

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА 1-АНИЛИНОНАФТАЛИН-8-СУЛЬФОНАТА С ПРЕПАРАТАМИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

А. Е. ЗАКАРЯН, Э. С. СЕКОЯН, А. Р. ЕГИАЗАРЯН

Исследовано взаимодействие флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната с препаратами плазматических мембран, выделенных из печени кроликов. Показано, что белки и препараты плазматических мембран индуцируют флуоресценцию анионного красителя 1-анилинонафталин-8-сульфоната. Флуоресценция зонда чувствительна к ионам водорода, изменяется в присутствии Ca^{2+} и ганглиозидов.

Изучение структурной и молекулярной организации биологических мембран, их функционирования представляет большой интерес в современной биологии и медицине. Перспективность указанных вопросов, как показали исследования последних лет, выполненные с помощью современных физических и физико-химических методов [1], не вызывает сомнений.

В настоящее время широкое применение получил метод флуоресцентных зондов, который может дать конкретную информацию о средстве разнообразных лигандов к компонентам мембранных структур и о различных конформационных перестройках, происходящих в этих образованиях [2, 3]. Многочисленными исследователями в качестве флуоресцентного зонда используется 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС⁻) [4, 5]. С помощью АНС⁻ были исследованы: взаимное расположение и подвижность полярных групп на поверхности мембран [6], структурные переходы в сывороточном альбумине человека в условиях различных значений рН среды [7, 8], конформационные изменения миозина и стабилизирующее влияние АТФ на последний при действии различных денатурирующих агентов [9, 10], сложных белково-липидных комплексов [11], а также связывание различных неорганических ионов с поверхностями биологических мембран [12].

В представленной работе приводятся экспериментальные данные, полученные при взаимодействии АНС⁻ с препаратами плазматических мембран в присутствии ганглиозидов и ионов кальция.

Материал и методика. Выделение препаратов плазматических мембран (ПМ) из печени кроликов проводилось по методу Нигама [13] на ультрацентрифуге VAC-60 z (ГДР). Количество мембранных препаратов в испытуемых пробах составляло в среднем 0,1 мг/мл по белку, определяемому методом Лоури. Рабочая концентрация АНС⁻ равнялась 10^{-4} мг/мл. Все растворы готовились на 0,05-молярном трис-аминометан-

НСI буфере со значениями рН среды 2,15; 7,2; 9,1. Спектрофлуориметрический анализ осуществлялся на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A фирмы «Hitachi», при этом условия регистрации (щели возбуждающего и регистрируемого света, усиление сигнала) были подобраны таким образом, чтобы собственная флуоресценция АНС— равнялась нулю.

В работе были использованы: сывороточный альбумин человека (САЧ) фирмы «Reanal», гамма-глобулин, пепсин, диметилформамид (ДМФ)—все отечественного производства—и ганглиозиды*, выделенные из серого вещества головного мозга людей, погибших от несчастных случаев.

Результаты и обсуждение. Прежде всего нами было установлено, что максимум возбуждения и максимум флуоресценции АНС— существенно не изменяются при различных значениях рН среды (2,15; 7,2; 9,1), хотя интенсивность флуоресценции находится в сильной зависимости от концентрации ионов водорода.

Учитывая тот факт, что ряд красителей, в том числе и АНС—, взаимодействует в основном с белковыми компонентами биологических мембран, и имея в виду гетерогенность этих структур, мы провели эксперименты с целью изучения взаимодействия АНС— с различными белками (САЧ, гамма-глобулин, пепсин) при различных концентрациях ионов водорода (рис. 1). Следует отметить, что указанные белки не однознач-

