



УДК 577.158.001.572

МОДЕЛЬНЫЕ МОЛИБДЕНСЕРНЫЕ И МОЛИБДЕНЖЕЛЕЗОСЕРНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

© 1996 г. О. В. Белоногова[#], Г. И. Лихтенштейн**Институт химической физики РАН, Черноголовка Московской обл.;*** Университет Бен-Гуриона, химический факультет, Беэр-Шева, Израиль*

Поступила в редакцию 25.10.95 г. После доработки 14.03.96 г.

Предложена методика синтеза многоядерных молибденсерных и молибденжелезосерных комплексов на основе сывороточного альбумина человека. Методом ЭПР установлено, что атомы железа и молибдена в синтезированных комплексах образуют кластеры. Показано, что каталитическая активность синтезированных комплексов, определяемая по восстановлению ацетилена под действием боргидрида натрия, значительно выше, чем для ранее описанных небиологических систем, однако не достигает величин, характерных для FeMo-кофактора нитрогеназы.

Ключевые слова: каталитическая активность многоядерных молибденсерных и молибденжелезосерных комплексов, ЭПР-спектроскопия, газожидкостная хроматография.

Одна из важнейших задач современного гомогенного катализа – моделирование структуры ферментов, в частности многоядерных металлсодержащих ферментов, обладающих рядом уникальных каталитических свойств. Одним из таких ферментов является нитрогеназа, катализирующая восстановление молекулярного азота до аммиака, ацетилена до этилена и т.д. Этот фермент содержит кластерный кофактор (FeMo-co), включающий атомы молибдена, железа и неорганический сульфид в соотношении $1 : 7 : 8 \pm 2$ [1].

Каталитически активные функциональные модели нитрогеназы на основе неорганических соединений молибдена или ванадия в щелочной среде были получены в работах [2, 3]. Низкомолекулярные неорганические комплексы железа и молибдена оказались практически неактивными в реакции восстановления молекулярного азота до аммиака [4]. Однако в последнее время был получен целый ряд кластеров молибдена и железа или ванадия и железа “кубанового” типа, структурно аналогичных FeMo-кофактору нитрогеназы и проявляющих каталитическую активность в реакциях восстановления гидразина и ацетилена [5–8]. Для структурного и функционального моделирования металлоферментов представляется перспективным получение многоядерных металлокомп-

лексов на белковой основе. Ранее для моделирования железосерных белков (FeS-) был использован сывороточный альбумин человека (ЧСА), однако полученный комплекс не проявлял заметной каталитической активности в реакции восстановления ацетилена [9].

В настоящей работе предлагается методика синтеза многоядерных молибденсерных (MoS-) и молибденжелезосерных (MoFeS-) комплексов на основе сывороточного альбумина человека с целью моделирования нитрогеназы, а также других ферментов, содержащих железо и молибден. Изучена способность полученных препаратов катализировать модельный процесс восстановления ацетилена в присутствии боргидрида натрия.

Методика включает в себя восстановление S–S-связей в альбумине до сульфгидрильных групп в присутствии мочевины и затем реконструкцию белковой макромолекулы при добавлении солей (Na_2MoO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ или $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в различных вариантах) и восстановителей (Na_2S и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Как следует из таблицы, в зависимости от состава комплексы меняют окраску от светло-желтой до темно-коричневой, причем наиболее интенсивно окрашены комплексы, полученные при введении иона MoS_4^{2-} . Наличие в активных центрах синтезированных комплексов лабильного сульфида и сульфгидрильных групп позволяет предположить, что хотя бы частично атомы Fe в комплексах организованы в *n*Fe – *n*S-кластеры.

Сокращения: FeMo-co – железомолибденовый кофактор, FeS – железосерный, MoS – молибденсерный, MoFeS – молибденжелезосерный, ЧСА – сывороточный альбумин человека, ПХМБ – *n*-хлормеркурибензоат, ПХМБ-радикал – 1-оксил-2,2,4,4-тетраметилпиперидил-4-*n*-хлормеркурибензоат.

