

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СВОЙСТВ МЕМБРАН ХЛОРОПЛАСТОВ

А. Б. АВАКЯН

НИИ земледелия Госагропрома Армянской ССР, г. Эчмиадзин

Аннотация — Показаны основные возможности применения метода флюоресцентных зондов при изучении энергизованного состояния и структурной организации мембран хлоропластов. Определены изменения поверхностного заряда мембран при различных воздействиях. Предполагается, что положительно заряженные группы периферических белков принимают участие в их стабилизации на этих мембранах.

Անոտացիա — Ցույց են տրված քլորոպլաստների մեմբրանների կենդանի ազդերով և կառուցվածքային կազմակերպման ուսումնասիրման ժամանակ ֆլյուորեսցենտային զոնդերի կիրառման մեթոդի հիմնական հնարավորությունները: Որոշված են թաղանթների մակերեսային լիցքի փոփոխությունները տարբեր ազդեցությունների դեպքում: Ենթադրվում է, որ պերիֆերիկ սպիտակուցների դրական լիցքավորված խմբերը մասնակցում են նրանց կայունացմանը այդ թաղանթների վրա:

Abstract — The basic possibilities of the application of the method of fluorescent probes in the investigation of energized condition and structure organization of chloroplast membranes have been shown. Changes of the surface charge of membranes during various influences have been determined. It has been supposed that the positively charged groups of peripheric proteins take part in their stabilization on these membranes.

Ключевые слова: хлоропласты, мембраны, флюоресцентные зонды.

В последние годы широкое применение в мембранологии получил метод флюоресцентных зондов, преимуществом которого являются его доступность, высокая чувствительность к изменению состояния мембран и возможность работы с сильно рассеивающими свет объектами [5]. Основные методологические вопросы применения данного метода на различных мембранах достаточно глубоко освещены в книге Владимира и Добрецова [5]. Следует, однако, отметить, что при изучении свойств мембран хлоропластов метод флюоресцентных зондов пока не получил широкого распространения, что, вероятно, обусловлено специфическими особенностями объекта исследования. Поэтому целью настоящей работы явилось рассмотрение возможностей применения этого метода при исследовании свойств мембран хлоропластов.

Наиболее широкое применение метод флюоресцентных зондов получил при изучении энергизованного состояния мембран хлоропластов. Эти работы были выполнены в основном с использованием акридиновых красителей [13, 23—25, 31]. На флюоресценцию этих красителей существенное влияние оказывает присоединение протона к атому азота кольца (pK аминоакридина—9,99, атебрина—7,7) [16, 23]. Безызлучательные процессы у акридинов обусловлены переходом электрона с возбужденного синглетного уровня на триплетный [22]. В связи с этим было сделано предположение, что фотоиндуцированное тушение

флюоресценции зондов обусловлено возникновением градиента рН [23—26, 34], и Роттенбергом была предложена формула для его расчета [34]. При этом считалось, что мембраны тилакоидов проницаемы только для незаряженных молекул красителя, которые при возникновении градиента рН, не взаимодействуя с указанными мембранами, проникают внутрь тилакоидов, в результате чего происходит тушение флюоресценции зонда. Применяя эту формулу, определяли, что при освещении хлоропластов внутри тилакоидов происходит уменьшение рН среды приблизительно на 3 единицы [34]. Однако экспериментальные результаты, полученные рядом авторов, выявили расхождение между теорией и опытом [16, 17, 26, 27, 38]. Было показано, что тушение флюоресценции красителей зависит от влияния электростатических факторов [26], и одной из возможных причин фотоиндуцированного тушения флюоресценции может быть изменение взаимодействия зондов с мембранами [9, 16, 38]. В последние годы обнаружена также зависимость степени фотоиндуцированного тушения флюоресценции атебрина от величины обоих компонентов электрохимического потенциала тилакоидов [7, 38], температуры среды [35] и взаимодействия красителя с белками мембран [24]. Ранее предполагалось, что молекула атебрина локализуется у полярных головок периферически расположенных фосфолипидных молекул мембран, а гидрофобный хвост плавает в водной фазе [27]. В настоящее время считают, что чувствительность атебрина к фотоиндуцированным изменениям обусловлена взаимодействием гидрофобного хвоста его молекулы с мембранами [9].

Применение атебрина при раздельном функционировании фотосистем 1 и 2 хлоропластов позволило выявить ряд закономерностей [7, 38]. На основании полученных результатов было предположено, что молекула этого зонда при энергизации фотосистем 1 и 2 связывается с различными участками тилакоидов. По изменению флюоресценции красителя было показано, что при работе фотосистемы 2 энергизованное состояние разряжается в основном за счет протонной проводимости, а в случае с фотосистемой 1—с участием калиевой проводимости.

