

УДК 517.3

А. Е. ЗАКАРЯН, С. Г. ТИРАЦУЯН, Г. А. ПАНОСЯН

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИНДУЦИРОВАННОГО СВОБОДНОГО РАДИКАЛА ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДА С ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ ПЕРЕМЕННОЙ ВАЛЕНТНОСТИ

Исследовались фотохемилюминесценция (ФХЛ) и ЭПР спектры индуцированным светом свободного радикала ФМН.

Показано, что некоторые ионы металлов переменной валентности неоднозначно действуют на уровень фотохемилюминесценции и на ЭПР спектры свободного радикала ФМН. Предполагается, что исследование параметров фотохемилюминесценции и ЭПР спектров ФМН в зависимости от присутствия ионов металлов переменной валентности, встречающихся в флавиновых ферментах, может дать важную информацию о физико-химических основах каталитических процессов, в которых участвуют флавиновые группы, а также о роли белкового компонента в этих процессах.

Рибофлавин и его производные являются переносчиками водорода и электронов в процессах биокаталитического окисления—восстановления. При этом указанные процессы могут сопровождаться образованием семихинонных свободных радикалов. Последние нередко участвуют в механизме ферментативного катализа. Из флавиновых соединений в качестве коферментов служат флавинмононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). При рассмотрении физико-химических и функциональных аспектов этих коферментов важное значение имеет изучение их промежуточных форм, посредством которых и происходит перенос атомов водорода и электронов. Различные стороны данного вопроса были освещены в ряде работ [7—10]. Исследовалась способность флавиновых групп образовывать комплексы как с неорганическими, так и с органическими компонентами клетки. Оказалось, что ионы металлов переменной валентности участвуют в каталитическом механизме ферментативной реакции, осуществляемой флавиновыми коферментами [9, 4]. Флавины взаимодействуют также с некоторыми ароматическими аминокислотами и их производными [1]. Особый интерес представляет изучение способности взаимодействия их с апоферментами и образования фермент-субстратного комплекса. Высказывалось предположение о взаимодействии радикала ФМН с гидрофобными центрами белков [5]. Для решения всех этих вопросов широко применяются физико-химические и физико-химические методы исследования. Особенно хорошо зарекомендовали себя методы ЭПР и хемилюминесценции, позволяющие изучать различные свойства свободного радикала ФМН в триплетном состоянии.

С помощью фотоиндуцированной хемилюминесценции были исследованы как флавиносодержащие ферменты [6], так и флавины [11].

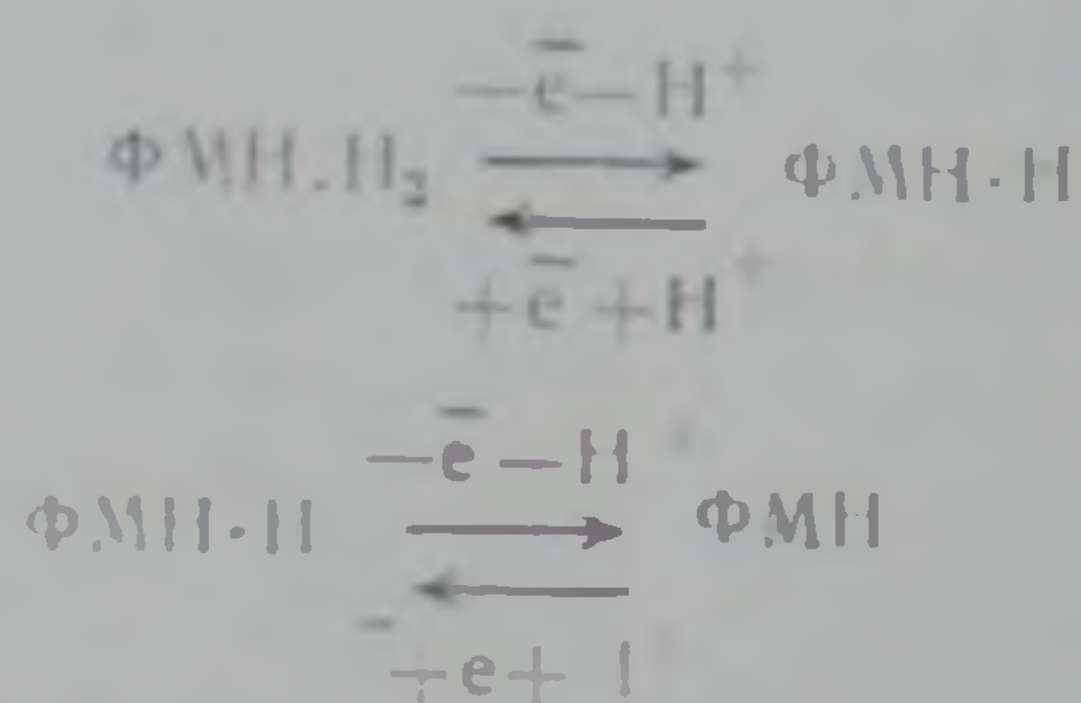
Настоящее сообщение посвящено изучению некоторых аспектов взаимодействия ФМН с ионами металлов переменной валентности методами фотохемилюминесценции и электроннопарамагнитного резонанса.

