

Р. М. НАЛБАНДЯН, А. А. МУТУСКИН, К. В. ПШЕНОВА

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ СИГНАЛА Э.П.Р. ПЛАСТОЦИАНИНА ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕКОТОРЫХ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ АГЕНТОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 V 1971)

Пластоцианин (ПЦ) — медьсодержащий белок фотосинтезирующих тканей, являющийся промежуточным переносчиком электронов в хлоропластах. Хотя впервые он был выделен более 10 лет назад (¹), но до настоящего времени не выяснены ни природа лигандных атомов, ни симметрия окружения входящих в состав белка атомов меди. За синюю окраску ПЦ в окисленном состоянии ответственна интенсивная полоса с максимумом около 600 м μ , обусловленная переносом заряда. Величина константы сверхтонкого расщепления спектра э.п.р. белка является необычно низкой для комплексов меди (60 э). Эти факты свидетельствуют об уникальности окружения меди в белке (²). Очевидно, это специфическое окружение меди определяется нативной структурой белка, ввиду чего денатурация должна приводить к изменению лигандного окружения меди, сопровождающемуся изменением параметров сигнала э.п.р.

В данной работе приводятся результаты исследования влияния ряда денатурирующих агентов — щелочи, мочевины и додецилсульфата на параметры сигнала э.п.р. ПЦ. ПЦ выделяли из листьев гороха 10—12-дневного возраста. Срезанные листья замораживали в сухом льду, измельчали в большой кофейной мельнице и экстрагировали в течение 40 мин. 0,002 M калий-фосфатным буфером, pH 7,2 (1 : 1). После отжимания через полотно к полученному экстракту добавляли по каплям охлажденный ацетон до 35% концентрации. Осадок отделяли центрифугированием, а к надосадочной жидкости прибавляли ацетон до 75% концентрации. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок суспендировали в небольшом количестве 0,01 M калий-фосфатного буфера, pH 7,2. После центрифугирования при 12 000 g надосадочную жидкость наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Дальнейшую очистку проводили на ДЭАЭ-целлюлозе и Сефадексе Г-75 по методу (³).

Использованные в данной работе препараты ПЦ имели $D_{278}/D_{597} = 1,5$. Препараты по данным электрофореза в полиакриламидном геле были гомогенны. Раствор нативного белка в 0,05 M калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2 M KCl, имел $D_{597} = 0,90$. Опыты по денатурации проводили при комнатной температуре. Для записей сигналов э.п.р. брали по 0,2 мл раствора белка. Спектры э.п.р. записывали при 77° K в полиэтиленовых трубках на приборе с длиной волны 3 см (ИХФ-2). Приводим параметры спектра э.п.р. нативного и денатурированного ПЦ:

Параметры	A_{\parallel} , э	A_{\perp} , э	$A_{\text{с.с.т.с.}}$, э	g_{\parallel}	g_{\perp}	$\Delta H_{1/2}$, э
Нативный белок	60	15	—	2,211	2,045	45
Денатурированный белок	94	15	16	2,123	2,012	75

Спектр э.п.р. нативного ПЦ приведен на рис. 1. Параметры сигнала э.п.р. нативного ПЦ из листьев гороха оказались близкими к параметрам для ПЦ из мари обыкновенной (⁴). Денатурация щелочью (до pH 11,0) приводила к необратимому обесцвечиванию раствора, хотя он оставался прозрачным по крайней мере в течение 20 мин. после добавления щелочи. Спектр э.п.р. денатурированного щелочью ПЦ приведен на рис. 2.

Сравнение рис. 1 и 2 приводит к заключению, что щелочная денатурация ПЦ сопровождается резким изменением окружения атомов меди, хотя интегральная интенсивность сигнала э.п.р. при этом практически не изменяется, что свидетельствует о сохранении валентности меди. Таким образом, щелочная денатурация не сопровождается восстановлением атомов двухвалентной меди ПЦ. Появление в спектре э.п.р. денатурирован-

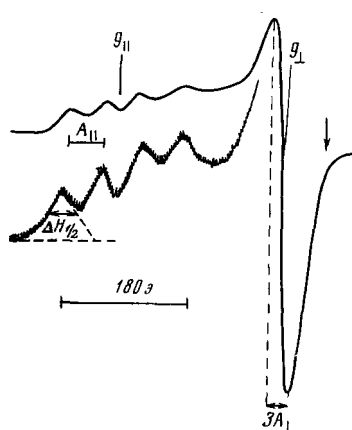


Рис. 1

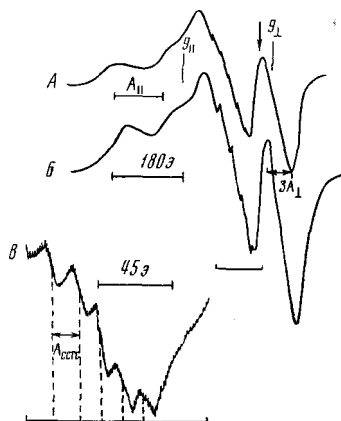


Рис. 2

Рис. 1. Спектр э.п.р. нативного ПЦ. Стрелка указывает значение $g = 2,003$. В нижней части показан участок спектра $g_{||}$ при большем усилении. Амплитуда модуляции 4 э

Рис. 2. Спектры э.п.р. денатурированного щелочью ПЦ. А — условия те же, что на рис. 1, В — усиление увеличено в ~ 2 раза, В — участок спектра с суперсверхтонкой структурой от атомов азота

Рис. 3. Спектры э.п.р. через 30 мин. после добавления мочевины (А) и додецилсульфата (В) к раствору ПЦ. Усиление для А в ~ 10 раз больше, чем для В

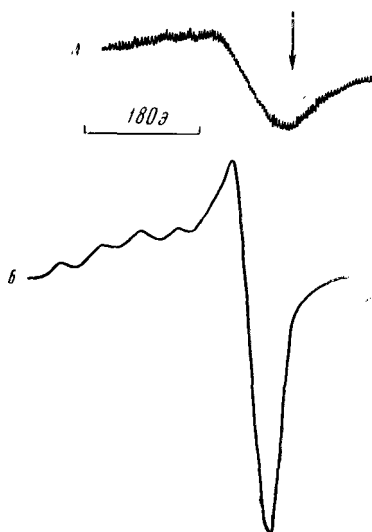


Рис. 3

ного белка пяти компонент суперсверхтонкой структуры (с.с.т.с.) с расщеплением между ними ~ 16 э свидетельствует о том, что в денатурированном щелочью белке двухвалентная медь связана по крайней мере с двумя атомами азота (ядерный спин N^{14} равен 1).

В отличие от щелочной денатурации, денатурация мочевиной (4,5 М) приводила к резкому уменьшению интенсивности сигнала э.п.р. (Показанный на рис. 3А сигнал наблюдается только при большом усилении). Падение интенсивности сигнала э.п.р. при денатурации мочевиной, вероятно, может быть связано с восстановлением меди белка. В качестве восстанавливающих групп могут выступать тиоловые группы, которые в ре-

зультате разрушения водородных связей оказываются расположенными достаточно близко к атомам двухвалентной меди.

В опубликованных недавно работах (⁵, ⁶) сообщается, что под влиянием щелочи происходит восстановление меди, входящей в состав грибной лакказы и белка из *Pseudomonas fluorescense*, азурина. В то же время денатурация мочевиной лакказы и медьсодержащего белка из плазмы крови млекопитающих, церулоплазмينا, не сопровождается восстановлением двухвалентной меди (⁷). Однако денатурация азурина мочевиной также приводит к восстановлению меди (⁸).

Было исследовано также влияние додецилсульфата натрия на параметры сигнала э.п.р. Оказалось, что инкубация ПЦ с этим детергентом в течение одного часа не приводила к заметным изменениям формы сигнала э.п.р. и интенсивности окраски ПЦ даже при концентрации детергента 4% (рис. 3Б). На основании этих фактов можно предположить, что гидрофобные взаимодействия не существенны для поддержания специфического лигандного окружения атомов меди в ПЦ, тогда как роль водородных и электростатических взаимодействий значительна.

В предварительно проведенных опытах обнаружено, что додецилсульфат натрия также не оказывает воздействия на синюю окраску и спектр э.п.р. церулоплазмينا.

Эти результаты вместе с представленными в настоящем сообщении литературными данными свидетельствуют о том, что специфическое лигандное окружение меди в медьсодержащих белках определяется взаимодействиями, благодаря которым поддерживается нативная структура белка.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Kato h, *Nature*, **186**, 533 (1960). ² A. S. Brill, R. B. Martin, R. J. P. Williams. In: *Electronic Aspects of Biochemistry*, N. Y., 1964. ³ D. S. Gorman, R. P. Levine, *Plant Physiol.*, **41**, 1637 (1966). ⁴ W. E. Blumberg, J. Peisach. *Biochim. et biophys. acta*, **126**, 269 (1966). ⁵ J. A. Fee, B. G. Malmström, T. Vänngård, *Biochim. et biophys. acta*, **197**, 136 (1970). ⁶ L. Avigliano, P. Guerrieri et al., *Ital. J. Biochem.*, **19**, 129 (1970). ⁷ B. G. Malmström, T. Vänngård, *J. Mol. Biol.*, **2**, 118 (1960). ⁸ A. Finazzi-Agro, G. Rotilio et al., *Biochemistry* **9**, 2009 (1970).