

БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Поляризованная флуоресценция в исследовании вращательной диффузии альбумина человека при денатурации под действием ДСНИ. М. Власова^a, А. М. Салецкий^b*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.**E-mail: ^avlasovairina1979@mail.ru, ^bsam@phys.msu.ru*

Статья поступила 14.07.2010, подписана в печать 08.11.2010

По анализу поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека (САЧ) определены параметры вращательной диффузии (время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна) молекул САЧ при денатурации под действием додецилсульфата натрия (ДСН). Показан двухстадийный характер денатурации САЧ под действием ДСН: первая стадия — разрыхление глобул, вторая стадия — разворачивание аминокислотной цепи белка. При рН, меньших рI САЧ, денатурация САЧ под действием ДСН проходит через две стадии, тогда как при рН, больших рI, денатурация проходит только первую стадию.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, триптофановая флуоресценция, поляризация, вращательная диффузия, денатурация, ионные детергенты.

УДК: 535.372.3. PACS: 42.62.Be, 82.53.Kp.

Введение

Сывороточный альбумин (66.4 кДа) представляет собой глобулярный белок плазмы крови человека. Уникальная способность молекулы сывороточного альбумина человека (САЧ) связывать обширный круг органических и неорганических лигандов определяет одну из основных функций этого белка — транспорт физиологических метаболитов. Основой взаимодействий молекулы САЧ с лигандами является структурная подвижность этой белковой молекулы, обеспеченная уникальной петлевой укладкой полипептидной цепи белка из 585 аминокислотных остатков [1]. Вторичная структура САЧ состоит из α -спиральных участков и участков хаотической укладки. Около 50—67% аминокислотных остатков САЧ уложены в α -спирали при физиологическом значении рН. На сегодняшний день существует модель третичной структуры САЧ в виде «сердца», три домена белка в этой модели расположены под углом друг к другу [1].

Денатурацией называют существенное изменение вторичной и третичной структур белка, т. е. нарушение, разупорядочивание системы нековалентных взаимодействий, не затрагивающее его ковалентной структуры. Денатурация, как правило, сопровождается утратой белком функциональных свойств, что обуславливает интерес к изучению механизмов белковой денатурации. Эффективными денатурирующими агентами являются ионные детергенты.

Детергенты представляют собой органические амфифильные соединения, молекулы которых имеют гидрофильные и гидрофобные участки. По типу гидрофильных групп различают несколько групп детергентов — ионные и неионные. В зависимости от знака заряда поверхностно-активного иона ионные детергенты делят на анионные, катионные и амфотерные. Благодаря

высокой поверхностной активности и способности к растворению липидов, а также способности вызывать диссоциацию и денатурацию белков, инактивацию вирусов и токсинов именно анионные детергенты широко применяются для приготовления медицинских фармацевтических препаратов (например, бактерицидных и дезинфицирующих), а также дерматологических и косметических средств [2]. К широко используемым анионным детергентам относится додецилсульфат натрия (ДСН).

Ранее нами была изучена денатурация САЧ под действием ДСН различными спектроскопическими методами — методом КР-спектроскопии [3], методом флуоресцентного анализа по флуоресценции наномаркера эозина, добавленного в растворы белка [4–6], методом флуоресцентного анализа по стационарной неполяризованной флуоресценции триптофана белка [7, 8]. В настоящей работе представлены результаты исследований денатурации САЧ под действием ДСН методами флуоресцентного анализа по изучению поляризованной триптофановой флуоресценции белка.

Исследование триптофановой собственной флуоресценции белков широко применяется для оценки конформационного состояния белковых молекул [9–11]. Единственный аминокислотный остаток триптофана (Trp-214) в САЧ расположен в домене II. Флуоресцентные свойства триптофана в молекуле САЧ весьма чувствительны к перестройкам белковой глобулы.

Исследование денатурации САЧ под действием ДСН важно в связи с физиологическими функциями САЧ в крови, так как позволяет делать выводы об уровне сохранения нативной конформации белка и, следовательно, о сохранности его физиологических свойств в различных условиях. Представляет интерес по анализу поляризованной триптофановой флуоресценции

САЧ исследовать вращательную диффузию молекул САЧ в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях рН, что и является целью настоящей работы.

1. Материалы и методы

Растворы САЧ получены путем разведения белка до концентрации 5 мкМ в двух различных буферных системах: 0.1 М $\text{CH}_3\text{COOH-KOH}$ (рН 3.5–5.0) и 0.1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4-0.1$ М NaOH (рН 5.5–6.0). В растворы САЧ при различных значениях рН (3.5–6.0) добавлены различные концентрации ДСН (0.5–7.0 мМ). Для анализа вращательной диффузии молекул САЧ в итоговые растворы добавлены различные концентрации сахарозы (0–200 мМ).

