

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН,
Н. Н. УГАРОВА, Б. М. КЕРШЕНГОЛЬЦ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ РАВНОВЕСИЯ МЕЖДУ НАТИВНЫМ ФЕРМЕНТОМ И АПО-ФЕРМЕНТОМ ДЛЯ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ХРЕНА

В работах по изучению связи гемина с белками (¹⁻⁴) показано, что в ряде гемсодержащих белков существует равновесие между нативным белком, с одной стороны, и смесью гемина с апоферментом, с другой. При нейтральных рН это равновесие практически полностью смещено в сторону образования комплекса. Известны величины констант диссоциации K_d для гемоглобина, метмиоглобина и цитохрома B_2 , равные при нейтральных рН 10^{-13} , $4,5 \cdot 10^{-12}$, $4,5 \cdot 10^{-12}$ М, соответственно (²⁻⁴). Однако зависимость K_d от рН до сих пор не исследована, хотя она может дать полезную информацию о природе групп, участвующих в связывании гемина с белком.

Целью настоящей работы было нахождение K_d для пероксидазы из хрена (П.х), которая не была определена ранее. Мы также изучили влияние рН, состава раствора, природы субстратов на величину K_d . Следовало ожидать, что как и в случае других гемсодержащих белков для П.х величина K_d должна быть меньше чем 10^{-8} М. Подобные величины не могут быть определены с помощью спектрофотометрических методов, поэтому мы использовали метод, основанный на измерении активности пероксидазы в широком диапазоне концентраций фермента ($5 \cdot 10^{-12}$ — 10^{-8} М). Мы нашли, что в этом интервале концентраций активность П.х. не прямо пропорциональна концентрации введенного в раствор фермента [П.х.]₀, а зависимость активности его от [П.х.]₀ описывается вогнутой кривой. Полученные экспериментально зависимости активности от [П.х.]₀ были обработаны следующим образом. Диссоциация нативной П.х. на гемин и апо-П.х. описывается равновесием:



Общая концентрация П.х. в растворе является суммой:

$$[\text{П.х.}]_0 = [\text{П.х.}] + [\text{апо-П.х.}] \quad (2)$$

Пероксидазной активностью обладает только нативный фермент, активностью же несвязанного гемина можно практически пренебречь:

$$v_0 = \beta [\text{П.х.}] \quad (3)$$

Совместное решение уравнений (1)–(3) приводит к выражению, удобному для определения K_d :

$$[\text{П.х.}]_0 / v_0 = 1/\beta + \sqrt{K_d/\beta} \cdot 1/\sqrt{v_0} \quad (4)$$

В работе использовали препарат пероксидазы фирмы Кох-Лайт, свободный от солей, лиофилизированный, $D_{403}/D_{278} = 3,00$. Запасные растворы фермента готовили в растворе 0,1 М KNO_3 , который в одних случаях содержал, а в других — не содержал 0,01 N фосфатный буфер, рН 7,00. Концентрацию П.х. определяли по поглощению ферропиридинхромогена (⁷).

Растворы свежевозогнанного *o*-дианизидина (*o*-д-н) готовили по навеске в смеси спирт — вода (1:1). Растворы пирогаллола, очищенного возгонкой в токе химически чистого аргона, также готовили по навеске в 10^{-3} M HCl. 76–80%-ю H_2O_2 , о.с.ч., разбавляли до нужной концентрации, которую определяли спектрофотометрически⁽⁸⁾. Буферные растворы готовили в 0,1 M KNO_3 , причем ионная сила буфера составляла 0,01. pH измеряли на pH-метре фирмы «Радиометр» с точностью 0,01 ед. pH. Использовали только дважды перегнанную воду.

Приготавливали 10–15 растворов П.х. разбавлением исходного концентрированного раствора фермента 0,1 M раствором KNO_3 , содержащим либо не содержащим 0,01 N фосфатный буфер, pH 7,0. Концентрация фермента в запасных растворах составляла 10^{-10} – $2 \cdot 10^{-7}$ M. При определении активности этих растворов П.х. в кварцевую кювету ($l=1$ см) вносили 2 мл соответствующего буферного раствора и 0,1 мл раствора П.х., смесь инкубировали в термостатированной ячейке спектрофотометра в течение 10 мин., затем добавляли 0,1 мл раствора субстрата и 0,1 мл раствора H_2O_2 и после быстрого перемешивания регистрировали образование продукта реакции по увеличению оптической плотности растворов при 430 мμ в случае пирогаллола и при 460 мμ в случае *o*-дианизидина на спектрофотометре SP-1800 фирмы Пай Уникам. Отклонение от линейной зависимости между концентрацией П.х. и ее активностью, особенно заметное при малых концентрациях П.х., могло быть также следствием сорбции фермента из раствора на стенках реакционного сосуда. Специальными опытами мы показали, что активность П.х. не зависит от величины отношения поверхности реакционного сосуда к его объему. Следовательно, сорбция фермента на стенках реакционного сосуда не является причиной наблюдавшихся на опыте отклонений от линейной зависимости между активностью и концентрацией П.х.

