

БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Образование дипольных нанокластеров в растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы европия и калия

Т. Н. Тихонова^{1,a}, Г. П. Петрова¹, [Ю. М. Петрусеvич], К. В. Федорова^{1,b}, В. В. Кашин²

¹*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра молекулярной физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.*

²*Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова РАН, лаборатория нанокомпозитных материалов. Россия, 125009, Москва, ул. Моховая, д. 11, корп. 7.*

E-mail: ^at.n.tikhonova@yandex.ru, ^bfedorova@physics.msu.ru

Статья поступила 25.10.2010, подписана в печать 27.11.2010

С помощью фотонно-корреляционной спектроскопии и атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследованы водные растворы основных белков сыворотки крови (альбумина и гамма-глобулина) при наличии в них малых концентраций ионов калия или европия. Получены значения коэффициентов трансляционной диффузии, а также эффективных радиусов рассеивающих частиц в растворах в зависимости от pH и концентрации соли. Обнаружено, что в указанных растворах образуются белковые дипольные нанокластеры, что подтверждается также методами АСМ.

Ключевые слова: сывороточный альбумин, гамма-глобулин, динамическое рассеяние света, фотонно-корреляционная спектроскопия, атомно-силовая микроскопия, коэффициент трансляционной диффузии, изоэлектрическая точка.

УДК: 577.32. PACS: 87.15.-v, 87.83.+a.

Введение

В течение последних лет процессы агрегации белка широко обсуждались из-за их важности во многих областях биотехнологических, фармацевтических и медицинских исследований. Несмотря на это, глобальное понимание явления и его основных механизмов все еще далеко до завершения. Агрегация белка характеризуется множественными взаимодействиями, в особенности конформационными изменениями и межмолекулярными взаимодействиями, которые сильно влияют друг на друга. Иерархия всех этих механизмов зависит от свойств среды и от некоторых физических и химических параметров, таких как температура, pH, ионная сила и др. [1].

В последние годы в работах, проводимых на физическом факультете, было обнаружено новое физическое явление — образование дипольных кластеров в растворах различных белков, содержащих ионы тяжелых металлов [2–4].

Образование белковыхnanoструктур было изучено нами в растворах альбумина и гамма-глобулина, содержащих ионы калия и европия, с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии и атомно-силовой микроскопии.

1. Физическая модель

Ранее в нашей лаборатории было выявлено, что на процесс кластерообразования влияет величина ионного радиуса металла [2–4]. Взаимодействие иона с поверхностью белка происходит, как правило, с участием их гидратных оболочек. В случаях, когда в растворах белков имеются малые ионы типа Na^+ (величина ионного радиуса равна 0.87 Å), образование дипольных класте-

ров не наблюдается, поскольку ион натрия находится у поверхности белка в окружении молекул воды и не может соединиться непосредственно с противоположным зарядом на белке.

Энергия связи иона с дипольной молекулой воды, определяемая формулой

$$E_{pq} = \frac{q^2 p_w^2}{12\pi\epsilon r_0^4} \frac{1}{kT},$$

обратно пропорциональна четвертой степени ионного радиуса, при этом она может быть порядка или меньше тепловой энергии kT . В этих случаях на поверхности ионов вода не сможет удерживаться. Это наблюдается для ионов с большим радиусом, таких как Cs^+ , Rb^+ , Cd^+ , Ce^+ , Pb^{2+} , Eu^{3+} , а также K^+ . (Здесь q — заряд иона, p_w — дипольный момент молекулы воды, ϵ — диэлектрическая проницаемость воды (~ 80), r_0 — радиус иона металла.)

Взаимодействуя с поверхностью белка непосредственно, ион металла с большим ионным радиусом болееочно связывается с отрицательно заряженной группой на белке и может образовывать кулоновский комплекс на макромолекуле белка с общей гидратной оболочкой. В этом случае металлические ионы полностью компенсируют локальный поверхностный заряд белковой молекулы [5].

