

Биология

М. Л. ГЕВОРКЯН, А. Е. ЗАКАРЯН, Ю. М. ДЕМИН

К ВОПРОСУ О ФОТОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ

Исследованы дозовая зависимость интенсивности фотохемилюминесценции (ФХЛ) и спектры флуоресценции растворов сывороточного альбумина человека (САЧ) и аргиназы при значениях рН 7 и 9,5. Показано, что в растворах САЧ скорости фотолиза триптофанилов при этих значениях рН различны ($K_7 = 3 \cdot 10^{-4}$ сек. $^{-1}$, $K_{9,5} = 2 \cdot 10^{-4}$ сек. $^{-1}$), в то время как у аргиназы они совпадают. На основании экспериментальных данных предполагается, что при изменении рН от 7 до 9,5 в молекуле САЧ, по-видимому, происходит некоторое изменение конформационного состояния, которое отражается на скорости фотолиза триптофанового остатка.

Исследование процессов фотохемилюминесценции (ФХЛ) позволяет получить ценные сведения не только о свободно-радикальных превращениях в растворе, многих вопросах фотохимии белков, но также о конформационных изменениях белковых молекул [1]. Однако в литературе имеется всего несколько работ, посвященных исследованию последнего вопроса. В работах Нисенбаума и сотрудников установлено, что нарушение нативной структуры молекул белков с помощью гуанидина, мочевины [2, 3] и додецилсульфата натрия [4] приводит к значительным изменениям интенсивности ФХЛ и кинетики затухания свечения. Было показано [5], что обратимые конформационные превращения белков, происходящие при изменении рН и солевого состава среды, в некоторых случаях также отражаются на интенсивности и кинетике процессов послесвечения.

В настоящей работе сделана попытка исследовать и некоторые другие параметры ФХЛ при воздействии факторов, влияющих на конформацию макромолекул белка. С этой целью изучалась дозовая зависимость ФХЛ растворов сывороточного альбумина человека (САЧ) и аргиназы при значениях рН 7 и 9,5.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовались препараты белков САЧ и аргиназы из печени крупного рогатого скота фирмы «Реанал» (Венгрия). Растворы белков готовились на 0,01 М фосфатном (рН 7) и 0,05 М глициновом (рН 9,5) буферах в концентрации 10^{-5} М. Измерения ФХЛ проводились на установке для регистрации хемилюминесценции [6]. Раствор белка (5 мл) облучали в открытой термостатированной кювете ($t = 25^\circ$) при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Облучение производилось полным светом ртутной лампы ПРК-4 на расстоянии 6 см от основания кюветы. Измерение спектров флуоресценции (ФЛ) растворов белков проводили на спектрофлуориметре 2М-А

(Hitachi) при длине волны возбуждения флуоресценции $\lambda = 290$ нм. Перед измерением флуоресценции исходные растворы разбавлялись в 10 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были получены кинетические кривые ФХЛ растворов САЧ при рН 7 и 9,5. Процесс затухания свечения в обоих случаях имеет двухстадийный характер. В первые 90 сек. происходит резкое снижение интенсивности ФХЛ, затем скорость затухания свечения уменьшается. Из кинетических кривых определялись начальная интенсивность ФХЛ— I^0 (экстраполяцией полулогарифмической анаморфозы к нулевой точке) и константы скоростей затухания свечения на быстром и медленном участках— k_1 и k_2 . Изменение рН раствора от 7 до 9,5 не влияло на значения величин I^0 и k_1, k_2 для кинетических кривых при пятиминутном облучении.

