и среднее число молекул лиганда в комплексе n), восстановленные при совместной аппроксимации экспериментально полученных зависимостей тирозиновой флуоресценции по модели САЧ, описанной в тексте

SDS (рис. 4.3) были определены среднее значение числа сайтов для лиганда n и значение константы реакции K , которые приведены в таблице 4.1. Из приведённых результатов совместной аппроксимации видно, что количество молекул SDS в комплексе с белком не слишком превышает 1, что говорит о применимости разработанной модели к полученным экспериментальным данным. Восстановленные значения константы реакции согласуются с литературными данными [64]. Определённое в результате совместной аппроксимации экспериментальных данных среднее увеличение сечения флуоресценции тирозиновых остатков в САЧ при присоединении одного лиганда β составляет $(37 \pm 4)\%$, поэтому можно сделать вывод о высокой чувствительности тирозиновой флуоресценции к структурным изменениям альбумина при присоединении молекул SDS в специфичные сайты ЖК.

§ 4.4. Выводы по главе 4

По итогам данной главы можно сделать следующие выводы:

1. Тирозиновая флуоресценция плазмы крови при добавлении SDS полностью определяется вкладом САЧ, при этом изменения вклада остальных компонентов плазмы крови (в том числе и IgG - второго по концентрации белка плазмы крови) не обнаружено. На основании данного факта можно сделать вывод, что тирозиновая флуоресценция плазмы крови является индикатором структурных изменений САЧ при специфичном и неспецифичном взаимодействии с SDS.
2. На основании совместной аппроксимации зависимостей тирозиновой флуоресценции раствора САЧ от концентрации SDS в диапазоне, соответствующем специфичному и неспецифичному связыванию дан-

ного лиганда, получена зависимость кажущейся константы комплексообразования и среднее число сайтов лиганда в белке. Константа комплексообразования согласуется с литературными данными и возрастает при уменьшении концентрации белка в растворе.

3. На основании совместной аппроксимации зависимостей тирозиновой флуоресценции раствора САЧ от концентрации SDS в диапазоне, соответствующем специфичному и неспецифичному связыванию данного лиганда, проведена оценка чувствительности тирозиновой флуоресценции к присоединению лиганда, близкого по свойства к ЖК. Увеличение 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.

Заключение

Исследования, проведённые в данной диссертационной работе, относятся к экспериментальному изучению вопроса о связи структурных изменений белков, вызванных их денатурацией, связыванием с лигандами или образованием интермедиатов, и их флуоресцентного отклика. Основное 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 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 сывороточного альбумина человека. На основании подобного отличия от анионного детергента был сделан вывод, что при связывании амфифильных лигандов 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 для 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 тирозино-

вой флуоресценции при связывании 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.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю, профессору кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ Фадееву Виктору Владимировичу и младшему научному сотруднику кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ Ширшину Евгению Александровичу за многочисленные обсуждения экспериментальных результатов и помощь в понимании физических процессов, происходящих в них. Также автор выражает признательность сотрудникам кафедры биофизики биологического факультета МГУ за предоставленное экспериментальное оборудование.

Приложение

В данной части диссертационной работы описаны основные методы флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии, используемые в диссертационной работе, а также их конкретная реализация. Кроме того, описана процедура приготовления исследуемых образцов.

П.1. Оптические методы исследования структуры сложных органических соединений и их реализация в данной работе

П.1.1. Стационарная флуоресцентная спектроскопия

Спектры флуоресценции исследуемых образцов были получены с помощью флуориметра Fluoromax 4 (Horiba, JobinYvon). Для возбуждения флуоресценции исследуемых растворов использовалось излучение ксеноновой лампы высокого давления. Параметры экспериментов указаны в таблице [П.1](#). Все измерения проводились в кварцевых кюветах объёмом 4 мл и внутренними размерами 10 мм x 40 мм x 40 мм, если не указано иное. Накопление сигнала для каждой длины волны регистрации производилось в течении 0,1 с.

Оптическая плотность растворов не превышала 0,3. Корректировка спектров, проведённая по методу, описанному в статье [\[114\]](#), не показала существенных отличий, поэтому растворы считались оптически прозрачными и анализировались без корректировки.

Определение критической концентрации образования мицелл (ККМ) по флуоресценции пирена

Детергентами (в англоязычной литературе - "surfactant") называются соединения, обладающие поверхностной активностью, которая является следствием амфифильности – наличия в структуре молекул детергента двух частей: гидрофобного «хвоста» и гидрофильной «головой» [\[115\]](#). Гидрофобный «хвост» представляет собой длинную цепочку, которая может быть как линейной, так и разветвленной. Детергенты обычно классифицируются по знаку заряда гидрофильной «головой» на анионные (отрица-

| Флуорофор | Параметры возбуждения | | Параметры регистрации | |
|--|-----------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | λ_{EXC} , нм | $\delta\lambda_{EXC}$, нм | λ_{EM} , нм | $\delta\lambda_{EM}$, нм |
| Триптофан (в свободном состоянии и в белках) | 295 | 2 | 300 — 500 | 3 |
| Триптофан (в белках) | 280 | 2 | 300 — 500 | 3 |
| Тирозин (в свободном состоянии и в белках) | 280 | 2 | 300 — 500 | 3 |
| Пирен | 334 | 10 | 350 - 480 | 1 |

Таблица П.1: Параметры экспериментов по измерению спектров флуоресценции исследуемых образцов: λ и $\delta\lambda$ - длина волны (диапазон длин волн в случае канала регистрации) и спектральная ширина щели монохроматора, соответственно. Индекс *EXC* относится к каналу возбуждения флуоресценции, индекс *EM* - к каналу её регистрации

тельно заряженные), катионные (положительно заряженные) и нейтральные (собственно нейтральные или имеющие одновременно и положительно и отрицательно заряженные функциональные группы) [115]. Додецилсульфат натрия (SDS, $C_{12}H_{25}SO_4Na$) относится к анионному типу детергентов, а цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ, $C_{19}H_{42}BrN$) - к катионному, структурные формулы которых представлены на рис. П.1.

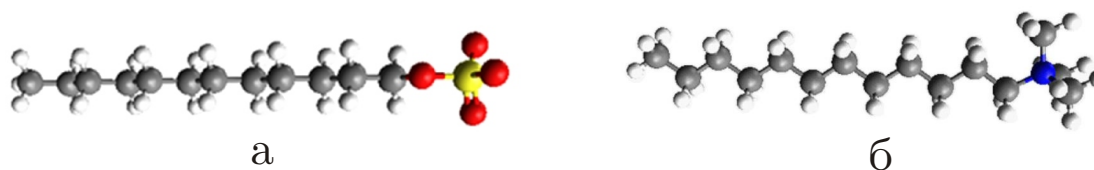


Рис. П.1: Структура молекул детергентов (а) SDS и (б) СТАВ без противоионов [116]

Одной из характерных особенностей этого класса веществ является их способность образовывать мицеллы. Образование мицелл зависит от растворителя [67] и характеризуется двумя параметрами:

- определённой температурой, при которой этот процесс становится возможным (температурой Крафта);
- определённой концентрацией (критическая концентрация образования мицелл (ККМ), в англоязычной литературе - CMC, critical micelle

concentration), после которой начинается резкая агрегация в мицеллы [117].

Присутствующие в растворе мицеллы можно охарактеризовать агрегационным числом, равным среднему числу мономеров, составляющих мицеллы [117]. Стоит отметить, что мицеллы не являются статичными образованиями, они находятся в динамическом равновесии с окружением: мономеров в мицеллах могут заменяться по диффузионно-контролируемому механизму [115].