Эффективное уменьшение поверхностного заряда белка, происходящее в результате прочного связывания ионов металла большого радиуса с макромолекулой, может привести к тому, что основным видом взаимодействия между белковыми молекулами станет диполь-дипольное притяжение, а не кулоновское отталкивание, поскольку белки имеют аномально высокие значения дипольных моментов (порядка нескольких сотен Д).

Смена характера межмолекулярного взаимодействия приводит к появлению в растворах белков молекулярных наноструктур — дипольных белковых кластеров.

2. Объекты исследования. Порядок приготовления растворов. Экспериментальные устройства

В работе были исследованы растворимые белки — человеческий альбумин (HSA) и гамма-глобулин (IgG) фирмы «Sigma». Исследуемые растворы готовились в лабораторных условиях непосредственно перед проведением эксперимента. Навески белка производились на электронных аналитических весах «Adventure», позволяющих проводить измерения с точностью до 0.1 мг, растворы готовились в кюветах «Clinicon» объемом ~5 мл. Для приготовления растворов белка в качестве растворителя была выбрана медицинская вода в ампулах для инъекций.

Из соображений удобства и во избежание повреждения локальной структуры белка концентрированными реактивами приготовление исследуемых систем необходимо проводить в несколько этапов:

1) приготовить первичный раствор белка с концентрацией $c = 50$ мг/мл (общее количество раствора рассчитывается с учетом предполагаемого количества экспериментов);

2) приготовить раствор соли с необходимым значением ионной силы в соответствии со следующим соотношением:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum (z_i + n^c + z_i - n^a),$$

где z и n — заряды и парциальные концентрации присутствующих в растворе катионов и анионов (общее количество рассчитывается с учетом предполагаемого числа экспериментов);

3) путем добавления малого количества слабых растворов HCl или KOH изменить концентрацию свободных протонов в растворителе (вода или раствор соли) до заданного значения pH (химическая посуда — стеклянная ампула объемом 5 мл);

4) приготовить конечную систему путем добавления 20 мкл раствора 1 в раствор 3. В результате получим белковый раствор с конечной концентрацией $c = 0.2$ мг/мл. После этого проводим повторное измерение pH;

5) концентрация белковых растворов варьировалась в пределах от $c = 0.2$ мг/мл до $c = 1.4$ мг/мл.

Образцы для работы на атомно-силовом микроскопе готовились следующим образом. В качестве подложки использовался свежесколотый графит. На него наносился глутаровый альдегид, который используется как фиксатор биологических тканей при исследовании методом электронной микроскопии. Затем альдегид смывался водой и на подложку наносился белковый раствор. При работе на АСМ концентрация альбумина в растворе не менялась и всегда составляла 0.8 мг/мл. Белковый раствор некоторое время держался на графите, а потом откачивался оттуда при помощи мерной пипетки. Это проводилось для того, чтобы на графитовой подложке оставались отдельные белковые молекулы.

В настоящей работе исследования водных растворов альбумина и гамма-глобулина проводились двумя мето-

дами: динамического рассеяния света и методом АСМ. Эксперименты по динамическому рассеянию света проводились с помощью фотонно-корреляционного спектрографа Photocor Complex [6]. Эксперименты по АСМ проводились с помощью установки ACM Solver P47 [7].

3. Экспериментальные результаты и обсуждение

В работе были получены значения коэффициентов трансляционной диффузии альбумина и гамма-глобулина в растворах, содержащих KCl при изменении pH и ионной силы. Результаты показаны на рис. 1 и 2. Как видно из приведенных зависимостей, величины D_t уменьшаются в области изоэлектрической точки белков (pH равно 5 и 6 соответственно) с ростом концентрации ионов K^+ .

