

Термоденатурация микросомальных белков в присутствии глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида

А.В. Зинченко, Е.В. Онищенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Белок-липидные и белок-белковые взаимодействия – решающие факторы при сохранении целостности биологических мембран.

Для исследования кооперативных явлений в отдельных мембранных компонентах и целостных структурах одним из наиболее информативных является метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), позволяющий охарактеризовать структурные и термодинамические особенности биологических мембран. Данный метод ДСК использовался для изучения мембран эритроцитов. В работе [6] исследовано дестабилизирующее действие этанола на белки эритроцитарных мембран человека в широком диапазоне значений ионной силы и pH; показано, что в присутствии этанола наблюдается выраженная дестабилизация белков мембран, которая может быть обусловлена нарушением белок-липидных взаимодействий. В работе [1] изучены индуцированные теплом структурные переходы в мембране эритроцитов собаки.

Микросомальные мембраны могут служить хорошей моделью для исследования влияния неэлектролитов на термодинамическую стабильность мембранных белков. Фракция микросом представляет собой суспензию морфологически замкнутых пузырьков с достаточно хрупкой мембраной, принципы построения которой не противоречат классической модели трехслойной мембраны с сильными гидрофобными взаимодействиями между неполярными хвостами жирных кислот и белками, расположенными на поверхности бислоя, что обеспечивает прикрепление последних к мембране.

Известно, что воздействие низких температур на нативные структуры клеток приводит к сложным изменениям в молекулярных компонентах мембран [4, 13]. Имеющиеся в настоящее время результаты экспериментальных исследований указывают на то, что неэлектролиты достаточно сложным образом влияют на микросомальные мембраны [5, 8, 9], углеводы значительно модифицируют структуру мембран микросом [10].

В работе [8] исследовали влияние диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида на изменение величины мембранного потенциала *E.coli* до и

после замораживания. Отмечено, что диэтилсульфоксид модифицирует мембрану сильнее, чем ДМСО.

Однако действие наиболее широко применяемых криопротекторов и замораживания на микросомальные мембраны изучены недостаточно. Для криобиологии представляет интерес использование микросомальных мембран, как модельного объекта для изучения действия замораживания и криопротекторов на мембранные системы.

Цель работы – изучение влияния некоторых криопротекторов на температуру и энтальпию тепловой денатурации белков микросомальных мембран до и после замораживания. Для исследования нами были выбраны криопротекторы (глицерин (Гл), 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и ДМСО), которые применяются не только в лабораторных исследованиях, но и на практике для криоконсервирования различных биологических объектов.

Материалы и методы

Объекты исследования. В работе использовали крыс-самцов линии Вистар весом 180-200 г. Микросомальную фракцию получали методом дифференциального ультрацентрифугирования [2]. Микросомы суспендировали в среде с 50 мМ трис-НС1 (pH=7,2). Содержание белка в суспензии, определяемое по методу Лоури в модификации Миллера [12], составляло 20-40 мг/мл. Микросомы в концентрации, соответствующей содержанию белка 10-12 мг/мл хранили при -196°C , затем смешивали с растворами криопротекторов в соотношении 1:1. Конечная концентрация Гл, ДМСО и 1,2-ПД в микросомальной суспензии составляла 5, 10, 20, 30 масс %, белка – 5 ± 6 мг/мл. Образцы охлаждали до -196°C погружением в жидкий азот с последующим нагревом на водяной бане при 37°C . Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре (ДАСМ-4) производства СКББП РАН, (Пушино). Уровень шума при сканировании составлял 5×10^{-7} Вт, скорость сканирования – $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при избыточном давлении 2,5 атм. Температуру перехода определяли как температуру максимума на кривой зависимости теплопоглощения от температуры.

Адрес для корреспонденции: Зинченко А.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41; факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Результаты и обсуждение

Задача первого этапа исследований – обоснование возможности использования микросом, хранившихся при температуре -196°C для дальнейшего изучения действия криопротекторов на стабильность микросомальных белков. С этой целью были сопоставлены температуры и теплоты денатурации микросомальных белков, измеренные методом ДСК для образцов микросом до и после замораживания до -196°C . Исследовали образцы микросом без криопротектора и с добавками 20 масс % Гл, ДМСО или 1,2-ПД. Полученные значения температур и теплоты денатурации микросомальных белков представлены на рис. 1, 2.

Теплоты денатурации белков без криопротекторов до и после замораживания отличаются в пределах 27%. Отличия теплот денатурации микросомальных белков без замораживания и после него в присутствии 20% ДМСО — в пределах 26%. В присутствии Гл и 1,2-ПД отличия теплот денатурации микросомальных белков находятся в пределах погрешности эксперимента.

