

**Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
“Казанский Федеральный университет”**

---

Институт физики

А.В.Халиуллина, А.В.Филиппов

**ИССЛЕДОВАНИЕ САМОДИФФУЗИИ БЕЛКОВ  
В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ЯМР**

Учебно-методическое пособие

**Казань 2013**

Печатается по решению  
Редакционно-издательского совета  
Института физики КФУ

*Рецензент:*

Руководитель ОНЦ «Медицинская физика», профессор, д.х.н.  
Аганов А. В.

**Халиуллина А.В., Филиппов А.В.** Исследование самодиффузии белков в растворе методом ЯМР. Учебно-методическое пособие для студентов специализации «Медицинская физика» и «Биофизика» Института физики. Казань. 2013. 47 с. В пособии даны современные представления о самодиффузии молекул белков в растворе. Особое внимание уделено особенностям экспериментального исследования самодиффузии молекул белков методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля. Может быть рекомендовано как студентам, так и исследователям, работающим в области биохимии, биофизики и биотехнологии белков.

Издание подготовлено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, контракт 02.740.11.0702.

© Институт физики  
Казанский федеральный  
университет, 2013.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Особенности строения и функционирования белков	5
2. Физические принципы и модели, используемые для описания самодиффузии белков в растворе	10
3. Особенности измерения коэффициента самодиффузии белков в растворе методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля	20
4. Некоторые экспериментальные результаты	25
• Обобщенная концентрационная зависимость коэффициентов самодиффузии молекул глобулярных белков	25
• Молекулярно-массовая зависимость коэффициентов самодиффузии молекул пептидов	31
• Процессы молекулярного обмена в системе белок/лиганд	34
• Кинетика агрегации белка лизоцима в водном растворе	40
5. Список литературы	44

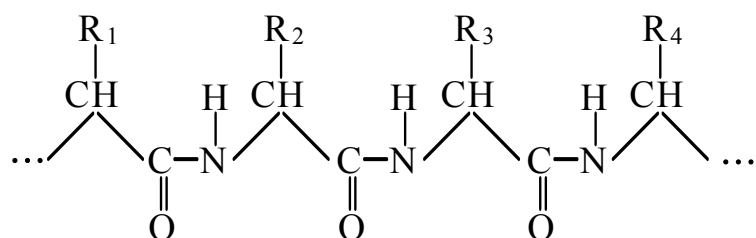
## **Введение**

Самодиффузия и диффузия молекул белков в водных растворах представляет интерес для молекулярной биофизики, что обусловлено необходимостью понимания состояния и механизмов функционирования различных белков внутренней среды организма (кровь, лимфа и тканевая жидкость). К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал по самодиффузии молекул глобулярных белков в зависимости от концентрации белка, кислотности, концентрации ионов и других параметров водных растворов. Литературные источники содержат данные о самодиффузии разнообразных по структуре и размеру молекул белков в зависимости от их конформации, а также при агрегации. Поведение белков в растворе отличается от поведения низкомолекулярных веществ, полимеров и других биополимеров. Многие белки выполняют свойственные им функции, находясь только в определенной конформации, которая может влиять на размер и форму молекулы белка, а, следовательно, и на коэффициент диффузии. Процессы агрегации имеют особое значение для белковых систем, так как они происходят при нормальном функционировании и в патологических состояниях. Поскольку агрегация связана с изменением размеров кинетических единиц в растворе, очевидно, что изменение коэффициентов самодиффузии может оказаться информативным для ее изучения. Одним из наиболее удобных методов для изучения самодиффузии пептидов и белков в растворах является метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП). При постановке задачи исследования и для эффективного использования ЯМР ИГМП при исследовании конкретных систем необходимо учитывать особенности этого метода, которые позволяют наблюдать сигнал от белка и трансляционную динамику белка в максимально доступном временном интервале. В данном учебном пособии мы обобщили ряд результатов исследований, которые могут быть рассмотрены как примеры использования метода ЯМР ИГМП для изучения самодиффузии в растворах пептидов и белков.

## 1. Особенности строения и функционирования белков

Белки (протеины) являются природными молекулярными машинами, выполняющими множество важных для живых организмов функций – ферментативных, транспортных, структурных, регуляторных, механохимических и других. Принято разделять белки на 3 основные группы: глобулярные, фибриллярные и мембранные белки, которые обычно обнаруживаются в мембранах клетки и ее органелл.

По химической классификации белки относятся к биополимерам. Принято рассматривать несколько уровней организации белковых макромолекул (Рис.1). Первичной структурой называется последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, связанных друг с другом пептидной связью -СО-NH-. Пептидная связь является ковалентной и, следовательно, прочной. Общая формула полипептидной цепи может быть записана следующим образом:



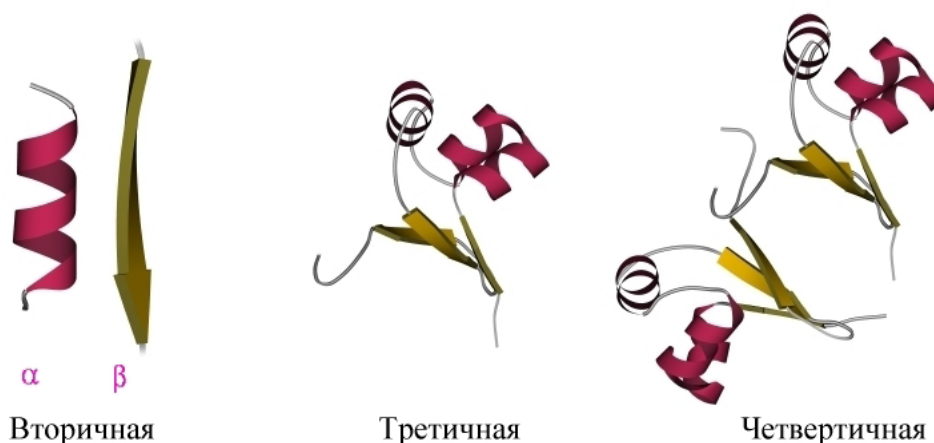
где  $R_1, R_2, \dots, R_n$  – боковые группы аминокислот (радикалы). Всего существует 20 «стандартных» аминокислот и две «нестандартных», которые встречаются в некоторых микроорганизмах. Их положение в белковой цепи кодируется генами. В некоторые белки включаются также кофакторы – малые молекулы, ионы, сахара, нуклеотиды, фрагменты нуклеиновых кислот и т.д.

Следующий, более высокий уровень организации – вторичная (пространственная) структура, которая образуется между функциональными группами пептидного остова и стабилизируется внутримолекулярными водородными связями. Элементами вторичной структуры в белках являются  $\alpha$  – спирали,  $\beta$  – складчатые листы, повороты и петли, среди которых  $\alpha$  –

спирали и  $\beta$  – складчатые листы наиболее распространены [1]. Различные участки молекулы белка могут иметь различную структуру и изменять ее в зависимости от внешних условий.

Белки, состоящие из небольшого количества аминокислотных остатков, обычно называют пептидами (до 30-40 аминокислот), характеризующимися минимальным набором образуемых вторичных структур. Более длинные аминокислотные последовательности, различные участки которых независимо упорядочены во вторичные структуры называются белками. Они могут быть упорядочены на более высоком уровне организации, образуя клубок, фибриллу или глобулу [1]. Таким образом, возникает сложная трехмерная конфигурация, называемая третичной структурой (конформацией). У ряда белков имеет место быть ассоциация нескольких третично упорядоченных полипептидных цепей в строго определенный молекулярный комплекс, образующий четвертичную структуру.

Первичная ... – *Gly – Val – Tyr – Gln – Ser – Ala – Ile – Asn – Lys – Ala – ...*



**Рисунок 1.** Уровни структурной организации белков; первичная (аминокислотная последовательность), вторичная, третичная (глобула), и четвертичная структуры белка [1].

К факторам, стабилизирующим конформацию белка, относятся водородные связи, дисульфидные мостики, электростатическое взаимодействие и образование комплексов с ионами металлов. Еще одним

важным стабилизирующим фактором является т.н. «гидрофобный эффект», в результате которого полипептидная цепь белковой глобулы в водном растворе сворачивается таким образом, что гидрофобные области боковых цепей оказываются внутри глобулы, формируя ядро глобулы, а гидрофильные области – на поверхности белка. Определяющую роль «гидрофобный эффект» играет и в свертывании полипептидной цепи мембранных белков. В связи с тем, что большая их часть погружена в гидрофобный бислой мембраны, строение трансмембранных (ТМ) белков существенно отличается от упаковки растворимых глобулярных белков: ТМ-сегменты у них существенно гидрофобнее, причем гидрофобные боковые цепи находятся не только внутри белка (как в случае глобулярных белков), но и на поверхности, где белок контактирует с углеводородными цепями липидных молекул.

Функции глобулярных белков очень многообразны. К глобулярным белкам относятся ферменты (например, амилаза и лактоза), биологические мессенджеры (пептидные гормоны – пролактин и инсулин), транспортные белки (глобулин и альбумин), а также структурные белки внутри клеток (тубулин). Глобулярные белки функционируют как антитела (глобулин) в иммунной системе организма, участвуют в процессах репликации и репарации ДНК (полимераза).

Гораздо менее разнообразные фибриллярные белки характеризуются упорядоченным расположением полипептидных цепей относительно одной оси с образованием длинных волокон (фибрилл) или слоев. Фибриллярные белки – это структурные и сократительные белки. Первые играют роль опорных и защитных компонент, входя в состав сухожилий, хрящей, костей, связок, и т.д. (коллагены), а также эпидермиса, волос, шерсти, рогов и т.д. (кератины). Вторые входят в состав рабочих веществ механохимических систем, в частности мышц (миозин).

Мембранные белки составляют до половины сухого веса мембраны. Они обеспечивают функциональную активность биомембран,

ограничивающих клетки и внутриклеточные органеллы. Мембранные белки участвуют во многих жизненно важных клеточных процессах: молекулярном и ионном транспорте, межклеточной рецепции и коммуникации, слиянии мембран и т.д.

В нативных (в естественных) условиях белки чаще всего функционируют в виде молекулярных комплексов. Классическими примерами комплексного функционирования белков в цитозоле являются гемоглобин эритроцитов крови, инсулин,  $\alpha$ -химотрипсин, белки актомиозинового комплекса и др. В мембране в качестве примеров белковых комплексов могут служить трансмембранный восьмикомпонентный димерный цитохормный b6/f комплекс, многочисленные ионные каналы мембраны и водные неионные каналы (аквапорины) и др.

Неправильное сворачивание (фолдинг) белка в организме может инициировать агрегацию макромолекул с образованием пучков высокоупорядоченных структурных полимерных нитей, представляющих собой  $\beta$ -амилоидные фибриллы. Считается, что способность многих белков как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*, переходить в фибриллярное состояние заложена в химической структуре полипептидной цепи [2]. Существует ряд тяжелых заболеваний (которые иногда называют «конформационными» болезнями), таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, атеросклероз, диабет II типа, а также некоторые формы рака, например, рак С-клеток щитовидной железы и т.д., сопровождающихся образованием амилоидных фибрилл [3, 4]. Эти болезни наиболее часто встречаются у людей преклонного возраста, когда защитные системы клеток и организма в целом не справляются с функцией ликвидации неправильно свернутых белков. Кроме того, в литературе описан ряд наследственных заболеваний человека, развитие которых связывают с нарушением вследствие мутаций процесса сворачивания (пигментозы, фиброзы и др.) [5].



### Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте уровни структурной организации белков.
2. На каком из уровней структурной организации белков наиболее важную роль выполняют: а) внутримолекулярные взаимодействия; б) межмолекулярные взаимодействия?
3. Какова природа «гидрофобного эффекта» и в чем он проявляется применительно к молекуле белка в водной среде?
4. Сравните регулярность расположения молекул белка или составляющих его аминокислот в фибриллярных и глобулярных агрегатах.
5. Что является причиной неправильного складывания белков при «конформационных» заболеваниях?

## 2. Физические принципы и модели, используемые для описания самодиффузии белков в растворе

Под самодиффузией понимают тепловое хаотическое пространственное перемещение молекул в результате их теплового движения в термодинамически равновесной системе. Следует различать самодиффузию и взаимодиффузию, которая происходит в неравновесной среде из-за наличия в ней градиента концентрации или, в общем случае, градиента химического потенциала.

