

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**ДИНАМИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ МОЛЕКУЛ СЫВОРОТОЧНОГО
АЛЬБУМИНА В РАСТВОРАХ НЕЙТРАЛЬНЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ В
ЗАВИСИМОСТИ ОТ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ ПО АНАЛИЗУ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА**

Выполнила студентка 405 группы:
Воробьева Елизавета Дмитриевна

подпись студента

Научный руководитель:
кандидат физ.-мат. наук, старший преподаватель
Власова Ирина Михайловна

подпись научного руководителя

Допущена к защите «__» «_____» 2021 г.

Зав. кафедрой

профессор Салецкий А.М.

подпись зав.кафедрой

Москва
2021

Оглавление

Введение	3
Глава 1. Структурные изменения белков при связывании низкомолекулярных лигандов по данным флуоресцентного анализа (литературный обзор)	4
§1.1. Структурная организация и особенности пространственной организации белков. Бычий сывороточный альбумин (БСА).....	4
§1.2. Пространственная конфигурация полимерных молекул белка и статистический характер организации биополимеров.....	9
§1.3. Объемные взаимодействия в полимерных молекулах белков...	15
§1.4. Нейтральные детергенты. Взаимодействие белков с нейтральными детергентами. Биохимический аспект.....	19
§1.5. Флуоресцентная спектроскопия. Основные понятия.....	24
§1.6. Флуоресцентный анализ в исследованиях взаимодействия белков и лигандов.....	28
Глава 2. Методическая часть экспериментов	33
§2.1. Приготовление растворов БСА и нейтрального детергента (Твин-20 / Тритон X-100) при вариации значений pH.....	33
§2.2. Добавление флуоресцентного зонда в растворы «белок-детергент».....	33
§2.3. Методика экспериментов для исследования флуоресценции зонда в растворах БСА и нейтрального детергента (Твин-20 / Тритон X-100) при различных значениях pH.....	33
Глава 3. Динамическая подвижность молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах нейтральных детергентов в зависимости от кислотности среды по анализу флуоресцентного зонда	35
Основные результаты и выводы	43
Список цитируемой литературы	44

Введение

Белки играют очень важную роль во всех процессах, которые протекают в организмах. Они выполняют множество функций: отвечают за рациональное использование питательных веществ, помогают сокращаться мышцам, участвуют в формировании иммунитета, регулируют синтез гормонов и т.д. Стабильность молекулы белка способствует эффективности выполнения белками своих функций. Белковые молекулы перестраиваются при взаимодействии с различными веществами, исследование этих взаимодействий необходимо для биологической и физической химии, также для исследования и разработки лекарственных препаратов.

В данной работе рассматривается взаимодействие молекул бычьего сывороточного альбумина и неионных (нейтральных) детергентов Тритона X-100 и Твина-20. Нейтральные детергенты, не вызывают денатурации белков. Если растворить и изолировать белки в растворе нейтрального детергента в их естественной и активной форме, то они будут сохранять свои биологические свойства.

Основная цель работы — это исследование по анализу флуоресцентного зонда динамической подвижности молекул БСА в процессе их комплексообразования с нейтральными детергентами Тритоном X-100 и Твин-20 в зависимости от кислотности среды. В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

во-первых, исследовать изменение флуоресценции эозина в растворах БСА при добавлении в них детергентов при различных значениях pH в зависимости от концентрации добавляемого каждого детергента,

во-вторых, проанализировать конкурирующие процессы взаимодействия молекул БСА с детергентами и с зондом эозином,

в-третьих, выявить закономерности в чувствительности флуоресценции эозина к двум разным детергентам при их комплексообразовании с БСА.

Глава 1. Структурные изменения белков при связывании низкомолекулярных лигандов по данным флуоресцентного анализа (литературный обзор)

§1.1. Структурная организация и особенности пространственной организации белков. Бычий сывороточный альбумин (БСА)

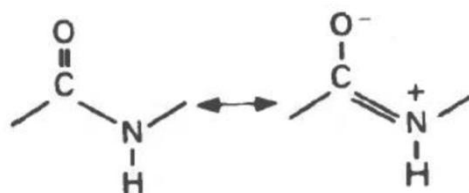
Белки - гетрополимеры с нерегулярной структурой (т. е. построенные за счет соединения разных мономеров, чередующиеся не по регулярным формулам). Они играют центральную роль в процессах жизнедеятельности клеток и в формировании клеточных структур [1-3].

Анализ содержания в крови определенных белков и ферментов широко используется в диагностических целях. В частности, при заболеваниях печени диагностическое обследование непременно включает электрофоретическое определение относительного содержания альбуминов и глобулинов в плазме крови. Анализ содержания в плазме липопротеинов и иммуноглобулинов с помощью электрофореза и других методов обычно используется при диагностике специфических типов гиперлиппротеинемии и иммунных нарушений.

Первичная структура белков формируется в результате соединения L- α -аминокислот пептидными связями. Структура большинства белков стабилизируется двумя классами прочных связей (пептидных и дисульфидных) и тремя классами слабых связей (водородных, гидрофобных и электростатических, т.е. солевых).

В структурных формулах пептидов связь между карбонильной группой и атомом α -азота изображается как одинарная, однако на самом деле эта связь между атомами углерода и азота носит характер частично двойной связи. Свободное вращение вокруг нее невозможно, и все четыре атома лежат в одной плоскости (компланарны). Эта полужесткость ведет к важным

последствиям, сказывающимся на более высоких уровнях структурной организации белка.

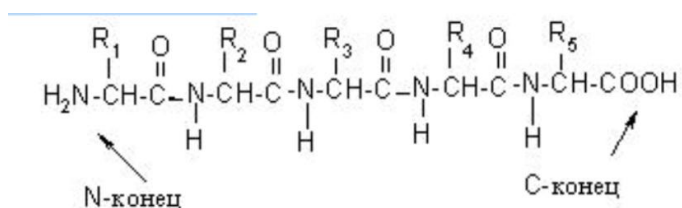


Принято выделять четыре уровня структурной организации белков, которые обозначаются как первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры белков.

Под первичной структурой, понимается последовательность (количество и порядок) аминокислот (аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями) в полипептидной цепи/цепях и положение дисульфидных связей, если они имеются. Чтобы определить первичную структуру полипептида, нужно установить число, химическую структуру и порядок расположения всех аминокислотных остатков, входящих в его состав.

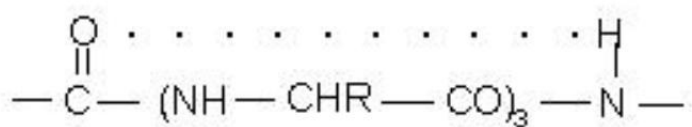
Эта структура в молекуле белка является основной, генетически детерминирована и любые изменения ее приводят к потере функций белка. Первичная структура каждого индивидуального белка закодирована в молекуле ДНК (участке, называемом геном) и реализуется в ходе транскрипции (переписывании информации на м-РНК) и трансляции (синтез пептидной цепи).

Полипептидная цепь на одном конце содержит свободную, не участвующую в образовании пептидной связи, NH_2 -группу, N-конец. На другой стороне располагается свободная, не участвующая в образовании пептидной связи, HOOC -группа, это – С-конец. За начало цепи принимается N-конец, именно с него начинается нумерация аминокислотных остатков:



Вторичная структура - формируется за счет водородных связей между пептидными группами (других соединений между радикалами). На этом структурном уровне описываются стерические взаимосвязи между расположенными близко друг к другу вдоль цепи аминокислотами. Вторичная структура может быть регулярной (α -спираль, складчатый β -слой) или не обнаруживать никаких признаков регулярности (неупорядоченная конформация).

α -Спираль по форме напоминает пружину. При формировании α -спирали атом кислорода каждой пептидной группы образует водородную связь с атомом водорода четвертой по ходу цепи NH-группы:

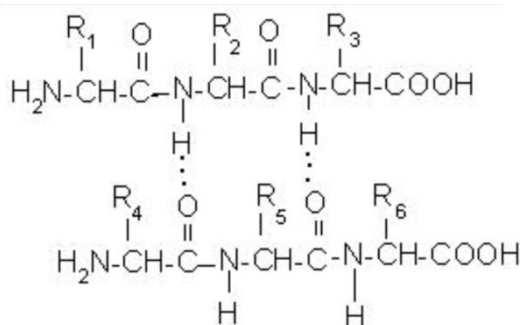


Спирализация полипептидной цепи обеспечивается водородными связями, возникающими между amino- и карбоксильными группами, пептидной связью, расположенной на противоположных витках спирали, а также гидроксильными группами тирозина и серина.

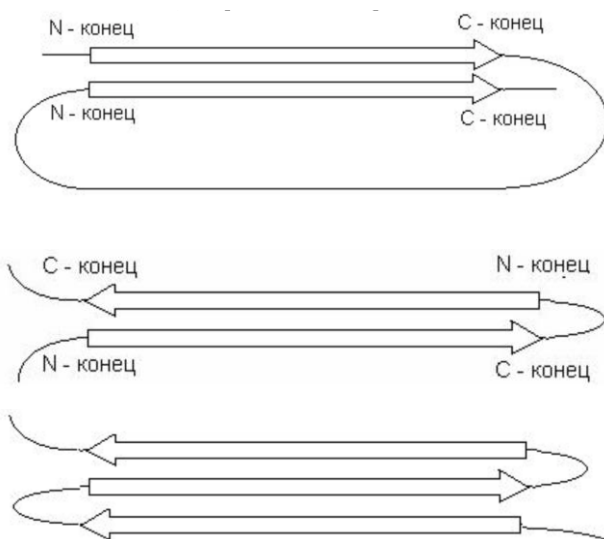
Каждый виток спирали связан со следующим витком спирали несколькими водородными связями, что придает структуре значительную прочность. α -Спираль обладает следующими характеристиками: диаметр спирали 0,5 нм, шаг спирали – 0,54 нм, на один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка.

Из природных L-аминокислот может быть построена как правая, так и левая α -спираль. Для большинства природных белков характерна правая спираль. Из D-аминокислот также можно построить как левую, так и правую спираль. Полипептидная же цепь, состоящая из смеси D-и L-аминокислотных остатков, не способна образовывать спираль. Некоторые аминокислотные остатки препятствуют образованию α -спирали.

Образование водородных связей между пептидными группами соседних полипептидных фрагментов цепей приводит к формированию β -структуры, или складчатого слоя:



В отличие от α -спирали складчатый слой имеет зигзагообразную форму, похожую на гармошку. Различают параллельные и антипараллельные складчатые слои.



Параллельные β -структуры образуются между участками полипептидной цепи, направления которых совпадают. Антипараллельные β -структуры образуются между противоположно направленными участками полипептидной цепи.

В составе одних белков вторичная структура может быть представлена только α -спиралью, в других – только β -структурами (параллельными, или антипараллельными, или и теми, и другими), в третьих – наряду с α -спирализованными участками могут присутствовать и β -структуры.

