

## Закономерности гидродинамического поведения белков в концентрированных растворах по данным ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля

А. М. Кусова<sup>1,2,\*</sup>, А. Э. Ситницкий<sup>1,†</sup>, Ю. Ф. Зуев<sup>1,2,3‡</sup>

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики,  
Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН»  
Россия, 420111, Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31

<sup>2</sup>Казанский федеральный университет, институт физики  
Россия, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18

<sup>3</sup>Казанский государственный энергетический университет. Россия, 420066, Казань  
(Статья поступила 14.05.2018; Подписана в печать 25.10.2018)

Исследованы концентрационные зависимости коэффициента самодиффузии различных белков: фибриногена, трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина,  $\alpha_S$ -казеина методом ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП). Экспериментальные данные были проанализированы в рамках феноменологического подхода, основанного на фрикционном формализме неравновесной термодинамики Винка. Полученные результаты свидетельствуют о том, что феноменологический подход является универсальным, обеспечивая адекватное описание экспериментальных данных для белков различной структуры и формы в широком диапазоне концентраций. С помощью подхода Винка охарактеризована диффузионная подвижность белков, определена концентрация, выше которой начинается ассоциация молекул  $\alpha_S$ -казеина.

PACS: 87.15.km; 87.15.kg; 82.56.Pp. УДК: 577.322.3

Ключевые слова: белки, краудинг, ЯМР ИГМП, диффузия, трансляционная подвижность, белок-белковые взаимодействия, взаимодействия белок-растворитель.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из отличительных особенностей живых систем является высокая концентрация макромолекул во внутриклеточном и внеклеточном пространствах (50–400 мг/мл) [1–3]. Макромолекулы, присутствующие в клетке, занимают значительную часть общего объема цитоплазмы (около 40%). В литературе такие условия, когда межмолекулярные расстояния сравнимы с линейными размерами молекул называются макромолекулярным краудингом. Краудинг влияет на структуру белка, форму, конформационную стабильность, связывание, ферментативную активность, агрегацию, белок-белковые взаимодействия, взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами.

Поведение макромолекул в растворах имеет большое значение для биологических систем. С ним связаны транспорт, термодинамическая стабильность, регуляция функциональной активности белков [4]. Трансляционная диффузия является одним из фундаментальных физических явлений, описывающих подвижность молекул [5]. Интерпретация концентрационной зависимости коэффициента самодиффузии (КСД) имеет большое значение для определения вкладов различных межмолекулярных взаимодействий.

В последние годы вырос интерес к гибридным материалам для решения задач регенеративной медицины и доставки лекарственных средств. Одними из наи-

более перспективных материалов в этих областях являются гидрогели на основе природных биополимеров (белков и полисахаридов). Гидрогели активно используются в клеточной терапии, для лечения ран, регенерации хрящевой и костной ткани, протезирования кровеносных сосудов, нервного волокна, мышечной ткани сердца, пролонгации действия лекарственных препаратов и пр. [6–8]. Все это возможно благодаря биосовместимости гидрогелей, сходств их структуры и физических свойств с тканями животного происхождения и возможности направленной регуляции их физико-химических характеристик.

Под задачи регенеративной медицины и средств доставки лекарств разрабатывают и используют казеиновые гидрогели, в которых трехмерная полимерная сетка стабилизирована межмолекулярными силами, включая электростатические (ван-дер-ваальсовы) взаимодействия, ионные мостики, водородные связи и гидрофобные взаимодействия. Очевидно, что характер и сила этих взаимодействий будет определяться не только химическим строением биомacroмолекул, но и их межмолекулярными взаимодействиями в составе трехмерной полимерной матрицы.

В настоящей работе метод ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) использован для изучения гидродинамических особенностей диффузионного поведения белков в широком диапазоне концентраций: глобулярных, сфероидальных белков — трипсина (Tr) и  $\alpha$ -химотрипсина (ChTr); фибриногена (Fg), имеющего сильно вытянутую форму с глобулярными и неструктурированными участками;  $\alpha_S$ -казеина ( $\alpha_S$ -CN) — белка с неупорядоченной структурой. Полученные обобщенные концентрационные зависимости КСД бел-

\*E-mail: alexakusova@mail.ru

†E-mail: sitnitsky@kibb.knc.ru

‡E-mail: yufzuev@mail.ru

ков проанализированы в рамках феноменологического подхода, основанного на фрикционном формализме неравновесной термодинамики. Показана возможность использования данного феноменологического подхода для анализа гидродинамического поведения белков различной формы и размера в широком диапазоне концентраций. Определены численные характеристики межбелковых взаимодействий. Планируется, что полученные в ходе выполнения работы результаты послужат фундаментальной основой для инженерии белковых гидрогелей под медико-биологические задачи.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были выбраны сфероидальные глобулярные белки: трипсин (ММ=24 кДа),  $\alpha$ -химотрипсин (ММ=24.8 кДа). Концентрационные зависимости КСД трипсина поджелудочной железы свиной, тип IX-S (SIGMA-ALDRICH, USA) и бычьего  $\alpha$ -химотрипсина, тип II (SIGMA-ALDRICH, USA) были получены в водном растворе ( $H_2O + D_2O / 90\%+10\%$ ), при температуре  $30^\circ C$ , pH=2 и pH=3 для трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина соответственно. Такие значения pH были выбраны в соответствии с наименьшей ферментативной активностью белков.

