

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ В.А. Кратасюк

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Влияние мутаций на стадии разворачивания карбоксиангидразы Б:  
метод времён жизни собственной флуоресценции белка

03.04.02 Физика

03.04.02.01 Биофизика

Научный руководитель \_\_\_\_\_ с.н.с., канд. физ.-мат. наук Е.В. Немцева

Выпускник \_\_\_\_\_ Н.Е. Карузина

Рецензент \_\_\_\_\_ д-р физ.-мат. наук Б.С. Мельник

Красноярск 2019

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Влияние мутаций на стадии разворачивания карбоксиангидразы Б: метод времён жизни собственной флуоресценции белка» содержит 47 страниц текстового документа, 14 рисунков, 9 формул, 3 таблицы, 48 использованных источников.

ТРИПТОФАНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, КАРБОКСИАНИДРАЗА Б, ВРЕМЯ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ; ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ; РАВНОВЕСНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ, КРИВАЯ ПЕРЕХОДА, СЕРЕДИНА ПЕРЕХОДА

Цель работы: оценка влияния мутаций (одиночных и двойных замен), введённых в отдельные элементы структуры карбоксиангидразы Б, на путь разворачивания этого белка с помощью метода время-разрешенной спектроскопии.

Определение стадий сворачивания/разворачивания белковых макромолекул, стабильности образующихся интермедиатов, условий изменения пути сворачивания белков является актуальной проблемой современной биофизики. В данной работе предлагается метод время-разрешенной спектроскопии для оценки влияния мутаций на пути разворачивания белка.

В работе проанализированы кривые перехода полученные по параметрам  $I_{320}/I_{360}$ ,  $\tau_1$  и  $\tau_2$  при равновесной денатурации мочевиной карбоксиангидразы быка. Определены середины перехода между различными состояниями белка по кривым перехода по  $I_{320}/I_{360}$ ,  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Проанализирована зависимость характера мутаций, наблюдаемых переходов и последовательность разворачивания элементов вторичной структуры ВСА. Проведена оценка влияния растворителя на время жизни флуоресценции триптофана. Показано, что кривые перехода могут нести информацию о последовательности разворачивания структурных элементов белка.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. Литературный обзор .....	6
1.1. Время-разрешенная флуоресценция. Время жизни флуоресценции.....	6
1.2. Собственная флуоресценция белков.....	8
1.2.1. Триптофан. Спектральные классы .....	10
1.2.1.1. Времена жизни триптофана в водном растворе .....	12
1.2.1.2. Времена жизни триптофана в белках .....	13
1.3. Виды и механизмы денатурации белков .....	16
1.4. Карбоксиангидразы.....	17
1.4.1. Карбоксиангидраза быка .....	19
2. Материалы и методы .....	22
2.1. Объекты исследования и оборудование .....	22
2.2. Методика исследования .....	23
3. Результаты и обсуждение.....	26
3.1. Сравнительный анализ переходов, полученных по спектрам стационарной и время-разрешенной флуоресценции .....	26
3.2. Анализ кривых перехода, полученных по спектрам время-разрешенной флуоресценции .....	31
3.2.1. Мутации L78A и A53C/A76C .....	31
3.2.2. Мутации L139A и T86C/T124C .....	33
3.2.3. Мутации I208A и D188C/K211C .....	34
3.2.4. Мутации: A53C/A76C, T86C/T124C, A154C/S181C, D188C/K211C ..	35
3.3. Последовательность разворачивания элементов вторичной структуры ВСА при денатурации мочевиной.....	37
3.4. Влияние растворов мочевины на время жизни флуоресценции триптофана.....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	40
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	42

## ВВЕДЕНИЕ

Определение стадий сворачивания/разворачивания белковых макромолекул, стабильности образующихся интермедиатов, условий изменения пути сворачивания белков является актуальной проблемой современной биофизики. В настоящее время не существует универсальных методов, способных предсказать особенности пути сворачивания белка, опираясь только на его пространственную структуру. Между тем, сбой в процессе укладки белковой макромолекулы может стать причиной патологических состояний живых организмов.

Стабильность белка обуславливают такие параметры как химический состав раствора, рН, температура и любое изменение этих параметров влияет на стабильность связей и структуру молекулы белка в целом. Собственная флуоресценция белковой глобулы является чувствительным параметром к любым конформационным изменениям в структуре [1, 2].

Перспективным методом регистрации состояния белковых молекул является метод флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением, отличающийся высокой чувствительностью к изменению структуры макромолекул. Спектральные характеристики флуорофоров (спектры поглощения и флуоресценции, время жизни флуоресценции, квантовый выход) дают информацию о взаимодействиях флуорофора с окружением, а также информацию о фотофизике системы в целом [3, 4].

Целью настоящей работы является оценка влияния мутаций (одиночных и двойных замен), введённых в отдельные элементы структуры карбоксиангидразы Б, на путь разворачивания этого белка с помощью метода время-разрешенной спектроскопии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. проанализировать середины перехода, полученные по спектрам стационарной и время-разрешенной флуоресценции;

2. провести сравнительный анализ кривых перехода, полученных по спектрам время-разрешенной флуоресценции;

3. проанализировать зависимость характера мутаций, наблюдаемых переходов и последовательность разворачивания элементов вторичной структуры ВСА;

4. оценить влияние растворителя на время жизни флуоресценции триптофана.

## 1. Литературный обзор

### 1.1. Время-разрешенная флуоресценция. Время жизни флуоресценции

Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением отслеживает события, происходящие в течение времени жизни возбужденного синглетного состояния. Эта временная шкала варьируется от нескольких пикосекунд до сотен наносекунд. Соответствующие биологические события, которые происходят в этой временной области, включают вращение целых белков, сегментов полипептидных цепей и отдельных боковых цепей аминокислот. Кроме того, возбужденный хромофор может взаимодействовать с молекулами растворителя или соседними аминокислотными остатками.

Некоторые флуорофоры демонстрируют кинетику моноэкспоненциального распада, когда они растворены в не взаимодействующих растворителях:

$$I(t) = I_0 \cdot \exp(-t/\tau), \quad (1)$$

где  $I_0$  – интенсивность в момент времени  $t = 0$ ;

$\tau$  – время затухания.

В случае биомолекул чаще встречается мультиэкспоненциальная кинетика, которая описывается уравнением:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot \exp(-t/\tau_i), \quad (2)$$

где  $\alpha_i$  – амплитудный коэффициент  $i$ -компоненты;

$\tau_i$  – время затухания.

Смесь флуорофоров может проявлять многоэкспоненциальный спад флуоресценции с числом констант  $\tau_i$ , равным количеству компонентов в смеси. В этом контексте один хромофор в разных микроокружениях может рассматриваться как смесь флуорофоров. Таким образом, можно было бы отнести две константы  $\tau_i$ , обнаруженные в белке, содержащем два триптофана, к остаткам индивидуальных триптофанов. Аналогично, если белок имеет только один остаток триптофана, но существует в двух конформациях, биэкспоненциальная кинетика спада флуоресценции может отражать эти два состояния белка и может использоваться для исследования их взаимопревращения.

Известно, что цвиттер-ион триптофана в растворе демонстрирует биэкспоненциальный спад флуоресценции, и одна из интерпретаций этого факта заключается в том, что триптофан существует в микрогетерогенных (ротамерных) формах. Много- или неэкспоненциальный характер спада может также возникнуть для чистого (гомогенного) флуорофора, участвующего в реакциях в возбужденном состоянии. К ним относятся такие процессы, как образование эксиплекса, релаксация растворителя в возбужденном состоянии, изменения конфигурации (например, цис-транс изомеризация), перенос протона в возбужденном состоянии и перенос энергии, и многие другие [5].

Время жизни флуоресценции (время затухания) является средним промежутком времени, в течение которого молекула флуорофора находится в возбужденном состоянии прежде, чем вернуться в основное. Величина времени жизни может варьировать, потому что возвращение возбужденного флуорофора в основное состояние может происходить различными параллельными путями [6, 7].

Время жизни флуоресценции флуорофора, описываемого диаграммой Яблонского (рисунок 1), определяется следующим образом:

$$\tau^l = k_r + k_{nr}, \quad (3)$$

где  $k_r$  – константа скорости излучательного перехода в основное состояние;  
 $k_{nr}$  – константа скорости всех безызлучательных процессов.

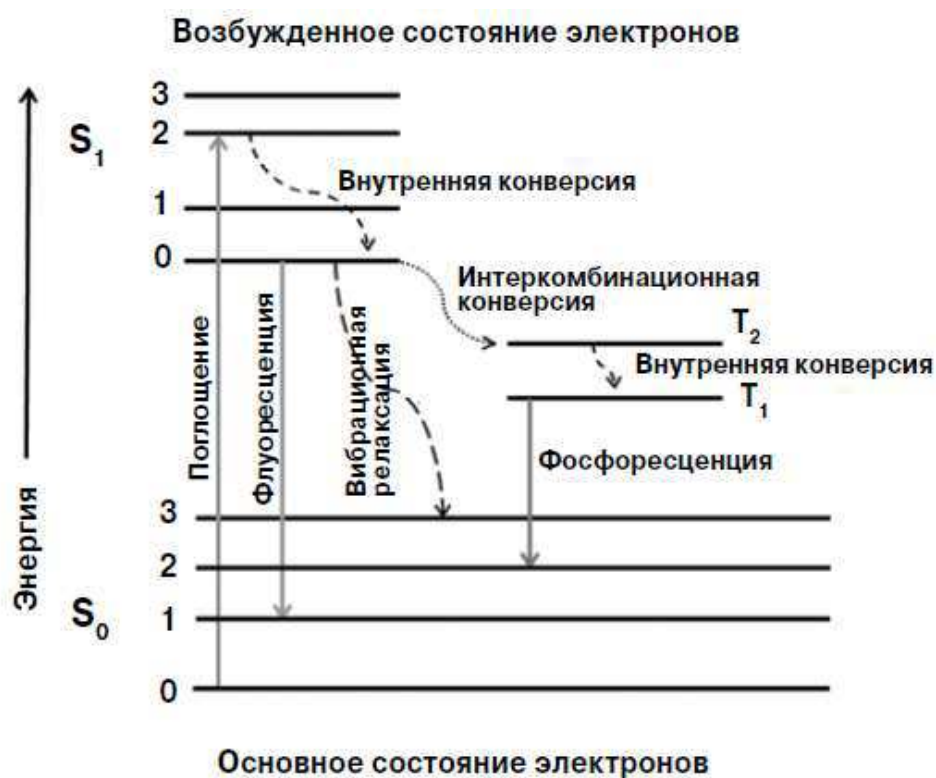


Рисунок 1 – Диаграмма Яблонского [3, 8]

Горизонтальные линии — энергетические уровни электронов:  $S_0$ — основное, невозбужденное состояние;  $S_1$  — синглетное возбужденное состояние; 0 — 3 — квантованные подуровни;  $T_1$ ,  $T_2$  — квантованные уровни триплетного возбужденного состояния. Стрелками показаны переходы электронов в разные энергетические состояния

## 1.2. Собственная флуоресценция белков

Собственная флуоресценция белков – чрезвычайно чувствительная характеристика по отношению к конформационным изменениям этих



молекул. Основными аминокислотными остатками, обуславливающими собственную флуоресценцию белков, являются остатки триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe) (рисунок 2) [9, 10].

