

# БЕЛКИ В НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНСАМБЛЯХ: ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ МЕТОДОМ РАЗРЕШЕННО–ВРЕМЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ АНИЗОТРОПИИ

© 2002 г.

Е. В. КУДРЯШОВА,  
А. К. ГЛАДИЛИН, А. В. ЛЕВАШОВ

*Химический факультет  
Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова*

I. Введение. II. Комплексы белков с основными классами природных соединений, биологические функции и особенности структуры комплексов. III. Физико-химические методы анализа структуры белок-содержащих комплексов. Флуоресцентные методы. IV. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Белки в природе не изолированы от остальных компонентов живой материи и, как правило, функционируют в составе тех или иных надмолекулярных ансамблей, которые являются основой молекулярной организации биологических систем. Надмолекулярные структуры играют важную роль во многих биохимических процессах (фолдинг белков, транспорт, биосинтез) [17, 18, 20, 83, 91]. Регуляция каталитической активности и стабильности ферментов *in vivo* часто осуществляется именно посредством образования надмолекулярных ансамблей, включающих вещества различной природы. В настоящем обзоре

---

*Принятые сокращения:* copA — конкановалин А; ЛП — липопротеиды; НП — нуклеопротеиды; ПЭ — полиэлектролит; ОА — олигоамин; СЖК — синтаза жирных кислот; ХТ —  $\alpha$ -химотрипсин; АДГ — алкогольдегидрогеназа; ГАФД — D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; АОТ — диоктилсульфосукцинат натрия (аэрозоль ОТ); ПАК — полиметакриловая кислота; ПАВ — поверхностно-активные вещества; РВФА — разрешенно-временная флуоресцентная анизотропия; ММ — молекулярная масса.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: helena\_koudriachova@hotmail.com

рассмотрены белок-содержащие нековалентные комплексы с основными классами природных и синтетических соединений и физико-химические методы исследования их структуры. Подробно рассмотрены флуоресцентные методы анализа. Одним из наиболее информативных при исследовании структуры надмолекулярных ансамблей является метод разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии (РВФА). Благодаря высокой чувствительности и уникальной возможности следить за общими динамическими свойствами комплекса, метод позволяет получить детальную информацию о структурной организации белок-содержащих надмолекулярных ансамблей.

## **II. КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С ОСНОВНЫМИ КЛАССАМИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ**

### **КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С УГЛЕВОДАМИ**

Углевод-белковые взаимодействия играют важную роль во многих биологических процессах. Например, специфическое взаимодействие белков с гликолипидами или гликопротеинами цитоплазматической мембраны клеток лежит в основе механизма клеточного узнавания. Полидентантные углевод-связывающие белки называются лектинами. В настоящий момент выделено несколько сотен различных лектинов, среди которых наиболее изучены растительные. Лектины не проявляют каталитической активности. Их основной функцией является способность узнавать и связываться со специфическими углеводными остатками. Различают два типа лектинов: интегральные (мембранные) и растворимые [41]. Многие лектины сами содержат углеводную часть. Для большинства лектинов характерно высокое содержание  $\beta$ -структур и низкое –  $\alpha$ -спиралей [47, 57, 138]. Так, например, conA (« $\alpha$ 1- $\beta$ -protein»), содержит 51%  $\beta$ -структурных областей и лишь 2%  $\alpha$ -спиральных [34, 136]. *Vicia faba lectin* содержит 40–57%  $\beta$ -структуры и 4–23%  $\alpha$ -спиралей. Причем при специфическом взаимодействии лектина с углеводами, например, с N-ацетил-D-глюкозамином, содержание  $\beta$ -структуры увеличивается [47]. Обычно лектины состоят из двух или более субъединиц, которые могут быть ковалентно связаны дисульфидными мостиками [56, 57, 118]. Как правило, каждая субъединица содержит один углевод-связывающий центр. Такие центры эквивалентны и проявляют одинаковую специфичность. Наличие более чем одного углевод-связывающего центра обуславливает способность лектинов вызывать агглютинацию клеток или рецептор-содержащих искусственных бислоев [32, 68]. Моновалентные

лектины, такие как рицин или  $RCA_{11}$  из касторовых бобов [35, 124], способны связываться с гликоорецепторами, но не вызывают реакцию агглютинации. Связывающий центр лектинов обычно представляет собой вытянутый участок, что обуславливает возможность одновременного взаимодействия с лектином нескольких гликозидных остатков. Взаимодействие лектинов с углевод-несущими молекулами осуществляется, в основном, посредством водородных связей [38, 111]. Например, связывание  $conA$  с рецептором осуществляется при взаимодействии лектина с маннозидными гидроксильными группами с образованием водородной связи между концевым остатком маннозы и связывающим центром лектина [36, 115]. Гидрофобные взаимодействия также вносят существенный вклад в стабилизацию структуры комплексов [35, 60].

#### КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С ЛИПИДАМИ

Липопротеиновые комплексы (ЛП) образуются за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий между липидами и специфическими белками, аполипопротеинами. ЛП разделяют на свободные или растворимые в воде (ЛП плазмы крови, молока, желтка яиц и др.) и нерастворимые – структурные (ЛП клеточных мембран, хлоропластов растений) [14, 94].

*Свободные ЛП* играют важную роль в метаболизме и транспорте липидов (триацилглицеринов, фосфолипидов, холестерина и холестеридов). Среди них наиболее изучены ЛП плазмы крови. Такие ЛП состоят из ядра, образованного эфирами холестерина и триацилглицеринов, которое окружено мономолекулярным слоем холестерина, фосфолипидов и гидрофильной частью белковых молекул. Различные комбинации липидов и аполипопротеинов образуют ЛП частицы различной плотности: хиломикроны, ЛП очень низкой плотности, ЛП низкой плотности и ЛП высокой плотности. ЛП низкой плотности характеризуются наиболее высоким содержанием холестерина (~10% в пересчете на сухой вес частицы) и являются транспортной формой липидов в крови, наиболее обогащенной холестерином. ЛП высокой плотности характеризуются низким содержанием холестерина и обогащены белковым компонентом (~55% в пересчете на сухой вес частицы). Белковые компоненты ЛП действуют как сигнальные молекулы, индуцирующие связывание ЛП с клеточными рецепторами и регулирующие активность ферментов, действующих на ЛП (липопротеинлипазу и лецитин-холестерол ацилтрансферазу) [85].

*Структурные ЛП* входят в состав биологических мембран. Соотношение липиды:белки (по массе) в биологических мембранах варьирует от 4:1 до 1:3. Основными липидными компонентами биологи-

ческих мембран являются фосфолипиды, гликолипиды и стерины. Распределение липидов и белков в биологических мембранах неоднородно. Обширные участки липидного бислоя, с низким содержанием белкового компонента, могут чередоваться с участками, характеризующимися высоким содержанием белка, в которых липиды располагаются в виде отдельных островков между белковыми молекулами. Специфические взаимодействия между белками приводят к образованию белковых ассоциатов, которые часто окружены липидами определенного типа. Такие ЛП участки, характеризующиеся определенным составом, удается выделить при фрагментации мембран [8].

*Мембранные белки* участвуют в рецепции гормональных и антигенных сигналов, выполняют транспортные функции, служат катализаторами протекающих в мембранах и на их поверхности реакций. Мембранные белки делятся на интегральные и периферические (или поверхностные). Последние сравнительно слабо связаны с мембраной и отделяются от нее в мягких условиях, например при повышении ионной силы раствора. Периферические белки по своим свойствам мало отличаются от обычных водорастворимых белков. Интегральные белки прочно связаны с мембраной, плохо растворимы в воде и склонны к образованию ассоциатов. Структурной особенностью интегральных белков является наличие в их полипептидной цепи протяженных участков с преобладающим содержанием неполярных аминокислот. Как правило, эти участки имеют конформацию  $\alpha$ -спирали, на внешней стороне которой расположены боковые неполярные группы аминокислотных остатков, в результате чего вся спираль приобретает гидрофобный характер. Доля  $\alpha$ -спиральных участков в мембранных белках высока (30–50%), остальная часть полипептидной цепи находится преимущественно в форме неупорядоченного клубка. Типичные примеры белков, которые удерживаются в мембранах благодаря гидрофобному  $\alpha$ -спиральному участку полипептидной цепи – цитохром  $b_5$ -редуктаза, цитохром  $b_5$ , АТФазы [12, 84, 99, 128].

Для изучения мембранных свойств белков и моделирования различных ферментативных, транспортных и рецепторных функций клеточных мембран часто используют искусственные комплексы: протеолипосомы, а также белок-содержащие мицеллярные системы. Липосомы представляют собой концентрические замкнутые липидные бислои, внутренний объем которых изолирован от внешней среды. Мицеллы – это сферические частицы, образованные ассоциатами амфифильных молекул ПАВ. В полярных растворителях существуют прямые мицеллы, в которых гидрофобные части молекул ПАВ образуют ядро мицеллы, а полярные группы находятся на поверхности. При растворении молекул ПАВ в неполярных органических раство-

рителях и добавлении воды в систему образуются обращенные мицеллы ПАВ, ядро которых образовано полярными группами. В таких системах возможна солюбилизация водных растворов ферментов, с сохранением их каталитической активности и субстратной специфичности [9, 78, 86, 89, 90, 94, 95].

#### БЕЛОК–БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Белок–белковые комплексы делятся на гомосубъединичные (или олигомерные белки) и гетеросубъединичные (или сложные белки) [26]. Среди белков первого типа наиболее распространены димеры, тетрамеры и октамеры [73]. Большинство олигомерных белков существуют только в виде перманентных комплексов. В водных растворах крайне сложно разделить олигомерные белки на мономеры, сохранив их нативную структуру. Эффективным методом исследования олигомерных белков является использование системы обращенных мицелл ПАВ. Такие системы позволяют регулировать каталитическую активность, стабильность и специфичность ферментов, а также олигомерный состав белков. Для целого ряда олигомерных ферментов (лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из мышц свиньи, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) из мышц кролика, пенициллинацилазы из *Escherichia coli*, щелочной фосфатазы из кишечника теленка [74, 75, 100, 107]) было найдено, что в системах обращенных мицелл ПАВ можно в мягких условиях осуществить диссоциацию комплексов. В зависимости от степени гидратации мицелл,  $w_0 = [H_2O]/[ПАВ]$ , образуются различные олигомерные формы белка. Каждой функциональной форме фермента в системе обращенных мицелл отвечает свой максимум на кривой зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ. Эти максимумы соответствуют размеру внутренней полости белок-содержащих обращенных мицелл ПАВ [74, 75, 100, 107]. Например, формиатдегидрогеназа (ФДГ) в водном растворе функционирует в виде димера (ММ 80 кДа) [105]. В системе обращенных мицелл АОТ в октане ФДГ характеризуется тремя оптимумами на профиле зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ. Методом скоростной седиментации было показано, что первый оптимум каталитической активности соответствует функционированию мономерной формы фермента, второй – димерной, третий – октамерной [15].

Использование системы обращенных мицелл ПАВ позволяет также конструировать различные гомо- и гетеросубъединичные белковые комплексы - осуществлять надмолекулярный дизайн. Ярким примером этого является образование в системе обращенных мицелл АОТ в октане гетерокомплексов ЛДГ и ГАФД. При степени гидратации

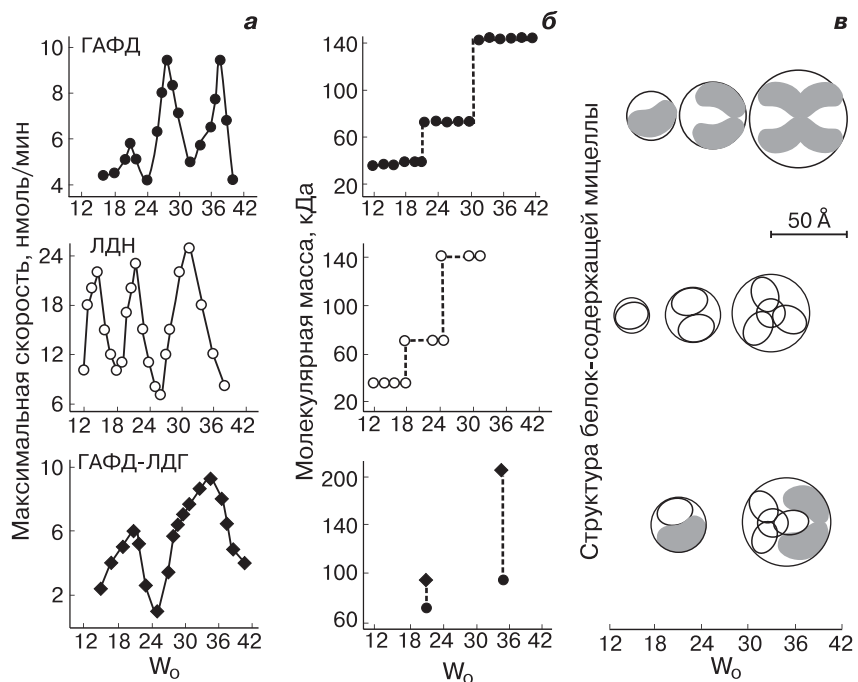


Рис. 1. Образование гомо- и гетеродимерных надмолекулярных структур: D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гетерокомплексов ЛДГ-ГАФД в системе обращенных мицелл АОТ в октане.