Третичная структура - конечная форма полипептидной цепи (когда полипептиды образуют третичную структуру их называют белками. Под

третичной структурой понимают стерические взаимосвязи между аминокислотными остатками, далеко отстоящими друг от друга по цепи. У многих белков вторичноорганизованные структуры (α -спирали, β - структуры) свернуты определенным образом в компактную глобулу. Таким образом, третичная структура характеризует трехмерное расположение участков полипептидной цепи в пространстве. В формировании третичной структуры принимают участие ионные и водородные связи, гидрофобные взаимодействия, ван-дер-ваальсовы силы. Стабилизируют третичную структуру дисульфидные мостики.

Третичная структура белков определяется их аминокислотной последовательностью. При ее формировании связи могут возникать между аминокислотами, расположенными в полипептидной цепи на значительном расстоянии. У растворимых белков полярные радикалы аминокислот, как правило, оказываются на поверхности белковых молекул и реже – внутри молекулы, гидрофобные радикалы оказываются компактно упакованными внутри глобулы, образуя гидрофобные области.

Четвертичная структура - способ укладки в пространстве нескольких полипептидных цепей, имеющих первичную, вторичную и третичную структуры. Если белки состоят из двух и более полипептидных цепей, связанных между собой нековалентными (не пептидными и не дисульфидными) связями, то говорят, что они обладают четвертичной структурой – олигомерный белок построен из протомеров. Довольно часто встречаются олигомеры, содержащие более четырех протомеров, особенно среди регуляторных белков (пример — транскарбамоилаза). Наиболее изученный пример — гемоглобин.

Для четвертичной структуры характерны особенности: 1) комплементарность протомеров – протомеры взаимодействуют между собой в строго определенных точках, называемых контактными поверхностями, 2) самосборка молекулярных структур.

Рассмотрим особо строение белка бычьего сывороточного альбумина, обладающего третичной структурой [1-3]. Бычий сывороточный альбумин – глобулярный белок массой 66 кДа, содержит 585 аминокислотных остатков, его концентрация в крови составляет 35-55 мг/мл. Трехмерная структура БСА состоит из трех гомологичных доменов (I, II, III), каждый из которых сформирован шестью спиралями и подразделяется на 2 субдомена. БСА содержит 17 дисульфидных связей, которые придают жесткость каждому субдомену.

Сывороточный альбумин играет основную роль в транспорте большого числа метаболитов, билирубина, гормонов, свободных жирных кислот и лекарственных препаратов.

Белок БСА способен подвергаться обратимой конформационной перестройке при изменении pH: E-форма (Extended; pH < 3), F-форма (Fast; pH 3 – 5), N-форма (Native; pH 5 – 7), B-форма (Basic; pH 7 – 8,5) и A-форма (Aged; pH > 8,5).

При нагревании α -спиральная структура БСА разрушается и образуются β -слои. При повышении температуры до 75 °C структура меняется на $\alpha+\beta$, состоящую из отдельных участков α - и β -структуры. Денатурацию БСА в водном растворе можно наблюдать, начиная с 50° C.

§1.2. Пространственная конфигурация полимерных молекул белка. Статистический характер организации биополимеров

Как хорошо известно, в основе структурной организации живого на планете Земля лежат макромолекулы. Это биополимеры – белки и нуклеиновые кислоты. Биополимеры - это природные естественные вещества.

В литературе обычно выделяют следующие общие свойства биополимеров:

1) большая масса из-за образования огромных макроцепей с разветвлениями в химической структуре;

2) сходные типы связей в макромолекулах (водородные, ионные взаимодействия, электростатическое притяжение, дисульфидные мостики, пептидные связи и прочие);

3) в основе структурной единицы каждой цепи лежит мономерное звено;

4) в строении возможна стереорегулярность.

Все виды взаимодействий между атомами в биомолекулах традиционно разделяют на 2 основных типа:

1. взаимодействия ближнего порядка между атомами соседних звеньев;

2. дальние взаимодействия между атомами.

При этом каждое «макросостояние» полимера характеризуют определенными значениями молекулярных параметров. «Макросостояние» может быть осуществлено большим количеством «микросостояний» (иногда говорят «конформаций»).

Хорошо известно, что тепловое движение и вращение вокруг единичных связей в полимерной цепи могут приводить к сворачиваемости цепи и образованию так называемого «клубка». Такой «клубок» обладает целым набором большого числа «конформаций».

Очевидно, что взаимозависимость теплового движения звеньев наиболее сильна у соседних звеньев и ослабевает по мере увеличения расстояния между ними.

В качестве простейшей модели биополимера рассмотрим свободно-сочлененную цепь, следуя работе [4].

В этой модели цепь построена из ряда прямолинейных кусков («сегментов»). «Сегмент» состоит из определенного числа отдельных звеньев. Внутри каждого «сегмента» существует корреляция в ориентации звеньев. Но между «сегментами» эта корреляция считается полностью

отсутствующей. Такая модельная цепь из отдельных «сегментов», взаимно независимых в пространственной ориентации, называется «свободно-сочлененной».

Далее в модели цепь разбивается на статистические «сегменты» так, чтобы число звеньев m , входящих в состав «сегмента», было достаточно большим для обеспечения независимой ориентации «сегментов». Это нужно для использования статистических методов расчета различных параметров модели.

То есть число «сегментов» N , равное $N = \frac{n}{m}$, где n — полное число звеньев в цепи, не должно быть мало ($N > 10$)

Радиус-вектор \vec{h} между концами цепи может быть представлен в виде суммы разных векторов $l_i, i = 1, \dots, N$ (для абсолютно вытянутой нити $l = |l|$), описывающих отдельный «сегмент»:

$$h = \sum_{i=1}^N l_i$$

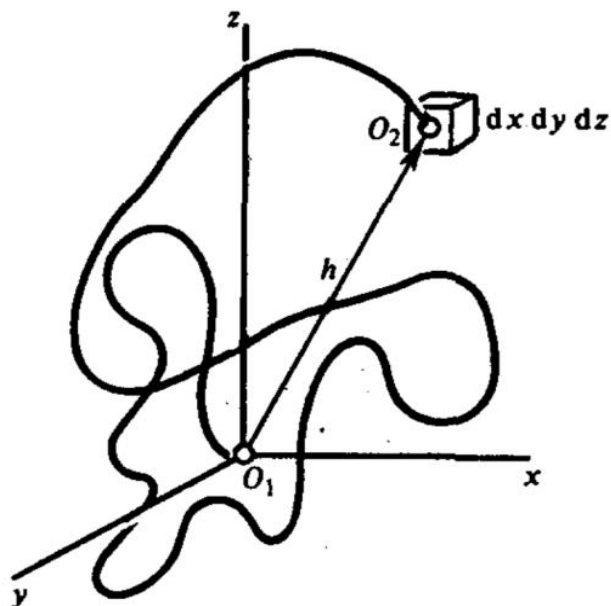
Реальная длинная цепная молекула принимает очень большое количество конфигураций. Понятно, что в молекуле эти конфигурации имеют различную вероятностью появления.

В рассматриваемой модели вероятность того, что определенный «сегмент» находится в конкретном положении относительно другого «сегмента», задается функцией распределения W_a вектора расстояний между сегментами. Вспомним, что функция W_a является функцией распределения величины a или, другими словами, плотностью вероятности нахождения данного значения a . То есть произведение $W_a da$ равно вероятности нахождения значения переменной a в интервале от a до $a + da$:

$$W_a da = P\{a, a + da\}$$

Из термодинамики и статистической физики известно, что для длинной «свободно-сочлененной» цепи в термодинамическом равновесии с окружающей средой функция распределения является гауссовой.

Тогда в системе координат, начало которой совмещено с начало цепи, функции распределения координат x, y, z конца цепи равна:



$$W_x = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{\frac{1}{2}} e^{-3x^2/2Nl^2}$$

$$W_y = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{\frac{1}{2}} e^{-3y^2/2Nl^2}$$

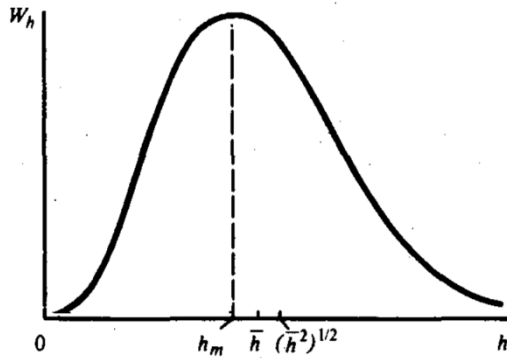
$$W_z = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{\frac{1}{2}} e^{-3z^2/2Nl^2}$$

$$d\tau = dxdydz$$

$$|\vec{h}| = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$$

В силу того, что x, y, z являются независимыми случайными величинами, вероятность попадания конца цепи в элемент объема $d\tau = dxdydz$ окрестности точки (x, y, z) равна произведению трех независимых событий. Следовательно, возникает такая формула:

$$W_{\tau} d\tau = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{\frac{3}{2}} e^{-3h^2/2Nl^2} d\tau$$



Продолжаем стандартные математические выкладки. Для ансамбля из n молекул произведение $W_{\tau} d\tau$ есть относительная доля молекул dn/n , конец которых попадает в элемент объема $d\tau$ при закреплении всех цепей в точке $(0,0,0)$. Вероятность того, что \vec{h} имеет длину h , не зависит от направления \vec{h} и пропорциональна произведению W_{τ} на элемент объема шарового слоя $4\pi h^2 dh$, в котором находятся концы всех векторов длиной от h до $h + dh$:

$$W_h dh = W_{\tau} \cdot 4\pi h^2 dh = 4\pi h^2 \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{\frac{3}{2}} e^{-3h^2/2Nl^2} dh$$

Произведение $W_h dh$ равно относительному числу молекул dn/n , для которых длина вектора \vec{h} заключена в интервале от h до $h + dh$.

Следуя данной модели в литературе, обычно рассматривают такие статистические характеристики свободного состояния цепи:

Среднее значение длины цепи h :

$$\vec{h} = \frac{1}{n} \int_0^n h dn = \int_0^{\infty} h W_n dh = \sqrt{\frac{8}{3\pi}} Nl^2.$$

Наиболее вероятное значение длины свободно-сочлененной цепи:

$$h_m \Rightarrow \max\{W_k\} \Rightarrow h_m = \sqrt{\frac{2}{3}} Nl^2.$$

Среднеквадратичное значение:

$$\overrightarrow{h}^2 = \frac{1}{n} \int_0^n h^2 dn = \int_0^\infty h^2 W_n dh = Nl^2.$$

В модели полимерной цепи с фиксированными и одинаковыми валентными углами, соединяющими сегменты, вокруг всех одинарных связей допускается свободное вращение. Отсюда для среднеквадратичного значения доказывается формула:

$$\overrightarrow{h}^2 = Nl^2 \frac{1+\cos\theta}{1-\cos\theta}.$$

Сворачивание полимерной цепи в «клубок» обусловлено термодинамической гибкостью цепи. Чем больше гибкость, тем меньше \overrightarrow{h} при заданных N и l . Наиболее вероятной конформацией полимерных молекул в растворенном состоянии является свернутый «клубок». При этом энтропия системы максимальна. При растяжении полимера имеет место разворачивание «клубка» и уменьшение числа возможных конформаций. При этом происходит уменьшение энтропии.

