

УДК 541.14.+547.979.4

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. С. МИХАЙЛОВА

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦИТОХРОМА С В ПРИСУТСТВИИ ХИНОНОВ; ДЕЙСТВИЕ СВЕТА

Изучая фотосенсибилизированные хлорофиллом окислительно-восстановительные превращения цитохрома с^(1, 2), мы нашли, что хиноны наряду с флавинами являются активными кофакторами этой реакции.

При постановке контрольных опытов с растворами цитохрома, содержащими хиноны (без хлорофилла), мы заметили, что восстановление цитохрома идет в темноте и белый свет активизирует эту реакцию.

Самовосстановление водных растворов цитохрома с и f было описано ранее⁽³⁻⁵⁾; эта реакция идет наиболее активно при щелочных рН, и при-

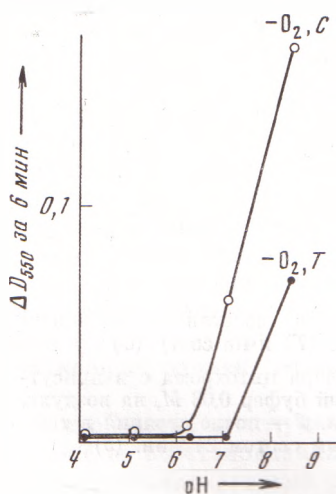


Рис. 1

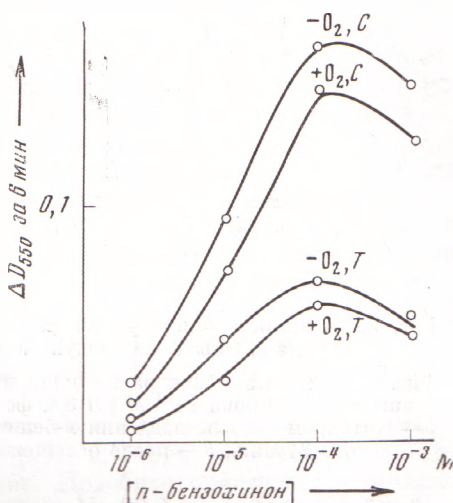


Рис. 2

Рис. 1. Влияние pH на восстановление цитохрома с в присутствии *n*-бензохинона (10^{-4} M). Реакция в вакууме, T — в темноте, C — при освещении

Рис. 2. Влияние концентрации *n*-бензохинона на восстановление цитохрома с. Опыты на воздухе (+O₂) и в вакууме (-O₂) в темноте (T) и на свету (C)

сутствие кислорода воздуха не препятствует восстановлению цитохрома. Предполагается^(4, 5), что восстановление центрального атома железа внутри молекулы цитохрома происходит самопроизвольно за счет электронодонорных группировок полипептидной цепи (например гистидин, триптофан). Мы подтвердили эти данные с использованием доступных нам препаратов цитохрома с. Так, при стоянии в темноте в течение 48 час. растворов цитохрома с (2,3 мг в 5 мл фосфатного буфера 0,03 M, pH 8,4) оптическая плотность *D* в максимуме восстановленной формы (550 мμ) увеличивалась на 0,03–0,04 при использовании препаратов «Biomed — Krakow» и BDH Lab. Chem. Div. (90–100%, с содержанием железа не менее 0,43%). Препарат фирмы «Schuchardt» (88,5%, свободный от гистамина) в этих условиях давал увеличение *D* до 0,12; при этом наблюдалось появление в спектре максимума 550 мμ. Освещение белым светом в течение

ние 4 час. в вакууме слабо активирует реакцию, увеличение D при 550 мμ составляет 0,02—0,03, тогда как на воздухе за это время увеличение D было незначительным. Предварительное нагревание раствора цитохрома при 40° в течение 10 мин. ускоряет процесс самовосстановления, по-видимому, за счет конформационных изменений в молекуле белка.

В настоящей работе исследовалось обнаруженное нами активирующее влияние хинонов на восстановление цитохрома. Большинство опытов проводилось с препаратами «Biomed»; сходные результаты получены с другими препаратами цитохрома.

Использовали свежесинтезированный *n*-бензохинон. Опыты проводили в трубках Тунберга, допускающих спектрофотометрические измерения в водных растворах, содержа-

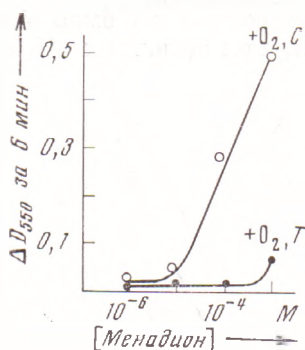


Рис. 3

Рис. 3. Влияние концентрации менадиона на восстановление цитохрома с. Опыты на воздухе в темноте (Т) и на свете (С)

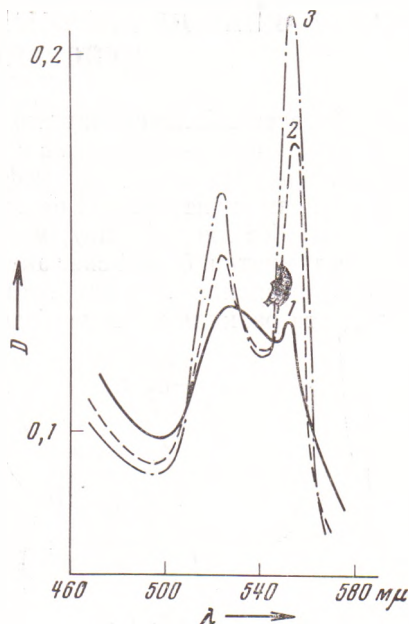


Рис. 4

Рис. 4. Изменение спектра поглощения раствора цитохрома с в присутствии *n*-бензохинона $10^{-4} M$ pH 8,4, фосфатный буфер 0,03 M , на воздухе. 1 — Цитохром с после введения *n*-бензохинона, 2 — после стояния в темноте 24 мин., 3 — после освещения белым светом 24 мин. (3)

щих фосфатный буфер 0,03 M при концентрации цитохрома с $3,5 \cdot 10^{-5} M$. Растворы освещали белым светом лампы накаливания на термостатируемой установке, описанной ранее (¹, ²), при 20°, интенсивность света $2 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек.

Прежде всего мы исследовали влияние pH (при постоянной концентрации *n*-бензохинона $10^{-4} M$). Опыты проводили в вакууме в темноте и на свету. Полученные данные представлены на рис. 1. Активность реакции достигает максимума в щелочном pH, что соответствует данным (³, ⁴, ⁵) для растворов цитохрома, не содержащего хинон. Освещение активирует реакцию уже при pH 7,1, т. е. в условиях, когда темновая реакция практически не идет, а при pH 8,4 свет ускоряет реакцию более чем в два раза.

Влияние концентрации *n*-бензохинона (см. рис. 2) изучалось при постоянном значении pH 8,4. Опыты проводили на воздухе и в вакууме. Максимальная активность реакции достигается при концентрации *n*-бензохинона $10^{-4} M$ и падает как при увеличении, так и при уменьшении его концентрации. Без хинона за время опыта D при 550 мμ не изменяется. В вакууме реакция идет быстрее, чем на воздухе. Белый свет отчетливо ускоряет реакцию. Изменения спектра поглощения цитохрома см. на рис. 4.

Мы испытали действие других хинонов. Так, менадион мало влияет на темновое восстановление цитохрома с, восстановление наблюдается

только при концентрации этого хинона 10^{-3} М. Однако освещение приводит к чрезвычайно эффективному восстановлению. Свет активирует реакцию уже при концентрации менадиона 10^{-5} М (рис. 3). Антрахинон не активен в темноте и при освещении.

2,3-диметоксиарабензохинон (10^{-4} М при рН 8,4) чрезвычайно ускоряет темновую и световую реакцию, тогда как 2,3-диметокси-5-метил-арабензохинон в тех же условиях был неактивен в темноте и мало активен при освещении.

Так как наши опыты с хлорофиллом проводятся в водном растворе тритона X-100, в котором происходит сольubilизация цитохрома и хлорофилла, мы испытали действие этого детергента на реакцию хинона с цитохромом. Опыты показали, что наличие детергента в концентрации до 1% не приводит к заметному активированию реакции.

Таким образом, хиноны активируют восстановление цитохрома с в темноте и при освещении. Этой реакции благоприятствует та конформация молекулы белка и степень ионизации электронодонорных групп, которая достигается при щелочных значениях рН. Действие света на эту реакцию чрезвычайно отчетливо, особенно в случае менадиона. Трудно сомневаться в том, что фоторецепторами-фотосенсибилизаторами являются молекулы хинона, которые практически закрывают поглощенные полосы Соре; при этом собственная фотохимическая активность цитохрома ничтожна.

Наиболее вероятно, что возбужденные светом молекулы хинона играют роль переносчиков электрона от электронодонорных групп молекул белка к центральному атому железа. Такой же механизм мы предполагали в случае фотосенсибилизированных превращений цитохрома под действием красного света, поглощаемого хлорофиллом.

Удивительно относительно слабое влияние кислорода на эту реакцию. По-видимому, при внутримолекулярном процессе кислород не может подойти к активному центру, спрятанному в скрученной полипептидной цепи. Аналогичное явление — отсутствие тушения флуоресценции фикобилинов кислородом наблюдалось ранее в нашей лаборатории (⁶).

Специфика действия отдельных хинонов, по-видимому, связана с величиной их окислительно-восстановительного потенциала и с их молекулярной конфигурацией, позволяющей войти в нужную «щель» молекулы белка.

Таким образом, молекулы хинонов обладают каталитическим действием в процессе восстановления цитохрома с, а при освещении проявляется их фотосенсибилизирующее действие. Подобное действие возможно не только в растворах, но и в клетках фотосинтезирующих организмов.

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

Поступило
25 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, ДАН, 185, 938 (1969). ² А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, ДАН, 194, 953 (1970). ³ E. Boeri, Sci. Med. Ital., 4, 321 (1955). ⁴ R. S. Brady, T. Flatmark, J. Mol. Biol., 57, 529 (1971). ⁵ H. S. Garewal, A. R. Wasserman, Biochim. et biophys. acta, 275, 437 (1972). ⁶ А. А. Красновский, Л. Г. Ерохина, ДАН, 183, 470 (1968).