



УДК 577.152.111*16 : 543.422.27

ИССЛЕДОВАНИЕ Т-КАТАЛАЗЫ *THERMUS THERMOPHILUS*
МЕТОДОМ ЭПР

Хангулов С. В., Барынин В. В.*, Мелик-Адамян В. Р.*,
Гребенко А. И.*, Воеводская Н. В., Блюменфельд Л. А.,
Добряков С. Н., Ильясова В. Б.

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва;

*Институт кристаллографии Академии наук СССР, Москва

Методом низкотемпературной ЭПР-спектроскопии показано, что активными центрами Т-каталазы из *Thermus thermophilus* являются биядерные комплексы марганца. Изучены их окислительно-восстановительные превращения и связь этих превращений с ферментативной активностью. При 50—70 К сигнал ЭПР от исходных препаратов представляет собой суперпозицию двух сигналов: 22-компонентного (сигнал А) и 16-компонентного (сигнал С). Показано, что парамагнитные центры, ответственные за появление сигнала А, — это биядерные комплексы ионов марганца: $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$. Парамагнитным является возбужденное состояние этого комплекса с $S = 1$ или 2. Центры ответственные за появление сигнала С, — комплексы ионов марганца, Mn^{3+} ($S = 2$) $\dots Mn^{3+}$ ($S = 3/2$), связанные сильным антиферромагнитным взаимодействием. Обработка исходных препаратов $NH_2OH \cdot HCl$ переводит все центры в состояние $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$ с образованием комплекса $(Mn^{2+} \dots Mn^{2+}) \cdot Cl^-$.

Теоретические спектры, рассчитанные по программе для быстрой реконструкции спектров ЭПР на мини-ЭВМ, хорошо согласуются с экспериментальными.

Каталаза ($H_2O_2 : H_2O_2$ —оксиредуктаза, КФ 1.11.1.6) — фермент, осуществляющий разложение перекиси водорода в клетках живых организмов. Большинство известных каталаз являются гемсодержащими белками [1]. Однако в ряде бактерий были обнаружены каталазы, которые не содержат гем и в отличие от гемовых каталаз не ингибируются цианидом и азидом [2—4]. Из них наиболее изучена марганецсодержащая каталаза из *Lactobacillus plantarum*. Этот белок имеет молекулярную массу 172 000 и состоит из шести нековалентно связанных субъединиц, на каждую из которых приходится 0,8—1,5 атома марганца. Получить спектры ЭПР этого белка в растворе не удалось [5, 6].

Мы исследовали другую негемовую каталазу, которая была выделена из экстремально-термофильной бактерии *Thermus thermophilus* НВ 8 и названа Т-каталазой. Белок отличается уникальной термостабильностью, сохраняя 85% активности при нагревании до 95° С в течение 10 мин, ингибируется азидом натрия и гидроксиламином. Т-каталаза имеет молекулярную массу 210 000 и состоит из шести идентичных субъединиц [7, 8]. Исследование пространственной структуры белка методом рентгеноструктурного анализа показало наличие в каждой субъединице двух близко расположенных ионов металла [8]. В настоящей работе методом ЭПР мы идентифицировали ионы металлов, входящие в состав активного центра, и установили его основные характеристики.

Т-Каталазу выделяли по методике, описанной в работе [7]. Часть экстрактов клеток *Th. thermophilus*, содержащих каталазную активность, была любезно предоставлена нам И. А. Морозовым (ИМБ АН СССР). При этом использовали супернатант клеточного экстракта *Th. thermophilus*, содержащий сульфат аммония в концентрации 50% от насыщения. Процедура получения супернатанта дана в работе [9]. Активность каталазы определяли титриметрически [10]. Спектры ЭПР снимали на спектрометре ЭПР-В, снабженном низкотемпературной приставкой, позволяющей проводить регистрацию спектров в диапазоне 8—100 К. Она пред-

