



УДК 577.158.52 + 535.372

**РОЛЬ ГЕМА В ФОРМИРОВАНИИ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ  
ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ХРЕНА. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ  
ФЛУОРЕСЦЕНЦИЕЙ И ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ ФЕРМЕНТА***Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
кафедра химической энзимологии*

Сняты спектры флуоресценции триптофана и параметры флуоресценции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ,  $R_q$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $\tau$ ) для пероксидазы из хрена, апопероксидазы и комплекса протопорфирина — апопероксидаза. Показано, что параметры флуоресценции при рН 2 и 8, а также зависимость интенсивности флуоресценции от рН в диапазоне рН 1,6—8,0 для апо- и нативного фермента резко различаются. Флуоресцентные свойства триптофана в комплексе протопорфирина—апопероксидаза близки к свойствам нативной пероксидазы. Сравнение зависимости флуоресценции триптофана от рН и спектров кругового дихроизма нативной и апопероксидазы и комплекса протопорфирина — апопероксидаза указывает на сходство третичной структуры белка в нативной пероксидазе и комплексе протопорфирина — апопероксидаза. Сделан вывод о том, что флуоресцентные свойства триптофана и протопорфирина, а также их изменение при варьировании внешних условий являются чувствительным тестом на общее конформационное состояние белка пероксидазы.

Гемин-белковое взаимодействие играет важную роль в формировании третичной структуры нативных гемсодержащих белков. На примере цитохрома *c*, пероксидазы из хрена, гемоглобина и других гембелков показано, что пространственные структуры апо- и холобелка сильно различаются. Об этом свидетельствуют существенные различия в спектральных свойствах (дисперсия оптического вращения, круговой дихроизм), в терм- и рН-стабильности апо- и холобелков [1—7]. С другой стороны, для комплексов протопорфирина с апоцитохромом *c* и апоцитохромом-*c*-пероксидазой показано, что их третичная структура не отличается от структуры нативных белков [7, 8]. В ряде работ комплекс протопорфирина — апопероксидаза использовался для изучения структуры и свойств пероксидазы [9, 10], однако до сих пор остается открытым вопрос о том, насколько пространственная структура этого комплекса близка к структуре нативного белка. Однозначный ответ на этот вопрос позволил бы более точно оценить и относительный вклад, который вносят в процесс формирования третичной структуры нативного гембелка гидрофобные взаимодействия с белком порфиринового макроцикла, донорно-акцепторные (или ионные) связи пропанонокислых остатков гема и, наконец, образование координационной связи железа гема с лигандом белка. В литературе по этому вопросу имеются лишь косвенные данные. Например, для пероксидазы из хрена безметалльный аналог фермента по рН-стабильности его при 25° не отличается от апопероксидазы, в то время как нативная пероксидаза при рН 5—9 в 30 раз более стабильна [3]. При комплексообразовании с про-

топорфирином апоцитохром-*c*-пероксидаза даже имеет меньшую стабильность [11].

В настоящей работе в качестве объекта исследования использована пероксидаза из хрена — изофермент *c*, по номенклатуре Шеннона [12]. Сравнение свойств нативного, апофермента и безметалльного аналога пероксидазы (комплекс протопорфирин — апопероксидаза) позволило сделать вывод о близости пространственной структуры нативного фермента и его безметалльного аналога.

В качестве метода исследования мы использовали в основном изучение флуоресценции вышеуказанных форм пероксидазы. Кроме того, были проведены измерения кругового дихроизма апопероксидазы, нативного фермента и его безметалльного аналога. Изучение собственной флуоресценции белков дает ценную информацию о локализации и природе окружения ароматических остатков белка (триптофана и в меньшей степени тирозина и фенилаланина). Изменение флуоресцентных параметров, наблюдаемое при внешних воздействиях на систему, может свидетельствовать о конформационных переходах в белке и в определенных случаях о молекулярном механизме этих переходов [13].