Известно, что энтропия молекулы есть:

$$S = k_B \ln W_\tau(h) = l - \frac{3k_B h^2}{2Nl^2}$$

Тогда сила, требуемая для разбиения полимерной цепи, равна:

$$f = -T \left(\frac{\partial S}{\partial h} \right)_T = \frac{3k_B T}{Nl^2} h$$

Возникновение упругой силы в клубке имеет энтропийный (статистический) характер. Такая сила пропорциональна абсолютной температуре.

Если молекула попадает в раствор, то набухание молекулы в растворе в результате попадания растворителя вглубь «клубка», также переводит ее в менее вероятную «конформацию». При этом возникает упругая сила, которая мешает набуханию, и набухание останавливается. Так моделируется эластичность полимеров в растворах.

Конечно, рассмотренная простая модель не учитывает реальные силы взаимодействия между элементами цепи. Однако она дает возможность рассчитывать ряд усредненных параметров и понять природу фундаментального свойства полимеров – гибкости.

§1.3. Объемные взаимодействия в полимерных молекулах белков

Как известно все взаимодействия между атомами при образовании макромолекулярных структур делятся на два типа: взаимодействия ближнего порядка между атомами соседних звеньев и дальние взаимодействия (то есть объемные эффекты между отстоящими друг от друга атомами). Объемные взаимодействия и являются темой рассмотрения в данном параграфе.

Рассмотрим, следуя [4], последовательность одинаковых звеньев вдоль цепи. Зададим геометрические параметры полимера среднеквадратичным расстоянием \vec{h} между его концами, а внутреннюю пространственную структуру полимера — пространственным распределением плотности звеньев $n(x)$.

Понятно, что плотность числа звеньев меняется от точки к точке. В полимерной нити изменение плотности в одной точке пространства связано с изменением плотности в другой точке из-за взаимосвязи звеньев. Так возникает пространственная корреляция плотности. Если в макромолекуле полностью отсутствуют объемные взаимодействия, то она не имеет достоверной пространственной структуры. Такое состояние называется «клубок».

Обычно радиус корреляции (ξ) сравним с размерами макромолекулы

$$\left[R = \sqrt{\vec{h}} \right] : \xi \sim R, \text{ где } R \sim lN^{\frac{1}{2}}.$$

Но объемные взаимодействия приводят к состоянию «глобулы», в котором флуктуации плотности малы по сравнению с самой плотностью. При

этом радиус корреляции флуктуаций плотности много меньше размеров макромолекулы:

$$\xi \ll R, \text{ где } R \sim N^{\frac{1}{3}}.$$

«Глобула» в отличие от «клубка» обладает компактной структурой. В модели считается, что в центре «глобулы» концентрация звеньев n_0 постоянна.

Вследствие объемных (дальних) взаимодействий сблизившиеся участки либо притягиваются, либо отталкиваются друг от друга. Понятно, что повышение температуры приводит к увеличению отталкивания между мономерами, а понижение — к их притяжению. Температура, при которой отталкивание мономеров уравнивается притяжением, называется θ -точкой или θ -температурой. При этой температуре объемных взаимодействий нет и молекула представляет собой «клубок» размером $R \sim lN^{\frac{1}{2}}$.

В области $T > \theta$ из-за увеличения сил отталкивания размеры клубка возрастают:

$$R > lN^{\frac{1}{2}}.$$

Следовательно, без учета объемных взаимодействий

$$\bar{R}^2 = \alpha(\bar{R}^2)_0, \text{ где } (\bar{R}^2)_0;$$

α — коэффициент набухания макромолекулы (при $T > \theta$: $\alpha > 1$, а при $T = \theta$: $\alpha = 1$).

В хороших растворителях притяжение атомов цепи и растворителя больше, чем между атомами цепи. Это приводит к увеличению их взаимного отталкивания в таком растворителе (область $T > \theta$, $\alpha > 1$).

В плохих растворителях взаимное притяжение звеньев полимера больше, чем их притяжение к молекулам растворителя (область $T < \theta$, $\alpha < 1$). Это может привести к конденсации «клубка» в «глобулу».

Иногда полимерную цепь без объемных взаимодействий рассматривают во внешнем сжимающем поле $\varphi(x)$. Это поле призвано моделировать взаимодействие полимера с окружающей средой. Например оно может моделировать пространственную неоднородность растворителя, наличие в нем поверхностей раздела фаз и инородных частиц. Для реальных растворов полимеров $\varphi(x)$ может рассматриваться как самосогласованное поле, образованное всеми элементами системы, как это принято в различных приложениях статистической физики.

Так рассматриваемая «глобула» может иметь дискретный спектр значений свободной энергии. Понятно, что температура выше критической приводит к исчезновению дискретного спектра и «глобулярного» состояния. Таким образом «глобула» может быть образована внешним полем лишь при достаточно низких температурах. В такой «глобуле» концы цепи статистически независимы, т. е. радиус корреляции много меньше размеров макромолекулы.

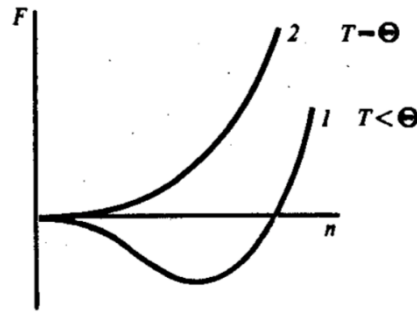
В реальных макромолекулах объемные взаимодействия в отсутствие внешнего поля могут создавать собственное самосогласованное поле, которое может приводить к образованию «глобулы».

Изменение температуры приводит к изменению размеров макромолекулы, что выражается в изменении энергии взаимодействия мономерных звеньев F , которое конечно зависит от числа звеньев n . При малом n свободная энергия взаимодействия допускает разложение в ряд по степеням n :

$$F = V k_B T (B n^2 + C n^3 + \dots),$$

где V — объем системы; B и C — вириальные коэффициенты разложения.

Если энергия притяжения при столкновениях велика по сравнению с $k_B T$, то силы притяжения играют наиболее важную роль. Они дают отрицательный вклад в общую энергию системы ($B < 0$), и макромолекула уменьшается в размерах относительно размеров идеального «клубка».



Если энергия притяжения меньше $k_B T$, то силы отталкивания дают в свободную энергию положительный вклад, и происходит набухание «клубка» ($B > 0$).

В отсутствие объемных взаимодействий при θ -температуре $B(\theta) = 0$. При этом в случае плохого растворителя $B < 0$, а в случае хорошего растворителя $B > 0$. Типичный вид зависимости свободной энергии глобулы от n представлен на рисунке выше (кривая 1): $B < 0$ и $C > 0$. Точке перехода «глобула – клубок» соответствует условие $F = 0$.

Переходы между состояниями «клубка» и «глобулы» можно рассматривать как переходы между разными фазами. Как известно из термодинамики фазовые переходы первого рода при изменении внешнего параметра (например, температуру) сопровождаются тепловым эффектом (например, плавление льда и образование жидкой водной фазы). Фазовые переходы второго рода происходят без тепловых эффектов.

При фазовых переходах первого рода энтропия и внутренняя энергия меняются скачком. В точке перехода второго рода теплоемкость меняется скачком, энтропия и внутренняя энергия — непрерывно.

Примером фазовых превращений второго рода могут быть процессы перехода гелия в сверхтекучее состояние. При этом структура системы меняется непрерывно, а симметрия — скачком, т. е. новые свойства проявляются скачком.

Конечно, строго говоря, фазовые переходы определены для случая, когда число частиц в системе $N \rightarrow \infty$. В реальных полимерах, где N — большое, но конечное число, существует конечная ширина температурного

перехода (ΔT). Тогда конформационный переход является фазовым, если его ширина стремится к нулю: $\Delta T \rightarrow 0$ при $N \rightarrow \infty$.

Таким образом, фазовые переходы «клубок – глобула» в зависимости от жесткости/гибкости цепи могут быть переходами как первого, так и второго рода.

§1.4. Нейтральные детергенты. Взаимодействие белков с нейтральными детергентами. Биохимический аспект

Детергенты - поверхностно-активные вещества с моющим действием, которое обусловлено их способностью образовывать в воде устойчивые коллоидные растворы. Поверхностная активность детергентов – способность адсорбироваться на границе раздела фаз (типа вода—воздух или вода—масло), связана с амфифильностью их молекул.

Амфифильными называют вещества, в молекулах которых имеются четко разграниченные гидрофильные и гидрофобные области, благодаря чему такие молекулы обладают сродством не только по отношению к воде, но и к неполярным органическим растворителям [5].

В воде молекулы детергентов стремятся ассоциировать друг с другом, давая мицеллы. Эти агрегаты состоят из большого числа детергентных молекул (обычно от нескольких десятков до нескольких сот), ориентированных в мицелле таким образом, что их неполярные группы формируют внутреннее гидрофобное ядро мицеллы, а гидрофильные полярные группировки находятся на ее поверхности и контактируют с окружающими молекулами воды.

Минимальная концентрация детергентов, при которой мицеллы обнаруживаются при данной температуре, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). При концентрации ниже ККМ, наблюдаются только мономеры; при концентрациях выше ККМ преобладает мицеллярная фаза.

Различают несколько типов детергентов: ионные и неионные (нейтральные).

Эффективными денатурирующими агентами являются ионные детергенты, среди которых в биохимической практике особенно часто используют анионный детергент додецилсульфат натрия (ДСН) и катионный детергент цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ, цетавлон).

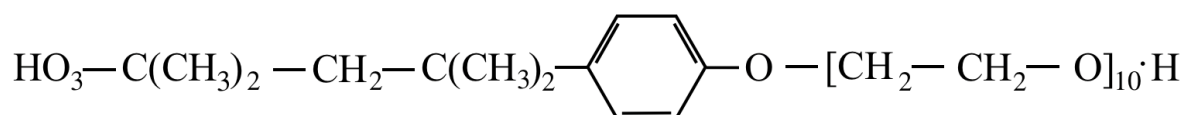
У неионных (нейтральных) детергентов головная группа гидрофильна и не заряжена, в отличие от ионных. Они считаются мягкими поверхностно-активными веществами, потому что они разрушают белково-липидные и межлипидные, но не межбелковые взаимодействия, и большинство из них не вызывает денатурации белков. Таким образом, белки с помощью нейтральных детергентов могут быть растворены и изолированы в своей естественной и активной форме с сохранением белковых взаимодействий. Нейтральные детергенты солюбилизируют белки, не повреждая их.

Неионные (нейтральные) поверхностно-активные вещества растворяются в воде, не ионизируясь. Растворимость таких детергентов в воде обуславливается наличием в них функциональных групп. Как правило, они образуют клатраты в водном растворе вследствие возникновения водородных связей между молекулами воды и атомами кислорода полиэтиленгликолевой части молекулы поверхностно-активного вещества. К ним относятся полигликолевые эфиры жирных спиртов и кислот, полигликолевые эфиры амидов жирных кислот, ацилированные или алкилированные полигликолевые эфиры алкиламидов.

