

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА В ДИАПАЗОНЕ -170°C – $+20^{\circ}\text{C}$ В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

© 2021 г. В.З. Пашенко, В.В. Горохов, Б.Н. Корватовский, П.П. Нокс, Н.П. Гришанова, С.Н. Горячев

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2019 г.

После доработки 25.02.2020 г.

Принята к публикации 20.02.2021 г.

Исследованы температурные зависимости (-170°C – $+20^{\circ}\text{C}$) длительности флуоресценции молекул триптофана в водном растворе, в растворах глицерина (50 и 75% по объему), диметилсульфоксида (50 и 75% по объему) и в 1 М водном растворе трегалозы. В этом температурном диапазоне во всех образцах кинетика флуоресценции наилучшим образом аппроксимируется тремя экспонентами с характерными временами при комнатных температурах $\tau_1 \sim 3$ нс, $\tau_2 \sim 4$ нс и $\tau_3 \sim 15$ нс. Наблюдается антибатный (противофазный) характер температурных зависимостей длительности флуоресценции наиболее быстрой и средней компонент в температурном диапазоне от -60°C до 10°C . Для объяснения такого характера данных температурных зависимостей нами предложена новая модель природы многокомпонентного свечения, учитывающая переход молекулы триптофана из возбужденного состояния в состояние с разделением заряда, обратный переход в возбужденное состояние, а также излучательный и безызлучательный переходы состояния с разделенными зарядами в основное состояние. Полученные результаты могут служить основой для интерпретации экспериментальных зависимостей длительности триптофановой флуоресценции от температуры в белках.

Ключевые слова: триптофан, флуоресценция, кинетика затухания флуоресценции, температурная зависимость.

DOI: 10.31857/S0006302921030054

Флуоресцентная спектроскопия триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного внутреннего индикатора конформационного состояния этих белков, их динамики, а также процессов межмолекулярных взаимодействий. Известно, что динамические (спектрально-кинетические) характеристики молекул триптофана (Trp) сильно зависят от свойств окружающей среды [1, 2]. Собственная флуоресценция индольного хромофора чувствительным образом реагирует на состояние окружающей среды, а длительность и квантовый выход флуоресценции являются индикатором даже небольших изменений в этом окружении [3, 4]. Так, положение максимума спектра флуоресценции белковых триптофанилов, определяемое релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного хромофора, уже давно ис-

пользуется в качестве показателя, отражающего состояние внутримолекулярной динамики белка, в том числе при изменении температуры [5, 6]. Сложнее ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Особенно это относится к малоисследованным температурным зависимостям длительности триптофановой белковой флуоресценции в диапазоне от криогенных температур до комнатной. Очевидно, что детальное выяснение природы локальных изменений окружения триптофановых остатков в структуре белка, влияющих на регистрируемые в эксперименте зависимости от температуры длительности флуоресценции (τ), требует комплексных исследований, включая различные модели, описывающие особенности изменения τ молекул Trp от температуры в различных растворителях.

Наблюдаемый в экспериментах многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Trp в растворе, а также в составе пептидов

Сокращения: Trp – триптофан, CTS – состояние с переносом заряда (Charge Transfer State), ДМСО – диметилсульфоксид, НВ – водородные связи (Hydrogen Bonds).

и белков можно связать, в том числе, с наличием трех возможных ротамеров индольных колец вокруг связи $C_\alpha-C_\beta$, возникающих в результате электростатических взаимодействий в молекуле Trp [7–10]. При этом обычно удельное содержание одного из ротамеров существенно выше, чем двух других. В свою очередь, среди этих двух наименее выраженных по содержанию ротамеров также преобладает один. В случае, когда триптофаны находятся в составе белковой матрицы, в дополнение к явным ротамерам боковой цепи Trp специфическим источником гетерогенности кинетики регистрируемого сигнала флуоресценции являются микроконформационные состояния белков в локальном окружении индольного кольца. Поэтому для белков правильнее говорить о конформерах вместо ротамеров [10]. Наличие нескольких компонент в кинетике затухания флуоресценции молекул Trp в белках связывают, в частности, с разными скоростями переноса электрона в ротамерах к пептидным связям при возбуждении триптофановых остатков [8, 9]. Удельное содержание различных ротамеров, а также скорости дезактивации возбужденного состояния Trp в разных растворителях отличаются, поэтому и наблюдается различие в длительностях и квантовых выходах флуоресценции Trp в зависимости от растворителя [8, 9].

В нашей предыдущей работе [11] были исследованы температурные зависимости кинетик затухания флуоресценции молекул Trp в растворе глицерина (50% по объему) и в 1 М водном растворе трегалозы. Флуоресценцию измеряли в спектральной области 292–417 нм с субнаносекундным временным разрешением. Оказалось, что при комнатной температуре кинетика флуоресценции в обоих случаях хорошо аппроксимировалась тремя экспонентами с временами $\tau_1 \sim 4$ нс, $\tau_2 \sim 6$ нс и $\tau_3 \sim 12.5$ нс. Было определено спектральное распределение амплитуд (Decay Associated Spectra – DAS) этих компонент и установлен антибатный (противофазный) характер температурных зависимостей длительности флуоресценции быстрой и средней компонент в температурном диапазоне от -60°C до 10°C . Третья (медленная) компонента давала незначительный вклад в сигнал флуоресценции и показывала слабую зависимость от температуры во всем исследованном диапазоне от -170°C до 20°C . В работе [11] мы предположили, что наблюдаемое антибатное поведение времен затухания флуоресценции двух компонент в определенном температурном интервале обусловлено переходом части молекул Trp, находящихся в возбужденном состоянии, из коротковолновой формы, обладающей коротким временем жизни флуоресценции, в длинноволновую форму с промежуточным значением длительности флуоресценции.

В последнее время в литературе обсуждается другой механизм возникновения двухкомпонентного характера кинетики затухания флуоресценции, который основан на возможности переноса электрона с индольного кольца возбужденной молекулы триптофана на амидные остатки или пептидные группы ближайшего окружения триптофана. Более того, в работе [12] с помощью методов молекулярной динамики и теории функционала электронной плотности (density functional theory – DFT) показана возможность образования в водном окружении триптофана упорядоченной системы водородных связей, которая приводит к появлению квазиузлы для переноса электрона от индольного кольца возбужденной молекулы триптофана на водородные связи. В результате возникает состояние с переносом заряда, которое переходит в основное состояние с более высокой (в два-три раза) скоростью, чем возбужденное состояние триптофана.