Температура денатурации микросомальных белков после замораживания без криопротекторов снижается на $1,5^{\circ}\text{C}$. В присутствии криопротекторов наблюдаются незначительные отличия в температурах денатурации микросомальных белков (в пределах $1,5^{\circ}\text{C}$) до и после замораживания.

Конформационная стабильность микросомальных белков практически не меняется, несмотря на уменьшение их количества после замораживания, на что указывает снижение ДН. На основании полученных результатов мы использовали для дальнейших исследований микросомы, хранившиеся при температуре -196°C .

Второй этап работы – изучение влияния криопротекторов при концентрациях 5-30 масс % на термодинамические параметры денатурации микросомальных белков.

Термограммы денатурации микросомальных белков в среде с различной концентрацией Гл представлены на рис. 3. Микросомальные мембраны до и после замораживания характеризуются одним достаточно размытым тепловым переходом при $54,5$ и $53,0^{\circ}\text{C}$ соответственно. Данный пик обусловлен денатурацией белковой компоненты микросомальных мембран [7]. Нами были получены калориметрические записи теплопоглощения для микросом в присутствии 1,2-ПД и ДМСО указанных концентраций. Эти кривые имеют один размытый пик плавления белковой части, однако несколько отличающийся по интенсивности для систем с разными криопротекторами. На основании полученных термограмм построены зависимости теплоты ΔH и

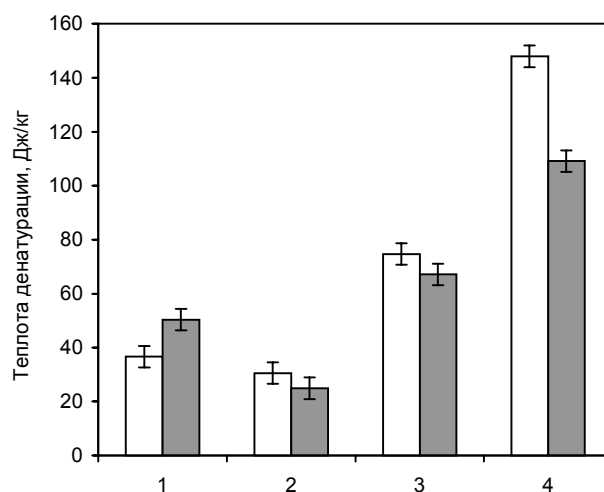


Рис. 1. Теплота денатурации микросомальных белков: 1 – микросомы без добавления криопротектора; 2 – микросомы + 20% Гл; 3 – микросомы + 20% 1,2-ПД; 4 – микросомы + 20% ДМСО; □ – до замораживания; ■ – после замораживания.

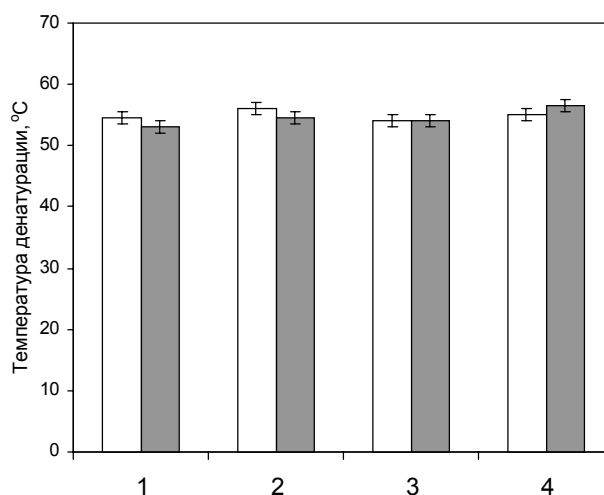


Рис. 2. Температура денатурации микросомальных белков: 1 – микросомы без добавления криопротектора; 2 – микросомы + 20% Гл; 3 – микросомы + 20% 1,2-ПД; 4 – микросомы + 20% ДМСО; □ – до замораживания; ■ – после замораживания.

температуры T_d денатурации микросомальных белков от концентрации криопротекторов в растворе (рис. 4, 5).

Теплота плавления белков микросомальных мембран при добавлении Гл и 1,2-ПД изменяется однотипно при росте концентрации криопротекторов. До 10 масс % наблюдается увеличение теплового эффекта плавления белков, а свыше – плавное уменьшение (рис.4). Однако зависимость теплоты денатурации ΔH микросомальных белков от концентрации ДМСО в среде имеет более сложный характер. При концентрации 10 масс % наблюдается минимум ΔH , в диапазоне концентраций 10-20 масс% ДМСО – рост энтальпии денатурации, при концентрации 20-30 масс % – ΔH не меняет значение.

