

*На правах рукописи*



**Лавриненко Игорь Андреевич**

**РАЗРЕШЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ  
ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ХРОМОФОРОВ НЕКОТОРЫХ ПРОСТЫХ И  
СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ В ДИАПАЗОНЕ ДЛИН ВОЛН 240–320 НМ**

Специальность: 03.01.02 — Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Воронеж — 2015

Работа выполнена на кафедре биофизики и биотехнологии в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

<b>Научный руководитель:</b>	доктор биологических наук, профессор <b>Артюхов Валерий Григорьевич</b>
<b>Официальные оппоненты:</b>	<b>Шайтан Константин Вольдемарович</b> доктор физико-математических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра биоинженерии биологического факультета, профессор
	<b>Евстигнеев Максим Павлович</b> доктор физико-математических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Севастопольский государственный университет», кафедра физики, заведующий
<b>Ведущая организация</b>	<b>ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН»</b>

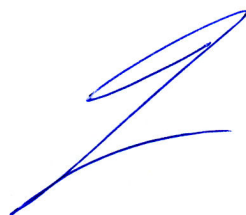
Защита диссертации состоится «28» декабря 2015 года в 15-30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан «27» ноября 2015 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук



Грабович М.Ю.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среди методов исследования структурно-функциональных свойств белков спектроскопия электронных переходов (электронная спектроскопия) занимает особое место. Данный метод может выступать, и как конечный этап измерений, например, как фотометрическое окончание при определении концентрации белка, и как основа для последующего анализа структуры белка более сложными, дорогостоящими методами, например, как спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

С помощью этого метода в условиях, близких к естественным средам живого организма, может быть изучено множество структурных состояний макромолекулы и ее конформационных перестроек при действии целого ряда физико-химических факторов (в т.ч., и в реальном масштабе времени, P.M. Kraus *et al.*, 2015). При этом, регистрируемое изменение спектральных свойств этой макромолекулы несет в себе важную информацию не только о ее состоянии, но и характере микроокружения ее хромофоров и молекулы белка в целом.

Доступность спектрофотометрического метода широкому кругу исследователей является важным преимуществом, что позволило аккумулировать достаточно большой объем информации по данному направлению. Тем не менее, в этой области знаний существуют определенные проблемы, которые, на наш взгляд, разрешены не в полной мере.

Часть таких исследований ориентирована на соотнесение полос поглощения к переходам, которые их формируют. Для ряда модельных систем, начиная от отдельных хромофорных групп в составе простых химических соединений, до хромофоров боковых групп аминокислот в составе полипептидных цепей, а также изолированных простетических групп белка и их производных, изменяя параметры среды, удалось выявить особенности происхождения тех или иных полос поглощения, и в ряде случаев, сопоставить к соответствующим электронным термам молекулы.

Однако различия в условиях проведения эксперимента и способов оценки полос поглощения при изучении нативных белков не позволяют корректно оценить диапазон варьирования их максимумов по местоположению и интенсивности. Это затрудняет сравнительную оценку полос светопоглощения для белков, сходных по своему аминокислотному составу и структуре, но полученных по различному протоколу эксперимента.

Таким образом, небольшие девиации в спектре светопоглощения белка при воздействии на него различных физико-химических агентов могут быть

маскированы различием протоколов эксперимента, представленных в опубликованных работах. При этом, в спектрах поглощения макромолекул хромофоры аминокислотных остатков, и в принципе простетических групп, могут формировать суперпозицию полос поглощения, пики которой из-за интерферирующего эффекта могут менять свое положение. Причем, эти изменения могут быть обусловлены только различием в соотношении количества однотипных радикалов боковых групп аминокислот тех или иных белков при одинаковых или сходных условиях микроокружения макромолекул.

Принимая это во внимание, для корректной оценки данных изменений необходимо, с одной стороны, выработать приемлемые способы или «стандарты» в оценке этих полос поглощения, доступных для большинства исследователей, с другой — изучить степень варьирования положения пиков поглощения для нативных белков в среде, близкой к естественной среде функционирующего белка, а также их определенным способом классифицировать.

Другая проблема, связанная с предыдущей, состоит в том, что разделение физико-химическими методами белка на составляющие зачастую приводит к ненадлежащим результатам исследований, вследствие нарушения системы внутримолекулярных взаимодействий. При этом изменения в локальном окружении хромофоров могут повлечь за собой соответствующие изменения их спектральных свойств.

Возможным путем решения обсуждаемой проблемы является разложение интегрального спектра поглощения вещества математическими методами, которые лишены рассмотренных недостатков, но имеющих, безусловно, из-за формализации свои ограничения.

Решение данной задачи потребует разработки способа разложения интегрального спектра на составляющие, который мог бы быть универсальным, и в принципе, применимым по своему подходу к решению аналогичных задач, выходящих за рамки спектрального анализа белков. Это может быть достигнуто созданием алгоритма и его математической реализации, опираясь, в том числе, и на существующие методы обработки сложных сигналов, известных своим применением в различных областях физики (D. Stranneby, W. Walker, 2004).

В связи с вышеизложенным, в настоящей работе нами проанализированы спектральные свойства простых белков — трипсина и альбумина, сложных белков — каталазы, гемоглобина и его производных по апобелковой и гемовой части макромолекулы: оксигемоглобина А и F, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А.

Цель исследования. Целью настоящей работы явилось разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм.

Задачи работы предусматривали:

1. Подбор оптимальных режимов работы спектрофотометра при регистрации данных и рациональных способов комбинированной цифровой фильтрации интегральных, разностных и дифференцированных спектров поглощения белков;

2. Разрешение полос поглощения в спектрах белков с помощью второй производной;

3. Соотнесение полос поглощения в спектрах белков к полосам поглощения в спектрах аддитивных моделей;

4. Идентификацию полос поглощения в спектрах белков путем их сопоставления в системе «аддитивная модель апобелка–свободные аминокислоты»;

5. Разработку способа разложения УФ-спектров поглощения хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент;

6. Разложение УФ-спектров светопоглощения производных гемоглобина на составляющие поглощения апобелка и простетических групп;

7. Сравнительный анализ УФ-спектров поглощения апобелковой составляющей окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина;

8. Исследование УФ-спектров поглощения простетических групп окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина.

Научная новизна. Работа представляет собой систематическое исследование спектров поглощения некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм с привлечением математических методов обработки сложных сигналов.

Показано, что вторые производные спектров светопоглощения некоторых простых и сложных белков (трипсина, альбумина, каталазы, гемоглобина и его производных: оксигемоглобина А и F, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А) содержат до 20 пиков различной степени разрешения и интенсивности, ассоциируемых с полосами поглощения, и которые, в свою очередь, были классифицированы по принадлежности к тем или иным типам аминокислотных остатков и суперпозиции светопоглощения последних.

Установлено, что моделирование спектров поглощения гемоглобина путем

рекомбинации белковой и небелковой составляющих оксиформ А и F показало их высокую аддитивность по отношению к результирующему спектру макромолекулы гембелка.

Выявлено, что изменения в моделях спектров поглощения апобелка производных гемоглобина коррелируют с изменениями положения атома железа относительно порфиринового кольца простетических групп.

Спектрофотометрическим методом показано, что лигандирование гемового железа приводит к изменению спектров поглощения тирозиновых аминокислотных остатков в молекуле гембелка.

