

СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА В СОСТАВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО И БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

© 2025 г. В.З. Пашенко^{*,#}, В.В. Горохов^{*}, П.П. Нокс^{*}, Б.Н. Корватовский^{*},
Н.П. Гришанова^{*}, С.Н. Горячев^{*}, А.Б. Рубин^{*}

^{*}Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

[#]E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2024 г.

После доработки 04.12.2024 г.

Принята к публикации 29.01.2025 г.

Исследована температурная зависимость длительности флуоресценции триптофана в составе человеческого и бычьего сывороточного альбумина в водном растворе и глицерине в диапазоне температур от -170°C до 20°C . Построена модель прямых и обратных электронных переходов в молекуле триптофана из возбужденного в основное состояние и в состояние с переносом заряда. Определены три основные спектральные области флуоресценции триптофана с различным поведением температурных зависимостей скоростей перехода из возбужденного состояния триптофана в состояние с переносом заряда. Установлено, что динамика системы водородных связей в выделенных спектральных областях оказывает определяющее влияние на характер изменения длительности флуоресценции триптофана. Обнаруженная в работе нелинейная зависимость скоростей внутримолекулярных переходов от температуры определяется взаимодействием молекул триптофана с его микроокружением. Перестройки в системе водородных связей белка альбумина, содержащего молекулу триптофана, оказывают определяющее влияние на процессы дезактивации возбуждения в триптофане.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, триптофан, флуоресценция.

DOI: 10.31857/S0006302925020031, EDN: LAEEVZ

Температурные зависимости динамики спектров флуоресценции и длительности флуоресценции триптофана (Трп) в диапазоне от криогенных температур до комнатной являются важным источником информации о характере внутримолекулярных взаимодействий ближайшего окружения и возбужденной молекулы Трп [1–5]. Кинетика затухания флуоресценции Трп в растворе, а также в составе пептидов и белков многокомпонентна. Как правило, во всех экспериментах наблюдают 2–3 компоненты кинетики затухания флуоресценции триптофана с временами от сотен пикосекунд до десятков наносекунд [6–10].

При разных температурах время жизни возбужденных электронных состояний во многом определяется процессом переноса электрона с

индольного кольца возбужденной молекулы Трп на амидные группы основного скелета молекулы, а также в систему водородных связей (Н-связей) либо растворителя [11, 12], либо на Н-связи белковой компоненты молекулы альбумина [13] с образованием состояния с переносом заряда. Сольватация возбужденных молекул Трп при взаимодействии с ближайшим окружением может индуцировать температурный сдвиг их спектров поглощения и флуоресценции [7, 14–17]. Как показано нами ранее [12], понижение температуры влияет на состояние водородных связей, меняя их упругость и упорядоченность. Этот эффект и является причиной изменения скорости сольватации возбужденной молекулы и сопровождается сдвигом спектра флуоресценции в длинноволновую область.

В работе [18] методом квазиупругого рассеяния нейтронов определены три основных

Сокращения: Трп — триптофан, HSA —сывороточный альбумин человека, BSA — бычий сывороточный альбумин, CTS — состояние с переносом заряда.

температурных области, определяющие динамику протонов водородных связей в водно-белковой среде. В области I ($T < -150^\circ\text{C}$) протоны совершают чисто гармонические колебания около равновесных положений, в области II ($-150^\circ\text{C} \leq T < -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды характеризуется скачкообразной диффузией протонов по Н-связям в пикосекундном временном диапазоне. В температурной области III ($T > -30^\circ\text{C}$) перестройки водно-белковой среды характеризуются более медленными масштабными движениями крупных молекулярных фрагментов [18]. В работах [18, 19] были наглядно показаны принципиально отличные изменения длительности флуоресценции ($\tau_{\text{фл}}$) молекул Тгр в этих температурных границах. В водном растворе Тгр в температурной области I образуется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей с молекулой Тгр [19]. Вокруг образовавшегося цвиттерионного хромофора формируется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами Тгр [18, 19]. После возбуждения молекулы Тгр происходит дополнительное упорядочивание Н-связей за счет увеличения их жесткости [19]. При достижении определенной упорядоченности системы Н-связей может образоваться квазизона проводимости, в которой электрон делокализуется с индольного кольца возбужденной молекулы Тгр (Тгр*) и может перейти на амидные группы с образованием состояния с переносом заряда [19]. Такая реакция проходит при достаточно низких температурах, причем скорость переноса электрона от индольного кольца Тгр* в систему водородных связей должна увеличиваться при дальнейшем понижении температуры. С другой стороны, при более высоких температурах (области II и III) за счет тепловых флуктуаций квазизона проводимости вырождается, а перенос электрона с индольных колец на амидные группы будет осуществляться по термоактивационному механизму. Отметим, что в температурной области II возможно также дополнительное упорядочивание Н-связей по аналогии со структурным фазовым переходом в сегнетоэлектрических кристаллах с Н-связями типа сегнетовой соли [20]. Этот процесс реализуется при таких низких температурах, когда взаимодействие диполей Н-связей молекул воды достаточно велико для их взаимного упорядочивания, но энергия теплового движения еще слишком мала, чтобы вызвать их разупорядочивание. В результате система водородных связей перестраивается за счет диффузионного перескока протонов по Н-связям [18], что приводит к образованию суммарного дипольного момента в окрестности молекулы Тгр*, электрическое поле которого и вызывает дополнительную сольватацию возбужденной молекулы Тгр. При этом за счет кулоновского взаимодействия

Тгр* с диполями Н-связей наблюдается сильный красный сдвиг спектра флуоресценции в водном растворе.

Известно, что функционирование каталитических белков тесно связано с их конформационной динамикой [21]. Для многих таких белков наблюдаются переходы между определенными конформационными подсостояниями, контролирующими их активность. Так, на примере сложной неэкспоненциальной кинетики разделения зарядов в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий [22] показано, что эта кинетика в значительной степени отражает микроконформационную динамику белка с течением времени. Можно сделать вывод, что динамика белка оказывает определяющее влияние на кинетику первичных реакций переноса электронов в фотосинтезирующих организмах. Важно отметить, что в цитируемых работах динамику белка отслеживали по абсорбционным изменениям триптофановых остатков в структуре белка реакционного центра после его светового возбуждения. Молекула Тгр обладает большой разницей в величине дипольных моментов между возбужденным и основным состояниями, что делает его спектр поглощения чувствительным к диэлектрической природе окружающей среды. При исследовании переноса электрона и динамики белка (по триптофановому индикатору) при криогенных температурах [23] авторы установили, что способность к переносу электронов при низких температурах является неотъемлемым свойством фотосинтетических белков как гетерогенного растворителя. Возникает вопрос, действительно ли белки фотосинтетических реакционных центров обладают специфическими свойствами, способствующими переносу электронов при криогенных температурах, или этим свойством обладают и другие белки. По мнению авторов работы [23], необходимы дальнейшие тщательные исследования динамики белковой конформационной диффузии и кинетики электронного переноса во всем диапазоне температур от криогенных до 295 К.

