



УДК 577.158.52.02

**ВЛИЯНИЕ МИКРОСРЕДЫ НА КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА  
ПРОТОПОРФИРИНА IX В ЕГО СПЕЦИФИЧЕСКОМ КОМПЛЕКСЕ  
С АНОПЕРОКСИДАЗОЙ***Савицкий А. И., Угарова Н. Н., Березин И. В.**Кафедра химической энзимологии Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова*

Изучены спектры поглощения и флуоресценции и сняты их рН-зависимости для специфического комплекса протопорфирина IX с апопероксидазой из хрена и нативного белка. Показано, что при  $\text{pH} < 3$  происходит одновременное присоединение двух протонов к молекуле порфирина. Отмечен высокий сдвиг  $\text{p}K_{\text{наж}}$  (4 единицы) протонирования пиррольных азотов порфирина в специфическом комплексе по сравнению с водным раствором порфирина. На основании сдвигов  $\text{p}K_{\text{наж}}$  порфирина оценена диэлектрическая постоянная в активном центре пероксидазы. Обсуждается влияние диэлектрической постоянной в гемсвязывающей области активного центра на окислительно-восстановительный потенциал пероксидазы. Высказано предположение о природе шестого лиганда железа гема для проявления низкого окислительно-восстановительного потенциала.

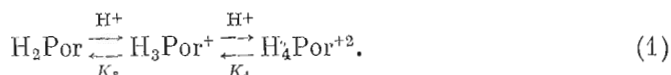
Гемсодержащие белки составляют большую группу функционально важных металлоферментов — переносчиков электронов и кислорода [1]. Структура ряда гембелков изучена весьма подробно с помощью рентгеноструктурного анализа и различных физико-химических методов [2, 3]. Модельным ферментом для изучения взаимосвязи между структурой и функциями гемсодержащих биокатализаторов в течение многих лет является пероксидаза из хрена [2, 4]. Изучение спектральных свойств пероксидазы и ее промежуточных соединений с перекисью водорода сыграло важную роль в развитии современных представлений о механизмах ферментативного катализа и роли металлов в белках [1, 5]. Тем не менее до сих пор топография активного центра пероксидазы, детальный механизм взаимодействия фермента и его промежуточных соединений с субстратами остаются неясными, несмотря на то что для исследования физико-химических характеристик гемина, входящего в состав пероксидазы, и для изучения структуры соединений  $E_1$  и  $E_2$ , образующихся при взаимодействии пероксидазы с перекисью водорода, в последние годы использованы физические методы (ЯМР, ЭПР и мессбауэровская спектроскопия, метод флуоресцентных и парамагнитных зондов и т. д.) [6—14].

Мы использовали качественно новый подход для изучения структуры гемсвязывающей области пероксидазы и исследовали не нативный фермент, а его аналог — не содержащий атома железа специфический комплекс протопорфирин — апопероксидаза [15]. В отличие от нативной пероксидазы этот комплекс обладает сильной флуоресценцией в красной области. Как известно, метод флуоресценции спектроскопии исключительно информативен при изучении микроокружения хромофоров и конформационных переходов в белках [16]. Третичная структура такого аналога

пероксидазы близка к структуре нативного фермента [15]. Кроме того, исследуемый хромофор — протопорфирин является неотъемлемой частью активного центра пероксидазы и не содержит других групп, способных вызывать отличия в структуре и свойствах от нативного фермента. Используемый нами аналог фермента удобен для исследования топографии активного центра пероксидазы.

Сравнение каталитических свойств гема и его комплексов в водном растворе со свойствами специфических гембелковых комплексов выявляет одну из основных причин высокой каталитической активности гемсодержащих ферментов — уникальное окружение гема на белке. Можно ожидать, что наличие неполярного окружения гема в пероксидазе [10, 13] должно существенно изменять свойства функциональных групп в активном центре фермента, в частности их кислотно-основные свойства.

В настоящей работе мы исследовали кислотно-основные равновесия молекулы протопорфина IX ( $H_2Por$ ), связанного в специфический комплекс с апопероксидазой (изофермент *c*) (*apoHRP-c*). Протонизация  $H_2Por$  по пиррольным азотам описывается следующим равновесием:



Свободное основание  $H_2Por$ , моно- и дикатион  $H_3Por^+$  и  $H_4Por^{+2}$  значительно различаются по спектральным свойствам, что позволяет четко идентифицировать различные состояния протонизации молекулы  $H_2Por$  [15, 17].

