

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИКАЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БЫКА СТРУКТУРНЫМИ АНАЛОГАМИ ХЛОРАМИНА ТАУРИНА

© 2017 г. Д.И. Рощупкин* **, К.В. Буравлева**, М.А. Мурина**, В.И. Сергиенко**

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1а;

**Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

E-mail: marina_murina@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.16 г.

Изучено влияние хлорамина таурина и его структурных аналогов, относящихся к антитромбоцитным агентам, на третичную структуру сывoroточного альбумина быка путем регистрации изменений его спектров флуоресценции. Альбумин был выбран как модель экстраклеточной части пуринового рецептора P2Y₁₂ в тромбоцитах. Для обнаружения слабых спектральных сдвигов флуоресценции белка использован показатель, который представляет собой отношение двух светосумм, измеренных от приблизительно середины спектра до коротковолновой и длинноволновой границ его регистрации. N-Хлортаурин и его аналоги N-ацетил-N-хлортаурин и N-изопропил-N-хлортаурин при введении в раствор альбумина в эквимольной концентрации вызывают ослабление и длинноволновый сдвиг триптофановой флуоресценции белка, что указывает на преобразование его третичной структуры, влекущее за собой изменение свойств микроокружения остатков триптофана, прежде всего Trp134. Все это, скорее всего, обусловлено ковалентной модификацией сульфгидрильной группы остатка Cys34. Предполагается, что хлорамины таурина способны ингибировать активность рецептора АДФ P2Y₁₂ в тромбоцитах за счет модификации сульфгидрильной группы, при этом ингибирующее влияние на центр связывания АДФ имеет аллостерический характер.

Ключевые слова: альбумин быка, конформация, флуоресценция, триптофан, хлорамин таурина, сульфгидрильная группа, рецептор P2Y₁₂.

Хлорамины таурина (2-аминоэтансульфоновой кислоты) и аминокислот ингибируют функциональную активность тромбоцитов, прежде всего их агрегацию (антитромбоцитное, антиагрегантное действие) [1–3]. Поскольку эти хлорамины образуются в организме при активации фагоцитов, их относят к природным соединениям. Среди аминокислотных хлораминов для хлорамина таурина характерна собственная повышенная устойчивость [4–8]. Поэтому представляет интерес создание структурных аналогов хлорамина таурина, которые имеют достаточную устойчивость, могли бы выступать в качестве перспективных ковалентных ингибиторов тромбоцитов.

Изучение модификации различных клеток показало, что в крови антитромбоцитное действие хлораминов аминокислот и таурина избирательно. Это выражается в том, что при сильном ингибировании функций тромбоцитов

другие клетки крови не изменяются в заметной степени [2,6]. В предыдущих работах было высказано предположение о том, что антитромбоцитное действие хлораминов аминокислот и таурина является результатом ковалентной модификации поверхностных белковых мишеней [3,9]. В категорию таких мишеней прежде всего следует включить пуриновый рецептор P2Y₁₂ (рецептор АДФ). В клинической практике для предупреждения артериальных тромбозов применяют тиенопиридиновые ингибиторы тромбоцитов (клопидогрел, прасугрел), у которых антиагрегантную активность проявляет тиольный метаболит. Он реагирует с сульфгидрильной группой рецептора P2Y₁₂ с образованием смешанного дисульфида, и в этом заключается молекулярный механизм действия тиенопиридиновых ингибиторов тромбоцитов [10,11].

Антитромбоцитная активность хлораминов аминокислот и таурина определяется хлораминной группой атомов. Эта группа способна химически модифицировать в белках доступные

Сокращения: БСА – сывoroточный альбумин быка.

сульфгидрильные группы остатков цистеина и доступные сульфидные группы остатков метионина [5,6,12–15]. Недавно опубликована пространственная структура пуринового рецептора P2Y₁₂ [16,17]. Его внеклеточная часть вблизи центра связывания АДФ имеет сульфгидрильную группу цистеина и сульфидную группу метионина [16,17]. Поэтому при анализе механизма действия хлораминов аминокислот и таурина на рецептор АДФ P2Y₁₂ необходимо принимать во внимание модификации и остатка цистеина, и остатка метионина. Следует ожидать, что при указанной модификации инактивация рецептора P2Y₁₂ должна быть следствием изменения его конформации, поскольку отмеченные серосодержащие аминокислоты не входят в центр связывания АДФ.