*а* – зависимость каталитической активности от  $w_0 = [H_2O]/[ПАВ]$ ;

*б* – седиментационный анализ; *в* – состав белок-содержащих мицелл [87].

мицелл, равной 20, ЛДГ и ГАФД образуют комплекс ЛДГ-ГАФД в соотношении 1:1; при степени гидратации мицелл, равной 35, соотношение в комплексе составляет 4:2 (рис. 1) [87].

В качестве примера белок-белковых гетерокомплексов приведем также иммунокомплексы (Ag–Ab). Образование специфического комплекса Ag–Ab (в данном случае речь идет о комплексах иммуноглобулинов (Ig) с соответствующими белками), обеспечивается, главным образом, гидрофобными взаимодействиями. Вклад в связывание антигена вносят также водородные связи и электростатические взаимодействия. Прочность комплексов Ag–Ab обусловлена образованием множественных контактов. Константы диссоциации комплексов ( $K_D$ ) изменяются в диапазоне  $10^{-5}$ – $10^{-11}$  М. Минимальные значения  $K_D$  характерны для гидрофобных антигенов [10, 21].

Более сложные гетерокомплексы образуются в *мультиферментных системах*, катализирующих цепи последовательных реакций. В таких системах субстрат и промежуточные соединения от начала до конца метаболического цикла не покидают комплекс. Классификация мультиферментных систем обсуждается в работе [91]. Различают три типа систем: мультиферментные комплексы (нековалентные ассоциаты белков), мультиферментные конъюгаты и мембрано-связанные мультиферментные системы. Примером мультиферментных комплексов являются рассмотренные в работе Б.И. Курганова [18, 91] динамические комплексы ферментов, которые способны связывать одни и те же метаболиты. В таких системах осуществляется прямая передача интермедиата от активного центра одного фермента к активному центру другого посредством образования тройного комплекса, содержащего оба фермента и метаболит. Было показано [18], что такой механизм прямой передачи интермедиата реализуется для NAD-зависимых дегидрогеназ, а также ферментов, участвующих в гликолизе. Так, при высоких концентрациях фруктозо-1,6-бисфосфата фруктозобисфосфат-альдолаза образует комплекс с димерной формой ГАФД, что приводит к активации фермента, т.к. димер ГАФД характеризуется более высокой каталитической активностью по сравнению с тетрамером. В таком комплексе происходит прямой перенос глицеральдегид-3-фосфата, образующегося из фруктозо-1,6-бисфосфата, на активный центр ГАФД, благодаря чему исключается выход глицеральдегид-3-фосфата в объем и его гидратация.

Примером мультиферментных комплексов и одновременно мультиферментных конъюгатов (в зависимости от источника) может служить комплекс СЖК, синтаза жирных кислот, состоящий из семи ферментов и катализирующий восемь реакций цикла биосинтеза жирных кислот [85]. В случае бактериальных клеток *E. coli* и клеток высших растений, СЖК состоит из семи отдельных ферментов, каждый из которых содержит один активный центр. СЖК из дрожжей состоит из двух полипептидных цепей, содержащих семь активных центров. А в случае позвоночных животных наблюдается полная интеграция ферментов в комплексе: СЖК представляет собой мультиферментный комплекс, состоящий из одной огромной полипептидной цепи (ММ 240 кДа) и содержащий по-прежнему семь активных центров. Причем активная форма такой системы – димер с ММ 480 кДа [85].

К наиболее организованным системам относятся *метаболоны* — мультиферментные системы, связанные с крупными надмолекулярными структурами, например, рибосомами или мембранами. Основное значение таких комплексов заключается в возможности регуля-



ции их функционирования как единого целого в зависимости от функционального состояния клетки. Важную роль в регуляции играет участок клеточной субструктуры, на котором адсорбирован комплекс и через который могут поступать те или иные сигналы. Примерами метаболонов могут служить метаболон цикла трикарбоновых кислот, комплексы гликолитических и фосфорилирующих ферментов. Ферменты располагаются в мембране в определенном порядке, что делает возможным последовательное протекание реакций метаболического пути. Многие мультиферментные системы способны автоматически поддерживать требуемую скорость суммарной реакции. В таких системах конечный продукт последовательности реакций является ингибитором первого фермента. В результате этого скорость всего процесса определяется стационарной концентрацией конечного продукта [18, 20, 22, 85, 91].

#### КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Нуклеопротеиды содержатся в каждой клетке и выполняют функции, связанные с хранением и реализацией генетической информации. Нуклеопротеидные комплексы стабилизированы водородными связями, электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. Диссоциацию комплексов вызывает высокая ионная сила раствора, присутствие мочевины, ионных ПАВ. Взаимодействия НК с белками делят на специфические (нуклеиново-белковое узнавание), когда белок связан с участком НК строго определенной нуклеотидной последовательности, и неспецифические. Специфические взаимодействия лежат в основе способности самосборки нуклеопротеидных комплексов: структура комплекса может быть полностью реконструирована из его отдельных компонентов [20]. Комплексообразование часто сопровождается сильными изменениями конформации НК, а иногда и белков, причем в составе комплекса нуклеиновая кислота имеет, как правило, существенно более компактную структуру, чем в изолированном виде [1–3].

Примером комплексов белков с ДНК может служить хроматин – комплекс ДНК с гистонами. Гистоны – группа сильноосновных белков (рI 9,5–12), – являются основными белковыми компонентами хромосом, участвуют в транскрипции и репликации. Гистоны при взаимодействии с ДНК образуют цепочку нуклеосом, представляющих собой сферические частицы, состоящие из октамерных агрегатов молекул гистонов, окруженных участком ДНК. Нуклеосомы являются структурными единицами хроматина и образуют низший уровень упаковки ДНК в хромосоме [20, 55, 96, 103].



В качестве примеров комплексов белков с РНК можно привести рибосомы, специфические и неспецифические комплексы матричных РНК с белками. К специфическим относятся комплексы мРНК с мРНК-связывающими белками: факторами инициации трансляции, специфическими репрессорами и активаторами трансляции, факторами, маскирующими мРНК и другими [24]. Помимо РНК-связывающих белков, специфически узнающих определенные последовательности и структурные элементы мРНК, ряд белков взаимодействует со всеми мРНК в цитоплазме, образуя информосомы [116]. Среди мажорных белков, связанных с мРНК, преобладают белки семейства р50 (mRNP-CP). Считается, что роль этих белков заключается в структурировании и упаковке мРНК в мРНК частицы, независимо от последовательности мРНК [117, 121].

#### КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ

Комплексы белков с синтетическими полиэлектролитами (ПЭ) спонтанно образуются, главным образом, за счет электростатических взаимодействий. Белок–ПЭ комплексы устойчивы в широком интервале значений рН и ионной силы и отличаются высокой стабильностью благодаря кооперативному характеру взаимодействия [11, 13]. В водном растворе образование комплекса с ПЭ, как правило, не приводит к изменению конформации белка и каталитических параметров ферментов [11, 13, 59, 80, 82]. Различия в конформациях свободного белка и белка в комплексе с ПЭ наблюдаются лишь в денатурирующих условиях — в водно-органических смесях с высоким содержанием органического растворителя (более 50 об.%) [80, 82] и при повышенной температуре [88]. Например, в случае комплекса  $\alpha$ -химотрипсина (ХТ) с полиметакриловой кислотой, предварительно образованного в водном растворе, вторичная структура белка остается неизменной в более широком интервале концентраций органического растворителя, чем в случае свободного фермента (рис. 2). Было найдено, что полиэлектролит стабилизирует ту конформацию белка, которая существует в условиях образования комплекса. Этот факт делает комплексообразование с ПЭ одним из наиболее эффективных и универсальных методов стабилизации белков и в частности, ферментов [59, 80].

Белок–ПЭ комплексы могут являться моделью неспецифических нуклеопротеидных комплексов, образованных за счет электростатического взаимодействия. Преимущества такого моделирования заключаются в том, что оно позволяет исследовать зависимость физико-химических свойств комплекса при варьировании в широких пре-

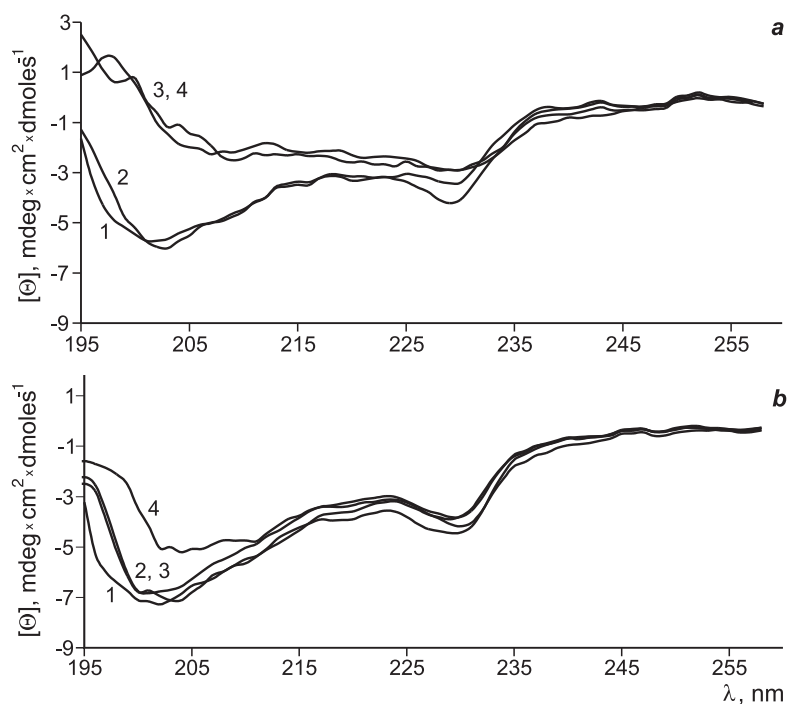


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма в дальней УФ области для свободного  $\alpha$ -химотрипсина (ХТ) (а) и комплекса ХТ с полиметакриловой кислотой (ПМА) (б) в системе вода–этанол.

Соотношение ХТ/ПМА по весу 4/1. Концентрации этанола, об. %. а: 1 – 0; 2 – 20; 3 – 30; 4 – 50. б: 1 – 0; 2 – 20; 3 – 50; (4) – 70. Условия эксперимента: 5 мМ MOPS, pH 7,5;  $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $[\text{ХТ}] = 4\text{ мкМ}$  [82].

делах длины цепи ПЭ, знака и плотности зарядов на ПЭ и т.д. Кроме того, такие системы легко образуются, оптически прозрачны и удобны для исследования физико-химическими методами.

Наиболее высокая конформационная стабильность фермента в комплексе, по-видимому, может быть достигнута при образовании тройных комплексов белок–полианион–поликатион [4], в которых белок связан с обоими ПЭ. Образование таких комплексов происходит при условии низкой плотности заряда на том ПЭ, который вносят в систему последним. В этом случае «последний» ПЭ комплементарен белку, у которого плотность заряда низкая, и некомплементарен «первому» ПЭ с высокой плотностью заряда. Так, было показано, что включение ХТ в тройной комплекс с поликатионом, ионеном 10-10, и поли-

акриловой кислотой (ПАК) приводит к дополнительной стабилизации фермента по сравнению с двойными комплексами в области существования суспензий биокатализатора (рис. 3). Тройные комплексы способствуют также повышению растворимости белков в неполярных органических растворителях, поскольку большая часть зарядов на белке и на ПЭ скомпенсирована в результате тройного комплексообразования. Интересно отметить, что рассмотренная система тройных комплексов белок–ПА–ПК может в определенном приближении рассматриваться как модельная система при изучении комплексообразования гистонов с ДНК при участии шаперонов. Например, взаимодействие кислого ядерного белка нуклеоплазмина при образовании нуклеосом необходимо для уменьшения взаимного электростатического отталкивания гистонов (которое обусловлено избытком положительно заряженных групп) и, с другой стороны, для предотвращения неупорядоченной агрегации гистонов с ДНК, т.е., в конечном итоге, для образования правильной структуры комплекса [20].

#### КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С ПРИРОДНЫМИ ОЛИГОАМИНАМИ

Многоточечное электростатическое взаимодействие с белком реализуется также при образовании комплексов с низкомолекулярными природными аналогами ПЭ – олигоаминами (ОА). Природные олигоамины играют существенную роль в регуляции процессов клеточного роста и дифференцирования клеток, биосинтеза белка, а также влияют на активность некоторых ферментов [97, 120]. Например, каталитическая активность АМФ-независимых протеинкиназ, аминоксил-тРНК-синтаз и др. ферментов регулируется ОА. Механизм влияния ОА на активность ферментов связан с нейтрализацией заряженных групп белка, что может приводить к конформационным изменениям. В ряде случаев активирующая роль ОА связана с их

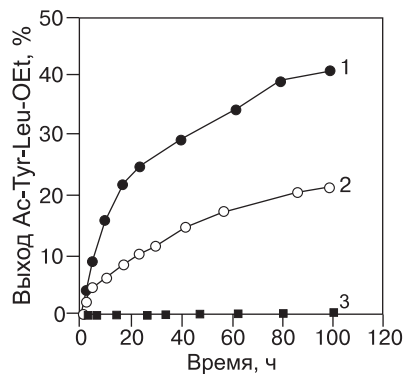


Рис. 3. Зависимость выхода этилового эфира N-ацетил-L-тирозин-L-лейцина от времени реакции в системе, содержащей 60 об. % диметилформамида (ДМФ), 34 об. % ацетонитрила и 6 об. % воды.

Свободный  $\alpha$ -химотрипсин (ХТ) (кривая 3); ХТ в двойном комплексе с полиакриловой кислотой (ПАК) (кривая 2); ХТ в тройном комплексе с ионеном-10,10 и ПАК (кривая 1) [4].

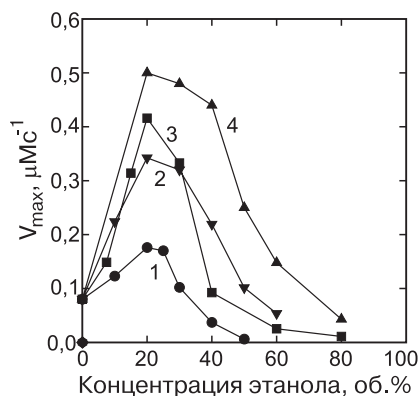


Рис. 4. Зависимость каталитической активности свободного  $\alpha$ -химотрипсина (ХТ) (кривая 1) и ХТ в комплексе с олигоаминами различной длины цепи (кривые 2–4) в реакции гидролиза пара-нитроанилида N-бензоил-L-тирозина от концентрации этанола в системе вода–этанол. ХТ–путресцин (кривая 2); ХТ–спермидин (кривая 3); ХТ–спермин (кривая 4).

Условия эксперимента: 5 мМ Mops, рН 7,5;  $t = 20^\circ\text{C}$ ;  $[\text{ХТ}] = 1 \text{ мкМ}$  [81].

комплексообразования на каталитическую активность фермента [81]. Было найдено, что неспецифическое комплексообразование ХТ с ОА, спермином, спермидином и путресцином, приводит к стабилизации фермента в гомогенных водно-органических смесях и к увеличению его каталитической активности при умеренных концентрациях органических растворителей (10–30 об.%) (рис. 4). Эффективность стабилизации и активации фермента при комплексообразовании определяется числом молекул ОА, связанных на поверхности ХТ. Константы диссоциации неспецифических комплексов ХТ–ОА в водном растворе составляют 0,05–0,18 мкМ, в зависимости от длины цепи ОА, а в 20% этаноле – примерно в 200 раз меньше. Такое существенное увеличение прочности комплексов при переходе от водного раствора к водно-органической смеси обусловлено усилением электростатических взаимодействий при уменьшении полярности среды. Вследствие этих же причин, существенно отличается и стехиометрический состав комплексов ХТ–ОА в водном растворе и в водно-органической смеси: число молекул ОА связанных с белком в

действием не на фермент, а на конформацию высокомолекулярных белковых субстратов (например, казеина или РНК полимеразы-I) [64, 110]. Мультифункциональность биологической активности обусловлена особенностями структуры олигоаминов. Заряды распределены по длине цепи, что определяет их способность связываться с участками макромолекул, находящимися на определенном расстоянии друг от друга. При взаимодействии с противоположно заряженными группами поверхности белка олигоамины, как и ПЭ, образуют комплексы, в которых конформация фермента стабилизирована [81, 97]. Низкая степень полимеризации ОА позволяет определять термодинамическую стабильность и стехиометрию таких комплексов и исследовать механизм влияния

водном растворе варьирует от 2 до 9, в зависимости от ОА, в то время как в 20% этаноле — от 15 до 30. Предполагаемый механизм стабилизации — это фиксирование каталитически активной конформации фермента в результате электростатического взаимодействия с ОА и экранирование поверхности белка от прямого контакта с органическим растворителем.

Данные о рассмотренных комплексах белков с высоко- и низкомолекулярными соединениями суммированы в табл. 1.

### **III. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ БЕЛОК-СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ**

Для понимания процессов, протекающих с участием белок-содержащих комплексов, важно не только следить за функциональной активностью белков, но и располагать достоверной информацией о пространственной структуре всего комплекса и белка в нем. Для этого используют различные физико-химические методы. Основные методы, а также, получаемая при их использовании информация, суммированы в табл. 2.

При исследовании структуры белков в растворе широко применяются флуоресцентные методы (рис. 5) [44, 84]. Преимуществами этих методов являются высокая чувствительность и информативность [84]. Широкое разнообразие флуоресцентных методов анализа позволяет подобрать метод или комбинацию методов, наиболее подходящих для исследуемой системы.

#### **МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

Метод флуоресцентной спектроскопии является одним из наиболее распространенных для изучения физико-химических свойств биологических систем [6, 84] и, в частности, структуры белков. Этот метод позволяет следить за изменениями в микроокружении собственных флуорофоров белка или введенной флуоресцентной метки. Белки содержат три аминокислотных остатка, которые вносят основной вклад в собственную флуоресценцию белка (тирозин, фенилаланин и триптофан). Собственная флуоресценция большинства белков обусловлена, в первую очередь, триптофановыми остатками. Для селективного возбуждения остатков триптофана используется диапазон длин волн 295–305 нм, в котором поглощение тирозина и фенилаланина минимально. Флуоресцентные свойства триптофана крайне чувствительны к изменению его микроокружения, и главным образом, полярности. В соответствии с этим, комплексообразование с низкомо-

Таблица 1  
**Белок-содержащие комплексы. Функции и особенности структуры.**

Комплексы с белками	Примеры комплексов	Функция	Примеры белков и особенности их структуры	Ссылки
Углеводы	Комплекс лектин-рецептор	Клеточное узнавание	<i>Лектины</i> : субъединичные белки, каждая субъединица содержит один углевод связывающий центр; высокое содержание β-структуры	[29, 32, 34–36, 38, 41, 47, 56, 57, 60, 68, 69, 111, 115, 118, 124, 136, 138]
Липиды	Липопротеины свободные структурные	Структурная, транспортная и рецепторная функции клеточных мембран	<i>Интегральные белки</i> : наличие протяженных участков с высоким содержанием неполярных аминокислот; содержание α-спиралей 30–50%	[12, 14, 23, 25, 30, 42, 43, 84, 94, 95, 99, 128, 137]
Белки	Субъединичные ферменты	Регуляция активности и стабильности ферментов	Наиболее распространены димерные и тетрамерные белки; сложно выделить в виде мономеров	[15, 23, 27, 74, 75, 83, 86, 87, 100, 105, 107]
<i>гетерокомплексы</i>	Комплекс антиген-антитело	Иммунная система	<i>Антитела</i> : комплекс Y- или T-образной формы, состоит из 4-х полипептидных цепей; содержит два F <sub>ab</sub> фрагмента (связывание антигенов) и F <sub>c</sub> фрагмент (связывание с мембраной).	[10, 21]
	Мультиферментные системы (метабоны)	Последовательное протекание реакций метаболического пути	Цепи дыхательных и фосфорилирующих ферментов	[17, 18, 20, 22, 83]
Нуклеиновые кислоты	Нуклеопротеиды (рибосомы, информосомы, хроматин)	Хранение и реализация генетической информации	<i>Листоны</i> : высокое содержание остатков Lys и Arg, отсутствие Trp. Вторичная структура: преобладают α-спирали. Третичная структура: C-концевая часть и N-концевая часть не структурированы и обогащены Lys и Arg	[1–3, 24, 71, 103, 116, 117, 119]
Синтетические ПЭ	Блок-ПЭ комплексы	Биокаталитическая, аналитическая	Белки являются полиамфолитами, содержат положительно и отрицательно заряженные группы, способны образовывать неспецифические комплексы электростатической природы с ПЭ	[9, 11, 13, 45, 59, 80, 82]
Олигоэлектролиты (ОА)		Регуляция активности и стабильности ферментов	АМФ-независимые протеинкиназы, аминоксил-тРНК-синтазы, неспецифические белки, содержащие доступные -COO <sup>-</sup> группы	[64, 81, 97, 110, 120]

Таблица 2  
**Физико-химические методы исследования  
 белок-содержащих комплексов в растворе**

Физико-химические методы	Определяемые свойства	Ссылки
ДСК	Термодинамические параметры конформационных переходов в белках	[59, 92, 93, 106]
ИК-спектроскопия	Вторичная структура белка:	[32, 49–51, 61, 62, 65, 72, 108, 119, 127]
область «амид 1»	<i>β-структура</i> 1628–1635 см <sup>-1</sup>	<i>α-спираль</i> 1652–1657 см <sup>-1</sup>
область «амид 2»	1521–1525 см <sup>-1</sup>	1545–1551 см <sup>-1</sup>
Спектроскопия КД в дальней и ближней УФ-области	Вторичная структура белка – дальняя УФ-область (185–260 нм) Третичная структура белка – ближняя УФ-область (260–340 нм)	[28, 63, 113, 135]
Абсорбционная спектроскопия а) интегральная б) дифференциальная	Изменения в микроокружении хромо- форов белка, агрегация	[16, 42, 136]
Флуоресцентные методы (схема 1)	Изменения в микроокружении флуоро- форов белка; вращательная динамика	[5, 44, 82, 84, 98, 112, 125, 126, 129–134]
Спектроскопия ЯМР	Пространственная структура белка в растворе, динамика.	[33, 39, 50, 67, 77, 102, 113, 123]

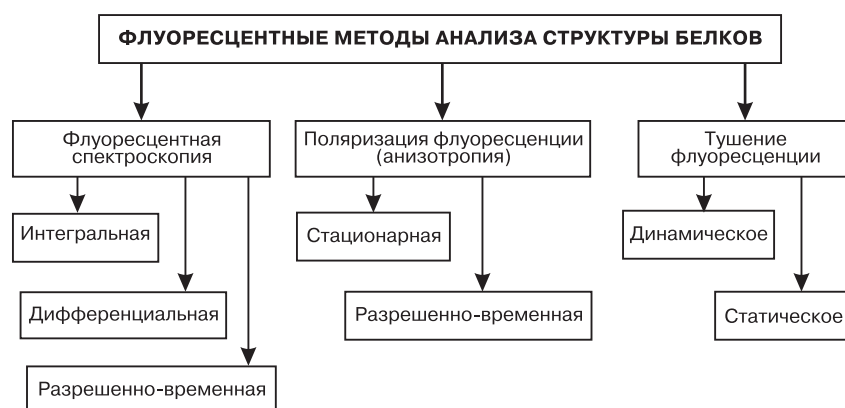


Рис. 5. Флуоресцентные методы анализа структуры белков.



лекулярными лигандами и макромолекулами, денатурация, агрегация и другие процессы существенным образом влияют на спектры флуоресценции белков. Например, при термоденатурации ХТ триптофановые остатки переходят из гидрофобных областей белка в полярное водное микроокружение. В результате этого  $\lambda_{\text{max}}$  собственной флуоресценции белка сдвигается в сторону больших длин волн (от 333 до 340 нм), а интенсивность флуоресценции увеличивается в два раза. Следует учесть, что триптофан в свободном состоянии (этиловый эфир N-ацетил-L-триптофана) характеризуется в водном растворе  $\lambda_{\text{max}}$  354 нм.

Высокая чувствительность метода ( $10^{-6}$ – $10^{-7}$  М по белку) позволяет исследовать разбавленные растворы, что важно при изучении структуры склонных к агрегации белков, а также в случае, когда необходимо следить за структурой фермента в условиях определения его каталитической активности (обычно это концентрации белка  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  М) [122].

Однако детальный анализ собственной флуоресценции белков затрудняется как обилием факторов, влияющих на флуоресценцию триптофана, так и наличием в белках нескольких остатков триптофана, различающихся микроокружением и степенью экспонированности. Например, в молекуле ХТ имеется 8 триптофановых остатков, которые делятся на три типа по степени экспонированности, микроокружению, и, соответственно, по величинам флуоресцентных времен жизни и длинам волн максимума спектра флуоресценции ( $\lambda_{\text{max}}$ ) [49]. Два остатка триптофана (Тгр-172 и Тгр-215) характеризуются временем жизни флуоресценции  $\phi_1 = 150$  пс и  $\lambda_{\text{max}}$  флуоресценции 325 нм. Триптофановые остатки (Тгр-51 и Тгр-237) имеют время жизни 1,45 нс и  $\lambda_{\text{max}}$  332 нм. Оставшимся четырем триптофанам (Тгр-27, -29, -141, -207) соответствует время жизни 4,2 нс и  $\lambda_{\text{max}} = 343$  нм. Спектры испускания остатков перекрываются во всем используемом диапазоне длин волн, в связи с чем крайне сложно разделить спектральные вклады каждого из них (рис. 6). Более того, спектры испускания сложны даже в случае белков, содержащих один триптофановый остаток [84].