Самодиффузия имеет случайный характер и описывается с помощью плотности условной вероятности  $P(\vec{r} - \vec{r}_0, t)$  обнаружить центр тяжести рассматриваемой молекулы в точке пространства с радиус-вектором  $\vec{r}$  в момент времени  $t$ , если в начальный момент времени  $t=0$  он находился в точке  $\vec{r}_0$ . При временах наблюдения  $t > \tau_{\max}$  (диффузионный режим), где  $\tau_{\max}$  является наибольшим из времен корреляции, связанных с пространственными степенями свободы рассматриваемой молекулы,  $P(\vec{r} - \vec{r}_0, t)$  описывается параметром  $D$  – коэффициентом самодиффузии (КСД) и имеет вид [6]:

$$P(\vec{r} - \vec{r}_0, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}_0)^2}{4Dt}\right), \quad (1)$$

со среднеквадратичным смещением молекулы  $\langle(\vec{r} - \vec{r}_0)^2\rangle = 6Dt$  за время  $t$  (соотношение Эйнштейна).

Коэффициент самодиффузии  $D$  из общих принципов статистической физики определяется через автокорреляционную функцию скорости молекулы  $\langle\vec{v}(t) \cdot \vec{v}(0)\rangle$ , где  $\vec{v}$  – вектор скорости центра масс молекулы следующим образом:

$$D = \frac{1}{3} \int_0^{\infty} \langle\vec{v}(t) \cdot \vec{v}(0)\rangle dt. \quad (2)$$

На практике часто применяется другое определение КСД, которое следует из решения уравнения Ланжевена в классической теории броуновского движения [6]:

$$D = \frac{kT}{f}, \quad (3)$$

где  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – температура,  $f$  – коэффициентом трения.

Для жесткой непроницаемой для молекул воды броуновской частицы сферической формы, движущейся в жидкости, коэффициент трения равен:

$$f = 6\pi\eta R, \quad (4)$$

где  $R$  – гидродинамический радиус частицы,  $\eta$  – коэффициент вязкости растворителя.

Таким образом, коэффициент самодиффузии (3) для броуновской сферической частицы приобретает вид:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}. \quad (5)$$

Полученное уравнение носит название уравнения Стокса-Эйнштейна.

Молекула глобулярного белка, чья компактная структура сохраняется в растворе, с гидродинамической точки зрения представляет собой жесткую, непроницаемую для молекул воды, несжимаемую частицу [7, 8], для описания самодиффузии которой может применяться соотношение (5).

Согласно уравнению Стокса-Эйнштейна (5) экспериментально полученные КСД позволяют рассчитать гидродинамический радиус  $R$  молекулы белка и, тем самым, оценить его размер. Однако при этом необходимо учитывать то, что на величину наблюдаемого КСД для белковой молекулы в растворе может оказывать влияние ряд факторов, таких как 1) несферичность поверхности молекулы белка, 2) влияние специфических взаимодействий вода-белок на КСД белков, 3) эффект столкновений между молекулами белков и другие. Рассмотрим их подробнее.

## Несферичность формы

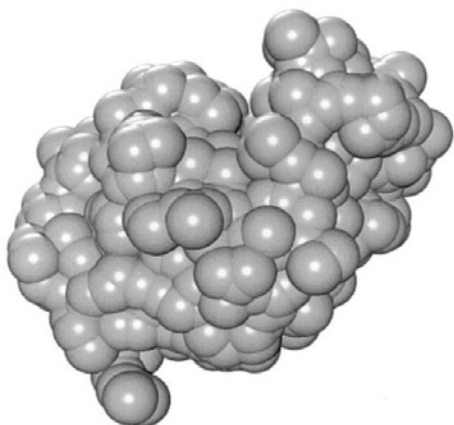
Учет несферичности частицы в уравнение Стокса-Эйнштейна (5) производят добавляя параметр  $F$ , называемый форм-фактором:

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R F} \quad (6)$$

Так, для эллипсоида вращения с соотношением главных осей  $p = a/b$ , где  $b$  – малая ось,  $a$  – большая ось, форм-фактор  $F$  описывается с помощью формул Перрена [9]:

$$F = \begin{cases} \frac{\sqrt{p^2 - 1}}{p^{2/3} \arctan \sqrt{p^2 - 1}} & p \geq 1 \quad (\text{сплющенный эллипсоид}) \\ \frac{\sqrt{1 - p^2}}{p^{2/3} \log \frac{1 + \sqrt{1 - p^2}}{p}} & p < 1 \quad (\text{вытянутый эллипсоид}) \end{cases} \quad (7)$$

В ряде случаев аппроксимации молекулы белка эллипсоидом вращения оказывается недостаточно для объяснения наблюдаемой разницы между экспериментальными и расчетными значениями КСД. Поэтому проводится более точный анализ формы поверхности молекулы. Одна из наиболее часто используемых моделей для расчета гидродинамических свойств молекул белков произвольной формы – модель бусин – была предложена Блумфельдом [10] и позже развита в работах Гарсия Торре [11]. В этой модели каждый атом (кроме водорода) в молекуле белка заменяется сферическим элементом, бусиной, имеющей радиус  $a$ . Эти бусины заполняют как пространство внутри молекулы, так и покрывают ее поверхность таким образом, чтобы размер и форма модели были наиболее близки к размерам и форме данной молекулы. В упрощённом виде молекула представляет собой набор взаимно пересекающихся сферических элементов (Рис.2). Нижний предел значения  $a$  – Ван-дер-Ваальсово значение радиуса атома приблизительно равняется 2 Å (без учета гидратации) [11, 12].



**Рисунок 2.** Схематическое представление белка лизоцима, атомы которого, кроме водорода, заменены сферическими элементами (бусинами). Рисунок воспроизведен из работы [12].

### **Гидратация**

Другой причиной различия между рассчитанным по формуле (5) и экспериментальным значением коэффициента самодиффузии молекулы белка являются специфические водно-белковые взаимодействия, приводящие к образованию вокруг молекулы белка в водном растворе гидратной оболочки из молекул воды. Очевидно, что с учетом гидратной оболочки эффективный гидродинамический радиус частицы увеличивается, что приводит к уменьшению коэффициента самодиффузии. Исходя из того, что: (i) молекулы белков содержат различные наборы аминокислотных остатков, каждый из которых характеризуется различной степенью гидрофобности; (ii) молекулы белков по-разному «упакованы», то есть имеют разную конформацию, которая к тому же может зависеть от pH, температуры и других внешних параметров, можно ожидать, что влияние гидратации будет различным для различных белков при разных условиях. Детальный учет всех особенностей первичной и вторичной структуры белка на его гидратацию и гидродинамические размеры является достаточно трудоемкой задачей. Для ее решения применительно к конкретным белкам и физико-химическим условиям используются компьютерные расчеты [12, 13].

Изменение гидродинамических свойств макромолекулы можно учесть при расчете количества воды, связанной с белком, рассчитываемого в

граммах присоединенной воды на грамм белка в соответствии с уравнением [11]:

$$\delta = \frac{(V_{hyd} - V_{anh})\rho}{V_{anh} / \nu} = \left( \frac{V_{hyd}}{V_{anh}} - 1 \right) \nu \rho, \quad (8)$$

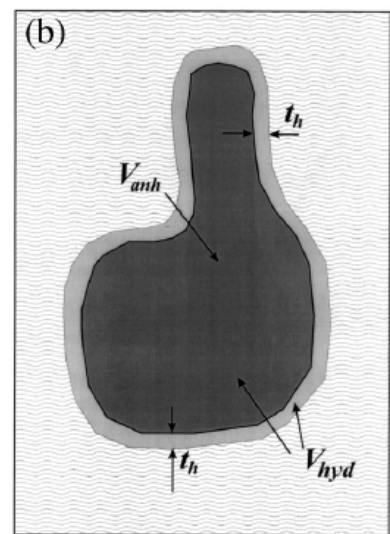
где  $V_{hyd}$  и  $V_{anh}$  – объемы молекулы белка с учетом и без учета эффекта гидратации соответственно,  $\rho$  – плотность раствора ( $\sim 1$  г/см<sup>3</sup>),  $\nu$  – удельный объем белка. Объем молекулы белка без учета гидратации рассчитывался как  $V_{anh} = M\nu/N_A$ , где  $M$  – молекулярная масса белка,  $N_A$  – число Авогадро.

Используя альтернативный подход эффект гидратации можно учитывать путем вычисления толщины гидратного слоя на поверхности молекулы белка. Частица произвольной формы с линейным размером  $u_{anh}$  при учете гидратной оболочки увеличивается равномерно в  $t_h$  раз  $u_{hyd} = t_h \cdot u_{anh}$ , где  $t_h$  – так называемый коэффициент линейного увеличения размера белка. Аналогичным образом может быть рассчитано изменение объема  $V_{hyd} = t_h^3 \cdot V_{anh}$ . Подставляя это выражение в формулу (8) получим:

$$\delta = (t_h^3 - 1)\nu\rho \quad (9)$$

или

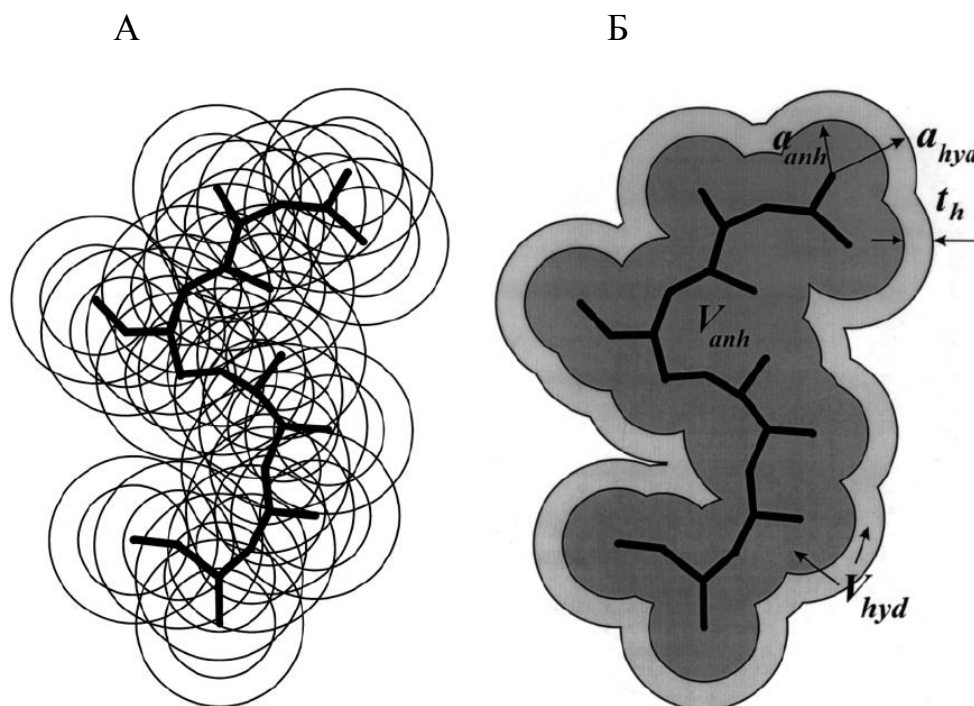
$$t_h^3 = \left( 1 + \frac{\delta}{\nu\rho} \right)^{1/3} \quad (10)$$



**Рисунок 3.** Схематическое изображение белковой молекулы произвольной формы с равномерно распределенной гидратной оболочкой. Рисунок воспроизведен из работы [11].

Типичными для глобулярных белков являются значения величин  $\nu = 0.72$  г/см<sup>3</sup> и  $\delta = 0.35$  г/г, откуда  $t_h = 1.14$ , что соответствует увеличению линейного размера белка из-за гидратации на 14% и увеличению в объеме на 48%.

Эффект гидратации может быть также интерпретирован в рамках модели бусин. В этом случае гидратация моделируется увеличением Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов молекулы белка  $a_{anh}$  на толщину гидратного слоя  $t_h$  [11] (Рис. 4.А, Б).



**Рисунок 4.** Схематическое представление модели бусин для гипотетической молекулы малых размеров с изображением А) контуров взаимно пересекающихся сферических атомов с учетом и без гидратного слоя и Б) четкой границы между молекулой белка и ее гидратной оболочкой толщины  $t_h$ . Каждый атом в молекуле характеризуется Ван-дер-Ваальсовым радиусом, зависящим от типа атома. Рисунок воспроизведен из работы [11].

Однако, в действительности, в прямом контакте с раствором находятся только атомы молекул белка, находящиеся на ее поверхности. Поэтому при расчете гидродинамических свойств молекул белков обычно моделируется только поверхность доступная молекулам растворителя. Эта поверхность описывается огибающей Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов и представляет собой гидратную оболочку молекулы толщины  $t_h$  (Рис. 4. Б).

Учет гидратной оболочки приводит к следующему изменению вида выражения для коэффициента самодиффузии [14]:

$$D = \left( \frac{T \cdot k}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot F} \right) \cdot \left( \sqrt[3]{\frac{4 \cdot \pi \cdot N_0}{3 \cdot M \cdot (V_2 + \delta \cdot V_1)}} \right), \quad (11)$$

где  $F$  – форм фактор,  $N_0$  – число Авогадро,  $M$  – масса частицы,  $V_1$  – удельный объем частицы,  $V_2$  – удельный объем растворителя,  $\delta$  – фракция растворителя, связанная с частицей.