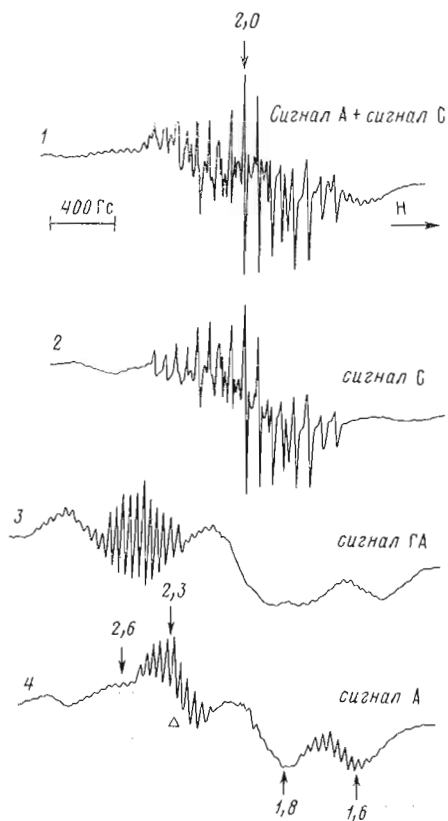


Рис. 1

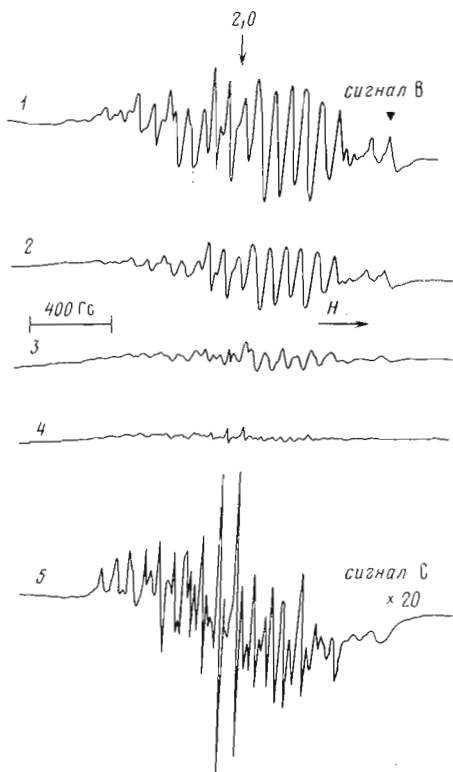


Рис. 2

Рис. 1. Спектры ЭПР Т-каталазы. 1 — раствор белка в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 6,8; 2 — в 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН 5,6; 3 — то же, что (1), но в присутствии 10^{-2} М гидроксиламин; 4 — то же, что (3), но после диализа против 50 мМ К-фосфатного буфера, рН 6,8. Количество белка 2,7 мг/мл, температура регистрации 50 К, мощность микроволнового поля 50 мВт. Цифры над стрелками указывают на значения g -факторов. Треугольником на спектре 4 отмечено положение компоненты, по которой строилась температурная зависимость сигнала А (см. рис. 5)

Рис. 2. Зависимость сигнала В от температуры регистрации. 1 — 12; 2 — 27; 3 — 38, 4 — 50, 5 — 50 К, но усиление увеличено в 20 раз. Мощность микроволнового поля 50 мВт. Препарат представляет собой мелкокристаллический осадок белка, выделенного с использованием трис-НСI-буфера, в 1,5 М сульфате аммония. Треугольником на спектре 1 помечено положение компоненты, по которой строилась температурная зависимость сигнала В (см. рис. 3).

ставляет собой модификацию приставки, предложенной в работе [11]. Исследуемые образцы помещали в цилиндрические ампулы с внутренним диаметром 4 мм, высота заполнения не превышала 7 мм.

Амплитуда высокочастотной модуляции — 5 Гс. Моделирование проводили на мини-ЭВМ по программе быстрой реконструкции анизотропных спектров, основанной на асимптотической оценке в окрестности критических точек при условии, что ширина линии много меньше параметров анизотропии спектров ЭПР [12].

В исходных препаратах Т-каталазы, полученных с использованием К-фосфатного буфера, при температуре 8—100 К наблюдали многокомпонентный сигнал ЭПР (рис. 1, 1). Понижение рН до 1,5—2,0 сопровождалось исчезновением многокомпонентного сигнала и появлением интенсивного 6-компонентного сигнала, характерного для ионов Mn^{2+} в растворе. В связи с этим мы предположили, что ионами металла, входящими в состав Т-каталазы, являются ионы Mn, которые и отвечают за появление многокомпонентного сигнала.