Анализ спектральных изменений собственной флуоресценции белков еще более усложняется при изучении многокомпонентных систем. Например, присутствие органического растворителя приводит к двум противоположным эффектам, влияющим как на интенсивность флуоресценции, так и на величину  $\lambda_{\text{max}}$ . Экспонирование на поверхность триптофановых остатков, находившихся во внутренних областях белковой глобулы, приводит к сдвигу  $\lambda_{\text{max}}$  в сторону больших длин волн и, как правило, увеличению интенсивности флуоресценции. Переход экспонированных триптофановых остатков в менее полярное окружение при увеличении концентрации органического растворителя

приводит к сдвигу  $\lambda_{\text{макс}}$  в сторону меньших длин волн и, как правило, также к увеличению интенсивности флуоресценции. Кроме того, при высоких концентрациях органического растворителя возможно влияние агрегации на интенсивность флуоресценции и положение  $\lambda_{\text{макс}}$ . В качестве примера приведем зависимость  $\lambda_{\text{макс}}$  флуоресценции моноклональных антител против циклоспорина А от концентрации этанола в системе (рис. 7а). Такая колоколообразная зависимость  $\lambda_{\text{макс}}$  флуоресценции от концентрации органического растворителя характерна для белков, претерпевающих конформационные изменения в водно-органических смесях. Восходящая ветвь кривой соответствует экспонированию триптофановых остатков в раствор, вызванного денатурацией белка [56], нисходящая ветвь – уменьшению полярности микроокружения экспонированных триптофановых остатков белка при увеличении концентрации этанола, как это наблюдается в случае модельного соединения – этилового эфира N-ацетил-L-триптофана (рис. 7б). Отметим, что изменения в спектрах собственной

Рис. 7. Зависимость длины волны максимума флуоресценции моноклональных антител против циклоспорина А (а) и этилового эфира N-ацетил-L-триптофана (б) от концентрации этанола в системе. Условия эксперимента:  $t = 20^\circ\text{C}$ ; концентрация антител  $0,05\ \mu\text{M}$ ; длина волны возбуждения  $295\ \text{nm}$  [56].

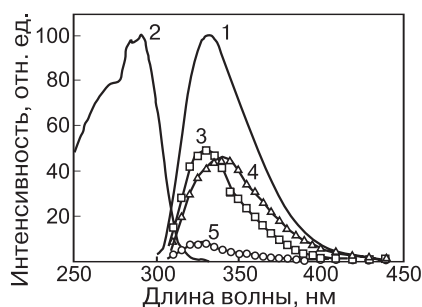
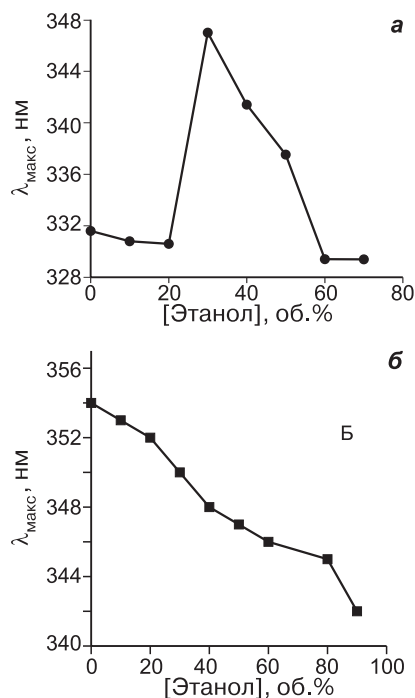


Рис. 6. Спектр собственной флуоресценции  $\alpha$ -химотрипсина (ХТ) (кривая 1). Длина волны возбуждения  $296\ \text{nm}$ . Теоретические спектры компонентов собственной флуоресценции ХТ (кривые 3–5), полученные путем деконволюции экспериментального спектра (кривая 1) согласно уравнению (1). Кривая 2 – спектр возбуждения ХТ.



флуоресценции белков сложны для однозначной интерпретации в плане понимания детальной структурной организации белков и позволяют сделать в основном лишь качественные выводы о происходящих изменениях конформации.

*Разделение вкладов триптофановых остатков в спектр флуоресценции белков*

Установить спектральные вклады различных триптофановых остатков можно путем изучения кинетики затухания флуоресценции методом разрешенно-временной флуоресцентной спектроскопии [6, 27, 52, 84], позволяющим определить флуоресцентные времена жизни для каждого из триптофановых остатков ( $\tau_j$ ), а также с помощью дифференциального метода анализа флуоресцентных спектров. Преимущество последнего метода состоит в существенно большем разрешении пиков по сравнению с интегральным спектром. Данный метод анализа спектров наиболее широко применяется в абсорбционной и ИК спектроскопии [59]. На основе анализа пространственной структуры белка (из данных РСА) и данных по кинетике затухания флуоресценции (или динамического тушения флуоресценции) в спектре испускания осуществляют соотношение флуоресцентных  $\lambda_{\max}$  к индивидуальным триптофановым остаткам (рис. 6) [52]. Разделение спектра флуоресценции и идентификация индивидуальных триптофановых остатков основаны на предположении о влиянии микроокружения флуорофора на зависимость времени затухания от длины волны. В этом случае доля интенсивности каждого остатка при любой длине волны ( $I_j(\lambda)$ ) равна:

$$I_j(\lambda) = I_{ss}(\lambda) [\alpha_j \tau_j / \sum \alpha_j \tau_j], \quad (1)$$

где  $I_{ss}(\lambda)$  стационарная интенсивность флуоресценции,  $\tau_j$  флуоресцентное время жизни,  $\alpha_j$  — относительный вклад в общую интенсивность флуоресценции.

Идентификация индивидуальных триптофановых остатков в спектрах флуоресценции позволяет получить детальную информацию об изменении структуры белка. Однако для успешного использования подхода требуется наличие базовых данных как по структуре, так и по кинетике затухания флуоресценции исследуемого белка, что создает определенные сложности, особенно при исследовании малоизученных белков.

*Флуоресцентные метки*

Для решения вышеуказанных проблем, а также для повышения чувствительности метода при изучении структуры биологических

объектов широко используются флуоресцентные метки (флуорофоры, ковалентно связанные с исследуемым биологическим объектом) и флуоресцентные зонды (флуорофоры, нековалентно связанные с исследуемым биологическим объектом). Классификация и флуоресцентные свойства этих соединений подробно рассмотрены в книге Ю.А.Владимирова [7]. В данном обзоре мы отметим, что флуоресцентные метки обычно выбирают, исходя из следующих основных соображений:

1. Учитывают основные характеристики флуорофоров (длины волны возбуждения и испускания, квантовый выход и флуоресцентное время жизни),

2. В качестве флуоресцентных меток обычно используют соединения, флуоресцентные свойства которых резко меняются при изменении полярности среды,

3. При взаимодействии с белком метка не должна приводить к существенным изменениям в структуре и свойства последнего, в частности, не должен существенно изменяться гидрофильно-липофильный баланс поверхности белка,

4. Простота методики введения флуоресцентной метки (отсутствие денатурирующих условий по отношению к белку и возможность следить за ее введением в условиях проведения реакции),

5. Полученный конъюгат должен быть стабилен, по крайней мере, в течение нескольких суток,

6. При изучении кинетики затухания анизотропии, флуоресцентное время жизни флуорофора должно быть сравнимо по порядку с предполагаемым корреляционным временем вращения белка (см. подробнее метод РВФА).

При взаимодействии с ферментом субстратоподобных ингибиторов, содержащих флуорофор, флуоресцентная метка может быть селективно введена в активный центр. Так, для сериновых протеаз (ХТ, трипсина, субтилизина) используют 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилфторид (дансилфторид) [40, 126]. Эта метка характеризуется спектрами абсорбции и эмиссии, удаленными от спектров собственной флуоресценции белка (триптофана и тирозина). К преимуществам дансилфторида относится также высокий квантовый выход. В случае ХТ наиболее удобной является метка антранил-*пара*-нитроанилид [54, 66, 82]. Длины волн максимумов абсорбции и эмиссии ХТ, меченного антранилом, соответственно 342 и 422 нм. За введением метки легко следить спектрофотометрически по выделению *пара*-нитроанилина. При этом исходное соединение, антранил-*пара*-нитроанилид, не имеет флуоресценции и не гидролизует в ходе реакции.

Во многих случаях связывание белков с субстратами, взаимодействие с мембранами и агрегация белков приводят к сдвигу в их спектре испускания. Так, максимум испускания лизоцима сдвигается от 340 до 331 нм при связывании субстрата, три-N-ацетил-D-глюкозамина. Этот сдвиг связан с экранированием триптофановых остатков в активном центре фермента от молекул воды [84]. Значительные изменения в спектре собственной флуоресценции белка наблюдаются при образовании тетрамера меллитина, белка пчелиного яда, при увеличении ионной силы раствора: длина волны максимума испускания триптофанового остатка меллитина (мономер меллитина содержит один триптофановый остаток) сдвигается в сторону более коротких длин волн более чем на 10 нм. ХТ, меченный по активному центру антранильной группой (А-ХТ), характеризуется в водном растворе  $\lambda_{\text{max}}$  флуоресценции 422 нм [54]. При образовании комплекса А-ХТ с полиметакриловой кислотой (ПМА) происходит сдвиг  $\lambda_{\text{max}}$  на 8 нм в сторону больших длин волн (430 нм) [82]. Интересно отметить, что в водном растворе модельное соединение (антранил-*para*-нитроанилид) характеризуется  $\lambda_{\text{max}}$  флуоресценции 428 нм. Сдвиг  $\lambda_{\text{max}}$ , наблюдаемый при комплексообразовании А-ХТ с ПМА, отражает увеличение полярности микроокружения антранильной группы, что связано с присутствием заряженных карбоксильных групп ПМА.

При изучении молекулярного механизма комплексообразования с белками можно также следить за флуоресценцией лигандов, содержащих метку [76]. Например, при связывании основного лектина из бобов с флуоресцентно меченым галактозамином наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции и сдвиг максимальной эмиссии флуоресценции в область более коротких длин волн. Это предполагает, что в результате связывания с белком флуорофор попадает в гидрофобное окружение. Таким образом, было показано наличие гидрофобной области в углевод-связывающем центре лектина.

#### МЕТОДЫ ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Методы тушения флуоресценции подробно рассмотрены в работах И. Лаковича и Ю.А. Владимирова [6, 84]. Отметим основные возможности этого метода. Обычно рассматривают два вида тушения флуоресценции: статическое — связанное с образованием нефлуоресцирующего комплекса, и динамическое — связанное со случайными столкновениями между флуорофором и тушителем. Статическое тушение флуоресценции описывается уравнением:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{стат.}}[Q], \quad (2)$$

где  $F_0$  и  $F$  — интенсивности флуоресценции, соответственно, в отсутствие и в присутствии тушителя, а  $[Q]$  — концентрация тушителя,  $K_{\text{стат.}} = [F - Q]/[F] - [Q]$ ,  $F - Q$  — комплекс флуорофора с тушителем.

Динамическое тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$F_0/F = 1 + k\tau_0[Q] = 1 + K_{\text{дин.}}[Q], \quad (3)$$

где  $\tau_0$  — флуоресцентное время жизни в отсутствие тушителя,  $k$  — бимолекулярная константа скорости тушения,  $K_{\text{дин.}} = k\tau_0$  — константа Штерна-Фольмера.

Данные по тушению обычно представляют в координатах  $F_0/F$  от  $[Q]$ , так как ожидается, что  $F_0/F$  должно линейно зависеть от концентрации тушителя. Линейная зависимость в координатах Штерна-Фольмера указывает на существование одного типа флуорофоров, одинаково доступных для тушителя. При тушении триптофановых остатков в белках полярными или заряженными тушителями, которые с трудом могут проникнуть внутрь белковой глобулы, экспериментальная кривая отклоняется от линейного вида. На этом основано использование метода динамического тушения для определения поверхностной доступности триптофановых остатков. Примером может являться исследование тушения флуоресценции триптофановых остатков люцифераз  $I^-$ ,  $Cs^+$ -ионами и акриламидом [27]. Тушение доступных остатков триптофана во многих случаях позволяет различить спектры испускания внутренних и внешних остатков.

#### Флуоресцентная анизотропия

При возбуждении флуоресцирующего образца поляризованным светом его испускание тоже поляризовано. Флуоресцентная анизотропия является характеристикой степени поляризации образца и выражается как разница параллельной и перпендикулярной составляющих флуоресценции в пересчете на общую интенсивность флуоресценции:

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH}) = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}), \quad (4)$$

где  $r$  — анизотропия,  $I_{VV}$  и  $I_{VH}$  — экспериментально определяемые интенсивности параллельной и перпендикулярной составляющих флуоресценции,  $G = I_{HV} / I_{HH}$ ,  $(I_{\parallel} + 2I_{\perp})$  — общая интенсивность флуоресценции.

