

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТРИПТОФАНА, ВЛИЯЮЩИЕ НА СВЕТОИНДУЦИРОВАННУЮ ДЕЗАКТИВАЦИЮ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ

Получены экспериментальные данные об обратимой светоиндуцированной дезактивации фосфоресценции триптофана в замороженных растворах молекул белков. Показано, что эффект фотодезактивации фосфоресценции триптофана в белках обусловлен взаимодействием карбонильной группы с плоскостью индольного кольца триптофана. При этом в качестве взаимодействующей карбонильной группы может выступать как собственная группа триптофанового остатка или такая группа другого аминокислотного остатка.

**Ключевые слова:** фотофизика белка, триптофан, фосфоресценция, светоиндуцированная дезактивация фосфоресценции.

### Введение

После наших первых работ [1,2] в которых был обнаружен эффект обратимого светового тушения фосфоресценции триптофана, появилось понимание основных деталей механизма фотофизических процессов, ответственных за наблюдаемый эффект. К настоящему времени получено достаточное количество экспериментальных результатов, которые позволяют утверждать что в основе механизма обратимого светового тушения фосфоресценции триптофана и его аналогов лежит взаимодействие индольного кольца триптофана с карбонильной группой, сближенной с ним на расстояние порядка 3-5 Å. В сложных молекулярных образованиях, которыми являются молекулы белка, понятие фотофизических процессов для одной из структур, входящих в состав молекулы белка, должно отличаться от понятий фотофизики одиночных небольших молекул. Триптофан входит в состав многих белков в виде триптофановых аминокислотных остатков. В данной работе исследование светового тушения фосфоресценции триптофановых остатков для разных белков проводили параллельно с изучением геометрических параметров тех структур, которые непосредственно касаются ближайшего окружения каждого триптофанового остатка.

Для геометрической интерпретации предлагаемых механизмов явления светового тушения фосфоресценции триптофана в белках использовались данные о структуре молекул, полученные из Банка Данных Белков (Protein Data Bank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В качестве инструмента для наблюдения геометрической структуры молекул использовалась программа визуализации RasMol - <http://www.openrasmol.org/>.

## Материалы и методы

Измерения фосфоресценции проводили на фосфороскопической установке, описанной в работах [1, 4], в одинаковых для всех образцов условиях. Растворы помещали в кварцевую трубку с внутренним диаметром 2 мм и замораживали до 77 К. Оптическая плотность образца не превосходила 0,2.

Для моделирования молекул и анализа особенностей их пространственной структуры использовали компьютерные программы визуализации молекул, в частности, программу *RasMol*. Структурные данные молекул в формате *PDB* получены из общедоступной международной базы данных *Protein Data Bank*.

## Результаты и обсуждение

Были проведены измерения фосфоресценции ряда молекул белков, в условиях, позволяющих наблюдать не только фосфоресценцию молекул, но также эффект тушения этой фосфоресценции при дополнительном облучении образца светом в области триплет-триплетного поглощения. Наличие во всех этих белках триптофанового ароматического аминокислотного остатка позволяло предположить, что для всех белков можно наблюдать эффект светового тушения фосфоресценции, обнаруженный нами ранее для растворов триптофана [1, 2].

Некоторые результаты таких измерений представлены в таблице 1. В ней показаны данные, характеризующие количество остатков триптофана (Trp) в молекуле белка, время затухания фосфоресценции ( $\tau$ ), а также параметр фототушения фосфоресценции ( $\delta$ ).

Наиболее интересным результатом из представленных в таблице представляется результат, полученный для сывороточного альбумина человека (САЧ). В этом белке всего один триптофановый аминокислотный остаток, однако для него параметр ( $\delta = 0,65$ ) заметно выше, чем для остальных белков (таблица).

Остальные исследованные белки имеют в своем составе больше, чем один триптофановый остаток. Поэтому интерпретация результатов эксперимента по наблюдению фосфоресценции и ее световому тушению для них должна

учитывать возможность переноса энергии между триптофановыми остатками одной и той же молекулы белка. Но перенос энергии должен скорее усиливать триптофановую фосфоресценцию белка. При этом следовало ожидать и более высокое значение параметра ( $\delta$ ). Из таблицы видно, что такое ожидание не оправдалось.

Таблица 1. Параметр фототушения фосфоресценции ( $\delta$ ) исследованных белков. Смысл других данных, представленных в таблице, указан в тексте.