Мы определяли значение K_d при pH 7,0 и исследовали влияние природы и концентрации субстратов на величину K_d . Результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что данные факторы практически не влияют на K_d .

Величина K_d , однако, существенно зависит от состава раствора, в котором приготовлен фермент. Если растворы П.х. готовили в 0,1 M KNO_3 , содержащем 0,01 N фосфатный буфер, то при pH 7,00 величина K_d оказалась равной $3 \cdot 10^{-12}$ M, причем активность фермента не изменялась в течение длительного времени при хранении растворов фермента при 4° (более 1 мес.). Если же запасные растворы П.х. готовили в 0,1 M KNO_3 , не содержащем фосфатного буфера, то величина K_d повышалась примерно на два порядка. При длительном хранении таких растворов П.х. наблюдали некоторую инактивацию фермента (на ~40% за 16 дней при 4°). Следовательно, присутствие фосфат-ионов стабилизирует П.х. и уменьшает ее константу диссоциации K_d .

Были определены величины K_d при различных значениях pH (табл. 2). Во всем изученном диапазоне pH (3,5–11,8) при 25° в ходе опытов не наблюдалась инактивации фермента. При pH < 3,5 точное измерение K_d

Таблица 1

[П.х.] $\cdot 10^{10}$, M	[H_2O_2], M	[<i>o</i> -д-н], M	[Пирогаллол], M	pK_d
0,05–11,2	$2,65 \cdot 10^{-5}$	$2,53 \cdot 10^{-4}$	—	$11,4 \pm 0,4$
0,05–11,2	$2,92 \cdot 10^{-4}$	$2,53 \cdot 10^{-4}$	—	$11,5 \pm 0,4$
0,05–11,2	$3,21 \cdot 10^{-3}$	$2,53 \cdot 10^{-4}$	—	$11,2 \pm 0,4$
0,10–9,7	$2,65 \cdot 10^{-5}$	$3,61 \cdot 10^{-4}$	—	$12,0 \pm 0,4$
0,13–9,7	$2,65 \cdot 10^{-5}$	$3,28 \cdot 10^{-5}$	—	$11,5 \pm 0,4$
0,07–6,6	$2,92 \cdot 10^{-4}$	—	$2,65 \cdot 10^{-3}$	$11,1 \pm 0,4$

оказалось невозможным, так как в этих условиях наблюдается заметная инактивация пероксидазы. Зависимость pK_d от pH показана на рис. 1. Видно, что в интервале pH 6–8,5 величина pK_d практически постоянна. При меньших значениях pH наблюдается небольшое понижение pK_d (наклон $\sim 0,2$). При $pH > 8,5$ величина pK_d заметно понижается, причем в области pH 10,5–11,8 наклон полученной кривой близок к 1.

Полученные результаты позволяют сделать ряд предположений о природе групп белка, участвующих в образовании комплекса апо-П.х. с гемином. Как видно из рис. 1, в щелочной области при pH 9–11 проявляется одна основная группа с pK 9,5–9,7. Естественно предположить, что эта группа образует в протонированном состоянии связь с одной из депротонированных карбоксильных групп гемина. Такой группой может быть, например, ϵ -аминогруппа лизина, что согласуется с предположениями Маэли⁽⁹⁾.

pK второй основной группы не проявляется до pH 11,8. При более высоком значении pH могла бы проявиться только гуанидиновая группа аргинина ($pK \sim 12,5$), которая по-видимому, связывается со вторым пропionoвокислым остатком гемина. Зависимость pK_d от pH в области $pH < 6,0$ свидетельствует о том, что в данной области pH проявляется некая группа, протонирование которой лишь несколько уменьшает pK_d . Весьма вероятно, это именно та группа белка, которая образует координационную связь с атомом железа гемина. По мнению ряда авторов^(10, 11) такой может быть имидазольная группа гистидина.

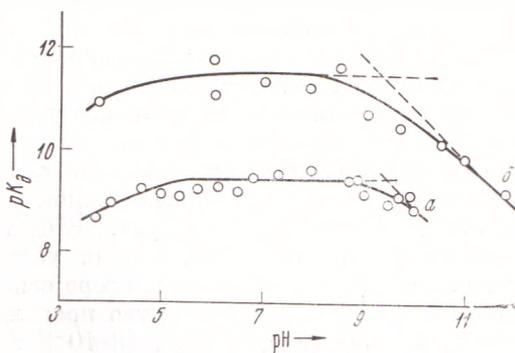


Рис. 1. Зависимость pK_d от pH для пероксидазы из хрена. Условия: а — П.х. растворена в 0,1 М KNO_3 , $[П.х.] = (1,2-80) \cdot 10^{-10}$ М, $[o$ -дианизидин] $= 4,3 \cdot 10^{-5}$ М, $[H_2O_2] = 1,15 \cdot 10^{-4}$ М б — П.х. растворена в 0,1 М KNO_3 , содержащем 0,01 N фосфат, pH 7,0 $[П.х.] = (0,06-367,3) \cdot 10^{-10}$ М, $[o$ -дианизидин] $= 6,2 \cdot 10^{-5}$ М, $[H_2O_2] = 1,15 \cdot 10^{-4}$ М

