

На правах рукописи

МЕЛЬНИКОВА ДАРЬЯ ЛЕОНИДОВНА

**ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ И ОСОБЕННОСТИ
НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ С ВНУТРЕННЕЙ
НЕУПОРЯДОЧЕННОЙ СТРУКТУРОЙ НА ПРИМЕРЕ α - И κ - КАЗЕИНОВ**

01.04.07 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2019

Работа выполнена на кафедре физики молекулярных систем Федерального государственного бюджетного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Научный руководитель: **доктор физико-математических наук, профессор
Скирда Владимир Дмитриевич**

Официальные оппоненты: **Волков Виталий Иванович**
доктор физико-математических наук, профессор
ИПХФ РАН, заведующий лабораторией ядерного
магнитного резонанса

Толстой Петр Михайлович
кандидат физико-математических наук, доцент
Санкт-Петербургский государственный университет,
доцент кафедры физической химии

Ведущая организация: **Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»**

Защита состоится «19» июня 2019 года в 14:30 на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском) федеральном университете, расположенном по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 16а, ауд. 110.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке К(П)ФУ (г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35). Электронная версия размещена на официальных сайтах ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ (vak.minobrnauki.gov.ru) и К(П)ФУ (kpfu.ru).

Отзывы на автореферат (два заверенных экземпляра) просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан «__» 2019 года.

Учёный секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н., профессор



Михаил Васильевич Еремин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Согласно современным представлениям около 10% всех белков даже в нативных функциональных условиях являются внутренне неупорядоченными (или, как их первоначально называли, неструктурированными). Такие белки характеризуются наличием неупорядоченных участков полипептидной цепи и обладают конформационной подвижностью, сохраняя при этом функциональную активность. Несмотря на большое число работ, посвященных структурно-динамическим свойствам таких белков, до сих пор остаются открытыми вопросы о том, как функционируют и каково поведение белков с внутренней неупорядоченной структурой в среде подобной клеточной (условия макромолекулярного краудинга). Кроме того, в отличие от компактных глобулярных белков, белкам с внутренней неупорядоченной структурой в большей степени свойственны межмолекулярные взаимодействия белковых молекул между собой, приводящие к образованию ассоциатов, аморфных агрегатов и амилоидоподобных структур. Известно, что именно образование таких агрегатов сопутствует тяжким нейродегенеративным заболеваниям.

Уникальная информация о структурно-динамических преобразованиях, различного рода межмолекулярных взаимодействиях и механизмах, лежащих в их основе, может проявиться через особенности трансляционной подвижности белков с внутренней неупорядоченной структурой. Однако, до сих пор не проводились систематические исследования самодиффузии белков с внутренней неупорядоченной структурой в области концентрированных растворов, при которых существенный вклад в трансляционную подвижность могут дать межмолекулярные белок-белок взаимодействия. Нет также данных по сравнению зависимостей коэффициентов самодиффузии (КСД) таких белков с известными обобщенными концентрационными зависимостями глобулярных белков, линейных гибкоцепных полимеров и дендримеров.

Целью работы является экспериментальное исследование и установление характерных особенностей трансляционной подвижности и надмолекулярной организации белков с внутренней неупорядоченной структурой на примере водных растворов α - и κ -казеина в широком диапазоне концентраций по данным метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля.

Для достижения поставленной цели решались **следующие задачи**:

1. Определить вид концентрационных зависимостей средних коэффициентов самодиффузии молекул белков с внутренней неупорядоченной структурой (α -казеин и κ -казеин) и сравнить их с ранее установленными обобщенными концентрационными зависимостями КСД для линейных гибкоцепных полимеров, дендримеров и глобулярных белков.

2. На основе анализа зависимостей формы диффузионных затуханий от концентрации, времени диффузии и других условий эксперимента исследовать признаки самоорганизации белков с внутренней неупорядоченной структурой.

3. Исследовать влияние на трансляционную подвижность молекул α - и κ -казеина и их способность к самоорганизации широко известного восстановителя дисульфидных связей ТСЕР.

4. На основе анализа всего комплекса экспериментальных данных оценить возможность определения особых признаков, типичных только для класса белков с внутренней неупорядоченной структурой.

Научная новизна. Впервые методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР с ИГМП) в широком диапазоне концентраций детально исследованы особенности трансляционной подвижности молекул в водных растворах α -казеина и κ -казеина, как типичных представителей нового класса белков – белков с неупорядоченной внутренней структурой.

Показано, что форма диффузионных затуханий молекул α -казеина описывается простой экспоненциальной функцией в области разбавленных растворов, но по мере увеличения концентрации приобретает сложный вид. Кроме того, форма ДЗ зависит от времени диффузии и времени выдержки образца. При этом для растворов κ -казеина эти особенности наблюдаются во всей области концентраций, включая разбавленные растворы.

Установлено, что в концентрированных растворах α - и κ -казеина порядка 90% и 40% молекул белка, соответственно, могут быть организованы в надмолекулярную структуру, удовлетворяющую признакам геля. Отличительной особенностью сформированной надмолекулярной структуры, является ее лабильный характер, что подтверждено экспериментами по растворимости в избытке воды. Общим для обеих изученных систем является также установленный факт динамического равновесия между свободными молекулами белка и молекулами, входящими в состав сетки геля. Впервые методом ЯМР получены оценки времени жизни молекул α -казеина и κ -казеина в сетке геля.

На примере исследованных растворов α -казеина и κ -казеина установлен неоднозначный характер влияния на формирование надмолекулярной структуры агента ТСЕР, широко используемого при исследованиях белковых систем в качестве восстановителя дисульфидных связей. Так, в растворах α -казеина ТСЕР активирует дополнительные химические процессы, которые приводят к образованию нелабильного и нерастворимого геля. На основе анализа экспериментальных данных сформулирована гипотеза о формировании в присутствии ТСЕР вторичных межмолекулярных $-S-S-$ связей, экранированных для молекул восстановителя. В то же время, в растворах κ -казеина наблюдается обратная ситуация: добавление молекул ТСЕР приводит к отсутствию всех, экспериментально регистрируемых до этого, признаков образования геля.

Получены концентрационные зависимости средних коэффициентов самодиффузии молекул белка в исследованных растворах с учетом их нормировки на локальную подвижность. Показано, что вид концентрационной зависимости КСД для растворов κ -казеина при выборе в качестве критической концентрации значения 18% с точностью до погрешности эксперимента совпадает с ранее установленным видом обобщенной концентрационной зависимости для линейных макромолекул с конформацией гауссового клубка. При этом, аналогичная концентрационная зависимость молекул белка в растворах α -казеина отличается от всех известных обобщенных зависимостей, как для линейных полимеров, так и для макромолекул с компактной конформацией - дендримеров и глобулярных белков.

Практическая значимость. Впервые апробирован способ определения и количественной оценки характерного времени жизни молекул в состоянии геля, основанный на анализе данных метода ЯМР с ИГМП.

Данные об особенностях трансляционной подвижности молекул белка с неупорядоченной структурой в концентрированных растворах (условия «self-crowding»), свидетельствующие об образовании надмолекулярной структуры типа геля, методика получения такой информации и использованная система доказательств могут быть востребованы при проведении исследований в более сложных в условиях – условиях, когда окружение для исследуемых молекул белков будет составлено из молекул другого сорта («crowding»).

Проведение исследований белков с внутренней неупорядоченной структурой необходимо для понимания механизмов надмолекулярной организации структур типа трехмерной сетки геля или формирования других типов агрегатов.

Результаты, полученные в данной работе, с одной стороны, дополняют современные представления о механизмах воздействия агента ТСЕР на внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи молекул белков в концентрированных растворах. С другой стороны,

полученные на примере концентрированных растворов α -казеина и κ -казеина данные свидетельствуют о неоднозначности результатов применения подобных восстанавливающих молекулярных агентов и указывают на необходимость более осторожного их применения и в других исследованиях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментальные результаты детального исследования особенностей трансляционной подвижности и надмолекулярной структуры в водных растворах α - и κ -казеина, в том числе и при наличии ТСЕР, полученные методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля в спектрально-разрешенном режиме. Данные о регистрации признаков аномальной диффузии и молекулярного обмена в исследованных системах, полученные на основе анализа зависимостей диффузионных затуханий от времени диффузии и от других параметров применяемых импульсных последовательностей.

2. В растворах молекул α -казеина признаки надмолекулярной организации наблюдаются только в концентрированных растворах в отличие от растворов κ -казеина, для которого эффекты ассоциации/агрегации регистрируются во всем диапазоне исследованных концентраций от 0.1 до 40 %.

3. Как для растворов α -казеина, так и для растворов κ -казеина при высоких концентрациях, характерны признаки образования надмолекулярной структуры типа трехмерной сетки геля. При этом молекулы белка, входящие в структуру геля, находятся в динамическом равновесии со свободными молекулами белка.

4. Впервые полученные данные о характерных временах жизни молекул в состоянии геля и о соотношении долей молекул белка в состоянии геля и в свободном состоянии. Так, для водного раствора α -казеина с концентрацией 15%, доля молекул белка в состоянии геля достигает значения 90%, со средним временем жизни в этом состоянии порядка 3,5 с., а для раствора κ -казеина с концентрацией белка 20% такие же характеристики имеют значения $\sim 37\%$ и ~ 1 с, соответственно.

5. Данные о неоднозначности механизма влияния молекулярного агента ТСЕР, широко используемого в экспериментах с белками с целью восстановления дисульфидных связей между цистеиновыми остатками. Так в разбавленных растворах α -казеина признаки влияния ТСЕР отсутствуют, а в растворах κ -казеина они обнаруживаются во всем диапазоне исследованных концентраций белка. При этом, в концентрированных растворах κ -казеина его присутствие приводит к исчезновению признаков геля, в то время как в концентрированных растворах α -казеина результат обратный: формируется необратимая структура геля с прочными межмолекулярными связями, за которые могут быть ответственны вторичные межмолекулярные $-S-S-$ связи, пространственно недоступные для молекул ТСЕР.

6. Вид концентрационной зависимости КСД для растворов κ -казеина при выборе в качестве критической концентрации значения 18% с точностью до погрешности эксперимента совпадает с ранее установленным видом обобщенной концентрационной зависимости для линейных макромолекул с конформацией гауссового клубка. В то же время концентрационная зависимость молекул белка в растворах α -казеина отличается от всех известных обобщенных зависимостей, как для линейных полимеров, так и для макромолекул с компактной конформацией - дендримеры и глобулярные белки, что, в отличие от растворов κ -казеина, предлагается трактовать как результат существования для α -казеина некоторой пороговой (порядка 4-5%) концентрации белка, при которой индуцируются процессы надмолекулярной организации.

