



УДК 577.158.52+535.372

СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ В ОБЛАСТИ АКТИВНОГО
ЦЕНТРА ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ХРЕНА И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗИ
С КАТАЛИТИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
РЕАКЦИИ

[Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В.]

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии*

Методами флуоресцентной спектроскопии изучено взаимодействие безметалло-го аналога пероксидазы – комплекса протопорфирин – апопероксидаза с различными субстратами пероксидазы (I^- , $Fe(CN)_6^{4-}$). Показано, что группа с pK 4, 3, определенная ранее в пероксидазе различными кинетическими и физико-химическими методами, существенно влияет на конформационную подвижность белковых фрагментов в области активного центра: протонирование этой группы приводит к уменьшению частоты и увеличению амплитуды колебаний. Этот процесс, по-видимому, определяет взаимодействие малых молекул с порфириновым кольцом. Бимолекулярная константа тушения флуоресценции порфирина в комплексе с апобелком ионами I^- при изменении pH изменяется аналогично бимолекулярной константе скорости реакции соединения E_2 пероксидазы с I^- . Предложен механизм окисления I^- соединением E_2 , в соответствии с которым для протекания реакции необходимо перекрывание электронных волновых функций субстрата и порфиринового кольца. Этот процесс в широком диапазоне pH контролируется ионной группой с pK 4, 3, которая, по-видимому, является протонированным остатком

тема.

Фермент-субстратные взаимодействия играют важную роль в ферментативном катализе. Образование фермент-субстратного комплекса типа Михаэлиса – Ментен в ряде случаев рассматривается как причина каталитического ускорения [1–5]. Согласно общепринятой точке зрения, белок – это структура, обладающая конформационной подвижностью. Нативному состоянию белка может соответствовать несколько близких по энергии конформаций, между которыми возможен быстрый переход [3]. Фермент-субстратные взаимодействия могут приводить к предпочтительному отбору одной из конформаций и, таким образом, к конформационному переходу в белке. Эти предположения являются основой теории индуцированного соответствия [1] и в какой-то мере теории «дыбы» [2]. Собственные частоты флуктуаций конформаций белка, по-видимому, должны оказывать существенное влияние на каталитические параметры: стадией, определяющей скорость реакции, может стать появление необходимой конформации белка, и в таком случае в белке должны существовать частоты флуктуации конформаций, эквивалентные числу оборотов ферментативной реакции [6].

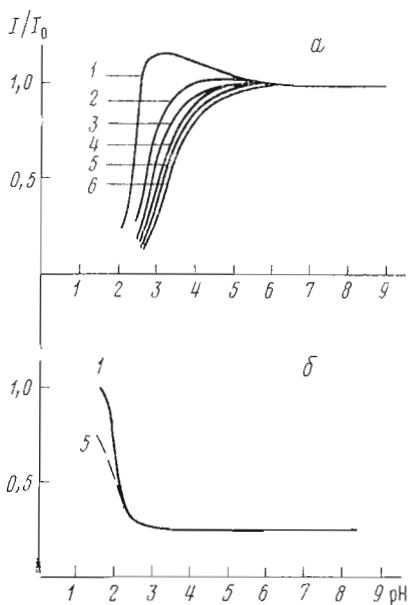


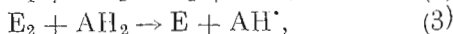
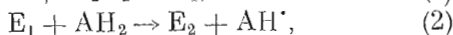
Рис. 1. pH-зависимость флуоресценции порфирина (а) и триптофана (б) в комплексе H_2Por -апоНRP-C в присутствии различных концентраций тушителя (KI). [KI], mM: 1 — 0; 2 — 5,9; 3 — 11,8; 4 — 17,6; 5 — 23,3; 6 — 29. а — возбуждение 400 нм, флуоресценция 628 нм, 5 mM фталат. б — возбуждение 290 нм, флуоресценция 340 нм

динационную связь с железом гема [10, 11].

Для выяснения природы взаимодействия отрицательно заряженных субстратов с пероксидазой из хрена мы использовали безметалльный аналог пероксидазы — специфический комплекс протопорфирин — апопероксидаза (H_2Por -апоНRP-C), третичная структура которого близка к структуре нативного фермента [12]. В отличие от нативной пероксидазы этот комплекс обладает сильной флуоресценцией в красной области. Флуоресцентная спектроскопия является исключительно информативным методом при изучении микроокружения и локализации хромофоров, конформационных переходов и конформационной подвижности в белках [13–15]. Исследуемый в данном случае хромофор — протопорфирин IX — неотъемлемая часть активного центра пероксидазы, не содержащая других групп, что могло бы приводить к различиям в структуре и свойствах между модельным и нативным ферментом. Более того, один из субстратов пероксидазы, I^- , широко используется как тушитель флуоресценции при выяснении локализации белковых хромофоров [14].

