

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В.А. Кратасюк
подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 20 __ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Изменение стационарных и время-разрешенных характеристик триптофановой флуоресценции белков в ходе равновесной денатурации

03.04.02 Физика
03.04.02.01 Биофизика

Научные руководители	_____	<u>с.н.с., к.ф.-м.н.</u>	<u>Е.В. Немцева</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
	_____	<u>ст. пр.</u>	<u>М.А. Герасимова</u>
	подпись, дата	должность	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>О.О. Лащук</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>д-р физ.-мат. наук</u>	<u>Б.С. Мельник</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Изменение стационарных и время-разрешенных характеристик триптофановой флуоресценции белков в ходе равновесной денатурации» содержит 55 страниц текстового документа, 26 рисунков, 4 таблицы, 6 формул, 31 использованный источник.

СОБСТВЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ БЕЛКА, ТРИПТОФАН, ВРЕМЯ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, МОЧЕВИНА, КАРБОКСИАНГИДРАЗА Б, БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА, РАВНОВЕСНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ.

Целью данного исследования является оценка информативности методов стационарной спектроскопии и спектроскопии с высоким временным разрешением для определения структурных переходов многотриптофановых белков в процессе равновесной денатурации на примере карбоксиангидразы Б быка и бактериальной люциферазы *P. leiognati*.

[Изъято 2 абзаца]

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 Литературный обзор	8
1.1 Собственная флуоресценция белков.....	8
1.1.1 Триптофан.....	8
1.1.2 Тирозин	10
1.1.3 Фенилаланин	12
1.2 Особенности белковой флуоресценции и спектральные классы триптофановых остатков.....	13
1.8 Стационарная и спектроскопия с временным разрешением.....	17
1.3 Время жизни флуоресценции	17
1.3.1 Времена жизни индола и триптофана в водном растворе	18
1.3.2 Время жизни триптофана в белках	19
1.4 Нативная и денатурированная формы белка.....	20
1.4.1 Методы денатурации белков	22
1.5 Методы определения стадий денатурации белков.....	23
1.6 Карбоксиангидраза Б	23
1.7 Бактериальная люцифераза.....	24
2 Материалы и методы	26
2.1 Материалы и методика эксперимента	26
2.2 Оборудование	27
2.3 Метод счета фотонов с временной корреляцией.....	27
2.4 Обработка данных.....	29

3 Результаты и обсуждение.....	31
3.1 Анализ изменения стационарных спектров поглощения и испускания люциферазы и карбоксиангидразы при денатурации.....	31
3.2 Анализ разрешенных по времени спектров флуоресценции люциферазы и карбоксиангидразы	32
3.3 Изменение характеристик стационарной флуоресценции люциферазы и карбоксиангидразы при равновесной денатурации.....	34
3.4 Изменение характеристик время-разрешенной флуоресценции люциферазы и карбоксиангидразы при равновесной денатурации.....	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	35
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	37

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач биофизической химии является поиск ответа на вопросы, каким образом происходит сворачивание белка в его активную форму, и как аминокислотная последовательность первичной структуры определяет пространственное расположение цепи белка. Из-за доступности большого количества возможных структур даже для полипептидной цепи средней длины, механизм случайного поиска нужной конформации в процессе укладки белка маловероятен, поэтому предполагается существование неслучайного пути фолдинга. Следовательно, основным интересом представляет изучение возможных промежуточных состояний, формирующихся при переходе от развернутой структуры к структуре белка в его нативном активном состоянии [1, 2].

Стабильность нативной структуры белка является функцией таких параметров как рН, температура, ионная сила раствора и его химический состав, и изменение этих параметров влияет на различные виды связей, обуславливающих стабильность. Количественный анализ роли данных переменных в формировании структуры белка является предпосылкой в описании сил, ответственных за конформационную стабильность. Основным методом исследований в этой области является оценка конформационных изменений, происходящих в результате воздействия на белковую глобулу различных денатурирующих агентов или при изменении температурного режима [2, 3].

В процессе денатурации многие физические характеристики белка претерпевают изменение. Ряд методов используется для исследования процессов разворачивания белковых структур, в том числе спектроскопия кругового дихроизма, флуоресцентная спектроскопия (включая поляризационную), ЯМР, и другие [4].

Изучение структурных параметров и динамики, а также предсказания структурных изменений в белках с помощью спектроскопических методов, основывается на использовании как внешних (ковалентных и нековалентных)

так и внутренних (триптофан, тирозин, фенилаланин, флавинадениндинуклеотид и т.д.) флуорофоров. Такие спектральные характеристики флуорофоров, как спектры поглощения и испускания, квантовые выходы, поляризация, времена жизни, позволяют получить необходимую информацию о фотофизике системы и взаимодействиях флуорофора со своим окружением. Использование спектроскопии с высоким временным разрешением позволяет проводить оценку микрополяриности, микровязкости, сольватационной динамики, а также определять пути релаксации возбужденных состояний, изучать кинетику различных процессов в субпикосекундном и микросекундном масштабе, что делает ее незаменимой при изучении физических, химических и биологических процессов [5, 6].

Целью данного исследования является оценка информативности методов стационарной спектроскопии и спектроскопии с высоким временным разрешением для определения структурных переходов многотриптофановых белков в процессе равновесной денатурации на примере карбоксиангидразы Б быка и бактериальной люциферазы *P. leiognati*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести равновесную денатурацию карбоксиангидразы и бактериальной люциферазы мочевиной, определяя характеристики флуоресценции при стационарном возбуждении и спадов интенсивности в наносекундном разрешении.
1. Получить зависимости изменения параметров стационарной и время-разрешённой флуоресценции от концентрации мочевины.
2. Проанализировать кривые конформационных переходов, получаемых на основе различных параметров флуоресценции, с точки зрения стадийности процесса денатурации белков.
3. Проанализировать сходство и различия найденных характеристик флуоресценции двух исследованных белков, опираясь на их трехмерную структуру и микроокружение триптофановых остатков в их составе.

1 Литературный обзор

1.1 Собственная флуоресценция белков

Белки являются уникальными клеточными полимерами, собственная флуоресценция которых высокочувствительна к конформационным изменениям, происходящим в результате различных белок-белковых взаимодействий, связывания лигандов, денатурации [5].

Собственная флуоресценция белков обусловлена наличием в них трех ароматических аминокислотных остатков: триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe). Триптофановая флуоресценция является доминирующей в виду ее высокого квантового выхода и исключительной чувствительности индольного кольца к изменению физических параметров микроокружения (вязкость, полярность, доступность флуорофора молекулам воды, доступность заряженным группам и т.д.) [5, 7]. Малый вклад тирозиновых и фенилаланиновых остатков в спектры флуоресценции белков объясняется их более слабой экстинкцией и наличием процессов переноса энергии возбуждения на триптофановый остаток [7, 8].

1.1.1 Триптофан

В водном растворе при комнатной температуре триптофан обладает двумя полосами поглощения (рис. 1): одна – с максимумом при 280 нм ($\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) и плечом при 288 нм ($\epsilon_{265} = 4500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) и вторая – с максимумом при 220 нм ($\epsilon_{220} = 36000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Длинноволновая полоса поглощения состоит из двух электронных переходов: 1L_a , 1L_b , с перпендикулярными друг к другу диполями испускания (рис. 2Б). В зависимости от растворителя испускание может происходить как из 1L_a , так и из 1L_b состояния [5, 7].

Положение максимума спектра флуоресценции остатков триптофана в белках варьирует в пределах от 307 до 353 нм, что определяется набором

физико-химических параметров (полярность, вязкость, доступность заряженным группам, возможность специфических взаимодействий), характеризующих окружение хромофора и влияющих на его флуоресценцию [9].

