УДК 577.322.2

СВЯЗЫВАНИЕ ФИБРИНОГЕНА С ЛИПИДНЫМИ БИСЛОЯМИ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА[1]

Валиуллина Ю.А., Бакирова Д.Р., Файзуллин Д.А., Зуев Ю.Ф.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,

ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111,

e-mail: valiullina@kibb.knc.ru

Белок плазмы крови фибриноген и продукт его протеолитического расщепления фибрин играют ключевую роль в процессах гемостаза. Скорость образования тромба, его механические свойства и проницаемость регулируются взаимодействием с белками и липидными частицами плазмы. Физико-химические аспекты этого взаимодействия изучены недостаточно ввиду экспериментальных трудностей, обусловленных специфическими свойствами фибриногена – это большая масса и сложная пространственная структура, способность к многоцентровым взаимодействиям и самоассоциации. Физико-химическому исследованию взаимодействия фибриногена с липидами посвящено ограниченное число работ, результаты которых противоречат друг другу. В настоящей работе дана характеристика связывания фибриногена с липидными бислоями различного состава на основе комплексного подхода. Использование широкого круга взаимодополняющих методов позволило уточнить некоторые спорные положения, в частности, о специфическом характере связывания липидов.

Экспериментальная часть

Материалы: Фосфатидилхолин (ФХ, яичный лецитин) (Sigma), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) (Sigma), пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин) (ПОФГ) (Avanti). Фибриноген

[1] Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан, грант № 15-44-02230 р_Поволжье_а.

плазмы крови человека (Sigma) (ФБ). Буфер 20 мМ трис HCl, 150 мМ NaCl, pH 7.6.

Приготовление липосом: Растворяли навеску ФХ в хлороформе, выпаривали под вакуумом и разводили буфером до концентрации 70 мМ. Полученную грубую дисперсию липида подвергали 3 циклам замораживания при температуре жидкого азота и оттаивания при 55°С. Липосомы получали, многократно продавливая суспензию через поликарбонатные фильтры с размером пор 100 нм (Avanti) при 55°С.

Микрогравиметрия: Измерение сорбции фибриногена на пленках липидов проводили с помощью кварцевых микровесов QCM-200 (США). Использовали кварцевые резонаторы 5 МГц с золотым покрытием.

Исследуемые растворы липидов в смеси хлороформ/этанол (95/5 v/v) наносили на поверхность электрода кварцевого резонатора. После испарения растворителя образовывалась однородная пленка на всей площади электрода [1]. По изменению частоты колебаний резонатора до и после нанесения вещества судили о массе образовавшейся пленки. Следили за тем, чтобы значения массы липида имели приблизительно одинаковую величину в экспериментах. Образцы помещали в емкость с раствором буфера и инкубировали 1 час при 60°С. Затем охлаждали до комнатной температуры и после уравновешивания вносили раствор фибриногена, последовательно увеличивая его концентрацию. Измеряли изменение частоты колебаний, пропорциональное массе сорбированного фибриногена: $\Delta f = -C_f \cdot \Delta m$, где Δf - наблюдаемое изменение частоты в Гц; Δm - изменение массы на единицу площади, в мкг/см^2; C_f - коэффициент чувствительности кристалла (56,6 Гц мкг$^{-1}$ см^2).

Все измерения проводили в идентичных условиях при температуре 25°С. Основываясь на величинах площади электрода (0.4 см^2) и площади, приходящейся на одну молекулу липида в монослое (66А^2), рассчитывали количество молекул липида во внешнем слое и величину *R= [ФБ]/[липид]* – количество молей сорбированного фибриногена к количеству молей липида во внешнем монослое.

Флуоресценция: Раствор фибриногена (1.5 мкМ) в кювете титровали суспензией липосом либо суспензию липосом с концентрацией 0.5 мМ титровали раствором фибриногена. Образцы перед измерением выдерживали в кварцевых кюветах при 25°С в течение 10 минут.

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама (ЛЮМЕКС, Россия) в обычном режиме в диапазоне 300 – 400 нм, при длине волны возбуждения 280 и 295 нм, а также в режиме синхронного сканирования в спектральном диапазоне 260–400 нм при величине смещения 15 нм (тирозин) и 60 нм (триптофан). Зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации фибриногена в суспензиях липосом корректировали на влияние рассеяния по методике [2].