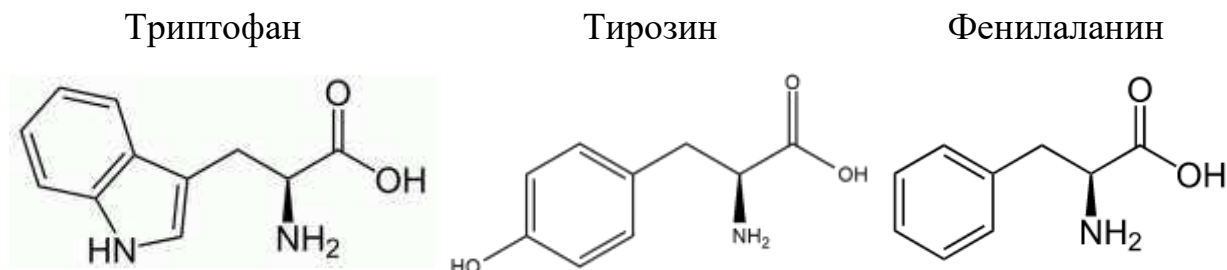


Рисунок 2 – Химическая структура ароматических аминокислотных остатков в составе белков [10, 11]

Спектральные свойства данных аминокислот представлены в таблице 1, где  $\lambda$  – максимум длинноволновой полосы поглощения,  $\lambda_{em}$  – максимум флуоресценции,  $\epsilon$  – коэффициент экстинкции,  $\phi$  – квантовый выход,  $\tau$  – время жизни флуоресценции [8, 12].

Таблица 1 – Спектрально-люминесцентные характеристики флуорофоров белков в воде

Флуорофор	$\lambda$ , нм	$\epsilon$ , $M^{-1}cm^{-1}$	$\lambda_{em}$ , нм	$\phi$	$\tau$ , нс
Триптофан	280	5600	348	0,20	3,0
Тирозин	274	1400	303	0,14	3,6
Фенилаланин	257	200	282	0,04	6,4

При возбуждении белков излучением с длиной волны от 295 до 305 нм флуоресцируют преимущественно остатки триптофана, так как спектры поглощения тирозина и фенилаланина лежат в более коротковолновой области [12]. Из-за перераспределения электронной плотности в ассиметричном индольном кольце триптофан является более чувствительным к изменениям микроокружения в отличие от тирозина и фенилаланина. Именно поэтому в исследованиях собственной флуоресценции белков речь идет именно о

спектральных характеристиках триптофановых остатков в составе этих макромолекул [13, 14].

### 1.2.1. Триптофан. Спектральные классы

Максимум спектра флуоресценции триптофановых остатков в белках лежит в диапазоне от 307 до 353 нм. Полярность растворителя, а также специфические взаимодействия между растворителем и индольным кольцом влияют на спектр флуоресценции триптофана.

Изучение спектров стационарной флуоресценции многочисленных белков, которые обладают различной структурой, привело к классификации возможных состояний триптофановых остатков в белковой глобуле. В своей работе Е. А. Бурштейн с соавторами сформулировал модель дискретных состояний триптофановых остатков в белках, которая утверждает, что существует пять наиболее вероятных спектральных форм остатков триптофана: А, S, I, II, III (рисунок 3) [3, 15].

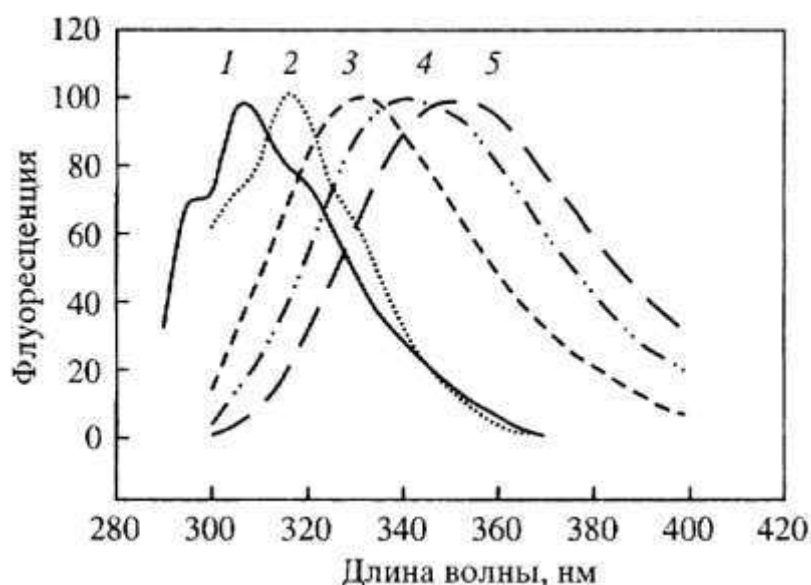


Рисунок 3 – Нормированные спектры флуоресценции остатков триптофана спектральных классов А (1), S (2), I (3), II (4), III (5) [3]

Спектральная форма класса А соответствует излучению невозмущенного индольного хромофора в нейтральном гидрофобном окружении внутри белковой глобулы. Такие остатки не образуют эксиплексы с растворителем или соседними аминокислотными группами белка. Максимум спектра излучения лежит в районе 308 нм.

Спектральная форма класса S – это триптофановые остатки, которые находятся внутри молекулы, но в более подвижной и полярной микросреде, чем класс А. Такие остатки могут образовывать эксиплекс 1:1 с ближайшей полярной белковой группой. Но у белка никогда не бывает чистого спектра класса S, так как в нем всегда будет присутствовать вклад спектра класса I. Максимум спектра флуоресценции лежит в районе 321 – 325 нм [3].

К классу I относятся триптофановые остатки, находящиеся внутри белковой молекулы и способные образовывать эксиплекс 2:1 с ближайшими полярными группами белка. Максимум спектра излучения – 330 – 333 нм.

Остатки триптофана, локализованные на поверхности белка, относятся к классам II и III.

Остатки класса II контактируют с молекулами связанной воды. Молекулы связанной воды по сравнению с молекулами свободной воды имеют более низкие показатели подвижности. Спектральный класс II содержится во многих белках. Он характеризуется максимумом флуоресценции 341 – 344 нм.

Остатки триптофана спектрального класса III контактируют с молекулами свободно релаксирующей воды. Спектр таких остатков практически совпадает со спектром излучения свободного триптофана в воде. Остатки триптофана спектрального класса III наиболее часто встречаются в развернутых белках и лишь иногда – в нативных. Максимум спектра флуоресценции лежит в районе 346 – 350 нм. Так как остатки класса III локализованы на поверхности белка, они легко доступны растворителю, ионам и молекулам внешних тушителей. В то время как остатки классов А, S и I локализованы внутри белковой структуры и плохо доступны воде, ионам и молекулам внешних тушителей [3, 13, 16].

Спектральные свойства белка карбоксиангидразы Б определяются семью триптофановыми остатками из трёх возможных спектральных классов:

- Trp15, Trp96, Trp207 – класс S,
- Trp190 – класс I,
- Trp4, Trp243 - могут быть отнесены как к классу I, так и классу II,
- Trp122 – между I и S классами [17].

### 1.2.1.1. Времена жизни триптофана в водном растворе

Затухание флуоресценции L-триптофана в воде происходит с двумя временами флуоресценции: 0,4 и 2,8 нс. В этаноле наблюдается три времени жизни флуоресценции – около 0,2, 1,8 и 4,8 нс. Триптофан поглощает на длине волны 280 нм ( $\epsilon_{280} = 5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) и 220 нм ( $\epsilon_{220} = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) с двумя переходами  $S_0 \rightarrow 1L_a$  и  $S_0 \rightarrow 1L_b$  (рисунок 4) [18-20].

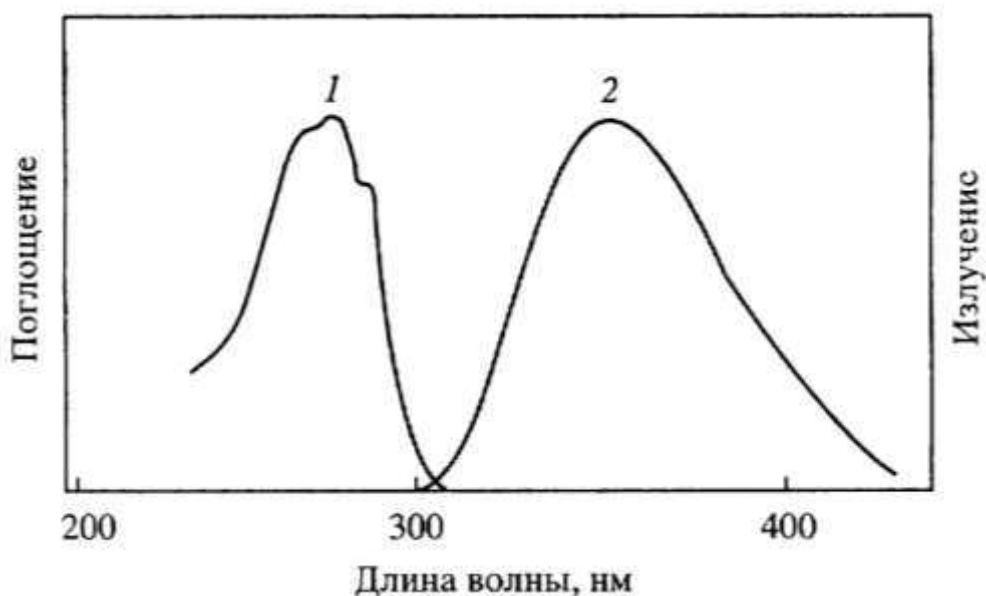


Рисунок 4 – Спектр поглощения (1) и флуоресценции (2) триптофана в водном растворе при нейтральных рН и комнатной температуре [3]

Оба перехода могут вызывать возбуждение триптофана, и время жизни флуоресценции может исходить от субструктур триптофана, генерируемых в возбужденном состоянии. Причем комбинация обоих переходных состояний

индуцирует возбужденное состояние триптофана и реорганизацию флуорофора в две взаимосвязанные структуры. Следовательно, нельзя исключать возможность того, что времена жизни флуоресценции не связаны напрямую ни с одним из двух переходов. Кроме того, это может просто означать, что возбуждение молекул триптофана в растворе приводит к возбужденному состоянию, в котором молекулы флуорофора сохраняют две или три конформации, отличные от наблюдаемых в основном состоянии [6, 21].

Оценка среднего расстояния между  $\text{C}\epsilon_3$  атомом индольного кольца и  $\text{C}$  атомом основной цепи (рисунок 5) для ряда одотриптофановых белков позволило соотнести регистрируемые времена жизни флуоресценции и ротационные кластеры триптофана. Согласно оценочным данным, полученным в результате сравнения бимолекулярной константы тушения акриламидом и относительной доступности растворителю боковой цепи триптофана в этом микросостоянии, было получено, что короткое время жизни (1,00 – 1,75 нс) соответствует близкому расстоянию от  $\text{C}\epsilon_3$  до  $\text{C}=\text{O}$ , предполагая механизм переноса электронов [22].

