

УДК 535.373:577.32

С. Ж. ЛОЗНИКОВА¹, А. А. СУХОДОЛА²**МИКРОСЕКУНДНАЯ ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ
МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В СУСПЕНЗИИ**¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: s_loznikova@mail.ru,²Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, e-mail: sukhodola@imaph.bas-net.by

(Поступила в редакцию 07.02.2013)

Введение. Тромбоциты – безъядерные клетки крови, которым принадлежит ведущая роль в процессах гемостаза. При повреждении кровеносного сосуда тромбоциты адгезируют к сосудистой стенке, агрегируют, формируют тромб и способствуют тем самым остановке кровотечения. Ключевую роль в этом процессе играют мембранные белки тромбоцитов [1, 2]. Биологические свойства мембранных белков тесно связаны с их конформацией и внутримолекулярной динамикой (ВМД). Уникальные возможности для изучения медленной ВМД белков предоставляет метод, основанный на использовании в качестве собственной фосфоресцентной метки белка остатков одной из ароматических кислот – триптофана. Важной характеристикой фосфоресценции является ее время жизни (τ). Выраженная зависимость значений τ триптофановой фосфоресценции от молекулярной подвижности окружения хромофора и соответствие времен жизни триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре (ТФКТ) характерным временам низкочастотных флуктуаций структуры макромолекул позволяют изучать фосфоресцентным методом медленную ВМД белков в диапазоне 10^{-6} – 10 с [3–5]. Впервые ТФКТ белков в составе биологических мембран описана В. М. Мажулем и соавт. в 1976 г. [6]. Позднее показано, что в клетке способностью к ТФКТ обладают в основном мембранные белки, в то время как у большинства водорастворимых белков фосфоресценция отсутствует [7]. Этот эффект обусловлен различиями медленной ВМД водорастворимых и мембранных белков. Сделано предположение [8, 9], что ограничение медленной ВМД мембранных белков обусловлено наличием в мембране белковых ассоциатов, изоляцией белков от водного окружения в составе липидного бислоя, повышенным содержанием в них жестких α -спиралей и плотно упакованных гидрофобных участков. Большинство водорастворимых белков клетки осуществляют интенсивные внутримолекулярные движения, которые приводят к тушению ТФКТ до уровня, не позволяющего осуществлять ее надежную регистрацию. Контрастные различия в способности к ТФКТ мембранных и водорастворимых клеточных белков позволяют проводить селективный мониторинг медленной ВМД мембранных белков *in situ* без предварительного выделения их из клеток. Ранее была обнаружена и изучена миллисекундная ТФКТ мембранных белков тромбоцитов человека [10].

Целью настоящей работы являлось исследование способности к микросекундной ТФКТ мембранных белков тромбоцитов в суспензии для расширения диапазона изучаемой ВМД белков *in situ*.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили тромбоциты, выделенные из крови человека. Стабилизированная раствором антикоагулянта (Sigma-Aldrich, США) донорская кровь получена в Республиканском научно-практическом центре гематологии и трансфузиологии МЗ РБ. Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием 5 мл крови при 200 g в течение 7–10 мин при комнатной температуре. Отмытые тромбоциты получали по методике, описанной в работе [11]. Для этого пластиковые пробирки с обогащенной тромбоцитами плазмой центрифугировали при 250 g в течение 2 мин для осаждения тромбоцитов.

К осадку тромбоцитов в каждую пробирку добавляли 300 мкл буфера Иреланда (120 мМ NaCl, 15,4 мМ KCl, 1,5 мМ ЭДТА, 6 мМ глюкозы, 13,3 мМ Tris-HCl, pH 6,5), осторожно ресуспендировали тромбоциты при помощи пипетки до образования равномерной взвеси клеток. Полученную суспензию клеток вновь центрифугировали при 250 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 500 мкл буфера Иреланда и снова суспендировали при помощи пипетки до образования равномерной суспензии тромбоцитов в концентрации $2,5 \cdot 10^9$ кл/мл.

