

14.4

Мандельштам-бриллюэновское рассеяние света в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных концентрациях в окрестности тепловой денатурации

© А.В. Дмитриев, А.И. Федосеев, С.Г. Лушников

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: sergey.lushnikov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 20 апреля 2020 г.
В окончательной редакции 20 апреля 2020 г.
Принято к публикации 20 апреля 2020 г.

С помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния света проведены исследования фазовых превращений бычьего сывороточного альбумина (БСА) в области температур от 300 до 380 К в растворах с концентрациями 50 и 5 mg/ml. В анализе результатов в качестве реперной использовалась последовательность фазовых превращений в концентрированном (100 mg/ml) растворе БСА. Показано, что последовательность фазовых превращений БСА модифицируется при уменьшении концентрации. Так, например, в области денатурации исчезает область с фибриллоподобными агрегатами белка, и меняются свойства гелеобразной высокотемпературной фазы.

Ключевые слова: мандельштам-бриллюэновское рассеяние света, бычий сывороточный альбумин, фазовые превращения, агрегаты, гелеподобная фаза.

DOI: 10.21883/JTF.2020.10.49789.140-20

Введение

Динамика биополимеров является одной из междисциплинарных областей знаний, лежащей на стыке физики конденсированных сред, молекулярной биологии, биохимии и других дисциплин. Более того она лежит в области, находящейся в фокусе внимания фундаментальной и практической медицины, поскольку уже хорошо известно, что изменения в структуре и динамике биополимеров могут приводить к изменениям их активности и биологических функций. Так, например, нарушения в структуре белка могут приводить к возникновению ненативных белок-белок взаимодействий, что в свою очередь приводит к процессам агрегации. Сегодня считается, что агрегация белков в организме является причиной многих нейродегенеративных заболеваний. Примером таких агрегатов могут служить фибриллы, вытянутые структуры, образующиеся за счет образования β -слоев между белками. Белки, участвующие в образовании фибриллоподобных структур, больше не могут выполнять свои биологические функции [1]. Таким образом, механизмы, ответственные за образования агрегатов, гелеподобных структур в последнее десятилетие являются предметом активных исследований с помощью различных физических методов. Одним из таких методов является мандельштам-бриллюэновское рассеяние (МБР) света. Это обусловлено тем, что динамика биополимеров в диапазоне частот от 1 до 1000 GHz обычно отражает локальные конформационные изменения, т.е. прыжки атомов от одной конфигурации к другой, и коллективные возбуждения. Динамика биополимеров в

этом диапазоне частот имеет много общего с динамикой стекол, переохлажденных жидкостей и других конденсированных сред. Например, в колебательном спектре белков обнаружены бозонный пик, быстрые ангармонические движения, подобные быстрой пикосекундной релаксации в стеклах, и др. [2,3]. МБР света дает возможность изучать колебательный спектр биополимеров в указанном диапазоне частот с высокой точностью и с минимальными воздействиями на изучаемую систему. Эффективность МБР света в исследовании динамики биополимеров была показана при изучении перехода ДНК из A в B форму, плавлении ДНК [4 и ссылки в ней], тепловой денатурации белков [5,6] и динамики коротких пептидов [7]. В одном из недавних исследований белков с помощью МБР света была восстановлена последовательность фазовых превращений бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0.1 М натрий-фосфатном буфере с концентрацией 100 mg/ml при нагревании (рис. 1) [5]. Эта последовательность хорошо согласуется с известными литературными данными и состоит из нескольких температурных областей. До 330 К белок в растворе находится в нативном состоянии, т.е. 330 К является верхней температурной границей обратимых структурных изменений, которые можно в целом описать как движения доменов белка относительно друг друга. При дальнейшем увеличении температуры все последующие структурные изменения являются необратимыми и сопровождаются процессами агрегации. Из рис. 1 видно, что область денатурации включает в себя три различных состояния. Границы области денатурации определены по результатам экспериментов по неупругому рассеянию