Другой представитель группы акридиновых зондов—9-аминоакридин практически не чувствителен к фотоиндуцированным изменениям структуры мембран [9]. С другой стороны, предполагается, что на мембранах хлоропластов имеется два типа центров связывания этого красителя [14]. С центрами связывания первого типа 9-аминоакридин взаимодействует в суспензии хлоропластов, и ими обусловлено «темновое» тушение его флюоресценции [14]. Центры связывания второго типа появляются при фотоиндуцированных изменениях мембран [14]. При варьировании рН среды уровень флюоресценции этого красителя коррелировал с выходом фотофосфорилирования в суспензии хлоропластов [8].

В последнее время при изучении трансмембранного потенциала широкое применение получили циановые и химически родственные им зонды, имеющие высокие квантовые выходы флюоресценции и коэффициенты поглощения (это позволяет измерять флюоресценцию при низких концентрациях зондов) и обладающие способностью к образованию не-

флюоресцирующих агрегатов [5]. С использованием этих зондов было изучено образование трансмембранного потенциала в хлоропластах [35]. Применение других зондов, в частности, индикатора pH умбеллиферона, позволило определить время первичных изменений pH тилакоидов [20], а антибиотика хлортетрациклина — изучить свойства сопрягаемого фактора хлоропластов [19].

Для исследования энергизованного состояния мембран хлоропластов использовали также универсальный зонд АНС, обладающий высокой чувствительностью к самым разнообразным изменениям его окружения [5]. Ранее предполагали, что основным внутримолекулярным процессом, конкурирующим с флюоресценцией, у этого красителя является переход электрона с возбужденного синглетного на триплетный уровень [37]. В полярном же окружении происходит сближение этого синглетного уровня с триплетным, в результате чего резко уменьшается квантовый выход его флюоресценции [39]. Проведенные в последнее время исследования с использованием метода флеш-фотолиза показали образование нонрадикалов АНС в воде [18]. Последнее позволило заключить, что тушение флюоресценции зонда в полярных средах происходит путем переноса электрона на воду, т. е. образования «сольватированного» электрона [18].

С использованием АНС изучены фотондуцированные изменения хлоропластов [28] и пигмент-липопротеидных комплексов фотосистемы I при окислении их феррицианидом [6]. В первом случае было обнаружено небольшое (около 20%) повышение интенсивности флюоресценции АНС в суспензии освещенных хлоропластов, которое связывали как с изменением взаимодействия зонда с мембранами вследствие протонирования их внутренней стороны при образовании градиента pH, так и с модификацией полярности окружения уже связанного АНС в мембранах [28]. Фотондуцированные же изменения параметров флюоресценции зонда в суспензии липопротеидных комплексов фотосистемы I при окислении центров феррицианидом объясняли конформационными изменениями комплекса [6]. Следует, однако, отметить, что в последней работе не исключали также возможности влияния на флюоресценцию зонда деструктивных процессов в комплексах, к которым может приводить длительное освещение [6]. Очевидно, что изучение взаимодействия АНС хлоропластами и пигмент-белковыми комплексами при различных pH позволило бы более однозначно интерпретировать полученные результаты. Влияние протонирования мембран на интенсивность флюоресценции этого зонда было изучено рядом исследователей [21, 28, 32]. Было обнаружено, что при физиологических pH среды квантовый выход флюоресценции зонда в суспензии хлоропластов увеличивается незначительно, однако он сильно возрастает при значениях pH меньше 4,5. Последнее объясняли нейтрализацией отрицательно заряженных групп мембран, которая может способствовать увеличению связывания отрицательно заряженного АНС с ними или же влиять на полярность его окружения в мембранах [28]. Титрование суспензии хлоропластов, инкубируемых в среде с pH меньше 4,5, раствором концентрированной щелочи приводило к резкому уменьшению флюоресценции



зонда, однако ее величина была все же больше, чем в контроле при рН 7,2 до титрования раствором кислоты [32]. Предполагали, что этот эффект обусловлен необратимыми изменениями конформации хлоропластов, индуцируемыми протонированием [32]. В дальнейшем, однако, нами было показано, что изменение флуоресценции зонда в суспензии хлоропластов, как и ее дополнительное (по сравнению с контролем) увеличение после титрования раствором щелочи суспензии хлоропластов, в основном обусловлено взаимодействием АНС с белками, вышедшими из состава мембран в среду инкубирования [1]. Проведенные нами эксперименты свидетельствуют, что в суспензии хлоропластов при низких значениях рН среды имеется два типа центров связывания зонда [1]. Первый находится на мембранах хлоропластов, а второй — на белках, вышедших из их состава [1]. Причем константа связывания АНС с центрами мембран хлоропластов приблизительно в 30 раз меньше, чем с центрами белков, вышедших из их состава [1]. Мембраны же хлоропластов, имеющие отрицательный поверхностный заряд при значениях рН среды больше 4,3 [30], в случае физиологических рН практически не взаимодействуют с зондом [1]. Нами показано, что пигмент-белковые комплексы фотосистемы I и светособирающего хлорофилл-белкового комплекса взаимодействуют с АНС также при значениях рН среды меньше 4,3 [1]. На основании полученных нами результатов можно предположить, что изменения флуоресценции этого зонда, обусловленные освещением хлоропластов [28] и пигмент-белковых комплексов [6], могут быть в основном индуцированы деструктивными процессами. Конечно, нельзя еще полностью исключить возможность, что в первом случае эффект может быть также связан и с протонированием отрицательно заряженных групп на внутренней стороне мембран тилакоидов при образовании градиента рН.