В определенном смысле наши исследования направлены на решение этой проблемы. Действительно, начатые нами детальные исследования молекулярно-релаксационных характеристик функциональных белков по флуоресценции внутренних триптофановых индикаторов в диапазоне температур от криогенных до комнатных могут дать значимую информацию для анализа механизмов осуществляемых ими функциональных процессов. В русле этих исследований интересно выяснить отличия в длительности

флуоресценции триптофана в составе функционального белка, в частности альбумина, от этих параметров в водном растворе триптофана. Важно также определить динамику спектров флуоресценции и внутримолекулярных констант дезактивации возбужденных состояний молекулы Trp с молекулярными группами белка, а также с молекулами окружающего растворителя. В этом отношении нам представляется актуальным детальное изучение температурных зависимостей спектров флуоресценции и компонентов кинетики затухания флуоресценции молекул триптофана, а также динамики водородных связей белковой компоненты альбумина для различных областей спектра флуоресценции триптофана. С этой целью в данной работе были подробно исследованы температурные зависимости флуоресцентных характеристик молекул Trp, входящих в состав двух гомологичных белков, состоящих из одной поли-пептидной цепи в составе 585 аминокислотных остатков — сывороточного альбумина человека (HSA) — и в составе 583 аминокислот — бычьего сывороточного альбумина (BSA). Оба белка представляют собой по форме эллипсоид вращения, малые и большие оси которого равны 3.8 и 15 нм соответственно [24]. Обе молекулы (HSA и BSA) имеют сходные аминокислотные последовательности и конформации [24]. Так, HSA содержит один триптофановый остаток в положении 214 в центральной части молекулы рядом с осью симметрии [24], в то время как BSA имеет один триптофановый остаток в положении 213, соответствующий положению 214 в HSA, и второй остаток — в положении 134, находящийся вблизи поверхности молекулы. Считается, что Trp213 в BSA находится в условиях, сходных с остатком Trp214 в HSA, который располагается в щели, или гидрофобной складке, белковой цепи [25–28]. Заметим, что в неполярных средах максимум спектра флуоресценции Trp213 локализован при 335 нм, тогда как максимум спектра флуоресценции Trp135 находится при 350 нм [28]. Согласно работе [28], оба Trp в BSA локализируются в гидрофобных карманах в подобластях ПА (Trp213) и IB (Trp134). Помимо детального изучения температурных зависимостей длительности флуоресценции в различных участках спектра была также исследована динамика спектров флуоресценции в наносекундном временном диапазоне. В частности, показано, что в области фазового перехода в системе Н-связей в диапазоне температур от -80°C до 20°C наблюдается резкое увеличение скорости сольватационного сдвига спектра флуоресценции Trp, особенно для триптофанов в составе HSA. Подчеркнем, что исследо-

дование температурной зависимости длительности флуоресценции Trp*, локализованного в белках HSA и BSA, выполнено впервые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали HSA и BSA фирмы Sigma (США). Концентрация белков в образцах составляла 20 мкМ. Измерения кинетики затухания флуоресценции проводили на установке со счетом фотонов PML-16 (<http://www.beckerhickl.de/pdf/pml16c21.pdf>2006, Becker & Hickl, Германия). Сигнал флуоресценции проходит через полихроматор, обеспечивающей спектральную полосу измерительной системы шириной 200 нм с разрешением 12.5 нм/канал. Это позволяет регистрировать трехмерную картину флуоресценции, отражающую изменения длительности (τ), длины волны (λ) и интенсивности (I) свечения. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового диода EPLED 280 (Edinburg Photonics, Шотландия). В экспериментах мы могли измерять кинетики затухания флуоресценции для любого спектрального канала в области 286–425 нм. Одновременно мы имели возможность регистрировать динамику спектров флуоресценции образца в различные моменты времени после возбуждения. Подробное описание методики спектрально-кинетических измерений приведено в работах [15, 17]. Получаемый в результате измерений массив спектрально-кинетических данных представляет собой набор кинетик затухания флуоресценции, зарегистрированных на разных спектральных каналах в области длин волн 286–425 нм с интервалом 12.5 нм:

$$F(t, \lambda) = \sum_i a_i(\lambda) \exp(-t/\tau_i), \quad i = 1, 2, \quad (1)$$

где $a_i(\lambda)$ представляет собой зависящий от длины волны предэкспоненциальный множитель компоненты с временем жизни τ_i .

χ_r^2 рассчитывали по формуле: $\chi_r^2 = 1/(N - p - 1) \sum_j (d_j - f_j)^2 / d_j$, $j = 1, \dots, 4096$, где d_j — экспериментальные значения кинетики затухания флуоресценции в j -й момент времени, f_j — значение рассчитанной для данного момента времени теоретической кривой, равной свертке функции (1) с аппаратной функцией ($f = F \otimes \text{IRF}$), N — число экспериментальных точек, p — число параметров теоретической кривой. Для всех выбранных спектральных областей значение χ_r^2 не превышало величины 1.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ экспериментальных данных мы проводили на основе модельной схемы переходов в молекуле Trp, опубликованной ранее [14, 15, 17].

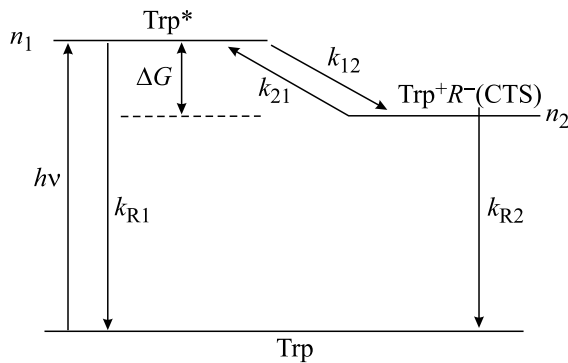


Рис. 1. Модельная схема кинетических переходов в триптофане: n_1 и n_2 — населенности возбужденного состояния молекул Trp и состояния с переносом заряда, Trp^+R^- , или CTS, где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Trp, так и амидные группы с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Trp; $k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$ — константа скорости дезактивации возбужденного состояния Trp, включающая флуоресценцию (k_{f1}) и безызлучательную релаксацию (k_{r1}); k_{12} — скорость перехода Trp^* в состояние CTS; k_{21} — скорость рекомбинации $\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$; $k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$ — скорость дезактивации CTS за счет флуоресценции и безызлучательной релаксации; ΔG — разность уровней свободной энергии состояний Trp^* и CTS.

