



УДК 577.112.854.088.5 : 543.424

СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО  
РАССЕЯНИЯ МИКРОПЕРОКСИДАЗЫ-11*Разумас В. Й., Казлаускайте Ю. Д.,  
Видугирис Г.-Й. А., Кулис Ю. Ю.**Институт биохимии Академии наук ЛитССР, Вильнюс*

Из анализа спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) геминсодержащего ундекапептида цитохрома *c* (MP-11) следует, что MP-11 необратимо адсорбируется на гидрозоле серебра с сохранением ковалентной связи между полипептидом и порфириновым циклом при непосредственном контакте последнего с металлом. Гемовое железо адсорбированных молекул находится в окисленном низкоспиновом состоянии. Полипептидная цепь MP-11 на поверхности серебра, по-видимому, находится в неупорядоченном состоянии, затрудняя десорбцию гемина.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) широко используется при изучении структурно-функциональных свойств биологических объектов на границе раздела металл/раствор [1—3]. Для получения детальной информации о поведении адсорбированных белков весьма перспективным представляется использование в этих исследованиях низкомолекулярных пептидов — моделей ферментов.

Цель настоящей работы — получение и изучение спектров ГКР ундекапептида (H-Val-Gln-Lys-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Gly-OH), содержащего ковалентно связанный с остатками цистеина протопорфирина IX. Этот геминсодержащий полипептид получают при гидролизе цитохрома *c* пепсином [4] и рассматривают в качестве модели гемсодержащих белков и ферментов [5]. Полипептид используют при изучении биологических ультраструктур [6]. Пероксидазная активность полипептида определила его тривиальное название — микропероксидаза-11 (MP-11). Поскольку MP-11 в качестве пятого аксиального лиганда геминового железа содержит гистидин, в работе проанализированы также спектры ГКР *L*-гистидина.

Гидрозоль серебра обладает максимумом поглощения при 390 нм. Добавление к коллоидному раствору MP-11 до 4,3 мкМ концентрации приводит к уменьшению интенсивности поглощения и возникновению новой широкой полосы в области 500 нм, положение которой нестабильно во времени (рис. 1). При наличии в золе 40 мМ гистидина также наблюдается уменьшение его поглощения при 390 нм и возникновение широкой полосы при 540 нм (рис. 2). Спектр комплекса золь—аминокислота стабилен во времени. Возникновение низкоэнергетического перехода гидрозоля в растворах MP-11 и гистидина может быть объяснено переносом заряда с металла на молекулу хемосорбированного вещества и агрегацией мицелл серебра [2].

Спектр ГКР адсорбированного на гидрозоле гистидина приведен на рис. 3. Линии спектра ГКР при 461, 772, 950, 1000, 1317 и 1356 см<sup>-1</sup> отвечают деформационным колебаниям нейтрального имидазольного кольца гистидина [7]. Полосы при 1583 и 1633 см<sup>-1</sup> обусловлены смещением деформационных колебаний скелета и связи N—H имидазольного цикла [7]. Максимум при 1400 см<sup>-1</sup>, по-видимому, отражает симметричные деформационные колебания ионизированной карбоксильной группы [8]. В спектре ГКР гистидина обнаруживается новая линия при 217 см<sup>-1</sup>, обусловленная комплексом серебро—гистидин. Возможно, что она вызвана взаимодействием серебра с атомом азота имидазольного цикла [9].