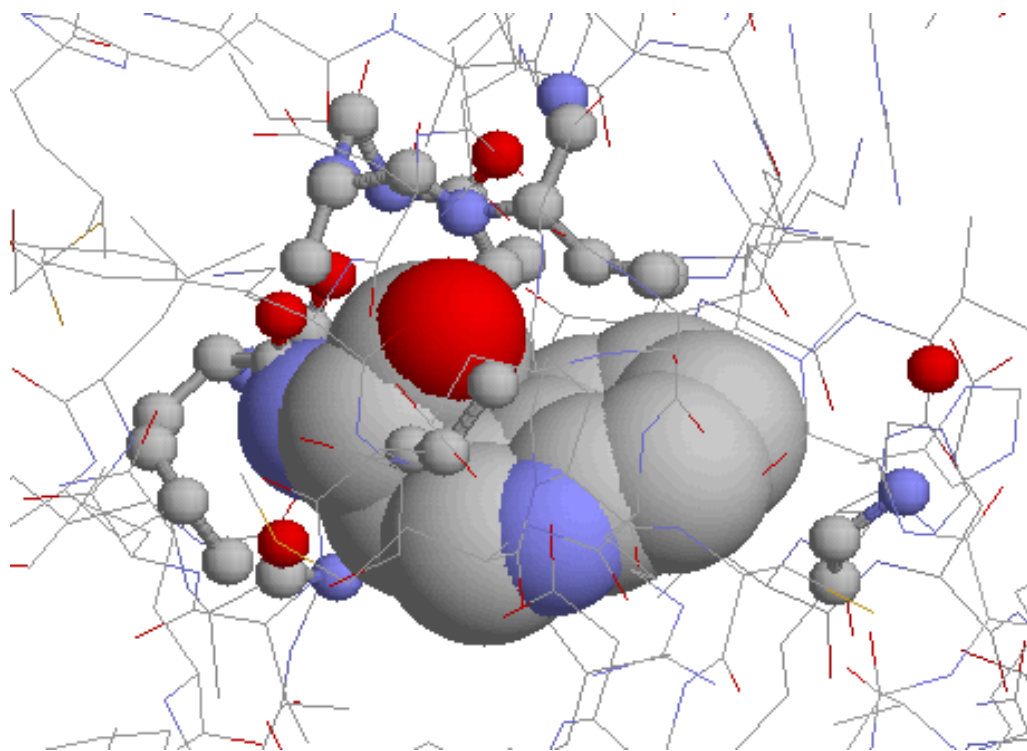
Белок	К-во Trp	$\tau$ (сек)	$\delta$
САЧ (Сывороточный альбумин человека)	1	4,2	0,65
РНКаза	2	4,0	0,33
Папаин	5	5,5	0,29
Лизоцим	5	2,2	0,52

Для понимания наблюдаемых результатов следовало рассмотреть особенности пространственной структуры фосфоресцирующих фрагментов различных белков.

В предварительных экспериментах нашей целью было убедиться, что карбонильная группа  $>C=O$  триптофана в результате вращения вокруг соответствующих одинарных связей  $C-C$  может располагаться достаточно близко от индольного фрагмента молекулы. Поскольку за оптические свойства индола ответственна сопряженная  $\pi$  - электронная система, нас интересовали такие ориентации карбонильной группы, при которых она находится **над** плоскостью индольной группы. Именно такие ориентации позволяют взаимодействовать электронам  $\pi$  - системы индола с электронами карбонильной группы. В результате исследований мы убедились, что в одной из допустимых конформаций расстояние от атома кислорода до плоскости индольного кольца составляет 2,82 Å. Ранее нами было показано [4], что в растворах индола с ацетоном или уксусной кислотой (эти небольшие молекулы содержат карбонильную группу) расстояние эффективного тушения составляло 4,6 Å.

На рис.1 показан фрагмент молекулы САЧ в окрестности триптофанового остатка Trp214. Из рисунка можно видеть, что единственная группа  $C=O$ , достаточно близкая к плоскости индольного кольца, - это собственная группа триптофанового остатка Trp214. Причем эта группа находится в конфигурации, похожей на теоретическую, полученную нами для одиночной молекулы триптофана. Таким образом, высокая эффективность фототушения триптофанового остатка Trp214 в молекуле сывороточного альбумина человека обусловлена оптимальной ориентацией атома кислорода карбониль-

ной группы Trp214 относительно индольной группы этого остатка. Для других белков, как следует из представленных в таблице данных, наличие не одного а нескольких триптофановых остатков в молекуле, не приводило к какому-либо пропорциональному увеличению исследуемого эффекта фототушения фосфоресценции.



**Рис. 1:** Фрагмент молекулы сывороточного альбумина человека (САЧ) в окрестности триптофанового остатка Trp214. Атомы аминокислотных остатков, находящихся на расстоянии не больше, чем  $5,0\text{\AA}$  от атомов Trp214, отображены как небольшие шарики. Удаленные фрагменты белка показаны схематически в виде наборов коротких линий, соответствующих длинам химических связей. Атомы, входящие в состав Trp214, отображены как сферы радиуса сил Ван дер Ваальса. Видно, что атом кислорода (красный) карбоксильной группы триптофана находится **над поверхностью** индольного кольца.