Флуоресцентный метод оказался весьма информативным в случае пероксидазы, поскольку изофермент *c* пероксидазы содержит лишь один остаток триптофана и пять остатков тирозина [14]. Наличие такой флуоресцентной метки, как единственный остаток триптофана, существенно облегчает интерпретацию экспериментальных данных. До настоящего времени в литературе имеются лишь фрагментарные данные по флуоресценции пероксидазы (смеси, а не индивидуальных изоферментов) [15—17]. Для ряда гембелков, как показали Вебер и Тиле [15], флуоресценция триптофана характеризуется низкими квантовыми выходами. Наиболее высокий квантовый выход был отмечен для пероксидазы ( $q \sim 0,01$ ). Авторы объясняли этот факт тем, что энергия возбуждения триптофана в сильной степени мигрирует на гем. Варкони с сотр. [16, 17] установили, что в пероксидазе флуоресцируют как триптофановый, так и тирозиновый компоненты. Анализ температурной зависимости флуоресценции дал возможность предположить, что ароматические аминокислотные остатки пероксидазы образуют водородные связи [16]. К сожалению, авторы не приводят изоферментный состав препарата и не указывают степени его гомогенности.

*Флуоресцентные свойства триптофана в нативной пероксидазе (изофермент *c*)*. Квантовый выход флуоресценции и форма спектра нативной пероксидазы, полученной при длине волны возбуждения 290 нм (рис. 1, 1), не меняются, если возбуждение проводят при 297 нм. В работе [14] было показано, что для изофермента *c* пероксидазы самая длинноволновая полоса поглощения тирозина расположена при 287 нм. Следовательно, спектр флуоресценции пероксидазы на рис. 1,1 можно с полным правом отнести к флуоресценции триптофана. В дальнейшей работе для возбуждения мы использовали длину волны 290 нм, поскольку при этой длине волны белок обладает гораздо большим поглощением. В нашем случае это обстоятельство весьма существенно, так как относительный квантовый выход ( $R_q$ ) флуоресценции триптофана в *c*-пероксидазе (измеренный по отношению к квантовому выходу флуоресценции свободного триптофана в растворе в тех же условиях в соответствии с рекомендациями Ковгилла [18]) составляет всего 0,014 (таблица).

При изменении pH от 8 до 3 интенсивность флуоресценции триптофана остается неизменной (рис. 2,1). При pH < 3 с уменьшением pH наблюдается резкое увеличение интенсивности флуоресценции, которая достигает максимума при pH ~ 1,6. Спектральные характеристики флуоресценции триптофана при pH 8 и 2 существенно различаются (таблица). Величина  $R_q$  при pH 2 увеличивается в 3,6 раза по сравнению с  $R_q$  при pH 8, а время жизни возбужденного состояния уменьшается от 3,3 до 2,7 нс.

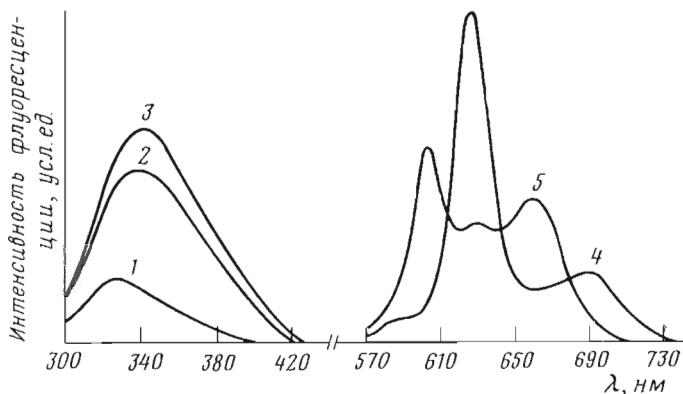


Рис. 1. Исправленные спектры флуоресценции остатка триптофана в нативной пероксидазе (рН: 1 — 8; 3 — 2) и апопероксидазе (рН 8 — 3). Спектры флуоресценции протопорфирина IX в комплексе с апопероксидазой при рН 8 (4) и 1,8 (5). Длина волны возбуждения: 290 нм (спектры 1 — 3) и 400 нм (4, 5)

