

## МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В РАСТВОРЕ

© А. М. Поляничко,<sup>1, 2, \*</sup> Н. В. Михайлов,<sup>1</sup> Н. М. Романов,<sup>1</sup>  
Ю. Г. Баранова,<sup>1</sup> Е. В. Чихиржина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,  
и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: a.polyanichko@spbu.ru

Изучали механизмы образования межмолекулярных белковых комплексов на примере мономеров, олигомеров и агрегатов бычьего сывороточного альбумина (БСА) в зависимости от концентрации белка, кислотности среды и концентрации мочевины. Используя методы динамического рассеяния света, аналитического ультрацентрифугирования и электрофореза в полиакриламидном геле, показали, что в растворах БСА существует динамическое равновесие между мономерным и агрегированным состоянием белка. Уменьшение рН раствора в интервале 4.0—1.0 приводит к росту размера агрегатов. В растворах с низкой концентрацией мочевины (до 2 М) происходит уменьшение размера агрегатов, тогда как увеличение концентрации мочевины в интервале 2—8 М приводит к росту их размеров вследствие денатурации белка.

Ключевые слова: сывороточный альбумин, аналитическое ультрацентрифугирование, динамическое светорассеяние.

Принятые сокращения: АУЦ — аналитическое ультрацентрифугирование, БСА — бычий сывороточный альбумин, СА — сывороточный альбумин.

Сывороточные альбумины (СА) — одни из наиболее доступных и хорошо изученных белков. Характерной особенностью СА является присутствие в его растворе заметных количеств димеров, олигомеров, а иногда и более крупных агрегатов (Zini et al., 1979; Tankersley, Finlayson, 1980; Darcel, 1987; Atmeh et al., 2007). В последнее время олигомерные формы СА нашли широкое применение в самых различных приложениях, простирающихся от их использования в качестве высокоэффективных переносчиков биологически активных лигандов в кровотоке до сборки полимерной матрицы для синтеза флуоресцентных металлических нанокластеров (Guo, Iru-dayaraj, 2011; Chen et al., 2014; Mohanty, Patel, 2014). Тем не менее механизмы формирования олигомерных форм СА и их свойства остаются плохо изученными (Atmeh et al., 2007; Majorek et al., 2012).

Опубликованные к настоящему времени работы, посвященные изучению механизмов взаимодействия между молекулами СА, немногочисленны и содержат порой противоречивые результаты. Одни авторы указывают на то, что олигомерные комплексы СА достаточно стабильны благодаря формированию межмолекулярных дисульфидных мостиков между остатками цистеина (Brahma et al., 2005). Другие полагают, что такие межмолекулярные комплексы образуются исключительно за счет нековалентных взаимодействий (Honda et al., 2000) и склонны к диссоциации и переходу в мономерное состояние (Atmeh et al., 2007).

Современная теория образования агрегатов предполагает выполнение некоторых условий, необходимых для агрегации: доступность остатков цистеина, предрасплавленное состояние белковой глобулы и др. (Speed et al., 1996; Wetzel, 1996, 1997). Последняя гипотеза подтверждается предпочтительным образованием комплексов из четного числа мономеров — димеров, тетрамеров и гексамеров (Atmeh et al., 2007). В настоящей работе мы изучали механизмы образования межмолекулярных комплексов СА на примере мономеров, олигомеров и агрегатов бычьего сывороточного альбумина (БСА), используя спектроскопические и гидродинамические подходы.

### Материал и методика

В работе использовали коммерческий препарат БСА (Реахим, Россия). Чистоту белка определяли методами нативного и денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. В исходных растворах БСА было обнаружено наличие как олигомеров, так и агрегатов. В ходе пробоподготовки агрегаты удаляли из исходных растворов БСА центрифугированием (10 мин при 10 000 g). Количество агрегатов в рабочих растворах не превышало 0.5 % от общего числа частиц, находящихся в растворе, по оценке методом динамического рассеяния света. Концентрацию белка в растворе определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции

$\epsilon_{279} = 43\,824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Pace et al., 1985; Gill, von Hippel, 1989).

Аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ). Эксперименты по определению коэффициента седиментации проводили на аналитической ультрацентрифуге ProteomeLab XL-I (Beckman-Coulter, США) при температуре образца  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Подготовку образцов проводили по описанной ранее методике (Поляничко и др., 2000). Регистрацию кривых седиментации осуществляли по поглощению при длине волны 280 нм и по интерференции (длина волны лазера 660 нм). Для проведения эксперимента методом АУЦ готовили пробы БСА в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7.0). Обработку данных проводили по методу распределения коэффициента седиментации  $c(S)$  (Schuck, 2000) с использованием программного обеспечения SEDFIT (sedfitsedphat.nibib.nih.gov/software/).