Парамагнитные центры, ответственные за возникновение многокомпонентного сигнала ЭПР, связаны с белком. Действительно, при обработке исследуемого белка 1,5 М раствором сульфата аммония при 4° С сигнал

ЭПР осадка приблизительно на порядок превышал сигнал маточного раствора. Многокомпонентный сигнал ЭПР маточного раствора обусловлен остаточной растворимостью исследуемого белка в растворе сульфата аммония. Ионы марганца, входящие в состав комплексов, прочно связаны с белковой глобулой. Обработка препаратов Т-каталазы таким комплексобразующим агентом, как EDTA (10^{-2} М), не приводила к изменению формы и интенсивности сигнала ЭПР. Высвобождение ионов марганца происходило лишь при денатурации белка. Так, при понижении pH от 7,0 до 4,5 образец остается прозрачным, появления 6-компонентного сигнала не наблюдается. При дальнейшем понижении pH происходит все возрастающее помутнение образца, вызванное денатурацией белка; по мере увеличения мутности растет 6-компонентный сигнал и соответственно падает интенсивность многокомпонентного сигнала ЭПР.

Форма многокомпонентного сигнала ЭПР варьирует от опыта к опыту в зависимости от процедуры выделения и может меняться при различных физико-химических воздействиях. Например, при использовании Na-ацетатного буфера наблюдается 16-компонентный сигнал (сигнал С) (рис. 1, 2). Обработка препаратов Т-каталазы гидроксиламином (10^{-2} М) — агентом, ингибирующим ферментативную активность, — приводила к появлению нового сигнала — сигнала ГА (рис. 1, 3). Последующий диализ против К-фосфатного буфера восстанавливал ферментативную активность Т-каталазы. В результате такой обработки сигнал ГА, обусловленный «неактивной» формой Т-каталазы, исчезал, а вместо него возникал новый сигнал — А (рис. 1, 4). Оказалось, что многокомпонентные сигналы ЭПР, наблюдаемые при 50—70 К в исходных препаратах (рис. 1, 1), представляют собой суперпозицию сигналов А и С.

Сигнал А. Для сигнала А характерно наличие четырех широких пиков с g -факторами 2,6; 2,3; 1,8 и 1,6 и двух групп линий сверхтонкой структуры. Расстояние между центрами групп составляет ~ 1040 Гс, среднее расстояние между линиями внутри каждой группы ~ 45 Гс, ширина отдельной линии сверхтонкой структуры ~ 22 Гс. В каждой группе можно выделить по 11 наиболее интенсивных линий и ряд спутников.

Сигнал С. Характерной особенностью сигнала С является наличие основных 16 компонент (9-я и 10-я компоненты спектра значительно превышают по интенсивности остальные, 12-я компонента расщеплена). Среднее расстояние между компонентами составляет 73 Гс, ширина отдельной компоненты («от пика до пика») ~ 10 Гс.

При понижении температуры регистрации до 8—15 К наблюдается появление еще одного сигнала — 18-компонентного сигнала В. Подбирая мощность микроволнового поля (достаточно большую) и температуру регистрации (достаточно низкую), можно получить сигнал В почти в чистом виде (рис. 2, 1).

Сигнал В. Для сигнала В среднее расстояние между компонентами в центральной части спектра составляет ~ 80 Гс, ширина отдельной компоненты ~ 30 Гс. На рис. 2 показано, как меняется общий вид спектра при повышении температуры от 12 до 50 К. При низкой температуре (12 К) общий вид спектра определяется почти исключительно сигналом В. При 27 К спектр представляет собой суперпозицию сигналов В и С. Дальнейшее повышение температуры до 50 К приводит к практически полному исчезновению сигнала В. С повышением температуры амплитуда сигнала В падает быстрее, чем $1/T$ (рис. 3), тогда как температурная зависимость сигнала С в отсутствие насыщения хорошо аппроксимируется законом Кюри, т. е. амплитуда сигнала пропорциональна $1/T$. Такое различие в температурных зависимостях сигналов В и С обеспечивает возможность надежной регистрации сигнала В, несмотря на то что компоненты сигналов В и С частично перекрываются.