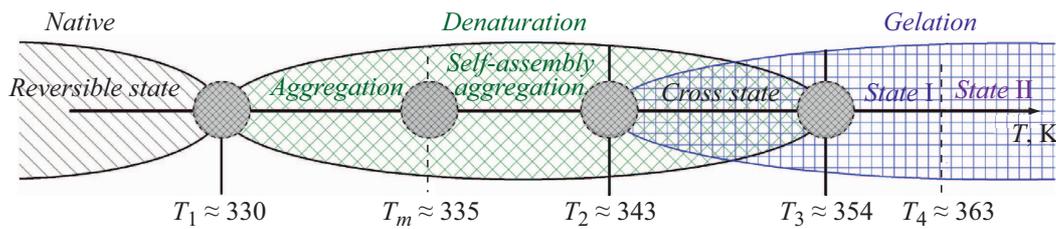


Рис. 1. Последовательность фазовых превращений в растворе БСА с концентрацией 100 mg/ml в 0.1 М натрий-фосфатном буфере [5].

нейтронов [8]. Белок БСА — трехдоменный белок, причем раскрытие доменов происходит неодновременно при тепловой денатурации [9]. Так, при достижении температуры плавления $T_m = 335$ К начинается процесс раскрытия II домена, который сопровождается увеличением количества β -слоев, что приводит к образованию в растворе самосогласованных агрегатов. Фаза с ориентированными и крупными (размер которых сопоставим с длиной волны) фибриллоподобными агрегатами в диапазоне температур $343 < T < 347$ К переходит в гелеподобную фазу, при этом в окрестности температуры $T_2 = 343$ К начинается процесс раскрытия I домена. При температуре выше T_2 фибриллоподобные агрегаты переориентируются и образуют полимерную сетку, которая в конечном итоге превращается в гель в окрестности $T_4 = 363$ К (рис. 1). Гелеподобная фаза в БСА состоит из двух различных состояний, отличающихся фрактальной размерностью [10]. В работе было показано, что трансформация вторичной и третичной структуры белка, его агрегация и гелеобразование в растворе БСА проявляются в спектрах МБР света в виде аномалий скорости и затухания гиперзвука, интенсивности рэлеевской компоненты и мандельштам-бриллюэновского дублета.

Анализ литературных данных, результатов наших измерений показал, что последовательность фазовых превращений белков в растворе определяется внешними условиями, такими, как pH буфера, давление, концентрация белка и т.д. [11]. Это мотивировало нас исследовать влияние концентрации БСА на низкочастотную динамику белка и последовательность фазовых превращений в окрестности денатурации с помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния света. В ходе настоящей работы мы опирались на последовательность фазовых превращений концентрированного раствора (100 mg/ml) БСА, сравнивая с ней полученные результаты.

1. Материалы и методы

В качестве объекта исследований выступал раствор белка БСА (Sigma) с молекулярной массой 69 kDa. В качестве растворителей использовался 0.1 М натрий-фосфатный буфер с pH = 7.45. После приготовления белковые растворы были подвергнуты центрифугированию. С целью исключения крупных нерастворенных фрагментов супернатант был отфильтрован. Концентрация белка

в буфере составляла 50 и 5 mg/ml. Полученные результаты по МБР света в белковых растворах сравнивались с экспериментальными результатами с концентрацией белка в растворе 100 mg/ml, приготовленному по аналогичному протоколу [5].

В качестве источника света в экспериментах по МБР света использовался аргоновый лазер с длиной волны 488 nm и мощностью 100 mW. Луч лазера проходил через оптическую схему и фокусировался на образце. Эксперименты проводились в 180-градусной геометрии. Рассеянный свет анализировался с помощью трехпроходного пьезосканируемого интерферометра Фабри-Перо и регистрировался с помощью системы счета фотонов. Для стабилизации и контроля интерферометра использовалась система DAS-1 фирмы Burleigh. Расстояние между зеркалами составляло 5.77 mm, что соответствовало свободному спектральному интервалу 26 GHz. Время накопления одного спектра составляло 300 s. Закрытая кварцевая кювета с раствором помещалась в самодельную печь с автоматической системой контроля и стабилизацией температуры с погрешностью менее 0.5 К. Исследуемая область температур составляла $293 < T < 370$ К. МБР света в жидкостях определяется адиабатическими флуктуациями плотности и энтропии. Флуктуации плотности отвечают за появление в спектре компонент дублета МБР, а флуктуации энтропии — компоненты рэлеевского рассеяния. Флуктуации плотности в жидкости — это тепловые звуковые волны с частотой $\Delta\nu = V\mathbf{q}/2\pi$, где V — скорость звука и \mathbf{q} — волновой вектор. Они соответствуют дублету МБР с частотой $\nu_0 \pm \Delta\nu$ (где ν_0 — частота возбуждающей линии) в спектре рассеянного света. Для интерпретации спектра рассеянного света для вязких жидкостей, в которых существует затухание звука, использовалось феноменологическое уравнение гидродинамики для средних значений — уравнение Стокса. Можно показать, что смещение компонент МБР $\Delta\nu$, отнесенное к частоте возбуждающего света ν_0 , пропорционально скорости упругих волн