Влияние протонирования на свойства мембран хлоропластов было изучено и с использованием положительно заряженных красителей — атебрина [8], 9-аминоакридина [8] и близкого им по свойствам родамина бЖ [4]. Нами было показано, что в суспензии хлоропластов имеется один тип центров связывания родамина бЖ, находящийся на мембранах [4]. При физиологических рН концентрация этих центров на мембранах была равна 2—5 в расчете на одну молекулу хлорофилла хлоропластов. По изменению флуоресценции зонда при различных рН мы обнаружили, что в составе мембран хлоропластов, пигмент-белковых комплексов фотосистемы I и светособирающего хлорофилл-белкового комплекса имеются группы с рК около 4 и больше 8 [4]. В то же время было отмечено, что выход периферических белков из состава мембран приводит к увеличению электроотрицательного заряда на поверхности этих мембран [4]. На основании этого было сделано предположение, что в составе слабо связанных с мембранами белков имеются положительно заряженные группы, принимающие участие в стабилизации их на мембранах [4].

Добавление в суспензию катионов также позволяет несколько нейтрализовать заряд мембран хлоропластов, но уже не изменяя рН среды [15]. Результаты проведенных нами и других исследований показали,

что в присутствии катионов в суспензии хлоропластов интенсивность флюоресценции АНС увеличивается [3, 21, 32]. Предполагали, что причиной этого явления может быть как нейтрализация отрицательно заряженных групп на поверхности мембран, индуцирующая увеличение связывания зонда, так и изменение полярности окружения АНС в мембранах [21, 32]. Нами было также установлено, что изменение флюоресценции зонда при добавлении катионов в суспензию хлоропластов может быть обусловлено и взаимодействием АНС с белками, вышедшими из состава мембран при воздействии катионов [3]. Одновременно показано, что в присутствии катионов возможно повышение связывания зонда с изолированными препаратами белков ламелл хлоропластов [11].

В суспензиях хлоропластов при добавлении минеральных солей возрастала интенсивность флюоресценции и положительно заряженных зондов—атетрина, 9-аминоакридина [9, 14, 33] и родамина 6Ж [3]. Предполагается, что в этом случае изменения в связывании красителей с хлоропластами в основном обусловлены влиянием катионов на величину поверхностного заряда мембран [3, 9, 14, 33]. Следует особо отметить, что двухвалентные катионы индуцировали одинаковые изменения интенсивности флюоресценции зондов при гораздо меньших концентрациях, чем одновалентные [3, 9]. Это, вероятно, обусловлено различной степенью их влияния на величину поверхностного заряда мембран [3, 15].

Известно, что тепловое воздействие отражается на функциональной активности хлоропластов [2, 32, 36]. Одной из причин может быть влияние данного фактора на структурную организацию мембран [12, 29]. С целью регистрации изменений в структурной организации мембран при тепловом воздействии выполнен ряд исследований с использованием метода флюоресцентных зондов [2, 10, 32]. Кратковременная обработка суспензии хлоропластов при температурах выше 40° приводила к небольшому повышению интенсивности флюоресценции АНС [2, 32]. Предполагали, что оно обусловлено увеличением связывания зонда с мембранами [32], однако нами было позже установлено, что данный эффект связан с выходом белков из состава мембран и взаимодействием АНС с ними [2]. В суспензии хлоропластов отмечено также уменьшение степени тушения флюоресценции 9-аминоакридина при постепенном повышении температуры от 24 до 30°, что связывают с динамическим изменением мембран [10].