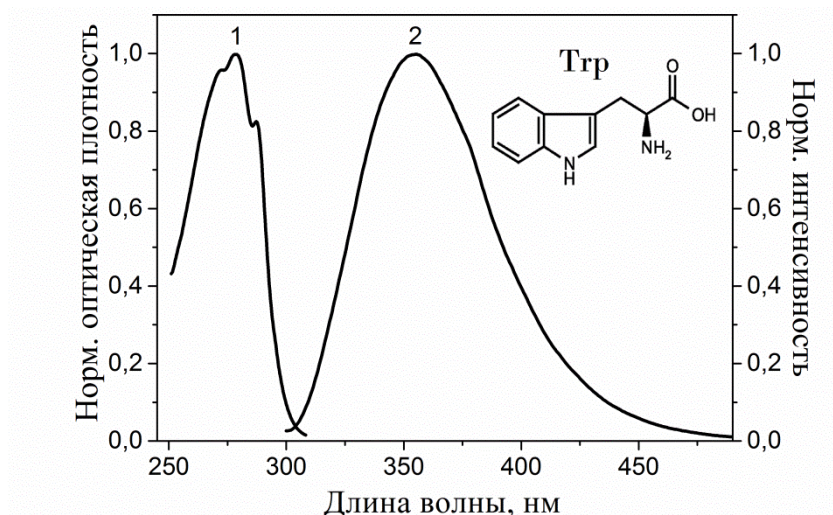


Рисунок 1 – Спектр поглощения (1) и испускания (2) триптофана в водном растворе при нейтральных рН и комнатной температуре [7]

Спектр испускания триптофана сильно зависит от полярности растворителя и возможности формирования водородной связи между иминогруппой и молекулами растворителя. В чистом циклогексане, при отсутствии водородных связей, наблюдается структурированный спектр испускания, являющийся зеркальным отражением $1L_b$ перехода. При образовании водородной связи (как например, в растворе этанола) спектр теряет структурированность и представляет собой зеркальное отражение $1L_a$ перехода (рис. 2). То есть в полностью неполярном окружении флуоресценция будет обуславливаться более низко энергичным $1L_b$ состоянием, в то время как в полярном окружении будет доминировать флуоресценция более низко энергичного $1L_a$ состояния [5, 10]. Квантовый выход триптофана в воде составляет около 0,13 [11].

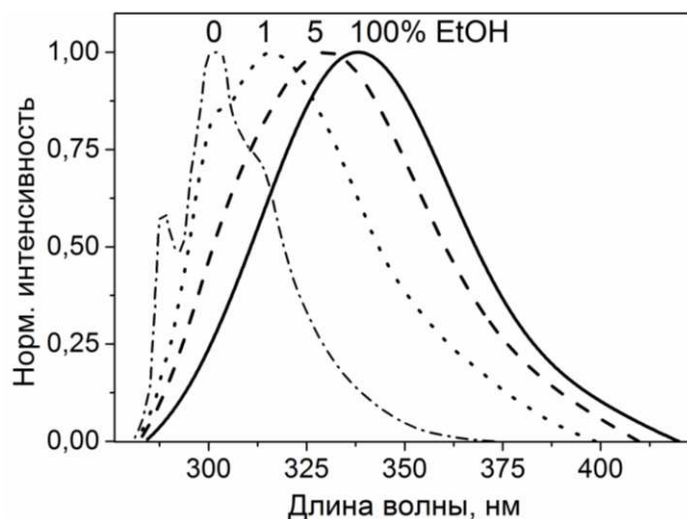


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции индола в циклогексане (0), 100% этаноле и их смесях с содержанием этанола 1 и 5% [10]

Кривая затухания флуоресценции триптофана и других производных индола при наносекундном импульсном возбуждении в воде при комнатной температуре не может быть аппроксимирована одной экспонентой. Показано, что спады флуоресценции свободного триптофана в гомогенных однокомпонентных растворителях описываются биэкспоненциальным законом с двумя временами жизни, лежащими в диапазонах 2–3,5 нс и 0,4–0,5 нс [5, 12, 13].

1.1.2 Тирозин

В нейтральном водном растворе максимумы спектра поглощения тирозина находятся при 222 нм ($\epsilon_{222} = 8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и 275-277 нм ($\epsilon_{275} = 1230 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (рис. 3). Длинноволновая полоса обладает слабо разрешенной колебательной структурой с плечами при 267 и 282 нм [5, 7]. Самый низкоэнергетический синглетный переход в тирозине, с поглощением 260-290 нм, определяется $1L_b$ переходом, дипольный момент которого ориентирован поперёк фенольного кольца (рис. 3). Более интенсивный высокоэнергетический переход определяется $1L_a$ полосой (поглощение ниже 250 нм). При

возбуждении в диапазоне >260 нм флуоресценция и абсорбция будут определяться $1L_b$ полосой [14].

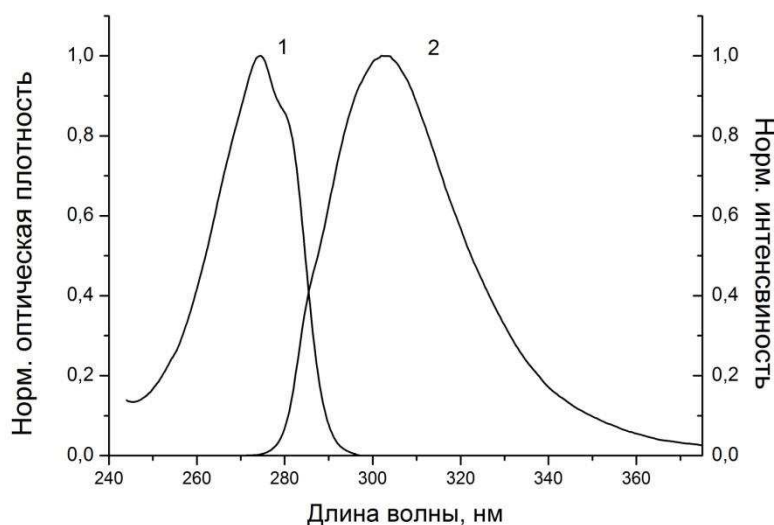


Рисунок 3 – Спектр поглощения (1) и испускания (2) тирозина в водном растворе при нейтральных рН и комнатной температуре [7]

При нейтральных рН и комнатной температуре максимум спектра флуоресценции тирозина расположен при 303-304 нм, его ширина 34 нм. Квантовый выход флуоресценции в воде составляет 0,14 при 23 °С. Время жизни флуоресценции тирозина в нейтральных водных растворах при комнатной температуре определено как $3,5 \pm 0,2$ нс [7, 15].

В отличие от триптофана максимум спектра испускания тирозина слабо изменяется в зависимости от условий. Причиной такого поведения является наличие у триптофана двух близких изоэнергитических переходов, в то время как флуоресценция тирозина возникает из одного электронного состояния (рис. 4) [5].

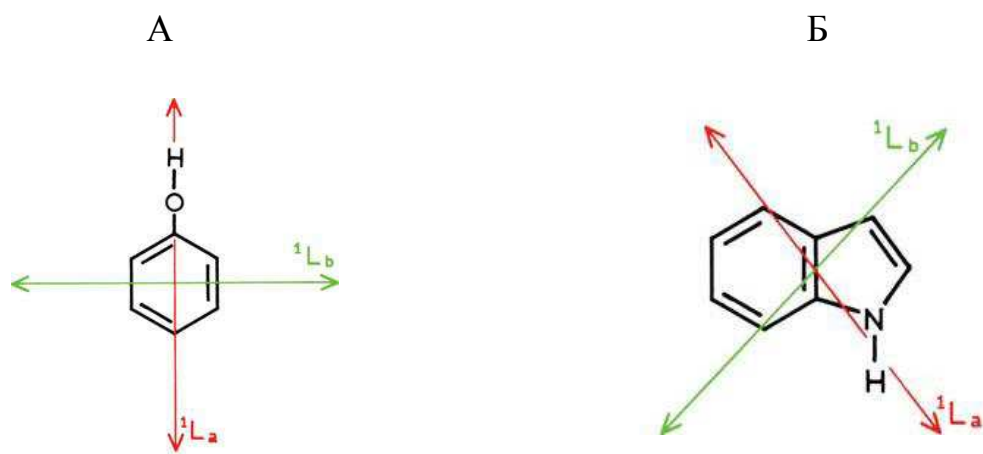


Рисунок 4 – направления электронных переходов поглощения в тирозине (А) и триптофане (Б) [5]

Значительная тирозиновая флуоресценция наблюдается для белков, в аминокислотную последовательность которых не входят триптофановые остатки. В случае ионизации фенольной группы тирозина, при наличии в растворителе протонных акцепторов или щелочном рН, образуется тирозинат, максимум спектра флуоресценции которого располагается при 345 нм, что может быть ошибочно принято за излучение триптофана. Время жизни флуоресценции тирозината при рН 11 равно 30 пс [5, 15].