В модельных спектрах светопоглощения гемовой компоненты белка обнаружены полосы поглощения, перекрывающиеся и маскирующиеся полосами поглощения апобелковой части макромолекулы.

Рассчитана относительная интегральная доля поглощения небелковой компоненты гемоглобина и его производных в диапазоне длин волн 240–320 нм.

На примере гемоглобина предложен и обоснован способ разложения спектров светопоглощения хромопротеидов на составляющие поглощения белковой и небелковой компонент.

Предложена схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул.

Практическая значимость. Полученные результаты систематизируют, расширяют и углубляют современные представления о спектральных свойствах простых и сложных белков на примере трипсина, альбумина, гемопротеидов.

Результаты работы представляют интерес как для биофизиков, биохимиков, для которых спектральный анализ является одним из основных аналитических методов изучения белков, так и для фотобиологов, исследующих влияние УФ-света на эти биополимеры.

Используемые подходы и способы анализа спектров поглощения белков, также могут быть полезны и для специалистов, сталкивающихся с практическими вопросами разрешения сложных сигналов, регистрируемых от многокомпонентных систем в случае плохого разделения их составляющих хроматографическими, электрофоретическими или другими физико-химическими методами исследования.

Результаты исследований и приемы анализа спектров поглощения белков, представленные в диссертации, нашли свое отражение в учебных программах дисциплин спецкурсов, предлагаемых студентам кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы представлены, доложены и обсуждены на 9-м съезде Белорусского объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2010); на IV и V съездах биофизиков России (Нижний Новгород, 2012; Ростов-на-Дону, 2015); научно-практической конференции и зонального рабочего совещания учреждений службы крови 5-й зоны РФ (Воронеж, 2012); международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013); а также на научных отчетных сессиях преподавателей и сотрудников Воронежского госуниверситета (Воронеж, 2008, 2014, 2015).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей, в том числе 3 статьи в журналах из «Перечня ВАК РФ».

На защиту выносятся следующие положения:

1. Разработан и обоснован способ разложения спектров поглощения сложных белков (оксигемоглобина А и F, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина А) до уровня: «апобелок–простетические группы»;

2. Вторые производные спектров поглощения некоторых простых и сложных белков (трипсина, альбумина, каталазы, гемоглобина и его производных) содержат до 20 пиков полос поглощения, классифицируемых по принадлежности к тем или иным типам аминокислотных остатков и суперпозиции светопоглощения последних;

3. В недифференцированных модельных спектрах поглощения простетических групп окси- и карбоксигемоглобина регистрируется полоса, обозначенная нами как « $\alpha$ »;

4. На второй производной модельных спектров поглощения производных гемоглобина выявляются две полосы, обозначенных как « $\alpha$ » и « $\beta$ »;

5. Изменения в моделях спектров поглощения апобелка окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина коррелируют с изменениями положения атома железа относительно порфиринового кольца простетических групп;

6. Предложена схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает 217 страниц машинописного текста, 12 таблиц, 62 рисунка, состоит из «Введения», 5 глав, «Заключения» и «Выводов». Список литературы содержит 172 источника, из них 69 отечественных и 103 зарубежных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава 1. Структура и некоторые физико-химические свойства белковых макромолекул

В главе изложены современные представления, касающиеся структуры, некоторых физико-химических и спектральных свойств простых белков, апобелковой составляющей сложных белков, а также структуры, электронных, магнитных и спектральных свойств простетической группы гемопротеидов. Отмечены подходы и концепции, лежащие в основе квантово-механических представлений о строении вещества и являющиеся теоретической основой абсорбционной молекулярной спектроскопии электронных переходов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись спектры поглощения фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина, цистеина, метионина и цистина; спектры поглощения некоторых простых и сложных белков.

Растворы ароматических, гетероциклических и серосодержащих L-аминокислот получены из кристаллических коммерческих препаратов (Ajinomoto, Япония и PanEco, Россия/Китай) в Na-фосфатном буфере (PanEco и Sigma-Aldrich, США).

Растворы белков были приготовлены как из кристаллических коммерческих препаратов: гемоглобин, каталаза, альбумин, трипсин (Sigma-Aldrich и PAA Laboratories, Австрия), так и выделены из цельной крови доноров, кордовой крови рожениц в Na-фосфатном буфере (PanEco/Sigma-Aldrich).

Оксигемоглобин получали барботацией кислородом (99,999 %, НИИ КМ, Россия) раствора гемоглобина в специальных герметизируемых силиконовыми септами кварцевых кюветах QS Hellma (Hellma, Германия). Регулировку давления осуществляли кислородным редуктором DINOX Plus O3 (GCE, Чехия). Время барботации составляло 30 минут.

Дезоксигемоглобин получали барботацией азотом (99,999 %, НИИ КМ) исходного раствора гемоглобина. Регулировку давления осуществляли редуктором DIN-Control NITROGEN (GCE). Время барботации составляло 40 минут.

Карбоксигемоглобин получали из исходного раствора гемоглобина и дезоксигемоглобина барботацией угарным газом (98,5 %, НИИ КМ). Регулировку



давления осуществляли редуктором DIN-Control HYDROGEN (GCE). Время барботации составляло 20 минут.

Метгемоглобин получали окислением гемового железа белка гексацианоферратом калия (III) (Вектон, Россия) стандартных кварцевых кюветках QS Hellma (Hellma). Время инкубации раствора гембелка с окислителем составляло 15 мин.

Фетальный гемоглобин получали по методу К. Зингера (Singer et al., 1951).

Регистрацию спектров поглощения образцов, оптически пустых растворов, осуществляли на спектрофотометрах исследовательского класса: Shimadzu-2401(PC) и Shimadzu-2550(PC) (Shimadzu, Япония).

Измерения поглощения образцов проводили в кварцевой кювете QS Hellma (Hellma) с длиной оптического пути 1 см в диапазонах длин волн 230–650 нм, со спектральной шириной щели 0,5 нм, шагом сканирования 0,5 (Shimadzu-2401(PC)) и 0,2 нм (Shimadzu-2550(PC)). Скорость сканирования соответствовала режиму Slow.

Управление спектрофотометрами и предварительную обработку данных выполняли с помощью ПО UVProbe (Shimadzu).

Снижение систематической фотометрической ошибки базовой линии спектрофотометров, а также ошибки, обусловленной асимметрией кювет, обеспечивалось путем регистрации спектров в режиме Split-beam.

Увеличение разрешения в спектрах поглощения образцов достигалось вычислением второй производной.

С целью снижения случайных ошибок фотометрических измерений, обусловленных тепловым шумом фотодетектора, спектры поглощения сглаживались и аппроксимировались кубическими сплайнами (Cubic Spline Smoothing, CSS) с точностью аппроксимации до 0,2 нм.

Дополнительная фильтрация шумов при анализе второй производной осуществлялась аппроксимацией спектров поглощения неоднородными рациональными Безье-сплайнами различных порядков (Non-Uniform Rational Bezier Spline, NURBS,) с передискретизацией или с применением окна Кайзера-Бесселя с низкочастотной фильтрацией (Kaiser-Bessel Lowpass Filtering, KBLF). При неоднозначности в интерпретации слабых сигналов в качестве альтернативы использовали сглаживание Савицкого-Голая (Savitzky-Golay Smoothing Filters, SGSF).

При некотором несоответствии оценок положения пиков полос поглощения в спектрах образцов, выявленных с помощью второй производной и

полученных непосредственно из недифференцированного спектра, были представлены оба значения.