В настоящей работе мы исследовали спектрально-люминесцентные свойства комплекса H_2Por -апоНRP-C в диапазоне pH 2–6 и изучили влияющие субстратов пероксидазы — тушителей флуоресценции I^- , $Fe(CN)_6^{4-}$ — на pH-зависимость флуоресценции комплекса. В области pH 3–6 в спектрах поглощения комплекса не наблюдается каких-либо изменений [17], в то время как интенсивность флуоресценции увеличивается на 18% при уменьшении pH от 6 до 3,3 (рис. 1, 1). При этом время жизни молекулы порфирина в возбужденном состоянии и форма спектра флуоресценции не меняются (табл. 1), что свидетельствует о наличии статического компонента в тушении флуоресценции при pH больше 3,3 [18]. Обработка

Пероксидаза из хрена является двух-субстратным ферментом, схему действия которого можно представить следующим образом:



где E_1 и E_2 — промежуточные соединения фермента, в которых железо находится в высокоокисленном состоянии [7], AN_2 — субстрат, донор водорода. Изучение стадий 2 и 3 для ряда субстратов методами быстрой кинетики показало, что это бимолекулярные реакции [8–10], для объяснения которых не требуется предположения об образовании фермент-субстратного комплекса. Изученные реакции с I^- , NO_2^- , SO_3^{2-} , $Fe(CN)_6^{4-}$ имеют одну отличительную особенность: $k_{кат}$ для стадий 2 и 3 в широком диапазоне pH в координатах $\lg k_{кат}$ от pH имеет вид прямой с тангенсом угла наклона -1 . Попытки объяснить такую pH-зависимость простым изменением эффективной концентрации отрицательно заряженного субстрата при изменении заряда белковой глобулы не приводят к успеху [11]. Эта pH-зависимость была объяснена влиянием группы с $pK \sim 0$, которой может быть имидазол гистидина, образующий коор-

Таблица 1

Времена жизни
молекулы порфирина
в возбужденном
состоянии
в комплексе
H₂Por-апоНRP-С при
различных рН
Буфер — 5 мМ
Na-фосфат

| рН | τ, нс |
|-----|-------|
| 7,8 | 16,7 |
| 3,7 | 16,5 |
| 2,3 | 11,6 |

кривой рН-зависимости флуоресценции комплекса H₂Por-апоНRP-С в диапазоне рН 3,3—6,0 по уравнению

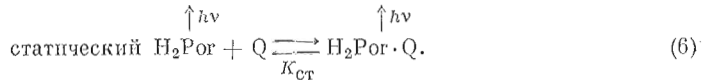
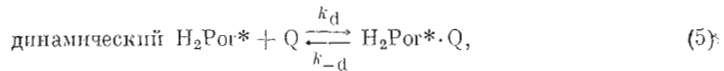
$$\left(\lg \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I - I_{\min}} - 1 \right) = n \text{ рН} - \text{рК} \quad (4)$$

(I_{макс}, I_{мин}, I — интенсивности флуоресценции при рН 3,3; 6,0 и в промежуточной точке соответственно, n — число присоединяемых протонов) показывает, что изменение флуоресценции может быть описано влиянием присоединения одного протона к комплексу H₂Por-апоНRP-С с рК 4,3. Эта величина рК близка к ранее определенным рК группы активного центра пероксидазы, которая влияет на взаимодействие фермента с H₂O₂ [19] и на процессы комплексообразования пероксидазы с ионами CN⁻, F⁻ [8, 20].

Методом ЯМР для нативной пероксидазы также было показано существование группы с рК 4,2 [21]. Это значение рК рядом авторов приписывается одному из пропионовокислых остатков гема [8, 21]. Как показывают модельные опыты с порфирином, солибилизированным положительно заряженными мицеллами бромистого цетилтриметиламмония, рК пропионовокислого остатка, находящегося в поверхностном слое мицеллы, составляет 4,5 [22]. Учитывая, что в этой области рН молекула пероксидазы также имеет в целом положительный заряд [23], значение рК 4,2—4,3 для нативной пероксидазы и для комплекса H₂Por-апоНRP-С вполне обоснованно может быть отнесено к пропионовокислому остатку порфиринового макроцикла. По-видимому, этот остаток находится в поверхностном слое, и его протонирование существенно изменяет флуоресценцию порфирина в комплексе H₂Por-апоНRP-С.

Увеличение квантового выхода флуоресценции при изменении рН от 6,0 до 3,3 без изменения спектров поглощения и флуоресценции и времени жизни порфирина в возбужденном состоянии может объясняться прежде всего конформационными изменениями в ферменте, которые контролируются группой с рК 4,3. Наличие статического компонента в тушении флуоресценции порфирина в комплексе H₂Por-апоНRP-С, на что указывает неизменность времени жизни порфирина в возбужденном состоянии, позволяет детализировать природу этого конформационного перехода.

Механизм динамического, или диффузионного, и статического типов тушения можно представить следующим образом:

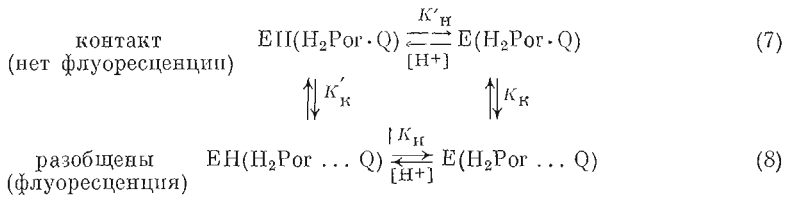


Здесь звездочка означает возбужденную молекулу, Q — тушитель флуоресценции, K_{ст} — константа равновесия образования комплекса в возбужденном состоянии. Для большинства изученных внутрибелковых тушителей флуоресценции характерен механизм переноса заряда [15], требующий перекрывания электронных волновых функций хромофора и тушителя. Образующийся комплекс H₂Por*·Q не флуоресцирует при той длине волны, где флуоресцирует H₂Por*. Поэтому, если комплекс H₂Por*·Q образуется только по пути 6, время жизни H₂Por в возбужденном состоянии не изменяется, в то время как квантовый выход флуоресценции уменьшается [18]. Если же комплекс H₂Por*·Q образуется только по пути 5, то наблюдается динамический тип тушения, при котором время жизни в возбужденном состоянии изменяется параллельно изменению

