

УДК 577.352.335+577.336

**ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛИЗА НЕОДНОРОДНОГО УШИРЕНИЯ
СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДСМ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
МОДЕЛЬНЫХ И ПРИРОДНЫХ МЕМБРАН**

Г.П.Горбенко*, О.А.Нардид, Т.С.Дюбко

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

E-mail: cryo@online.kharkov.ua or tdyubko@lincom.kharkov.ua

Поступила в редакцию 15 мая 1998 г

Разработана модификация метода анализа параметров неоднородного уширения спектров применительно к флуоресцентному зонду ДСМ. Изучены возможности использования разработанного подхода к изучению изменений структуры модельных и биологических мембран индуцированных белками, ионизирующей радиацией, низкими температурами. Показано, что анализ спектров флуоресценции ДСМ позволяет получать информацию о характере изменений полярности микроокружения зонда при разнообразных воздействиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биофизика, флуоресцентный зонд, анализ спектров, структура мембран, облучение, низкие температуры, белок-липидные взаимодействия

Среди физических методов исследования структуры и динамических свойств биологических мембран важная роль принадлежит методу флуоресцентных зондов [1,2]. Использование различных модификаций этого метода позволяет получить ценную информацию о таких характеристиках мембранных систем, как поверхностный заряд, полярность, микровязкость, толщина липидного бислоя, взаимное расположение белков и липидов и т.д. [1-3]. Высокая чувствительность спектральных параметров флуоресцентных зондов к физико-химическим свойствам их микроокружения создает предпосылки для выяснения факторов, лежащих в основе изменений структурной организации мембран при разнообразных воздействиях. Основной проблемой в такого рода исследованиях является установление корреляции между наблюдаемыми спектральными эффектами и характером изменений полярности и динамического состояния области локализации зонда в мембране. К настоящему времени предложено множество теорий влияния растворителей на спектры флуоресценции [3]. Большинство из них основано на рассмотрении взаимосвязи между сдвигом максимума флуоресценции и физическими параметрами среды

- диэлектрической постоянной и показателем преломления. Вместе с тем, влияние среды может проявляться не только в сдвиге максимума флуоресценции, но также в изменении квантового выхода и формы спектра. В этом аспекте представляет несомненный интерес предложенный в работах [4-6] подход, позволяющий описать форму и изменения интенсивности спектров на основе выделения в спектрах флуоресценции двух частей - однородной составляющей, зависящей от внутримолекулярных свойств зонда и распределения неоднородного уширения, параметры которого определяются физико-химическими характеристиками окружения молекул флуорофора. Применение этого подхода к анализу спектров флуоресценции 1,8-анилино-нафталин-сульфоната (АНС) и N-фенил-1-нафтиламина (ФНА) продемонстрировало его высокую чувствительность и информативность в исследовании структуры белков и биомембран [6]. Мы предприняли попытку расширить границы использования модели неоднородного уширения и оценить степень ее применимости для описания параметров флуоресценции других зондов. Был проведен анализ спектров флуоресценции ряда соединений: 4-(N-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний N-толуолсульфоната (ДСМ), его производных ДСП-6 и ДСП-12, 4-диметиламинохалкона (ДМХ) и 6-метоксибензантрона (МБА). Среди изученных зондов наибольшая чувствительность спектральных характеристик к изменению свойств микроокружения была выявлена для ДСМ. Оказалось, что анализ параметров неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ может быть использован при изучении механизмов структурных изменений мембран, вызванных взаимодействием с белками, облучением, воздействием низких температур. Результаты проведенных исследований обобщены в настоящей работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ДСМ ("Zonde", Латвия), фосфатидилхолин (ФХ), дифосфатидилглицерин (ДФГ) (Концерн "Биолек", Харьков). Липосомы формировали из смеси ФХ и ДФГ в соотношениях 9:1 или 4:1 путем инъекции этанольного раствора липидов в избыток 10 мМ трис-НСI буфера, рН 7.4 с последующим удалением этанола диализом. Мембраны эритроцитов выделяли из крови крыс или доноров по методу [7] и суспендировали в 5 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7.4. Концентрацию белка в препаратах мембран определяли по методу Лоури [8].