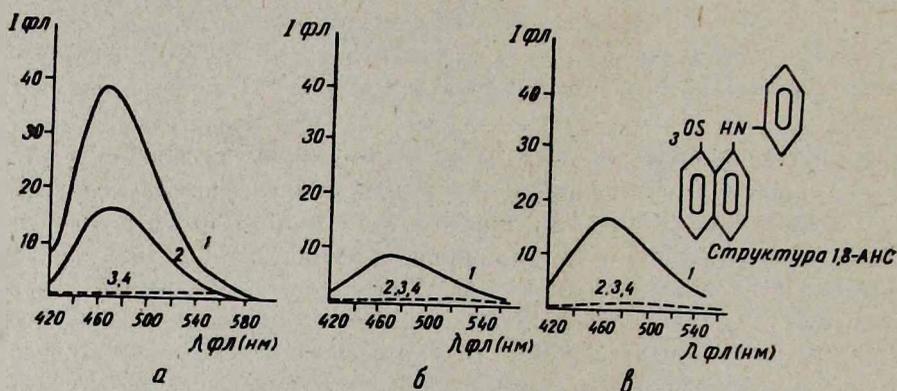


Рис. 1. Флуоресценция АНС— в присутствии белков при различных значениях рН среды: а—2,15; б—7,2; в—9,1; 1—АНС— +САЧ; 2—АНС— + гамма-глобулин; 3—АНС— +пепсин; 4—АНС—.

но влияют на интенсивность флуоресценции красителя. Пепсин, к примеру, не приводит к сколько-нибудь заметному усилению флуоресценции, с гамма-глобулином краситель заметно флуоресцирует лишь при рН 2,1, при дальнейшем подщелачивании флуоресценция полностью исчезает. Что касается взаимодействия АНС— с САЧ, то следует сказать, что при переходе от кислой среды (рН 2,15) к нейтральной (рН 7,2) происходит резкое уменьшение интенсивности флуоресценции (на 25% по сравнению с таковой при рН 2,15). Однако при значении рН 9,1 она

* Ганглиозиды были любезно предоставлены О. П. Соцким.

зновь увеличивается. В целом эти данные согласуются с литературными [14]. На основании полученных результатов неоднозначное взаимодействие АНС с различными белками можно объяснить разной природой и адсорбционной возможностью последних. Влияние рН среды на интенсивность флуоресценции, вероятно, свидетельствует о частичных конформационных перестройках белковой молекулы.

В последующих экспериментах были исследованы выделенные нами препараты плазматических мембран. Согласно полученным данным (рис. 2), ПМ резко интенсифицируют флуоресценцию красителя, как и в

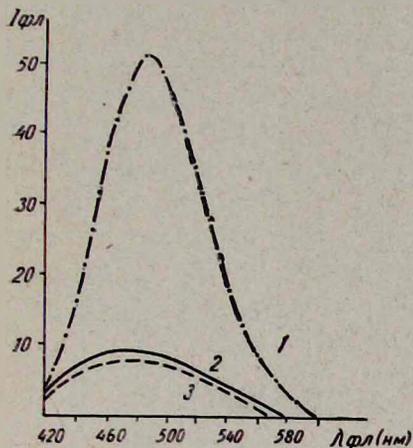


Рис. 2. Изменение флуоресценции системы АНС—ПМ при различных значениях рН среды: 1—2,15; 2—7,2; 3—9,1.

случае с белками, что, как нам кажется, является свидетельством его взаимодействия с белковыми компонентами мембран. Можно допустить, что механизм индуцирования флуоресценции объясняется прежде всего уменьшением подвижности связанного красителя в результате его фиксации на поверхности белок-липидного комплекса. В пользу такого предположения говорит частично тот факт, что при подщелачивании среды, когда суммарный заряд на поверхности белкового слоя мембран меняется, происходит освобождение связанных молекул АНС с последующим уменьшением флуоресценции. Учитывая структуру АНС, нетрудно допустить, что участок его связывания и место флуоресценции находятся в разных концах зонда. В целом следует отметить, что подобное уменьшение подвижности молекул АНС, возможно, равнозначно эффекту поляризации, при котором обычно наблюдается увеличение выхода флуоресценции. Изменение интенсивности флуоресценции АНС в присутствии препаратов ПМ в зависимости от рН среды может быть также обусловлено некоторыми нарушениями конформации мембранных белков, что, возможно, приводит к изменению адсорбционной способности мембранной поверхности для красителя [15]. Об этом свидетельствует тот факт, что ДМФ, являющийся денатурирующим агентом и конкурируя за образование водородных связей, вызывает резкое усиление флуоресценции при изменении рН среды в указанных пределах. Между тем, добавление препаратов ПМ в этих условиях не только не повышает

интенсивность флуоресценции АНС⁻, но и несколько (на 15—20%) подавляет ее. Подтверждают это также результаты экспериментов, проведенных в присутствии 7-молярной мочевины, которые показали резкое торможение флуоресценции системы АНС⁻—ПМ (при рН 2,15—более чем на 60%, а при других значениях — почти полностью).