К дополнительному сопротивлению движения белковой молекулы в растворе, а следовательно, и к уменьшению коэффициента трансляционной подвижности белка может привести эффект столкновений соседних белковых молекул, что обуславливает необходимость учета таких взаимодействий.

### Эффект столкновений

При расчете коэффициентов самодиффузии белков иногда следует учитывать, что белки занимают некоторую долю объема раствора, ограничивая тем самым собственную трансляционную подвижность, а также диффузию других частиц. Учет объемной доли белка в растворе приводит к следующей концентрационной зависимости коэффициента самодиффузии броуновской частицы, предложенной Токуяма и Оппенхаймом [15]:

$$D = D_0 \cdot f(\varphi) = \frac{D_0(1 - 9\varphi/32)}{1 + H(\varphi) + (\varphi/\varphi_0)/(1 - \varphi/\varphi_0)^2} \quad (12)$$

$$H(\varphi) = \frac{2b^2}{(1-b)} - \frac{c}{(1+2c)} - \frac{bc(2+c)}{(1+c)(1-b+c)},$$

$$b = \left( \frac{9\varphi}{8} \right)^{1/2}, \quad c = \frac{11\varphi}{16},$$

где  $D_0 = kT/6\pi\eta R$  – коэффициент самодиффузии белка при бесконечном разбавлении,  $\varphi$  – объемная доля белка в растворе,  $\varphi_0 \approx 0.5718$  концентрация



плотной упаковки сфер [15]. Концентрационные зависимости коэффициентов самодиффузии жестких сфер обычно представляют в координатах  $D/D_0$  и  $\varphi$ .

Используя альтернативный подход, учет эффекта взаимных столкновений молекул глобулярных белков может быть произведен на основе скейлинговой теории Хана и Герцфилд [16]:

$$D = D_0 \cdot f(\varphi) = D_0 \exp\left(-\frac{\Delta r}{R} \left(3 \frac{\varphi}{1-\varphi} + \frac{9}{2} \frac{\varphi^2}{(1-\varphi)^2} + \frac{9}{4} \frac{\varphi^3}{(1-\varphi)^3}\right)\right), \quad (13)$$

где  $\Delta r$  – смещение диффундирующей молекулы,  $R$  – радиус сферической частицы. Для области разбавленных растворов, когда  $\varphi \rightarrow 0$  выражение 13 преобразуется к виду:

$$D = D_0 \left[1 - 3 \left(\frac{\Delta r}{R}\right) \varphi\right]. \quad (14)$$

Из сравнения выражения (14) с предложенной Ханом [17] концентрационной зависимостью КСД макромолекул в области разбавленных растворов:

$$D = D_0 (1 - 2\varphi), \quad (15)$$

получаем отношение  $\Delta r/R = 2/3$ .

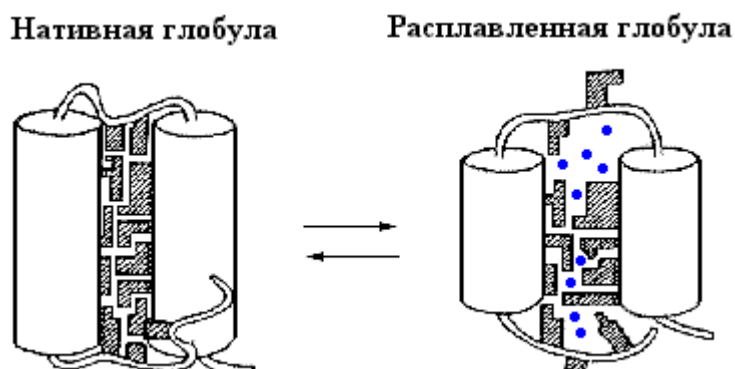
### **Влияние конформации**

Значения КСД молекул белков в растворе зависят от конформации белка. Это объясняется тем, что для разных конформаций белка его гидродинамический радиус  $R$  принимает различные значения.

Теоретически предсказано, экспериментально обнаружено и детально охарактеризованы, как минимум, четыре основные конформации глобулярных белков. К таковым относятся: (i) нативное (полностью упорядоченное), (ii) «расплавленная глобула» ("molten globule") [18] (Рис.5), (iii) «пред-расплавленная глобула» ("pre-molten-globule state") [18, 19] и (iv) полностью разупорядоченная полипептидная цепь (набор быстро

флуктуирующих конформаций, ассоциирующихся со статистическим гауссовым клубком) [18].

Обнаружение такого физического состояния белковой молекулы как «расплавленная глобула», которое является переходным при разворачивании и сворачивании белка, позволило приблизиться к пониманию физической природы процесса денатурации белков.



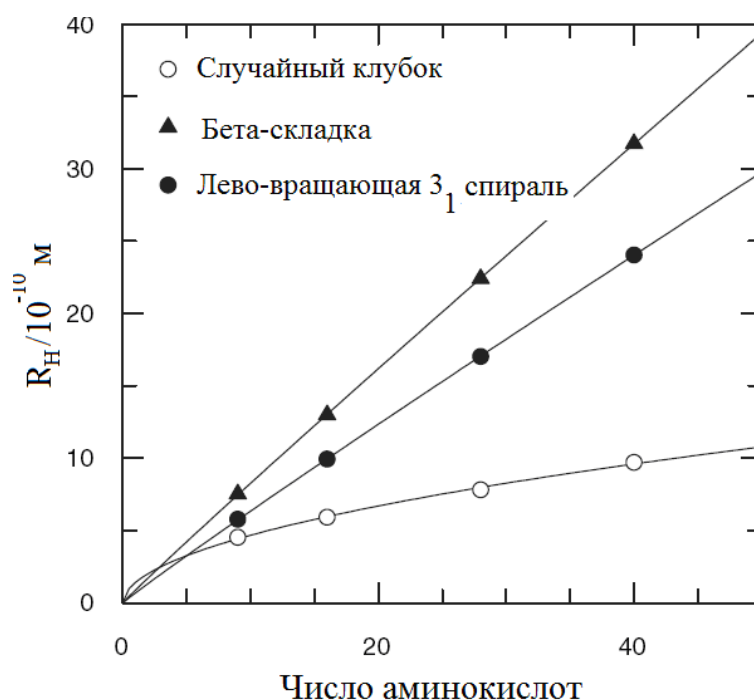
**Рисунок 5.** Схематическая модель нативной и «расплавленной» глобулы в молекуле белка. Для простоты, на Рисунке показаны только две аспирали, соединенные петлей. Входящие в гидрофобное ядро белка боковые группы заштрихованы. В расплавленной глобуле они обретают свободу движений, поскольку отсутствует жесткая упаковка боковых групп. Так в глобуле возникают поры, куда вода (●) проникает, не разваливая глобулу полностью [1].

«Расплавленная глобула» характеризуется меньшей степенью упорядоченности по сравнению с нативной структурой, однако белок в этом состоянии продолжает сохранять компактную глобулярную структуру. Это было показано, например, при изучении молекул лактальбумина методом малоуглового рентгеновского рассеяния [20]. При этом было установлено, что в состоянии «расплавленной глобулы» происходит увеличение гидродинамического радиуса примерно на 15% по сравнению с нативным состоянием, что соответствует увеличению объема на 50% [21].

Белки в состоянии «пред-расплавленной глобулы» (или «перерасплавленной глобулы», если анализировать не сворачивание белка, а обратный процесс – его разворачивание) обладают менее компактной структурой, чем белки в состоянии «расплавленной глобулы», но более

компактной, чем в развернутом состоянии. При сравнении с нативным состоянием, гидродинамический объем глобулярных белков в состоянии «перерасплавленной глобулы» возрастает в 3 раза, а в полностью развернутом состоянии - в 12 раз [21].

Даниельсон с соавторами [22] оценили теоретические зависимости гидродинамического радиуса  $R$  полипептидной цепи белков разной длины от их вторичной структуры. Как видно из Рисунка 6, у полипептидов, не имеющих периодической пространственной организации и представляющих собой случайный клубок, гидродинамический радиус значительно меньше, чем у полипептида той же длины, но с регулярной вторичной структурой  $\beta$ -складчатым листом или левозакрученной  $\alpha$ -спиралью. При этом значения  $R$  полипептидной цепи в конформации  $\alpha$ -спирали меньше, чем в конформации  $\beta$ -складчатого листа. Кроме того, теоретически предсказано, что величина  $R$  имеет линейную зависимость от количества аминокислот в полипептидной цепи только в случае, когда она обладает регулярной вторичной структурой.



**Рисунок 6.** Расчетные зависимости гидродинамического радиуса  $R_h$  полипептидной цепи от количества  $N$  аминокислотных остатков в цепи для регулярной конформации цепи ( $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -складчатый лист) и случайного клубка. Рисунок воспроизведен из работы [22].

Уилкинс с соавторами [23] установили эмпирические соотношения между экспериментальными значениями  $R$  и количеством аминокислотных остатков полипептидной цепи ( $N$ ): в случае нативного белка  $R = 4.75N^{0.29} \text{ \AA}$ , а для белка в денатурированном состоянии  $R = 2.21N^{0.57} \text{ \AA}$ . Эти соотношения могут быть использованы для оценки КСД белков в растворе.

### **Влияние агрегации**

Кроме перечисленных выше факторов на величину наблюдаемого КСД для белковой молекулы в растворе могут оказывать влияние процессы ассоциации или агрегации белков. Различие между ассоциацией и агрегацией достаточно условно, так как в обоих этих процессах результатом является объединение нескольких отдельных молекул белка в единую частицу. Как правило, под ассоциацией понимают такой процесс объединения молекул белка, в ходе которого не нарушается их компактная глобулярная структура. При агрегации же взаимодействуют белковые молекулы, развернутые вследствие денатурации. Это способствует образованию агрегатов, которые, в зависимости от структуры белка и внешних условий, могут иметь аморфный характер, либо возникают амилоидные фибриллы с повышенным содержанием  $\beta$ -структур.

Денатурация – распад нативной структуры белка, который может способствовать агрегации. Этот процесс активизируется под воздействием таких параметров среды, как температура, рН раствора, ионная сила или концентрация соли или белка в растворе. Поэтому, если требуется сохранение нативной структуры белка, крайне важен выбор подходящих условий, препятствующих денатурации.

### Вопросы для самоконтроля

1. Может ли рассматриваться в качестве броуновской частицы: а) молекула белка альбумина человека; б) цилиндрическая фибрилла амилоидного пептида?
3. Как гидратация белка может влиять: а) на подвижность участков пептидной цепи; б) на вращательную подвижность молекулы; в) на самодиффузию молекулы в растворе?
4. Каким образом такие характеристики раствора белка как «разбавленный», «полуразбавленный» и «концентрированный» связаны с частотой столкновений (или интенсивностью взаимодействия) между молекулами белка?
5. С чем связан особый интерес к конформации «расплавленной глобулы»?
6. В какой конформации пептид имеет наименьший и наибольший гидродинамический размер?
7. Рассматривая свойства агрегата (например, самодиффузию) из нескольких молекул пептидов можно ли считать, что они являются простой комбинацией свойств образующих его молекул?

### 3. Особенности измерения коэффициента самодиффузии белков в растворе методом ЯМР ИГМП

Применение метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ИГМП) для измерения коэффициента самодиффузии молекул (КСД) основано на потере фазовой когерентности ядерных спинов за счет трансляционных перемещений молекул в таком поле. Метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля был разработан Стейскалом и Таннером [24]. В зависимости от своего пространственного положения в образце различные спины прецессируют с различными ларморовыми частотами. Это приводит к уменьшению поперечной составляющей намагниченности из-за расфазировки спинов. Воздействуя на спиновую систему последовательностью р.ч. импульсов  $90^\circ - \tau - 180^\circ$ , в момент времени  $2\tau$  при условии  $2\tau \ll T_2$  получают сигнал спинового эха, амплитуда которого будет определяться амплитудой сигнала индукции  $A(0)$  после первого  $90^\circ$  импульса и релаксации ядерных спинов. Однако если ядро за время эксперимента  $t$  меняет свое положение в пространстве в неоднородном магнитном поле с некоторым градиентом  $\vec{g}_0 = d\vec{H}_0/d\vec{r}$ , то вследствие непрерывного изменения частоты прецессии рассматриваемого магнитного ядерного момента его перемещение  $\vec{r}$  будет характеризоваться относительным изменением фазы прецессии:

$$\Phi(t) = -\gamma \int_0^t \vec{g}_0 \vec{r}(t') dt',$$

которое, в рассматриваемом случае, нельзя будет восстановить последующим действием  $180^\circ$  импульса. В результате амплитуда сигнала спинового эха  $A(t)$  становится меньше по сравнению с  $A(0)$  и, следовательно будет содержать информацию о пространственном перемещении спина, т.е. молекулы. Более детальное описание методики измерения коэффициентов самодиффузии молекул можно найти, например, в монографии [6].