Существует несколько причин деполяризации (уменьшения анизотропии), среди которых основной является вращательная диффузия флуорофоров. Таким образом, величину флуоресцентной анизотропии определяет скорость вращательной диффузии флуоро-

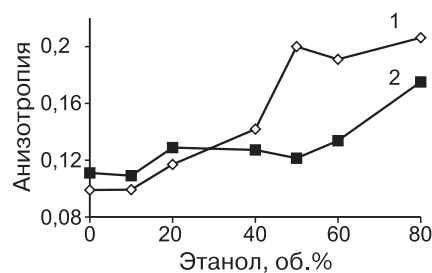


Рис. 8. Зависимость флуоресцентной анизотропии свободного  $\alpha$ -химотрипсина (ХТ) (1) и ХТ в комплексе с полиметакриловой кислотой (ПМА) (2) от концентрации этанола. Условия эксперимента: 5 мМ Mops, pH 7,5;  $t = 20^\circ\text{C}$ ;  $[\text{ХТ}] = 1 \text{ мкМ}$ . Длина волны возбуждения 300 нм.

фора во время жизни его возбужденного состояния. Взаимосвязь между экспериментально определяемой флуоресцентной анизотропией, флуоресцентным временем жизни и скоростью вращательной диффузии флуорофора устанавливается уравнением Перрена:

$$r/r_0 = 1 + \tau/\phi, \quad (5)$$

где  $\phi$  — корреляционное время вращения, отражающее скорость вращательной диффузии флуорофора,  $\tau$  — флуоресцентное время жизни,  $r$  — экспериментально определяемая флуоресцентная анизотропия,  $r_0$  — фундаментальная анизотропия (анизотропия в отсутствие деполаризации, обусловленной вращательной диффузией флуорофора и переносом энергии) [84].

Данная взаимосвязь лежит в основе использования методов измерения флуоресцентной анизотропии в биохимических исследованиях. Измерение анизотропии флуоресценции используется для количественной оценки денатурации и реакций ассоциации белков с лигандами [131], для изучения комплексообразования с макромолекулами: связывание антигена с антителом, ассоциация белков [109]. При комплексообразовании существенно меняются размер, пространственная структура и подвижность сегментов макромолекулы, которые сопровождаются изменением флуоресцентной анизотропии. Приведем несколько примеров исследования белок-содержащих комплексов методом стационарной анизотропии.

Данный метод позволил изучить агрегацию ХТ в водно-органической смеси [82]. За агрегацией фермента в системе вода—этанол следили по увеличению флуоресцентной анизотропии белка в результате увеличения массы и размера вращающихся частиц. Анизотропия ХТ увеличивается, начиная с концентрации этанола 20 об. % (рис. 8). В то же время было установлено, что при образовании комплекса ХТ с ПМА увеличение анизотропии наблюдается при существенно более высоких концентрациях этанола — 60 об. % и выше. Таким образом, было показано, что комплексообразование с ПЭ приводит к расширению интервала концентраций органического растворителя, в кото-



ром фермент не агрегирует. Данный эффект обусловлен электростатическим отталкиванием частиц белок–ПЭ комплексов, содержащих на поверхности большое число одноименно заряженных групп ПЭ, не вовлеченных в образование электростатических связей с поверхностью белка.

Другим интересным примером является слежение за образованием компактной структуры комплекса ХТ с ПМА и определение констант диссоциации комплекса в системе вода–этанол методом стационарной анизотропии [82]. В общем случае анизотропия макромолекул зависит как от молекулярной массы, так и от структуры – формы, компактности, жесткости. При взаимодействии ХТ с ПМА увеличение ММ при комплексообразовании незначительно, так как молекулярная масса ПЭ (ПМА, ММ 300 кДа) и фермента (ХТ, ММ 25 кДа) различаются более чем в 10 раз.

Основной вклад в изменение анизотропии вносит структурирование молекулы ПЭ. В водном растворе ПМА характеризуется низкой анизотропией – 0,005, что соответствует высокой подвижности цепей в молекуле. Комплексообразование приводит к увеличению анизотропии ПМА (рис. 9а), что обусловлено образованием все более и более компактной структуры ПМА по мере увеличения соотношения ХТ/ПМА в комплексе. Максимальное значение анизотропии соответствует наиболее компактной структуре ПМА. Полученные данные позволяют определить константу диссоциации для комплекса. При дальнейшем

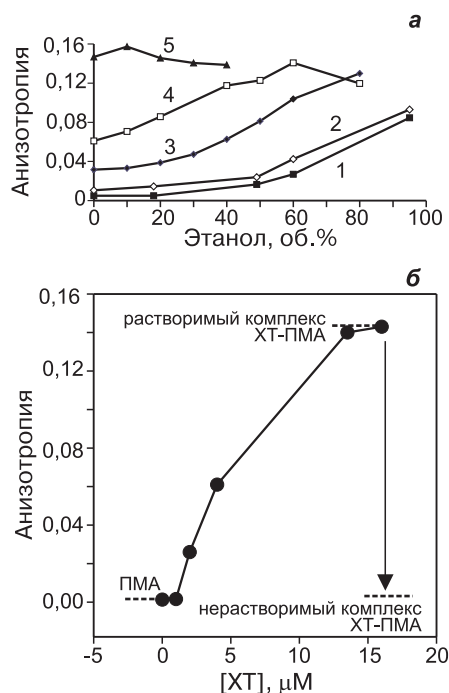


Рис. 9. а – зависимость флуоресцентной анизотропии для свободной пирен–полиметакриловой кислоты (ПМА) (кривая 1) и для комплекса  $\alpha$ -химотрипсина (ХТ) с ПМА (кривые 2–5) от концентрации этанола. Соотношение ХТ/ПМА по массе: (2) – 1/1; (3) – 4/1; (4) – 8/1; (5) – 32/1.

б – зависимость флуоресцентной анизотропии пирен–ПМА от концентрации ХТ в водном растворе. Условия эксперимента: 5 мМ Морс, рН 7,5;  $t = 20^\circ\text{C}$ ; [пирен–ПМА] = 0,04 мкМ. Длина волны возбуждения 340 нм [82].

увеличении соотношения ХТ/ПМА происходит образование стехиометрического комплекса, в котором практически все заряды на ПЭ скомпенсированы, и наблюдается образование осадка (рис. 9б).

В водно–этанольной смеси константа диссоциации комплекса снижается из-за усиления электростатических взаимодействий при уменьшении полярности среды. Вследствие этого, образование компактной структуры комплекса ХТ–ПМА, сопровождающееся увеличением анизотропии, происходит при более низких концентрациях ХТ (рис. 9а).

#### МЕТОД РАЗРЕШЕННО-ВРЕМЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ АНИЗОТРОПИИ (РВФА)

Весьма ценную информацию о структуре белков и белок-содержащих комплексов дает применение метода РВФА. Теория и техника эксперимента в этой области получили значительное развитие в последние годы. Метод РВФА исключительно ценен при изучении структурной организации надмолекулярных ансамблей, поскольку он, позволяя следить за вращательной динамикой как всего комплекса, так и отдельных его фрагментов, дает детальное представление о пространственной организации и динамике комплекса.

В РВФА эксперименте определяется величина флуоресцентной анизотропии как функция времени:

$$r(t) = (I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)) / (I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)), \quad (6)$$

где  $I_{\parallel}(t)$  и  $I_{\perp}(t)$  – наблюдаемые параллельная и перпендикулярная компоненты флуоресценции относительно направления поляризации возбуждающего луча.

Анизотропия сферических молекул, вращение которых симметрично (изотропно), затухает согласно моноэкспоненциальному закону. В общем случае «затухание» анизотропии описывается мультиэкспоненциальной зависимостью:

$$r(t) = \sum \beta_j \cdot \exp(-t/\phi_j), \quad (7)$$

где  $\phi_j$  – индивидуальные корреляционные времена вращения, отражающие скорость вращательного движения флуорофора, а  $\beta_j$  – вклады соответствующих компонентов в затухание анизотропии.

Анизотропия рассчитывается, исходя из измерения разности интенсивностей двух компонент излучаемой флуоресценции.

Надежные значения анизотропии  $r(t)$  могут быть получены для тех интервалов времени, при которых наблюдается интенсивная флуоресценция. По этой причине в качестве метки обычно выбирают флуорофоры со временем затухания, сравнимым с предполагаемым корреляционным временем вращения. Если флуоресцентное время жизни

$\tau$  много меньше  $\phi$ , то интенсивность флуоресценции затухает раньше, чем произойдет заметная потеря анизотропии.

В белках существует несколько причин потери анизотропии (или деполяризации): быстрое движение флуоресцентной метки относительно места ее прикрепления, более медленное внутреннее движение сегментов белка, медленное вращение всей молекулы белка, очень медленное вращение белковых агрегатов (рис. 10), а также перенос энергии между хромофорами [37]. Для многих белков преобладает один вид деполяризации, связанный с вращением всей молекулы белка [54, 82, 98, 132]. В этом случае потеря анизотропии описывается как моноэкспоненциальная зависимость:

$$r(t) = \beta \cdot \exp(-t/\phi). \quad (8)$$

При этом для глобулярных белков корреляционное время вращения ( $\phi_{\text{белка}}$ ) связано с общим объемом белковой молекулы ( $V$ ) (или с молекулярной массой белка  $M$ ) соотношением Стокса-Энштейна:

$$f_{\text{белка}} = hV/RT = hM(v + h)/RT, \quad (9)$$

где  $v$  — удельный объем белка;  $\eta$  — вязкость растворителя;  $h$  — величина гидратации,  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $T$  — абсолютная температура. Например, сывороточный альбумин человека ( $M$  69 кДа), содержащий один триптофановый остаток, характеризуется одним корреляционным временем вращения  $\phi_1$  (26,0 нс). Теоретически рассчитанная величина из уравнения Стокса-Энштейна для белка с такой молекулярной массой составляет 26,5 нс и хорошо согласуется с экспериментально наблюдаемым временем. Это указывает на то, что триптофановый остаток альбумина вращается вместе с белком и не имеет внутренней подвижности [98, 132]. Экспериментально определенные величины корреляционного времени вращения могут нем-

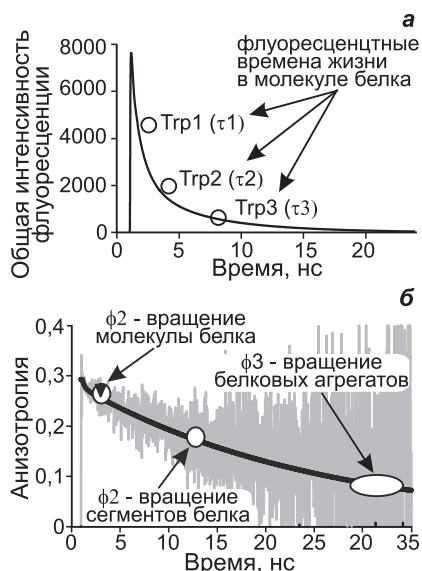


Рис. 10. Схематическое расположение флуоресцентных времен жизни остатков триптофанов в белке (а) и корреляционных времен вращения, соответствующих движению независимо вращающихся фрагментов белковой молекулы (б), на кривых общей интенсивности флуоресценции (а) и флуоресцентной анизотропии (б), разрешенных в наносекундной шкале.

ного превышать теоретически рассчитанные значения за счет гидратации белка. Обычно гидратный слой составляет 0,2 г воды на 1 г белка [132]. Например, ХТ, меченный по активному центру антранильной группой, характеризуется одним корреляционным временем вращения (12 нс), что соответствует вращению гидратированной белковой молекулы с массой 25 кДа [54, 82]. Отсутствие более коротких корреляционных времен вращения, отражающих сегментарную подвижность белка, связано с тем, что антранильная метка не имеет вращательной подвижности, независимой от движения всей молекулы белка [66].

В ряде случаев наблюдаемые значения  $\phi$  в 1,3–2 раза превышают теоретически рассчитанные [101]. Данный факт чаще всего обусловлен тем, что многие белки имеют несферическую (эллипсоидную) форму и вращение относительно более длинной оси определяет общую скорость вращения молекулы белка. Например, овальбумин куриного яйца имеет эллипсоидную форму и характеризуется одним корреляционным временем вращения – 24 нс. Теоретически рассчитанное значение  $\phi$  для белка с ММ 45 кДа составляет 20 нс. Для белков несферической формы наблюдаются различия в корреляционных временах вращения белка, полученных при разных длинах волн возбуждения. Это свойство используют для выявления причин отклонения значения  $f$  от теоретического. Например, АДГ из печени лошади – димер, состоящий из двух идентичных субъединиц (ММ 40 кДа каждая) и характеризующийся эллипсоидной формой с длинами полуосей 6 и 11 нм, имеет корреляционные времена вращения при длинах волн возбуждения 300 и 295 нм, соответственно, 36 и 33 нс [132].