Сейчас изучение такого механизма возможно с использованием модельного белка. Наиболее подходящей моделью экстраклеточной части пуринового рецептора P2Y₁₂ может быть сывороточный альбумин быка. Близко к поверхности его молекулы имеется свободный остаток цистеина (Cys34) и остатки метионина [18]. Известно, что с этими остатками взаимодействуют многие реактивные оксиданты [19–22]. С другой стороны, в молекулу сывороточного альбумина быка (БСА) входят два остатка триптофана, которые, как известно, сравнительно легко изучать с помощью спектрофлуориметрии в ультрафиолетовой области спектра. Один из них (Trp134), расположенный близко к поверхности молекулы белка в субдомене IB, доступен для растворителя [18]. Второй остаток триптофана (Trp213), находящийся в субдомене ПА, значительно погружен внутрь, как и единственный остаток триптофана в молекуле сывороточного альбумина человека [23]. Судя по рентгеноструктурным данным [18], определенная доступность Trp213 извне возможна. Изменение флуоресцентных характеристик остатков триптофана в белках вообще [24,25] и в сывороточных альбуминах в частности [26,27] часто используют в качестве показателя модификации конформации белковых молекул.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы методом регистрации спектров триптофановой флуоресценции обнаружить изменения под действием хлорамина таурина и его структурных аналогов конформации БСА как модели экстраклеточной части рецептора P2Y₁₂ в тромбоцитах. Показателями изменения конформации молекул БСА могут быть интенсивность флуоресценции и ее спектральное распределение.

В работе были поставлены следующие конкретные задачи: 1) исходя из того, что кван-

товый выход флуоресценции остатков триптофана зависит от конформации молекул белка, провести анализ изменения интенсивности и светосуммы флуоресценции сывороточного альбумина быка под действием N-хлортаурина и его N-алкильных и N-ацильных структурных аналогов; 2) выяснить возможность изменения спектрального положения флуоресценции сывороточного альбумина быка при взаимодействии с хлорамином таурина и его структурными аналогами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коммерческие препараты сывороточного альбумина быка (Sigma, США), гипохлорита натрия (Sigma-Aldrich, США) и неорганических солей (Fluka, Швейцария). Хлорамин таурина, его алкильные и ацильные аналоги получали путем введения гипохлорита натрия в водные растворы таурина, N-ацетилтаурина и N-изопропилтаурина, молярная концентрация которых превышала концентрацию гипохлорита на 10%. Образование хлорамина таурина и N-хлоризопропилтаурина контролировали спектрофотометрически по наличию в их спектрах поглощения максимумов соответственно при 252 и 265 нм. Спектры поглощения хлораминов снимали на спектрофотометре DU-720 (Beckman-Coulter, США). Концентрации гипохлорита натрия и хлораминовых производных таурина определяли методом йодометрического титрования.

Раствор БСА исходно готовили в концентрации 4 мМ в воде, затем разводили забуференным физиологическим раствором (рН 7,4) до необходимой концентрации. Хлорамины, растворенные в воде, в объеме 50 мкл добавляли к 1,95 мл раствора БСА. Конечная концентрация белка составляла 16 мкМ. В контроле вместо хлораминов вводили воду. Инкубацию образцов БСА с хлораминами проводили при комнатной температуре.

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре SM 2203 («Солар», Беларусь) с использованием кюветы толщиной 1 см, флуоресценцию регистрировали под углом 90° относительно направления распространения возбуждающего света. Длины волн возбуждения флуоресценции 280 или 290 нм. Спектральная ширина полос возбуждения и регистрируемой флуоресценции составляла 1 нм. Первоначально спектр получали в виде электронной таблицы, значения интенсивности флуоресценции считывали через 0,2 нм. Таблицу экспортировали в формате, доступном для обработки с помощью Microsoft Excel. Приближенную величину

площади, ограниченной значениями интенсивности и длин волн, находили по формуле трапеций. Эта площадь была мерой светосуммы флуоресценции.

Хлорамин таурина и его аналоги поглощают ультрафиолетовое излучение в области поглощения белка [28] и, следовательно, при введении в образец БСА могут ослаблять флуоресценцию в результате эффекта внутреннего экранирования. Для оценки снижения интенсивности флуоресценции БСА в результате внутреннего экранирования, возникающего за счет хлораминов, использовали известную общую формулу, которая описывает суммарный поток флуоресценции, распространяющейся по всем направлениям. В случае чистого образца и образца в присутствии экранирующего соединения имеем формулы (1) и (2):

$$F_0 = q\Phi(1 - \exp(-D \ln 10)), \quad (1)$$

$$F = q\Phi D(1 - \exp(-(D + D_s) \ln 10)) / (D + D_s). \quad (2)$$

Здесь, применительно к БСА, F_0 и F – потоки флуоресценции чистого образца белка и флуоресценции в присутствии хлораминов (экранирующих соединений); Φ и q – поток возбуждающего света, падающего на образец, и квантовый выход флуоресценции, являющиеся постоянными величинами; D и D_s – оптическая плотность чистого образца БСА и оптическая плотность, обусловленная хлораминном. Отношение рассматриваемых потоков флуоресценции определяется величинами D и D_s .