В настоящей работе были исследованы температурные зависимости кинетик затухания флуоресценции водных растворов молекул Trp в присутствии таких агентов, как глицерин, трегалоза и диметилсульфоксид. При этом, так же как и в работе [11], наблюдался антибатный характер температурных зависимостей длительности флуоресценции быстрой и средней компонент в температурном диапазоне от -60°C до 10°C . Для объяснения антибатного характера наблюдаемых температурных зависимостей мы использовали новую модель, описывающую переход молекулы Trp из возбужденного состояния в состояние с разделенными зарядами ($\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$, где CTS – состояние с переносом заряда (Charge Transfer State)), обратный переход $\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$, а также излучательный и безызлучательный переход CTS в основное состояние. Физический смысл процессов перехода в новой модели совершенно иной, чем в ротамерной модели, использованной нами ранее в работе [11]. Суть отличий состоит в том, что в ротамерной модели трехкомпонентное свечение Trp объясняется присутствием трех разных центров свечения, тогда как в новой модели три компонента в кинетике затухания флуоресценции являются следствием иных физических процессов, описывающих дезактивацию Trp^* с участием промежуточного состояния с переносом заряда. Анализируемые нами эффекты, очевидно, могут дать новый полезный материал для интерпретации экспериментальных зависимостей длительности триптофановой флуоресценции от температуры в белках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали триптофан, трегалозу и диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы Sigma (США), глицерин фирмы Merck (США). Измере-

ния кинетики флуоресценции проводили на установке с коррелированным по времени и длине волны счетом единичных фотонов PML-16 (Becker & Hickl GmbH, Berlin, Germany, <http://www.becker-hickl.de/pdf/pml16c21.pdf2006>). Данная установка оборудована 16-канальной мультианодной трубкой Hamamatsu R5900, содержащей 16 отдельных входных анодных элементов и общую катодную и диодную систему. Получаемый сигнал флуоресценции направляется в полихроматор с дифракционной решеткой 600 штрихов/мм, обеспечивающей ширину спектральной полосы измерительной системы 200 нм с разрешением 12.5 нм/канал. Это позволяет регистрировать трехмерную картину флуоресценции, отражающую изменения длительности (τ), длины волны (λ) и интенсивности (I) свечения. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового диода EPLED 280 (Edinburg Photonics, Шотландия), длительность импульса света составляла 870 пс, спектральная ширина – 10 нм, частота следования импульсов 10 МГц. Для получения хорошего отношения сигнал/шум время накопления сигнала было выбрано равным 30 с. Таким образом, регистрируя трехмерное (τ, λ, I) изображение свечения триптофанилов, мы могли измерять кинетику затухания флуоресценции в любом спектральном канале. В эксперименте образец находился в охлаждаемой жидким азотом кювете, температуру которой контролировали с помощью термодары. Время охлаждения до -170°C составляло около 10 мин, скорость последующего нагревания была равной 5–7 град/мин.

Получаемый в результате измерений массив спектрально-кинетических данных представляет собой набор кинетик затухания флуоресценции, зарегистрированных при разных λ в области свечения Trp 292 – 425 нм с интервалом 12.5 нм. Число экспериментальных точек при регистрации каждой кинетики составляло 4096. Для каждого спектрального канала измеряли также число фотонов, зарегистрированных в данной области спектра.

Спектры поглощения в образцах измеряли с использованием спектрофотометра Hitachi-557 (Hitachi Ltd., Япония), спектры флуоресценции препаратов ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм) – на спектрофлуориметре Hitachi-850.

Аппроксимацию экспериментальных кинетик проводили для каждого спектрального канала при помощи программы SPCImage (Bekker & Hickl, Germany) по формуле (1), позволяющей разлагать кинетики по методу Марквардта–Левенберга на сумму от одной до пяти экспонент, свернутых с аппаратной функцией системы регистрации, измеряемой для каждого спектрального канала. При разложении экспериментальных ки-

нетик мы ограничились тремя экспонентами, так как дальнейшее увеличение числа компонент не приводило к снижению χ_r^2 . На первом этапе проводили свободное варьирование параметров a_i и τ_i для каждого спектрального канала. Затем полученные значения τ_i ($i = 1, \dots, 3$) усреднялись по всем спектральным каналам. Полученные усредненные значения τ_i подставляли в программу глобального анализа по всем спектральным каналам Globals Unlimited (Illinois University, США) как неварьируемые параметры для окончательного определения предэкспоненциальных коэффициентов $a_i(\lambda)$, которые затем использовали для получения спектрального распределения этих коэффициентов:

$$F(t, \lambda) = \sum_i a_i(\lambda) \exp(-t/\tau_i) \quad (i = 1, \dots, 3). \quad (1)$$

Здесь $a_i(\lambda)$ представляет собой зависящий от длины волны сигнала флуоресценции предэкспоненциальный множитель компоненты с временем жизни τ_i . Среднеквадратичное отклонение экспериментальной кривой от теоретической χ_r^2 рассчитывалось по формуле: $\chi_r^2 = 1/(N - p - 1) \sum_j (d_j - f_j)^2 / s_j^2$ ($j = 1, \dots, 4096$), где d_j – экспериментальные значения кинетики затухания флуоресценции в j -й момент времени, f_j – значение рассчитанной для данного момента времени теоретической кривой, равной свертке функции (1) с аппаратной функцией ($f = F \otimes A \Phi$), s_j – дисперсия экспериментальной кривой в j -й точке, N – число экспериментальных точек, p – число параметров теоретической кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы сопоставили температурные зависимости различных параметров, характеризующих спектры флуоресценции Trp и кинетики затухания флуоресценции в чистом водном растворе, а также водных растворах глицерина (50 и 75% по объему), ДМСО (50 и 75% по объему) и 1 М водном растворе трегалозы. Методика обработки температурной зависимости этих параметров во всех экспериментах была одинаковой, поэтому детальный анализ данных мы приводим только для водного раствора Trp.

На рис. 1 и 2 представлены спектры поглощения и флуоресценции раствора Trp в воде при комнатной температуре. Из рис. 1 видно, что спектр поглощения Trp в водном растворе обладает сложной структурой и имеет длинноволновое монотонно уменьшающееся по интенсивности крыло. Очевидно, что такой спектр поглощения является суперпозицией нескольких центров поглощения, отличающихся положением их максимумов. Для детального анализа этот спектр был

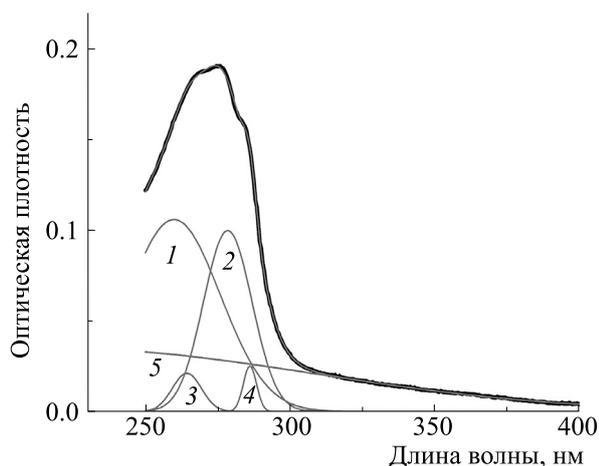


Рис. 1. Спектр поглощения триптофана в водном растворе при комнатной температуре. Цифрами 1–5 обозначены гауссовы компоненты разложения спектра поглощения на составляющие.