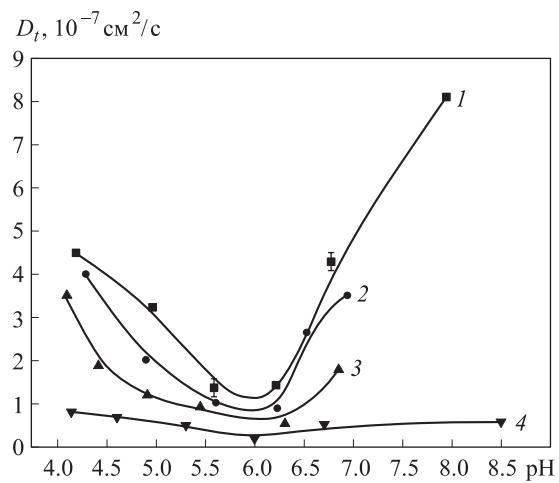


Рис. 1. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t гамма-глобулина от показателя pH для водных растворов с добавлением соли KCl: 1 — водный раствор гамма-глобулина, 2 — раствор гамма-глобулина с KCl ($I = 0.001$ моль/л), 3 — раствор гамма-глобулина с KCl ($I = 0.005$ моль/л), 4 — раствор гамма-глобулина с KCl ($I = 0.01$ моль/л)

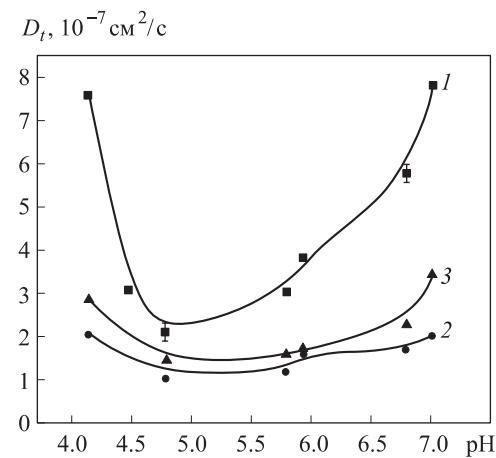


Рис. 2. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t альбумина от показателя pH для водных растворов с добавлением соли KCl: 1 — водный раствор альбумина, 2 — раствор альбумина с KCl ($I = 0.01$ моль/л), 3 — раствор альбумина с KCl ($I = 0.005$ моль/л)

Согласно формуле Стокса–Эйнштейна, уменьшение величины коэффициента трансляционной диффузии примерно в два раза означает, что радиус рассеивающих частиц увеличивается вдвое, при этом масса частиц (кластеров) возрастает примерно на порядок по сравнению с молекулярной массой белка. Таким образом, под воздействием ионов калия возникает агрегация молекул гамма-глобулина и альбумина вблизи их изоэлектрических точек.

Роль калия в жизнедеятельности организма очень важна. Электрические свойства (потенциал покоя — потенциал действия) большинства клеток определяются этим ионом, а также ионами кальция и натрия, поэтому они называются потенциалообразующими. Как известно, натрий содержится в крови, в плазматической жидкости межклеточного пространства, в то время как калий в организме человека в основном находится внутри клеток. Так, внутри мышечных клеток калия почти в 50 раз больше, чем в межклеточном пространстве. Для поддержания такой концентрационной неравновесности затрачивается большая энергия. С помощью молекулярных «машин» Атфаз натрий из клеток выкачивается, и в клетки закачивается калий. При патологическом состоянии у человека может происходить разрушение клеточных мембран (лизис клеток). В этом случае выходящий из клеток калий нарушает процесс синтеза белков и ферментов и приводит к кластеризации макромолекул.

В качестве примера воздействия металла с большим ионным радиусом на альбумин можно привести результаты измерения радиуса кластеров, образующихся в растворах белка, содержащих малые концентрации соли европия (рис. 3). На этом же рисунке для сравнения показано воздействие на альбумин ионов калия.