Здесь мы приводим упрощенную модель для наглядности, чтобы не затруднять читателя. Согласно этой модели (рис. 1), процессы дезактивации возбужденного состояния молекулы Trp представляются в виде последовательности событий:

$\text{Trp}^* \xrightarrow{k_{R1}} \text{Trp}$, $\text{Trp}^* \xrightarrow{k_{12}} \text{CTS} \xrightarrow{k_{21}} \text{Trp}^* \xrightarrow{k_{R1}} \text{Trp}$, $\text{CTS} \xrightarrow{k_{R2}} \text{Trp}$. Обозначения констант скоростей приведены в подписи к рис. 1. В соответствии с этой схемой кинетика затухания флуоресценции Trp будет иметь двухкомпонентный характер.

Из этой схемы следует, что дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит по двум каналам — с испусканием флуоресценции (k_{f1}) и безызлучательной релаксацией (k_{r1}) в ос-

новное состояние $S^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$ ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$), а также с переходом молекулы Trp в промежуточное состояние (состояние с переносом заряда, CTS) $\text{Trp}^* \xrightarrow{k_{12}} \text{Trp}^+\text{R}^-$ со скоростью k_{12} . Состояние CTS рекомбинирует затем со скоростью k_{21} обратно в

S^* -состояние: $S^* \xrightarrow{k_{12}} \text{CTS} \xrightarrow{k_{21}} S^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$. Согласно работе [29], помимо обратного перехода в S^* -состояние распад CTS также может происходить с испусканием флуоресценции и посредством безызлучательной релаксации в основное состояние (CTS $\xrightarrow{k_{R2}} S_0$) ($k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$).

Составив и решив систему дифференциальных уравнений, описывающих переходы в молекуле Trp (рис. 1), мы получим выражения для населенностей n_1 и n_2 , констант скоростей затухания компонент k_1 , k_2 и соответственно длительности τ_1 и τ_2 двух компонент разложения в кинетике затухания флуоресценции. Эти выражения имеют вид:

$$n_1(t) = a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}, \quad n_2(t) = b_1 e^{-k_1 t} + b_2 e^{-k_2 t},$$

$$\begin{cases} k_1 = \frac{1}{2} \left(g_1 + g_2 + \sqrt{(g_1 - g_2)^2 + 4k_{12}k_{21}} \right), \\ k_2 = \frac{1}{2} \left(g_1 + g_2 - \sqrt{(g_1 - g_2)^2 + 4k_{12}k_{21}} \right), \end{cases} \quad (2)$$

$$\tau_1 = 1/k_1, \quad \tau_2 = 1/k_2,$$

где $g_1 = k_{R1} + k_{12}$, $g_2 = k_{21} + k_{R2}$.

Параметры a_1 , a_2 , b_1 , b_2 определяются из следующих соотношений:

$$a_1 = \frac{g_1 - k_2}{k_1 - k_2}; \quad a_2 = \frac{k_1 - g_1}{k_1 - k_2};$$

$$b_1 = \frac{-k_{12}}{k_1 - k_2}; \quad b_2 = \frac{k_{12}}{k_1 - k_2}.$$

Очевидно, что $a_1 + a_2 = 1$; $b_2 = -b_1$.

При обработке экспериментальных данных спектр флуоресценции триптофана был разбит на три участка по аналогии с работами [14, 15, 17, 18]. Это разбиение спектра флуоресценции оправдано тем, что динамика протонов водородных связей в водно-белковой среде различна в этих областях при различных температурах. Эти три области спектра флуоресценции обозначены как коротковолновая область (280–330 нм), промежуточная область (330–380 нм) и длинноволновая область (380–430 нм). В коротковолновой области спектра флуоресценции излучает та часть возбужденных молекул Trp, в окрестностях которой система водородных связей находится в начале перестройки в электрическом поле Trp^* , а протоны флуктуируют вдоль водородных связей. При этом образуется виртуальная зона проводимости системы водородных связей, что приводит к увеличению скорости перехода $\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$ в области фазового перехода. Средний участок спектра флуоресценции Trp^* формируется за счет излучения той части молекул, в окружении которых уже произошел фазовый переход некоторого числа водородных связей, а также той части молекул Trp^* , в окружении которых часть системы водородных связей все еще находится в состоянии перестройки. Наконец, в длинноволновой области спектра (400–700 нм) флуоресцируют те молекулы Trp^* , в окружении которых перестройка водородных связей завершается, а сами водородные

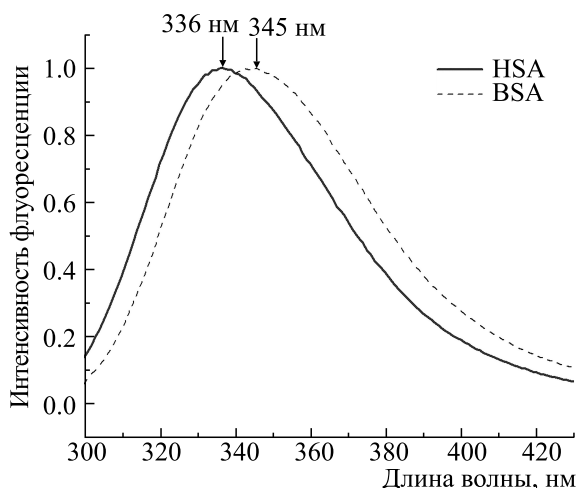


Рис. 2. Спектры флуоресценции триптофана в составе альбумина HSA и BSA при комнатной температуре.

связи находятся в новом устойчивом положении. Состояние водородных связей очевидным образом сказывается на длительности флуоресценции и скоростях переходов k_{12} и k_{21} , что хорошо видно на рис. 3–5. Спектры флуоресценции триптофана в составе HSA и BSA приведены на рис. 2.

Ход экспериментальной температурной зависимости длительности τ_1 и τ_2 (точки) и теоретических кривых (сплошные линии) для двух компонент в кинетике затухания флуоресценции Trp в водном растворе альбумина HSA и BSA в различных спектральных областях показан на рис. 3а–5а. Видно, что температурные зависимости времен затухания короткой и длинной компонент

флуоресценции в данных спектральных областях имеют немонотонный характер. На рис. 3б–5б показаны рассчитанные температурные зависимости констант скоростей прямого перехода k_{12} (Trp* \rightarrow CTS) и обратного перехода k_{21} (CTS \rightarrow Trp*). Из рис. 3б–5б видно, что температурная зависимость константы скорости перехода k_{12} в области $T < -125^\circ\text{C}$ имеет безактивационный характер: с увеличением температуры константа скорости k_{12} уменьшается пропорционально величине $1/\sqrt{T_K}$, где T_K – абсолютная температура. Ранее мы показали [15, 17], что для Trp в водной среде образование квазизоны проводимости системы Н-связей может происходить уже при температурах $T < -125^\circ\text{C}$, что следует из безактивационного переноса электрона на амидные группы по системе Н-связей. Наоборот, при $T > -90^\circ\text{C}$ с ростом температуры должно происходить термоактивационное увеличение константы скорости k_{12} при постоянной энергии активации перехода.