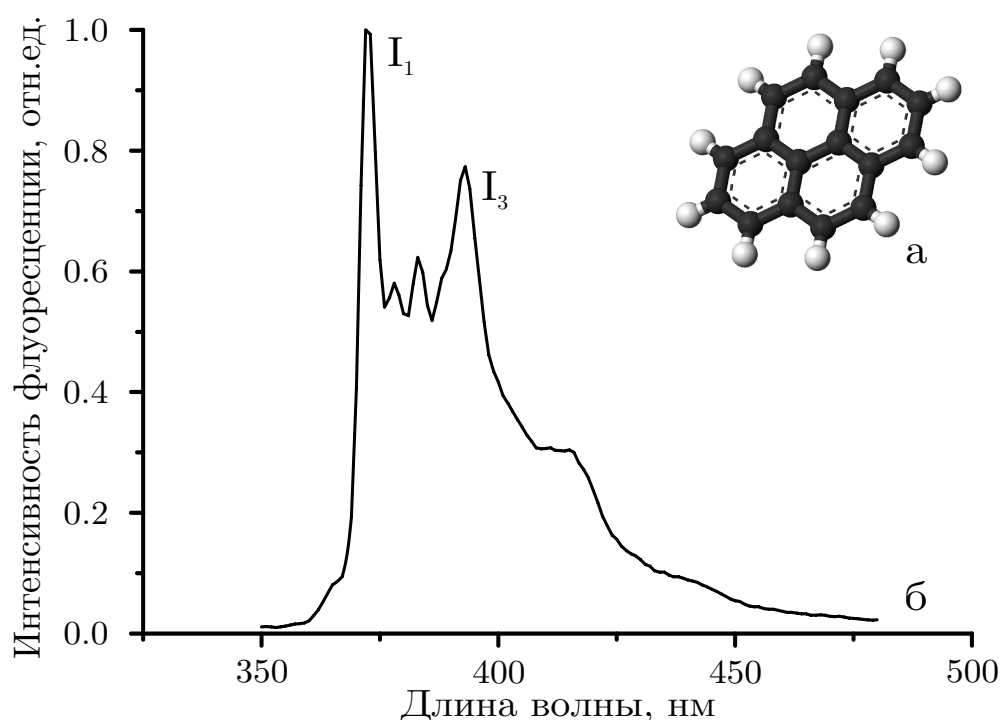


Рис. П.2: Структура молекулы пирена (а) и его спектр флуоресценции в водном растворе в отсутствии мицелл. На спектре указаны пики (I_1 и I_3), отношение интенсивностей которых служит индикатором полярности окружения молекул пирена. Нормировка спектра произведена на значение интенсивности флуоресценции в максимуме

Для ионных детергентов наличие других ионов в растворе сильно влияет на значение ККМ [67], поэтому в данной работе ККМ определялась непосредственно для используемого буфера (Tris-HCl) по флуоресценции пирена. Пирен — полиароматическое соединение (рис. П.2 а), флуоресценция которого представляет собой набор линий (рис. П.2 б). Известно, что отношение первого и третьего пиков флуоресценции пирена может считаться индикатором полярности окружения молекулы [118]. Если в растворе пирена присутствуют мицеллы, то молекулы пирена встраиваются в них

| Вещество | ККМ в буфере | ККМ в воде |
|----------|--------------|--------------------|
| SDS | 0,7 мМ | 7 мМ 7 - 10 мМ* |
| СТАВ | 0,02 мМ | 0,92 - 1 мМ* |

* по данным производителя (SigmaAldrich, USA)

Таблица П.2: Сравнение значений ККМ детергентов (SDS и СТАВ) в водном растворе и в используемом буфере, экспериментально определённых в данной работе

и полярность окружения таких молекул резко меняется. Соответствующее резкое изменение отношения первого и третьего пиков флуоресценции ($\frac{I_1}{I_3}$) свидетельствует о начале образования мицелл в растворе. Пирен достаточно сильно сорбируется из водного раствора на стенки сосудов, однако использование для детектирования мицелл именно отношения пиков его флуоресценции снимает данное экспериментальное ограничение.

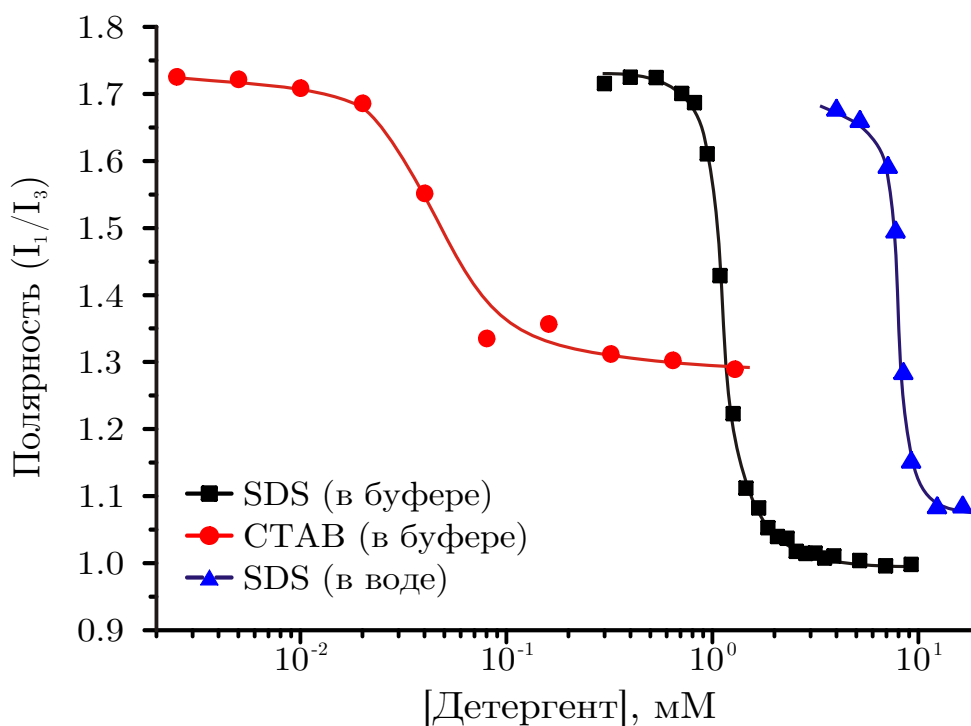


Рис. П.3: Зависимость от концентрации детергентов (SDS - чёрным и синим, СТАВ - красным) отношения первого (I_1) и третьего (I_3) пиков флуоресценции пирена в буфере (чёрным и красным) и в воде (синим)

Результат определения ККМ для SDS и СТАВ в используемом буфере, а также для SDS в воде представлен на рис. П.3. Отношение $\frac{I_1}{I_3}$ в отсутствии мицелл одинаково для всех трёх случаев, однако различается

для SDS и СТАВ, следовательно, полярность среды внутри мицелл для используемых детергентов различна. Из рис. П.3 видно, что для воды значение ККМ согласуется с данными производителя реактива. Сравнение ККМ для используемых детергентов в воде и буфере, приведённое в таблице П.2, показывает, что наличие буфера снижает ККМ примерно в 10 раз.

Определение вклада флуоресценции тирозиновых остатков в полный спектр флуоресценции альбумина в растворе

При возбуждении на длине волны 280 нм и 295 нм форма спектра флуоресценции альбумина, денатурированного детергентом SDS, различна (рис. П.4), что объясняется наличием тирозиновых остатков белка, поглощение которых существенно в первом случае, а во втором - им можно пренебречь [119]. Известно, что форма спектра триптофановой флуоресценции не меняется от длины волны возбуждения в выбранном диапазоне [76], поэтому различие в форме спектра флуоресценции белка, приведённое на рис. П.4, определяется вкладом тирозиновых остатков в спектр альбумина.

В данной работе для определения вклада тирозиновых и триптофановых остатков спектры флуоресценции альбумина при возбуждении на длине волны 280 нм раскладывались на сумму двух составляющих (по аналогии с работами [71, 76, 77]) с использованием следующих предположений:

- коротковолновая часть спектра флуоресценции альбумина (300-375 нм) соответствует сумме вкладов тирозиновых и триптофановых остатков;
- длинноволновая часть спектра флуоресценции альбумина (375-500 нм) определяется только вкладом триптофановых остатков, форма спектра которых не зависит от длины волны возбуждающего излучения и экспериментально измеряется для каждого образца при возбуждении на длине волны 295 нм.

На основании указанных предположений флуоресценция белка при коротковолновом возбуждении I_{SA}^{280} может быть представлена как сумма

$$I_{SA}^{280} = I_{Ty}^{280} + I_{Trp}^{280} = I_{Ty}^{280} + \alpha I_{Trp}^{295}, \quad (\text{П.1})$$

где форма полосы триптофановой флуоресценции при возбуждении на длине волны 280 нм I_{SA}^{280} совпадает с таковой I_{Trp}^{295} , измеренной при возбуждении на длине волны 295 нм, а масштабирующий коэффициент α