1.1.3 Фенилаланин

Спектр испускания фенилаланина обладает четкой колебательной структурой с максимумами при 275, 282 и 289 нм и плечом при 300-305 нм (рис. 5). Колебательная структура спектров поглощения и испускания при комнатной температуре говорит о равенстве дипольного момента фенилаланина нулю как в основном, так и в возбужденном состоянии [5, 7].

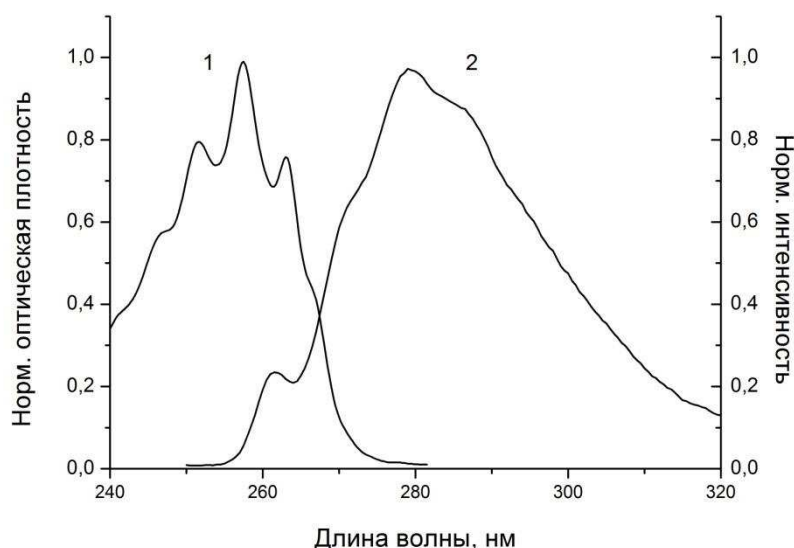


Рисунок 5 – Спектр поглощения (1) и испускания (2) фенилаланина в водном растворе при нейтральных рН и комнатной температуре [7]

Квантовый выход фенилаланина в воде при 20°C равен 0,025, что значительно ниже квантового выхода триптофана и тирозина. Время жизни при 20°C равно 6,8 нс. При высоких концентрациях (10^{-1} М) в результате взаимодействия возбужденных и молекул флуорофора в основном состоянии формируются эксимеры, для которых характерны более низкие квантовые выходы. В случае формирования эксимера спад интенсивности флуоресценции должен описываться суммой двух экспонент, однако диссоциация эксимера происходит быстрее, чем деактивация возбужденного состояния, что вносит сложность в регистрации короткого времени жизни [8, 16].

1.2 Особенности белковой флуоресценции и спектральные классы триптофановых остатков

Как было сказано выше, полярность растворителя и специфические взаимодействия между индольным кольцом и растворителем влияют на спектр флуоресценции триптофана. Поэтому положения максимума испускания будет зависеть от тех факторов, которые влияют на экспонированность остатков молекулам растворителя. В белках, содержащих несколько триптофановых остатков, спектр флуоресценции будет отражать усредненные характеристики

микроокружения каждого остатка. Если большая часть остатков погружена в глобулу белка (например, азурин или рибонуклеаза T1), спектр испускания будет гипсохромно сдвинут по сравнению со спектром свободного триптофана. И наоборот, в случае, если большинство остатков экспонировано, максимум испускания белка будет близок по значению к максимуму испускания свободного триптофана [5, 7, 9].

Значения максимумов флуоресценции и квантового выхода широко варьируют для разных белков. Однако в результате денатурации данные параметры принимают близкие значения, что говорит о том, что спектр флуоресценции определяется структурой белка. То или иное конформационное состояние белка будет определять возможность резонансного переноса энергии между триптофановыми остатками, тушения флуоресценции амино ($-\text{NH}_2$) и карбоксильными ($-\text{COOH}$) группами или тушения при переносе электрона с дисульфидной ($-\text{S}-\text{S}-$) или амидной ($-\text{CONH}_2$) группы на возбужденное индольное кольцо [5, 7].

Вероятность взаимодействий, приводящих к таким процессам, сильно зависит от расстояния между аминокислотными остатками. Например, скорость тушения флуоресценции при переносе электрона экспоненциально уменьшается с увеличением расстояния, а также сильно зависит от локализации близлежащих заряженных групп, которые могут, как стабилизировать, так и дестабилизировать процесс переноса электрона [5].

При наличии нескольких триптофановых остатков спектры поглощения и флуоресценции будут представлять собой суперпозицию вкладов от каждого остатка. При этом возникает проблема однозначной интерпретации спектров и их разложения на индивидуальные компоненты [5, 12, 17].

В 1967 году С.В. Конев выдвинул гипотезу существования двух основных классов триптофановых остатков в белке, которым можно присвоить дискретные значения максимума спектра флуоресценции и квантового выхода. К первому классу относятся триптофановые остатки, находящиеся в низкополярном гидрофобном окружении внутри белковой глобулы ($\lambda_{\text{max}} \sim 330$

нм, $\Phi = 0,04 \div 0,07$). Второй класс представляют экспонированные остатки, находящиеся в высокополярном водном окружении ($\lambda_{\max} \sim 350$ нм, $\Phi \sim 0,13 \div 0,17$). Предложенная гипотеза была основана на наблюдениях батохромного сдвига спектров испускания белков на 350-353 нм в результате денатурации мочевиной и гипсохромного сдвига на 330-332 нм при добавлении анионных детергентов или растворов с кислым рН. Однако эта модель не могла объяснить существование белков с высоким квантовым выходом ($\Phi = 0,20 \div 0,27$, как в случае сывороточных альбуминов) и одно-триптофановых белков с максимумом испускания при ~ 340 нм [17].

В 1973 гипотеза Конева была пересмотрена и дополнена Е.А. Бурштейном, который сформулировал модель дискретных состояний остатков триптофана в белках. Согласно этой модели, существует пять статистически наиболее вероятных спектральных форм триптофановых остатков (рис. 6) [9, 17].

1. К спектральной форме А относятся флуорофоры, находящиеся в нейтральном гидрофобном окружении и не формирующие комплексов в возбужденном состоянии (эксиплексов) с молекулами растворителя или соседними аминокислотными остатками. Максимум спектра флуоресценции в этом случае является структурированным и находится при 308 нм. Такое излучение было найдено пока только у двух белков – азурина и бактериородопсина.

2. Спектральная форма S соответствует излучению индольного хромофора, локализованного внутри белковой глобулы и образующего эксиплекс 1:1 с какой-то ближайшей полярной белковой группой. У белка никогда не бывает чистого спектра класса S – он всегда сопровождается вкладом спектра класса I, который соответствует излучению эксиплекса 2:1. Спектр флуоресценции в этом случае также является структурированным, и максимум находится при 316 нм.

3. Спектральная форма I соответствует флуорофору, погруженному в глобулу белка и формирующему эксиплекс в стехиометрии 2:1 с ближайшими

полярными группами белка. Спектр флуоресценции триптофановых остатков класса I не имеет колебательной структуры; его максимум расположен при 330-332 нм; его ширина 48-50 нм.