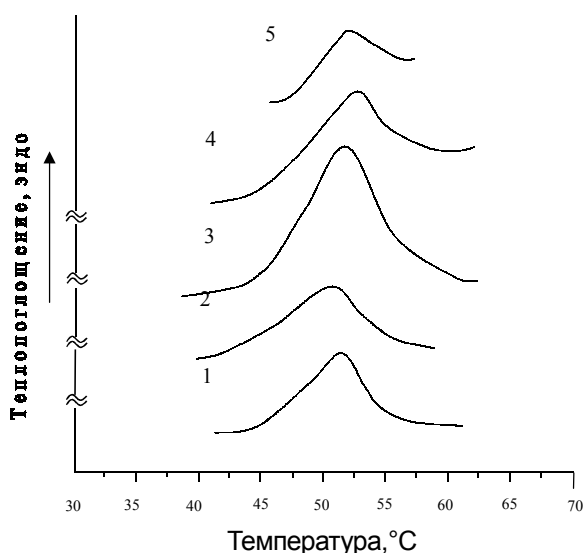


Рис. 3. ДСК-термограммы, снятые при нагреве суспензий микросом после замораживания в присутствии Гл: 1 – контроль; 2 – 5 масс % Гл; 3 – 10 масс % Гл; 4 – 20 масс % Гл; 5 – 30 масс % Гл.

Температура денатурации микросомальных белков незначительно возрастает при увеличении концентрации всех исследованных нами криопротекторов в среде от 10-15 до 30 масс % (рис. 5). В области концентраций около 20% Гл и ДМСО наблюдается максимум температуры денатурации микросомальных белков (рис.5), который в большей степени выражен в присутствии ДМСО и в меньшей степени в присутствии Гл. На графике зависимости температуры денатурации микросомальных белков от концентрации 1,2-ПД отмечается уменьшение T_d на 1°C в области 10 масс% 1,2-ПД, а затем ее монотонный рост до 55°C при концентрации 30 масс% 1,2-ПД.

Из приведенных результатов (рис. 4, 5), видно что используемые криопротекторы во всем исследуемом диапазоне концентраций оказы-

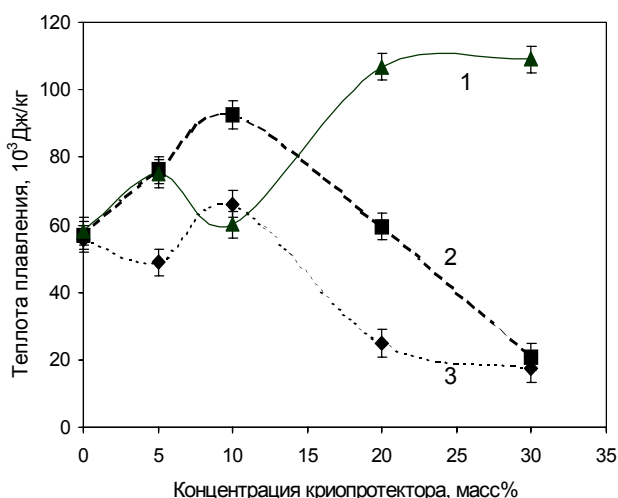


Рис. 4. Температура плавления микросомальных белков в присутствии криопротекторов: 1 – ДМСО; 2 – 1,2-ПД; 3 – ГЛ

вают значительное влияние на термостабильность микросомальных белков. Вероятно, такие изменения обусловлены их структурными перестройками. Так, в области возрастания энтальпии и температуры денатурации, очевидно, происходит стабилизация молекул белков, в то время как при уменьшении этих показателей – разрыхление или разворачивание белковой глобулы. По данным исследований [3, 11], гидратное окружение белков сильно подвержено действию органических растворителей, в том числе и различных диолов. При этом происходит замещение молекул воды на молекулу неэлектролита и формируются водородные связи между молекулой криопротектора и поверхностью молекулы белка, увеличивающие сольватный слой.

Наблюдаемые незначительные отличия на зависимостях ΔH и T_d от концентрации Гл и 1,2-ПД могут быть обусловлены, тем, что Гл является трехатомным спиртом, а 1,2-ПД – двухатомным, а также наличием гидрофобной группы CH_3 в молекуле пропандиола. Вероятно, и характер встраивания этих полиолов в гидратную оболочку будет сходен (рис. 4, 5).

