

7. Mineev K.S., Bocharov E.V., et. al., Dimeric structure of the transmembrane domain of glycoporphin a in lipidic and detergent environments. *Acta Naturae*, 2011, vol. 3, no. 2, pp. 90-98.
8. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C., GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, 2005, vol. 26, no. 16, pp. 1701-1718.
9. Berger O., Edholm O., Jähnig F., Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.*, 1997, vol. 72, no. 5, pp. 2002-2013.
10. Кузнецов, А.С., Ефремов Р.Г. Оценка влияния среды на димеризацию трансмембранных доменов гликофорина А в компьютерном эксперименте. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технической конференции*, Севастополь, 2016, т. 1, № 1, с. 250-253. [Kuznetsov A.S., Efremov R.G. In Silico Estimation of the Membrane Effect on the Dimerization of Transmembrane Domains of Glycophorin A. *Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH-2016: Proceedings of XI International Science-Technical Conference*, Sevastopol, 2016. v. 1, no. 1, pp. 250-253 (In Russ.)]

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ДИФФУЗИЯ БЕЛКОВ В ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРАХ

Кусова А.М.^{1,2}, Ситницкий А.Э.¹, Идиятуллин Б.З.¹, Бакирова Д.Р.¹, Зуев Ю.Ф.^{1,2}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН
ул. Лобачевского, 2/31, Казань, РФ

² Казанский (Приволжский) Федеральный Университет
ул. Кремлевская, 18, Казань, РФ
e-mail: alexakusova@mail.ru

Аннотация. В настоящем исследовании основное внимание уделяется получению обобщенной концентрационной зависимости коэффициента самодиффузии (КСД) трипсина и α – химотрипсина в качестве представителей глобулярных сфероидальных белков и фибриногена в качестве примера белка сложного строения, имеющего сильно вытянутую форму с глобулярными и неструктурированными участками. Эксперименты проводились методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с использованием импульсного градиента магнитного поля (ИГМП). Полученная обобщенная концентрационная зависимость КСД белков проанализирована в рамках феноменологического подхода, основанного на фрикционном формализме неравновесной термодинамики. Показана возможность использования данного феноменологического подхода для белков различной формы и размеров в широком диапазоне концентраций. Определены динамические параметры системы, а именно: коэффициенты трения между молекулами белка и между молекулами белка и растворителем. Предложено качественное объяснение полученных значений.

Ключевые слова: ЯМР, диффузия, белки, концентрационная зависимость КСД.

TRANSLATIONAL DIFFUSION OF PROTEINS IN HIGHLY CONCENTRATED SOLUTIONS

Kusova A.M.^{1,2}, Sinitzky A.E.¹, Idiyatullin B.Z.¹, Bakirova D.R.¹, Zuev Yu.F.^{1,2}

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences
Lobachevsky str., 2/31 Kazan, Russia

² Kazan (Volga Region) Federal University
Kremlevskaya str., 18, Kazan, Russia
e-mail: alexakusova@mail.ru

Abstract. The present study focuses on obtaining a generalized concentration dependence of the self-diffusion coefficient for trypsin and α -chymotrypsin as representatives of globular spheroidal proteins and for fibrinogen as an example of irregular-shaped protein. Diffusion experiments were performed by nuclear magnetic resonance (NMR) using a pulsed magnetic field gradient (PFG). The resulting generalized concentration dependence of the self-diffusion coefficient of proteins was analyzed within the framework of known theoretical approach - phenomenological approach based on the frictional formalism of non-equilibrium thermodynamics. We showed the possibility of using the phenomenological approach to describe the mobility of proteins of various shapes and sizes over a wide range of concentrations. The dynamic parameters of the system were determined: friction coefficients between protein molecules and friction coefficients between protein and solvent molecules. A qualitative explanation of the obtained values is proposed.

Key words: NMR, diffusion, proteins, concentration dependence.