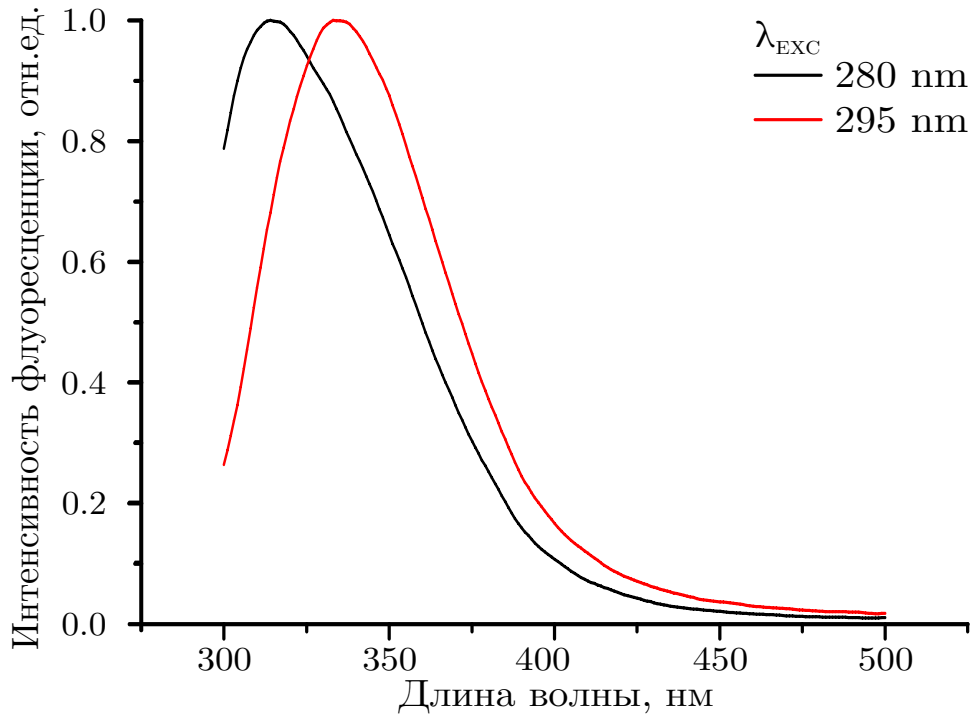


Рис. П.4: Отличие формы спектра флуоресценции БСА при возбуждении на 280 нм (чёрным) и 295 нм (красным), обусловленное вкладом тирозиновой флуоресценции, в присутствии детергента. Концентрация БСА - 4.1 мкМ. Концентрация SDS - 32.86 мМ. Нормировка спектров произведена на значение интенсивности флуоресценции в максимуме

подлежит определению. Считая, что при добавлении детергента полоса тирозиновой флуоресценции является достаточно узкой, можно определить неизвестный коэффициент α путём минимизации невязки:

$$\chi^2 = \sum_{\lambda > 375} \{I_{SA}^{280}([SDS], \lambda) - \alpha I_{SA}^{295}([SDS], \lambda)\}^2 = \min. \quad (\text{П.2})$$

Корректность описанного алгоритма разложения спектров на тирозиновую и триптофановую составляющие подтверждалась неизменностью формы восстановленной спектральной полосы тирозиновых остатков при добавлении лигандов и денатурирующих агентов [59, 120]. Результат применения алгоритма разложения спектров для максимальной (32.86 мМ) и минимальной концентрации (0) SDS приведён на рис. П.5.

Определение положения максимума спектра триптофановой флуоресценции белка (при возбуждении на 295 нм) производилось после его сглаживания методом Савицкого-Голэя [121] (с использованием окна шириной 21 точка по модели полинома 4 степени), которое позволяет точнее определять положение максимума и практически не влияет на значения интенсивности в максимуме. Ширина окна сглаживания была выбрана боль-

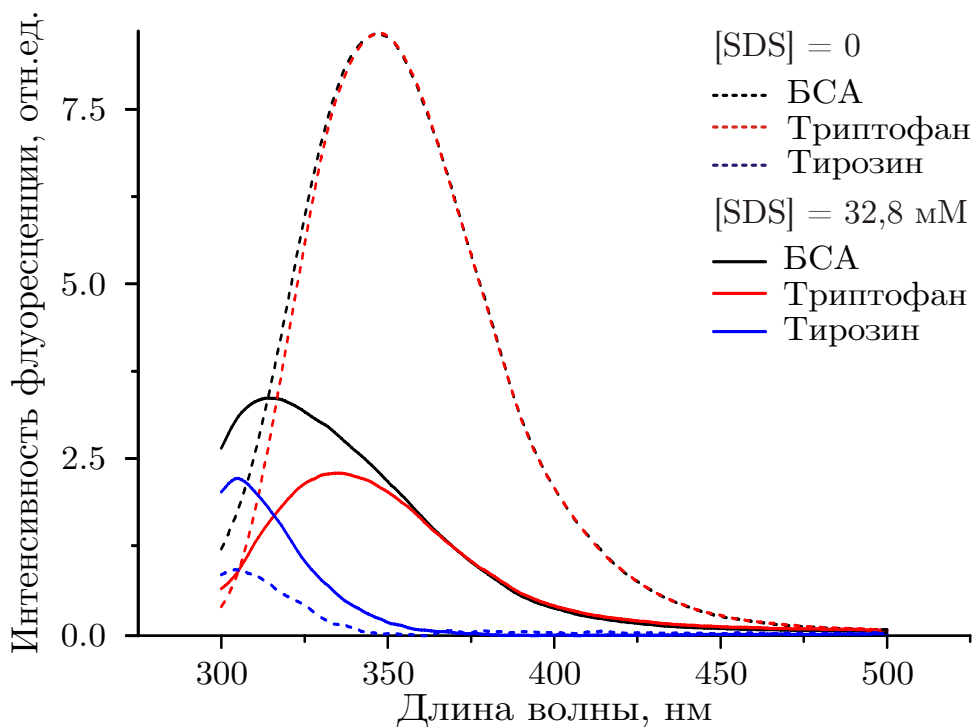


Рис. П.5: Пример разложения спектров флуоресценции БСА при возбуждении на 280 нм (чёрным) на тирозиновую (синим) и триптофановую (красным) составляющие в отсутствии ($[\text{SDS}] = 0$) (пунктир) и в присутствии детергента ($[\text{SDS}] = 32.8$ мМ) (сплошная линия). Концентрация БСА - 4.1 мкМ

шой, т. к. спектры имели простую структуру (один широкий максимум), поэтому такое определение положения максимума было корректным. Погрешность данного метода определения интенсивности флуоресценции тирозиновых остатков не превышает 1.1%.

Определение эффекта тяжёлого атома с помощью облучения раствора белка лазерными импульсами с различной частотой повторения

Для регистрации эффекта тяжёлого атома использовался лазерный флуориметр, в котором для возбуждения флуоресценции была выбрана четвёртая гармоника импульсных YAG:Nd³⁺ лазеров (длина волны 266 нм, длительность импульса 10 нс), которые отличались частотой повторения и энергией в импульсе (1 кГц и 2 мкДж; 10 Гц и 200 мкДж). Все измерения проводились в кварцевой микрокювете объёмом 0,54 мл и внутренними размерами 4 мм x 4 мм x 34 мм, в которую лазерное излучение заводилось через дно для облучения всего объёма исследуемого образца. Сигнал

флуоресценции регистрировался при помощи полихроматора, на выходе которого была установлена ССD-матрица с усилителем яркости.

Наблюдаемое в данной работе уменьшение интенсивности флуоресценции при облучении импульсами с частотой 10 Гц является следствием фотодеградации образца, т.е. образованием не восстанавливаемого фотопродукта. Если помимо образования таких фотопродуктов в исследуемой системе возможно образование не флуоресцирующего состояния с характерным временем релаксации в интервале от 1 мс до 0,1 с, то при облучении импульсами с частотой 1 кГц и более число флуорофоров в таком состоянии будет накапливаться. Увеличение числа молекул в не флуоресцирующем состоянии будет приводить к обеднению основного, а следовательно, к более быстрому уменьшению интенсивности флуоресценции при таком облучении по сравнению с облучением редкими импульсами.

П.1.2. Время-разрешённая флуоресцентная спектроскопия

Для исследования параметров релаксации возбуждённых состояний аминокислотных остатков (T_{1g} и T_{1r}), а также флуоресцентного зонда Нильского красного использовалась установка, позволяющая регистрировать кинетику флуоресценции для разных длин волн регистрации с использованием время-коррелированного счёта фотонов.

В качестве источника возбуждающего излучения использовались импульсные лазерные диоды с длиной волны 280 нм (для возбуждения собственной флуоресценции белков) и 515 нм (для возбуждения собственной флуоресценции зонда Нильского красного). Остальные характеристики источников приведены в таблице **П.3**.

Регистрация кинетики флуоресценции производилась с помощью шестнадцатиканального фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) (PML-16, Becker & Hickl) и полихроматора, оснащённого дифракционной решёткой (600 штр./мм или 1200 штр./мм). Итоговая ширина спектра составляла 200 нм, что в зависимости от используемой решётки приводило к интегрированию сигнала в каждом канале ФЭУ по части спектра шириной 12,5 нм или 6,25 нм. Калибровка полихроматора осуществлялась с помощью излучения лазерного диода на длине волны 405 нм. Время накопления для всех образцов составляло 30 сек, что давало оптимальный уровень сигнала для процедуры деконволюции в программе SPCImage (Becker and Hickl), подробно описанной в [122].

| Параметр | | |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Длина волны | 280 нм | 510 нм |
| Ширина спектра | 10 нм | 10 нм |
| Длительность импульса (FWHM) | 700 пс | 100 пс |
| Частота повторений импульсов | 10 МГц | 50 МГц |
| Мощность импульса | 0,8 мкВт | 130 мВт |
| Производитель | Edinburgh Instruments | ООО «Интегрированные технологии» |

Таблица П.3: Параметры лазерных диодов, используемых в экспериментах по измерению времени затухания флуоресценции альбуминов и флуоресцентного зонда Нильского красного

Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для триптофановых остатков регистрировалась в канале ФЭУ, близком к максимуму интенсивности триптофана в нативном белке ($\lambda_{Trp} \sim 355$ нм). На основании данных о разложении спектров флуоресценции (см. П.1.1) можно считать, что на данном канале вкладом тирозиновых остатков в кинетику флуоресценции можно пренебречь. Минимальная невязка при определении времени затухания флуоресценции альбуминов при регистрации на длине волны λ_{Trp} достигалась при обработке кинетик биэкспоненциальными зависимостями.