ИК-спектроскопия: ИК спектры измеряли на спектрофотометре IR Affinity1 (Shimadzu, Япония) в режиме нарушенного полного внутреннего отражения на приставке с кристаллом ZnSe в качестве измерительного элемента. Спектральное разрешение 8 см$^{-1}$, число накоплений 512. Растворы липидов в этаноле выпаривали на поверхности измерительного элемента, подбирая концентрацию и объем наносимого раствора так, чтобы получить пленки одинаковой оптической плотности 0.1 по полосе 2920 см-^{1}, соответствующей поглощению CH_2-групп липида. Пленку помещали в проточную микрокювету, через которую подавали поток буферного раствора или раствора фибриногена (1 мг/мл). Кювету термостатировали при 37°С.

Результаты и обсуждение

Метод пьезокварцевого микровзвешивания позволяет регистрировать изменения частоты механических колебаний чувствительного элемента – пьезокристалла, вызванные изменениями массы при адсорбции веществ из раствора на его поверхности. Метод использован нами для доказательства связывания фибриногена с липидными поверхностями различного состава и количественной оценки степени связывания. Липидная пленка, покрывающая электрод, представляет собой мультислойное покрытие, но поскольку взаимодействие

лиганда происходит только с его наружной частью, то толщина этой пленки не имеет большого значения.

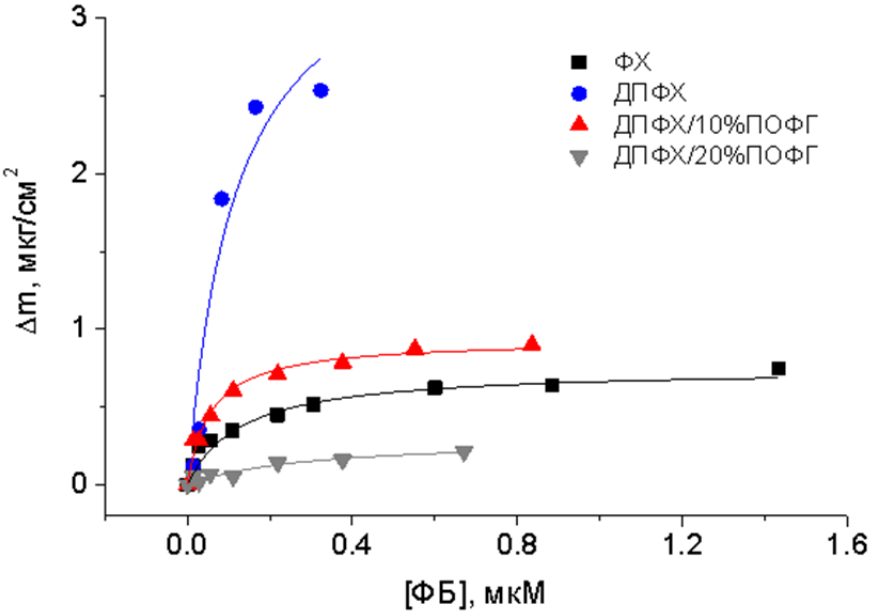

Рис. 1. Изотермы сорбции фибриногена на пленках липидов: ФХ, ДПФХ, ДПФХ/10%ПОФГ, ДПФХ/20%ПОФГ. Линиями представлены аппроксимации изотермой Ленгмюра. Параметры аппроксимации приведены в таблице 1.

На рисунке 1 представлены зависимости изменения массы вещества, ассоциированной с электродом, от концентрации фибриногена в растворе. Максимальный уровень сорбции белка наблюдается на поверхности липидного слоя из нейтрального по заряду ДПФХ. На пленке из природного ФХ (яичный лецитин) сорбция происходит в значительно меньшем размере. На пленках из ДПФХ с добавлением отрицательно заряженного ПОФГ сорбция снижается по мере увеличения доли ПОФГ, что может быть результатом электростатического отталкивания. Низкая сорбция фибриногена на яичном ФХ, в этом случае, может объясняться присутствием отрицательно заряженных жирных кислот в качестве примеси в препарате. Однако нельзя исключить также влияния вязкости бислоя, которая существенно зависит от присутствия ненасыщенных связей в алифатических хвостах. Следует обратить внимание, что при добавлении 10% ПОФГ к ДПФХ константа вначале возрастает по сравнению с чистым ДПФХ, и вновь падает при увеличении содержания ПОФГ до 20%.