Согласно рентгеновским данным [8], в активном центре белка имеются два близко расположенных иона металла. Это обстоятельство, а также наличие многокомпонентной структуры сигналов А, В и С позволяет предположить наличие сильного обменного взаимодействия между ионами марганца. В рамках этого предположения могут быть интерпретиро-

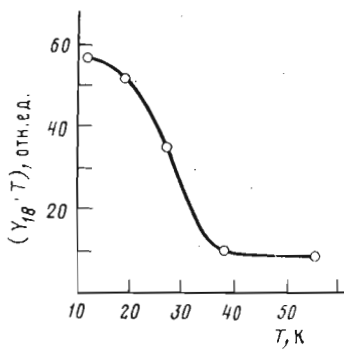


Рис. 3

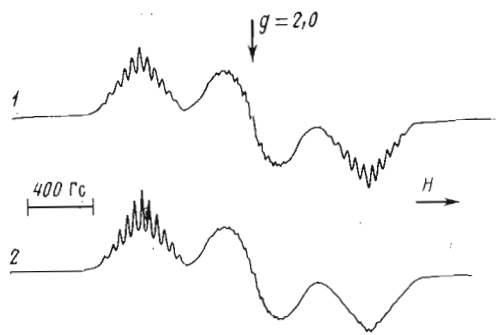


Рис. 4

Рис. 3. Температурная зависимость интегральной интенсивности сигнала В в отсутствие насыщения. Оценку интегральной интенсивности проводили по произведению $V_{18} \cdot T$, где T — температура регистрации, V_{18} — амплитуда 18-й компоненты сигнала В. Положение 18-й компоненты сигнала В отмечено на рис. 2, 1 треугольником

Рис. 4. Теоретические спектры сигналов А (1) и ГА (2) для частицы со спином $S = 2$ (аналогичные спектры можно получить и для частицы со спином $S = 1$); $D = 600$ Гс, $E = 192,5$ Гс, $A_1 = A_2 = 40$ Гс, $I_1 = I_2 = 5/2$, ширина индивидуальной линии 22 Гс; $g_x = g_y = g_z = 2,000$ (1) и $g_x = g_y = 2,000$, $g_z = 1,994$ (2)

ваны наблюдаемые нами сигналы А, В и С. Дальнейшее рассмотрение мы будем проводить, следуя в основном работе [13].

Легко показать, что спин-гамильтониан двух ионов, связанных сильным обменным взаимодействием ($|J| \gg h\nu$),

$$H = \beta \vec{H} (g_1 \vec{S}_1 + g_2 \vec{S}_2) + A_1' \vec{I}_1 \vec{S}_1 + A_2' \vec{I}_2 \vec{S}_2 + J \vec{S}_1 \vec{S}_2 \quad (1)$$

может быть сведен к спин-гамильтониану

$$H = \beta \vec{H} g \vec{S} + (A_1 \vec{I}_1 + A_2 \vec{I}_2) \vec{S} + J \vec{S}_1 \vec{S}_2, \quad (2)$$

где $g = [g_1 (\vec{S}_1 \vec{S}) + g_2 (\vec{S}_2 \vec{S})] / S^2$; A_i ($i = 1, 2$) = $A_i' (\vec{S} \vec{S}_i) / S^2$;

$$\vec{S} = \vec{S}_1 + \vec{S}_2 \quad (3)$$

(β — магнетон Бора, \vec{H} — внешнее магнитное поле, g_1 и g_2 — g -факторы первого и второго ионов в изолированном состоянии, g — g -фактор биядерного комплекса, \vec{S}_1 и \vec{S}_2 — спины первого и второго ионов в изолированном состоянии, \vec{S} — спин биядерного комплекса ($\vec{S} = \vec{S}_1 + \vec{S}_2$), A_1' и A_2' — константы сверхтонкой структуры (СТС) первого и второго ионов в изолированном состоянии, A_1 и A_2 — эффективные константы СТС, описывающие сверхтонкое взаимодействие спина S с первым и вторым ядрами ионов марганца (ядерные спины соответственно I_1 и I_2), J — обменный интеграл, $h\nu$ — энергия кванта микроволнового поля).