Эксперименты с действием на БСА каждого хлорамина было повторены несколько раз. Количество таких экспериментов в случае N-хлортаурина, N-ацетил-N-хлотаурина и N-изопропил-N-хлортаурина составило соответственно 3, 4 и 5. Полученные данные приведены в виде средних арифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок. В каждом эксперименте спектры флуоресценции опытных и контрольных образцов белка измеряли парно. Поэтому в случае N-хлортаурина (небольшое количество повторных опытов) статистический анализ данных проведен с помощью парного t -критерия Стьюдента. При исследовании других хлораминов статистическую обработку данных проводили, как правило, с помощью непарного t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружение спектрального смещения флуоресценции альбумина посредством измерения светосумм. Изменение микроокружения ос-

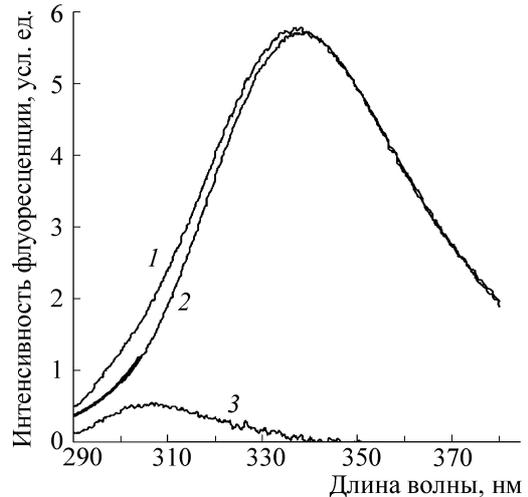


Рис. 1. Спектры флуоресценции сывороточного альбумина быка (16 мкМ) при ее возбуждении на длине волны 280 нм (кривая 1) и 290 нм (кривая 2). Интенсивности нормированы при 350 нм. Жирный участок кривой 2 (диапазон 290–304 нм) – значения интенсивностей получены путем экстраполяции. Кривая 3 – разность кривых 1 и 2, которая приближенно описывает спектр флуоресценции остатков тирозина.

татков триптофана в белках может приводить не только к изменению интенсивности флуоресценции, но и спектрального распределения интенсивностей [24]. Спектр флуоресценции БСА представляет собой широкую полосу, максимум слабо выражен [29] (см. также рис. 1). Поэтому обнаружение небольшого спектрального сдвига флуоресценции БСА прямым измерением длины волны максимума затруднительно. Известен способ исследования небольших смещений (предел 0,1 нм) спектров флуоресценции белков, который состоит в нахождении отношения интенсивностей, измеренных в середине коротковолнового и длинноволнового склонах спектра [25]. Использование этого способа в наших опытах вследствие наличия заметных шумов не представляется возможным. С целью снижения влияния шумов мы изучили возможность обнаружения спектральных сдвигов флуоресценции БСА, используя отношение не интенсивностей, а светосумм. В зависимости от длины волны возбуждения интенсивность флуоресценции непосредственно измеряли в области 290–380 нм (возбуждение 280 нм) или в области 300–380 нм (возбуждение 290 нм). Находили две светосуммы, рассчитываемые примерно от середины спектра флуоресценции: коротковолновую светосумму (S_1) для области 291–339,6 нм (возбуждение 280 нм) или 301–339,6 нм (возбуждение 290 нм) и длинноволновую светосумму (S_2) для области 339,8–379 при

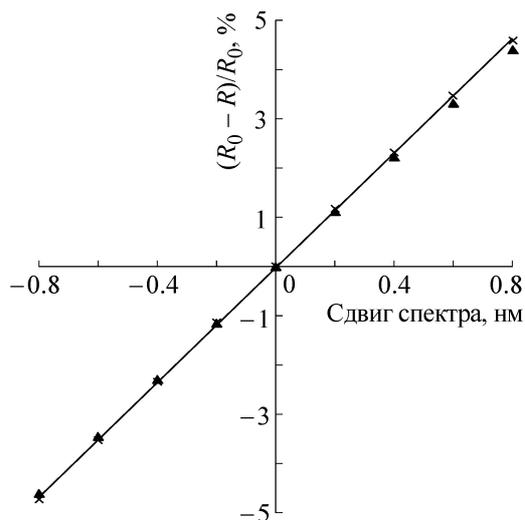


Рис. 2. Влияние сдвига спектра флуоресценции БСА на соотношение светосумм, рассчитываемых от середины спектра до коротковолновой (S_1) и длинноволновой (S_2) границ. $R = S_1/S_2$; S_1 — светосумма флуоресценции в области 291–339,6 нм (возбуждение 280 нм) или 301–339,6 нм (возбуждение 290 нм); S_2 — светосумма в области 339,8–379 нм; R_0 — исходное отношение. Треугольники и крестики — данные при длинах волн возбуждения 280 и 290 нм соответственно.

