



УДК 577.152.169*93.01:577.336

ДИАМЕТР ГЛОБУЛЫ И НЕКОТОРЫЕ ЭЛЕКТРОННО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ФЛАВОПРОТЕИНОВОГО ФРАГМЕНТА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПО ДАННЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2000 г. В. И. Сухарев, Н. Л. Векшин[#]

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Московская обл.

Поступила в редакцию 12.04.2000 г. Принята к печати 31.05.2000 г.

С помощью флуоресцентной спектроскопии – импульсной разрешенной во времени, фазово-модуляционной, поляризационной и корреляционной конфокальной – проведены измерения размера глобулы флавопротеинового (периферического) фрагмента митохондриальной NADH-дегидрогеназы и изучены некоторые электронно-конформационные свойства этого белка. Эффективный ротационный диаметр фрагмента белка составляет не менее 44 Å, а трансляционный – около 72 Å. Диаметр протомиохондриальных частиц сердца быка, из которых была получена фракция периферических фрагментов, был не менее 2300 Å. Триптофановое и флавиновое излучение белка сильно затухает железом кластеров. Это говорит о сильном электрон-колебательном взаимодействии железа с триптофановыми остатками и флавином. Не исключено, что обобществление электронных орбиталей железо-серных кластеров, триптофановых остатков и флавина облегчает перенос электрона по белковой структуре. Температурная инактивация фермента не сопровождалась ни существенными конформационными изменениями, ни заметной потерей ионов железа из кластеров, находящихся недалеко от триптофановых остатков.

Ключевые слова: NADH-дегидрогеназа; триптофан; флавин; затухание флуоресценции; поляризация; корреляционная спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

NADH-дегидрогеназа (КФ 1.6.99.3) – ключевой фермент (комплекс I) дыхательной цепи митохондрий. Этот 750-кДа фермент состоит из ~40 субъединиц, содержит флавиномононуклеотид (FMN) и пять–шесть железо-серных кластеров. Он катализирует восстановление убихинона и сопряженный с транспортом электронов перенос протонов через мембрану [1, 2]. С помощью компьютерного анализа электронных снимков была проведена реконструкция общей структуры фермента в двумерных кристаллах, которая показала, что комплекс имеет вид “сапожка” размером не менее 100 Å [3]. При воздействии хаотропными агентами комплекс разделяется на водонерастворимую мембранную и водорастворимую периферическую части. Периферическая часть проявляет высокую каталитическую активность в присутствии искусственных акцепторов электронов [4, 5]. В зависимости от способа выделения периферическая часть может содержать разное количество субъединиц, железо-серных кластеров и флавина.

Цель данной работы – изучение обобщенных структурных свойств периферического фрагмента NADH-дегидрогеназы из митохондрий сердца быка с помощью флуоресцентной спектроскопии – импульсной разрешенной во времени, фазово-модуляционной, поляризационной и корреляционной конфокальной. В качестве флуорофоров использованы триптофановые остатки и флавин самого белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поляризационная и фазово-модуляционная спектроскопия

Фазовое время жизни возбужденного состояния FMN в периферическом фрагменте ферментного комплекса составляет около 4.5 нс (табл. 1). Высокая степень поляризации излучения (0.3) говорит о том, что в первом приближении собственным вращением флавина можно пренебречь и тогда, зная время жизни и поляризацию, можно по уравнению Левшина–Перрена вычислить эффективный размер белковой глобулы (см. методике в “Эксперимент. части”). Аналогичным образом можно поступить, измерив время жизни и

[#] Автор для переписки (e-mail: vekshin@venus.iteb.serpukhov.su; тел.: (095) 923-74-67 (2-92)).