Для измерений коэффициентов самодиффузии (КСД) молекул наиболее широко используется импульсная последовательность стимулированного спинового эха (Рис.7). Суть этой методики заключается в том, что после подачи первого р.ч. импульса, поворачивающего вектор намагниченности  $\vec{M}$  системы на  $90^\circ$  ( $\pi/2$  импульс), подается первый импульс градиента магнитного поля  $g$ , приводящий к расфазировке намагниченности в образце. После третьего  $90^\circ$ -импульса подается второй фазирующий градиентный импульс.

Если градиент  $g_z$  приложен в направлении оси  $z$ , компонента вектора намагниченности вдоль координаты  $z$  за время действия градиента будет прецессировать с частотой

$$\omega = \gamma(z \cdot g_z + B_0), \quad (16)$$

где  $\gamma$  – гиромагнитное отношение резонирующих ядер,  $B_0$  – индукция постоянного магнитного поля. За время действия первого расфазировочного градиентного импульса длительностью  $\delta$  каждый спин будет накапливать свою фазу  $\varphi_i = \omega_i \delta$ , которая, как видно из формулы (16), будет зависеть от его координаты  $z$ . Если вдоль оси  $z$  за временной интервал между импульсами градиента  $\Delta$  не происходит перемещение этого спина, то в результате действия второго градиентного импульса происходит полная компенсация фазы на ту же самую величину  $\varphi_i$ . Любое случайное перемещение спина вдоль оси  $z$  за время  $\Delta$  будет приводить к необратимой расфазировке на величину:

$$\langle \varphi^2 \rangle = \gamma^2 \delta^2 g^2 \langle r^2 \rangle, \quad (17)$$

где величина среднеквадратичного перемещения спинов  $\langle r^2 \rangle$  связана с КСД ( $D$ ) молекулы соотношением  $\langle r^2 \rangle = 2D\Delta$ .

Амплитуда сигнала стимулированного эха при условии  $g \gg g_0$  (где  $g_0$  – величина постоянного градиента магнитного поля) для однофазной с точки

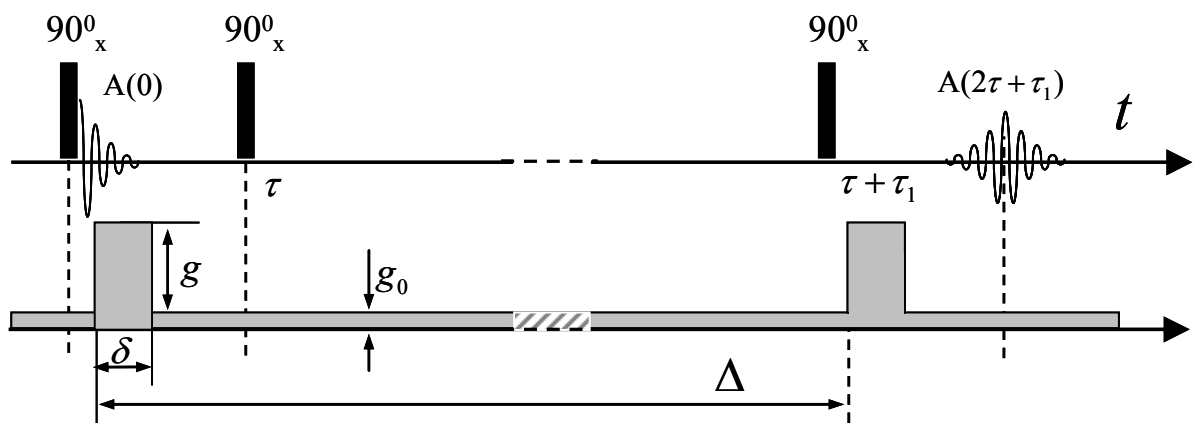
зрения ЯМР системы, характеризующейся одним значением  $D$ , определяется выражением:

$$A(2\tau, \tau_1, g^2) = A(2\tau, \tau_1, 0) \exp\left[-\gamma^2 g^2 \delta^2 D t_d\right]. \quad (18)$$

Для случая экспоненциальной релаксации

$$A(2\tau, \tau_1, 0) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right), \quad (19)$$

где  $A(2\tau, \tau_1, 0)$  – амплитуда сигнала стимулированного спинового эха при  $g = 0$ ,  $A(0)$  – начальная амплитуда сигнала свободной индукции после первого  $90^\circ$  р.ч. импульса,  $\tau$  и  $\tau_1$  – временные интервалы между первым и вторым, и вторым и третьим  $90^\circ$  рч импульсами, соответственно (Рис. 7);  $T_2$  – время спин-спиновой релаксации;  $T_1$  – время спин-решеточной релаксации;  $\delta$  и  $g$  – длительность и амплитуда ИГМП, соответственно; время  $t_d = \Delta - \delta/3$ , за которое формируется «диффузионный вклад» в затухание сигнала спинового эха, называется временем диффузии.



**Рисунок 7.** Стандартная импульсная последовательность стимулированного спинового эха.

Проводя серию экспериментов при варьировании одного из двух параметров  $\delta$  или  $g$  при постоянных временных характеристиках эксперимента, в координатах  $\lg[A(2\tau, \tau_1, g^2)/A(2\tau, \tau_1, 0)]$  от  $\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d$



получают, так называемые, кривые диффузионных затуханий (ДЗ) сигнала стимулированного спинового эха.

В простейшем случае в многофазных системах, характеризующихся различными КСД  $D_i$  и временами релаксации  $T_{1i}$  и  $T_{2i}$ , диффузионное затухание стимулированного эхо описывается выражением вида:

$$A(2\tau, \tau_1, g^2) = \frac{A(0)}{2} \sum_{i=1}^N p'_i \exp\left[-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_i t_d\right], \quad (20)$$

$$p'_i = \frac{p_i \exp\left(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}}\right)}{\sum_{i=1}^N p_i \exp\left(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}}\right)}. \quad (21)$$

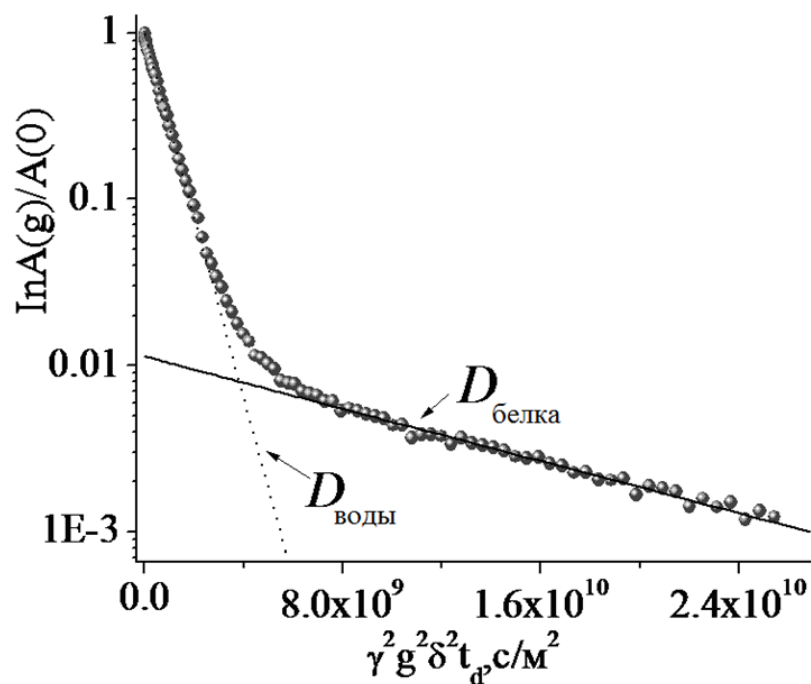
Здесь  $N$  – число фаз в системе,  $p_i$  – вес компоненты, характеризующейся КСД  $D_i$  и временами релаксации  $T_{1i}$  и  $T_{2i}$ .

Рассмотрим экспериментальную кривую диффузионного затухания для раствора белка лизоцима, который является типичным глобулярным белком (Рис. 8).

Из Рисунка 8 видно, что форма диффузионных затуханий имеет двухэкспоненциальный вид, определяемый вкладами от протонов воды с КСД  $1.26 \cdot 10^{-9}$  м<sup>2</sup>/с и лизоцима  $9.24 \cdot 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с. Сигнал от протонов молекул воды наблюдается только при малых значениях градиента поля (пунктирная линия). При больших значениях градиента сигнал обусловлен только протонами белка (сплошная линия). Таким образом, ДЗ, показанное на Рисунке 8, представляет собой сумму двух компонент:

$$A(g^2) = p'_1 \exp\left(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_1 t_d\right) + p'_2 \exp\left(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_2 t_d\right), \quad (22)$$

где  $D_1$  и  $D_2$  – наибольший и наименьший коэффициенты самодиффузии,  $p'_{1,2}$  – веса (населенности, кажущиеся фракции) соответствующих компонент диффузионного затухания. Значения  $p'_{1,2}$  определяются в соответствии с выражением (21).



**Рисунок 8.** Диффузионное затухание для раствора лизоцима в воде при весовой концентрации белка 11.6% и pH=7. T=291K. Сплошная линия характеризует КСД лизоцима ( $9.03 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ ), а пунктирная линия КСД воды ( $1.26 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ ), с населенностями 0.01 и 0.99, соответственно. Параметры эксперимента: 300 МГц  $^1\text{H}$  ЯМР,  $\delta=0.45 \text{ мс}$ ,  $\tau=2.5 \text{ мс}$ ,  $t_d=100 \text{ мс}$ , и  $g$  варьировалась от 0 до 5 Т/м.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Каким образом градиентные импульсы, используемые при измерении самодиффузии методом ЯМР ИГМП, влияют на измеряемый КСД?
2. Почему неоднородность поля, создаваемая импульсами градиента в методике ЯМР ИГМП, не приводит к уширению линий спектра ЯМР?
3. Как связано время диффузии с КСД белка в растворе?
4. Для измерения самодиффузии молекул в жидкости наиболее часто используют двухимпульсную последовательность (последовательность Хана) и трехимпульсную последовательности (стимулированного эхо). Какие преимущества и недостатки имеют каждая из этих последовательностей при измерении КСД белков в растворе?
5. Молекулы воды образуют гидратную оболочку растворенных молекул белка. Можно ли используя метод ЯМР ИГМП наблюдать сигнал от этих молекул воды?