Расстояние от него до ближайшего атома индольного кольца  $3,3\text{\AA}$

Например, в молекуле РНКазы имеется два остатка триптофана (Trp10, Trp35). Однако ни параметры фосфоресценции, ни параметр фототушения фосфоресценции ( $\delta$ ) для этого белка не свидетельствовали о двукратном увеличении. Более того, эффект фототушения флуоресценции был вдвое ниже, чем для молекулы САЧ с одним триптофановым остатком.

Из данных PDB, имеющих в международной базе данных, следует, что оба остатка триптофана – Trp10 и Trp35 практически полностью находятся на поверхности молекулы и не могут взаимодействовать ни с одной из карбонильных групп белка, кроме своей карбонильной группы. Расстояния от

плоскости индольного кольца до карбонильной группы для них составляют, соответственно 3,46 Å и 3,42 Å.

На первый взгляд, наше исследование геометрии белка РНКазы в окрестности триптофановых остатков этого белка и результаты по фототушению фосфоресценции не согласуются с результатами, полученными для других белков (Таблица 1). С одной стороны, оба триптофановых остатка имеют благоприятную для фототушения фосфоресценции ориентацию индольных колец и собственных карбонильных групп. С другой стороны, коэффициент, характеризующий фототушение фосфоресценции для этого белка в нормальных условиях, заметно ниже, чем для САЧ или папаина. Однако следует приять во внимание, что оба триптофановых остатка молекулы РНКазы находятся на поверхности белковой глобулы и, следовательно, способны достаточно легко изменять свою конформацию. Видимо в условиях нашего эксперимента, реальные конформации обоих триптофановых остатков заметно отличались от конформации, представленной по данным PDB. В связи с этим нужно заметить, что рентгеноструктурные данные, на основе которых получены результаты о пространственном расположении всех атомов молекулы, получены для кристаллов белка, т.е. в условиях, когда поверхность белковой молекулы находится в достаточно специфических условиях. Для молекулы в разбавленном растворе аминокислотные остатки на поверхности белка должны быть весьма подвижны, поэтому в растворе возможны не такие конформации, как в жесткой кристаллической среде. Для решения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

В молекуле **папаина** имеется 5 остатков триптофана - Trp7, Trp26, Trp69, Trp177 и Trp181. Триптофановые остатки находятся в молекуле в виде трех отдельно расположенных групп: Trp26 и Trp69, Trp177 и Trp181, Trp7.

Из наших измерений однозначно следует, что ни для одного из триптофановых остатков папаина собственные карбонильная и индольная группы в нормальных условиях не могут эффективно взаимодействовать друг с другом. Поэтому эффективность светового тушения фосфоресценции для этого белка невысока (см. таблицу).

Триптофановый остаток Trp7, удаленный от остальных двух пар остатков на расстояние около 20 Å, практически не обменивается энергией возбуждения ни с одним из остальных четырех триптофановых остатков. В окрестности Trp7 нет ни одной группы  $-C = O$ , способной взаимодействовать с сопряженной системой электронов индольного кольца. Группа  $-C = O$ , принадлежащая этому остатку, находится в плоскости его индольного кольца, поэтому также не может участвовать в эффекте светового тушения фосфо-

ресценции. Другими словами, если даже этот остаток триптофана и дает вклад в фосфоресценцию молекулы папаина, то он не может давать вклада в эффект фототушения фосфоресценции.

Можно предположить, что внутри групп Trp26, Trp69 и Trp177, Trp181 происходит эффективный обмен энергией возбуждения. Trp26 и Trp69 расположены близко друг от друга, причем Trp69 расположен на поверхности белковой молекулы. Между ними возможен перенос энергии возбуждения по любому механизму, в частности и по обменному.

Измеренные нами расстояния от плоскости индольного кольца соответствующего триптофанового остатка до ближайших карбонильных групп других аминокислотных остатков приведены ниже (атомы O соответствующих карбонильных групп показаны рядом с каждой такой группой).

Trp69	–	Tyr67.O	5,0 Å
Trp69	–	Ser70.O	4,9 Å
Trp26	–	Ser60.O	3,5 Å
Trp26	–	Gly66.O	3,6 Å
Trp26	–	Ser24.O	4,0 Å

Из приведенных данных видно, что Trp26 может эффективно взаимодействовать с тремя карбонильными группами, принадлежащими остаткам серин-60, серин-24 и глицин-66. Trp69 способен взаимодействовать с двумя карбонильными группами, принадлежащими тирозину-67 и серину-70. Однако эффективность такого взаимодействия невысока из-за относительной удаленности соответствующих карбонильных групп (около 5 Å).