разложен на гауссовы компоненты. Видно, что в спектре поглощения присутствуют две основных (1 и 2) и две минорных компоненты (3 и 4), а также широкая полоса (5) в длинноволновой области. В литературе уже давно было отмечено, что Тгр в воде имеет две-три отчетливых компоненты флуоресценции в зависимости от pH и три времени жизни в присутствии органических растворителей типа метанола, этанола или диметилсульфоксида. Это объясняется наличием ротамеров вокруг связи $C_{\alpha}-C_{\beta}$ [7, 13]. При этом наблюдение двух, а не трех компонентов может быть обусловлено близкими временами жизни двух компонентов и незначительным квантовым выходом одного из них. Также понижение температуры, согласно работе [14], может приводить к «вымораживанию» определенных ротамеров. Данная точка зрения впоследствии подтверждалась во многих исследованиях [10, 15–18].

Ротамерная модель прямо подтверждается данными ЯМР-спектроскопии, а также измерениями времени жизни триптофановой флуоресценции индивидуальных белковых кристаллов с единственным триптофановым остатком [19, 20].

До настоящего времени в литературе нет сведений о принадлежности центров поглощения (1–4) конкретным формам Тгр в водном растворе. Отнесение полос к тем или иным формам Тгр можно сделать исходя из известных представлений о связи вкладов и спектральной ширины компонент в спектре поглощения с интенсивностью и длительностью компонент в кинетике затухания флуоресценции [8]. Мы считаем, что две основных компоненты представляют собой полосы поглощения двух ротамеров, присутствующих в водном растворе триптофана, одна из минорных полос (3) соответствует спектру третьей дол-

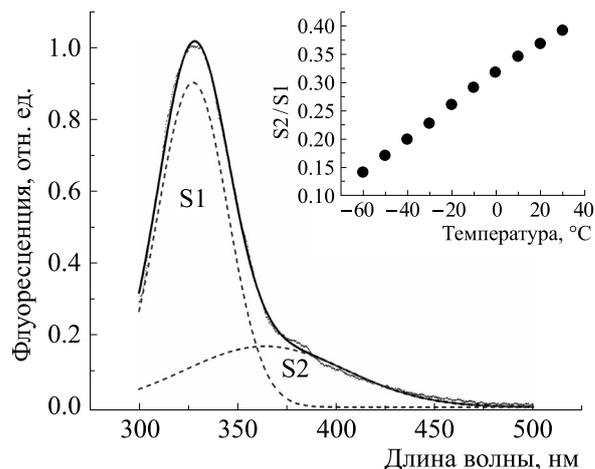


Рис. 2. Спектр флуоресценции триптофана в воде при комнатной температуре. Символами S1 и S2 обозначены компоненты разложения спектра на гауссовы составляющие, а также их площади. На врезке показана зависимость отношения площадей гауссовых компонент разложения спектра S2/S1 от температуры.

гоживущей ротамерной формы. Спектральная компонента (4) по своим характеристикам (положение λ_{\max} , полуширина) близка к спектру поглощения несольватированной или частично сольватированной формы Тгр с длинным временем затухания флуоресценции [21]. Широкая длинноволновая компонента (5) спектра поглощения Тгр связана, предположительно, с прямым переходом молекулы Тгр, окруженной сеткой водородных связей (НВ), при возбуждении из основного состояния системы Тгр + НВ в состояние с переносом заряда $\text{Тгр}^+\text{НВ}^-$, образующееся в результате перехода электрона с индольного кольца на систему водородных связей, окружающих молекулу Тгр. При понижении температуры амплитуда широкой компоненты уменьшается до нуля при -60°C .

Несмотря на достаточно сложный спектр поглощения Тгр в водном растворе, его спектр флуоресценции (рис. 2) характеризуется только двумя компонентами, причем более слабая компонента S2 является существенно уширенной по сравнению с основной полосой S1. Очевидно, что компонента S2 соответствует более короткому времени жизни возбужденного состояния Тгр, чем S1. Из данных спектров флуоресценции можно сделать вывод, что основные ротамерные формы триптофана (рис. 1, 1,2), в водном растворе характеризуются близкими временами жизни флуоресценции, а широкая полоса связана с процессами тушения флуоресценции и является причиной немонотонного характера кинетики затухания флуоресценции. На рис. 3а,б приведено спектральное распределение амплитуд

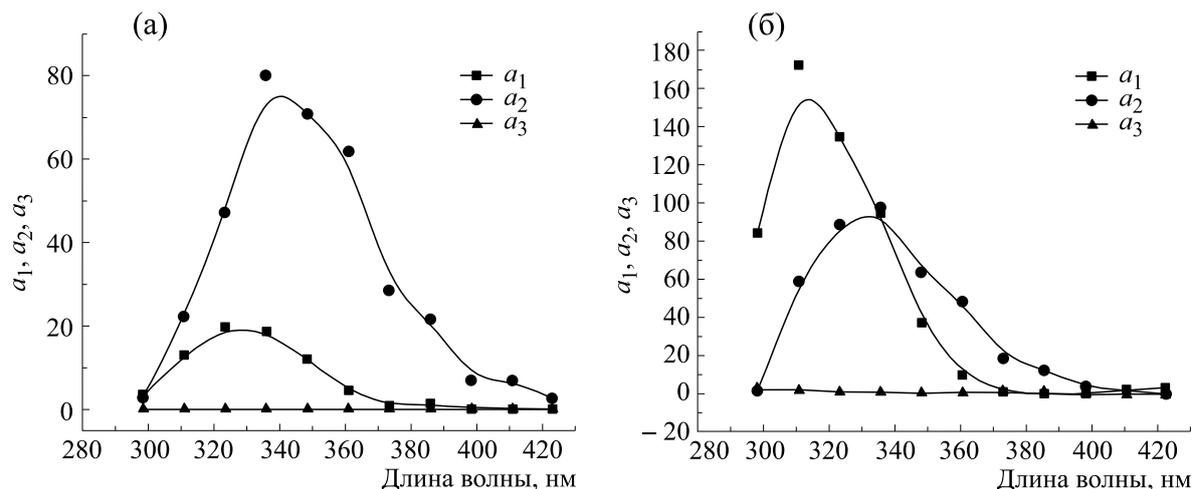


Рис. 3. Спектральные распределения амплитуд для трех компонент флуоресценции триптофана в воде при температуре 10°C (а) и -170°C (б); a_1 , a_2 , a_3 – амплитуды этих компонент.