4. Спектральная форма II соответствует излучению индольного хромофора на поверхности белка в контакте с молекулами связанной воды, подвижность которых низка по сравнению с подвижностью молекул свободной воды. Для флуорофоров данного класса характерно длительное время дипольной релаксации, что исключает завершение индуцированного релаксацией спектрального сдвига в течение времени жизни возбужденного состояния. Спектр флуоресценции является бесструктурным и имеет максимум при 340-342 нм и ширину 53-55 нм.

5. К спектральному классу III относятся полностью экспонированные флуорофоры, находящиеся в контакте с молекулами свободной воды, полностью релаксирующие за время жизни возбужденного состояния, что делает их спектры почти совпадающими со спектрами свободного триптофана в воде. Спектр флуоресценции бесструктурен и имеет максимум при 350-353 нм и ширину 59-61 нм.

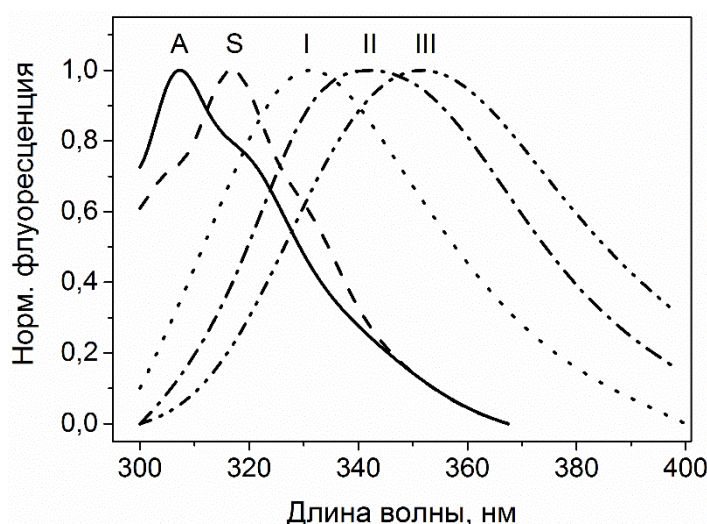


Рисунок 6 – Нормированные спектры флуоресценции остатков триптофана, принадлежащих A, S, I, II, III классам [7]

Модель, предложенная Бурштейном, является статистической, т.е. нахождение триптофанов в окружении, приводящем к реализации спектральных форм А, S, I, II и III, является более вероятным, чем нахождение в другом окружении, хотя возможны и промежуточные варианты [7].

1.8 Стационарная и спектроскопия с временным разрешением

Методы флуоресцентной спектроскопии могут быть разделены на две группы, одна из которых включает в себя методы стационарной спектроскопии, другая – методы спектроскопии с временным разрешением.

В стационарной спектроскопии образец возбуждается непрерывным пучком света и испускание регистрируется с помощью системы детекции. Регистрируемый стационарный спектр испускания флуоресценции усреднен по времени и отражает равновесные условия, при которых процессы релаксации (колебательной вызванной растворителем) завершены. В методах измерения флуоресценции с временным разрешением образец возбуждают импульсом света. Длительность импульса должна быть как можно короче, желательно намного меньше, чем регистрируемое время жизни флуорофора [5].

В случае флуорофора с экспоненциальным затуханием, спад интенсивности флуоресценции во времени описывается как:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

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

τ – время затухания [5].

1.3 Время жизни флуоресценции

Время жизни или время затухания флуоресценции представляет собой средний промежуток времени, в течение которого молекула находится в возбужденном состоянии, прежде чем вернуться в основное. Для флуорофора,

описываемого диаграммой Яблонского (рис. 7), время затухания определяется как:

$$\tau^{-1} = k_r + k_{nr}$$

где k_r – константа скорости излучательного перехода в основное состояние,

k_{nr} – константа скорости всех безызлучательных процессов.

Константа k_{nr} определяется суммой следующих констант скорости: интеркомбинационной конверсии, тушения флуоресценции растворителем, переноса протона и электрона. Величина времени жизни может варьировать, так как возбужденный флуорофор может вернуться в основное состояние различными параллельными путями [5, 12].

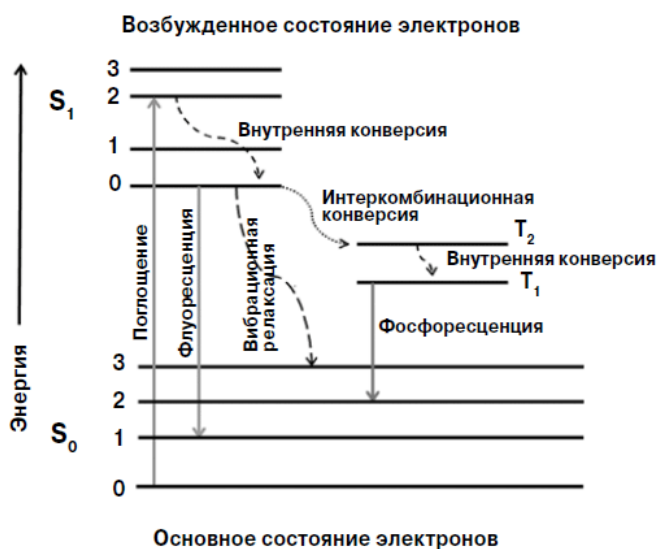


Рисунок 7 – Диаграмма Яблонского описывающая процессы, которые могут происходить при переходе молекулы из основного состояния в возбужденное [5]

1.3.1 Времена жизни индола и триптофана в водном растворе

Установлено, что затухание флуоресценции свободного триптофана в гомогенных однокомпонентных растворителях описывается биэкспоненциальным законом с двумя временами жизни 2–3,5 нс и 0,4–0,5 нс [11, 12, 13].

В водно-этанольных растворах триптофан характеризуется тремя временами жизни: 0,5, 1,8, 5 нс, два из которых (0,5 нс и 1,8 нс) близки к временам жизни триптофана в воде или буфере (0,5 нс и 2,5 нс). При этом, популяция второго времени вносит наибольший вклад, как в случае триптофана в воде или буфере (0,95), так и в случае триптофана в водно-этанольном растворе (0,65). Согласно [18] величины времен жизни и их вклады независимы от длины волны возбуждения.

Индол, растворенный в воде или этаноле, характеризуется двумя временами жизни флуоресценции, значения которых зависят от длины волны регистрации и отличаются от значений времен жизни флуоресценции для свободного триптофана, поэтому индол не может выступать в качестве модели для понимания происхождения времен жизни триптофана в растворе или в белках [7].

1.3.2 Время жизни триптофана в белках

Для триптофанов, входящих в структуру белка, спад интенсивности флуоресценции, в основном, характеризуется тремя временами жизни. При этом два из них имеют значение, близкое к временам жизни свободного триптофана в воде или буфере (табл. 1).

Таблица 1 – Времена жизни флуоресценции (τ_i) и их вклады (α_i) для свободного триптофана и триптофанов, входящих в состав различных белков [19]

Пример	N	τ_1 , нс	α_1 , %	τ_2 , нс	α_2 , %	τ_3 , нс	α_3 , %
L-Трп в воде		–	–	3,06	95,29	0,43	4,71
L-Трп в этаноле		4,87	11,37	1,78	70,07	0,15	18,56
HSA	1	7,46	56,60	3,57	31,04	0,53	12,35
BSA	2	6,58	69,60	3,055	25,70	0,27	4,73
Хеликаза	3	4,37	44,96	1,735	37,20	0,47	17,83
Химотрипсин	8	3,82	27,71	1,472	45,03	0,69	27,26

Изучение ряда белков показало, что наличие трех времен жизни не зависит от количества триптофановых остатков и их локализации в глобуле белка, при этом значение времен в различных белках близки, в то время как их вклады различаются. При денатурации белков три времени сохраняются, но их значения изменяются. Также значения времен жизни и предэкспоненциальных множителей не зависят от длины волны возбуждения [19].

Наличие многокомпонентного спада интенсивности флуоресценции, как для свободных триптофанов, так и для белков, содержащих один триптофановый остаток, является причиной, значительно затрудняющей анализ связи отдельных временных компонент с определенными триптофановыми остатками в структуре белка [5, 12].