Коррекция молярных спектров поглощения производных гемоглобина с максимально возможным содержанием основной формы осуществлялась путем вычитания молярных спектров поглощения оставшихся производных гемоглобина. Для компенсации вычтенной доли неосновной компоненты полученные молярные спектры поглощения производных гемоглобина нормировались к исходному значению.

### Глава 3. Разрешение и идентификация перекрывающихся полос поглощения хромофоров белков в диапазоне длин волн 240–320 нм

В ходе проведенных экспериментов получены спектры поглощения растворов гемоглобина человека и его производных, спектры поглощения каталазы, выделенной из печени быка, спектры поглощения бычьего сывороточного альбумина и спектры поглощения трипсина, выделенного из поджелудочной железы быка.

Анализ второй производной этих спектров позволил выявить ряд скрытых (плохо разрешенных) полос, обусловленных, прежде всего, поглощением боковых групп ароматических аминокислотных остатков, входящих в состав белковой молекулы (рис. 1). Обнаружено до 20 плохо разрешенных полос поглощения. Из представленных данных следует, что вариации гемовой компоненты по типу лиганда и степени окисления гемового железа (рис. 1А–D) не оказывают заметного влияния на положение пиков вторых производных спектров поглощения гемоглобина. Это обстоятельство может указывать или на отсутствие полос поглощения гемов вообще, или на их слишком большую спектральную полуширину (размытость). Однако с позиции анализа второй производной спектров поглощения апобелковой компоненты, эта особенность позволяет исследовать хромофоры боковых групп аминокислот в составе белка без его разделения на апобелковую и небелковую составляющие (рис. 1А–F).

Одним из возможных путей в идентификации полос поглощения белков является сравнительный анализ спектра светопоглощения раствора биополимера и аддитивного спектра, полученного в результате суммирования парциальных спектров растворов аминокислот, входящих в состав макромолекулы. Очевидно, что при этом не учитываются наличие внутримолекулярных связей, полярность локального окружения, расположение боковых групп в молекуле белка и т. д.

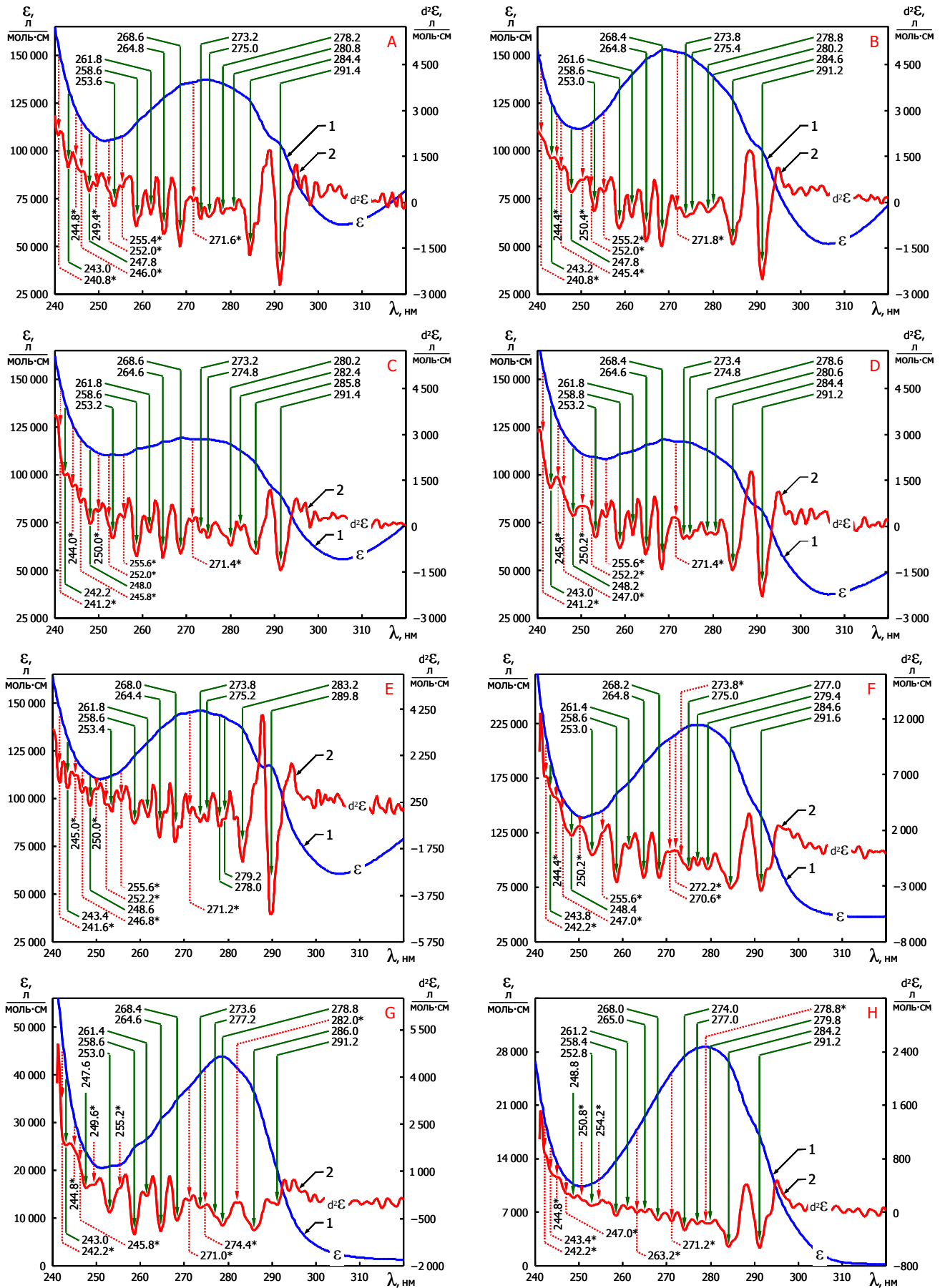


Рис. 1. Молярные спектры поглощения (1), их вторые производные (2) для окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина A (A, B, C, D), оксигемоглобина F (E), каталазы (F), альбумина (G) и трипсина (H)

Так как существуют вполне определенные устойчивые области пиков поглощения второй производной спектров белков (рис. 1), то для сопоставления спектров нативных макромолекул и их моделей достаточно биополимера одного типа. Для этих целей был использован спектр поглощения гемоглобина человека (рис. 2, кривая 2), к которому была построена его аддитивная модель по апобелку (кривая 1).

