

УДК 577.352.335

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФИБРИНОГЕНА С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ ЗОНДОМ ДСМ

В.А. Гаврик, Э.А. Ромоданова, Т.С. Дюбко*, С.В. Гаташ

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, Харьков, пл.Свободы, 4, Украина
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Харьков, ул. Переяславская, 23,
Украина; e-mail: cryo@online.kharkov.ua, tdyubko@lincom.kharkov.ua

Поступила в редакцию 15 февраля 1999 г.

Методом флуоресцентной спектроскопии исследовано взаимодействие фибриногена с флуоресцентным зондом ДСМ после замораживания растворов белка до -8 и -196°C с различной скоростью. На молекуле фибриногена обнаружено два типа центров связывания зонда, различающихся величинами параметров спектров флуоресценции. Показано, что при медленном замораживании происходят большие конформационные нарушения молекулы фибриногена, чем при быстром.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибриноген, конформация, флуоресцентная спектроскопия, зонд, связывание, замораживание, скорость охлаждения

Ранее было показано [1], что режим замораживания растворов фибриногена приводит к изменению спектральных свойств собственных хромофоров белка и взаимодействующего с ним флуоресцентного зонда - 4-диметиламинохалкона (ДМХ). В настоящей работе исследовано влияние режимов охлаждения растворов фибриногена на взаимодействие белка с флуоресцентным зондом 4-(N-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний N-толуолсульфонатом (ДСМ) [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на растворах фибриногена в бидистиллированной воде, концентрация которого составляла 2 мг/мл. Степень очистки белка (94%) контролировалась по осаждению фибриногена тромбином. В опытах использовали препараты белков Харьковской областной станции переливания крови. Замораживание образцов производили по двум режимам: до -196°C со скоростью $\sim 200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (V_1) при быстром погружении пробирки с образцом в жидкий азот и до -8°C со скоростью $\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (V_2) в морозильной камере. Оттаивание образцов проводили на водяной бане (40°C) со встряхиванием.

В эксперименте использовали зонд ДСМ производства кооператива «Zonde» (Латвия). Спектры флуоресценции ДСМ регистрировали при термостатировании образцов при 22°C на спектрофлуориметре «Hitachi F-4010» (Япония) с автоматической коррекцией спектров. Точность поддержания температуры составляла $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Возбуждение флуоресценции проводили на длине волны 460 нм. Ширины входной и выходной щелей составляли 5 нм. Анализ спектров флуоресценции ДСМ в образцах проводили на ЭВМ, с помощью специально разработанной программы, после предварительного вычитания фона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие молекулы флуоресцентного зонда со сложной макроструктурой белка может характеризоваться кинетикой изменения спектральных характеристик зонда [1]. На рис.1 приведены зависимости изменения интенсивности (I_{max}) спектров флуоресценции зонда в растворах фибриногена от времени. Интенсивность спектра флуоресценции раствора ДСМ, используемой в эксперименте концентрации, в бидистиллированной воде составляла 7,759 отн. ед. Присутствие белка в растворе вначале, после добавления, резко увеличивает интенсивность флуоресценции зонда и это изменение интенсивности зависит от режимов замораживания. Далее, в течение часа, интенсивность I_{max} монотонно уменьшается в растворах как нативного, так и охлажденного со скоростью V_1 белка. В то же время, для белка, охлажденного со скоростью V_2 после 40-минутной инкубации наблюдается незначительное увеличение I_{max} , но для всех образцов после 60 минут инкубации устанавливается стационарное значение I_{max} , примерно на 10% меньше первоначальной величины.