Спектр поглощения полученного нами комплекса (см. «Экспериментальную часть»)  $H_2Por$  — *apoHRP-c* приведен на рис. 1. Хорошо разрешенные максимумы  $H_2Por$  в видимой области свидетельствуют о том, что порфирин находится в мономерном состоянии. Высокое значение  $RZ = D_{405}/D_{280} = 5,65$  свидетельствует о низком содержании примесных белков. На отсутствие примеси *apoHRP-c* также указывает рН-зависимость флуоресценции остатка триптофана в полученном препарате (рис. 2), где проявляются изменения флуоресценции, свойственные только *apoHRP-c*, связанной с гемом или  $H_2Por$ , и отсутствуют изменения, характерные для свободной апопероксидазы [15]. Спектр красной флуоресценции  $H_2Por$  — *apoHRP-c*, не исправленный на спектральные характеристики прибора, приведен на рис. 3. Сравнение его с аналогичным спектром  $H_2Por$  в водном растворе [18] обнаруживает сильное смещение максимума флуоресценции (626 нм) в длинноволновую область. Следовательно, при нейтральных рН спектр поглощения и флуоресценции комплекса соответствует молекуле  $H_2Por$  (см. рис. 3, 1), не протонированной по пиррольным азотам.

рН-зависимость спектра поглощения  $H_2Por$  — *apoHRP-c* (рис. 4, 1) в целом аналогична рН-зависимости спектра поглощения нативной *HRP-c*

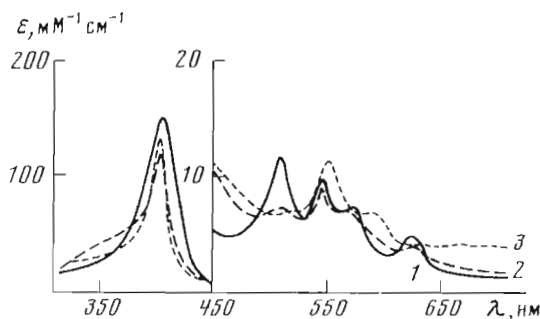


Рис. 1. Спектры поглощения 10 мМ раствора  $H_2Por$  — *apoHRP-c* при рН: 7,0 (1), 2,2 (2), 1,6 (3); 5 мМ  $Na_2HPO_4$ , 20° С

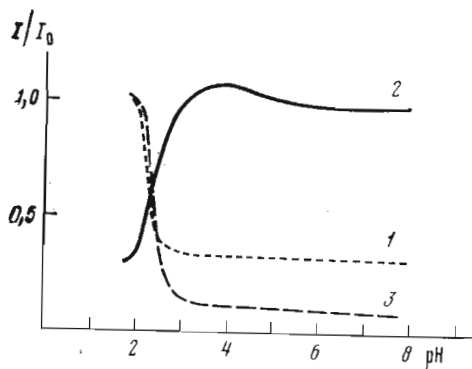


Рис. 2

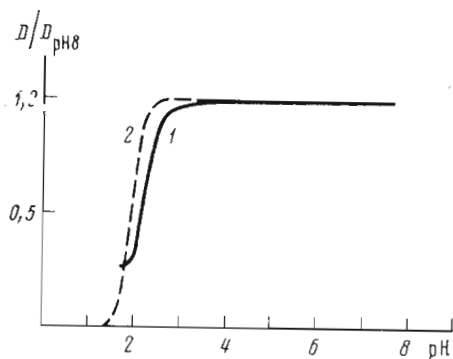


Рис. 4

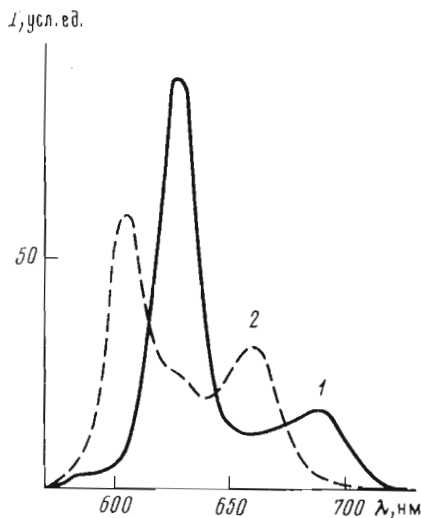


Рис. 3

Рис. 2. pH-зависимость флуоресценции комплекса  $H_2Por - apoHRP-c$ : 1 — флуоресценция триптофана при 340 нм, возбуждение 290 нм; 2 — флуоресценция свободного основания  $H_2Por$  при 626 нм, возбуждение 405 нм; 3 — флуоресценция дикатиона проторфрина  $H_4Por^{+2}$  при 600 нм, возбуждения 405 нм