В общем случае ионы, входящие в состав биядерного комплекса, не являются, как это предполагалось при выводе выражения (3), сферически симметричными частицами; влияние лигандов сказывается на появлении у отдельных ионов тонкой структуры уровней, которая определяется параметрами, характеризующими компоненты кристаллического поля лигандов. Кроме того, между ионами существует диполь-дипольное взаимодействие. Учет этих факторов приводит к тому, что спин-гамильтониан (3) должен быть дополнен членами, которые характеризуют аксиальное (D) и ромбическое (E) искажение биядерного комплекса

$$H_{\text{в}} = \beta g \vec{H} \vec{S} + (A_1 \vec{I}_1 + A_2 \vec{I}_2) \vec{S} + D [S_z^2 - 1/3 S(S+1)] + E (S_x^2 - S_y^2). \quad (4)$$

Член $J \vec{S}_1 \vec{S}_2$ опущен, так как влияет лишь на сдвиг уровней с одним и тем же значением S , но не на характер их расщепления.

Сигнал А. Характерные особенности сигнала А нам удалось моделировать, предполагая, что магнитные свойства двух близко расположенных

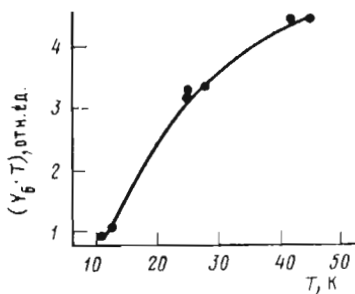


Рис. 5. Температурная зависимость интегральной интенсивности сигнала А в отсутствие насыщения. Оценку интегральной интенсивности сигнала А проводили по произведению $Y_6 \cdot T$, где T — температура регистрации, Y_6 — амплитуда 6-й компоненты сигнала А. Положение 6-й компоненты сигнала А отмечено на рис. 1, 4 треугольником

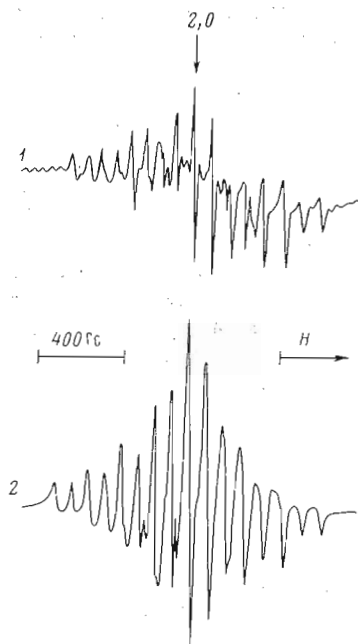


Рис. 6. Моделирование формы сигнала С. 1 — сигнал С, условия регистрации как на рис. 1, 2; 2 — теоретический спектр для частицы с $S = 1/2$, $g = 2,0$, $A_{x1} = A_{y1} = 80$ Гс, $A_{z1} = 74$ Гс, $A_{x2} = A_{y2} = 156$ Гс, $A_{z2} = 140$ Гс, $J_1 = J_2 = 5/2$; ширина линий между точками максимального наклона 20 Гс

ионов марганца в молекуле Т-каталазы могут быть описаны в рамках спин-гамильтониана (4) с константами СТС $A_1 = A_2 = 40$ Гс и со спином $S = 1$ или 2 (рис. 4, 1). В рамках предложенной модели равенство $|A_1/A_2| \cong 1$ выполняется лишь в том случае, когда состояние с $S = 1, 2$ и т. д. возникает за счет спаривания одинаковых спинов, т. е. $S_1 = S_2$. Рассчитанные по эффективным константам СТС A_1 и A_2 , константы СТС A_1' и A_2' близки к 80 Гс, т. е. к константам СТС изолированных ионов Mn. Сигнал А обусловлен, таким образом, состоянием с целочисленным спином, которое возникает за счет обменного взаимодействия двух ионов, находящихся в одинаковом спиновом состоянии $S_1 = S_2$.