Динамическое рассеяние света. С помощью этого метода определяли коэффициент диффузии и размер частиц, находящихся в растворе. Коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  рассчитывали по соотношению Стокса—Эйнштейна:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi \eta_0 \eta_r (f/f_0) R_h},$$

где  $D_t$  — коэффициент трансляционной диффузии,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура,  $\eta_0$  — динамическая вязкость растворителя,  $\eta_r$  — относительная вязкость растворителя,  $f$  — коэффициент трения гидратированной молекулы,  $f_0$  — коэффициент трения молекулы до гидратации,  $R_h$  — гидродинамический радиус. Коэффициент диффузии связан с радиусом частицы формулой Стокса—Эйнштейна:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi \eta R},$$

где  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура раствора,  $\eta$  — динамическая вязкость растворителя,  $R$  — радиус рассеивающего центра.

Радиус частиц определяли на установке PhotoCor-Complex (Россия). Измерения проводили в термостатируемой кювете при длинах волн лазеров 405 и 654 нм и при мощности 25 мВт. Данные обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения, которое поставляется с прибором (PhotoCor software, DynaLS v.2.0).

$\zeta$ -Потенциал определяли на установке Horiba SZ100 (Япония). Для обработки данных использовали стандартное программное обеспечение, поставляемое с установкой. Измерения проводили в термостатируемой камере (при  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) при длине волны лазера 532 нм (мощность лазера 10 мВт). Значение  $\zeta$ -потенциала определяли согласно теории Смолуховского (Фридрихсберг, 1984) по формуле

$$\zeta = \frac{3\eta\mu_E}{2\epsilon},$$

где  $\zeta$  — потенциал диффузного слоя,  $\eta$  — вязкость растворителя,  $\mu_E$  — электрофоретическая подвижность частиц,  $\epsilon$  — диэлектрическая проницаемость растворителя.

УФ-спектроскопию поглощения проводили на установке Shimadzu UV-1800 (Япония). Для обработки

данных использовали программное обеспечение UVProbe software, поставляемое вместе с оборудованием. Измерения проводили в интервале длин волн 230—320 нм в кюветах с оптическим путем 2, 5 или 10 мм в зависимости от оптической плотности образца. Погрешность измерения  $\Delta A$  составляла 0.002—0.006 ед. поглощения в зависимости от интенсивности регистрируемого сигнала.

## Результаты и обсуждение

СА является самым распространенным белком плазмы крови (Rothschild et al., 1988), что делает его легко доступным и дешевым материалом для лабораторных исследований. СА осуществляет транспорт разнообразных веществ, необходимых для жизнедеятельности организма (Kragh-Hansen, 1981). Согласно данным рентгеноструктурного и спектрального анализа (Majorek et al., 2012; Поляничко и др., 2014), вторичная структура молекулы БСА включает в себя 67 %  $\alpha$ -спиральных участков, 16 %  $\beta$ -поворотов, около 3 % спиралей типа  $3_{10}$ ; 14 % составляют остальные, преимущественно неупорядоченные, участки. В целом структура БСА изучена довольно подробно, благодаря чему его удобно использовать в качестве стандарта при исследовании более сложных систем. Однако, как и многие другие белки, БСА проявляет способность к агрегации, особенно при высоких концентрациях. При этом образуются сравнительно крупные комплексы, достаточно скудно описанные в литературе.

Размеры надмолекулярных комплексов БСА в зависимости от концентрации белка в растворе. Для исследования агрегационной активности БСА методом динамического светорассеяния мы оценили размеры образующихся агрегатов в зависимости от концентрации белка в растворе. Использование этого метода накладывает ограничение на максимальную концентрацию частиц в исследуемом растворе, так как при концентрациях выше предельного значения в системе может наблюдаться многократное рассеяние света, которое вносит искажения в регистрируемый сигнал. Максимально допустимая концентрация определяется экспериментально и зависит от размера частиц, находящихся в растворе. В наших экспериментах предельное значение концентрации БСА составило 20 мг/мл.