$$\pm \frac{\Delta\nu}{\nu_0} = 2n \frac{V}{c} \sin \frac{\theta}{2}, \tag{1}$$

где n — коэффициент преломления и θ — угол между падающим и рассеянным лучами [12]. Полуширина на полувисоте компонент МБР дублета ($\delta\omega$) связана с

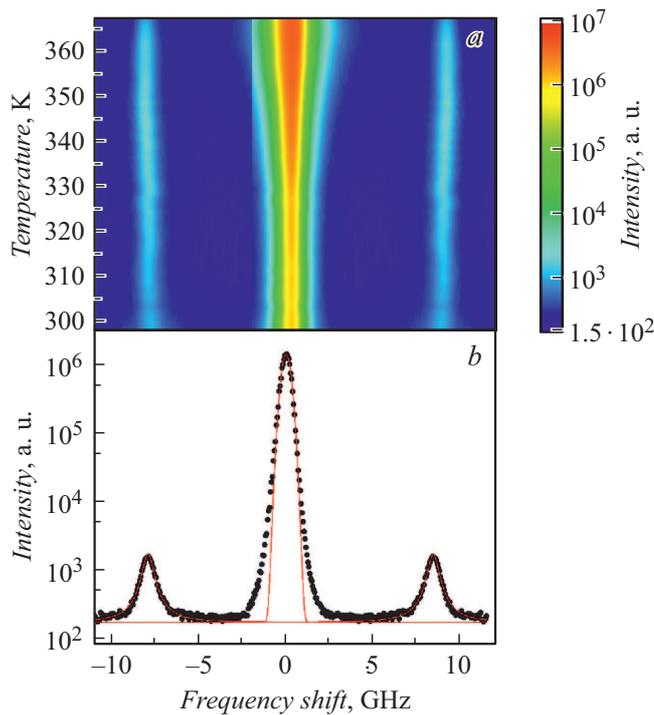


Рис. 2. Панель экспериментальных спектров рэлеевского и мандельштам-бриллюэновского рассеяния света при изменении температуры для раствора БСА с концентрацией 5 mg/ml. Внизу показан пример обработки экспериментального спектра раствора БСА с концентрацией 5 mg/ml при $T = 320$ К. Черные точки — экспериментальный результат, сплошная линия — результаты обработки спектров с помощью предложенной в тексте модели.

затуханием упругой волны (α) и параметрами гидродинамической теории выражением

$$\delta\omega = 2\alpha V = \mathbf{q}^2(4\eta/3 + \xi)/(2\rho), \quad (2)$$

где η и ξ — коэффициенты сдвиговой и объемной вязкости соответственно и ρ — плотность.

Пример экспериментального спектра рассеяния света с обработкой для белкового раствора с концентрацией 5 mg/ml показан на рис. 2, *b*. Экспериментальный спектр состоит из центральной компоненты на нулевой частоте (рэлеевское рассеяние), описываемое функцией Гаусса, и мандельштам-бриллюэновского дублета, форма линии каждой компоненты описывалась функцией Лоренца [5]. На рис. 2, *a* показана панель спектров с разверткой по температуре (по шкале Y). Цветом представлена интенсивность рассеянного света. Из рис. 2, *a* видно, что интенсивность и полуширина компоненты рэлеевского рассеяния света увеличивается с ростом температуры, в то время как для компоненты МБР дублета сдвиг частоты и интенсивность меняются при нагревании, а полуширина практически не зависит от температуры.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Температурное поведение относительного изменения сдвига частоты в растворах БСА различной концентрации