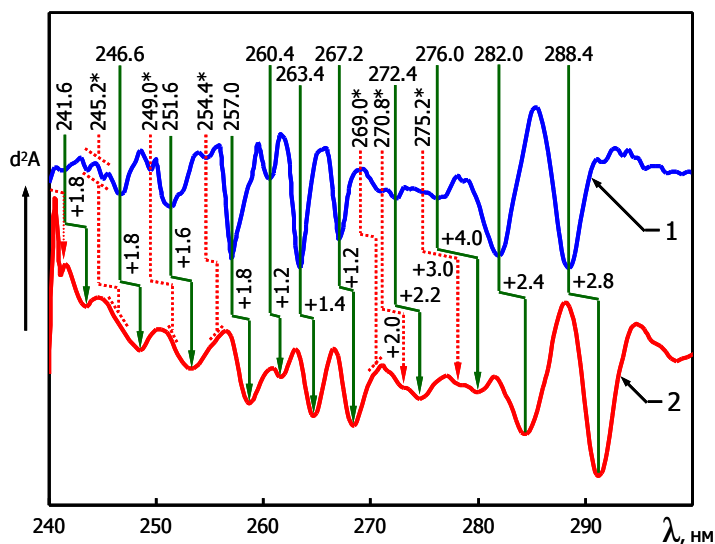


Рис. 2. Вторые производные спектров поглощения гемоглобина (2) и его аддитивной модели по апобелку (1); пунктиром и знаком «\*» отмечены вероятные полосы поглощения; по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ ); производные спектров поглощения нормированы по амплитуде и смещены друг относительно друга по оси ординат на константу

Как следует из представленных данных (рис. 2), пики второй производной спектра поглощения нативного гемоглобина находятся в хорошем соответствии с таковыми для аддитивной модели по критериям: форма, относительные соотношения их амплитуды и положения. Для пиков нативного гемоглобина характерен положительный волновой сдвиг относительно модельного спектра, что хорошо соотносится с теоретическими представлениями (Ч. Кантор, П. Шиммел, 1984).

Проведена идентификация полос поглощения в спектрах белков путем их сопоставления в системе «аддитивная модель апобелка–свободные аминокислоты».

Так как вторые производные спектров поглощения аддитивных моделей различных белков демонстрируют сходство, то для качественной оценки происхождения полос поглощения, как нам представляется, достаточно одной модели. В этом виде была использована аддитивная модель альбумина (рис. 3).

Подробно проанализирован вклад каждой из составляющих аддитивный спектр поглощения аминокислот: фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина, цистеина, метионина и цистина. Из 20 полос (обозначенных номерами от 1 до 20), зафиксированных по вторым производным спектров поглощения белков и их моделей, только полоса с №14 была отмечена как «возможная».

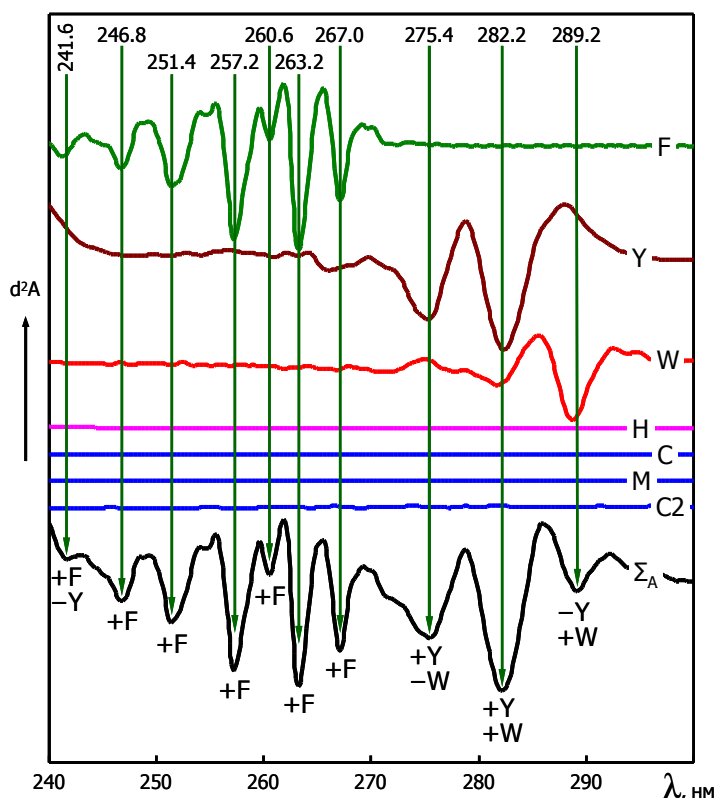


Рис. 3. Вторые производные спектров поглощения аддитивной модели альбумина ( $\Sigma_A$ ) и парциальных спектров поглощения составляющих ее аминокислот: фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), цистеина (C), метионина (M), цистина (C2); вертикальные линии проведены по пикам второй производной аддитивной модели альбумина; знаком «-» и «+» показан вклад аминокислоты в формирование результирующего пика аддитивной модели; по оси ординат — вторая производная поглощения ( $d^2A$ ); производные спектров поглощения приведены в одном масштабе, но по ординате смещены друг относительно друга на константу

#### Глава 4. Разложение УФ-спектров поглощения хромопротеидов на спектры светопоглощения простетических групп и апобелка с помощью аддитивной модели

Возможным путем исследования спектров поглощения различных типов хромофорных групп, входящих в состав белка, является разложение его интегрального спектра поглощения математическими методами.

Нами предложен и продемонстрирован на примере гемоглобина способ разложения УФ-спектра поглощения хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент в диапазоне длин волн 240,0–320,0 нм с помощью аддитивной модели.

В основу предлагаемого способа разложения интегрального спектра поглощения хромопротеида на апобелковую и небелковую составляющие, положен следующий алгоритм с определенными условиями и допущениями:

1) Вклад апобелковой и небелковой компонент в спектр поглощения белка представляется аддитивной моделью общего вида:

$$A + B = C, \quad (1)$$

где  $A$  и  $B$  — взаимосвязанные спектры поглощения апобелка и его простетических групп, которые необходимо найти, а  $C$  — известный спектр поглощения белковой макромолекулы.

2) Используемый диапазон длин волн должен быть практически свободен

от поглощения пептидными группами белка.

3) В качестве исходной модели спектра поглощения апобелка ( $A_0$ ) используется аддитивная модель спектра, которая получена в результате суммирования парциальных спектров поглощения аминокислот, входящих в состав макромолекулы.

4) Исходная модель спектра поглощения небелковой компоненты ( $B_0$ ) получается вычитанием  $A_0$  из  $C$ .

5) Повышение степени соответствия модельного спектра  $A_0$  к целевому спектру  $A$  достигается смещением  $A_0$  по оси абсцисс на величину, необходимую для компенсации сдвига относительно спектра  $C$  (его апобелковой составляющей). В результате вычислений получается смещенный на  $\Delta x$  модельный спектр  $A_1$ .

6) Предполагается (А. П. Демченко, 1981; Ч. Кантор, П. Шиммел, 1984; Л. Страйер, 1984), что существующая разность в интенсивности, ширине и форме полос поглощения боковых групп аминокислот для спектров  $A_0$  и  $A$  не столь значительна и может быть нивелирована аппроксимацией (п. 10 и 11 алгоритма).

7) Необходимая величина спектрального сдвига ( $\Delta x$ ) задается формальным критерием (кросс-корреляция спектров поглощения).

8) Полученный вычитанием спектра  $A_1$  из  $C$ , спектр  $B_1$ , используется, в том числе, как тест на корректность и эффективность трансформации спектра  $A_0$ .

9) Эмпирическим критерием оптимально заданной величины  $\Delta x$  по этому тесту является минимальное присутствие «отпечатков» полос поглощения хромофоров аминокислотных остатков в модельном спектре  $B_1$ .

10) Для устранения дефектов спектра  $B_1$ , обусловленных остаточным присутствием «следов» полос поглощения хромофоров аминокислот, выполняется его аппроксимация по заданному критерию. В результате получается итоговый модельный спектр поглощения протетических групп ( $B$ ).

11) Вычитанием  $B$  из  $C$  рассчитывается итоговый модельный спектр поглощения апобелка ( $A$ ).