В табл. 1 приведены коэффициенты диффузии и радиусы агрегатов, полученные по результатам анализа данных динамического светорассеяния для пяти различных концентраций БСА. Для всех растворов с ростом концентрации наблюдается уменьшение коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  и увеличение радиуса агрегатов. Во всем исследованном диапазоне концентраций

Таблица 1

Коэффициенты трансляционной диффузии ( $D_t$ ) и радиусы ( $r$ ) агрегатов БСА в зависимости от его концентрации

[БСА], мг/мл	$D_t \cdot 10^{-12}$ , м <sup>2</sup> /с	$r$ , нм
1	$2.46 \pm 0.11$	$87 \pm 4$
5	$2.18 \pm 0.06$	$98 \pm 3$
10	$2.02 \pm 0.03$	$106 \pm 2$
15	$1.77 \pm 0.04$	$121 \pm 3$
20	$1.74 \pm 0.05$	$123 \pm 4$

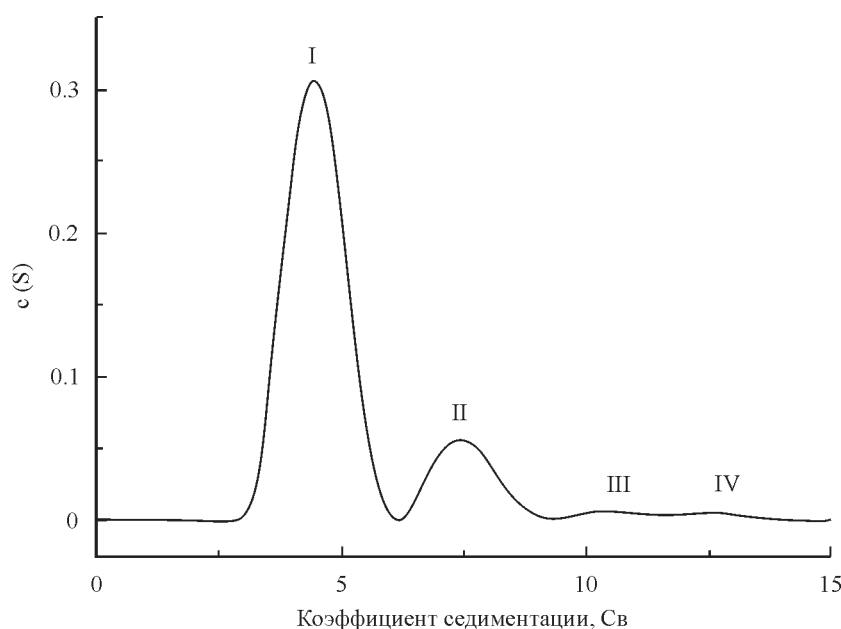


Рис. 1. Относительное содержание основных подфракций бычьего сывороточного альбумина (БСА), различающихся по коэффициенту седиментации (S), — мономеров (I), димеров (II), тримеров (III) и тетрамеров (IV).

По оси ординат — функция распределения  $c(S)$ .

наблюдается монотонный рост линейных размеров агрегатов с увеличением концентрации белка в пробе. Такой вид зависимости говорит о том, что агрегаты и мономеры в растворе находятся в состоянии динамического равновесия.

Можно выделить как минимум два основных фактора, определяющие процесс роста агрегатов. Первый связан с ростом вероятности столкновений между мономерами при увеличении концентрации белка в растворе и описывается моделью диффузионно-ограниченной агрегации (Witten, Sander, 1981). В рамках этой модели увеличение размера агрегатов приводит к повышению вероятности диссоциации мономера с поверхности агрегата. Когда эта вероятность достигает значения вероятности присоединения мономера к агрегату, изменение размеров агрегата прекращается. Второй фактор связан с тем, что в реальных растворах столкновение мономера с агрегатом является необходимым, но недостаточным условием для присоединения к агрегату (Speed et al., 1996). Как показано в работах Ветзеля (Wetzel, 1996, 1997), взаимодействие мономеров БСА идет через промежуточное состояние расплавленных глобул. Именно эти расплавленные глобулы, взаимодействуя между собой, образуют олигомеры и агрегаты. Подобный механизм формирования надмолекулярных комплексов отнюдь не уникален и встречается также среди белков, полностью или частично неупорядоченных в нативном состоянии (Родионова и др., 2009; Polyanchiko, Weser, 2010; Поляничко и др., 2011; Polyanchiko, Chikhirzhina, 2012, 2013).

Влияние кислотности среды на размер белковых частиц. Конформационная стабильность глобулярных белков в растворе зависит, в частности, от кислотности раствора. Таким образом, изменяя pH среды, можно оценить влияние степени нативности и заряда белка на размеры образующихся комплексов. Методом АУЦ изучали растворы БСА в присутствии 100 мМ NaCl в интервале значений pH от 2.0 до 7.5. На рис. 1 представлен характерный вид распределения, получаемого в результа-

те эксперимента. Рассчитанные приблизительные значения коэффициентов седиментации и молекулярных масс частиц, соответствующих пикам 1—4 (рис. 1), представлены в табл. 2.