Нейтральные детергенты используют для выделения интегральных мембранных белков и получения их в активной биохимической форме, а также для перевода глобулярных водорастворимых белков из водной среды в липидную среду. Для этой цели необходимы детергенты, позволяющие солюбилизовать белки и сохранить их в растворе.

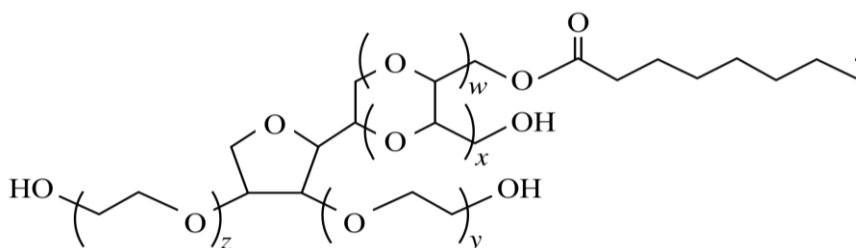
Рассмотрим несколько примеров нейтральных детергентов, которые будут использованы в данной работе: Тритон X-100 и Твин-20.

Тритон X-100 является наиболее характерным примером неионного поверхностно-активного вещества. Тритон X-100 (ККМ при 25°C равна 0,25 мМ) используется для солюбилизации белков, липополисахаридов и других гидрофобных молекул, а также при электрофорезе белков. Агрегационное число – 140. Данный детергент является эффективным детергентом для солюбилизации белков, при этом он не вызывает их денатурации.



Структурная формула Тритон X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)₁₀)

Твин-20 относится к нейтральным поверхностно-активным веществам. Твин-20 (ККМ при 25°C равна 0,06 мМ) является мягким поверхностно-активным веществом, не влияющим на активность белка и эффективным для выделения белка в активной форме.

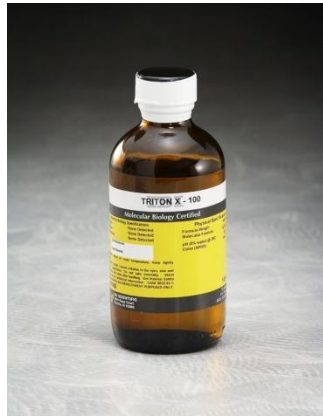


Структурная формула Твин-20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆)

Взаимодействие белков с детергентами может изучаться различными методами: дифференциальной сканирующей калориметрией, с помощью кругового дихроизма, флуоресценции и УФ-спектроскопии поглощения.

В [6] для изучения мембранных белков, которые делятся на интегральные и периферические, интегральные были извлечены из мембраны с помощью неполярных детергентов.

Существуют детальные описания взаимодействий белков с детергентами, и в [7-11] приводится обзор методов, которые могут быть применены для анализа структуры мембранных белков, солюбилизированных детергентами.



Работа [10] представляет собой описание достижений в сверхэкспрессии мультисубъединичных комплексов мембрана-белок, в стратегии стабилизации этих комплексов и выделения: исследованы структуры мембрана-белок с помощью электронного криомикроскопа.

По характеру действия на клетки и ее органеллы, а в особенности на мембранные белки, детергенты классифицируют как «мягкие», которых солюбилизируют мембранные белки, не нарушая его нативной пространственной структуры, так как нарушают белок-липидные и липид-липидные ассоциаты, но не затрагивают белок-белковых взаимодействий, и «жесткие», которые нарушают и белок-белковые взаимодействия, и всю нативную пространственную структуру [7, 12, 13].

Ионные детергенты, по большей части, относятся к «жестким» детергентам и поэтому преимущественно применяются для разрушения клеточных структур и денатурации белков, которые можно затем разделять, например, гель-электрофорезом. Одним из наиболее широко используемых в структурной биологии детергентов является додецилсульфат натрия (ДСН). Как правило, ДСН используют при первичном растворении бактериальных телец включения или белковых осадков с последующим переводом в ренатурирующий «мягкий» детергент [14-21].

Например, в [20] сообщается структура FXVD2b, одного из двух вариантов сплайсинга белка, определенная с помощью NMR-спектроскопии в мицеллах детергента.

В [22] методом триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре изучена медленная (миллисекундная) внутримолекулярная динамика белков изолированных мембран эритроцитов человека при действии ионных и неионных детергентов - додецилсульфата натрия (0,1 – 6,0 мМ), дезоксихолата натрия (0,16 – 6,00 мМ), саркозила (0,17 – 6,00 мМ), дигитонина (0,025 – 6,000 мМ), твина 20 (0,01 – 6,00 мМ). Установлено, что разрушение детергентами белковых ассоциатов в мембране, нарушение белок-липидных взаимодействий, денатурационное разворачивание белков приводит к значительному усилению их медленной внутримолекулярной динамики. В зависимости от химических особенностей детергентов они могут оказывать различное действие на структурно-динамическое состояние мембранных белков. На основании результатов проведенных исследований сделан вывод о том, что ограниченная по сравнению с большинством водорастворимых белков медленная внутримолекулярная динамика мембранных белков *in situ* обусловлена наличием в мембране белковых ассоциатов, изоляцией макромолекул белков от водного окружения в составе липидного бислоя, повышенным содержанием в составе макромолекул белков жестких α -спиралей и β -структур.

В [23] в опытах на белках в зависимости от природы денатурирующего воздействия и его интенсивности, а также от структуры белка можно наблюдать различные денатурационные состояния белка, отличающиеся друг от друга рядом свойств. Для некоторых белков известны изомерные состояния, которые возникают при обработке мягкими денатурирующими агентами. Эти изоморфные формы можно считать начальными стадиями денатурации, они сравнительно легко обратимы при снятии действия денатуранта. Агрегация является процессом, закрепляющим денатурированное состояние молекул и препятствующим более полному прохождению ренатурации. В агрегации денатурированных молекул принимают участие те же связи, которые стабилизируют нативную структуру глобулярных белков: гидрофобные, водородные, солевые и в некоторых

случаях дисульфидные. Денатурирующие факторы условно можно разделить на 3 группы: физические (температура, давление, силы поверхностного натяжения, ультразвук, лучистая энергия, механические воздействия), химические (ионы водорода и гидроксила, органические растворители, амиды и их производные, детергенты) и биологические (ферменты) [24].

В [25] разработана модель, описывающая форму и размер мицелл в зависимости от соотношения белок/детергент. Измерены параметры модели мицелл, сформированных различными липидами и детергентами.

§1.5. Флуоресцентная спектроскопия. Основные понятия

Физическое явление «люминесценции» представляет собой свечение атома, которое возникает в результате электронного перехода при возвращении атома из возбужденного состояния в основное [26].

Явление «фотолюминесценция» – это свечение, возбуждаемое электромагнитным излучением на некоторой оптической частоте. В зависимости от природы возбужденного электронного состояния «фотолюминесценция» в литературе подразделяется на два типа – «флуоресценцию» и «фосфоресценцию». «Флуоресценция» возникает при переходах между уровнями одинаковой мультиплетности (то есть при переходах с первого S_1 , или реже – второго возбужденного синглетного уровня S_2 на основной синглетный уровень S_0). «Фосфоресценция» возникает при переходах между уровнями различной мультиплетности (при переходах с первого триплетного T_1 на основной синглетный уровень S_0).

Типичные времена для «запаздывания» «флуоресценции» – порядка наносекунд (10^{-9} с). Вследствие этого наблюдатель воспринимает «флуоресценцию» как практически мгновенный отклик на возбуждение светом.

В курсе оптики под спектром «флуоресценции» понимают зависимость интенсивности «флуоресценции» от длины волны λ (или волнового числа ν).

Прибор для измерения спектров «флуоресценции» называют спектрофлуориметром или просто флуориметром.

Стандартный коммерческий флуориметр может измерять три типа спектров – спектры испускания «флуоресценции», спектры возбуждения «флуоресценции» и «синхронные» спектры.

В литературе спектры обычно подразделяются таким образом:

1. Спектр «люминесценции» представляет собой функцию распределения излучаемой веществом энергии по длинам волн (или по частотам). При этом каждой полосе поглощения первого электронного возбужденного состояния соответствует своя полоса «флуоресценции».

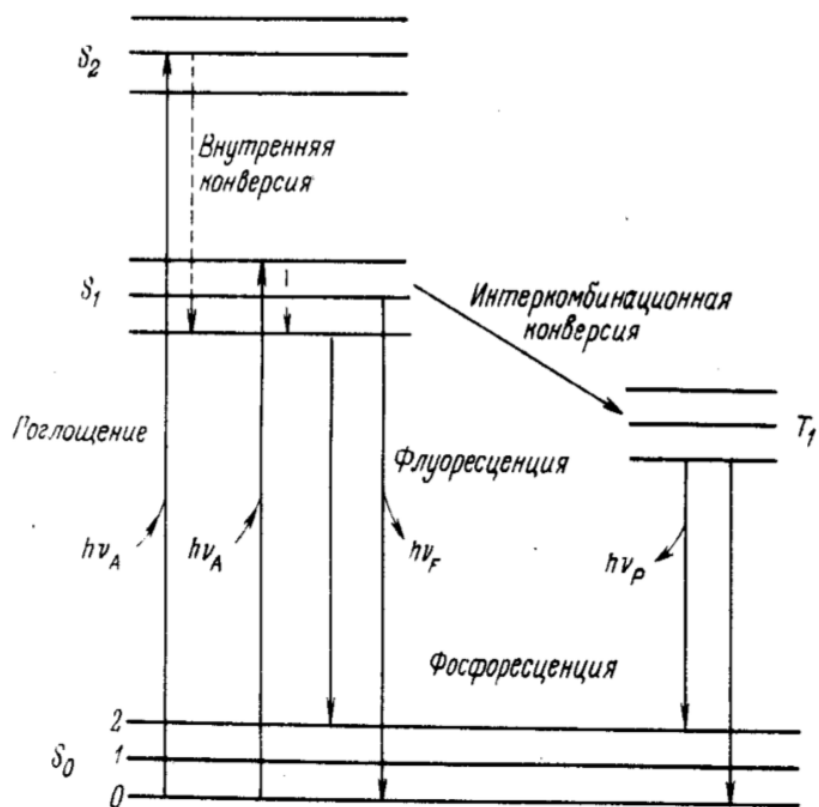


Диаграмма Яблонского для энергетических уровней молекулы. Стрелками обозначены основные процессы преобразования энергии фотовозбуждения в молекуле.

2. Спектр возбуждения показывает эффективность различных длин волн возбуждающего света вызывать «флуоресценцию». Другими словами, он описывает распределение излучаемой веществом энергии в зависимости от длины волны возбуждения.

Как следует из теоретической литературы [27], форма спектра возбуждения должна быть идентична форме спектра поглощения молекул и не зависеть от длины волны, при которой измеряют «флуоресценцию». Однако на практике это выполняется очень редко, так как спектры поглощения и возбуждения могут отличаться из-за различия химических и физических свойств молекулы в возбужденном состоянии по сравнению с основным.