Смещение положения максимума в длинноволновую область (рис. 1, ср. 1 и 3) свидетельствует о заметном повышении полярности окружения остатка триптофана в пероксидазе при рН 2 по сравнению с рН 8. Увеличение константы штерн-вольмеровского тушения флуоресценции триптофана иодид-ионами (рис. 3) от  $0,604 \text{ M}^{-1}$  при рН 5 до  $5,36 \text{ M}^{-1}$  при рН 2 указывает на значительно большую доступность внешнему тушителю остатка триптофана в пероксидазе при рН 2 по сравнению с растворами, близкими к нейтральным.

Полученные результаты говорят о том, что состояние триптофана, полярность его окружения, доступность растворителю существенно изменяются для нативной пероксидазы при переходе от нейтральных и слабых кислых к кислым растворам. С другой стороны, именно при рН  $< 3$  становится возможной быстрая диссоциация пероксидазы на гемин и апофермент [19]. Все эти данные позволяют предположить, что при рН  $< 3$  происходит изменение конформации белковой глобулы пероксидазы, след-

**Спектральные характеристики флуоресценции остатка триптофана в изоферменте с пероксидазы из хрена для нативного и апофермента, для комплекса протопорфирина — апопероксидаза**

Измеряемый параметр	Нативная пероксидаза		Апопероксидаза		Комплекс протопорфирина — апопероксидаза *	
	рН 8	рН 2	рН 8	рН 2	рН 8	рН 2
Квантовый выход по отношению к свободному триптофану в растворе, $R_q$	$0,014 \pm 0,002$	$0,051 \pm 0,002$	$0,041 \pm 0,002$	$0,058 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,002$	$0,048 \pm 0,002$
Положение максимума, $\lambda_{\text{макс}}$ , нм	328	345	335	345	328	345
Ширина спектра на половине высоты, $\Delta\lambda$ , нм	56	65	65	65	56	65
Время жизни возбужденного состояния триптофана, $\tau$ , нс	$3,3 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$

\* Параметры флуоресценции триптофана определены при эквимолекулярном соотношении протопорфирина и апопероксидазы.

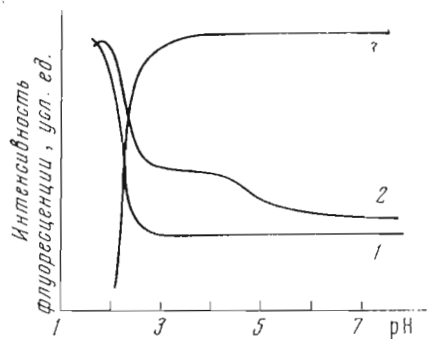


Рис. 2

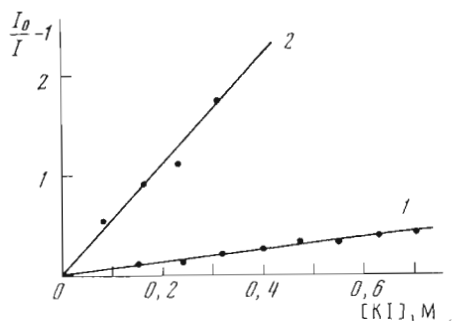


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции от рН остатка триптофана в нативной пероксидазе (1), а также триптофана (2) и протопорфирина (3) в комплексе протопорфирин — апопероксидаза. Измерения флуоресценции проводили при 330 нм для триптофана и при 625 нм для протопорфирина. Комплекс протопорфирина—апопероксидаза содержит только протопорфирин, специфически связанный с белком

Рис. 3. Зависимость Штерва — Фольмера тушения флуоресценции остатка триптофана в пероксидазе иодид-ионами при рН 5 (1) и 2 (2). Тушитель — KI

ствием чего являются наблюдаемые изменения флуоресцентных свойств триптофана и быстрая диссоциация гембелкового комплекса.