Достоверность полученных результатов.

Экспериментальные результаты исследования воспроизводимы, что подтверждается их повторяемостью при сравнении данных, измеренных, либо в разные периоды времени, либо для вновь приготовленных образцов.

Достоверность обнаруженной зависимости диффузионных затуханий от времени диффузии и последующих из ее анализа выводов подтверждена результатами проведения контрольных экспериментов при других параметрах импульсной последовательности, позволяющих исключить неоднозначность трактовки первичных экспериментальных данных.

Сформулированные на примере исследованных систем выводы, касающиеся неоднозначности влияния на формирование в исследованных системах надмолекулярных структур восстанавливающего $-S-S-$ связи агента ТСЕР, не противоречат ряду литературных источников. При этом, сам факт обнаруженной разнонаправленности результата действия ТСЕР на свойства гелевой структуры в исследованных растворах может быть логически связан, как минимум, с существенно различающимся расстоянием между двумя цистеинами, входящими, соответственно, в структуру молекул α -казеина и κ -казеина.

Достоверность численных значений коэффициентов самодиффузии, определяемых из анализа экспериментальных диффузионных затуханий определена погрешностью регистрации амплитуд сигнала стимулированного эха, которая за счет применения режимов накопления сигнала во всех случаях не превышала 10%.

Корректность сопоставления диффузионных затуханий тому или иному молекулярному компоненту исследуемой системы обеспечивалась проведением измерений в спектрально-разрешенном режиме с использованием резонанса ядер как водорода (1H), так и фосфора (^{31}P).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях: «Магнитный резонанс и его приложения» (Санкт-Петербург, 2017); «Структура и динамика молекулярных систем» (Йошкар-Ола, 2017, 2018); «Ломоносов-2018» (Москва, 2018); «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его приложений» (Казань, 2018); «MODERN DEVELOPMENT OF MAGNETIC RESONANCE» (Казань, 2018).

Публикации. Непосредственно по материалам, включенными в диссертацию, опубликовано 2 статьи в журналах, индексируемых Web of Science и 6 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. Полный список научных работ автора в области развития методик ЯМР и его приложений дополнительно содержит: 2 статьи (Scopus); два патента РФ; 8 тезисов и материалов конференций.

Личный вклад автора. Подготовка образцов для ЯМР исследований, постановка и выбор оптимальных параметров в применяемых импульсных последовательностях для обеспечения исследований процессов самодиффузии молекул белка в спектрально-разрешенном режиме в зависимости от времени диффузии, времени хранения образца и других параметров. Интерпретация результатов эксперимента, постановка и проведение дополнительных экспериментов, обеспечивающих получение доказательств достоверности основных получаемых результатов. Подготовка материалов для публикаций.

Обсуждение материалов публикаций осуществлялось совместно с соавторами статей.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, включающего 217 наименований. Работа содержит 167 страниц машинописного текста, в том числе 3 таблицы и 42 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы цель и задачи исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе дается обзор и проводится анализ современных представлений и экспериментальных исследований самодиффузии молекул белков с внутренней неупорядоченной структурой. Приводится описание и основных свойств молекул белков с внутренней неупорядоченной структурой. В конце главы формулируется задача диссертации и обосновывается выбор объектов исследования.

В второй главе рассматриваются теоретические основы и особенности применения метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля к изучению трансляционной подвижности молекул. Даются характеристики объектов исследования, описываются методики приготовления образцов и проведения измерений.

В третьей главе представлены результаты экспериментальных исследований зависимостей КСД и формы диффузионного затухания молекул α -казеина в водных растворах. Приведено сравнение полученных зависимостей КСД для α -казеина с установленными ранее обобщенными концентрационными зависимостями средних КСД полимерных молекул для линейных полимеров, дендримеров и глобулярных белков. Обсуждается неэкспоненциальность формы диффузионного затухания для молекул белка и ее зависимость от времени диффузии.

Форма диффузионного затухания в растворах белков

Методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля на ядрах ^1H были получены зависимости формы диффузионного затухания и значений коэффициентов самодиффузии молекул белка α -казеина в водных растворах от концентрации.

Полученные диффузионные затухания молекул белка α -казеина для диапазона концентраций представлены на рисунке 1.

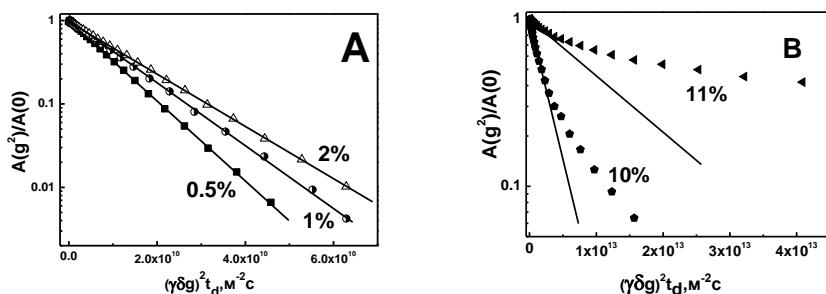


Рисунок 1 – Диффузионные затухания, полученные по спектральным линиям (от 3.61-0.16 м.д.) для белка в водных растворах при весовых концентрациях белка α -казеина: А – 0,5, 1 и 2%; В – 10 и 11%. Сплошные линии соответствуют начальным наклонам диффузионных затуханий.

По признаку формы диффузионного затухания в диапазоне концентраций от 0,5 до 2% форма диффузионных затуханий хорошо описывается экспоненциальным законом с одним единственным коэффициентом самодиффузии белка D_s :

$$A(g^2)/A(0) = \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d D_s) \quad (1)$$

где $A(0)$ – амплитуда эха при нулевом градиенте магнитного поля, γ – гиromагнитное отношение резонирующих ядер, $t_d = \Delta - \delta/3$ время диффузии, Δ – время между импульсами градиента магнитного поля, δ – длительность импульса градиента магнитного поля, g – величина градиента магнитного поля.

Для образцов с более высокими концентрациями белка регистрируемая форма диффузионных затуханий требует для своего описания введения спектра КСД, который может быть записан в виде непрерывного или, например, дискретного спектра

$$A(g) = A(0) \sum_i^n p_i \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 D_{si} t_d), \quad (2)$$

где D_{si} и p_i – коэффициент самодиффузии и населенность i -ой компоненты исследуемой системы.

Обычно в случае спектра коэффициента самодиффузии для характеристики трансляционной подвижности молекулярной системы в целом имеет смысл использовать средний коэффициент самодиффузии $\langle D_s \rangle$ [2; 3]:

$$\langle D_s \rangle = \sum_i p_i D_{si} \quad (3)$$

Заметим, что значение $\langle D_s \rangle$ с хорошей степенью точности может быть определено по начальному наклону диффузионного затухания.

На рисунке 1 для всех диффузионных затуханий соответствующих концентраций α -казеина от 10 процентов сплошные линии рассчитаны по выражениям типа

$$\frac{A(g^2)}{A(0)} = \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d \langle D_s \rangle) \quad (4)$$

где значение $\langle D_s \rangle$ для каждой концентрации определено по формуле (3) и, очевидно, зависит от концентрации α -казеина в растворе.

Из Рисунка 1 видно, в области разбавленных растворов ($\leq 2\%$) в диффузионных затуханиях не обнаруживается никаких признаков отклонения от экспоненциального закона, в то время как при высоких концентрациях белка отклонение от экспоненты проявляется тем сильнее, чем выше концентрация.

Концентрационные зависимости средних КСД

При рассмотрении концентрационных зависимостей коэффициентов самодиффузии полимера в [1] предлагается анализировать не исходные данные $\langle D_s \rangle(\varphi)$, а $D'_s(\varphi)$ – получаемые путем нормировки исходных значений на концентрационную зависимость локальной подвижности полимерной цепи следующим образом:

$$D'_s(\varphi) = \frac{\langle D_s \rangle(\varphi)}{L(\varphi)} \quad (5)$$

где $L(\varphi)$ – некоторая экспериментально измеренная по данным времен спин-спиновой или спин-решеточной релаксации безразмерная функция, несущая информацию о зависимости от концентрации характеристик локальной (внутримолекулярной) подвижности полимера; φ – объемная концентрация полимера.

На рисунке 2 представлена зависимость $D'_s(\varphi)$ для водных растворов молекул α -казеина. Как видно, представленную концентрационную зависимость коэффициентов самодиффузии молекул α -казеина в водных растворах можно описать двумя асимптотиками: $D'_s(\varphi) \propto \varphi^0$ в области разбавленных и $D'_s(\varphi) \propto \varphi^{-12}$ в области концентрированных растворов. Итак, в области концентрированных растворов зависимость коэффициентов самодиффузии от концентрации представляется аномально сильной, что не может быть согласовано с какими известными теоретическими предсказаниями.

По нашему мнению, причина столь сильной зависимости коэффициентов самодиффузии молекул белка α -казеина в водных растворах в области больших концентраций может быть связана с эффектами организации в исследуемой системе надмолекулярных структур. Об этом, в частности, свидетельствует сильное отклонение формы ДЗ от экспоненциального вида в области больших концентраций.

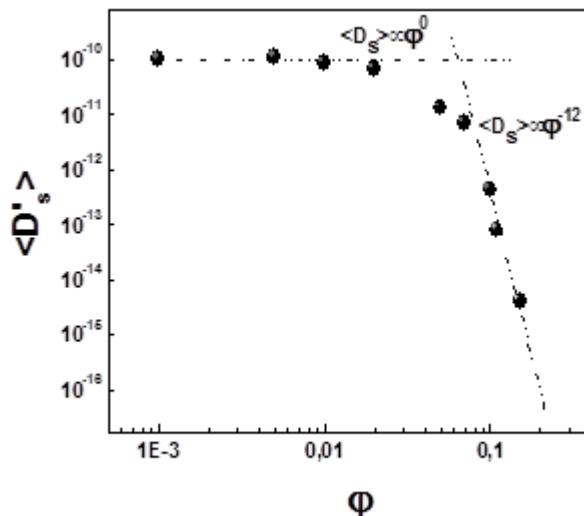


Рисунок 2 – Зависимость $D'_s(\varphi)$ для молекул α -казеина в водных растворах

Зависимость формы диффузионных затуханий от времени хранения и времени диффузии. Признаки образования геля.