обеих длинах волн возбуждения. Светосуммы рассчитывали для измеренного спектра и после его смещения в красную или синюю области с шагом 0,2 нм. В качестве показателя спектрального смещения флуоресценции мы выбрали величину $(R_0 - R)/R_0$; $R = S_1/S_2$, R_0 — исходное значение отношения.

На рис. 2 видно, что уже при незначительных смещениях спектра, составляющих менее 1 нм, и в красную область (положительные значения сдвига) и в синюю (отрицательные значения сдвига) наблюдается значительное изменение выбранного показателя. Обращает на себя внимание тот факт, что показатели сдвига при длинах волн возбуждения 280 и 290 нм почти не отличаются. Проблема в том, что коротковолновая часть спектра обусловлена свечением не только остатков триптофана, но и тирозилов; при этом вклад тирозилов больше в случае возбуждения при 280 нм. Для оценки этого вклада в условиях наших опытов спектры (рис. 1), измеренные при возбуждении длинами волн 280 (кривая 1) и 290 (кривая 2, область прямых измерений 300–380 нм) нм, нормировали по интенсивности при 350 нм, когда свечением тирозина можно пренебречь. Далее для спектра флуоресценции, возбуждаемой при 290 нм, находили в диапазоне 312–304 нм зависимость интенсивности от длины волны (экспоненциальная линия тренда) и по этой зави-

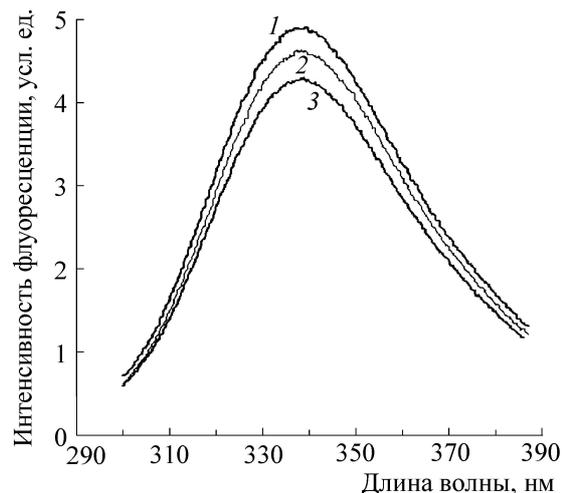


Рис. 3. Изменение спектра флуоресценции сывороточного альбумина быка под действием N-хлор-таурина. Кривая 1 — чистый раствор белка (16 мкМ), кривые 2 и 3 — растворы белка в присутствии соответственно 16 и 160 мкМ N-хлор-таурина. Возбуждение флуоресценции при 290 нм, инкубация приблизительно 3 мин.

симости рассчитали интенсивности флуоресценции остатков триптофана в интервале 304–290 нм. В результате был получен приближенный спектр флуоресценции остатков триптофана БСА, начиная с 290 нм (рис. 1, кривая 2). Спектр флуоресценции остатков тирозина при возбуждении длиной волны 280 нм был получен в виде разницы между кривыми 1 и 2. В области 290–339,6 нм светосумма флуоресценции тирозилов составила небольшую долю суммарной светосуммы, всего лишь около 9,5%. Надо полагать, что этим объясняется незначительное влияние флуоресценции тирозилов на показатель смещения спектра флуоресценции БСА.

Ослабление флуоресценции альбумина. Хлорамин таурина вызывает заметное снижение интенсивности флуоресценции белка уже при молярном соотношении 1:1. При увеличении концентрации хлорамина в 10 раз эффект усиливается, ослабление флуоресценции в максимуме спектра составляет около 13% (рис. 3). Примерно такое снижение интенсивности флуоресценции БСА под действием хлорамина таурина было отмечено ранее. Измерения флуоресценции, возбуждаемой при 295 нм, проведены при концентрации белка 50 мкМ, концентрации хлорамина таурина 500 мкМ [27]. Поскольку хлорамин таурина поглощает свет, возбуждающий флуоресценцию, необходимо учесть тривиальное влияние хлорамина по механизму внутреннего экранирования. Если хлорамин таурина не расходуется, то согласно расчетам (см. раздел «Материалы и методы»), снижение

интенсивности флуоресценции белка за счет внутреннего экранирования в условиях наших опытов должно быть менее 5%.