В работе [3] было показано, что фибриноген не связывается с липосомами из яичного ФХ и ДПФХ, однако связывание растет в присутствии отрицательно заряженного дипальмитоилфосфатидилсерина (ДПФС). Максимальный уровень

связывания достигался на липосомах ДПФС и составлял R= 0.009, что близко к полученной нами величине R на пленке ДПФХ+20%ПОФГ. Авторы отнесли наблюдаемый эффект полностью на счет благоприятного электростатического взаимодействия.

Табл. 1. Термодинамические параметры связывания фибриногена на пленках липидов: K_a – константа Ленгмюра, M_{max} – предельный уровень сорбции, R=[ФБ]/[липид] – количество молей сорбированного фибриногена к количеству молей липида во внешнем монослое

Липид	K_a, мкМ$^{-1}$	M_{max}, мкг/см^2	R, М/М
ФХ	10.25±2.14	0.73±0.04	0.017
ДПФХ	8.63±5.32	3.73±0.95	0.09
90%ДПФХ / 10% ПОФГ	17.64±2.7	0.935±0.035	0.022
80%ДПФХ / 20% ПОФГ	3.49±1.73	0.30±0.068	0.007

Наши результаты показывают, что ситуация не столь однозначна. Очевидно, что помимо заряда могут играть роль и такие факторы, как структура головной части липидов и вязкость липидного бислоя.

Взаимодействие фибриногена с липидными везикулами в растворе исследовали методом флуориметрии на примере яичного ФХ. На рисунке 2 приведены зависимости интенсивности флуоресценции белка от концентрации фибриногена в буферном растворе и в суспензии липосом. Разность между двумя зависимостями пропорциональна концентрации связанного белка. Константа связывания в суспензии липосом имеет значение в два раза меньшее, чем при связывании на плоском бислое по данным гравиметрии.

Различие слишком велико, чтобы быть только следствием погрешности измерений и, по-видимому, отражает влияние кривизны поверхности. Данные, полученные при возбуждении на длине волны 280 нм (не приводятся), показали аналогичный результат. Большое количество тирозиновых и триптофановых остатков в молекуле фибриногена, сильно различающихся по гидрофобности окружения, не позволяет разделить их вклады просто путем возбуждения флуоресценции на длине волны соответствующего максимума поглощения. Показано, что метод синхронного сканирования в ряде случаев позволяет улучшить разрешение и выявить различия в поведении этих групп хромофоров [4].

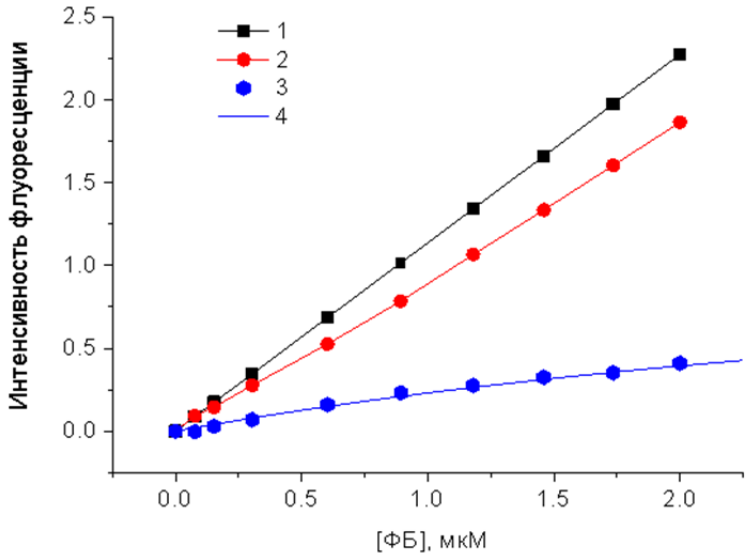

Рис. 2. Интенсивность флуоресценции ФБ (λ_{ex}= 295 нм, λ_{em}= 340 нм) от концентрации белка в буфере (1) и в суспензии липосом (2) (ФХ-0.5 мМ), 3 - разность между зависимостями 1 и 2, 4 - аппроксимация уравнением Ленгмюра (K_a =4.88±1.41 мкМ$^{-1}$).