Зависимость интенсивности флуоресценции от времени, соответствующая сумме сигналов для триптофановых и тирозиновых остатков, регистрировалась в канале ФЭУ, который, с одной стороны, обладает достаточной чувствительностью для проведения процедуры деконволюции, а с другой стороны, находится в полосе флуоресценции тирозиновых остатков ($\lambda_{Tyr} \sim 310$ нм). Минимальная невязка при определении времени затухания флуоресценции альбуминов при регистрации на длине волны λ_{Tyr} достигалась при обработке кинетик триэкспоненциальными зависимостями.

На основании сравнения зависимостей от концентрации детергента восстанавливаемых времён затухания флуоресценции при регистрации на длине волны λ_{Trp} , которые соответствуют триптофановым остаткам, два больших из трёх восстанавливаемых времён затухания флуоресценции при регистрации на длине волны λ_{Tyr} были отнесены к триптофановым остат-

кам белка. Изучение поведения компонент кинетики флуоресценции, относящихся к триптофановым остаткам в белках выходит за пределы данной диссертационной работы, поэтому для анализа изменения их окружения использовалось среднее время затухания флуоресценции, определяемое по формуле:

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1,2} \tau_i a_i, \quad (\text{П.3})$$

с учётом амплитуд (a_i) времён (τ_i), соответствующих данному типу аминокислотных остатков. Меньшее из трёх восстанавливаемых времён затухания флуоресценции при регистрации на длине волны λ_{Tyr} (τ_3) было отнесено к тирозиновым остаткам белка. Разный характер зависимости от концентрации добавляемых химических веществ τ_3 и $\langle \tau \rangle$ (см. рис. 2.6) также подтверждает корректность сделанной в данной работе интерпретации компонент кинетики собственной флуоресценции альбумина.

П.1.3. Абсорбционная спектроскопия

Спектры поглощения исследуемых образцов были получены с помощью спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer) в диапазоне длин волн 250-600 нм, спектральная ширина щели монохроматора была выбрана 1 нм, скорость поворота решётки монохроматора составляла 960 нм/мин. Все измерения проводились в кварцевых кюветах объёмом 4 мл и длиной оптического пути 10 мм.

Характеристика мутности раствора

В стандартной схеме измерения оптической плотности источник, образец и детектор располагаются на одной прямой, поэтому сигнал детектора измеряет полное ослабление сигнала источника, связанное не только с поглощением, но и с рассеиванием света, причём вклад рассеяния падает с увеличением длины волны света. Другими словами, если есть априорная информация об отсутствии значительного поглощения исследуемым веществом в какой-либо области спектра, то оптическая плотность в этой области спектра позволяет оценить изменение рассеяния и указать на возможное увеличение размеров частиц в исследуемом образце [27, 65, 75]. В данной диссертационной работе изменение оптической плотности растворов белков при исследуемых внешних воздействиях определялось по отли-

| Вещество | λ , нм | ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$ | Ссылка |
|------------------|----------------|------------------------------|--------|
| САЧ | 280 | $3,5 \cdot 10^4$ | [123] |
| БСА | 295 | $4,4 \cdot 10^4$ | [123] |
| NO_3^- | 300 | 7.14 | [124] |
| Триптофан | 280 | 5501 | [119] |
| Тирозин | 275 | 1399 | [119] |
| Нильский красный | 555 | $2,0 \cdot 10^4$ | - |

Таблица П.4: Значение коэффициентов экстинкции ϵ на длине волны λ для используемых в работе веществ. Для флуоресцентного красителя Нильского красного ϵ определён экспериментально, что согласуется с литературными данными [49]

чению значения оптической плотности образца и используемого буфера на длине волны 600 нм.

Определение концентраций веществ

В случае отсутствия значительного рассеяния значение разности оптических плотностей раствора исследуемого и буфера на характерной для длины волны позволяет определить концентрацию данного вещества в растворе по его коэффициенту экстинкции. Для используемых в данной диссертационной работе веществ значения коэффициентов экстинкции приведены в таблице П.4

Анализ спектров поглощения с помощью взятия производной четвёртого порядка

Как было указано в Главе 2 настоящей работы, в отличие от спектров флуоресценции спектры поглощения представляют собой результат перекрывания уширенных в результате взаимодействия с окружением спектров поглощения аминокислот [43, 44, 80]. Работа [42] является одной из первых, в которой был описан метод дифференцирования спектров поглощения и его применение к реальным растворам (модельным бинарным и тринарным смесям ароматических аминокислот - фенилаланина, тирозина и триптофана), позволяющий охарактеризовать состав раствора.

В основе данного метода лежит численное дифференцирование спектра сложной формы для выявления близких (и даже совпадающих по положению максимума, но отличающихся по ширине) перекрывающихся по-

лос поглощения различной интенсивности, характерных для биологических объектов. В работах [80, 125] показано, что взятие производной второго и четвёртого порядков от модельных спектров, являющихся суммой перекрывающихся гауссовых функций, позволяет зарегистрировать наличие их структуры, которая практически неуловима при анализе исходных спектров. Сложность на момент написания работы [80] заключалась в отсутствии численного дифференцирования, что было преодолено в указанной работе с помощью специальных радиотехнических устройств для измерения производной сигнала.

Более детальное описание и верификация метода анализа спектров по их производным были проведены в статье [125]. В данной работе исследовались не только гауссовы, но и лоренцевы формы линий, а также их сумма с различным парциальным соотношением. Авторами показано, что максимумы поглощения и производных чётных порядков совпадают, а ширина пиков сужается, тем самым увеличивается их разрешение. Так, лоренцева форма линии с шириной 20 нм на полувысоте при взятии четвёртой производной имеет пик с шириной 4 нм (в 5 раза уже). Уменьшение ширины пика при взятии второй и четвёртой производной от лоренцевой и гауссовой формы линии приведено на рис. П.6 а и б, соответственно, и в таблице П.5. При этом отличие между шириной второй и четвёртой производными незначительное, однако в отличие от второй производной положение максимума четвёртой совпадает с положением максимума исходной полосы.

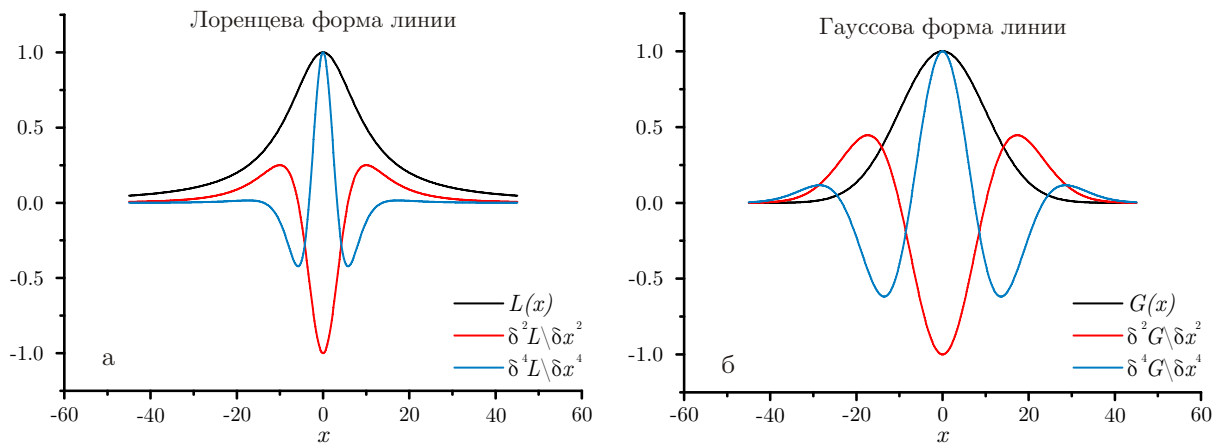


Рис. П.6: Изменение ширины пика при взятии производных для лоренцевой (а) и гауссовой (б) формы линии (чёрным). Красным показана их вторая производная, синим - четвёртая. Нормировка зависимостей произведена так, чтобы пиковое значение равнялось 1 для функции и её четвёртой производной и -1 для её второй производной

| Порядок производной | Лоренцева форма линии | Гауссова форма линии |
|---------------------|-----------------------|----------------------|
| 0 | 20 нм | 20 нм |
| 2 | 6,6 нм | 12,5 нм |
| 4 | 4 нм | 9,6 нм |

Таблица П.5: Изменение полной ширины пика на полувысоте (FWHM) для лоренцевой и гауссовой формы линии при взятии производной

На основании приведённых данных на рис. П.6 и в таблице П.5 по аналогии с работой [125] можно отметить следующие преимущества анализа чётных производных:

- положение максимума соответствует максимумам исходным спектрам, если номер производной делится на 4; если же номер производной не делится на 4, то для подобного совпадения положения максимумов надо взять производную с обратным знаком;
- при увеличении порядка производной, ширина её пика сужается.

