

CZY W REAKCJI CYTOCHROMU C I HEMATYNY Z NADTLENKIEM
WODORU POWSTAJE TLEN SINGLETOWY?*

Danuta Sławińska, Janusz Sławiński, Bogusław Żywucki

Zakład Fizyki, Akademia Rolnicza, 60-637 Poznań,
ul. Wojska Polskiego 38/42

Możliwość generowania wzbudzonego tlenu cząsteczkowego O_2 w stanach $^1\Delta_g$, $^1\Sigma_g^+$ oraz ich kombinacji w reakcji białek hemowych z produktami radiolizy wody o charakterze utleniaczy (O_2 , O_2^- , OH^\cdot , H_2O_2) była postulowana w kilku pracach [1, 10, 11]. Oddziaływanie cytochromów z produktami radiolizy wody powoduje nieodwracalne zmiany w strukturze komponenty białkowej i w samej grupie prostetycznej [5, 12]. Procesy te m.in. zapoczątkowują łańcuch katabolicznych reakcji prowadzących do barwników żółciowych [6]. Oddziaływanie cytochromu c z jonorodnikiem O_2^- rozważane było teoretycznie z termodynamicznego punktu widzenia [7]. Celem tej pracy było doświadczalne sprawdzenie tworzenia się tlenu singletowego w reakcji cytochromu c z nadtlenkiem wodoru.

METODYKA

W pracy badano reakcję cytochromu c(Fe^{3+}) w stężeniu $10^{-5}M$ z nadtlenkiem wodoru o stężeniu $10^{-2}M$ w roztworze buforu fosforanowego (pH = 8, siła jonowa I = 0,289, stężenie $10^{-1}M$). Jako układ pomocniczy badano reakcję hematyny (grupa prostetyczna cytochromu c), w stężeniu $10^{-5}M$ z nadtlenkiem wodoru w takim samym stężeniu i buforze. Aby stwierdzić powstawanie tlenu singletowego w wymienionych układach zmierzono:

- widma emisji chemiluminescencji (CL) układu modelowego: cyt c(Fe^{3+}) + H_2O_2 i układu pomocniczego - hematyna + H_2O_2 , mierzone

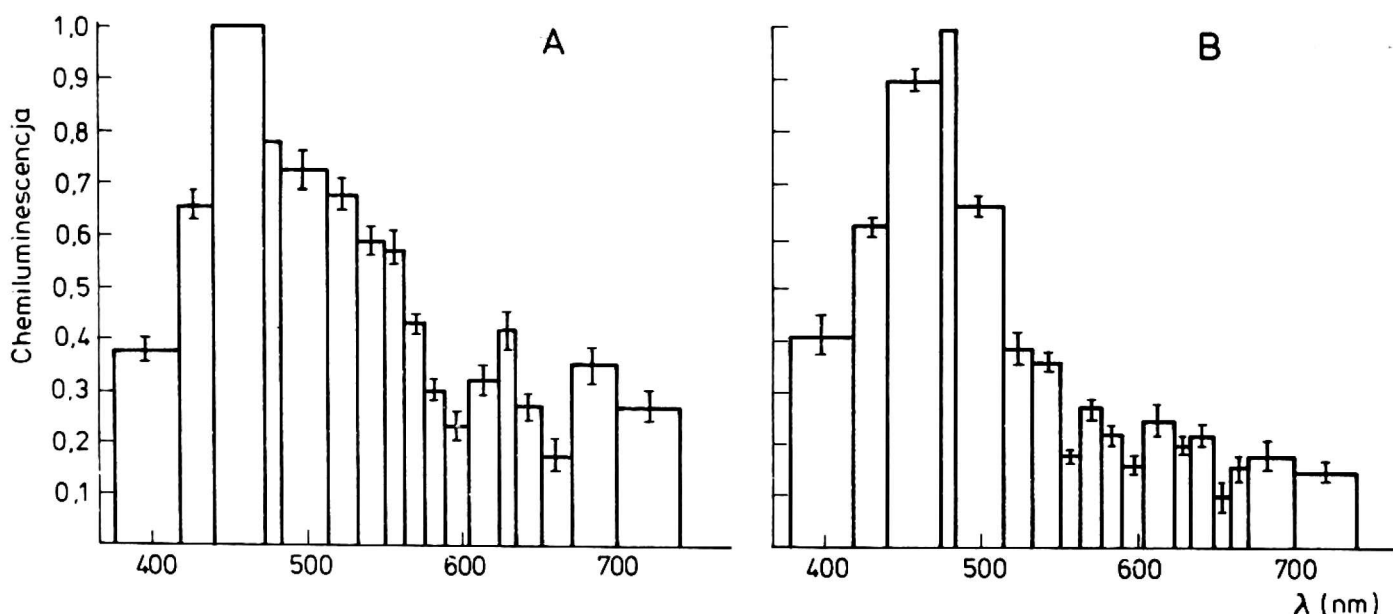
*Praca realizowana w temacie R.III 13.I.2

w zakresie 380-740 nm metodą zliczania pojedynczych fotonów w stacjonarnym układzie przepływowym [9],