Более сложную зависимость от времени инкубации и скорости охлаждения имеет изменение длины волны максимума (λ_{max}) спектра флуоресценции ДСМ. Для раствора ДСМ в дистиллированной воде $\lambda_{\text{max}} = 616$ нм. При связывании с белком наблюдается смещение λ_{max} в коротковолновую область. Наиболее яркий «синий» сдвиг наблюдается при взаимодействии ДСМ с нативным белком. Кривая зависимости λ_{max} от времени имеет небольшой подъем при 50-60 минутах инкубации и выходит на постоянное

значение после 90 минут инкубации (~ 591 нм). Для образца, охлажденного со скоростью V_2 , наблюдается плавное незначительное уменьшение λ_{\max} (в пределах 2 нм) в течение 30 мин. Более сложный характер имеет зависимость λ_{\max} от времени инкубации при охлаждении раствора фибриногена со скоростью V_1 . Именно для этого случая сложному виду зависимости $\lambda_{\max} = f(t)$ соответствует и более сложная зависимость $I_{\max} = f(t)$. В таблице 1 приведены величины параметров спектров флуоресценции ДСМ при достижении ими постоянных значений.

Таблица 1. Влияние режимов замораживания фибриногена на спектральные свойства ДСМ

Образец	λ_{\max} , nm	I_{\max} , nm
Бидистиллированная вода	616,0	7,759
Раствор нативного фибриногена (контроль)	586 (591)	147 (130)
Раствор фибриногена, охлажденный со скоростью V_1	586 (590)	133 (135)
Раствор фибриногена, охлажденный со скоростью V_2	586 (587)	194 (185)

Спектры флуоресценции ДСМ анализировали, используя модель формирования электронно-колебательных спектров многоатомных молекул, по формуле [3]:

$$S_{\Sigma}(v, \{C_i, v_i^c, \sigma_i\}_N) = \sum_{i=1}^N \int \frac{1}{\pi} \cdot \frac{\Gamma(v_s)}{(v - v_s)^2 + \Gamma^2(v_s)} \mu^2(v_s) \frac{C_i}{\sqrt{2\pi\sigma_i}} \exp\left[-\frac{1}{2} \left(\frac{v_i^c - v_s}{\sigma_i}\right)^2\right] dv_s, \quad (1)$$

где v и v_s – частоты излучаемого света и перехода системы, v_i^c и σ_i – центр и дисперсия распределения неоднородного уширения i -й компоненты спектра, C_i – нормировочные коэффициенты, N – число различающихся по физико-химическим характеристикам центров сорбции зонда в молекуле белка, $\Gamma(v_s)$ – полуширина лоренцовой линии перехода, $\mu^2(v_s)$ – вероятность распада возбужденного электронного состояния

Анализ параметров неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ в растворах фибриногена позволил выделить кроме водной составляющей ДСМ еще три спектральные компоненты, соответствующие различной локализации зонда на белковой молекуле. Результаты анализа спектров представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние режимов замораживания на параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ в растворах фибриногена

Параметры неоднородного уширения спектров	Образцы (растворы)			
	Дистиллированная вода	Нативный фибриноген (контроль)	Фибриноген, охлажденный со скоростью V_1	Фибриноген, охлажденный со скоростью V_2
$v_1^c, \text{см}^{-1}$	15710	16820	16820	16820
$\sigma_1, \text{см}^{-1}$	890	880	875	945
k_1	0.54	0.30	0.30	0.27
$v_2^c, \text{см}^{-1}$		17300	17300	17300
$\sigma_2, \text{см}^{-1}$		880	880	890
k_2		0.08	0.08	0.18
$v_3^c, \text{см}^{-1}$		18550	18550	18550
$\sigma_3, \text{см}^{-1}$		860	860	860
k_3		0.08	0.09	0.01

Из таблицы 2 видно, что из всех центров неоднородного уширения компонент, v_1^c наиболее близок к значению, характерному для спектра флуоресценции ДСМ в дистиллированной воде. Принимая это во внимание, а также учитывая данные [2], можно предположить, что центры сорбции ДСМ этого типа (I) расположены на поверхности белковой молекулы. Поскольку молекула ДСМ имеет единичный положительный заряд, вероятно, что центры связывания типа I включают отрицательно заряженные полярные группы боковых радикалов аминокислот. Положение полосы и дисперсия всех трех исследованных видов растворов фибриногена имеют одинаковое значение, а вклад первой составляющей (k_1) в суммарный спектр уменьшается почти в восемь раз для образцов, охлажденных со скоростью V_2 .