**Флуоресцентные свойства триптофана в апопероксидазе (изофермент с).** Сравнение спектральных характеристик флуоресценции нативной и апопероксидазы (рис. 1 и таблица) показывает, что положение максимума флуоресценции для апопероксидазы при рН 8 сдвинуто в длинноволновую область (335 нм по сравнению с 328 нм для нативного фермента). При уменьшении рН от 4 до 2 для апопероксидазы наблюдается постепенный сдвиг положения максимума от 335 к 345 нм.

При рН 8 квантовый выход флуоресценции триптофана в 2,9 раза выше у апопероксидазы, чем у нативного фермента, а время жизни возбужденного состояния составляет 2,6 нс по сравнению с 3,3 нс для нативного фермента. Как предложено в работах [15—17], низкий квантовый выход флуоресценции триптофана в пероксидазе обусловлен тушащим влиянием гема по механизму миграции энергии. Процесс миграции энергии проявляется как динамический тип тушения [20], и при удалении гема от белка следовало ожидать увеличения времени жизни  $\tau$  наряду с увеличением квантового выхода  $R_q$ . Мы же наблюдаем уменьшение  $\tau$  при значительном возрастании  $R_q$ . Следовательно, для нативной пероксидазы при изменении рН от 8 до 2 и при переходе от нативной пероксидазы к апопероксидазе существенно изменяется соотношение вкладов статического и динамического компонентов тушения флуоресценции триптофана. Это можно объяснить только изменением конформационного состояния белка в указанных выше условиях. Итак, большие различия во флуоресцентных параметрах триптофана в нативной и апопероксидазе при рН 8 указывают на существенное различие в окружении триптофана в этих двух различных по своей пространственной структуре формах пероксидазы.

При рН 2 флуоресцентные свойства триптофана в нативном и апоферменте практически совпадают ( $\lambda_{\text{макс}}$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $\tau$ ) и различаются лишь величины  $R_q$ , что, по-видимому, связано с тушащим действием гема в нативном ферменте. При рН 2 окружение триптофана в апопероксидазе и пероксидазе оказывается по своим свойствам весьма близким. Зависимости интенсивности флуоресценции апопероксидазы (рис. 4, 1) и нативной пероксидазы (рис. 2, 1) от рН весьма различны. Для апопероксидазы при рН < 6 наблюдается заметное увеличение интенсивности флуоресценции

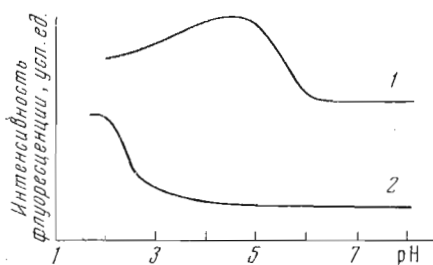


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции от рН остатка триптофана в апопероксидазе (1) и в комплексе протопорфирина—апопероксидаза (2). В опыте (2) измеряемый раствор содержал 1,5-кратный избыток протопорфирина

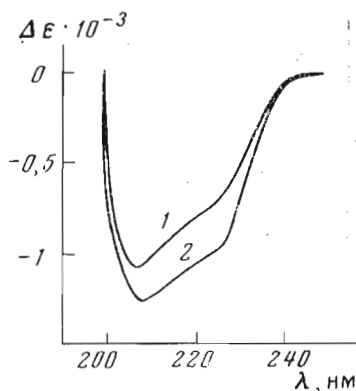


Рис. 5

Рис. 5. Спектры кругового дихроизма апопероксидазы (1) и комплекса протопорфирина — апопероксидаза (2)

и в отличие от нативного белка при  $\text{pH} < 3$  не происходит резкого увеличения интенсивности флуоресценции. Причем увеличение интенсивности при  $\text{pH} < 6$  происходит без изменения времени жизни возбужденного состояния  $\tau$ . Изменение интенсивности флуоресценции апопероксидазы при  $\text{pH} 4-6$ , по-видимому, отражает определенный конформационный переход в апобелке пероксидазы, который был ранее предложен в работе [1].