Исследуемые образцы облучали на линейном ускорителе электронов в дозе 1000 Гр. Концентрация белка в исследованных образцах составляла 0,1 мг/мл, а концентрация тиомочевины - 80 мМ. Быстрое замораживание образцов производили путем погружения в жидкий азот (-196 °С), отогрев - на водяной бане (40 °С). Анализ спектров флуоресценции ДСМ проводили непосредственно после замораживания и через 24 ч после радиационного воздействия.

Спектры флуоресценции ДСМ регистрировали на спектрофлуориметрах Signe-4M и Hitachi F-4010 при длине волны возбуждения 460 нм и ширине щелей возбуждения и испускания 5 нм.

ТЕОРИЯ МЕТОДА

В рамках модели формирования электронно-колебательных спектров многоатомных молекул, предложенной в работах [4-6], спектры флуоресценции ДСМ в различных растворителях описывали уравнением:

$$S(\nu, C, \nu^c, \sigma) = \int \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s)^2 + \Gamma^2(\nu_s)} \frac{\mu^2(\nu_s) C}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{\nu^c - \nu_s}{\sigma}\right)^2\right\} d\nu_s \quad (1)$$

где ν^c и σ - центр и дисперсия распределения неоднородного уширения спектра, ν_s - частота перехода системы, ν - частота излучаемого света, $\Gamma(\nu_s)$ - полуширина однородной лоренцевой линии перехода, $\mu^2(\nu^f)$ - вероятность распада возбужденного электронного состояния с излучением, C - нормировочный коэффициент. Параметры C , ν^c и σ определяли методом наименьших квадратов, минимизируя функцию:

$$F = \sum_{i=1}^N \{I(\nu_i) - S(\nu_i)\}^2 \quad (2)$$

где $I(\nu_i)$ - интенсивность нормированного экспериментального спектра, N - число экспериментальных точек. По аналогии с [6], зависимости Γ и μ^2 от частоты представляли в виде:

$$\Gamma(\nu_s) = a_0 + a_1\nu_s + a_2\nu_s^2 \quad (3)$$

$$\lg\{\mu^2(\nu_s)\} = b_0 + b_1\nu_s + b_2\nu_s^2 \quad (4)$$

Коэффициенты a_0, a_1, a_2 и b_0, b_1, b_2 подбирали так, чтобы в минимуме функции F выполнялось соотношение:

$$f = \sqrt{F/N} \frac{1}{I_{\max}} \leq \delta \quad (5)$$

где δ - погрешность измерения, не превышающая в наших экспериментах 3%. Функции Γ и μ^2 были найдены при описании спектров флуоресценции ДСМ в воде, ацетоне и смесях воды с этанолом и глицерином уравнением (1). Общее число модельных спектров составляло 11, а количество используемых в расчетах экспериментальных точек для каждого спектра равнялось 160. Значения коэффициентов составили

$$a_0 = 5.184 \cdot 10^3, a_1 = -0.526, a_2 = 1.375 \cdot 10^{-5}, \\ b_0 = -11.383, b_1 = 1.081 \cdot 10^{-3}, b_2 = -2.827 \cdot 10^{-8}.$$

Решение данной оптимизационной задачи не является единственным, но оно достаточно устойчиво, что достигалось использованием избыточной информации - на-

бора спектров, число точек в которых намного превышало число параметров. Значения коэффициентов $a_0, a_1, a_2, b_0, b_1, b_2$ и C , найденные для модельных спектров, использовались в дальнейшем при описании спектров флуоресценции ДСМ в суспензии липосом или мембран эритроцитов уравнением:

$$S(\nu, \{C_i, \nu_i^c, \sigma_i\}_n) = \sum_{i=1}^n \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s)^2 + \Gamma^2(\nu_s)} \frac{\mu^2(\nu_s) K_i C}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left\{ \frac{\nu_i^c - \nu_s}{\sigma_i} \right\}^2\right) d\nu_s \quad (6)$$