Таблица 2

П.х. растворена в 0,1 М KNO_3 , содержащем 0,01 N фосфатный буфер, pH 7,00			П.х. растворена в 0,1 М KNO_3		
буфер	pH	$K_d \cdot 10^{12}$	буфер	pH	$K_d \cdot 10^{10}$
Ацетат	3,50	$10,7 \pm 9,8$	Ацетат	3,68	$22,2 \pm 9,8$
	6,00	$8,0 \pm 6,5$		4,00	$10,8 \pm 4,9$
Цитрат-фосфат	6,00	$1,5 \pm 1,2$	Фосфат	4,61	$5,3 \pm 0,5$
	7,00	$3,7 \pm 3,4$		5,00	$7,1 \pm 0,2$
Борат	7,90	$5,4 \pm 4,6$	Фосфат	5,42	$7,1 \pm 0,2$
	8,50	$1,6 \pm 1,5$		5,66	$5,0 \pm 0,5$
Карбонат	9,10	$22,7 \pm 3,0$	Борат	6,06	$4,5 \pm 0,7$
	9,70	$32,4 \pm 12,4$		6,48	$6,3 \pm 0,9$
	10,50	$61,6 \pm 30,2$		6,86	$3,2 \pm 1,2$
				7,33	$2,8 \pm 0,5$
Боратно-щелочной	11,0	$120,4 \pm 53,6$	Борат	7,91	$2,7 \pm 0,3$
	11,80	$526,0 \pm 156,0$		8,75	$3,7 \pm 0,4$
Карбонат			8,93	$3,6 \pm 1,2$	
			9,01	$7,3 \pm 1,2$	
			9,52	$10,7 \pm 3,1$	
			9,74	$6,1 \pm 0,4$	
			9,88	$5,8 \pm 1,7$	
			9,96	$13,9 \pm 4,9$	

Однако протонирование ее не оказывает существенного влияния на величину K_d , так как другие более прочные связи гидрофобного и электростатического характера между геминим и апо-П.х. препятствуют резкому изменению K_d с уменьшением рН.

рК пропионовокислых групп гемина не проявляются в области рН, больших 3,5. Следовательно, рК этих групп сильно смещены в кислую область. Протонирование их должно приводить к заметному нарушению связи гемина с белком. Известно (¹²), что гемин с этерифицированными пропионовокислыми остатками почти не связывается с апо-П.х., т. е. протонирование пропионовокислых групп гемина должно значительно уменьшать рК_d. При этом должна сильно возрастать равновесная концентрация апо-П.х. Согласно нашим данным, при рН < 4,0, при 25° апо-П.х. быстро денатурирует, следствием чего является и довольно быстрая денатурация П.х. в этих условиях. Данные в литературе (¹¹) указывают на сходство в характере связи между геминим и белком в метмиоглобине и П.х. Это сходство проявляется и в близких значениях констант диссоциации для П.х. ($3 \cdot 10^{-12} M$ — наши данные, рН 7,00) и для метмиоглобина ($4,5 \cdot 10^{-12} M$, рН 7,0 (⁴)).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 IX 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Rossi-Fanelli, E. Antonini, *J. Biol. Chem.*, **235**, PC4 (1960). ² R. Banerjee, *Biochim. et biophys. acta*, **64**, 368 (1962). ³ A. Rossi-Fanelli, E. Antonini, A. Caputo, *Adv. Protein. Chem.*, **19**, 143 (1964). ⁴ P. Pajot, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 887 (1971). ⁵ T. Yonetani, *J. Biol. Chem.*, **242**, 5008 (1967). ⁶ S. B. Brown, T. K. Dean, P. Jones, *Biochem. J.*, **117**, 733 (1970). ⁷ K. G. Paul, H. Theorell, A. Akerson, *Acta chem. scand.*, **7**, 1284 (1953). ⁸ P. George, *Biochem. J.*, **54**, 267 (1953). ⁹ A. C. Maehly, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **44**, 430 (1953). ¹⁰ J. Nakamura, M. Tohjo, K. Shibata, *ibid.*, **102**, 144 (1963). ¹¹ T. Asakura, T. Yonetani, *J. Biol. Chem.*, **244**, 537, 4573 (1969). ¹² M. Tamura, T. Asakura, T. Yonetani, *Biochim. et biophys. acta*, **268**, 292 (1972).