Материал и методика. В экспериментах использовались ФМН (производство ГДР, трипсин, пепсин (Чехословакия, Спофа), α — нафтол и соли металлов переменной валентности. Растворы готовились на 0.01 М фосфатном буфере (при исследовании ЭПР спектров — на фиксанале).

Исследование фотохемилюминесценции ФМН проводилось на собранной нами квантометрической установке [3], модифицированной в режиме постоянной записи сигнала на электронносамопишущем приборе КСП-4. Индуцирование осуществлялось полным спектром лампы ПРК-4 с открытой поверхности испытуемого образца. Последний с помощью полуавтоматической системы переводился в оптическую кювету, помещенную перед окошком ФЭУ-42.

Спектры ЭПР снимались на модифицированном в лаборатории космической биологии МГУ приборе РЭ-1301. Облучение образца проводилось в кварцевой плоской кювете объемом 1 мл непосредственно в резонаторе сфокусированным светом лампы ДСШ-1000 ($\lambda > 365$ нм). Конечная концентрация ФМН составляла $1 \cdot 10^{-5}$ М. Эксперименты проводились в условиях комнатной температуры без откачки воздуха.

Результаты и обсуждение. Облученный УФ светом ФМН дает фотохемилюминесценцию ФХЛ с затухающей двустадийной кривой (рис. 1). ФХЛ исчезает в присутствии ингибитора свободных радикалов α -нафтола (рис. 1, кр. 2). Возможно, первая, быстрая фаза обусловлена переходом ФМН в триплетновозбужденном состоянии с последующей дезактивацией путем высвечивания кванта света. Вторая, более медленная фаза связана с образованием фотопродуктов семихинонной природы (свободных радикалов), сопровождающимся выделением световой энергии. Это предположение можно обосновать тем, что при облучении ФМН в течение 20 мин и больше кривая послесвечения постепенно сглаживается, переходя в форму кривой второй стадии, а интенсивность начинает падать. При этом можно также допустить известный одноступенчатый протонно-обменный механизм реакции:



Максимальный выход фотохемилюминесценции ФМН наблюдался в слабословных средах (рН 8), когда, действительно, сравнительно легко может произойти процесс депротонизации.

Действие ионов металлов на фотохемилюминесценцию исследовалось в условиях рН 7,2 при их добавлении либо до облучения ФМН, либо сразу после прекращения трехминутного облучения — в момент регистрирования фотохемилюминесценции. В первом случае Fe^{2+} приво-