Уменьшение интенсивности флуоресценции БСА под влиянием хлорамина таурина меньше выражено в коротковолновой области спектра, где флуоресцируют тирозилы (рис. 3). Поэтому можно считать, что хлорамин оказывает влияние в основном на флуоресценцию остатков триптофана.

Ослабление флуоресценции БСА, вызываемое структурными аналогами хлорамина таурина N-ацетил-N-хлортаурином и N-изопропил-N-хлортаурином, было изучено с использованием светосуммы. Определяли зависимость светосуммы флуоресценции белка от концентрации хлораминов и длительности инкубации при комнатной температуре (рис. 4). Контрольные образцы раствора белка инкубировали в тех же условиях, что и его смеси с хлораминами. При инкубации чистого раствора белка наблюдалось некоторое ослабление флуоресценции, усиливающееся с ростом длительности инкубации. Причина этого не вполне ясна. Важно, что оба структурных аналога хлорамина таурина ослабляли во всех случаях флуоресценцию белка. Уменьшение светосуммы достигало примерно 20% при концентрации N-ацетил-N-хлортаурина 160 мкМ (молярное соотношение белка к хлорамину 1:10) и инкубации 60 мин (рис. 4а). В случае N-изопропил-N-хлортаурина при тех же условиях светосумма флуоресценции БСА снижалась несколько меньше (рис. 4б).

Сдвиг спектра флуоресценции альбумина. Влияние хлораминов таурина на спектральное положение флуоресценции БСА зависело сложным образом от их концентрации и длительности инкубации с белком. Как видно из таблицы, при одинаковой концентрации хлораминов и белка, равной 16 мкМ, показатель смещения спектров флуоресценции имел положительные значения примерно от 1,4 до 3 (за исключением хлорамина таурина при инкубации с белком 60 мин). Согласно рис. 2, эти данные свидетельствуют о том, что в указанных условиях исследованные хлорамины вызывают сдвиг спектров флуоресценции БСА в длинноволновую область на 0,24–0,5 нм.

Увеличение концентрации хлораминов в 5 и 10 раз приводило к уменьшению показателя смещения спектров (таблица). Кроме того, проявлялось различие в эффектах N-изопропил-N-хлортаурина и N-ацетил-N-хлортаурина при их инкубации с белком в течение 60 мин. Первое соединение по-прежнему приводило к смещению спектра в длинноволновую область, хотя и в меньшей степени. В то же время N-ацетил-

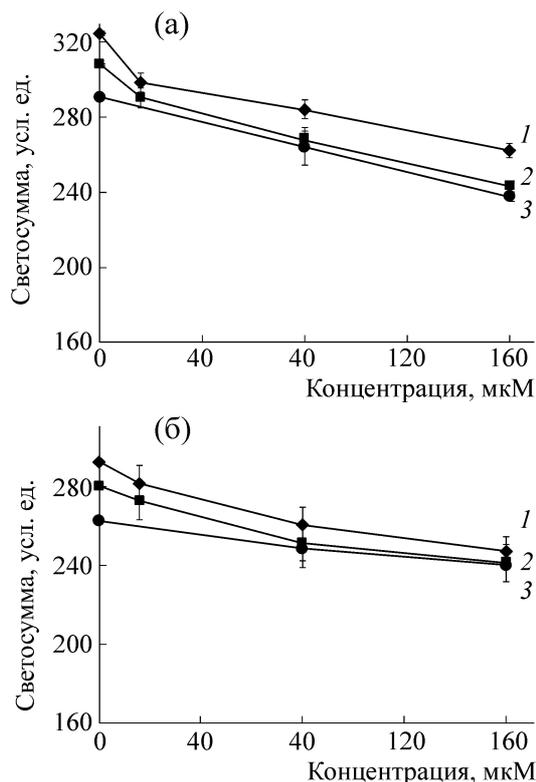


Рис. 4. Изменение светосуммы флуоресценции БСА (в диапазоне 290–380 нм) в присутствии N-ацетил-N-хлортаурина (а) и N-изопропил-N-хлортаурина (б). Кривые 1, 2 и 3 – инкубация в течение 3, 20 и 60 мин соответственно; возбуждение флуоресценции при 280 нм.

