



УДК 547.962 : 543.422.23. + 577.158.8

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ПМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЦИТОХРОМЕ *c* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВИДИМОГО СВЕТА

*Табатуа М. И., Сибельдина Л. А.*

*Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино;  
Институт химической физики Академии наук СССР, Москва*

Метод протонного магнитного резонанса высокого разрешения применен для исследования структурных изменений в цитохроме *c* под действием видимого света. Показано, что облучение видимым светом раствора ферроцитохрома *c* приводит к необратимым изменениям в молекуле белка — фотоокислению шестого лиганда гемового железа. Облучение раствора феррицитохрома *c* вызывает фотоокисление пятого и шестого аксиальных лигандов гема. В обоих случаях имеет место изменение электронной структуры гемового кольца.

Действие видимого света на растворы белков, содержащих фоточувствительный центр, в присутствии кислорода вызывает фотосенсибилизированное окисление аминокислотных остатков, расположенных в непосредственной близости от фоточувствительного центра [1, 2]. Так как порфирины в растворе достаточно хорошо сенсибилизируют фотоокисление отдельных аминокислот [3, 4], представляется очевидным, что порфириновая группа в цитохроме *c* является подобным фоточувствительным центром. Действительно, как показали Джори с сопр. [1, 2], облучение раствора цитохрома *c* видимым светом приводит к необратимому избирательному фотоокислению пятого и шестого аксиальных лигандов гемового железа — гистидина-18 и метионина-80.

Цель настоящей работы — исследовать методом протонного магнитного резонанса (ПМР) изменения в структуре цитохрома *c*, вызванные поглощением гемом кванта видимого света.

**Ферроцитохром *c*.** В спектре ПМР ферроцитохрома *c* (рис. 1, *a*) три сигнала с интегральной интенсивностью в один протон при  $-1,9$ ;  $-2,6$ ;  $-3,8$  м. д. и сигнал с интегральной интенсивностью в три протона при  $-3,3$  м. д. отнесены ранее соответственно к трем из четырех протонов двух метиленовых групп и  $\text{SCH}_3$ -группе метионина-80, который координирован с гемовым железом, как шестой лиганд [5, 6]. Высокопольные сдвиги этих сигналов обусловлены полем кольцевого тока гема и очень чувствительны к изменениям белковой структуры в окрестностях гема. В спектре ПМР ферроцитохрома *c*, облученного видимым светом в течение 1 ч (рис. 1, *b*), наблюдается уменьшение интегральной интенсивности сигнала  $\text{SCH}_3$ -группы вдвое и появление нового сигнала при  $-2,5$  м. д. Равенство интегральной интенсивности метильного сигнала при  $-3,3$  м. д. в спектре необлученного белка и суммарной интенсивности двух сигналов при  $-2,5$  и  $-3,3$  м. д. в спектре облученного ферроцитохрома *c* позволяет предполо-