12) Сравнением вторых производных спектров  $A$  и  $B$  (их экстремумов) осуществляется оценка корректности выполненных преобразований.

Выполнено разложение спектров поглощения макромолекул для наиболее значимых производных гемоглобина на составляющие компоненты до уровня: «апобелковая/небелковая части биополимера»:  $Hb_A O_2$ ,  $Hb_A CO$ ,  $Hb_A$  и  $MtHb_A$  (рис. 4А–D) и  $Hb_F O_2$  (рис. 4Е). Относительная доля поглощения апобелковой и небелковой составляющей показана на рис. 4F.

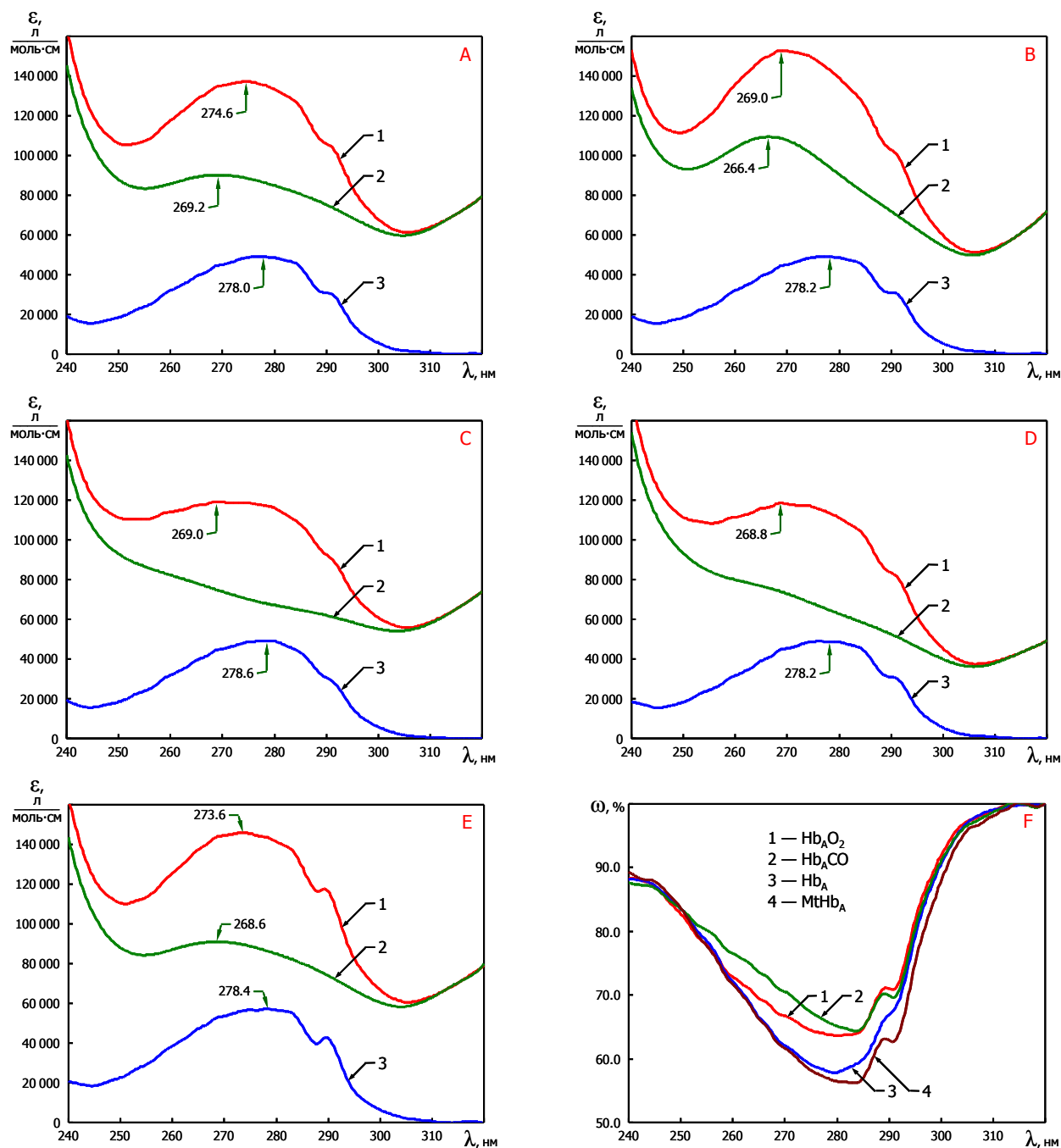


Рис. 4. Спектры поглощения гемоглобина (1), модельный спектр поглощения гемовой компоненты и апобелка (2 и 3 соответственно) для окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина A (A, B, C, D), оксигемоглобина F (E), F — относительная доля поглощения некоторых производных гемоглобина;  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения; отмеченные пики поглощения определены из недифференцированных спектров

## Глава 5. Анализ УФ-спектров поглощения апобелковой и гемовой компонент некоторых производных гемоглобина в составе макромолекулы

Изменение спектральных свойств гемоглобина при реконфигурации электронной структуры комплексобразователя в ходе его окисления/восстановления или замене гемового лиганда продемонстрировано рядом работ

(Г. А. Вашанов, 2004; В. Г. Артюхов *и др.*, 2013 г.). Однако наблюдаемые изменения в УФ-спектрах при этом не дифференцируют на составляющие поглощения белковой и небелковой частей биополимера из-за невозможности физического разделения апобелковой и гемовой компонент без нарушения их структурного состояния и влекущее, критическое для адекватного анализа, изменение спектральных свойств этих составляющих относительно таковых для нативной макромолекулы.

Детально проанализировано изменение спектральных свойств апобелковой и гемовой компонент в составе макромолекулы гемоглобина при связывании биополимером некоторых лигандов.

На рис. 5 продемонстрировано изменение спектральных свойств апобелка, обусловленное изменением микроокружения аминокислотных остатков тирозина вследствие лигандирования по шестому координационному месту комплексообразователя. Полученные данные находятся в хорошем соответствии со схемой оксигенации М. Перутца (М. F. Perutz, 1970).

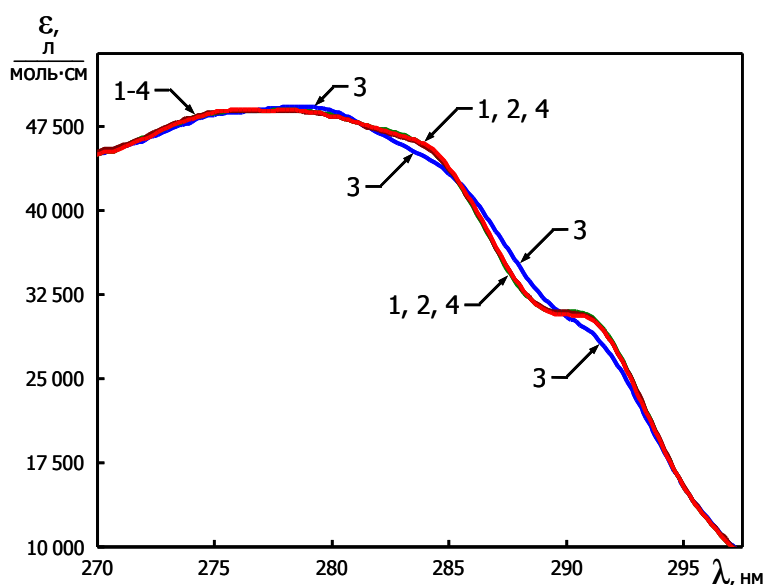


Рис. 5. Модели спектров поглощения апогемоглобина А в диапазоне длин волн 270,0–297,5 нм: оксигемоглобин (1), карбоксигемоглобин (2), дезоксигемоглобин (3) и метгемоглобин (4);  $\epsilon$  — молярный показатель поглощения

Изучены интегральные и дифференцированные по второй производной модели спектров поглощения простетических групп гемоглобина (табл. 1).