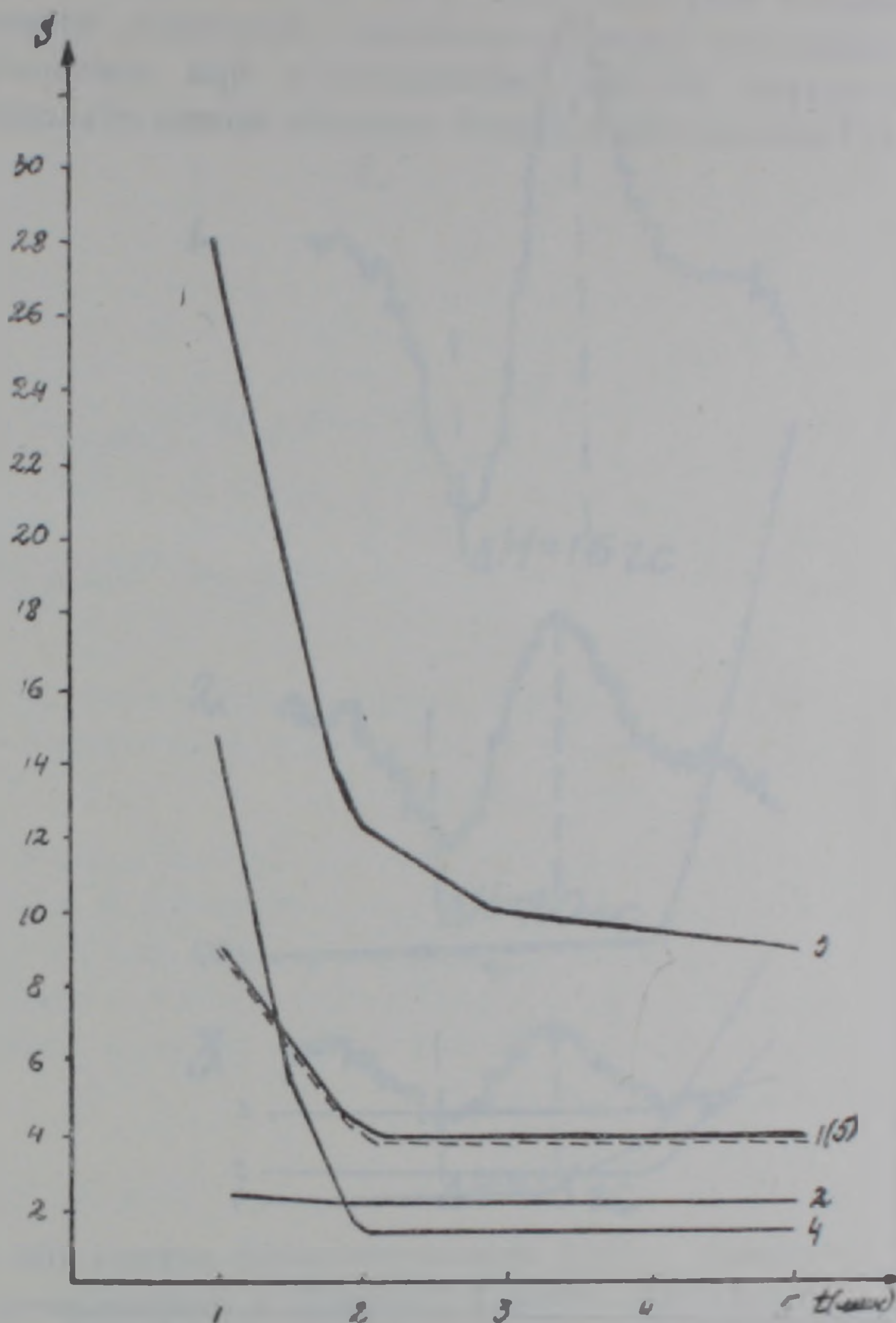
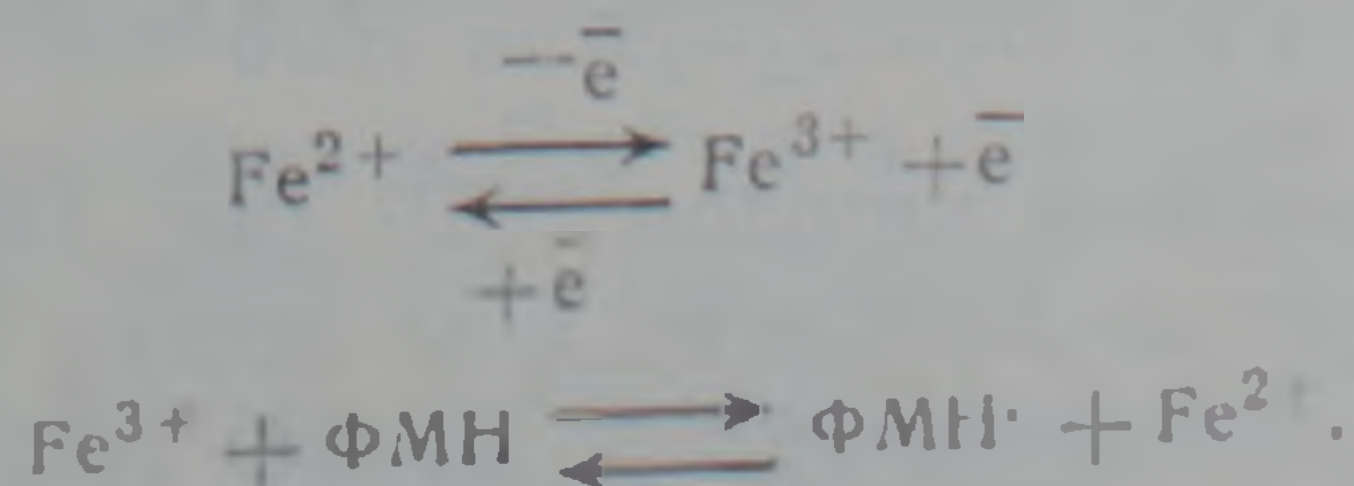