Обработка экспериментальных результатов выявляет различный характер температурной зависимости τ_1 и τ_2 и скоростей перехода k_{12} и k_{21} в температурной области, где предполагается нелинейный характер сольватации возбужденного состояния триптофана ($-90^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$) для различных участков спектра. Для адекватной аппроксимации экспериментальной температурной зависимости k_{12} во всей исследованной области температур предполагалась зависимость энергии активации перехода E_a от температуры в температурной области $-90^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$ в следующем виде [30]:

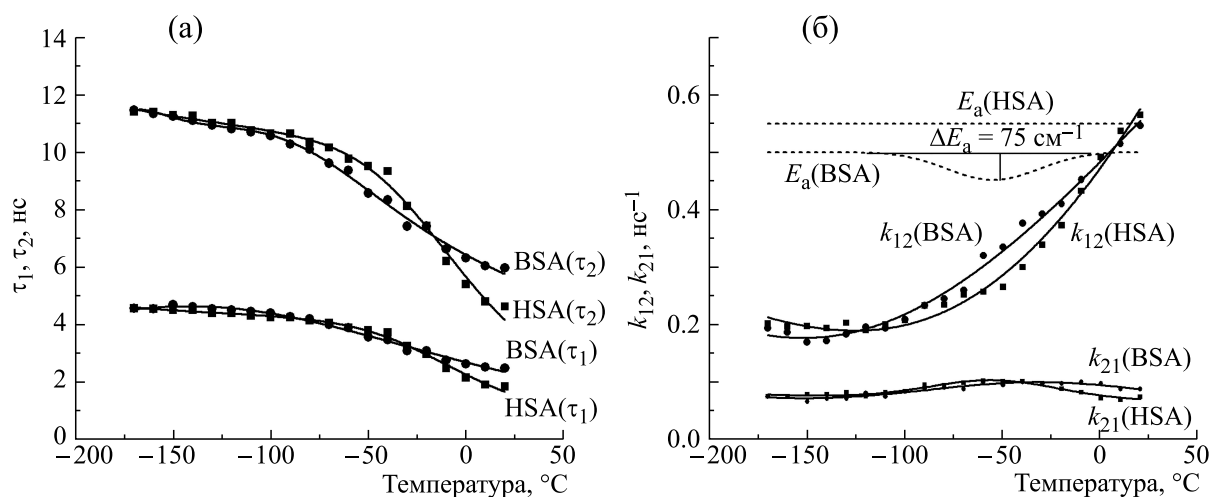


Рис. 3. (а) – Температурные зависимости времен τ_1 и τ_2 кинетик затухания флуоресценции триптофана в водной среде образцов HSA и BSA в синей области спектра. (б) – Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда Trp* \rightarrow Trp⁺R[−] и k_{21} обратной реакции Trp⁺R[−] \rightarrow Trp* для триптофана в составе альбумина HSA и BSA в синей спектральной области. E_a – энергия активации перехода.

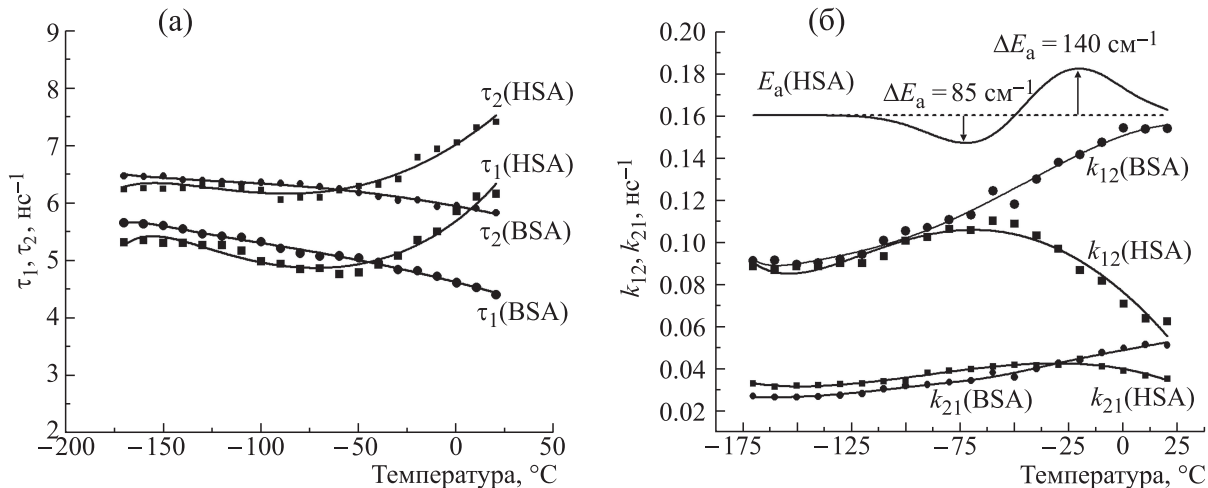


Рис. 4. (а) — Температурные зависимости τ_1 и τ_2 времен затухания кинетик флуоресценции триптофана в составе альбумина HSA и BSA в средней области спектра флуоресценции. (б) — Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ и k_{21} обратной реакции $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ для триптофана в составе альбумина HSA и BSA в средней спектральной области. E_a — энергия активации перехода.

$$E_a = \frac{(-G + E_r)^2}{4E_r}, \quad (3)$$

где E_r — энергия реорганизации среды при образовании CTS, ΔG — разность уровней свободной энергии состояний Trp^* и CTS (схема 1). При этом считалось, что процессы переноса электронов происходят в неинвертированной области параметров соотношения (3), для которой выполняется условие $\Delta G < E_r$. В этом случае при уменьшении энергии реорганизации E_r энергия активации перехода E_a также уменьшается и достигает нуля при $\Delta G = E_r$ (безактивационный переход). Водородные связи ближайшего окружения Trp дают определенный вклад в энергию реорганизации среды и, согласно уравнению (3), также влияют на величину энергии активации перехода $\text{Trp} \rightarrow \text{CTS}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для синего спектрального диапазона состояние водородных связей альбумина слабо влияет на энергию активации перехода E_a , в связи с чем температурная зависимость кинетик затухания флуоресценции триптофанов в составе HSA и BSA близка к температурной зависимости с постоянной энергией активации (рис. 3). Более слабый эффект влияния водородных связей водной среды на скорости перехода k_{12} и k_{21} для альбумина в составе HSA по сравнению с данными работ [15, 17] для триптофана в воде, очевидно, связан с большим расстоянием молекулы триптофана от водородных связей среды разведения образцов из-за наличия белковой оболочки вокруг Trp . При этом, аналогично работе [15], для BSA на-

блюдается температурная область с увеличенной скоростью k_{12} и k_{21} , (рис. 3б). Этот эффект можно объяснить влиянием водородных связей водной среды на триптофан Trp134 бычьего альбумина, который расположен в BSA существенно ближе к поверхности молекулы. Кроме того, видно (рис. 3б), что изменения в величине энергии реорганизации среды E_a наблюдаются только для молекул Trp в BSA. По нашему мнению, этот эффект вызван взаимодействием возбужденной молекулы Trp134 с водородными связями растворителя (водной среды). Мы полагаем также, что Trp213 (BSA) и Trp214 (HSA) находятся глубоко в структуре альбумина и при возбуждении не взаимодействуют с Н-связями растворителя. Именно по этой причине не происходит изменение E_a для Trp человеческого альбумина. Отсюда следует, что для Trp HSA в средней спектральной области происходит процесс формирования фазового перехода в системе водородных связей самого HSA, в результате наблюдается увеличение E_a в области высоких температур и уменьшение E_a в области низких температур. Данный процесс аналогичен поведению E_a при фазовом переходе в системе водородных связей около Trp^* в водной среде [17].