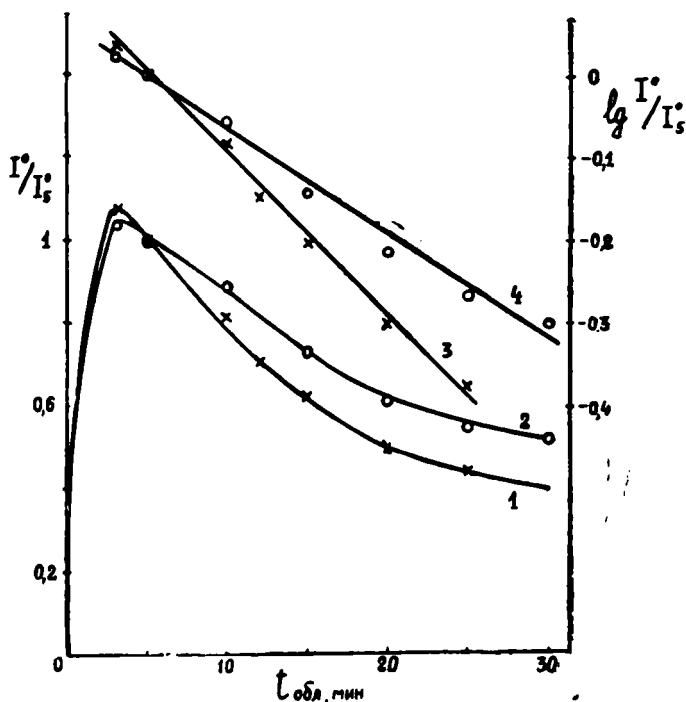


Рис. 1. Зависимость относительной начальной интенсивности ФХЛ от времени облучения и ее полулогарифмическая анаморфоза при рН 7 (1, 3) и 9,5 (2, 4).

Была исследована зависимость начальной интенсивности ФХЛ от времени облучения УФ светом. Ход этой зависимости имеет обычный вид — вначале наблюдается резкий подъем, I^0 проходит через максимум и затем экспоненциально снижается (рис. 1). Значения k_1 и k_2 для кинетических кривых с увеличением времени облучения почти не меняются, что свидетельствует об отсутствии существенных конформационных изменений макромолекулы САЧ в ходе облучения [3]. Для растворов белка со значениями рН 7 и 9,5 ход зависимости I^0 ФХЛ от времени облучения на спадающем участке различен. Как видно из

рис. 1, скорость снижения начальной интенсивности ФХЛ при рН 7 больше, чем при рН 9,5. По углу наклона этих анаморфоз были определены константы скорости снижения начальной интенсивности ФХЛ. Они составляют $K_7 = 3,15 \cdot 10^{-4} \text{ сек.}^{-1}$ и $K_{9,5} = 2,1 \cdot 10^{-4} \text{ сек.}^{-1}$ для растворов с рН 7 и 9,5 соответственно. Учитывая, что снижение интенсивности ФХЛ связано с фотолизом триптофанилов в белке [7], можем заключить, что при этих значениях рН триптофановые остатки в молекуле САЧ разрушаются с различными скоростями. По-видимому, при увеличении значений рН раствора от 7 до 9,5 происходит некоторое изменение конформации молекулы белка, не влияющее на кинетику послесвечения, но уменьшающее чувствительность остатков триптофана к УФ облучению.

Далее, для дополнительного изучения этого вопроса было проведено измерение спектров флуоресценции растворов САЧ для тех же значений рН. При длине волны возбуждения $\lambda = 290 \text{ нм}$, где поглощают преимущественно триптофанилы, интенсивность и положение максимума ФЛ при переходе от рН 7 к 9,5 не изменялись. Исследовались спектры ФЛ растворов белка, облученных в тех же условиях, в которых была измерена ФХЛ. Эти опыты показали, что с увеличением времени облучения интенсивность ФЛ падает и максимум смещается в коротковолновую область. При 30 мин. облучения этот сдвиг составляет примерно 12—14 нм для растворов с рН 7 и 8—10 нм для растворов с рН 9,5. На рис. 2 приведены зависимости интенсивностей ФЛ в максимуме от времени облучения растворов САЧ при рН 7 и 9,5 в полулогарифмических координатах. Как и у большинства белков, эти зависимости имеют излом, причем скорости фотолиза триптофановых

