

FOTOINDUKOWANA CHEMILUMINESCENCJA CYTOCHROMU C*

Danuta Sławińska, Janusz Sławiński, Włodzimierz Puzyna

Akademia Rolnicza w Poznaniu i Szczecinie

Instytut Fizyki i Chemii AR, 60-625 Poznań, ul. Wojska Polskiego 75

Absorpcja promieniowania UV i widzialnego przez wodne roztwory hemoproteidów inicjuje procesy fizyczne i chemiczne, jak wzbudzenie elektronowo-oscylacyjne, fotojonizacja, reakcje rodnikowe i fotodestrukcja. Procesom tym towarzyszy chemiluminescencja (CL) o wydajności kwantowej rzędu 10^{-10} - 10^{-8} i czasie trwania od kilkunastu sekund do minut [5, 7-9]. Stanowi ona przedmiot coraz liczniejszych badań, gdyż dostarcza istotnych informacji o mechanizmie tych procesów. W związku z potencjalną możliwością rozcieńczenia stratosferycznej warstwy ozonowej i zwiększeniem natężenia słonecznego promieniowania UV w biosferze, szczególnie aktualne staje się poznanie mechanizmów i skutków oddziaływania promieniowania UV i widzialnego na białka hemowe. Wiele z nich, jak np. cytochromy, ulega fotodestrukcji [2, 6], co prowadzi do zaburzenia transportu elektronów w procesach fotosyntezy, oddychania i hydroksylacji.

Celem niniejszej pracy było zbadanie widm absorpcji, fluorescencji i chemiluminescencji wodnych roztworów cytochromu (cyt c), poddanych działaniu promieniowania UV i widzialnego.

MATERIAŁY I METODY

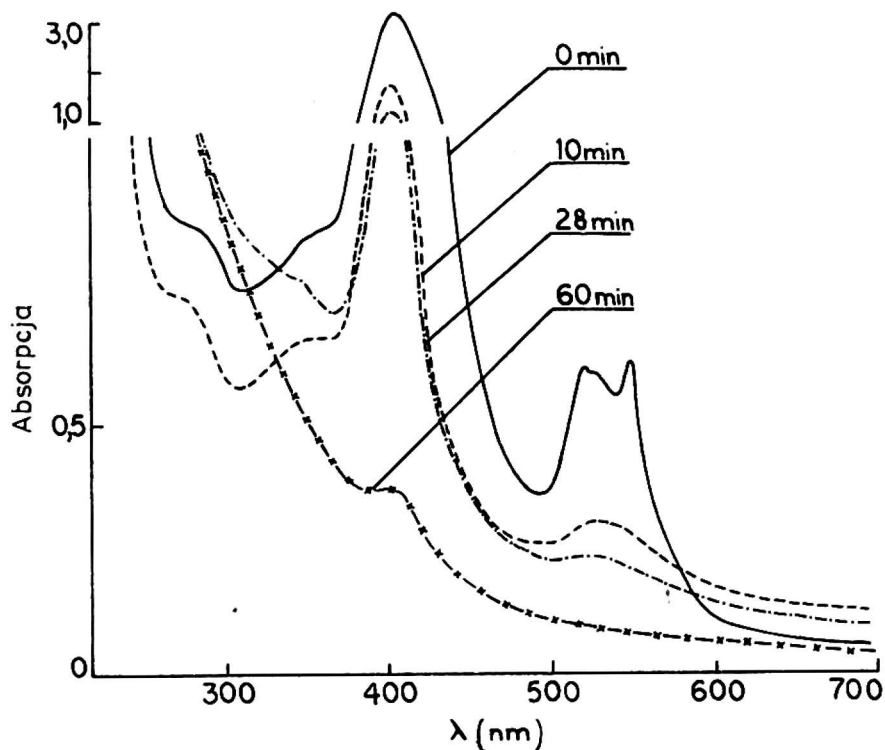
Do badań użyto cytochromu c z serc wieprzowych w postaci preparatu liofilizowanego lub w fizjologicznym 0,85% roztworze NaCl produkcji Biomed, Kraków. Wodne roztwory cytochromu c, zawierają-

