



УДК 547.962 : 543.422.23 + 577.158.8

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ПМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ДВУХ КОНФОРМЕРОВ ФЕРРИЦИТОХРОМА *c*
В РЕАКЦИИ ЕГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ NADH***Табатура 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 в исследовании активности двух конформеров феррицитохрома *c*, различающихся природой шестого лиганда гемового железа, в реакции восстановления цитохрома *c* молекулой восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH). Установлено, что конформер феррицитохрома *c* с метионином-80 в качестве шестого лиганда гемового железа (D_2O , рD 6,8) восстанавливается нуклеотидом с большей скоростью, чем конформер с лигандом другой природы (D_2O , рD 8—10,6). Восстановление феррицитохрома *c* молекулой NADH происходит в результате комплексообразования белка с нуклеотидом. CN-феррицитохром *c* не восстанавливается нуклеотидом в D_2O в области рD от 5 до 10. Данные подтверждают, что природа шестого лиганда гемового железа и его связь с полипептидной цепью играют важную роль в транспорте электрона.

В ряде исследований конформационных особенностей цитохрома *c* методами абсорбционной спектрофотометрии установлено пять конформационных переходов в белке под влиянием рН среды [1]. Структура феррицитохрома *c* в водном растворе в области рН от 6 до 8 отличается от его структуры в области рН от 8 до 10,6 как конформацией полипептидной цепи в окрестности гемового кольца, так и природой шестого лиганда гемового железа [2—4]. Феррицитохром *c* с метионином-80 в качестве шестого лиганда гемового железа назван нами ранее [4] конформером 1. Структура белка, возникающая в результате замены шестого лиганда метионина-80 на лизин-79 (рК перехода 9,3), названа конформером 2.

Цель настоящей работы — сравнить активность двух конформеров феррицитохрома *c*, различающихся природой шестого лиганда гемового железа в реакции восстановления цитохрома *c* молекулой NADH. Восстановление феррицитохрома *c* NADH исследовалось в работе [5] методом абсорбционной спектрофотометрии. Нами применен метод ПМР высокого разрешения.¹

В спектре ПМР NADH (рис. 1, *a*) 2,2-диметил-2-силапентансульфоно-вой-5 кислоты (ДСС) два резонансных сигнала при 8,4 и 8,2 м. д. и сигнал интенсивностью в один протон при 6,9 м. д. отнесены ранее к протонам 8-Н и 2-Н аденинового кольца и 2-Н-протону никотинамидного кольца соответственно, а сигналы в области 6 м. д. — к протонам рибозных колец [6]. Конформация NADH в растворе достаточно стабильна при рН от 5 до 10,6 [7], что позволяет ожидать неизменность спектра ПМР нуклеотида в этой же области рН. В спектре ПМР раствора смеси феррицитохрома *c* с NADH, снятом в аналогичных условиях (рис. 1, *b*), наблюдается

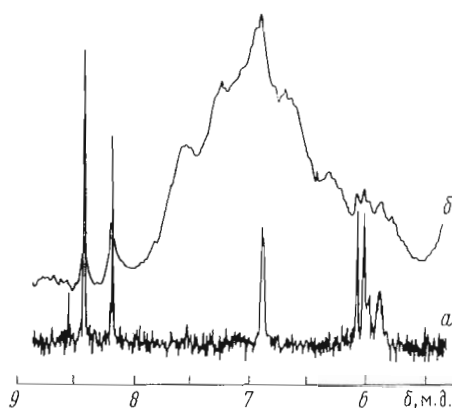


Рис. 1

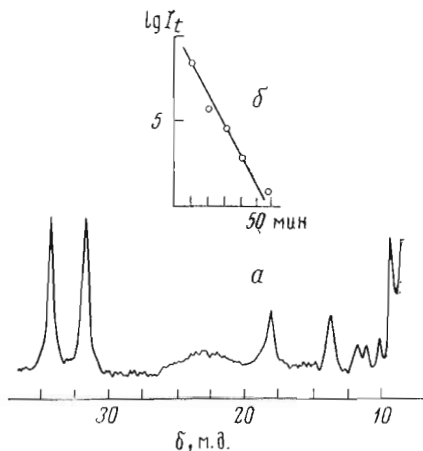


Рис. 2

Рис. 1. Спектры ПМР NADH в D_2O при 90 МГц в области от 6 до 9 м. д. (рD 8): *a* — концентрация нуклеотида 40 мМ, $N = 1000$; *б* — в присутствии феррицитохрома *c*, соотношение концентраций белок — NADH 1 : 1, $N = 3000$

Рис. 2. Спектр ПМР феррицитохрома *c* в D_2O при 90 МГц в области от 10 до 35 м. д. (рD 6,8): *a* — концентрация белка 8 мМ, соотношение концентраций белок — NADH 1 : 7, $N = 3000$; *б* — зависимость I_t сигналов метильных групп гема при 35 и 32 м. д. от времени реакции с NADH

заметное уширение резонансных сигналов нуклеотида в присутствии феррицитохрома *c*, что, по-видимому, связано с образованием комплекса нуклеотида с белком.