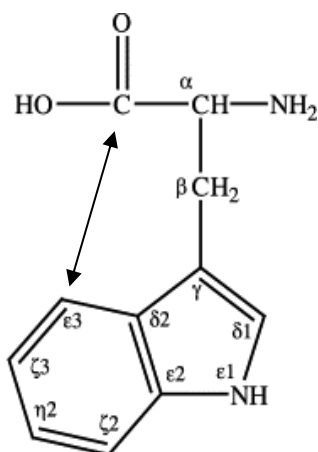


Рисунок 5 - Химическая структура молекулы триптофана

### 1.2.1.2. Времена жизни триптофана в белках

Время жизни триптофана в белках варьирует от нескольких сотен пикосекунд до 9 нс. Двумя распространенными тушителями флуоресценции

триптофана являются молекулы воды и белковые группы. На основании исследований бимолекулярного тушения в водном растворе остатки лизина, глутамин, аспарагин и нейтрального гистидина должны быть относительно слабыми тушителями; нейтральные глутаминовая и аспарагиновая кислоты должны быть умеренными тушителями; а тирозин, цистеин, положительно заряженный гистидин и цистин должны быть сильными тушителями белков. Близость индольного кольца к этим тушащим боковым группам будет влиять на время жизни флуоресценции. Особое внимание стоит уделять глутаминовой и аспарагиновой кислотам и гистидину. Ионизированное состояние этих боковых цепей оказывает сильное влияние на способность к тушению, и эти остатки часто имеют аномальные значения  $pK_a$  в белках.

В белках расстояние, специфическая геометрия или локальная полярность могут дополнительно усиливать способность тушить боковых групп аминокислот, например, отрицательно заряженных глутаминовой и аспарагиновой кислоты, серина, треонина, метионина и аргинина. Расстояние и ориентация, несомненно, способны усилить или подавить конкретные механизмы тушения. Взаимодействия в основном состоянии могут стать более значимыми в свернутых белках, где функциональные группы аминокислот окружают индольное кольцо.

Обмен протонами в возбужденном состоянии, вероятно, имеет довольно строгие геометрические требования. А именно, донор протонов должен контактировать с углеродами C2, C4 или C7 индольного кольца в правильной ориентации, чтобы катализировать обмен. Пока неизвестно, могут ли боковые цепи лизина и тирозина тушить флуоресценцию триптофана в пептидах и белках путем протонного обмена. С другой стороны, перенос электронов в возбужденном состоянии предъявляет менее строгие структурные требования и, следовательно, вероятно, является основным механизмом тушения пептидов и белков. Перенос электронов может происходить через пространство или через сопряженные связи на расстояния до 10 Å. Хотя в экспериментах с бимолекулярным тушением, как правило, доминирует один

механизм тушения боковыми цепями, следует помнить, что в белках триптофан будет вовлечён во множественные взаимодействия, приводящие к тушению [14, 23].

Исследование карбоксиангидразы человека с заменой каждого из семи триптофановых остатков на другие аминокислоты показало, что в нативном состоянии в белке присутствуют процессы тушения флуоресценции триптофана и безызлучательный перенос энергии между группами аминокислотных остатков. Это приводит к тому, что флуоресценция белка в нативном состоянии обусловлена всего лишь двумя триптофановыми остатками – в положении 97 и 245 [24].

Известно, что для триптофановых остатков, которые находятся глубоко внутри белковой молекулы, маловероятны процессы тушения растворителем. Флуоресценция внутренних триптофанов слабо зависит от температуры, что согласуется с тушением пептидными связями. Наличие нескольких времен жизни флуоресценции у внутреннего триптофана могут быть объяснены различными микроконформационными состояниями индольного кольца по отношению к соседним пептидным и амидным группам хромофора [23].

В своей работе Y. Chen и M.D. Barkley показали, что N-ацетильные производные глицина, аланина, валина, лейцина, фенилаланина, пролина, гидроксипролина, серина, треонина, метионина и аргинина при нейтральных pH не тушат флуоресценцию 3-метилиндола [14]. Напротив, при pH 5-6 все аминокислоты, исключая фенилаланин и лейцин, тушат триптофановую флуоресценцию за счет переноса электрона в возбужденном состоянии. Для свободных аминокислот тушение определяется переносом протона в возбужденном состоянии, катализируемым протонированной  $\alpha$ -аминогруппой, по аналогии с глицином. Это тушение не определяется боковыми цепями или карбоксилатом [3, 14].

### 1.3. Виды и механизмы денатурации белков

Нативная структура белка – это функционально активная конформация молекулы, формируемая внутримолекулярными взаимодействиями. Температура, рН, тип растворителя являются параметрами, изменение которых приводит к нарушению внутренних связей в белке и, как следствие, к денатурации.

Денатурация белков является кооперативным переходом с одновременным и резким S-образным изменением многих характеристик молекулы. S-образность отражает переход соответствующих характеристик молекулы от тех, что характерны для нативного состояния, в те, что соответствуют денатурированному. Чем уже S-образная кривая, тем более кооперативный переход она описывает, то есть данный переход охватывает сразу много аминокислотных остатков [4].

Тепловая денатурация достигается повышением (понижением) температуры белка до точки плавления. Предполагается, что эффекты гидратации играют основную роль в тепловом разворачивании. Общепринято, что термическое разворачивание происходит главным образом из-за того, что при увеличении температуры меньшее количество молекул воды связано в областях упорядоченной воды вокруг неполярных боковых цепей [25].

Считается, что изменение рН растворителя приводит к денатурации белка по одной основной причине – отталкиванию между одноименно заряженными группами белка из-за изменения концентрации  $H^+$  в среде в большую или меньшую сторону. При низких значениях рН такие аминокислоты, как аспарагиновая и глутаматовая кислоты становятся протонированными. При высоких значениях рН лизин, тирозин и аргинин становятся отрицательно заряженными. В обоих случаях происходит электростатическое отталкивание, которое и приводит к дестабилизации, а затем и денатурации белка [27, 28].



Для химической денатурации мочевиной существует минимум два предположения о механизме этого процесса. Мочевина растворяется в воде в больших количествах и хорошо встраивается в водородные связи воды. Также она является акцептором и донором водородных связей и имеет больше участков для дисперсионного взаимодействия, чем вода. Кроме того, она хорошо взаимодействует с боковыми цепями белков и поэтому накапливается в их окружении. Одно из предположений о механизме денатурации мочевиной – это то, что мочевина вызывает дестабилизацию белка путем изменения структуры воды. Но большинство ученых склоняются к мнению, что мочевина все-таки вызывает денатурацию именно из-за локальных взаимодействий. Химически она похожа на пептидный скелет, а потому может конкурировать за водородные связи, которые стабилизируют вторичную структуру белка ( $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -листы), а также может взаимодействовать с различными боковыми группами аминокислот. Водородные связи мочевины с белком являются важным взаимодействием в процессе денатурации, но все же этого недостаточно, чтобы полностью объяснить дестабилизацию белков в присутствии мочевины [29].

Гуанидин хлорид – также известное химическое соединение, вызывающее денатурацию белков. Молекула данного вещества является заряженной. Механизм денатурирующего эффекта гуанидин хлорида предполагают в том, что гуанидин разрушает нековалентные связи в полипептидной цепи белка и имеет меньшее влияние на незаряженные остатки белка [27].

#### **1.4. Карбоксиангидразы**

Карбоксиангидраза (СА) – фермент, катализирующий обратимую реакцию гидратации/дегидратации углекислого газа:



Данный фермент был обнаружен практически во всех живых организмах. На сегодняшний день у млекопитающих идентифицировано 16 различных изоферментов СА. В целом в семействе генов карбоксиангидразы есть три различные группы изоэнзимов:

- цитоплазматические – включают в себя СА I, II, III, V, VII и XIII; данные изоэнзимы обнаружены в цитоплазме различных тканей, за исключением ограниченного митохондриями СА V;

- мембраносвязанные – состоит из СА IV, IX, XII, XIV и XV; эти изоэнзимы связаны с плазматическими мембранами многих типов тканей;

- последняя группа содержит несколько очень интригующих изоэнзимов, СА VIII, X и XI, которые называются белками, связанными с СА; эти изоэнзимы утратили классическую активность СА – гидратацию / дегидратацию  $\text{CO}_2$  – и не имеют известной физиологической функции; тем не менее, их высоко консервативная природа предполагает очень важную роль у позвоночных [30, 31].

Различные изоферменты СА обнаруживаются во многих различных тканях и участвуют в ряде различных физиологических процессов, включая резорбцию кости, кальцификацию, ионный транспорт, кислотно-щелочной транспорт и ряд различных метаболических процессов. Однако одна из наиболее важных и хорошо изученных ролей СА связана с движением дыхательных газов в организме.

Одну из наиболее важных ролей играют СА в красных кровяных тельцах, где фермент был впервые обнаружен [32]. В эритроцитах СА является строго цитоплазматическим и в основном участвует в процессе транспорта и выделения  $\text{CO}_2$ . Процесс переноса  $\text{CO}_2$  начинается с диффузии молекулярного  $\text{CO}_2$  из тканей в кровоток, а затем в красные кровяные тельца вдоль градиента парциального давления. В красных кровяных тельцах  $\text{CO}_2$  гидратируется до бикарбонат и протон; данный процесс является катализируемым

карбоксиангидразой. Затем оба конечных продукта гидратации  $\text{CO}_2$  удаляются из эритроцитов, позволяя максимальному количеству  $\text{CO}_2$  быть загруженным в кровь. На дыхательной поверхности (жабры, легкие и/или кожа) эти реакции запускаются в обратном направлении, и  $\text{CO}_2$  выводится из организма по градиенту парциального давления [33, 34].

#### 1.4.1. Карбоксиангидраза быка

Карбоксиангидраза быка (BCA II) состоит из одной полипептидной цепи из 259 аминокислотных остатков. Общая форма свернутой молекулы близка к сферической [35]. Молекулярная масса белка составляет 29 кДа [36, 37].

Вторичная структура BCA II представлена четырьмя структурными элементами (рисунок 6): две  $\beta$ -спильки (41 – 84 и 187 – 212 а.о.),  $\alpha\beta$ -спилька (151 – 184 а.о.) и  $\beta$ -лист, состоящий из трех  $\beta$ -стрендов (85 – 155 а.о.). С-конец и N-конец цепи содержат неструктурированные участки 1 – 40 и 213 – 259 а.о. [38].