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре «Perkin Elmer LS55», спектрально-флуоресцентные характеристики приготовленных образцов исследовались при комнатной температуре. Триптофановая флуоресценция САЧ регистрировалась в диапазоне 300–500 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{exc}} = 295$ нм. Степень поляризации P триптофановой флуоресценции САЧ рассчитывалась по значениям I_{\parallel} и I_{\perp} в максимуме спектра испускания флуоресценции белка, где I_{\parallel} и I_{\perp} — интенсивности флуоресценции, измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света. Спектры флуоресценции обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

2. Обсуждение результатов

В работе проведены исследования поляризованной триптофановой флуоресценции САЧ. Получены зависимости степени поляризации триптофановой флуоресценции САЧ (P) от концентрации ДСН для различных значений рН (рис. 1). Значения P рассчитывались по значениям I_{\parallel} и I_{\perp} в максимуме спектров испускания флуоресценции САЧ.

Как известно, изменения поляризации флуоресценции обуславливаются двумя причинами: во-первых, вращательной диффузией флуорофоров и, во-вторых, безызлучательным переносом энергии между флуорофорами. Благодаря подбору экспериментальных условий (исследованы сильно разбавленные растворы белка (5 мкМ) и использовано возбуждение флуоресценции триптофана на дальнем длинноволновом крае (295 нм)) вклад от второй причины — безызлучательного переноса энергии между флуорофорами — отсутствует.

Таким образом, при данных экспериментальных условиях на поляризацию флуоресценции триптофана САЧ оказывает влияние только вращательная диффузия флуорофора — триптофанового остатка молекулы САЧ. Эта поляризация флуоресценции триптофанового остатка молекулы САЧ в общем случае обусловлена как вращением целой молекулы белка (броуновское диффузионное движение) и вращением домена II САЧ, содержащего триптофановый остаток, так и вращением самого хромофора (триптофана) относительно своего ближайшего окружения. Проведенные в настоящей работе измерения поляризованной стационарной флуоресценции САЧ позволяют анализировать вращение целой

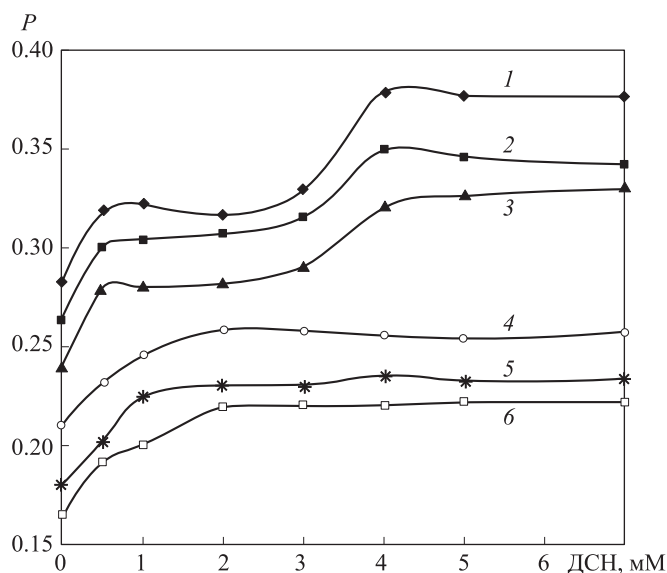


Рис. 1. Зависимость степени поляризации P триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{exc}} = 295$ нм) САЧ (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3.5 (1), 4.0 (2), 4.5 (3), 5.0 (4), 5.5 (5) и 6.0 (6)

молекулы белка, а вклад вращения домена, содержащего триптофан, и вращения триптофанового остатка относительно ближайшего окружения считается пренебрежимо малым.

Как видно из рис. 1, значения P возрастают в области до 1 мМ ДСН для всех значений рН, что указывает на первую стадию денатурации САЧ — разрыхление глобул.

Дальнейшее увеличение (больше 1 мМ) концентрации ДСН при рН, больших изоэлектрической точки САЧ рI (4.7), практически не меняет значений P (рис. 1), что указывает на то, что денатурация останавливается на первой стадии.