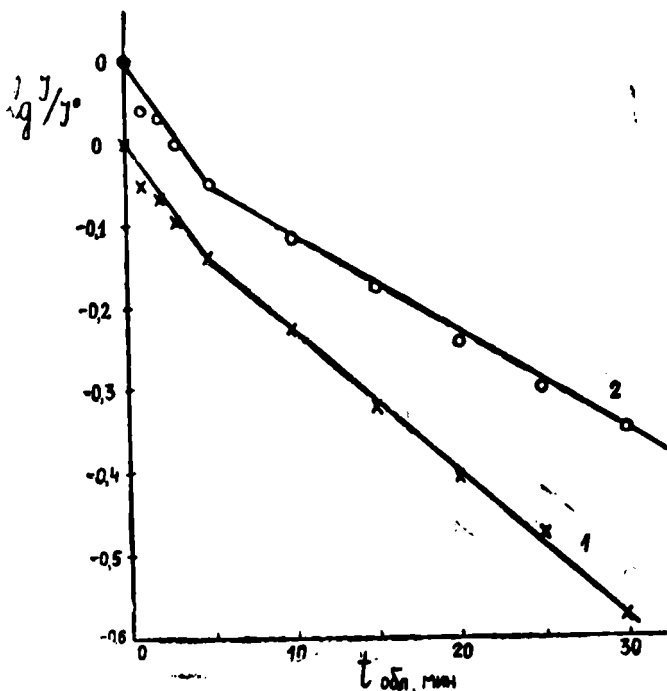


Рис. 2. Зависимость фотолиза триптофанового остатка САЧ при рН 7(1) и 9,5(2) от времени облучения в полулогарифмических координатах.

остатков в растворах с рН 7 больше, чем при рН 9,5. Константы скоростей фотораспада триптофанилов для медленных составляющих равны $K_7^{\phi} = 3 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ и $K_{9,5}^{\phi} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ для рН 7 и 9,5, что близко к значениям соответствующих констант, полученных методом ФХЛ. Совпадение значений этих величин еще раз подтверждает тот факт, что процессы ФХЛ связаны с фотолизом триптофановых остатков в белках при действии УФ облучения.

Неэкспоненциальный характер дозовых зависимостей интенсивности ФЛ вначале объясняли различной чувствительностью к УФ облучению остатков триптофана в белках, связанной, по-видимому, с полярностью их микроокружения [8, 9]. Дальнейшее исследование этого вопроса показало [10, 11], что полярность микроокружения не является причиной неоднородности триптофанилов по светочувствительности. В наших экспериментах неэкспоненциальный характер дозовой зависимости наблюдается и в случае, когда белок содержит всего один остаток триптофана. Это свидетельствует о том, что в наблюдаемых процессах играют роль не различные остатки триптофана, отличающиеся по светочувствительности, а, по-видимому, изменения, происходящие в молекуле в ходе облучения. Можно предположить, что образующиеся в растворе САЧ при УФ облучении фотопродукты изменяют микроокружение триптофанила (включая полярность, наличие заряженных групп, специфические связи и т. д.), что, возможно, и влияет на скорость фотолиза его и положение максимума ФЛ. Необходимо отметить, что остаток триптофана в молекуле САЧ расположен в конформационно-чувствительном участке белковой молекулы [12]. Принимая во внимание это обстоятельство, изменение скорости фотолиза триптофанила в зависимости от рН раствора можем объяснить тем, что при увеличении рН от 7 до 9,5 в молекуле САЧ, по-видимому, происходят незначительные изменения конформации (либо изменения микроокружения без конформационных перестроек), которые отражаются на способности триптофанила к фотохимическому разрушению.

Согласно вышеизложенному наблюдаемая разница в скоростях фотолиза триптофанила САЧ является следствием специфических для данной молекулы изменений конформации. Представляло интерес провести аналогичные эксперименты с растворами другого белка. С этой целью нами проводились измерения ФХЛ в растворах аргиназы. Типичная кинетическая кривая ФХЛ растворов аргиназы при рН 9,5 приводилась нами ранее [6]. Как показали наши эксперименты, интенсивность ФХЛ и константы скоростей затухания свечения с изменением рН до 7 почти не меняются. Так же, как и в опытах с САЧ, исследовалась дозовая зависимость интенсивности ФХЛ. Ход этой зависимости при рН 9,5 приведен в работе [6]. Константа скорости снижения начальной интенсивности ФХЛ на спадающем участке дозовой кривой в настоящих опытах составляет $K_3^x = 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ как для рН 7, так и 9,5 (отличие в значениях этих величин по сравнению с данными работы [6] связано с использованием различной интенсивности облучения в этих двух случаях).

Измерение флуоресценции растворов аргиназы показало, что интенсивность и положение максимума спектра ФЛ (336—338 нм) в исследуемой области не зависят от рН. В облученных растворах аргиназы интенсивность ФЛ падает без смещения положения максимума. На рис. 3 приведена зависимость относительной интенсивности ФЛ в максимуме от времени облучения растворов аргиназы с рН 7 и 9,5 в полупологарифмических координатах. Скорости фотолиза триптофанилов

совпадают, и константа скорости на медленном участке составляет $K_{\Phi} = 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$, что согласуется с данными по ФХЛ. По-видимому, изменение рН раствора не вызывает каких-либо изменений конформационного состояния молекулы аргиназы, по крайней мере в области триптофановых остатков, влияющих на скорость их фотодеструкции.