## 4. Некоторые экспериментальные результаты

### Обобщенная концентрационная зависимость коэффициентов самодиффузии молекул глобулярных белков

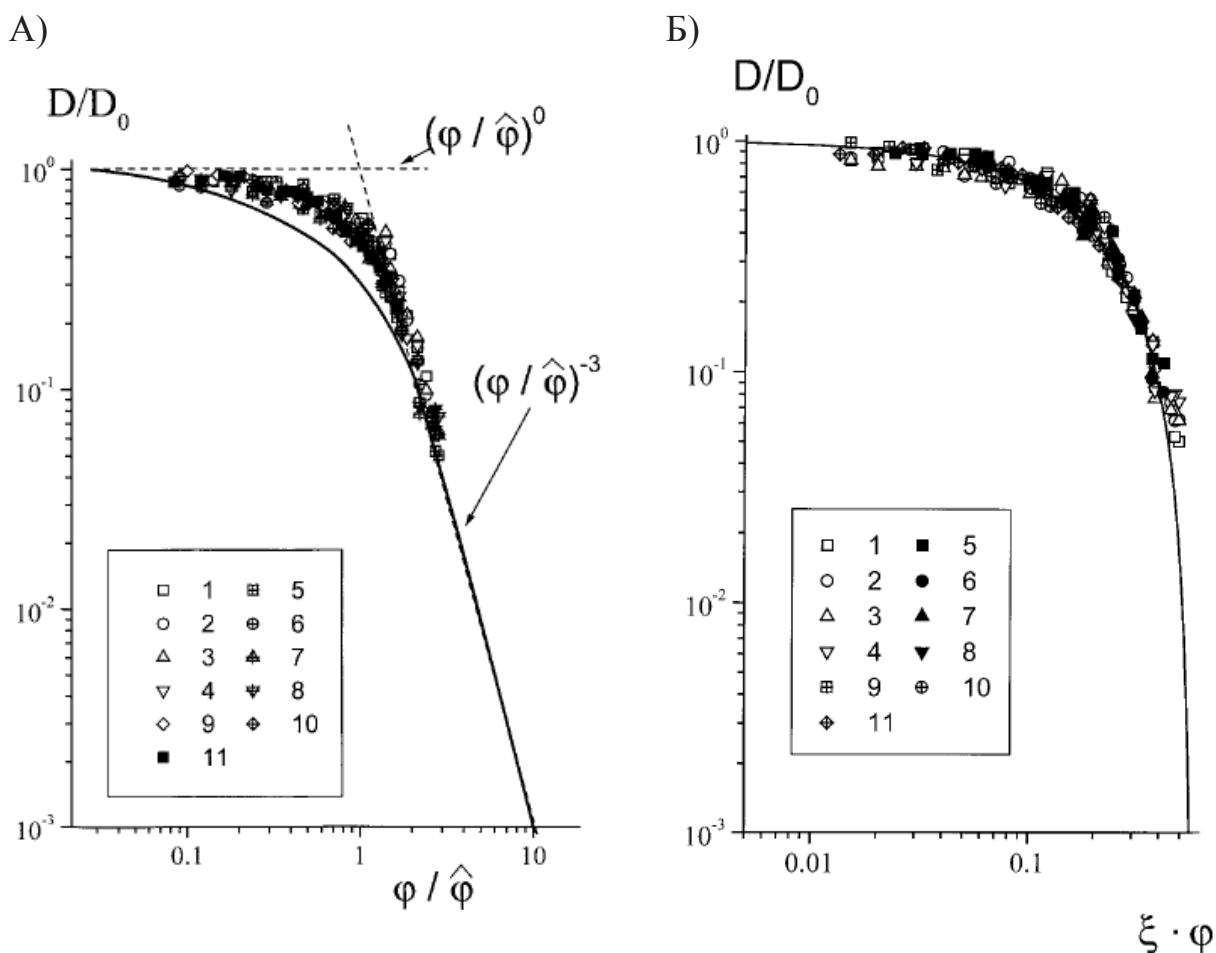
Молекулы различных глобулярных белков проявляют индивидуальные особенности при изменении свойств раствора, например рН, температуры и концентрации. Тем не менее, их трансляционная динамика в растворе может быть успешно описана обобщенной концентрационной зависимостью КСД в координатах  $\ln(D(\varphi)/D_0)$  и  $\ln(\varphi/\hat{\varphi})$ , где  $D_0$  – значение КСД белков при бесконечном разбавлении,  $\varphi$  – объемная доля белка в растворе, рассчитываемая по формуле  $\varphi = 1 / (1 + \rho_2 \cdot w_1 / \rho_1 \cdot (1 - w_1))$ , где  $w_1$  – весовая доля воды в растворе,  $\rho_1$  и  $\rho_2$  – плотности воды и белка, соответственно.  $\hat{\varphi}$  – это некоторая динамическая критическая концентрация, которая определяет изменение динамических свойств молекул белков при переходе от области разбавленных растворов (в приближении отсутствия взаимодействия между молекулами белков) к области концентрированных растворов (где это взаимодействие существует). Величина  $\hat{\varphi}$  зависит от индивидуальных особенностей молекул белка в растворе. При введении обобщенных координат различия между молекулами, связанные с природой белка, исключаются из рассмотрения путем подбора зависящей от свойств молекул критической концентрации  $\hat{\varphi}$ , что, в конечном счете, позволяет анализировать общие динамические свойства молекул.

На Рисунке 9А представлена обобщенная концентрационная зависимость КСД молекул, полученная в [25], ряда глобулярных белков в растворе в широком интервале концентраций. Величина  $\hat{\varphi}$  для каждой системы белок-растворитель находилась как пересечение асимптоты с нулевым наклоном, проведенной к экспериментальной кривой в приближении бесконечного разбавления, и касательной с наклоном  $(\varphi)^{-3}$ ,

проведенных к экспериментальной кривой в области концентрированного раствора. Значения  $\hat{\phi}$  для исследованных растворов белков приведены в таблице 1. Величина  $D_0$  определялась из линейной экстраполяции полученных концентрационных зависимостей КСД белков  $D(\phi)$  на нулевое значение концентрации.

При исследовании самодиффузии молекул глобулярных белков авторами работы [25] было проведено сравнение полученных данных по самодиффузии молекул глобулярных белков с результатами, характерными для молекул гибкоцепных полимеров, а также с моделью жестких броуновских частиц, представляющих собой два крайних случая с точки зрения структуры. Оказалось, что обобщенные концентрационные зависимости коэффициентов самодиффузии молекул белков и гибкоцепных полимеров различаются. Это различие, как видно из Рисунка 9А, проявляется в существовании на обобщенной концентрационной кривой КСД белков более резкого перехода от асимптоты с нулевым наклоном  $(\phi/\hat{\phi})^0$  к участку с наклоном  $(\phi/\hat{\phi})^{-3}$ , чем на концентрационной зависимости КСД гибкоцепных полимеров. По мнению авторов это обусловлено одной из главных особенностей молекул глобулярных белков – их жесткой глобулярной структурой.

При сравнении полученных концентрационных зависимостей глобулярных белков с известными закономерностями трансляционной динамики жестких броуновских частиц в диапазоне приведенных концентраций было достигнуто хорошее согласие (Рис.9.Б). Однако, для этого потребовалось проведение нормировочной процедуры с введением нормировочного коэффициента  $\xi = \hat{\phi}_0 / \hat{\phi}$ , где  $\hat{\phi}_0$  определяется для растворов броуновских сфер из пересечения асимптоты с нулевым наклоном и касательной с наклоном  $(\phi)^{-3}$ , проведенных к теоретической кривой (формула (12)). Значения использовавшихся нормировочных коэффициентов приведены в Таблице 1.



**Рисунок 9.** А) Обобщенная концентрационная зависимость КСД молекул глобулярных белков в водных суспензиях. Сплошная линия – обобщенная концентрационная зависимость КСД гибкоцепных полимеров [26]. Б) Сплошная линия – обобщенная концентрационная зависимость КСД жестких броуновских частиц, построенная с учетом эффекта столкновений [15]. На рисунках приведены экспериментальные значения для бычьего сывороточного альбумина (рН=4.8–5.2) и миоглобина (рН=6.8–7.2) при 10 (1, 5), 20 (2, 6), 24 (3, 7), 35°C (4, 8); лизоцима при 30°C, рН=2.9–3.0 (9) и рН=7.4–7.8 (10); барстара при 303К, рН=8.0–8.2 (11). Рисунки воспроизведены из работы [25].

Из Рисунка 9Б видно, что в пределах ошибки эксперимента, теоретическая зависимость КСД жестких сфер от концентрации совпадает в приведенном диапазоне концентраций с общей концентрационной зависимостью КСД молекул глобулярных белков, полученной в результате нормировочной процедуры. Это дает основания полагать, что общие динамические свойства молекул глобулярных белков в растворах во всей области исследованных концентраций (до максимальной концентрации,

равной  $0.85 \varphi_0$ , где  $\varphi_0$  – концентрация плотной упаковки сфер, формула (12)), близки свойствам жестких броуновских частиц.

Построенная обобщенная концентрационная зависимость может быть использована для прогнозирования КСД молекул глобулярных белков. При этом уменьшение критической концентрации  $\hat{\varphi}$  по сравнению с  $\hat{\varphi}_0$  может являться индикатором происходящей в растворе ассоциации молекул.

Авторами [25] было оценено расстояние между молекулами белков в растворе с концентрацией, равной критической  $\hat{\varphi}$ . Они рассмотрели единицу объема, в которой находится  $N$  молекул белка с простой кубической упаковкой, и аппроксимировали их сферами радиусом  $R$  и объемом  $V$ , равным объему молекулы белка. Тогда, при объемной доле сфер  $\hat{\varphi}$  длина ребра ячейки  $N^{-1/3}$  равна расстоянию между центрами масс молекул белков  $d$ :

$$d = \frac{1}{N^{1/3}} = \sqrt[3]{\frac{V}{\hat{\varphi}}}, \quad (23)$$

Значения  $d$  для исследованных белков также приведены в Таблице 1.

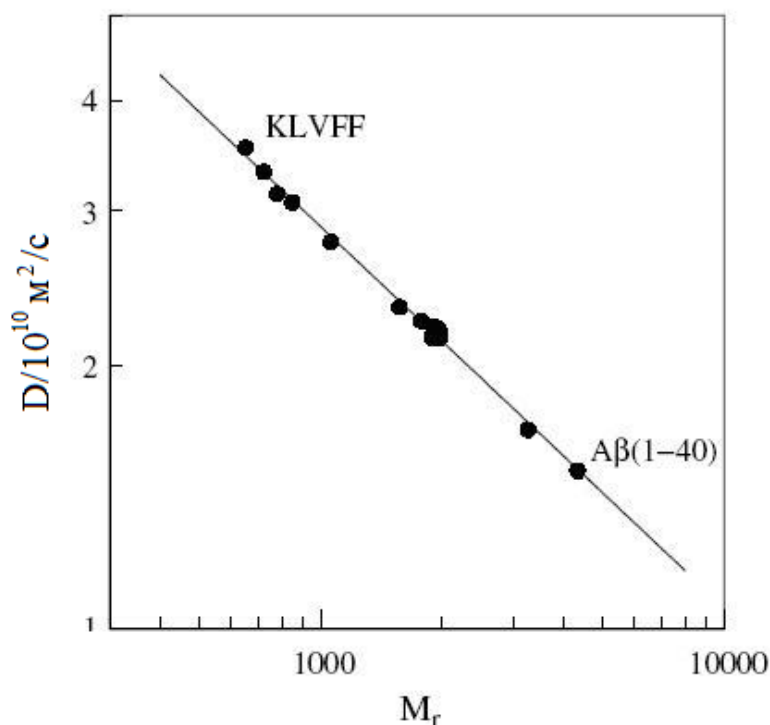
**Таблица 1.** Значения критической концентрации  $\hat{\varphi}$  для растворов ряда белков; расстояния  $d$  между центрами масс молекул белка в растворе с концентрацией белка, равной  $\hat{\varphi}$ , рассчитанные по соотношению (23) и нормировочный коэффициент  $\xi = \hat{\varphi}_0 / \hat{\varphi}$  по данным [25].

Исследуемый водный раствор	Размеры молекул белков, Å	$\hat{\varphi}$ , объемные доли	$d$ , Å	Нормировочный коэффициент, $\xi = \hat{\varphi}_0 / \hat{\varphi}$
Миоглобин, pH=6.8 - 7.2	45x35x25	$0.16 \pm 0.003$	50	$1 \pm 0.02$
БСА, pH=4.8 - 5.2	140x40x40	$0.1 \pm 0.005$	105	$1.6 \pm 0.08$
Барстар, pH=8.0 - 8.2	29x22x21	$0.13 \pm 0.01$	38	$1.23 \pm 0.1$
Лизоцим, pH=2.9 - 3.0	45x30x30	$0.15 \pm 0.02$	52	$1.07 \pm 0.13$
Лизоцим, pH=7.4 - 7.8	45x30x30	$0.08 \pm 0.005$	64	$2 \pm 0.13$

## Молекулярно-массовая зависимость коэффициента самодиффузии молекул пептидов

Авторами работы [27] была исследована самодиффузия в водных растворах амилоидного Аβ-пептида, участвующего, как принято считать, в развитии болезни Альцгеймера, и серии его фрагментов разной длины. В результате этого была установлена молекулярно-массовая зависимость коэффициентов самодиффузии ( $D$ ) исследованных пептидов. Она была описана с помощью эмпирического соотношения Ауэрбаха  $D = \xi_1 M_r^{-\xi_2}$ , где  $M_r$  – молекулярная масса диффундирующих молекул,  $\xi_1$  и  $\xi_2$  – эмпирические константы, зависящие от природы диффундирующего вещества в растворе.

На Рисунке 10 представлена линейная зависимость  $D$  от  $M_r$  для исследуемых пептидов разной длины [27], описываемая уравнением  $D = \xi_1 M_r^{-\xi_2} \text{ м}^2/\text{с}$  с параметрами  $\xi_1 = 6.06 \times 10^{-9}$  и  $\xi_2 = 0.44$ . В Таблице 2 приведены результаты пересчета  $D(M_r)$ .



**Рисунок 10.** Зависимость экспериментальных значений КСД ( $D$ ) пептидов в водном растворе с концентрацией 50 мкмоль от молекулярной массы этих пептидов ( $M_r$ ). Сплошная линия рассчитана при помощи уравнения  $D = \xi_1 M_r^{-\xi_2} \text{ м}^2/\text{с}$  с параметрами  $\xi_1 = 6.06 \times 10^{-9}$  и  $\xi_2 = 0.44$ .  $T=298\text{K}$ . Рисунок воспроизведен из работы [27].

