

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ТЕРМОТРОПНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ФИБРИНОГЕНА

В.П. Берест, С.В. Гаташ, Т.Ф. Морозова*

*Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077; * Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, ул. Переяславская, 23, 310015*

Поступила в редакцию 15 мая 1998 г.

Помимо конформационного перехода II (около 10°C), в физиологических условиях при помощи методов УФ-спектрофотометрии и СВЧ-диэлектрометрии показано существование конформационного перехода фибриногена при 18-22°C, связанного, вероятно, с изменением структуры D-домена белка и увеличением доступности для растворителя части триптофанилов. Предполагается, что данный конформационный переход определяет характер температурной зависимости агрегации тромбоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибриноген, УФ-спектрофотометрия, СВЧ-диэлектрометрия, температура, конформационные изменения

При изменении температуры от 2 до 56°C, помимо денатурационного перехода I (около 49°C) в растворах фибриногена и его фрагмента D, происходит конформационный переход II (11-16°C) [1]. Переход II обратим и чувствителен к изменению ионной силы раствора. При температуре 11°C отмечен резкий переход от ускоряющего к тормозящему действию фибриногена на самосборку фибрина [2]. Наблюдаемые конформационные изменения фибриногена получены в специфических условиях (кислые или щелочные pH, большие ионные силы). С точки зрения участия фибриногена в системе гемостаза, представляет интерес исследование конформационной динамики его молекулы в физиологических условиях.

Фибриноген является обязательным кофактором агрегации тромбоцитов [3]. Предложен общий фибриноген-зависимый механизм агрегации тромбоцитов, контролируемый занятием фибриногенового рецептора. Молекулы фибриногена, подобно мостикам, соединяют соседние клетки, вызывая тем самым их агрегацию. Максимальная агрегация тромбоцитов наблюдается при комнатной температуре и ослабевает при ее увеличении или уменьшении [4,5]. Для выяснения механизма зависимости агрегации тромбоцитов от температуры необходимо исследовать состояние молекулы фибриногена при разных температурах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибриноген выделяли из донорской крови по методу [6]. Использовали растворы фибриногена в 0,15 M NaCl концентрации 0,5-1,2 мг/мл.

Регистрировались спектры поглощения раствора фибриногена на ультрафиолетовом регистрирующем спектрофотометре "PYE UNICAM SP 8000" (Англия) в диапазоне 250-350 нм. Запись спектров проводилась через 2°C

при нагревании раствора белка от 4 до 52°C. По спектрам поглощения определялись мутность раствора, интенсивность поглощения и интенсивность максимумов первой производной спектров поглощения (1ПСП).

Измерение действительной (ϵ') и мнимой (ϵ'') частей комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon''$ растворов фибриногена проведено с помощью СВЧ-диэлектromетра резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц [7]. Измеряли величину сдвига резонансной частоты Δf и затухание $\text{tg}\delta$ при внесении исследуемого образца в резонатор. Погрешность определения величин Δf и $\text{tg}\delta$ составляла 0,5%. Температура образца измерялась термопарой медь-константан с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первых производных спектров поглощения раствора фибриногена регистрируются отрицательные максимумы 286-287 нм, 292-294 нм, менее интенсивные 284 нм, 298 нм и слабо разрешенные пики 281 нм, 288 нм. Положение максимумов при изменении температуры в пределах точности измерений не изменяется, но интенсивность их зависит от температуры образца. Пики 284 и 288 нм дополняют друг друга, синхронно появляясь и исчезая в 1ПСП. В частности при температурах 10-20°C становится лучше разрешен пик 288 нм, но плохо разрешен пик 284 нм, то же и в диапазоне температур 38-44°C. Обратная ситуация наблюдается при температурах 6-12°C и 24-36°C. Практически не изменяется с температурой положение максимумов 298 нм и 286-287 нм. Положение основного максимума 292-294 нм довольно стабильно до 20°C. При повышении температуры появляется и становится хорошо разрешен пик 295-296 нм.

При нагревании раствора фибриногена наблюдается уменьшение интенсивности максимума 292-294 нм первой производной спектра поглощения в области температур 16-22°C (рис.1.а) и мутности в интервале 16-18°C (рис.1.б). Интенсивность максимума 1ПСП 298 нм не изменяется во всем диапазоне температур от 4 до 50°C.

Интенсивности пиков 284 нм и 288 нм, по-видимому, меняются синхронно, но противоположно друг другу: при температурах 10-20°C интенсивность максимума 284 нм уменьшается, интенсивность максимума 288 нм растет, а при температуре выше 35°C увеличение интенсивности максимума 284 нм сопровождается уменьшением интенсивности максимума 288 нм (рис.2).