Измерения кинетики и спектров флуоресценции в микросекундном диапазоне при комнатной температуре (20 °С) проводились на автоматизированном лазерном спектрометре, созданном в Институте физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси [12]. В качестве возбуждающего излучения использовались импульсы четвертой гармоники лазера на неодиме YAG: Nd³⁺ длительностью 10 нс и длиной волны генерируемого излучения $\lambda_b = 266$ нм. Энергия возбуждающего импульса изменялась в пределах 0,1–1 мДж. Исследуемый образец находился в кварцевой кювете размером 1×1 см. Люминесценция образца под прямым углом к возбуждающему излучению фокусировалась на входную щель монохроматора МСД-1. Прошедшее через монохроматор излучение регистрировалось фотоэлектронным умножителем, сигнал с которого подавался на один из каналов аналого-цифрового преобразователя (АЦП). На второй канал АЦП подавался опорный сигнал с фотодиода, который контролировал интенсивность возбуждающего излучения. Данные АЦП обрабатывались компьютером. Для работы лазерного спектрометра была создана программа, с помощью которой можно управлять шаговым двигателем монохроматора, накапливать импульсы люминесценции с последующим усреднением результатов измерений и визуализацией полученных данных. Программа позволяет измерять спектры люминесценции, разрешенные во времени, а также кинетику люминесценции на отдельных длинах волн регистрации. Поскольку молекулы кислорода эффективно тушат возбужденные триплетные состояния, в том числе и триптофанилов, все исследования флуоресценции выполнены в бескислородной среде. Удаление кислорода из суспензии тромбоцитов осуществляли с помощью сульфита натрия (хч, Реахим, Россия) в конечной концентрации 50 мМ [13]. Время инкубации растворов с сульфитом натрия составляло 20 мин. Остаточная концентрация кислорода в растворах не превышала 1–2 нМ. Кинетику затухания ТФКТ суспензии тромбоцитов анализировали путем аппроксимации суммой трех экспоненциальных компонент по методу наименьших квадратов по формуле:

$$I(t) = I_0 \cdot (\alpha_1 \exp^{-t/\tau_1} + \alpha_2 \exp^{-t/\tau_2} + \alpha_3 \exp^{-t/\tau_3}),$$

где $I(t)$ – интенсивность флуоресценции; I_0 – интенсивность флуоресценции в начальный момент времени; τ_1 – время жизни быстрого компонента; τ_2, τ_3 – время жизни медленного компонента; α_1 и α_2, α_3 – вклады быстрого и медленных компонент соответственно. Для оценки адекватности выбранной модели экспериментальным данным использовали анализ характера временной зависимости средневзвешенных остатков (разности между измеренными значениями функции затухания и восстановленными значениями).

Результаты и их обсуждение. Обнаружена ТФКТ тромбоцитов человека в микросекундном диапазоне. На рис. 1 представлен спектр ТФКТ тромбоцитов человека, измеренный через 500 мкс после возбуждающего импульса, при возбуждении излучением длины волны $\lambda_b = 266$ нм. Спектр ТФКТ тромбоцитов имеет три максимума при 417, 454 и 490 нм и локализован в области, характерной для триптофансодержащих белков, что свидетельствует о триптофановой (белковой) природе флуоресценции клеток в суспензии [3–7].

Микросекундная кинетика затухания ТФКТ тромбоцитов в суспензии представляет собой суперпозицию нескольких экспонент (рис. 2). Анализ кривой затухания позволил установить, что кривая затухания микросекундной флуоресценции тромбоцитов хорошо аппроксимируется суммой трех экспонент с временами жизни: $\tau_1 = 30,5 \pm 5$ мкс, $\tau_2 = 107,7 \pm 5,7$ мкс, $\tau_3 = 427,6 \pm 121,9$ мкс. Конкретные значения параметров ТФКТ несколько отличались у тромбоцитов, полученных из крови различных доноров.

Как известно, при комнатной температуре способностью к флуоресценции обладают триптофанылы, локализованные в участках макромолекулы с ограниченной ВМД (жесткой структурой).

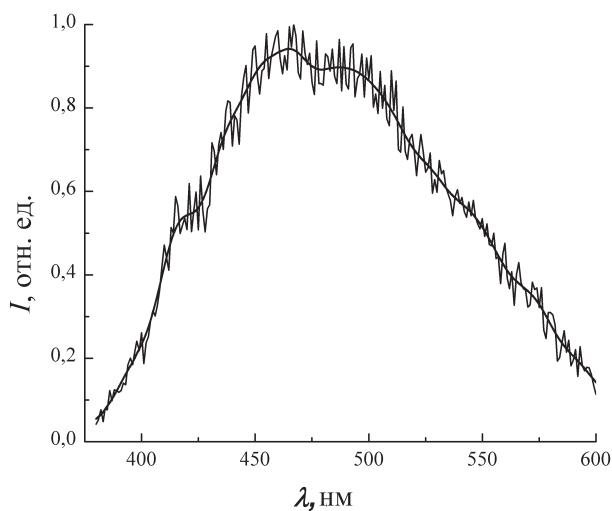


Рис. 1. Спектр триптофановой флуоресценции при комнатной температуре тромбоцитов, измеренный через 500 мкс после возбуждающего импульса, $\lambda_{\text{в}} = 266$ нм. Суспензия тромбоцитов в 0,15 М буфере Дюльбекко, pH 7,35. Концентрация тромбоцитов $2,5 \cdot 10^8$ кл/мл