Основная проблема анализа реальных спектров, отмеченная в работе [125], - это наличие шумов экспериментально полученных данных. Так, амплитуда n -й производной 1%-ного шума увеличивается с ростом её порядка в 2^n раз. Для фильтрации шумов наиболее эффективным методом можно считать метод Савицкого-Голэя, подробно описанный в работе [121].

На рис. П.7 а приведены спектры поглощения для ароматических аминокислот (по данным [119]), сглаженные по алгоритму Савицкого-Голэя [121] с наименьшим размером окна фильтрации (9 точек) для последующего взятия производных четвёртого порядка (рис. П.7 б).

При дальнейшем развитии метода анализа четвёртой производной спектров поглощения для характеристики белков было показано, что она является выгодным компромиссом между улучшением разрешения пиков и увеличением уровня шума ([43, 44, 121, 125]).

Для исследования окружения тирозина в работах [43–45, 80, 121, 125] используются следующие характеристики четвёртой производной спектра поглощения белка (рис. П.8):

- положение пиков λ_1 и λ_2 , второй из которых соответствует 0-0 переходу фенольного кольца тирозина;
- отношение $R = \frac{p_2}{p_1}$.

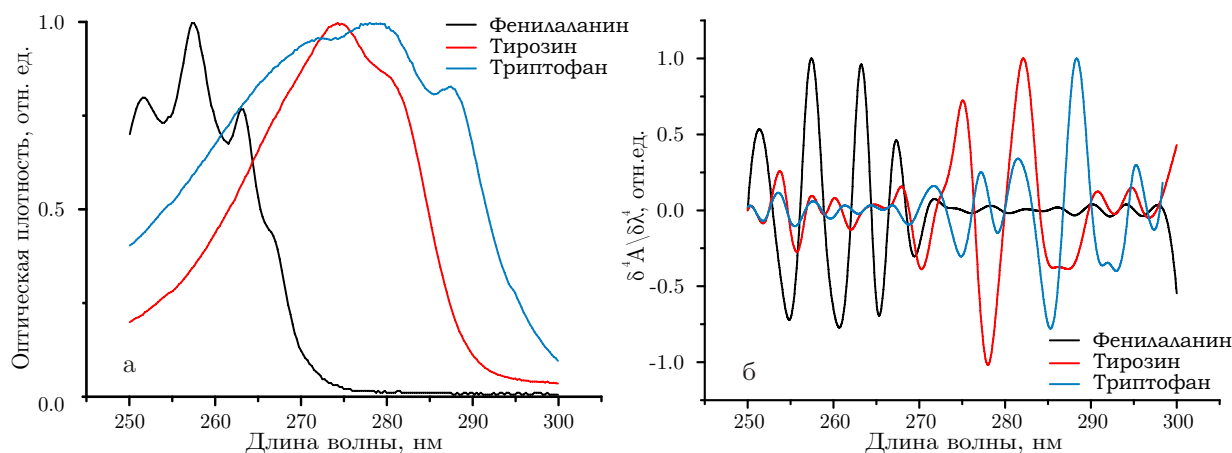


Рис. П.7: Спектры поглощения (а) и их четвёртые производные (б) для водных растворов ароматических аминокислот: фенилаланина (чёрным), тирозина (красным) и триптофана (синим)

Отношение R зависит в основном от гетерогенности окружения тирозина (его рост говорит о более сходном окружении различных тирозиновых остатков) и не сильно зависит от наличия водородной связи ОН-группы тирозина. Напротив, значение положения 0-0 перехода фенольного кольца λ_2 в основном характеризует величину указанной водородной связи и в меньшей степени гетерогенность окружения тирозина.

В данной диссертационной работе анализ четвёртой производной спектров поглощения был выполнен по аналогии с работой [81]. Четвёртая производная измеренных спектров поглощения определялась по алгоритму Савицкого-Голэя [43, 45, 121, 126] с наименьшим размером окна фильтрации (9 точек). К рассчитанной таким образом четвёртой производной спектров поглощения была применена интерполяция кубической зависимостью, что улучшает разрешение пиков производной до 0,05 нм [81]. В качестве основных параметров, характеризующих изменение окружения тирозина в альбумине при внешнем воздействии, были выбраны отношение R и длина волны 0-0 перехода фенольного кольца λ_2 .

П.2. Приготовление образцов

Для приготовления растворов в данной работе использовалась дважды дистиллированная вода, полученная при помощи стеклянного бидистиллятора БС (ОАО "Химлаборприбор"). Проверка получаемого бидистиллята показала, что электропроводность и содержание основных компо-

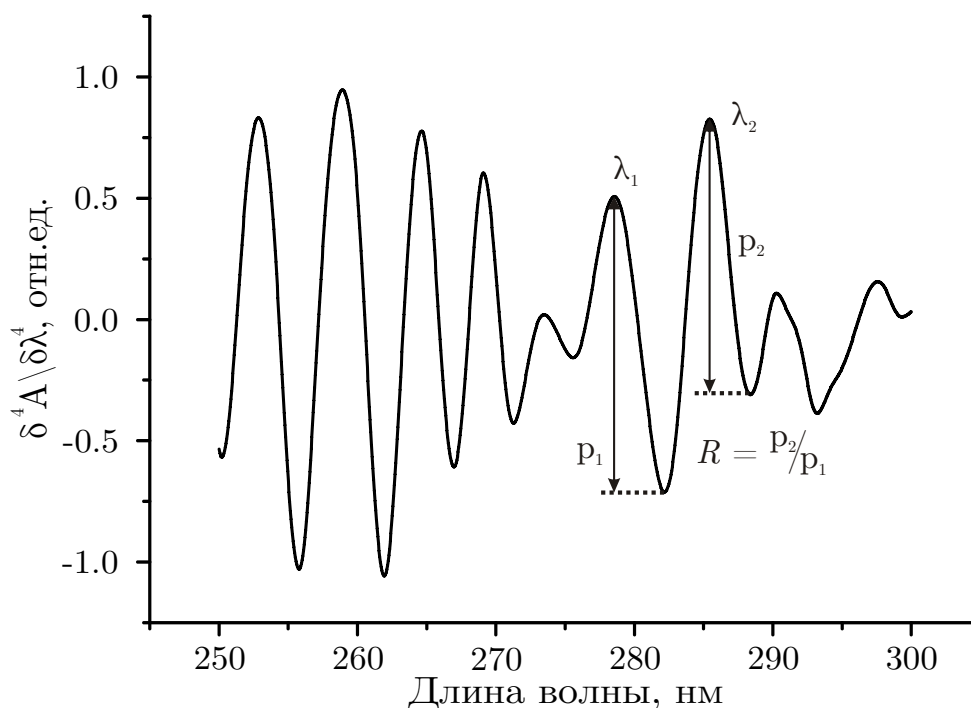


Рис. П.8: Четвёртая производная спектра поглощения БСА в нативном состоянии и параметры, используемые при её анализе (по [43–45, 80, 121, 125]). Концентрация БСА - 4.1 мкМ

ментов находятся в пределах предельно допустимых значений. С точки зрения оптических свойств, вклад флуоресценции используемого бидистиллята не превышал величины случайной погрешности эксперимента. Для приготовления концентрированного стокового раствора флуоресцентного зонда Нильского красного использовался диметилсульфоксид (ДМСО). Все химические вещества, используемые в работе, обладали необходимой степенью чистоты и никакой дополнительной очистки не проводилось.

Концентрация веществ в стоковых растворах, обладающих характерными полосами поглощения, определялась по известным коэффициентам экстинкции, как это было указано в П.1.3. Для остальных веществ концентрация определялась по известным массе сухого вещества и объёму растворителя. Для измерения массы веществ с точностью до 0.5 мг использовались аналитические весы HR-100А (ООО «Эй энд Ди Рус»), причём масса веществ была не менее 10 мг. В экспериментах по исследованию влияния этанола на структуру белков (§ 3.4) использовалась азеотропная смесь ([EtOH]=95,6 % (v/v)).