Для характеристики «люминесцентных» свойств молекул вводится константа, называемая стоксовым сдвигом. Эта константа равна разнице длин волн максимумов спектров возбуждения/поглощения и «флуоресценции»

$$\Delta\nu_{\text{ст}} = \frac{10^7}{\lambda_{\text{возб}}} - \frac{10^7}{\lambda_{\text{фл}}}$$

В курсе оптики выделяют следующие основные спектральные закономерности «люминесценции»:

1. Независимость спектров «люминесценции» от длины волны возбуждающего света, что связано с быстрой колебательной релаксацией, к равновесному распределению молекул по подуровням электронного состояния.
2. Закон Стокса — Ломмеля, следуя которому спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону больших длин волн.
3. Правило зеркальной симметрии спектров поглощения и «люминесценции» Левшина: нормированные спектры поглощения и «люминесценции», изображенные как графики функций $\alpha(\nu)$ и $I(\nu)/\nu$, зеркально-симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения обоих спектров (здесь α и I — показатель поглощения и интенсивность «люминесценции» на частоте ν).

Известно, что у различных излучающих систем длительность «люминесценции» отличаются.

Затухание флуоресценции происходит по экспоненциальному закону:

$$I = I_0 e^{-t/\tau},$$

где I – интенсивность флуоресценции спустя время t после прекращения облучения; I_0 – постоянная интенсивность флуоресценции во время облучения; τ – среднее время затухания, за которое интенсивность флуоресценции уменьшается от исходной величины в e раз. Это время есть длительность возбужденного состояния.

«Фотолюминесценция» возникает вследствие поглощения энергии возбуждающего света [27]. Однако лишь часть такой энергии превращается в энергию люминесценции. Поэтому вводят понятие выхода «люминесценции», которое отражает эффективность превращения веществом возбуждающего излучения в свет «люминесценции». В курсе оптики разделяют «энергетический» и «квантовый» выходы «люминесценции».

«Энергетический» выход Γ равен отношению испускаемой при «люминесценции» энергии $E_{\text{исп}}$ к поглощённой энергии $E_{\text{погл}}$:

$$\Gamma = E_{\text{исп}}/E_{\text{погл}}$$

«Квантовый» выход γ равен отношению числа квантов «люминесценции», испускаемых единицей объема вещества в единицу времени $N_{\text{исп}}$, к числу поглощенных фотонов возбуждающего излучения $N_{\text{погл}}$:

$$\gamma = N_{\text{исп}}/N_{\text{погл}}$$

«Энергетический» и «квантовый» выходы «люминесценции» связаны между собой соотношением:

$$\Gamma = \gamma (\nu_{\text{люм}}/\nu_{\text{возб}}),$$

где $\nu_{\text{люм}}$ – средняя частота полосы «люминесценции», $\nu_{\text{возб}}$ – частота возбуждающего излучения. Так как $\nu_{\text{люм}} < \nu_{\text{возб}}$, то энергетический выход «люминесценции» всегда меньше квантового:

$$\Gamma < \gamma.$$

Понятно, что выход «люминесценции» чувствителен к внешним воздействиям, которые могут приводить к тушению (часто говорят к гашению) свечения. Среди них: влияние различных растворителей, посторонних веществ, температурное воздействие, и так далее и тому подобное.

§1.6. Флуоресцентный анализ в исследованиях взаимодействия белков и лигандов

Флуоресцентный анализ применяется для исследований в биологических и медицинских целях (изучаются физико-химические свойства объектов). Белки обладают способностью флуоресцировать (имеют собственную флуоресценцию) из-за наличия в них ароматических аминокислот: фенилаланина, триптофана и тирозина. Для них максимумы флуоресценции находятся в диапазоне 330-345 нм.

В триптофансодержащих белках флуоресценция в основном определяется остатками триптофана [28]. Изучение флуоресценции триптофановых остатков с их лабильными флуоресцентными свойствами может давать особенно важную информацию о строении белковой макромолекулы. Молекулы триптофана, находящиеся в различных по степени гидрофобности участках белковой макромолекулы, а также в соседстве с заряженными группами и различными тушителями люминесценции, гетерогенны по своим флуоресцирующим свойствам.

Триптофан, находящийся в низкополярном гидрофобном окружении, т.е. в условиях, реализуемых внутри глобулы белка, характеризуется коротковолновым спектром флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}^{\text{max}} \approx 331$ нм), а также низким квантовым выходом (0,07 – 0,10).

Молекулы триптофана, находящиеся на поверхности белковой глобулы и соответственно в гидрофильном окружении, напротив, обладают длинноволновым спектром с большим квантовым выходом флуоресценции

($\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}} \approx 350$ нм и квантовым выходом $\varphi \approx 0,2 - 0,25$). Денатурация белка различными способами приводит к смещению спектра флуоресценции белка в длинноволновую сторону до 350-353 нм.

В [29] эксперименты проводились *in vitro*, исследования взаимодействия лигандов с альбумином выполнялось с помощью флуоресцентного анализа, основанного на эффекте концентрационного тушения флуоресценции белка при связывании с лигандами. Установлено, что тушение флуоресценции BSA ибупрофеном, фенилбутазоном и варфарином носило статический характер и было связано с образованием лиганд-протеинового комплекса.

В [30] методами флуоресцентного анализа были проведены систематические исследования особенностей реорганизации цитоскелета в клетках различного происхождения под действием иммобилизованных и свободных лигандов. Было изучено действие агентов, активирующих малые ГТФазы Rho, Rac, Cdc42 на реорганизацию цитоскелета. Проводилось исследование распределения в цитоплазме и соколизации со структурами актинового цитоскелета протеасом, альфа-РНП и транскрипционного фактора NF κ b. Проведен анализ состава фосфорилируемых белков, взаимодействующих с цитоскелетом при распластывании клеток на разных субстратах. В результате проведенных исследований установлено [30], что:

1) взаимодействие внешних свободных иммобилизованных лигандов, регулирующих поведение клеток в культуре, с поверхностными рецепторами клетки сопровождается специфической для каждого лиганда реорганизацией актинового цитоскелета;

2) характер реорганизации определяется, главным образом, типом иммобилизованного лиганда, а не происхождением культивируемых клеток;

3) при действии свободных лигандов на клетку, с уже сформированным цитоскелетом происходит его перестройка. При этом переход из одного структурного состояния цитоскелета в другой проходит через стадию полной разборки предшествующих структур.

В [31] описана процедура иммобилизации белка на чипах датчика SPR. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) стал признанным методом изучения взаимодействий между биологически активными молекулами. Измерения SPR проводили на приборе Biacore 3000. Измерения флуоресценции проводились на спектрофлуориметре SLM-AMINCO 8100 с двойной решеткой.

В [32] использовали аналитическое ультрацентрифугирование и стационарную флуоресцентную спектроскопию, чтобы охарактеризовать взаимодействие потенциального нового противоракового препарата, AG1478-мезилата, с белками плазмы в суспензии нормального сывороточного альбумина (NSA). Для всех проанализированных образцов зависимость поглощения от радиальных кривых, построенных как функция времени, показала, что значительная часть лиганда осаждалась вместе с более крупной макромолекулой в растворе образца. Полученные данные показали, что значительная часть лиганда связывает человеческий альбумин в суспензии NSA. предположено, что AG1478-мезилат-каптитол (1:1) комплекс связывается с альбумином, по крайней мере, в 10 раз более эффективно, чем один только AG1478-мезилатный лиганд. В [32] продемонстрирован подход к связыванию с белками плазмы, основанный на флуоресценции лекарств, который является быстрым, чувствительным и неразрушающим.

В [33] описывается использование спектрофлуориметрии для определения как разворачивания, так и изменения объема белка, вызванного связыванием лиганда. Степень разворачивания белка контролировали по собственной флуоресценции триптофана. В [33] описываются различные подходы к анализу экспериментальных спектров флуоресценции и обсуждается влияние на качество термодинамических параметров.

Использование красителей в [34] для контроля термической денатурации белков с помощью чувствительной флуоресцентной спектроскопии позволяет быстро определять стабильность белков с

использованием инструментов ПЦР в реальном времени. Путем скрининга широкого диапазона условий раствора анализ теплового сдвига легко определяет условия, которые значительно повышают стабильность рекомбинантных белков. Тот же подход можно использовать в качестве начального недорогого скрининга для обнаружения новых взаимодействий белок-лиганд за счет увеличения стабильности белка, которое обычно происходит при связывании лиганда.

В [35] описывается общий подход для количественного анализа взаимодействия между флуоресцентными пептидными лигандами (L), рецепторами (R) и G-белками (G) с использованием флуоресцентной проточной цитометрии. Схема зависит от использования коммерчески доступных флуоресцентных микрогранул в качестве стандартов для калибровки концентрации флуоресцентных пептидов в растворе и количества рецепторов на клетках в суспензии.

Spon2 — это матричный белок протоонкогена, который играет важную роль в онкогенезе и метастазировании рака желудка. В [36] предложили зарегистрировать флуоресцентным методом автоингибирование Spon2 путем нацеливания на SH-домен с помощью конкурентных пептидных лигандов. Было определено, что пептидные лиганды обладают умеренным или высоким сродством к домену SH; они также могут увеличивать обменную активность Spon2 в 1,2 – 6,1 раза, демонстрируя значительную корреляцию с их аффинностью связывания SH.

В настоящее время «отлов» лигандов на основе наносфер невозможно осуществить с помощью обработки изображений, хотя этот шаг важен для идентификации в реальном времени. В [37] представлена методика «ловли лигандов» в сочетании с визуализацией в реальном времени для идентификации лигандов для белка теплового шока 90α (Hsp 90α), в работе использована как флуоресцентная спектроскопия, так и масс-спектрометрия.

Исследования связывания лигандов с белками-носителями имеют решающее значение для определения фармакологических свойств лекарств-

кандидатов. В [38] был синтезирован и охарактеризован новый комплекс палладия (II). Исследования *in vitro* связывания этого комплекса с двумя белками-носителями, человеческим сывороточным альбумином (HSA) и β -лактоглобулином (β LG), были изучены с использованием флуоресцентных методов, а также компьютерного моделирования. Результаты экспериментов показали, что комплекс Pd (II) взаимодействует с двумя белками-носителями с умеренным сродством связывания ($K_b \approx 0,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ для HSA и $0,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ для β LG). Связывание комплекса Pd (II) с HSA и β LG вызывало сильное тушение флуоресценции обоих белков за счет статического механизма тушения. В двух изученных системах водородные связи и силы Ван-дер-Ваальса были основными стабилизирующими силами в образовании комплекса лекарство-белок. Измерения в УФ-видимой области и ИК-Фурье показали, что связывание вышеуказанного комплекса с HSA и β LG может вызывать конформационные изменения и изменения в микросреде двух белков. Анализ стыковки белок-лиганд подтвердил, что комплекс Pd (II) связывается с остатками, расположенными в субдомене IIА HSA и сайте А β LG. Все эти экспериментальные и вычислительные результаты предполагают, что β LG и HSA могут действовать как белок-носитель для комплекса Pd (II), доставляя его к молекулам-мишеням.