- widma fluorescencji i fosforescencji cyt c i produktów utleniania przy użyciu spektrofotometru typu Perkin-Elmer MPF-3,
- wpływ cyt c + H_2O_2 na natężenie fluorescencji związków pułapkujących tlen singletowy (tzw. traps),
- wpływ wygaszaczy tlenu singletowego $O_2 (^1\Delta_g)$.
- zbadano efekt izotopowy D_2O w widmach emisji CL obydwu układów.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

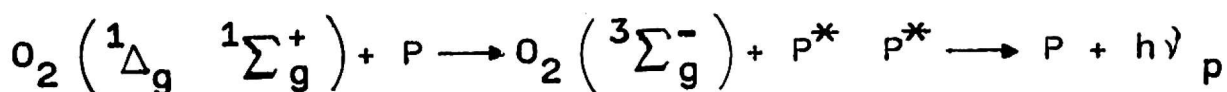
Z przedstawionych na rysunku 1 widm wynika, że w układzie cytochrom c (Fe^{3+}) + H_2O_2 (rys. B) nie obserwuje się emisji charakterystycznej dla powstawania tlenu singletowego. Brak w tym wid-



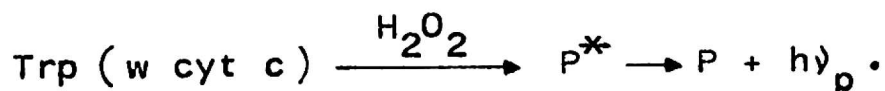
Rys. 1. Widmo chemiluminescencji układu; A - hematyna + H_2O_2 + bufor fosforanowy pH = 8, I = 0,289 M, B - cytochrom c + H_2O_2 + bufor fosforanowy pH = 8, I = 0,289 M

mie pasma odpowiadające przejściu ze stanu $2(^1\Delta_g)$ do $(^3\Sigma_g^-)_{v=1}$ ($(^3\Sigma_g^-)_{v=0}$) odpowiadające $\lambda = 703$ nm oraz $2(^1\Delta_g)$ do $(^3\Sigma_g^-)_{v=0}$ odpowiadające $\lambda = 634$ nm. Pasma te natomiast pojawiają się w widmie emisji układu pomocniczego - hematyna + H_2O_2 (rys. 1A). Sugeruje to tworzenie się tlenu wzbudzonego w formie singletowej w tym układzie. Trudne jest natomiast do interpretacji pasmo odpowiadające długościom fali 440-480 nm. Formalnie emisja ta może być

przypisana przejściu $2 \text{O}_2 \left({}^1\Delta_g \quad {}^1\Sigma_g^+ \right) \longrightarrow 2 \text{O}_2 \left({}^3\Sigma_g^- \right)$ odpowiadającemu długości $\lambda = 478 \text{ nm}$. Wiadomo jednak, że produkty oksydacyjnej degradacji tryptofanu (Trp), np. pochodne kinureniny (P) wykazują fluorescencję w tym zakresie widma. Dlatego też zmierzono widma fotoluminescencji cytochromu c natywnego i po utlenieniu. Stwierdzono, że cytochrom c utleniony przez H_2O_2 fluoryzuje w zakresie 420-620 nm z maksimum emisji dla 470 nm. W miarę postępu reakcji, natężenie fluorescencji przy 470 nm rośnie. Rozwory cytochromu c odgazowane argonem wykazują fosforescencję w temperaturze 77°K typową dla Trp z maksimum emisji dla 450 nm przy długości wzbudzenia 285 nm. Po 20 minutach reakcji cytochromu c z H_2O_2 , zachodzącej w atmosferze argonu, obserwuje się zmniejszenie natężenia fluorescencji z Trp oraz pojawienie się szerokiego pasma fosforescencji w zakresie 420-620 nm z maksimum dla 530 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$). Dlatego też bardziej prawdopodobny byłby proces przenoszenia energii, czyli tzw. CL aktywowanej:



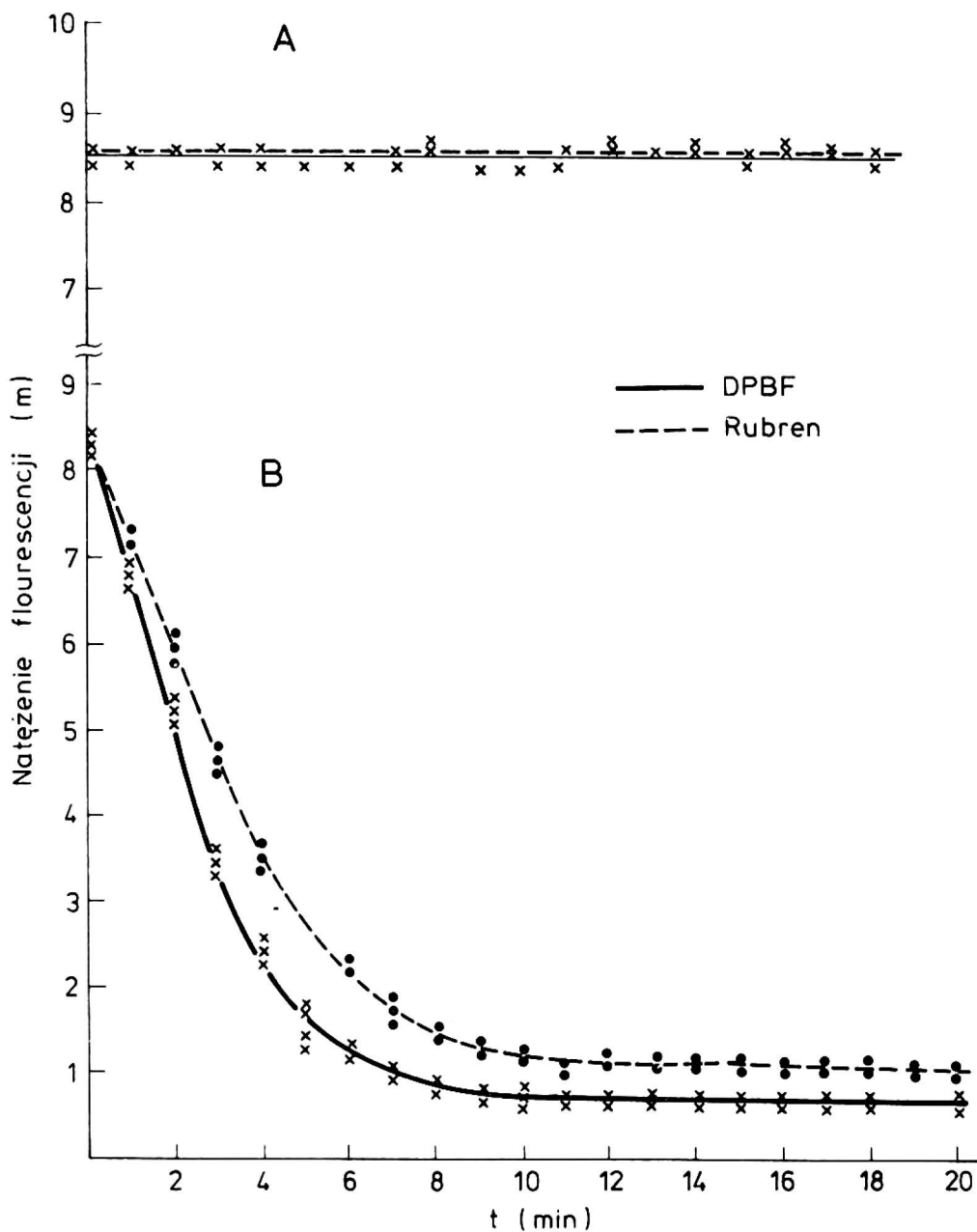
lub bezpośrednio:



Proces ten jest bardzo prawdopodobny w świetle wyników otrzymanych przez Burtona [2]. W przypadku hematyny, która sama nie fluoryzuje nic nie wiadomo o składzie widmowym ewentualnej fluorescencji produktów jej degradacji.