Анализ полученных седиментационных кривых позволил определить значения основных гидродинамических параметров для мономерных частиц при различных значениях pH, которые представлены в табл. 3. Полученные результаты демонстрируют, что при pH раствора меньше 4 происходит увеличение радиуса мономера с одновременным уменьшением коэффициента седиментации. Такое поведение параметров может свидетельствовать о потере нативной третичной структуры БСА и о конформационном переходе нативная структура—клубок, который сопровождается увеличением асимметрии и разворачиванием молекулы белка. При pH 4.2 молекула БСА заряжена положительно. При уменьшении значения кислотности раствора заряд молекулы БСА растет, что вызывает разворачивание белковой молекулы за счет электростатического отталкивания различных участков полипептидной цепи друг от друга, в результате чего увеличивается гидродинамический радиус молекулы. При значениях pH раствора, близких к физиологическим, из-

Таблица 2

Значения коэффициентов седиментации (S) и молекулярных масс (M) частиц БСА, соответствующих моно-, ди-, три- и тетрамерам

Частица	S, Св	M, кДа
Мономеры	4.4	$(7 \pm 1) \cdot 10$
Димеры	7.4	$(15 \pm 2) \cdot 10$
Тримеры	10.4	$(24 \pm 4) \cdot 10$
Тетрамеры	12.5	$(32 \pm 5) \cdot 10$

Примечание. Содержание фракций частиц БСА см. на рис. 1.

Характеристики мономерных частиц, образующихся в растворе БСА (100 мМ NaCl), в зависимости от величины рН

Характеристика	Величина рН						
	2.0	3.5	4.2	5.2	6.0	6.7	7.5
S (Св)	3.40	3.75	4.40	4.44	4.46	4.46	4.46
$f/f_0$	1.73	1.55	1.35	1.34	1.32	1.34	1.32
a/b obl	11.30	7.80	4.60	4.50	4.20	4.40	4.20
a/b prol	10.00	7.10	4.30	4.20	4.00	4.10	3.90
r, нм	4.62	4.09	3.63	3.61	3.56	3.60	3.54

Примечание. S — коэффициент седиментации в единицах Сведберга,  $f/f_0$  — соотношение коэффициентов трения гидратированной (f) и негидратированной ( $f_0$ ) молекул, a/b obl — соотношение полуосей сплюснутого эллипсоида, описанного вокруг молекулы, a/b prol — соотношение полуосей вытянутого эллипсоида, описанного вокруг молекулы, r — гидродинамический радиус.

менений параметров мономеров БСА в пределах погрешности не происходит.

Изучение влияния степени кислотности раствора БСА на величину потенциала диффузного слоя ( $\zeta$ -потенциал) и на заряд молекулы показало, что в интервале значений рН от 4 до 6 значение  $\zeta$ -потенциала, проходя через ноль, меняет знак (рис. 2). Аппроксимировав экспериментальные данные в этом интервале значений рН прямой линией и найдя точку пересечения аппроксимирующей прямой с горизонтальной осью, определили значение изоэлектрической точки pI для БСА, которое составило 4.8, что согласуется с данными из литературы (Ge et al., 1998).

При смещении значения рН раствора от изоэлектрической точки значение  $\zeta$ -потенциала растет по модулю. Рост значения  $\zeta$ -потенциала связан с увеличением заряженных боковых групп в полипептидной цепи молекулы БСА. При уменьшении значения рН раствора от 3.0 до 1.0 значение  $\zeta$ -потенциала начинает уменьшаться (рис. 2). По всей видимости, при уменьшении рН раствора ниже 4.0 молекулы БСА начинают разворачиваться, приобре-

тая структуру расплавленной глобулы. Мономеры БСА, находящиеся в этом состоянии, с большей вероятностью образуют агрегаты. Известно, что эффективный поверхностный заряд агрегатов и олигомеров падает с ростом числа мономеров, образующих эти агрегаты (Atmeh et al., 2007). Таким образом, уменьшение  $\zeta$ -потенциала при уменьшении кислотности раствора до рН 1.0 может быть объяснено образованием агрегатов в растворе БСА. При увеличении значения рН раствора от 4.0 до 6.0 молекулы БСА проходят изоэлектрическую точку и перезаряжаются, меняя знак суммарного заряда с положительного на отрицательный. При дальнейшем увеличении величины рН значение  $\zeta$ -потенциала продолжает уменьшаться и в области физиологических значений рН (~7.0) выходит на уровень приблизительно -50 мВ. Такое значение  $\zeta$ -потенциала соответствует системе, не склонной к агрегированию (Фридрихсберг, 1984).