Для среднего спектрального диапазона наблюдается значительное отличие в температурной зависимости длительностей τ_1 и τ_2 , а также констант скоростей переходов k_{12} и k_{21} для HSA от BSA (рис. 4). Можно сделать предположение, что, в отличие от триптофана в водной среде, для Trp в составе HSA в средней, а также и в красной спектральных областях основную роль в динамике переходов возбужденных состояний играют водородные связи, входящие в структуру HSA.

В процессе перехода возбужденного состояния триптофана в составе альбумина HSA в CTS при температуре выше -90°C важную роль играет меняющееся соотношение между энергией реорганизации E_r и изменением G в процессе фазового перехода в системе водородных связей. Из рис. 4 видно, что при росте температуры от -90°C до -70°C происходит уменьшение E_a за счет уменьшения E_r в процессе реорганизации водородных связей. При дальнейшем росте температуры G уменьшается в результате фазового перехода, сопровождающегося возникновением дипольного момента системы водородных связей. Этот фазовый переход понижает энергию Trp^* , что приводит к уменьшению величины k_{12} для триптофана в макромолекуле HSA (рис. 4б). Такой процесс аналогичен переходу возбужденного состояния триптофана в средней спектральной области в CTS в водной среде [15]. При этом для триптофана в BSA температурная зависимость k_{12} и k_{21} соответствует переходу с постоянной энергией активации.

Таким образом, нелинейную зависимость скорости перехода из возбужденного состояния Trp^* в состояние с переносом заряда (CTS) по сравнению со стандартной реакцией с постоянной энергией активации E_a мы связываем с фазовым переходом системы водородных связей в окружении Trp^* в составе альбумина HSA в области температур $-90^{\circ}\text{C} < T < 20^{\circ}\text{C}$.

В длинноволновом участке спектра ($380 \text{ нм} < \lambda < 420 \text{ нм}$) наблюдается существенно аномальный характер температурной зависимости скорости перехода Trp^* в состояние CTS k_{12} для HSA. Такое явление, по нашему мнению, можно объяснить увеличением числа водородных связей, участвующих в переходе, за счет дополнительного вовлечения внутримолекулярных водородных связей, испытывающих фазовый переход. В результате уменьшается энергия реорганизации данной реакции и энергия активации перехода в CTS. Для BSA процесс формирования области фазового перехода в системе внутренних водородных связей не развивается, например, в результате нарушения симметрии за счет $\text{Trp}134$ и миграции энергии электронного возбуждения между $\text{Trp}213$ и $\text{Trp}134$.

Как видно из рис. 5а,б, в длинноволновой области спектра флуоресценции в диапазоне температур от -70°C до 20°C происходит уменьшение времени затухания τ_1 и соответствующее увеличение скорости перехода k_{12} . Красный участок спектра формируется за счет флуоресценции той части возбужденных молекул триптофана, для которых количество водородных связей, испытывающих фазовый переход и находящихся в режиме перестройки, наибольшее. В результате одно-

временно с перестройкой системы водородных связей во время фазового перехода происходит уменьшение жесткости части водородных связей в окружении молекул триптофана в составе HSA. Вследствие этого уменьшается энергия реорганизации перехода E_r . Следовательно, уменьшается энергия активации перехода E_a (см. уравнение (3)) в температурной области $-90^{\circ}\text{C} < T < 20^{\circ}\text{C}$ и увеличивается скорость перехода возбужденного состояния триптофана в CTS (рис. 5б). Для BSA данный эффект выражен значительно слабее (рис. 5а,в).

На рис. 6 показана динамика спектров флуоресценции триптофана в составе HSA и BSA с ростом температуры от -170°C до 10°C . Видно, что спектр флуоресценции триптофана в составе BSA сдвигается значительно слабее, чем в случае HSA. Следовательно, влияние сольватационных процессов на спектр флуоресценции триптофанов в BSA значительно слабее, чем в HSA. Этот факт свидетельствует, что система водородных связей в белке BSA упорядочена в меньшей степени, чем в HSA. Очевидно, причиной нарушения упорядоченности сетки Н-связей в BSA является присутствие в структуре молекулы альбумина второй молекулы триптофана $\text{Trp}134$. На рис. 7 представлена зависимость положения максимумов спектров флуоресценции от температуры для молекул триптофана в HSA и BSA в водном растворе. Видно, что в случае HSA данная зависимость имеет нелинейный характер, в то время как для BSA положение максимума спектра флуоресценции смещается в красную область спектра почти линейно. По нашему мнению, это связано с существенно нелинейным характером возникновения фазового перехода в HSA, тогда как для BSA фазовый переход в системе водородных связей в окружении триптофана практически отсутствует.

Отметим, что обнаруженные в работе температурные зависимости констант скоростей прямого перехода $\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$ (k_{12}) и обратного перехода $\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$ (k_{21}) наблюдаются только для замороженных водных растворов триптофана, для которых возможно возникновение упорядоченной сетки водородных связей [15], тогда как для раствора триптофана в глицерине такие эффекты не наблюдаются (рис. 5в). Из этого же рисунка видно, что для HSA в глицерине в красной области спектра флуоресценции триптофана температурная зависимость τ_1 качественно аналогична температурной зависимости τ_1 триптофана в HSA в водной среде в красной области спектра (рис. 5в) [31]. Это является хорошим подтверждением вывода, что на сольватационную динамику спектров флуоресценции триптофана в составе HSA основное влияние оказывают внутримолекулярные водородные связи альбумина, например водородные связи связанной воды в структуре