Сорбционная поверхность препаратов ПМ тестировалась также в присутствии ионов кальция (рис. 3), действие которого на мембранные структуры достаточно хорошо изучено. Установлено, что увеличение концентрации Ca²⁺ ведет к заметному усилению флуоресценции системы АНС⁻—ПМ и что это увеличение носит линейный характер. Подоб-

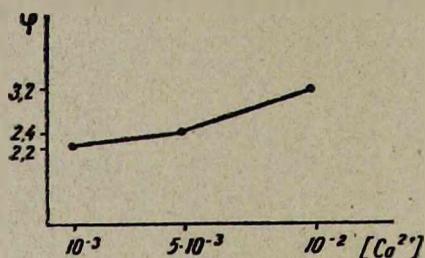


Рис. 3. Влияние концентрации ионов кальция на коэффициент усиления флуоресценции (K) системы АНС⁻—ПМ,

$$\left(K = \frac{I(\text{АНС}^- - \text{ПМ}) + I(\text{АНС}^- - \text{ПМ}) + \text{Ca}^{2+}}{I(\text{АНС}^- - \text{ПМ})} \right).$$

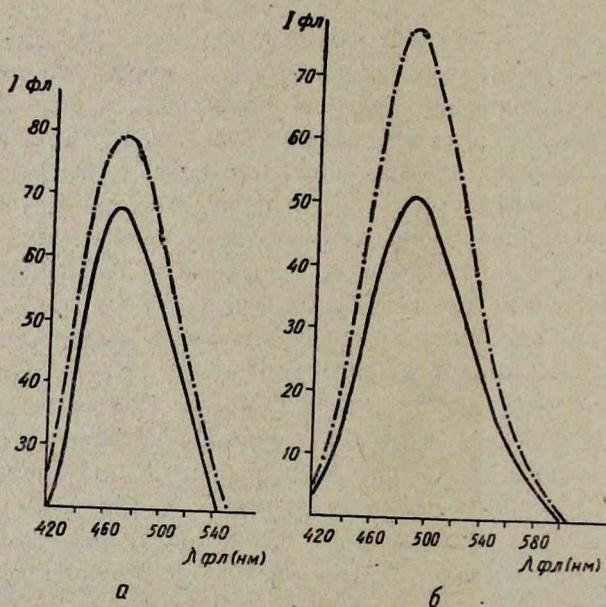


Рис. 4. Взаимодействие ганглиозидов с препаратами ПМ в трис-аминометан-НСI буфере, рН 7,2 (а), и в 50% растворе ДМФ (б).

— АНС⁻—ПМ, — · — АНС⁻—ПМ в присутствии ганглиозидов (100 мкг/мл).

ное действие Ca^{2+} , вероятно, объясняется стабилизацией поверхности мембранных структур, что было отмечено еще в работе Волоча [16]. Нам кажется, что стабилизация обеспечивается в основном за счет блокирования отрицательных зарядов мембранных белков, улучшающего условия адсорбции АНС⁻.

В дальнейшем было исследовано изменение флуоресценции системы АНС⁻—ПМ в присутствии ганглиозидов. Предполагалось, что ганглиозиды, являясь сложной структурой липидной природы и характерными компонентами плазматических мембран, могут взаимодействовать с последними и изменять их конформацию, а следовательно, и адсорбционную способность. Установлено, что добавление их к системе АНС⁻—ПМ приводит к некоторому увеличению флуоресценции (на 10—15%), причем это увеличение лучше выявляется при нейтральных значениях рН среды (рис. 4 а). Это, возможно, обусловлено связыванием ганглиозидов с мембранами (вероятно, за счет взаимодействия с липидными компонентами последних), приводящему к увеличению адсорбционной поверхности для красителя, поскольку при отсутствии мембранных препаратов они не влияют на флуоресценцию АНС⁻. Взаимодействие ганглиозидов с препаратами ПМ было более наглядным в опытах с 50%-ным раствором ДМФ (рис. 4 б), что свидетельствует об осуществлении его на уровне водородных и других слабых связей.

