

В. И. СОРОКОВОЙ, Г. И. КЛЕБАНОВ, Ю. А. ВЛАДИМИРОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МИТОХОНДРИЙ В РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

(Представлено академиком Г. М. Франком 4 XI 1970)

В настоящее время большое внимание уделяется изучению механизмов конформационных изменений мембранных белков и связи их с функциональным состоянием биологических мембран. Для этого использовались различные методы: инфракрасная спектроскопия⁽¹⁾, дисперсия оптического вращения и циркулярный дихроизм⁽²⁾, метод молекулярного зонда^(3, 4). Одним из многообещающих методов исследования конформационных перестроек мембранных белков является метод люминесцентного анализа⁽⁵⁻⁸⁾.

В данной работе нами изучались изменения ультрафиолетовой (у.-ф.) белковой люминесценции митохондрий в различных состояниях (по Чансу). Для качественного учета влияния тривиальных оптических эффектов на у.-ф. люминесценцию в идентичных условиях регистрировались изменения у.-ф. люминесценции в тонком слое и дифференциальный спектр поглощения в области 300—400 м μ , а также люминесценция НАД-Н₂. Митохондрии печени крыс выделялись методом

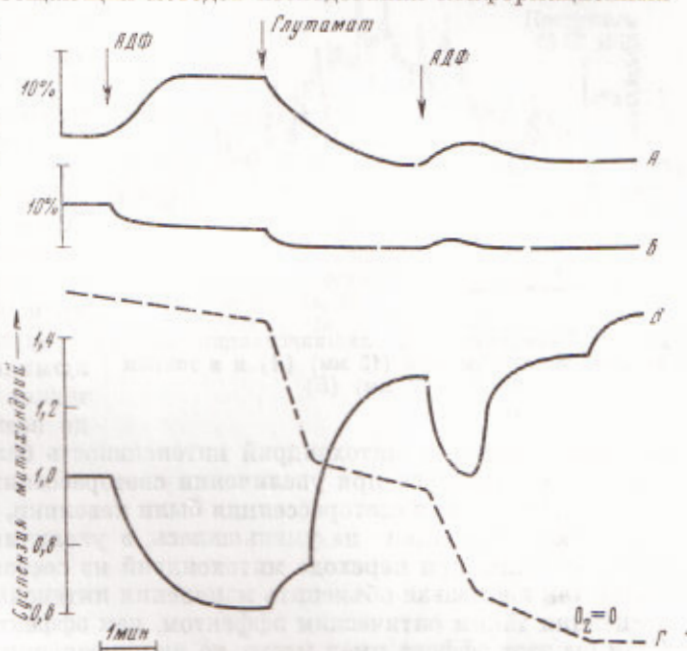


Рис. 1. Изменения оптических параметров суспензии митохондрий в различных функциональных состояниях: у.-ф. люминесценции (А), светорассеяния (Б), люминесценции НАД-Н₂ (В); Г — кривая скорости потребления кислорода

дифференциального центрифугирования в 0,25 М сахарозе. Употребляемая в опытах среда инкубации включала: 0,25 М сахарозу, 0,01 М КСl, 0,005 М MgCl₂, 0,01 М КН₂РO₄, рН 7,4. По ходу опыта производились добавки АДФ и глутамата или сукцината. Возбуждение у.-ф. люминесценции митохондрий производилось светом с длиной волны 297 м μ , а интенсивность люминесценции измерялась при 325, 340, 370, 390 м μ ; параллельно на том же образце регистрировалось потребление кислорода методом полярографии. Люминесценция НАД-Н₂ возбуждалась светом с длиной волны 365 м μ и регистрировалась при 440 м μ . Дифференциальный спектр

поглощения измерялся при помощи спектрофотометра ДФС-2. В каждом опыте измерялись потребление кислорода и один из оптических параметров: либо у.-ф. люминесценция митохондрий, либо флуоресценция НАД-Н₂, либо светорассеяние.

Полученные результаты приведены на рис. 1. Можно видеть, что при добавлении к митохондриям АДФ (переход из состояния I в состояние II), наряду с окислением НАД (рис. 1 B) происходит достоверное, в среднем на 5,5%, увеличение интенсивности у.-ф. люминесценции (рис. 1 A). Добавление субстрата дыхания, вызывающего переход митохондрий в фос-

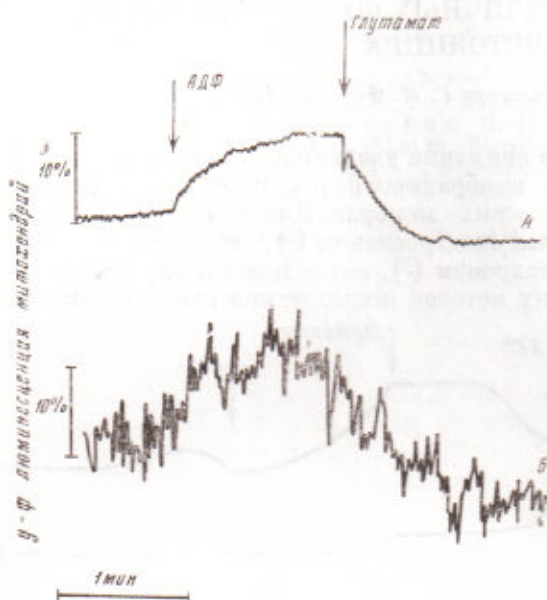


Рис. 2. Изменение у.-ф. люминесценции митохондрий в толстом слое (12 мм) (A) и в тонком слое (1 мм) (B)