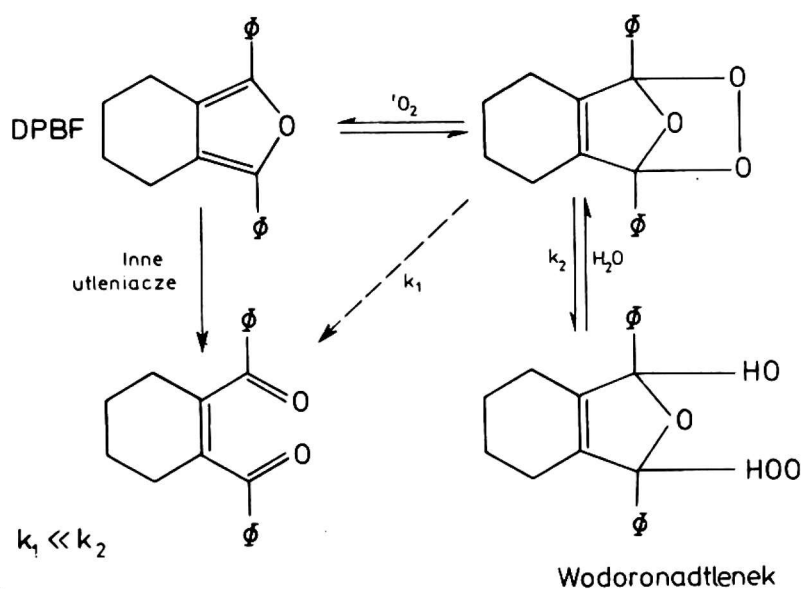
Przedstawioną hipotezę weryfikowano poprzez zbadanie działania substancji pułapkujących ${}^1\text{O}_2$ (rys. 2). Do doświadczenia użyto dwufenylo-izo-benzofuranu (DPHF) i rubrenu rozpuszczonych w acetonie i metanolu. Badano zmianę natężenia fluorescencji DPBF $\lambda_{\text{f1}} = 458 \text{ nm}$ i rubrenu $\lambda_{\text{f1}} = 540 \text{ nm}$, proporcjonalną do ich stężenia w badanym układzie w czasie trwania reakcji cytochromu c + H_2O_2 i hematyny + H_2O_2 . W wyniku reakcji substancji pułapkującej z ${}^1\text{O}_2$ przechodzi ona w formę wodoronadtlenkową według schematu przedstawionego na stronie 189 (rys. 3).

Reakcja z ${}^1\text{O}_2$ jest odwracalna. Po podgrzaniu badanego układu wodoronadtlenek DPBF (ew. rubrenu) rozkłada się na substraty wyjś-



Rys. 2. Zależność natężenia fluorescencji substancji pułapkujących $^1\text{O}_2$ od czasu reakcji; A - cytochrom c z H_2O_2 + buf. fosf. + substancje pułapkujące B - hematyna + H_2O_2 + buf. fosf. + substancja pułapkująca. Stosunek objętościowy rozpuszczalników: 50% wody + 50% acetonu i 50% wody + 50% metanolu, $[\text{Rubren}]_0 = 10 \mu\text{M}$, $[\text{DPBF}]_0 = 50 \mu\text{M}$

ciowe. Zabieg ten pozwala oszacować ilość DPBF, która przereagowała z $^1\text{O}_2$. Na podstawie wyników tych doświadczeń obliczono, że około 75% DPBF w układzie hematyna + H_2O_2 przereagowało z $^1\text{O}_2$ (rys. 2); bardzo wyraźnie potwierdza istnienie $^1\text{O}_2$ w układzie hematyna + H_2O_2 oraz jego brak w układzie modelowym - cyt c(Fe^{3+}) + H_2O_2 .