Многие белки проявляют два типа реориентации флуорофоров: быстрое вращение сегмента белка, содержащего флуорофор, и более медленное вращение всей молекулы белка. В этом случае потеря анизотропии описывается следующим образом:

$$r(t) = (\beta_1 \exp(-t/\phi_{\text{внутр}}) + \beta_2 \cdot \exp(-t/\phi_{\text{белка}})) \quad (10)$$

и характеризуется двумя корреляционными временами вращения:  $\phi_{\text{внутр}}$  и  $\phi_{\text{белка}}$ .

Например, глутатионредуктаза из эритроцитов крови – флавопротеин с молекулярной массой 100 кДа – характеризуется двумя корреляционными временами вращения: 3,6 нс и 38 нс. Долгое корреляционное время соответствует вращению флуорофора (ФАДа) вместе со всей гидратированной молекулой белка. Это согласуется с теоретически рассчитанным значением для белка с такой молекулярной массой. Короткое время вращения отражает подвижность сегмента белка, связанного с ФАД [84].

При включении в комплекс или агрегации белка, затухание анизотропии приобретает более сложный характер: появляются дополнительные источники деполяризации, связанные с вращением всего комплекса и/или его отдельных сегментов, что отражается в появлении соответствующих корреляционных времен вращающегося. При этом, как правило, изменяется динамика самого белка: подвижность его сегментов и/или всей молекулы.

Рассмотрим несколько примеров исследования белок-содержащих надмолекулярных структур методом РВФА, иллюстрирующих исключительно широкие возможности метода, а также многообразие информации, которую он позволяет получать.

*Взаимодействие мембранных белков с мицеллами и липидными бислоями*

Преимущества метода РВФА при изучении таких систем заключается в том, что он позволяет осуществлять прямые измерения динамики вращательной реориентации белков при их взаимодействии с мембранами в реальном времени. Методом РВФА было исследовано взаимодействие поверхностного белка из бактериофага М13 с мицеллами SDS и малыми моноламеллярными везикулами димиристоилфосфатидилхолин/димиристоилфосфатидовая кислота (80/20 по массе). За флуоресценцией следили по триптофановому остатку белка.

В случае взаимодействия белка с мицеллами спад анизотропии характеризуется двумя корреляционными временами вращения. Короткое корреляционное время  $\phi_1$  (0,5 нс) отражает быстрый деполяризационный процесс внутри белка, долгое —  $\phi_2$  (9,8 нс) — соответствует вращению всей мицеллы, содержащей белок ( $\phi_{\text{белок+мицелла}}$ ). Это корреляционное время связано с динамическим объемом белок-содержащей мицеллы уравнением Стокса-Энштейна:

$$V_{\text{общий}} = RT\phi_{\text{белок+мицелла}}/\eta, \quad (11)$$

где  $V$  — динамический объем вращающейся частицы,  $\eta$  — вязкость растворителя.

Исходя из величины динамического объема ( $V$ ), можно оценить число молекул ПАВ ( $n$ ) в каждой белок-содержащей мицелле в соответствии с уравнением:

$$V_{\text{общий}} = 2M_{\text{прот}}(v_{\text{прот}} + h) + nM_{\text{SDS}}(v_{\text{SDS}} + h), \quad (12)$$

где  $v$  — парциальные сферические объемы ( $v_{\text{прот}} = 0,74 \text{ см}^3/\text{г}$ ,  $v_{\text{SDS}} = 0,87 \text{ см}^3/\text{г}$ ),  $h$  — величина гидратации.

Было установлено, что мицеллу, содержащую две молекулы белка, образуют 57 молекул SDS.

Для получения информации о форме вращающейся частицы изучают зависимость общего корреляционного времени вращения от температуры. Например, для данной системы было найдено, что  $\phi_{\text{белок+мицелла}}$  зависит от температуры, причем таким образом, что динамический объем комплекса ( $V_{\text{общий}} = RT \phi_{\text{белок+мицелла}}/h$ ) остается постоянным. Это указывает на то, что белок-содержащие мицеллы вращаются в виде компактных сферических частиц [46].

В случае комплекса белка М13 с везикулами динамический объем всего белок-содержащего комплекса определить не удастся, так как движение всего комплекса не вносит существенного вклада в снижение анизотропии в исследуемой временной шкале и проявляется только в том, что анизотропия не падает до нуля. Из-за слишком медленного движения комплекса его корреляционное время вращения намного больше флуоресцентного времени жизни триптофана [46].

#### *Белки, включенные в систему обращенных мицелл ПАВ*

Метод РВФА исключительно эффективен при изучении структуры белков, включенных в систему обращенных мицелл ПАВ [54, 130, 133, 134]. Благодаря высокой чувствительности РВФА позволяет определять динамические параметры даже при крайне низкой степени заполнения мицелл белком (значительно меньше 1%). Это позволяет изучать структуру частиц в условиях определения каталитической активности ферментов в таких системах. Например, методом РВФА было изучено влияние включения в систему обращенных мицелл ПАВ на структуру активного центра и конформационную подвижность ХТ [54].

В качестве флуоресцентной метки использовали антранильную группу, которая была введена в активный центр фермента в результате реакции ацилирования ХТ антранил-*para*-нитроанилидом. Антранильная группа характеризуется достаточно долгим флуоресцентным временем жизни, что позволяет определить вращательную подвижность как свободного белка, так и белок-содержащих обращенных мицелл ПАВ. Было найдено, что свободный химотрипсин характеризуется единственным корреляционным временем вращения (12 нс), которое соответствует вращению всей молекулы белка. Включение фермента в систему обращенных мицелл ПАВ приводит к появлению короткого корреляционного времени вращения, которое соответствует движению метки в активном центре. Это предполагает, что активный центр ХТ, включенного в систему обращенных мицелл, характеризуется существенно меньшей жесткостью по сравнению со свободным белком. Долгое время вращения ( $\phi_2$ ) соответствует вращению белок-содержащей мицеллы.

При варьировании степени гидратации мицелл,  $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]$  в диапазоне от 10 до 25 долгое корреляционное время вращения не изменялось и было равно 45 нс. Данное значение соответствует динамическому объему белок-содержащей мицеллы, равному  $3,6 \cdot 10^2 \text{ нм}^3$  (в соответствии с уравнением  $V_{\text{общ}} = V_{\text{белка}} + V_{\text{оболочки}} = \phi_{\text{долгое}} RT/\eta$ ). Это означает, что в таких мицеллах молекула белка окружена 350 молекулами ПАВ. Размер белок-содержащих мицелл остается постоянным при увеличении степени гидратации в отличие от «пустых» мицелл, для которых наблюдается монотонное возрастание размера при увеличении степени гидратации [132]. Учитывая, что в данной системе ХТ имеет оптимум каталитической активности при степени гидратации 10, был сделан вывод, что фермент создает «свою мицеллу», которая наибольшим образом соответствует его размеру [54].

#### *Ферменты в средах, содержащих органические растворители*

Использование метода РВФА позволило изучить взаимосвязь каталитической активности и структуры ферментов в системах, содержащих органические растворители, двух типов (гетерогенных и гомогенных): ферменты, суспензированные в неполярных органических растворителях и растворенные в водно-органических смесях. На примере ХТ и субтилизина было показано, что в случае суспензий ферментов происходит образование агрегатов, в которых отсутствует подвижность отдельных молекул белка, но сохраняется подвижность белковых сегментов. Причем было обнаружено, что именно подвижность сегментов белка определяет уровень каталитической активности и энантиоселективности ферментов в суспензиях [41]. В случае ферментов, растворенных в водно-органических смесях, отмечено существование мономеров, а также растворимых белковых ассоциатов — тримеров и тетрамеров [82].

#### *Белок-содержащие капли бездетергентных микроэмульсий*

Метод РВФА был применен для изучения структуры белок-содержащих капель бездетергентных микроэмульсий, существующих в тройной системе гексан—изопропанол—вода. Такие микрогетерогенные системы используются для проведения практически важных биокаталитических реакций [9]. Преимущество данных систем состоит в легкости выделения продукта реакции и возможности регенерации фермента. Методом РВФА удалось определить размер трипсин-содержащих капель бездетергентных микроэмульсий, который составляет  $27\text{--}37 \text{ \AA}$  в зависимости от состава системы. Было показано, что молекула фермента окружена в микроэмульсиях водным слоем толщиной  $7\text{--}10 \text{ \AA}$ , который экранирует фермент от контакта с органическим



растворителем, что, очевидно, способствует сохранению каталитически активной конформации белка в системах с низким содержанием воды [79].

#### *Ферменты в комплексе с субстратами и эффекторами*

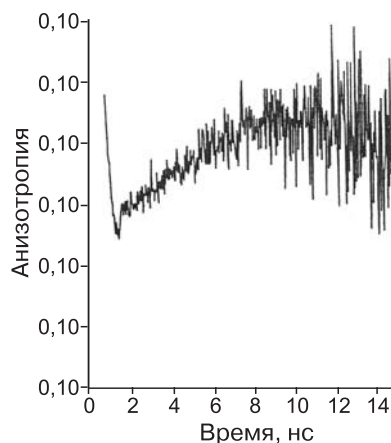
АДГ из печени лошади – НАД-зависимый фермент, состоящий из двух идентичных субъединиц (с общей молекулярной массой 80 кДА). АДГ характеризуется одним корреляционным временем вращения (36,2 нс), отражающим вращение всей молекулы белка. При образовании тройного комплекса, белок–НАДН–субстратоподобный ингибитор (изобутирамид), были обнаружены существенные изменения во вращательной динамике белка. Появляется короткое время вращения  $\tau_1$  (2,6 нс), соответствующее движению сегментов белка, а время вращения всего тройного комплекса  $\tau_2$  составляет 33 нс, т.е. уменьшается на 10% по сравнению со свободным ферментом. Эти данные указывают на то, что при комплексообразовании АДГ происходит «сжатие» белка. Полученные данные позволили выявить структурные различия между свободным ферментом и ферментом в процессе его каталитического действия [112].

#### *Диссоциация флавиновых кофакторов*

Вращение собственных флуорофоров белка, а также искусственно введенных меток характеризуется субнаносекундным корреляционным временем вращения (0,1–1 нс), что обычно отражает быстрое вращение небольшого сегмента белка, несущего метку, или вращение флуорофора вокруг места прикрепления. Отметим, что короткое корреляционное время вращения (50–100 пс) может отражать также движение диссоциированных флуоресцентных молекул, например ФАД и ФМН. Методом РВФА можно следить за диссоциацией этих молекул. Примером может служить исследование влияния концентрационной зависимости желтого флуоресцентного белка (YFP), содержащего ФМН, на его вращательную динамику. При высоких концентрациях YFP мажорным компонентом анизотропийного ответа является долгое корреляционное время вращения  $\tau_{\text{общее}}$  (14,8 нс), соответствующее вращению комплекса YFP-ФМН. Минорный компонент (0,15 нс) соответствует вращению свободного ФМН ( $\tau_{\text{ФМН}}$ ). При снижении концентрации белка в растворе наблюдается заметная диссоциация ФМН и вклад быстрого корреляционного времени ( $\tau_{\text{ФМН}}$ ) в анизотропию существенно увеличивается [84].

Интересные результаты получены при исследовании методом РВФА динамики ФАД-содержащего белка Туг-159 мутанта НАДН пероксидазы. При повышении температуры с 293 до 313 К анизотро-

Рис. 11. Разрешенная во времени флуоресцентная анизотропия ФАД-содержащего Tug-159A мутанта НАДН-пероксидазы, регистрируемая на длине волны 567 нм. Быстрый спад анизотропии соответствует быстрой деполяризации диссоциированных молекул ФАД. Рост анизотропии соответствует вращательному движению молекулы белка, содержащей ФАД. Условия эксперимента: T 313K [131].



пийный ответ этого фермента (регистрируемый на длине волны 576 нм) имеет необычный характер: резкий спад во временном интервале до 1 нс, за которым следует увеличение анизотропии. Такой вид анизотропии обусловлен диссоциацией ФАД при повышенной температуре. Резкий спад анизотропии соответствует деполяризации свободного ФАД, интенсивность флуоресценции которого намного выше по сравнению с ФАД, связанного с белком. При более долгих временах наблюдается возрастание вклада связанного с белком ФАД и, как следствие, рост анизотропии (рис. 11) [53, 131].

#### *Исследование доменов в молекуле иммуноглобулина E (IgE)*

Методом РВФА было исследовано взаимодействие IgE с мембранным рецептором [70]. Как известно, IgE имеют Y-образную структуру. Две верхних ветви представляют собой антиген-связывающий фрагмент ( $F_{ab}$ ). В основании вилки расположен  $F_c$  фрагмент, который связывается с плазматической мембраной. Флуоресцентную метку вводили путем связывания дансил-лизина с антиген-связывающим фрагментом иммуноглобулина,  $F_{ab}$ . Было найдено, что не связанный с мембраной дансил-лизин-IgE характеризуется двумя корреляционными временами вращения: 48 и 125 нс. Долгое время вращения соответствует вращению комплекса дансил-лизин-IgE; короткое время вращения характеризует независимое вращение  $F_{ab}$  фрагмента. При связывании с мембранным рецептором анизотропийный ответ меняется существенным образом. Долгое корреляционное время вращения увеличивается до 438 нс и отражает движение связанного с мембраной дансил-лизин-IgE. Короткое время вращения, соответствующее движению  $F_{ab}$  фрагмента белка, практически не изменяется при связывании с мембранным рецептором. Таким образом было показано, что

IgE взаимодействует с рецептором через  $F_c$  фрагмент и это взаимодействие не влияет на независимое вращение  $F_{ab}$  фрагмента белка.