*Pracę realizowano w temacie MNSzWiT R. III. 13. 1. 2.

ce rozpuszczony tlen ($0,3 \mu\text{M O}_2$) i 10 mM bufor węglanowy o pH 10 poddano naświetlaniu w przepływowych reaktorach fotochemicznych, opisanych szczegółowo w pracy [1]. Natężenie integralnego promieniowania ($\lambda = 250-570 \text{ nm}$), określone metodą aktynometryczną wynosiło $\approx 10^{19} \text{ h}\nu/\text{s} \cdot \text{dcm}^3$. Stężenia cytochromu zmieniano od $1 \mu\text{M}$ do $10 \mu\text{M}$, temperaturę pomiarów utrzymywano na poziomie 30°C . Widma absorpcji badanych roztworów mierzono po różnym czasie naświetlania za pomocą spektrofotometru Techtron 635-D, Varian. Widma fluorescencji rejestrowano na spektrofotometrze Hitachi MPM-4. Skład widmowy fotoindukowanej chemiluminescencji określono metodą filtrów granicznych i zliczania pojedynczych fotonów, stosując układ przepływowy [4].

WYNIKI I DYSKUSJA

Zmiany widma absorpcji cytochromu c pokazane na rysunku 1 wyraźnie świadczą o tym, że naświetlanie powoduje fotodegradację makrocząsteczki, obejmującą zarówno komponentę białkową, jak też pierścień porfirynowy i układ hemowy. Natężenie pasm α i β przy



Rys. 1. Widma absorpcji $10 \mu\text{M}$ roztworu cytochromu c, pH = 10.2, $T = 303^\circ\text{K}$ naświetlanego promieniowaniem UV i widzialnym

520 i 546 nm zmniejsza się, co wskazuje na utlenianie cytochromu (Fe^{2+}) do cytocheomu (Fe^{3+}). Najbardziej wrażliwe jest pasmo Soret przy 410 nm (tab. 1). Absorpcja aromatycznych aminokwasów przy 275 nm początkowo maleje i po $\tau_{ir} = 10$ min wzrasta. Sugeruje to, że reszty aminokwasowe komponenty białkowej Trp, Tyr, Phe oraz Cys i Met ulegają fotoutlenianiu. Dodatkowych dowodów dostarczają widma fluorescencji (rys. 2). Natywny cytochrom c nie fluoryzuje [3, 10]. Po naświetleniu obserwuje się wzrost natężenia fluorescencji i przesunięcie batochromowe w widmach wzbudzenia i emisji z obszaru Trp ($\lambda_{exc} = 270$ nm, $\lambda_{em} = 352$ nm) do obszaru $\lambda_{exc} = 360-400$ i $\lambda_{em} = 400-550$ nm. Wyniki te świadczą o tym, że reszty aminokwasów aromatycznych, w szczególności Trp, podlegają procesom utleniającej degradacji do fluoryzujących produktów typu formylokinureniny, kwasów ksanturenowego, aminosalicylowego i o-aminofenonu [5, 11].

T a b e l a 1

Wartości stosunku sygnał/tło fotochemiluminescencji roztworów cytochromu c i jego składników naświetlanych promieniowaniem mono- i polichromatycznym