Константы Штерна – Фольмера тушения
флуоресценции порфирина различными солями
в 5 мМ Na₂HPO₄, рН 8,0

| Тушитель | К, М ⁻¹ | Тушитель | К, М ⁻¹ |
|----------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|
| KI | 22,4±1,2 | NaCl | 1,0±0,4 |
| CsCl | 16,3±1,1 | K ₄ [Fe(CN) ₆] | 25,2±0,7 |

квантового выхода [18]. По-видимому, при рН 6 существуют по крайней мере два близких по энергии конформационных состояния белка. В одном из конформеров тушитель, который входит в состав белка (сера метионина или дисульфидной связи, карбоксилат-ион и т. д. [15]), вступает в контакт с порфириновым макроциклом и тушит его флуоресценцию. Это соответствует пути б, т. е. статическому типу тушения. В другом конформере белковый тушитель и порфириновый макроцикл пространственно разобщены. Схематически это можно изобразить следующим образом:



Здесь E обозначает белковую матрицу, EH — ее протонированную форму, Q — внутрибелковый тушитель, контактирующий с порфириновым макроциклом в конформерах EH(H₂Por·Q) и E(H₂Por·Q), которые, следовательно, не флуоресцируют. Флуоресцируют только конформеры EH(H₂Por...Q) и E(H₂Por...Q), где порфириновый макроцикл и тушитель Q разобщены, K_K' и K_K — константы конформационных равновесий, K_H' и K_H — константы протонирования соответствующих форм. Время жизни каждого из конформеров EH(H₂Por·Q), E(H₂Por·Q), EH(H₂Por...Q) и E(H₂Por...Q) должно быть существенно больше времени жизни молекулы порфирина в возбужденном состоянии, т. е. иметь величину порядка микросекунд или более. Увеличение квантового выхода при изменении рН от 6,0 до 3,3 означает увеличение вероятности появления конформера EH(H₂Por...Q), в котором порфириновый макроцикл и тушитель разобщены. Следовательно, величины констант конформационных равновесий, K_K и K_K', должны различаться (K_K' > K_K).

Для дальнейшей детализации природы конформационного перехода мы исследовали влияние тушителей — неорганических ионов I⁻, Cl⁻, Cs⁺, [Fe(CN)₆]⁴⁻ — на кривые спектрофлуориметрического титрования комплекса H₂Por-апоНRP-С. При рН 6,0 ионы I⁻ не тушат флуоресценцию комплекса, хотя молекула белка имеет положительный заряд [23] и электростатическое взаимодействие белка с I⁻-ионами должно благоприятствовать тушению флуоресценции. Ионы Cs⁺ в водных растворах тушат флуоресценцию протопорфирина IX приблизительно с той же эффективностью, что и ионы I⁻ (табл. 2), но не тушат флуоресценцию комплекса H₂Por-апоНRP-С. Поэтому влияние локального отрицательного заряда на процесс тушения также исключено. Следовательно, при рН, близких к нейтральным, порфириновый макроцикл в комплексе H₂Por-апоНRP-С стерически недоступен малым молекулам из водного раствора в конформере E(H₂Por...Q). При рН < 5 ионы I⁻ начинают эффективно тушить флуоресценцию протопорфирина в комплексе H₂Por-апоНRP-С, причем эффективность тушения возрастает по мере уменьшения рН (рис. 1а) и, следовательно, по мере увеличения вероятности появления конформера

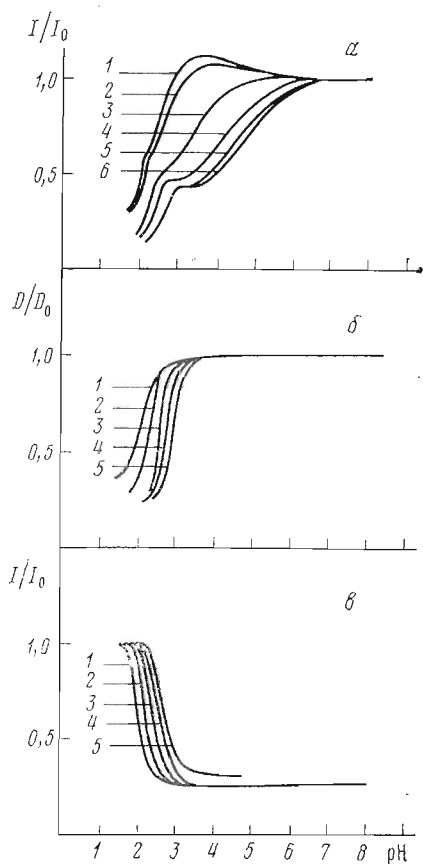


Рис. 2

Рис. 2. Влияние NaCl на спектрально-люминесцентные свойства комплекса H_2Por -апоHRP-C при различных pH в 5 мМ Na_2HPO_4 : а — pH-зависимость флуоресценции порфирина, возбуждение 400 нм, флуоресценция 628 нм; б — pH-зависимость оптической плотности на полосе Soret, 400 нм; в — pH-зависимость флуоресценции триптофана, возбуждение 290 нм, флуоресценция 340 нм. [NaCl], M: 1 — 0; 2 — 0,01; 3 — 0,1; 4 — 0,4; 5 — 0,8; 6 — 1