Детальные исследования формы диффузионных затуханий для молекул белка продемонстрировали два эффекта. Первый касается обнаруженной зависимости формы диффузионного затухания от времени хранения образца. Второй – зависимости от времени диффузии. Если говорить о зависимости ДЗ от времени хранения, то, прежде всего возникает предположение о необратимых процессах в образце, обусловленных, например, его денатурацией, разложением и т.д. Чтобы проверить это мы провели «тест на обратимость». Суть его заключалась в том, что в образец с исходной концентрацией белка 15%, в котором в течение 72 часов мы наблюдали достаточно существенные изменения в форме диффузионных затуханий, было добавлено такое количество растворителя, которое соответствовало бы концентрации белка 2%. По истечении примерно двух суток, необходимых для полного растворения белка, было зарегистрировано диффузионное затухание и сравнено с таковым для образца с исходной концентрацией белка 2%. Результат сравнения показал их полную идентичность. Такой результат позволяет заключить, что все наблюдаемые нами изменения формы ДЗ от времени хранения свидетельствуют о формировании в концентрированных растворах α -казеина надмолекулярной структуры, механизмы образования которой не требуют осуществления каких-либо необратимых химических реакций. В связи с этим обратимся к результатам по исследованию зависимости формы ДЗ от времени диффузии.

На рисунке 3 показаны диффузионные затухания для 15% раствора α -казеина, полученные при значениях t_d 200, 400 и 800 мс.

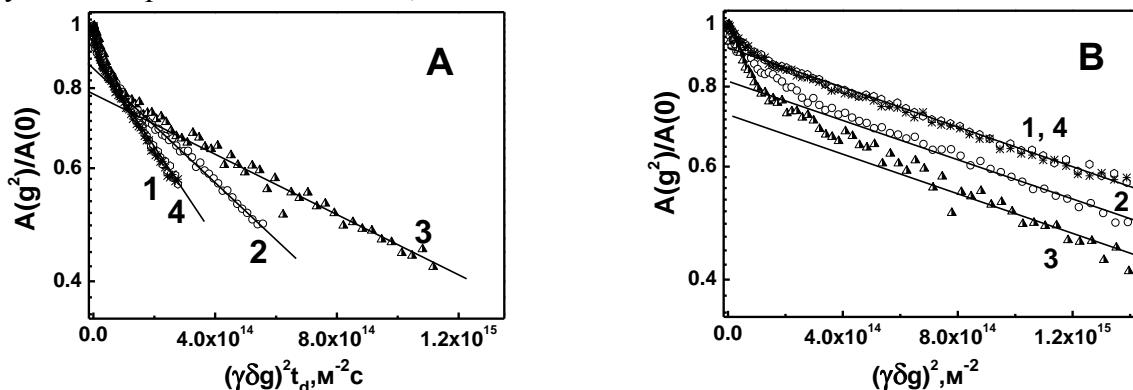


Рисунок 3 - ДЗ, полученные по спектральным линиям (от 3,61-0,16 м.д.) для белка в водном растворе при весовой концентрации белка α -казеина 15%, при разных временах диффузии в обычных координатах $(\delta g)^2 t_d$ (А) и координатах, соответствующих тестированию режима полностью ограниченной диффузии $(\delta g)^2$ (В) [4; 5]: кривые 1-3 соответствуют диффузионным затуханиям при временах диффузии 200, 400 и 800 мс соответственно. Кривая 4 - соответствует «контрольному» диффузионному затуханию при времени диффузии 200 мс, полученному после проведения серии экспериментов с другими значениями t_d .

Как видно из рисунка 3А, диффузионные затухания для разных времен диффузии различаются, причем так, что с ростом времени диффузии для части молекул белка, характеризующихся малыми значениями КСД, наклон диффузионного затухания уменьшается, что соответствует уменьшению значений КСД для этой части молекул. На рисунке 3В показаны те же диффузионные затухания, но в координатах, в которых может быть легко протестирован режим полностью ограниченной диффузии [4; 5]. Наклон компоненты диффузионного затухания с наименьшим коэффициентом самодиффузии остается неизменным для всех значений t_d , как показано пунктирными линиями на рисунке 3В. Это означает, что коэффициент самодиффузии обратно пропорционален времени диффузии, а среднеквадратичное смещение молекул α -казеина остается постоянным $\langle r^2 \rangle \sim t_d^0$, так как это следует из уравнения:

$$D_{min} = \frac{\langle r^2 \rangle}{6 \cdot t_d} \propto t_d^{-1} \quad (6)$$

Наличие такой зависимости позволяет нам с большей уверенностью утверждать, что в концентрированных растворах α -казеина наблюдаются процессы, связанные с гелеобразованием. Зависимость минимального значения коэффициента самодиффузии от времени диффузии, представленная на рисунке 4, действительно демонстрирует, что при концентрации белка 15%, часть молекул α -казеина находится в полностью ограниченном состоянии. Подобные эффекты наблюдались в гелях желатина [5] и в сшитых полибутиденинах [6].

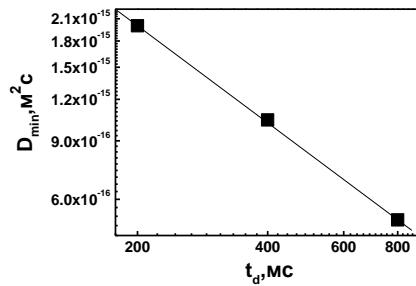


Рисунок 4 – Зависимость значений минимального коэффициента самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d в водном растворе с концентрацией α -казеина 15%. Сплошная линия имеет соответствует $D_{min} \propto t_d^{-1}$

молекулы α -казеина могут нековалентно взаимодействовать (т.е., гидрофобным образом, электростатически, или через водородные связи), чтобы сформировать трехмерную подобно гелю структуру, приводя к полностью ограниченной подвижности отдельной цепи полимера α -казеина в целом.

Возвращаясь к данным, показанным на рисунке 3 (А), отметим, что зависимости от времени диффузии подвержена только та часть диффузационного затухания, которая характеризуется минимальными значениями КСД. При этом начальные участки диффузионных затуханий явной зависимости от t_d не демонстрируют. Это значит, что только часть молекул белка характеризуется аномальной диффузией, другая же часть, по-видимому, никаких ограничений в трансляционной подвижности не испытывает. Другими словами, в исследуемом концентрированном растворе имеет смысл выделить два подансамбля молекул α -казеина с различающимися характеристиками трансляционной подвижности как в значениях коэффициентов самодиффузии, так в части их зависимости от времени диффузии. В таком случае становится естественным вопрос о возможности обмена молекул белка между двумя этими подансамблями (состояниями или «фазами»).

Из формы ДЗ, показанных на рисунке 3 (В), явно следует, что регистрируемая доля молекул белка, для которых коэффициент самодиффузии $D_{min} \propto t_d^{-1}$, уменьшается с ростом времени диффузии. Как известно [1; 11; 12], это может быть связано, либо с процессами обмена, либо с факторами, обусловленными спин-решеточной релаксацией. В связи с этим были проведены дополнительные эксперименты, направленные на выяснение возможного влияния на вид зависимости $A(g, t_d)$ процессов спин-решеточной релаксации. Результаты таких контрольных экспериментов показали отсутствие какой-либо связи формы ДЗ с процессами спин-решеточной релаксации, что дало возможность наблюдать результат однозначно трактовать как следствие молекулярного обмена между двумя состояниями молекул α -казеина с различающимися характеристиками трансляционной подвижности как в значениях коэффициентов самодиффузии, так в части их зависимости от времени диффузии.

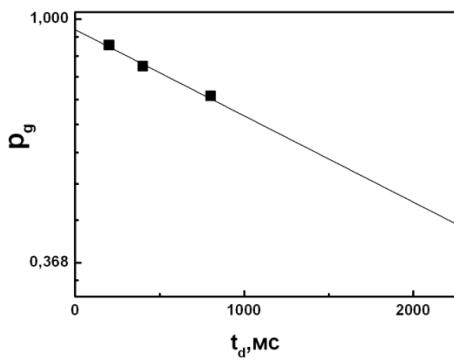


Рисунок 5 – Зависимость в ДЗ для 15% раствора α -казеина доли с D_{min} с от времени диффузии t_d . Прямая линия рассчитана по (7).

Интерпретация данных, полученных методом ЯМР, позволила нам определить, что в концентрированных растворах α -казеина между свободными молекулами белка и молекулами, образующими гель, существует молекулярный обмен. Насколько нам известно, такого типа результат получен впервые.

Итак, на примере системы α -казеин в водном растворе при концентрации белка 15% более 90% молекул образуют надмолекулярную структуру типа трехмерной сетки геля с характерным временем жизни молекул белка в состоянии геля около 3,5 секунд. Этот факт свидетельствует о том, что образующаяся в растворах α -казеина надмолекулярная структура, хотя и имеет все признаки геля, тем не менее сохраняет свойства лабильности. Именно поэтому образование надмолекулярной структуры оказалось обратимым процессом.

Надо заметить, что в предыдущих исследованиях систем с гелеобразованием методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля подобные эффекты не обнаруживались.

В четвертой главе проведен анализ формы диффузионных затуханий для α -казеина в водном растворе в присутствии восстанавливающего дисульфидные связи агента ТСЕР при различных концентрациях белка. Установлено, что в разбавленных растворах (при концентрации белка 1 и 3%) разрушение дисульфидной связи $\text{Cys}^{36}\text{-Cys}^{40}$, присутствующей в одной из фракций исследуемого α -казеина [13; 14], не изменяет трансляционную подвижность и вторичную структуру белка. Напротив, в концентрированном 15% растворе α -казеина, для которого ранее нами было обнаружено формирование гелевой надмолекулярной структуры, добавление ТСЕР приводит к существенным изменениям свойств формируемого геля.