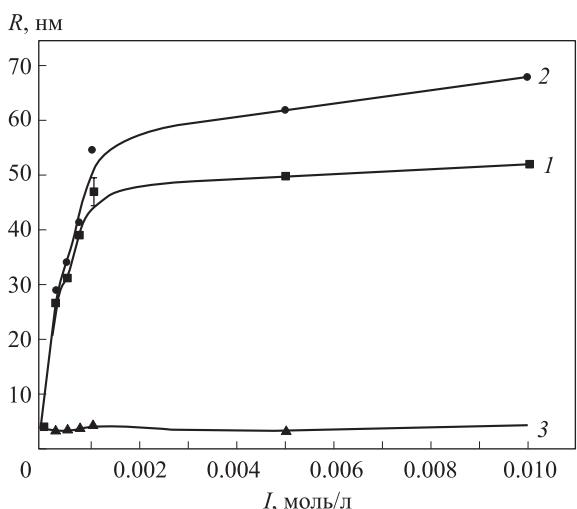


Рис. 3. График зависимости радиуса нанокластеров альбумина от ионной силы раствора: 1 — водный раствор альбумина с KCl, 2 — раствор альбумина с $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, 3 — раствор альбумина с KCl после воздействия на него ультразвука

На этом же графике приведена зависимость радиуса частиц от ионной силы раствора после воздействия ультразвука на раствор 3. В ультразвуковую ванну с мощностью 50 Вт был помещен раствор с образо-

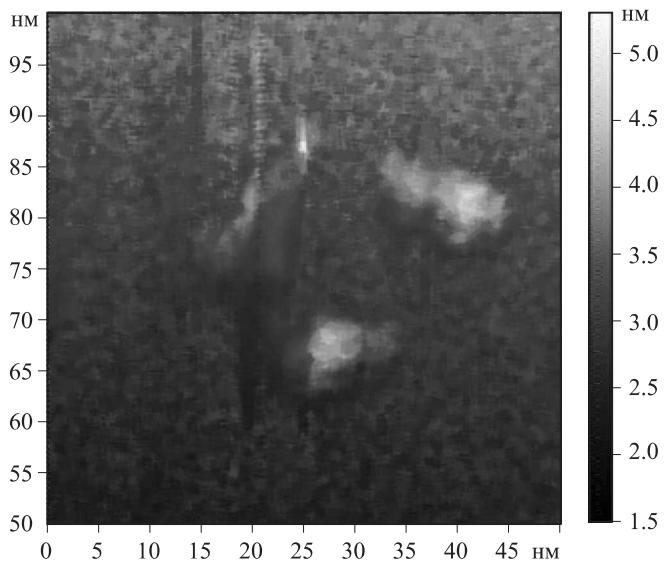


Рис. 4. Строение молекулы альбумина, полученное с помощью туннельного микроскопа

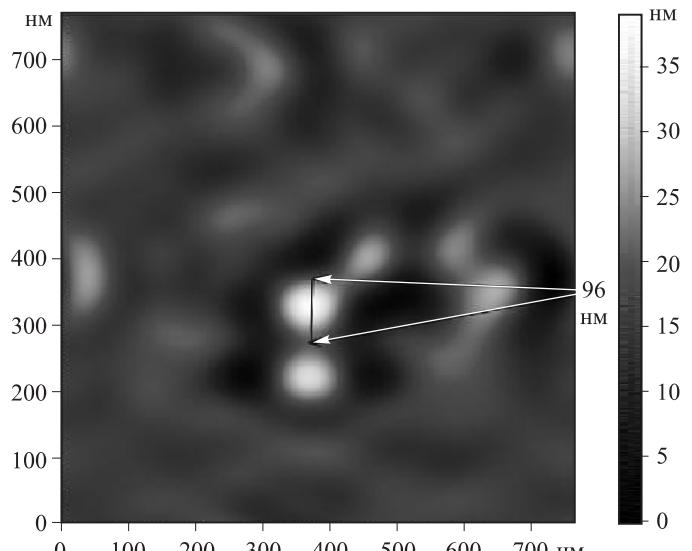


Рис. 5. Двумерное изображение частиц, образующихся в растворе альбумина при добавлении KCl, полученное с помощью ACM