Концентрационная зависимость КСД бычьего фибриногена (Calbiochem, USA) получена в 0.02M Tris-HCl буфере, содержащим 150 mM NaCl при температуре  $37^\circ C$ . Для фибриногена было выбрано значение pH=7.4, это значение соответствует pH плазмы крови.

Также для исследования был выбран лиофилизированный белок  $\alpha_S$ -казеин ( $\alpha_S$ -CN) (ММ=23.6 кДа). Концентрационные зависимости КСД  $\alpha_S$ -казеина коровьего молока (SIGMA-ALDRICH, USA) получены в водных растворах (99.8%  $D_2O$ , SIGMA-ALDRICH, USA), при температуре  $5^\circ C$  и  $30^\circ C$ , pH=7. Значение pH было выбрано для увеличения растворимости белка и для предотвращения неконтролируемой агрегации  $\alpha_S$ -казеина.

Эксперименты проводились на ЯМР спектрометре Bruker AVANCE III (600.13 МГц), с датчиком TXI 5 мм, оснащенный градиентной катушкой, способной создавать максимальный градиент магнитного поля 55.7 Гс/см. Для измерения КСД использована импульсная последовательность «стимулированное эхо» с биполярными градиентами (BPP-LED). Измерения КСД проведены на ядрах протонов  $^1H$  (600.13 МГц). Сигнал воды подавлялся посредством преднасыщения. Использовались следующие экспериментальные параметры: длительность импульса  $90^\circ$  10–13 мкс; ширина спектра 12 м.д.; время между повторами экспериментов 2–5 с. Амплитуда градиента поля изменялась от 2% до 98% от его максимального значения с шагом 16–32 при постоянном времени диффузии ( $\Delta = 50$  мс) и длительности градиента ( $\delta = 4$ –18 мс). Обработка данных и анализ выполнялись с использованием программного обеспечения Bruker Topspin 3.5. Поскольку образцы

Fg были приготовлены в недеитерированном растворителе, запись спектров ЯМР и измерения КСД выполнялись в режиме «unlocked» [9]. Диапазон химического сдвига для измерения коэффициента самодиффузии был выбран в спектральной области, которая содержала сильные протонные сигналы при 0.9–0.6 м.д. для Fg и 1–0.5 м.д. для Tr и ChTr, 0.6–1 м.д. для  $\alpha_S$ -CN. Принимая во внимание возможные экспериментальные ошибки в определении концентрации и pH, коэффициенты самодиффузии были определены с точностью 7–10%.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для различных концентраций белков наблюдались моноэкспоненциальные или мультиэкспоненциальные диффузионные спады (рис. 1). Практически для всех концентраций Fg и  $\alpha_S$ -CN наблюдалось моноэкспоненциальное поведение, тогда как для Tr и ChTr такое поведение наблюдалось для разбавленных и полуразбавленных растворов, а при увеличении концентрации спады имели мультиэкспоненциальную форму (рис. 1). Для моноэкспоненциального диффузионного спада амплитуда спинового эха  $A(g)$  зависит от градиента магнитного поля  $g$  следующим образом:

$$\frac{A(g)}{A(0)} = \exp(-D_S \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)), \quad (1)$$

где  $A(0)$  — амплитуда спинового эха при  $g = 0$ ,  $\gamma$  — гиромагнитное отношение для протонов,  $\delta$  — длительность градиентного поля,  $\Delta$  — время диффузии,  $D_S$  — коэффициент самодиффузии.

В этом случае коэффициент самодиффузии определялся по линейному наклону зависимости в соответствии с уравнением (1). Мультиэкспоненциальные диффузионные спады описываются спектром дискретных коэффициентов самодиффузии или средним коэффициентом самодиффузии  $\langle D_S \rangle$ , который может быть определен с высокой точностью по начальному наклону зависимости при  $g \rightarrow 0$  [10].

Отклонение формы диффузионного спада от моноэкспоненциальной конфигурации, скорее всего, связано с полидисперсностью диффундирующих частиц из-за их обратимой ассоциации [11]. Значения коэффициентов самодиффузии при бесконечном разбавлении были получены путем экстраполяции зависимостей на нулевую концентрацию:  $D_0$ :  $5.22 \times 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с (Fg),  $1.76 \times 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с (Tr),  $1.52 \times 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с (ChTr),  $8.1 \times 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с ( $\alpha_S$ -CN). Для фибриногена, трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина полученные нами результаты близки к литературным данным для белков в мономерном состоянии [12, 13], что касается  $\alpha_S$ -казеина — значение коэффициента самодиффузии при бесконечном разбавлении не отклоняется от литературных данных [14] и соответствует радиусу димера  $\alpha_S$ -казеина [15].