Известно, что значения коэффициента  $D$  для коротких пептидов (KLVFF, KLVFFA, KKLVFFA) и фрагмента пептида  $A\beta(12-28) G_{19}G_{20}$  при данных условиях (низкая концентрация, физиологические pH и  $T=298K$ ) относятся к мономерам этих пептидов. Поскольку совокупность значений  $D$  и  $M_r$  образуют на Рисунке 10 единую прямую линию, однозначно указывая на их полную коррелированность, авторы высказали предположение, что все исследуемые фрагменты разной длины  $A\beta$  пептида в водных растворах при данных условиях также являются мономерами. Более того, такая линейная зависимость  $D$  от  $M_r$  для исследуемых пептидов, по мнению авторов, может также свидетельствовать о том, что вторичная структура фрагментов пептидов идентична. Так как структурной формой коротких пептидов (KLVFF, KLVFFA, KKLVFFA) и коротких фрагментов пептида  $A\beta$  при данных условиях является случайный клубок, то есть основания считать, что и  $A\beta(1-40)$  находится в состоянии случайного клубка.

**Таблица 2.** Коэффициенты самодиффузии  $A\beta(1-40)$  пептида и серии его фрагментов разной длины. Таблица воспроизведена из работы [27].

Пептид	$M_w$ (кДа)	конц. (ммоль)	Частота спектро- метра (МГц)	pH	растворитель <sup>a</sup>	$D^b$ (* $10^{-10}$ м <sup>2</sup> /с)	$D^c$ (* $10^{-10}$ м <sup>2</sup> /с)
KLVFF	0.653	3.12	400	7.03	D <sub>2</sub> O	2.90 ± 0.01	3.53 ± 0.01
KLVFFA	0.724	1.90	400	7.08	D <sub>2</sub> O	2.78 ± 0.02	3.32 ± 0.02
KKLVFFA	0.852	1.0	400	6.92	H <sub>2</sub> O	3.00 ± 0.01	3.06 ± 0.02
$A\beta(12-24)$	1.596	1.0	400	7.36	H <sub>2</sub> O	2.28 ± 0.01	2.32 ± 0.01
$A\beta(12-28)G_{19}G_{20}$	1.774	1.0	400	7.39	H <sub>2</sub> O	2.20 ± 0.01	2.24 ± 0.01
$A\beta(12-28)E_{22}G$	1.883	0.096	400	7.23	D <sub>2</sub> O	1.77 ± 0.02	2.14 ± 0.02
$A\beta(12-28)D_{23}G$	1.896	0.52	400	7.20	H <sub>2</sub> O	2.17 ± 0.02	2.21 ± 0.02
$A\beta(12-28)D_{23}A$	1.910	0.094	400	7.13	D <sub>2</sub> O	1.80 ± 0.04	2.19 ± 0.04
$A\beta(12-28)E_{22}D$	1.941	0.39	400	6.95	D <sub>2</sub> O	1.79 ± 0.01	2.17 ± 0.01
$A\beta(12-28)E_{22}Q$	1.954	0.45	400	7.40	D <sub>2</sub> O	1.81 ± 0.01	2.19 ± 0.01
$A\beta(12-28)E_{22}K$	1.954	0.42	400	7.13	D <sub>2</sub> O	1.77 ± 0.02	2.14 ± 0.01
$A\beta(12-28)D_{23}K$	1.967	0.40	600	6.87	H <sub>2</sub> O	2.10 ± 0.05	2.14 ± 0.05
$A\beta(12-28)E_{22}E$	1.968	0.32	600	7.42	H <sub>2</sub> O	2.14 ± 0.03	2.18 ± 0.03
$A\beta(1-28)$	3.262	0.098	600	7.23	D <sub>2</sub> O	1.39 ± 0.01	1.68 ± 0.01
$A\beta(1-40)$	4.327	0.050	800	7.40	D <sub>2</sub> O	1.25 ± 0.02	1.52 ± 0.02

<sup>a</sup>D<sub>2</sub>O обозначает, что используется D<sub>2</sub>O. H<sub>2</sub>O обозначает, что используется смесь H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O (90:10).

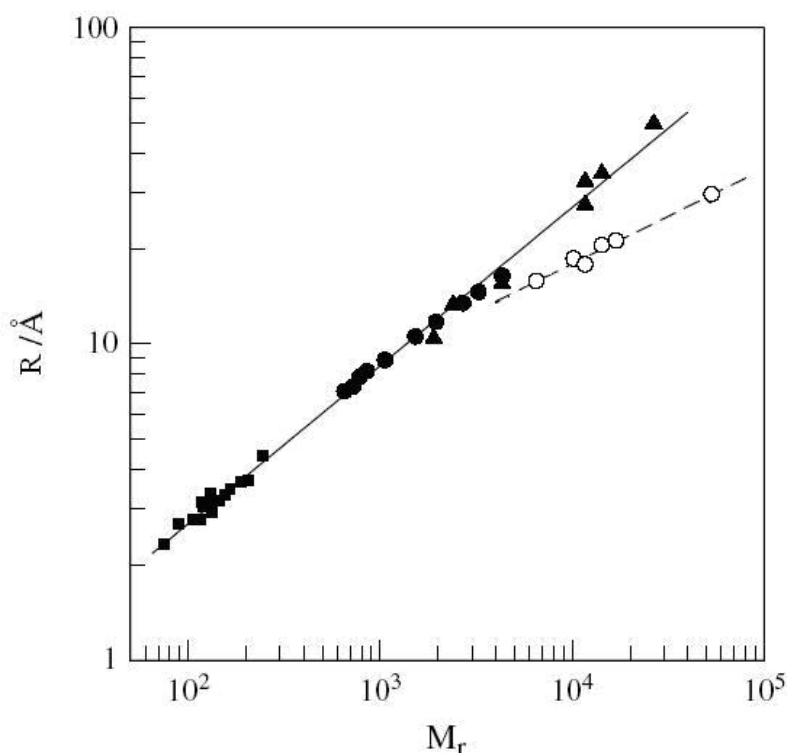
<sup>b</sup>Экспериментально измеренный коэффициент самодиффузии.

<sup>c</sup>Скорректированные значения КСД для раствора в 100% H<sub>2</sub>O.



Анализ молекулярно – массовой зависимости коэффициента самодиффузии молекул дает возможность определить гидродинамический радиус  $R$  диффундирующей молекулы, который может быть рассчитан с использованием формулы Стокса-Эйнштейна (5). Так, на Рисунке 11 по полученным авторами [27] данным представлен график зависимости  $R(M_r)$ , который был аппроксимирован прямой линией, описываемой уравнением  $R = 0.27M_r^{0.57}$  нм. Оказалось, что полученные результаты хорошо согласуются с данными других авторов как для ряда пептидов с меньшим значением  $M_r$  (аминокислоты, ди- и трипептиды) [28], так и для белков бóльшей массы  $M_r$  (в денатурированном состоянии), по сравнению с  $M_r$  исследуемой серии фрагментов Аβ пептида. Действительно, из Рисунка 11 видно, что точки, соответствующие этим литературным данным, ложатся на одну прямую. При этом отмечается, что для всех этих пептидов и белков доминирующей структурной формой является случайный клубок. Когда белкам присуща нативная глобулярная конформация, зависимость  $R(M_r)$  описывается линейной зависимостью  $R = 1.13M_r^{0.30}$  нм.

На основании проведенного анализа экспериментальных данных авторы делают вывод о том, что 1) гидродинамические свойства для пептидов и белков в состоянии случайного клубка и белков, для которых характерна нативная глобулярная конформация, существенно отличаются; 2) гидродинамические свойства Аβ пептида и его фрагментов разной длины близки по своим характеристикам к полипептидам, находящимся в растворе в состоянии случайного клубка.



**Рисунок 11.** График логарифмической зависимости гидродинамического радиуса ( $R$ ) от молекулярной массы ( $M_r$ ) пептидов и белков разной длины в водном растворе по данным экспериментальных исследований: ■ (аминокислоты, ди- и трипептиды) [28], ● (A $\beta$  пептид и серия его фрагментов разной длины) [27], ▲ (белки в денатурированном состоянии) и ○ (белки в нативной глобулярной конформации) [23]. Сплошная линия рассчитана при помощи уравнения  $R = 0.27M_r^{0.57}$  нм для случая, когда пептиды и белки находятся в конформации случайного клубка. Пунктирная линия соответствует уравнению  $R = 1.13M_r^{0.30}$  нм для случая, когда белкам присуща нативная глобулярная конформация. Для расчета гидродинамического радиуса диффундирующих частиц в растворе была использована формула (1). Рисунок воспроизведен из работы [27].

### Процессы молекулярного обмена в системах белок/лиганд

Исследование характеристик обмена между «фазами» (компонентами) в эксперименте ЯМР с ИГМП может способствовать пониманию природы отдельных «фаз» и особенностей взаимодействия между ними. К примеру, информация о динамике обмена между диффундирующими молекулами может быть полезной при исследовании образования комплексов между малой молекулой (ионом, метаболитом, гормоном), именуемой лигандом, и центрами связывания лиганда на макромолекуле [29].

При изучении самодиффузии в растворах белков в присутствии лигандов, лиганды, связанные с центром связывания (именуемым активным центром) на белковой молекуле могут быть рассмотрены как отдельная «фаза». Они имеют меньшую, по сравнению со свободными лигандами в растворе, подвижность и между двумя фазами лигандов может происходить молекулярный обмен.

Впервые задача измерения коэффициентов самодиффузии при наличии обмена между фазами была рассмотрена [30] на примере двухфазной системы в предположении экспоненциальных функций распределения значений времен жизни в «фазах». Решение, полученное в [30], соответствует регистрации диффузионного затухания  $A(t_d)$  при переменной величине  $t_d$ :

$$A(t_d) = p'_a \exp(-q^2 t_d D'_a) + p'_b \exp(-q^2 t_d D'_b), \quad (24)$$

где  $q = \gamma \delta g$ ,  $p'_a$  и  $p'_b$  представляют собой кажущиеся значения населенности «фаз» «a» и «b», характеризующихся кажущимися значениями коэффициентов самодиффузии  $D'_a$  и  $D'_b$ , определяемые следующим образом:

$$D'_{a(b)} = \frac{1}{2} \left\{ \begin{array}{l} D_a + D_b + \frac{1}{q^2} \left( \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right) (\pm) \\ (\pm) \sqrt{\left[ \left( D_b - D_a + \frac{1}{q^2} \left( \frac{1}{\tau_a} - \frac{1}{\tau_b} \right) \right)^2 + \frac{4}{q^4 \tau_a \tau_b} \right]} \end{array} \right\}; \quad (25)$$

$$p'_b = \frac{1}{D'_b - D'_a} (p_a D_a + p_b D_b - D'_a); \quad p'_a = 1 - p'_b.$$

В этом выражении величины  $D_a$  и  $D_b$  представляют собой истинные значения КСД в обменивающихся «фазах», а населенности  $p_a$  и  $p_b$  этих компонент есть убывающие функции времени диффузии  $t_d$ :

$$p_{a,b}(t_d) / p_{a,b}(t_d = 0) = 1 - \int_0^{t_d} \psi_{a,b}(\tau_{a,b}) d\tau_{a,b}, \quad (26)$$

где  $p_{a,b}(t_d=0)$  – истинная населенность «фазы» “ $a$ ” и “ $b$ ”, а интеграл – накопленная за время  $t_d$  вероятность покинуть соответствующую «фазу» хотя бы один раз,  $\psi_{a,b}(\tau_{a,b})$  – функции плотности распределения времен жизни  $\tau_{a,b}$  в соответствующих «фазах» или состояниях.

При различных соотношениях между  $t_d$  и временами жизни в фазах, различают следующие формы диффузионного затухания, [6] характерные для:

1) условий быстрого обмена ( $t_d \gg \tau'_a, \tau'_b$ ):

$$A(g^2) = \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d \bar{D}), \quad (27)$$

где  $\bar{D} = p_a D'_a + p_b D'_b$ .

2) условий медленного обмена ( $t_d \ll \tau'_a, \tau'_b$ ):

$$A(g^2) = p_a \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_a) + p_b \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_b), \quad (28)$$

3) условий промежуточного обмена ( $t_d \approx \tau'_a, \tau'_b$ ):

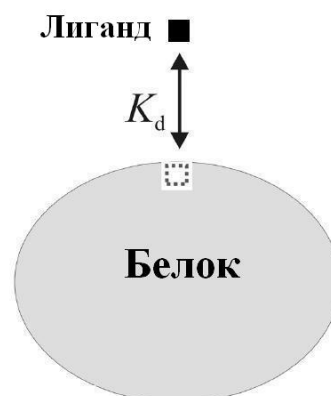
$$A(g^2) = \sum_j W_j(t_{aj}, t_{bj}) \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 (D_a t_{dj} + D_b t_{dj})], \quad (29)$$

где  $t_{aj}, t_{bj}$  – суммарные времена пребывания ядер в состоянии  $a$  и  $b$  в течение времени диффузии  $t_d$ ,  $W_j(t_{aj}, t_{bj})$  – вероятность осуществления таких реализаций. Величина  $(D_a t_{aj} + D_b t_{bj})/t_d$  имеет смысл некоторого усредненного (кажущегося) КСД для молекул, удовлетворяющих в промежутке  $0 - t_d$   $j$ -й реализации обмена.