В ходе эксперимента наблюдается окисление NADH до NAD и параллельно восстановление феррицитохрома *c*. Это, очевидно, связано с переносом электрона с восстановленной молекулы нуклеотида на трехвалентный ион гемового железа феррицитохрома *c*.

В спектре ПМР феррицитохрома *c* (рис. 2, *a*) сигналы при 35 и 32 м. д., сдвинутые в слабое поле благодаря сверхтонкому взаимодействию ядерных спинов этих групп протонов со спином неспаренного электрона гемового железа, отнесены к протонам кольцевых метильных групп гема [8] и характеризуют нативную конформацию феррицитохрома *c*, в которой шестым лигандом гемового железа является метионин-80. Уменьшение суммарной интегральной интенсивности этих сигналов в зависимости от времени после добавления в раствор белка избытка NADH иллюстрирует рис. 2, *б*. Здесь I_t — суммарная интегральная интенсивность двух контактно сдвинутых сигналов кольцевых метильных групп гема при 35 и 32 м. д. Практически весь феррицитохром *c* восстанавливается за 60 мин. Повышение рD раствора феррицитохрома *c* от 8 до 10,6 приводит к уменьшению I_t сигналов при 35 и 32 м. д. с параллельным ростом I_t сигналов при 24 и 21 м. д. Сдвиг сигналов метильных групп гема при 35 и 32 м. д. в сильное поле к положениям при 24 и 21 м. д. ранее объяснен заменой шестого лиганда гемового железа метионина-80 на более сильный лиганд (возможно, лизин-79), сопровождающейся изменением распределения плотности неспаренного электрона железа на гемовом кольце [9]. На рис. 3, *a* показана область слабого поля в спектре ПМР феррицитохрома *c*. Ход реакции восстановления этого конформера феррицитохрома *c* при добавлении в раствор NADH представлен зависимостью I_t от времени (рис. 3, *б*). Весь феррицитохром *c* в растворе смеси восстанавливается за 120 мин. При рD 9,3 в спектре ПМР феррицитохрома *c* между 24 и 35 м. д. наблюдаются сигналы метильных групп гема обоих конформеров белка (рис. 4, *a*). Ход реакции восстановления смеси двух конформеров цито-

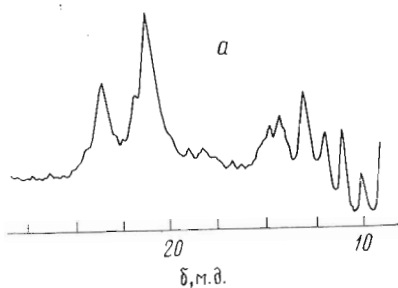
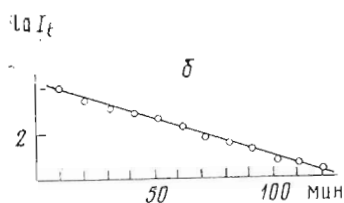


Рис. 3

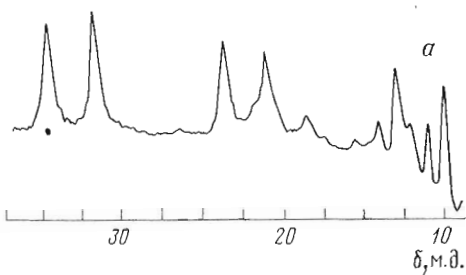
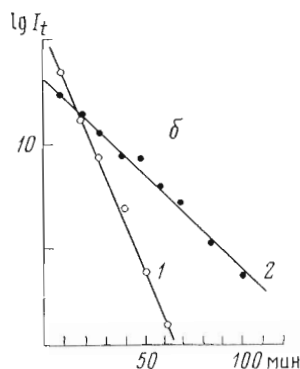


Рис. 4

Рис. 3. Спектр ПМР феррицитохрома *c* в D_2O при 90 МГц в области от 10 до 24 м. д. (рD 9,3): *a* — соотношение концентраций белок — NADH 1 : 5, $N = 3000$; *б* — зависимость I_t сигналов метильных групп гема при 24 и 21 м. д. от времени реакции с NADH