1.4 Нативная и денатурированная формы белка

Под нативной структурой понимают функционально активную конформацию белка, формируемую за счет внутримолекулярных взаимодействий [5].

Стабильность нативной структуры белка зависит от таких внешних переменных как рН, температура, ионная сила, типа растворителя. Изменение данных параметров приводит к нарушению связей, ответственных за внутреннюю стабильность и, как следствие, к денатурации. Под денатурацией понимают процесс, при котором изменяется пространственное расположение полипептидной цепи белковой глобулы от такого, которое типично для нативного белка, до более беспорядочного [20].

В денатурированном белке гидрофобные радикалы, которые в нативной структуре молекулы спрятаны внутри гидрофобного ядра, оказываются на поверхности, изменяется упорядоченность окружения боковых групп белка. Степень же упорядоченности главной цепи белка (ее вторичная структура), размеры глобулы, плотность гидрофобного ядра могут как сохраняться, так и меняться очень сильно. Также изменяется доступность обычно глубоко погруженных триптофановых остатков молекулам растворителя, что

сказывается на изменении спектров флуоресценции и квантовых выходов [5, 20].

Денатурация малых белков является кооперативным переходом, т.е. переходом охватывающим множество аминокислотных остатков, с “S-образным” одновременным и резким изменением многих характеристик молекулы. S-образность отражает наличие двух наиболее стабильных состояний белка, наблюдающихся в значительном количестве, одно из которых соответствует начальному (нативному), другое – конечному (денатурированному) (рис. 8). Денатурация больших глобулярных белков складывается из плавления входящих в них доменов [22].

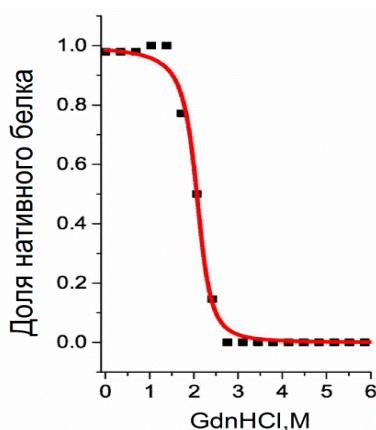


Рисунок 8 – Денатурация лизоцима гуанидингидрохлоридом, сопровождающаяся S-образным переходом, определенная по спектрам кругового дихроизма [21]

При экспериментальном исследовании денатурации белков было также показано появление равновесного промежуточного состояния, названного «расплавленной глобулой». Одним из свойств расплавленной глобулы является существование вторичной структуры, практически в том же количестве, что и в нативном белке, при почти полном отсутствии упорядоченности боковых групп. В то же время в структуре сохраняется доля нативных контактов боковых групп, особенно ароматических. Переход от нативного белка в такое промежуточное состояние является переходом «все-или-ничего». Некоторые небольшие нативные белки, разворачиваются в клубок, минуя стадию расплавленной глобулы. Также существуют белки, которые при одном методе

денатурации (например, тепловом) превращаются в расплавленную глобулу, а при другом (например, при денатурации гуанидингидрохлоридом) – в клубок. Из-за высокого активационного барьера в процессе денатурации наблюдаются отдельные интермедиаты скорей, чем континуум промежуточных состояний [22].

1.4.1 Методы денатурации белков

Денатурация белка может быть вызвана высокими или низкими температурами, изменением значения рН раствора, при добавлении в раствор денатуратов. Наиболее распространенные денатурирующие агенты – гуанидин гидрохлорид, мочевины, додецилсульфат натрия, гидроксид калия. Природа развёрнутого состояния зависит от метода денатурации. Кроме этого, свойства развёрнутого состояния в значительной степени определяются аминокислотной последовательностью, как и в случае нативного состояния [7].

В данной работе в качестве денатурирующего агента использовали мочевины. Мочевина является небольшой молекулой, которая хорошо растворяется в воде даже в большой концентрации и может формировать водородные связи с молекулами воды, атомами основной цепи белка и любыми заряженными остатками. В литературе обсуждается два основных механизма, лежащих в основе дестабилизации нативной структуры белка раствором мочевины: косвенный (indirect) механизм и прямой (direct). В пользу последнего механизма свидетельствует наибольшее количество модельных и экспериментальных исследований. В основе косвенного механизма лежит изменение сети водородных связей воды, что способствует смягчению гидрофобного эффекта, обеспечивая доступ растворителя к гидрофобному ядру белка. В основе прямого механизма лежит изменение электростатических взаимодействий либо путем сольватирования заряженных частиц, либо путем формирования водородных связей с белковым остовом. В некоторых модельных экспериментах было показано, что механизм денатурации может зависеть от концентрации мочевины [24, 25].

1.5 Методы определения стадий денатурации белков

Для определения и характеристики интермедиатных состояний, образующихся в процессе денатурации или ренатурации белков, могут быть использованы различные методы, включающие спектроскопию кругового дихроизма, стационарную и время-разрешённую флуоресцентную спектроскопию, кинетические измерения [4].

На основе данных, полученных с помощью перечисленных выше методов возможно построить денатурационные кривые, отражающие зависимость изменения таких параметров как интенсивность флуоресценции на определенной длине волны, изменение эллиптичности в спектрах кругового дихроизма и т.д. при переходе белка из нативного в денатурированное состояние. Денатурационные кривые позволяют оценивать конформационную стабильность, то есть насколько нативный белок более стабилен, чем денатурированный, сделать выводы о механизме разворачивания или фолдинга, а также сделать выводы о структуре белка. Так, например, денатурационная кривая с более чем одним переходом указывает на наличие у белка более чем одного домена [4, 22].

1.6 Карбоксиангидраза Б

Карбоксиангидраза Б (BCA) – многостадийно сворачивающийся однодоменный белок с молекулярной массой 29 кДа, состоящий из одной полипептидной цепи и содержащей один ион цинка Zn^{2+} в качестве кофактора (рис. 9). Относится к ферментам группы углерод-кислород-лиаз, катализирует обратимую реакцию расщепления угольной кислоты до двуокиси углерода и воды, а также участвует в транспорте двуокиси углерода в организме. В пространственной структуре BCA можно выделить β -структуры (40%) и α -спирали (10%). В состав белка включено 259 аминокислотных остатка (из них Phe – 36, Tyr – 28, Trp – 7) [23].

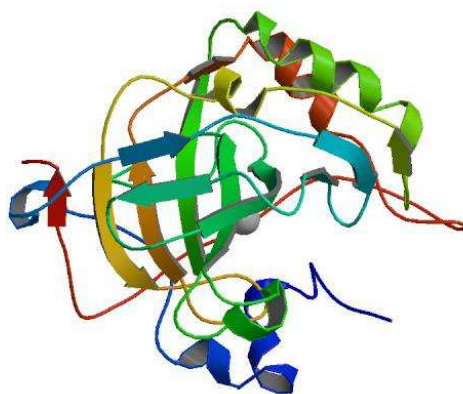
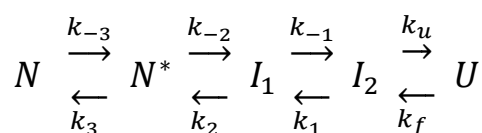


Рисунок 9 – Структура карбоксиангидразы Б (PDB: 1V9E)

Фолдинг ВСА происходит с образованием как минимум трех промежуточных состояний:



где N - нативное состояние карбоксиангидразы;

N* - конформационное состояние, отличающееся от нативного отсутствием связанного Zn⁺;

I₁, I₂ - промежуточные состояния;

U-развернутое состояние.

Так как стадии сворачивания ВСА проходят за время порядка нескольких минут, ВСА является хорошим модельным объектом для изучения принципов сворачивания сложных белков.