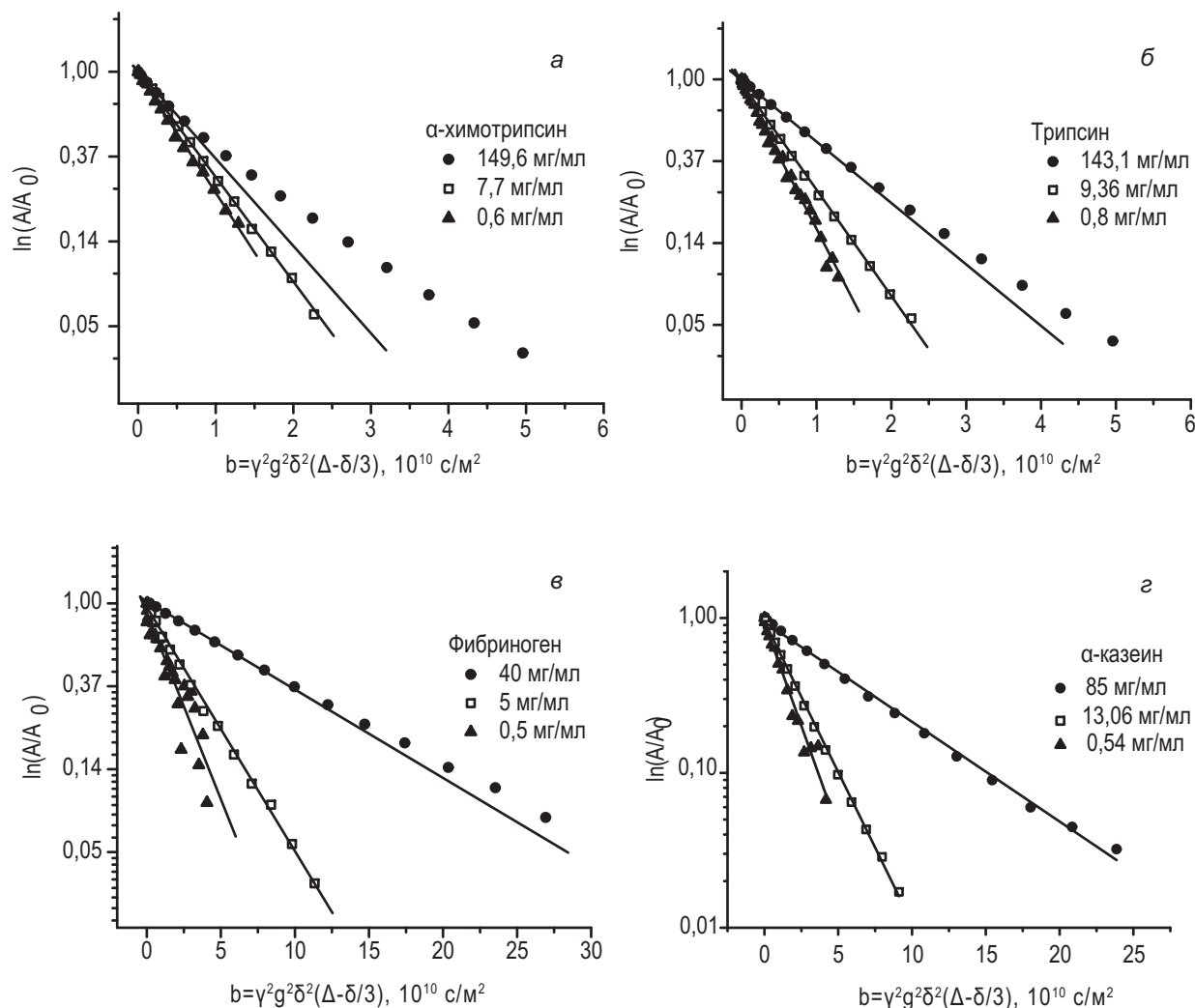


Рис. 1: Диффузионные спады: а —  $\alpha$ -химотрипсина, б — трипсина, в — фибриногена, г —  $\alpha$ S-казеина

Полученные коэффициенты самодиффузии белка показаны на рис. 2.

Предварительный качественный анализ полученных зависимостей показывает, что диффузионная подвижность Fg и  $\alpha$ S-CN намного меньше, чем у Tg и ChTg. Для Fg такое поведение является следствием значительного различия в молекулярной массе, а также в размере Fg по сравнению с глобулярными белками. Известно, что молекула Fg имеет длину около 45 нм и диаметр 2–3 нм [16], а Tg и ChTg — сфериды со средним радиусом около 2 нм [17]. Для Fg наблюдается замедление коэффициента самодиффузии, начиная с первых точек, достигающих примерно 10-кратного уменьшения при объемных фракциях белка около 4%. В то время как Tg и ChTg демонстрируют более слабое затухание диффузионной подвижности во всем изучаемом диапазоне концентраций.