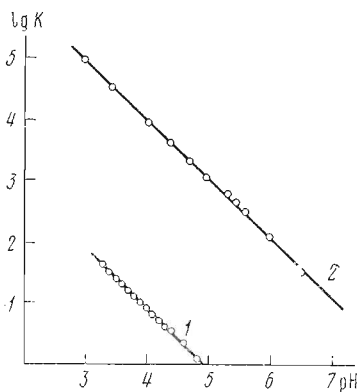


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость логарифма константы Штерна — Фольмера (1), бимолекулярной константы скорости реакции окисления I^- соединением E_2 пероксидазы по данным работы [10] (2) от pH

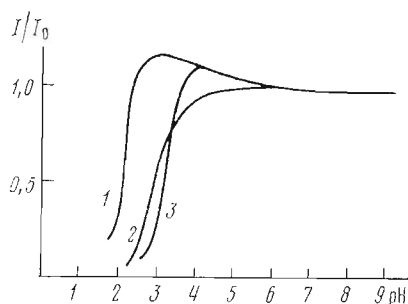


Рис. 4

Рис. 4. Влияние размеров тушающего иона на pH-зависимость флуоресценции порфирина в комплексе H_2Por -апоHRP-C при одинаковой концентрации тушителей (17,6 мМ) в отсутствие тушителя (1), в присутствии KI (2), $K_4[Fe(CN)_6]$ (3)

($EH(H_2Por \dots Q)$) с разобщенными белковым тушителем и порфирином. Можно предположить, что конформер $EH(H_2Por \dots Q)$ является более «рыхлым» по своей структуре, чем конформер $EH(H_2Por \dots Q)$ и малые молекулы тушителя I^- за время жизни молекулы порфирина в возбужденном состоянии успевают продиффундировать на большую глубину внутрь белка и потушить флуоресценцию порфирина.

Разрыхление структуры может быть либо общим разрыхлением структуры всей белковой глобулы, либо локальным разрыхлением в области активного центра. Опыты по тушению флуоресценции другого хромофора комплекса H_2Por -апоHRP-C — остатка триптофана — ионами I^- показывают, что заметное увеличение тушения его флуоресценции наблюдается только при $pH < 3$ (рис. 16), когда действительно происходит общее разупорядочивание структуры белковой глобулы [12]. Таким образом, при $pH < 5$ происходит локальное разрыхление структуры белка в гемсвязи-

вающей области, а при $pH < 3$ наблюдается общее разрыхление белковой глобулы. Двухступенчатый характер разрыхления структуры белка пероксидазы при понижении pH наиболее наглядно проявляется при тушении флуоресценции порфирина в комплексе H_2Por -апоНRP-C ионами Cl^- (рис. 2а). Ионы Cl^- являются слабыми тушителями флуоресценции протопорфирина (табл. 2) и практически не тушат флуоресценцию остатков триптофана в белках [24]. Увеличение концентрации ионов Cl^- практически не влияет на спектры поглощения комплекса H_2Por -апоНRP-C и pH -зависимость оптической плотности на полосе $Soret$ в диапазоне pH 3–6 (рис. 2б), на pH -зависимость флуоресценции остатка триптофана в том же диапазоне pH (рис. 2в), что свидетельствует о малом влиянии высоких концентраций $NaCl$ на белок в исследуемом диапазоне pH . Однако флуоресценция порфирина в комплексе H_2Por -апоНRP-C эффективно тушится ионами Cl^- , причем на pH -зависимости интенсивности флуоресценции четко проявляются две ступеньки: при pH 3–6 — тушение, связанное с локальным, а при $pH < 3$ — с общим разрыхлением белковой глобулы пероксидазы. Такая двухстадийность также проявляется и в нативной пероксидазе. Взаимодействие с H_2O_2 [19], комплексообразование с различными лигандами помимо группы с pK 3,9–4,2 обнаруживают также группу с pK 2,9–3,1 [7, 19–20].

Количественно тушение флуоресценции порфирина I^- -ионами в комплексе H_2Por -апоНRP-C можно охарактеризовать константой тушения Штерна — Фольмера, которая была рассчитана при различных pH из зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации I^- -ионов по уравнению

$$I_0/I = 1 + K_{эфф}[I^-]. \quad (9)$$

Зависимость логарифма константы Штерна — Фольмера от pH в интервале pH 3–5 для тушения I^- -ионами имеет вид прямой с тангенсом угла наклона -1 (рис. 3). Учитывая, что для процессов тушения, контролируемых диффузией (а тушение флуоресценции порфирина I^- -ионами относится именно к таким процессам), константа Штерна — Фольмера с точностью до множителя пропорциональна числу столкновений между хромофором и тушителем, можно утверждать, что в диапазоне pH 3–5 логарифм числа столкновений I^- с порфириновым макроциклом линейно зависит от pH с тангенсом угла наклона -1 . Именно таким образом $\lg k_{кат}$ для реакций 2 и 3 зависит от pH (рис. 3), причем обе эти реакции бимолекулярны [10, 11], т. е. зависят от числа столкновений. Следовательно, можно утверждать, что для окисления I^- пероксидазой необходимо перекрывание электронных волновых функций I^- и порфиринового макроцикла пероксидазы.