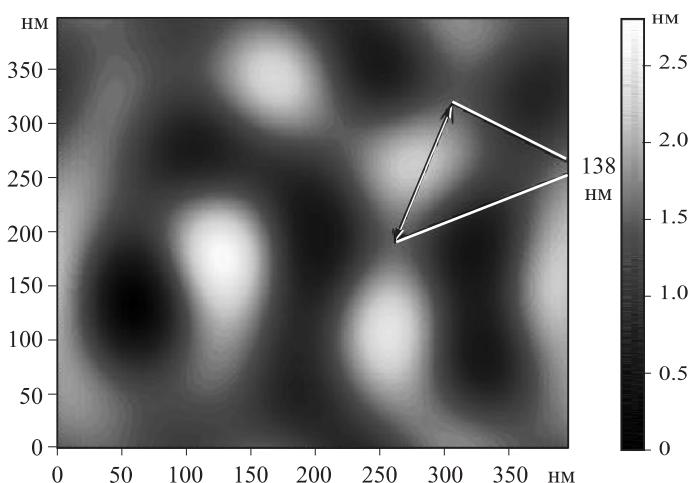


Рис. 6. Двумерное изображение белковых кластеров в растворе альбумина, содержащем соль $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$

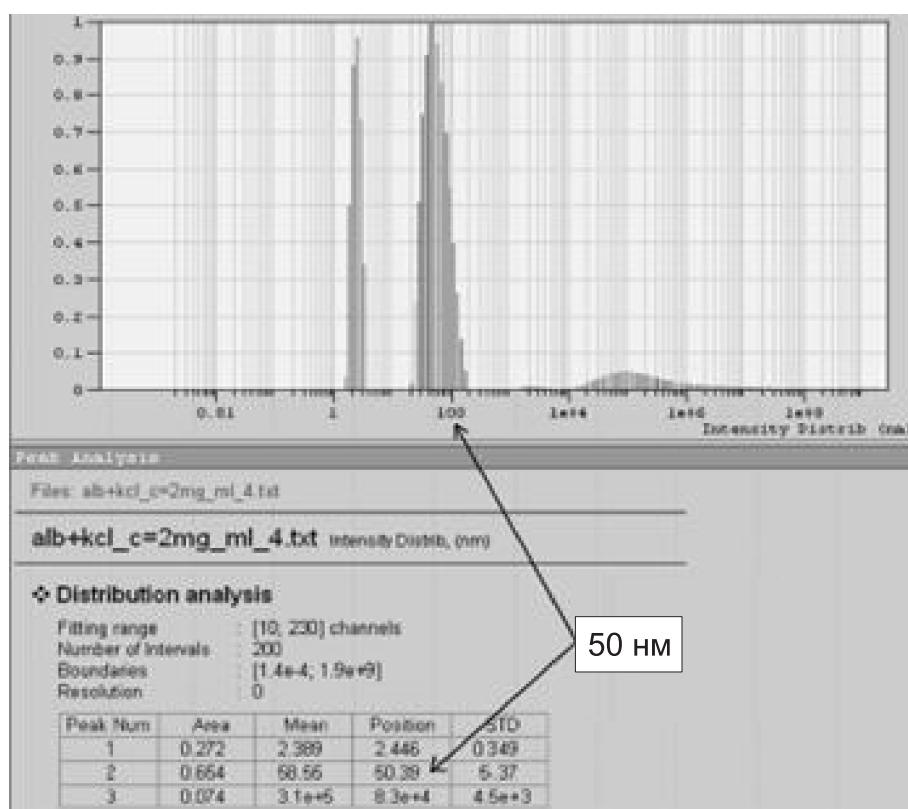


Рис. 7. Радиус нанокластеров в растворе альбумина при добавлении KCl, определяемый с помощью корреляционного спектрографа