Рис. 3. Спектры флуоресценции комплекса  $H_2Por - apoHRP-c$  при pH: 7,0 (1), 1,6 (2). Возбуждение при 405 нм

Рис. 4. pH-Зависимость поглощения в полосе Сорэ для нативной HRP-c (2) (403 нм) и комплекса  $H_2Por - apoHRP-c$  (1) (408 нм). Концентрация белка 10 мкМ, 5 мМ  $Na_2HPO_4$ , 20° С

(рис. 4, 2). В диапазоне pH 3–8 форма спектра и коэффициенты экстинкции при различных длинах волн не меняются. Различия наблюдаются только при  $pH < 3$ . Изменение поглощения на полосе Сорэ, связанное с денатурацией белка при низких pH, в комплексе  $H_2Por - apoHRP-c$  происходит при менее кислых значениях pH, чем в нативной HRP-c. Такое различие может быть связано с отсутствием в комплексе координационной связи железа гема с белковыми лигандами, понижающим стабильность комплекса при низких значениях pH по сравнению с нативной HRP-c. Следовательно, в области pH 3–8 спектры поглощения как комплекса  $H_2Por - apoHRP-c$ , так и нативной пероксидазы не регистрируют каких-либо изменений в белковой части фермента.

При pH ниже 3 исходная четырехполосная структура спектра поглощения  $H_2Por - apoHRP-c$  в видимой области начинает размываться (см. рис. 1, 2) и при pH 1,6 появляется двухполосный спектр (см. рис. 1, 3) с максимумами при 550 и 590 нм, характерными для дикатиона порфирина [17]. Отсутствие изобестических точек на спектрах (см. рис. 1) свидетельствует о том, что в данном случае мы наблюдаем сложное равновесие, обусловленное более чем двумя спектральными формами. Однако по своему характеру спектр при pH 2,2 не соответствует спектру монокатиона [19], поэтому отсутствие изобестических точек связано, по-видимому, с изменением свойств микросреды, сопровождающим протонирование молекулы  $H_2Por$ . Таким образом, при кислотной денатурации белка по

спектрам поглощения мы регистрируем только дикатион порфирина  $H_4Por^{2+}$  и не наблюдаем форму  $H_3Por^+$ .

К такому же заключению нас приводит изучение рН-зависимости флуоресценции порфирина в комплексе  $H_2Por - apoHRP-c$ , рН-зависимость флуоресценции порфирина в комплексе  $H_2Por - apoHRP-c$  при 626 нм (см. рис. 2, 2) в общих чертах сходна с рН-зависимостью оптической плотности в полосе *Soret* (408 нм) комплекса  $H_2Por - apoHRP-c$  (см. рис. 4, 1). В области рН 3,7–6,0 происходит увеличение квантового выхода флуоресценции  $H_2Por$ , не сопровождающееся изменениями времени жизни в возбужденном состоянии и спектров поглощения и флуоресценции  $H_2Por - apoHRP-c$  (см. рис. 4, 1). Причины изменения квантового выхода флуоресценции  $H_2Por$  в этой области рН и их роль в структуре белка будут рассмотрены позже. При рН < 3,0 в спектре флуоресценции  $H_2Por$  начинает появляться спектр флуоресценции дикатиона порфирина (см. рис. 3, 2). Спад флуоресценции непротонированной формы  $H_2Por$  при 626 нм антибатен увеличению флуоресценции дикатиона  $H_4Por^{2+}$  при 600 нм (см. рис. 2), что также свидетельствует об отсутствии промежуточной формы монокатиона  $H_3Por^+$ .