Иной характер зависимостей P от концентрации ДСН наблюдается (рис. 1) при рН, меньших рI САЧ: в области концентраций ДСН от 1 до 2 мМ значение P практически постоянно, в области концентраций ДСН от 2 до 4 мМ происходит дальнейшее увеличение P , что указывает на увеличение линейно-продольных размеров молекул САЧ при разворачивании аминокислотной цепи, следовательно, молекулы САЧ переходят во вторую стадию денатурации — стадию полного разворачивания. При увеличении концентрации ДСН свыше 4 мМ (до 7 мМ) значения P практически постоянны, что указывает на полную денатурацию молекул САЧ. Следовательно, по двухстадийному увеличению значений P при увеличении концентрации ДСН можно заключить, что при рН, меньших рI САЧ, денатурация САЧ в присутствии ДСН представляет собой ступенчато-двухстадийный процесс.

Метод поляризованной флуоресценции позволяет оценивать параметры вращательной диффузии флуорофоров. Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В. Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии. На основе этой теории было получено выражение для

степени поляризации P флуоресценции:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{kT\tau_0}{V\eta},$$

где T — абсолютная температура, η — вязкость раствора, V — объем, k — постоянная Больцмана, τ_0 — среднее время затухания флуоресценции флуорофора (для триптофана САЧ 2.8 нс), P_0 — предельная степень поляризации флуоресценции.

Таким образом, меняя вязкость растворов (добавлением различных концентраций сахарозы) и откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η , получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$.

Тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс

$$\operatorname{tg} \varphi = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{k\tau_0}{V}$$

при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного объема

$$V = \frac{(3 - P_0)k\tau_0}{3P_0 \operatorname{tg} \varphi}$$

и, следовательно, эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна a , связанный с молекулярным объемом соотношением

$$V = \frac{4\pi a^3}{3}.$$

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации (или разупорядочивания вследствие тепловой диффузии) ξ флуорофора по формуле

$$\xi = \frac{V\eta}{Tk},$$

где V — молекулярный объем.

Для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии D_{rot} :

$$D_{\text{rot}} = \frac{kT}{6\eta V}.$$

Путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна молекул САЧ в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях рН.

На рис. 2 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии D_{rot} молекул САЧ от концентрации ДСН при различных значениях рН. Видно, что более сильное уменьшение D_{rot} молекул САЧ в растворах с ДСН происходит при значениях рН, меньших рI САЧ, что указывает на глубокую и сильную денатурацию белка. Также видно, что резкое уменьшение D_{rot} молекул САЧ происходит при концентрациях ДСН, меньших 0.5 мМ, при всех значениях рН, что указывает на изменение геометрической конфигурации глобул САЧ — увеличение линейно-продольных размеров молекул САЧ при их разрыхлении вследствие прохождения первой стадии денатурации. Дальнейшее увеличение концентрации ДСН приводит к сравнительно небольшому одностадийному уменьшению D_{rot} молекул

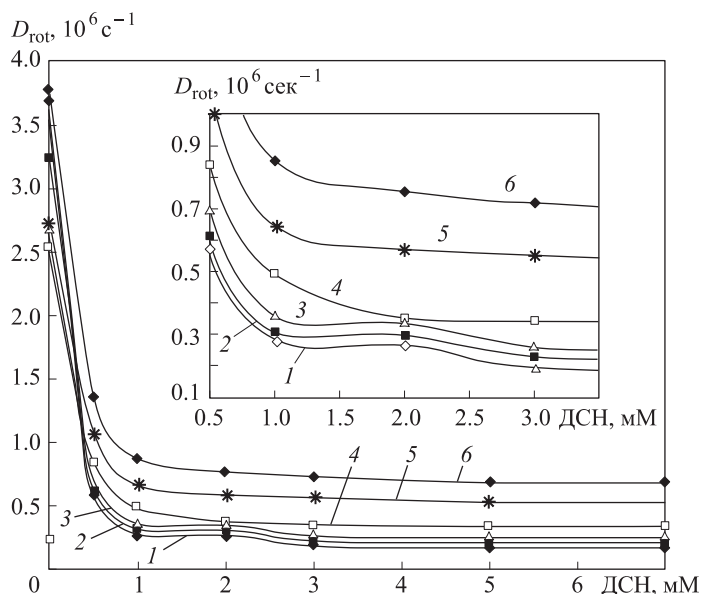


Рис. 2. Зависимость коэффициента вращательной диффузии D_{rot} молекул САЧ (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3.5 (1), 4.0 (2), 4.5 (3), 5.0 (4), 5.5 (5) и 6.0 (6)