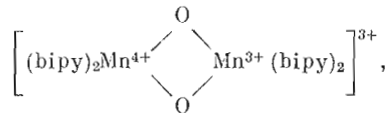
При $J > 0$ (антиферромагнитное спаривание) основным состоянием такого комплекса является состояние с $S = 0$ (непарамагнитное состояние), а состояния с $S = 1, 2, \dots$ являются возбужденными. Мы полагаем, что за появление сигнала А ответственно возбужденное состояние такого комплекса с $S = 1$ или 2. Доказательством этого является аномальный характер температурной зависимости сигнала А — с понижением температуры от 70 до 10 К интегральная интенсивность сигнала в отсутствие насыщения падала (рис. 5).

Так как сигнал А при восстановлении препаратов дитионитом увеличивается, то за появление сигнала могут быть ответственны лишь центры двух типов: Mn^{2+} ($S = 5/2$)... Mn^{2+} ($S = 5/2$) и Mn^{3+} ($S = 2$)... Mn^{3+} ($S = 2$). Исследование спектрофотометрическими методами показало, что центрами, ответственными за появление сигнала А, являются комплексы Mn^{2+} ... Mn^{2+} . Действительно, исходные препараты Т-каталазы имеют слегка розоватую окраску, спектры поглощения похожи на спектры поглощения марганецсодержащей супероксиддисмутазы из *Escherichia coli*, в которой ионы Mn находятся в состоянии Mn^{3+} [14, 15]. Обработка препаратов Т-каталазы гидроксиламином с последующим диализом против

К-фосфатного буфера (остается только сигнал А) приводила к обесцвечиванию препаратов и к исчезновению полос поглощения, характерных для Mn^{3+} ($\lambda = 500$ нм). В связи с этим мы предполагаем, что комплексы $Mn^{3+} \dots Mn^{3+}$ не могут быть ответственны за возникновение сигнала А. Ионы Mn^{2+} , связанные обменным взаимодействием, могут давать сигнал, сходный по своим параметрам с сигналом А. Так, в препаратах енолазы дрожжей (этот фермент имеет два близко расположенных центра связывания ионов Mn) при избытке $MnCl_2$ наблюдался сигнал типа сигнала А [16].

Сигнал В. Теоретическое рассмотрение [17] показало, что биядерные комплексы марганца Mn^{2+} ($S = 5/2$) \dots Mn^{3+} ($S = 2$), связанные сильным обменным взаимодействием, могут приводить к появлению 18-компонентного сигнала, сходного по своим параметрам с сигналом В.

Сигнал С. Параметры сигнала С весьма близки к параметрам сигнала ЭПР марганецсодержащего димера



где (bipy) — 2,2-дипиридил [13, 17]. В работе [17] показано, что магнитные свойства этого комплекса хорошо описываются спин-гамильтонианом (4) для состояния с эффективными константами A_1 и A_2 , равными соответственно 167 и 79 Гс.

Характерные особенности сигнала С (наличие основных 16 компонент, асимметрия крайних линий, 9-я и 10-я компоненты превосходят по интенсивности остальные компоненты спектра) нам удалось смоделировать, предположив, что за появление сигнала С ответственно состояние со спином $S = 1/2$ и константами СТС $A_{x1} = A_{y1} = 156$ Гс, $A_{z1} = 140$ Гс и $A_{x2} = A_{y2} = 80$ Гс, $A_{z2} = 74$ Гс (рис. 6).

В рамках предложенной модели равенство $|A_1/A_2| \cong 2$ выполняется лишь в том случае, когда состояние с $S = 1/2$ возникает за счет спаривания спинов $S_1 = 2$ и $S_2 = 3/2$. Рассчитанные по эффективным константам A_1 и A_2 , константы СТС A_1' и A_2' близки к 80 Гс, т. е. к константам СТС, характерным для изолированных ионов марганца. Сигнал С обусловлен, таким образом, состоянием со спином $S = 1/2$, которое возникает за счет антиферромагнитного взаимодействия двух ионов Mn со спинами $S_1 = 2$ и $S_2 = 3/2$. Такими могут быть комплексы Mn^{2+} ($S = 3/2$) \dots Mn^{3+} ($S = 2$) и Mn^{3+} ($S = 2$) \dots Mn^{4+} ($S = 3/2$). Мы полагаем, однако, что сигнал С обусловлен комплексами $Mn^{3+} \dots Mn^{4+}$, так как состояние с $S = 3/2$ нетипично для большинства комплексов Mn^{2+} .

