

## МОДИФИКАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, ИНДУЦИРОВАННАЯ ВАКУУМНЫМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

© 2000 г. А.А. Пантявин, В.Г. Артюхов, Г.А. Вашанов

*Воронежский государственный университет*

Методами диск-электрофореза, гель-хроматографии и кислотно-основного титрования изучены структурно-функциональные изменения молекул бычьего сывороточного альбумина, индуцированные воздействием вакуумного ультрафиолетового излучения в диапазоне длин волн 131-161 нм в дозах 6-300 кДж/м<sup>2</sup>. Установлено, что изменения указанных свойств молекул альбумина после облучения в условиях различного микроокружения свидетельствуют о преобладании процессов ассоциации в исследуемой системе. ВУФ-свет в области поглощения пептидных связей белковых молекул индуцирует разрыв слабых внутримолекулярных связей, что приводит к инактивации белковых макромолекул.

Вакуумный ультрафиолет - сравнительно малоизученная область электромагнитного излучения Солнца. В связи с наличием над нашей планетой озонового экрана ВУФ-излучение поверхности Земли не достигает. Однако в период биохимической эволюции вакуумному ультрафиолету могла принадлежать ведущая роль в синтезе органических молекул, в том числе и белков, так как энергия его квантов составляет величины 6 - 120 эВ.

Одной из важнейших сторон абиогенеза биологически важных соединений было проявление этими веществами фотохимической резистентности. Анализ экспериментальных данных, касающихся физико-химических изменений макромолекул, позволяет наметить некоторые модельные подходы к установлению возможных путей эволюции структуры белков.

На кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского госуниверситета на протяжении трех десятилетий проводятся комплексные исследования по изучению влияния УФ-излучения на структурно-функциональные свойства белков крови. Расширение спектрального диапазона в область энергетически более богатого вакуумного ультрафиолета ( $\lambda < 200$  нм) может дать ценную информацию о фотохимических превращениях белков в организме.

Сывороточный альбумин – один из важнейших белков плазмы крови. Молекула его, как и других глобулярных белков, легко изменяет свои свойства и поведение под действием различных физико-химических факторов: рН среды, УФ-излучения, температуры, органических растворителей и др. Он является удобным объектом ис-

следования, так как расшифрованы уровни его структурной организации и известны те важные функции, которые он выполняет в организме.

Исходя из вышеизложенного, нами проведены систематические исследования структурно-функциональных модификаций сывороточного альбумина под влиянием вакуумного УФ-света.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коммерческий препарат бычьего сывороточного альбумина (БСА) фирмы "Sigma" (США), фракция V, содержащая 96-99% альбумина, полученный E.J. Cohn et al. [1] и очищенный от жирных кислот по методике R.F. Chen [2].

Образцы получали высушиванием водных растворов белка (концентрация  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) в объеме 10 мкл на подложках MgF<sub>2</sub> (диаметр 30 мм, толщина 1 мм). Толщина пленок белка, измеренная при помощи интерференционного микроскопа МИИ-4 ("ЛОМО", Россия), составляла 0,1-0,5 мкм.

Облучение образцов проводили светом лампы барьерного разряда в криптоне КрБФ-10 в диапазоне длин волн 131-161 нм ( $\lambda_{\max} = 146$  нм).

В экспериментах использовали метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле и гель-фильтрации на сефадексе G-100. Для проведения хроматографического анализа раствор БСА, полученный путем растворения тонкой пленки, в объеме 1 мл наносили на колонку размером 1 см × 57 см, упакованную сефадек-

сом G-100 и уравновешенную 0,01 н. натрий-фосфатным буфером (рН 7,4).

Регистрацию кривых кислотно-основного титрования белковых растворов осуществляли на специально созданной на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета установке [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как сывороточный альбумин является одним из наиболее лабильных белков крови, то присоединение к его молекуле различных лигандов, в частности жирных кислот, приводит к изменениям конформации белка. В кровяном русле сывороточный альбумин представлен популяцией структурных конформеров [4]. В проведенных нами исследованиях гетерогенность этого белка проявилась достаточно четко.

В первой серии экспериментов были исследованы гель-хроматографические свойства растворов альбумина и молекул белка, полученного путем перевода тонкой пленки в раствор при рН 6,0. Выявлено, что в растворе БСА находится как в виде димерных молекул, так и в мономерной форме. Причем содержание димеров составляет 5-6% от общего количества белка.