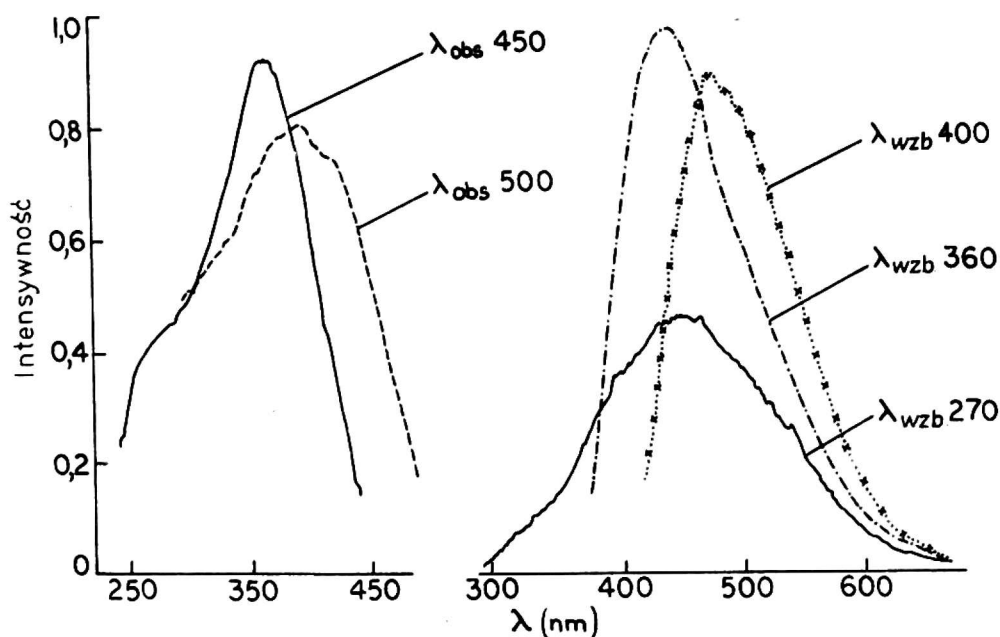
| Roztwór | Sygnał/tło | |
|--|--------------------------|------------------------------|
| | $\lambda_{exc} = 254$ nm | $\lambda_{exc} = 250-570$ nm |
| 20 mM bufor węglanowy pH 10,2 (r.kontrolny) | - | 11,2 \pm 2,7 |
| 10 μ M hematyna | 1,6 \pm 0,1 | 12,6 \pm 3,4 |
| 10 μ M albumina (BSA) | 6,0 \pm 2,1 | 28,4 \pm 8,0 |
| 10 μ M cytochrom c | 5,1 \pm 1,3 | 40,6 \pm 12,1 |

Początkową względną szybkość ($\Delta A_{\lambda} / \Delta \tau_{ir}$) utleniającej fotodegradacji* cytochromu c obliczoną z widm absorpcji, przy $\tau_{ir} = 10$ min przedstawiają następujące dane:

* Warunki fotodegradacji cyt c: pH 10,2, temperatura 30-35°C, czas napromieniowania (τ_{ir}) 10 min.