Таким образом, применение метода флюоресцентных зондов позволяет получать необходимую информацию о свойствах мембран хлоропластов при различных воздействиях, что позволяет считать перспективным его использование в исследованиях этих органелл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян А. Б., Венедиктов П. С., Добрецов Г. Е., Рубин А. Б. Биофизика, 27, 3, 415—419, 1982.
2. Авакян А. Б., Венедиктов П. С., Добрецов Г. Е., Рубин А. Б. Научн. докл. высш. школы. Биологические науки, 11, 30—34, 1982.
3. Авакян А. Б., Венедиктов П. С., Добрецов Г. Е., Рубин А. Б. Научн. докл. высш. школы. Биологические науки, 5, 33—36, 1983.
4. Авакян А. Б., Венедиктов П. С., Рубин А. Б. Биофизика, 29, 6, 980—983, 1984.

5. Владимиров Ю. К., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
6. Кочубей С. М., Абарсу А. Э. *Studia biophysica*, 59, 1, 1—5, 1976.
7. Креждева Т. Е., Тулбу Г. В. *Биофизика*, 26, 4, 636—641, 1981.
8. Кузнецова Е. А., Кукушкин А. К. *Биофизика*, 26, 4, 633—686, 1981.
9. Кузнецова Е. А., Кукушкин А. К. *Биофизика*, 27, 3, 539—540, 1982.
10. Кузнецова Е. А., Кукушкин А. К. *Биофизика*, 28, 5, 776—778, 1983.
11. Яковлева Г. А., Молодцовский Ю. Г. *Физиология растений*, 26, 2, 283—293, 1979.
12. Armond P. A., Stachelin L. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55, 4, 1901—1905, 1976.
13. Avron M. *FEBS Lett.*, 95, 2, 225—232, 1978.
14. Bose S., Hoch G. E. *Z. Naturforsch.*, 33c, 1—2, 108—112, 1978.
15. Dunlea J. T., Scullay M. J., Thorne S. M. *J. Theor. Biol.*, 79, 4, 473—484, 1979.
16. Fiolet J., Bakker E., Van Dan K. *Biochim. Biophys. Acta*, 368, 3, 432—445, 1974.
17. Fiolet J., van der Erf-Ter Haar L., Kraayenhof K., Van Dam K. *Biochim. Biophys. Acta*, 387, 3, 320—334, 1975.
18. Flemming G. R., Porter G., Robbins R. J., Synowicz J. S. *Chem. Phys. Lett.*, 52, 2, 228—232, 1977.
19. Girault G., Galmiche J. M. *FEBS Lett*, 95, 1, 135—139, 1978.
20. Grunhagen H. H., Witt H. T. *Z. Naturforsch.*, 25b, 4, 373—378, 1970.
21. Itoh S. *Plant Cell Physiol.*, 19, 1, 149—166, 1978.
22. Kellman A. *J. Phys. Chem.*, 81, 5, 1195—1198, 1977.
23. Kraayenhof R. In: *Fluorescence Techniques in Cell Biology*, 391—394, Berlin: Springer-Verlag, 1973.
24. Kraayenhof R. *Methods Enzymol.*, 60, 3, 510—520, 1980.
25. Malkin S., Siderer Y. *Biochim. Biophys. Acta*, 368, 3, 422—431, 1974.
26. Massary S., Dell'Antonio P., Colonna R., Azzone G. *Biochem.*, 13, 5, 1039—1043, 1974.
27. Massary S. *Biochim. Biophys. Acta*, 375, 1, 22—34, 1975.
28. Muracami S., Packer L. J. *Cell Biol.*, 47, 2, 332—351, 1970.
29. Murata N., Trouton J. H., Fork D. C. *Plant Physiol.*, 55, 4, 508—517, 1975.
30. Nakatani H. Y., Barber J., Forrester J. A. *Biochim. Biophys. Acta*, 504, 1, 215—225, 1978.
31. Pick U., Avron M. *Biochim. Biophys. Acta*, 440, 1, 189—204, 1976.
32. Prasad U., Singhal G. S., Mohanty P. *Biophys. Struct. Mechanism*, 3, 2, 250—274, 1977.
33. Scarle G. F. M., Barber J., Mills J. D. *Biochim. Biophys. Acta*, 461, 3, 413—425, 1977.
34. Schuldner S., Rottenberg H., Avron M. *Eur. J. Biochem.*, 25, 1, 64—70, 1972.
35. Schuurmans J. J., Casey P., Kraayenhof R. *FEBS Lett.*, 94, 2, 405—409, 1978.
36. Schuurmans J. J., Vernan F. C. I., Fransche J. A., Torre-Pereira J. M. G., Kraayenhof R. *Plant Physiol.*, 74, 1, 170—175, 1984.
37. Sellscar C. J., Brand L. *Science*, 171, 3973, 799—800, 1971.
38. Tulby G. V., Keendeleya T. E., Kaurou B. S., Rubin A. B. *Studia biophys.*, 62, 3, 189—200, 1977.
39. Turner D. C., Brand L. *Biochem.*, 7, 18, 3381—3390, 1968.

Поступило 3.III 1986 г.