Мы проанализировали данные по самодиффузии в соответствии с феноменологическим подходом Винка, основанным на фрикционном формализме неравно-

весной термодинамики [18]. Для коэффициента самодиффузии частицы данный подход дает:

$$D_s = \frac{RT}{f_{12}c_1 + f_{22}c}, \tag{2}$$

где  $f_{12}$  — молярный коэффициент трения между растворителем и растворенным веществом,  $f_{22}$  — молярный коэффициент трения между молекулами растворенного вещества,  $c_1$  и  $c$  — молярные концентрации растворителя и растворенного вещества соответственно. В нормализованной форме:

$$\frac{D_s}{D_s^0} = \frac{f_{12}c_1}{f_{12}c_1 + f_{22}c}, \tag{3}$$

где  $D_s^0$  коэффициент самодиффузии частицы при бесконечном разбавлении. Принимая во внимание, что сумма объемных фракций растворенного вещества и растворителя равна 1, мы имеем:

$$c_1 v_1 + c v_2 = 1, \tag{4}$$

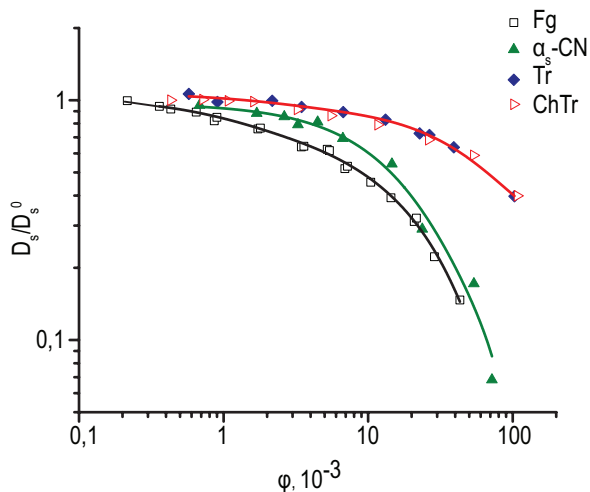


Рис. 2: Концентрационные зависимости КСД: фибриногена при 310 К, рН = 7.4 (квадраты); трипсина = 303 К, рН = 2 (ромбы);  $\alpha$ -химотрипсина = 303 К, рН = 3 (полые треугольники);  $\alpha_S$ -казеина = 303 К, рН = 7 (заполненные треугольники)

где  $v_1$  — парциальный объем молекулы растворителя,  $v_2$  — парциальный объем молекулы растворенного вещества. Если обозначить:

$$\rho = \frac{f_{22}v_1}{f_{12}v_2}, \phi = cv_2, \quad (5)$$

то уравнение (3) можно представить в виде:

$$\frac{D_s}{D_s^0} = \frac{1}{1 + \rho \frac{\phi}{1-\phi}}. \quad (6)$$

Последнее выражение содержит только безразмерные составляющие и нормированный КСД и является удобной для описания концентрационной зависимости КСД белковых молекул в растворах.

Сначала проведем описание экспериментальных данных, полученных для  $\alpha_S$ -CN. На рис. 3 видно, что теория Винка хорошо совпадает с полученными экспериментальными данными только до определенной концентрации белка, которая составляет около 0.019 объемной доли белка (25 мг/мл) с дальнейшим сильным отклонением экспериментальных от теоретических зависимостей.

Теория Винка, в которой коэффициент трения определяется размером диффундирующей частицы, постулирует фиксированность этого размера. Итак, мы предложили, что при дальнейшем увеличении концентрации белка мы имели дело с ассоциацией  $\alpha_S$ -CN. Для определения размера ассоциатов был определен размер диффундирующей частицы  $\alpha_S$ -CN в разбавленных растворах в соответствии с уравнением Стокса-Эйнштейна:

$$D_s = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (7)$$

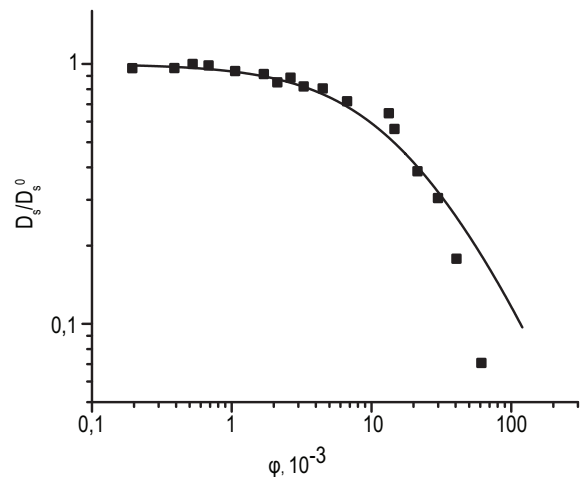


Рис. 3: Концентрационная зависимость КСД  $\alpha_S$ -CN. Сплошная линия — теоретическая концентрационная зависимость КСД согласно феноменологическому подходу, основанному на фрикционном формализме неравновесной термодинамики