Введение. Трансляционная и вращательная подвижность белков имеет большое значение для функционирования биологических систем. С ней связаны транспорт, термодинамическая стабильность, функциональная активность белков [1,2]. Коэффициент трансляционной диффузии полезен для прогнозирования их транспортных свойств в более концентрированных средах. Современные исследования показывают, что концентрация биологических макромолекул внутри клеток достигает 40 % [3]. Высокая концентрация макромолекул оказывает значительные эффекты на термодинамику и кинетику явлений в цитоплазме, влияя на ассоциацию и агрегацию макромолекул, стабильность белков, кинетику ферментативных и сигнальных процессов в биологических системах [4]. Интерпретация концентрации зависимости коэффициента самодиффузии имеет большое значение для определения вкладов различных межмолекулярных взаимодействий. В настоящее время хорошо изучена диффузия белков и разбавленных

растворах, однако описание и понимание диффузии белков в высококонцентрированных растворах макромолекул отсутствует.

В этой работе были получены обобщенные концентрационные зависимости коэффициентов самодиффузии двух глобулярных белков семейства сериновых протеаз и палочкообразного фибриногена. Полученная обобщенная концентрационная зависимость КСД белков проанализирована в рамках феноменологического подхода, основанного на фрикционном формализме неравновесной термодинамики [5].

Материалы и методы. Для исследования были выбраны сфероидальные глобулярные белки: трипсин (ММ = 24 кДа), α -химотрипсин (ММ=24.8 кДа). Концентрационные зависимости КСД трипсина поджелудочной железы свиньи, тип IX-S (SIGMA-ALDRICH, USA) и бычьего α -химотрипсина, тип II (SIGMA-ALDRICH, USA) были изучены в водном растворе (H₂O + D₂O / 90%+10%), при температуре 30 °С, pH=2 и pH=3 для трипсина и α -химотрипсина, соответственно. Такие значения pH были выбраны в соответствии с наименьшей ферментативной активностью белков [6-8]. Концентрационная зависимость КСД бычьего фибриногена (Calbiochem, USA) получена в 0.02 М Tris-HCl буфере, содержащим 150 мМ NaCl при температуре 37 °С. Для фибриногена было выбрано значение pH = 7.4, это значение соответствует pH плазмы крови [9].

Концентрации белков в растворах определялись и контролировались спектрофотометрически. Для этого использовались следующие коэффициенты экстинкции: для трипсина $E_{280}^{1\%} = 1,38$; для α -химотрипсина $E_{280}^{1\%} = 1,36$, для фибриногена $E_{280}^{1\%} = 1,51$ [10-11].

Эксперименты проводились на спектрометре ЯМР Bruker AVANCE III (600,13 МГц), с датчиком TXI 5 мм, оснащенным градиентной катушкой. Для измерения КСД использована импульсная последовательность “стимулированное эхо” с биполярными градиентами (BPP-LED). Измерения КСД проведены на ядрах протонов ¹H (600,13 МГц). Градиент магнитного поля в экспериментах изменяли в интервале от 0 до 0,5 Тл·м⁻¹ при постоянном времени диффузии и длительности импульсов градиента магнитного поля. Сигнал воды подавлялся посредством преднасыщения.

Учитывая экспериментальную ошибку при определении концентраций и pH, значения коэффициентов самодиффузии определяются с точностью 8-10 %.

Результаты и обсуждения. Целью работы было получение и описание концентрационных зависимостей КСД различных белков. Полученные концентрационные зависимости КСД представлены на рисунке 1 в координатах D_s / D_s^0 и ϕ , где ϕ - объемная доля белковых молекул, D_s^0 - значение КСД белка в бесконечно разбавленном растворе.