Таблица 1. Степень поляризации и фазовое время жизни возбужденного состояния триптофановых остатков и флавина периферического фрагмента NADH-дегидрогеназы и вычисленные по уравнению Левшина–Перрена размеры белковой глобулы

Величина	Trp	FMN
Максимум излучения, нм	340 ± 1	525 ± 1
Фазовое время жизни, нс	2.0 ± 0.2	4.5 ± 0.2
Поляризация	0.36 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Угол вращения, град	~18	~26
Объем глобулы, Å ³	46600 ± 6100	43700 ± 4900
Диаметр глобулы, Å	45 ± 2	44 ± 2

Таблица 2. Параметры* кинетики затухания триптофановой флуоресценции периферического фрагмента NADH-дегидрогеназы до и после прогревания при 40°C

Параметры	Белок	Инактивированный белок
τ_1 (нс); α_1 (%)	0.14; 33.6	0.12; 35.1
τ_2 (нс); α_2 (%)	1.05; 38.6	0.99; 37.5
τ_3 (нс); α_3 (%)	3.27; 24.4	3.28; 24.0
r_1	0.248	0.246
t (нс)	3.85	3.66

* τ_1 , τ_2 , τ_3 – первая, вторая и третья компоненты затухания флуоресценции; α_1 , α_2 , α_3 – их амплитуды; минорная артефактная компонента не приведена; r_1 – начальная анизотропия; t – время вращательной корреляции.

поляризацию триптофановых остатков. Из табл. 1 видно, что диаметр белка, найденный обоими способами, составляет не менее 44 Å.

Несмотря на достаточно высокое фазовое время жизни белкового флавина, квантовый выход флавинового излучения низок из-за быстрой дезактивации возбужденного флавина железосерным кластером Fe₄S₄ [6, 7]. Это означает, что между флавином и железом имеется сильная электрон-колебательная связь. Такое электронное обобществление гетероароматического флавина с железосерным кластером должно облегчать перенос электрона между ними.

Импульсная разрешенная во времени спектроскопия остатков триптофана

На рисунке представлено затухание триптофановой флуоресценции белка с последующей математической обработкой методом деконволюционного анализа компонентного состава и вкладов в интенсивность и анизотропию флуоресценции. Результаты такой обработки представлены в табл. 2. Кривая затухания триптофановой флуоресценции белка содержит три достоверные компоненты: 0.14, 1.05 и 3.27 нс с амплитудами 33.6, 38.6 и 24.4% соответственно (кроме перечисленных, наблюдалась также слабая ~3%-ная артефактная 15-нс компонента, вызванная погрешно-