Для того чтобы понять природу линейной зависимости $\lg K_{эфф}$ от pH , необходимо проанализировать конкретную модель. Определяемая на опыте константа Штерна — Фольмера является эффективной величиной ($K_{эфф}$), и ее изменение при изменении pH определяется в первую очередь изменением в зависимости от pH вероятности реализации различных conformаций белковой глобулы, где порфирин доступен или недоступен для молекул тушителя (см. уравнения 8, 7). Если предположить, что тушение I^- происходит только при взаимодействии с протонированными молекулами комплекса H_2Por -апоНRP-C, причем процесс протонирования описывается уравнением 8 с pK 4,3, то интенсивность флуоресценции порфирина в комплексе H_2Por -апоНRP-C в отсутствие тушителя можно выразить таким образом:

$$I_0 = \frac{\left(1 + \frac{1}{K_K}\right) I_{мин} + \left(1 + \frac{1}{K'_K}\right) I_{макс} \frac{[H^+]}{K_H}}{1 + \frac{1}{K_K} + \left(1 + \frac{1}{K'_K}\right) \frac{[H^+]}{K_H}}. \quad (10)$$

Так как тушение наблюдается только для формы $\text{EH}(\text{H}_2\text{Por} \dots \text{Q})$, уравнение 10 в присутствии тушителя приобретает вид

$$I = \frac{\left(1 + \frac{1}{K_{\text{K}}}\right) I_{\text{мин}} + \left(1 + \frac{1}{K'_{\text{K}}}\right) I_{\text{макс}} \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{H}}} \cdot \frac{1}{1 + K[J^-]}}{1 + \frac{1}{K_{\text{K}}} + \left(1 + \frac{1}{K'_{\text{K}}}\right) \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{H}}}}, \quad (11)$$

где K — истинная константа Штерна — Фольмера для конформера $\text{EH}(\text{H}_2\text{Por} \dots \text{Q})$, а отношение I_0/I выражается уравнением

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{K[J^-]}{1 + \frac{I_{\text{мин}}}{I_{\text{макс}}} \cdot \frac{(K_{\text{K}} + 1) K'_{\text{K}}}{(K'_{\text{K}} + 1) K_{\text{K}}} \cdot \frac{K_{\text{H}}}{[\text{H}^+]} (1 + K[J^-])}. \quad (12)$$

Учитывая, что $\frac{I_{\text{макс}}}{I_{\text{мин}}} = \frac{(K_{\text{K}} + 1) K'_{\text{K}}}{K_{\text{K}} (K'_{\text{K}} + 1)}$, уравнение 12 можно преобразовать

к виду

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{K[J^-]}{1 + \frac{K_{\text{H}}}{[\text{H}^+]} (1 + K[J^-])}. \quad (13)$$

Следовательно, $K_{\text{эфф}}$ из уравнения 9

$$K_{\text{эфф}} = \frac{K}{1 + \frac{K_{\text{H}}}{[\text{H}^+]} (1 + K[J^-])} \quad (14)$$

в принятой нами модели не является величиной, независимой от концентрации тушителя, однако если ограничиться областью малых концентраций тушителя, когда $K[J^-] \ll 1$, то

$$K_{\text{эфф}} = \frac{K}{1 + \frac{K_{\text{H}}}{[\text{H}^+]}}. \quad (15)$$

Пренебрежение слагаемым $K[J^-]$ в знаменателе выражения 14 при используемых нами концентрациях I^- приводит к ошибке в определении $K_{\text{эфф}}$, не превышающей 10–15% в диапазоне pH 3–6. Поэтому такое упрощение вполне оправданно. При $[\text{H}^+] \ll K_{\text{H}}$

$$\lg K_{\text{эфф}} = \lg \frac{K}{K_{\text{H}}} - \text{pH}, \quad (16)$$

т. е. при pH, близких к нейтральным, логарифм числа столкновений линейно зависит от pH с тангенсом угла наклона -1 . Однако в области pH, близкой к pK, при выбранной нами модели должно наблюдаться существенное отклонение $\lg K_{\text{эфф}}$ от линейности. Следовательно, pH-зависимость $\lg K_{\text{эфф}}$ может быть объяснена либо тем, что нами неверно выбрана модель (схемы 8 и 7) и доступность порфирина малым молекулам из раствора контролируется не группой с pK 4,3, а группой с pK, близким к 0 [9, 10], либо тем, что, начиная с определенного pH, должно изменяться K в уравнении 15. В рамках схем 8 и 7 зависимость K от pH может быть определена из уравнения

$$\frac{I}{I_0 - I} = \left(1 + \frac{K'_{\text{H}}}{[\text{H}^+]}\right) \cdot \frac{1}{K} \cdot \frac{1}{[J^-]} + \frac{K_{\text{H}}}{[\text{H}^+]}. \quad (17)$$