для трех компонент флуоресценции триптофана в воде с временами $\tau_1 \approx 3.1$ нс, $\tau_2 \approx 4.5$ нс, $\tau_3 \approx 15.4$ нс при температуре 10°C (рис. 3а) и $\tau_1 \approx 4.8$ нс, $\tau_2 \approx 7.0$ нс, $\tau_3 \approx 15.5$ нс при -170°C (рис. 3б). Видно, что вклад третьей компоненты незначителен и практически не зависит от температуры. Такая же картина наблюдалась и для третьей компоненты кинетики флуоресценции в других растворителях. Поэтому во всех кинетических измерениях мы представляли кинетику затухания флуоресценции в трехэкспоненциальном приближении, а дальнейший анализ данных проводили, учитывая только две наиболее быстрые экспоненты с амплитудами a_1 и a_2 . Отчетливо видно, что при комнатной температуре вклад быстрой компоненты (амплитуда a_1) существенно меньше вклада компоненты с амплитудой a_2 , а при -170°C картина меняется на противоположную. Очевидно, необходимо было проанализировать поведение длительностей и вкладов этих компонент во всем температурном диапазоне от -170°C до 20°C. Ход зависимости от температуры длительности ($\tau_{1,2}$) двух основных компонент флуоресценции, а также их вкладов (площади $A_1 = a_1\tau_1$ и $A_2 = a_2\tau_2$) в суммарную интенсивность флуоресценции показаны на рис. 4.

Видно, в частности, что изменение параметров A_1 и A_2 от температуры происходит антибатно (в противофазе). Обращают на себя внимание два температурных диапазона: от -150°C до -110°C и от -90°C до 10°C, где отчетливо проявляется «перекачка» интенсивности флуоресценции первой компоненты во вторую. Действительно, в диапазоне температур от -170°C до -110°C вклад $A_1 > A_2$, затем наблюдается инверсия кривых $A_1(T)$ и $A_2(T)$ в диапазоне от -90°C до 10°C. После

нагревания выше -20°C снова происходит изменение температурной зависимости вкладов A_1 и A_2 , т.е. вновь растет вклад от быстрой компоненты и падает вклад медленной компоненты. В данном температурном диапазоне противоположным образом меняются и характерные длительности компонент τ_1 и τ_2 . В работе [11] эти изменения мы связали с индуцируемыми температурой переходами между двумя ротамерами Трр с максимальным значением скорости этого перехода при температуре около -20°C. В окрестности этой температуры (-20°C) происходит также сдвиг длины волны (λ_{\max}) максимума в спектре флуоресценции первой компоненты (рис. 5). В то же

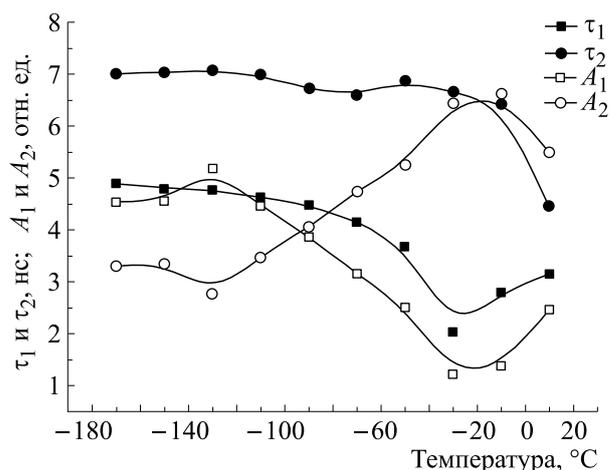


Рис. 4. Зависимости от температуры длительности (τ_1 , τ_2) двух основных компонент флуоресценции, а также вкладов данных компонент $A_1 = a_1\tau_1$ и $A_2 = a_2\tau_2$ в суммарную интенсивность флуоресценции.

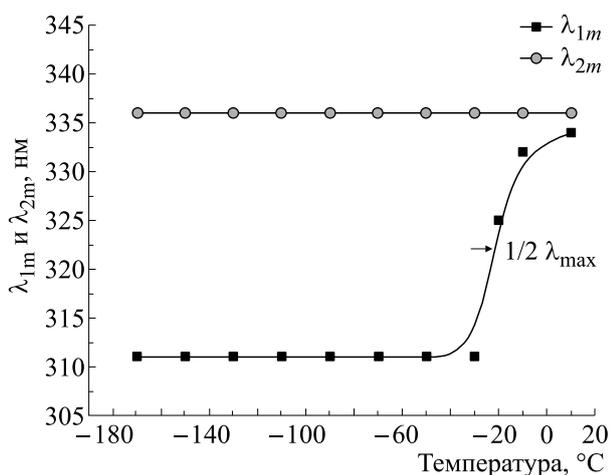


Рис. 5. Температурные зависимости длины волны (λ_{\max}) максимального значения в спектральном распределении первой и второй компонент флуоресценции от температуры; $1/2 \lambda_{\max}$ указывает на температуру половинного сдвига λ_{\max} первой компоненты флуоресценции.

время видно, что значение λ_{\max} второй компоненты флуоресценции остается постоянным во всем диапазоне измеряемых температур: $\lambda_{\max} \approx 336$ нм. Отметим также, что λ_{\max} первой компоненты сохраняет постоянное значение, равное 311 нм в диапазоне температур от -170°C до $\approx -40^\circ\text{C}$, а при дальнейшем повышении температуры сдвигается к значениям, близким для таковых у второй компоненты.

Известно, что сдвиг спектра люминесценции флуоресцирующего хромофора при повышении температуры связан с увеличением подвижности его окружения [5, 8], в данном случае — диполей воды. Полученная температура (около -20°C) скорее всего отвечает температуре затвердевания (кристаллизации) 1 М раствора Тгр в воде. Очевидно, что в разных растворителях температура затвердевания должна меняться. Соответственно, должны наблюдаться и разные значения температуры перехода между ротамерами Тгр (температур-

ных областей антибатного поведения короткого и длинного времен затухания флуоресценции Тгр). Действительно, если смещение спектра люминесценции происходит в результате увеличения подвижности растворителя, то в разных растворителях это смещение должно наблюдаться в разных областях температур, а именно там, где происходит активизация молекулярной динамики в окружении флуоресцирующих хромофоров. Для проверки этого предположения мы провели исследование температурного сдвига λ_{\max} для водных растворов Тгр в 50%-м и 75%-м глицерине, в 50%-м и 75%-м ДМСО и 1 М растворе трегалозы. Результаты приведены в таблице.

Отметим прежде всего, что изменение состава растворителя само по себе меняло исходное соотношение «весов» A_1 и A_2 двух основных компонент флуоресценции в замороженных до -170°C образцах. Амплитуда третьей компоненты во всех случаях продолжала оставаться незначительной. По сравнению с чисто водным раствором Тгр соотношение весов A_1 и A_2 в растворе глицерина увеличивалось, а в растворах ДМСО и трегалозы уменьшалось (см. таблицу).