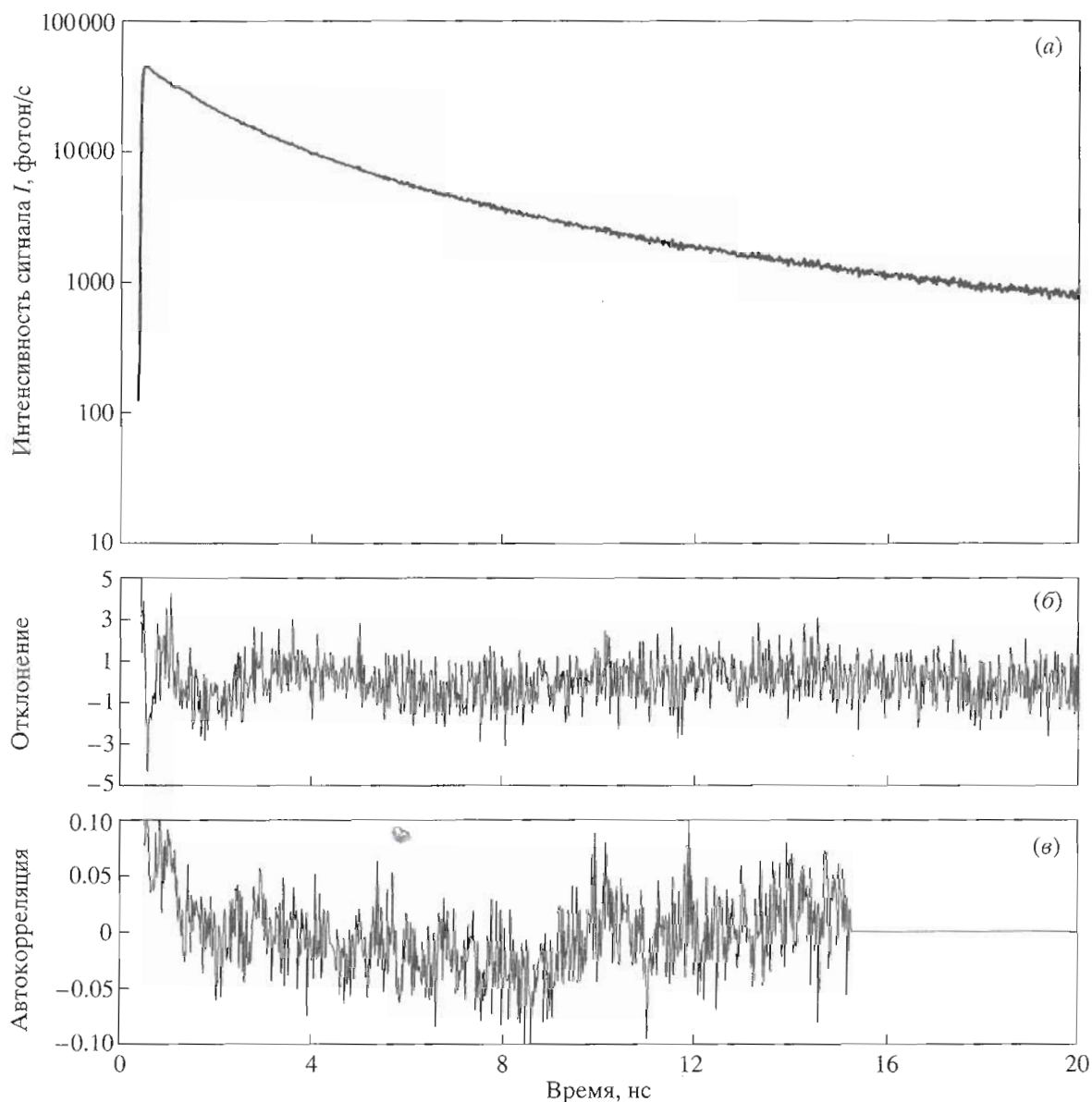
стями измерений и вычислений; этой компонентой можно пренебречь). Исходя из полученных малых времен жизни можно сделать однозначный вывод, что триптофановые остатки белка сильно затухают какими-то дезактивирующими группами. В работе [8] было показано, что наиболее сильными тушителями в белках являются железосерные кластеры, снижающие время жизни остатков триптофана примерно до 0.1–1 нс. В периферическом фрагменте NADH-дегидрогеназы содержится кластер Fe₄S₄, а также два или три других подобных кластера [4, 5]. На основании сказанного можно заключить, что по крайней мере две компоненты – самые короткоживущие – принадлежат тем триптофановым остаткам, которые находятся относительно недалеко от кластеров, в радиусе электронных орбиталей железа, до 10 Å.

Известно, что время жизни возбужденного состояния остатка триптофана зависит от его микроокружения, а амплитуда зависит только от количества триптофановых остатков с данным временем жизни [9]. Относительные амплитуды пропорциональны числу остатков в том или ином окружении. Очевидно, что 0.14- и 1.05-нс компоненты, составляющие вместе примерно 72% по амплитуде, принадлежат тем триптофановым остаткам, которые затухают железом. Таким образом, правомочно сделать вывод о том, что большинство остатков триптофана белка находится в сфере орбиталей железа. Не исключено, что такое электронное обобществление гетероароматических триптофанов с железосерными кластерами облегчает перенос электрона по белковой структуре.

Недавно было показано [7], что окисление NADH ферментом в присутствии ряда искусственных акцепторов электронов может происходить без участия флавина и убихинона. Вероятно, в подобных реакциях задействован кластер Fe₄S₄. Нами было сделано наблюдение, что NADH : феррицианид-редуктазная активность препарата полностью теряется после двухчасового прогревания при 40°C (с последующим охлаждением до 20°C). Между тем, как видно из табл. 2, никаких заметных изменений в кинетике затухания триптофановой флуоресценции после прогревания образца не наблюдается. Это говорит как об отсутствии существенных конформационных изменений, так и о том, что причиной температурной инактивации фермента не может являться потеря железа.