Влияние агента ТСЕР на трансляционную подвижность молекул белка в разбавленных растворах α -казеина

Исследование влияния ТСЕР на молекулярную подвижность α -казеина в разбавленных растворах мы проводили на образцах белковых растворов с концентрациями 1 и 3 %, что соответствовало области разбавленных растворов без добавления и с добавлением ТСЕР с такой концентрацией, что молекулярное отношение $N_{\text{protein}}/N_{\text{TCER}}=1/10$. Заметим, что для области разбавленных растворов спектры ЯМР показывали достаточное разрешение для получения диффузионных затуханий в спектрально-разрешенном режиме, как для молекул белка, так и для молекул ТСЕР. Нами было установлено, что в достаточно большом динамическом диапазоне форма ДЗ для ТСЕР представляет собой моноэкспоненциальный вид. При этом, вычисленное значение КСД молекул ТСЕР $D_{\text{TCER}} = 4.2 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$, согласуется с результатами [15] и почти на порядок меньше такового для молекул воды $D_{\text{water}} = 2.7 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. Данные о

На рисунке 5 показана зависимость доли молекул регистрируемых в состоянии геля p_g , от времени диффузии.

Сплошная линия на рисунке 5 представляет наилучшее соответствие уравнению вида:

$$p_g(t_d) = p_g(0) \exp\left(-\frac{t_d}{\tau_g}\right) \quad (7)$$

которое, как и ожидалось, имеет экспоненциальный вид. Из него легко оценить время жизни τ_g молекул в состоянии геля. Вычисленное таким образом время жизни молекул α -казеина в гель фазе составляет значение 3.5 ± 0.4 с.

Таким образом, анализ и

интерпретация данных, полученных методом ЯМР с ИГМП, позволила нам определить,

что в концентрированных растворах α -казеина между свободными молекулами белка и

молекулами, образующими гель, существует молекулярный обмен. Насколько нам

известно, такого типа результат получен впервые.

Итак, на примере системы α -казеин в водном растворе при концентрации белка

15% более 90% молекул образуют надмолекулярную структуру типа трехмерной сетки геля с характерным временем жизни молекул белка в состоянии геля около 3,5 секунд.

Этот факт свидетельствует о том, что образующаяся в растворах α -казеина надмолекулярная структура, хотя и имеет все признаки геля, тем не менее сохраняет

свойства лабильности. Именно поэтому образование надмолекулярной структуры

оказалось обратимым процессом.

Надо заметить, что в предыдущих исследованиях систем с гелеобразованием

методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля подобные эффекты не обнаруживались.

В четвертой главе проведен анализ формы диффузионных затуханий для α -казеина в водном растворе в присутствии восстанавливающего дисульфидные связи агента ТСЕР при различных концентрациях белка. Установлено, что в разбавленных растворах (при концентрации белка 1 и 3%) разрушение дисульфидной связи $\text{Cys}^{36}\text{-Cys}^{40}$, присутствующей в одной из фракций исследуемого α -казеина [13; 14], не изменяет трансляционную подвижность и вторичную структуру белка. Напротив, в концентрированном 15% растворе α -казеина, для которого ранее нами было обнаружено формирование гелевой надмолекулярной структуры, добавление ТСЕР приводит к существенным изменениям свойств формируемого геля.

Влияние агента ТСЕР на трансляционную подвижность молекул белка в разбавленных растворах α -казеина

Исследование влияния ТСЕР на молекулярную подвижность α -казеина в разбавленных растворах мы проводили на образцах белковых растворов с концентрациями 1 и 3 %, что соответствовало области разбавленных растворов без добавления и с добавлением ТСЕР с такой концентрацией, что молекулярное отношение $N_{\text{protein}}/N_{\text{TCER}}=1/10$. Заметим, что для области разбавленных растворов спектры ЯМР показывали достаточное разрешение для получения диффузионных затуханий в спектрально-разрешенном режиме, как для молекул белка, так и для молекул ТСЕР. Нами было установлено, что в достаточно большом динамическом диапазоне форма ДЗ для ТСЕР представляет собой моноэкспоненциальный вид. При этом, вычисленное значение КСД молекул ТСЕР $D_{\text{TCER}} = 4.2 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$, согласуется с результатами [15] и почти на порядок меньше такового для молекул воды $D_{\text{water}} = 2.7 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. Данные о

трансляционной подвижности молекул белка в присутствии ТСЕР и без него, представлены на рисунке 6.

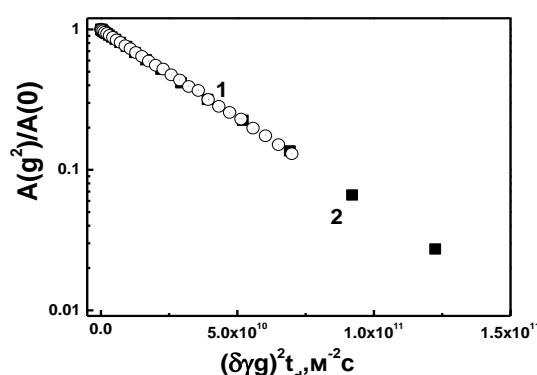


Рисунок 6 – Спектрально разрешенные ДЗ для водного раствора белка при концентрации а-казеина 3% с добавлением ТСЕР, полученные по областям спектральных линий от 0.16 до 2.0 м.д. (1) и диффузионное затухание сигнала стимулированного спинового эха, полученное по спектральным линиям от 0,16 м.д. до 3.61 м.д. для водного раствора белка при концентрации а-казеина 3% без добавления (2) агента ТСЕР и NaOD.

молекулы белка. Такой результат может быть обусловлен пространственной близостью цистеинов Cys³⁶-Cys⁴⁰ в белке. Тогда наличие или отсутствие между ними –S–S– связи мало сказывается на конформации белка.

Дополнительно отсутствие влияния молекул ТСЕР на вторичную структуру молекул а-казеина в разбавленных растворах было нами подтверждено [16] результатами сравнения спектров кругового дихроизма (КД). При этом, сам факт присутствия цистеиновых остатков в α_{s2} -казеине и, следовательно, способность ТСЕР к восстановлению дисульфидных связей, был подтвержден [16] флуоресцентным методом ковалентно меченых цистеиновых остатков α_{s2} -казеина с использованием тиол-реактивного пирена и малеимидов Alexa-532.

Анализ диффузионных затуханий в спектрально разрешенном режиме в концентрированных растворах а-казеина в присутствии ТСЕР

В концентрированных растворах а-казеина присутствие восстановливающего агента ТСЕР привело к некоторым сложностям при трактовке результатов экспериментов в спектрально-разрешенном режиме на частоте резонанса ^1H . Дело в том, что на протонных спектрах высокого разрешения не удается четко выделить линии, относящиеся только к молекулам белка и только к молекулам ТСЕР. Поэтому дополнительную информацию о трансляционной подвижности ТСЕР мы получили из анализа формы диффузионного затухания для молекул ТСЕР на частоте резонанса ядер ^{31}P , поскольку восстановливающий агент ТСЕР содержит фосфатные группы.

На рисунке 7 представлен спектр ЯМР ^{31}P для водного раствора с концентрацией а-казеина 15% в присутствии ТСЕР, без добавления ТСЕР и водный раствор ТСЕР с NaOD, который использовался на этапе приготовления образца. Как видно из рисунка 7 ЯМР спектр ^{31}P для «чистого» раствора а-казеина (2) характеризуется одиночным синглетом в области 0-5 м.д.. Сам факт наличия сигнала на ядрах ^{31}P в белке связан с тем, что все типы казеинов имеют определенную степень фосфорилирования [17].

Из сравнения ЯМР спектра для «чистого» раствора α -казеина со спектрами белкового раствора с добавлением ТСЕР (1) и водного раствора ТСЕР (3) видно, что линии спектра в области хим. сдвигов от 13 до 22 м.д. и в области 59 м.д. связаны только с ТСЕР. При этом, наличие узкого синглетного пика, расположенного в области 59 м.д., хорошо согласуется со спектральными данными для ТСЕР в работе [18].

В целом, спектры ЯМР ^{31}P белковых растворов с ТСЕР демонстрируют принципиальную возможность получения однозначной информации о характере трансляционной подвижности молекул ТСЕР на ядрах ^{31}P по диффузионному затуханию линии в области 59 м.д..

Таким образом была получена однозначная информация о форме ДЗ (экспоненциальная в динамическом диапазоне до трех десятичных порядков) и о значении коэффициента самодиффузии для молекул ТСЕР.

Данные по форме ДЗ и значениях коэффициентов самодиффузии для молекул ТСЕР, полученные на частоте резонанса ^{31}P , были использованы для идентификации вклада ТСЕР в ДЗ, регистрируемое для молекул белка в спектрально-разрешенном режиме на частоте резонанса ^1H .

На рисунке 8 представлено результатирующее диффузионное затухание для молекул белка, полученное при времени диффузии $t_d = 100$ мс, для образца водного раствора с 15% концентрацией α -казеина в присутствии ТСЕР.

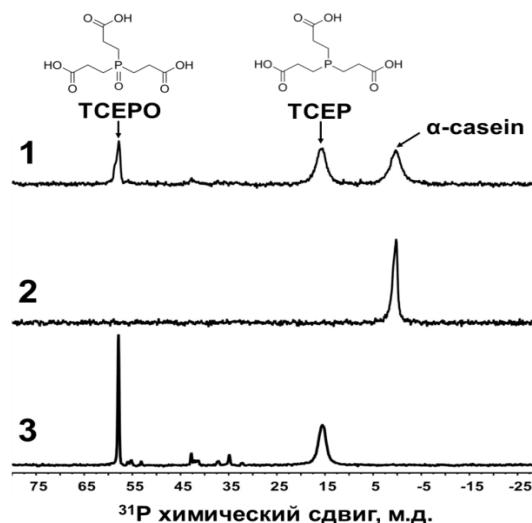


Рисунок 7 – ЯМР спектры ^{31}P водного раствора α -казеина с концентрацией 15%: в присутствии восстанавливающего агента ТСЕР (1); без добавления ТСЕР (2); водный раствор ТСЕР с NaOD (3).