Влияние режимов замораживания на взаимодействие...

При этом вклад составляющей k_2 (центры типа II) в случае медленного охлаждения увеличивается более, чем в 2 раза. Что касается третьей компоненты, то большие изменения наблюдаются для дисперсии (σ_3), характеризующей сольватное окружение этих центров связывания (типа III). Для растворов, охлажденных со скоростью V_2 , этот параметр увеличивается на 7,3 %, а вклад третьей компоненты в общий спектр снижается.

Анализ спектров флуоресценции ДСМ в растворах фибриногена позволил разделить вклад зонда в свободном и связанном с белковой молекулой состояниях в величину параметров неоднородного уширения спектров и идентифицировать два типа центров сорбции на молекуле фибриногена ($\nu_2^0 = 16980 \text{ см}^{-1}$, $\sigma_2 = 945 \text{ см}^{-1}$ и $\nu_3^0 = 18550 \text{ см}^{-1}$, $\sigma_3 = 800 \text{ см}^{-1}$).

Режимы замораживания оказывают влияние на характеристики центров сорбции зонда на белковой молекуле. При быстром замораживании до температуры жидкого азота возрастает количество зонда, сорбированного на поверхностных участках молекулы. При этом возрастают величины ν_1^0 (полярность) и σ_1 (подвижность). При медленном режиме замораживания уменьшается количество зонда, сорбированного в наиболее неполярных центрах сорбции ($\nu_3^0 = 118550 \text{ см}^{-1}$) и, в то же время, существенное количество зонда остается в достаточно гидрофобном окружении ($\nu_2^0 = 16980 \text{ см}^{-1}$). Можно предположить, что в результате медленного замораживания становятся менее доступны гидрофобные участки связывания зонда. В целом, сравнение этих двух режимов замораживания показывает, что при медленном замораживании имеют место большие конформационные изменения молекулы фибриногена, чем при быстром.

ВЫВОДЫ

Флуоресцентный зонд ДСМ является чувствительным индикатором изменения структуры фибриногена. При связывании с молекулой белка спектр флуоресценции зонда испытывает коротковолновый сдвиг на 30 нм и почти 20-кратное увеличение интенсивности. Взаимодействие ДСМ с молекулой фибриногена зависит от времени инкубации в растворе белка; параметры спектров достигают стационарных значений только через 70-90 минут инкубации. Зависимости параметров спектров ДСМ от времени инкубации различны для разных режимов замораживания растворов белка.

Анализ параметров спектров флуоресценции ДСМ позволил выявить три спектральные компоненты зонда, соответствующие трем центрам сорбции зонда с различной локализацией на молекуле фибриногена. Режимы замораживания растворов оказывают влияние на свойства центров связывания зонда. При более медленной скорости охлаждения раствора фибриногена большая относительная доля молекул зонда связывается гидрофобными центрами сорбции по сравнению с гидрофильными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.К., Ромоданова Э.А., Дюбко Т.С., Гаташ С.В., Гаврик В.А.// Проблемы криобиологии. 1998. № 3. С. 18-21.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. - М.: Наука, 1989. - 277 с.
3. Бойцов В.М., Орлов С.Н.// Биофизика. 1982. Т.27, №6. С.1049-1052.
4. Бойцов В.М., Южаков В.И.// ДАН СССР. 1985. Т.281, №2. С.358-361.
5. Бойцов В.М.// Биологические мембраны. 1987. Т.4, №7. С.677-695.
6. Горбенко Г.П., Нардид О.А., Дюбко Т.С.// Вісн. Харк. Ун-ту. 1998. №410. Біофізичний вісн. Вип. 1. С. 86-95.