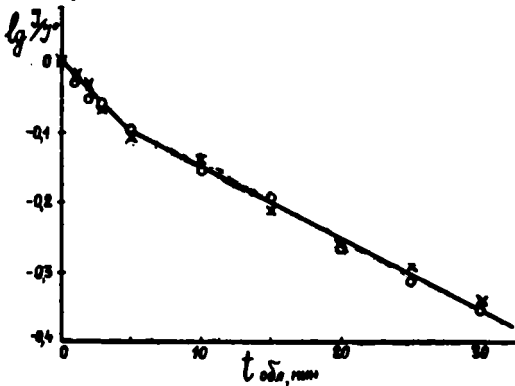


Рис. 3. Зависимость фотолиза триптофановых остатков аргиназы при рН 7(x) и 9,5(o) от времени облучения в полулогарифмических координатах.

Таким образом, на основании экспериментальных данных можно заключить, что исследование дозой зависимости ФХЛ позволяет получить новые сведения о небольших сдвигах в конформации белковых молекул.

Кафедра биохимии и лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступила 14.07.1975

ЛИТЕРАТУРА

1. Сапежинский И. И., в кн.: «Молекулярная радиобиология», Атомиздат, М., 96, 1972.
2. Нисенбаум Г. Д., Аксентев С. Л., Конев С. В., Биофизика, 13, 1, 138, 1968.
3. Аксентев С. Л., Нисенбаум Г. Д., Конев С. В., Биофизика, 13, 3, 428, 1968.
4. Нямаа Д., Катибников М. А., Конев С. В., Нисенбаум Г. Д., Изв. АН БССР, сер. биол., 6, 88, 1974.
5. Нисенбаум Г. Д., Аксентев С. Л., Конев С. В., Биофизика, 14, 3, 402, 1969.
6. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Давтян М. А., Биол. журн. Армении, 27, 9, 44, 1974.
7. Сапежинский И. И., ДАН СССР, 175, 1167, 1967.
8. Перрассе Н. И., Кондакова Н. В., Калабухова Т. Н., Владимиров Ю. А., Эйдус Л. Х., Биофизика, 13, 1, 24, 1968.
9. Конев С. В., Воскресенская Л. Г., Волотовский И. Д., Шейко М. М., ДАН БССР, 15, 12, 1133, 1971.
10. Калабухова Т. Н., Кондакова Н. В., Эйдус Л. Х., в кн.: «Ультрафиолет. излуч. и его применение в биол.», Пушино, 45, 1973.
11. Калабухова Т. Н., Кондакова Н. В., Эйдус Л. Х., Молекулярн. биол., 7, 6, 829, 1973.
12. Ивкова М. Н., Веденкина Н. С., Бурштейн Э. А., Молекулярн. биол., 5, 2, 214, 1971.

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ե. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, ՅՈՒ. Մ. ԴՅՈՄԻՆ

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՖՈՏՈՔԵՄԼՅՈՒՄԻՆԵՍԻՑԵՆՑԻԱՅԻ ԼԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել են մարդու արյան սիճուկի ալբումինի (ՄՍԱ) և արգինազայի ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիայի ինտենսիվության կախումը ճառագայթման տևողությունից, ինչպես նաև այդ սպիտակուցների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները: Պարզվել է, որ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների ազդեցությամբ ՄՍԱ-ի տրիպտոֆանի մնացորդի ֆոտոլիզի արագությունը pH-ի 7 և 9,5 արժեքների դեպքում տարբեր է ($K_7=3.10^{-4}$ վրկ $^{-1}$, $K_{9.5}=2.10^{-4}$ վրկ $^{-1}$) արգինազայի համար նման տարբերություն չի նկատվում: Ենթադրվում է, որ pH-ի փոփոխությունը ՄՍԱ-ի մոլեկուլներում առաջացնում է կոնֆորմացիայի այնպիսի փոփոխություն, որը անդրադառնում է տրիպտոֆանի մնացորդի ֆոտոլիզի արագության վրա: