Доклады Академии наук СССР
1972. Том 207, № 1

УДК 577.15

БИОХИМИЯ

Е. Н. ФРОЛОВ, В. К. ГИНС, Е. Н. МУХИН, Г. И. ЛИХТЕНШТЕЙН

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ФЕРРЕДОКСИНОВ ГОРОХА И КУКУРУЗЫ МЕТОДОМ СПИНОВЫХ МЕТОК

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 1 II 1972)

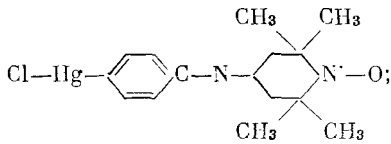
Ферредоксины функционируют в растительных и бактериальных клетках в качестве низкопотенциальных переносчиков электронов ([1]). Установлено, что в состав активного центра ферредоксинов входят негеминовое железо и неорганическая сера. Ионы железа связаны с белковой глобулой через цистеиновые остатки. Ряд косвенных данных полученных методами э.п.р., я.г.р. и магнитной восприимчивости, приводит к предположению о наличии магнитных взаимодействий между ионами железа в белке, т. е. об их близком взаимном расположении ([2–4]). Однако важный для понимания механизма действия ферредоксинов вопрос о строении их активных центров окончательно не решен.

Как было показано в работах ([5, 6]), информация о взаимном расположении атомов металла в железо-белковом комплексе может быть получена с помощью спиновых меток, т. е. производных стабильных иминоксильных радикалов, имеющих неспаренный электрон и способных присоединяться к определенным группам белка.

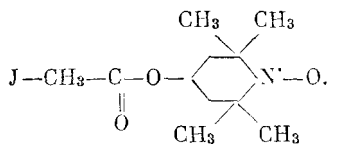
Такие спиновые метки, специфически связывающиеся с цистеиновыми остатками, способны замещать ионы железа в железо-серных белках. Изучение взаимодействия парамагнитных центров меток методом э.п.р. позволяет охарактеризовать взаимное расположение ионов железа в белке, а также идентифицировать свободные и связанные с железом остатки цистеина.

В настоящем сообщении излагаются результаты изучения активного центра двух растительных ферредоксинов методом спиновых меток.

В качестве парамагнитных меток в работе использовали следующие производные иминоксильного радикала:



(I)



(II)

Указанные вещества специфически связываются с цистеиновыми остатками белка ([7]). К раствору ферредоксина с концентрацией 6—8 мг/мл добавляли 1—30-кратный молярный избыток спиртового раствора спиновой метки I или II в концентрации 10^{-2} *М*. Реакционную смесь инкубировали в течение 12 час. при 5°. Отделение непрореагировавшей метки достигалось путем гель-фильтрации на сефадексе Г-50.

Количественное определение числа спиновых меток, связывающихся с ферредоксином, проводили путем сравнения спектров э.п.р. при 77° К спин-меченого ферредоксина и спиртового раствора метки известной концентрации методом графического интегрирования спектров э.п.р.

Для получения ферредоксина в работе использовали листья двухнедельных проростков гороха сорта «Неистощимый» и кукурузы сорта «Стерлинг белая». Материал измельчали и экстрагировали 0,005 *М* трис-HCl-буфером pH 8. Полученный экстракт фракционировали сульфатом аммония при 60 и 90% насыщении с последующей гель-фильтрацией на сефадексе Г-50, уравновешенном 0,05 *М* трис-HCl-буфером pH 8. Последующая очистка белка включала хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозных колонках, уравновешенных тем же буфером. Белок элюировали 0,05 *М* трис-HCl-буфером pH 8 с концентрацией NaCl 0,2 мол/л ([8]).

Активность ферредоксина в реакции фотовосстановления НАДФ хлоропластами гороха измеряли по увеличению поглощения при 340 мμ в системе, содержащей суспензию хлоропластов, соответствующую 40 μг хлорофилла, 0,67 μ моля НАДФ, 20 μ мол. $MgCl_2$, 80 μг фередоксина, и 0,05 *М* трис-HCl-буфер pH 8.

Хлоропласты выделяли из листьев гороха по методу, описанному Кейстером и сотрудниками ([9]).

Оба выделенных белка обладали специфическими для класса растительных ферредоксинов свойствами: содержали по 2 атома железа и «лабильной» серы на 1 молекулу белка, в спектрах поглощения наблюдались характерные максимумы, в том числе в области 420 мμ, при восстановлении возникали сигналы э.п.р. с $g = 1.94$ (рис. 1), в окисленном состоянии сигнал э.п.р. не наблюдался.

Спектры э.п.р. спин-меченых ферредоксинов, полученные при 15-кратном избытке метки I в реакционной смеси и снятые при температуре 290 или 77° К, приведены на рис. 2*а*. Спектры представляют собой наложение двух типов сигналов — триплетного с константой изотропного сверхтонкого взаимодействия $A = 15{,}5$ э и синглетного с шириной линии около 20 э. При добавлении к раствору спин-меченых ферредоксинов химически инертного по отношению к меченому белку парамагнетика — феррицианида («спинового зонда») до концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ *М* наблюдается исчезновение триплетного сигнала и более четкое разрешение синглетного сигнала (рис. 2*в*). Исчезновение триплетного сигнала связано с уширением линий э.п.р. метки в результате обменной релаксации при столкновении со спиновым зондом ([10]). Синглетный сигнал обусловлен обменным взаимодействием парамагнитных центров спиновых меток ([5]). Как показали наши наблюдения, связывание спиновых меток с белками при указанных выше концентрациях сопровождается исчезновением поглощения в области 420 мμ, обусловленного железо-белковым комплексом ([11]), а также потерей каталитической активности ферредоксинов в реакции фотовосстановления НАДФ. Это свидетельствует о том, что спиновые метки, связываясь с цистеиновыми остатками, замещают ионы железа в белке.

В спектре э.п.р. спин-меченых ферредоксинов, полученных при инкубации со спиновой меткой I до 1—2-кратного избытка или со спиновой меткой II до 20-кратного избытка, синглетный сигнал отсутствует (рис. 2*д*, *е*). Модифицированные таким способом ферредоксины сохраняют каталитическую активность и поглощение в области 420 мμ. Следовательно, при низких концентрациях меток в среде инкубации не происходит замещения атомов железа в белке.

Полученные данные указывают на то, что триплетный сигнал молекулы спин-меченого ферредоксина обусловлен спиновыми метками, связывающимися со свободными, некомплексующими железо-цистеиновыми остатками. В то же время синглетный сигнал обусловлен спиновыми мет-

ками, замещающими ионы железа. Наблюдаемое обменное взаимодействие между такими спиновыми метками, заместившими ионы железа, свидетельствует о близком расположении цистеиновых остатков, комплексующих ионы железа, т. е. о полиядерной природе железо-белкового комплекса. К такому же заключению приводят результаты опытов по воздействию 8 *М* мочевины на спин-меченые ферредоксины, обнаруживающие синглетные сигналы (как на рис. 2*а*). В этом случае наблюдается трансформация синглетного сигнала в триплетный, характерный для не взаи-

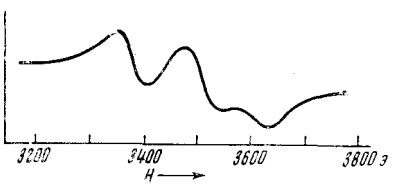


Рис. 1. Спектр э.п.р. восстановленного ферредоксина из листьев гороха. Спектр снят на спектрометре трехсантиметрового диапазона

Рис. 1

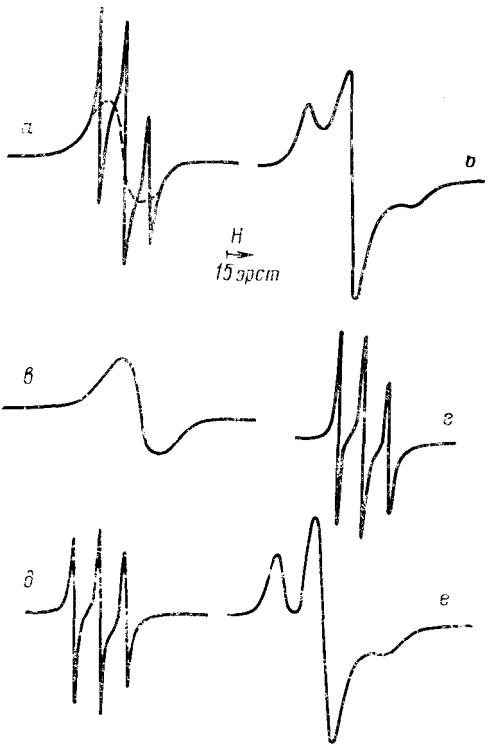


Рис. 2. Спектры э.п.р. спин-меченых ферредоксинов в окисленном состоянии: в случае добавления к белку 15-кратного избытка метки I при 290° К (*а*), при 77° К (*б*), после добавления $5 \cdot 10^{-2}$ *М* феррицианида при 290° К (*в*), после добавления 8 *М* мочевины при 290° К (*г*); в случае 1—2-кратного избытка метки I или 20-кратного избытка метки II при 290° К (*д*), при 77° К (*е*)

Рис. 2

модействующих друг с другом меток (рис. 2*г*); эта трансформация обусловлена «разрыхлением» белковой глобулы мочевиной и взаимным удалением меток.

Результаты графического интегрирования спектров э.п.р. спин-меченых ферредоксинов и растворов метки показали, что общее число спиновых меток, способных связываться с молекулой ферредоксина растительного типа, равно 6 ± 1. В то же время интенсивность триплетного сигнала при добавлении к спин-меченому белку 8 *М* мочевины возрастает в 5 раз, т. е. синглетный сигнал обусловлен взаимодействием четырех спиновых меток. Следовательно, на основании изложенного можно заключить, что в изученных ферредоксинах 4—5 цистеиновых остатков связаны с железом; имеется также 1—2 свободных остатка цистеина. Проверка общего числа цистеиновых остатков в белках, проведенная с помощью специфических реагентов на цистеиновые остатки, таких как 5.5′-дитио-(2-нитробензойная кислота) и *п*-хлормеркурийбензоат, по методам, описанным в работах ([12], [13]), дает те же значения.

Таким образом, приведенные выше результаты, полученные с помощью метода спиновых меток, прямо указывают на полиядерный характер железо-белкового комплекса растительных ферредоксинов, а также на наличие двух типов сульфгидрильных групп в молекуле белка — связанных с железом и свободных.

Отсутствие ингибирования фотовосстановления НАДФ при блокировании свободных сульфгидрильных групп ферредоксинов специфическим реагентом (метка II) позволяет предполагать, что эти группы не входят в состав активного центра изученных белков.

На основании полученных данных можно прийти к заключению о близком сходстве в строении активного центра ферредоксинов из листьев гороха и кукурузы.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
20 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Е. Н. Мухин, Усп. совр. биол., **67**, 221 (1969). [2] J. C. M. Tsibris, R. L. Tsai et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **59**, 955 (1968). [3] K. K. Rao, R. Cammack et al., Biochem. J., **122**, 257 (1971). [4] M. Roe, W. D. Phillips et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **65**, 797 (1970). [5] Е. Н. Фролов, Г. И. Лихтенштейн, Л. А. Сырцова, ДАН, **196**, 1149 (1971). [6] Л. А. Сырцова, Л. А. Левченко и др., Мол. биол., **5**, в. 5 (1971). [7] Г. И. Лихтенштейн, Г. Х. Бободжанов и др., Мол. биол., **2**, 344 (1968). [8] Е. Н. Мухин, С. Г. Хруслова, В. К. Гинс, Физиол. раст., **15**, № 6 (1970). [9] D. L. Keister, A. San-Pietro, E. Stolzenbach, Arch. Biochem. and Biophys., **94**, 187 (1961). [10] Г. И. Лихтенштейн, Ю. Б. Гребенщиков и др., Мол. биол., 4, 782 (1970). [11] W. Lowenberg, B. B. Buchanan, J. C. Rabinowitz, J. Biol. Chem., **238**, 3899 (1963). [12] L. L. Ellman, Arch. Biochem., **82**, 70 (1959). [13] P. D. Boyer, J. Am. Chem. Soc., **76**, 4331 (1954).