Обработка кривых, представленных на рис. 2 и 4, была проведена по уравнению

$$\lg \left( \frac{I_2 - I_1}{I - I_1} - 1 \right) = + n \text{ рН} - \text{рК}, \quad (2)$$

где  $I_1$  и  $I_2$  — интенсивность флуоресценции или оптические плотности либо полностью протонированной формы, либо непротонированной формы порфирина,  $I$  — значение флуоресценции или оптической плотности в промежуточной точке рН,  $n$  — число присоединяемых протонов. Эта обработка показывает, что спад интенсивности флуоресценции при 626 нм, увеличение интенсивности флуоресценции при 600 нм и уменьшение оптической плотности в полосе *Soret* в комплексе  $H_2Por - apoHRP-c$  и в нативном ферменте (см. рис. 2 и 4) при рН < 3 соответствуют присоединению трех протонов. Следовательно, протонирование пиррольных азотов порфирина не может быть причиной кислотной денатурации комплекса  $H_2Por - apoHRP-c$ . Кроме того, рН-зависимость флуоресценции триптофана в комплексе  $H_2Por - apoHRP-c$  практически совпадает с рН-зависимостью флуоресценции дикатиона  $H_4Por^{2+}$  (см. рис. 2). Эти данные приводят нас к выводу, что протонирование молекулы порфирина является следствием кислотной денатурации молекулы белка. При этом изменение среды носит скачкообразный характер, в результате чего молекула порфирина сразу переходит в форму дикатиона.

Сравнение кажущейся константы протонирования  $H_2Por$  в комплексе  $H_2Por - apoHRP-c$  (рис. 2 и 4) с аналогичным значением  $\text{рК } H_2Por$  в водном растворе [18] показывает, что кажущаяся константа протонирования смещается как минимум на 4 единицы. Сдвиг кажущейся константы протонирования  $H_2Por$  в мицеллярных растворах на 6 единиц был объяснен значительным понижением диэлектрической постоянной (до ~10) в гидрофобном ядре мицеллы [18]. Однако в случае молекулы белка необходимо также учитывать, что при рН < 3 молекула  $HRP-c$  может нести на себе до 29 положительных зарядов [20, 21]. Естественно, что столь сильный положительный заряд также может вызывать сдвиг  $\text{рК}$  в пределах единицы: Более того, локальный поверхностный положительный заряд вблизи гемовой щели может оказаться более высоким, чем заряд, усредненный по всей поверхности белка. Но в любом случае только положительный заряд не может привести к сдвигу  $\text{рК}$  на 4 единицы, и бесспорным является существенное понижение полярности в гемовой щели. Расчет по ранее описанному методу [18] приводит к величине диэлектрической постоянной в гемсвязывающей области активного центра пероксидазы, равной ~20. О низкой полярности в гемовой щели свидетельствуют также

данные по связыванию флуоресцентной метки 1-аминонафталин-8-сульфоукислоты с *apo*HRP-с [10, 11, 13].

Таким образом, кажущиеся константы протонирования функциональных групп в активном центре пероксидазы сильно смещены в сторону низких значений  $pK$ , т. е. кислотноосновные свойства функциональных групп в активном центре фермента в значительной степени отличаются от свойств этих групп в водных растворах.