Методом динамического светорассеяния были получены распределения размеров частиц в растворе БСА вблизи изоэлектрической точки в интервале  $4.2 < \text{pH} < 4.8$ . В растворе при рН 4.2 обнаружены три

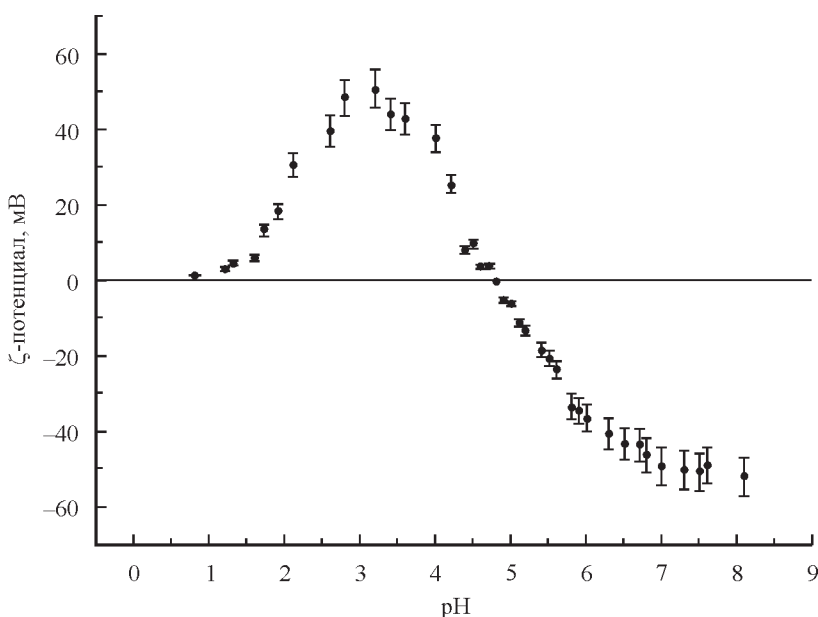


Рис. 2. Зависимость  $\zeta$ -потенциала мономеров БСА от величины рН раствора.

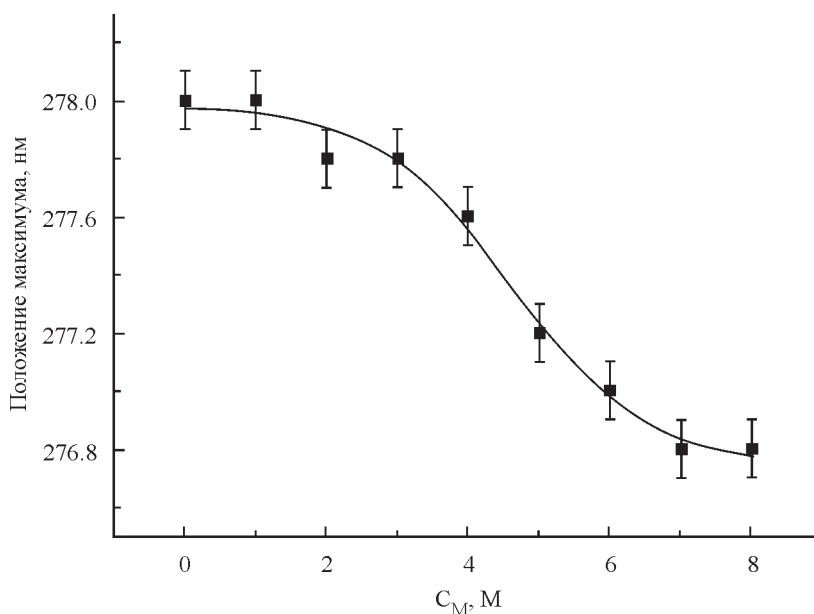


Рис. 3. Зависимость положения максимума в спектрах поглощения растворов БСА от концентрации мочевины (C<sub>M</sub>), М.  
По оси абсцисс — концентрация мочевины (C<sub>M</sub>), М.

фракции частиц с разными радиусами. Радиусы самых крупных агрегатов при рН 4.2 составили  $102 \pm 7$  нм. В растворах БСА с рН 4.8 (изоэлектрическая точка БСА) содержатся агрегаты с радиусами  $500 \pm 100$  нм и олигомеры с радиусами  $13 \pm 5$  нм. При этом в исследованном растворе мы не обнаружили мономеров БСА (при рН 4.2 мономеры составляют не менее 99.5 % от числа всех частиц). При уменьшении рН от 4.2 до 2.0 увеличиваются радиусы агрегатов БСА от  $21 \pm 3$  до  $37 \pm 8$  нм для агрегатов малых размеров и от  $89 \pm 5$  до  $130 \pm 10$  нм для агрегатов больших размеров. Эта область изменения рН соответствует области уменьшения значения  $\zeta$ -потенциала (рис. 2).