где n - число спектральных компонент, соответствующих различным формам зонда, ν_i^c и σ_i - параметры неоднородного уширения i -й компоненты, K_i - вклад i -й формы зонда в суммарный спектр. Первоначально полагали, что $n = 1$, и в минимуме функции F по уравнению (5) рассчитывали параметр f . Если при $n = 1$ величина f превышала погрешность измерения, значение n последовательно увеличивали до тех пор, пока не выполнялось условие $f \leq 0.03$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно имеющимся в литературе и полученным в настоящей работе данным, участки связывания ДСМ с модельными и природными мембранами гетерогенны, что приводит к наличию нескольких компонент в спектрах флуоресценции зонда [2]. Обнаружено, что спектр флуоресценции ДСМ в суспензии липосом может быть описан суммой двух компонент (Рис. 1), соответствующих различающимся по физико-химическим свойствам центрам связывания зонда. Как показал анализ спектров флуоресценции ДСМ в различных растворителях, уменьшение полярности среды сопровождается возрастанием параметров неоднородного уширения ν^c и σ , а изменение вязкости не оказывает существенного влияния на эти величины. В таблице 1 представлены значения ν^c и σ для длинноволновой (ν_1^c и σ) и коротковолновой (ν_2^c и σ) спектральных компонент. Незначительные различия между ν_1^c и значением ν^c для спектров флуоресценции ДСМ в буфере позволяют предположить, что первая спектральная компонента соответствует поверхностной локализации зонда. Поскольку молекула ДСМ имеет единичный положительный заряд, весьма вероятно, что в состав центров связывания первого типа входят отрицательно заряженные полярные головкиДФГ. Существование участков связывания второго типа, характеризующихся меньшей полярностью, по-видимому, обусловлено проникновением анилинового кольца ДСМ в область глицериновых остатков.

Как следует из приведенных в табл. 1 данных, физико-химические свойства липосомальных центров сорбции ДСМ претерпевают изменения при модификации структуры липидного бислоя в результате облучения (см. рис. 1) или образования белок-липидных комплексов. Радиационное воздействие приводило к повышению полярности центров первого типа, снижению полярности центров второго типа и возрастанию вклада участков связывания второго типа в суммарный спектр. Наблюдаемые эффекты, по-видимому, являются следствием нарушения структуры липосомальных мембран, сопровождающегося изменением числа и природы контактов зонда с молекулами фосфолипидов и воды, а также перераспределением ДСМ между