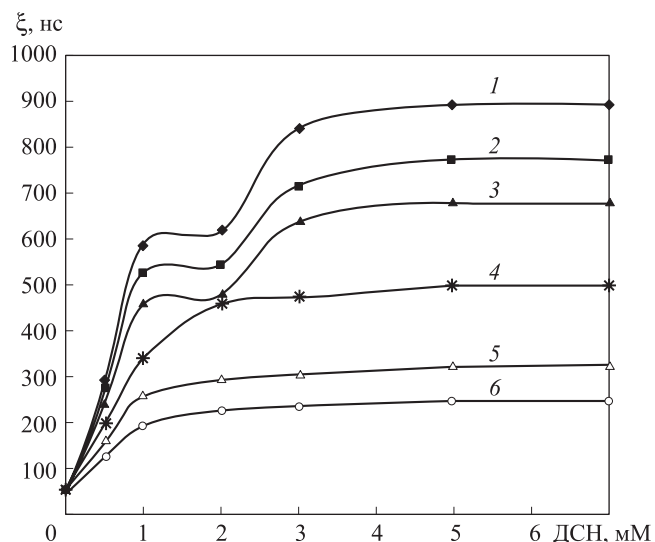


Рис. 3. Зависимость времени вращательной релаксации ξ молекул САЧ (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3.5 (1), 4.0 (2), 4.5 (3), 5.0 (4), 5.5 (5) и 6.0 (6)

САЧ при значениях рН, больших рI САЧ, и к большему двухстадийному уменьшению D_{rot} молекул САЧ при значениях рН, меньших рI САЧ.

На рис. 3 представлены зависимости времени вращательной релаксации ξ , отражающей время разупорядочивания вследствие тепловой диффузии, молекул САЧ от концентрации ДСН при различных значениях рН. Зарегистрировано, что при всех значениях рН в растворах с ДСН ξ молекул САЧ существенно больше времени жизни флуорофора — триптофанового остатка в САЧ (2.8 нс), что обуславливает высокую поляризацию флуоресценции растворов САЧ.

На рис. 4 представлены зависимости эффективного радиуса Эйнштейна a молекул САЧ от концентрации

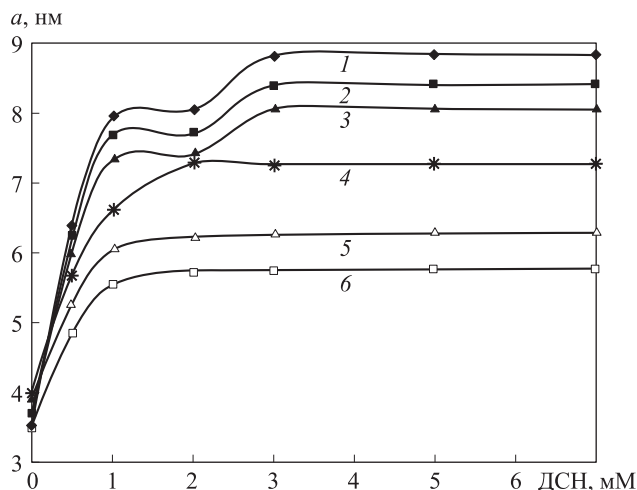


Рис. 4. Зависимость эффективного радиуса Эйнштейна a молекул САЧ (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях pH: 3.5 (1), 4.0 (2), 4.5 (3), 5.0 (4), 5.5 (5) и 6.0 (6)

ДСН при различных значениях pH. Радиус a молекул САЧ, определенный таким образом в сферическом приближении (по уравнению Стокса–Эйнштейна), отражает не реальный геометрический размер молекул САЧ, которые при прохождении денатурации под действием ДСН приобретают все более вытянутую, несферическую геометрическую форму, а показывает эффективный размер молекул САЧ, меняющийся под действием ДСН и удобный для оценки степени глубины денатурации белка под действием ДСН. Видно, что более сильное увеличение размеров молекул САЧ имеет место при значениях pH, меньших pI САЧ, что говорит о глубокой денатурации белка при этих значениях pH. При значениях pH, больших pI САЧ, увеличение a молекул САЧ происходит одностадийно с увеличением концентрации ДСН, но при значениях pH, меньших pI САЧ, увеличение a происходит двухстадийно.

При рассмотрении зависимостей P флуоресценции САЧ, D_{rot} , ξ и a молекул САЧ от концентрации ДСН видно, что денатурация САЧ под действием ДСН носит двухстадийный характер.

При значениях pH, меньших pI САЧ (4.7), при концентрациях ДСН до 1–2 мМ происходит первая стадия денатурации — разрыхление глобул САЧ, при концентрациях 3–4 мМ ДСН наступает вторая стадия — разворачивание аминокислотной цепи молекул САЧ, дальнейшее увеличение концентрации ДСН (больше 4 мМ) ничего не меняет в системе.