*Исследование структуры комплексов ферментов с  
полиэлектролитами*

При образовании белок–ПЭ комплексов (например, с синтетическими полиэлектролитами, заряженными полисахаридами, нуклеиновыми кислотами и др.) пространственная структура полиэлектролита обычно существенным образом изменяется, причем конформация белка также может измениться. Метод РВФА позволяет следить за вращательной динамикой каждого из компонентов комплекса и за общей структурой всего комплекса.

Данный метод был применен для изучения пространственной структуры фермент–ПЭ комплекса ХТ (ММ 25 кДа) и ПМА (ММ 300 кДа) в водном растворе и в системе вода–этанол [82]. В качестве метки для ПМА использовали пирен.

Для свободной ПМА было обнаружено два типа вращательного движения: быстрое вращение метки относительно места прикрепления ( $\varphi_1 = 0,5$  нс) и более медленное движение гидрофобных узлов в ПМА ( $\varphi_2 = 5$  нс) (рис. 12, а, б). Вращательное движение всей молекулы ПМА не оказывает влияние на затухание анизотропии, так как ПМА не образует компактной структуры при нейтральных значениях рН.

Комплексообразование с белком существенно изменяет вращательную динамику ПМА. При низких соотношениях ХТ/ПМА взаимодействие с ферментом приводит к образованию квази-регулярной структуры комплекса, которая представляет собой несколько идентичных сегментов ( $\varphi_{\text{сегм}} = 60$  нс, что соответствует молекулярной массе 100 кДа), в каждом из которых белок окружен участком ПЭ (рис. 13, а, б). При увеличении соотношения ХТ/ПМА происходит увеличение числа белок-содержащих сегментов, и, одновременно, уменьшение участка ПМА взаимодействующего с каждой молекулой белка в таком сегменте ( $\varphi_{\text{сегм}}$  уменьшается до 29 нс, что соответствует ММ 50 кДа). «Насыщение» ПМА белком приводит к образованию компактной структуры комплекса, что проявляется в появлении вращательного движения комплекса как целой частицы ( $\varphi_{\text{комплекс}} = 278$  нс, соответствует ММ 550–600 кДа). Вращательная динамика самого белка практически не изменяется при образовании комплекса. Таким образом было показано, что ХТ, белок с ММ 25 кДа (менее 10% по сравнению с молекулярной массой ПЭ) способен индуцировать образование квази-регулярной компактной структуры ПМА [82].

Известно, что образование компактных структур при неспецифическом связывании с белками лежит в основе механизма структурирования и упаковки нуклеиновых кислот. Примерами являются

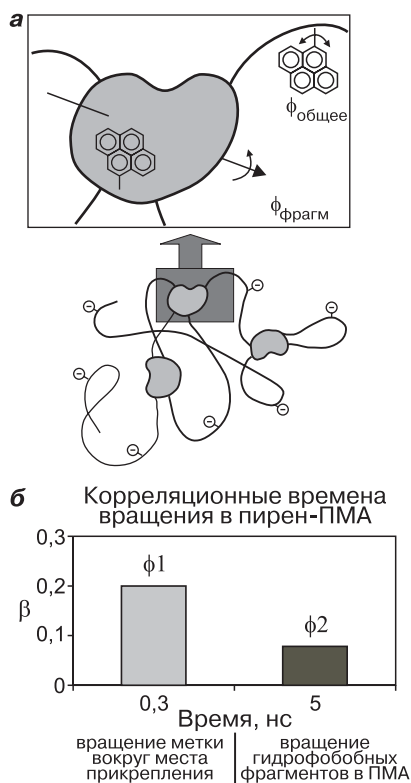


Рис. 12. Предполагаемая структура пирен-ПМА (а), предложенная на основе анализа распределения корреляционных времен вращения в пирен-ПМА, полученных методом РВФА (б).

● – гидрофобный фрагмент в ПМА.  
 б – Условия эксперимента: 5 мМ Mops, рН 7,5; t = 20 °С; [пирен-ПМА] = 0,04 мкМ. Длины волн возбуждения и испускания, соответственно, 343 и 393 нм [82].

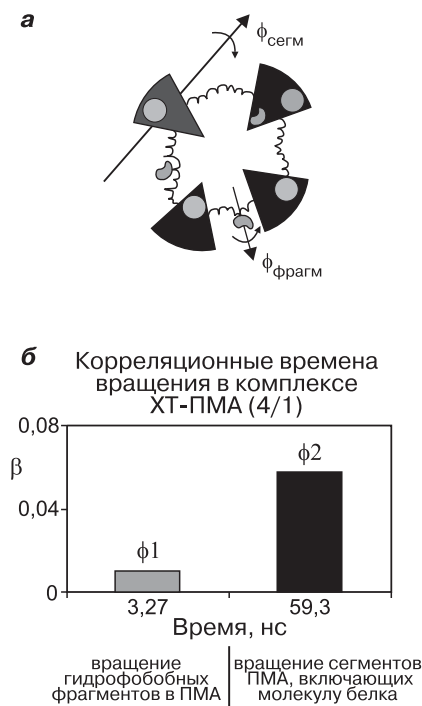


Рис. 13. Предполагаемая структура ХТ-ПМА (а) при ХТ/ПМА соотношении 4/1 по массе, предложенная на основе анализа распределения корреляционных времен вращения в ХТ-пирен-ПМА, полученных методом РВФА [82].

а. ● – ХТ; ● – гидрофобный фрагмент ПМА.

б. Условия эксперимента аналогичные рис. 12 б.

образование комплекса ДНК с гистонами или комплексов мРНК с рибосомными белками. Ключевая роль белков при образовании нуклеопротеидных комплексов состоит в наведении структуры нуклеиновых кислот и перевода их в более компактную форму [24]. Считается, что такие комплексы являются универсальной формой существования нуклеиновых кислот, пригодной для внутриклеточного транспорта,

трансляции, маскирования, деградаци. Удивительным является тот факт, что взаимодействие такого не склонного к образованию каких-либо упорядоченных структур – атактического ПЭ (ПМА) и белка (ХТ), функции которого в природе никоим образом не связаны с регулированием структуры нуклеиновых кислот или других ПЭ, приводит к образованию комплекса, характеризующегося квази-регулярной компактной структурой. По-видимому, способность проявлять свойства неспецифической матрицы при образовании надмолекулярных структур является одним из фундаментальных свойств белков.

#### IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, флуоресцентные методы анализа обеспечивают широкие возможности при исследовании конформационных переходов в белках. При изучении белок-содержащих надмолекулярных ансамблей исключительно информативен метод РВФА, который позволяет получать детальную информацию о пространственной структуре как всего комплекса, так и его отдельных компонентов. Можно ожидать, что в ближайшем будущем область применения РВФА для изучения биологических объектов будет расширяться, поскольку с усовершенствованием технического оснащения станут доступны принципиально новые приложения метода, например, возможность слежения за динамикой отдельных частиц в растворе.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов NWO № 047-007-005, NATO № LST.CLG. 974984.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов А.А., Лебедева Р.К. Нуклеиново-белковое узнавание. Итоги науки и техники, сер. Мол. биология. Т. 5. М. 1975.
2. Богданов А.А., Лебедева Р.К. Нуклеиново-белковое узнавание. Итоги науки и техники, сер. Мол. биология. Т. 17. М. 1982.
3. Богданов А.А. Химическая энциклопедия. 1992. Т. 3. С. 599–600.
4. Вакуров А.В. Нековалентные фермент–полиэлектrolитные комплексы в водно-органических смесях. Дисс. канд. хим. наук. М.: МГУ им.М.В. Ломоносова. 1998. С. 84.
5. Векшин Н.Л. Фотоника биологических структур. Наука. Пушино. 1988.
6. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М. Высш. Шк. 1989.
7. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М. Наука. 1980.
8. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М. Мир. 1994.
9. Гладилин А.К., Левашов А.В. // Успехи Биол. Хим., 1996. Т. 36. С. 141–161.
10. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М. Высш. Шк. 1991.

11. Изумрудов В.А., Зезин А.В., Кабанов В.А. // ДАН СССР. 1984. Т. 275. С. 1120–1123.
12. Иванов А.С., Скворцов В.С., Арчаков А.И. // Вопр. Мед. Хим. 2000. Т. 46. С. 615–625.
13. Кабанов В.А., Мустафаев В.И. // ВМС А. 1981. Т. 23. С. 255–260.
14. Климов А.Н. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: 1981. С. 45–75.
15. Клячко Н.Л., Вакула С.В., Гладышев В.Н., Тишков В.И., Левашов А.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1683–1687.
16. Кост О.А., Орт Т.А., Никольская И.И., Наметкин С.Н., Левашов А.В. // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 1301–1306.
17. Курганов Б.И., Федуркина Н.В., Мицкевич Л.Г., Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Поглазов Б.Ф. // ДАН. 1999. Т. 367. С. 122–125.
18. Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов. Баховские чтения. XLVI. М. Наука. 1992.
19. Лихтенштейн Г. И., Белоногова О.В., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Хмельницкий Ю.Л., Клячко Н.Л., Мартинек К. // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 379–386.
20. Поглазов Б.Ф. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1941–1947.
21. Ройт А. Основы иммунологии. М. Мир. 1991.
22. Розанов В.А., Фан Бан Ти, Герасимьяк Г.Р., Любарев АЕ, Курганов Б.И., Розанов АИ. // Укр. Биохим. Журнал. 1991. Т. 63. С. 66–71.
23. Сим. Э. Биохимия мембран. М. Мир. 1985.
24. Спирин А.С. // Успехи биол. химии. 1996. Т. 36. С. 3–48.
25. Финеан Д. Колмен Р., Мичелл Р. Мембраны и их функции в клетке. М. Мир. 1977.
26. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М. Мир. 1986.
27. Чудинова Е.А., Деменьтьева Е.И., Бровко Л.Ю., Савицкий А.П., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 1301–1308.
28. Alder A.J., Greenfield N.J., Fasman G.D. // Meth. Enzym. 1973. C27. P. 675–735.
29. Allen H.J., Cywinski M., Palmberg R., DiCioccio R. // Arch. Biochem. Biophys. 1987. Vol. 256. P. 523–533.
30. Almers W., Stirling C. // J. Membr. Biol. 1984. Vol. 77. P. 169–186.
31. Alvarez J., Haris P.I., Lee D.C., Chapman D. // Biochem. Biophys. Acta. 1987. Vol. 916. P. 5–12.
32. Arata Y., Hirabayashi J., Kasai K. // J. Biochem. (Tokyo). 1997. Vol. 121. P. 1002–1009.
33. Arkchipova G., Bayder L., Burlarova E. Krivandin A., Pogoretskaya I. // Magnetic resonance in Chemistry and Biolog. Suzdal. P. 96
34. Arrondo J.L., Young N.M., Mantsch H.H. // Biochem. Biophys. Acta. 1988. Vol. 952. P. 261–268.
35. Baenziger J.V., Fiete D. // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254. P. 9795–9799.
36. Barre A., Bourne Y., Van Damme E.J., Peumans W.J., Rouge P. // Biochimie. 2001. Vol. 83. P. 645–651.
37. Bastiaence P.I.H., van Hoek A., Wolkers W.F., Brochon J.C., Visser A.J.W.G. // Biochemistry. 1992. Vol. 31. P. 7050–7060.
38. Bhatsacharyya L., Khan M.I., Brewer F. // Biochemistry. 1988. Vol. 22. P. 8762–8767.
39. Blackwell H.E., Sadowsky J.D., Howard R.J., Sampson J.N., Chao J.A., Steinmetz W.E., O'Leary D.J., Grubbs R.H. // J. Org. Chem. 2001. Vol. 66. P. 5291–5302.
40. Bross J., Visser A.J., Engberesen J., Verboom W., Van Hoek A., Reinhoudt D. // J. Amer. Chem. Soc. 1995. Vol. 117. P. 12657–12663.
41. Carver J.P., Michnick S.W., Imberty A., Cumming D.A. // Carbohydrate recognition in cellular function. Wiley. Chichester (Ciba Foundation Symposium 145). 1989. P. 6–26.