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что в соответствии с моделью 8 и 7 в диапазоне pH 5,0–4,6 должны существовать значительные стерические затруднения при тушении флуоресценции ионами I^- : константа Штерна — Фольмера тушения флуоресценции комплекса составляет

Зависимость констант Штерна – Фольмера, вычисленных по уравнениям 9 и 14, от рН

| рН | $K_{эфф}$ из ур-ния 9 | $lg K_{эфф}$ из ур-ния 9 | K из ур-ния 14 | $lg K$ | рН | $K_{эфф}$ из ур-ния 9 | $lg K_{эфф}$ из ур-ния 9 | K из ур-ния 14 | $lg K$ |
|-----|-----------------------|--------------------------|------------------|--------|-----|-----------------------|--------------------------|------------------|--------|
| 5,0 | 0,44 | -0,35 | 8,19 | 0,91 | 3,9 | 10,78 | 1,03 | — | — |
| 4,8 | 1,16 | 0,064 | 7,24 | 0,86 | 3,8 | 13,51 | 1,13 | 18,5 | 1,27 |
| 4,6 | 2,17 | 0,336 | 7,79 | 0,89 | 3,7 | 17,1 | 1,23 | — | — |
| 4,4 | 3,45 | 0,538 | 8,87 | 0,95 | 3,6 | 20,9 | 1,32 | 25,4 | 1,40 |
| 4,3 | 3,98 | 0,6 | — | — | 3,5 | 26,69 | 1,43 | — | — |
| 4,2 | 5,34 | 0,73 | 10,38 | 1,02 | 3,4 | 33,8 | 1,53 | 39,29 | 1,59 |
| 4,1 | 6,54 | 0,82 | — | — | 3,3 | 44,38 | 1,65 | — | — |
| 4,0 | 8,64 | 0,94 | 13,65 | 1,14 | | | | | |

$8 M^{-1}$ по сравнению с $22 M^{-1}$ для не связанного с белком порфирина (табл. 2). Начиная с рН 4,4 стерические затруднения должны постепенно уменьшаться. Если это действительно так, можно подобрать такой тушитель, который в силу своих размеров начнет эффективно тушить флуоресценцию порфирина при $pH < 4,4$, когда уменьшатся стерические затруднения. Иодид-ион начинает эффективно тушить флуоресценцию порфирина начиная с рН 5,8 (рис. 4, 2), в то время как ферроцианид — с рН 4,2 (рис. 4, 3). Для оценки размеров иона ферроцианида и иодида мы использовали параметр a максимального сближения ионов из уравнения Дебая — Хюккеля: для ферроцианида он составляет 5 \AA , а для иодид-иона 3 \AA [25]. Следовательно, опыты по тушению флуоресценции ферроцианид-ионом свидетельствуют в пользу схем 8 и 7 с первоначально затрудненным стерически контактом объемного тушителя и хромофора. Снятие стерических затруднений для тушения в конформере $EH(H_2Por \dots Q)$ начиная с рН 4,4 означает, что его структура не постоянна, а изменяется, и должно быть по крайней мере еще одно значение pK , близкое к 4,3, но не регистрируемое нами спектрально. Из кривых титрования водородных ионов в пероксидазе [23] следует, что в диапазоне рН 3–5 в белке ионизируются 16 карбоксильных групп с характеристическим pK 4,5. По-видимому, протонирование некоторых из этих групп и приводит к снятию стерических затруднений при тушении.

Анализ полученных данных позволяет конкретизировать природу конформационного перехода в области рН 3–5. Если в белке существует колебание белковых фрагментов друг относительно друга с определенной частотой и амплитудой, то положения, соответствующие крайним точкам амплитуды (или точкам поворота), можно рассматривать как два конформационных состояния, так как в течение периода колебания большую часть времени колеблющиеся фрагменты проводят вблизи этих точек, а переход от одной точки к другой происходит достаточно быстро. По-видимому, именно такой процесс существует в пероксидазе при нейтральных рН и конформеры $E(H_2Por \cdot Q)$ и $E(H_2Por \dots Q)$, между которыми, как было показано выше, возможен быстрый переход, соответствующий двум крайним точкам колебания. Протонирование комплекса H_2Por -апоHRP-C приводит к увеличению доли конформера $EH(H_2Por \dots Q)$ ($K'_K > K_K$) с разобценными внутрибелковым тушителем и порфириновым макроциклом.