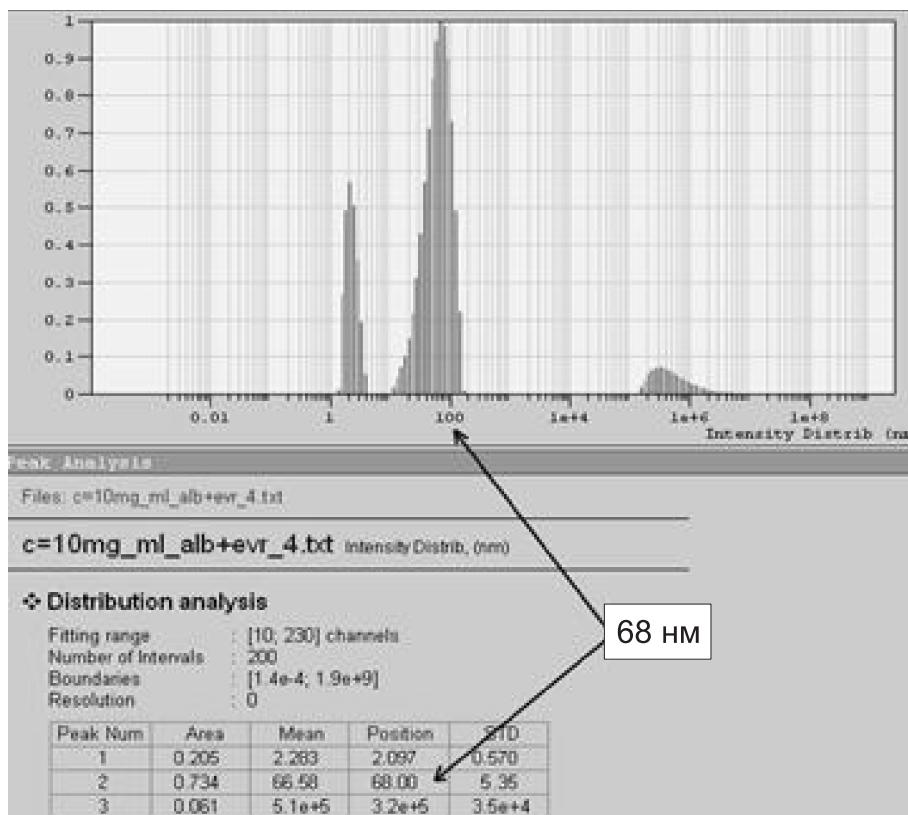


Рис. 8. Радиус нанокластеров в растворе альбумина при добавлении Eu(NO₃)₃, определяемый с помощью корреляционного спектрографа

вавшимися частицами примерно на 7–10 мин. Затем раствор был вынут из ультразвуковой ванны и изучен с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии. Оказалось, что под действием ультразвука нанокластеры разрушаются, и размер частиц становится порядка 5 нм, что в пределах погрешности совпадает с размерами молекулы альбумина.

С помощью атомно-силового микроскопа были впервые получены изображения молекул основных белков сыворотки крови — альбумина и гамма-глобулина, а также изображения белковых кластеров, которые образуются в растворах при добавлении ионов металлов с большими ионными радиусами. В качестве подложки использовался графит с высокой степенью ориентации поверхности (HOPG), который часто используется при работе с биоматериалами [8, 9].

В качестве примера на фотографиях (рис. 4–6) показаны снимки молекул альбумина и белковых агрегатов в растворах альбумина с ионами калия и европия.

Фотография, приведенная на рис. 4, получена с помощью туннельного микроскопа. Она дает представление о размере молекулы альбумина (~ 8 нм).