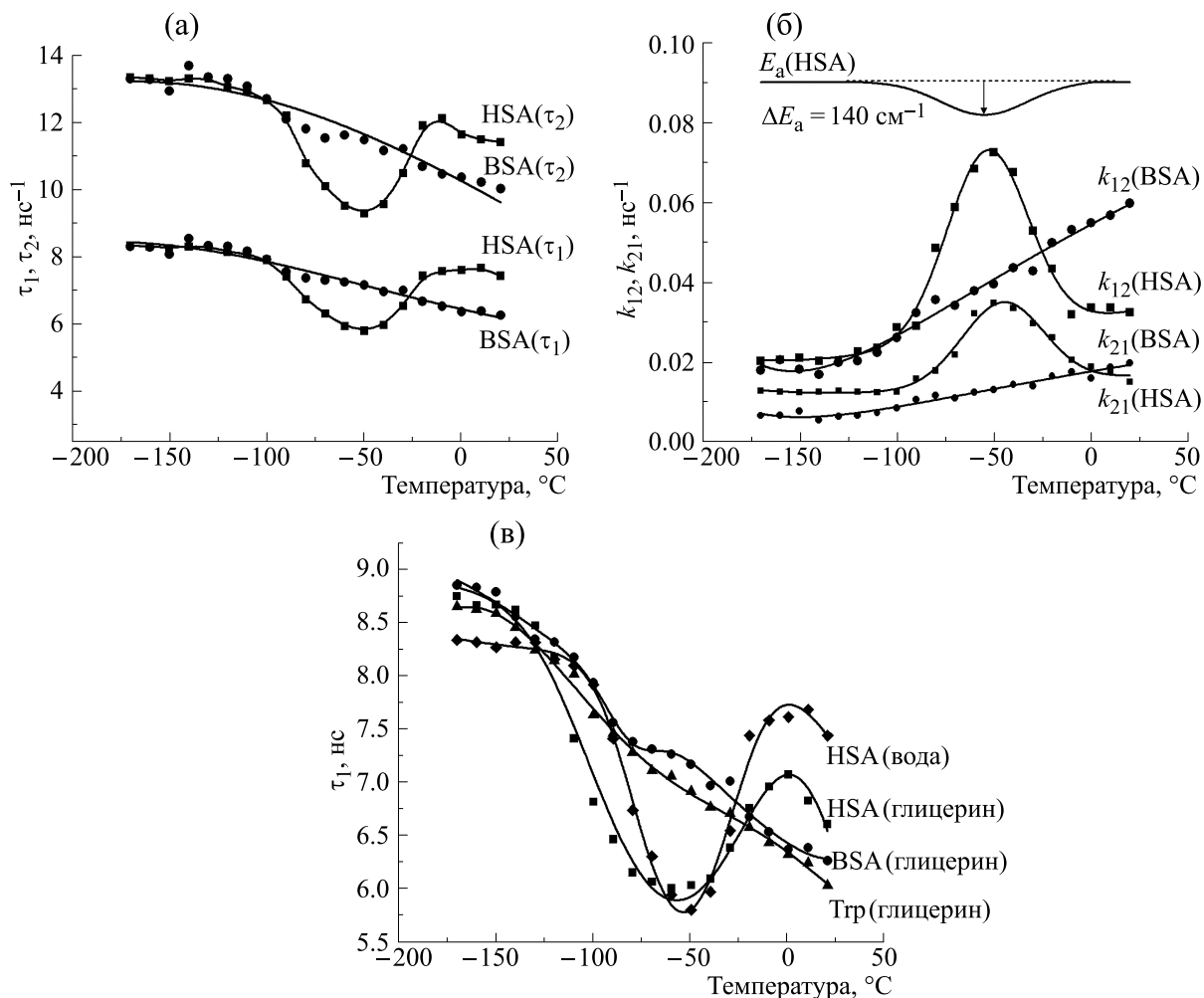


Рис. 5. (а) — Температурные зависимости быстрого (τ_1) и медленного (τ_2) времен затухания кинетик флуоресценции триптофана в составе альбумина HSA и BSA в водной среде в красной области спектра. (б) — Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ и k_{21} обратного перехода $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ для триптофана в составе альбумина HSA и BSA в красной спектральной области. E_a — энергия активации перехода. (в) — Температурные зависимости длительности быстрого компонента τ_1 кинетик затухания флуоресценции глицериновых растворов Trp (▲), HSA (■), BSA (●) и HSA (◆) в водном растворе в красной спектральной области.

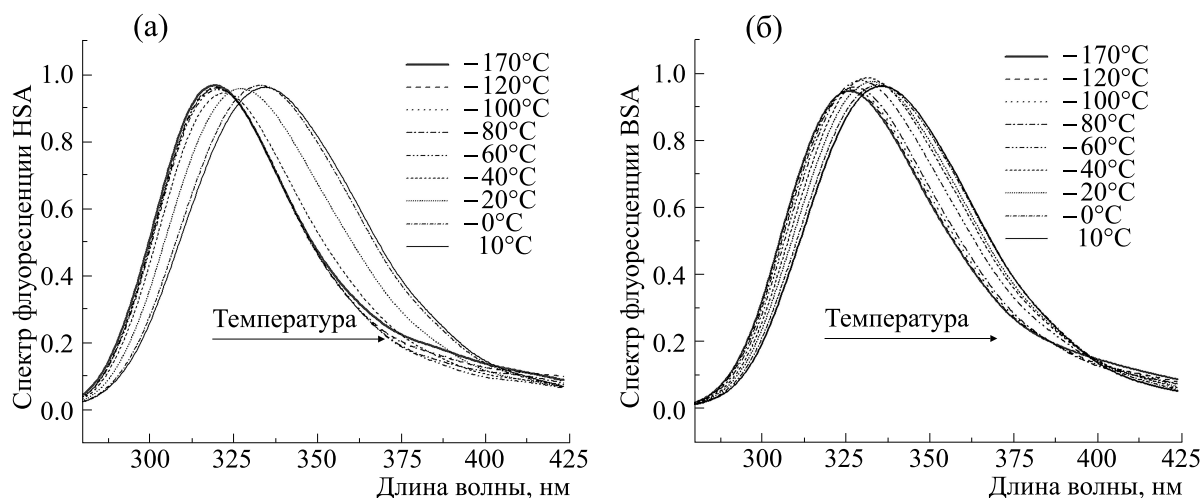


Рис. 6. Динамика спектров флуоресценции в температурной области фазового перехода в системе водородных связей HSA-альбумина (а) и BSA-альбумина (б) в окружении Trp^* .

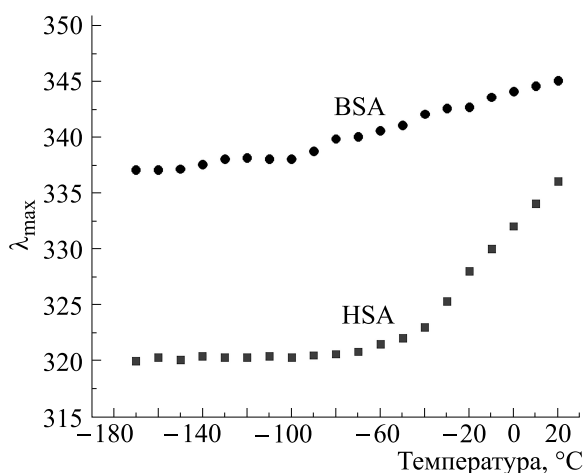


Рис. 7. Температурные зависимости положения максимумов спектров флуоресценции HSA и BSA в водном растворе.