Уменьшение частоты колебаний при протонировании комплекса H_2Por -апоHRP-C приводит к тому, что за время жизни конформера $EH(H_2Por \dots Q)$, который можно рассматривать как раскрытую конформацию (рис. 5б) или «рыхлую», малые молекулы тушителя I^- успевают продиффундировать на значительную глубину внутрь белка и потушить флуоресценцию порфирина. А у раскрытой конформации $E(H_2Por \dots Q)$, время жизни которой, естественно, меньше, чем у конформера $EH(H_2Por \dots Q)$,

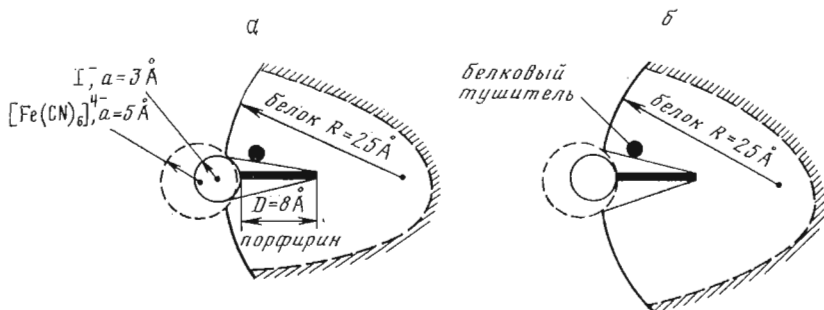


Рис. 5. Влияние амплитуды колебаний в области активного центра на взаимодействие порфирина с малыми молекулами из водного раствора. *а* — амплитуда мала, и только малые молекулы I^- контактируют с порфириновым кольцом; для больших молекул $[Fe(CN)_6]^{4-}$ существуют стерические затруднения; *б* — амплитуда достаточно велика, и оба типа молекул могут контактировать с порфириновым циклом

так как частоты выше, малые молекулы не успевают продиффундировать на достаточную глубину внутрь белка и не тушат флуоресценцию порфирина. Уменьшение стерических затруднений для тушения ионами I^- начиная с рН 4,4 связано с увеличением амплитуды колебаний белковых фрагментов вблизи молекулы порфирина. На увеличение амплитуды указывает и тушение ионами ферроцианида, которое начинается только после снятия стерических затруднений. Физическая природа уменьшения частоты колебаний и увеличения амплитуды связана с увеличением при понижении рН электростатической свободной энергии белка. При уменьшении рН от 5 до 3 суммарный заряд пероксидазы возрастает от +5 до +16 [23]. Расчет по приближенному уравнению для электростатической свободной энергии перепроницаемых для растворителя глобулярных белков [26] показывает, что электростатическая свободная энергия белка при этом возрастает от 1,2 до 12,2 ккал/моль. Радиус белка пероксидазы принимается равным 25 Å [11, 23, 26].

Таким образом, согласно полученным данным, в широком диапазоне рН в пероксидазе существует конформационная подвижность в области активного центра, т. е. колебание белковых фрагментов вблизи молекулы порфирина. Увеличение подвижности белковых фрагментов при понижении рН связано с увеличением электростатической свободной энергии белка. Наиболее существенное влияние на конформационную подвижность оказывает протонирование ряда карбоксильных групп с характеристическим рК, близким к 4,5. Среди этих карбоксильных групп особое значение имеет группа с рК 4,3, протонирование которой приводит к качественным изменениям в характере колебаний белковых фрагментов, что в свою очередь делает возможным контакт малых молекул субстрата с порфириновым макроциклом. Эта группа, по-видимому, является пропировокислым остатком порфиринового кольца.

Конформеры $E(H_2Por \cdot Q)$, $EH(H_2Por \cdot Q)$ и $E(H_2Por \dots Q)$. $EH(H_2Por \dots Q)$ одинаково важны для катализа пероксидазой. Параллельно с уменьшением доли конформеров $E(H_2Por \cdot Q)$ и $EH(H_2Por \cdot Q)$ уменьшается константа скорости образования соединения E_1 (уравнение 1). Этот процесс в схеме 8 и 7 контролируется константой K_n' , которая меньше K_n , так как $K_n' > K_n$. Получаемое опытным путем значение рК 3,9, влияющее на скорость образования соединения E_1 , действительно несколько меньше значения рК, определяемого по комплексообразованию с лигандами и спектрам ЯМР [19]. Следовательно, закрытые конформеры (рис. 5) важны при взаимодействии фермента с перекисью водорода, в то время как раскрытые конформеры, в которых возможно перекрытие электронных волновых функций субстратов типа I^- , $[Fe(CN)_6]^{4-}$ и порфиринового макроцикла, важны при окислении неорганических субстратов

соединениями E_I и E_{II} . Следовательно, причиной изменения каталитических параметров реакции окисления I^- -ионов при изменении рН является изменение конформационной подвижности белковых фрагментов и, как следствие, увеличение доступности порфиринового макроцикла малым молекулам из водного раствора.

Экспериментальная часть

В работе использовали изофермент С пероксидазы из хрена, выделенный по методу Шеннона [27] из коммерческого препарата фирмы Reanal (Венгрия), как описано ранее [28]. Протопорфирин IX (Calbiochem, США) употребляли без дополнительной очистки. Другие реактивы были марки ос. ч. или очищены соответствующим образом. В работе использовали трижды перегнанную в стекле воду. Комплекс H_2Pog -апоHRP-C получали по методу [17]. Спектры поглощения растворов регистрировали на двухлучевом спектрофотометре В-25 (Beckman, США), рН измеряли с помощью РНМ-64 (Radiometer, Дания). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре МРФ-4 (Hitachi, Япония). Все измерения проводили при термостатировании образцов при 20°С. Концентрацию пероксидазы определяли по пиридингеохромогену, а H_2Pog -апоHRP-C — по поглощению дикатиона протопорфирина в 2,7 М HCl [29]. Для записи зависимости интенсивности флуоресценции от рН использовали непрерывный метод регистрации, как описано ранее [17]. Времена жизни молекулы порфирина определяли на установке, описанной в работе [30]. рН-зависимость оптической плотности записывали на установке, описанной ранее [22].