Корреляционная конфокальная микроскопия флавина

Корреляционная спектроскопия позволяет оценить размеры диффундирующих частиц по флуктуациям интенсивности их флуоресценции в микроскопическом освещаемом объеме [10] (см. "Эксперимент. часть"). Как видно из табл. 3, сво-



Кинетика затухания триптофановой флуоресценции периферического фрагмента NADH-дегидрогеназы и проверка трехкомпонентной модели затухания: (а) – экспериментально зарегистрированная кинетика затухания флуоресценции фермента (результат решения обратной задачи деконволюционного анализа указанной кинетики не показан, поскольку теоретическая кривая почти совпадает с экспериментальной); (б) – результат вычисления поточечной разности между теоретической и экспериментальными кривыми затухания (масштаб по вертикальной оси тот же, что и на верхнем графике); (в) – автокорреляционная функция.

бодный флаavin имеет диффузионный диаметр около 15 Å. В эту цифру значительный вклад вносит его сольватная оболочка.

Мы наблюдали, что свободный FMN может быстро встраиваться из водного раствора в мицеллы додецилсульфата натрия (SDS). Диаметр частиц SDS с флавином составляет 75 Å (табл. 3). Эта цифра согласуется с величинами, полученными методом корреляционной микроскопии в работе [10] для мицелл SDS с флуоресцентно-мечеными фосфолипидами: диаметры частиц от 74 до 102 Å.

Из табл. 3 видно, что эффективный диаметр диффундирующей глобулы белка составляет около 72 Å. Эта цифра выше, чем было получено для вращающейся глобулы по Левшину–Перрену (около 44 Å). Разница может быть обусловлена несколькими причинами: а) различием диффузионного и ротационного диаметров анизотропной белковой структуры; б) заниженными значениями ротационного диаметра из-за пренебрежения вращательным движением флуорофора внутри белковой глобулы; в) приближенным характером определения коэффициента диффузии.

Таблица 3. Диффузионное время (τ_d), измеренное при помощи корреляционной микроскопии флуктуаций флавиновой флуоресценции и вычисленные диаметры (d)

Образец	τ_d , мкс	d , Å
FMN в воде	59 ± 7	15 ± 2
FMN с SDS	295 ± 4	75 ± 1
Белок	$360 \pm 5^*$	72 ± 2
ПротоМХ**	9000 ± 100	2290 ± 30

* В данном случае τ_d было измерено в световом объеме 1.1 фл.

** ПротоМХ – протомитохондрии, полученные путем фильтрации митохондриальной суспензии через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США).

Протомитохондриальные частицы, содержащие интактную NADH-дегидрогеназу и другие компоненты дыхательной цепи [11], имеют диффузионный диаметр 2280 Å (табл. 3), что совпадает с диаметром пор фильтра, использованного при получении этих частиц, 0.22 мкм (Millipore, США).

Таким образом, полученные данные позволяют количественно охарактеризовать размеры частиц в препаратах NADH-дегидрогеназы и их некоторые электронно-конформационные свойства. В дальнейшем использованные методы будут привлечены для изучения взаимодействия NADH-дегидрогеназы с донорами и акцепторами электронов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Митохондрии выделяли из сердечной мышцы быка, основываясь на стандартном методе [12]. Выделение фракции периферического фрагмента NADH-дегидрогеназы из митохондрий осуществлялось согласно [4, 13] с некоторыми модификациями [11], обеспечивающими воспроизводимые результаты. Полученная фракция фрагментов содержит железо-серные кластеры и флавины (%): FMN – 70, рибофлавин – 15, FAD – 15 [6, 11]. Все флавины находились в связанном белками виде. Поскольку FMN (или рибофлавин) характерен только для NADH-дегидрогеназы дыхательной цепи, то значит именно этот белок составляет наибольшую долю от всех флавопротеинов. Периферический фрагмент NADH-дегидрогеназы, состоящий из 8 субъединиц, составлял не менее 85% всего белка фракции. Полученная фракция обладает достаточно высокой ферментативной активностью в отношении окисления NADH искусственными акцепторами электронов – феррицианидом, дихлорфенолиндофенолом и паранитротетразолием фиолетовым [7, 11].