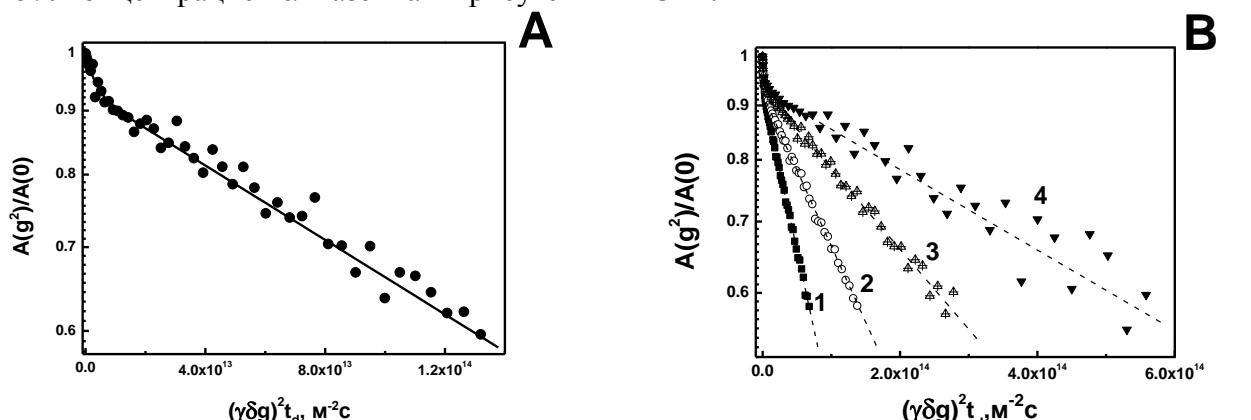


Рисунок 8 – Диффузионные затухания для молекул белка образца водного раствора с 15% концентрацией α -казеина в присутствии ТСЕР: (А) ДЗ при 100 мс и результат аппроксимации двух-экспоненциального диффузионного затухания (сплошная кривая); (В) ДЗ при разных временах диффузии t_d : 1 – 50 мс; 2 – 100 мс; 3 – 200 мс; 4 – 400 мс. Пунктирной линией показаны наклоны компонент диффузионного затухания с наименьшим коэффициентом самодиффузии.

Как видно из рисунка 8, полученное диффузионное затухание молекул α -казеина, носит сложный характер и описывается соотношением вида (3), в соответствии с которым ДЗ аппроксимируется суммой двух экспонент:

$$A(\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d)/A(0) = p'_2 \cdot \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d D_2) + p'_1 \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d D_1), \quad (8)$$

при следующих значениях параметров: $p'_1 = p_1/(p_1 + p_2) = 0.93$;

$$D_1 = 3.40 \times 10^{-15} \text{ м}^2/\text{с}; p'_2 = p_2/(p_1 + p_2) = 0.07; D_2 = 3.00 \times 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}.$$

Полученный результат позволяет с достаточной степенью уверенности утверждать, что трансляционная подвижность молекул α -казеина в водном растворе с концентрацией белка 15% в присутствии молекул восстанавливающего агента ТСЕР, также, как и для 15% раствора α -казеина без добавления ТСЕР, характеризуется бимодальным распределением КСД. При этом порядка 7% молекул α -казеина обладают достаточно высокой трансляционной подвижностью с $D_2 = 3.00 \times 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$, в то время как основная часть молекул белка имеет значение КСД на два десятичных порядка меньше. Очевидно, что эта часть молекул белка организована в какую-то надмолекулярную структуру.

Как видно из рисунка 8 В, с увеличением времени диффузии для части молекул белка, характеризующихся малыми значениями КСД, наклон диффузионного затухания уменьшается, что соответствует уменьшению значений КСД для них с ростом времени диффузии. Другими словами, этот факт свидетельствует о том, что трансляционная подвижность молекул α -казеина осуществляется в условиях неких пространственных ограничений.

Для получения дополнительной информации о характере возможной образовавшейся надмолекулярной структуры на рисунке 9 представлена зависимость формы диффузионных затуханий от времени диффузии t_d .

Аппроксимируя диффузионные затухания выражением(8) типа (2) с $n=2$ можно получить значения всех, входящих в него параметров и проанализировать их зависимость от времени диффузии. Результаты такого анализа для значений коэффициентов самодиффузии и населеностей от времени диффузии представлены на рисунке 9.

Рисунок 9 – Зависимость значений КСД молекул α -казеина D_1 , D_2 и p'_1 от времени диффузии t_d в водном растворе с концентрацией белка 15% в присутствии восстанавливющего агента ТСЕР.

Анализ экспериментальных данных представленных на рисунке 9 показывает, что численные значения населенности p'_1 , а также значения D_2 в пределах погрешности эксперимента остаются неизменными при различных временах диффузии. В то же время наименьший коэффициент самодиффузии D_1 , характеризующий трансляционную подвижность большинства (более 90%) молекул α -казеина, оказался функцией времени диффузии, а точнее – демонстрирует обратную пропорциональность от времени диффузии. Такой характер аналогичен характеру зависимостей, наблюдавшихся при исследовании концентрированных растворов α -казеина в отсутствии каких-либо химических добавок (восстанавливающих агентов) в главе 3. Как известно [5; 19], зависимость типа $D_s \sim t_d^{-1}$ соответствует режиму полностью ограниченной диффузии. При этом, вычисленный размер ограничений

$$\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 45 \pm 5 \text{ нм.}$$

Стоит отметить, что основными установленными особенностями чистой системы α -казеин/вода в предыдущей главе являлись выводы о лабильности сетки геля и наличии в системе молекулярного обмена. Если вернуться к данным, представленным на рисунке 9, то можно видеть, что регистрируемая в эксперименте доля молекул, относимых к структуре геля, никаких признаков зависимости от времени диффузии не имеет. Это говорит нам о том, что в результате присутствия в системе ТСЕР молекулы α -казеина образовали структуру типа геля, которая, в отличие от аналогичной надмолекулярной структуры в системе без ТСЕР отличается наличием более долгоживущих межмолекулярных связей.

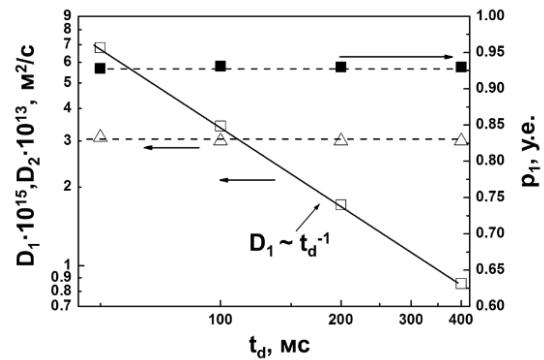


Рисунок 9 – Зависимость значений КСД молекул α -казеина D_1 , D_2 и p'_1 от времени диффузии t_d в водном растворе с концентрацией белка 15% в присутствии восстановливающего агента ТСЕР.

Таким образом, нами было установлено, что в концентрированных растворах α -казеина молекулы ТСЕР, обладающие функцией восстановления $-S-S-$ связей, активируют дополнительные химические процессы, которые приводят к образованию нелабильного и нерастворимого геля. Предполагается, что основной причиной такого результата является формирование вторичных межмолекулярных дисульфидных связей между молекулами α_{S2} -казеина, пространственно экранированных для дальнейшего доступа молекул ТСЕР.

В пятой главе представлены данные по исследованию формы диффузионных затуханий в растворах κ -казеина в диапазоне от разбавленных до концентрированных растворов в зависимости от времени диффузии и времени выдержки образца, а также результаты контрольных экспериментов. Представлен вид концентрационной зависимости для средних коэффициентов самодиффузии молекул κ -казеина в сравнении с таковой для α -казеина. Проведено сравнение с известной обобщенной концентрационной зависимостью для линейных гибкоцепных полимеров. Приведены результаты по влиянию молекулярного агента ТСЕР на трансляционную подвижность молекул белка и надмолекулярную структуру в растворах κ -казеина.

Первая особенность исследуемой системы – водного раствора κ -казеина по сравнению с ранее изученной системой (водные растворы α -казеина) проявилась в том, что даже в области разбавленных растворов наблюдается сложный неэкспоненциальный вид диффузионного затухания, который свидетельствует о наличии не одного, а спектра коэффициентов самодиффузии. Вторая особенность проявилась также в области разбавленных растворов и заключается в достаточно явной зависимости формы регистрируемого диффузионного затухания от времени выдержки образца с момента его приготовления.

Особенности изменений формы диффузионных затуханий в зависимости от времени диффузии в разбавленных и концентрированных растворах

На рисунке 10 представлены диффузионные затухания для водных растворов κ -казеина с концентрациями белка от 0,1% до 4%.

Как видно из рисунка 10, форма ДЗ представляет собой неэкспоненциальный вид, причем с увеличением концентрации κ -казеина в водном растворе происходит уменьшение значения минимального КСД. Конечно, при исследованиях α -казеина мы также наблюдали неэкспоненциальность ДЗ, и ее зависимость от концентрации. Однако, в отличие от рассматриваемой системы, в α -казеине при концентрациях порядка 2-3% не наблюдалось никаких признаков неэкспоненциальности. В то же время для κ -казеина неэкспоненциальная форма релаксационного затухания регистрируется даже для сильно разбавленного раствора белка – при концентрации 0,1%.

Таким образом, полученные данные демонстрируют ярко выраженную склонность молекул κ -казеина к ассоциации (агрегации) даже в разбавленных растворах. В принципе, это согласуется с результатами исследования [20] растворов α - и κ -казеинов методом флуоресцентной микроскопии, которые свидетельствуют о разном характере ассоциации для них.

Перейдем к рассмотрению данных по изучению зависимости формы диффузионных затуханий от времени диффузии.

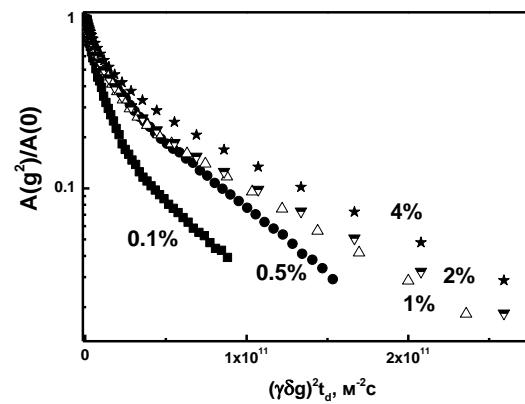


Рисунок 10 – Диффузионные затухания, полученные по спектральным линиям (от 3,61-0,16 м.д.) для белка в водных растворах при различных весовых концентрациях белка κ -казеина.

Разбавленные растворы

На рисунке 12 представлены диффузионные затухания сигнала спинового эхо протонов молекул к-казеина в водном растворе с концентрацией 0.5% при различных временах диффузии t_d . Представленные диффузионные затухания к-казеина в водном растворе при концентрации белка 0.5% носят сложный характер и описываются уравнением (2), содержащим не менее двух экспоненциальных слагаемых. Представленные диффузионные затухания к-казеина в водном растворе при концентрации белка 0.5% носят сложный характер и описываются уравнением (2) содержащим не менее двух экспоненциальных слагаемых. Из данных, представленных на рисунка 11 можно заключить, что величины среднего КСД $\langle D_s \rangle$ и минимального D_{min} не зависят от времени диффузии t_d .