Таким образом, приведенные экспериментальные данные показывают, что анионный краситель АНС⁻ хорошо взаимодействует с препаратами плазматических мембран, и это взаимодействие сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции, характерной для зонда. Тестирование ПМ различными факторами в проведенных нами экспериментах свидетельствует о возможности получения информации о конформационных сдвигах с помощью флуоресцентного зонда АНС⁻.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики,
Ереванский государственный медицинский институт,
кафедра фармакологии

Поступило 28.XII 1977 г.

**1,8-ԱՆՍ ՖԼՈՒՈՐԵՍԿԵՆՏԱՅԻՆ ԶՈՆԴԻ ԵՎ ՊԼԱՉՄԱՏԻԿ
ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ՊՐԵՊԱՐԱՏՆԵՐԻ ՓՈՆԵԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

Ա. Ե. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Է. Ս. ՄԵԿՈՅԱՆ, Ա. Ռ. ՆՂԻԱԶԱՐՅԱՆ

Բացահայտված է, որ որոշ սպիրտակուցների և թաղանթային պրեպարատների ավելացումը 1,8-ԱՆՍ լուծույթին ուղեկցվում է ֆլուորեսցենցիայի խիստ մեծացմամբ: Հետազոտությունները տարվել են ջրածնային իոնների տարբեր կոնցենտրացիաների պայմաններում: Ուսումնասիրվել է նաև նշված ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը կալցիումի երկվալենտ իոնների, միզանյութի, 50%-ոց դիմեթիլֆորմամիդի և գանգլիոզիդների առկայության պայմաններում:

Ծնթադրվում է, որ ֆլուորեսցենցիայի փոփոխության և պլազմատիկ թաղանթների կոմֆորմացիոն տեղաշարժերի միջև գոյություն ունի որոշակի կապ:

THE STUDY OF INTERACTION OF THE 1-ANILINO NAPHTHALIN-8-SULPHOHATE FLUORESCENT SOUND WITH THE PLASMATIC MEMBRANE PREPARATIONS

A. E. ZAKARIAN, E. S. SEKOIAN, A. R. EGIASARIAN

The interaction of the 1-anilino-naphthalin-8-sulphonate fluorescent sound with the plasmatic membrane preparations from rabbit liver has been studied.

When no sound fluorescence, the proteins and plasmatic membrane preparations induce the fluorescence of the anilino-sound-1-anilino-naphthalin-8-sulphonate. The sound fluorescence is sensitive to hydrogen ions and is changed in the presence of Ca^{+2} and gangliosides.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Добрецов Г. Е., Харитоненков И. Г., Мишиев Е. В., Владимиров Ю. А. Биофизика, 20, 4, 581, 1975.
2. Алфимова Е. Я., Ксельтовер В. К., Райхман Л. М. Биофизика, 17, 6, 1043, 1972.
3. Добрецов Г. Е. Сб. Молекулярная биология, 6 (Итоги науки и техники). М., 34, 1975.
4. Laurence D. Biochem. J., 51, 168, 1952.
5. Weber G. Biochem. J., 31, 56, 1954.
6. Duncan H. Membrane Biol., 17, 3—4, 313, 1974.
7. Жолы М. К. Физическая химия денатурации белков, 64, М., 1968.
8. Черницкий Е. А. Наука и техника, Минск, 1972.
9. Медведева Н. В., Рууче Э. К. Биофизика, 20, 1, 1975.
10. Weber G., Young L. J. Biol. Chem., 239, 1415, 1964.
11. Chosh S., Basu M., Schweppe J. Biochem. et biophys. acta, 337, 395, 1974.
12. Сергеев П. В., Денисов Ю. П. и др. Биофизика, 20, 2, 1975.
13. Nigam V., Meralls S., Karasaki R. Biochem. et biophys. acta, 249, 34, 1971.
14. Chen R. J. Biol. Chem., 242, 173, 1967.
15. Pessi J. Biochem. et biophys. acta, 311, 2, 251, 1973.
16. Wallach D. J. Biol., 30, 601, 1966.