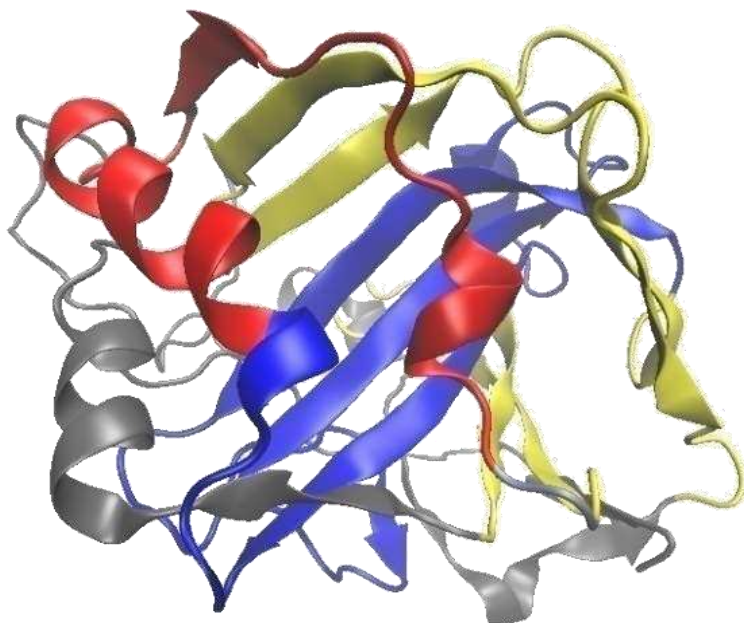


Рисунок 6 – Трехмерная структура карбоксиангидразы быка.  
Цвета обозначены:  $\beta$ -спилька (желтый),  $\alpha\beta$ -спилька (красный),  $\beta$ -лист (синий),  
неструктурированные участки (серый)

Центральная складка белка состоит из 12 цепей параллельных или антипараллельных  $\beta$ -листов, образуя структуру ядра с окружающими  $\beta$ -листы семью  $\alpha$ -спиралями [35]. Активный центр ВСАII образует воронкообразный канал с внешним диаметром 13 Å, который простирается от молекулярной поверхности до центра, а ион цинка расположен в нижней части канала на глубине 10 Å от поверхности [39]. Три первичных лиганда белка (His93, His95, His118) и молекулы воды, расположенные в центре  $\beta$ -листа, координируются с ионом  $Zn^{2+}$  в тетраэдрической геометрии. Вторичные лиганды (Gln91, Glu116, Thr197, Asn242) усиливают основность первичных гистидиновых лигандов, а также помогают их расположению для оптимальной координации иона металла [40].

Ароматические остатки Phe92, Phe94 и Trp96 образуют большой гидрофобный кластер, который закрепляет  $\beta$ -цепь, содержащую His93 и His95, в гидрофобном ядре фермента, и стабилизируют конформацию карбоксиангидразы. Центр связывания субстратов, расположенный на расстоянии 3,4 Å от цинка, образован боковыми цепями аминокислотных остатков Val120, Val142, Leu196 и Trp207 [35]. С-концевая область ВСАII, как и область НСАII, характеризуется уникальным С-концевым узлом, в котором полипептидная цепь пересекает себя таким образом, что один сегмент цепи проходит ниже либо же выше другого сегмента. Топология «узла» ВСА II более жесткая и более стабильная, чем у НСА II [39].

Карбоксиангидраза Б имеет семь триптофановых остатков, которые обуславливают люминесцентные свойства белка. Триптофаны равномерно распределены вдоль цепи ВСА II на следующих структурных элементах:

- неструктурированный участок 1 (Trp4, Trp15),
- $\beta$ -лист (Trp96, Trp122),
- $\beta$ -шпилька 2 (Trp190, Trp207),
- неструктурированный участок 2 (Trp243).

Кинетика рефолдинга карбоксиангидразы быка была изучена различными методами в широком временном диапазоне от миллисекунд до часов. Было показано, что рефолдинг данного белка протекает в три этапа. На первом этапе сворачивания образуются гидрофобные кластеры, состояние цепи становится более компактным. На втором этапе гидрофобные кластеры десольватируются и образуется жесткое гидрофобное ядро подобное нативному состоянию белка. Третий этап сопровождается образованием активного белка с нативной структурой [41, 42].

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Объекты исследования и оборудование

В работе был использован лиофилизированный препарат белка карбоксиангидразы быка (BCA II), предоставленный Институтом белка РАН (г. Пущино), дикого типа и с введенными мутациями [43]. Виды замен аминокислотных остатков на отдельных структурных элементах белка представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Виды замен аминокислотных остатков на отдельных структурных элементах BCA II

Структурный элемент/ диапазон номеров а.о.	Мутация	
	Одиночная	Двойная
$\beta$ -шпилька 1 /41-84	L78A	A53C/A76C
$\beta$ -лист /85-155	L139A	T86C/T124C
$\alpha\beta$ -шпилька /151-181	–	A154C/S181C
$\beta$ -шпилька 2 /187-212	I208A	D188C/K211C

Для регистрации оптических характеристик использовали спектрофотометр Cary 5000 (Agilent Technologies, Australia) и спектрофлуориметр Fluorolog-3 (Horiba, Jobin Yvon, Франция). Для регистрации стационарных спектров флуоресценции использовали ксеноновую лампу. Разрешенные во времени спады флуоресценции регистрировали при возбуждении импульсным диодом NanoLED с максимумом длины волны излучения 296 нм и длительностью импульса 1.2 нс.

Для проведения экспериментов были использованы кварцевые кюветы сечением 10x10 мм объемом 4 мл.

## 2.2. Методика исследования

Растворы белков исследовали в Tris-HCl буфере (20 мМ, рН 8,2). Концентрация белка в кювете составляла около 0,18 мг/мл.

В качестве денатурирующего агента использовали мочевины (Panreac). Белки инкубировали в растворах с концентрацией 0 – 8,5 М при комнатной температуре в течение не менее 18 часов.

Концентрацию ВСА II определяли спектрофотометрически с использованием значения коэффициента экстинкции на длине волны 280 нм:  $\epsilon_{280} = 56000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Концентрации мочевины в растворе определяли с помощью рефрактометра ИРФ-454Б2М (КОМЗ, Россия).

Спектры флуоресценции при стационарном возбуждении при длине волны 295 нм измеряли в диапазоне 300 – 450 нм. Спектральная ширина щелей составляла 2 нм. Спектры были откорректированы с учетом эффекта внутреннего фильтра и фона растворителя [8].

Спектры поглощения регистрировали в диапазоне 200 – 600 нм.

Разрешенные во времени спектры флуоресценции снимали в диапазоне 305 – 417 нм с шагом 4 нм, разрешение составляло 27 пс/канал. Для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококолоидное вещество Ludox. Времена жизни флуоресценции выделяли с помощью метода деконволюции [44]. Наборы кривых спада флуоресценции были проанализированы методами глобального анализа, при котором происходит одновременное описание всей совокупности спадов флуоресценции на разных длинах волн с подбором времен жизни, а также их вкладов на соответствующей длине волны [45].

Спад интенсивности флуоресценции во времени был описан, как сумма экспонент согласно формуле 1.

Вклад временной компоненты в общее время жизни флуоресценции определяли как:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i}. \quad (5)$$

где  $\tau_i$  – время жизни;

$\alpha_i$  – амплитудный коэффициент  $i$ -ой компоненты.

Спектры, ассоциированные с конкретным временем жизни флуоресценции, рассчитывали по формуле:

$$I(\lambda, \tau_i) = I_{ss}(\lambda) f_i(\lambda), \quad (6)$$

где  $I_{ss}(\lambda)$  – стационарный спектр флуоресценции;

$f_i(\lambda)$  – вклад  $i$ -ой компоненты времени жизни на длине волны  $\lambda$  [46].

Изменение положения и формы спектра флуоресценции ВСА II при стационарном возбуждении анализировали по значению центра тяжести, вычисленному по формуле:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_i \lambda_i \cdot I_i}{\sum_i I_i}, \quad (7)$$

где  $I_i$  - интенсивность флуоресценции при длине волны  $\lambda_i$ .



Обработка данных и анализ результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel и Microcal Origin Pro 8.1. S-образные зависимости характеристик флуоресценции белка от концентрации мочевины в области перехода аппроксимировали, используя функцию Больцмана:

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + \exp(\frac{x - x_0}{dx})}, \quad (8)$$

где  $x$  – концентрация мочевины,

$y$  – значение параметра флуоресценции (центр тяжести спектра, время жизни и т.п.).

По результатам аппроксимации анализировали середину перехода ( $x_0$ ) и ширину перехода ( $dx$ ). Относительную ширину перехода каждого белка RW находили делением  $dx$  на характеристику, определенную для дикого типа.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Сравнительный анализ переходов, полученных по спектрам стационарной и время-разрешенной флуоресценции

Были получены следующие характеристики флуоресценции ВСА (дикого типа и мутантных форм) при различных концентрациях мочевины:

- спектры флуоресценции при непрерывном возбуждении, которые характеризовали отношением  $I_{320}/I_{360}$  и положением центра тяжести GC;
- спады флуоресценции при импульсном возбуждении, которые характеризовали временами жизни  $\tau_1$  и  $\tau_2$ .

По зависимостям характеристик флуоресценции от концентрации мочевины были получены кривые перехода для дикого типа ВСА (ВСА<sub>WT</sub>) и мутантных форм белка. Описание кривых перехода функцией Больцмана позволило определить середины переходов, значения которых представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристики переходов ВСА (дикий тип и мутантные формы) при денатурации мочевиной, определённые по различным спектральным параметрам: середина перехода  $S_m$  и относительная ширина RW

Изъята 1 таблица

Середины перехода, вычисленные по параметрам стационарной флуоресценции, указывают на разрыхление белковой глобулы после введения всех одиночных мутаций. Что касается двойных мутаций, то наблюдается неоднозначная картина: в одних случаях разрыхление (для белков с заменами T86C/T124C и D188C/K211C), в других – стабилизация структуры (для белков с мутацией A53C/A76C и A154C/S181C).

Если значение середины перехода говорит о стабильности белка, то о кооперативности перехода можно судить по такому параметру как ширина перехода. Относительная ширина перехода исследуемых белков (по сравнению с переходом дикого типа) также представлена в таблице 3.

Сравнительный анализ относительной ширины перехода ВСА дикого типа и белков с введенными мутациями дает дополнительную информацию о стабильности белка. Так, например, можно говорить не только о дестабилизирующем взаимодействии белковой структуры и денатурирующего агента, но и о «продолжительности» разворачивания белковой молекулы относительно концентрации денатурирующего агента.

Чем больше значение  $RW$ , тем менее кооперативный переход наблюдается у белка, и тем более затянут переход по молям мочевины. То есть от точки концентрации денатурирующего агента, в которой начинается переход, до точки – в которой заканчивается, необходимо большее количество молей для достижения денатурированного состояния.

Разрешенная во времени флуоресценция позволяет определить два времени жизни –  $\tau_1$  (1,5 – 2 нс) и  $\tau_2$  (4,8 – 5,7 нс), и два перехода ВСА, соответственно. Оказалось, что середины переходов, найденные по временам жизни флуоресценции для ВСА<sub>WT</sub>, находятся в хорошем соответствии с переходами, определенными кинетическими методами [17].