Авторы выражают глубокую благодарность д-ру хим. н. М. Г. Кузьмину и канд. хим. н. Н. А. Садовскому за помощь при измерении времен жизни возбужденного состояния порфирина и обсуждении результатов спектрофлуориметрических измерений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koshland D. (1959) in: The enzymes, vol. 1, p. 7, Acad. Press.
2. Ламри Р., Билтонен Р. (1973) в сб.: Структура и стабильность биологических макромолекул, с. 7–172, «Мир», М.
3. Волькенштейн М. В. (1975) Молекулярная биофизика, с. 387–394, «Наука», М.
4. Linderström-Lang K., Shellman J. (1959) in: The enzymes, vol. 1, p. 443, Acad. Press.
5. Березин И. В., Мартинек М. (1977) Основы физической химии ферментативного катализа, с. 34–70, «Высшая школа», М.
6. Лихтенштейн Г. И. (1966) Биофизика, 11, 24–32
7. Dunford H. B., Stillman J. S. (1976) Coord. Chem. Rev., 19, 187–251.
8. Roman D., Dunford H. B. (1966) Biochemistry, 11, 2076–2082.
9. Roman D., Dunford H. B. (1973) Can. J. Chem., 51, 588–596.
10. Roman D., Dunford H. B., Evett M. (1971) Can. J. Chem., 49, 3059–3063.
11. Steiner H., Dunford H. B. (1978) Eur. J. Biochem., 82, 543–549.
12. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1977) Биоорганическая химия, 3, 1242–1250.
13. Алфимова Е. А., Лихтенштейн Г. И. (1976) в сб.: Молекулярная биология, т. 8, с. 127–129, ВИНТИ, М.
14. Владимирев Ю. А. (1965) Фотохимия и люминесценция белков, с. 90–93, «Наука», М.
15. Бурштейн Э. А. (1977) в сб.: Биофизика, т. 7, с. 120–160, ВИНТИ, М.
16. Бурштейн Э. А., Бушуева Т. Л., Пермяков Е. А. (1978) Ж. прикл. спектроскопии, 28, 653–657
17. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1979) Биоорганическая химия, 5, 1210–1216.
18. Биркс Дж., Манро И. (1974) Успехи физ. наук, 105, 251–305.
19. Dolman D., Newell G. A., Thurlow M. D., Dunford H. B. (1975) Can. J. Biochem., 53, 495–501.
20. Ellis W. D., Dunford H. B. (1968) Biochemistry, 7, 2054–2062.
21. Morishima J., Ogawa S., Inubushi T., Gonezawa T., Iizuka D. (1977) Biochemistry, 16, 5109–5117.
22. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1979) Биоорганическая химия, 5, 259–266.

23. Phelps Ch., Forlani L., Antonini E. (1971) *Biochem. J.*, **124**, 605-614.
24. Altekar W. (1975) *Ind. J. Biochem. and Biophys.*, **12**, 397-399.
25. Kieland J. G. (1937) *J. Amer. Chem. Soc.*, **59**, 1675-1678.
26. Тенфорд Ч. (1965) *Физическая химия полимеров*, с. 530, «Химия», М.
27. Shennon L. M., Kay E., Lew J. Y. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166-2172.
28. Березин И. В., Угарова Н. Н., Бровко Л. Ю. (1975) *Биохимия*, **40**, 257-261.
29. Falk J. E. (1964) *Porphyrins and Metalloporphyrins*, p. 236, Elsevier, Amsterdam — N. Y.— London.
30. Кузьмин М. Г., Садовский Н. А. (1975) *Химия высоких энергий*, **9**, 291-310.

Поступила в редакцию
25.V.1979

**A SPECTROFLUORIMETRIC STUDY OF CONFORMATIONAL MOBILITY
IN THE ACTIVE SITE OF HORSERADISH PEROXIDASE
AND ITS RELATION TO CATALYTIC PARAMETERS OF ENZYMATIC
REACTION**

SAVITSKII A. P., UGAROVA N. N., BEREZIN I. V.

Department of Chemistry, M.V. Lomonosov State University, Moscow

The interaction of non-metal peroxidase analog, a protoporphyrin-apoperoxidase complex, with various peroxidase substrates (I^- , $Fe(CN)_6^{4-}$) have been studied by fluorescence spectroscopy. It has been shown that the group with pK 4.3, earlier revealed in peroxidase by different kinetic and physico-chemical methods, considerably influences a conformational mobility of the protein moiety in the active site: the protonation of this group seems to decrease the frequency and increase the amplitude of oscillation. This process apparently determines the interaction of low-molecular-weight molecules with porphyrin ring. The bimolecular constant for the I^- quenching of the porphyrin fluorescence in its apoprotein complex shows a pH-dependence similar to that of bimolecular rate constant for E_2 peroxidase reaction with I^- . A mechanism for I^- oxidation by compound E_2 is suggested, which requires the overlap of electron wave functions of the substrate and porphyric ring for the reaction to occur. Over a wide pH range this process is controlled by ionic group of pK 4.3, which may be a heme propionic residue.