Рис. 1. Кинетика ФХЛ облученных в течение 3-х минут ФМН с ионами металлов переменной валентности и α — нафтола. 1. ФМН (контроль). 2. ФМН + α — нафтол. 3. ФМН + Fe^{2+} . 4. ФМН + Cu^{2+} . 5. ФМН + Fe^{2+} .

дит к увеличению интенсивности свечения (рис. 1, кр. 3) тогда как Fe^{3+} не действует на нее (рис. 1, кр. 5).

В этом случае нами допускается, что при совместном облучении Fe^{2+} с ФМН происходит дальнейшее окисление Fe^{2+} под лучом Fe^{3+} , а последнее, по-видимому, ускоряет реакцию фотохемилюминесценции посредством захвата электронов от ФМН по схеме:



Основанием для такого предположения может служить тот факт, что Fe^{3+} не приводит к изменению интенсивности фотохемилюминесценции (ФХЛ) ни при совместном облучении с ФМН, ни при добавлении его

после прекращения облучения (рис. 2 кр. 5). Во втором случае, т. е. когда Fe^{2+} добавляют после прекращения облучения, интенсивность ФХЛ заметно падает. То же наблюдается и при добавлении Cu^{2+} (рис. 2, кр. 4). Такое снижение уровня свечения можно объяснить обра-