Таблица 1. Положение некоторых пиков в исходных и дифференцированных по второй производной спектрах поглощения простетических групп

Дериваты гемоглобина	$\lambda_{max}$ , нм			
	«- $\alpha$ »		«- $\beta$ »	
	A	$d^2A$	A	$d^2A$
Hb <sub>A</sub> O <sub>2</sub>	269,2	268,0	—	289,2
Hb <sub>A</sub> CO	266,4	266,6	—	291,4
Hb <sub>A</sub>	—	263,2	—	290,0
MtHb <sub>A</sub>	—	267,8	—	290,6
Hb <sub>F</sub> O <sub>2</sub>	268,6	267,6	—	288,2

Примечание:  $\lambda_{max}$ , нм — значение положения пиков поглощения по абсциссе; исходный (A) и дифференцированный ( $d^2A$ ) спектр; «- $\alpha$ » и «- $\beta$ » — вычисленные полосы поглощения простетических групп; «—» — пики не определены



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимизацией режимов работы спектрофотометров и комбинированной цифровой фильтрацией получаемых исходных интегральных и дифференцированных по второму порядку спектров поглощения некоторых протеиногенных аминокислот, несущих хромофоры в составе боковых групп, а также некоторых простых и сложных белков (трипсина, альбумина, каталазы и гемоглобина), достигнуты необходимые условия, позволяющие выявлять плохо разрешенные полосы в спектрах светопоглощения изучаемых образцов в диапазоне длин волн 240–320 нм.

Отмечается некоторое несоответствие в положении пиков для исходных и производных спектров поглощения исследуемых молекул, что связано с особенностями процедуры дифференцирования. Однако наблюдаемое несоответствие не представляет сложности для анализа таких экстремумов во вторых производных спектров поглощения, т.к. сопоставление пиков осуществляется в одной и той же «системе координат».

Систематически возникающие пики-сателлиты в некоторых областях проанализированных дифференцированных спектров также могут быть дополнительными реперными точками, что позволяет по ним сравнивать спектры поглощения белков как между собой, так и с аддитивными моделями этих биополимеров, построенных на основе парциальных спектров свободных аминокислот.

Установлено, что в диапазоне длин волн 240–320 нм для рассматриваемых нами белков: трипсина, альбумина, каталазы и гемоглобина, во вторых производных их спектров поглощения обнаруживаются до 20 пиков (ассоциируемых с полосами поглощения), положение которых достаточно консервативно.

Вариабельность местоположения этих экстремумов, как известно, зависит от соотношения аминокислотных остатков в макромолекуле и характера их микроокружения.

Причем, как нами было показано, во вторых производных спектров поглощения нативных макромолекул небелковая компонента хромопротеидов не затрудняет определение местоположения пиков апобелка по причине отсутствия у гемовых групп полос с узкой полушириной поглощения, т.е. в некотором смысле они «оптически прозрачны».

Ввиду того, что диапазоны варьирования положения пиков апобелка по абсциссе, за некоторым исключением, не перекрываются, то целесообразно

представить эти диапазоны в виде областей и присвоить им порядковые номера полос от 1 до 20, начиная от меньших длин волн.

Наличие таких устойчивых обособленных областей пиков вторых производных спектров поглощения макромолекул позволяет осуществлять прогноз положения данных максимумов, вероятно, для большинства белков, а аномалии в их расположении могут представлять дополнительный интерес при изучении структурно-функционального состояния этих биополимеров.

Так как соотнесение пиков во вторых производных спектров поглощения белков к таковым для свободных аминокислот не совсем корректно из-за возникающего в суперпозиции поглощения макромолекулы подобия интерференционной картины для ее экстремумов, то одним из способов решения данной проблемы является сопоставление с аналогичными пиками аддитивной модели апобелка, созданной на основе парциальных спектров аминокислот.

Из-за того, что вариабельность положения пиков во вторых производных аддитивных моделей апобелка, по понятным причинам (таким как, например, инвариантность микроокружения хромофоров), значимо меньше, т.е., амплитуда варьирования пиков в анализируемой системе «нативный белок–модель апобелка» лимитируется только лишь спектром нативной макромолекулы, то эффективность примененного нами подхода вполне очевидна.

Обнаруживаемый волновой сдвиг между исходным спектром нативного белка и его моделью позволяет оценивать роль микроокружения боковых групп аминокислот в составе макромолекулы, с одной стороны, с другой — скоррелированность такого сдвига дает возможность, как найти, так и уточнить местоположение некоторых плохо разрешенных пиков полос поглощения биополимера.

Последующее разложение аддитивного спектра поглощения до исходных компонент позволяет оценить вклад каждого аминокислотного остатка, входящего в определенную модель, в спектр поглощения нативной макромолекулы.

Тогда, по нашим данным, пики во второй производной спектров поглощения белков в областях с 3 по 13 обусловлены боковыми группами фенилаланина, 2 — главным образом, фенилаланина и несущественно тирозина, 1 — по всей вероятности, фенилаланина и отчасти тирозина. Ненадежно разрешенный пик в области под номером 14, вероятно, — плохо выраженная суперпозиция поглощения тирозина и фенилаланина.

Пики областей 15–20 определяются, главным образом, комбинациями

экстремумов тирозина и триптофана, с возрастающим вкладом последнего в суперпозицию этих пиков с увеличением длины волны в спектре поглощения белка. Высокая чувствительность боковой группы тирозина к параметрам своего микроокружения, наряду с интерферирующим эффектом ее спектра со спектром триптофана во вторых производных, делает положение результирующих пиков в областях 15–19 наиболее лабильным, а в области 17–18 — перекрывающимися.

Отношение количества аминокислотных остатков тирозина к триптофану к соответствующему отношению амплитуд пиков второй производной как в нативных белках, так и их апобелковых моделях, может быть аппроксимировано экспоненциальной зависимостью, что позволяет выполнять прогнозы, исходя из известного соотношения их аминокислотных остатков в макромолекуле или соотношения пиков второй производной в ее спектре поглощения.

Вкладом гистидина, цистеина и метионина в формирование интегрального спектра поглощения макромолекулы можно пренебречь, т.к. они имеют, по данным модельного спектра, низкую относительную долю светопоглощения.

Кроме этого, по результатам анализа спектра аддитивной модели, данные аминокислоты, а также цистин, не вносят значимых изменений в спектр поглощения по второй производной, что объясняется отсутствием пиков в исходных (недифференцированных) спектрах этих аминокислот (цистеин, метионин), или имеющих очень большую спектральную полуширину (гистидин, цистин) в используемом диапазоне длин волн.

С целью изучения индивидуальных спектров поглощения белковой и небелковой компонент без нарушения нативной структуры макромолекулы из-за применения различных физико-химических методов разделения, нами предложен и протестирован способ разложения спектра поглощения биополимера математическими методами.