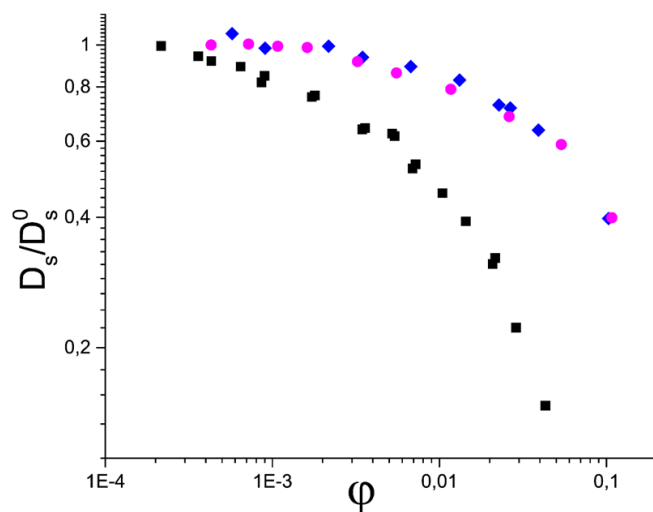


Рисунок 1 – Обобщенная концентрационная зависимость коэффициента самодиффузии фибриногена (квадраты) при T=37 °С, pH=7.4, α -химотрипсина (круги) при T=30 °С, pH=3; трипсина (ромбы) T=30 °С, pH=2

Для теоретического описания концентрационных зависимостей КСД всех изучаемых белков нами предложено воспользоваться феноменологическим подходом, основанным на фрикционном формализме неравновесной термодинамики, сформулированным в статье Винка [5]. Он основан на фундаментальных физических принципах неравновесной термодинамики, берущих начало от известных соотношений Онзагера для кинетических коэффициентов. Согласно теории Винка величина КСД D_s в зависимости от концентрации определяется следующим образом:

$$D_s = \frac{RT}{(\zeta_{12}c_1 + \zeta_{22}c)}. \quad (1)$$

Где ζ_{12} – молярный гидродинамический коэффициент трения растворенного вещества о растворитель, ζ_{22} – молярный гидродинамический коэффициент трения между молекулами растворенного вещества, c_1 и c – концентрации растворителя и растворенного вещества соответственно.

Нормированный КСД на D_s^0 имеет вид:

$$\frac{D_s}{D_s^0} = \frac{\zeta_{12}c_1}{(\zeta_{12}c_1 + \zeta_{22}c)} \tag{2}$$

Принимая во внимание, что сумма объемных долей растворителя и растворенного вещества равна 1:

$$c_1\tau_1 + c\tau_2 = 1, \tag{3}$$

где τ_1 объем молекулы растворителя, τ_2 объем молекулы растворенного вещества, а также введя обозначения:

$$\rho = \frac{\zeta_{22}\tau_1}{\zeta_{12}\tau_2}, \quad \varphi = c\tau_2,$$

уравнение (2) может быть представлено в следующем виде:

$$\frac{D_s}{D_s^0} = \frac{1}{1 + \rho \frac{\varphi}{1 - \varphi}} \tag{4}$$

Концентрационные зависимости для трипсина, α – химотрипсина, фибриногена, аппроксимированные уравнением (4), представлены на рисунке 2.

