

В. И. Древаль

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Методом тушения собственной флуоресценции белков исследовали влияние ионизирующего излучения в дозах $10-10^4$ Гр на структуру кальций-связывающих белков плазматических мембран тимоцитов. Охарактеризованы особенности изменения структуры белков в зависимости от дозы излучения.

Введение. Ранее нами были исследованы конформационные изменения мембранных белков при воздействии ионизирующего излучения с использованием диффузионного тушителя акриламида [1], что позволило получить представление об общих закономерностях нарушения структуры всего комплекса мембранных белков в целом. Вместе с тем представляло интерес оценить изменения структуры отдельных мембранных белков в результате воздействия радиации на биомембраны. Для этого в качестве тушителей триптофановой флуоресценции белков можно использовать лиганды, связывающиеся с определенными мембранными белками. Такой подход позволил охарактеризовать особенности изменения структуры АТФ-связывающих белков плазматических мембран при воздействии ионизирующего излучения [2]. Известно, что для тушения собственной флуоресценции белков можно применять одно- и двухвалентные ионы металлов [3]. Нами было установлено наличие кальций-связывающих белков в плазматических мембранах тимоцитов [4]. Поэтому в данной работе, чтобы охарактеризовать особенности конформационных изменений кальций-связывающих белков при воздействии ионизирующего излучения, для тушения собственной флуоресценции белков плазматических мембран тимоцитов мы использовали ионы Ca^{2+} .

Материалы и методы. В работе использовали плазматические мембраны тимуса крупного рогатого скота [4]. Суспензию мембран (0,4 мг белка в 1 мл) в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 7,4) облучали в дозах 10 , 10^2 , 10^3 или 10^4 Гр на импульсном ускорителе электронов энергией 5 МэВ. Интенсивность флуоресценции регистрировали при 340 нм на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2A» (Япония) при 25 °С (длина волны возбуждения 296 нм). В качестве тушителя применяли CaCl_2 .

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены графики Штерна — Фольмера для тушения собственной флуоресценции белков плазматических мембран ионами Ca^{2+} . Внешний вид графиков, вогнутых по отношению к оси ординат, указывает на смешанный характер динамического и статического тушения ионами Ca^{2+} [3]. В связи с тем, что ионы Ca^{2+} взаимодействуют с кальций-связывающими участками белков плазматических мембран [4], образующийся внутримолекулярный комплекс в основном состоянии может быть достаточно устойчивым, в результате чего наблюдается как динамическое, так и статическое тушение. Поэтому данные по тушению флуоресценции мембранных белков ионами Ca^{2+} анализировали с помощью модифицированной формы

уравнения Штерна — Фольмера [3]:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{каж}} \cdot [Q];$$

$$K_{\text{каж}} = K_{\text{дин}} + K_{\text{ст}} + K_{\text{дин}} \cdot K_{\text{ст}} \cdot [Q],$$

где $K_{\text{каж}}$ — кажущаяся константа скорости тушения; $K_{\text{дин}}$ — динамическая константа тушения; $K_{\text{ст}}$ — статическая константа тушения; F_0 и F — интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии Ca^{2+} соответственно; $[Q]$ — концентрация CaCl_2 .

График зависимости $K_{\text{каж}}$ от $[Q]$ позволяет рассчитать значения $K_{\text{ст}}$ и $K_{\text{дин}}$ (рис. 2). На основании полученных данных при изучении

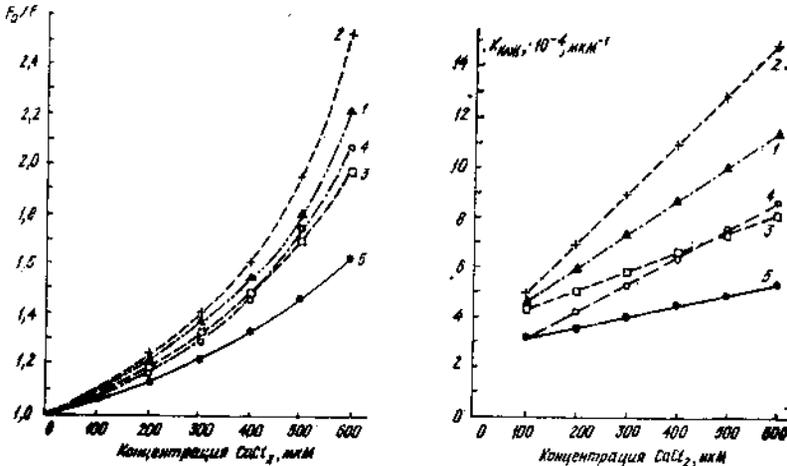


Рис. 1. Графики Штерна — Фольмера для тушения флуоресценции белков плазматических мембран тимоцитов ионами Ca^{2+} : 1 — 0 (необлученный контроль); 2 — 10^1 ; 3 — 10^2 ; 4 — 10^3 ; 5 — 10^4 Гр

Рис. 2. Зависимость $K_{\text{каж}}$ модифицированной формы уравнения Штерна — Фольмера при тушении флуоресценции ионами Ca^{2+} (обозначения, как на рис. 1)

структурных изменений кальций-связывающих белков от дозы излучения (таблица) можно сделать вывод о том, что воздействие ионизирующего излучения приводит к значительным изменениям структуры белков. Следует отметить, что дозовая зависимость $K_{\text{ст}}$ и $K_{\text{дин}}$ позволяет

Зависимость тушения флуоресценции кальций-связывающих белков плазматических мембран от дозы радиации

Показатель, мкм^{-1}	Доза ионизирующего излучения, Гр				
	0	10^1	10^2	10^3	10^4
$K_{\text{ст}} \cdot 10^{-8}$	3,06	4,76	4,90	5,50	1,70
$K_{\text{дин}} \cdot 10^{-5}$	34,9	32,9	30,0	19,9	25,9

выделить экстремальные зависимости при дозе облучения 10^4 Гр. В результате правомочно заключение о том, что различные мембранные белки претерпевают изменения структуры при разных дозах облучения. Если для суммарных мембранных белков подобные изменения, выявляемые при титровании акриламидом, регистрируются уже при дозе 10^3 Гр [1], то отдельные белки, связывающие Ca^{2+} (данная работа) или АТФ [2], относительно более радиоустойчивы — существенные изменения их структуры отмечаются при дозе 10^4 Гр. Очевидно, наблюдаемые различия в радиоустойчивости обусловлены структурными особенностями организации белков в биологических мембранах [5].

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЕННЯ
НА КАЛЬЦІЙ-ЗВ'ЯЗУЮЧІ БІЛКИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН

Резюме

Методом гасіння власної флуоресценції білків досліджено вплив іонізуючого випромінювання у дозах 10^{-1} — 10^4 Гр на структуру кальцій-зв'язуючих білків плазматичних мембран тимоцитів. Охарактеризовано особливості зміни структури білків в залежності від дози випромінювання.

V. I. Drevail'

INFLUENCE OF IONIZING RADIATION
ON THE CALCIUM-BINDING PLASMA MEMBRANE PROTEINS

Summary

The effect of ionizing radiation in doses 10^0 , 10^2 , 10^3 or 10^4 Gy on meat cattle thymocytes calcium-binding plasma membrane proteins was studied. The influence of ionizing radiation on the plasma membranes was shown to be followed by changes of the protein structure-dynamic organization.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Древаль В. И.* Влияние ионизирующего излучения на белки плазматических мембран // Биофизика.— 1992.— 37, № 2.— С. 384—385.
2. *Древаль В. И.* Влияние АТФ и ионизирующего излучения на структуру плазматических мембран // Биополимеры и клетка.— 1992.— 8, № 1.— С. 78—82.
3. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
4. *Древаль В. И., Назаренко Н. Д.* Связывание ионов кальция с плазматическими мембранами тимоцитов // Биол. науки.— 1991.— № 1.— С. 27—31.
5. *Kennedy S. J.* Structures of membrane proteins // J. Membrane Biol.— 1978.— 42, N 3.— P. 265—279.

Харьков. гос. ун-т

Получено 16.09.93