В основе этого способа используется алгоритм с определенными условиями и допущениями. Вклад белковой ( $A$ ) и небелковой ( $B$ ) частей в интегральный спектр ( $C$ ) макромолекулы представляется аддитивной моделью. В качестве исходной модели ( $A_0$ ) выступает модель спектра поглощения апобелка, полученная на основе парциальных спектров аминокислот, входящих в его состав. Повышение степени соответствия  $A_0$  к целевому  $A$  достигается смещением  $A_0$  на  $\Delta x$  по заданному критерию, при этом получается спектр  $A_1$ . Вычитанием  $A_1$  из  $C$  находится спектр поглощения протетических групп ( $B_1$ ). Так как  $B_1$  содержит артефакты, обусловленные остаточным присутствием «отпечатков» полос поглощения хромофоров апобелка, аппроксимация интерполирующим

полиномом по определенным критериям дает целевой спектр  $B$ . Вычитанием  $B$  из  $C$  получается  $A$ . Сравнением вторых производных  $A$  и  $B$  проверяется корректность выполненных преобразований.

Разложение исходных спектров поглощения гемоглобина  $A$  и  $F$  в окси-, дезокси-, карбокси- и метформе на белковую и небелковую составляющие показало хорошее соответствие модельных спектров светопоглощения апобелковой компоненты к спектрам простых белков, полученным экспериментальным путем по результатам собственных исследований и данных литературных источников.

Сопоставление модельных спектров поглощения (гемпроизводных) небелковой части макромолекулы (240–320 нм) со спектрами поглощения соответствующих нативных молекул гемоглобина (320–380 нм), где поглощают только протетические группы, показало, что эти части единого спектра гармонизируют между собой по наличию/отсутствию максимумов, интенсивности и степени выраженности пиков.

Практически полное (ограниченное только ошибкой измерения и неизбежными артефактами аппроксимации) совпадение модельных спектров поглощения гемовой составляющей оксигемоглобина  $A$  и  $F$ , указывает на высокую аддитивность между белковой и небелковой компонентами, что также подтверждается данными из спектров поглощения видимого диапазона (380–600 нм) для нативных макромолекул, в частности,  $Hb_AO_2$  и  $Hb_FO_2$ .

Это, в свою очередь, позволяет моделировать спектры поглощения гемоглобина путем рекомбинации белковой и небелковой частей макромолекулы не только для гемоглобинов  $A$  и  $F$ , но и, по всей вероятности, и для других форм.

Анализ вторых производных интегральных спектров поглощения гемоглобина и его дериватов, а также моделей спектров светопоглощения апобелковой составляющей этих макромолекул с помощью различных методических приемов показал, что апобелковая компонента гемоглобина в дезоксиформе достаточно существенно отличается от таковых для других лигандных форм гембелка.

Вместе с тем, апобелковые части макромолекулы для окси-, карбокси и метформ гемоглобина практически идентичны с точки зрения проявления ими своих спектральных свойств.

Дальнейшее исследование выявленных различий в интегральных, разностных и дифференцированных спектрах поглощения апобелковой компоненты показало ведущую роль тирозиновых аминокислотных остатков в

возникновении таких изменений. Этот факт хорошо согласуется как с данными по чувствительности боковой группы тирозина к изменению ее микроокружения, так и находится в очень хорошем соответствии со схемой оксигенации Перутца.

Вычисленная нами на основании данных рентгеновской кристаллографии дериватов гемоглобина дистанция положения гемового железа относительно плоскости порфиринового кольца для этих форм отлично коррелирует с изменениями в модельных спектрах поглощения апобелковых компонент различных гемпроизводных белка.

Анализ вторых производных аппроксимирующих полиномов как модельных спектров поглощения гемовой компоненты позволил выявить полосы в этих спектрах, обозначенные нами как « $-\alpha$ » и « $-\beta$ ». Данные полосы по соотношению интенсивностей поглощения (« $-\alpha$ »/« $-\beta$ ») во вторых производных модельных спектров небелковой компоненты коррелируют с полосами  $\alpha/\beta$  в видимом участке спектра для нативных гемпроизводных белка. Причем, сами полосы « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » по их интенсивности имеют некоторую симметрию относительно оси ординат (и полосы Core) относительно  $\alpha$  и  $\beta$ .

Нами использован ряд тестов, позволяющих в той или иной степени ассоциировать « $-\beta$ »-полосу с гемовой компонентой, а не как с возможным артефактом модельного спектра вследствие различных математических преобразований и вычислений.

Однако, несмотря на приведенные аргументы в пользу наличия « $-\alpha$ » и « $-\beta$ »-полос в спектрах поглощения производных гембелка, однозначно утверждать о присутствии, прежде всего « $-\beta$ »-полосы, а отчасти « $-\alpha$ »-полосы для дезокси- и метгемоглобина, несколько преждевременно. Вопрос об их существовании, по нашему мнению, окончательно не снят, и для его разрешения в будущем потребуется анализ новых данных и применение новых методических приемов.

В конечном итоге, результаты наших исследований могут быть представлены в виде возможной схемы расположения областей идентифицированных пиков полос поглощения для некоторых простых и сложных белков (рис. 6).

Таким образом, комплекс мер, направленных на разрешение, идентификацию и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм позволил в определенной степени решить ряд задач, связанных с изучением коррелированного изменения структуры белковых макромолекул и

соответствующим проявлением ими своих спектральных свойств.

Это, с одной стороны, показывает результативность спектральных методов и актуальность их применения, с другой — позволяет более эффективно исследовать влияние различных физико-химических агентов на структурно-функциональное состояние белков и их комплексов с помощью данного метода и приемов, рассмотренных и использованных в настоящей работе.