Затем проведено воздействие ВУФ-света на интактные пленки белка с последующим их переводом в раствор при рН 6,0. Обнаружено, что при облучении молекул белка в дозе 72 кДж/м<sup>2</sup> в изучаемой системе накапливается хроматографическая фракция с кажущейся молекулярной массой, превышающей молекулярную массу димерной формы молекулы (табл. 1).

**Таблица 1.** Величины кажущихся молекулярных масс необлученных и ВУФ-модифицированных молекул БСА

Доза, кДж/м <sup>2</sup>	Молекулярная масса мономера, кДа	Молекулярная масса димера, кДа
0	66,8±1,1	124,2±0,7
72	84,1±0,6	230,6±0,7
300	91,1±0,6	233,8±0,6

При увеличении энергетической экспозиции до 300 кДж/м<sup>2</sup> происходит дальнейшее снижение содержания мономерной фракции и накопление продукта с большим эффективным объемом, что свидетельствует в пользу представления об ассоциации белковых молекул под действием ВУФ-излучения (рис. 1). На накопление агрегатов сывороточного альбумина под действием  $\gamma$ -излучения указано в работе С.Г. Rosen [5]. Отсюда можно заключить, что ВУФ-излучение с энергией квантов свыше 8 эВ вызывает “разворачивание” белковой молекулы с увеличением кажущейся молекулярной массы.

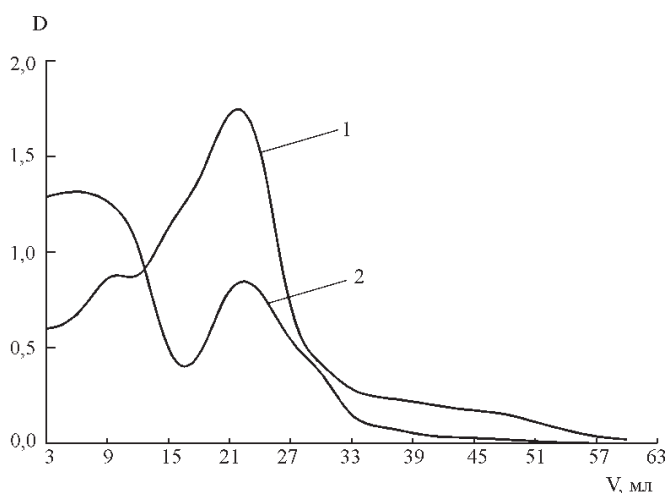
Таким образом, проанализированные результаты указывают на нарушение третичной структуры молекул бычьего сывороточного альбумина под влиянием вакуумного ультрафиолетового излучения.

При изучении электрофоретических свойств интактных молекул БСА в растворе и после растворения его тонкой пленки не было отмечено достоверных изменений в количестве и характере распределения фракций, что свидетельствует о том, что электрофоретические свойства молекул БСА при переходе от раствора к пленке не изменяются.

Затем были изучены электрофоретические свойства БСА в тонкой пленке после облучения его светом криптоновой барьерной лампы в диапазоне длин волн 131-161 нм. Показано, что при облучении пленок альбумина в дозах 24-30 кДж/м<sup>2</sup> не происходило статистически достоверных изменений в количестве и характере распределения электрофоретических фракций (табл. 2).

**Таблица 2.** Величины электрофоретической подвижности фракций необлученных и ВУФ-модифицированных молекул БСА (рН 6,0)

Доза, кДж/м <sup>2</sup>	Относительная электрофоретическая подвижность		
	Первая фракция	Вторая фракция	Третья фракция
0	0,46±0,02	0,63±0,01	0,86±0,02
24	0,44±0,01	0,62±0,01	0,87±0,01
30	0,44±0,01	0,60±0,02	0,84±0,02
72	-	0,65±0,01	0,94±0,01



**Рис. 1.** Профили элюции молекул бычьего сывороточного альбумина при ВУФ-облучении его образцов:

1 - контроль (необлученный образец); 2 - после ВУФ-облучения в дозе 300 кДж/м<sup>2</sup>