Согласно предыдущим исследованиям, сворачивание/разворачивание ВСА II происходит через ряд промежуточных состояний и описывается схемой [47]:



где  $N'$  – нативное состояние без иона  $Zn^{2+}$ ;

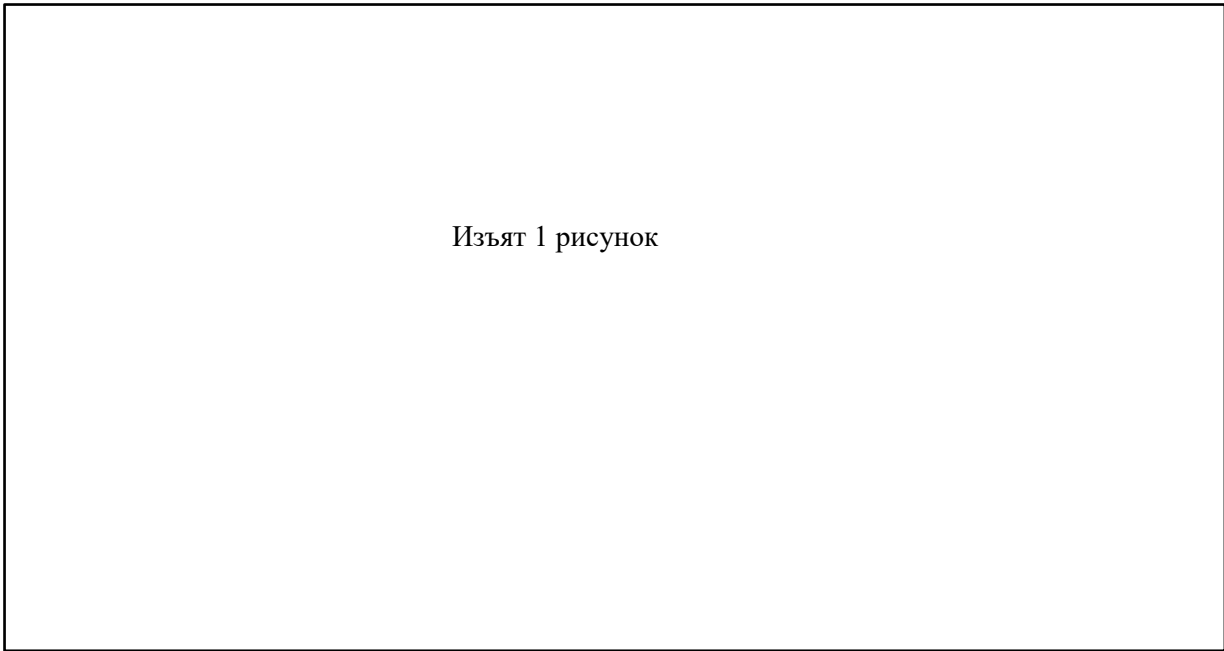
$I$  – интермедиат;

$MG$  – расплавленная глобула;

$U$  – денатурированное состояние.

Согласно [47] переход  $N' \rightleftharpoons I$  имеет середину при 6,2 М мочевины, а переход  $I \rightleftharpoons MG$  – при 5,7 М. По таблице 3 видно, что для белка дикого типа переход по времени жизни  $\tau_1$  хорошо соответствует  $I \rightleftharpoons MG$ , а по  $\tau_2$  –  $N' \rightleftharpoons I$ .

Сопоставление переходов карбоксиангидразы быка дикого типа, полученных по изменению спектра кругового дихроизма [48] и времени жизни  $\tau_1$ , представлено на рисунке 7.



Изъят 1 рисунок

Рисунок 7 – Сопоставление зависимостей сигнала кругового дихроизма ( $\epsilon_{220}$ ) и времени жизни флуоресценции  $\tau_1$  от концентрации мочевины для ВСА<sub>WT</sub> [48]

Совпадение этих переходов позволяет заключить, что изменение времени жизни флуоресценции  $\tau_1$  происходит одновременно с разрушением вторичной структуры ( $\beta$ -структур) белка.

Относительное положение середин переходов карбоксиангидразы быка дикого типа и с введенными мутациями, полученных при анализе таких параметров как  $I_{320}/I_{360}$ ,  $\tau_1$  и  $\tau_2$ , представлены на рисунке 8.

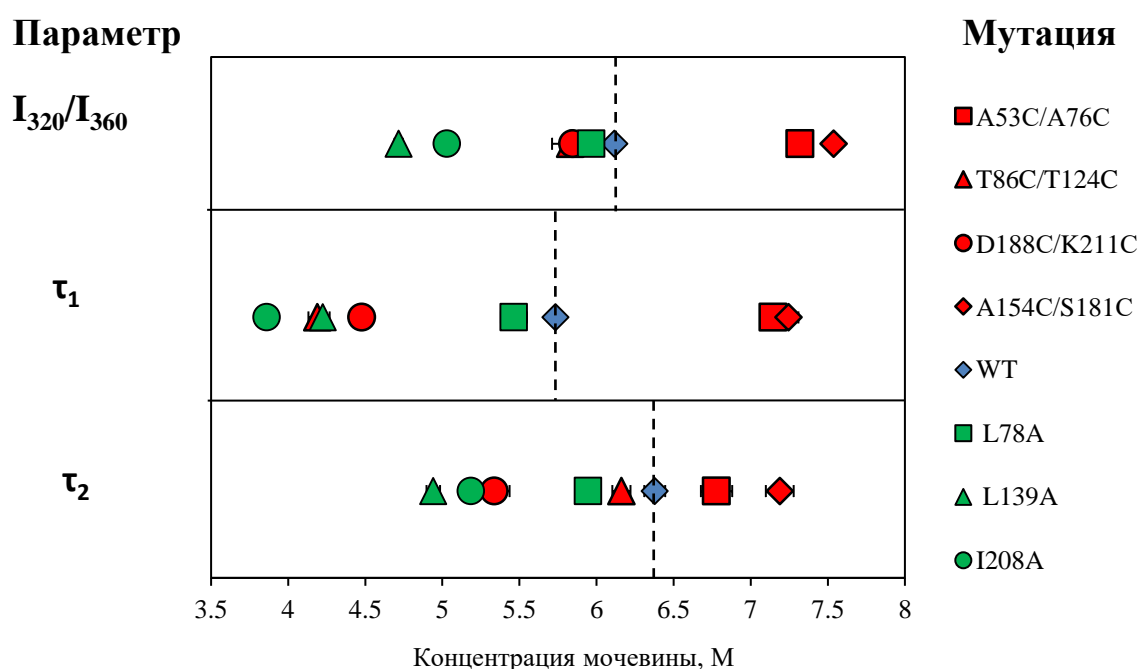


Рисунок 8 – Середины переходов для исследованных белков при денатурации мочевиной.

Штриховой линией отмечено положение перехода для дикого типа.

Сравнительный анализ середины перехода по параметру  $I_{320}/I_{360}$  указывает на дестабилизацию белков с мутациями L139A и I208A, в то время как одиночная замена лейцина на аланин в положении 78 ( $BCA_{L78A}$ ) практически не влияет на стабилизацию белка. Белки с двойными мутациями T86C/T124C и D188C/K211C имеют незначительно сдвинутые середины переходов в сторону меньшей концентрации мочевины. В свою очередь, мутации A53C/A76C и A154C/S181C имеют явный стабилизирующий эффект на структуру белка.

Кривые перехода, построенные по временам жизни флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$ , показывают более детальную картину относительно влияния мутаций на стабильность белка. У белков с введенной одиночной мутацией в положении 139 и 208 происходит значительная дестабилизация интермедиата I (кривая перехода по  $\tau_1$ ) и соответственно вторичной структуры молекулы. Такой же эффект наблюдается у мутантов  $BCA_{T86C/T124C}$  и  $BCA_{D188C/K211C}$ . Что касается мутантов  $BCA_{A53C/A76C}$  и  $BCA_{A154C/S181C}$ , то кривые перехода, построенные по  $\tau_1$ , находятся в хорошем соответствии с переходами, видимыми по параметру стационарной флуоресценции  $I_{320}/I_{360}$ . Наложения кривых переходов представлены на рисунке 9.

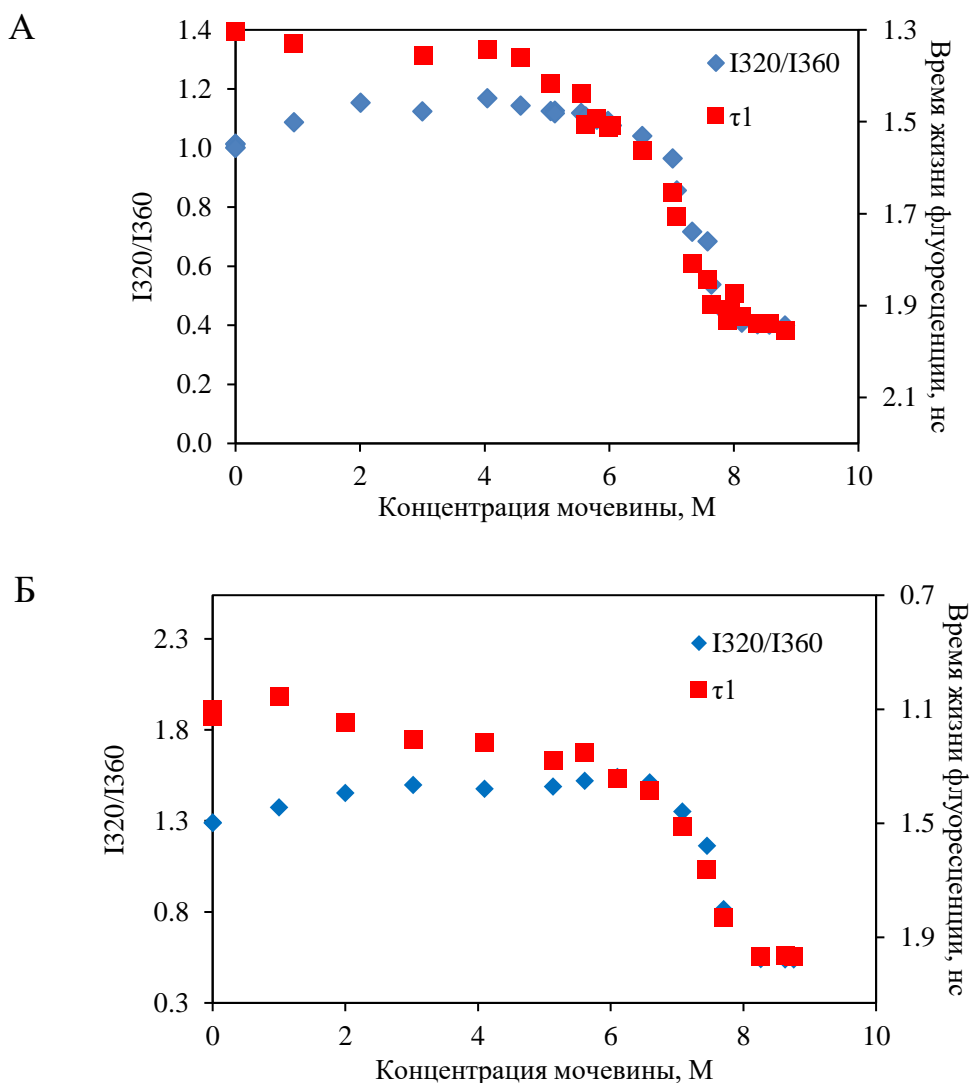


Рисунок 9 – Сопоставление зависимостей  $I_{320}/I_{360}$  и  $\tau_1$  от концентрации мочевины для  $BCA_{A53C/A76C}$  (А) и  $BCA_{A154C/S181C}$  (Б)

Совпадение данных кривых говорит о том, что либо компонента с временем жизни  $\tau_1$  имеет подавляющий спектральный вклад в флуоресценцию этих белков, либо оба перехода белка, видимые по временам жизни, происходят в неразличимо близком диапазоне концентраций мочевины.