Температурные зависимости относительного изменения сдвига (далее — сдвиг частоты) компонент Мандельштама–Бриллюэна для трех белковых растворов с различной концентрацией 100, 50 и 5 mg/ml изображены на рис. 3. Детальное описание процедуры расчета относительного изменения сдвига частоты можно найти в работе [5]. Здесь укажем только, что приведенные на рис. 3 температурные зависимости „очищены“ от влияния буфера и представляют собой чистую динамику белка в растворе. Рассмотрим поведение температурной зависимости относительного изменения сдвига компоненты МБР для 100 mg/ml (рис. 3, *a*). Хорошо видно, что до 330 К относительный сдвиг компонент МБР в растворе БСА с концентрацией 100 mg/ml демонстрирует

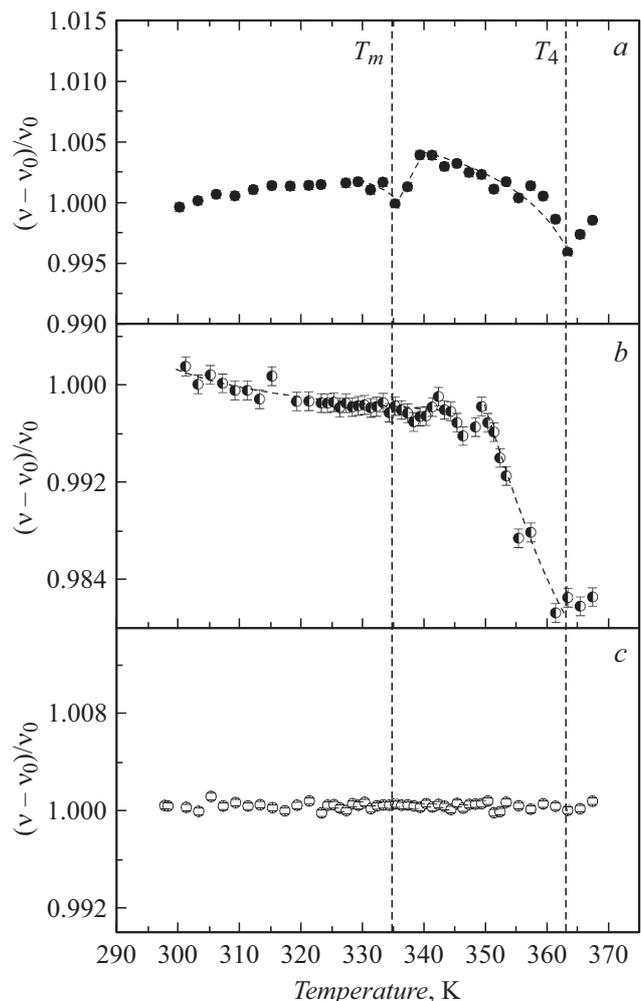


Рис. 3. Температурные зависимости изменения относительного сдвига дублета Мандельштама-Бриллюэна для белковых растворов с различной концентрацией: *a* — 100, *b* — 50 и *c* — 5 mg/ml. Штриховые линии проведены на глаз.

слабую зависимость от температуры. Начиная с 330 К, наблюдается падение значений относительного сдвига компонент МБР. В окрестности $T_m = 335$ К наблюдается аномалия в виде ступеньки. Дальнейший нагрев ведет к немоному падению относительного сдвига компонент МБР. В окрестности второй температурной аномалии при $T_4 = 363$ К зависимость меняется критическим образом. В работе [5] было показано, что аномалия в температурной зависимости сдвига частоты в окрестности T_m связана с денатурацией белка и раскрытием II домена. Критическое поведение сдвига частоты при $T > 350$ К обусловлено переходом в гелеобразную фазу. Уменьшение концентрации белка в растворе до 50 mg/ml приводит к изменению температурных зависимостей сдвига частоты. До 330 К температурные зависимости для обеих рассматриваемых концентраций подобны (рис. 3, *a* и *b*). При увеличении температуры мы можем видеть на рис. 3, *b* слабую аномалию в виде минимума сдвига частоты в окрестности 335 К, связанную с денатурацией БСА. Еще одна аномалия, отсутствующая в температурной зависимости сдвига частоты в растворе БСА с концентрацией 100 mg/ml, наблюдается в окрестности 345 К (ср. рис. 3, *a* и *b*). По-видимому, таким образом проявляются изменения в третичной структуре белка, связанные с раскрытием домена I. Отсутствие подобного максимума в температурной зависимости относительного изменения сдвига может быть связано с тем, что при высоких концентрациях, таких как 100 mg/ml, процессы агрегации и гелеобразования доминируют над процессами, связанными с раскрытием доменов, из-за увеличения вклада межмолекулярных взаимодействий. Дальнейшее увеличение температуры приводит к критическому поведению сдвига частоты (его уменьшению) и резкому изменению вида зависимости в окрестности $T_4 = 363$ К, что соответствует переходу в гелеподобную фазу. В растворе с концентрацией БСА 5 mg/ml поведение сдвига частоты не зависит от температуры (рис. 3, *c*), что, по-видимому, связано с малой чувствительностью используемой нами установки при таких концентрациях.