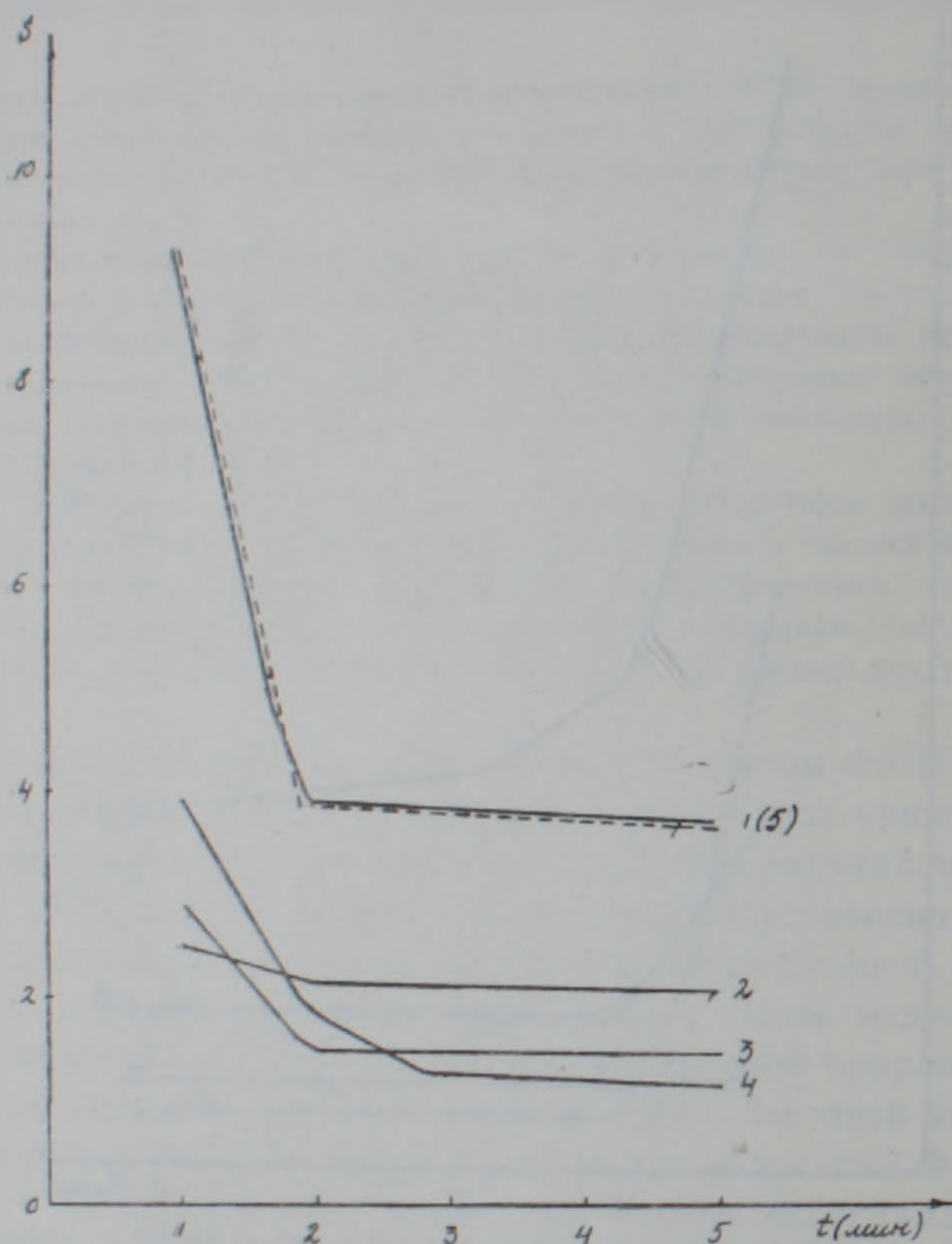


Рис. 2. Кинетика ФХЛ облученного ФМН в присутствии ионов металлов переменной валентности, добавленных после облучения. 1. ФМН (контроль). 2. α — нафтол + ФМН. 3. Fe^{2+} + ФМН. 4. Cu^{2+} + ФМН. 5. Fe^{3+} + ФМН.

зованием комплексных связей между флавином и ионом металла, приводящих к нарушению энергетического режима высвечивания. Вероятно, при этом чем прочнее связь, тем затухание ФХЛ должно быть более наглядным. Так, и в литературе встречаются данные о более прочной связи Cu^{2+} с некоторыми красителями, родственными по строению с флавинами, чем Fe, но эти данные косвенные и не могут быть адекватно интерпретированы.

Результаты, полученные методом ЭПР (рН 1,68), показали, что ионы железа неоднозначно действуют и на сигнал ЭПР свободного радикала ФМН, индуцированного светом $\lambda \geq 360$ нм (рис. 3). Как видим, Fe^{2+} действует на сигнал ЭПР свободного радикала ФМН заметно слабее, чем Fe^{3+} (рис. 3, кр. 2 и 3). Этот факт можно объяснить и более сильно выраженными парамагнитными свойствами Fe^{3+} по сравнению