По оси абсцисс - объем, мл

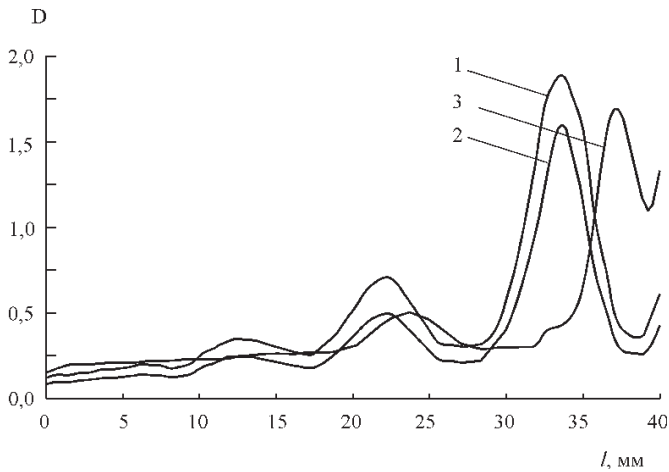
По оси ординат - оптическая плотность

**Рис. 2.** Денситограммы молекул бычьего сывороточного альбумина при ВУФ-облучении его образцов:

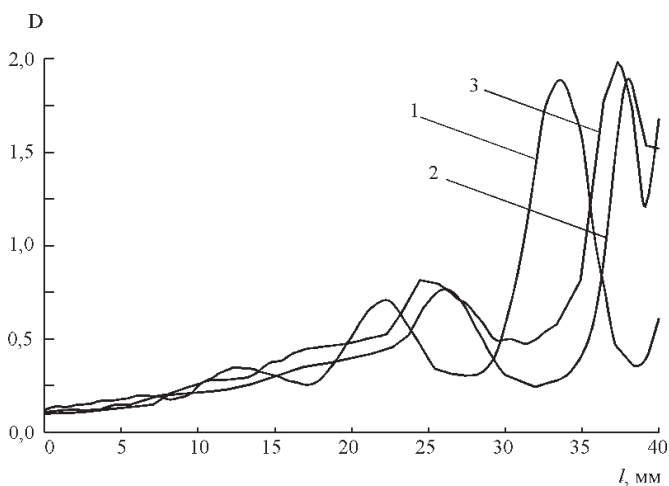
1 - контроль (необлученный образец); 2 - после ВУФ- облучения в дозе 24-30 кДж/м<sup>2</sup>; 3 - после ВУФ-облучения в дозе 72 кДж/м<sup>2</sup>

По оси абсцисс - длина, мм

По оси ординат - оптическая плотность



Однако при увеличении энергетической экспозиции до 72 кДж/м<sup>2</sup> наблюдается уменьшение количества электрофоретических фракций до двух, при этом подвижность самой быстрой из фракций возрастает (рис. 2). Эти данные, возможно, свидетельствуют об ассоциации молекул БСА под действием ВУФ-излучения. Это предположение также согласуется с данными, полученными нами методом гель-хроматографии и с данными других авторов по исследованию действия ионизирующих излучений на глобулярные белки [6, 7].



**Рис. 3.** Денситограммы молекул бычьего сывороточного альбумина при ВУФ-облучении его образцов:

1 - контроль (необлученный образец); 2 - после ВУФ- облучения в дозе 30 кДж/м<sup>2</sup> при температуре 40 °С; 3 - после ВУФ-облучения в дозе 30 кДж/м<sup>2</sup> в трис-глициновом буфере (рН 8,3)

По оси абсцисс - длина, мм

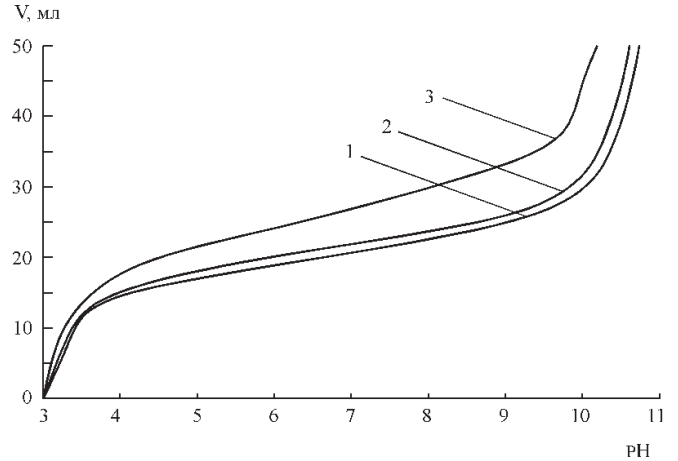
По оси ординат - оптическая плотность

**Рис. 4.** Кривые кислотно-основного титрования молекул сывороточного альбумина:

1 - контроль (необлученная пленка белка); 2 - после ВУФ- облучения в дозе 6 кДж/м<sup>2</sup>; 3 - после ВУФ-облучения в дозе 30 кДж/м<sup>2</sup>