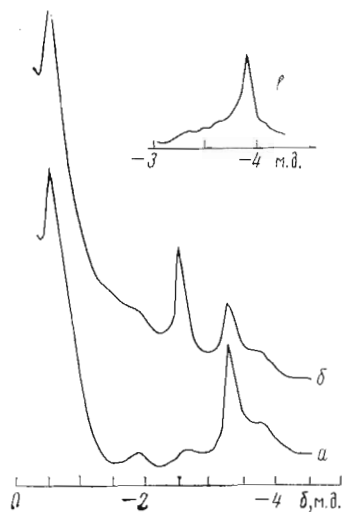


Рис. 1

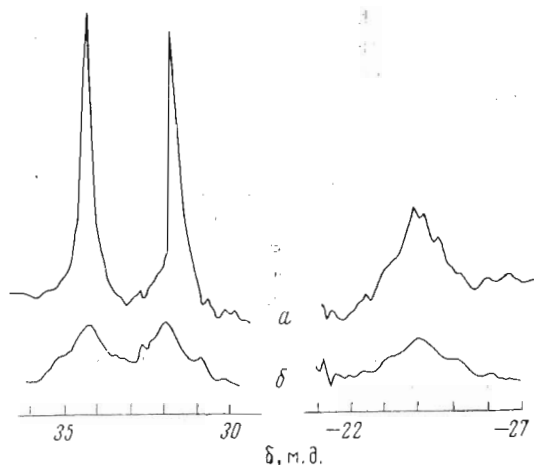


Рис. 2

Рис. 1. Спектры ПМР ферроцитохрома *c* в  $D_2O$ : при 90 МГц в области от 0 до 5 м. д. (рН 7,3): *a* — до облучения, *б* — после облучения видимым светом в течение 1 ч, *в* — спустя 12 ч после облучения.  $N = 3000$

Рис. 2. Спектры ПМР феррицитохрома *c* в  $D_2O$  при 90 МГц в области контактно сдвинутых сигналов (рН 7,3): *a* — до облучения, *б* — после 1 ч облучения видимым светом.  $N = 6000$

жить, что сигнал при  $-2,5$  м. д. принадлежит  $SCH_3$ -группе метионина-80, претерпевающего модификацию в результате облучения. Джори с сотр. [2] с помощью аминокислотного анализа ферроцитохрома *c* до и после облучения видимым светом показали избирательное фотоокисление метионина-80 до метионинсульфоксида. Таким образом, сигнал при  $-2,5$  м. д. в спектре облученного цитохрома *c* можно отнести к протонам метильной группы метионинсульфоксида-80.

Увеличение времени облучения приводит к росту интегральной интенсивности указанного сигнала и параллельному уменьшению интенсивности сигнала при  $-3,3$  м. д. Спустя 6 ч после облучения в спектре наблюдается полное исчезновение обоих сигналов при  $-2,5$  и  $-3,3$  м. д. и появление нового сигнала с интенсивностью в три протона при  $-3,9$  м. д.

Можно предположить, что фотоокисление метионина-80 до метионинсульфоксида несколько ослабляет прочность координационной связи серы с железом, в результате такое состояние становится неустойчивым. Переход белка в устойчивое состояние спустя несколько часов (рис. 1, *в*), вероятно, связан с пространственной переориентацией модифицированного метионинового лиганда относительно плоскости гема и с образованием прочной координационной связи серы метионинсульфоксида с гемовым железом.

Таким образом, оба сигнала при  $-2,5$  и  $-3,9$  м. д. могут быть отнесены к  $SCH_3$ -группе метионинсульфоксида, который по-разному ориентирован к плоскости гема ферроцитохрома *c*.

**Феррицитохром *c*.** В спектре ПМР феррицитохрома *c* обнаруживаются сильные сдвиги ряда сигналов протонов гемгруппы, обусловленные сверхтонким взаимодействием ядерных спинов этих протонов со спином неспаренного электрона железа [7—9]. Изменения в электронной структуре гема, а также конформационные изменения вблизи гемового кольца отражаются на параметрах сигналов. На рис. 2, *a* представлена область контактно

сдвинутых сигналов феррицитохрома *c*: сигналов двух кольцевых  $\text{CH}_3$ -групп гема при 34,2 и 31,8 м. д. и сигнала  $\text{SCH}_3$ -группы метионина-80 при —24 м. д. Все три сигнала после облучения белкового раствора видимым светом уширяются на величину 66, 60 и 41 Гц соответственно, а их интегральные интенсивности уменьшаются почти вдвое (рис. 2, б).

Облучение раствора феррицитохрома *c* видимым светом, как показано ранее Джори методом аминокислотного анализа [1], приводит к фотоокислению двух аксиальных лигандов гемового железа — гистидина-18 и метионина-80. Модификация двух аксиальных лигандов гема, по-видимому, приводит к ослаблению координационных связей и возможной замене лиганда 5 или 6 на молекулу  $\text{H}_2\text{O}$ , что обусловит переход гемового железа из низкоспинового состояния в высокоспиновое.