С ростом температуры интенсивность максимума 1ПСП 281 нм уменьшается в интервале 8-14°C и затем растет при температуре выше 35°C (рис.3). Максимум 1ПСП 281 нм, по-видимому, отражает состояние центров полимеризации [8], а изменение его интенсивности при температурах около 10 и 35°C говорит об изменении в структуре Д-домена белка.

Сопоставляя мутность и интенсивность 1ПСП, можно предположить, что при температурах 18-22°C происходят изменения размеров и расположения внутренних участков молекулы фибриногена, содержащих остатки триптофана, часть которых становится более доступной растворителю. Описанные изменения, по-видимому, связаны с изменением структуры Д-домена фибриногена, так как в Е-доме все триптофаны доступны растворителю [1]. Изменения на поверхности молекулы, по нашим данным, происходят при температурах около 10°C и выше 35°C.

При температурах 8-10°C и 20-22°C, а также в области температур выше 35°C зависимости действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей комплексной

диэлектрической проницаемости растворов фибриногена от температуры имеют особенности, выражающиеся в отклонении от монотонности изменения этих параметров при увеличении температуры. Таких отклонений не наблюдается для температурной зависимости диэлектрических параметров раствора 0,15 М NaCl (рис.4). Это свидетельствует об изменении состояния связанной и свободной воды в растворе фибриногена при данных температурах, которое обусловлено, по-видимому, изменением "плотности" упаковки участков молекулы при изменении конформации белка.

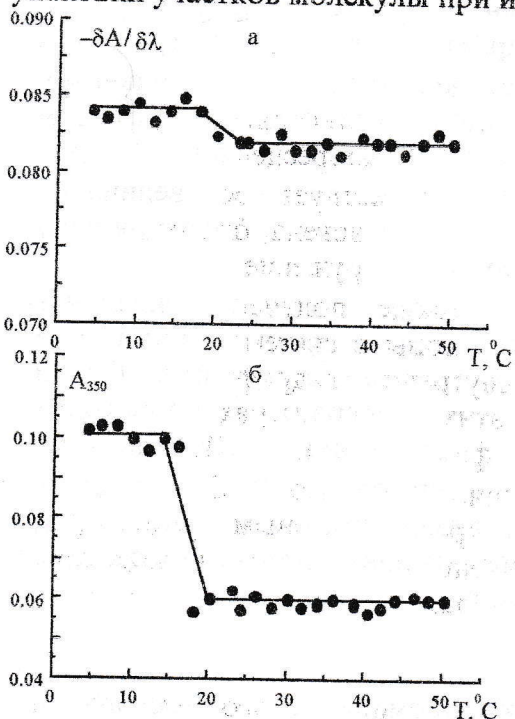


Рис. 1. Зависимость интенсивности максимума ПСП 292-294 нм (а), мутности (б) раствора фибриногена от температуры

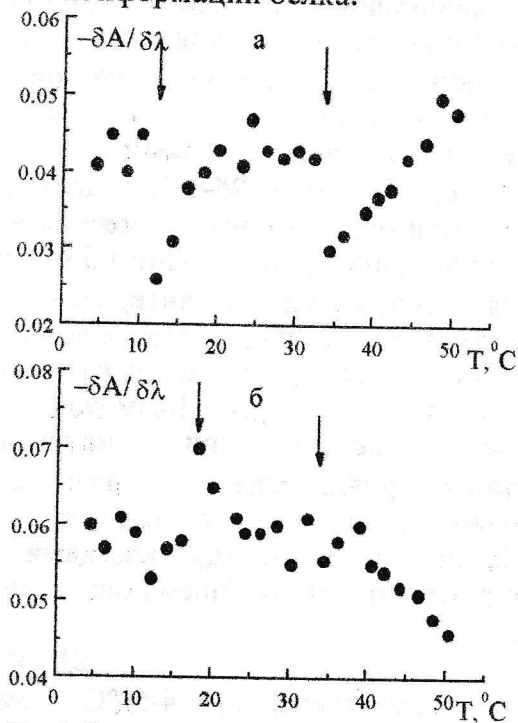


Рис. 2. Зависимость интенсивности максимумов ПСП 284 нм (а) и 288 нм (б) раствора фибриногена от температуры

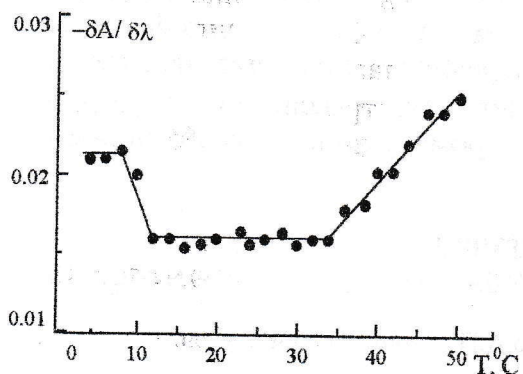


Рис. 3. Зависимость интенсивности максимума ПСП 281 нм раствора фибриногена от температуры