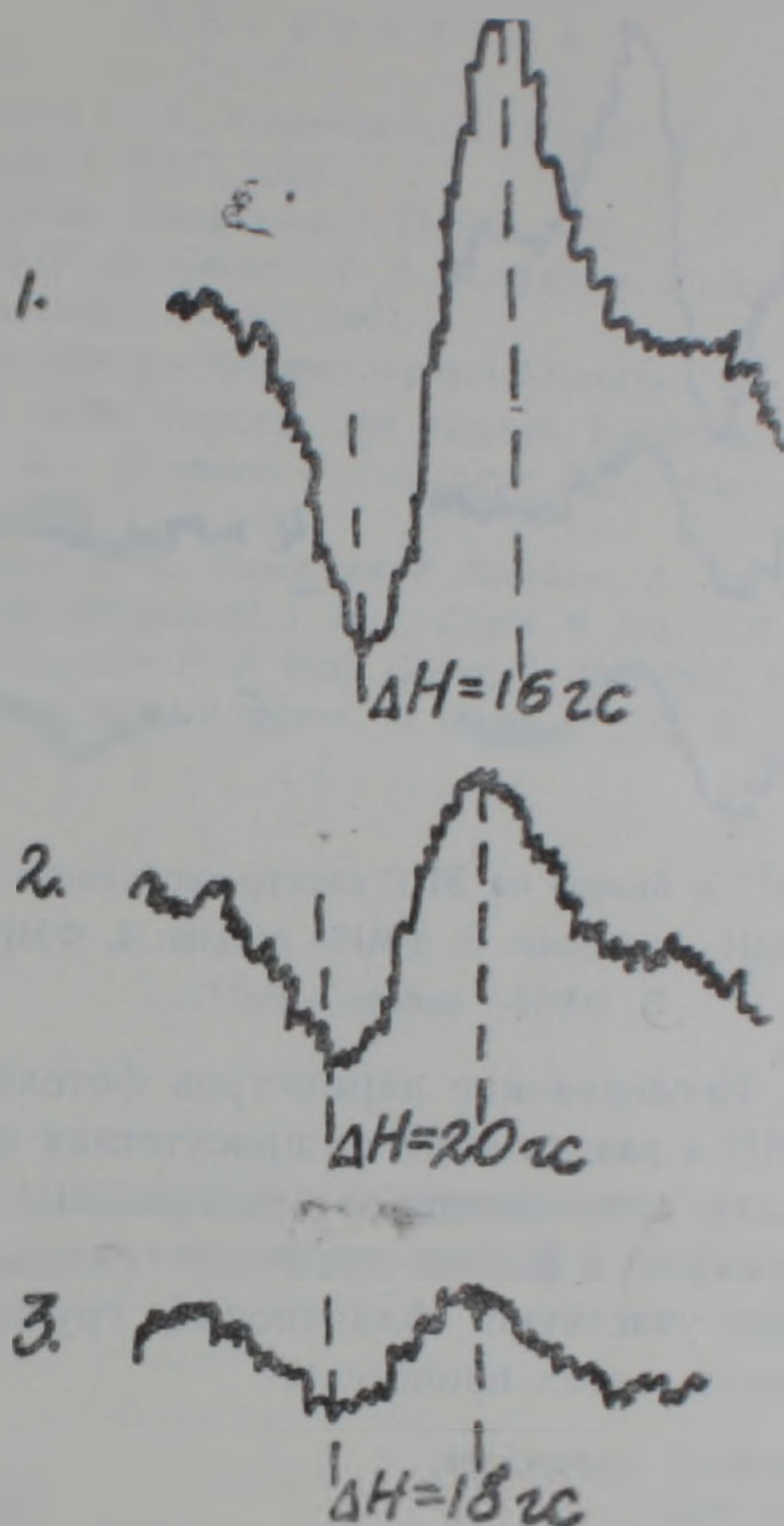


Рис. 3. ЭПР спектры свободного радикала ФМН в присутствии различных ионов металлов. 1. Контроль. 2. ФМН — Fe^{2+} . 3. ФМН — Fe^{3+} .

с Fe^{2+} . Они неоднозначно действуют и на величину полуширины максимального наклона (ΔH) сигнала ЭПР. Так, например, если для ФМН $\Delta H = 16$ Гс, а для Fe^{2+} — 20 Гс, то для Fe^{3+} $\Delta H = 18$ Гс.