[#] Автор для переписки.

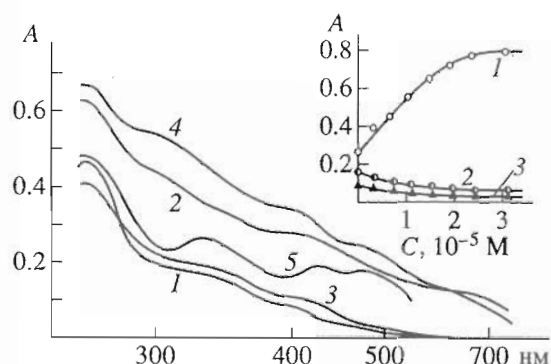


Рис. 1. Спектры поглощения комплексов: 1 – MoS-A^a; 2 – MoFeS-A^a; 3 – MoS-A^b; 4 – MoFeS-A^b ($C_K \sim 1-1.2 \times 10^{-5}$ М, 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.2; 25°C); 5 – ферредоксин ($C_K \sim 2.3 \times 10^{-5}$ М, 0.01 М фосфатный буфер, pH 7.5; 25°C) [10]. На вставке – кривые титрования комплекса MoFeS-A^b ($C \sim 10^{-5}$ М) *n*-хлормеркурибензоатом при λ 250 (1), 313 (2), 420 нм (3).

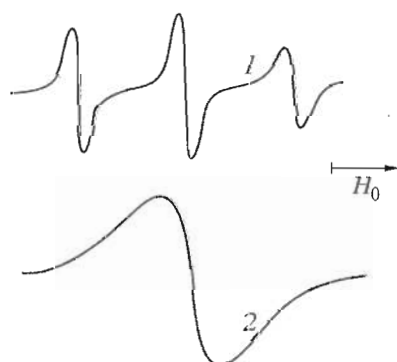


Рис. 2. Спектры ЭПР (20°C) меченных ПХМБ-радикалом ЧСА [13] (1) и комплекса MoFeS-A^a (2) (0.1 М фосфатный буфер, pH 7.2).

Оптические спектры комплексов (рис. 1) имеют слаборазрешенную структуру, характерную для железосерных кластерных систем (например, ферредоксина [10]). Согласно работе [11], неболь-

шое плечо при λ 313–314 нм, наблюдаемое в спектрах всех комплексов, включая FeMo-кофактор, обусловлено поглощением тиокомплексов молибдена. При добавлении ионов Fe²⁺ появляются дополнительные полосы с максимумом при 420 и 460–470 нм, которые также характерны для тиокомплексов как железа, так и молибдена [11]. Следует отметить, что при титровании по Бойеру реагентом *n*-хлормеркурибензоатом [12], который избирательно реагирует с сульфгидрильными группами, наряду с увеличением оптической плотности при λ 250 нм наблюдается симбатное уменьшение величины поглощения при 313 и 420 нм (рис. 1, вставка). Это также свидетельствует о том, что атомы Mo и Fe в синтезированных комплексах связываются с белковой матрицей через серу.

Ранее было показано [13], что природные и модельные кластерные железосерные центры взаимодействуют с 1-оксил-2,2,4,4-тетраметилпиперидил-4-*n*-хлормеркурибензоатом (ПХМБ-радикал) с образованием ансамбля спиновых меток с сильным обменным взаимодействием, проявляющимся в спектре ЭПР в виде синглета. Поэтому для решения вопроса о взаимном расположении ионов металлов в комплексах был использован метод ЭПР. Было показано, что при обработке комплексов ПХМБ-радикалом сигнал ЭПР от радикала из триплета трансформируется в синглет (рис. 2). Такой спектр характерен для сильного обменного взаимодействия между спиновыми метками, замещающими атомы железа или молибдена в комплексах (см. выше) при их близком расположении друг относительно друга. Таким образом, данные метода ЭПР подтверждают кластерную природу расположения Mo и Fe в комплексах.

Важным критерием оценки соответствия химической модели ферменту (наряду с соответствием структуре активного центра) является способность модельного соединения катализировать конкретную для фермента реакцию. Известно,

Состав и каталитическая активность модельных молибденосерных и молибденжелезосерных комплексов на основе ЧСА, определяемая по восстановлению ацетилена по методу [14]

Тип комплекса*	Окраска комплекса	Состав, моль/моль белка				Активность, моль C ₂ H ₂ /(моль белка · мин)
		Fe	Mo	SH	S ²⁻	
MoS-A ^a	Светло-желтая	0.1	2	6	0.4	1.1 ± 0.1
MoFeS-A ^a	Коричневая	10	4	14	7	3.3 ± 0.3
MoS-A ^b	Ярко-желтая	0.1	10	8	3	3.3 ± 0.3
MoFeS-A ^b	Темно-коричневая	10	15	2	20	10 ± 1
FeS-A	Черная	10	0.1	9	6	0.1 ± 0.01
FeMo-кофактор [15]	Светло-коричневая	7	1		8	44 ± 4
Неорганические комплексы [4]						0.01

* Верхним индексом ^a и ^b обозначены альбуминовые комплексы, в синтезе которых были использованы соответственно MoO₄²⁻ и MoS₄²⁻ - соли (см. "Экспер. часть").

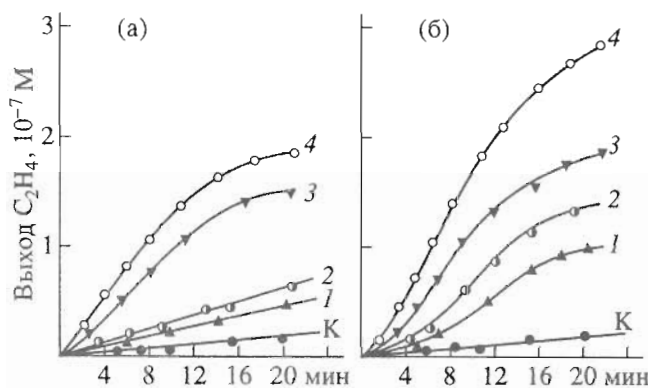


Рис. 3. Зависимости выхода этилена от времени для комплексов MoS-A^a (а) и MoFeS-A^b (б), взятых в концентрациях (10⁻⁴ М): 0.5 (1), 1 (2), 3.5 (3а) и 1.75 (3б), 6 (4а) и 2.6 (4б) (0.1 М фосфатный буфер, рН 7,2; 25°С).

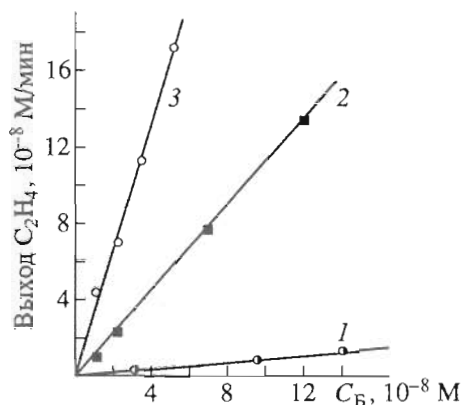


Рис. 4. Зависимости начальных скоростей восстановления ацетилена от концентраций (по белку) комплексов FeS-A (1), MoS-A^a (2), MoFeS-A^a (3) (условия см. рис. 3).