Измерение поляризованного триптофанового излучения периферического фрагмента NADH-дегидрогеназы проводили в 20 mM Трис-НСl или фосфатном буфере (рН 7.5) на спектрофлуорометре “SLM-4800” (SLM Inc., США) при возбуждении 300 нм и регистрации при 340 нм, а поляризованного флавинового излучения – при 460 и 520 нм,

соответственно. Время жизни возбужденного состояния измеряли фазовым способом на том же приборе при частоте модуляции 30 МГц. При этом были использованы зеркальные кюветы, позволяющие многократно усилить флуоресцентный сигнал [9].

Подстановка времени жизни и степени поляризации в уравнение Левшина–Перрена [9] позволяет оценить (если пренебречь собственной вращательной подвижностью флуорофоров внутри белковой глобулы) величину вращательной подвижности (угол θ) флуоресцирующего белка и вычислить его объем (V):

$$\begin{aligned} 1/P - 1/3 &= (1/P_0 - 1/3)(1 + RT\tau/\eta V) = \\ &= (1/P_0 - 1/3)(2/(3 \cos^2\theta - 1)), \end{aligned}$$

где P – измеряемая поляризация, P_0 – предельная поляризация (0.42 для FMN [6] и практически столько же – для триптофана [14]), R – универсальная постоянная, T – абсолютная температура (293 К), τ – время жизни, η – вязкость раствора (для разбавленных водных растворов она равна 0.01 П).

Измерение кинетики затухания флуоресценции остатков триптофана белка проводилось в условиях термостатирования при 20°C на лабораторной установке Вагенингенского университета (Голландия) [8]. Длина волны возбуждения была 300 нм, частота следования импульсов – 951.2 кГц, временное разрешение на канал системы детекции – 20 пс; регистрация излучения происходила в 2048 каналах. Для выделения триптофанового излучения был использован интерференционный фильтр 348.8 нм (Shott, США). Для калибровки начального участка кривой затухания использовали паратерфенил с заведомо одноэкспоненциальным характером затухания (время жизни 20 пс) в смеси четыреххлористого углерода и циклогексана (1 : 1). Измерения начинались с 3 циклов по 1 мин на каждую составляющую поляризации паратерфенила – параллельную и перпендикулярную. Затем регистрировали 10 таких же циклов каждой поляризации для образца. Потом, после измерения фоновой флуоресценции растворителя (буфера в отсутствие белка) в количестве 4 циклов, повторяли измерение 3 циклов паратерфенила. Обработка данных заключалась в вычитании усредненных значений фоновой флуоресценции с последующим применением метода максимальной энтропии, обеспечивающим высокую точность разложения на компоненты [8, 9]. Для обработки использовались каналы с 20-го по 1500-й, которым соответствовал временной диапазон 240 пс–30 нс.

Корреляционная микроскопия осуществлялась на установках типа “ConfoCor” (Zeiss, Германия). Лазерное излучение с длиной волны 488 нм и мощностью на выходе лазера ~20 мВт проходило через ослабляющий фильтр с оптическим поглощением 1.5 и фокусировалось в объеме ~0.4 фл (на установке “ConfoCor” Вагенингенского уни-