где  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура,  $\eta$  — вязкость растворителя,  $R$  — радиус диффундирующей частицы. Соответственно, для двух типов диффундирующих частиц (растворитель и растворенная макромолекула) отношение их коэффициентов самодиффузии будет равно обратному отношению их гидродинамических радиусов:

$$\frac{D_{s1}}{D_{s2}} = \frac{R_2}{R_1} \quad (8)$$

Используя это соотношение для измеренных значений коэффициентов самодиффузии воды и белка, мы определили соотношение водных и белковых гидродинамических радиусов для образцов с различной концентрацией белка. Учитывая постоянство радиуса молекулы воды во всех образцах, можно определить изменение размеров белка с увеличением его концентрации. Таким образом, уже при 29.05 мг/мл наблюдается значительное увеличение (в 2.6 раза) размера молекулы белка по сравнению с разбавленным раствором 1.42 мг/мл. Это означает, что гидродинамический радиус диффундирующей частицы изменяется от 3.5 нм в разбавленном растворе, что соответствует размеру белка [15], до примерно 8 нм (концентрированный раствор), что свидетельствует об увеличении размера агрегатов  $\alpha_S$ -CN при концентрации белка 29.05 мг/мл. Такой размер в очень приблизительной оценке может соответствовать 20-мерному ассоциату для твердых сферических частиц. Однако, учитывая неупорядоченную форму молекулы  $\alpha_S$ -CN [19], эта оценка, по-видимому, сильно завышена. Очевидно, что при этой концентрации мы имеем олигомер белка низкого порядка, размер которого не противоречит литературным данным, в которых сообщается о существовании ассоциатов  $\alpha_S$ -CN с  $R = 6$  нм [20].



Для дальнейшего теоретического описания диффузионного поведения  $\alpha_S$ -CN мы рассмотрим точку концентрации 25 мг/мл в качестве границы между мономерным и связанным состояниями белка. Чтобы проанализировать применимость подхода Винка к гидродинамическим свойствам неупорядоченных белков, мы не выходим за пределы этой границы.

На рисунке 4 видно, что уравнение (6) дает хорошее описание экспериментальных данных для всех белков в широком диапазоне концентраций. Численный результат этой аппроксимации состоит в величине безразмерного параметра  $\rho$  (табл. 1), который отражает относительный вклад коэффициентов трения между растворителем и растворенным веществом ( $f_{12}$ ) и между молекулами растворенного вещества ( $f_{22}$ ) в коэффициент самодиффузии белка. Чтобы сравнить значения  $f_{12}$  и  $f_{22}$  для исследуемых белков, сначала определим коэффициент трения растворителя-растворенного вещества как [21]:

$$f_{12} = \frac{M(1 - \tau_2\lambda)}{N_A s}, \quad (9)$$

где  $M$  — молекулярная масса белка,  $N_A$  — постоянная Авогадро,  $s$  — коэффициент седиментации,  $\lambda$  — плотность растворителя.

Все необходимые данные для использования уравнения (9) были найдены в литературе [22–28]. Затем коэффициент трения между молекулами растворенного вещества ( $f_{22}$ ) определялся через параметр  $\rho$  по формуле (5). Значения представлены в табл. 1.

При анализе коэффициентов трения сначала проведем сравнение между белками, принципиально различающимися по форме и в своей основе имеющими жесткую структуру, т.е. вытянутым фибриногеном и сфероидальными трипсином и  $\alpha$ -химотрипсином. Нужно отметить почти десятикратное различие в величине  $\rho$  между сфероидальными и удлинёнными белками. Значительно большее значение  $\rho$  физически означает, что для раствора Fg коэффициент трения между молекулами растворенного вещества  $f_{22}$  значительно больше, чем коэффициент трения между растворителем и растворенным веществом  $f_{12}$ . В то время как различие в природе и форме белка изменяет значение коэффициента трения между растворителем и растворенным веществом  $f_{12}$  в 5–6 раз, а коэффициент трения между молекулами белка увеличивается в 300–400 раз. Скорее всего основной причиной является гораздо более вытянутая и неправильная форма Fg по сравнению с сфероидальными Tg и ChTr. Согласно известным данным [29] молекула Fg имеет длину 45 нм и диаметр около 2–3 нм.

Молекула Fg имеет две дистальные глобулярные области  $D$  и одну центральную глобулярную область  $E$ , соединенную двумя тройными  $\alpha$ -спиральными катушками длиной 17 нм. Кроме того, имеется относительно неструктурированная часть, простирающаяся от дистальной спиральной катушки каждой цепи  $A\alpha$ , называемой областями  $\alpha C$  (остатки A $\alpha$ 221–610 в челове-

ческом Fg), содержащей около 25% массы молекулы. Области  $\alpha C$  Fg взаимодействуют друг с другом и с центральной областью молекулы, но эти внутримолекулярные взаимодействия относительно слабы, поэтому могут быть неустойчивыми в растворе. Гибкие фрагменты  $\alpha C$  двух разных молекул могут освобождаться, цепляться или даже перепутываться друг друга [30]. Последний процесс вызывает значительное трение чисто механической природы при движении молекул Fg относительно друг друга. В результате молекулы Fg испытывают существенно более высокое трение при диффузии, чем молекулы трипсина и химотрипсина.