Кривая перехода по  $\tau_2$  отражает переход белка из нативного состояния ( $N$ ) в интермедиат I. Вообще, считается, что любые замены в аминокислотной последовательности белка будут влиять на стабильность нативного состояния, так как меняются различные характеристики внутри молекулы: полярность, плотность упаковки, доступность растворителю [7]. По полученным нами данным можно утверждать, что мутации L139A, I208A и D188C/K211C значительно влияют на стабильность белка уже в нативном состоянии, в то время как мутации L78A и T86C/T124C дестабилизируют молекулу незначительно. Интересен тот факт, что при наблюдаемом незначительном разрыхлении нативного состояния введением двойной мутации на  $\beta$ -листе (T86C/T124C) происходит явная дестабилизация интермедиата I. В то же время, разрыхление  $\beta$ -шпильки 1 одиночной мутацией L78A, лишь незначительно сдвигает середину перехода по  $\tau_1$  в сторону меньшей концентрации мочевины. Стабилизация нативного состояния приводит к переходу  $I \rightleftharpoons MG$  при большей концентрации мочевины и, как следствие, к общей стабилизации структуру молекулы белка.

## **3.2. Анализ кривых перехода, полученных по спектрам время-разрешенной флуоресценции**

### **3.2.1. Мутации L78A и A53C/A76C**

Мутации L78A и A53C/A76C были произведены на  $\beta$ -шпильке 1 белка (таблица 2). Кривые перехода, построенные по временам жизни, для  $BCA_{WT}$ ,  $BCA_{L78A}$  и  $BCA_{A53C/A76C}$  представлены на рисунке 10.

Лейцин является довольно объемным аминокислотным остатком по сравнению с аланином, что может объяснять дестабилизацию нативного

состояния ВСА при такой замене аминокислот. По рисунку 10 мы видим, что денатурация ВСА<sub>L78A</sub> начинается при меньшей концентрации мочевины по сравнению с диким типом, как по  $\tau_1$ , так и по  $\tau_2$ .

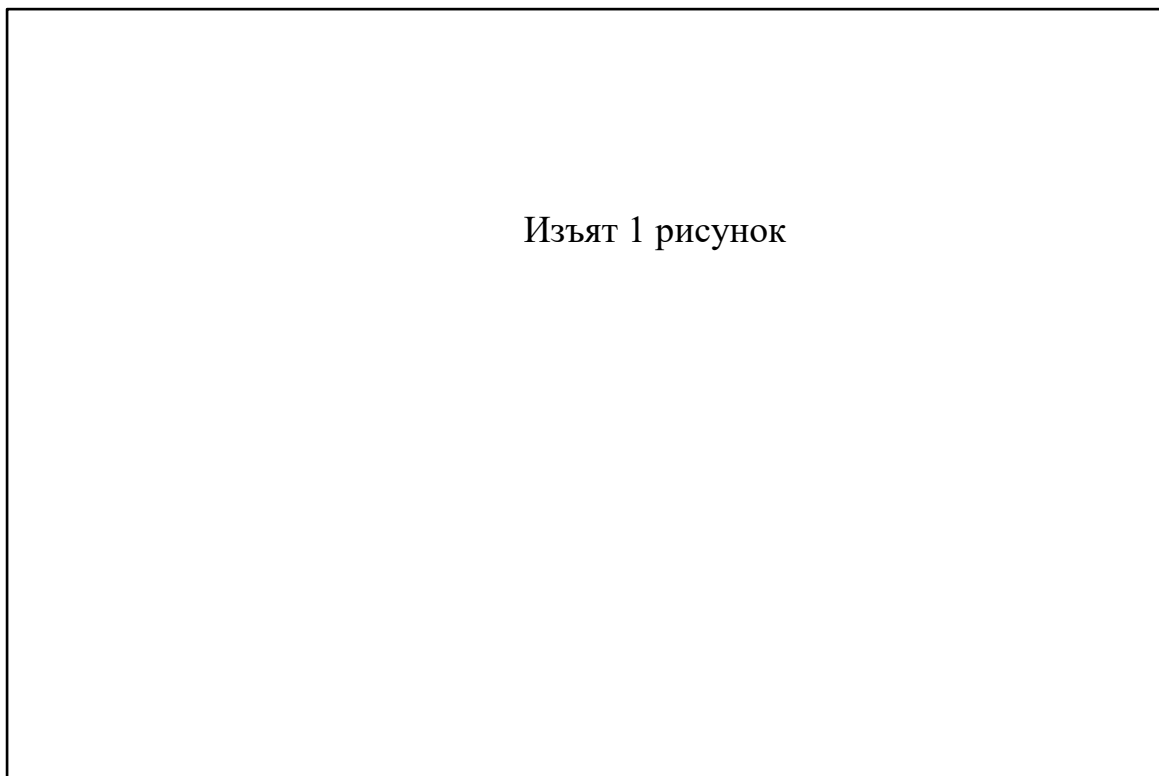


Рисунок 10 – Сопоставление зависимостей  $\tau_1$  (А) и  $\tau_2$  (Б) от концентрации мочевины для ВСА<sub>WT</sub>, ВСА<sub>L78A</sub> и ВСА<sub>A53C/A76C</sub>

При дестабилизации структуры молекулы белка наблюдается менее кооперативный переход из нативного состояния в денатурированное ( $RW_{WT} < RW_{L78A}$ ), как по  $\tau_1$ , так и по  $\tau_2$ . При переходе  $N' \rightarrow I$  снижение концентрации белка в состоянии  $N'$  начинается при меньшей концентрации мочевины по сравнению с ВСА<sub>WT</sub>, что может объясняться менее плотной упаковкой структуры белка в связи с введением мутации L78A. Исчезновение состояния  $N'$  при небольших концентрациях мочевины влечет за собой также дестабилизацию состояния I.

При введении двойной мутации аминокислотные остатки аланина в положениях 53 и 76 были заменены на цистеины. В результате, помимо очевидного закрепления  $\beta$ -шпильки дополнительным цистеиновым мостиком, можно предположить, что замена аланина на аминокислоту, занимающую



больший объем, влечет за собой более плотную упаковку молекулы белка, тем самым создавая сложности для взаимодействия с растворителем внутренних связей белка. Возможно, именно этот эффект позволяет переходу  $N' \rightarrow I$  (предположительно наблюдаемому по изменению  $\tau_2$ ) заканчиваться при большей концентрации денатурирующего агента, а состояние  $I$  становится более стабильным.

### 3.2.2. Мутации L139A и T86C/T124C

Кривые перехода, построенные по временам жизни, для  $BCA_{WT}$ ,  $BCA_{L139A}$  и  $BCA_{T86C/T124C}$  представлены на рисунке 11.

Одиночная мутация с заменой лейцина на аланин в положении 139 вносит дестабилизирующий эффект, судя как по  $\tau_1$ , так и по  $\tau_2$ . Как и при мутации L78A можно предположить разрыхление белковой структуры и, как следствие, начало перехода при меньших концентрациях мочевины. Судя по ширине перехода, переход  $I \rightarrow MG$  при данной мутации является более кооперативным, чем переход  $N' \rightarrow I$ .

Изъят 1 рисунок

Рисунок 11 - Сопоставление зависимостей  $\tau_1$  (А) и  $\tau_2$  (Б) от концентрации мочевины для  $BCA_{WT}$ ,  $BCA_{L139A}$  и  $BCA_{T86C/T124C}$

Получено, что мутация T86C/T124C также делает белок менее стабильным. Треонин является полярной аминокислотой, цистеин напротив – неполярной. Вероятно, такая замена на  $\beta$ -листе приводит к локальному изменению полярности в структуре белка, что приводит к дестабилизации нативного состояния.

В белке с мутацией T86C/T124C переход I  $\rightarrow$  MG начинается при концентрации мочевины около 3 М, и N'  $\rightarrow$  I – около 4,5 М. Такой эффект «непоследовательного» разворачивания белка можно объяснить сильным разрыхлением структуры  $\beta$ -листа в связи с изменением полярности на данном элементе.

### 3.2.3. Мутации I208A и D188C/K211C

Одиночная мутация I208A была введена на  $\beta$ -шпильке 2 ВСА (таблица 2). Изолейцин также как и аланин является неполярной аминокислотой, но имеет радикал крупнее, чем у аланина. Различие в размерах аминокислот, возможно, приводит к разрыхлению структуры. На рисунке 12 изображены кривые перехода для ВСА по  $\tau_1$  и  $\tau_2$ .

Изъят 1 рисунок

Рисунок 12 - Сопоставление зависимостей  $\tau_1$  (А) и  $\tau_2$  (Б) от концентрации мочевины для ВСА<sub>WT</sub>, ВСА<sub>I208A</sub> и ВСА<sub>D188C/K211C</sub>

Значения относительной ширины перехода, представленные в таблице 3, указывают на не кооперативный переход белка по  $\tau_1$  и менее кооперативный, чем у ВСА<sub>WT</sub> по  $\tau_2$ . Одиночная мутация вносит явную дестабилизацию в белковую структуру, что приводит к началу денатурации на небольших концентрациях мочевины (2 – 3 М).

Двойная замена в положениях 188 и 211 на  $\beta$ -шпильке 2 белка также приводит к дестабилизации структуры карбоксиангидразы. Можно предположить, что причиной этому является не только замена полярных аминокислот (аспарагиновая кислота, лизин) на неполярные (цистеин), то есть изменение локальной полярности в структуре, но так же и различие размеров взаимозаменяемых аминокислот. Цистеин обладает радикалом небольших размеров, в отличие от лизина и аспарагиновой кислоты.

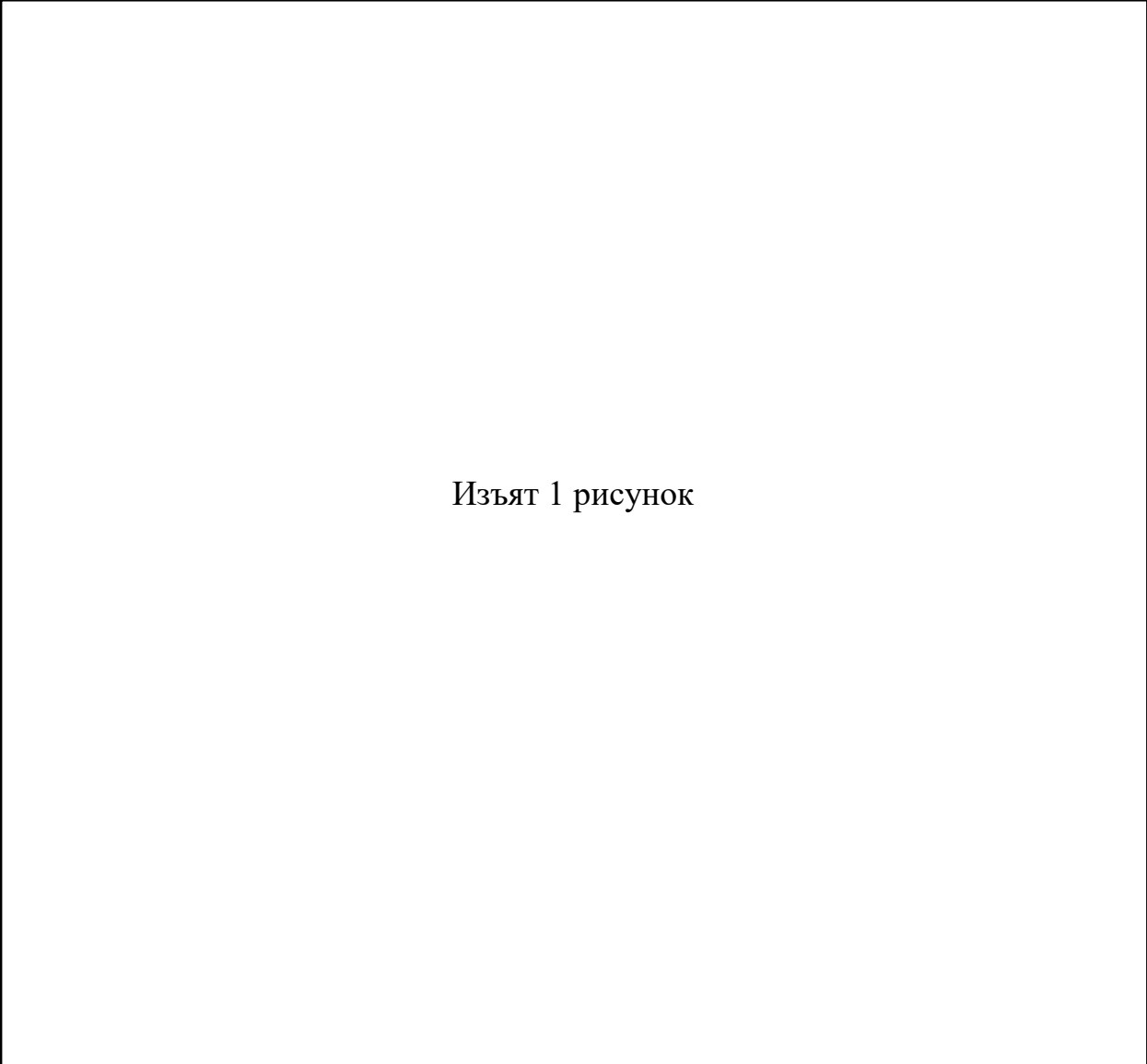
Двойная мутация в большей степени влияет на состояние I белка, сдвигая начало денатурации на 2,5 М мочевины и изменяя характер перехода на менее кооперативный по сравнению с диким типом.