Очевидно, что состав растворителя, определяющий детали его взаимодействия с индольным ядром и аланильной боковой цепью молекулы Тгр, явным образом влияет на величину конкретных соотношений популяций разных ротамеров, фиксируемых низкой температурой. Из таблицы также видно, что по сравнению с чисто водным раствором температурная точка половинного сдвига первой компоненты λ_{\max} , характеризующегося длительностью флуоресценции τ_1 , смещается к $\approx -30^\circ\text{C}$ и $\approx -40^\circ\text{C}$ в растворах с 50% глицерина и 50% ДМСО соответственно. Однако в растворах с 75% глицерина и 75% ДМСО эта точка снова смещается к более высоким температурам: к -12°C и -22°C соответственно. Этот факт является дополнительным подтверждением связи температурной области регистрируемых нами переходов между ротамерами Тгр с молекулярной динамикой окружающего растворителя. Действительно, температуры затвердевания водных

Зависимость отношения спектральных вкладов и температуры половинного сдвига λ_{\max} спектра первой компоненты кинетики флуоресценции Тгр от растворителя

Растворитель	A_1/A_2 (-170°C)	Температура половинного сдвига λ_{\max} первой компоненты флуоресценции
H ₂ O	1.54	-20
50% глицерина	1.86	-30
75% глицерина	2.3	-12
50% ДМСО	≈ 1	-40
75% ДМСО	≈ 1	-22
1 М трегалоза	1.27	-5

растворов как глицерина, так и ДМСО немоно-тонно зависят от соотношения глицерин/ H_2O и ДМСО/ H_2O . При смешивании двух чистых компонентов растворителя – глицерина и H_2O – температура затвердевания (замерзания) раствора понижается по мере увеличения массовой доли глицерина вплоть до $-38^\circ C$ при 70% содержании глицерина. При дальнейшем же увеличении концентрации глицерина эта температура замерзания резко повышается. Аналогичная картина наблюдается и с водными растворами ДМСО, с тем уточнением, что минимальные температуры затвердевания смеси ДМСО/ H_2O еще более низкие, чем у смесей глицерина с водой [22–24].

Что касается раствора трегалозы, то на основании второго закона Рауля [25] можно оценить, на какую величину должна понизиться температура замерзания чистой воды в присутствии 1 М трегалозы. Оказывается, что эта температура составляет $\sim -3^\circ C$, что практически совпадает с величиной $1/2$ сдвига λ_{max} первой компоненты флуоресценции Тгр в растворе трегалозы: $-5^\circ C$ (см. таблицу).

Многокомпонентный характер кинетик затухания флуоресценции Тгр обычно связывают с переходами между его различными ротамерами [8]. В нашей работе [11] антибатный характер температурной зависимости короткого (τ_1) и длинного (τ_2) времени жизни кинетики затухания флуоресценции Тгр в растворе мы объяснили переходом между двумя ротамерными формами Тгр в возбужденном состоянии. При этом каждой форме Тгр приписывалась свое время жизни флуоресценции.

Однако возможен и альтернативный подход к объяснению особенностей зависимости длительностей и квантовых выходов флуоресценции Тгр от температуры, основанный на иных физических механизмах возникновения многокомпонентной кинетики затухания флуоресценции. В последнее время в ряде работ появились сведения, что кинетики флуоресценции собственно ротамерных форм Тгр моноэкспоненциальны, причем длительность флуоресценции разных ротамеров отличается незначительно [26]. При этом тушение флуоресценции какой-либо ротамерной формы Тгр и связанный с этим многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Тгр в белках объясняется дополнительным каналом дезактивации возбужденного состояния Тгр – переносом электрона с возбужденного индольного кольца на амидные группы основного скелета Тгр либо на его электрон-акцепторные боковые связи. В белке также возможен перенос протона с ближайших аминокислот, например с тирозина на индольное кольцо [27]. Для объяснения природы многокомпонентного свечения Тгр в воде, а также механизмов тушения флуоресцен-

ции Тгр в работе [12] выдвинуто предположение, что при возбуждении молекул Тгр происходит делокализация электронной плотности между индольным кольцом и соседними молекулами воды. При этом происходит напряжение сети водородных связей, приводящее к сильному красному сдвигу спектра флуоресценции Тгр в водном растворе. Как следует из наших экспериментальных данных, это предположение справедливо только в определенном температурном диапазоне ($-50^\circ C \div 10^\circ C$), в котором регистрируются широкие полосы с длинным крылом как в спектре поглощения, так и в спектре флуоресценции, а также происходит сдвиг спектра флуоресценции быстрой компоненты на ~ 20 нм. В остальной области температур перенос электрона может происходить на амидные группы основного скелета молекулы Тгр, либо на обладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Кроме того, мы предположили, что состояние с переносом заряда CTS может переходить обратно в возбужденное состояние триптофана, а также в основное состояние за счет излучательного и безизлучательного процессов. В этом случае моноэкспоненциальная кинетика затухания флуоресценции Тгр приобретает двухкомпонентный характер. Процессы, происходящие при возбуждении Тгр в водном окружении, можно представить в виде модельной схемы, показанной на рис. 6. Эта схема использовалась для проведения целевого анализа («Target analysis») кинетики затухания флуоресценции Тгр и определения параметров, характеризующих динамику процессов при возбуждении Тгр в водной среде. При разложении кинетики согласно модели рис. 6 определенные параметры приходилось задавать априори из известных спектроскопических данных: например, константа скорости затухания флуоресценции Тгр полагалась равной обратному времени затухания флуоресценции формы 4, составлявшей $(14.5 \text{ нс})^{-1}$, константа скорости излучательного перехода CTS в основное состояние молекулы триптофана оценивалась по ширине полосы минорной формы (S2) спектра флуоресценции Тгр (рис. 2) и принималась равной $(8 \text{ нс})^{-1}$. Остальные параметры кинетической схемы определялись в процессе аппроксимации кинетики затухания флуоресценции. При этом существование состояния с делокализованным электроном в системе водородных связей предполагалось только в области температур $-50^\circ C \div 10^\circ C$. По нашему мнению, в области температур $-170^\circ C \div -50^\circ C$ тушение флуоресценции Тгр и немоноэкспоненциальный характер кинетики затухания флуоресценции обусловлены переносом электрона с возбужденного индольного кольца молекулы Тгр на амидные группы основного скелета либо на обладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Этот процесс сопровождается образованием состояния с переносом за-

ряда и обратным переходом в возбужденное состояние индольного кольца, а также возможной релаксацией состояния с переносом заряда в основное состояние. Описываемая схема кинетических процессов (рис. 6) применима также и для описания переходов между ротамерными формами Тгр, приводящих к антибатной температурной зависимости времени жизни компонент в кинетике флуоресценции [11]. В математическом плане использованная нами в работе [11] модель перехода одной ротамерной формы в другую сходна с моделью, описывающей переходы каждой ротамерной формы в состояние с переносом заряда с учетом обратного перехода. Для ответа на вопрос, какая модель физически более адекватно описывает переходы в возбужденном состоянии молекулы Тгр, необходимо провести измерение кинетик изменения оптической плотности в области поглощения триптофана. Это требует, однако, наличия соответствующей экспериментальной техники.