Далее необходимо включить в обсуждение результаты, полученные для неструктурированного белка  $\alpha_S$ -CN. Интересно отметить, что неупорядоченная структура молекул  $\alpha_S$ -CN приводит к уменьшению трения между растворителем и белком  $f_{12}$  и увеличению тех же характеристик взаимодействия между молекулами белка  $f_{22}$ , возможно, это происходит вследствие внутримолекулярных взаимодействий. Вероятно, основной причиной увеличения коэффициента трения между молекулами  $\alpha_S$ -CN в сравнении со сфероидальными белками является неупорядоченная структура  $\alpha_S$ -CN. Если сравнивать три белка (трипсин,  $\alpha$ -химотрипсин,  $\alpha_S$ -казеин), проанализированных в этом исследовании, то они имеют одинаковую массу, но, по оценкам,  $\alpha_S$ -CN имеет больший размер, чем Tg и ChTr. Это связано с тем, что молекула  $\alpha_S$ -CN имеет гибкие расширенные фрагменты, которые способствуют полимерным эффектам в межмолекулярных взаимодействиях.

Кажется информативным сравнить полученные параметры для неструктурированного и нерегулярного  $\alpha_S$ -казеина как со схожими глобулярными белками: трипсином и  $\alpha$ -химотрипсином с одной стороны, и с белком вытянутой, неправильной формы — фибриногеном (Fg), имеющего два длинных гибких домена ( $\alpha C$ -придатки), с другой стороны. Молекулы белка представляют собой огромные объекты по сравнению с молекулами растворителя. Кроме того, поверхность белков чрезвычайно негладкая и имеет тенденцию цепляться друг с другом при прямом механическом взаимодействии. По этой причине, когда даже белки глобулярной формы среднего размера (например, Tg и ChTr) контактируют друг с другом, это взаимодействие обеспечивает более высокий коэффициент трения между молекулами белка  $f_{22}$  ( $\sim 6 \div 7$  единиц), нежели коэффициент трения при их взаимодействии с молекулами растворителя  $f_{12}$  ( $\sim 1$  единица). Ситуация резко меняется для белковых молекул неправильной формы, таких как  $\alpha_S$ -CN ( $\sim 15$  единиц против  $\sim 0.7$  единиц) или огромных Fg ( $\sim 2430$  единиц против  $\sim 7$  единиц). Для этих белков гибкие домены могут цепляться и препятствовать движению молекул. Такие контакты обеспечивают долгоживущие ассоциации двух и более молекул.

