

УДК 525.235; 538.958

## **КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕНАТУРАЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДСН ПО СПЕКТРАМ ТРИПТОФАНОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

Власова И.М., Салецкий А.М.

*МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: vlasovairina1979@mail.ru*

Сывороточный альбумин (66,4 кДа) представляет собой глобулярный белок плазмы крови человека. Уникальная способность молекулы сывороточного альбумина человека (САЧ) связывать обширный круг органических и неорганических лигандов определяет одну из основных функций этого белка – транспорт физиологических метаболитов. Исследование денатурации этого белка чрезвычайно важно в связи с его физиологическими функциями в крови, т.к. позволяет делать выводы об уровне сохранения нативной конформации белка и, следовательно, об уровне сохранности его физиологических свойств в различных условиях.

Основой взаимодействий молекулы САЧ с лигандами является её структурная подвижность, обеспеченная уникальной петлевой укладкой единственной полипептидной цепи из 585 аминокислотных остатков. Вторичная структура САЧ, стабилизируемая водородными связями между пептидными группами аминокислотной цепи, состоит из  $\alpha$ -спиральных участков и участков хаотической укладки. Между остатками цистеина в САЧ образуются 17 дисульфидных связей, которые формируют 9 петель или субдоменов (6 больших и 3 малые петли). Структурная единица, содержащая 2 большие петли и 1 малую петлю, представляет собой глобулярную структуру, называемую доменом. В настоящее время принята доменная модель структуры альбумина, согласно которой молекула САЧ состоит из 3 практически одинаковых доменов. На сегодняшний день третичная структура САЧ описывается моделью «сердца», домены в этой модели расположены под углом друг к другу.

Денатурацией называют существенное изменение вторичной и третичной структуры белка, т.е. нарушение, разупорядочивание системы нековалентных взаимодействий, не затрагивающее его ковалентной структуры. Эффективными денатурирующими агентами являются ионные детергенты, среди которых в биохимической практике часто используют анионный детергент додецилсульфат натрия (ДСН).

В данной работе представлены результаты исследований механизма денатурации молекул САЧ под действием различных концентраций ДСН при различных значениях pH растворов методами флуоресцентного анализа по изучению собственной белковой триптофановой флуоресценции. Единственный аминокислотный остаток триптофана Trp-214 в САЧ расположен в домене II. Флуоресцентные свойства аминокислотного остатка триптофана в молекуле САЧ весьма чувствительны к перестройкам макромолекулы белка.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Растворы САЧ были получены путём разведения белка до концентрации 5 мкМ в двух различных буферных системах: 0,1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 0,1 М КОН (pH 3,5–5,0) и 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 М NaOH (pH 5,5–6,0). В растворы САЧ при различных значениях pH (3,5–6,0) добавлялись различные концентрации ДСН (0,5–7,0 мМ).

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin Elmer). Триптофановая флуоресценция САЧ регистрировалась в диапазоне 300 – 500 нм при возбуждении светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ**

Белковые макромолекулы способны претерпевать структурные перестройки под действием различных факторов и агентов. Возможны два типа таких динамических перестроек: переход белка из нативного в денатурированное функционально неактивное состояние (денатурационный переход) и переход между двумя функционально активными формами (функциональный переход).

*1. Триптофановая флуоресценция в исследованиях функциональных переходов САЧ при изменении pH в диапазоне 3,5 – 6,0*

Модификации во внутримолекулярной динамике белков в растворах, происходящие при изменении pH растворов в отсутствие ДСН в исследуемом диапазоне (3,5–6,0), относятся к функциональным переходам, т.е. происходят в пределах нативной структуры белка. В данной работе перед исследованием денатурационных переходов САЧ, вызванных действием ДСН, были рассмотрены функциональные переходы этого белка при изменении pH растворов (в отсутствие ДСН). Проведены исследования флуоресцентно – спектральных характеристик аминокислотного остатка триптофана в молекуле САЧ при различных значениях pH растворов (в отсутствие ДСН).

Получены зависимости интенсивности в максимуме пектра флуоресценции  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  (рис. 1, кривая 1) и длины волны в максимуме спектра флуоресценции  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  (рис. 1, кривая 2) в максимуме спектра триптофановой флуоресценции САЧ от рН раствора. При увеличении значения рН от 3,5 до 6,0 происходит увеличение  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ . Помимо разгорания триптофановой флуоресценции САЧ при увеличении рН происходит красный сдвиг спектра флуоресценции.