Фотография, приведенная на рис. 5, получена с помощью АСМ. На этом снимке видны более крупные образования, возникающие в растворе альбумина при добавлении KCl. Как можно видеть, размер частиц увеличился почти на порядок.

На фотографии (рис. 6), полученной с помощью АСМ, показано изображение частиц, образующихся в растворе альбумина при добавлении соли Eu(NO₃)₃.

Взаимодействие альбумина с солями калия и европия было исследовано также методом фотонно-корреляционной спектроскопии. Размеры белковых нанокластеров, полученные с помощью АСМ, хорошо совпадают с размерами этих же частиц, определенных с помощью коррелятора, и составляют в диаметре около 100 нм и 138 нм в случае взаимодействия альбумина с KCl и Eu(NO₃)₃ соответственно. Это можно наглядно увидеть при сравнении рис. 5, 6 с рис. 7, 8.

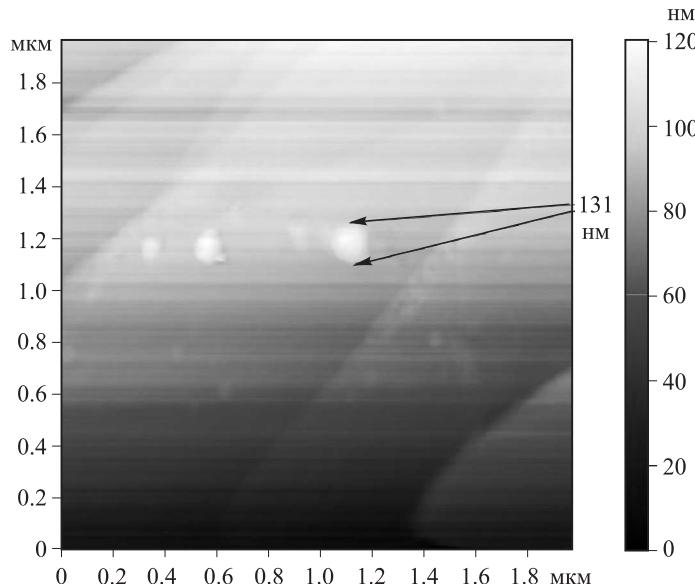


Рис. 9. Двумерное изображение частиц, образующихся в растворе гамма-глобулина при добавлении KCl, полученное с помощью АСМ

На рис. 7 и 8 приведены результаты компьютерной обработки корреляционной функции [10]. Первый пик соответствует спектральной плотности интенсивности флуктуаций броуновского движения молекул альбумина (радиус частиц примерно равен 2 нм). Не все молекулы этого белка связываются с ионами европия, поэтому часть альбумина присутствует в растворе в свободном виде. Второй пик соответствует рассеянию на кластерах (частицы с радиусом, равным примерно 68 нм), образовавшиеся в результате взаимодействия альбумина с ионами европия. Третий широкий пик описывает вклад от частиц пыли, присутствующей в растворе.

На атомно-силовом микроскопе также были получены изображения нанокластеров, образовавшихся при взаимодействии гамма-глобулина с ионами калия (рис. 9).

Размеры частиц составили около 130 нм, что в пределах погрешности хорошо совпадает с данными фотонно-корреляционной спектроскопии.

Заключение

Методами динамического рассеяния света и зондовой микроскопии были проведены исследования явления агрегации макромолекул в водных растворах основных белков сыворотки крови, содержащих ионы калия и европия, при изменении различных параметров среды, таких как концентрация макромолекул белка, водородный показатель раствора, концентрация солей.

В результате для исследованных систем было обнаружено уменьшение коэффициента трансляционной диффузии частиц в растворах альбумина и гамма-глобулина при добавлении ионов калия, что свидетельствует о возникновении дипольных нанокластеров.

Впервые с помощью АСМ получены изображения нанокластеров, образующихся при взаимодействии альбумина с солями калия и европия. Показано, что методика АСМ является неинвазивной для исследования белковых молекул, так как размеры кластеров, полученные методами фотонно-корреляционной спектроскопии, совпадают с размерами этих же кластеров, полученных с помощью АСМ.