42. Chebotareva N.A., Klinov S.V., Kurganov B.I. // *Biotech. and Gen. Eng. Rev.* 2001. Vol. 18. P. 265–297.
43. Corell G.D., Cheser R.N., Nome F., Fendler J.H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1978. Vol. 100. P. 1254–1262.
44. Dale R.E. // *Membrane structure and dynamics by fluorescence probe depolarization kinetics in Time-resolved fluorescence spectroscopy in Biochemistry and Biology.* / Eds. R.B.Cundall and R.E.Dale. NATO ASI Series. N.Y. Plenum. 1983. Vol. 69. P. 555–605.
45. Dainiak M.B., Izumrudov V.A., Muro-netz V.I., Galaev I.Y., Mattiasson B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1381. P. 279–285.
46. Datema K.P., Visser A.J., van Hoek A., Wolfs C.J., Spruijt R.B., Hemminga M.A. // *Biochemistry.* 1987. Vol. 26. P. 6145–6152.
47. Datta P.K., Basu P.S., Datta T.K. // *Biochem. J.* 1988. Vol. 251. P. 195–199.
48. De Jongh H.H.J., Goormaghtigh E., Ruysschaert J.M. // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34. P. 172–179.
49. De Jongh H.H.J., Goormaghtigh E., Ruysschaert J.M. // *Analytical Biochemistry.* 1996. Vol. 242. P. 95–103.
50. De Jongh H.H.J., Goormaghtigh E., Ruysschaert J.M. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 13593–13601.
51. De Marco A., Zetta L., Menegatti E., Guarneri M. // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 178. P. 39–43.
52. Desie G., Boens N., De Schryver F.C. // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 8301–8308.
53. Digris A.V., Skakoun V.V., Novikov E.G., Van Hoek A., Claiborne A., Visser A.J.W.G. // *Eur. Biophys. J.* 1999. Vol. 28. P. 526–531.
54. Dorovska-Taran V.N., Veeger C., Visser A.J.W.G. // *Eur. J. Biochemistry.* 1993. Vol. 211. P. 47–55.
55. Eissenberg J.C. // *Gene.* 2001. Vol. 275. P. 19–29.
56. Gida Y., Sutoh K., Ikai A. // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 4461–4467.
57. Gida Y., Ikai A., Takahashi K. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 6197–6203.
58. Gladilin A.K., Kudryashova E.V., Vakurov A.V., Izumrudov V.A., Mozhaev V.V., Levashov A.V. // *Biootechnol. Lett.* 1995. Vol. 17. P. 1329–1333.
59. Gladilin A.K., Kiselev M.V., Ageeva E.V., Melik-Nubarov N.S., Lisitsky E. A., Sveshnikov P.G., Korpela T., Levashov A.V. // *International conference Biocatalysis, Moscow.* 2000. P. 26.
60. Goldstein I.J., Reichert C.M., Misaki A., Gorin P. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1973. Vol. 317. P. 500–504.
61. Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruys-schaert J.M. // *Subcell. Biochem.* 1994. Vol. 23. P. 329–450.
62. Goormaghtigh E., Raussens V., Ruys-schaert J.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1422. P. 105–185.
63. Greenfield N., Fasman G.D. // *Biochemistry.* 1969. Vol. 8. P. 4108–4116.
64. Hara T., Endo H. // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21. P. 2632–2637.
65. Haris P.I., Lee D.C., Chapman D. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1986. Vol. 874. P. 255–265.
66. Haugland R.P. and Stryer L. // *Conformation of Biopolymers.* / Ed. G.N.Ramachandran. N.Y. Acad. Press. 1967. P. 321.
67. Heinemann U., Illing G., Oschkinat H. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. Vol. 12. P. 348–354.
68. Hirabayashi J., Satoh M., Kasai K. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 15485–15490.
69. Hoekstra D., Duzgunes N. // *Subcellular Biochemistry* / Eds. J.H.Harris, A.H.Etamadi. N.Y. Plenum Press. 1989. Vol. 14. P. 229–278.
70. Holowka D., Wensel T., Baird B. // *Biochemistry.* 1990. Vol. 29. P. 4607–4612.
71. Isenberg I. // *Ann. Rev. Biochem.* 1979. Vol. 4. P. 159–191.
72. Jackson M., Mantch H.H. // *Cr. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995. Vol. 30. P. 95–120.
73. Jones S. Thornton J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 13–20.



74. Kabakov V.E., Klyachko N.L., Martinek K., Levashov A.V. // FEBS Lett. 1992. Vol. 311. P. 209–212.
75. Kabanov A.V., Klyachko N.L., Nametkin S.N., Merker S.N., Zaroza A.V., Bulnik V.I., Ivanov M.V., Levashov A.V. // Prot. Eng. 1991. Vol. 4. P. 1009–1017.
76. Kahn M.I., Sastry M.V.K., Surolia A. // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 3013–3019.
77. Katragadda M., Alderfer J.L., Yeagle P.L. // Biophys. J. 2001. Vol. 81. P. 1029–1036.
78. Khmel'nitsky Yu.L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K. // Enz. Microb. Technol. 1988. Vol. 10. P. 710–723.
79. Khmel'nitsky Yu.L., Van Hoek A., Veeger C., Visser A.J.W.G. // J. Phys. Chem. 1989. Vol. 93. P. 872–878.
80. Kudryachova E.V., Gladilin A.K., Vakurov A.V., Mozhaev V.V., Levashov A.V. // Biotech. Bioeng. 1997. Vol. 55. P. 267–277.
81. Kudryachova E.V., Artemova T.A., Gladilin A.K., Mozhaev V.V., Levashov A.V. // Lipids and surfactants dispersed systems. M.1999. P. 47–48.
82. Kudryachova E.V., Gladilin A.K., van Hoek A., Visser A.J.W.G., Levashov A.V. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1550. P. 129–143.
83. Kurganov B.I. // J. Teor. Biol. 1986. Vol. 119. P. 445–455.
84. Lakowicz J.R. // Principles of Fluorescence Spectroscopy (2-nd Ed.). N.Y. Plenum Press 1999.
85. Leninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. // Principles of biochemistry (2-nd Ed.). N.Y. Worth Publishers. 1993.
86. Levashov A.V., Khmel'nitsky Yu.L., Klyachko N.L., Martinek K. // Surfactants in solution / Eds. K.L.Mittal, B.Lindman. N.Y. Plenum Press. 1984. Vol. 2. P. 1069–1091.
87. Levashov A.V., Ugolnikova A.V., Ivanov M.V., Klyachko N.L. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. Vol. 42. P. 527–534.
88. Levitsky V.Yu., Lozano P., Gladilin A.K., Ibbora J.L. // Stability and stabilization of biocatalists/ Eds. A.Bal-  
lesteros, F.J.Plou, J.L.Ibbora. 1998. P. 417–422.
89. Luisi P.L., Magid L. // CRC Critical Rev. Biochem. 1986. Vol. 20. P. 409–474.
90. Luisi P.L., Giomini M., Pileni M.P., Robinson B.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. Vol. 947. P. 209–246.
91. Lyubarev A.E., Kurganov B.I. // Organization of Biochemical Systems: Structural and regulatory aspects. / Eds. B.I.Kurganov and A.E.Lyubarev. 1996. N.Y. Nova Science. Inc. P. 2–60.
92. Makarov A.A., Protasevich I.I., Bazhulina N.P., Episova N.G. // FEBS Lett. 1995. Vol. 357. P. 58–61.
93. Makharadze G.I., Privalov P.L. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 213. P. 375–384.
94. Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Khmel'nitsky Yu.L., Berezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1986. Vol. 155. P. 453–468.
95. Martinek K., Klyachko N.L., Kabanov A.V., Khmel'nitsky Yu.L., Levashov A.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. Vol. 981. P. 161–172.
96. Mondal N., Parvin J.D. // Nature. 2001. Vol. 413. P. 435–438.
97. Morozova L., Desmet J., Joniau M. // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 218. P. 303–309.
98. Munro I., Pecht I., Stryer L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76. P. 56–60.
99. Naito N.R., Hui H.L., Noble R.W., Hoffman B.M. // Biochemistry. 2001. Vol. 20. P. 2060–2065.
100. Nametkin S.N., Kabanov A.V., Levashov A.V. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1993. Vol. 29. P. 103–111.
101. Nyguerabide J., Epstein H., Stryer L. // J. Mol. Biol. 1970. Vol. 51. P. 573–578.
102. Oakley A.J., Ketterman A., Wilce M.C. // Croat. Med. J. 2001. Vol. 42. P. 375–378.
103. Ogden S.K., Lee K.C., Wernke-Dollries K., Stratton S.A., Aronow B., Barton M.C. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 42057–42062.

104. *Pap E.H.W., Hanicak A., van Hoek A., Wirtz K.W.A., Visser A.J.W.G.* // *Biochemistry*. 1995. P. 9118–9125.
105. *Popov V.O., Lamsin V.S.* // *Biochem. J.* 1994. Vol. 301. P. 1–13.
106. *Privalov P.L., Potekhin S.A.* // *Meth. Enzym.* 1986. Vol. 131 L. P. 4–51.
107. *Pshezhetsky A.V., Levashov A.V., Wiederschain G.Ya.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. Vol. 1122. P. 154–160.
108. *Purcell J.M., Susi H.* // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1984. Vol. 9. P. 193–199.
109. *Rawitch A.B., Weber G.* // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 10. P. 680–685.
110. *Rose K.M., Bell L.E., Siefken D.A., Jacob S.T.* // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 7468–7477.
111. *Salelmuiddin M., Husain Q.* // *Enz. Micr. Technol.* 1991. Vol. 13. P. 290–295.
112. *Schauerte J.A., Schlyer B.D., Steel D.G., Gafni A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995. Vol. 92. P. 569–573.
113. *Shapiro Y.E., Pykhteeva E.G., Levashov A.V.* // *J. Colloid. Interface. Sci.* 1998. Vol. 206. P. 168–176.
114. *Shibata A., Yamashita T., Chiou J.-S., Kamaya H., Ueda I.* // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31. P. 5728–5733.
115. *Shimura K., Kasai K.* // *Anal. Biochem.* 1995. Vol. 227. P. 186–194.
116. *Spirin A.S., Ajthozhin M.A.* // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 162–165.
117. *Spirin A.S.* // *Mol. Reprod. Dev.* 1994. Vol. 38. P. 107–117.
118. *Stoeva S., Franz M., Wacker R., Krauspenhaar R., Guthohrlein E., Mikhailov A., Betzel C., Voelter W.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. Vol. 392. P. 23–31.
119. *Susi H., Byler D.M., Purcell J.M.* // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1985. Vol. 11. P. 235–240.
120. *Tabor C.W., Tabor H.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1984. Vol. 53. P. 749–790.
121. *Tafari S.R., Wolffe A.P.* // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 24255–24261.
122. *Tomiuchi Y., Kijima T., Kise H.* // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1993. Vol. 66. P. 1176–1181.
123. *Tompson K.F., Gierach L.M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. Vol. 106. P. 3648–3652.
124. *Utsumi T., Aizono Y., Funatsu G.* // *FEBS Lett.* 1987. Vol. 216. P. 99–103.
125. *Van Hoek A., Vos K., Visser A.J.W.G.* // *IEEE J. Q. Electr. Qe-23.* 1987. Vol. 10. P. 1812–1819.
126. *Vaz W.L.C., Schoellmann G.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1976. Vol. 439. P. 194–205.
127. *Venyaminov S.Y., Kalnin N.N.* // *Biopolymers.* 1990. Vol. 30. P. 1242–1257.
128. *Villalba J.M., Navas P.* // *Antioxid. Redox. Signal.* 2000. P. 213–230.
129. *Visser A.J.W.G., Lee J.* // *Biochemistry*. 1980. Vol. 19. P. 4366–4370.
130. *Visser A.J.W.G., Vos K., Santema J.S., Bouwstra J., Van Hoek A.* // *Photochem. Photobiol.* 1987. Vol. 46. P. 457–461.
131. *Visser A.J.W.G., Van der Berg P., Visser N., Van Hoek A., Van den Burg H. A., Parsonage D., Claiborn A.* // *J. Phys. Chem. B.* 1998. Vol. 102. P. 10431–10439.
132. *Vos K., Van Hoek A., Visser A.J.W.G.* // *Eur. J. Biochem.* 1987. Vol. 165. P. 55–63.
133. *Vos K., Laane C., Van Hoek A., Veeger C., Visser A.J.W.G.* // *Eur. J. Biochem.* 1987. Vol. 169. P. 275–282.
134. *Vos K., Laane C., Weijers S. R., Van Hoek A., Veeger C., Visser A.J.W.G.* // *Eur. J. Biochem.* 1987. Vol. 169. P. 259–268.
135. *Walde P., Peng Q., Fadnavis N.W., Battistel E., Luisi L.* // *Eur. J. Biochem.* 1988. Vol. 173. P. 401–409.
136. *Wang J.M., Takeda A., Yang J.T., Wu C.-S. C.* // *J. Prot. Chem.* 1992. Vol. 11. P. 157–164.
137. *Werner M., Garret G., Chin A., Klempher L.* // *Clin. Chem.* 1982. Vol. 28. P. 2352–2358.
138. *Wright C.S.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997. Vol. 7. P. 631–636.