Уменьшение интегральной интенсивности сигналов в спектре облученного феррицитохрома *c* можно объяснить переходом гемового железа определенной доли белковых молекул в высокоспиновое состояние. Сильное уширение этих сигналов, вероятно, связано с наличием достаточно быстрого обмена между молекулами с высокоспиновым и низкоспиновым гемовым железом.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что действие видимого света на молекулу цитохрома *c* вызывает необратимую модификацию пятого и шестого аксиальных лигандов гемового железа в феррисостоянии и шестого лиганда в ферросостоянии с последующими необратимыми изменениями в пространственной ориентации модифицированных аминокислотных остатков — лигандов гема и в электронной структуре гема.

### Экспериментальная часть

Цитохром *c* из сердца свиньи (Medical, Краков) дополнительно очищен по методу, описанному в [10]. Раствор цитохрома *c* перед облучением и снятием спектров ПМР лиофилизирован из  $\text{D}_2\text{O}$  для обмена лабильных протонов на дейтерий. Дополнительное окисление белка осуществляли феррицианидом калия, а восстановление — дитионитом натрия. В обоих случаях белок диализовали. Концентрация белка в растворе 4 мМ (рис. 1) и 8 мМ (рис. 2). pH раствора устанавливали равным 7,3 путем добавления  $\text{DCI}$  и  $\text{NaOD}$ . Раствор цитохрома *c* в  $\text{D}_2\text{O}$  облучали светом видимой области ксеноновой лампы сверхвысокого давления ДКСШ-1000 через светофильтр СЖ-11 в кварцевой кювете толщиной 1 мм на расстоянии 40 см от источника. Температура образца во время облучения поддерживалась путем циркуляции воды вдоль стенок кюветы с точностью  $\pm 1$  К. Во время облучения раствор продували кислородом.

Спектр ПМР снимали на спектрометре НХ-90Е (Bruker-Physik) в режиме фурье-преобразования при 301 К. Химический сдвиг протонов  $\delta$  определяли относительно внутреннего эталона 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоновой кислоты. Число накоплений  $N$  составляло 3000—6000.

Авторы выражают признательность проф. Л. П. Каюшину за проявленный интерес к работе.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Jori G., Gennari G., Galiazzo G., Scoffone E. (1970) FEBS Lett., 6, 267—269.
2. Jori G., Gennari G., Galiazzo G. (1971) Biochim. et biophys. acta, 229, 525—528.
3. Jori G., Galiazzo G., Scoffone E. (1969) Biochemistry, 8, 2869—2872.
4. Каюшин Л. П., Грибова З. П., Азизова О. А. (1973) Электронный парамагнитный резонанс фотопроцессов биологических соединений, с. 45, «Наука», М.
5. McDonald C. C., Phillips W. D. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 1513—1525.
6. Gupta R. K., Redfield A. G. (1970) Science, 169, 1204—1206.
7. Redfield A. G., Gupta R. K. (1971) Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 36, 405—411.
8. Wüthrich K. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 63, 1017—1078.

9. Sibeldina L. A., Kayushin L. P., Kutysenko V. P., Lasareva A. V., Bronnikov G. E.  
(1976) *Studia Biophys.*, **54**, 15-30.

10. Margoliash E. (1952) *Nature*, **170**, 1014-1020.

Поступила в редакцию  
17.V.1976

## THE NMR STUDY OF STRUCTURAL CHANGES IN THE CYTOCHROME *c* UNDER THE ACTION OF VISIBLE LIGHT

TABAGUA M. I., SIBELDINA L. A.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,  
Pushchino, Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

High resolution  $^1\text{H-NMR}$  has been used to follow the structural changes in cytochrome *c* induced by visible light. It was shown that the illumination of ferrocycytochrome *c* solution produces the irreversible changes in the structure of the protein molecule, namely, it results in photooxidation of the sixth ligand of the heme iron. The illumination of the solution of ferricytochrome *c* causes the photooxidation the fifth and sixth axial ligands of the heme. In both cases there are the changes in the electronic structure of the heme ring.

---