Сравнение флуоресцентных параметров триптофана в нативной и апопероксидазе, а также зависимостей интенсивности флуоресценции от рН указывает на резкое различие в поведении флуоресцентной метки в этих двух белках при изменении внешних условий. Интересно, что заметные изменения флуоресцентных свойств триптофана наблюдаются именно в тех условиях, где белок претерпевает конформационные изменения: при  $\text{pH} 4-6$  для апопероксидазы, при  $\text{pH} < 3$  для нативной пероксидазы. Итак, различия в третичной структуре апо- и нативного фермента, конформационные переходы в белке достаточно четко обнаруживаются при исследовании его флуоресценции. Это показывает, что остаток триптофана в пероксидазе является флуоресцентной меткой, чувствительной к общему конформационному состоянию белковой глобулы пероксидазы.

*Флуоресцентные свойства комплекса протопорфирина — апопероксидаза (изофермент с).* Флуоресцентные свойства триптофана в апопероксидазе резко изменяются при взаимодействии ее с протопорфирином. Добавление 1,5-кратного избытка протопорфирина к апопероксидазе (в этих условиях практически весь белок находится в виде комплекса протопорфирина — апопероксидаза) при  $\text{pH} 8$  вызывает уменьшение  $R_q$  от 0,041 до 0,016.  $\lambda_{\text{макс}}$  сдвигается от 335 к 328 нм,  $\Delta\lambda$  уменьшается от 65 до 56 нм, а  $\tau$  возрастает до 3,1 нс. Следовательно, в образующемся комплексе флуоресцентные параметры триптофана практически не отличаются от таковых в нативной пероксидазе. Как видно из рис. 4, 2, после добавления протопорфирина к апопероксидазе зависимость интенсивности флуоресценции триптофана от рН приобретает характер, свойственный нативному белку: исчезает изменение интенсивности при  $\text{pH} 4-6$  и появляется увеличение интенсивности при  $\text{pH} < 3$ .

Таким образом, окружение триптофана, изменение его флуоресценции с изменением рН в безметалльном аналоге пероксидазы очень близки к флуоресцентным свойствам триптофана в нативном ферменте и сильно отличаются от таковых в апобелке. Поскольку флуоресценция триптофана в

пероксидазе и ее производных чувствительна к общему конформационному состоянию белка, можно считать, что близость флуоресцентных свойств триптофана в нативном ферменте и комплексе протопорфирин—апопероксидаза отражает близость третичной структуры белка в пероксидазе и ее безметалльном аналоге. Это же подтверждают следующие независимые эксперименты.

Как известно [5], при отделении гема от белка интенсивность отрицательной ветви в спектре кругового дихроизма пероксидазы при 221 нм уменьшается на 18%. Для комплекса протопорфирин—апопероксидаза интенсивность отрицательной ветви возрастает на 18% при 221 нм по сравнению с апопероксидазой и достигает значений, свойственных нативной пероксидазе (рис. 5). Следовательно, спектры кругового дихроизма также указывают на близость третичной структуры нативной пероксидазы и ее безметалльного аналога.

Кроме того, мы изучили флуоресценцию протопорфирина в комплексе протопорфирин—апопероксидаза. Для этой цели был получен комплекс, содержащий только специфически связанный с белком протопорфирин (см. «Экспериментальную часть»). Полученный препарат содержит примесь апопероксидазы, чем обусловлено некоторое изменение интенсивности флуоресценции при рН 4—6 (рис. 2, 2). Значительное возрастание интенсивности флуоресценции триптофана при рН < 3 указывает на то, что большая часть белка связана в комплекс с протопорфирином (рис. 2, 2).