Рис. 4. Спектр ПМР феррицитохрома *c* в D_2O при 90 МГц в области от 10 до 35 м. д. (рD 9,3): *a* — соотношение концентраций белок — NADH 1 : 5, $N = 3000$; *б* — зависимость I_t сигналов метильных групп гема при 35 и 32 (1) и 24 и 21 м. д. (2)

хрома *c* (рис. 4, б) подтверждает, что белок в конформации, характерной для нейтральных значений рD, восстанавливается с большей скоростью, чем в конформации, существующей в растворе при рD 8—10,6. При добавлении KCN к раствору феррицитохрома *c* при рD 7 происходит вытеснение шестого лиганда гемового железа с последующим образованием прочной координационной связи CN^- с железом гемового кольца [10]. При этом в спектре ПМР наблюдается сдвиг сигналов метильных групп гема при 35 и 32 м. д. к 23 и 21 м. д. соответственно. Добавление NADH в раствор CN^- -феррицитохрома *c* в достаточно большом избытке (соотношение концентраций белок: нуклеотид — 1 : 20) не приводит к восстановлению белка при рD от 7 до 10. Полученные результаты свидетельствуют, что природа шестого лиганда гемового железа и его связь с полипептидной цепью белка играют важную роль в реакции восстановления. Замена метионина-80 на другой аминокислотный остаток приводит к уменьшению скорости восстановления феррицитохрома *c* вплоть до полного блокирования восстановления, если шестым лигандом является CN^- и нарушена связь шестого координационного положения гема с полипептидной цепью цитохрома *c*.

К настоящему времени предложено несколько механизмов транспорта электрона в цитохроме *c*. В механизме Диккерсона — Винфилда [11, 12] цитохром *c* восстанавливается посредством свободнорадикальных стадий с участием ароматических остатков тирозина-74 и -67 и триптофана-59. Механизм окисления авторами не рассмотрен. Чанс с сотр. [13] предложили механизм квантовомеханического туннелирования электрона в цитохроме *c*. Детальное теоретическое исследование возможности туннельного транспорта электронов между компонентами цепи электронного переноса проведено в работах [14—16].

Салем с сотр. [3] предложили механизм, в котором восстановление (или окисление) цитохрома *c* осуществляется в результате непосредственного переноса электрона с молекулы восстановителя (или окислителя) на атом железа гемового кольца. Однако ни один из рассматриваемых окислительно-восстановительных механизмов в цитохроме *c* не получил до настоящего времени экспериментального подтверждения.

Наблюдаемое нами уменьшение активности к восстановлению конформера 2 феррицитохрома *c* при щелочных значениях рD 8 [6,10] согласуется с данными по восстановлению цитохрома *c* гидратированными электронами [17], согласно которым конформация феррицитохрома *c* в растворе при рD 6 [8] проявляет большую активность к восстановлению, чем конформация, существующая в растворе при рD 8 [10, 6].

Известно, что в области рD 6—8 гидроксильная группа ароматического кольца тирозина-67 протонирована, что обуславливает существование водородной связи между тирозином-67 и треонином-78 [12]. Изменение рD от 8 до 10 приводит к ионизации гидроксильной группы тирозина-67 [18—20] и соответственно к разрыву водородной связи тирозин-67 — треонин-78 с последующим раскрытием гемовой щели цитохрома *c* [3]. Такая перестройка в структуре белка может повысить доступность молекулы восстановителя к непосредственному взаимодействию с гемом и, таким образом, обусловить непосредственный перенос электрона с молекулы восстановителя на d_{xz} -орбиталь гемового железа.

Исследование селективно дейтерированного и селективно фторированного аналогов цитохрома *c* из дрожжей, проведенное нами ранее [21, 22], показало, что окисление-восстановление белка сопровождается сильным изменением пространственной ориентации ароматических колец. Последнее свидетельствует, что в процессе переноса электрона существенную роль играют ароматические остатки белка.

Сравнивая активности двух конформеров феррицитохрома *c* в реакции восстановления молекулой NADH, можно заключить, что наиболее активно феррицитохром *c* восстанавливается, если шестым лигандом гемового железа является метионин-80. Скорость восстановления уменьшается при замене шестого лиганда и пространственной перестройке ароматических колец в структуре, приводящей к дополнительному раскрытию гемовой щели феррицитохрома *c*. В последнем случае восстановление может происходить при непосредственном взаимодействии молекулы восстановителя с гемовым железом. Очевидно, в CN⁻-феррицитохроме *c* отсутствует необходимая перестройка структуры белка с дополнительным раскрытием гемовой щели, что обуславливает полное блокирование реакции восстановления молекулой NADH.