Модель переходов молекулы Тгр с образованием состояния с переносом заряда СТС (рис. 6) описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dn_1}{dt} &= -(k_{F1} + k_{R1} + k_{12})n_1 + k_{21}n_2, \\ \frac{dn_2}{dt} &= k_{12}n_1 - (k_{F2} + k_{R2} + k_{21})n_2, \end{aligned} \quad (2)$$

где n_1 обозначает населенность возбужденных молекул Тгр*, n_2 – населенность состояния с переносом заряда СТС, k_{F1} – скорость затухания флуоресценции Тгр* без учета скорости перехода в состояние n_2 , k_{R1} – скорость безызлучательного перехода Тгр* в основное состояние, k_{12} – скорость перехода возбужденного состояния Тгр* в состояние с переносом заряда n_2 , k_{21} – скорость обратного перехода СТС → Тгр*, k_{F2} , k_{R2} – скорости излучательного и безызлучательного переходов СТС на основной уровень, ΔG – разность уровней энтальпии возбужденного состояния триптофана Тгр* и СТС.

Аппроксимацию кинетики затухания флуоресценции проводили минимизацией функционала среднеквадратичной ошибки экспериментальной кинетики и теоретической кривой при варьировании параметров кинетической схемы рис. 6. Теоретические кривые сворачивались с аппаратной функцией системы регистрации. Данная аппроксимация позволяет непосредственно определять скорости прямого перехода k_{12} и обратной рекомбинации k_{21} .

Решение системы дифференциальных уравнений, описывающих переходы молекулы Тгр (рис. 6), дает выражения для населенностей n_1 и n_2 , а также

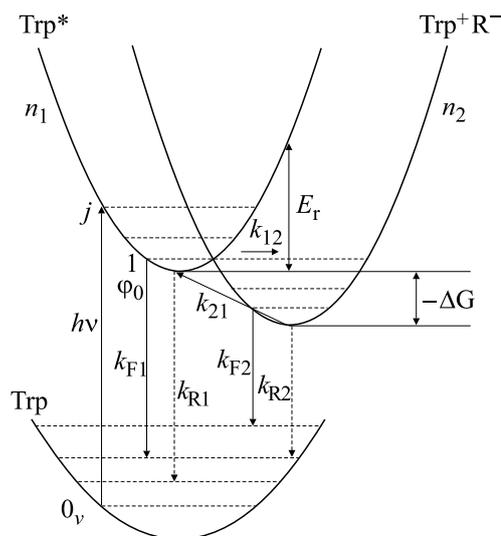


Рис. 6. Модельная схема кинетических переходов в триптофана: n_1 , n_2 – населенности возбужденного состояния молекул Тгр и состояния с переносом заряда, Тгр⁺R⁻ – состояние с переносом заряда (СТС), где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Тгр, так и амидные группы и пептидные связи с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Тгр, k_{F1} – константа скорости затухания флуоресценции возбужденного состояния триптофана, k_{12} – скорость перехода Тгр* в состояние СТС; k_{R1} – скорость безызлучательного перехода Тгр* в основное состояние, k_{21} – скорость обратного перехода СТС → Тгр*, k_{F2} – скорость излучательного перехода СТС на основной уровень, k_{R2} – скорость безызлучательного перехода СТС на основной уровень Тгр, ΔG – разность уровней энтальпии состояний Тгр* и СТС, E_r – энергия реорганизации среды, связанная с образованием СТС. Горизонтальными штрихованными линиями показаны некоторые колебательные уровни основного и возбужденных состояний Тгр.

длительности τ_1 и τ_2 двух компонент разложения кинетики флуоресценции в виде формул:

$$\begin{aligned} n_1(t) &= a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}, \\ n_2(t) &= b_1 e^{-k_1 t} + b_2 e^{-k_2 t}, \end{aligned} \quad (3)$$

$$\frac{1}{\tau_{1,2}} = k_{1,2} = \frac{1}{2} \left(g_1 + g_2 \pm \sqrt{(g_1 - g_2)^2 + 4k_{12}k_{21}} \right),$$

где $g_1 = k_{F1} + k_{R1} + k_{12}$, $g_2 = k_{21} + k_{F2} + k_{R2}$.

Для a_1 , a_2 , b_1 , b_2 выражения имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} a_1 &= \frac{g_1 - k_2}{k_1 - k_2}; \quad a_2 = \frac{k_1 - g_1}{k_1 - k_2}; \\ b_1 &= \frac{-k_{12}}{k_1 - k_2}; \quad b_2 = \frac{k_{12}}{k_1 - k_2}. \end{aligned}$$

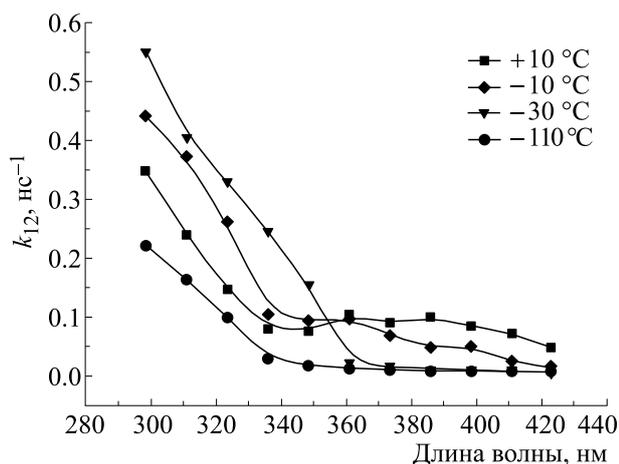


Рис. 7. Спектральные зависимости величины константы скорости перехода возбужденного состояния триптофана в состояние с переносом заряда. На данном рисунке не приведен спектр при -50°C , так как он практически повторяет спектр при -110°C .

Из данных выражений следует, что $a_1 + a_2 = 1$; $b_2 = -b_1$;

Обозначения параметров в уравнении (1) указаны в подписи к рис. 6.

При фитировании кинетик флуоресценции согласно модели рис. 6 значение для $n_2(t)$ необходимо умножить на квантовый выход флуоресценции этого состояния $\varphi_{F2} = \frac{k_{F2}}{k_{F2} + k_{R2}}$.

Согласно полученным выражениям для k_1 и k_2 , если в некоторой области температур значение k_1 увеличивается за счет роста подкоренного члена (3), то значение k_2 в этой же области будет уменьшаться. В результате будет наблюдаться антибатный характер температурных зависимостей времени жизни короткой и длинной компонент кинетики флуоресценции Тгр в водном растворе в соответствующей температурной области.