Микросреда может оказывать влияние не только на кислотноосновные свойства функциональных групп активного центра, но и на другие свойства, например на окислительно-восстановительный потенциал железа гема, величина которого зависит как от природы аксиальных лигандов, так и от свойств микросреды. При переходе от одного гембелка к другому стандартный окислительно-восстановительный потенциал феррогем-ферригем сильно изменяется. Для гемоглобина и миоглобина он составляет соответственно 0,14 и 0,05 В [22], для цитохрома *c* 0,26 В [23], для ряда цитохромов электронотранспортной цепи фотосинтеза от +0,3 до +0,4 В [24], в то время как для HRP — 0,27 В [22], цитохрома P-450 — 0,23 В [25]. В модельных опытах было показано, что такие сильные лиганды железа гема, как имидазол, метионин, в водных растворах изменяют стандартный окислительно-восстановительный потенциал гема от —0,12 до —0,21 и +0,02 В соответственно [26]. Смешанный имидазол-метиониновый комплекс гема имеет окислительно-восстановительный потенциал —0,05 В [26]. Таким образом, лиганды гема могут приводить как к увеличению, так и к уменьшению окислительно-восстановительного потенциала гема. Однако наиболее сильное влияние на окислительно-восстановительный потенциал гема оказывает неполярное окружение: окислительно-восстановительный потенциал дипиридинового комплекса гема в воде составляет 0,11 В, в то время как в бензоле 0,4 В [27]. В настоящее время считается общепринятым, что одним из лигандов железа гема в HRP, так же как и в гемоглобине, миоглобине, цитохроме *c*, является имидазол гистидина [2]. Для всех перечисленных гемовых белков, в том числе и для пероксидазы, как показано в настоящей работе, характерно неполярное окружение гема. Следовательно, различие в окислительно-восстановительных потенциалах может быть связано, во-первых, с различной степенью неполярности, во-вторых, с различной природой шестого лиганда гема. В цитохромах таким лигандом является метионин [3], и в модельных опытах это приводит к максимальному повышению окислительно-восстановительного потенциала. В гемоглобине лигандом выступает вода, и соответственно окислительно-восстановительный потенциал несколько ниже. В отношении пероксидазы природа шестого лиганда неясна: наличие воды в координационной сфере железа гема сомнительно [7, 12]. Шестой лиганд должен быть слабым, что могло бы объяснить спектры поглощения и спиновое состояние железа в пероксидазе. Для того чтобы объяснить низкое значение окислительно-восстановительного потенциала в пероксидазе, разумно предположить, что шестой лиганд несет на себе отрицательный заряд. Поскольку атом железа в ферригеме имеет положительный заряд +1, для стабилизации ферригема в неполярном окружении энергетически выгодно образование ионной пары с отрицательно заряженным шестым лигандом. Восстановление железа до двухвалентного снимает в этом случае положительный заряд с гема и в неполярном окружении появится отрицательный заряд шестого лиганда, что энергетически невыгодно. Таким образом, отрицательно заряженный шестой лиганд должен приводить к стабилизации ферригема по сравнению с феррогемом и, следовательно, к понижению окислительно-восстановительного потенциала. Более того, наличие отрицательно заряженного лиганда гема в пероксидазе должно способствовать стабилизации высокоокисленных форм железа в промежуточных соединениях  $E_1$  и  $E_2$  [2]. Ранее ряд авторов предположили, что шестым лигандом в пероксидазе является карбоксильная группа [28–30]. Следует от-

метить, что карбоксильная группа достаточно хорошо удовлетворяет тем требованиям к шестому лиганду гема, которые были сформулированы выше.

### Экспериментальная часть

В работе использовали изофермент с пероксидазы из хрена, выделенный по методу Шеннона [31] из продажного препарата фирмы Reanal (Венгрия) по методу [32]. Апопероксидазу получали по методу [12]. Протопорфирин IX (Calbiochem, США) употребляли без дополнительной очистки. В работе использовали трижды перегнанную в стекле воду.

Комплекс  $H_2Por - apoHRP-c$  получали следующим образом: к 3 мл 0,5 мМ раствора *apoHRP-c* в 0,01 М буфере трис-HCl (рН 8,0) добавляли 1,5-кратный избыток  $H_2Por$  в том же буфере и инкубировали 3 ч в темноте (все операции проводили при 4°С). После инкубирования раствор наносили на комбинированную колонку (17×2 см с сефадексом G-25 (тонкий) и 17×2 см с сефадексом А-25), уравновешенную 5 мМ Na-фосфатным буфером (рН 7,0), и элюировали тем же буфером.

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 HRP-c определяли по пиридингемохромогену, а  $H_2Por - apoHRP-c$  — по поглощению дикациона протопорфирина в 2,7 М HCl [33].