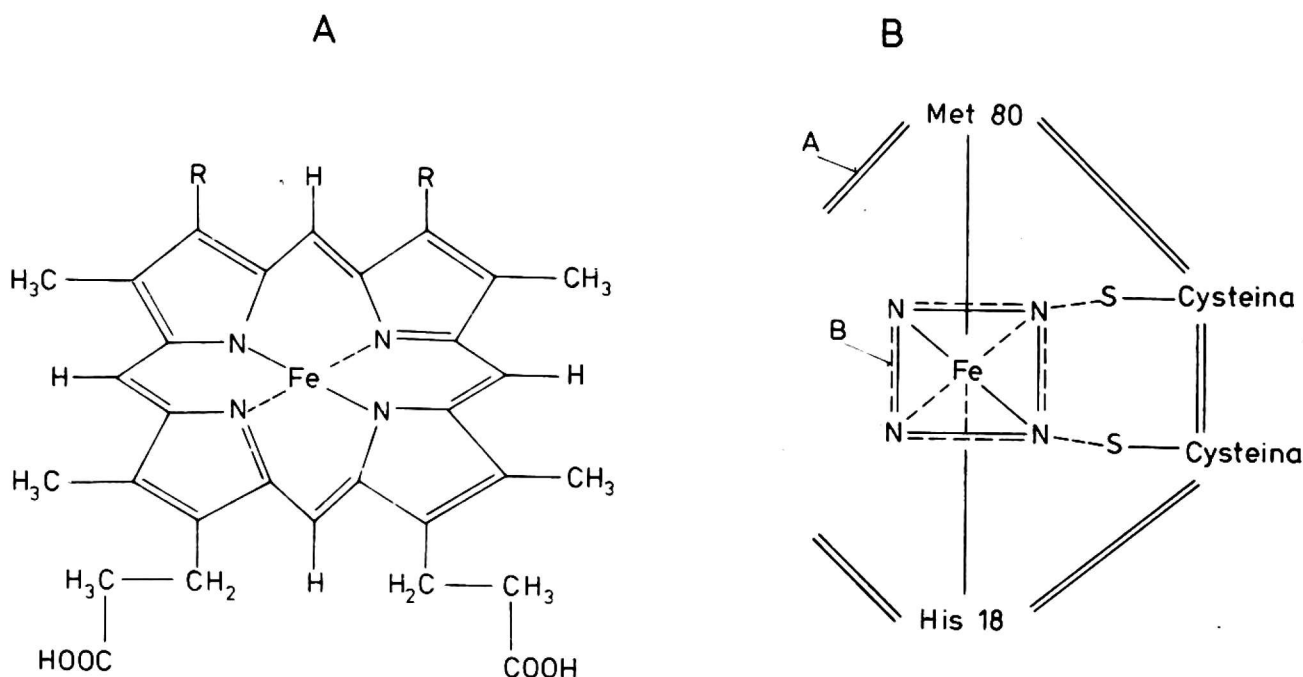
Rys. 3. Schemat reakcji utleniania DPBF; Φ - rodnik fenylowy

Następnym etapem w wykrywaniu tlenu singletowego było badanie oddziaływania wygaszaczy tlenu singletowego, takich jak: biliwerdyna ($10^{-6}M$), azydek sodu ($10^{-3}M$) i 1,4-dwuazodwucyklo [2.2.2] oktan (DABCO) ($10^{-3}M$), na reakcję cytochromu c(Fe^{3+}) i hematyny z H_2O_2 . W przypadku cytochromu c sygnał chemiluminescencji nie zmniejszał się. Podobny efekt zaobserwowano w reakcji hematyny z H_2O_2 . Stosowanie wygaszaczy daje na ogół dobre wyniki w roztworach niewodnych, natomiast wynik ich działania w wodnych roztworach może być różny. Brak zarejestrowanego efektu wygaszaczy na układ modelujący mógł być spowodowany małą czułością spektralną użytego fotopowielacza w czerwonym zakresie widma (typ fotopowielacza Feu 18 A). Również w badaniu efektu izotopowego nie zauważono wpływu dodawania wygaszaczy 1O_2 do badanych układów. W środowisku D_2O obserwowano wyraźne spowolnienie reakcji cytochromu c (Fe^{3+}) z H_2O_2 . Wiadomo, że dysocjacja H_2O_2 zachodzi trudniej w D_2O niż w H_2O , dlatego też można oczekiwać zmniejszenia szybkości rozkładu H_2O_2 i obniżenia natężenia świecenia [11]. Z obliczeń wynika, że w wyniku rozkładu H_2O_2 w obecności hematyny stężenie tlenu singletowego wynosi około $3,7 \times 10^{-5}M$. Wniosek ten oparto na obliczeniach zmiany stężenia DPBF i rubrenu w badanej mieszaninie przy założeniu, że jedna cząsteczka substancji pułapkowej 1O_2 reaguje z jedną cząsteczką tlenu wzbudzonego. W układzie cytochromu c(Fe^{3+}) + bufor fosforanowy nie zaobserwowano istnienia tlenu singletowego. Brak występowania 1O_2 w tym układzie oznacza, że

produkcja $^1\text{O}_2$, o ile w ogóle zachodzi, jest bardzo mało wydajna (poniżej 10^{-6}M).