#### **3.2.4. Мутации: A53C/A76C, T86C/T124C, A154C/S181C, D188C/K211C**

На  $\alpha\beta$ -шпильке карбоксиангидразы была произведена двойная замена аминокислотных остатков в положениях 154 и 181, которая привела к увеличению стабильности белка по сравнению с диким типом. Кривые перехода белков представлены на рисунке 13.

В положении 154 остаток аланина был заменен на остаток цистеина, то есть неполярная аминокислота с небольшим размером радикала, была заменена на неполярную аминокислоту с радикалом большего размера. В положении 181 серин был заменен на цистеин. Серин является полярной аминокислотой.

Можно предположить, что мутации, которые влекут за собой изменений полярности (T86C/T124C, D188C/K211C) и размеров радикалов аминокислотных остатков (D188C/K211C) приводят к дестабилизации структуры молекулы белка в целом, даже, несмотря на образование цистеиновых мостиков. Незначительное изменение размеров радикалов аминокислотных остатков (A53C/A76C, A154C/S181C) компенсируется образованием цистеиновых мостиков в структурном элементе молекулы и приводит к стабилизации белка.



Изъят 1 рисунок

Рисунок 13 - Сопоставление зависимостей  $\tau_1$  (А) и  $\tau_2$  (Б) от концентрации мочевины для ВСА<sub>WT</sub> и белка с введенными двойными мутациями

### **3.3. Последовательность разворачивания элементов вторичной структуры ВСА при денатурации мочевиной**

Неоднозначное влияние введенных двойных мутаций на стабильность структуры ВСА, а также разрыхление структуры одиночными мутациями позволяет высказать предположения о последовательности разворачивания структурных элементов белка.

Анализируя значения середины перехода, относительной ширины перехода, а также концентрации мочевины, при которой начинается переход, можно сделать выводы, что мутации, введенные в белковую глобулу имеют наименьшее влияние на те структурные элементы белка, которые разворачиваются в первую очередь. То есть разрыхление глобулы приводит лишь к сдвигу начала перехода в сторону меньшей концентрации мочевины. Напротив, если мутация касается тех элементов, которые при денатурации разворачиваются в последнюю очередь, то происходит дестабилизация структуры белка и, как следствие, изменение пути разворачивания.

В нашем случае можно предположить, что участки цепи 53-76 и 154-181 разворачиваются на первых стадиях денатурации, то есть данный переход затрагивает такие структурные элементы белка как  $\beta$ -шпилька 1 и  $\alpha\beta$ -шпилька. Участки 86-124 и 188-211 разворачиваются в последнюю очередь ( $\beta$ -лист и  $\beta$ -шпилька 2) именно поэтому введение мутаций на данных участках цепи может привести к более выраженной дестабилизации структуры белка, чем на других [43].

### **3.4. Влияние растворов мочевины на время жизни флуоресценции триптофана**

Были измерены времена жизни флуоресценции триптофана в растворах мочевины с концентрацией 0 – 8,5 М.

Изменение времени  $\tau_1$  для триптофана лежит в диапазоне от 2,77 нс до 3,3 нс. Значение времен жизни в буферном растворе (в отсутствие мочевины)

согласуется с литературными данными для триптофана в водном растворе ( $\tau_1 = 2,8$  нс) [18-20].

Сопоставление зависимостей времени жизни флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  белков и триптофана в растворе от концентрации мочевины представлено на рисунке 14.

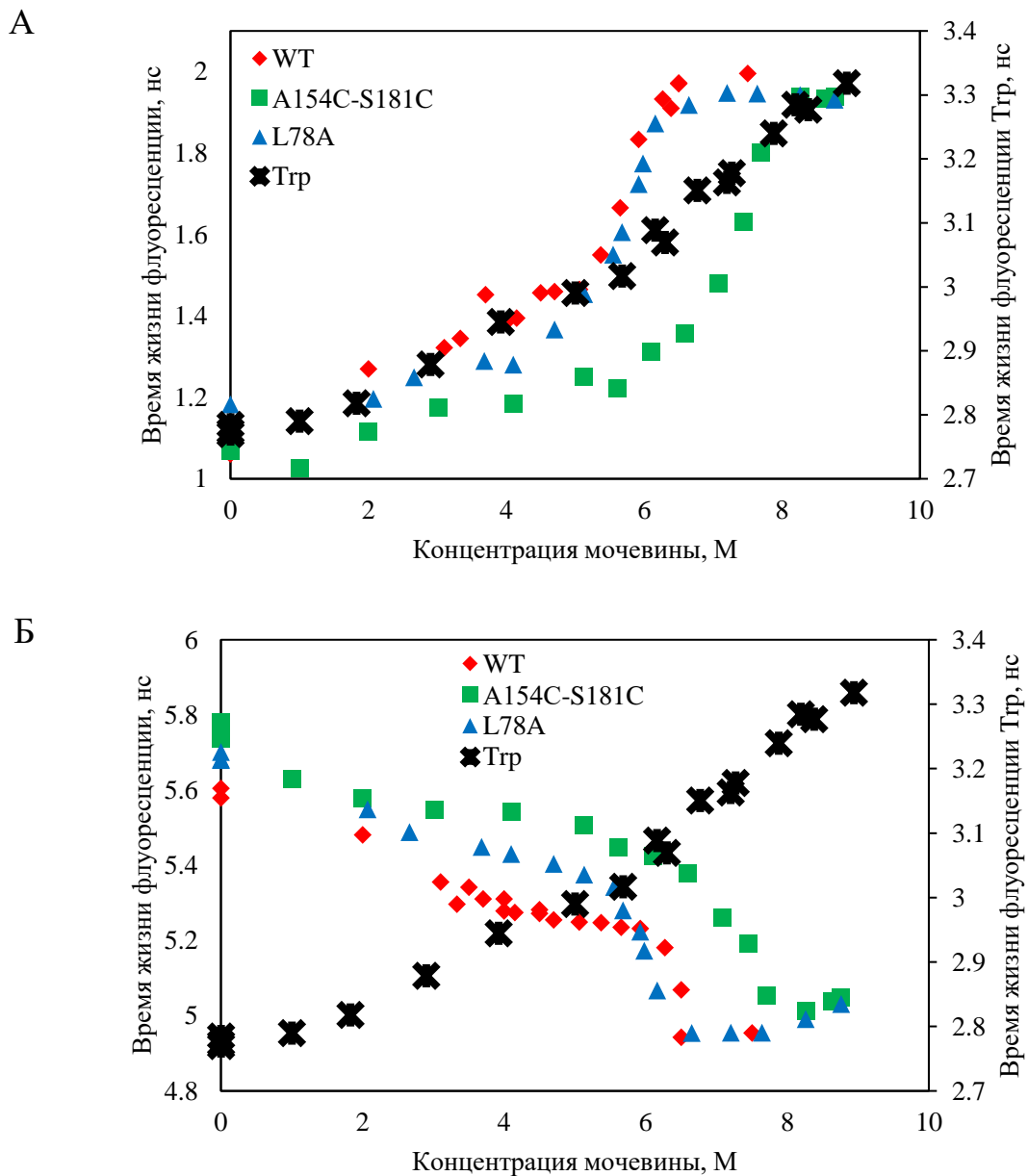


Рисунок 14 - Сопоставление зависимостей времени жизни флуоресценции  $\tau_1$  (А) и  $\tau_2$  (Б) белков и триптофана в растворе от концентрации мочевины

Сопоставляя кривые времени жизни флуоресценции белков и триптофана можно сделать вывод, что при концентрации мочевины от 0 до 4 М время жизни  $\tau_1$  имеет тенденцию линейного роста под влиянием, в большей степени, концентрации мочевины. Аналогичная картина наблюдается и на кривой времени жизни флуоресценции  $\tau_2$  белков при концентрации мочевины более 8 М, когда все структурные переходы белков уже закончены. Стоит отметить, что влияние растворителя на триптофановую флуоресценцию незначительно по сравнению с влиянием белкового окружения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование было направлено на определение стадий разворачивания белковых макромолекул с помощью время-разрешенной спектроскопии. Анализ кривых перехода позволяет определить характер влияния введенных мутаций на стабильность структуры белка.

Были изучены время-разрешенные характеристики карбоксангидразы быка дикого типа и с введенными мутациями в условиях равновесной денатурации. Определены времена жизни флуоресценции, построены кривые перехода и проанализированы их изменения в зависимости от введенной мутации в структуре белка.