фигурации мембран митохондрий интенсивность белковой флуоресценции может увеличиваться при увеличении светорассеяния. Однако, как видно из рис. 1, изменения светорассеяния были невелики, причем интенсивность у.-ф. люминесценции не уменьшалась, а увеличивалась с уменьшением светорассеяния при переходе митохондрий из состояния I в состояние II. Точно так же нельзя объяснить изменения интенсивности белковой люминесценции таким оптическим эффектом, как эффект «сита» («проскока»). Если бы этот эффект имел место, то люминесценция белков должна была быть в состоянии II ослаблена по сравнению с IV состоянием митохондрий, поскольку в состоянии II матрикс имеет большую плотность (⁹). В действительности же наблюдается обратная картина (рис. 1). Таким образом, ни изменения светорассеяния митохондрий, ни изменения объема матрикса сами по себе не могут объяснить наблюдаемые изменения их белковой флуоресценции.

Вторая возможная причина изменений у.-ф. люминесценции — реабсорбция флуоресценции восстановленным никотинамидадениннуклеотидом. Действительно, как видно из рис. 1, всякий раз, когда концентрация НАД-Н₂ увеличивалась, люминесценция белка уменьшалась и наоборот. Однако, как показали измерения дифференциальных спектров поглощения, изменение оптической плотности НАД-Н₂ в суспензии митохондрий не превышает 0,0035 для 1 мм оптического пути в различных состояниях. В то же время изменения белковой люминесценции в тонком слое (1 мм)

сопровождалось увеличением концентрации НАД-Н₂ и снижением интенсивности белковой флуоресценции, которая после фосфорилирования всего АДФ (состояние IV) была в среднем на 4,5% ниже, чем в состоянии I. Повторный переход митохондрий в состояние III приводил к снижению концентрации НАД-Н₂ и небольшому увеличению у.-ф. люминесценции; эти параметры возвращались к прежним значениям в состоянии IV. Таким образом, интенсивность белковой флуоресценции митохондрий в состоянии IV была на 10% ниже, чем в состоянии II. Состояния I и III были в этом отношении промежуточными.

Причин различия в у.-ф. люминесценции митохондрий может быть несколько. Прежде всего, при изменении кон-

при переходе из состояния I в состояние II по характеру и величине оставались прежними (рис. 2). Кроме этого, изменения белковой флуоресценции наблюдались не только при длине волны 340 мμ, где поглощение НАД-Н₂ максимально, но и при 390 мμ, где НАД-Н₂ практически не поглощает. Таким образом, изменения у.-ф. люминесценции митохондрий в наших опытах нельзя объяснить влиянием реабсорбции НАД-Н₂.

К сожалению, без постановки дополнительных опытов довольно трудно исключить еще один путь возможного влияния НАД-Н₂ — миграции энергии на этот кофермент с апофермента в дегидрогеназах. Указанием на то, что этот эффект не может полностью объяснить наблюдаемые изменения у.-ф. люминесценции, может быть сопоставление кинетики изменений флуоресценции НАД-Н₂ и белка, которое показывает, что, хотя эти два параметра всегда изменяются в противоположных направлениях, между величинами этих изменений нет количественного соответствия. Этот вопрос будет рассмотрен в последующих сообщениях.

Нам представляется, что наиболее вероятная причина наблюдаемых изменений интенсивности у.-ф. люминесценции митохондрий при изменении их функционального состояния — изменение конформации белков мембран, которое приводит к изменению локального окружения триптофановых остатков, ответственных за белковую флуоресценцию.

Второй Московский государственный
медицинский институт
им. Н. И. Пирогова

Поступило
23 IX 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. M. Grecham, D. F. H. Wallach, *Biochim. et biophys. acta*, **193**, 4, 225 (1969). ² J. M. Wrigglesworth, L. Packer, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **128**, 790 (1968). ³ Л. Я. Гендель, Н. Д. Гольфельд и др., В сборн. Митохондрии, «Наука», 1969, стр. 243. ⁴ V. Chance, *Chuan-pu-lee, Febs Letter*, **4**, 3, 181 (1969). ⁵ Ю. А. Владимиров, Фотохимия и люминесценция белков, «Наука», 1965. ⁶ С. В. Конев, Электронно-возбужденные состояния биополимеров, Минск, 1965. ⁷ С. В. Конев, Т. И. Лыскова, *Биофизика*, **10**, 4, 649 (1965). ⁸ А. Я. Потапенко, А. Ф. Поглазов и др., *Биофизика*, **15**, 3, 549 (1970). ⁹ C. R. Haskenbrock, *J. Cell. Biol.*, **30** 270 (1966).