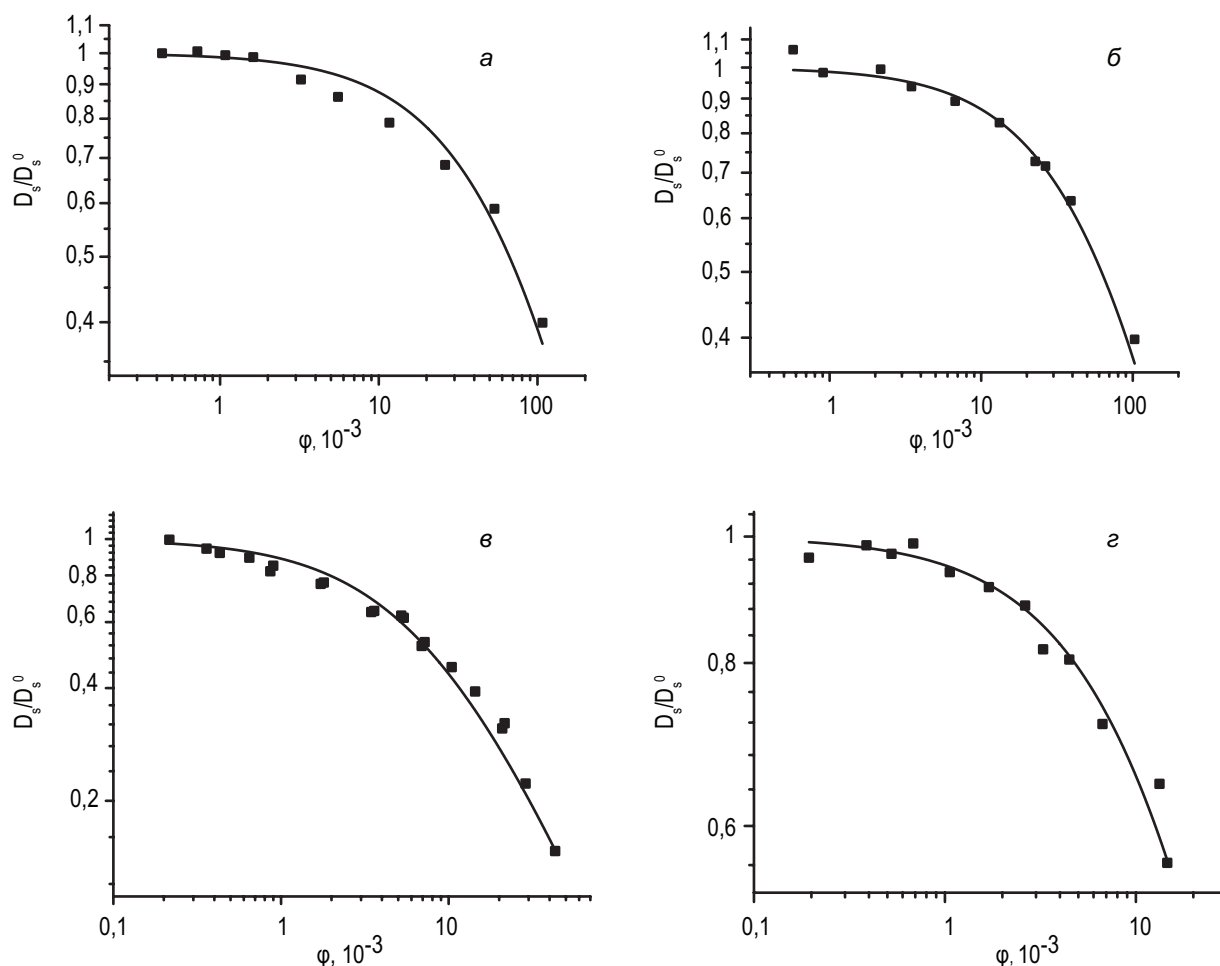


Рис. 4: Обобщенная концентрационная зависимость КСД: *a* –  $\alpha$ -химотрипсина, *b* – трипсина, *v* – фибриногена, *z* –  $\alpha$ -казеина. Сплошная линия показывает концентрационную зависимость КСД, которая основана на теории Винка

Таблица I: Молекулярная масса  $M$ , параметр  $\rho$ , гидродинамический коэффициент трения между молекулами белка и растворителя  $f_{12}$ , гидродинамический коэффициент трения между молекулами белка  $f_{22}$ , гидродинамический радиус  $R$

Белок	$M$ , кДа	$\rho$	$f_{12}$ , $10^{-10}$ кг/с	$f_{22}$ , $10^{-6}$ кг/с	$R$ , нм
Тг	24.0	14.4	1.2	6.4	1.6
ChТг	24.8	14.0	1.4	7.6	1.8
Fg	330.0	127.9	6.9	2430.0	6.1
$\alpha_S$ -CN	23.6	52.0	0.7	14.5	3.5

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для нахождения общих законов, описывающих трансляционную диффузию белков в растворах, необходимо определить влияние различных типов взаимодействий на обобщенную концентрационную зависимость КСД. В работе были получены концентрационные зависимости коэффициента самодиффузии белков (трипсина,  $\alpha$ -химотрипсина, фибриногена,  $\alpha_S$ -казеина), определены характеристики трансляци-

онной подвижности. Показана возможность использования феноменологического подхода Винка для описания гидродинамического поведения белков различной формы и размеров в широком диапазоне концентраций, включая условия краудинга. Феноменологический подход Винка обеспечивает хорошее описание для поведения всех типов белков.

Представленная работа дает новую информацию о поведении казеинов в растворах в широком диапазоне концентраций, включая начальные стадии гелеобразования. Была определена концентрация, при кото-

рой начинается ассоциация молекул казеина, а также размер получившихся олигомеров.

Полученные результаты обеспечивают лучшее понимание трансляционной подвижности белков в растворах, степени и условий ассоциации, а также взаимодействий происходящих в изучаемых системах. Результаты работы непременно стоит учитывать при со-

здании новых материалов на основе биополимеров, таких как казеиновые гидрогели в применении к регенеративной медицине, что позволит заранее оценивать характеристики новых материалов, концентрируясь на желаемых свойствах.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант №18-415-160011.