В [39] представлен метод идентификации фосфорилированных пептидов в сложных смесях, который основан на характеристиках фосфорилированных частиц в растворе с ионами Fe (III) и последующим анализе флуоресценции. Система основана на специфическом высвобождении флуоресцентного репортерного лиганда из Fe (III) - комплекса в присутствии фосфорилированных пептидов. Этот метод проиллюстрирован в [39] с использованием гидролизата фосфорилированного альфа-казеина.

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов БСА и нейтрального детергента (Твин-20 / Тритон X-100) при вариации значений pH

Растворы 5 мкМ бычьего сывороточного альбумина БСА (Sigma) приготовлены в двух буферных системах:

- 1) 0,1 М CH_3COOH – 0,1 М KOH (pH 3,0 – 5,0);
- 2) 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH (pH 6,0 – 7,0).

К растворам БСА (5 мкМ) добавлены различные концентрации нейтрального детергента:

- 1) или Твин-20 (0,1 – 0,7 мМ) при pH 3,0 – 7,0;
- 2) или Тритона X-100 (0,1 – 0,7 мМ) при pH 3,0 – 7,0.

§2.2. Добавление флуоресцентного зонда в растворы «белок-детергент»

В готовые белковые растворы (5 мкМ БСА) с различными концентрациями нейтрального детергента (или Твин-20, или Тритон X-100) при различных значениях pH (3,0 – 7,0) последним добавлялся флуоресцентный зонд – 5 мкМ эозин (ч.д.а., «Реахим», Россия).

§2.3. Методика экспериментов для исследования флуоресценции зонда в растворах БСА и нейтрального детергента (Твин-20 / Тритон X-100) при различных значениях pH

Флуоресцентные исследования образцов проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 при комнатной температуре.

Измерения флуоресценции образцов «БСА – детергент – зонд» проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них и детергента, и зонда эозина.

Флуоресценция эозина, находящегося в растворах с БСА и детергентом (Твин-20 или Тритон X-100), регистрировалась в диапазоне 530 – 750 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 520$ нм.

Спектры флуоресценции эозина в растворах «белок – детергент» обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

Глава 3. Динамическая подвижность молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах нейтральных детергентов в зависимости от кислотности среды по анализу флуоресцентного зонда

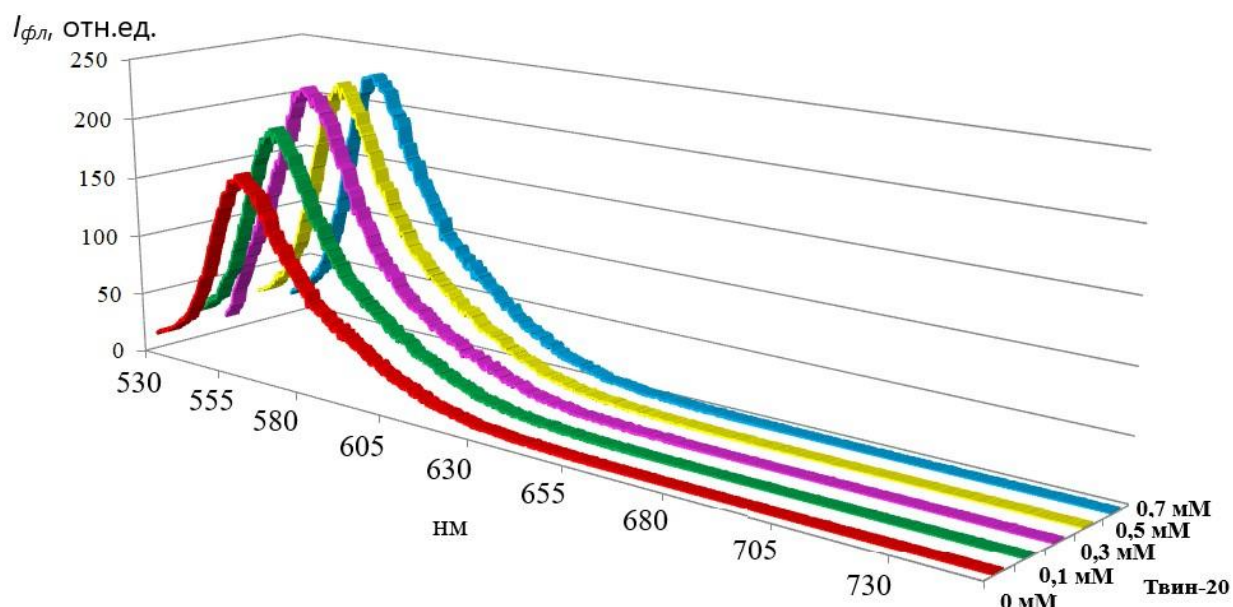
Для исследования процессов комплексообразования БСА и мицелл Твин-20 при различных значениях рН в растворы был добавлен флуоресцентный зонд эозин (5 мкМ). В исследованном диапазоне концентраций Твин-20 находится в мицеллярной фазе (ККМ 0,09 мМ). Мицеллы Твина-20 взаимодействуют с молекулами БСА и образуют с ними сложные ассоциаты.

Как известно, при связывании с белком флуоресценция эозина тушится. Причем максимально эффективное связывание эозина с БСА имеет место при $\text{pH} < 5,0$, когда молекулы белка в целом положительно заряжены (поскольку значения рН лежат ниже изоэлектрической точки белка), а эозин находится в форме моноаниона (при $\text{pH} < 5,0$ эозин находится в форме моноаниона, а при $\text{pH} > 5,0$ эозин находится в форме дианиона). По мере увеличения значений рН относительно 5,0 эозин все хуже связывается с БСА.

Получены спектры флуоресценции эозина в растворах БСА с добавлением различных концентраций Твин-20 при различных значениях рН, на рис. 3.1 в качестве примера представлены данные спектры для рН 3,0.

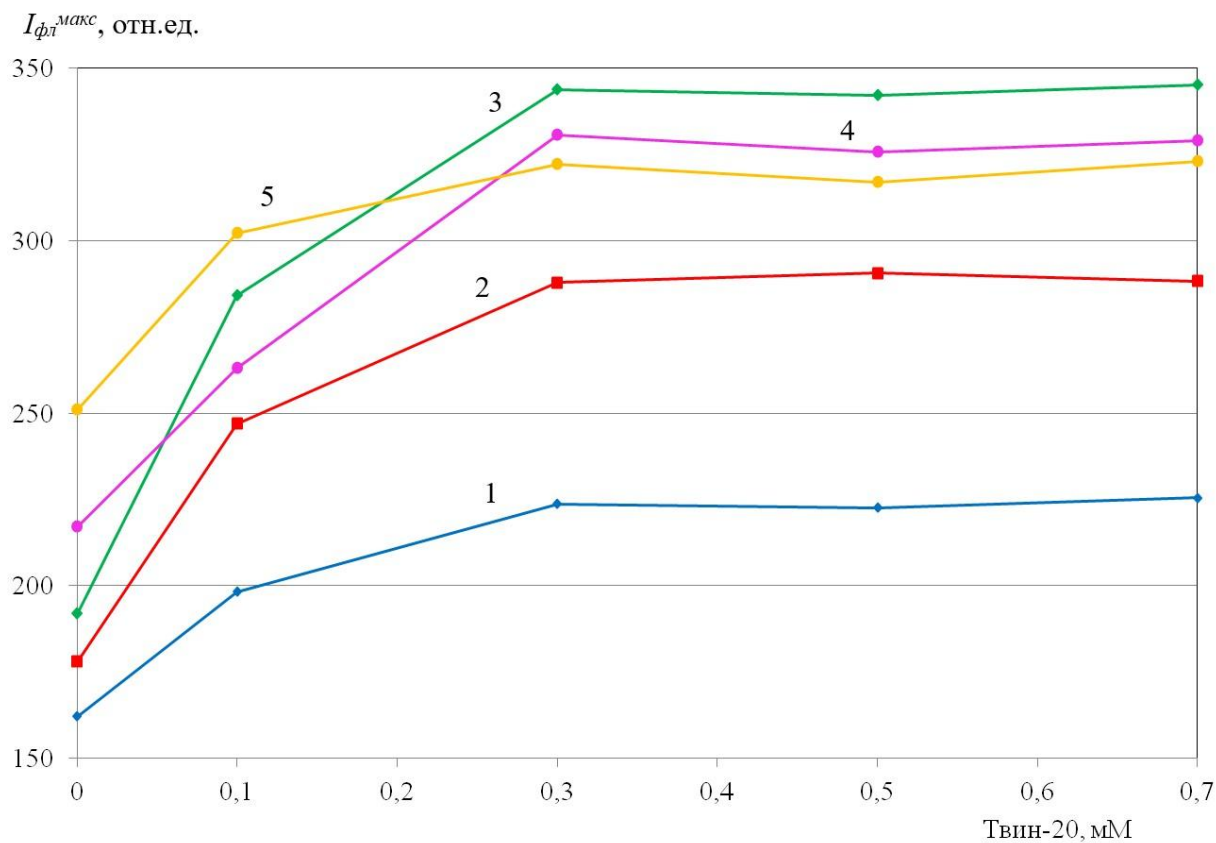
На рис. 3.2 представлена зарегистрированная зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина в растворах БСА от концентрации Твин-20 в растворах при различных значениях рН.

Видно (рис. 3.2), что при всех значениях рН интенсивность флуоресценции эозина в растворах белка с Твин-20 выше, чем в растворах белка без детергента. При наличии Твин-20 в белковых растворах интенсивность флуоресценции эозина возрастает, но только в области до 0,3 мМ Твин-20, а дальнейшее увеличение концентрации Твин-20 в растворе уже не влияет на флуоресценцию эозина – она остается постоянной в области 0,3 – 0,7 мМ Твин-20 при всех исследованных значениях рН.