1.7 Бактериальная люцифераза

Бактериальная люцифераза *Photobacterium leiognathi* (BL) является αβ-гетеродимером (рис. 10), который катализирует окисление восстановленного флавинмононуклеотида и алифатического альдегида кислородом воздуха. При этом в ходе реакции излучается свет. α-субъединица люциферазы содержит 355

аминокислотных остатка (из них Phe – 19, Tyr – 12, Trp – 5) и имеет молекулярную массу равную 40 375 Да, а β -субъединица – 324 остатка (из них Phe – 17, Tyr – 16, Trp – 2) с молекулярной массой 37 377 Да. $\alpha\beta$ -гетеродимер бактериальной люциферазы можно приближенно вписать в параллелепипед с размерами 75x45x40 Å [26].

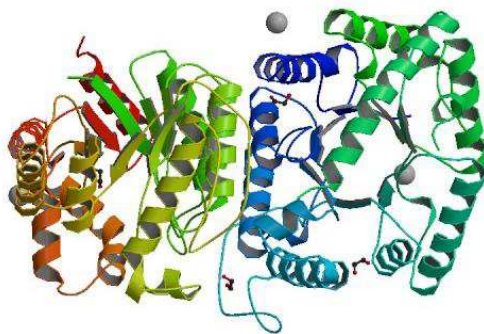


Рисунок 10 – Структура бактериальной люциферазы из *Vibrio harveyi* (PDB ID: 3FGC) [27]

Активный центр фермента находится на α -субъединице, в то время как β -субъединица, необходимая для каталитической реакции, участвует в процессах стабилизации конформации α -субъединицы и обеспечивает её сродство к субстрату. Аминокислотная последовательность данной люциферазы обнаруживает существенную гомологию с аминокислотной последовательностью люциферазы *Vibrio harveyi* (50-60%) [27].

2 Материалы и методы

2.1 Материалы и методика эксперимента

Объектом исследования выступали: бактериальная люцифераза *Photobacterium leiognathi* (Институт биофизики СО РАН) (BL) и карбоксиангидраза быка (Институт белка РАН) (BCA). Концентрацию исследуемых веществ определяли, используя значения экстинкции на длине волны 280 нм (табл. 2).

Таблица 2 – Молярный коэффициент экстинкции для определения концентрации белка

	BCA [25]	BL [27]
$\epsilon_{280}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	56000	82000

Концентрация BCA составляла 6,5 μM , концентрация BL 2 μM . В качестве денатурирующего агента использовали мочевины (Panreac). В случае BCA, раствор мочевины готовили на основе 0,02 М Трис-HCl буфера, pH 8.2. В случае люциферазы, раствор мочевины готовили на основе 0,05 М фосфатного буфера (ФБ), pH 6,9. Концентрация растворов мочевины (0 – 7 М) проверяли рефрактометрически.

Согласно стандартной методике проведения равновесной денатурации, измерение спектров поглощения, флуоресценции, спадов интенсивности флуоресценции осуществляли после 24 часов инкубации исследуемых белков в растворах мочевины разной концентрации.

Спектры флуоресценции растворов отдельных соединений и их смесей снимали при длине волны возбуждения 295 нм.

Разрешенные во времени спады интенсивности флуоресценции снимали в диапазоне 305-419 нм, разрешение составляло 27 пс/канал. Для извлечения информации об истинном времени жизни исследуемого вещества применялся метод деконволюции с использованием высококоллоидного соединения Ludox для восстановления формы возбуждающего сигнала.

2.2 Оборудование

Спектры поглощения были измерены с использованием спектрофотометра Cary 5000i (Agilent Technologies). Стационарные и временно-разрешенные измерения флуоресценции проводили с использованием спектрофлуориметра Fluorolog 3-22 (Horiba Jobin Yvon) с приставкой для измерения спада интенсивности флуоресценции методом счета фотонов с временной корреляцией. Источником возбуждения служил диодный лазер NanoLED с максимумом длины волны возбуждения 296 нм и длительностью импульса 1,2 нс.

Эксперименты проводили с использованием кварцевых кювет 10x10 мм объемом 4 мл и 2x10 мм объемом 0,8 мл. При измерении кюветы были помещены в термостатированный держатель. В случае люциферазы измерения проводили при температуре 25°C, для ВСА – при 20°C.

2.3 Метод счета фотонов с временной корреляцией

Принцип счета фотонов с временной корреляцией представлен на рис. 11 [5,28].

Измерение запускается импульсом излучения, которое возбуждает образец и запускает часы времени измерения. Счет фотонов с временной корреляцией осуществляется при помощи цифровой техники, регистрируемые счетные фотоны коррелированы во времени относительно возбуждающего импульса. Главным элементом данного метода является временно-амплитудный конвертор, который может быть представлен как быстродействующий секундомер. Образец периодически возбуждают, используя импульсный источник света, чаще всего это лазер или импульсная лампа.