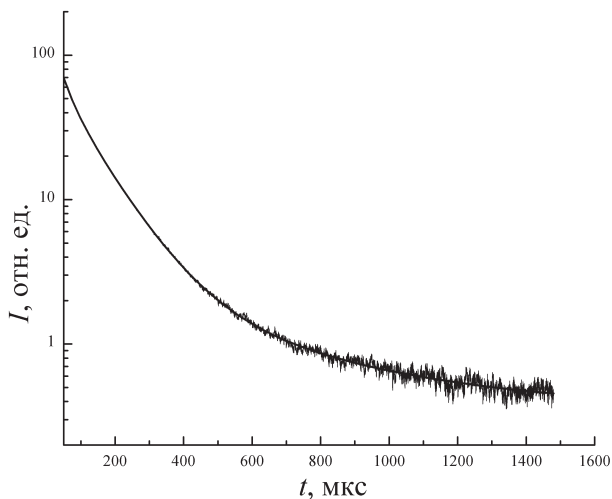


Рис. 2. Кинетика микросекундной триптофановой флуоресценции при комнатной температуре тромбоцитов, $\lambda_{\text{в}} = 266$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 450$ нм. Суспензия тромбоцитов в 0,15 М буфере Дюльбекко, pH 7,35. Концентрация тромбоцитов $2,5 \cdot 10^8$ кл/мл

ценции, обусловленным существованием в белках выраженных тепловых флуктуаций конформационных элементов глобулы с микросекундными характерными временами. Лишь в тех относительно редких случаях, когда медленная ВМД белков в растворе существенно заторможена, они проявляют способность к микросекундной ТФКТ. Выявленная способность тромбоцитов к ТФКТ свидетельствует о том, что его медленная ВМД существенно ограничена по сравнению с большинством водорастворимых белков.

При сравнении способности к ТФКТ мембранных и водорастворимых белков животных клеток (гепатиты крысы, лимфоциты периферической крови человека) и микроорганизмов (дрожжи *Candida utilis*, бактерии *Escherichia coli*) установлено, что в миллисекундном и секундном диапазонах флуоресценция клетки определяется белками, включенными в состав мембранных структур. У подавляющей части белков цитоплазмы, карิโอплазмы и матриксов органелл миллисекундная ТФКТ затухает – их значения τ и квантовый выход на 2–3 порядка ниже, чем у мембранных белков.

Хромофоры, расположенные в жестком гидрофобном ядре глобулы, обладают значительно большими значениями τ ТФКТ, чем хромофоры, находящиеся в периферических участках белковой глобулы [3–5]. Представляет особую важность то обстоятельство, что многие процессы, протекающие в клетке на молекулярном и мембранном уровнях, реализуются в той же временной шкале, что и низкочастотные ВМД белков [5, 8]. Миллисекундная ВМД структуры белка отражает передвижения между фиксированными положениями колец ароматических аминокислот, происходящие во временном диапазоне 10 мкс – 10 мс, и движения крупных фрагментов полипептидной цепи, смещения доменов и субъединиц, происходящие во временном диапазоне 10 мкс – 10 с.

Кинетические кривые затухания ТФКТ тромбоцитов триэкспоненциальны, что отражает существование в белке структур, дискретно различающихся по жесткости. Со временем жизни τ_2 , τ_3 фосфоресцируют триптофаны, локализованные в тех местах, где ВМД белков заторможена в наибольшей степени. Обычно участки с такой жесткой структурой находятся в глубине гидрофобного ядра глобулы. Триптофаны, фосфоресцирующие со временем жизни τ_1 включены в состав участков структур белков с умеренно лабильной ВМД. Существенно, что информация о ВМД белков получена на основании анализа фосфоресцентных свойств естественных хромофоров (триптофанов), а не с использованием фосфоресцентных меток, способных самостоятельно изменить структурно-динамическое состояние белковых макромолекул.

Как известно, у подавляющего большинства белков в растворе ТФКТ не регистрируется [3–7]. Это объясняется эффективным динамическим тушением триптофановой флуоресценции.