Экспериментальная часть

Цитохром *c* из сердца свиньи фирмы Bio-Med-Krakow дополнительно очищен по методу [23]. NADH фирмы Reanal использовали без дополнительной очистки. Дополнительное окисление белка осуществляли феррицианидом калия с последующим диализом. Цитохром *c* перед снятием спектров ПМР лиофилизировали из D₂O для обмена лабильных протонов на дейтерий. Значение рD раствора, равное 8; 6,8; 9,3; 10,6, устанавливали добавлением NaOD и DCl и контролировали до и после реакции восстановления. Концентрация белка в водном растворе смеси белок — нуклеотид составляла 8 мМ, а концентрация нуклеотида — 40 мМ. CN⁻-феррицитохром *c* получали добавлением KCN в раствор феррицитохрома *c* с последующим диализом.

Спектры ПМР измеряли на спектрометре НХ-90Е фирмы Bruker-Physik (90 МГц) в режиме фурье-преобразования при 300 К. Число накопленных (*N*) при снятии спектров составляло 1—3000. Химический сдвиг про-

гонов (δ) определяли относительно внутреннего эталона 2,2-диметил-2-силапентансульфоной-5 кислоты.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Theorell H., Akesson A. (1944) *J. Biol. Chem.*, **63**, 1804—1826.
2. Gupta R. K., Koenig S. H. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1134—1143.
3. Salemm F., Krout J., Kamen M. J. (1973) *Biol. Chem.*, **248**, 7701—7716.
4. Sibeldina L. A., Kayushin L. P., Kutyshenko V. P., Lasareva A. V., Bronnikov G. E. (1976) *Studia Biophys.*, **54**, 15—30.
5. Vorking W. P., Cusanovich M. A. (1974) *Photochem. Photobiol.*, **19**, 205—215.
6. Jardetzky O., Norma G. Wade-Jardetzky (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 85—91.
7. Catterall W. A., Hollis D. P., Walter C. F. (1969) *Biochemistry*, **8**, 4032—4036.
8. Wüthrich K. (1970) *Structure and Bonding*, **8**, p. 53.
9. Redfield A. G., Gupta R. K. (1971) *Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol.*, **36**, 405—411.
10. Wüthrich K. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 1071—1078.
11. Winfield M. E. (1965) *J. Mol. Biol.*, **12**, 600—611.
12. Takano T., Kallai O. B., Swanson R., Dickerson R. E. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 5234—5255.
13. Chance B., Devault D., Legallais V., Mela L., Yonetani T. (1967) *Nobel Symposium 5*, pp. 437—468, N. Y.
14. Григоров Л. Н. (1970) Канд. дис., МГУ.
15. Григоров Л. Н., Чернавский Д. С. (1972) *Биофизика*, **17**, 195—200.
16. Бломевфельд Л. А. (1974) *Проблемы биологической физики*, с. 226—235, «Наука», М.
17. Wilting J., Braams R., Nauta H., Karel J. H., Buuren I. P. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **283**, 543—547.
18. Sokolovsky M., Aviram I., Schejter A. (1970) *Biochemistry*, **19**, 5113—5117.
19. Scov K., Hofmann T., Williams G. R. (1969) *Can. J. Biochem.*, **47**, 750—752.
20. Schejter A., Aviram I., Sokolovsky M. (1970) *Biochemistry*, **19**, 5118—5122.
21. Sobeldina L. A. (1975) *Abstr. V Intern. Biophys. Congress, Copenhagen*.
22. Kayushin L. P., Sibeldina L. A., Lasareva A. V., Okon M. S., Kutyshenko V. P. (1975) *Studia Biophys.*, **51**, 221—227.
23. Margoliash E. (1952) *Nature*, **170**, 1014—1020.

Поступила в редакцию
17.V.1976.

THE NMR STUDY OF THE ACTIVITY OF TWO CYTOCHROME *c* CONFORMERS ON REDUCTION BY NADH

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*

^1H -NMR spectroscopy has been used to investigate the activity of the two conformers of ferricytochrome *c*, which differ by the nature of the sixth ligand of heme iron, in the reduction of cytochrome *c* by NADH. It was shown that the conformer with methionine 80 as the sixth ligand (D_2O , pD 6-8) is reduced by the nucleotide at a faster rate than the conformer with a ligand of different character (D_2O , pD 8-10.6). The reduction of ferricytochrome *c* by NADH takes place as a result of complex formation between the protein and nucleotide. CN^- -ferricytochrome *c* is not reduced by the nucleotide in D_2O at pD 5-10. These results support the idea that the nature of the sixth ligand of heme iron and its interaction with the polypeptide chain play an important role in the electron transfer.