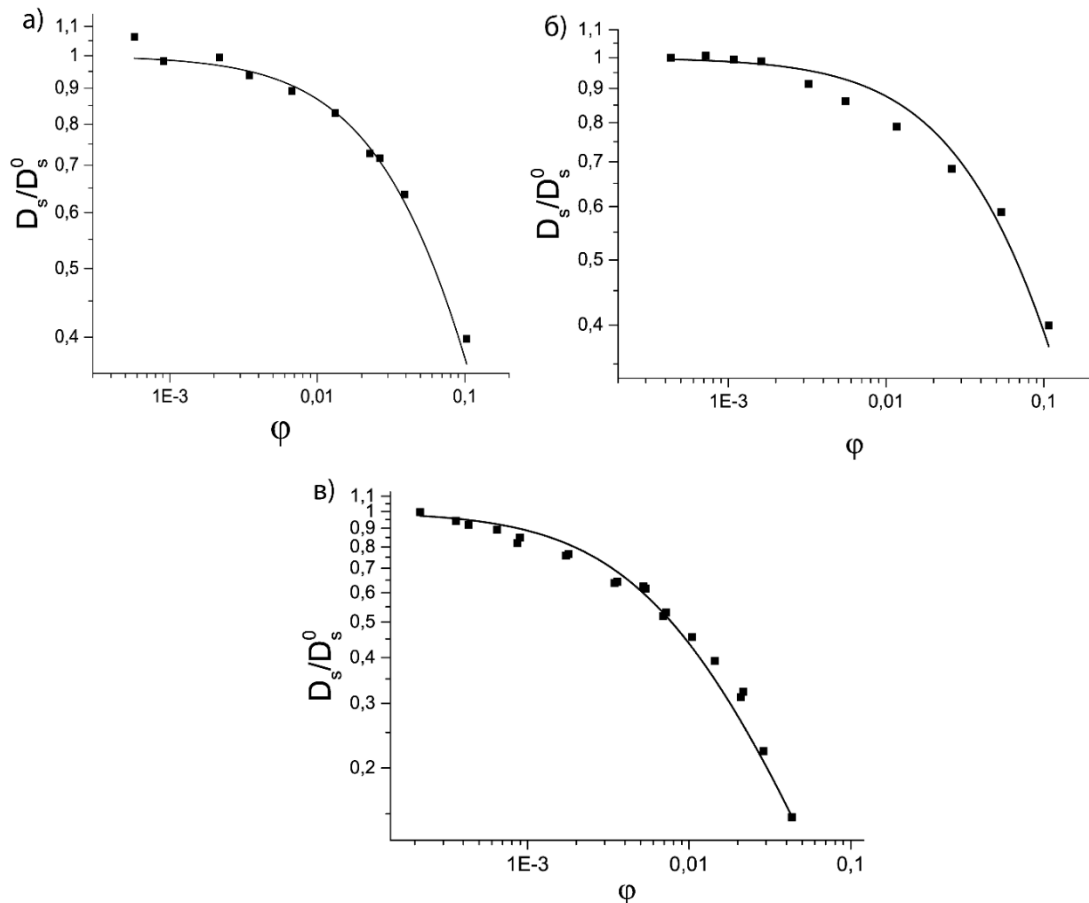


Рисунок 2 – Обобщенные концентрационные зависимости КСД белков: а) трипсина, б) α – химотрипсина, в) фибриногена. Сплошной линией показана концентрационная зависимость КСД, основанная на теории Винка

Из рисунка 2 мы видим, что теория Винка хорошо описывает концентрационные зависимости КСД для всех изучаемых белков во всем исследованном диапазоне концентраций. Это означает, что феноменологический подход, основанный на фрикционном формализме неравновесной термодинамики, может применяться для описания поведения различных белков в широком диапазоне концентраций. Основываясь на экспериментальных данных и уравнении (4), можно однозначно определить параметр ρ для каждой изучаемой системы. Значения ρ приведены в

таблице 1. Как было показано выше, параметр ρ содержит в себе два фрикционных коэффициента. Для того чтобы их однозначно определить необходимо обратиться к выражению (5), которое позволяет альтернативным способом рассчитать коэффициент трения белок-растворитель ζ_{12} [12]:

$$\zeta_{12} = \frac{M(1 - \tau_2 \rho)}{N_A s}, \quad (5)$$

где M – молекулярная масса, N_A – число Авогадро, s – коэффициент седиментации.

Все недостающие коэффициенты были найдены в литературе [13-18]. Парциальные объемы белков были рассчитаны с помощью программы CSS Chimera [15]. Полученные коэффициенты трения ζ_{12} для всех белков представлены в таблице 1. Теперь мы можем определить последний неизвестный параметр системы – коэффициент трения между молекулами растворенного вещества ζ_{22} . Значения ζ_{22} также представлены в таблице 1.