N-хлортаурин вызывал сдвиг спектра в сторону меньших длин волн. В широком плане можно заключить, что механизм модификации структуры БСА хлораминами таурина изменяется по мере увеличения их концентрации и длительности действия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что броламиновые производные аминокислот, таурина, сукцинимид, а также некоторые хлорамины, например N-хлорсукцинимид, химически модифицируют доступные остатки триптофана в белках [27,30,31]. Важно подчеркнуть, что ослабление флуоресценции БСА под действием изученных хлораминов – N-хлортаурина, N-изопропил-N-хлортаурина и N-ацетил-N-хлортаурина – не является результатом прямой химической деструкцией остатков триптофана и тирозина. Это, во-первых, следует из того, что триптофан и тирозин в чистых растворах, если и реагируют, то очень медленно с хлорамин таурина. Во-вторых, надо учесть, что флуоресценция доступного триптофанила

Изменение спектра флуоресценции БСА в результате его инкубации с хлорамином таурина (возбуждение при 290 нм) и его структурными аналогами (возбуждение при 280 нм)

Соединение	Длительность инкубации, мин	$(R_0 - R)/R_0, \%$		
		Концентрация хлорамина, мкМ		
		16	80	160
N-Изопропил-N-хлортаурин	3	1,39 ± 0,63*	0,28 ± 0,277	-0,1 ± 0,186
	20	2,51 ± 0,635*	0,47 ± 0,423	0,39 ± 0,177
	60	3,08 ± 0,534*	1,23 ± 0,514*	0,85 ± 0,305*
N-Хлортаурин	3	1,41 ± 0,278*	-	0,43 ± 0,439
	60	-0,61 ± 1,125	-0,333 ± 0,445	-0,77 ± 0,668
N-Ацетил-N-хлортаурин	3	2,11 ± 0,647*	0,3 ± 0,721	0,95 ± 0,206
	20	2,06 ± 0,378*	-0,94 ± 0,728	0,56 ± 0,073
	60	1,68 ± 0,501*	-2,96 ± 0,442*	-1,71 ± 0,515

Примечание. R_0 и R – отношение светосуммы флуоресценции в области 290–339,4 нм к светосумме в области 339,6–380 нм в контроле и в присутствии хлорамина. Звездочкой отмечены данные, достоверно отличающиеся от контроля.

Trp134 составляет большую часть флуоресценции белка. Поэтому при прямом разрушении указанного остатка триптофана флуоресценция БСА при высоких концентрациях хлораминов должна ослабляться в несколько раз, как это наблюдается при действии на БСА N-бромтаурина [27,31]. Однако в действительности это не происходит (рис. 3,4). Выходит, что изменения флуоресценции БСА под влиянием хлорамина таурина и его структурных аналогов в виде снижения интенсивности и спектрального сдвига, обнаруживаемые уже при небольшом молярном соотношении белка и хлораминов, отражают изменение пространственной структуры белка. Наиболее вероятно, что оно заключается в преобразовании третичной структуры. Такого типа явление известно при связывании белком ряда лигандов [32–34].

Можно полагать, что при небольшой концентрации хлораминов таурина в основном мы наблюдали изменения флуоресценции остатка Trp134 в субдомене IV, а не Trp213 в субдомене IIА. В пользу этого говорят литературные данные, полученные при изучении действия хлорамина Т на флуоресценцию триптофанила в субдомене IIА сывороточного альбумина человека. Этот хлорамин тоже способен модифицировать остатки цистеина и метионина. Показано, что при молярном соотношении 1:7 белка и хлорамина Т и инкубации их смеси в течение 60 мин изменение флуоресценции не происходит [35].

Изменение третичной структуры БСА под влиянием исследуемых хлораминов таурина прежде всего может быть результатом ковалентной модификации сульфгидрильной груп-

пы Cys34. В других работах уже показано окисление этой группы хлорамином таурина; оно характеризуется стехиометрическим соотношением 1:1 [19]. С другой стороны, известно, что при химической модификации сульфгидрильной группы Cys34, располагающегося в субъединице IA, происходит изменение конформации БСА, затрагивающее удаленные участки белка. Например, при образовании смешанного дисульфида в реакции цистеина в БСА с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой усиливается связывание пальмитиновой кислоты [36]. Вблизи одного из мест связывания жирных кислот – кармана FA1, находящегося в субъединице IV – располагается остаток Trp134. Можно полагать, что изменение структуры этого кармана связывания индуцирует трансформацию физико-химических свойств вокруг остатка триптофан. Следует подчеркнуть, что обсуждаемая трансформация третичной структуры БСА относится к аллостерическому типу. Дело в том, что остатки Cys34 и Trp134 в молекуле БСА пространственно значительно удалены друг от друга; согласно нашим наблюдениям, расстояние между ними составляет приблизительно 1,8 нм (доступ 4F5S в базе PDB, программа RasWin Molecular graphics).

На основании всех этих данных можно полагать, что действительно при небольших концентрациях (16 мкМ) БСА и хлораминов таурина изменение третичной структуры белка, обнаруживаемое по ослаблению флуоресценции (рис. 3) и ее длинноволновому сдвигу (таблица), является результатом начального превращения боковой группы ($-\text{CH}_2\text{SH}$) остатка Cys34. Это превращение представляет собой S-гидроксили-

рование сульфгидрильной группы. Такая реакция Cys34 при действии реактивных оксидантов на сывороточные альбумины хорошо известна [20,22]. Белок при этом приобретает сульфеновую кислотную группу $-\text{CH}_2\text{SOH}$.