Существенным оказался тот факт, что присутствие Fe^{3+} по-разному влияет на взаимодействие белков со свободным радикалом ФМН (рис. 4). Если трипсин и пепсин почти одинаково снижают амплитуду сигнала ЭПР ФМН (рис. 4, кр. 2 и 3), а Fe^{2+} совместно с пепсином почти не приводит к изменению сигнала (рис. 4), то Fe^{3+} в комбинации с трипсином полностью снимает ЭПР сигнал (рис. 4, кр. 5). Такая разница скорее всего может быть интерпретирована более сильным взаимодействием между трипсином и Fe^{3+} и, в конечном счете, их совместным взаимодействием со свободным радикалом ФМН.

Таким образом, исходя из совокупности приведенных экспериментальных данных, можно заключить: исследуемая нами фотохемилюминесценция регистрируется от индуцированного светом свободного радикала ФМН, некоторые ионы металлов переменной валентности неоднозначно действуют как на интенсивность свечения ФМН, так и на ЭПР

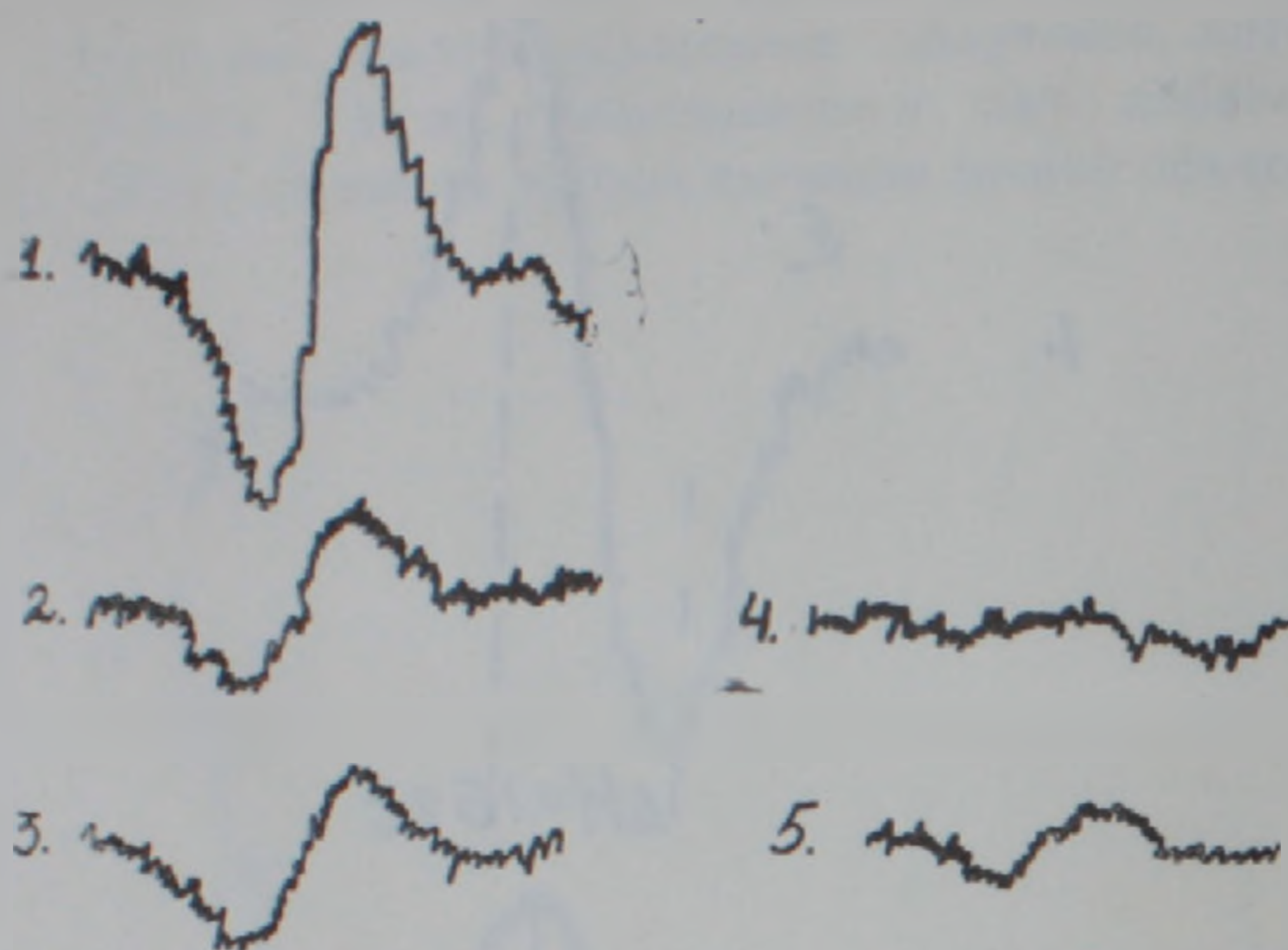


Рис. 4. Действие Fe^{3+} и белков на ЭПР спектр свободного радикала ФМН.

1. Контроль. 2. ФМН — трипсин. 3. ФМН — пепсин. 4. ФМН — трипсин — Fe^{3+} .
5. ФМН — пепсин — Fe^{3+} .

спектр последнего. Исследование параметров фотохемилюминесценции и ЭПР спектра ФМН в зависимости от присутствия ионов металлов переменной валентности, встречающихся в флавиновых ферментах, может дать ценную информацию о физико-химических основах каталитических процессов, в которых участвуют флавиновые группы, а также о роли белкового компонента в этих процессах.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 11.III 1975 г

Ա. Ե. ՋԱԲԱՐՅԱՆ, Ս. Գ. ՏՐԻԱՑՈՒՆՅԱՆ, Գ. Ա. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ԼՈՒՅՍՈՎ ԻՆԴՈՒԿՑՎԱԾ ՖԼԱՎԻՆՄՈՆՈՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴԻ ԱԶԱՏ