Конечная концентрация веществ в исследуемых образцах определялась по известным объёмам смешиваемых веществ и исходных концентраций стоковых растворов. В экспериментах по исследованию влияния детер-

гентов на структуру белков (Глава 2, § 3.1) для изменения концентрации лиганда с высокой точностью в широких пределах применялась процедура последовательного разбавления образцов раствором белка той же концентрации. Строго говоря, такая процедура приготовления образцов позволяет исследовать рефолдинг белка (в англоязычной литературе refolding означает восстановление структуры белка после снятия внешнего воздействия). Однако сравнение получаемых сигналов для последовательного разбавления и для смешивания стоковых растворов показало отсутствие гистерезиса. Помимо повышения точности концентраций получаемых растворов метод последовательного разбавления позволяет избежать высоких локальных концентраций лигандов в исследуемых образцах за счёт смешивания макроскопических объёмов жидкостей.

Для фиксирования pH исследуемых растворов во всех экспериментах (кроме измерения зависимости собственной флуоресценции белков от концентрации катионов свинца и от pH, § 3.3) использовался Tris-HCl буфер концентрации 50 мМ, pH $7,44 \pm 0,05$. Для получения желаемого значения pH в раствор Tris добавлялось необходимое количество соляной кислоты (1 М). Для фиксирования pH растворов, равным $7,44 \pm 0,05$, в экспериментах по изучению влияния катионов свинца использовалось добавление в исследуемые образцы гидроксида калия (KOH) или HCl. Для измерения зависимости структуры белков от pH (§ 3.3) использовался универсальный буферный раствор, приготовление которого подробно описано в работе [96]. Для получения необходимого значения pH приготавливаемого раствора в буферный стоковый раствор (состав приведён в табл. П.6) добавлялось необходимое количество разбавленной (0,1 М) соляной кислоты согласно таблице, приведённой в [96]. Данный буферный раствор позволяет работать в широком диапазоне значений pH, при этом ионная сила раствора меняется не более, чем на 10% [96]. Результирующее значение pH исследуемых растворов измерялось при помощи pH-метра И-410 (ООО "Аквилон СЗ") непосредственно перед экспериментом. Калибровка pH-метра проводилась по трём стандартным буферным растворам (pH 4,01, 7,01, 10,01) перед началом проведения измерений.

В экспериментах по изучению тирозиновой флуоресценции плазмы крови использовалась разведённая в 500 раз Tris-HCl буфером (для предотвращения внутреннего фильтра) плазма здорового донора, приготовленная в сертифицированной медицинской лаборатории (ООО "ИНВИТРО"). Там

| Вещество | Количество |
|---|------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,673 г |
| $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,320 г |
| H_3BO_3 | 0,177 г |
| NaOH, 1 М | 12,15 мл |

Таблица П.6: Состав буферного стокового раствора из расчёта общего объёма 50 мл согласно методике, описанной в работе [96]

же был проведён стандартный биохимический анализ для определения концентрации основных белков плазмы крови.

Литература

1. *Peters T.* Serum albumin // *Advances in protein chemistry.* — 1985. — Vol. 37. — Pp. 161–245.
2. *Curry S.* Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin // *Drug Metab. Pharmacokinet.* — 2009. — Vol. 24, no. 4. — Pp. 342–357.
3. *Varshney A., Sen P., Ahmad E., Rehan M., Subbarao N., Khan R. H.* Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? // *Chirality.* — 2010. — Jan.. — Vol. 22, no. 1. — Pp. 77–87.
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. *Koch-Weser J., Sellers E. M.* Binding of drugs to serum albumin // *New England Journal of Medicine.* — 1976. — Vol. 294, no. 6. — Pp. 311–316.
6. *Kariv I., Cao H., Oldenburg K. R.* Development of a high throughput equilibrium dialysis method // *Journal of pharmaceutical sciences.* — 2001. — Vol. 90, no. 5. — Pp. 580–587.
7. Clustal w and clustal x version 2.0 / M. A. Larkin, G. Blackshields, N. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm et al. // *Bioinformatics.* — 2007. — Vol. 23, no. 21. — Pp. 2947–2948.
8. *Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K.* Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution // *Protein Engineering, Design & Selection.* — 1999. — Vol. 12, no. 6. — Pp. 439–446.
9. *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.

10. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. — Ун-т Кн. дом М., 2002.
11. 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.
12. Rondeau P., Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts // *Biochimie*. — 2011. — Vol. 93, no. 4. — Pp. 645–658.
13. Sattarahmady N., Moosavi-Movahedi A. A., Ahmad F., Hakimelahi G. H., Habibi-Rezaei M., Saboury A. A., Sheibani N. Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. — 2007. — Vol. 1770, no. 6. — Pp. 933–942.
14. Bouma B., Kroon-Batenburg L. M., Wu Y.-P., Brünjes B., Posthuma G., Kranenburg O., de Groot P. G., Voest E. E., Gebbink M. F. Glycation induces formation of amyloid cross- β structure in albumin // *Journal of biological chemistry*. — 2003. — Vol. 278, no. 43. — Pp. 41810–41819.
15. Dobson C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation // *Seminars in cell & developmental biology* / Elsevier. — Vol. 15. — 2004. — Pp. 3–16.
16. Krebs M. R., Bromley E. H., Donald A. M. The binding of thioflavin-t to amyloid fibrils: localisation and implications // *Journal of structural biology*. — 2005. — Vol. 149, no. 1. — Pp. 30–37.
17. Bhattacharya M., Jain N., Mukhopadhyay S. Insights into the mechanism of aggregation and fibril formation from bovine serum albumin // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2011. — Vol. 115, no. 14. — Pp. 4195–4205.
18. 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.

19. *Gurachevsky A., Kazmierczak S. C., Jörres A., Muravsky V.* Application of spin label electron paramagnetic resonance in the diagnosis and prognosis of cancer and sepsis // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. — 2008. — Vol. 46, no. 9. — Pp. 1203–1210.
20. *Gurachevsky A., Muravskaya E., Gurachevskaya T., Smirnova L., Muravsky V.* Cancer-associated alteration in fatty acid binding to albumin studied by spin-label electron spin resonance // *Cancer investigation*. — 2007. — Vol. 25, no. 6. — Pp. 378–383.
21. *Abadie J. M., Blassingame C. L., Bankson D. D.* Albumin cobalt binding assay to rule out acute coronary syndrome // *Annals of Clinical & Laboratory Science*. — 2005. — Vol. 35, no. 1. — Pp. 66–72.
22. *Соловьев К. Н., Борисевич Е. А.* Внутримолекулярный эффект тяжелого атома в фотофизике органических молекул // *Успехи физических наук*. — 2005. — Т. 175, № 3. — С. 247–270.
23. *Santos M. N. B.* External heavy-atom effect on fluorescence kinetics // *PhysChemComm*. — 2000. — Vol. 3, no. 5. — Pp. 18–23.
24. *Platt J. R.* Classification of spectra of cata-condensed hydrocarbons // *The Journal of Chemical Physics*. — 1949. — Vol. 17, no. 5. — Pp. 484–495.
25. *Callis P. R., Burgess B. K.* Tryptophan fluorescence shifts in proteins from hybrid simulations: an electrostatic approach // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 1997. — Nov.. — Vol. 101, no. 46. — Pp. 9429–9432.
26. *Sobolewski A. L., Domcke W.* Ab initio investigations on the photophysics of indole // *Chemical Physics Letters*. — 1999. — Dec.. — Vol. 315, no. 3–4. — Pp. 293–298.
27. *Lakowicz J. R.* Principles of fluorescence spectroscopy. — 3rd edition. — Springer Science & Business Media, 2007.
28. *Callis P. R.* Simulating electrostatic effects on electronic transitions in proteins // *Molecular Simulation*. — 2015. — Jun.. — Vol. 41, no. 1–3. — Pp. 190–204.
29. *Callis P.* Predicting fluorescence lifetimes and spectra of biopolymers. // *Methods in enzymology*. — 2010. — Dec.. — Vol. 487. — Pp. 1–38.

30. *Vivian J. T., Callis P. R.* Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins // *Biophysical Journal*. — 2001. — May. — Vol. 80, no. 5. — Pp. 2093–2109.
31. *Burstein E., Vedenkina N., Ivkova M.* Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // *Photochemistry and photobiology*. — 1973. — Vol. 18, no. 4. — Pp. 263–279.
32. *Szabo A., Rayner D.* Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution // *journal of the American Chemical Society*. — 1980. — Vol. 102, no. 2. — Pp. 554–563.
33. *Julien O., Wang G., Jonckheer A., Engelborghs Y., Sykes B. D.* Tryptophan side chain conformers monitored by nmr and time-resolved fluorescence spectroscopies // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 2012. — Vol. 80, no. 1. — Pp. 239–245.
34. *Engelborghs Y.* The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2001. — Vol. 57, no. 11. — Pp. 2255–2270.
35. *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.
36. *Rappoport Z.* The Chemistry of Phenols, 2 Volume Set. — John Wiley & Sons, 2004.
37. *Saraiva M. A., Jorge C. D., Santos H., Maçanita A. L.* Earliest events in α -synuclein fibrillation probed with the fluorescence of intrinsic tyrosines // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2016. — Jan.. — Vol. 154. — Pp. 16–23.
38. *McGaughey G. B., Gagné M., Rappé A. K.* π -stacking interactions alive and well in proteins // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273, no. 25. — Pp. 15458–15463.
39. *Etienne T., Assfeld X., Monari A.* Qm/mm calculation of absorption spectra of complex systems: The case of human serum albumin // *Computational and Theoretical Chemistry*. — 2014. — Jul.. — Vol. 1040–1041. — Pp. 360–366.