макромолекулы альбумина. При этом температурная зависимость кинетик флуоресценции триптофана в составе BSA в красной области спектра значительно отличается от таковой для триптофана в составе HSA и не имеет выраженного резонансного характера, соответствующего фазовому переходу в системе водородных связей HSA (рис. 5а,в). Известно, что в составе BSA помимо центральной молекулы Trp213 имеется дополнительная молекула Trp134, расположенная близко к периферии молекулы альбумина [32]. Расстояние между молекулами триптофана в положениях 134 и 213 составляет примерно 6.5 нм. При этом диполи электронного перехода этих молекул параллельны друг другу. Величина ферстеровского радиуса взаимодействия между триптофанами в белках равна 7 нм [33]. Очевидно, при таком пространственном расположении возможна миграция энергии электронного возбуждения между молекулами триптофана Trp213 и Trp134 [24, 25, 33, 34], что может препятствовать возникновению фазового перехода в системе водородных связей BSA [20, 34]. Кроме того, дополнительная молекула триптофана в составе BSA искажает систему водородных связей [20, 25], что также может нарушать условие образования в системе водородных связей фазового перехода. Из данных по рентгеноструктурному анализу следует, что молекула альбумина представляет собой эллипсоид с осями, равными 15 нм и 6.6 нм. Длина молекулы Trp составляет 2 нм. Мы полагаем, что в молекуле HSA фазовый переход возможен за счет особой конфигурации системы водородных связей, которые образуют кольцевую структуру вокруг оси вращения эллипсоподобной молекулы альбумина. При возбуждении молекулы триптофана в составе HSA (Trp214) фазовый переход происходит в системе водородных связей вдоль

оси кольцевой структуры системы водородных связей. С течением времени данный фазовый переход приводит к возникновению энергетической воронки вокруг возбужденной молекулы триптофана, приводящей к красному сдвигу его спектра флуоресценции. В случае BSA кольцевая структура водородных связей искажается в области нахождения Trp134, что препятствует возникновению фазового перехода в окрестности Trp213.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые исследована зависимость от температуры длительности флуоресценции и динамика спектров флуоресценции молекул Trp, входящих в структуру белков HSA и BSA. Получен принципиально важный результат — в системе внутримолекулярных водородных связей HSA наблюдается фазовый переход. В структуру BSA, помимо центральной молекулы Trp213, входит дополнительная молекула Trp134. Асимметричное расположение этих молекул Trp искажает систему водородных связей в структуре BSA и нарушает условие протекания фазового перехода. Возникновению фазового перехода может также препятствовать миграция энергии электронного возбуждения между Trp213 и Trp134.

Использованный в работе спектрально-динамический подход также может быть полезен при исследовании переходов возбужденных пигментов в белковой среде, обладающей упорядоченной системой водородных связей. В качестве примера можно привести направленный перенос электрона по активной цепи в реакционном центре пурпурных бактерий, несмотря на близкую симметрию активной и неактивной цепей. В этом случае перенос электрона по неактивной цепи может быть блокирован за счет изменения движущей силы ΔG в результате фазового перехода в системе водородных связей, в то время как для активной цепи осуществляется режим безактивационного переноса электрона. Физически это может выглядеть, как возникновение в результате фазового перехода в активной и неактивной цепях противоположно направленных электрических полей, одно из которых блокирует движение электрона по неактивной цепи, другое обеспечивает его безактивационный перенос по активной цепи.

Таким образом, можно сделать вывод, что состоянием системы водородных связей также во многом определяется характер внутримолекулярной микрokonформационной динамики белка, что может влиять на его функциональную активность. Необходимая информация о механизмах происходящих при этом процессов может быть получена путем сравнительного анализа температурных зависимостей параметров

флуоресценции триптофана в растворе и нативном белке.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (проект № 121032500058-7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dashnau J. L., Zelent B., and Vanderkooi J. M. Tryptophan interactions with glycerol/water and trehalose/sucrose cryosolvents: infrared and fluorescence spectroscopy and *ab initio* calculations. *Biophys. Chem.*, **71**, 114 (2005). DOI: 10.1016/j.bpc.2004.10.003
2. Schlamadinger D. E., Gable J. E., and Kim J. E. Hydrogen bonding and solvent polarity markers in the UV resonance Raman spectrum of tryptophan: application to membrane proteins. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14769 (2009). DOI: 10.1021/jp905473y
3. Burshtein E. A. Intrinsic protein luminescence as a tool for studying fast structural dynamics. *Mol. Biol. (Moscow)*, **17**, 455 (1983).
4. Knox P. P., Gorokhov V. V., Korvatovskiy B. N., Lukashev E. P., Goryachev S. N., Paschenko V. Z., and Rubin A. B. The effect of light and temperature on the dynamic state of *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers proteins determined from changes in tryptophan fluorescence lifetime and $P^+Q_A^-$ recombination kinetics. *J. Photochem. Photobiol. B*, **180**, 140 (2018). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.01.027
5. Knox P. P., Korvatovskiy B. N., Gorokhov V. V., Goryachev S. N., Mamedov M. D., and Paschenko V. Z. Comparison of tryptophan fluorescence lifetimes in cyanobacterial photosystem I frozen in the light and in the dark. *Photosynth. Res.*, **139**, 441 (2019). DOI: 10.1007/s11120-018-0595-8
6. Szabo A. G. and Rayner D. M. Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 554 (1980). DOI: 10.1021/ja00522a020
7. Lakowicz J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. (Springer, N.-Y., 2006). DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4
8. Adams P. D., Chen Y., Ma K., Zagorski M. G., Sonnichsen F. D., McLaughlin M. L., and Barkley M. D. Intramolecular quenching of tryptophan fluorescence by the peptide bond in cyclic hexapeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9278 (2002). DOI: 10.1021/ja0167710
9. Ross J. A. and Jameson D. M. Time-resolved methods in biophysics. 8. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 1301 (2008). DOI: 10.1039/b804450n
10. Knox P. P., Gorokhov V. V., Korvatovsky B. N., Grishanova N. P., Goryachev S. N., and Paschenko V. Z. Specific features of the temperature dependence of tryptophan fluorescence lifetime in the temperature range of -170 – 20°C . *J. Photochem. Photobiol. A*, **393**, 112435 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotochem.2020.112435
11. Gorokhov V. V., Knox P. P., Korvatovskiy B. N., Seyfullina N. Kh., Goryachev S. N., and Paschenko V. Z. Temperature dependence of tryptophan fluorescence lifetime in aqueous glycerol and trehalose solutions. *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1269 (2017). DOI: 10.1134/S0006297917110049
12. Paschenko V. Z., Gorokhov V. V., Korvatovsky B. N., Knox P. P., Grishanova N. P., and Goryachev S. N. A study of the temperature dependence of tryptophan fluorescence lifetime in the range of -170°C to $+20^\circ\text{C}$ in various solvents. *Biophysics*, **66**, 385 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921030143
13. Han K. L. and Zhao G. J. *Hydrogen bonding and transfer in the excited state* (John Wiley&Sons Ltd., Chichester, UK, 2011). DOI: 10.1002/9780470669143
14. Gorokhov V. V., Korvatovsky B. N., Knox P. P., Grishanova N. P., Goryachev S. N., Paschenko V. Z., and Rubin A. B. Temperature dependence of tryptophan fluorescence lifetime as an indicator of its microenvironment dynamics. *Dokl. Biochem. Biophys. (Moscow)*, **498**, 170 (2021). DOI: 10.1134/S1607672921030030
15. Gorokhov V. V., Knox P. P., Korvatovsky B. N., Goryachev S. N., Paschenko V. Z., and Rubin A. B. Influence of the microenvironment dynamics of tryptophan on its fluorescence parameters at different temperature. *Biophysics*, **68**, 503 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923040061
16. Knox P. P., Lukashev E. P., Gorokhov V. V., Seifullina N. Kh., and Paschenko V. Z. Relaxation processes accompanying electron stabilization in the quinone acceptor part of *Rb. sphaeroides* reaction centers. *J. Photochem. Photobiol. B*, **189**, 145 (2018). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.005
17. Gorokhov V. V., Knox P. P., Korvatovsky B. N., Lukashev E. P., Goryachev S. N., Paschenko V. Z., and Rubin A. B. Comparison of spectral and temporal fluorescence parameters of aqueous tryptophan solutions frozen in the light and in the dark. *Chem. Phys.*, **571**, 111919 (2023). DOI: 10.1016/j.chemphys.2023.111919
18. Doster W. The dynamical transition of proteins, concepts and misconceptions. *Eur. Biophys. J.*, **37**, 591 (2008). DOI: 10.1007/s00249-008-0274-3
19. Liu H., Zhang H., and Jin B. Fluorescence of tryptophan in aqueous solution. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **106**, 54 (2013). DOI: 10.1016/j.saa.2012.12.065