Таким образом, используя теоретическую модель (3), а также схему, представленную на рис. 6, мы смогли описать экспериментальные температурные зависимости длительностей компонент τ_1 и τ_2 . Кроме того, решение системы уравнений (2) позволило определить значения коэффициентов a_1 , a_2 , b_1 , b_2 и построить зависимость величины константы скорости перехода триптофана k_{12} в состояние с переносом заряда от длины волны при разных температурах, показанную на рис. 7. Видно, что в области температур от -50°C до -10°C константа скорости перехода Тгр из возбужденного состояния в состояние с переносом заряда k_{12} имеет большее значение в сравнении с другими температурами (10°C , -110°C), при этом ее

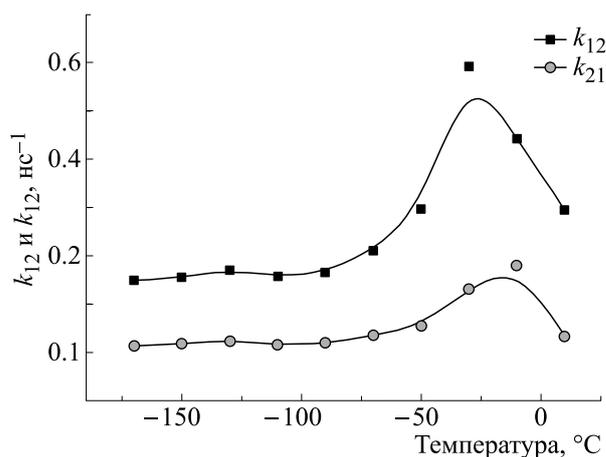


Рис. 8. Температурные зависимости скорости перехода триптофана из возбужденного состояния в состояние с переносом заряда k_{12} и обратного перехода k_{21} .

зависимость от длины волны уширена, что приводит к дополнительному увеличению этой скорости и соответствующему уменьшению времени жизни компоненты кинетики флуоресценции с временем затухания τ_1 в данном температурном диапазоне. При этом, согласно уравнению (3), время жизни компоненты кинетики флуоресценции с временем жизни τ_2 увеличивается. Это приводит к антибатному характеру температурных зависимостей времени жизни короткой и длинной компонент кинетики флуоресценции Тгр в водном растворе в области $-50^{\circ}\text{C} \div -10^{\circ}\text{C}$. Таким образом, выражение (3) позволяет естественным образом описать антибатный характер времен жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 при увеличении константы скорости перехода k_{12} из возбужденного состояния Тгр в состояние с переносом заряда, поскольку изменение величин констант скоростей k_1 и k_2 происходит при этом в противоположном направлении (при увеличении значения k_1 величина k_2 уменьшается). Обращает на себя внимание существование длинноволнового вклада в константу скорости перехода при температурах 10°C и -10°C , что коррелирует с существованием при данных температурах широкой полосы с длинноволновым хвостом как в спектре поглощения, так и в спектре флуоресценции Тгр (рис. 1 и 2). В остальной температурной области приведенная модель позволяет объяснить тушение флуоресценции Тгр и двухкомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции даже в предположении, что времена жизни флуоресценции ротамерных форм в отсутствие «сольватирующей» сетки водородных связей примерно одинаковы. Так, на рис. 8 показана зависимость констант скоростей прямого перехода из возбуж-

денного состояния T_{gr}^* в состояние с переносом заряда CTS k_{12} и обратного перехода k_{21} от температуры. Видно, что в температурной области $-60^\circ C \div 10^\circ C$ данные константы имеют большие значения по сравнению с таковыми при других температурах. Изменения констант скоростей k_{21} и k_{12} от температуры качественно похожи, за исключением того, что k_{21} имеет меньшие значения во всем диапазоне температур. Это связано с аррениусовской зависимостью константы скорости обратного перехода от скорости прямого перехода, энергетического зазора ΔE и температуры T ($k_{21} = k_{12} \exp(-\Delta E/kT)$). В результате, согласно уравнениям (3), в данной области температур и наблюдается антибатное поведение времени затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 .

Отметим, что значения τ_1 и τ_2 , рассчитанные на основе модели, представленной на рис. 6, близки к данным, полученным в результате глобального анализа кинетик, а их спектры близки к спектральному распределению амплитуд глобального анализа (рис. 3а,б). Величина χ^2 при аппроксимации согласно схеме на рис. 6 не превышала 1.5.

Влияние водородных связей в окружении возбужденных хромофоров на их флуоресцентные свойства изучалось в ряде работ (см., например, монографию [28]). В частности, в работе [26] показано, что сильное влияние на вероятность перехода молекулы T_{gr} в состояние с переносом заряда в белке оказывает расположение диполей окружающей воды относительно индольного кольца. В работе [29] выдвинуто предположение, что при возбуждении молекул T_{gr} формируются эксиплексы молекул растворителя с индольным кольцом. Последние образуются и стабилизируются в результате диполь-дипольных взаимодействий молекул растворителя с атомами индольного кольца в возбужденном состоянии. В работе [12] показано, что возбужденное состояние T_{gr} в воде переходит в состояние с переносом заряда в результате взаимодействия индольного кольца с молекулами воды. Этот переход сопровождается образованием цвиттерионного комплекса и напряжением определенных водородных связей. При этом происходит частичное упорядочивание водородных связей, в результате чего в системе водородных связей возникает квазизона проводимости для электрона индольного кольца, в которой электрон делокализуется. Наши данные указывают, что состояние с переносом заряда может переходить в возбужденное состояние молекулы T_{gr} , а также релаксировать в основное состояние. При этом образование квазизоны проводимости в системе водородных связей и делокализация электрона по молекулам воды происходят в определенной области температур,

в которой взаимодействие диполей водородных связей достаточно велико, чтобы вызвать упорядочивание сетки водородных связей. При этом температура должна быть ниже некоторой критической, превышение которой может привести к разупорядочиванию этой сетки и исчезновению проводимости. В нашем случае — это температурная область, индикатором которой является появление широких полос в спектре поглощения и спектре флуоресценции триптофана. Другим признаком возникновения упорядоченной системы водородных связей и образования в ней квазизоны проводимости служит антибатность температурной зависимости короткого и длинного времени жизни флуоресценции триптофана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В использованном нами подходе к изучению флуоресцентных свойств триптофана в водном растворе возникновение тушения флуоресценции и переход от моноэкспоненциальной кинетики флуоресценции триптофана к многокомпонентному свечению объясняется переносом электрона от индольного кольца на амидные группы или на водородные связи окружающей молекулу T_{gr} воды. Данный процесс сопровождается образованием состояния с переносом заряда. При этом возможен обратный переход из данного состояния в возбужденное состояние T_{gr} , либо излучательный или безызлучательный переходы на основной уровень. В температурной области $-50^\circ C \div -10^\circ C$ главную роль в образовании состояния с переносом заряда может играть сетка окружающих молекулы T_{gr} водородных связей в результате их частичного упорядочивания и образования квазизоны проводимости. Как следствие, происходит перенос электрона от возбужденного индольного кольца в систему водородных связей и его делокализация. В результате изменяются как спектр, так кинетика флуоресценции T_{gr} в водном растворе. Отметим, что возможен и прямой переход молекулы триптофана в состояние с делокализованным электроном, что приводит к возникновению широкого длинноволнового крыла в спектре поглощения (рис. 1).