Представленные диффузионные затухания к-казеина в водном растворе при концентрации белка 0.5% носят сложный характер и описываются уравнением (2), содержащим не менее двух экспоненциальных слагаемых. Из данных, представленных на рисунка 11 можно заключить, что величины среднего КСД $\langle D_s \rangle$ и минимального D_{min} не зависят от времени диффузии t_d . При этом доля молекул к-казеина, движущихся существенно медленнее основной их части, с увеличением времени диффузии уменьшается. Таким образом, зависимость формы ДЗ от времени диффузии даёт основания для утверждения о существовании в исследуемом водном растворе к-казеина с концентрацией белка 0.5% молекулярного обмена.

Как и в предыдущих главах используя подход, заключающийся анализе поведения компоненты с минимальным значением КСД, можно полагать, что значения D_{min} характеризуют трансляционную подвижность неких ассоциатов, а поведение $p_{min}(t_d)$ характеризует среднее время жизни $\langle \tau^* \rangle$ таких ассоциатов или время нахождения молекул в составе таких ассоциатов.

В итоге, зависимость, представленная на рисунке 11, хорошо аппроксимируется (прямая линия) функцией:

$$p_{min}(t_d) = p_{min}(0) \exp\left(-\frac{t_d}{\langle \tau^* \rangle}\right) \quad (9)$$

при $p_{min}(0) = 0.23 \pm 0.002$ и $\langle \tau^* \rangle = 530 \pm 60$ мс.

В рамках вышеизложенного, полученную величину $\langle \tau^* \rangle$ можно трактовать как время жизни макромолекулярных ассоциатов в исследуемой системе. Полученный нами результат самого факта наблюдения эффекта ассоциации, как уже указывалось, согласуется с данными, например, работы [21], однако мы не нашли исследований, в которых было бы оценено среднее время жизни таких молекулярных кластеров.

Действительно, согласно литературным данным [21] особенностью к-казеина является способность самоорганизовываться, причем в некоторых случаях в виде агрегатов, подобных амилоидным фибриллам [22; 23]. При этом, хотя в работе [24] и предполагается, что в механизме самоассоциации белковых молекул может базироваться на образовании межмолекулярных дисульфидных связей, представить это справедливым для рассматриваемого случая достаточно сложно. Дело в том, что $-S-S-$ связи относятся к разряду прочных химических связей. Поэтому такую гипотезу сложно согласовать с полученными данными по обмену.

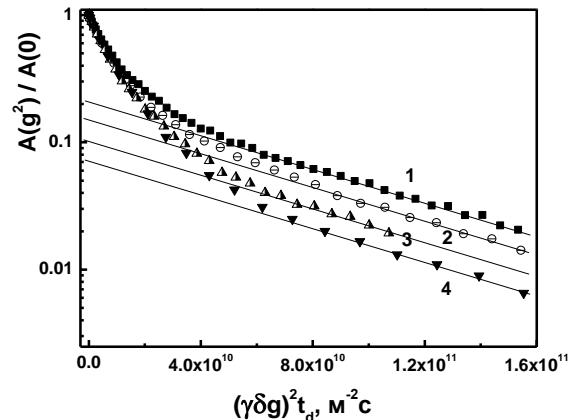


Рисунок 11 – ДЗ для к-казеина в водном растворе при весовой концентрации белка 0.5%, при разных временах диффузии: кривые 1-4 соответствуют ДЗ при временах диффузии 50, 150, 400 и 600 мс соответственно.

Мы наблюдаем результат фактически непрерывного процесса распада старых и образования новых белковых ассоциатов. Это может быть только в том случае, когда ответственные за ассоциацию межмолекулярные связи лабильны и, следовательно, относительно слабые.

Концентрированные растворы

На рисунке 12 представлены диффузионные затухания, полученные при разных временах диффузии для молекул κ -казеина в водном растворе при весовой концентрации 20%.

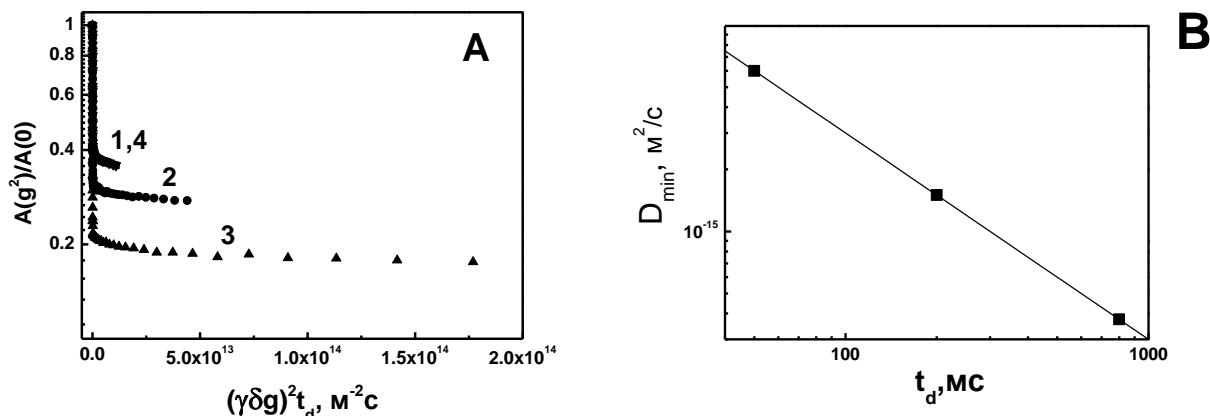


Рисунок 12 – (А) ДЗ для κ -казеина в водном растворе при концентрации белка κ -казеина 20%, при разных временах диффузии t_d : кривые 1-3 соответствуют ДЗ при t_d 50, 200 и 800 мс соответственно. Кривая 4 - соответствует «контрольному» диффузионному затуханию при t_d 50 мс, полученному после проведения экспериментов с другими значениями t_d (В) Зависимость значений минимального коэффициента самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d в водном растворе с концентрацией κ -казеина 20%.

Из сравнения кривых, представленных на рисунке 12 А видно, что форма диффузионного затухания зависит от времени диффузии t_d . Это означает, что молекулы κ -казеина в этом состоянии характеризуются независящим от времени значением среднеквадратичного смещения $\langle r^2 \rangle \sim t_d^0$, что соответствует режиму полностью ограниченной диффузии. Размер ограничений, вычисленный используя формулу (6), равен $\sqrt{\langle r^2 \rangle} \approx 42 \pm 4$ нм. Полученная величина превышает размеры самой молекулы κ -казеина, величина гидродинамического радиуса которой находится в диапазоне 3 – 4 нм [21].

Таким образом, как и в случае концентрированных растворов α -казеина, мы имеем право сделать вывод о формировании в концентрированных растворах κ -казеина надмолекулярной структуры типа сетки геля. При этом, сравнивая между собой значения полученных среднеквадратичных смещений для α -казеина (см. главу 3) и κ -казеина можно утверждать, что характеристики сетки гели не сильно различаются между собой. Кроме этого, нами были получены результаты, также свидетельствующие о лабильности формирующейся сетки геля.

Стоит отметить, что доля молекул κ -казеина, участвующих в гелеобразовании характеризуется коэффициентом самодиффузии D_{min} . На рисунке 13 показано, что при увеличении времени диффузии регистрируемая доля молекул в состоянии геля p_{min} уменьшается, что свидетельствует об обмене между «свободными» молекулами и молекулами κ -казеина находящихся в состоянии геля.

Как видим, сплошная линия на рисунке 13 представляет наилучшее соответствие уравнению вида (9) которое имеет экспоненциальный вид.

Из него легко оценить время жизни τ_g молекул в состоянии геля. Вычисленное таким образом значение среднего времени жизни молекул κ -казеина в гель фазе составляет значение 980 ± 80 мс.

Таким образом, из полученных данных следует, что в концентрированных растворах κ -казеина формируется трехмерная сетка геля, причем молекулы белка, входящие в структуру геля находятся в динамическом равновесии со свободными молекулами. Этот результат требует предположения лабильности межмолекулярных контактов. Тогда можно ожидать, что если в образец ввести некий избыточный объем растворителя, то сетка геля может со временем раствориться.

Как и в главе 2, нами был проведен «тест на обратимость» сформированной гелевой структуры. Было установлено, что в концентрированных растворах κ -казеина лабильна.

Влияние ТСЕР на трансляционную подвижность и надмолекулярную структуру в растворах κ -казеина

Данные исследования влияния ТСЕР на молекулярную подвижность κ -казеина в разбавленных растворах показали, что в среднем КСД молекул κ -казеина увеличились в результате присутствия ТСЕР. И это, не смотря на то, что при объяснении неэкспоненциальности формы диффузионного затухания для исходного раствора κ -казеина считалось маловероятным участие $-S-S-$ связей в механизме ассоциации.

Рассмотрим ситуацию с концентрированными растворами κ -казеина, в которых формируется более определенная надмолекулярная структура - структура типа геля. На рисунке 14 представлены два диффузионных затухания для концентрированных растворов κ -казеина, один из которых дополнительно содержал восстанавливающий агент в расчете 10 молекул ТСЕР на одну молекулу белка.

Как видно из сравнения приведенных на рисунке диффузионных затуханий, влияние ТСЕР оказалось существенным. При этом полностью исчезли все признаки геля. Это хорошо демонстрируется сравнением двух диффузионных затуханий, показанных на рисунке 14. Более того, как оказалось, форма ДЗ в данной системе оказалась также зависящей от времени диффузии в соответствии с признаками обмена. При этом время жизни молекул белка с малым КСД оказалось достаточно малым: всего 200 мс.

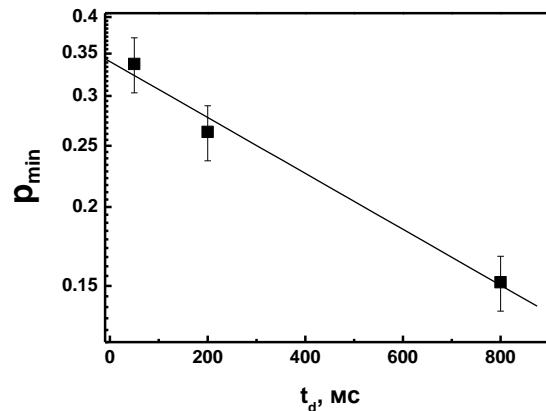


Рисунок 13 – Зависимость доли молекул p_{min} в 20% водном растворе κ -казеина с наименьшим коэффициентом самодиффузии D_{min} от времени диффузии t_d . Наилучшая аппроксимация экспериментальных данных показана сплошной линией.