верситета – 1.1 фл) [10]. Флуктуации интенсивности флуоресцентного сигнала регистрировались от эллипсоида с главными полуосями ~0.25 и ~1 мкм с непрерывной записью коррелограммы – автокорреляционной функции. Математический анализ этой функции позволяет определить диффузионное время броуновского движения флуоресцирующих частиц, откуда по коэффициенту трансляционной диффузии можно оценить размер флуоресцирующих частиц и их количество в рабочем объеме. Концентрации частиц составляли (нМ): белок – 2.8, протомитохондрии – 0.6, FMN – 89, FMN в SDS – 8.2. Диаметр (d) частицы определяли по известному уравнению [10]:

$$d = kT/3\pi D\eta,$$

где k – постоянная Больцмана, D – коэффициент трансляционной диффузии, который находится как $\omega^2/4\tau_d$, где τ_d – время, необходимое для диффундирования частицы на расстояние ω (характерный размер сечения эллипсоида, равный корню квадратному из πr^2); вязкость (η) воды = 1 сП.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны В.В. Ашину (ИБФМ РАН) за выделение фермента, А.Э. Ковалеву (ИБК РАН), А. Ван Хоек и М. Хинк (Вагенингенский университет) – за большую помощь в измерениях. Работа выполнена при финансовой поддержке The Netherlands Organization for Scientific Research, грант NWO 047-007-005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hatefi Y. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 1015–1025.
2. Brandt U. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1318. P. 79–91.
3. Boekema E.J., van Heel M.G., van Bruggen E.F.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 787. P. 19–26.
4. Dooijewaard G., Slater E.C., van Dijk P.J., De Bruin G.J.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 503. P. 405–424.
5. Walker J.E., Skehel J.M., Buchanan S.K. // Meth. Enzymol. 1995. V. 260. P. 14–34.
6. Vekshin N.L., Sharova I.V., Sukharev V.I. // Flavins and Flavoproteins. Proceedings of the 13th Intern. Symp. in Konstanz / Ed. S. Ghisla. Berlin, 1999. P. 635–638.
7. Ломтев А.С., Шарова И.В., Векшин Н.Л. // Докл. РАН. 2000 (в печати).
8. Dorovska-Taran V., van Hoek A. // FEBS Lett. 1994. V. 348. P. 305–310.
9. Vekshin N.L. Photonics of Biopolymers. Moscow: MGU, 1999.
10. Hink M.A., van Hoek A. // Langmuir. 1999. V. 15. P. 992–997.
11. Шарова И.В., Векшин Н.Л. // Митохондрии, клетки и активные формы кислорода. Пушино, 2000. С. 163–166.
12. Smith A.L. // Meth. Enzymol. 1967. V. 10. P. 81–85.
13. Hatefi Y., Rieske J.S. // Meth. Enzymol. 1967. V. 10. P. 225–239.
14. Valeur B., Weber G. // Photochem. Photobiol. 1977. V. 25. P. 441–444.

The Globule Diameter and Some Electron and Conformational Properties of the Flavoprotein Fragment of Mitochondrial NADH Dehydrogenase Studied by Fluorescence Spectroscopy

V. I. Sukharev and N. L. Vekshin[#]

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

The globule dimensions and some electron and conformational properties of the flavoprotein (peripheral) fragment of the mitochondrial NADH dehydrogenase were determined by the time-resolved, phase-modulating, and polarization fluorescence spectroscopies, as well as correlated confocal microscopy. The rotational and the diffusion (translocation) diameters of the protein fragment were shown to be no less than 44 Å and ~72 Å, respectively. The diameter of protomitochondrial particles from the bovine heart, which were used for the isolation of the fraction of peripheral fragments, was no less than 2300 Å. The fluorescence from tryptophan and flavin fluorophores in the fragment is strongly quenched by iron of the iron–sulfur clusters, which suggests that a strong electron-vibrational interaction of iron with Trp residues and flavin takes place. An overlapping of the electron clouds of iron–sulfur clusters, Trp residues, and flavin is likely to facilitate the electron transfer through the protein. The heat inactivation of the enzyme was accompanied by neither its substantial conformational changes, nor a considerable release of iron ions from the clusters located near the Trp residues.

Key words: correlation spectroscopy, NADH dehydrogenase, flavin, fluorescence decay, polarization, tryptophan

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 923-7467 (2-92); e-mail: vekshin@venus.iteb.serpukhov.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 10. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.