что при определенных условиях нитрогеназа восстанавливает азот и ацетилен, поэтому были проведены соответствующие эксперименты с модельными комплексами. Было найдено, что комплексы не катализируют восстановление азота под действием боргидрида натрия. По методу [14] была определена активность полученных комплексов в реакции восстановления ацетилена под действием NaBH₄ (рис. 3, таблица). Следует отметить, что соли Fe и Mo, используемые в синтезе комплексов, в различных вариантах в присутствии всех компонентов реакционной смеси, кроме ЧСА, заметной активностью, отличной от контроля, в реакции восстановления ацетилена не обладают. Зависимости начальных скоростей восстановления ацетилена, определяемых по наклону касательной к кривой выхода этилена во времени (рис. 3), от концентрации белка в комплексах представлены на рис. 4: наибольшей активностью обладают MoFeS-комплексы. При замене иона MoO₄²⁻ на MoS₄²⁻ активность комплексов возрастает приблизительно в 3 раза (таблица), однако не достигает величин, характерных для кофактора нитрогеназы [15].

Масс-спектрометрически был определен состав продуктов, полученных в результате каталитической реакции восстановления ацетилена в присутствии исследуемых комплексов. Основным продуктом восстановления является этилен (99.2%) с небольшой примесью этана (0.8%).

Таким образом: 1) предложена методика синтеза молибденсерных и молибденжелезосерных многоядерных комплексов на белковой основе; 2) показано, что полученные комплексы молибдена или молибдена и железа на белковой основе имеют кластерную природу; 3) MoS- и MoFeS-комплексы на белковой основе обладают ацетилен-

восстанавливающей активностью, но эти активности не достигают величин, характерных для FeMo-кофактора нитрогеназы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали препараты сывороточного альбумина человека (ЧСА) фирмы "Reanal", спиновую метку 1-оксил-2,2,4,4-тетраметилпиперидил-4-л-хлормеркурибензоат фирмы "Reanal" и реактивы "Реахим" (мочевина, 2-меркаптоэтанол, Na₂MoO₄ · 2H₂O, (NH₄)₂MoS₄ · 7H₂O, FeSO₄ · 7H₂O, Na₂S · 9H₂O, Na₂S₂O₄, NaBH₄) марки х.ч.

Синтез комплексов. 100 мг ЧСА (~1.5 ммоль) растворяли в 1 мл воды, затем добавляли 760 мг мочевины и 0.05 мл 2-меркаптоэтанол, разбавленного в 10 раз. В реакционной смеси растворяли 5.5 мг Na₂MoO₄ (или (NH₄)₂MoS₄) с последующим добавлением 1 мл раствора, содержащего 14.4 мг Na₂S и 34.8 мг Na₂S₂O₄ в фосфатном буфере (рН 7.2; 0.15 М). При синтезе MoFeS-комплексов перед добавлением в реакционную смесь восстановителей (Na₂S и Na₂S₂O₄) вводили 11 мг FeSO₄ · 7H₂O. Во всех вариантах синтеза последующей стадией была очистка на колонке с сефадексом G-50 в анаэробных условиях. Очистка повторялась дважды. Синтез FeS-комплекса проводился по методике синтеза MoFeS-комплексов, но стадия добавления соединений молибдена опускалась.

Число связанных атомов Mo и Fe определяли методом абсорбционной спектроскопии на атомно-абсорбционном спектрометре "Сатурн". Число SH-групп определяли двумя методами: амперометрическим титрованием [16] и титрованием по Бойеру [12]. Количество лабильного сульфида определяли по методу [17], концентрацию белка – по биуретовой реакции [18].

Активность комплексов определяли по восстановлению ацетилена по методу [14]. К 3.3 мл боратного буфера (рН 9.6; 0.1 М) добавляли 0.2 мл раствора комплекса (концентрации $\sim 10^{-4}$ М по белку) и инкубировали в атмосфере аргона с 1 см³ C₂H₂ в течение 4 ч (общий объем газовой фазы ~ 10 см³). Реакцию инициировали 0.1 мл раствора 2 М NaBH₄ в диметилформамиде. Количество восстановленного ацетилена определяли методом газожидкостной хроматографии (хроматограф ЛХМ-8МД, модель 3) по высоте пика. Азотфиксирующую способность полученных препаратов измеряли методом микродиффузии [19].

Для получения спинмеченых комплексов использовали спиновую метку 1-оксил-2,2,4,4-тетраметилпиперидил-4-*n*-хлормеркурибензоат (ПХМБ-радикал), которую добавляли в спиртовом растворе в 10-кратном избытке по отношению к концентрации белка [13]. Смесь инкубировали 10 мин, затем проводили очистку на колонке с сефадексом G-50. Спектры ЭПР записывали на спектрометре ЭПР-3 в условиях ненасыщающих значений СВЧ-поля при амплитуде модуляции 0.18 мТ и частоте модуляции 20 кГц при 25°C. Число присоединившихся спиновых меток (*n*) определяли при 77 К сравнением интенсивности сигналов исследуемого и стандартного образцов (*n* = 4). Погрешность измерения 10%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shah V.K., Brill W.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 3249–3253.
2. Shilov A.E., Denisov N.T., Efimov O.N., Shuvalov V.F., Shuvalova N.I., Shilova A.K. // Nature. 1971. V. 231. P. 460–465.
3. Денисов Н.Т., Ефимов О.Н., Шувалова Н.И., Шилова А.К., Шилов А.Е. // Журн. физ. химии. 1970. Т. 44. С. 2964–2969.
4. Schrauzer G.N., Tano K. // J. Am. Chem. Soc. 1975. V. 97. P. 5404–5410.
5. Challen P.R., Koo S.-M., Kim C.G., Dunham W.R., Coucouvanis D. // J. Am. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 8606–8607.
6. Coucouvanis D., Mosier P.E., Demadis K.D., Patton S., Malinak S.M., Kim C.G., Tyson M.A. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 12193–12194.
7. Coucouvanis D., Malinak S., Laughlin L., Demadis K., Mosier P. // Abstr. 10th Int. Congress on Nitrogen Fixation. Saint Petersburg, 1995. 19s.
8. Coucouvanis D., Demadis K.D., Laughlin L.J., Malinak S.M., Mosier P. // J. Inorg. Biochem. 1995. V. 59. P. 726.
9. Лихтенштейн Г.И., Фролов Е.Н., Незнайко Н.Ф., Левченко Л.А., Скляр Ю.С. // Молекуляр. биология. 1972. Т. 6. С. 201–208.
10. Rao K.K., Gammack R., Hall D.O., Johnson C.F. // Biochem. J. 1971. V. 122. P. 254–263.
11. Zumft W.G. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 91. P. 345–359.
12. Boyer P.D. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 4331–4338.
13. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974.
14. Corbin J.L., Pariyadath N., Stifel E.J. // J. Am. Chem. Soc. 1976. V. 98. P. 7862–7870.
15. Madden M.S., Krezel A.M., Allen R.M., Ludden P.W., Shah V.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 6487–6491.
16. Benesch R.E., Lardy H.A., Benesch R. // J. Biol. Chem. 1995. V. 216. P. 663–675.
17. Lovenberg W., Buchanan B.B., Rabinowitz J.C. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 3899–3910.
18. Бейлу Дж. Методы химии белков. М.: Мир, 1965.
19. Bulen W.A., Burns R.C., LeCompte J.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1965. V. 53. P. 532–539.

Model Molybdenum and Iron–Molybdenum Sulfide Protein Complexes

O. V. Belonogova* and G. I. Likhtenstein**

*Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

**Ben-Gurion University, Department of Chemistry, Beer Sheva, Israel

Abstract—A procedure was developed for synthesizing complexes of polynuclear molybdenum sulfide and iron–molybdenum sulfide on the basis of human serum albumin. EPR showed that molybdenum and iron atoms formed clusters in the synthesized complexes. The catalytic activity of the complexes, as determined through reaction of acetylene reduction by sodium borohydride, was significantly higher than that for previously described nonbiological systems, but lower than the characteristic values of FeMo-cofactor of nitrogenase.

Key words: catalytic activity of polynuclear molybdenum sulfide and iron–molybdenum sulfide complexes, EPR spectroscopy, gas-liquid chromatography.