Для записи зависимости интенсивности флуоресценции от рН использовали непрерывный метод регистрации, как описано ранее [15], с некоторыми модификациями. В спектрофлуориметрическую кювету помещали 3,3 мл исследуемого раствора белка в 5 мМ  $Na_2HPO_4$ . Через специальный держатель в раствор вводили малые электроды G-2222 и K-4112 (Radiometer, Дания), связанные с рН-метром. Раствор перемешивали магнитной мешалкой, вмонтированной в кюветное отделение спектрофлуориметра. Изменение рН осуществляли добавлением микроколичеств 0,6 М HCl при помощи диффузной титрационной системы DTS-633 (Radiometer, Дания). Сигнал с рН-метра подавали на координату  $x$ , а сигнал с усилителя спектрофлуориметра — на координату  $y$  двухкоординатного самописца. рН-зависимость поглощения регистрировали на установке, описанной ранее в работе [18].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hemes and Hemoproteins (1966) Chance B., Estabrook R. W., Yonetani T., eds, Acad. Press, N. Y.
2. Dunford H. B., Stillman J. S. (1976) *Coord. Chem. Rev.*, **19**, 187–251.
3. Dickerson R., Timkovich R. (1975) in: *Enzymes*, vol. 11, Cytochromes c, Acad. Press, N. Y.
4. Braunitzer G., Hilse K., Rudloff V., Hilsehmann N. (1964) *Adv. Prot. Chem.*, **19**, 1–73.
5. Saunders B. G., Holmes-Siedle A. C., Stark B. P. (1964) *Peroxidase*, Butterworth, London.
6. Williams R. J. P., Wright P. E., Mazza G., Ricard J. R. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **412**, 127–147.
7. Vuk-Pavlovic S., Benko B. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1154–1159.
8. Champion P. M., Chiang R., Münk E., Debrunner P., Hager L. P. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4159–4166.
9. Asakura T., Leigh J. S., Jr., Drott H. R., Jonetani T., Chance B. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 861–865.
10. Rosen C. G., Nilson R. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **236**, 1–7.
11. Tao T. (1969) *Biopolymers*, **8**, 609–632.
12. Vuk-Pavlovic S., Siderer Y. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **79**, 885–889.
13. Rosen C. (1970) *FEBS Lett.*, **6**, 158–160.

14. Blumberg W. E., Peisach J., Wittenberg B. A., Wittenberg J. V. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1854-1862.
15. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1242-1250.
16. Алфимова Е. А., Лихтенштейн Г. И. (1976) в сб.: *Молекулярная биология*, т. 8, ч. II, с. 127-179, ВИНТИ, М.
17. Гурвинович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. П. (1968) *Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений*, «Наука и техника», Минск.
18. Савицкий А. П., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 259-267.
19. Цвирко М. П., Соловьев К. Н., Квюкшто В. Н., Градюшко А. Г. (1975) *Ж. прикл. спектроскопии*, **23**, 643-647.
20. Phelps Ch., Forlani L., Antonini E. (1974) *Biochem. J.*, **124**, 605-614.
21. Welinder K. G. (1976) *FEBS Lett.*, **72**, 19-23.
22. Harbury H. A. (1957) *J. Biol. Chem.*, **225**, 1009-1024.
23. Brandt K., Paris P., Czelinski G., Hess G. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 4180-4191.
24. Маковкина Л. Е., Местечкина Н. М., Кузнецов Б. А., Мугускин А. А., Пшенова К. В. (1978) *Биохимия*, **43**, 564-567.
25. Scheller F., Prümke H.-J. (1976) *Studia Biophysica*, **60**, 137-142.
26. Harbury H. A., Cronin J. R., Fanger M. W., Hettinger T. P., Murphy A. J., Meyer Y. P., Vinogradov S. N. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 1658-1664.
27. Kassner R. J. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2263-2267.
28. Rakshit G., Spiro Th. G. (1974) *Biochemistry*, **13**, 5317-5326.
29. Brill A. S., Williams R. J. P. (1961) *Biochem. J.*, **78**, 246-253.
30. Nickolle P. (1962) *Biochim. et biophys. acta*, **60**, 217-225.
31. Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166-2172.
32. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц В. М., Бровко Л. Ю. (1975) *Биохимия*, **40**, 257-261.
33. Falk J. E. (1964) *Porphyryns and Metallporphyryns*, Elsevier, Amsterdam - N. Y. - London.

Поступила в редакцию  
24.I.1979

После доработки  
13.II.1979

## MICROENVIRONMENT EFFECTS ON THE ACID-BASE PROPERTIES OF PROTOPORPHYRIN IX IN ITS SPECIFIC COMPLEX WITH APOPEROXIDASE

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

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

Absorbance and fluorescence spectra have been studied and their pH-dependences obtained for the protoporphyrin IX complex with horse-radish apoperoxidase and native enzyme. It has been shown that two hydrogen ions are added to the porphyrin molecule at the pH lower than 3. A considerable shift of the apparent pK (4 units) takes place on the protonation of the porphyrin pyrrolic ring in the specific complex as compared with aqueous solutions. From this shift, the dielectric constant is evaluated for the active site of the enzyme. The effects of the dielectric constant of the heme-binding site on the peroxidase redox potential are discussed. The probable requirements concerning the sixth ligand are formulated which may be essential for ensuring a low redox potential.