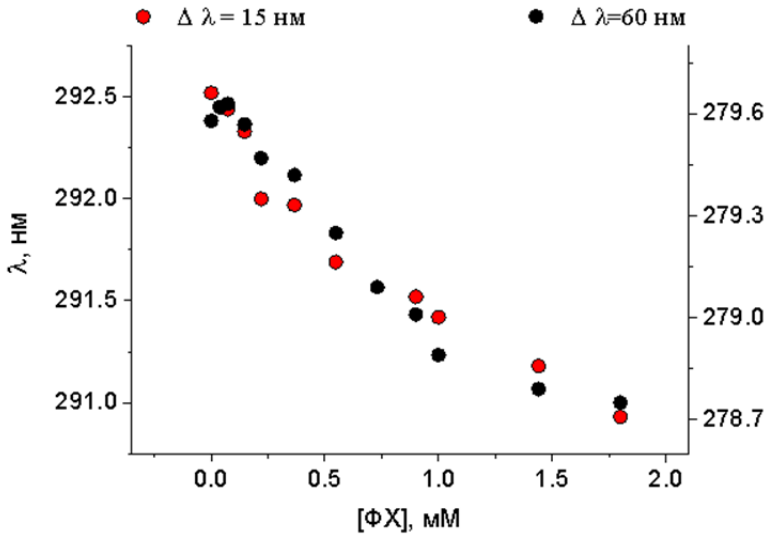

Рис. 3. Длина волны флуоресценции фибриногена от концентрации липида в суспензии яичного ФХ при синхронном сканировании с Δλ=15 нм (левая ось, красные символы) и Δλ=60 нм (правая ось, черные символы).

На рисунке 3 представлены зависимости длины волны максимума эмиссии, соответствующей преимущественно тирозинам или триптофанам, от концентрации липосом из ФХ. Зависимости для обеих групп практически совпадают, демонстрируя монотонный синий сдвиг максимума от концентрации липида с тенденцией к насыщению, свидетельствующий о росте гидрофобности окружения в одинаковой степени как для тирозиновых, так и триптофановых остатков в молекуле фибриногена.

Дополнительная информация, подтверждающая наличие связывания фибриногена с липидной поверхностью и влияние липидов на вторичную структуру, получена методом ИК-спектроскопии на липидных пленках. Конфигурация эксперимента, в целом, аналогична примененной в микрогравиметрии, что упрощает сопоставление данных, полученных этими методами.

При помещении пленки липида в раствор фибриногена с концентрацией 1 мг/мл происходит быстрый рост интенсивности полос амид 1 и 2 в спектре белка (данные не приводятся). Наличие временных изменений указывает на то, что регистрируются спектры именно адсорбируемого белка, а не белка в растворе. Максимальный уровень сорбции через 30 минут экспозиции достигался на пленке из ФХ, на пленке из ДПФХ – на 10% ниже и в присутствии 20% ПОФГ – на 40% ниже. Полученный результат подтверждает данные микрогравиметрии о том, что присутствие отрицательно заряженного липида снижает уровень сорбции белка.

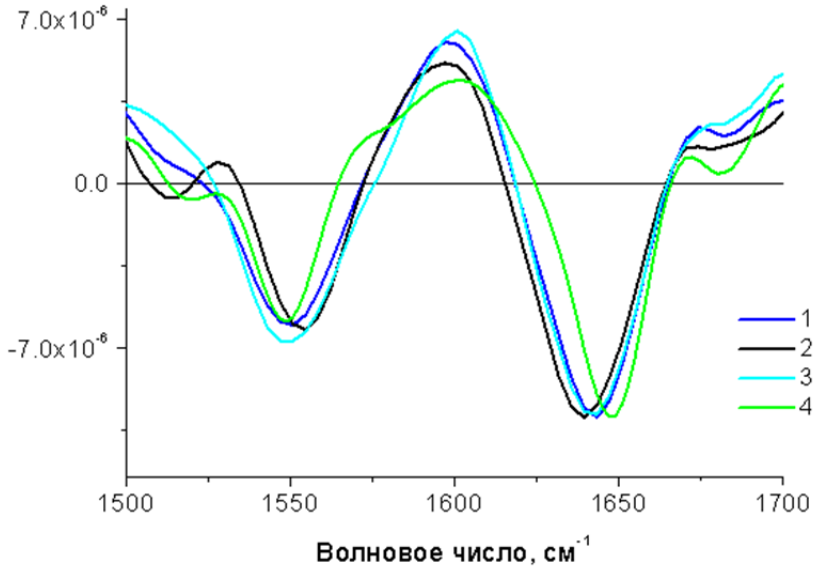

Рис. 4. Вторая производная от спектров ФБ на пленках липида после 30 минут сорбции: ФХ (1), ДПФХ (2), ДПФХ/20% ПОФГ (3), раствор ФБ в буфере (4). Спектры выровнены по интенсивности в максимуме полосы амид 1.