2.2. Температурное поведение интенсивности дублетов мандельштам-бриллюэновского рассеяния света в растворах БСА с различной концентрации

Рассмотрим поведение интенсивностей компонент дублета МБР при изменении температуры (рис. 4). Для белкового раствора с концентрацией 100 mg/ml интенсивность слабо возрастает до 330 К, при дальнейшем нагреве испытывает немоное уменьшение со сменой режимов в окрестности температур 340 и 350 К (рис. 4, *a*). Подобное поведение интенсивности дублета МБР наблюдалось и при исследовании температурной денатурации лизоцима [6]. В обоих случаях уменьшение интенсивности связано с процессом

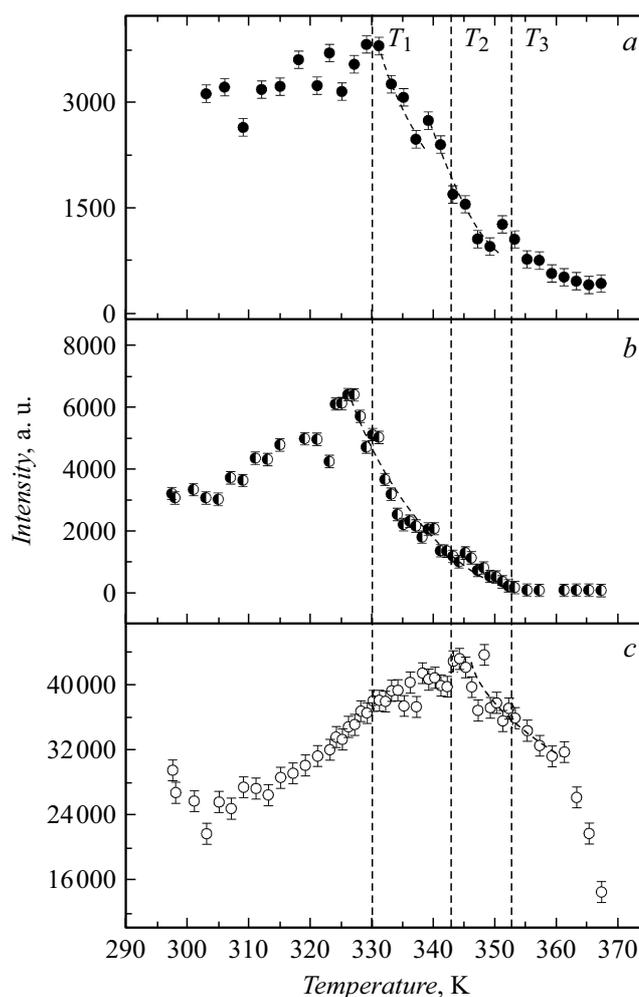


Рис. 4. Температурные зависимости изменения интенсивности компонент дублета мандельштам-бриллюэновского рассеяния света для растворов БСА с различной концентрацией: *a* — 100, *b* — 50 и *c* — 5 mg/ml. Штриховая линия на рис. 4, *a* проведена на глаз.

агрегации и переходом системы в гель-фазу. В случае раствора БСА с концентрацией 100 mg/ml смена режима уменьшения интенсивности дублета МБР связана с многостадийностью процесса денатурации БСА, включающего в себя раскрытие различных доменов и образование фибрилл. Интенсивность компоненты МБР для белкового раствора с концентрацией 50 mg/ml ведет себя аналогично: возрастает до 325 К и при дальнейшем повышении температуры резко уменьшается практически до нулевых значений. Сдвиг области денатурации в область низких температур при уменьшении концентрации согласуется с результатами калориметрических измерений [13]. Температурное поведение интенсивности дублета МБР при $T > 325$ К — немоное: излом в температурной зависимости наблюдается в окрестности 343 К, что согласуется с аномалией поведения сдвига частоты и связано с изменениями в третичной структуре белка (раскрытием I домена). При $T > 355$ К