Достоверный спектральный сдвиг флуоресценции БСА в красную сторону не наблюдается при повышенной концентрации (80 и 160 мкМ) хлораминов таурина и при небольшой длительности (3 и 20 мин) их инкубации с белком (таблица). Другими словами, в указанных условиях происходит обратный сдвиг спектра флуоресценции белка в сравнении с концентрацией 16 мкМ. Причиной этого должны быть иные взаимодействия хлораминов с белком. В круг таких взаимодействий, во-первых, могут входить вторичные реакции хлораминов с боковой группой цистеина с образованием последовательно сульфеновой ($-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{H}$) и сульфеной ($-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$) кислотных групп. Во-вторых, возможно, что на флуоресценцию остатков триптофана влияет медленный процесс превращения боковой группы доступных остатков метионина ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$) в сульфоксидную группу ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_3$). Такие превращения остатка цистеина в белках под действием оксидантов описаны в литературе [37–39].

В случае действия на БСА N-ацетил-N-хлортаурина обнаруживается особый эффект при его повышенной концентрации и длительной инкубации 60 мин: спектр флуоресценции белка смещается в коротковолновую область относительно контроля (таблица, нижняя строка). Одно из объяснений этой особенности взаимодействия N-ацетил-N-хлортаурина с БСА – связывание части хлорамина с белком без его химической модификации. Сдвиг спектра флуоресценции БСА в коротковолновую область длин волн описан при связывании перфтороктансульфеновой или перфтороктановой кислот при молярном соотношении свыше двух [29]. Ранее спектрофотометрическим методом мы обнаружили изменение конформации БСА при введении в его раствор N,N-дихлортаурина в молярном соотношении 1:15. В дифференциальном спектре поглощения, т.е. зависимости разности оптической плотности смеси и чистого белка от длины волны, быстро проявлялся ряд максимумов ароматических аминокислот, которые характерны для сдвига спектра поглощения в красную область длин волн. Было предположено, что БСА способен связывать N,N-дихлортаурин [40].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что хлорамины таурина (N-хлортаурин, N-ацетил-N-хлортаурин и N-хлор-N-изопропилтаурин) при введении в раствор

БСА в эквимольной концентрации вызывают ослабление и длинноволновый сдвиг триптофановой флуоресценции белка без деструкции триптофанилов. Эти эффекты можно трактовать как свидетельство преобразования третичной структуры БСА, влекущее за собой изменение свойств микроокружения остатков триптофана, прежде всего Trp134. Изменение структуры белка в указанных условиях обусловлено начальной модификацией сульфгидрильной группы цистеина-34, с которой хлорамины таурина быстро реагируют. При повышенных концентрациях хлораминов таурина характер трансформации структуры БСА существенно меняется. Можно предполагать, что хлорамины таурина способны ингибировать активность рецептора P2Y12 в тромбоцитах путем ковалентной модификации сульфгидрильной группы, и при этом влияние указанной модификации на центр связывания АДФ имеет аллостерический характер.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-04-00220.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. А. Мурина, Д. И. Рошупкин, Н. Н. Кравченко и др., *Биофизика* **42** (6), 1279 (1997).
2. Д. И. Рошупкин, М. А. Мурина, Н. Н. Кравченко и др., *Биофизика* **52** (5), 527 (2007).
3. М. А. Мурина, Д. И. Рошупкин, К. В. Кондрашова и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **157** (2), 169 (2014).
4. J. M. Zgliczynski, T. Stelmaszynska, J. Domanski, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 419 (1971).
5. W. Gottardi, M. Hagleitner, and M. Nagl, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **338**, 473 (2005).
6. М. А. Мурина, Д. И. Рошупкин, А. О. Петрова и др., *Вестн. РАМН*, № 10, 43 (2009).
7. L. Wang, B. Belisle and M. Bassiri, *Antimicrob. Agents Chemother.* **55** (6), 2688 (2011).
8. C. Martini, A. Hammerer-Lercher, M. Zuck, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1979 (2012).
9. Д. И. Рошупкин, К. В. Кондрашова и М. А. Мурина, *Биофизика* **59** (6), 1045 (2014).
10. J. M. Siller-Matula, J. Krumphuber, and B. Jilma, *British J. Pharmacol.* **159**, 502 (2010).
11. P. Damman, P. Woudstra, W. J. Kuijt, et al., *J. Thromb. Thrombolysis* **33**, 143 (2012).
12. E. L. Thomas, M. B. Grisham, and M. M. Jefferson, *J. Clin. Invest.* **72**, 441 (1983).
13. W. Vogt, *Free Radic. Biol. Med.* **18** (1), 93 (1995).
14. A. V. Peskin and C. C. Winterbourn, *Free Radic. Biol. Med.* **35** (10), 1252 (2003).
15. B. S. Rayner, D. T. Love, and C. L. Hawkins, *Free Radic. Biol. Med.* **71**, 240 (2014).