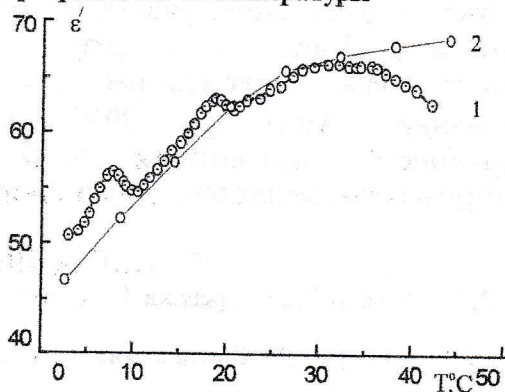


Рис. 4. Зависимость ϵ раствора фибриногена (1) и физраствора (2) от температуры

Полученные методом УФ-спектрофотометрии данные, свидетельствующие об изменении состояния группировок, расположенных преимущественно на поверхности молекулы фибриногена в диапазонах температур 8-12°C и выше 35°C, совпадают с результатами, полученными при помощи метода СВЧ-диэлектрметрии, указывающими на изменение состояния воды в растворе фибриногена при этих температурах. Известно, что структурные изменения при 10-16°C связывают с конформационным переходом II (11-16°C), для которого методом фотон-корреляционной спектроскопии зарегистрирована

компактизация D-домена, вызывающая разрыхление структуры белка [9]. При этом изменяется способность фибриногена тормозить самосборку фибрина [2]. По нашим данным, изменение интенсивности максимума 1ПСР 281 нм, относящегося к центрам полимеризации фибриногена, происходит при 8-14°C. При температурах 8-10°C отмечено изменение состояния свободной воды в системе белок-вода. По-видимому, наблюдаемые изменения отражают существование в фибриногене при физиологических условиях конформационного перехода II, зарегистрированного ранее при pH 6,5.

Наблюдаемые изменения спектральных характеристик и диэлектрических параметров раствора фибриногена при температуре выше 35°C носят плавный, не скачкообразный характер. Они, вероятно, связаны с описанным в [1] фактом предденатурационного повышения параметра флюоресценции A для фибриногена в зоне 25-38°C, которое свидетельствует об увеличении подвижности определенных сегментов молекулы фибриногена, благодаря чему часть триптофанилов переходит в более гидрофобное окружение.

Для температурного интервала 18-22°C также получено совпадение результатов, отражающих изменение состояния воды в системе белок-вода и изменения в молекуле белка, затрагивающие внутренние гидрофобные участки и геометрию молекулы. Возможно, при этих температурах происходит изменение конформации молекулы фибриногена. По-видимому, конформационный переход в молекуле фибриногена около 20°C приводит к изменению константы связывания его с тромбоцитарным рецептором, ослаблению связи между клетками и уменьшению степени агрегации тромбоцитов при дальнейшем повышении температуры.

ВЫВОДЫ

В области температур 4-50°C, помимо конформационного перехода II, происходящего при 8-12°C, в физиологических условиях обнаружен конформационный переход при 18-20°C. Этот переход связан с изменением расположения внутренних участков молекулы фибриногена, принадлежащих, по-видимому, D-домену. В результате перехода часть триптофанилов становится более доступной растворителю. Предполагается, что изменение конформации белка при 20°C определяет экстремальный характер температурной зависимости агрегации тромбоцитов, необходимым фактором которой является фибриноген.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зима В.Л., Медвиль Л.В., Варещка Т.В., Коваль В.Г. // ДАН УРСР, Сер. Б. 1979. N 5. С. 378-381.
2. Зима В.Л., Варещкая Т.В., Свистальская Л.А., Демченко А.П. // Укр. биохим. журн. 1978. Т. 50. N 4. С.459-464.
3. Позднякова Т.М., Белицер Н.В. // Усп. совр. биол. 1990. Т. 110, вып. 2. С. 267-283.
4. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы. Минск. Университетское, 1990. 104 с.
5. Trenchard P.M., Jeffery D.M. // Clin. Phys. Physiol. Meas. 1989. Vol. 10, N 1. P. 65-74.
6. Методы исследования фибринолитической системы крови. М. Изд. МГУ, 1981. 132 с.
7. Николов О.Т., Жилыкова Т.А. // Журн. физ. хим. 1991. Т.65. 5. С. 1312-1316.
8. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев. Наукова думка, 1981. 208 с.
9. Левчук Ю.М. Фотон-корреляційна спектроскопія рідких біологічних систем. Автореф. дис... док. ф.-м. наук. Харьков. ХГУ. 1995. 38 с.