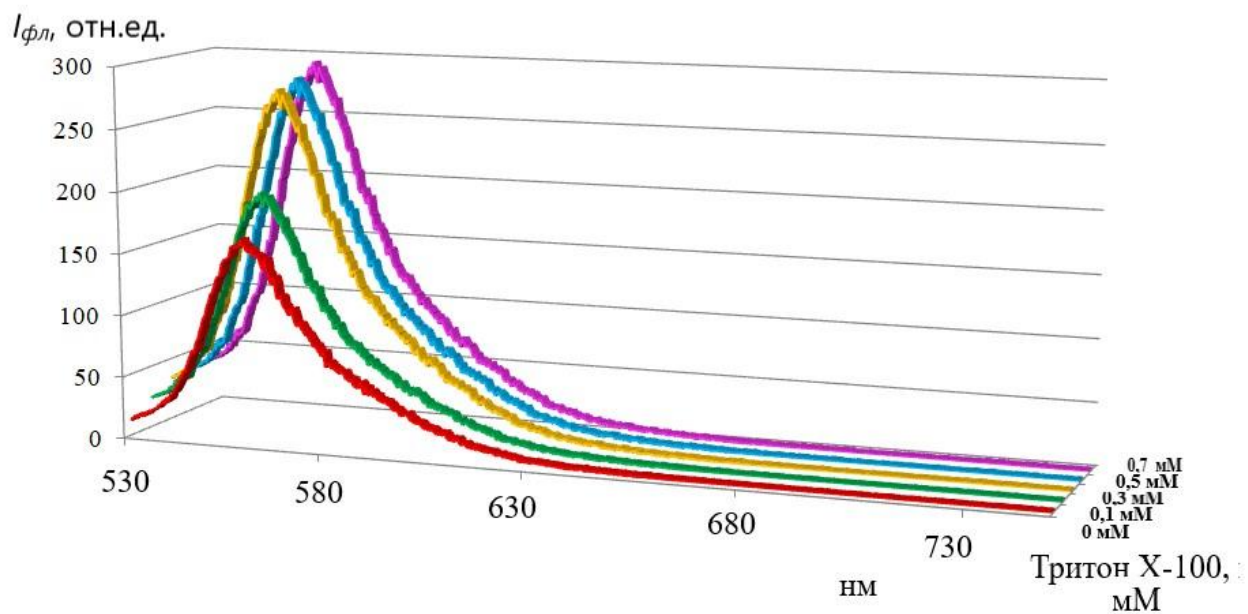
Спектры флуоресценции эозина (возбуждение 520 нм) в растворах БСА (5 мкМ) и Твин-20 при рН 3,0

Рис. 3.1. Спектры флуоресценции ($\lambda_{возб} = 520$ нм) эозина (5 мкМ) в растворах БСА (5 мкМ) и разных концентраций Твин-20 при рН 3,0.



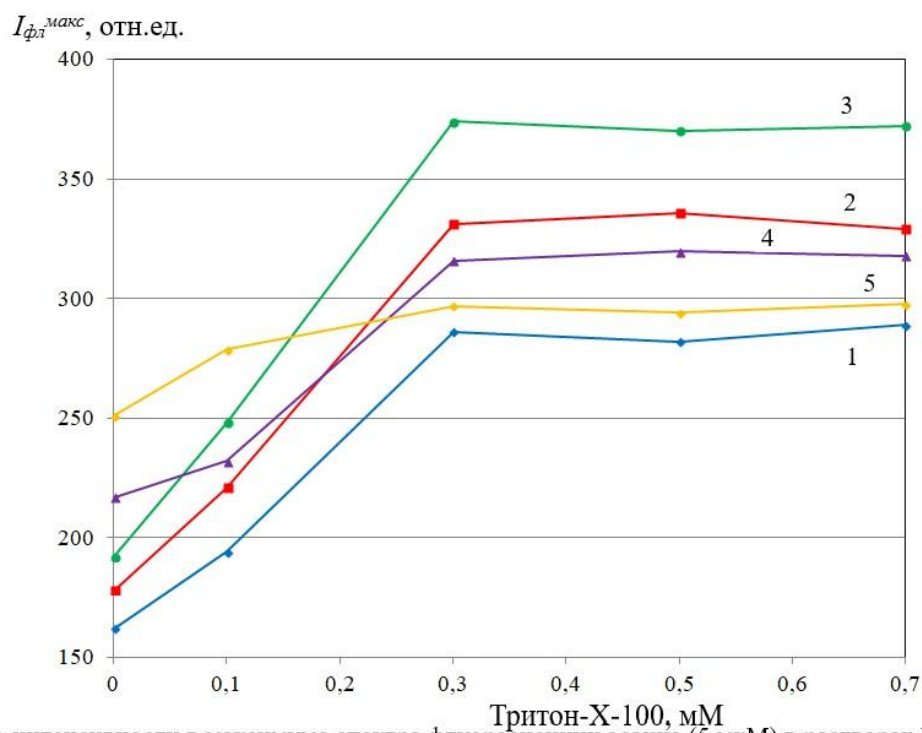
Интенсивность в максимуме спектра флуоресценции эозина (5 мкМ) в растворах БСА (5 мкМ) и Твин-20 при различных значениях pH: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5).

Рис. 3.2. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина (5 мкМ) в растворах БСА (5 мкМ) от концентрации Твин-20 при различных значениях pH: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5).



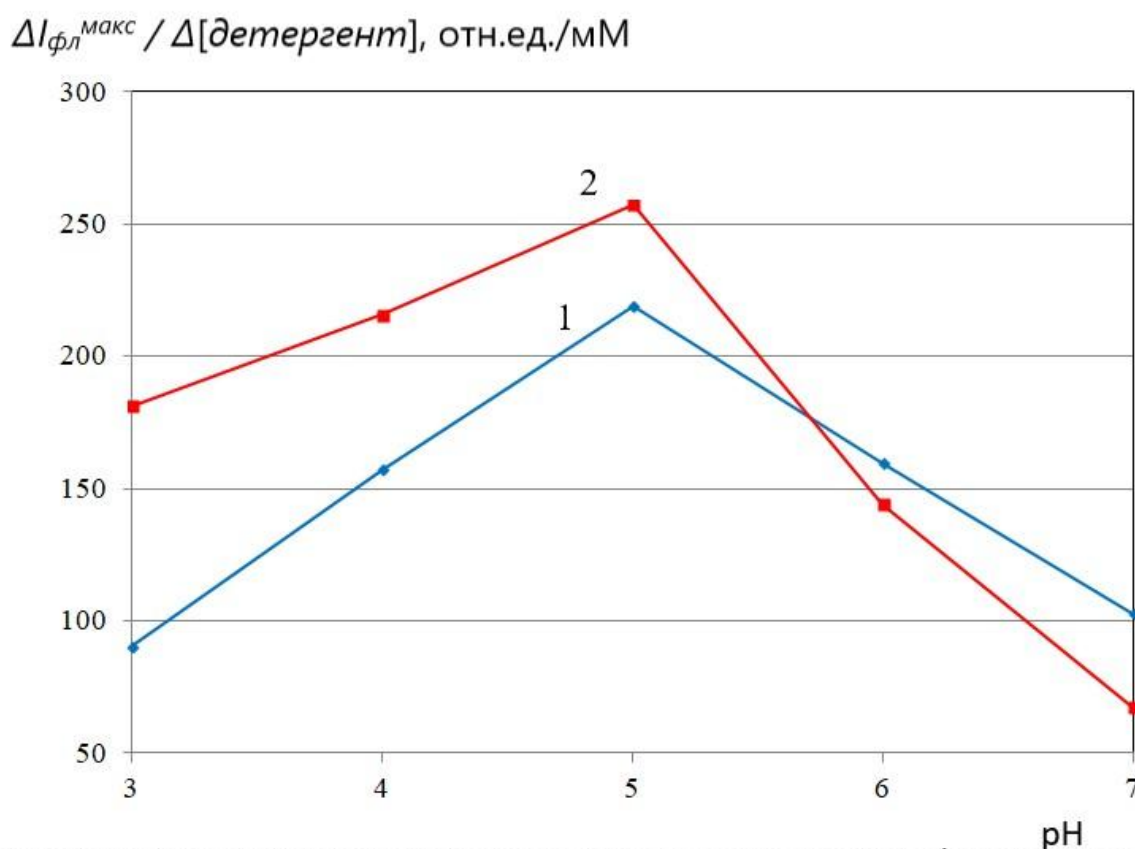
Спектры флуоресценции ($\lambda_{возб} = 520$ нм) эозина (5 мкМ) в растворах БСА (5 мкМ) и разных концентраций Тритона X-100 при рН 3,0.

Рис. 3.3. Спектры флуоресценции ($\lambda_{возб} = 520$ нм) эозина (5 мкМ) в растворах БСА (5 мкМ) и разных концентраций Тритона X-100 при рН 3,0.



Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина (5 мкМ) в растворах БСА (5мкМ) от концентрации Тритона-Х-100 при различных значениях рН: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5).

Рис. 3.4. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина (5 мкМ) в растворах БСА (5мкМ) от концентрации Тритона-Х-100 при различных значениях рН: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5).



Среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина при изменении концентрации детергента в растворе БСА: 1 – при Твин-20, 2 – при Тритон-Х-100.

Рис. 3.5. Среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина при изменении концентрации детергента в растворе БСА: 1 – при Твин-20, 2 – при Тритон-Х-100.

Данные изменения во флуоресценции эозина в растворах БСА и Твин-20 объясняются тем, что в области концентраций Твин-20, меньших 0,3 мМ, происходит эффективное комплексообразование мицелл Твин-20 с молекулами БСА и, соответственно, происходит конкуренция мицелл Твин и молекул эозина за места связывания на БСА. Поэтому при концентрациях Твин-20 < 0,3 мМ в условиях конкуренции с мицеллами Твин-20 эозин меньше связывается с БСА и больше находится в свободной форме, и его флуоресценция возрастает. При концентрациях Твин-20 > 0,3 мМ происходит эффект насыщения в комплексообразовании БСА с мицеллами Твин-20, дальнейшего образования комплексов БСА-Твин больше не происходит, и количество мест связывания для эозина на белке остается постоянным, поэтому флуоресценция эозина в этой области концентраций остается постоянной.

В данной работе с помощью зонда эозина также исследованы процессы комплексообразования БСА и другого нейтрального детергента Тритона-Х-100 при различных значениях рН. Критическая концентрация мицеллообразования Тритона-Х-100 0,25 мМ. Как обнаружено ранее [40], в области концентраций до 0,3 мМ Тритон-Х-100 находится в молекулярной фазе, и его молекулы взаимодействуют с БСА, образуя с ними комплексы. При концентрациях Тритона Х-100 больше 0,3 мМ детергент находится в мицеллярной фазе, и его мицеллы солубилизируют БСА, образуя крупные комплексы.

Получены спектры флуоресценции эозина в растворах БСА с добавлением Тритона-Х-100 при различных значениях рН, на рис. 3.3 в качестве примера представлены спектры для рН 3,0.

На рис. 3.4 изображена зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина в растворах БСА от концентрации Тритона-Х-100 при различных значениях рН.

Видно (рис. 3.4), что, как и в случае с Твин-20, при всех значениях рН интенсивность флуоресценции эозина в растворах БСА с Тритоном-Х-100

выше, чем в растворах БСА без детергента. Интенсивность флуоресценции эозина возрастает в белковых растворах до концентрации 0,3 мМ Тритона-Х-100, дальнейшее увеличение концентрации детергента в растворе уже не влияет на флуоресценцию эозина при всех исследованных значениях рН.

При концентрации Тритона-Х-100 < 0,3 мМ происходит эффективное комплексообразование Тритона-Х-100 с БСА и, соответственно, происходит конкуренция молекул Тритона и эозина за места связывания на БСА, поэтому за счет наличия свободного несвязанного с белком эозина его флуоресценция возрастает. При концентрациях Тритона-Х-100 > 0,3 мМ дальнейшего образования комплексов БСА-Тритон больше не происходит, начинается стадия насыщения комплексообразования БСА-Тритон, и количество мест связывания для эозина на БСА остается постоянным, поэтому флуоресценция эозина не меняется.