40. *Vekshin N., Vincent M., Gally 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.
41. *Weissbluth M.* Hypochromism // *Quarterly reviews of biophysics*. — 1971. — Vol. 4, no. 01. — Pp. 1–34.
42. *Fell A.* The analysis of aromatic amino acids by second and fourth derivative UV-spectroscopy // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. — 1979. — Vol. 31, no. S1. — P. 23P.
43. *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.
44. *PADRÓS E., DUÑACH M., Morros A., SABÉS M., MAÑOSA J.* Fourth-derivative spectrophotometry of proteins // *Trends in Biochemical sciences*. — 1984. — Vol. 9, no. 12. — Pp. 508–510.
45. *PADRÓS E., MORROS A., MAÑOSA J., DUÑACH M.* The State of Tyrosine and Phenylalanine Residues in Proteins Analyzed by Fourth-Derivative Spectrophotometry // *European Journal of . . .* — 1982. — Vol. 122, no. 1. — Pp. 117–122.
46. *Stirpe A., Pantusa M., Rizzuti B., Sportelli L., Bartucci R., Guzzi R.* Early stage aggregation of human serum albumin in the presence of metal ions // *International journal of biological macromolecules*. — 2011. — Vol. 49, no. 3. — Pp. 337–342.
47. *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.
48. *Anand U., Mukherjee S.* Reversibility in protein folding: effect of β -cyclodextrin on bovine serum albumin unfolded by sodium dodecyl sulphate // *Physical Chemistry Chemical Physics*. — 2013. — Vol. 15, no. 23. — Pp. 9375–9383.
49. *Hawe A., Sutter M., Jiskoot W.* Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization // *Pharmaceutical research*. — 2008. — Vol. 25, no. 7. — Pp. 1487–1499.

50. *Sackett D. L., Knutson J., Wolff J.* Hydrophobic surfaces of tubulin probed by time-resolved and steady-state fluorescence of nile red. // *Journal of Biological Chemistry*. — 1990. — Vol. 265, no. 25. — Pp. 14899–14906.
51. *Sackett D. L., Wolff J.* Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces // *Analytical biochemistry*. — 1987. — Vol. 167, no. 2. — Pp. 228–234.
52. *Dutta A. K., Kamada K., Ohta K.* Spectroscopic studies of nile red in organic solvents and polymers // *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*. — 1996. — Vol. 93, no. 1. — Pp. 57–64.
53. *Davis D. M., Birch D. J.* Extrinsic fluorescence probe study of human serum albumin using nile red // *Journal of fluorescence*. — 1996. — Vol. 6, no. 1. — Pp. 23–32.
54. *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.
55. *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.
56. *Teale F.* The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution // *Biochemical Journal*. — 1960. — Vol. 76, no. 2. — P. 381.
57. *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.
58. *Cowgill R. W.* Fluorescence and protein structure: Xiv. tyrosine fluorescence in helical muscle proteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*. — 1968. — Vol. 168, no. 3. — Pp. 417–430.
59. *Abou-Zied O. K., Al-Shihi O. I.* Characterization of subdomain iia binding site of human serum albumin in its native, unfolded, and refolded

- states using small molecular probes // *Journal of the American Chemical Society*. — 2008. — Jul.. — Vol. 130, no. 32. — Pp. 10793–10801.
60. *Shweitzer B., Zanette D., Itri R.* Bovine serum albumin (bsa) plays a role in the size of sds micelle-like aggregates at the saturation binding: the ionic strength effect // *Journal of colloid and interface science*. — 2004. — Sep.. — Vol. 277, no. 2. — Pp. 285–291.
61. *Zhdanova N. G., Shirshin E. A., Maksimov E. G., Panchishin I. M., Saletsky A. M., Fadeev V. V.* Photochemical & photobiological sciences // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2015. — Vol. 14. — Pp. 897–908.
62. *Turro N. J., Lei X.-G., Ananthapadmanabhan K., Aronson M.* Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: the bsa/sds system // *Langmuir*. — 1995. — Vol. 11, no. 7. — Pp. 2525–2533.
63. *Gelamo E., Tabak M.* Spectroscopic studies on the interaction of bovine (bsa) and human (hsa) serum albumins with ionic surfactants // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2000. — Vol. 56, no. 11. — Pp. 2255–2271.
64. *Gelamo E., Silva C., Imasato H., Tabak M.* Interaction of bovine (bsa) and human (hsa) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. — 2002. — Vol. 1594, no. 1. — Pp. 84–99.
65. *Anand U., Mukherjee S.* Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. — 2013. — Vol. 1830, no. 12. — Pp. 5394–5404.
66. *Anand U., Jash C., Mukherjee S.* Spectroscopic probing of the microenvironment in a protein-surfactant assembly // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2010. — Vol. 114, no. 48. — Pp. 15839–15845.
67. *Otzen D.* Protein-surfactant interactions: a tale of many states // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. — 2011. — Vol. 1814, no. 5. — Pp. 562–591.
68. *Takeda K., Miura M., Takagi T.* Stepwise formation of complexes between sodium dodecyl sulfate and bovine serum albumin detected by measurements of electric conductivity, binding isotherm, and circular dichroism //

- Journal of Colloid and Interface Science.* — 1981. — Vol. 82, no. 1. — Pp. 38–44.
69. Santos S. F., Zanette D., Fischer H., Itri R. A systematic study of bovine serum albumin (bsa) and sodium dodecyl sulfate (sds) interactions by surface tension and small angle x-ray scattering // *Journal of colloid and interface science.* — 2003. — Vol. 262, no. 2. — Pp. 400–408.
70. Gelamo E. L., Itri R., Alonso A., da Silva J. V., Tabak M. Small-angle x-ray scattering and electron paramagnetic resonance study of the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants // *Journal of colloid and interface science.* — 2004. — Vol. 277, no. 2. — Pp. 471–482.
71. Weinberg R. B. Exposure and electronic interaction of tyrosine and tryptophan residues in human apolipoprotein A-IV // *Biochemistry.* — 1988. — Vol. 27, no. 5. — Pp. 1515–1521.
72. Borkmann R., Phillips S. Tyrosine-to-tryptophan energy transfer and the structure of calt gamma-II crystallin // *Experimental Eye Research.* — 1985. — Vol. 40, no. 6. — Pp. 819–826.
73. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes / S. Gorinstein, I. Goshev, S. Moncheva, M. Zemser, M. Weisz, A. Caspi, I. Libman, H. T. Lerner, S. Trakhtenberg, O. Martín-Belloso // *Journal of protein chemistry.* — 2000. — Vol. 19, no. 8. — Pp. 637–642.
74. Li D., Hong D., Guo H., Chen J., Ji B. Probing the influences of urea on the interaction of sinomenine with human serum albumin by steady-state fluorescence // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* — 2012. — Vol. 117. — Pp. 126–131.
75. Saito Y., Tachibana H., Hayashi H., Wada A. EXCITATION-ENERGY TRANSFER BETWEEN TYROSINE AND TRYPTOPHAN IN PROTEINS EVALUATED BY THE SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF FLUORESCENCE AND ABSORBANCE // *Photochemistry and Photobiology.* — 1981. — Mar.. — Vol. 33, no. 3. — Pp. 289–295.
76. Eisenhawer M., Cattarinussi S., Kuhn a., Vogel H. Fluorescence resonance energy transfer shows a close helix-helix distance in the transmem-