Для иллюстрации исследования характеристик обмена между лигандами и белками в растворе в эксперименте ЯМР с ИГМП обратимся к некоторым результатам работы [29]. Авторы этой работы изучили связывание лекарственного препарата салицилата с бычьим сывороточным альбумином. На Рисунке 12 схематически представлен случай двухфазной системы, состоящей из низкомолекулярной компоненты – лиганда  $L$ , свободно диффундирующего в растворе при наличии молекулярного обмена с лигандом, связанным с активным центром на белковой молекуле  $P$ . На

Рисунке 12  $K_d$  представляет собой константу диссоциации  $LP$  комплекса ( $LP \xleftrightarrow{K_d} P + L$ ).

**Рисунок 12.** Схематическое изображение молекулярного обмена лиганда между его «свободным» состоянием (темный квадрат) и связанным с белком состоянием (светлый квадрат). Рисунок заимствован из работы [31].



На Рисунке 13 представлены  $^1\text{H}$  ЯМР спектры салицилата в водном растворе в присутствии бычьего сывороточного альбумина при различных значениях импульсного градиента. Авторы отмечают [29], что в кривых диффузионных затуханий выделить третью компоненту, которая характеризовала бы салицилат, связанный с белком, не удалось. При всех заданных концентрациях альбумина и салицилата компонента диффузионного затухания, характеризовавшая салицилат в растворе, оставалась одноэкспоненциальной. Этот экспериментальный факт, по мнению авторов [29], связан с тем, что обмен между свободными молекулами салицилата и молекулами салицилата, связанными с белками, может быть быстрым по сравнению со временем наблюдения за процессом диффузии, и тогда наблюдаемый КСД есть усредненный коэффициент самодиффузии, характеризующий как свободные салицилаты в растворе и салицилаты, связанные с активным центром на белковой молекуле:

$$D = p_b D_b + p_f D_f, \quad (30)$$

где  $p_f$  и  $p_b$  – доли протонов свободной и связанной с активным центром белка салицилатов,  $D_f$  и  $D_b$  – КСД молекул свободной и связанной с активным центром белка салицилатов, соответственно. Так как КСД  $D_b$  меньше, чем КСД  $D_f$ , то согласно выражению (30) значение  $D$  в случае быстрого обмена между свободными салицилатами и салицилатами, связанными с белком,

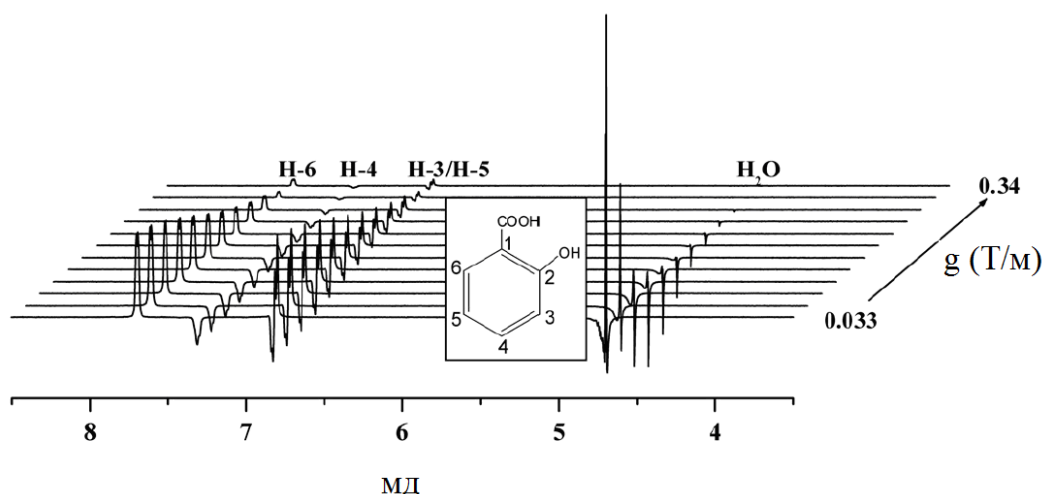
должны быть также меньше, чем КСД свободно диффундирующих молекул салицилата. Населенности  $p_f$  и  $p_b$  могут быть рассчитаны как [29]:

$$p_b = \alpha - \sqrt{\alpha^2 - \beta}, \quad p_f = 1 - p_b \quad (31)$$

где

$$\alpha = \frac{C_L + nC_P + K_d}{2C_L}, \quad \beta = \frac{nC_P}{C_L}. \quad (32)$$

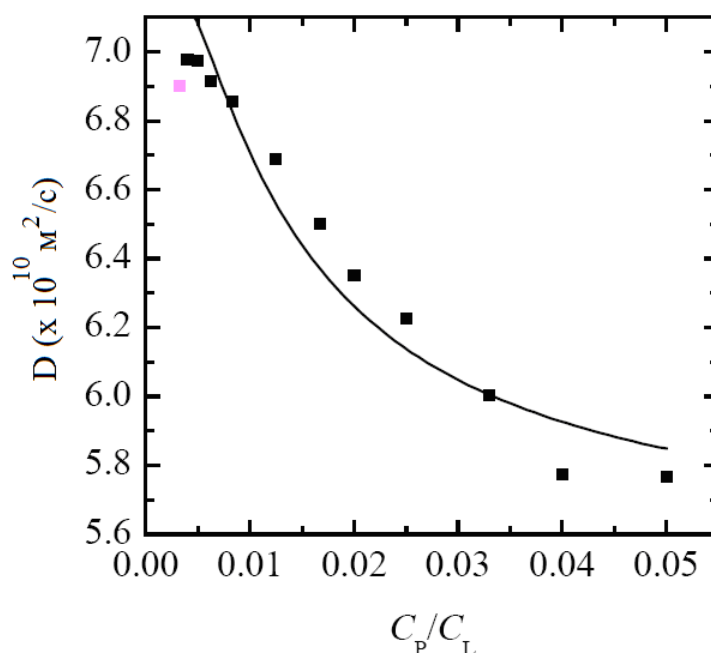
Здесь  $C_L$  и  $C_P$  представляют собой общую концентрацию свободных лигандов и свободных белков в растворе, соответственно.  $D_b$ , при достаточно хорошем приближении идентичен КСД молекулы свободного белка в растворе  $D_P$ . Так, для концентрации альбумина 0.5 мМ в отсутствие молекул салицилатов  $D_P = 0.64 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$  при  $T = 298 \text{ К}$ .



**Рисунок 13.** Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР салицилата (80 мМоль) в водном растворе в присутствии бычьего сывороточного альбумина (0.5 мМоль) при различных значениях импульсного градиента (амплитуда сигнала убывает по мере увеличения импульсного градиента).  $T = 298 \text{ К}$ . Частота  $^1\text{H}$  ЯМР 500 МГц. Сигнал от воды подавлялся с помощью методики ЯМР *WATERGATE* [29]. Остаточный сигнал от протонов воды наблюдался при 4,7 мд. Другие три спектральные линии (слева от сигнала от воды) соответствуют группам Н-6, Н-4, Н-3/Н-5, принадлежащих молекуле салицилата (структура изображена на вкладке). Рисунок воспроизведен из работы [29].

Для определения константы диссоциации  $K_d$  была выполнена серия экспериментов по измерению коэффициентов самодиффузии для системы салицилат/альбумин в зависимости от концентрации салицилата в растворе.

Эти зависимости в координатах КСД салицилата – отношение концентрации альбумина  $C_p$  к концентрации салицилата  $C_L$  в растворе представлены на Рисунке 14. Константа диссоциации  $K_d$  была рассчитана путем анализа экспериментальных данных с использованием уравнений (30)-(33). Она оказалась равной  $0.030 \pm 0.004$  М. В то же время на Рисунке 14 нельзя не заметить наблюдающегося значительного отклонения экспериментальной зависимости от рассчитанной. Одна из возможных причин указанного обстоятельства, по мнению авторов, может состоять в том, что используемая модель требует дополнительного уточнения. В частности, необходим учет вероятной необратимой ассоциации/агрегации молекул лигандов друг с другом и с молекулами белков при высоких концентрациях лигандов.



**Рисунок 14.** Зависимость коэффициентов самодиффузии салицилата в присутствии бычьего сывороточного альбумина (0.5 мМоль) в водном растворе от относительной концентрации свободных центров связывания на белках ( $C_p$ ) и свободных лигандов ( $C_L$ ) в растворе. Частота  $^1\text{H}$  ЯМР 500 МГц. Аппроксимирующая кривая – результат расчета с помощью уравнений (30-33) с коэффициентом  $K_d = 0.030 \pm 0.004$  и  $n = 33 \pm 3$ . Рисунок воспроизведен из работы [29].

## Кинетика агрегации лизоцима в водном растворе

Прайсом с соавторами [32] была изучена кинетика агрегации лизоцима в водном растворе в интервале концентраций от 3 до 7 мМ, при условиях, способствующих агрегации лизоцима (рН 6 и присутствие соли 0.5 М NaCl при  $T=298\text{K}$ ) методом ЯМР диффузометрии. Кинетические кривые зависимости коэффициентов самодиффузии лизоцима, полученные при различных концентрациях белка, приведены на Рисунке 15. Авторы отмечают, что компонента диффузионного затухания, характеризовавшая белок в растворах, где присутствовали ассоциированные молекулы, оставалась в исследованном динамическом диапазоне одноэкспоненциальной при всех приведенных концентрациях.

На Рисунке 15 открытыми фигурками ( $\circ\triangle\nabla\square$ ) изображены КСД белка ( $D_1^C$ ) в мономерной форме для различных концентраций лизоцима в растворе, рассчитанные с учетом поправки Токуяма  $f(\varphi)$  (см. уравнение (12)) [15], учитывающей влияние концентрации на КСД молекул:

$$D_1^C = D_1^0 \cdot f(\varphi), \quad (33)$$

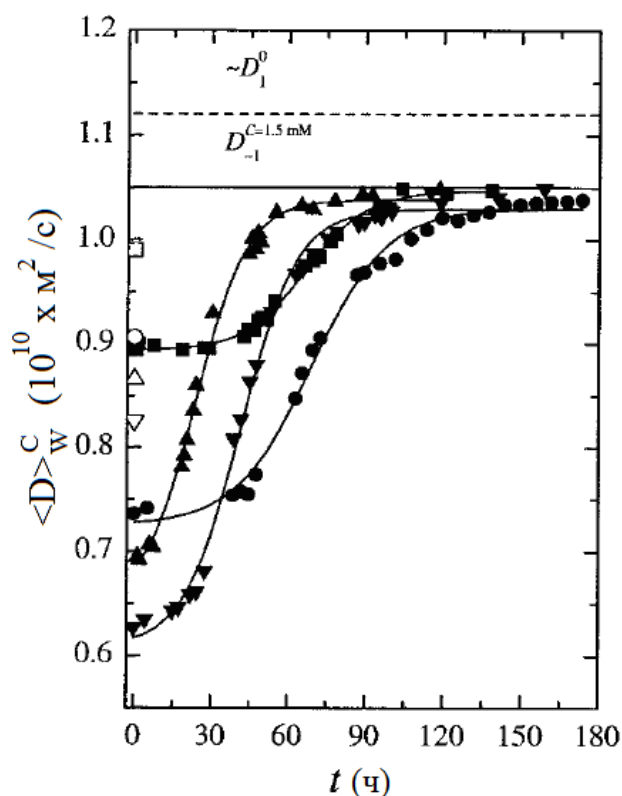
где  $D_1^0$  – КСД мономера белка при бесконечном разбавлении, рассчитанный с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна ( $D_1^0 = 1.12 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$ ). Значения параметров  $f(\varphi)$  для исследуемых концентраций представлены в Таблице 3. Видно, что величины  $D_1^C$  и экспериментальные значения КСД лизоцима в начальный момент времени ( $t = 0$ ) значительно отличаются друг от друга. Этот факт, а также то обстоятельство, что в экспериментах компонента диффузионного затухания, характеризовавшая белок в растворах, где присутствуют ассоциаты, при всех концентрациях практически не отличалась от экспоненты, по мнению авторов [32], может означать, что наблюдаемые в эксперименте КСД, как в начальный момент времени, так и в последующее время, одновременно характеризовали и мономеры и ассоциаты, состоящие из различного числа мономеров. Таким образом, наблюдался средний КСД



$\langle D \rangle_W^C$  для всех представленных в растворе кинетических единиц, который может быть представлен как:

$$\langle D \rangle_W^C = \frac{\sum_i M w_i n_i D_i^C}{\sum_i M w_i n_i}, \quad (34)$$

где индекс  $i$  – число мономеров лизоцима, входящих в ассоциат, молекулярная масса которого  $M w_i$  (к примеру,  $i = 2$  соответствует димеру лизоцима,  $i = 3$  – тримеру и т.д.);  $n_i$  – количество  $i$ -ассоциатов;  $D_i^C$  – коэффициент самодиффузии  $i$ -ассоциата;  $C$  – индекс, обозначающий концентрацию белка в растворе.