20. Blinc R. and Zeks B. *Soft modes in ferroelectrics and anti-ferroelectrics* (Am. Elsevier Publ. Comp. Inc, N.-Y., 1974). DOI: 10.1088/0031-9112/27/3/038
21. Finkelstein A. V. and Ptitsyn O. B. *Protein physics: A course of lectures* (Elsevier Sci., 2016). DOI: 10.13140/RG.2.1.1319.8320
22. Wang H., Lin S., Allen J. P., Williams J. A. C., Blankert S., Laser C., and Woodbury N. W. Protein dynamics control the kinetics of initial electron transfer in photosynthesis. *Science*, **316**, 747 (2007). DOI: 10.1126/science.1140030
23. Wang H., Lin S., Katilius E., Laser C., Allen J. P., Williams J. A. C., and Woodbury N. W. Unusual temperature dependence of photosynthetic electron transfer due to protein dynamics. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 818 (2009). DOI: 10.1021/jp807468c
24. Nicholson J. P., Wolmarans M. R., and Park G. R. The role of albumin in critical illness. *Brit. J. Anaesthesia*, **85**, 599 (2000). DOI: 10.1093/bja/85.4.599
25. Togashi D. M., Ryder A. G., McMahon D., Dunne P., and McManus J. Fluorescence study of bovine serum albumin and Ti and Sn oxide nanoparticles interactions. In: *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV*, Ed. by D. Schweitzer and M. Fitzmaurice (Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics, 2007), vol. 6628, paper 6628_61. DOI: 10.1364/ECBO.2007.6628_61
26. Carter D. C. and Ho J. X. Structure of serum albumin. In: *Advances in Protein Chemistry*, Ed. by C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, and D. S. Eisenberg (Acad. Press, San Diego, 1994), vol. 45, pp. 153–203. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60640-3
27. Bell K. L. and Brenner H. C. Phosphorescence and optically detected magnetic resonance study of the tryptophan residue in human serum albumin. *Biochemistry*, **21**, 799 (1982). DOI: 10.1021/bi00533a034
28. Peterman B. F. and Laidler K. J. Study of reactivity of tryptophan residues in serum albumins and lysozyme by *N*-bromosuccinamide fluorescence quenching. *Arch. Biochem. Biophys.*, **199**, 158 (1980). DOI: 10.1016/0003-9861(80)90268-4
29. Vandewal K. Interfacial charge transfer states in condensed phase systems. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **67**, 113 (2016). DOI: 10.1146/annurev-physchem-040215-112144
30. Marcus R. A. and Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265 (1985). DOI: 10.1016/0304-4173(85)90014-X
31. Punyiczki M. and Rosenberg A. The effect of viscosity on the accessibility of the single tryptophan in human serum albumin. *Biophys. Chem.*, **42**, 93 (1992). DOI: 10.1016/0301-4622(92)80011-s
32. Moriyama Y., Ohta D., Hachiya K., Mitsui Y., and Takeda K. Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. *J. Prot. Chem.*, **15**, 265 (1996). DOI: 10.1007/BF01887115
33. Jeremias H. F., Lousa D., Hollmann A., Coelho A. C., Baltazar C. S., Seixas J. D., Marques A. R., Santos N. C., Romão C. C., and Soares C. M. Study of the interactions of bovine serum albumin with a molybdenum(II) carbonyl complex by spectroscopic and molecular simulation methods. *PLoS One*, **13** (9), e0204624 (2018). DOI: 10.1371/journal.pone.0204624
34. Ghisaidoobe A. B. T., and Chung S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 22518 (2014). DOI: 10.3390/ijms151222518

Spectral and Kinetic Characteristics of Tryptophan Fluorescence in Human and Bovine Serum Albumin at Different Temperatures

V.Z. Paschenko*, V.V. Gorokhov*, P.P. Knox*, B.N. Korvatovsky*, N.P. Grishanova*, S.N. Goryachev*, and A.B. Rubin*

**Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

The temperature dependence of the tryptophan fluorescence lifetime in human and bovine serum albumin in an aqueous solution and glycerol in the temperature range of -170°C to 20°C was studied. A model of forward and reverse electronic transitions in the tryptophan molecule from the excited state to the ground state and to the charge transfer state was constructed. Three main spectral regions of tryptophan fluorescence with different behavior of temperature dependences of transition rates from the excited state of tryptophan to the state with charge transfer were determined. It was found that the dynamics of the hydrogen bonding system in the selected spectral regions had a determining influence on the character of changes in the duration of tryptophan fluorescence. The nonlinear dependence of intramolecular transition rates on temperature found in the work is determined by the interaction of tryptophan molecules with its microenvironment. The rearrangements in the hydrogen bonding system of albumin protein containing tryptophan molecule have a determining influence on the processes of excitation deactivation in tryptophan.

Keywords: human serum albumin, bovine serum albumin, tryptophan, fluorescence