При рН 1.0 размеры агрегатов, содержащихся в растворе, уменьшаются до  $21 \pm 1$  и  $92 \pm 1$  нм для малых и больших агрегатов соответственно. При этом уменьшаются радиусы частиц наименьшей фракции от  $2.4 \pm 0.2$  до  $1.3 \pm 0.7$  нм, что может быть обусловлено частичным разрушением полипептидной цепи в очень кислом растворе (рН 1.0). Последнее предположение косвенно подтверждается резким уменьшением значения  $\zeta$ -потенциала от  $30 \pm 3$  мВ при рН 2.0 до  $2 \pm 0.2$  мВ при рН 1.0, так как меньшие по размеру фрагменты полипептидной цепи несут меньший заряд, характеризующийся меньшим значением  $\zeta$ -потенциала.

Агрегация БСА в присутствии мочевины. Гидрофобные взаимодействия играют определяющую роль при образовании третичной структуры белков. Добавление в раствор белка денатурирующего агента должно разрушать эти взаимодействия, стабилизирующие структуру БСА, что в конечном итоге приведет к формированию агрегатов БСА в растворе. В качестве денатурирующего агента мы использовали мочевину. Как было показано ранее другими авторами (см., например, Povarova et al., 2007), характер денатурации белка не зависит от выбора денатуранта. Вместе с тем во многих опубликованных ранее работах, посвященных изучению структурных переходов в БСА другими методами (в частности, в работах по малоугловому рентгеновскому рассеянию: Itri

et al., 2004), в качестве денатурирующего агента использовали именно мочевину, чем и был обусловлен наш выбор.

Методом УФ-спектрофотометрии мы получили спектры поглощения растворов БСА в присутствии 8 М мочевины. Длина волны максимума поглощения  $\lambda_{\text{макс}}$  смещается в область меньших длин волн с ростом концентрации мочевины в растворе (рис. 3). Полученные значения с учетом погрешности могут быть аппроксимированы сигма-функцией, характерной для систем, способных находиться в двух различных состояниях.

Анализ кривой позволяет предположить, что при повышении концентрации мочевины в растворе от 0 до 8 М происходит конформационный переход и молекулы БСА денатурируют. При денатурации в растворах БСА должно наблюдаться увеличение радиусов агрегатов БСА. Распределения по радиусам частиц, содержащихся в растворе в присутствии мочевины (0, 2, 4, 6 и 8 М), были получены нами методом динамического светорассеяния. Во всех растворах наблюдались три фракции — мономеры, агрегаты малого и большого радиусов. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

**Средние значения радиусов частиц <r> трех фракций в растворах БСА (1 мг/мл)**

Концентрация мочевины, М	Мономеры	Агрегаты малых размеров	Агрегаты больших размеров
0	$3.3 \pm 0.2$	$22 \pm 2$	$88 \pm 1$
2	$2.7 \pm 0.7$	$14 \pm 2$	$59 \pm 1$
4	$3.0 \pm 0.5$	$14 \pm 2$	$72 \pm 2$
6	$9.0 \pm 2.0$	$28 \pm 4$	$120 \pm 20$
8	$8.0 \pm 1.0$	$45 \pm 6$	$170 \pm 30$

Примечание. Фракции соответствуют пикам I—III на рис. 1. Среднее значение радиуса (<r>) частиц указано в нм.

При увеличении концентрации мочевины в растворе БСА до 2 М радиусы частиц уменьшаются от  $22 \pm 2$  до  $14 \pm 2$  нм для маленьких агрегатов и от  $88 \pm 1$  до  $59 \pm 1$  нм — для крупных. Такое поведение может быть объяснено разрушением гидрофобных взаимодействий, участвующих в образовании агрегатов. При дальнейшем увеличении концентрации мочевины до 8 М радиусы агрегатов увеличиваются до  $45 \pm 6$  нм для агрегатов меньших радиусов и  $170 \pm 30$  нм для агрегатов больших радиусов.