DYSKUSJA

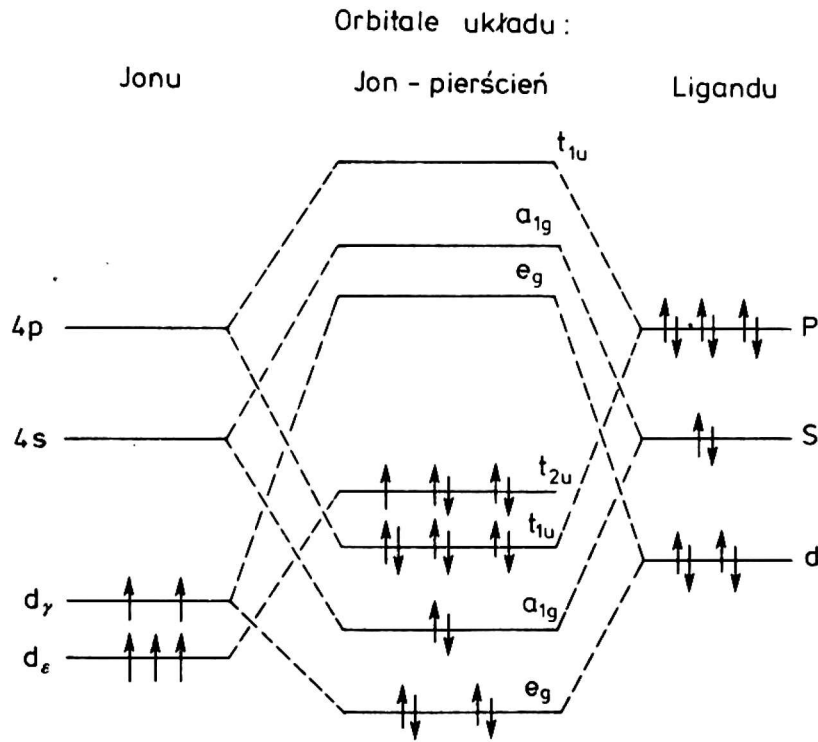
Chemiluminescencja emitowana w wyniku reakcji cytochromu c z H_2O_2 pochodzi od grupy prostetycznej cyt c. Wynika to z poprzednich badań [10] i porównania widma emisji dla układu z hematyłą i cytochromem c oraz z badań rozkładu poziomów energetycznych żelaza w grupie prostetycznej. W przypadku układu pomocniczego redukcja jonu żelaza Fe^{3+} do Fe^{2+} zachodzi poprzez oddanie elektronu od atomu tlenu w H_2O_2 . Proces ten bardzo komplikuje się w przypad-



Rys. 4. Schemat struktur hematyny (A) i cytochromu c (B); A – kompleks białkowy 4 łańcuchy peptydowe spiralnie skręcone równoległe do płaszczyzny hemu

ku cytochromu c. Jon żelaza Fe^{3+} znajduje się w polu polikrystalicznym, pochodzącym od czterech otaczających atomów azotu. Piąty ligand związany z histydyną 18 oraz szósty z metioniną 80 mają mały wpływ na to pole (rys. 4); można je traktować odpowiednio jako zaburzenie pierwszego i drugiego rzędu. Na podstawie obliczeń kwantowo-mechanicznych [1, 3, 4, 13] orbitale pochodzące od stanu Fe^{3+} przyjmują konfigurację [13] przedstawioną na rysunku 5 (str. 191).

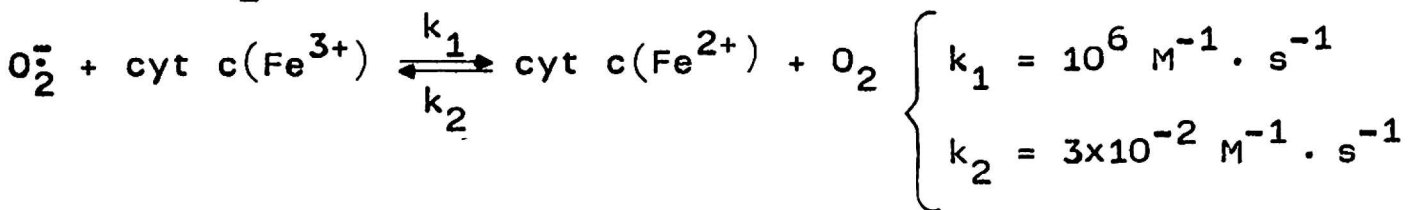
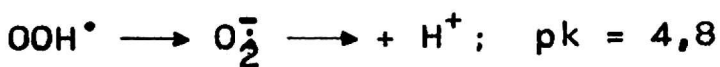
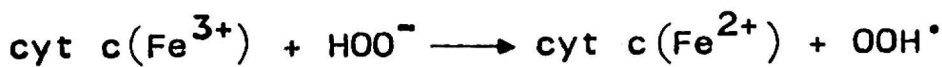
Przejścia z tych stanów są bardzo zbliżone do analogicznych przejść w przypadku hematyny. Stąd zrodziła się hipoteza, że mogą



Rys. 5. Schemat orbitali π dla jonu Fe^{3+} w cytochromie c; objaśnienia w tekście

brać udział w luminescencji powstającej w wyniku redukcji Fe^{3+} na Fe^{2+} . Przemawia za tym fakt, że są to przejścia dozwolone oraz że ich różnice energetyczne są zbliżone do długości fali $\lambda = 470$ nm, emitowanej w badanej reakcji. Hipotezie tej zaprzeczają natomiast wstępne obliczenia: siła oscylatora, która powinna odpowiadać obserwowanemu przejściu nie pokrywa się z siłą obliczoną dla omawianych przejść.