Лишь в тех относительно редких случаях, когда водорастворимая фракция содержит в повышенной концентрации белки с аномально высоким квантовым выходом (типа альдолазы, гликогенфосфорилазы или бактериальной щелочной фосфатазы), они могут вносить ощутимый вклад в фосфоресцентный сигнал клетки [14–19]. Причины контрастных различий ВМД мембранных и водорастворимых белков недостаточно ясны. Прежде всего, высокая конформационная жесткость интегральных белков мембран может быть объяснена высоким содержанием α -спиралей и гидрофобных участков – структур с ограниченной ВМД. Затормаживанию ВМД способствует и наличие в мембране белковых ассоциатов [20]. Кроме того, флуктуации элементов структуры белка в мембране могут ограничиваться в результате изоляции макромолекул от водного окружения в составе липидного бислоя. Необходимо отметить, что процедура изоляции из клеток мембранных белков способна изменить структурно-динамическое состояние мембранных белков. Так, в результате изоляции мембран из клеток *E. coli* возрастает доля фрагментов структуры белков с расторможенной ВМД [16]. Таким образом, опасность искажения информации о нативной динамике структуры белков в процессе получения мембранных препаратов демонстрирует преимущества фосфоресцентного метода, позволяющего осуществлять мониторинг ВМД мембранных белков в клетках *in situ*, без процедуры предварительной изоляции мембран из клетки.

Заключение. Обнаружена микросекундная ТФКТ мембранных белков тромбоцитов человека в суспензии и изучены ее спектрально-кинетические характеристики. Полученные результаты свидетельствуют о высокой конформационной жесткости мембранных белков тромбоцитов, существенно превышающей таковую у большинства водорастворимых белков. Способность мембранных белков тромбоцитов к микросекундной ТФКТ открывает возможность изучения их функциональной активности *in situ* в норме и при развитии патологии.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б11-059).

Литература

1. Lancé M. D., Sloep M., Henskens Y. M., Marcus M. A. // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2012. Vol. 18, № 6. P. 561–568.
2. Van der Spuy W. J., Pretorius E. // Rev. Neurosci. 2012. Vol. 23, № 3. P. 269–278.
3. Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Щербин Д. Г. // Биофизика. 2000. Т. 45, № 6. С. 965–989.
4. Gonnelli M., Strambini G. B. // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 42. P. 13847–13857.
5. Mazhul V. M., Timoshenko A. V., Zaitseva E. M. et al. // Reviews in Fluorescence 2008 / Ed. C. D Geddes. N. Y.: Springer, 2010. Vol.5. P. 37–67.
6. Мажуль В. М., Ермолаев Ю. С., Бобров В. А. и др. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1976. № 6. С. 52–56.
7. Мажуль В. М., Конев С. В., Ермолаев Ю. С. и др. // Биофизика. 1983. Т. 28, № 6. С. 980–988.
8. Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Щербин Д. Г. // Биофизика. 2000. Т. 45, № 6. С. 965–989.
9. Мажуль В. М., Галец И. В. // Биофизика. 2006. Т. 51, № 3. С. 413–417.
10. Mazhul V., Chernovets T., Zaitseva E., Shcharbin D. // Cell. Biol. Int. 2003. Vol. 27, № 7. P. 571–578.
11. Nathan I., Fleischer G., Livne A. et al. // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254, № 19. P. 9822–9828.
12. Борисевич Н. А., Суходола А. А., Толсторожев Г. Б. // Журн. прикл. спектр. 2007. Т. 74., № 3. С. 341–345.
13. Mazhul V. M., Scherbin D. G. // Proc. SPIE, Advances in Fluorescence Sensing Technology III. 1997. Vol. 2980 P. 507.
14. Мажуль В. М., Конев С. В., Ермолаев Ю. С. и др. // Биофизика. 1983. Т. 28, № 6. С. 980–988.
15. Mazhul V. M., Mjakinnik I. V., Volkova A. N. // Proc. SPIE. 1994. Vol. 2370. P. 706–710.
16. Мажуль В. М., Кананович С. Ж., Прокопова Ж. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2001. № 1 С. 60–64.
17. Кананович С. Ж., Мажуль В. М., // Журн. прикл. спектр. 2003. Т. 70, № 5. С. 673–677.
18. Mazhul V. M., Ivin I. V., Shcharbin D. G. et al. // Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions / Eds. J. Greve, G. J. Puppels, C. Otto. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1999. P. 21–22.
19. Mazhul V., Shcherbin D., Zavodnik I. et al. // Cell. Biol. Int. 1999. Vol. 23, № 5. P. 345–350.
20. Конев С. В. // Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. Мн., 1987.

S. G. LOZNIKOVA, A. A. SUHODOLA

MICROSECOND ROOM TEMPERATURE TRYPTOPHAN PHOSPHORESCENCE OF MEMBRANE PROTEINS OF HUMAN PLATELETS

Summary

The room temperature tryptophan phosphorescence (RTTP) of platelets in microsecond range was found. Its spectral and kinetic parameters were studied. The role of membrane proteins in RTTP of platelets was discussed.