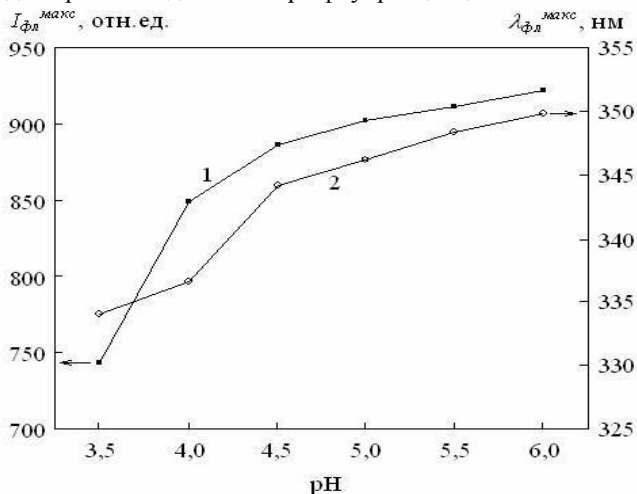


Рис. 1. Зависимости интенсивности  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  (1) и длины волны  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  (2) в максимуме спектра триптофановой флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм) САЧ (5 мкМ) от рН растворов в отсутствие ДСН.

Таким образом, уменьшение значения рН растворов от 6,0 до 3,5 приводит к уменьшению  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  и к сдвигу в коротковолновую область  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ , что обусловлено конформационным функциональным переходом белка (так называемым N – F переходом). Данный N – F переход САЧ при уменьшении рН от 6,0 до 3,5 и соответствующее изменение триптофановой флуоресценции белка связаны с протонированием карбоксильных групп белка. F – форма САЧ, имеющая место при низких значениях рН растворов, характеризуется более рыхлой структурой с разупорядоченными гидрофобными областями.

## 2. Триптофановая флуоресценция в исследованиях денатурационных переходов САЧ под действием ДСН при различных значениях рН

После исследования функциональных переходов САЧ (в пределах его нативной структуры) при изменении рН растворов в отсутствие

ДСН мы обратились к исследованию денатурационных переходов этого белка под действием различных концентраций ДСН при различных значениях рН.

Характер изменений спектров триптофановой флуоресценции САЧ при увеличении концентраций ДСН различался для значений рН (3,5–4,5), меньших изоэлектрической точки САЧ (рI 4,7), и для значений рН (5,0–6,0), больших рI САЧ.

На рис. 2 изображены зависимости интенсивности в максимуме спектров триптофановой флуоресценции САЧ ( $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ ) от концентрации ДСН для различных значений рН. В растворах с ДСН триптофановая флуоресценция САЧ тушится. Тушение триптофановой флуоресценции САЧ в растворах с ДСН объясняется его денатурацией, вследствие которой при разворачивании глобулы хромофорная группа триптофана становится более доступной для молекул воды, тушащих её флуоресцентное свечение.

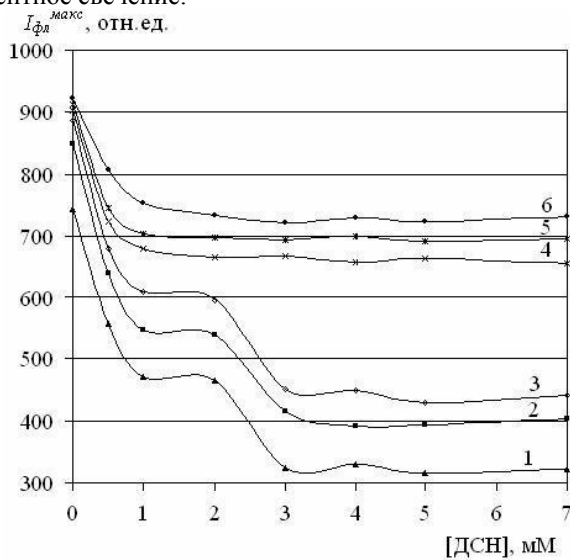


Рис. 2. Зависимость интенсивности  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  в максимуме спектра триптофановой флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм) САЧ (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6).

Из рис. 2 видно, что более сильное тушение собственной триптофановой флуоресценции САЧ, наблюдаемое в растворах с ДСН, при одинаковых концентрациях ДСН имеет место при более низких значениях рН растворов. Данная закономерность говорит об

электростатическом механизме взаимодействия САЧ с ДСН. Более сильная денатурация белка под действием ДСН имеет место при рН, меньших рI.

Установленные из экспериментальных данных зависимости  $I_{фл}^{макс}$  при различных значениях рН от концентрации ДСН (рис. 2) можно объяснить двустадийным механизмом денатурации САЧ в присутствии ДСН.