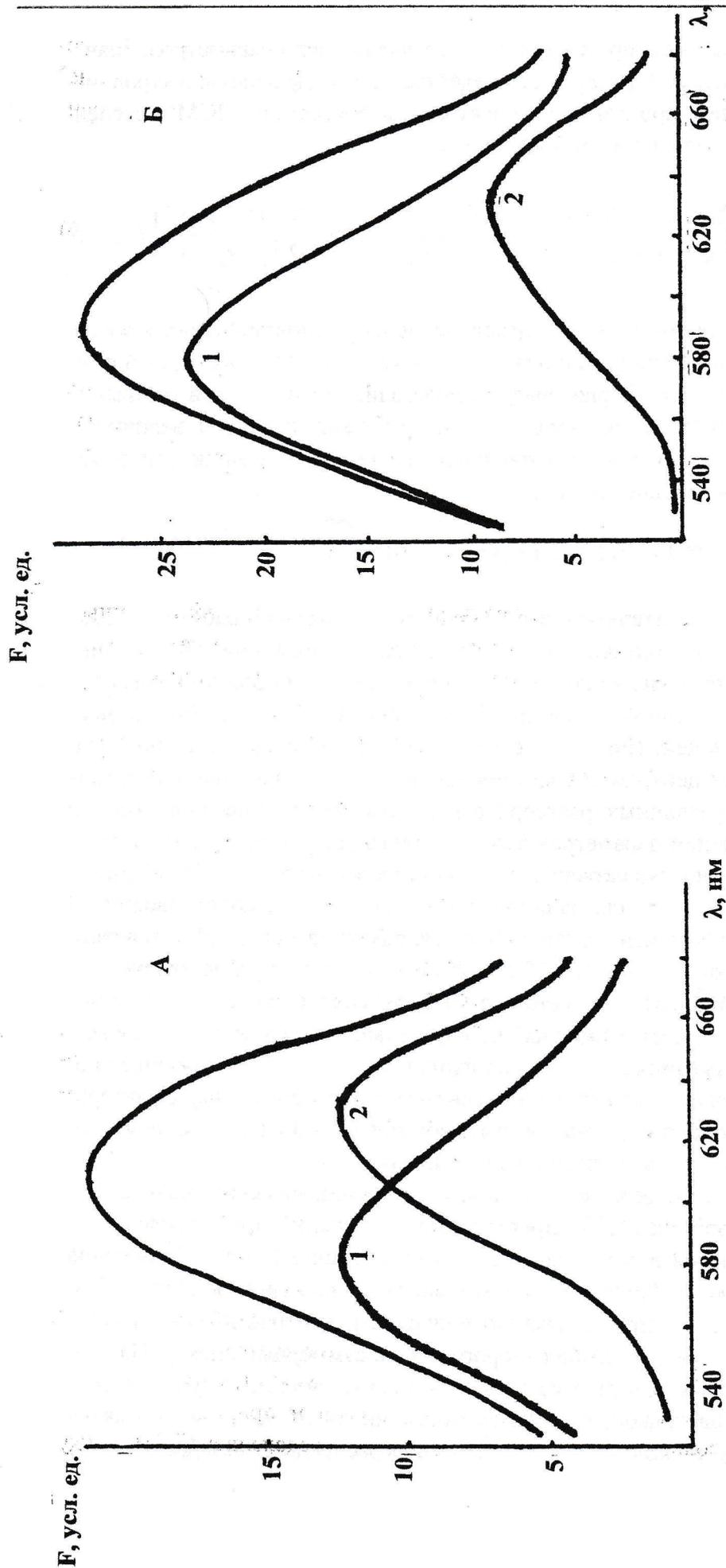


Рис. 1. Спектры флуоресценции ДСМ в суспензии липосом, состоящих из ФХ и ДФГ (9:1). 1 и 2 - спектральные составляющие, рассчитанные по уравнениям (3)-(6). Концентрация зонда - 4 мкМ. Концентрация липида - 0.3 мМ.
 А - нативные липосомы; Б - липосомы, облученные в дозе 1000 Гр. Время пострадиационной инкубации - 24 ч.

Таблица 1

Параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ

Параметры неоднородного уширения компонент спектра	10 mM трис-НСI буфер, рН 7.4	ФХ:ДФГ (9:1)				ФХ:ДФГ (4:1)			
		контроль	Облучение в дозе 1000 Гр	Контроль + тиомо- чевина	1000 Гр + тиомо- чевина	+ рибонуклеаза, соотношение белок:липид		+ лизоцим, соотношение белок:липид	
						7.3 10 ⁻³	1.8 10 ⁻³	16095	16116
ν_1^f, cm^{-1}	15250	15450	15320	15460	15460	16095	16116	16062	16264
σ_1, cm^{-1}	910	895	1070	920	870	1120	1140	1080	1008
K_1	-	0.53	0.36	0.55	0.58	0.65	0.63	0.63	0.42
ν_2^f, cm^{-1}	-	16380	16380	16240	16240	16730	16794	16714	16786
σ_2, cm^{-1}	-	1410	1400	1480	1480	1780	1818	1794	1905

Примечание: максимальная погрешность составляла 36 для ν_1^f и ν_2^f , 44 для σ_1 и σ_2 и 0.04 для K_1 .

различными центрами связывания. Ингибирующее влияние антиоксиданта - тиомочевины (см. табл. 1) свидетельствует об участии процессов перекисного окисления липидов в формировании наблюдаемых радиационных эффектов. Параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ оказались чувствительными также к структурным изменениям модельных мембран при белок-липидных взаимодействиях. Образование комплексов рибонуклеазы и лизоцима с липосомами сопровождалось уменьшением полярности центров связывания зонда (см. табл.1). В основе этого эффекта могут лежать различные факторы. Проникновение белков во внутреннюю область липосомальных мембран может сопровождаться возникновением структурных дефектов, способствующих более глубокому погружению молекул зонда в бислой. С другой стороны, не исключено, что образование электростатических контактов между заряженными группами белков и фосфолипидов приводит к повышению плотности упаковки липидных молекул и вытеснению воды из полярной области липидного бислоя, в которой локализуются молекулы ДСМ.