Таблица 1. Молекулярная масса, парциальный объем, коэффициент седиментации, параметр ρ , коэффициент трения белок-растворитель ζ_{12} , коэффициент трения между молекулами растворенного вещества ζ_{22} для всех исследуемых растворов белков

	M , кДа	v , 10^3 \AA^3	s , 10^{-13} с	ρ	ζ_{12} , 10^{-10} кг/с	ζ_{22} , 10^{-6} кг/с
трипсин	24,0	53,61	3,4	14,4	1,17	6,4
α -химотрипсин	24,8	56,24	3,0	14,0	1,37	7,6
фибриноген	330,0	387,00	7,9	127,9	6,94	2430,0

Сравнивая коэффициенты трения между молекулами растворенного вещества ζ_{22} для всех изучаемых объектов, видно, что для фибриногена этот коэффициент больше на два порядка, чем для трипсина и α – химотрипсина. Во-первых, одной из причин является большая молекулярная масса молекул фибриногена, чем трипсина и α – химотрипсина. Во-вторых, это связано с тем, что молекулы фибриногена имеют вытянутую форму, а также на концах молекулы имеются подвижные части, которые способствуют увеличению механического трения между молекулами.

Заключение. Белки проявляют свои уникальные свойства, зависящие как от внутреннего строения молекул, так и от их окружения. Для того чтобы найти наиболее общие законы, описывающие трансляционную диффузию белков в растворе, необходимо определить влияние различных типов взаимодействий на обобщенную концентрационную зависимость КСД.

В работе были получены и исследованы концентрационные зависимости трех белков (трипсина, α – химотрипсина, фибриногена). Для описания концентрационных зависимостей КСД белков был использован феноменологический подход, основанный на фрикционном формализме неравновесной термодинамики. Показана возможность использования теории Винка для изучения поведения белков различной формы и массы в широком диапазоне концентраций. Определены фрикционные коэффициенты и параметр ρ для всех систем. Разница в коэффициентах ζ_{22} и параметре ρ обусловлена различием масс и форм исследуемых объектов, т.е. молекулы фибриногена за счет своей большей массы и вытянутой формы испытывают более сильное механическое трение друг о друга, чем молекулы глобулярных белков: трипсина и α – химотрипсина.

Список литературы / References:

1. Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, vol. 15, iss. 12, pp. 23090-23140.
2. Zimmerman S. B., Minton A. P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1993, vol. 22, pp. 27-65.
3. Zimmerman S. B., Trach S. O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, pp. 599-620.
4. Zhou H.X., Rivas G.N., Minton A.P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Ann Rev Biophys*, 2008, vol. 37, pp. 375-397.
5. Vink H. Mutual diffusion and self-diffusion in the frictional formalism of non-equilibrium thermodynamics *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 1985, vol. 81, pp. 1725-1730.
6. Dixon M., Webb E.C. *Enzymes*. New York: Academic Press, 1979, 1116 p.
7. Анисимов А.А. *Основы биохимии*. М.: Высшая школа, 1986, 551 с. [Anisimov A.A. *Osnovy biokhimii*. Moscow: Vysshaya shkola, 1986, 551 p. (In Russ.)]
8. Fersht A. *Enzyme Structure and Mechanism*. New York: W H Freeman & Co (Sd), 1985, 475 p.
9. Збарский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.П. *Биологическая химия*. М.: МЕДГИЗ, 1960, 520 p.
10. Zuev Yu.F., Zakharchenko N.L., Stupishina E.A., Faizullin D.A., Vylegzhana N.N. Peculiarities of substrate immobilization and the trypsin catalytic activity in reverse microemulsion. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2003, vol. 44, iss. 1, pp. 13-15. [Zbarskiy B.I., Ivanov I.I., Mardashev C.P. *Biologicheskaya khimiya*. Moscow: MEDGIZ, 1960, 520 p. (In Russ.)]
11. Dellenback R. J., Chien S. The extinction coefficient of fibrinogen from man, dog, elephant, sheep, and goat at 280 nm. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1970, vol. 134, pp. 353-355.