Протопорфирин в комплексе с апопероксидазой имеет спектр флуоресценции и поглощения, характерный для свободного основания (рис. 1, 4), т. е. когда два центральных атома азота не протонированы [21]. Форма спектра не изменяется в интервале рН 2—8. При рН < 2 наблюдается спектр флуоресценции дикатиона протопорфирина (рис. 1, 5), а спектр флуоресценции монокатиона не наблюдается. Следовательно, при рН ~ 2 в комплексе вблизи молекулы протопорфирина происходит скачкообразное изменение среды, приводящее к одновременному протонированию двух центральных атомов азота.

Сопоставление зависимости интенсивности флуоресценции протопорфирина ( $\lambda_{\text{возб}}$  400 нм,  $\lambda_{\text{эм}}$  625 нм, рис. 2, 3) от рН с аналогичной зависимостью для триптофана показывает, что эти две кривые антибатны. Уменьшение интенсивности флуоресценции протопорфирина при рН < 3 четко коррелирует с увеличением интенсивности флуоресценции триптофана в этих же условиях. Следовательно, зависимости от рН, которые характеризуют поведение двух независимых флуоресцентных меток, однозначно говорят об изменениях пространственной структуры белка нативной пероксидазы или ее безметалльного аналога в области рН < 3.

Полученные в настоящей работе доказательства того, что пространственные структуры нативной пероксидазы и комплекса протопорфирин—апопероксидаза близки, позволяют сделать важный вывод о механизме формирования структуры нативного белка при взаимодействии апобелка с гемом. Основное «сворачивающее» влияние оказывает гидрофобное и донорно-акцепторное взаимодействие с белком порфиринового макроцикла и его боковых пропионовокислых остатков. Уже на стадии образования комплекса протопорфирин—апопероксидаза третичная структура белка соответствует структуре нативного фермента. Однако прочность этого комплекса не столь высока, как комплекса с гемом, и основное стабилизирующее действие оказывает образование координационной связи лиганда белка с железом гема.

Результаты настоящего исследования, а также анализ литературных данных показывают, что существует определенное сходство в свойствах пероксидазы и цитохрома *c*. Для обоих белков основное сворачивание белковой глобулы в нативный конформер происходит при взаимодействии ее с порфириновым макроциклом ([7], настоящая работа). Наличие железа важно для стабилизации нативной структуры, поэтому стабильность ком-

плекса протопорфирина — белок невысока [3, 22]. В молекуле пероксидазы и цитохрома *c* пропаноновокислые остатки гема направлены внутрь белка [23—27]. Совпадают  $pK$  протонирования протопорфирина в безметалльных аналогах гембелков ([22], данная работа), а также зависимость флуоресценции триптофана от  $pH$  ([28], данная работа). Все эти сходные свойства указывают и на определенное сходство в структурной организации этих двух гембелков, а возможно, и на сходство в механизме функционирования пероксидазы и цитохрома *c*.

### Экспериментальная часть

Использовали изофермент *c* пероксидазы из хрена, выделенный по методу Шеннона [12] из продажного препарата фирмы Reanal (Венгрия) с  $RZ = D_{403}/D_{273} = 0,6$ . Методика очистки подробно описана ранее [3]. Полученный изофермент *c* имел  $RZ$  3,3, концентрацию определяли по пиридингемохромогену [29]. 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. Апопероксидазу получали, как описано ранее [3], с некоторыми модификациями: 5 мг пероксидазы растворяли в 1 мл 5 мМ Na-фосфатного буфера ( $pH$  7), охлаждали до  $0^\circ$  и затем, добавляя по каплям 6 н. HCl, доводили  $pH$  до 1,8. Гемин экстрагировали дважды 1 мл метилэтилкетона. После отделения органического растворителя водный раствор нейтрализовали и диализовали против 1 мл 0,01 М буферного раствора Трис-HCl,  $pH$  8 ( $4^\circ$ , 3 смены). Раствор апопероксидазы лиофилизации не подвергали, поскольку она, как мы установили, приводит к частичной денатурации белка. Концентрацию нативной апопероксидазы определяли методом спектрофотометрического титрования белка темином [19].