**Рисунок 15.** Временная зависимость среднего коэффициента самодиффузии  $\langle D \rangle_W^C$  белка лизоцима при концентрациях белка в растворе 3 мМ (■), 5 мМ (●), 6 мМ (▲), 7 мМ (▼). Исследования агрегации лизоцима проводились в присутствии соли 0.5 М NaCl, pH 6 и  $T=25^\circ\text{C}$ . Сплошные кривые рассчитаны по уравнению (35). Пунктирная горизонтальная линия относится к КСД мономера лизоцима  $D_1^0 = 1.12 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$  при бесконечном разбавлении. Прямая горизонтальная линия относится к КСД мономера  $D_{-1}^{C=1.5 \text{ мМ}} = 1.05 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$ . Рисунок воспроизведен из работы [32].

Образование агрегатов сопровождалось увеличением наблюдаемого КСД белка, как видно из Рисунка 15, что коррелировало с наблюдавшимся появлением белкового осадка. По мнению авторов [32], агрегация белков в водных растворах сопровождается увеличением скорости поперечной ( $T_2$ ) ЯМР релаксации протонов белка, что может приводить к исчезновению в сигнале спинового эхо вклада от молекул лизоцима в осадке. По мере

агрегации и выпадения части белка в осадок, наблюдаемый средний КСД  $\langle D \rangle_W^C$  белка в растворе характеризует мономеры и ассоциаты, состоящие из уменьшающегося во времени числа мономеров, что объясняет увеличение наблюдаемого КСД белка во времени. При достаточно больших значениях времени измерения для исследуемых концентраций величины  $\langle D \rangle_W^C$  практически перестают зависеть от времени измерения.

Проведенный в работе [32] анализ кинетических кривых показал, что в интервале приведенных концентраций лизоцима кинетические кривые удовлетворительно описываются сигмоидальной функцией Больцмана вида:

$$\langle D \rangle_W^C = \frac{\langle D(t_0) \rangle_W^C - \langle D(t_\infty) \rangle_W^C}{1 + e^{t - t_{\text{sigm}}/t_s}} + \langle D(t_\infty) \rangle_W^C, \quad (35)$$

где  $\langle D(t_0) \rangle_W^C$  – КСД лизоцима в начальный момент времени ( $t = 0$ );  $\langle D(t_\infty) \rangle_W^C$  – предельное значение КСД лизоцима при  $t \rightarrow \infty$ ;  $t_{\text{sigm}}$  – точка перегиба сигмоидальной функции Больцмана;  $t_s$  – параметр, определяющий наклон перегиба: показывает за какой промежуток времени разность  $\langle D(t_0) \rangle_W^C - \langle D(t_\infty) \rangle_W^C$  изменится в «е» раз. Значения параметров представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Параметры, характеризующие изменение самодиффузии молекул лизоцима при его агрегации из водного раствора.

Концентрация	$f(C)$	$\langle D(t_0) \rangle_W^C$ (*10 <sup>-10</sup> М <sup>2</sup> /с)	$\langle D(t_\infty) \rangle_W^C$ (*10 <sup>-10</sup> М <sup>2</sup> /с)	$t_{\text{sigm}}$ (h)	$T_s$ (h)
3 mM	0.884	0.89 ± 0.00	1.05 ± 0.00	66.5 ± 0.8	11.8 ± 0.7
5 mM	0.809	0.72 ± 0.01	1.03 ± 0.00	68.9 ± 1.2	14.6 ± 1.0
6 mM	0.773	0.65 ± 0.01	1.04 ± 0.00	23.9 ± 0.9	9.9 ± 0.8
7 mM	0.737	0.61 ± 0.01	1.03 ± 0.00	41.4 ± 0.9	10.8 ± 0.8

Таким образом, информация о временной зависимости среднего значения коэффициента самодиффузии белка лизоцима в растворе позволила исследовать особенности начальной стадии агрегации этого белка.

### Вопросы для самоконтроля

1. Какими факторами определяется зависимость коэффициента самодиффузии белка от его концентрации в растворе?
2. О чем свидетельствует универсальный вид зависимости коэффициента самодиффузии белка от его концентрации?
3. Каким образом проявляются индивидуальные отличия в свойствах белков на концентрационной зависимости их коэффициентов самодиффузии?
4. С чем связано различие вида концентрационных зависимостей коэффициентов самодиффузии глобулярных белков от зависимости КСД гибкоцепных полимеров?
5. Какой из описанных в Таблице 1 белков в наибольшей степени соответствует жесткой броуновской частице?
6. Метод ЯМР ИГМП позволяет измерять коэффициенты самодиффузии в интервале  $\sim 10^{-14}$  -  $\sim 10^{-7}$  м<sup>2</sup>/с. Оцените, можно ли используя этот метод измерит КСД глобулярных белков с молекулярными массами 1 МДа и 10 МДа?
7. Какие причины могут затруднять измерение методом ЯМР ИГМП КСД белков большой молекулярной массы?
8. Можно ли изучать явления обмена между «фазами» в эксперименте ЯМР ИГМП по изменению среднего значения КСД белка?
9. При каком соотношении времени диффузии эксперимента ЯМР ИГМП и времени пребывания молекул в фазах применение этого метода наиболее информативно для исследования динамики обмена?
10. Каким образом можно изучать агрегацию белков в эксперименте ЯМР ИГМП?

## Список литературы:

1. Финкельштейн, А. В. Физика белка [Text] /Финкельштейн А.В., О.Б. Птицын – 3-е изд. – М.: КДУ, 2005. – 465 с.
2. Faendrich, M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates [Text] /Faendrich M. // Cell. Mol. Life Sci – 2007. – V. 64. – P. 2066 – 2078.
3. Ross, C. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease [Text] /C. A. Ross, M. Poirier // Nature Medicine – 2004. – V. 10. – P. S10–S17.
4. Taylor, J. P. Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease [Text] /J. P. Taylor, J. Hardy, K.H. Fischbeck // Science – 2002. – V. 296. – P. 1991.
5. Weedon, D. Skin Patology [Text] /Weedon D. – 3rd ed. – Churchill Livingstone. АО, – 2010. – 1060 p.
6. Маклаков, А. И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров [Text] /А. И. Маклаков, В. Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин – Казань: Изд-во Казанского гос. ун-та, 1987. – 224 с.
7. Richards, F. M. The interpretation of protein structures: total volume, group volume, distributions and packing density [Text] /Richards F.M. // J. Mol. Biol. – 1974. – V. 82. – P. 1–15.
8. Klapper, M. H. On the nature of the protein interior [Text] /Klapper M.H. // Biochim. Biophys. Acta – 1971. – V. 229. – P. 557–566.
9. Perrin, F. The brownien movement of an ellipsoide. I Dielectric dispersion of an ellipsoidal molecule. [Text] /Perrin F. // J. Phys. Radium – 1934. – V. 5. – P. 497–511.
10. Bloomfield, V. A. Frictional coefficients of mul-tisubunit structures. I. Theory. [Text] /V. A. Bloomfield, W. O. Dalton, K.E. Holde // Bipolymers – 1967. – V. 5. – P. 135–148.
11. Torre, J. G. Hydration from hydrodynamics. General considerations and applications of bead modelling to globular proteins [Text] /Torre J.G. // Biophysical Chemistry – 2001. – V. 93. – P. 159–170.

12. Torre, J. G. HYDRONMR: Prediction of NMR Relaxation of Globular Proteins from Atomic-Level Structures and Hydrodynamic Calculations [Text] /J. G. Torre, M. L. Huertas, B. Carrasco // J.Magn.Reson. – 2000. – V. 147. – P. 138–146.
13. Zhou, H.-X. A unified picture of protein hydration: prediction of hydrodynamic properties from known structures. [Text] /Zhou H.-X. // Biophys. Chem. – 2001. – V. 93. – P. 171–179.
14. Krishnan, V. Determination of Oligomeric State of Proteins in Solution from Pulsed-Field-Gradient Self-Diffusion Coefficient Measurements. A Comparison of Experimental, Theoretical, and Hard-Sphere Approximated Values [Text] /Krishnan V. // J. Magn. Reson. – 1997. – V. 124. – P. 468.
15. Tokuyama, M. Dynamics of hard-sphere suspensions. [Text] /M. Tokuyama, I. Oppenheim // Phys. Rev. – 1994. – V. 50. – P. 16–19.
16. Han, J. Macromolecular Diffusion in Crowded Solutions [Text] /J. Han, J. Herzfeld // Biophysical J. – 1993. – V. 65. – P. 1155–1161.
17. Hanna, S. Self-diffusion of spherical Brownian particles with hard-core interaction [Text] /S. Hanna, W. Hess, R. Klein // Physica – 1982. – V. 111A. – P. 181–199.
18. Ptitsyn, O. B. Molten globule and protein folding. [Text] /Ptitsyn O.B. // Adv. Protein Chem. – 1995. – V. 47. – P. 83–229.
19. Uversky, V. N. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. [Text] /V. N. Uversky, O.B. Ptitsyn // J. Mol. Biol. – 1996. – V. 225(1). – P. 215–228.
20. Kataoka, M. Structural characterization of the molten globule of alpha-lactalbumin by solution X-ray scattering. [Text] /M. Kataoka, K. Kuwajima, F. Tokunaga, Y. Goto // Protein Sci. – 1997. – V. 6(2). – P. 422–430.
21. Uversky, V. N. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. [Text] /Uversky V.N. // Protein Sci. – 2002. – V. 11(4). – P. 739 – 756.

22. Danielsson, J. The Alzheimer b-peptide shows temperature-dependent transitions between left-handed  $3_1$ -helix,  $\beta$ -strand and random coil secondary structures [Text] /J. Danielsson, J. Jarvet, P. Damberg, A. Graeslund // FEBS – 2005. – V. 272. – P. 3938–3949.
23. Wilkins, D. K. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques [Text] /D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, et al. // Biochemistry – 1999. – V. 38. – P. 16424–16431.
24. Stejskal, E. O. Self-diffusion measurements: spin-echoes in presence of a time dependent field gradient [Text] /E. O. Stejskal, J.E. Tanner // J. Chem. Phys. – 1965. – V. 42. – P. 288–292.
25. Nesmelova, I. V. Generalized Concentration Dependence of Globular Protein Self-Diffusion Coefficients in Aqueous Solutions [Text] /I. V. Nesmelova, V. D. Skirda, V.D. Fedotov // Biopolymers – 2002. – V. 63. – P. 132–140.
26. Skirda, V. D. On the generalized concentration and molecular mass dependence of macromolecular self-diffusion in polymer solutions [Text] /V. D. Skirda, V. I. Sundukov, A. I. Maklakov, O. E. Zgadzai, et al. // Polymer – 1988. – V. 2(7). – P. 1294–1300.
27. Danielsson, J. Translational diffusion measured by PFG-NMR on full length and fragments of the Alzheimer A $\beta$ (1–40) peptide. Determination of hydrodynamic radii of random coil peptides of varying length [Text] /J. Danielsson, J. Jarvet, P. Damberg, A. Graslund // Magn. Reson. Chem. – 2002. – V. 40. – P. S89–S97.
28. Tirado, M. M. Comparison of theories for the translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. Application to short DNA fragments [Text] /M. M. Tirado, C. L. Martínez, J.G. Torre // J. Chem. Phys. – 1984. – V. 81. – P. 2047–2053.
29. Price, S. W. PGSE-WATERGATE, a new tool for NMR diffusion-based studies of ligand–macromolecule binding [Text] /S. W. Price, F. Elwinger,

- C. Vigouroux, P. Stilbs // Magn. Reson. Chem. – 2002. – V. 40. – P. 391–395.
30. Karger, J. Zur messbarkeit von diffusionkoeffizienten in zweiphasen system mit hilfe der methode der gepulsten feldgradienten [Text] /Karger J. // Annalen der Physik – 1969. – V. 24, No 1-2. – P. 1–7.
31. Price, W. C. Applications of Pulsed Gradient Spin-Echo NMR Diffusion Measurements to Solution Dynamics and Organization [Text] /Price W.S. // Diffusion Fundamentals – 2005. – V. 2. – P. 112.1 – 112.19.
32. Price, W. S. Time Dependence of Aggregation in Crystallizing Lysozyme Solutions Probed Using NMR Self-Diffusion Measurements [Text] /W. S. Price, F. Tsuchiya, Y. Arata // Biophysical Journal – 2001. – V. 80. – P. 1585 – 1590.