Молекулы ДМСО содержат полярную группу $=\text{S}=\text{O}$ и две гидрофобные CH_3 -группы, что позволяет им проявлять как гидрофобные, так и гидрофильные свойства. Этим можно объяснить характер влияния ДМСО на изменение энтальпии денатурации микросомальных белков. Так, при содержании ДМСО 20-30 масс % энтальпия денатурации увеличивается почти в 2 раза по сравнению с контрольным образцом, энтальпия плавления которого составляет $58 \times 10^{-3} \text{ Дж} \times \text{кг}^{-1}$. Максимальное повышение температуры денатурации белков зарегистрировано в присутствии 20 масс % ДМСО и составляет $5,5^\circ\text{C}$. на основании этих данных можно говорить о сильном взаимо-

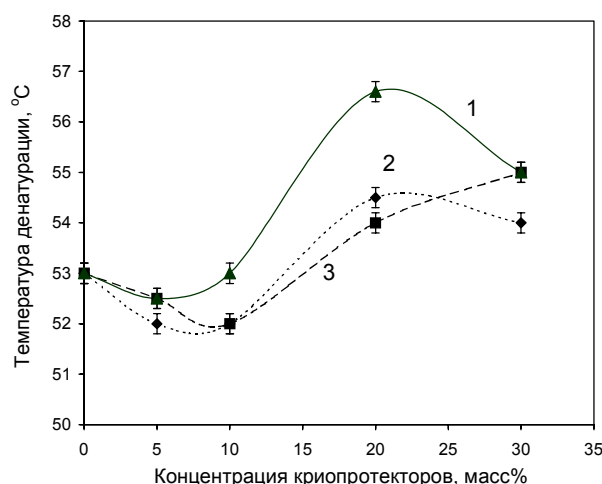


Рис. 5. Температура денатурации микросомальных белков в присутствии криопротекторов: 1 – ДМСО; 2 – 1,2-ПД; 3 – ГЛ

действии ДМСО с гидратной оболочной микросомальных белков, вероятно, как по гидрофильному, так и гидрофобному механизмам.

Выводы

Микросомы достаточно сложным образом взаимодействуют с криопротекторами. Разный характер зависимостей T_d и ΔH от концентрации криопротекторов в суспензиях микросом свидетельствует об одновременном проявлении разных факторов во взаимодействиях криопротекторов с белками микросомальных мембран как стабилизирующих, так и дестабилизирующих молекулу белка. Низкие концентрации криопротекторов (до 5-10 масс%), воздействуя на гидратное окружение микросомальных белков, вероятно, оказывают стабилизирующее действие на микросомальные мембраны, в то время как более высокие – дестабилизирующее при использовании Гл и 1,2-ПД. Отсюда следует, что процедура криоконсервирования биологических объектов требует их отмывки от криопротекторов.

Литература

1. Акоев В.Р., Бобровский Р.В., Жадан Г.Г. и др. Калориметрическое исследование структурных переходов в мембранах эритроцитов собаки // Биологические мембраны.– 1991.– Т. 8, N1.– С. 78-84
2. Арчаков А.И. Микросомальное окисление.– М.: Наука, 1975.– 327 с.
3. Белова А.Б., Можеев В.В., Левашов А.В. и др. Взаимосвязь физико-химических характеристик органических растворителей с их денатурирующей способностью по отношению к белкам // Биохимия.– 1991.– Т. 56, №4.– С. 1923-1938.
4. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 256 с.
5. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Гулевский А.К. Молекулярно-клеточная концепция криповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов // Криобиология.– 1987.– №2.– С. 3-10.
6. Заводник И.Б., Лапшина Е.А., Степура И.И. Термостабильность эритроцитарных мембран в присутствии этанола // Биофизика.– 1994.– Т. 39, Вып.3.– С. 470-474.
7. Луневич А.Я. Термотропные свойства цитохром Р-450-содержащих модельных и биологических мембран: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Минск, 1987.– 20 с.
8. Маркарян Ш.А., Баграмян К.А., Аракелян В.Б. Мембранный потенциал до и после глубокого замораживания *E. coli* в присутствии диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида // Биофизика.– 2002.– Т. 75, Вып. 2.– С. 315-317.
9. Ancho doguy T.Y., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology.– 1987.– №4.– P. 324-331.
10. Crowe L.M., Mouradian R., Crowe J.H. et al. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities // Biochim. Biophys. Acta.– 1984.– Vol. 769, N1.– P. 141-150.
11. Gekko K., Morikava T. Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol-water mixtures // J. Biochem.– 1981.– Vol. 90.– P. 39-50.
12. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Analyt. Chem.– 1959.– Vol. 31, N5.– P. 964-966.
13. Yamazaki H., Inoue K., Turvy C.G. et al. Effect of freezing, thawing and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes // Drug. Metab. Dispos.– 1997.– N2.– P. 168-174.