ԽԱԴԻԿԱԼԻ ՓՈՓՈԽԱԿԱՆ ՎԱՂԵՆՏԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ ՈՒՆԵՑՈՂ ՄԵՏԱԴ
ԻՈՆՆԵՐԻ ՀԵՏ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտվել է ֆլավինմոնոնուկլեոտիդի (ՖՄՆ) լույսով ինդուկցված ազատ ռադիկալի ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիան և էՊՌ-սպեկտրները: Ցույց է տրված, որ փոփոխական վալենտականություն ունեցող մետաղ իոններից մի քանիսը տարբեր ազդեցություն են ունենում թե ՖՄՆ-ի ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիայի և էՊՌ սպեկտրների վրա:

Ենթադրվում է, որ ՖՄՆ-ի ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիայի և էՊՌ-սպեկտրների պարամետրերի հետազոտությունը՝ կախված այն փոփոխական վալենտականություն ունեցող մետաղ իոնների ազդեցությունից, որոնք հանդիպում են ֆլավինային ֆերմենտներում, կարող են նշանակալի ինֆորմացիա տալ այնպիսի կատալիտիկ պրոցեսների ֆիզիկա-քիմիական մեխանիզմների մասին, որոնցում մասնակցում են ֆլավինային խմբերը և այլն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бреслер С. Е., Васильева Н. Н., Казбеков Э. Н., Носкин Л. А. и Фомичев В. Н. Молекулярная биология, 4, 4, 571, 1970.
2. Вальпант П., Ван де Восст. Биофизика, 1, 17, 965, 1972.
3. Закарян А. Е., Акопян Т. Н., Паносян Г. А. Биофизика, 17, 5, 769, 1972.
4. Замараев К. Н. Биофизика, 12, 5, 810, 1967.
5. Сент-Дьёрдьи А. Введение в субмолекулярную биологию. М., 1964.
6. Arneson Richard M. Arch. Biochem. and Biophys. 2, 136, 352, 1970.
7. Beinert H., Palmer G., Cremona T., Singer T. P. Biochem. Biophys. Res. Comm, 6, 12, 432, 1963.
8. Bray R. C., Malmstrom B. G., Vangered T. Biochem. J., 73, 193, 1959.
9. Bray R. C., Palmer G., Beinert H. J. Biol. Chem, 8, 239, 2657, 1964.
10. Rajagopalan K. V., Handler P. J. Biol. Chem. 8, 239, 2667, 1964.
11. Vorst Albertvande, Sion Sves. Biochem. et Biophys. acta, 3, 238, 117, 1971.