12. Usdin E., Snyder S.H. Frontiers in catecholamine research. *International catecholamine symposium, 3rd*, University of Strasbourg, 1973, p. 49.
13. Levashov A.V., Khmel'nitsky Y. L., Klyachko N. L., Chernyak V. Ya., Martinek K. Enzymes entrapped into reversed micelles in organic solvents: Sedimentation analysis of the protein-aerosol OT-H₂O-Octane system *J. of Col. and Int. Sci.*, 1982, vol. 88, iss. 2, pp. 444-457.
14. Siegel L.M., Monty K.J. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, vol. 112, pp. 346-362.
15. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.*, 2004, vol. 25, iss. 13, pp. 1605-1612.
16. Patabhi V., Ibrahim B. Syed, Shamaladevi N. Trypsin Activity Reduced by an Autocatalytically Produced Nonapeptide. *J.Biomol.Struct.Dyn.*, 2004, vol. 21, pp. 737-744.
17. Capasso M., Rizzi C.M., Menegatti E., Ascenzi P., Bolognesi M. Crystal structure of the bovine α -chymotrypsin:kunitz inhibitor complex. An example of multiple protein:protein recognition sites. *J.Mol.Recog.*, 1997, vol. 10, pp. 26-35.
18. Medved L. V., Weisel J. W. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J. Thromb. Haemostasis*, 2009, vol. 7, iss. 2, pp. 355-359.

РАЗРЕШЕНИЕ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОФОРОВ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ НЕОДНОРОДНЫХ РАЦИОНАЛЬНЫХ БАЗОВЫХ СПЛАЙНОВ

Лавриненко И.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.
Воронежский государственный университет
Университетская площадь, 1, Воронеж, 394006, РФ
e-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Аннотация. Предложен подход и методика разрешения перекрывающихся полос поглощения хромофоров белков с помощью неоднородных рациональных базовых сплайнов. Исследованы особенности и границы эффективного применения данной методики. Сущность подхода состоит в следующем: в качестве опорного спектра используется базовая линия, представляющая собой сглаживающий сплайн к спектру поглощения исследуемого образца. Вычитанием сплайна из спектра светопоглощения получается функция, сходная с производной второго порядка спектра поглощения этого образца. Данная функция представляет собой остаток между регистрируемым значением отклика и значением, вычисленным в соответствии с рассматриваемой моделью. По местоположению и амплитуде остатков могут быть выявлены плохо разрешенные пики полос поглощения исследуемого вещества. При этом уменьшение количества контрольных точек NURBS до минимума превращает данную кривую в типичную базовую линию, с помощью которой обычно оцениваются пики в спектрах поглощения. Предложенный подход может найти применение в задачах разрешения сложных сигналов, регистрируемых от многокомпонентных систем в случае плохого разделения их составляющих хроматографическими, электрофоретическими или другими физико-химическими методами исследования.

Ключевые слова: разностная спектрофотометрия, базовая линия, разрешение полос поглощения, NURBS.

RESOLUTION OF THE OVERLAPPING BEAMS OF PROTEINS CHROMOPHORES ABSORPTION BY NON-UNIFORM RATIONAL BASIS SPLINEES

Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G.
Voronezh State University
University Square, 1, Voronezh, 394006, Russia
e-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Abstract. An approach and a technique for resolving overlapping absorption bands of proteins chromophores by non-uniform rational basis splinees is proposed. The features and boundaries of the effective application of this technique are investigated. The essence of the approach is in follows: the baseline is used as a reference spectrum, it is a smoothing spline to the absorption spectrum of the sample under study. By subtraction of the spline from the light absorption spectrum a function similar to the derivative of the second order of the absorption spectrum of this sample yields. This function is the remainder between the registered value of the response and the calculated in accordance with this model value. By location and amplitude of the residues, poorly resolved peaks of the test substance absorption bands can be detected. At the same time, a decrease in the number of NURBS control points to a minimum turns this curve into a typical baseline, it helps to estimate peaks in the absorption spectra. The proposed approach can find application in problems of solving complex signals recorded from multicomponent systems in the case of poor separation of their components by chromatographic, electrophoretic or other physical and chemical methods.

Keywords: difference spectrophotometry, baseline, resolution of absorption bands, NURBS.

Молекулярные спектры поглощения в ультрафиолетовом и видимом диапазонах длин волн характеризуются, как