Анализ спектров флуоресценции ДСМ в суспензии теней эритроцитов крыс позволил выделить три типа участков связывания зонда, характеризующиеся различными значениями ν^c и σ (Рис. 2). Как показывает сопоставление данных, представленных в Табл. 1 и 2, индуцируемые радиацией изменения параметров неоднородного уширения ДСМ, связанного с эритроцитарными и липосомальными мембранами, сходны по характеру. Это позволяет предположить, что зонд локализуется, главным образом, в липидной фазе теней эритроцитов и реагирует на лучевое повреждение липидного компонента мембран. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения служит подавление спектральных эффектов в присутствии ингибитора перекисного окисления липидов (см. табл. 2).

В нативных мембранах эритроцитов донора, также как и в случае теней эритроцитов крыс, удалось выявить три типа участков связывания ДСМ, различающихся по характеристикам ближайшего микроокружения зонда и отвечающих за его различную локализацию в мембране (Табл. 3).

После криовоздействия наблюдалось как увеличение количества связанного с мембранами ДСМ, так и его перераспределение между различными типами участков связывания. Обнаружены также более гидрофобные по типу участки связывания, которые характеризуются наибольшей величиной параметра ν^c . Сопоставляя полученные результаты с данными литературы [9], можно прийти к заключению, что в основе низкотемпературного нарушения структуры эритроцитарных мембран лежит сложный комплекс взаимосвязанных процессов, затрагивающих как белковую, так и липидную фазы. Обнаруженные после замораживания изменения характеристик центров сорбции ДСМ на эритроцитарных мембранах, по-видимому, отражают эти процессы. Увеличение гидрофобности микроокружения зонда и усиление его связывания с мембранами может, в частности, быть результатом большего встраивания зонда в мембрану вследствие увеличения при вызванной замораживанием агрегации внутримембранных частиц доли свободного липида, ранее контактировавшего с белками. В то же время, учитывая, что ДСМ имеет примерно одинаковое сродство к глицериновым остаткам и к поверхности липидного бислоя [2], мы не исключаем возможности появления дополнительных центров сорбции зонда в области белок-