- [1] *Fulton A. B.* Cell. 1982. **30**. P. 345.  
 [2] *Zimmerman S. B.* Journal of molecular biology. 1991. **222**. P. 599.  
 [3] *Ellis R. J., Minton A. P.* Nature. 2003. **425**. P. 27.  
 [4] *Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N.* Int. J. Mol. Sci. 2014. **15**. P. 23090.  
 [5] *Price W. S.* NMR Studies of Translational Motion. Principles and Application. Cambridge University Press: Cambridge, 2009.  
 [6] *Balakrishnan B., Banerjee R.* Chem. Rev. 2011. **111**. P. 4454.  
 [7] *Ahadian S., Sadeghian R. B., Salehi S., Ostrovidov S., Bae H., Ramalingam M., Khademhosseini A.* Bioconjugate Chem. 2015. **26**. P. 1984.  
 [8] *Song F., Zhang L., Shi N. Li.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010. **79**. P. 142.  
 [9] *Hoye T. R., Eklov B. M., Ryba T. D., Voloshin M., Yao L. J.* Org. Lett. 2004. **6**. P. 953.  
 [10] *Маклаков А. И., Скурда В. Д., Фаткуллин Н. Ф.* Само-диффузия в растворах и расплавах полимеров. Казань: Казанский Государственный университет, 1987.  
 [11] *Minton A. P.* Mol Cell Biochem. 1983. **55**. P. 119.  
 [12] *Wasilewska M. Adamczyk, Z., Jachimska B.* Langmuir. 2009. **25** (6). P. 3698.  
 [13] *Young M. E., Carroad P. A.* Biotechnology and Bioengineering. 1980. **22**. P. 947.  
 [14] *Melnikova D. L., Skirda V. D., Nesselova I. V.* J. Phys. Chem. 2017. **121**(14). P. 2980.  
 [15] *Marchesseau S. J.* Dairy Sci. 2002. **85**. P. 2711.  
 [16] *Medved L. V., Weisel L. W., Thromb J.* Haemostasis. 2009. **7**. P. 355.  
 [17] *Zuev Yu. F., Vylegzhanina N. N., Zakhartchenko N. L.* Appl. Magn. Res. 2003. **25**. P. 29.  
 [18] *Vink H. J.* Chem. Soc. Faraday Trans. 1985. **81**. P. 1725.  
 [19] *Redwan E. M., Xue B., Almehdar H. A., Uversky V. N.* Current Protein and Peptide Science. 2015. **16**. P. 228.  
 [20] *Thorn D. C., Ecroyd H., Sunde M., Poon S., Carver J. C.* Biochemistry. 2008. **47**. P. 3926.  
 [21] *Padding J. T.* Theory of Polymer Dynamics. University of Cambridge: UK. 2005.  
 [22] *Schmidt D. G., Payens T. A. J., Markwijk B. W., Brinkhuis J. A.* Biochemical and biophysical research communications. 1967. **27**. P. 448.  
 [23] *Perkins S. J.* European journal of biochemistry. 1968. **157**. P. 169.  
 [24] *Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E.* J. Comput. Chem. 2004. **25**. P. 1605.  
 [25] *Levashov A. V., Khmelnskiy Y. L., Klyachko N. L., Chernyak V. Ya, Martinek K. J.* Coll. Interface Sci. 1982. **88**. P. 444.  
 [26] *Siegel L. M., Monty K. J.* Biochim. Biophys. Acta. 1966. **112**. P. 346.  
 [27] *Pattabhi V., Shamaladevi N.* J. Biomol. Struc. Dyn. 2004. **21**. P. 737.  
 [28] *Capasso C., Rizzi M., Menegatti E., Ascenzi P., Bolognesi M. J.* Mol. Recog. 1997. **10**. P. 26.  
 [29] *Tsurupa G., Tsonev L., Medved L.* Biochemistry. 2002. **41**. P. 64.  
 [30] *Zuev Y. F., Litvinov R. I., Sitnitsky A. E., Idiyatullin B. Z., Bakirova D. R., Galanakis D. K., Weisel J. W.* J. of Phys. Chem. B. 2017. **121**(33). P. 7833.

## Hydrodynamic behavior of proteins in concentrated solutions according to the pulsed field gradient NMR

A. M. Kusova<sup>1,2,a</sup>, A. E. Sitnitsky<sup>1,b</sup> Yu. F. Zuev<sup>1,2,3,c</sup>

<sup>1</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS  
Russia, 420111, Kazan

<sup>2</sup>Kazan Federal University. Russia, 420008, Kazan

<sup>3</sup>Kazan State Power Engineering University. Russia, 420066, Kazan

E-mail: <sup>a</sup>alexakusova@mail.ru, <sup>b</sup>sitnitsky@kibb.knc.ru, <sup>c</sup>yufzuev@mail.ru

The concentration dependences of self-diffusion coefficient of various proteins: fibrinogen, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin and  $\alpha$ S-casein were studied by means of the pulse field gradient nuclear magnetic resonance. The experimental data was analyzed in a view of the Vink's phenomenological approach based on the frictional formalism of non-equilibrium thermodynamics. The obtained results indicate that the phenomenological approach is universal and provides an adequate description of the experimental data for

proteins of different structure and shape in a wide concentration range. With the help of Vink's approach the diffusion mobility of proteins was characterized. The concentration was determined, when the  $\alpha_S$ -casein oligomerization appears.

PACS: 87.15.km; 87.15.kg; 82.56.Pp.

*Keywords:* proteins, crowding, PFG NMR, diffusion, translational mobility, protein-protein interactions, protein-solvent interactions.

*Received 14 May 2018.*

#### **Сведения об авторах**

1. Кусова Александра Михайловна — мл. науч. сотрудник, студент; тел.: (939) 733-77-10, e-mail: alexakusova@mail.ru.
  2. Ситницкий Александр Эдуардович — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник; e-mail: sitnitsky@kibb.knc.ru.
  3. Зувев Юрий Федорович — доктор хим. наук, профессор, гл. науч. сотрудник; e-mail: yufzuev@mail.ru.
-