интенсивность компонент дублета стремится к нулю, а полуширина его увеличивается. Перейдем к случаю 5 mg/ml. Интенсивность компоненты МБР такого белкового раствора в отличие от случая 50 и 100 mg/ml возрастает вплоть до 345 К — температуры начала раскрытия домена I. Дальнейший нагрев раствора, как и в случае других концентраций, приводит к падению интенсивности компоненты дублета МБР с изменением поведения температурной зависимости в окрестности 360 К. Эту аномалию в температурной зависимости интенсивности можно связать с образованием геля. Но в случае раствора БСА с концентрацией 5 mg/ml свойства геля разительно отличаются от случаев 50 и 100 mg/ml. Действительно, при концентрации 5 mg/ml раствор БСА в области высоких температур практически не мутнеет. В случае же 50 и 100 mg/ml в растворе БСА наблюдается критическая опалесценция при высоких температурах, гель мутнеет и становится практически непрозрачным.

Выводы

Уменьшение концентрации белка в растворе ослабляет вклад взаимодействий между молекулами белков. Подобное изменение внешних условий находит отражение в модификации температурного поведения сдвига частоты и интенсивности компонент дублета мандельштамбриллюэновского рассеяния света. Было показано, что при высоких концентрациях БСА в растворе процессы, связанные с раскрытием первого домена на второй ступени денатурации, в окрестности 343 К маскируются агрегацией белка. Уменьшение концентрации белка в растворе позволяет выделить более тонкие процессы, связанные с изменением структуры. Таким образом, варьируя концентрацию белка в буфере, мы можем анализировать вклад межмолекулярных взаимодействий в низкочастотную динамику белков и исследовать динамические процессы, связанные с раскрытием доменов и изменением третичной структуры белков.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Frost B., Diamond M. // Nature Rev. Neuroscience. 2010. Vol. 11. P. 155.
- [2] Galiskan G., Kistiuk A., Tsai A.M., Soles C.L., Sokolov A.P. // J. Chem. Phys. 2003. Vol. 118. N 9. P. 4230–4236.
- [3] Perticaroli S., Nickels J.D., Ehlers G., Sokolov A.P. // Biophys. J. 2014. Vol. 106. P. 2667–2674.
- [4] Lushnikov S.G., Dmitriev A.V., Fedoseev A.I., Zakharov G.A., Zhuravlev A.V., Medvedeva A.V., Schegolev B.F., Savvateeva-Popova E.V. // JETP Lett. 2013. Vol. 98. N 11. P. 830–836.
- [5] Dmitriev A.V., Vashchenkov V.E., Fedoseev A.I., Lushnikov S.G. // J. Raman Spectr. 2019. Vol. 50. N 4. P. 537.
- [6] Svanidze A.V., Lushnikov S.G., Kojima S. // JETP Lett. 2009. Vol. 90. N 1. P. 80–84.
- [7] Vashchenkov V.E., Fedoseev A.I., Petukhov M.G., Khavinson V.Kh., Savvateeva-Popova E.V., Lushnikov S.G. // J. Phys.: Conf. Series. 2014. Vol. 572. P. 012015.
- [8] Henning M., Roosen-Runge F., Zhang F., Zorn S., Skoda M.W.A., Jacobs R.M.J., Seydel T., Schreiber F. // Soft Matter. 2012. Vol. 8. P. 1628–1633.
- [9] Flora K., Brennan J.D., Baker G.A., Doody M.A., Bright F.V. // Biophys. J. 1998. Vol. 75. N 2. P. 1084–1096.
- [10] Chodankar S., Aswal V.K., Kohlbrecher J., Vavrin R., Wagh A.G. // Phys. Rev. E. 2009. Vol. 79. N 2. P. 021912.
- [11] Onuchic J.N., Luthey-Schulten Z., Wolynes P.G. // Annu. Rev. Phys. Chem. 1997. Vol. 48. P. 545–600.
- [12] Fabelinskii I.L. Molecular scattering of light. NY: Plenum Press, 1968.
- [13] Deep S., Ahluwalia J.C. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2001. Vol. 3. P. 4583–4591.