Ферментативная активность Т-каталазы обусловлена именно теми ионами марганца, которые ответственны за появление сигналов А, В и С. Так, после обработки исследуемого белка гидроксиламином ферментативная активность белка падала на 99%. При этом сигналы А, В и С исчезали и возникал новый сигнал — ГА (рис. 1, 3). После диализа против К-фосфатного буфера ферментативная активность восстанавливалась, сигнал ГА исчезал и возникал сигнал А (рис. 1, 4). Эти эксперименты говорят о том, что обработка гидроксиламином приводит к восстановлению центров, ответственных за возникновение сигналов В и С ($Mn^{3+} \dots Mn^{4+}$) до состояния $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$ (сигнал А). При избытке гидроксилamina образуется комплекс $(Mn^{2+} \dots Mn^{2+}) \cdot NH_2OH$, ответственный за сигнал ГА. Моделирование спектров показало, что в случае сигнала ГА мы действительно имеем дело (как и в случае сигнала А) с сигналом от комплексов типа $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$. Из сопоставления спектров на рис. 1, 3 и 4 видно, что основное различие сигналов А и ГА состоит в том, что у последнего не появляется высокопольная группа линий. «Смазывание» высокопольных линий СТС может быть объяснено небольшой анизотропией g -фактора в комплексе $(Mn^{2+} \dots Mn^{2+}) \cdot Cl^-$ (рис. 4, 2).

В последнее время интерес к биядерным комплексам марганца значительно возрос, так как существуют весьма веские основания предполагать,

что такие комплексы принимают участие в реакциях фотосинтетического разложения воды. Сигнал ЭПР, близкий по своим характеристикам к сигналу С, наблюдался в хлоропластах и субхлоропластных частицах, обогащенных фотосистемой 2 [17—19]. Характерный отклик этого сигнала на режим освещения, т. е. зависимость амплитуды от числа вспышек, которыми освещались образцы непосредственно перед замораживанием, позволили авторам выдвинуть предположение, что центр, ответственный за появление этого сигнала, принимает участие в фотосинтетическом разложении воды. Возможность участия биядерных комплексов Mn в фотосинтетическом разложении воды широко обсуждалась и ранее в ряде модельных и теоретических исследований [20, 21].

Специфичность формы многокомпонентных сигналов ЭПР Т-катализатора, присутствие в образцах значительного количества ионов Mn, рентгеновские данные, свидетельствующие о наличии в каждом мономере белка двух близко расположенных ионов металла, позволили нам сделать вывод, что наблюдаемые сигналы ЭПР обусловлены биядерными комплексами марганца. Удалось установить природу парамагнитных центров, приводящих к появлению таких сигналов. Для сигнала А такими центрами являются биядерные комплексы ионов марганца $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$, для сигнала С — комплексы $Mn^{3+} \dots Mn^{4+}$.

В настоящее время мы не располагаем данными, которые позволили бы нам установить валентное состояние ионов марганца в центрах, приводящих к появлению сигнала В. Так как этот сигнал исчезает при восстановлении препаратов гидроксиламином, можно думать, что парамагнитными центрами, ответственными за появление сигнала В, являются реакционные центры Т-катализатора либо в состоянии $Mn^{2+} \dots Mn^{3+}$, либо в состоянии $Mn^{3+} \dots Mn^{4+}$ (в последнем случае предполагается, что центры $Mn^{3+} \dots Mn^{4+}$ могут находиться в двух состояниях: одно из них приводит к появлению сигнала С, другое — к появлению сигнала В). Гидроксиламин восстанавливает все центры до состояния $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$ с образованием комплекса $(Mn^{2+} \dots Mn^{2+}) \cdot Cl^-$. Опыты с препаратами, обработанными гидроксиламином, свидетельствуют также о том, что биядерные комплексы Mn являются активными центрами Т-катализатора.

Наиболее интересный вопрос, который вытекает из настоящего исследования, состоит в том, использовала ли природа одну и ту же заготовку, т. е. биядерный комплекс марганца, для выполнения различных биологических функций: в фотосинтетических объектах для разложения воды, а в бактериях *Th. thermophilus* — для разложения перекиси.