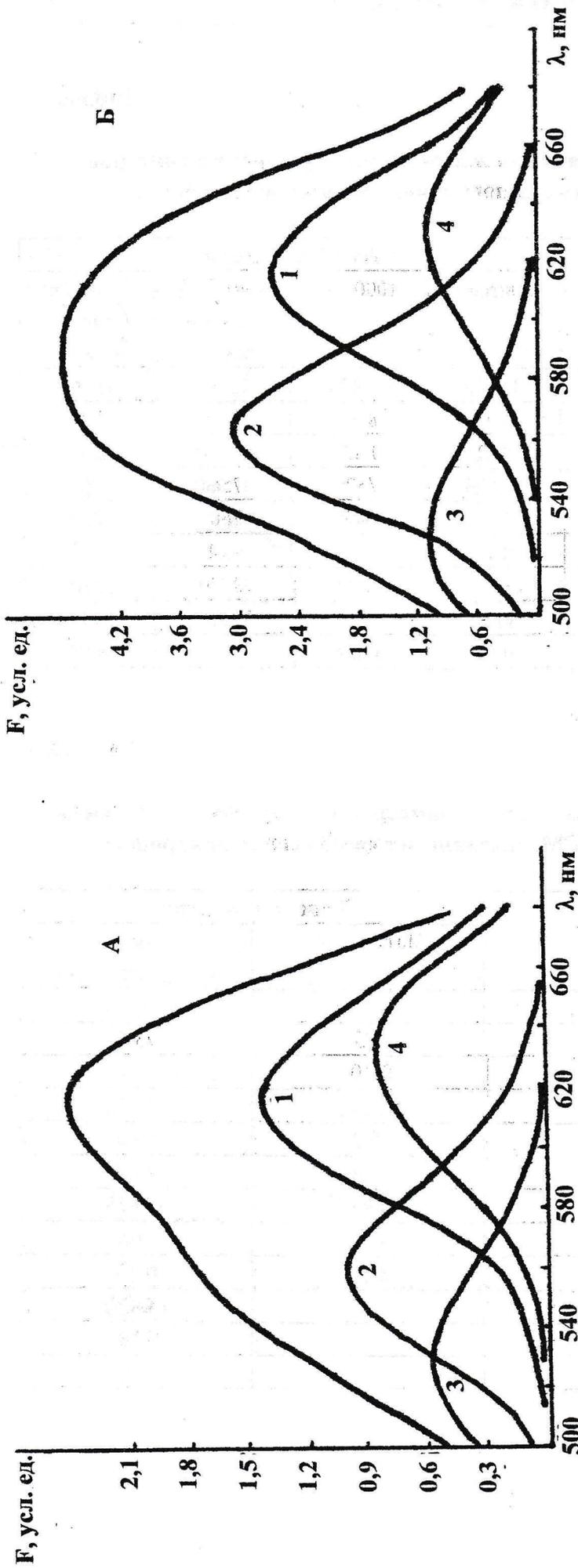


Рис. 2. Спектры флуоресценции ДСМ в суспензии эритроцитарных мембран. 1 - 4 - спектральные составляющие, рассчитанные по уравнениям (3)-(6) для связанного (спектры 1 - 3) и свободного (спектр 4) зонда. Концентрация ДСМ - 8 мкМ, концентрация белка - 0,2 мг/мл.

А - нативные мембраны, Б - мембраны, облученные в дозе 1000 Гр. Время пострадиационной инкубации - 24 часа.

Таблица 2

Влияние облучения на параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ, связанного с мембранами эритроцитов

Параметры неоднородного уширения компонент спектра	Тени эритроцитов			
	Контроль	1000 Гр	Контроль + тиомочевина	1000 Гр + тиомочевина
$\nu_1^c, \text{см}^{-1}$	15760	15820	15760	15760
$\sigma_1, \text{см}^{-1}$	800	800	800	760
K_1	0.42	0.42	0.45	0.47
$\nu_2^c, \text{см}^{-1}$	17620	17520	17560	17520
$\sigma_2, \text{см}^{-1}$	880	840	860	700
K_2	0.14	0.23	0.14	0.15
$\nu_{31}^c, \text{см}^{-1}$	18720	18700	18700	18700
$\sigma_3, \text{см}^{-1}$	1150	1260	11800	1180
K_3	0.08	0.09	0.07	0.08

Таблица 3

Влияние быстрого замораживания на параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ, связанного с мембранами эритроцитов

Параметры неоднородного уширения компонент спектра	Тени эритроцитов	
	Нативные	После замораживания
$\nu_1^c, \text{см}^{-1}$	16130	16130
$\sigma_1, \text{см}^{-1}$	935	935
K_1	0.40	0.44
$\nu_2^c, \text{см}^{-1}$	17240	17240
$\sigma_2, \text{см}^{-1}$	990	990
K_2	0.06	0.04
$\nu_{31}^c, \text{см}^{-1}$	17975	17975
$\sigma_3, \text{см}^{-1}$	968	968
K_3	0.13	0.12
$\nu_4^c, \text{см}^{-1}$		18820
$\sigma_4, \text{см}^{-1}$		970
K_4		0.07

липидных контактов в результате происшедших конформационных изменений мембранных белков.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ характеризуются высокой чувствительностью к различающимся по своей природе структурным изменениям модельных и природных мембран. Проведенные исследования продемонстрировали применимость используемого подхода при исследовании модификации структурного состояния липидного бислоя под влиянием радиации и низких температур, образовании белок-липидных комплексов. Анализ спектров флуоресценции ДСМ позволяет сделать вывод о характере изменений полярности микроокружения зонда при разнообразных воздействиях. Дальнейшее развитие модели неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ может заключаться в поиске параметра, коррелирующего с вязкостью области локализации зонда в мембране.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.- М.: Наука, 1980.- 320 с.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов.- М.: Наука, 1983.- 151 с. В
3. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.- М: Мир, 1986, 496 с.
4. Бойцов В.М., Орлов С.Н. // Биофизика. 1982, Т. 27, N 6, С. 1049-1052.
5. Бойцов В.М., Южаков В.И.// Докл. АН СССР. 1985, Т. 281, N 2, С. 358-361.
6. Бойцов В.М. Биол. мембраны.- 1987, Т. 4, N 7, С. 677-695.
7. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. // Arch. Biochem. and Biophys. 1963, V. 100, P.119-130.
8. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem. 1951, V. 193, N 1, P. 265-275.
9. Репин Н.В. Электронно-микроскопическое изучение характера кристаллизации при замораживании водных растворов криопротекторов и некоторых клеток: Дис. ... канд. биол. наук.- Харьков, 1984.- 197 с.