Таким образом, температурные зависимости длительности флуоресценции T_{gr} в растворе могут быть объяснены как переходами между различными формами ротамеров T_{gr} [11], так и переходами между возбужденным состоянием триптофана и состоянием с переносом заряда, образующимся при переносе электрона с индольного кольца на обладающие электрон-акцепторными свойствами амидные группы, пептидные связи или водородные связи ближайшего окружения молекул T_{gr} . Отличие этих моделей состоит в следующем: в случае ротамерной модели три компонента кинетики затухания флуоресценции

объясняются присутствием трех различных центров свечения, при этом при изменении температуры часть молекул Тгр, находящихся в возбужденном состоянии, может переходить из коротковолновой короткоживущей формы в длинноволновую форму с большим временем жизни. Новая модель объясняет физический механизм возникновения многокомпонентного сигнала флуоресценции при возбуждении молекул Тгр, находящихся в идентичных условиях. При этом дезактивация молекул Тгр* происходит либо непосредственно в основное состояние, либо через промежуточное состояние СТС. Выводы о предпочтительном характере той или другой модели можно будет сделать в результате дальнейших исследований. Может оказаться, что для некоторых случаев, например для триптофанов в составе белков (может быть гидрофобных) в реакционных центрах или в других системах, может быть справедливым существование ротамеров, приводящее к двухкомпонентному характеру кинетики флуоресценции триптофана. В других случаях, в частности для растворов триптофана в водной среде или в гидрофильных белках, более подходящей окажется модель, связанная с переносом заряда и образованием состояния с переносом электрона, в том числе с образованием системы упорядоченных водородных связей (цвиттерионного комплекса [12]) в окружении возбужденной молекулы триптофана.

Совершенно ясно, однако, что результаты данного исследования необходимо учитывать при анализе температурных зависимостей времени жизни флуоресценции Тгр в составе белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Е.П. Лукашева за помощь в измерении спектров поглощения и флуоресценции триптофана в водном растворе.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. L. Dashnau, B. Zelent, and J. M. Vanderkooi, *Biophys. Chem.* **114**, 71 (2005).
2. D. E. Schlamadinger, J. E. Gable, and J. E. Kim, *J. Phys. Chem. B* **113**, 14769 (2009).
3. Y. Chen and M. D. Barkley, *Biochemistry* **3**, 9976 (1998).
4. G. Mei, A. Di Venere, A. F. Agrò, et al., *J. Fluoresc.* **13**, 467 (2003).
5. Э. А. Бурштейн, *Молекуляр. биология* **17**, 455 (1983).
6. Y. K. Reshetnyak and E. A. Burstein, *Biophys. J.* **81**, 1710 (2001).
7. A. G. Szabo and D. M. Rayner, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 554 (1980).
8. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. (Springer, N. Y., 2006).
9. P. D. Adams, Y. Chen, K. Ma, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9278 (2002).
10. J. A. Ross and D. M. Jameson, *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1301(2008).
11. В. В. Горохов, П. П. Нокс, Б. Н. Корватовский и др., *Биохимия* **82**, 1615 (2017).
12. H. Liu, H. Zhang, and B. Jin, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy* **106**, 54 (2013).
13. E. Gudgin, R. Lopez-Deigado, and W. R. Ware, *Phys. Chem.* **87**, 1559 (1983).
14. J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. McDonald, and G. R. Fleming, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3824 (1983).
15. M. Hellings, M. De Maeyer, and S. Verheyden, *Biophys. J.* **85**, 1894 (2003).
16. T. Liu, P. R. Callis, B. H. Hesp, and M. de Groot, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4104 (2005).
17. C.-P. Pan, P. L. Muino, M. D. Barkley, and P. R. Callis, *J. Phys. Chem. B* **115**, 3245 (2011).
18. A. Kadyan, S. Juneja, and S. J. Pandey, *Phys. Chem. B* **123**, 7578 (2019).
19. J. B. A. Ross, H. R. Wyssbrod, R. A. Porter, and G. P. Schwartz, *Biochemistry* **31**, 1585 (1992).
20. T. E. S. Dahms, K. J. Willis, and A. G. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2321(1995).
21. I. Compagnon, F. C. Hagemester, R. Antoine, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8440 (2001).
22. *Physical properties of glycerine and its solutions* (Glycerine Producers' Association, N. Y., 1963).
23. R. N. Havemeyer, *J. Pharmaceutic. Sci.* **55**, 851(1966).
24. J. J. Towey, A. K. Soper, and L. Dougan, *J. Phys. Chem. B* **120**, 4439 (2016).
25. *Физическая химия*, под ред. К. С. Краснова, 3-е изд. (Высш. школа, М., 2001), т. 1.
26. M. R. Hilairea, I. A. Ahmed, C.-W. Lina, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 6005 (2017).
27. P. R. Callis, *J. Mol. Struct.* **1077**, 22 (2014).
28. K. L. Han and G. J. Zhao, *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State* (John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2011).
29. M. V. Hershberger and R. Lumry, *Photochem. Photobiol.* **23**, 391(1976).

The Study of the Temperature Dependence of Tryptophane Fluorescence Lifetime in the Range of -170°C to $+20^{\circ}\text{C}$ in Various Solvents

V.Z. Paschenko, V.V. Gorokhov, B.N. Korvatovsky, P.P. Knox,
N.P. Grishanova, and S.N. Goryachev

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

The temperature dependences of the fluorescence lifetime of tryptophan molecules in an aqueous solution, aqueous solutions of glycerol (50 and 75%, v/v) and dimethyl sulfoxide (50 and 75%, v/v) and 1 M aqueous trehalose solution were studied in the range of -170°C – $+20^{\circ}\text{C}$. In this temperature range, the fluorescence kinetics in all samples is best approximated by three exponential terms with characteristic times $\tau_1 \sim 3$ ns, $\tau_2 \sim 4$ ns and $\tau_3 \sim 15$ ns at room temperature. Temperature dependences of fluorescence lifetimes for the fastest and medium components exhibited antisymbatic (antiphase) behavior in the temperature range of -60°C to 10°C is observed. To explain the behavior of these temperature dependences, a new model of the nature of multicomponent fluorescence kinetics was suggested. This model takes into account the transition of a tryptophan molecule from the excited state to the state with separated charges—charge transfer state, the transition back to the excited state, radiative and non-radiative transitions of the charge transfer state to the ground state. The obtained results can be used for explanation the experimental temperature dependences of tryptophan fluorescence lifetime in proteins.

Keywords: tryptophan, fluorescence, fluorescence decay kinetics, temperature dependence