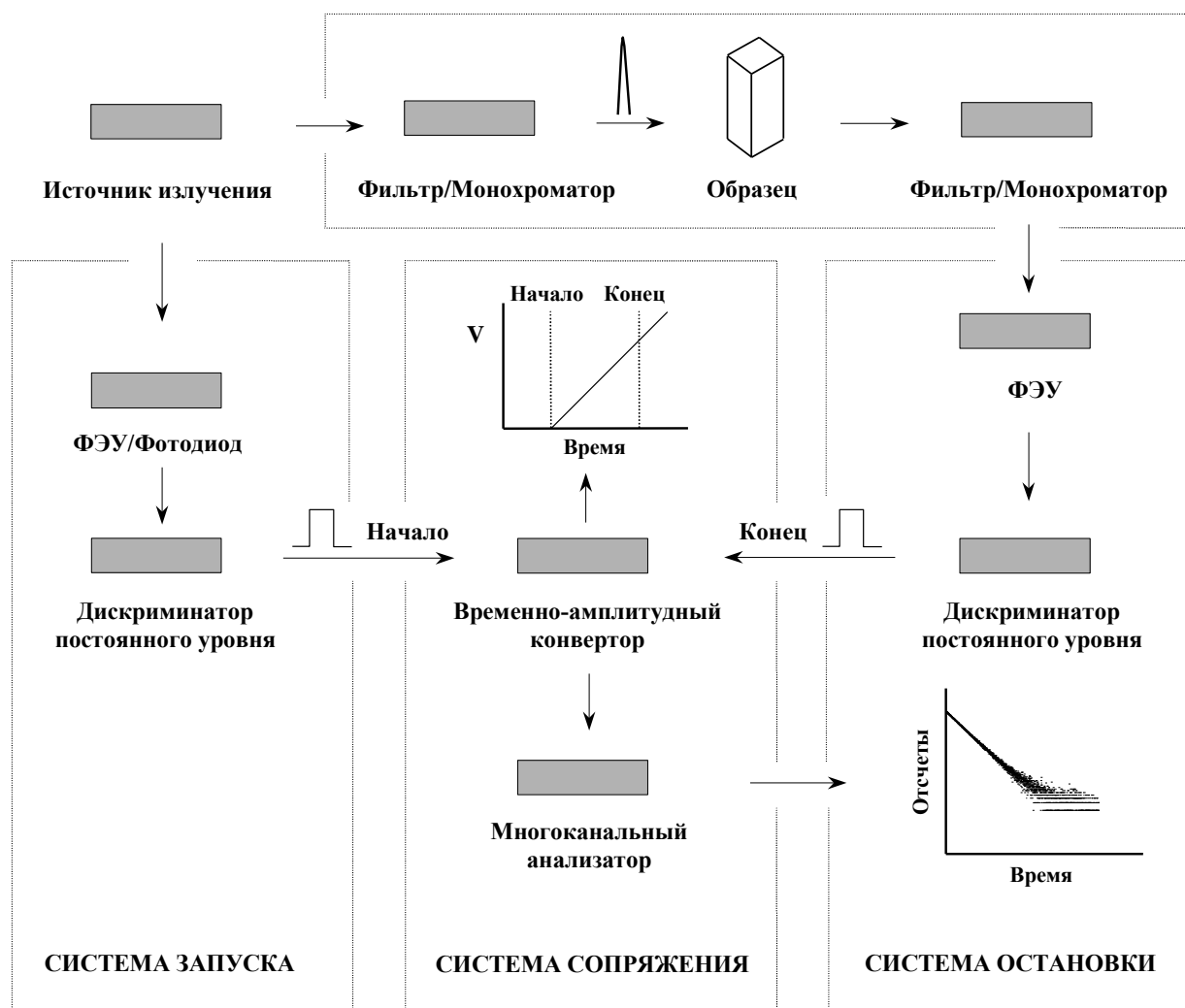


Рисунок 11 – Принципиальная схема счета фотонов с временной корреляцией

Быстродействующий ФЭУ фиксирует каждый импульс, чтобы сгенерировать пусковой сигнал начала линейного изменения напряжения временно-амплитудного конвертора. Линейное изменение напряжения прекращается, когда первый фотон флуоресценции образца будет обнаружен. Временно-амплитудный конвертор обеспечивает выходной импульс, чье напряжение пропорционально времени между началом и концом сигналов. Многоканальный анализатор преобразует это напряжение во временной канал, используя аналогово-цифровой конвертор. Суммируя по всем импульсам, многоканальный анализатор постепенно создает вероятностную гистограмму отсчетов от временных каналов. Эксперимент продолжается до тех пор, пока не накопится более чем 10^3 отсчетов в максимальном канале. В этих условиях

гистограмма времен поступления фотонов представляет собой спад интенсивности образца. Этот измеренный спад интенсивности $F^E(t)$ есть свертка функции истинного отклика $i(t)$ образца с δ -функцией лампы, обычно представленная функцией конечного отклика прибора. Математически свертка спада может быть записана как

$$F^E(t) = e(t) \otimes i(t) = \int_0^t e(t-x)i(x)dx$$

2.4 Обработка данных

Полученные спектры корректировали с учетом чувствительности прибора, эффекта внутреннего фильтра и объемного разведения, также из спектров был вычтен фон от растворителя.

Обработка разрешенных во времени спадов интенсивности флуоресценции проводили с помощью специальной программы DAS6 v.6.6 (Horiba Jobin Yvon). Время-разрешенные данные анализировали с помощью глобального анализа, суть которого заключается в одновременном описании всей совокупности спадов на разных длинах волн с подбором времен жизни и их вкладов на соответствующей длине волны. Качество аппроксимации оценивалось по статистическому критерию описания – взвешенным остаткам и χ^2 .

Спад интенсивности флуоресценции во времени описывали как сумму экспонент:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$$

где τ – время жизни,

α_i – амплитудный коэффициент i -компоненты.

Вклад каждой временной компоненты в общее время жизни определяли с помощью выражения:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i}$$

Для получения спектров, ассоциированных с временами жизни ($I(\lambda, \tau_i)$) рассчитывали произведение интенсивности флуоресценции образца и вклада каждой из временной компонент на определенной длине волны:

$$I(\lambda, \tau_i) = I_{ss}(\lambda) f_i(\lambda) \quad (1)$$

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

$f_i(\lambda)$ – вклад i -компоненты времени жизни на длине волны λ .

Анализ и обработка результатов проводили с применением прикладных программ Microsoft Excel и Microcal Origin Pro 8.1.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Анализ изменения стационарных спектров поглощения и испускания люциферазы и карбоксиангидразы при денатурации

Были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции исследуемых белков в нативном и денатурированном состоянии (рис. 12).

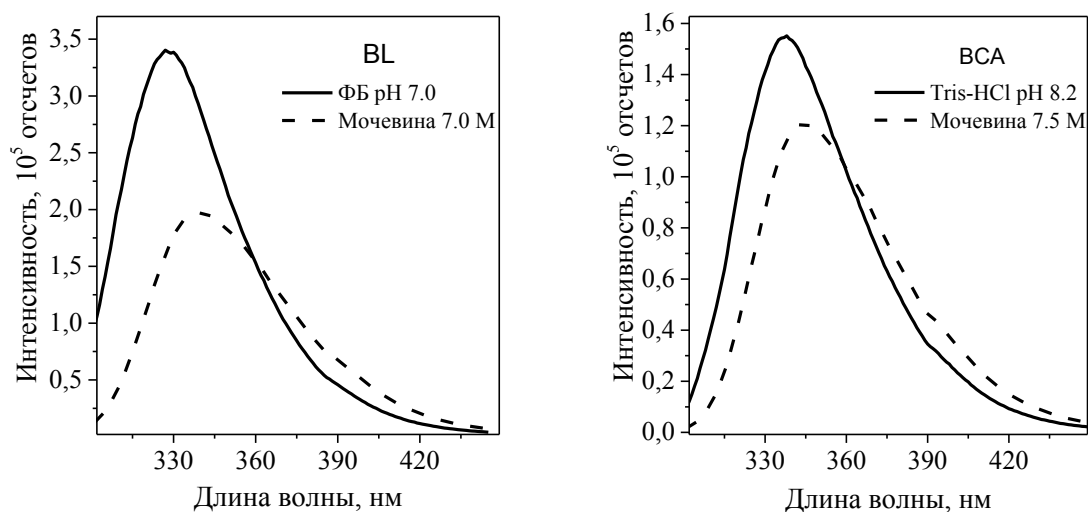


Рисунок 12 – Стационарные спектры флуоресценции BL и VCA в нативном и денатурированном состоянии

Спектры флуоресценции снимали при длине волны возбуждения 295 нм, следовательно, флуоресценция белков обусловлена вкладом только триптофановых остатков. Максимумы флуоресценции (λ_{\max}) люциферазы и VCA располагаются при 333 нм и 338 нм, соответственно. При денатурации белков раствором мочевины максимумы флуоресценции смещаются в длинноволновую область спектра и принимают значение равное 345 нм, что говорит об увеличении экспонированности триптофановых остатков в растворитель.

[Изъят абзац]

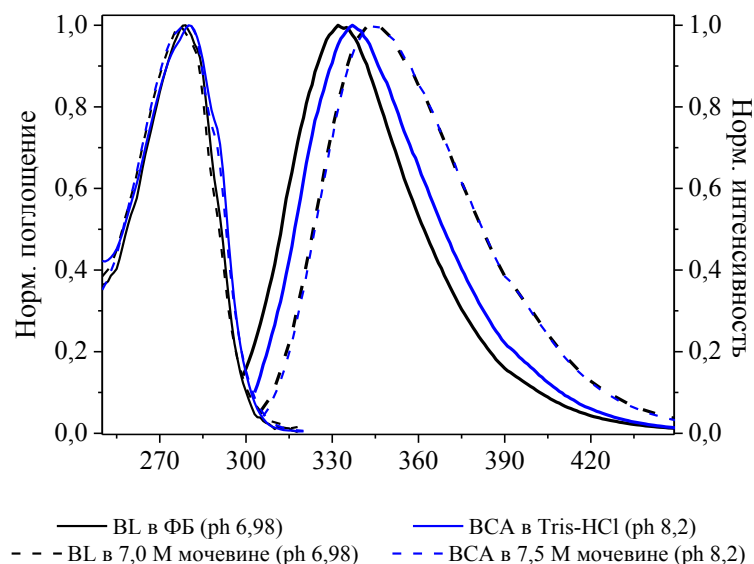


Рисунок 13 – Нормированные спектры поглощения и флуоресценции BL и VCA в нативном (сплошная линия) и денатурированном (штриховая линия) состоянии [Изьят абзац]

3.2 Анализ разрешенных по времени спектров флуоресценции люциферазы и карбоксиангидразы

Применение методов глобального анализа для обработки спадов флуоресценции белков при различных длинах волн регистрации выявило наличие трёх временных компонент, что согласуется с литературными данными [12, 19]. Полученные времена τ_1 , τ_2 и τ_3 для люциферазы и VCA приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Времена жизни флуоресценции и их вклады для нативной и денатурированной форм белка

Белок	τ_1 , нс	f_1	τ_2 , нс	f_2	τ_3 , нс	f_3	χ^2
Нативное состояние							
VCA	5,60	0,82	1,1	0,12	~ 0,14	0,06	1,01
BL	6,01	0,49	2,08	0,43	~ 0,05	0,08	1,08
Денатурированное состояние (мочевина 7 -7,5 М)							
VCA	4,95	0,57	1,99	0,40	~ 0,22	0,03	1,05

VL	4,65	0,51	1,76	0,45	~ 0,14	0,04	0,87
----	------	------	------	------	--------	------	------

[Изъято 3 абзаца]

Сопоставление данных о временах жизни и их вкладов на каждой длине волны со стационарным спектром флуоресценции, согласно выражению (1), позволяет получить спектры, ассоциированные с отдельными временными компонентами (рис. 14).