Мы благодарим сотрудников лаборатории физической химии биополимеров ИХФ АН СССР Д. Ш. Бурбаева и М. Г. Гольдфельда за участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Неорганическая биохимия/Ред. Эйхорн Г. М.: Мир, 1978, т. 2, с. 316.
2. Delwich E. A. J. Bacteriol., 1961, v. 81, p. 416—418.
3. Johnston M. A., Delwich E. A. J. Bacteriol., 1962, v. 83, p. 936—938.
4. Jones D., Deibel R. H., Niven C. F. J. Bacteriol., 1964, v. 88, p. 602—610.
5. Kono Y., Fridovich I. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 10, p. 6015—6019.
6. Kono Y., Fridovich I. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 22, p. 13646—13648.
7. Барышин В. В., Гребенко А. И. Докл. АН СССР, 1986, т. 286, № 2, с. 461—464.
8. Vainshtein B. K., Melik-Adamian V. R., Baryunin V. V., Vagin A. A. In: Progress in bioorganic chemistry and molecular biology/Ed. Ovchinnikov Yu. A. Amsterdam—New York—Oxford: Elsevier Sci. Publ., 1984, p. 117—132.
9. Морозов И. А., Гамбарян А. С., Венкстери Т. В. Молекуляр. биология, 1984, т. 18, № 4, с. 1046—1051.
10. Herbert D. Meth. Enzymol., 1955, v. 2, p. 784—788.
11. Асатуриян Р. А., Черняк И. В., Нехорошев Н. С., Кузьев А. П., Муромцев В. И. Приборы и техника эксперимента, 1968, № 6, с. 203—204.
12. Добряков С. П., Ильясова В. Б., Россоленко Т. В., Каюшин Л. П. Алгоритмы и программы, 1985, т. 1, № 64, с. 75.
13. Cooper S. R., Dismukes G. C., Klein M. R., Calvin M. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 23, p. 7248—7252.

14. Keele B. B., McCord J. M., Fridovich I. J. *Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 22, p. 6176—6181.
15. Villafranca J. J., Yost F. J., Fridovich I. J. *Biol. Chem.*, 1974, v. 249, № 8, p. 3532—3536.
16. Chien J. C. W., Westhead E. W. *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 17, p. 3198—3203.
17. Dismukes G. C., Siderer Y. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 1, p. 274—278.
18. Hansson O., Andreasson L.-E. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 679, № 2, p. 261—268.
19. Damocles R., Dismukes G. *FEBS Lett.*, 1984, v. 174, № 1, p. 157—161.
20. Джабиев Т. С., Шилов А. Е. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 2, с. 503—514.
21. Шафирович В. А., Ханнанов Н. К., Шилов А. Е. Кинетика и катализ, 1978, т. 19, № 6, с. 1498.

Поступила в редакцию
12.VIII.1985.
После доработки
11.XI.1985.

EPR STUDY OF T-CATALASE FROM *THERMUS THERMOPHILUS*

KHANGULOV S. V., BARYNIN V. V.*, MELIK-ADAMYAN V. R.*,
GREBENKO A. I.*, VOEVODSKAYA N. V., BLUMENFELD L. A.,
DOBRYAKOV S. N., IL'YASOVA V. B.

*Institute of Chemical Physics and *Institute of Crystallography,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Using low-temperature electron paramagnetic resonance (EPR) measurements, it has been found that the active centers in the T-catalase from *Thermus thermophilus* are formed by the binuclear complexes of manganese. Redox transformations of these centers and their relation to the enzymatic activity have been studied. At 50—70K, the EPR spectra of the initial preparations are the superposition of two signals, the 22-component signal A and 16-component signal C. It is shown that paramagnetic centers responsible for the formation of signal A are the binuclear complexes $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$ which are paramagnetic in excited state with S equal 1 or 2. Signal C is due to the complexes $Mn^{3+} (S = 2) \dots Mn^{4+} (S = 3/2)$ with a strong antiferromagnetic interaction. Treatment of the initial samples with $NH_2OH \cdot HCl$ transforms all the centers into the $Mn^{2+} \dots Mn^{2+}$ state with the formation of $(Mn^{2+} \dots Mn^{2+}) (Cl^-)$ complexes. Theoretical spectra calculated on a mini-computer using a program for rapid spectra simulation show a good agreement with the experimental EPR data.