Na podstawie przeprowadzonych badań reakcja cytochromu c z H_2O_2 najprawdopodobniej przebiega według następującego schematu:



Schemat ten należy jednak traktować jako hipotezę roboczą, która nie została jeszcze zweryfikowana. Poparta jest jednak szeregiem wyników doświadczalnych oraz rozważań teoretycznych, podanych poniżej.

1e Maksimum natężenia CL otrzymuje się dla stosunku

$$\frac{[H_2O_2]}{[cyt\ c]} \approx 1000, \quad a \quad \frac{[OOH^-]}{[cyt\ c(Fe^{3+})]} \approx 1$$

2e Reakcji $H_2O_2 + cyt\ c(Fe^{3+})$ towarzyszy obniżenie pH. Termodynamiczny potencjał redukcyjny $cyt\ c(Fe^{3+})/cyt\ c(Fe^{2+})$ wynosi 0,25 V, natomiast dla $O_2/O_2^- = -0,33$ V. Dla układu z tlenem singletowym otrzymano [7]: $O_2(^1\Delta_g)/O_2^- = 0,65$ V, $O_2(^1\Sigma_g^+)/O_2^- = 0,5$ V. Na podstawie tych potencjałów obliczono, że średnia energia swobodna dla reakcji: $cyt\ c(Fe^{3+}) + O_2^- \rightarrow cyt\ c(Fe^{2+}) + O_2$, $\Delta G_o = RT \ln \frac{k_1}{k_{-1}} = -42,15$ kJ/mol. Natomiast dla reakcji cytochrom $c(Fe^{3+})/Fe^{2+} + O_2^- / ^1O_2$ energia swobodna $\Delta G_o = +29,2$ kJ/mol. Analogiczne obliczenia przeprowadzono dla hematyny. Do obliczeń użyto potencjałów redukcyjnych hematyna: $(Fe^{3+}) / \text{hematyna}(Fe^{2+}) = -0,18$ [8]. W przypadku reakcji $O_2^- / ^3O_2$ energia ta wynosi: $\Delta G_o = -nF E = -49,1$ kJ/mol, natomiast dla reakcji $O_2^- / ^1O_2$ $\Delta G_o = -80,09$ kJ/mol. Z obliczeń tych wynika, że w reakcji cytochromu c z H_2O_2 powstanie formy wzbudzonej tlenu jest mało prawdopodobne. W przypadku hematyny bardziej prawdopodobna w ujęciu termodynamicznym, jest reakcja w wyniku której powstaje tlen singletowy. Ponadto wyzwolona energia jest zbliżona do energii przejścia między poziomami $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g$ tlenu.

WNIOSKI

1. Obecność tlenu singletowego w układzie hematyna + H_2O_2 . W wyniku rozpadu H_2O_2 w obecności hematyny stężenie 1O_2 wynosi $3,74 \times 10^{-5}$ M. Średnia prędkość pierwszej fazy reakcji wynosiła $k = 0,31 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; po upływie pięciu minut zaczęła szybko maleć.
2. Nie zaobserwowano istnienia 1O_2 w układzie z cytochromem. Wskazuje to, że w wyniku rozpadu H_2O_2 w obecności cytochromu c 1O_2 nie tworzy się w ogóle, lub w stężeniach mniejszych niż 10^{-6} M.
3. W widmie chemiluminescencji hematyny z H_2O_2 stwierdzono pasma odpowiadające o 1O_2 oraz niebieskie maksimum emisji, natomiast w przypadku cytochromu c zaobserwowano niebieskie maksimum

$\lambda = 470$ nm odpowiedzialne są prawdopodobnie produkty degradacji Trp (w przypadku cytochromu c) oraz pierścienia porfirynowego (w przypadku hematyny).