Показано, что при добавлении соли Eu₃(NO₃)₃ в растворы альбумина размеры рассеивающих частиц увеличиваются примерно в 20 раз.

Обнаружено, что в процессе образования нанокластеров в растворах альбумина, содержащих ионы K⁺ и Eu⁺⁺⁺, наблюдается насыщение (размер частиц не изменяется) при ионной силе порядка 0.001 моль/л, что соответствует ПДК для этих металлов.

Таким образом, нами обнаружен и объяснен механизм образования наноразмерных дипольных кластеров в растворах белков, содержащих различные ионы металлов [2–4].

Можно предполагать, что образование белковых кластеров в организме человека под действием тяжелых металлов приводит к нарушениям целого ряда ферментативных реакций, транспортной и иммунной функций крови и лимфы а также к структурным изменениям ряда органов и тканей.

Список литературы

1. *Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V.* // *Eur. Biophys. J.* 2006. **36**, N 7. P. 717.
2. *Petrova G.P., Petrushevich Yu.M., Evseevicheva A.N.* // *Gen. Phys. and Biophys.* 1998. **17**, N 2. P. 97.
3. *Петрова Г.П., Петрущевич Ю.М.* // *Биомед. радиоэлектроника.* 2000. № 3. С. 41.
4. *Петрова Г.П., Петрущевич Ю.М., Тен Д.И.* // *Квант. электроника.* 2002. **32**, № 10. С. 897.
5. *Hong L., Xingcan S., Zhiliang J. et al.* // *Science in China.* 2000. **43**, N 6. P. 600.
6. <http://www.photocor.ru/dls-instrument.htm>
7. <http://www.ntmdt.ru/device/solver-p47-pro>
8. *Xu L., Soman P., Agnihotri A., Siedlecki C.* // *Biol. Interactions on Material Surfaces.* 2009. P. 43.
9. *Yang J.* // *Cell Biochemistry and Biophysics.* 2004. **41**, N 3. P. 435.
10. <http://www.photocor.ru/software.htm>

Formation of dipole nanoclusters in the blood serum protein solutions containing ions of europium and potassium

T. N. Tikhonova^{1,a}, G. P. Petrova¹, Yu. M. Petrushevich¹, K. V. Fedorova^{1,b}, V. V. Kashin²

¹*Department of Molecular Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.*

²*Laboratory of Nanocomposite Materials, V. A. Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Moscow 125009, Russia.*

E-mail: ^a*t.n.tikhonova@yandex.ru*, ^b*fedorova@physics.msu.ru*.

The aqueous solutions of main blood serum proteins (albumin, γ -globulin) containing small concentrations of ions of potassium and europium were investigated with the help of photon-correlation spectroscopy and atomic-force microscopy (AFM). The dependence of translation diffusion coefficient values and also effective radiiuses of dispersive particles were obtained on pH and salt concentration. It is revealed that in these solutions protein dipole nanoclusters are formed that is also confirmed by AFM.

Keywords: serum albumin, γ -globulin, dynamic light scattering, photon-correlation spectroscopy, atomic-force microscopy, translation diffusion coefficient, isoelectric point.

PACS: 87.15.-v, 87.83.+a.

Received 25 October 2010.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 2(2011).

Сведения об авторах

1. Тихонова Татьяна Николаевна — аспирантка; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: t.n.tikhonova@yandex.ru.
2. Петрова Галина Петровна — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: petrova@phys.msu.ru.
3. **[Петрущевич Юрий Михайлович]** — докт. физ.-мат. наук, профессор.
4. Федорова Ксения Вячеславовна — соискатель; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: fedorova@physics.msu.ru.
5. Кашин Вадим Валерьевич — науч. сотр.; e-mail: vvkashin@mail.cplire.ru.