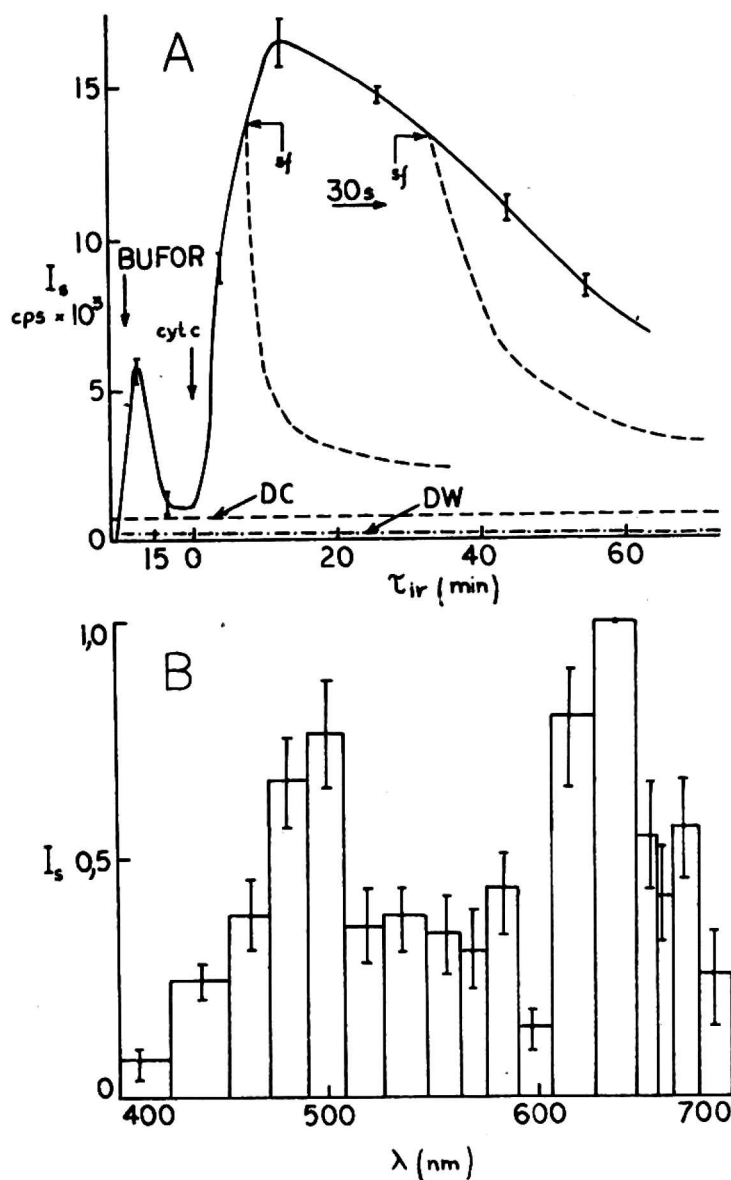
| pasma absorpcji λ , nm | | | |
|--------------------------------|------|-----|-----|
| 270 | 410 | 520 | 546 |
| -9,2 | 28,0 | 2,4 | 2,3 |

Jak wynika z tabeli 2 efekt działania promieniowania monochromatycznego (85% emisji z linii Hg 254 nm) na natężenie CL jest znacznie mniejszy niż promieniowania polichromatycznego. Zasadniczą przyczyną jest większa moc lampy TQ-81 od lampy rezonansowej, przypadająca na jednostkę objętości naświetlanego roztworu. Nie można jednak wykluczyć inicjowania fotoutleniania w wyniku absorpcji w pasmach Soreta i α , β z udziałem tlenu singletowego $O_2(^1\Delta_g)$.



Rys. 2. Widma wzbudzenia (z lewej) i emisji (z prawej) fluorescencji roztworów cyt c napromienionego w ciągu 1 godz. Widma bez poprawek na krzywą czułości spektralnej fotopowielacza

Zagadnienie to wymaga dalszych badań. Z tabeli 2 widać również że oddzielnie badane składniki roztworu cyt c wnoszą istotny wkład do obserwowanej CL, której natężenie nie jest wielkością addytywną. Jest to zrozumiałe z uwagi na możliwość migracji energii wzbudzenia i gaszenia luminescencji w kompletnej makrocząsteczce cytochromu c [3, 10].



Rys. 3. Kinetyka (A) i skład spektralny (B) fotochemiluminescencji 10 μ M roztworu cyt c, napromienionego lampą TQ-81; I_s - natężenie CL podczas stacjonarnego przepływu; czas martwy ≈ 3 s, τ_{ir} - czas napromieniania, DC - prąd ciemny, DW - natężenie emisji z nie-napromienionej wody bidestylowanej (tło), cps - liczba zliczeń na 1s. Linia przerywaną zaznaczono krzywe kinetyczne zaniku CL $I = f(t)$ od momentu wstrzymania przepływu (sf). B - widmo CL; wysokość słupków odpowiada względnemu natężeniu CL, a ich szerokość odległości $\Delta\lambda$ między krótkofalowymi granicami przepuszczalności filtrów