Trp177 и Trp181 расположены близко друг от друга, причем оба остатка находятся практически на поверхности белковой молекулы. Между ними также как и в случае пары Trp26 и Trp69 возможен перенос энергии возбуждения. Измеренные нами расстояния до ближайших карбонильных групп приведены ниже.

Trp177	–	Asn175.O	4,04 Å
Trp181	–	Tyr144.O	3,82 Å

В наиболее выгодной ориентации карбонильных групп по отношению к индольной группировке для светового тушения фосфоресценции находятся индольная группа Trp26.

Примечательно, что по нашим данным за взаимодействие с индольным кольцом ответственны карбонильные группы аминокислотных остатков, удаленных по первичной последовательности от фосфоресцирующего триптофанового остатка. За их пространственное сближение ответственна вторичная и третичная структуры белка. Видимо, именно с этим фактором связано рез-

кое усиление эффекта светового тушения фосфоресценции при изменении рН среды. Хорошо известно, что изменение рН среды приводит к существенным перестройкам вторичной и, особенно, третичной структуры белков. Таким образом, из этих данных следует, что изменение эффекта светового тушения фосфоресценции позволяет регистрировать изменение структуры белковой молекулы. Но это означает, что фототушение фосфоресценции триптофановых остатков белков может использоваться как метод наблюдения за пространственными перестройками таких молекул.

В молекуле **лизоцима** имеется 6 остатков триптофана (Trp28, Trp62, Trp63, Trp108, Trp111, Trp123). С учетом достаточно малых размеров молекулы (30x40 Å) триптофановые группы расположены компактно.

Ниже представлены данные о расположении ближайших атомов кислорода карбонильных групп, расположенных **над** плоскостью индольного кольца каждого из остатков триптофана.

Trp28	– Leu17.O	4,00 Å
Trp62	– Arg61.O	4,03 Å
Trp63	– Arg62.O	4,11 Å
Trp108	– Ala107.O	4,42 Å
Trp111	– Trp111.O	3,46 Å
Trp111	– Met105.O	3,25 Å
Trp123	– Val29.O	4,97 Å

Из представленных результатов измерений видно, что в особом положении находится только один остаток триптофана - Trp111. В этом остатке собственная карбонильная группа ориентирована так, что она способна взаимодействовать с плоскостью своего индольного кольца. Аналогичная ситуация наблюдалась для САЧ. Видимо такая конфигурация атомов триптофанового остатка является наиболее выгодной для осуществления фототушения фосфоресценции. Кроме того, для этой молекулы возможно одновременное взаимодействие индольного кольца триптофанового остатка TRP111 двумя карбоксильными группами: собственной и карбоксильной группой метионина105 (Met105). Видимо результатом такого одновременного взаимодействия и является короткое время жизни фосфоресценции для этого белка - 2,2 сек. Для остальных представленных в таблице белков это время вдвое больше. Исследование деталей фотофизических процессов в этом белке необходимо продолжить.

## Выводы

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о важной роли карбонильных групп в процессах световой дезактивации триплетного состояния триптофанового аминокислотного остатка молекул белков. Выполнены оценки оптимального расстояния от плоскости индольной группы триптофанового остатка белка до атома кислорода карбонильной группы того же остатка белка или карбонильных групп других ближайших аминокислотных остатков белка. По нашим оценкам такое расстояние не должно превышать 4 Å.

## Литература

1. Львов К.М., Кузнецов С.В., Костиков А.П. Обратимое снижение интенсивности фосфоресценции триптофана при действии света в области триплетного поглощения при 77К. Биофизика. 1993. Т. 38. С. 568–573.
2. Львов К.М., Кузнецов С.В., Костиков А.П. Кинетическая модель обратимого снижения заселенности триплетного состояния триптофана при действии света. Биофизика. 1993. Т. 38. С. 574–579.
3. Kostikov A.P. Light induced deactivation of tryptophan phosphorescence in proteins. Biophysical Journal. 2003. Vol. 84. p. 500A.
4. Костиков А.П. Светоиндуцированная дезактивация фосфоресценции триптофана, роль карбонильной группы в механизме этого явления. Збірник наукових праць фізико-математичного факультету ДДПУ. 2018. Вип. 8. С. 65–70.

---

### Kostikov Alexander P.

Donbas State Pedagogical University, Slovians'k, Ukraine.

#### **Structural particular qualities of tryptophan influencing on the light induced deactivation of proteins phosphorescence.**

Experimental data on the reversible light-induced deactivation of tryptophan phosphorescence in frozen solutions of protein molecules were obtained. It was shown that the photo deactivation of phosphorescence of tryptophan in proteins is due to the interaction of the carbonyl group with the plane of the indole ring of tryptophan. At the same time, as an interacting carbonyl group, it can act as an own group of the tryptophan residue or such a group of another amino acid residue.

**Keywords:** *protein photophysics, tryptophan, phosphorescence, light-induced deactivation of phosphorescence.*