Рисунок изъят

Рисунок 14 – Спектры, ассоциированные с временами жизни, для нативного (А, Б) и денатурированного (В, Г) состояния VL и ВСА

[Изъят абзац]

Рисунок изъят

Рисунок 15 – Нормированные спектры, ассоциированные с временами жизни, для компонент τ_1 и τ_2 нативных (А, Б) и денатурированных (В, Г) форм HSA, BSA, BCA, BL

3.3 Изменение характеристик стационарной флуоресценции люциферазы и карбоксиангидразы при равновесной денатурации

[Изъято 13 страниц]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была исследована равновесная денатурация многотриптофанных белков бактериальной люциферазы и карбоксиангидразы Б методами стационарной флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии с высоким временным разрешением.

[Изъято 6 абзацев]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Trp – триптофан;

Tyr – тирозин;

Phe – фенилаланин;

BCA – карбоксиангидраза быка;

BL – Бактериальная люцифераза *Photobacterium leiognathi*;

ФБ – фосфатный буфер;

HSA – сывороточный альбумин человека;

BSA – бычий сывороточный альбумин

λ_{\max} – максимум спектра флуоресценции;

I_{320}/I_{360} – отношение интенсивности флуоресценции на двух длинах волн;

R – линейный коэффициент корреляции Пирсона.

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. – Т. 6. – №. 2. – С. 87-103.
2. Privalov P. L. Intermediate states in protein folding //Journal of molecular biology. – 1996. – Т. 258. – №. 5. – С. 707-725.
3. Dubey, V. K. Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature / V. K.Dubey, M. V. Jagannadham // Biochemistry. – 2003. – Т. 42. – №. 42. – С. 12287-12297.
4. Pace C. N. [14] Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves //Methods in enzymology. – Academic Press, 1986. – Т. 131. – С. 266-280.
5. Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy / J.R. Lakowicz. –New York: Springer Science, 2006.
6. Ross, J.A. Time-resolved methods in biophysics. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence / J.A. Ross, D.M. Jameson // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – V. 7. – P. 1301-1312.
7. Пермяков, Е.А. Метод собственной люминесценции белка / Е.А. Пермяков. – М.: Наука, 2003. – 189 с.
8. Teale F. W. J., Weber G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids //Biochemical Journal. – 1957. – Т. 65. – №. 3. – С. 476.
9. 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. – Т. 18. – №. 4. – С. 263-279.
10. Gryczynski I. et al. Lifetime distributions and anisotropy decays of indole fluorescence in cyclohexane/ethanol mixtures by frequency-domain fluorometry //Biophysical chemistry. – 1988. – Т. 32. – №. 2-3. – С. 173-185.
11. Chen, Y. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins / Y. Chen, M.D. Barkley // Biochemistry. – 1998. – Т. 37. – С. 9976-9982.

12. 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.
13. Albani, J.R. Fluorescence lifetimes of tryptophan: structural origin and relation with $S_0 \rightarrow {}^1L_b$ and $S_0 \rightarrow {}^1L_a$ transitions / J. R. Albani // *J. Fluoresc.* – 2009. – V. 19. – P. 1061-1071.
14. Ross JBA, Laws WR, Rousslang KW, Wyssbrod HR. 1992. Tyrosine fluorescence and phosphorescence from proteins and polypeptides. In *Topics in fluorescence spectroscopy, Vol. 3: Biochemical applications*, pp. 1–63. Ed JR Lakowicz. Plenum Press, New York.
15. Chen R. F. Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine // *Analytical Letters*. – 1967. – T. 1. – №. 1. – C. 35-42.
16. Leroy E., Lami H., Laustriat G. Fluorescence lifetime and quantum yield of phenylalanine aqueous solutions. Temperature and concentration effects // *Photochemistry and Photobiology*. – 1971. – T. 13. – №. 5. – C. 411-421.
17. Reshetnyak Y. K., Burstein E. A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins // *Biophysical journal*. – 2001. – T. 81. – №. 3. – C. 1710-1734.
18. Albani, J.R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 1. Fluorescence lifetimes origin of tryptophan free in solution / J.R. Albani // *J. Fluoresc.* – 2014. – V. 24. – P. 93-104.
19. Albani, J.R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: Fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins / J.R. Albani // *J. Fluoresc.* – 2014. – V. 24. – P. 105-117.
20. Kauzmann W. Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation // *Advances in protein chemistry*. – Academic Press, 1959. – T. 14. – C. 1-63.
21. Seelig J. Cooperative protein unfolding. A statistical-mechanical model for the action of denaturants // *Biophysical chemistry*. – 2018. – T. 233. – C. 19-25.

22. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. – М. : Книжный дом, 2005.
23. Canchi R. Deepak. Backbone and Side-Chain Contributions in Protein Denaturation by Urea / Deepak R. Canchi, Angel E. Garcí'a // Biophysical Journal. – 2011. – V. 100. – P. 1526–1533.
24. Peter J. Rossky. Protein denaturation by urea: Slash and bond / Rossky J. Peter // PNAS. – 2008. – V. 105. – №. 44. – P. 16825 – 16826.
25. Saito R. et al. Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. – 2004. – T. 60. – №. 4. – С. 792-795.
26. Илларионов, Б.А. Нуклеотидная последовательность генов α - и β -субъединиц люциферазы *Photobacterium leiognathi* / Б.А. Илларионов, М.В. Протопопова, В.А. Каргинов, Н.П. Мертвецов, И.И. Гительзон // Биоорг. хим. – 1988. – Т. 14. – С. 412–415.
27. Fisher, A.J. The 1,5-Å resolution crystal structure of bacterial BLiferase in low salt condition / A.J. Fisher, T.B. Tompson, J.B. Thoden, T.O. Baldwin, I. Rayment // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 21956-21968.
28. Beechem, J.M. Time-resolved fluorescence of proteins / J.M. Beechem, L. Brand // Ann. Rev. Biochem. – 1985. – V. 54. – P. 43-71.
29. Немцева, Е.В. Сходство спектральных компонент с индивидуальным временем жизни для триптофановой флуоресценции белков разной сложности / Е.В. Немцева, О.О. Лащук, М.А. Герасимова // Биофизика. – 2016. – Т. 61. – №. 2. – С. 231-238.
30. Nemtseva, E. V. Fluorescence lifetime components reveal kinetic intermediate states upon equilibrium denaturation of carbonic anhydrase II / E. V. Nemtseva, , O. O. Lashchuk, , M. A. Gerasimova, , T. N. Melnik, , G. S. Nagibina, B. S. Melnik // Methods and applications in fluorescence. – 2018. – Т. 6. – №. 1. – С. 015006.


31. Inlow, J. K. Mutational analysis of the subunit interface of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase / J. K. Inlow, T. O. Baldwin // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 3906–3915.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В.А. Кратасюк

« 14 » 06 2018 г.

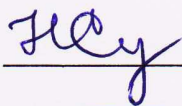
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Изменение стационарных и время-разрешенных характеристик
триптофановой флуоресценции белков в ходе равновесной
денатурации**

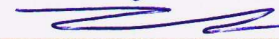
03.04.02 Физика

03.04.02.01 Биофизика

Научные руководители



с.н.с., к.ф.-м.н. Е.В. Немцева



ст. пр. М.А. Герасимова

Выпускник



О.О. Лащук

Рецензент



рук. гр., д.ф.-м.н., Б.С. Мельник

Красноярск 2018