На основании полученных в работе результатов были сделаны следующие выводы:

1. изменение времени  $\tau_1$  характеризует конформационные изменения, сопровождающиеся потерей вторичной структуры ВСА, а изменение  $\tau_2$  – переход  $N' \rightleftharpoons I$ ;

2. сравнительный анализ характеристик перехода позволяет определить последовательность разворачивания участков цепи ВСА:  $\beta$ -шпилька 1 и  $\alpha\beta$ -шпилька, вероятно, разворачиваются на начальных стадиях денатурации, в то время как  $\beta$ -лист и  $\beta$ -шпилька 2 разворачиваются в последнюю очередь;

3. увеличение концентрации мочевины приводит к росту времени жизни триптофана в растворе, что, вероятно, отражается на изменении  $\tau_1$  ВСА при концентрации мочевины от 0 – 4 М, и  $\tau_2$  при концентрации > 8 М.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СА – карбоксиангидраза

BCA<sub>II</sub> – карбоксиангидраза быка

BCA<sub>WT</sub> – дикий тип карбоксиангидразы Б

BCA<sub>L78A</sub> – карбоксиангидраза Б с заменой в положении 78 лейцина на аланин

BCA<sub>L139A</sub> – карбоксиангидраза Б с заменой в положении 139 лейцина на аланин

BCA<sub>I208A</sub> – карбоксиангидраза Б с заменой в положении 208 изолейцина на аланин

BCA<sub>A53C/A76C</sub> – карбоксиангидраза Б с заменой в положениях 53 и 76 аланина на цистеин

BCA<sub>T86C/T124C</sub> – карбоксиангидраза Б с заменой в положениях 86 и 124 треонина на цистеин

BCA<sub>A154C/S181C</sub> – карбоксиангидраза Б с заменой в положении 154 аланина на цистеин и в положении 181 серина на цистеин

BCA<sub>D188C/K211C</sub> – карбоксиангидраза Б с заменой в положении 188 аспарагиновой кислоты на цистеин и в положении 211 лизина на цистеин

$I_{320}/I_{360}$  – отношение интенсивности спектра излучения на длине волны 320 нм к 360 нм

$\tau$  – время жизни флуоресценции, нс

$S_m$  – середина перехода

RW – относительная ширина перехода

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Kuwajima, K. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular protein structure / K. Kuwajima // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 1989. – V. 6. – p. 87-103.
2. Privalov P. L. Intermediate states in protein folding // *Journal of molecular biology*. – 1996. – V. 258. – p. 707-725.
3. Пермяков, Е.А. Метод собственной люминесценции белка / Е.А. Пермяков. - М.: Наука, 2003. - 189 с.
4. Финкельштейн, А. В. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын – 3-е изд., испр. и доп. - М. : КДУ, 2012. – 456 с.
5. Beechem, J. M. Time-resolved fluorescence of proteins / J. M. Beechem, L. Brand // *Ann. Rev. Biochem.* – 1985. – V. 54. – p. 43 – 71
6. Engelborghs, Y. The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins / Y. Engelborghs // *Spectrochimica Acta Part A*. – 2001. – V. 57. – p. 2255-2270
7. Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy / J.R. Lakowicz. – New York: Springer Science, 2006
8. Векшин, Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров / Н.Л. Векшин. – Пущино: ООО «Фотон век», 2014. – 188 с.
9. Баренбойм, Г. М. Люминесценция биополимеров и клеток / Г.М. Баренбойм, А.Н. Доманский, К.К. Туроверов; Отв. ред. М.В. Волькенштейн; АН СССР. Ин-т цитологии. - М.-Л. : Наука, 1966. - 232 с.
10. Владимиров, Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков / Ю.А. Владимиров - М.: Наука, 1965. – 232 с.
11. Teale, F. W. J. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids / F. W. J. Teale, G. Weber // *Bioch.* – 1957. – V. 65. – p. 476 – 482

12. Бенсассон, Р. Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз: применение в биохимии и медицинской химии / Р. Бенсассон, Э. Лэнд, Т. Траскот – пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 98 с.
13. PFAST: Protein Fluorescence and Structure Toolkit [электронный ресурс] : база данных о свойствах флуоресценции белка. – Режим доступа: <http://pfast.phys.uri.edu>.
14. Chen, Y. Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins / Y. Chen, M.D. Barkley // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – p. 9976-9982
15. Burstein, E. A. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules / E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, M. N. Ivkova // *Photochemistry and Photobiology*. – 1973. – V. 18. – p. 263 – 279
16. Демченко, А. П. Люминесценция и динамика структуры белков / А. П. Демченко – Киев : Наук. думка, 1988. – 280 с.
17. Nemtseva, E. Fluorescence lifetime components reveal kinetic intermediate states upon equilibrium denaturation of carbonic anhydrase II / E. Nemtseva, O. Lashchuk, M. Gerasimova, T. Melnik, G. Nagibina, B. Melnik // Submitted to *Methods and Applications in Fluorescence*. – 2017. – V. 6. – p. 1 - 19
18. Pace, C.N. How to measure and predict the molar absorption coefficient of protein / C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee // *Protein Science*. – 1995. – V. 4. – p. 2411-2423
19. Schmid, F.-X. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry / F.-X. Schmid // *Encyclopedia of Life Sciences*. – 2001. – p. 1-4
20. Sweeney, J. A. Tryptophan UV Resonance Raman Excitation Profiles / J. A. Sweeney, S. A. Asher // *American Chemical Society*. – 1990. – V. 94. – p. 4784-4791
21. Albani, J.R. Fluorescence lifetimes of tryptophan: structural origin and relation with  $S_0 \rightarrow 1 L_b$  and  $S_0 \rightarrow 1 L_a$  transitions / J. R. Albani // *J. Fluoresc.* – 2009. – V. 19. – p. 1061-1071

22. Hellings, M. The Dead-End Elimination Method, Tryptophan Rotamers, and Fluorescence Lifetimes / M. Hellings, M. De Maeyer, S. Verheyden // *Biophysical Journal*. – 2003. – V. 85. – p. 1894 – 1902
23. Chen, Y. The Peptide Bond Quenches Indole Fluorescence / Y. Chen, B. Liu, H.-T. Yu // *American Chemical Society*. – 1996. – V. 118. - № 39. – p. 9271-9278
24. Mirtensson, L.-G. Contribution of Individual Tryptophan Residues to the Fluorescence Spectrum of Native and Denatured Forms of Human Carbonic Anhydrase II / L.-G. Mirtensson, P. Jonasson, P.-O. Freskgard // *Biochemistry*. – 1995. – V. 34. - № 3. – p. 1011-1021
25. Kishore, D. A  $\beta$ -galactosidase from chick pea (*Cicer arietinum*) seeds: Its purification, biochemical properties and industrial applications / D. Kishore, A. M. Kayastha // *Food Chemistry*. – 2012. V. – 134. – p. 1113 – 1122
26. Fitter, J. A Measure of Conformational Entropy Change during Thermal Protein Unfolding Using Neutron Spectroscopy / J. Fitter // *Biophysical Journal*. – 2003. – V. 84. – p. 3924 – 3930
27. Tanford, C. Protein Denaturation / C. Tanford // *Advances in Protein Chemistry*. – 1968. – V. 23. – p. 121 – 282
28. Fersht, A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding / A. Fersht. – USA: W. H. Freeman and Company, 1999. – p. 631
29. Canchi, D. R. Cosolvent Effects on Protein Stability / D. R. Canchi<sup>1</sup>, A. E. Garcia // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2013. – V. 64. – p. 273 – 293
30. Tashian, R.E. The Carbonic Anhydrases: New Horizons / R.E. Tashian, D. Hewett-Emmett, N.D. Carter // *Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs) and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains* / W.R. Chegwidden, N.D. Carter, Y. H. Edwards. – Berlin: Birkhauser, Basel, 2000. – p. 105 – 120
31. Tashian, R.E. The Carbonic Anhydrases: Widening Perspectives on Their Evolution, Expression and Function / R.E. Tashian // *BioEssays*. – 1989. – V. 10. – p. 186-192

32. Brinkman, R. The CO<sub>2</sub> catalyst present in blood / R. Brinkman, R. Margaria, N.U. Meldrum // *J. Physiol.* – 1932. – V. 75. – p. 3–4
33. Esbaugh, A.J. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates / A.J. Esbaugh, B.L. Tufts // *Respiratory Physiology & Neurobiology.* – 2006. – V. 154. – p. 185-198
34. Swenson, E.R. The Carbonic Anhydases: New Horizons / E.R. Swenson // *Respiratory and renal roles of carbonic anhydrase in gas exchange and acid base regulation* / W.R. Chegwidden, N.D. Carter, Y. H. Edwards. – Berlin: Birkhauser, Basel, 2000. – p. 281 – 342
35. Chiuri, R. Exploring Local Flexibility/Rigidity in Psychrophilic and Mesophilic Carbonic Anhydases / R. Chiuri, G. Maiorano, A. Rizzello et al. // *Biophysical Journal* – 2009. – V. 96, №4. – p. 1586–1596
36. Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase / Lindskog, S // *Pharmacol. Ther.* - 1997. – V. 74, №1. – p. 1 – 20
37. Bijari, N. Spectroscopic and molecular modeling studies on binding of dorzolamide to bovine and human carbonic anhydrase II / N. Bijaria, S. Ghobadia, H. Mahdiunia, R. Khodarahmib, S. A. Ghadami // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2015. - №80. – p. 189 – 199
38. Protein Data Bank [сайт] : структура карбоксиангидразы Б 1v9e. – Режим доступа: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
39. Saito, R. Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å / R. Saito, T. Sato, A. Ikai, N. Tanaka // *Acta Crystallographica.* – 2004. - № D60. – p. 792 – 795
40. Huang, C. Reversal of the Hydrogen Bond to Zinc Ligand Histidine-119 Dramatically Diminishes Catalysis and Enhances Metal Equilibration Kinetics in Carbonic Anhydrase II / C. Huang, C. A. Lesburg, L. L. Kiefer // *Biochemistry* – 1996. – V. 35, № 11 – p. 3439-3446
41. McCoy, L. F., Jr. Multiparameter kinetic study on the unfolding and refolding of bovine carbonic anhydrase B / L. F. McCoy, Jr., E. S. Rowe, K.-P. Wong // *Biochemistry.* – 1980. - №19. – p. 4738 – 4743

42. Semisotnov, G. V. Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B / G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, V. P. Kutysenko, B. Ebert, J. Blanck, O. B. Ptitsyn // FEBS. – 1987. – V. 224, №1. – p. 9 – 13

43. Мельник, Б.С. Подход, позволяющий определить последовательность разрушения структурных элементов белка при его разворачивании. Исследование карбоксиангидразы Б / Б.С. Мельник, Г.С. Нагибина, А.С. Глухов, Т.Н. Мельник // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 6. – С. 1098 – 1108

44. Ameloot, M. Extension of the performance of Laplace deconvolution in the analysis of fluorescence decay curves / M. Ameloot, H. Hendrickx // Biophys. J. – 1983. – V. 44 (1). – p. 27 - 34

45. Knutson, J. R. Simultaneous analysis of multiple fluorescence decay curves: A global approach / J. R. Knutson, J. M. Beechem, L. Brand // Chem. Phys. Lett. – 1983. – V. 102 (6). – p. 501 – 507

46. Немцева, Е. В. Сходство спектральных компонент с индивидуальным временем жизни для триптофановой флуоресценции белков разной сложности / Е.В. Немцева, О.О. Лашук, М.А. Герасимова // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 2. – 231 – 238 с.

47. Melnik, B.S. Multy-state protein: Determination of carbonic anhydrase free-energy landscape / B.S. Melnik, V.V. Marchenkov, S.R. Evdokimov // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2008. – V. 369. – p. 701-706

48. Мельник, Б.С. Неопубликованные данные

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Кратасюк В.А. Кратасюк

«26» июни 2019 г.

### МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние мутаций на стадии разворачивания карбоксиангидразы Б:  
метод времён жизни собственной флуоресценции белка

03.04.02 Физика

03.04.02.01 Биофизика

Научный руководитель Немцева с.н.с., канд. физ.-мат. наук Е.В. Немцева

Выпускник

Карузина

Н.Е. Карузина

Рецензент

Мельник

д-р физ.-мат. наук

Б.С. Мельник

Красноярск 2018