При значениях pH, больших pI САЧ (4.7), при концентрациях ДСН до 1–2 мМ происходит первая стадия денатурации — разрыхление глобул САЧ, дальнейшее увеличение концентрации ДСН не приводит к углублению денатурации.

Следовательно, более глубокая и сильная денатурация САЧ под действием ДСН имеет место при значениях pH, меньших pI САЧ, что объясняется электростатическими причинами. При значениях pH, меньших pI белка, в целом положительно заряжен-

ные молекулы САЧ легко связываются с додецилсульфат-анионами (ДСН в растворах диссоциирует на додецилсульфат-анионы и катионы натрия), что и объясняет более сильную и глубокую денатурацию при этих значениях pH. При значениях pH, больших pI белка, додецилсульфат-анионы слабо взаимодействуют с в целом отрицательно заряженными молекулами белка, хотя и сохраняющими на себе какие-то положительно заряженные участки, поэтому денатурация белка при этих значениях pH под действием ДСН происходит слабее.

Заключение

По анализу поляризованной триптофановой флуоресценции САЧ исследована вращательная диффузия молекул САЧ при денатурации под действием ДСН при различных значениях pH.

Определена степень поляризации флуоресценции САЧ, время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна молекул САЧ в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях pH.

По полученным параметрам вращательной диффузии молекул САЧ зарегистрирован двухстадийный характер денатурации САЧ под действием ДСН: первая стадия — разрыхление глобул, вторая стадия — разворачивание аминокислотной цепи белка. Показано, что более глубокая и сильная денатурация САЧ под действием ДСН имеет место при значениях pH, меньших изоэлектрической точки белка, что объясняется электростатическими причинами. При значениях pH, меньших pI белка, денатурация САЧ под действием ДСН проходит через две стадии, тогда как при значениях pH, больших pI белка, денатурация САЧ под действием ДСН проходит только первую стадию.

Список литературы

1. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. М., 1994.
2. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., 2002.
3. Vlasova I.M., Polyansky D.V., Saletsky A.M. // Laser Phys. Lett. 2007. **4**, N 12. P. 890.
4. Власова И.М., Землянский А.Ю., Салецкий А.М. // Журн. прикл. спектроскопии. 2006. **73**, № 5. С. 661.
5. Власова И.М., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2009. № 4. С. 52.
6. Власова И.М., Салецкий А.М. // Хим. физика. 2008. **27**, № 4. С. 66.
7. Власова И.М., Салецкий А.М. // Хим. физика. 2009. **28**, № 12. С. 66.
8. Власова И.М., Салецкий А.М. // Журн. прикл. спектроскопии. 2009. **76**, № 4. С. 564.
9. Dockal M., Carter D.C., Ruker F. // J. Biol. Chem. 2000. **275**. P. 3042.
10. Gelamo E.L., Silva C.H.T.P., Imasato H., Tabak M. // Biochem. Biophys. Acta. 2002. **1594**. P. 84.
11. Gelamo E.L., Tabak M. // Spectrochim. Acta A. 2000. **56**. P. 2255.

Polarized fluorescence in investigation of rotational diffusion of human albumin at denaturation under action of SDS**I. M. Vlasova^a, A. M. Saletsky^b***Department of General Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.**E-mail: ^a vlasovairina1979@mail.ru, ^b sam@phys.msu.ru.*

By analysis of polarized tryptophan fluorescence of human serum albumin (HSA) the parameters of rotational diffusion (time of rotational relaxation, coefficient of rotational diffusion and Einstein's effective radius) of HSA molecules at denaturation under action of sodium dodecyl sulfate (SDS) are determined. The two-stage character of denaturation of HSA under action of SDS was shown: first stage — loosening of protein globules, second stage — unfolding of amino-acidic chain of protein. At pH smaller than pI of HSA, the denaturation of HSA under action of SDS has two stage, whereas at pH larger than pI of HSA, the denaturation has one stage.

Keywords: human serum albumin, tryptophan fluorescence, polarization, rotational diffusion, denaturation, ionic detergents.

PACS: 42.62.Be, 82.53.Kp.

Received 14 July 2010.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 1(2011).

Сведения об авторах

1. Власова Ирина Михайловна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель; тел.: (495) 939-14-89, e-mail: vlasovairina1979@mail.ru.
2. Салеский Александр Михайлович — докт. физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой; тел.: (495) 939-14-89, e-mail: sam@phys.msu.ru.