Увеличение роста радиусов агрегатов можно объяснить следующим образом. В исходных растворах белка содержатся как мономеры, так и более крупные олигомерные частицы БСА. В растворах с малой концентрацией мочевины (0—2 М) происходит разрушение двух типов гидрофобных взаимодействий: 1) межмолекулярных взаимодействий, за счет которых происходит образование олигомеров; 2) внутримолекулярных взаимодействий, стабилизирующих третичную структуру молекул БСА. При этом наблюдается разрушение олигомеров, сопровождающееся уменьшением размеров белковых частиц БСА и одновременным увеличением вероятности нахождения молекул БСА в состоянии расплавленной глобулы. При дальнейшем повышении концентрации мочевины молекулы БСА переходят в состояние расплавленной глобулы. Гидрофобные аминокислотные остатки, обращенные внутрь молекулы БСА в слабых растворах мочевины, оказываются доступными для межмолекулярных взаимодействий, что приводит к появлению агрегатов.

Фракция БСА с наименьшими радиусами демонстрирует схожее поведение. При увеличении концентрации мочевины от 0 до 4 М радиусы наименьшей фракции не изменяются в пределах погрешности:  $3.3 \pm 0.2$  (0) и  $3 \pm 1$  нм (4 М мочевины). При дальнейшем увеличении концентрации мочевины радиусы частиц наименьшей фракции увеличиваются до  $8 \pm 2$  нм (среднее значение для концентраций мочевины 6—8 М).

**Заключение.** Таким образом, мы показали, что в растворе БСА система мономеры—агрегаты находится в состоянии динамического равновесия. Увеличение концентрации белка в растворе приводит к увеличению размеров агрегатов БСА. При уменьшении pH раствора от 4.0 до 1.0 происходит конформационный переход: молекулы БСА теряют третичную структуру, полипептидная цепь БСА разворачивается, что ведет к росту размеров агрегатов. Кроме того, к росту размеров агрегатов приводит и уменьшение поверхностного заряда, сопровождаемое уменьшением  $\zeta$ -потенциала. В процессе образования агрегатов БСА участвуют гидрофобные взаимодействия, которые разрушаются в растворах с низкой концентрацией мочевины (до 2 М), что приводит к уменьшению размеров агрегатов БСА. В растворах с высокой концентрацией мочевины (2—8 М) происходит денатурация молекул БСА, сопровождаемая ростом размеров агрегатов. БСА может быть использован в качестве контроля при исследовании крупных белковых частиц и для анализа белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-08-06876 (седиментация и спектроскопия) и проект 15-04-06993 (очистка белка, определение  $\zeta$ -потенциала)). Часть исследований проведена в ресурсных центрах «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Центр диагностики функциональных мате-

риалов в медицине, фармакологии и нанoeлектроники» С.-Петербургского государственного университета.

### Список литературы

- Поляничко А. М., Давыденко С. Г., Чихиржина Е. В., Воробьев В. И. 2000. Взаимодействие суперспиральной ДНК с негистоновым белком HMG1. Цитология. 42 (8) : 787—793. (Polyanichko A. M., Davydenko S. G., Chikhirzhina E. V., Vorob'ev V. I. 2000. Interaction of superhelical DNA with the nonhistone protein HMG1. Tsitologiya. 42 (8) : 787—793.)
- Поляничко А. М., Родионова Т. Ю., Воробьев В. И., Чихиржина Е. В. 2011. Конформационные особенности ядерного белка HMGB1 и специфика его взаимодействия с ДНК. Цитология 53 (1) : 55—60 (Polyanichko A. M., Rodionova T. J., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. 2011. Conformational properties of nuclear protein HMGB1 and specificity of its interaction with DNA. Cell Tissue Biol. 5 (2) : 114—119.)
- Поляничко А. М., Романов Н. М., Старкова Т. Ю., Костылева Е. И., Чихиржина Е. В. 2014. Анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 по спектрам инфракрасного поглощения. Цитология. 56 (4) : 316—322. (Polyanichko A. M., Romanov N. M., Starkova T. Yu., Kostyleva E. I., Chikhirzhina E. V. 2014. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 8 : 352—358.)
- Фридрихсберг Д. А. 1984. Курс коллоидной химии. Л.: Химия. 178—191. (Friedrichsberg D. A. 1984. Colloid Chemistry. Leningrad: Khimia. 178—191.)
- Atme R. F., Arafa I. M., Al-Khateeb M. 2007. Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties. Jordan J. Chem. 2 : 169—182.
- Brahma A., Mandal C., Bhattacharyya D. 2005. Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition. Biochim. Biophys. Acta. 1751 : 159—169.
- Chen Z., Lu D., Cai Z., Dong C., Shuang S. 2014. Bovine serum albumin-confined silver nanoclusters as fluorometric probe for detection of biothiols. Luminescence. 29 (7) : 722—727.
- Darcel C. L. 1987. On the heterogeneity of serum albumin: effect of sodium dodecyl sulphate on agarose chromatography of the protein. Int. J. Biochem. 19 : 213—216.
- Ge S., Kojio K., Takahara A., Kajiyama T. 1998. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 9 : 131—150.
- Gill S. C., von Hippel P. H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal. Biochem. 182 : 319—326.
- Guo C., Irudayaraj J. 2011. Fluorescent Ag clusters via a protein-directed approach as a Hg(II) ion sensor. Anal. Chem. 83 : 2883—2889.
- Honda C., Kamizono H., Endo K. 2000. Studies on thermal aggregation of bovine serum albumin as a drug carrier. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 48 : 464—466.
- Itri R., Caetano W., Barbosa L. R. S., Baptista M. S. 2004. Effect of urea on bovine serum albumin in aqueous and reverse micelle environments investigated by small angle X-ray scattering, fluorescence and circular dichroism. Brazilian J. Physics. 34 : 58—63.
- Kragh-Hansen U. 1981. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. Pharmacol. Rev. 33 : 17—53.
- Majorek K. A., Porebski P. J., Dayal A., Zimmerman M. D., Jablonska K., Stewart A. J., Chruszcz M., Minor W. 2012. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. Mol. Immunol. 52 : 174—182.
- Mohanty T., Patel A. S. 2014. Silver nanoclusters in BSA template: a selective sensor for hydrogen peroxide. J. Mater. Sci. 49 : 2136—2143.
- Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. 1985. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci. 4 : 2411—2423.