Комплекс протопорфирин—апопероксидаза для изучения флуоресценции триптофана и кругового дихроизма получали следующим образом: к 0,1 мл 0,5 мМ раствора апопероксидазы в 0,01 М буфере Трис-HCl ( $pH$  8) добавляли 0,15 мл 0,5 мМ раствора протопорфирина в том же буфере и инкубировали 3 ч в темноте (все операции проводили при  $4^\circ$ ). Непосредственно перед записью спектров 0,2 мл раствора разбавляли 3 мл 5 мМ Na-фосфатного буфера. Для изучения флуоресценции протопорфирина после инкубирования растворов, как указано выше, протопорфирин, не связанный с белком или связанный неспецифически, отделяли от специфического комплекса протопорфирин—апопероксидаза на колонке ( $2,5 \times 8$  см) с сефадексом G-25 (грубая фракция). Комплекс элюировали 5 мМ Na-фосфатным буфером, а протопорфирин, не связанный с белком, прочно сорбировался в верхней части колонки в виде темно-коричневого кольца.

Спектры поглощения растворов регистрировали на двулучевом спектрофотометре SP-1800 (Pye Unicam, Англия).  $pH$  измеряли с помощью  $pH$ -метра-26 (Radiometer, Дания). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония). Щели эмиссии и возбуждения устанавливали равными 4 нм. Спектры кругового дихроизма снимали на дихрографе (Roussel-Jouan, Франция) в 1-см кювете. Все измерения проводили при термостатировании образцов при  $20^\circ$ .

Для записи зависимости интенсивности флуоресценции от  $pH$  использовали непрерывный метод регистрации. В спектрофлуориметрическую кювету помещали 2,5 мл исследуемого раствора белка (5 мкМ в 5 мМ  $Na_2HPO_4$ ),  $pH$  8. Затем через специальный держатель в раствор вводили малые электроды G-222C и K-4112, связанные с  $pH$ -метром. Раствор перемешивали магнитной мешалкой, вмонтированной в кюветное отделение спектрофлуориметра. 1 М раствор HCl прибавляли в кювету автобюреткой АВU-1С (Radiometer, Дания). Сигнал с  $pH$ -метра подавали на координату  $x$ , а сигнал с усилителя ФЭУ спектрофлуориметра — на координату  $y$

двухкоординатного самописца Endim-20-01. Длительность измерения зависимости от рН в диапазоне рН 8—1,5 не превышала 7 мин, а в диапазоне 3—1,5 равнялась 2 мин. За этот промежуток времени, как было показано ранее [30], не происходит заметной необратимой денатурации пероксидазы и ее производных.

Времена жизни возбужденного состояния триптофана измеряли на установке, описанной в работе [31], с использованием 4-см хлорного фильтра на возбуждении. В качестве источника света применяли импульсную водородную лампу с давлением водорода 5,5 атм. Флуоресценцию регистрировали при 340 нм с помощью монохроматора. Форму вспышки учитывали по формуле, предложенной Бирксом и Манро [20]:

$$\tau^2 = \tau_F^2 - \tau_E^2,$$

где  $\tau_F$  — «наблюдаемое» время затухания,  $\tau_E$  — время затухания вспышки. Затухание флуоресценции было экспоненциальным.