16. K. Zhang, J. Zhang, Z.-G. Gao, et al., *Nature* **509**, 115 (2014).
17. J. Zhang, K. Zhang, Z.-G. Gao, et al., *Nature* **509**, 119 (2014).
18. A. Bujacz, *Acta Cryst.* **D68**, 1278 (2012).
19. A. C. Carr, C. L. Hawkins, S. R. Thomas, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 526 (2001).
20. L. Turell, R. Radi, and B. Alvarez, *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 244 (2013).
21. M. Niziolek, M. Kot, and K. Pyka, *Acta Biochim. Pol.* **50** (3), 753 (2003).
22. W. L. L. Demian, N. Kottari, and T. Ch. Shiao, *J. Mass Spectrom.* **49**, 1223 (2014).
23. S. Sugio, A. Kashima, S. Moshizuki, et al., *Prot. Engineer.* **12**, 439 (1999).
24. E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, and M. N. Ivkova, *Photochem. Photobiol.* **18**, 263 (1973).
25. S. V. Konev, E. A. Chernitskii, S. L. Aksentsev, et al., *Mol. Cell. Biochem.* **7**, 5 (1975).
26. S. Ghosh, C. Ghosh, S. Nandi, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 8017 (2015).
27. V. F. Ximenes, L. M. da Fonseca, and A. C. de Almeida, *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 315 (2011).
28. W. Gottardi and M. Nagl, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **9**, 411 (2002).
29. H. Chen, P. He, H. Rao, et al., *Chemosphere* **129**, 217 (2014).
30. Y. Shechter, Y. Burstein, and A. Patchornik, *Biochemistry* **14**, 4497 (1975).
31. L. De Carvalho Bertozo, N. H. Morgon, A. R. De Souza, et al., *Biomolecules* **6**, 23 (2016).
32. S. Curry, P. Brick, and N. P. Franks, *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 131 (1999).
33. J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, et al., *J. Mol. Biol.* **353**, 38 (2005).
34. P. Ascenzi and M. Fasano, *IUBMB Life* **61** (12), 1118 (2009).
35. M. Anraku, U. Kragh-Hansen, K. Kawai, et al., *Pharmaceut. Res.* **20** (4), 684 (2003).
36. K. Takabayashi, T. Imada, Y. Saito, et al., *Eur. J. Biochem.* **136**, 291 (1983).
37. D. Spadaro, B.-W. Yuna, S.H. Spoela, et al., *Physiology Plantarum* **138**, 360 (2010).
38. H. Grigoryan, H. Li, A. T. Iavarone, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1633 (2012).
39. C. L. Hawkins, D. I. Pattison, and M. J. Davis, *Amino Acids* **25**, 259 (2003).
40. М. А. Мурина, Д. И. Рощупкин, Н. А. Чудина и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **147** (6), 642 (2009).

Fluorometric Study of Modification of Bovine Serum Albumin with Structural Analogs of Taurine Chloramine

D.I. Roshchupkin* **, K.V. Buravleva, M.A. Murina**, and V.I. Sergienko****

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1a, Moscow, 117997 Russia*

***Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia*

We studied the effects of taurine chloramine and its structural analogs, relating to antiplatelet agents, on the tertiary structure of bovine serum albumin by registering changes in its fluorescence spectrum. BSA has been chosen as a model for the extracellular part of purine P2Y₁₂ receptor in platelets. To detect weak spectral shifts of the protein fluorescence, an index, which was the ratio of the two light sum, measured from about the middle of the spectrum towards the short- and longwave limits of its registration, has been used. N-chlorotaurine or its analogs N-acetyl-N-chlorotaurine and N-isopropyl-N-chlorotaurine when administered in albumin solution in equimolar concentrations cause weakening and red shift of the protein tryptophanyl fluorescence, that suggests a reorganization of the protein tertiary structure, thereby changing the properties of the microenvironment of tryptophan residues, primarily, Trp 134. All this is most likely due to a covalent modification of sulfhydryl group of Cys34 residue. It is assumed that the taurine chloramines have the ability to inhibit the activity of the ADP P2Y₁₂ receptor in blood platelets due to modification of its sulfhydryl group and in this case the inhibitory effect on the ADP binding site has an allosteric character.

Key words: bovine serum albumin, conformation, fluorescence, tryptophan, taurine chloramine, sulfhydryl group, P2Y₁₂ receptor