Kinetyka fotoindukowanej CL ma złożony przebieg, odpowiadający reakcjom następczym (rys. 3A). W procesach fotodegradacji tworzą się przejściowe produkty wzbudzone - narastanie krzywej $I_s = f(\tau_{ir})$, które stopniowo są zużywane (spadek krzywej). Z krzywych wygasania $I = f(t)$, mierzonych metodą wstrzymanego przepływu wynika, że czas życia wzbudzonych produktów jest stosunkowo długi rzędu 1-100 s. Zanikają one w dwóch procesach o stałych szybkości rzędu $k_1 \approx 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ i $k_2 \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Analiza widma CL, (rys. 3B) świadczy o generowaniu w naświetlanym roztworze cytochromu c wzbudzonych produktów, które emitują w niebieskim i czerwonym zakresie widma. Pasma w części niebieskiej pokrywa się z fluorescencją wzbudzonych produktów fotodegradacji Trp (rys. 2). Pasma w zakresie czerwonym można natomiast przypisać emisji ze wzbudzonych bimoli tlenu singletowego $(O_2)_2(^1\Delta_g)$. Bezsporne wykazanie udziału 1O_2 jest trudne i wymaga specjalnych badań, które są w toku.

LITERATURA

1. Elbanowski M., Lisicki E., Sławińska D., Sławiński J.: Roczn. AR w Poznaniu, seria Fizyka i Chemia, w druku, 1980
2. Erixon K., Butler W. L.: Biochim. Biophys. Acta, 253, 483-490 1971
3. Lindquist L., Lopez-Campillo., Alpert B.: Photochem. Photobiol., 28, 417-420, 1971
4. Polewski K., Pukacki W., Sławińska D., Sławiński J.: Zesz., Probl. Post. Nauk. Rol., w druku, 1979
5. Sapezhinsky I. I., Dontsova E. G.: Biofizyka, 18, 932-997; 1974, 19, 34-37, 1973
6. Schmidt W., Thomson K., Butler W. L.: Photochem. Photobiol. 26, 4, 407-411, 1977
7. Sławińska D., Sławiński J.: IVth Intern. Biophys. Congr., Moskwa, Abstr. E161/6 pp. 51-52, 1972
8. Sławińska D., Sławiński J.: Acta Univ. Lodziensis, ser.II, 11 203-241, 1977
9. Stauff J.: Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 68, 773-781, 1964
10. Teale F. W. J.: Biochem. J., 76, 381-388, 1960
11. Warlant P., Santus R., Grossweiner L. I.: Photochem. Photobiol., 22, 63-65, 1975

Д. Славиньска, Я. Славиньски, В. Пузына

ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЦИТОХРОМА c

Резюме

Изучено кинетику и спектральный состав хемилюминесценции возникающей при облучении УФ и видимым светом ($\lambda = 250-570$ нм интенсивность 10^{19} $h\nu$ с:дцм³) водных растворов цитохрома c (1-10 мкМ, рН 10, T = 303 К). Изменения спектров поглощения в области 275-410 и, 520-546 нм, а также нарастание флуоресценции в области

420–550 нм (λ_{exc} 360 нм) указывают на процессы фотоокислительной деструкции белка и гема. В этих процессах образуются электронно возбуждённые продукты типа кинуренина (эмиссия в области 420–480 нм) и возможно синглетного молекулярного кислорода $O_2(^1\Delta_g)$ (полосы испускания 630 и 700 нм).

D. Sławińska, J. Sławiński, W. Puzyna

PHOTOINDUCED CHEMILUMINESCENCE OF CYTOCHROME C

S u m m a r y

The kinetics and spectral distribution of chemiluminescence induced by the irradiation with UV and visible - light of aqueous solutions of cytochrome c 1-10 μM , pH 10, $T = 303^\circ\text{K}$ ($\lambda = 250-570$ nm, intensity $\approx 10^{19}$ $\text{h}\nu / \text{s dcm}^3$) were investigated. Changes of absorption spectra in the region of 275, 410 and 520–546 nm, as well as the increase of fluorescence in the range 420–550 nm (λ_{exc} 360 nm) indicate that both the haem and protein part of cyt c undergo photooxidative degradation. In these processes electronically excited products of kinurenine type are generated which emit in the range 420–480 nm. The possibility also exists that singlet molecular oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ is responsible for the observed red emission bands at 630 and 700 nm.