Анализ спектров выявил специфическое влияние липидной поверхности на вторичную структуру фибриногена (Рис. 4). В отличие от спектра в растворе, спектры сорбированного белка имеют большую ширину полосы амид 1, а максимум этой полосы смещен в низкочастотном направлении.

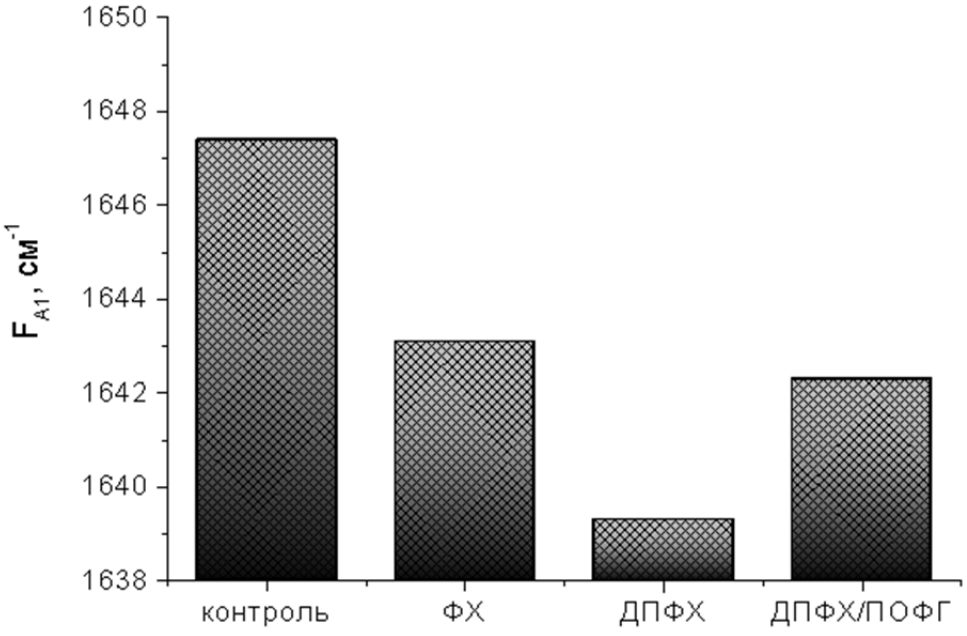

Рис. 5. Положение максимума полосы амид 1 фибриногена в растворе и при сорбции на пленках липидов: ФХ, ДПФХ, ДПФХ/20% ПОФГ.

Эти факторы указывают на рост гетерогенности структуры белка при его сорбции и увеличение доли менее упорядоченных структур.

Величина смещения максимума полосы амид 1 фибриногена от вида липида представлена на рисунке 5. Данные свидетельствуют, что наименьшее денатурирующее влияние оказывает яичный ФХ. При сорбции на ДПФХ сдвиг полосы максимален, но добавление 20% ПОФГ возвращает максимум к его положению в системе с яичным ФХ.

Выводы

Полученные результаты показывают, что фибриноген проявляет определенное сродство к липидной поверхности, зависящее от химической структуры липида и кривизны поверхности, и может сопровождаться денатурационными изменениями вторичной структуры белка. Оба фактора – иммобилизация белка на липидной поверхности и модификация его вторичной структуры – могут сказываться на основной гемостатической функции фибриногена.

Литература

1. Okahata Y., Ebato H. Absorption behaviors of surfactant molecules on a lipid-coated quartz-crystal microbalance. An alternative to eye-irritant tests. // Analytical Chemistry. 1991. V. 63. P.203-207.

2. Birdsall B., King R.W., Wheeler M.R., Lewis C.A.Jr., Goode S.R., Dunlap R.B., Roberts G.C.K. Correction for light absorption in fluorescence studies of protein-ligand interactions // Analytical biochemistry. 1983. V.132. P.353-361.
3. Cunningham M.T., Citron B.A., Koerner T.A. Evidence of a phospholipid binding species within human fibrinogen preparations // Thrombosis Research. 1999. V.95. P.325–334.
4. Jayabharathi J., Thanikachalam V., Perumal M.V. Mechanistic investigation on binding interaction of bioactive imidazole with protein bovine serum albumin—A biophysical study // Spectrochimica Acta Part A. 2011. V.79. P.502–507.