формируемая трехмерная сетка геля в

концентрированных растворах κ -казеина лабильна.

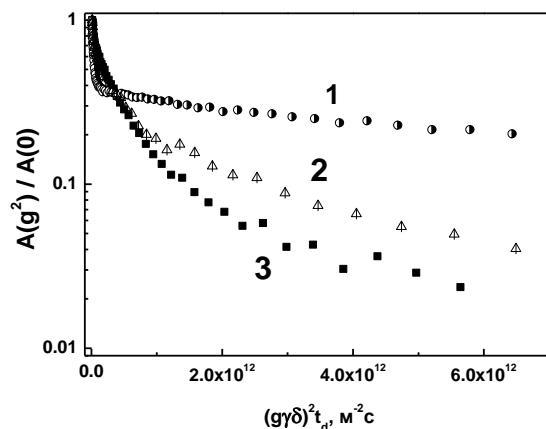


Рисунок 14 – Диффузионные затухания для κ -казеина в водных растворах при концентрации белка 20%: кривая 1 – чистый раствор белка без ТСЕР; 2 – с ТСЕР при времени диффузии 50 мс; 3 – с ТСЕР при времени диффузии 200 мс.

Зависимость средних коэффициентов самодиффузии молекул κ -казеина от концентрации белка в растворе

Одной из задач диссертации являлось установление вида концентрационных зависимостей средних коэффициентов молекул белка в растворах α - и κ -казеина. В Главе 3 было показано, что полученная для растворов α -казеина концентрационная зависимость средних коэффициентов самодиффузии молекул белка существенно отличается от опубликованных в литературе обобщенных зависимостей. Этот результат связывался с формированием в этих растворах надмолекулярной структуры, влияние которой на значения средних КСД невозможно учесть на этапе нормировки измеренных значений КСД на локальную подвижность.

Рассмотрим в связи с этим данные и для растворов κ -казеина.

На рисунке 15 представлена зависимость средних значений коэффициентов самодиффузии молекул κ -казеина в зависимости от их концентрации в растворе в относительных координатах, используемых в работах [5; 25]. Как видим, в отличие от α -казеина, обнаруживается удивительное сходство вида концентрационной зависимости для κ -казеина с опубликованной в [1] обобщенной кривой для линейных гибкоцепных макромолекул. Мы предполагаем, что это может быть связано со следующим: в κ -казеине признаки образования надмолекулярных структур наблюдаются во всей области концентраций, в то время как для α -казеина существует некая критическая концентрация в районе 2%, ниже которой никаких признаков образования надмолекулярных структур нами зафиксировано не было.

Для сопоставления полученных концентрационных зависимостей КСД молекул белка с обобщенной кривой [1] мы использовали формальную процедуру подбора значения, так называемой концентрации перекрывания $\hat{\phi}$, до достижения максимального совпадения кривых. В данном случае, для растворов α -казеина кривая на рисунке 15 построена при $\hat{\phi} = 3\%$, а для κ -казеина - при $\hat{\phi} = 18\%$. В качестве D_0 использовались значения измеренных средних КСД, экстраполированные на нулевую концентрацию.

ВЫВОДЫ

1. Впервые методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля экспериментально установлено формирование трехмерной структуры геля в концентрированных водных растворах молекул α - и κ -казеина, как представителей белков с внутренней неупорядоченной структурой. Получены оценки характерных размеров (40 – 50 нм) между узлами сетки геля.

2. Впервые по данным ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля зафиксировано и охарактеризовано состояние динамического равновесия между свободными молекулами (α - или κ -казеина) и молекулами, входящими в состав структуры геля. Получены оценки времен жизни молекул белка в составе структуры геля: $\approx 3,5$ с для α -казеина, и ≤ 1 с для κ -казеина.

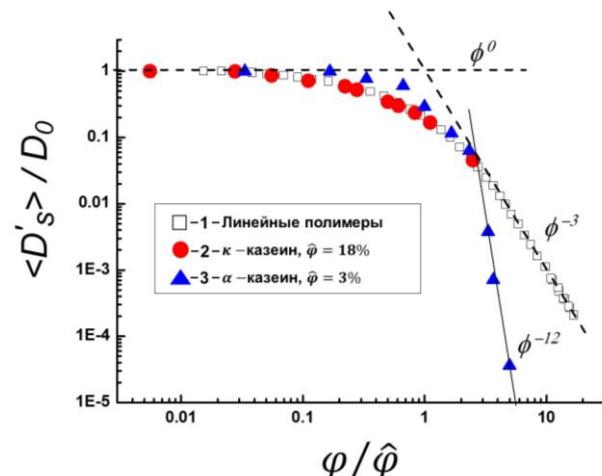


Рисунок 15 – Зависимость средних значений КСД молекул α - и κ -казеина в водных растворах в приведенных координатах в сравнении с универсальной концентрационной зависимостью коэффициентов самодиффузии макромолекул [1].

3. Установлено, что именно эффект самоорганизации, проявляющийся в системе α -казеин/вода только выше определенной критической концентрации, является причиной аномально сильной концентрационной зависимости средних значений коэффициентов самодиффузии молекул α -казеина в области высоких концентраций, не совпадающей ни с одной из известных обобщенных концентрационных зависимостей средних коэффициентов самодиффузии, ранее установленных для линейных гибкоцепных полимеров, а также для дендримеров и глобулярных белков.

4. Показано, что, в отличие от растворов α -казеина, растворы κ -казеина демонстрируют склонность к образованию лабильных надмолекулярных структур – долгоживущих ассоциатов – во всем исследованном диапазоне концентраций. Предположительно, именно по этой причине вид полученной концентрационной зависимости средних коэффициентов самодиффузии молекул κ -казеина формально совпадает с видом аналогичной обобщенной функции, характерной для линейных гибкоцепных полимеров.

5. Доказано, что в концентрированных растворах α -казеина молекулы ТСЕР, обладающие функцией восстановления –S–S– связей, активируют дополнительные химические процессы, которые приводят к образованию нелабильного и нерастворимого геля. Основной причиной такого результата предполагается формирование вторичных межмолекулярных дисульфидных связей, пространственно экранированных для дальнейшего доступа молекул ТСЕР.

6. На примере исследованных растворов α - и κ -казеина доказано, что стандартная процедура введения молекул ТСЕР в растворы белков с целью обеспечения ими функции восстановления –S–S– связей, может привести к неоднозначным результатам по воздействию на формирующуюся надмолекулярную структуру. Так в водных растворах κ -казеина молекулы ТСЕР полностью разрушают структуру, в растворах α -казеина – укрепляют.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Маклаков, А. И. Самодиффузия в расплавах полимеров Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров / А. И. Маклаков, В. Д. Скирда, Н. Ф. Фаткуллин. – Казань: Казанский университет. – 1987. – 220 с.
2. Маклаков, А.И. Самодиффузия макромолекул в растворах полимеров. / А. И. Маклаков, В. А. Севрюгин, В. Д. Скирда, Н. Ф. Фаткуллин // Высокомолекул. соед. – 1984. – Т. 26А, №12. – С. 2502-2507.
3. Скирда, В.Д. Особенности трансляционной подвижности макромолекул в расплавах и растворах полимеров / В. Д. Скирда, В. А. Севрюгин, А. И. Маклаков // Докл. АН СССР. – 1983. – Т.269, №3. – С.638-640.
4. Skirda, V. D. Translational Mobility of Macromolecules in Networks. / V. D. Skirda, I. R. Gafurov, A. I. Maklakov, M. M. Doroginitskii, G. Flyaisher // Vysokomol. Soedin. B. – 1988. – V.30. – P. 313-314.
5. Gafurov, I. R., NMR Study of the Structure of Aqueous Gelatine Gels and the Process of Their Formation. / I. R. Gafurov, V. D. Skirda, A. I. Maklakov, S. P. Perevezentseva, Y.A. Zimkin // Polymer Science U.S.S.R. – 1989. – V.31. – P. 292-300.
6. Skirda, V. D. Detection of Spatial Fluctuations of Segments in Swollen Polybutadiene Networks by Nuclear Magnetic Resonance Pulsed Field Gradient Technique / V. D. Skirda, M. M. Doroginizkij, V. I. Sundukov, A. I. Maklakov, G. Fleischer, K. G. Häusler, E. Straube // Makromol. Chem. – 1988. – V. 9, no. 9. – P. 603-607.
7. Pineda, A. O. Molecular dissection of Na^+ binding to thrombin / A. O. Pineda et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279, Iss. 30. – P. 31842-31853.
8. Åslund, F. Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation / F. Åslund, J. Beckwith // Cell. – 1999. – Vol. 96, no. 6. – P. 751-753.