При значениях рН, меньших рI САЧ (рН 3,5–4,5), видно (рис. 2, кривые 1-3), что денатурация САЧ в присутствии ДСН при этих значениях рН представляет собой не непрерывный одностадийный процесс, а ступенчато – двустадийный. Двухэтапное тушение собственной флуоресценции САЧ при увеличении концентрации ДСН при этих значениях рН, меньших рI САЧ, объясняется двустадийным механизмом его денатурации и последовательными конформационными перестройками белковой глобулы, приводящими к оголению триптофана и увеличению его доступности для молекул воды, тушащих его флуоресценцию.

При значениях рН, больших рI САЧ (рН 5,0–6,0), денатурация САЧ под действием ДСН идет слабо. По форме кривых (рис. 2, кривые 4-6) видно, что двустадийный процесс денатурации САЧ в присутствии ДСН при этих значениях рН проходит только одну первую стадию. При увеличении концентрации ДСН до 1 – 2 мМ происходит тушение триптофановой флуоресценции альбумина, т.е. наблюдается денатурационное разрыхление белковых глобул (первая стадия денатурации), приводящее к увеличению доступности триптофана САЧ для тушащих его флуоресценцию молекул воды. Добавление больших концентраций ДСН (больших 2 мМ) при этих значениях рН не приводит к дальнейшей второй стадии денатурации. В отличие от значений рН, меньших рI белка, где денатурация САЧ под действием ДСН проходит две стадии (разрыхление; полное разворачивание), при рН, больших рI, денатурация под действием ДСН останавливается на первой стадии (происходит только разрыхление белковых глобул) в интервале исследованных концентраций ДСН.

Механизм денатурации САЧ под действием ДСН исследован также по анализу положения длины волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции САЧ ( $\lambda_{фл}^{макс}$ ). Следует отметить, что при увеличении рН растворов максимум спектра триптофановой флуоресценции САЧ смещается в сторону больших длин волн, как для растворов с ДСН, так и для растворов, не содержащих ДСН.

При добавлении в раствор первой концентрации ДСН (0,5 мМ) происходит резкий синий сдвиг максимума спектра триптофановой флуоресценции САЧ (примерно на 8 – 12 нм в зависимости от рН). Добавление дальнейших увеличивающихся концентраций ДСН (от 0,5 мМ до 7,0 мМ) приводит к уже небольшому синему сдвигу спектров триптофановой флуоресценции САЧ. Синий сдвиг  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  в растворах с ДСН объясняется изменением ближайшего окружения хромофорной группы триптофана САЧ вследствие денатурационной конформационной перестройки глобулы белка и влияния связавшихся с белком молекул ДСН.

В отличие от поведения  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ , имеющей поэтапное двуступенчатое тушение при увеличении концентрации ДСН, поведение положения  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  изменяется не двуступенчато, а однократно при увеличении концентрации ДСН. Изменение положения  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  чувствительно только к изменению ближайшего окружения триптофана, а изменение  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  несет отпечаток как локальных перестроек ближайшего окружения триптофана, так и более отдаленных периферийных изменений белковой глобулы САЧ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследованы параметры триптофановой флуоресценции САЧ при различных значениях рН растворов. Исследованы как функциональные переходы САЧ (в пределах его нативной структуры), происходящие при изменении рН растворов в отсутствие ДСН, так и денатурационные переходы этого белка, происходящие под действием ДСН при различных рН.

По изменению триптофановой флуоресценции САЧ показан конформационный функциональный переход (N – F переход) САЧ в пределах его нативной структуры (в отсутствие ДСН), происходящий при уменьшении значения рН растворов от 6,0 до 3,5.

По оценке собственной белковой триптофановой флуоресценции исследованы денатурационные переходы САЧ под действием ДСН при различных значениях рН растворов. Двухэтапное тушение триптофановой флуоресценции САЧ при увеличении концентрации ДСН указывает на двустадийный характер денатурации: первая стадия – разрыхление белковых глобул, вторая стадия – полное разворачивание аминокислотной цепи белка. При рН растворов, меньших рI САЧ, денатурация проходит через обе стадии. При рН растворов, больших рI САЧ, денатурация проходит слабо и останавливается на первой стадии.

По изменению триптофановой флуоресценции САЧ показано, что более эффективная и сильная денатурация под действием ДСН происходит при значениях рН, меньших рI САЧ, а по мере увеличения рН растворов эффективность денатурации САЧ под действием ДСН уменьшается.