*Polyanichko A., Chikhirzhina E. 2012* Interaction between nonhistone protein HMGB1 and linker histone H1 facilitates the formation of structurally ordered DNA-protein complexes. *Spectroscopy: An Internat. J.* 27 : 393—398.

*Polyanichko A., Chikhirzhina E. 2013*. Supramolecular organization of the complexes of DNA with chromosomal proteins HMGB1 and H1. In: Marques M. P., Batista de Carvalho L. A. E., Haris P. I. (eds). *Advances in biomedical spectroscopy: spectroscopy of biological Molecules*. Amsterdam: IOS Press. 185—190.

*Polyanichko A., Wieser H. 2010*. Structural organization of DNA—protein complexes of chromatin studied by vibrational and electronic circular dichroism. *Spectroscopy: An Internat. J.* 24 : 239—244.

*Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2007*. Different disturbances is one pathway of protein unfolding. Actin folding—unfolding and misfolding. *Cell Biol. Intern.* 31 : 405—412.

*Rothschild M. A., Oratz M., Schreiber S. S. 1988*. Serum albumin. *Hepatology.* 8 : 385—401.

*Schuck P. 2000*. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78 : 1606—1619.

*Speed M. A., Wang D. I., King J. 1996*. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nat. Biotechnol.* 14 : 1283—1287.

*Tankersley D. L., Finlayson J. S. 1980*. Quantitation of monomeric and non-monomeric forms of albumin. *Develop. Biol. Stand.* 48 : 113—121.

*Wetzel R. 1996*. For protein misassembly, it's the «I» decade. *Cell.* 86 : 699—702.

*Wetzel R. 1997*. Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders. *Adv. Protein Chem.* 50 : 183—242.

*Witten T. A., jr., Sander L. M. 1981*. Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon. *Phys. Rev. Lett.* 47 : 1400—1403.

*Zini R., D'Athis P., Barre J., Tillement J. P. 1979*. Binding of indomethacin to human serum albumin. Its non displacement by various agents, influence of free fatty acids and the unexpected effect of indomethacin on warfarin binding. *Biochem. Pharmacol.* 28 : 2661—2665.

Поступила 22 I 2016

#### INTERMOLECULAR INTERACTIONS IN THE SOLUTIONS OF SERUM ALBUMIN

*A. M. Polyanichko,<sup>1,2</sup> \* N. V. Mikhailov,<sup>1</sup> N. M. Romanov,<sup>1</sup> Yu. G. Baranova,<sup>1</sup> E. V. Chikhirzhina<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034,  
and <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: a.polyanichko@spbu.ru

The mechanisms of intermolecular protein complex formation were studied by the example of monomers, oligomers and aggregates of bovine serum albumin (BSA) depending on the protein concentration, pH and urea concentration. Using dynamic light scattering (DLS), analytical ultracentrifugation (AUC) and PAG electrophoresis, we have shown that there is dynamic equilibrium between monomers and aggregates in BSA solution. Decreasing pH of the solution (4.0—1.0) resulted in increasing sizes of the aggregates. In the solutions with low urea concentrations (below 2 M), the sizes of aggregates decreased, while higher urea concentrations induced formation of larger aggregates due to the unfolding of the protein.

**Key words:** serum albumin, analytical ultracentrifugation, dynamic light scattering.