9. Vogl, T. Mechanism of protein stabilization by disulfide bridges: calorimetric unfolding studies on disulfide-deficient mutants of the α -amylase inhibitor Tendamistat / T. Vogl et al. // Journal of molecular biology. – 1995. – V. 254, no. 3. – P. 481-496.
10. Rajagopalan, L. Role of intramolecular disulfides in stability and structure of a noncovalent homodimer / L. Rajagopalan, C. C. Chin, K. Rajarathnam // Biophysical journal. – 2007. – Vol. 93, Iss. 6. – P. 2129-2134.
11. Maklakov A. I. Self-diffusion in polymer system / A. I. Maklakov, V. D. Skirda, N. F. Fatkullin // Encyclopedia of fluid mechanics. – 1990. – V.9, no. 22. – P.705-745.
12. Скирда, В. Д. Самодиффузия в полимерных системах: (Исследование методом ЯМР с большими значениями импульсного градиента магнитного поля): Дис. докт. физ.-мат. наук (01.04.14) в форме научного доклада / Казань, 1992. – 58 с.
13. Byler, D. M. Raman-Spectroscopic Study of Casein Structure / D. M. Byler, H. M. Farrell, H. Susi // J. Dairy Sci. – 1988. – V.71. – P.2622-2629.
14. Swaisgood, H. E. Review and update of casein chemistry / H. E Swaisgood // Journal of dairy science. – 1993. – V. 76, no. 10. – P. 3054-3061.
15. Santarino, I. B. Protein reducing agents dithiothreitol and tris (2-carboxyethyl) phosphine anodic oxidation / I. B. Santarino, S. C. Oliveira, A. M. Oliveira-Brett // Electrochemistry Communications. – 2012. – V. 23. – P. 114-117.
16. Melnikova, D. L. Effect of Reducing Agent TCEP on Translational Diffusion and Supramolecular Assembly in Aqueous Solutions of α -Casein / D. L. Melnikova, V. D. Skirda, I. V. Nesmelova // J. Phys. Chem. B. – 2019. – V. 123. – P. 2305-2315.
17. Swaisgood, H. E. Review and update of casein chemistry / H. E. Swaisgood // Journal of dairy science. – 1993. – V. 76, no. 10. – P. 3054-3061.
18. Dery, S. Insights into the deselenization of selenocysteine into alanine and serine Chemical science / S. Dery, P. S. Reddy, L. Dery, , R. Mousa, R. N. Dardashti, N. Metanis // Chem. Sci. – 2015. – V. 6, no. 11. – P. 6207-6212.
19. Yamakawa, H. Concentration dependence of the frictional coefficient of polymers in solutions / H. Yamakawa // J. Chem. Phys. – 1962. – V.16, no. 11. – P. 2995-3001.
20. Melnikova, D. L. Effect of Intrinsic Disorder and Self-Association on the Translational Diffusion of Proteins: The Case of α -Casein / D. L. Melnikova, V. D. Skirda, I. V. Nesmelova // J. Phys. Chem. B. – 2017. – V.121, no. 14. – P. 2980-2988.
21. Ossowski, S. Aggregation behavior of bovine κ -and β -casein studied with small angle neutron scattering, light scattering, and cryogenic transmission electron microscopy / S. Ossowski, A. Jackson, M. Obiols-Rabasa, C. Holt et al. // Langmuir. – 2012. – Vol. 28, Iss. 38. – P.13577-13589.
22. Thorn D. C. et al. Amyloid fibril formation by bovine milk α s2-casein occurs under physiological conditions yet is prevented by its natural counterpart, α s1-casein // Biochemistry. – 2008. – V. 47, no. 12. – P. 3926-3936.
23. Pan, K. Amyloid-like fibrils formed from intrinsically disordered caseins: physicochemical and nanomechanical properties / K. Pan, Q. Zhong // Soft matter. – 2015. – V. 11, Iss. 29. – P. 5898-5904.
24. Rasmussen, L. K. Disulphide-linked caseins and casein micelles / L. K. Rasmussen, L. B. Johnsen, A. Tsiora et al.// Int. Dairy J. – 1999. – V.9. – P. 215-218.
25. Gafurov, I. R. Self-Diffusion and Gelation in Benzyl Alcohol Solutions of Cellulose Triacetate. / I. R. Gafurov, V. D. Skirda, A. I. Maklakov, I. I. Ryskina // Polymer Science U.S.S.R. – 1988. – V.30, Iss. 7. – P. 1644-1645.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Melnikova, D. L.** Effect of Intrinsic Disorder and Self-Association on the Translational Diffusion of Proteins: The Case of α -Casein / **D. L. Melnikova**, V. D. Skirda, I. V. Nesmelova // Journal of Physical Chemistry B. – 2017. – V.121. №14. – P. 2980-2988.
2. **Melnikova, D. L.** Effect of Reducing Agent TCEP on Translational Diffusion and Supramolecular Assembly in Aqueous Solutions of α -Casein / **D. L. Melnikova**, V. D. Skirda, I. V. Nesmelova // Journal of Physical Chemistry B. – 2019. – V.123. – P. 2305-2315.

Тезисы и материалы докладов на конференциях:

1. **Melnikova, D. L.** Investigation of α -casein translational mobility by NMR methods / **D.L. Melnikova**, I.V. Nesmelova, V.D. Skirda // Abstracts of 14th International youth school-conference «Magnetic resonance and its applications». – Saint Petersburg, 2017. – P. 82-84.
2. **Мельникова, Д. Л.** Трансляционная подвижность и надмолекулярная структура белка альфа-казеина в водных растворах / **Д.Л. Мельникова**, В. Д. Скирда // Сборник тезисов докладов XXIV Всероссийской конференции "СТРУКТУРА И ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ". – Йошкар-Ола, 2017. – С. 81.
3. **Мельникова, Д. Л.** Влияние восстановливающего агента ТСЕР на процессы гелеобразования в водных растворах белка альфа-казеина / **Д. Л. Мельникова**, В. Д. Скирда // Сборник тезисов докладов и сообщений на XXV Всероссийской конференции "СТРУКТУРА И ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ". – Йошкар-Ола: ПГТУ, 2018. – С. 85.
4. **Мельникова, Д.Л.** Трансляционная подвижность и надмолекулярная организация белков с внутренне неупорядоченной структурой (по данным ЯМР на примере альфа-казеина) [Электронный ресурс] / Материалы Международного молодежного научного форума "ЛОМОНОСОВ-2018" / Отв. ред. И.А. Аleshковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – М.: МАКС Пресс, 2018. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. – Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод DVD-ROM; Adobe Acrobat Reader. – 1450 Мб. – 11000 экз.
5. **Melnikova, D.L.** Towards an alpha-casein translational mobility by NMR / **D. L. Melnikova**, I. V. Nesmelova, V. D. Skirda // Actual problems of magnetic resonance and its application: program, lecture notes, proceedings of the XX International Youth Scientific School (Kazan, 24-29 September 2018). – Kazan: Kazan University Press, 2018. – P. 112.
6. **Melnikova, D. L.** Towards an Alpha-Casein Translational Mobility by NMR / **D. L. Melnikova**, I. V. Nesmelova, V. D. Skirda // Abstracts of the «INTERNATIONAL CONFERENCE "MODERN DEVELOPMENT OF MAGNETIC RESONANCE»». – Kazan, 2018. – P.165.

ДРУГИЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ АВТОРОМ В ОБЛАСТИ РАЗВИТИЯ МЕТОДИК И ПРИЛОЖЕНИЙ ЯМР

Статьи:

1. *Gizatullin B.I. Investigation of molecular mobility and exchange of n-hexane and water in silicalite-1 by 2D 1H NMR relaxometry / B.I. Gizatullin, Savinkov A.V., Shipunov T.V., Melnikova D.L., Doroginitsky M.M., Skirda V.D. // Magnetic Resonance in Solids. Electronic Journal. – 2018. – Vol. 20, No 1. – 18102 (9 pp.).*
2. *Мельникова Д.Л. Применение метода ядерно-магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля для исследования эмульсий в режиме спектрального разрешения / Мельникова Д.Л., Гнездилов О.И., Скирда В.Д. // Нефтяное хозяйство. – 2016. – №9. – С. 100-104.*

Патенты:

1. Пат.2679630 Российская Федерация, МПК G01V 3/14. Способ ядерного магнитного каротажа и устройство для его реализации / В.Д. Скирда, А.С. Александров, **Д.Л. Мельникова**, М.М. Дорогиницкий, О.И. Гнездилов, А.В. Брагин, В.М. Мурзакаев. – №2018118572; заявл. 21.05.2018; опубл. 12.02.2019, Бюл. №5.
2. Пат.2645909 Российская Федерация, МПК G01V 3/14. Способ ядерного магнитного каротажа и устройство для его реализации / В.Д. Скирда, **Д.Л. Мельникова**, А.С. Александров, М.М. Дорогиницкий, А.В. Брагин, В.М. Мурзакаев. – №2016151184/98; заявл. 26.12.2016; опубл. 28.02.2018, Бюл. №7.

Тезисы и материалы докладов на конференциях:

1. **Мельникова Д.Л.** Исследование процесса влагонасыщения кернов доломитов методом МРТ / Мельникова Д.Л., Кобчикова П.П. // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Достижения, проблемы и перспективы развития нефтегазовой отрасли». – Альметьевск: Альметьевский государственный нефтяной институт. – 2018. – Т.2. – С. 54-57.
2. **Melnikova D.L.** Molecular mobility of *n*-Hexane in Silicalite-1 by 2D NMR Relaxo- and Diffusometry / D.L. Melnikova, T.V. Shipunov, M.N. Makarov, H. Zhou, B.I. Gizatullin // Abstracts of the international conference Modern Development of Magnetic Resonance. – Kazan, 2016. – Р. 160-161.
3. **Мельникова Д.Л.** Исследование особенностей трансляционной подвижности и структуры СОЖ методом ЯМР // Сборник научных статей Казанского федерального университета 2016 года: сборник статей / Мин-во образования и науки; Казанский (Приволжский) федеральный ун-т. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2016. – С. 58-59.
4. **Мельникова Д.Л.** Исследование особенностей трансляционной подвижности и структуры СОЖ методом ЯМР / Д.Л. Мельникова // Сборник тезисов участников форума «Наука будущего - наука молодых». – Москва, 2016. – Т.2. – С. 338-340.
5. **Мельникова Д.Л.** Исследование трансляционной подвижности и структуры СОЖ методом ЯМР / Д. Л. Мельникова // Сборник тезисов международной конференции студентов, аспирантов, и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоновосов-2016». – М. Физический факультет МГУ, 2016. – С. 249-250.
6. **Мельникова Д.Л.** Применение методики 2D распределения времен ядерной магнитной релаксации T_1 и T_2 на примере сложных молекулярных систем / Мельникова Д.Л., Скирда В.Д., Дорогоницкий М.М., Гизатуллин Б.И. // Сборник тезисов, материалы Двадцать первой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых (ВНКСФ-21, Омск): материалы конференции, тезисы докладов: В 1 т. Т.1 – Екатеринбург - Омск: издательство АСФ России, 2015. – С. 218.
7. **Мельникова Д.Л.** Применение методики 2D распределения времен ядерной магнитной релаксации T_1 и T_2 на примере сложных молекулярных систем// Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015» / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2015. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. - Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод DVD-ROM; Adobe Acrobat Reader. ISBN 978-5-317-04946-1
8. **Мельникова Д.Л.** Визуализация двумерного измерения времён релаксации различных флюидов в пористой среде кернов / Д. Л. Мельникова, М. М. Дорогоницкий, Б. И. Гизатуллин, Т. А. Зарипов // Материалы 11-ой зимней молодежной школы-конференции Санкт-Петербургского университета с международным участием «Магнитный резонанс и его приложения». – СПб.: Б.и. – 2014. – С. 142-144.