По оси абсцисс - рН

По оси ординат - объем, мл



Поскольку эффективность фотохимических реакций повышается в области предденатурационных температур [8], то в следующей серии экспериментов нами изучены электрофоретические свойства молекул БСА после облучения вакуумным ультрафиолетом в дозе 30 кДж/м<sup>2</sup> с одновременным термостатированием при температуре 40°С в вакуумной сушилке. В данном случае наблюдали уменьшение количества электрофоретических фракций и дальнейшее увеличение подвижности самой быстрой из них до  $0,98 \pm 0,02$ . Это, по-видимому, также свидетельствует в пользу представления о процессах ассоциации, протекающих в анализируемой системе при сочетанном действии ВУФ-излучения и температуры (рис. 3).

Микроокружение, в частности изменение величины рН, влияет на квантовый выход фотохимической реакции, поэтому в следующей серии экспериментов мы изучили электрофоретические свойства молекул БСА в пленках, приготовленных с использованием 0,01 н. трис-глицинового буфера (рН 8,3) и после облучения данных пленок вакуумным ультрафиолетом. Известно [9], что при рН > 8 наблюдается изменение конформации молекулы альбумина (при указанном значении рН она “разворачивается”). После облучения в дозе 30 кДж/м<sup>2</sup> в указанных условиях также наблюдается уменьшение количества электрофоретических фракций, возможно, вследствие накопления агрегатов (рис. 3).

Таким образом, после ВУФ-облучения глобулярного белка - сывороточного альбумина - повышается его молекулярная масса, причем при облучении до-

зами, не превышающими 72 кДж/м<sup>2</sup>, происходят конформационные перестройки в молекулах белка, а при больших дозах образуются ассоциаты белковой макромолекулы.

При изучении функциональных свойств сывороточного альбумина нами зарегистрированы кривые кислотно-основного титрования его молекул. Показано, что после ВУФ-облучения пленок белка светом криптоновой барьерной лампы в дозе 6 кДж/м<sup>2</sup> не происходит изменений буферных свойств БСА. Увеличение энергетической экспозиции до 30 кДж/м<sup>2</sup> вызывает смещение кривой титрования в область меньших значений рН, что свидетельствует в пользу представления о повышении буферной емкости облученного белка (рис. 4). Наблюдаемые изменения кислотно-основных свойств ВУФ-облученной макромолекулы БСА могут быть связаны с ее разворачиванием и экспонированием титруемых зарядов на поверхность белковой глобулы.

Другими словами, ВУФ-излучение индуцирует разрыв слабых внутримолекулярных связей и увеличение объема белковой макромолекулы, сопровождаемое разрушением ее гидрофобного ядра.

## ЛИТЕРАТУРА

1. E.J. Cohn, L.E. Strong, W.L. Hughes, D.J. Mulford, J.N. Ashworth, M. Melin, H.L. Taylor // Amer. Chem. Soc. 1946. V.68. №3. P. 459-475.
2. Chen R.F. // Biol. Chem. 1967. V.242. №2. P. 173-181.
3. Пантявин А.А., Артюхов В.Г., Вашанов Г.А. // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий: Материалы XIII межреспубликанской научно-практической конференции.- В печати.
4. Соркина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков. Киев: Выща школа. 1989. 118 с.
5. Rosen C.G. // Int. J. Radiat. Biol. 1971. V.19. №6. P. 587-601.
6. Павловская Т.Е., Пасынский А.Г. // Коллоидный журнал. 1955. Т.17. №4. С. 305-314.
7. Страхов И.П., Головтеева А.А., Булгакова И.В. // Изв. вузов. Технология легкой промышленности. 1976. №4. С. 58-62.
8. Артюхов В.Г., Крючкова В.Т., Лобода Т. // Биофизика. 1979. Т.24. вып. 4. С. 598-601.
9. B.J.M. Harmsen, S.H. De Bruin, L.H.M. Janssen, J.F. Rodrigues De Miranda, J.H. Van Os // Biochemistry. 1971. V.10. №17. P. 3217-3221.