LITERATURA

1. Berthier G., Mikie P.: J. Chem. Phys., 8-18, 1965
2. Burton R. Anderson: Biochim. Biophys. Acta, 542, 527-536, 1978
3. Golovanov I.B., Sobolev V.M.: Dokł. Akademii Nauk SSSR, 218, 478-480, 1974
4. Harris-Loew G.: Theor. Chim. Acta, 17, 18-36, 1970
5. Ilan Y., Schafferman A.: Biochim. Biophys. Acta, 501, 127-135 1978
6. King F.G.J., Brown S.B.: Biochem. J., 74, 103-108, 1960
7. Koppenol W.H., Van Burren K.J.H., Butler J., Braams R.: Acta Biochem. Biophys., 449, 157-168, 1976
8. Lardy H.A.: Respiratory Enzymes (tłum. ros.), Inostr. Lit., Moskwa 1952
9. Polewski K., Pukacki W., Sławińska D., Sławiński J.: Proc. Intern. Conf. Analytical Application of Chemistry and Bio-Luminescence (E. Schram, Ed.), Bruxelles, 239, 1979
10. Sławińska D., Sławiński J.: Acta Biochem. Polon., 16, 339-354 1969
11. Spikes J.D., Swartz H.M.: Photochem. Photobiol., 4/5 921-933, 1978
12. Stauff J., Schmiedkunz H., Hartmann G.: Nature, 198, 281-283, 1963
13. Veillard A., Pullman B.: J. Theor. Biol., 8, 317-326, 1962

Д. Славиньска, Я. Славиньски, Б. Живуцки

ВОЗНИКАЕТ ЛИ СИНГЛЕТНЫЙ КИСЛОРОД В РЕАКЦИИ ЦИТОХРОМА c И ГЕМАТИНА с H_2O_2 ?

Р е з ю м е

Целью работы являлось исследование возникновения возбуждённого кислорода O_2 ($^1\Delta_g$, $^1\Sigma_g^+$) в следующих реакциях:

а) 10 мкМ цитохром c(Fe^{3+}) + 10 мМ H_2O_2 в фосфатном буфере pH = 8,0;

б) 10 мкМ гематин + 10 мМ H_2O_2 в том же самом буфере.

Измеряя спектры хемилюминесценции (ХЛ) и флуоресценции, а также пользуясь ловушками O_2 дифенилбензофураном (ДПБФ) и рубреном, установлено, что:

- в реакции гематина с H_2O_2 возникло около 37,5 мкМ O_2 ;

- в реакции цитохрома с с H_2O_2 не наблюдалось возникновения O_2 в концентрации большей, чем 1 мкМ;

- спектры ХЛ для системы б) также дают характеристические полосы для переходов: $2(^1\Delta_g) \rightarrow 2(^3\Sigma_g^-)_{v=0}$ $\lambda = 634$ нм $2(^1\Delta_g) \rightarrow$
 $\rightarrow (^3\Sigma_g^-)_{v=1}$ $(^3\Sigma_g^-)_{v=0}$ $\lambda = 703$ нм.

В системе а) спектр ХЛ имеет только голубую полосу испускания = 440-480 нм, которая совпадает с полосой флуоресценции продуктов окисления цитохрома с.

D. Sławińska, J. Sławiński, B. Żywucki

IS SINGLET OXYGEN FORMED IN THE REACTION OF CYTOCHROME C
AND HEMATIN WITH H_2O_2 ?

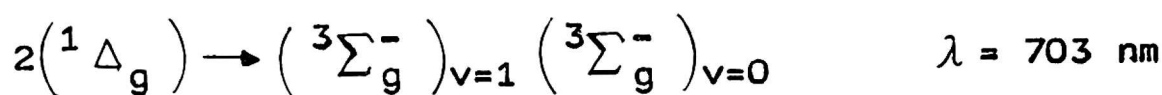
S u m m a r y

The aim of the work was to investigate whether singlet molecular oxygen $\text{O}_2(^1\Delta_g, ^1\Sigma_g^+)$ is generated in the following reactions:

a) 10 μM cytochrome c with 10 mM H_2O_2 in phosphate buffer at pH 8,0

b) 10 μM hematin with 10 mM H_2O_2 in the same buffer.

Measurements of chemiluminescence (CL) and fluorescence spectra as well as use of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ traps: diphenylisobenzofurane (DPBF) and rubrene indicate that $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ is generated in the reaction of hematin + H_2O_2 in the concentration 3,75 μM . In the system cytochrome c + H_2O_2 no $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ was detected ($[\text{}^1\text{O}_2] \leq 1 \mu\text{M}$). CL spectra of the system (b) reveal emission bands typical of the following transitions:



In the system (a) CL spectrum has only one maximum in the blue part of the spectrum which may be assigned to the fluorescence of the cyt c oxidation products.