- brane M13 procoat protein. // *Biochemistry*. — 2001. — oct. — Vol. 40, no. 41. — Pp. 12321–8.
77. *Eisinger J., Feuer B., Lamola A.* Intramolecular singlet excitation transfer. Applications to polypeptides. // *Biochemistry*. — 1969. — oct. — Vol. 8, no. 10. — Pp. 3908–3915.
78. *Kronman M., Holmes L.* The fluorescence of native, denatured and reduced-denatured proteins // *Photochemistry and Photobiology*. — 1971. — Vol. 14, no. 2. — Pp. 113–134.
79. *Tikhonova T. N., Shirshin E. A., Budylin G. S., Fadeev V. V., Petrova G. P.* Assessment of the europium (iii) binding sites on albumin using fluorescence spectroscopy // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2014. — Vol. 118, no. 24. — Pp. 6626–6633.
80. *Talsky G., Mayring L., Kreuzer H.* High-Resolution, High-Order UV/Vis Derivative Spectroscopy // *Photochemistry and Photobiology*. — 1981. — Vol. 17, no. 11. — Pp. 785–799.
81. *NING A.-M., MENG L., Zhao Z.-L., Zheng X.-F., Wan X.-S.* Mechanism of Interaction between Bovine Serum Albumin and Sodium Dodecyl Sulfate // *Acta Physico-Chimica* — 2013. — Vol. 29, no. 12. — Pp. 2639–2646.
82. *Ojha B., Das G.* Role of hydrophobic and polar interactions for bsa-amphiphile composites // *Chemistry and physics of lipids*. — 2011. — Vol. 164, no. 2. — Pp. 144–150.
83. *Tian J., Zhao Y., Liu X., Zhao S.* A steady-state and time-resolved fluorescence, circular dichroism study on the binding of myricetin to bovine serum albumin // *Luminescence*. — 2009. — Vol. 24, no. 6. — Pp. 386–393.
84. *Engelborghs Y.* Correlating protein structure and protein fluorescence // *Journal of fluorescence*. — 2003. — Vol. 13, no. 1. — Pp. 9–16.
85. *Shen X., Knutson J. R.* Subpicosecond fluorescence spectra of tryptophan in water // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2001. — Vol. 105, no. 26. — Pp. 6260–6265.
86. *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.
87. *Saha A., Yakovlev V. V.* Structural changes of human serum albumin in response to a low concentration of heavy ions // *Journal of biophotonics*. — 2010. — Vol. 3, no. 10-11. — Pp. 670–677.
88. *Navarra G., Tinti A., Leone M., Militello V., Torreggiani A.* Influence of metal ions on thermal aggregation of bovine serum albumin: aggregation kinetics and structural changes // *Journal of inorganic biochemistry*. — 2009. — Vol. 103, no. 12. — Pp. 1729–1738.
89. *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.
90. *Pedersen K.* Binding of calcium to serum albumin iii. influence of ionic strength and ionic medium // *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. — 1972. — Vol. 29, no. 4. — Pp. 427–432.
91. *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.
92. *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.
93. *Pigault C., Gerard D.* Influence of the location of tryptophanyl residues in proteins on their photosensitivity // *Photochemistry and photobiology*. — 1984. — Vol. 40, no. 3. — Pp. 291–296.
94. *Wang X., Guo L., Ma H.* Analysis of local polarity change around cys34 in bovine serum albumin during n→ b transition by a polarity-sensitive fluorescence probe // *Spectrochim. Acta, Part A*. — 2009. — Vol. 73, no. 5. — Pp. 875–878.
95. *Cornell C. N., Kaplan L. J.* Spin-label studies of the sulfhydryl environment in bovine plasma albumin. 1. the nf transition and acid expansion // *Biochemistry*. — 1978. — Vol. 17, no. 9. — Pp. 1750–1754.

96. ÖSTLING S., VIRTAMA P. A modified preparation of the universal buffer described by teorell and stenhagen // *Acta Physiologica Scandinavica*. — 1946. — Vol. 11, no. 4. — Pp. 289–293.
97. Gally J., Edelman G. The effect of temperature on the fluorescence of some aromatic amino acids and proteins // *Biochimica et biophysica acta*. — 1962. — Vol. 60, no. 3. — Pp. 499–509.
98. White A. Effect of ph on fluorescence of tyrosine, tryptophan and related compounds // *Biochemical Journal*. — 1959. — Vol. 71, no. 2. — P. 217.
99. 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.
100. 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}C nmr multiplet relaxation study // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35, no. 1. — Pp. 340–347.
101. Lubas B., Soltysik-Rasek M., Lesniewska I. Proton nuclear magnetic resonance study of the association of monovalent and divalent alcohols with bovine serum albumin // *Biochemistry*. — 1979. — Vol. 18, no. 22. — Pp. 4943–4951.
102. Banishev A., Shirshin E., Fadeev V. Laser fluorimetry of proteins containing one and two tryptophan residues // *Laser Physics*. — 2008. — Vol. 18, no. 7. — Pp. 861–867.
103. Uversky V. N., Narizhneva N. V., Kirschstein S. O., Winter S., Löber G. Conformational transitions provoked by organic solvents in β -lactoglobulin: can a molten globule like intermediate be induced by the decrease in dielectric constant? // *Folding and design*. — 1997. — Vol. 2, no. 3. — Pp. 163–172.
104. 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.

105. *Togashi D. M., Ryder A. G., O'Shaughnessy D.* Monitoring local unfolding of bovine serum albumin during denaturation using steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy // *Journal of fluorescence*. — 2010. — Vol. 20, no. 2. — Pp. 441–452.
106. *Anand U., Jash C., Mukherjee S.* Protein unfolding and subsequent refolding: a spectroscopic investigation // *Physical Chemistry Chemical Physics*. — 2011. — Vol. 13, no. 45. — Pp. 20418–20426.
107. *Zhdanova N., Shirshin E., Fadeev V., Priezzhev A.* Sds-binding assay based on tyrosine fluorescence as a tool to determine binding properties of human serum albumin in blood plasma // *Saratov Fall Meeting 2015 / International Society for Optics and Photonics*. — 2016. — Pp. 991713–991713.
108. *Chuang V. T. G., Otagiri M.* How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin? // *Pharmaceutical research*. — 2002. — Vol. 19, no. 10. — Pp. 1458–1464.
109. *Cistola D. P., Small D. M.* Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. // *Journal of Clinical Investigation*. — 1991. — Vol. 87, no. 4. — Pp. 1431–1441.
110. *Pavićević I. D., Jovanović V. B., Takić M. M., Penezić A. Z., Aćimović J. M., Mandić L. M.* Fatty acids binding to human serum albumin: Changes of reactivity and glycation level of cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal // *Chemico-biological interactions*. — 2014. — Vol. 224. — Pp. 42–50.
111. *BIRKETT D. J., MYERS S. P., SUDLOW G.* Effects of fatty acids on two specific drug binding sites on human serum albumin // *Molecular pharmacology*. — 1977. — Vol. 13, no. 6. — Pp. 987–992.
112. *Sudlow G., Birkett D., Wade D.* Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin // *Molecular pharmacology*. — 1976. — Vol. 12, no. 6. — Pp. 1052–1061.
113. *Shirshin E., Cherkasova O., Tikhonova T., Berlovskaya E., Priezzhev A., Fadeev V.* Native fluorescence spectroscopy of blood plasma of rats with experimental diabetes: identifying fingerprints of glucose-related metabolic

- pathways // *Journal of biomedical optics*. — 2015. — Vol. 20, no. 5. — Pp. 051033–051033.
114. *Yappert M. C., Ingle J.* Correction of polychromatic luminescence signals for inner-filter effects // *Applied Spectroscopy*. — 1989. — Vol. 43, no. 5. — Pp. 759–767.
115. *Halder M.* Determination of the critical micellar concentration (cmc) of a cationic micelle from stokes shift data // *The Chemical Educator*. — 2007. — Vol. 12, no. 1. — Pp. 33–36.
116. *Viana R. B., da Silva A. B., Pimentel A. S.* Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants // *Advances in Physical Chemistry*. — 2012. — Vol. 2012.
117. *Hinze W. L., Singh H., Baba Y., Harvey N. G.* Micellar enhanced analytical fluorimetry // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 1984. — Vol. 3, no. 8. — Pp. 193–199.
118. *Kalyanasundaram K., Thomas J.* Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems // *Journal of the American Chemical Society*. — 1977. — Vol. 99, no. 7. — Pp. 2039–2044.
119. *Fasman G. D., Sober H. A. et al.* Handbook of biochemistry and molecular biology. — CRC press Cleveland, 1977. — Vol. 1.
120. *Permyakov E. A., Burstein E. A.* Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence // *Biophysical chemistry*. — 1984. — Vol. 19, no. 3. — Pp. 265–271.
121. *Savitzky A., Golay M.* Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. // *Analytical chemistry*. — 1964. — Vol. 36, no. 8. — Pp. 1627–1639.
122. *Becker W.* The bh TCSPC handbook. — Becker & Hickl, 2014.
123. *Peters Jr T.* 3 serum albumin // *THE PLASMA PROTEINS 2E V1: Structure, Function, and Genetic Control*. — 2012. — Vol. 1. — P. 133.
124. *Buck R., Singhadeja S., Rogers L.* Ultraviolet absorption spectra of some inorganic ions in aqueous solutions // *Analytical Chemistry*. — 1954. — Vol. 26, no. 7. — Pp. 1240–1242.

125. *Butler W. L.* Fourth derivative spectra // *Methods in enzymology*. — 1979. — Vol. 56. — Pp. 501–515.
126. *Antonov L.* Fourth derivative spectroscopy—a critical view // *Analytica chimica acta*. — 1997. — Vol. 349. — Pp. 295–301.