Авторы выражают глубокую благодарность д-ру хим. наук М. Г. Кузьмину и канд. хим. наук Н. А. Садовскому за ценные замечания при обсуждении работы и помощь при измерении времен жизни возбужденного состояния триптофана.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Phelps C., Forlani L., Antonini E. (1971) *Biochem. J.*, **124**, 605—614.
2. Rosen C.-G., Nilsson R. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **236**, 1—7.
3. Березни И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. (1975) *Биохимия*, **40**, 257—261.
4. Ellis W. D., Dunford H. B. (1968) *Can. J. Biochem.*, **46**, 1231—1235.
5. Strickland E. H., Kay E., Shannon L. M., Horwitz J. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3560—3565.
6. Stellwagen E., Rysavy R. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 8074—8077.
7. Fisher W. R., Taniuchi H., Anfinsen C. B. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 3188—3195.
8. Larsson L. O., Hagman L.-O., Kierkegaard P., Jonetani T. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 902—903.
9. Mank M. R., Girotti A. W. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1757—1763.
10. Kang J. I., Spikes J. D. (1976) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **172**, 565—573.
11. Asacura T., Jonetani T. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 537—544.
12. Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166—2172.
13. Буриштейн Э. А. (1973) в сб. *Молекулярная биология*, т. 3, с. 127—215, ВИНТИ, М.
14. Strickland E. H., Horwitz J., Kay E., Shannon L. M., Wilchek M., Billups C. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2631—2638.
15. Weber G., Teale F. I. W. (1959) *Disc. Faraday Soc.*, **27**, 134—141.
16. Várkonyi Z., Kabok K. (1975) *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.*, **10**, 129—137.
17. Várkonyi Z., Szalay L. (1974) *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.*, **9**, 255—264.
18. Cowgill R. W. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **168**, 417—430.
19. Jonetani T. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 5008—5013.
20. Биркс Дж., Манро И. (1971) *Успехи физических наук*, **105**, 251—305.
21. Гурипович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. П. (1968) *Спектроскопия хлорофилла в родственных соединений*, «Наука и техника», М.
22. Vanderkooi J. M., Erecinska M. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **60**, 199—207.
23. Tamura M., Asakura T., Jonetani T. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **268**, 292—304.
24. Ohlsson P.-I., Paul K.-G. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **315**, 293—305.
25. Paul K.-G. (1959) *Acta chem. scand.*, **13**, 1239—1240.
26. Paul K.-G., Gewitz H. S., Völker W. (1959) *Acta chem. scand.*, **13**, 1240—1242.
27. Dickerson R. E., Takano T., Eisenberg D., Kallai O. B., Samson L., Cooper A., Margoliash E. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1511—1535.
28. Chen J. S., Fisher W. R., Schechter A. N. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1113—1118.
29. Falk J. E. (1964) *Porphyrins and Metalloporphyrins*, p. 236, Elsevier, Amsterdam — N. Y. — London.
30. Кершенгольц Б. М. (1975) Канд. дис. «Исследование некоторых свойств пероксидазы из хрена в растворимом и иммобилизованном состоянии», МГУ.
31. Кузьмин М. Г., Садовский И. А. (1975) *Химия высоких энергий*, **9**, 291—310.

Поступила в редакцию  
27.1.1977



HEME IMPLICATION IN TERTIARY STRUCTURE ACQUISITION;  
BY HORSERADISH PEROXIDASE. RELATIONSHIP BETWEEN FLUORESCENCE  
AND ENZYME TERTIARY STRUCTURE

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

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

Fluorescence spectra were recorded and the parameters of tryptophan fluorescence ( $\lambda_{\max}$ ,  $R_q$ ,  $\Delta\lambda$ ,  $\tau$ ) obtained for horseradish peroxidase, apoperoxidase and protoporphyrin-apoperoxidase complex. It was shown that the fluorescence parameters at pH 2 and 8, as well as pH-dependences of fluorescence intensity measured over the pH range 1.6—8.0 are greatly different for holo- and apoenzymes. A comparison of the pH-dependences of tryptophan fluorescence and circular dichroism spectra for apoperoxidase, native enzyme, and protoporphyrin-apoperoxidase complex provides evidence for a similarity of the protein tertiary structure in the latter two. The tryptophan and protoporphyrin fluorescence properties and their change on variation of external conditions were demonstrated to be a sensitive test as to the conformational state of peroxidase.

---