На рис. 3.5 представлено среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина при изменении концентрации детергента в растворе БСА. Как видно, в области низких значений рН < 5,0 (где, как известно, эозин эффективно связывается с БСА) флуоресценция эозина более чувствительна к комплексообразованию БСА с Тритоном Х-100 по сравнению с ассоциацией БСА с Твин-20. Тогда как в области высоких значений рН > 5,0 флуоресценция эозина практически одинакова чувствительна к ассоциации БСА как с Тритоном Х-100, так и с Твин-20. Также из рис. 3.5 видно, что максимальные изменения в интенсивности флуоресценции эозина в растворах БСА – детергент имеют место при рН 5,0, что объясняется высоким сродством эозина к БСА при данном значении рН, несмотря на эффективное комплексообразование БСА с детергентами при этом рН и несмотря на конкуренцию молекул эозина и молекул/мицелл детергента за центры связывания на белке.

Основные результаты и выводы

1. Методом флуоресцентного анализа с применением молекулярного зонда эозина исследована динамическая подвижность молекул бычьего сывороточного альбумина в процессе их комплексообразования с нейтральными детергентами – Тритоном-Х-100 и Твин-20 – в зависимости от значения рН.
2. Обнаружено, что при наличии нейтрального детергента (Твин-20 или Тритон-Х-100) в растворах БСА интенсивность флуоресценции эозина возрастает в области до 0,3 мМ детергента при всех исследованных значениях рН (3,0 – 7,0), причем дальнейшее увеличение концентрации детергента в растворе уже не влияет на флуоресценцию эозина.
3. Полученные результаты объяснены тем, что при концентрации каждого детергента до 0,3 мМ происходят его эффективное комплексообразование с БСА и конкуренция детергента и эозина за места связывания на БСА, поэтому за счет наличия несвязанного с белком эозина его флуоресценция возрастает. При концентрациях детергента больше 0,3 мМ начинается стадия насыщения комплексообразования «БСА-детергент», и количество мест связывания для эозина на БСА остается постоянным, поэтому флуоресценция эозина не меняется.
4. Обнаружено, что в области низких значений рН $< 5,0$ флуоресценция эозина более чувствительна к комплексообразованию БСА с Тритоном Х-100 по сравнению с ассоциацией БСА с Твин-20, тогда как в области высоких значений рН $> 5,0$ флуоресценция эозина практически одинакова чувствительна к ассоциации БСА с обоими детергентами.

Список цитируемой литературы

1. Фаллер Д.М., Шилдс Д. «Молекулярная биология клетки» // Москва, Бином-пресс, 2006.
2. Эллиот В., Эллиот Д. «Биохимия и молекулярная биология» // Москва, Наука, 2002.
3. Ленинджер А. «Биохимия» // Москва, Мир, 1972.
4. Рубин А.Б. «Биофизика. Теоретическая биофизика» // Москва, Издательство Московского Университета, 2004.
5. Остерман Л.А. «Методы исследования белков и нуклеиновых кислот» // Москва, МЦНМО, 2002.
6. Кузьмичев П.К. Структурно-функциональные исследования семиспиральных мембранных белков. // МФТИ.
7. Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2004, v. 1666, № 1–2, pp. 105-117.
8. Garavito R. M., Ferguson-Miller S. Detergents as tools in membrane biochemistry. // *J Biol Chem*, 2001, v. 276, № 35, pp. 32403-32406.
9. Moraes I., Evans G., Sanchez-Weatherby J., Newstead S., Stewart P. D. Membrane protein structure determination - the next generation. // *Biochim Biophys Acta*, 2014, v. 1838, № 1, pp. 78-87.
10. Zorman S., Botte M., Jiang Q., Collinson I., Schaffitzel C. Advances and challenges of membrane- protein complex production. // *Curr Opin Struct Biol*, 2015, v. 32, pp. 123-130.
11. Wang L., Tonggu L. Membrane protein reconstitution for functional and structural studies. // *Sci China Life Sci*, 2015, v. 58, № 1, pp. 66-74.
12. Booth P. J., Flitsch S. L., Stern L. J., Greenhalgh D. A., Kim P. S., Khorana H. G. Intermediates in the folding of the membrane protein bacteriorhodopsin. // *Nat Struct Biol*, 1995, v. 2, № 2, pp. 139-143.

13. Tulumello D. V., Deber C. M. Efficiency of detergents at maintaining membrane protein structures in their biologically relevant forms. // *Biochim Biophys Acta*, 2012, v. 1818, № 5, pp. 1351-1358.
14. Arseniev A. S., Barsukov I. L., Bystrov V. F., Lomize A. L., Ovchinnikov Yu A. ¹H-NMR study of gramicidin A transmembrane ion channel. Head-to-head right-handed, single-stranded helices. // *FEBS Lett*, 1985, v. 186, № 2, pp. 168-174.
15. Lomize A. L., Pervushin K. V., Arseniev A. S. Spatial structure of bacterioopsin polypeptide in SDS micelles determined from nuclear magnetic resonance data. // *J Biomol NMR*, 1992, v. 2, № 4, pp. 361-372.
16. Pervushin K. V., Arseniev A. S. Three-dimensional structure of bacterioopsin in methanol- chloroform mixture and SDS micelles determined by 2D ¹H-NMR spectroscopy. // *FEBS Lett*, 1992, v. 308, № 2, pp. 190-196.
17. Chill J. H., Louis J. M., Miller C., Bax A. NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles. // *Protein Sci*, 2006, v. 15, № 4, pp. 684-698.
18. Chill J. H., Louis J. M., Delaglio F., Bax A. Local and global structure of the monomeric subunit of the potassium channel KcsA probed by NMR. // *Biochim Biophys Acta*, 2007, v. 1768, № 12, pp. 3260-3270.
19. Krishnamani V., Hegde B. G., Langen R., Lanyi J. K. Secondary and tertiary structure of bacteriorhodopsin in the SDS denatured state. // *Biochemistry*, 2012, v. 51, № 6, pp. 1051- 1060.
20. Gong X. M., Ding Y., Yu J., Yao Y., Marassi F. M. Structure of the Na,K-ATPase regulatory protein FXYD2b in micelles: implications for membrane-water interfacial arginines. // *Biochim Biophys Acta*, 2015, v. 1848, № 1, pp. 299-306.
21. Miyamoto K., Togiya K. Solution structure of LC4 transmembrane segment of CCR5. // *PLoS One*, 2011, v. 6, № 5, pp. e20452.

22. Мажуль В.М., Галец И.В. Фосфоресцентный анализ действия детергентов на внутримолекулярную динамику мембранных белков эритроцитов человека. // Биофизика, 2008, т. 53, № 4, с. 602-609.
23. Мудрикова О.В., Митрохин П.В. Исследование влияния детергентов на белки молока. // Техника и технология живых производств, 2010.
24. Hafiz A. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. // Ahmed Hafiz, CRC Press LLC, 2005, p. 389.
25. Минеев К.С. Разработка методов ЯМР-спектроскопии и их применение для исследования олигомеризации мембранных белков. // Диссертация на соискание степени доктора химических наук, 2020.
26. Пацаева С.В., Южаков В.И. Спецпрактикум кафедры общей физики для студентов 3 и 4-го курса физического факультета МГУ.
27. Левшин Л.В., Салецкий А.М. «Люминесценция и ее измерения» // Москва, МГУ, 1989.
28. Литвин Ф.Ф. Молекулярная спектроскопия: основы теории и практика // Учебное пособие, 2014
29. Пшенкина Н.Н. Кинетический и термодинамический анализ взаимодействия лигандов с альбумином. // ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»
30. Пинаев Г.П., Козлова А.А., и пр. Изучение молекулярных механизмов реорганизации активного цитоскелета при взаимодействии клетки с различными лигандами. // Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
31. Huber W., Perspicace S., Kohler J., Müller F., Schlatter D. SPR-based interaction studies with small molecular weight ligands using hAGT fusion proteins. // F. Hoffmann-La Roche Ltd, Pharmaceutical Research, Discovery Chemistry, CH-4070- Basel, Switzerland.
32. Clayton A.H.A., Perugini M.A., Weinstock J., Rothacker J., Watson K.G., Burgess A.W., Nice E.C. Fluorescence and analytical ultracentrifugation analyses of the interaction of the tyrosine kinase inhibitor, tyrphostin

- AG1478-mesylate, with albumin. // Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne Tumour Biology Branch, P.O. Royal Melbourne Hospital, Parkville, Vic. 3050, Australia.
33. Skvarnavicius G., Toleikis Z., Grigaliunas M., Smirnoviene J., Norvaisas P., Cimpmperman P., Matulis D., Petrauskas V. High pressure spectrofluorimetry – a tool to determine protein-ligand binding volume. // Department of Biothermodynamics and Drug Design, Institute of Biotechnology, Vilnius University, Vilnius, Lithuania, 2017.
34. Huynh K., Partch C.L. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. // Department of Chemistry and Biochemistry, University of California Santa Cruz, Santa Cruz, California, 2015, 10.1002/0471140864.ps2809s79.
35. Fay S.P., Posner R.G., Swann W.N., Sklar L.A. Real-time analysis of the assembly of ligand, receptor, and G protein by quantitative fluorescence flow cytometry. // // Biochemistry, 1991, v. 30, p. 139.
36. Zhenglei Xu, Zhichao Yu, Shumei Nai, Ruiyue Shi, Qinhong Tang, Haiyang Zhang, Lijuan Ye, Lisheng Wang, Yincai Hong. Structure-based design of competitive ligands to target Spon2 in gastric cancer: An integration of molecular modeling and in vitro assay. // Department of Gastroenterology, The Second Clinical Medical College, Shenzhen People's Hospital, Jinan University, Shenzhen 518000, China, 2017, 10.1016/j.bioorg.2017.07.011.
37. Zhaoyi Miao, Yue Hu, Xiaojing Zhang, Xiaotong Yang, Yingying Tang, An Kang, Dong Zhu. Screening and identification of ligand-protein interactions using functionalized heat shock protein 90-fluorescent mesoporous silica-indium phosphide/zinc sulfide quantum dot nanocomposites. // School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210023, PR China, 2018.
38. Shahraki S., Heydari A. Binding forces between a novel Schiff base palladium (II) complex and two carrier proteins: human serum albumin and β -

- lactoglobulin. // Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan , Zahedan , Iran, 2018.
39. Krabbe J.G., Gao F., Li J., Ahlskog J.E., Lingeman H., Niessen W.M.A., Irth H. Selective detection and identification of phosphorylated proteins by simultaneous ligand-exchange fluorescence detection and mass spectrometry. // Faculty of Sciences, Division of Chemistry, Department of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Vrije Universiteit Amsterdam, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands, 2006, 10.1016/j.chroma.2006.05.085.
40. Власова И.М., Журавлева В.В., Салецкий А.М. Определение параметров вращательной диффузии комплексов сывороточных альбуминов с Тритоном X-100 по анализу поляризованной триптофановой флуоресценции. // Химическая Физика, 2013, т. 32, № 10, с. 53-58.