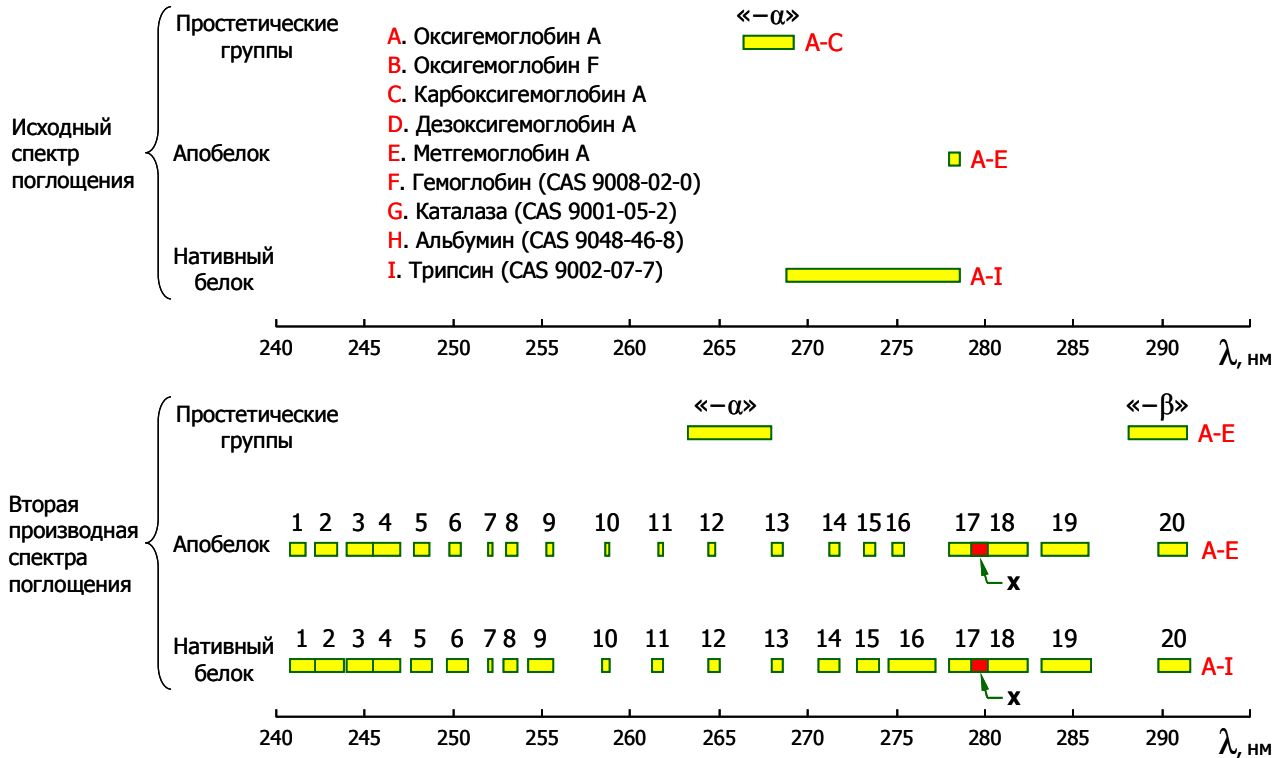


Рис. 6. Возможная схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул; знаком «X» показана область перекрытия полос поглощения

## ВЫВОДЫ

1. Вторые производные спектров поглощения белков — трипсина, альбумина, гемоглобина и каталазы, содержат пики полос поглощения, которые расположены в областях, обозначенных нами номерами от 1 до 20: №1 (240,8–242,2 нм), №2 (242,2–243,8 нм), №3 (244,0–245,4 нм), №4 (245,4–247,0 нм), №5 (247,6–248,8 нм), №6 (249,6–250,8 нм), №7 (252,0–252,2 нм), №8 (252,8–253,6 нм); №9 (254,2–255,6 нм), №10 (258,4–258,8 нм), №11 (261,2–261,8 нм), №12 (264,4–265,0 нм), №13 (268,0–268,6 нм), №14 (270,6–271,8 нм), №15 (272,8–274,0 нм), №16 (274,6–277,2 нм), №17 (278,0–280,2 нм), №18 (279,2–282,4 нм), №19 (283,2–286,0 нм) и №20 (289,6–291,6 нм).

2. Пики во второй производной спектров поглощения белков в областях с 3 по 13 обусловлены боковыми группами фенилаланина, 2 — главным образом

фенилаланина и несущественно тирозина, 1 — по всей вероятности, фенилаланина и отчасти тирозина. Ненадежно разрешенный пик в области под номером 14, вероятно, — плохо выраженная суперпозиция поглощения тирозина и фенилаланина. Пики областей 15–20 определяются, главным образом, комбинациями экстремумов тирозина и триптофана.

3. Высокая чувствительность боковой группы тирозина к параметрам своего микроокружения, наряду с интерферирующим эффектом ее спектра со спектром триптофана во вторых производных, лабилизирует положения результирующих пиков в областях 15–19, а области 17–18 при этом становятся перекрывающимися.

4. Моделирование спектров поглощения гемоглобина путем рекомбинации белковой и небелковой составляющих оксиформ А и F показало высокую аддитивность в системе «апобелок–простетические группы».

5. Изменения в моделях спектров поглощения апобелка производных гемоглобина коррелируют с изменениями положения атома железа относительно порфиринового кольца простетических групп.

6. Лигандирование гемового железа приводит к изменению спектров поглощения тирозиновых аминокислотных остатков в молекуле гембелка.

7. Относительная интегральная доля поглощения небелковой части макромолекулы для гемоглобина А и F в диапазоне длин волн 240–320 нм превышает 70 % ( $\text{Hb}_A\text{O}_2$  — 77,5 %,  $\text{Hb}_A\text{CO}$  — 77,9 %,  $\text{Hb}_A$  — 75,7 %,  $\text{MtHb}_A$  — 73,7 % и  $\text{Hb}_F\text{O}_2$  — 74,3 %).

8. В модельных недифференцированных спектрах светопоглощения простетических групп окси- и карбоксигемоглобина обнаруживается полоса, обозначенная как « $-\alpha$ » с  $\lambda_{\max}=269,2$  нм ( $\text{Hb}_A\text{O}_2$ ), 266,4 нм ( $\text{Hb}_A\text{CO}$ ) и 268,6 нм ( $\text{Hb}_F\text{O}_2$ ).

9. В дифференцированных модельных спектрах простетических групп положения выявленных полос поглощения « $-\alpha$ » и « $-\beta$ » приходятся на длины волн: для  $\text{Hb}_A\text{O}_2$  — 268,0 и 289,2 нм;  $\text{Hb}_A\text{CO}$  — 266,6 и 291,4 нм;  $\text{Hb}_A$  — 263,2 и 290,0 нм;  $\text{MtHb}_A$  — 267,8 и 290,6 нм и  $\text{Hb}_F\text{O}_2$  — 267,6 и 288,2 нм соответственно.

10. Предложена схема расположения пиков полос поглощения электронных переходов, отвечающих за спектральные свойства белковых макромолекул.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Регуляция функциональной активности гемоглобина изменением соотношения форм его молекул / Г. А. Вашанов, О. В. Путинцева, В. Г. Артюхов, И. А. Лавриненко // Циклы природы и общества: Материалы V Междунар. конф. "Циклы природы и общества", посвященной 100-летию со дня рождения А.Л.Чижевского и 220-летию г. Ставрополя (г. Ставрополь, 12-19 окт. 1997 г. ). — 1997. — Ч. 2. — С. 202–203.

2. Вашанов Г. А. Исследование спектров поглощения растворов гемоглобина человека в диапазоне длин волн 240–320 нм / Г. А. Вашанов, И. А. Лавриненко, М. К. Рубан // Физиология и психофизиология мотиваций : межрегион. сб. науч. работ. — Воронеж, 2007. — Вып. № 8. — С. 31–32.

3. Лавриненко И. А. Анализ UV-спектров поглощения растворов гемоглобина с помощью аддитивных моделей / И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, М. К. Рубан // Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы : Международная научно-методическая конференция, 24-27 июня 2013 г., Воронеж : материалы докладов. — Воронеж, 2013. — С. 52–55.

4. Рубан М. К. Оксид азота (II) в реакциях окисления-восстановления гемового железа оксигемоглобина / М. К. Рубан, Г. А. Вашанов, И. А. Лавриненко // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2013. — № 7. — С. 59–64.

5. Лавриненко И. А. Analysis of the Contribution of Chromophores in side Groups of Amino Acids to the Absorption Spectrum of Hemoglobin / I. A. Lavrinenko, G. A. Vashanov, M. K. Ruban // Journal of Applied Spectroscopy. — 2014. — V. 80, N. 6. — P. 899–904.

6. Лавриненко И. А. Разложение УФ-спектра поглощения гемоглобина на спектры поглощения простетических групп и апобелка с помощью аддитивной модели / И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, В. Г. Артюхов // Биофизика. — 2015. — Т. 60, вып. 2. — С. 253–261.

Статьи № 4, 5, 6 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ.

Статьи № 5, 6 индексируются в базе данных Scopus.

Статья № 5 индексируется в базе данных Web of Science.