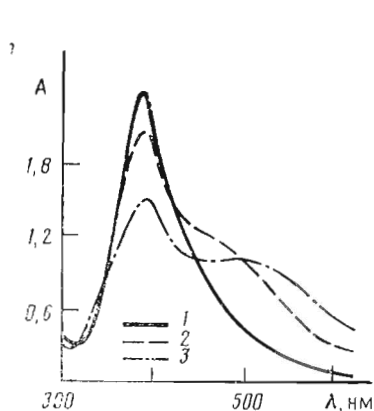


Рис. 1

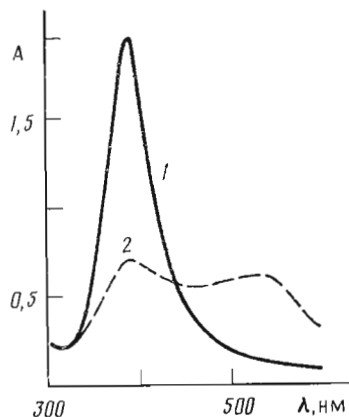


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения чистого гидрозоля серебра (1) и при наличии 4,3 мкМ микропероксидазы-11, полученные сразу после смешивания (2) или после выдерживания в течение 2 сут при 20° С (3). Водные растворы, рН 7,0

Рис. 2. Спектр поглощения гидрозоля серебра в отсутствие (1) и при наличии 40 мМ гистидина (2). Водные растворы, рН 7,0

На рис. 3 представлен спектр ГКР МР-11, а в таблице приведено отношение соответствующих спектральных линий. Как следует из этих данных, в спектре МР-11 в основном проявляются колебания порфиринового цикла. Ряд полос колебаний порфирина подвержен влиянию химических превращений центрального атома железа [8]. Полоса  $\nu_4$  чувствительна

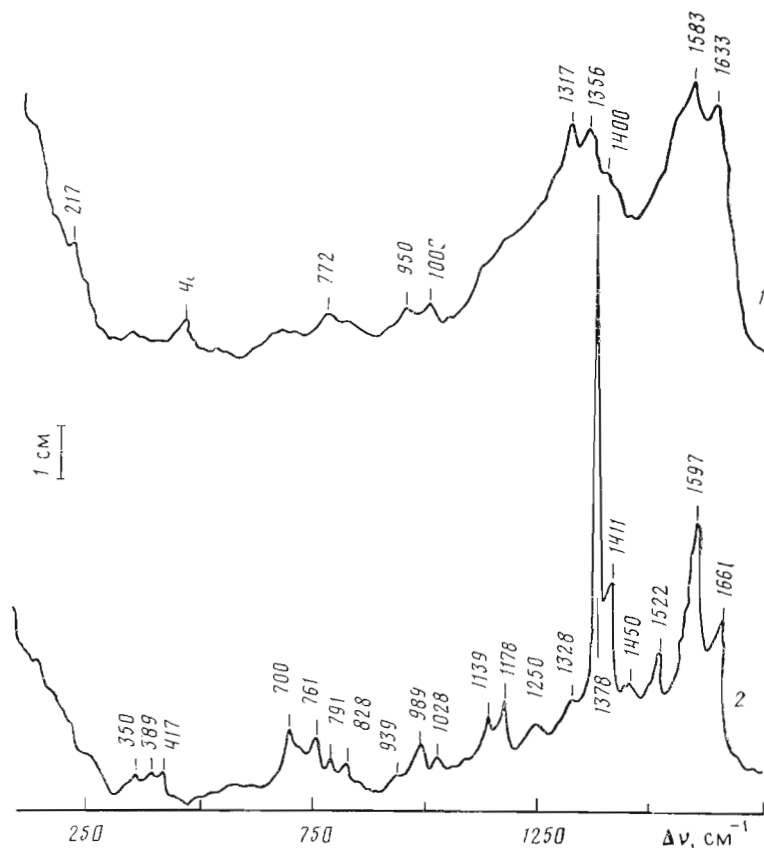


Рис. 3. Спектры ГКР 40 мМ гистидина (1) и 4,3 мкМ микропероксидазы-11 (2) на гидрозоле серебра.  $\lambda_{\text{возб}}$  488 нм. Водные растворы, рН 7,0

Обозначения и отнесения линий в спектре ГКР микропероксидазы-11 на гидрозоле серебра (данные [10, 11])

$\Delta\nu$ , $\text{см}^{-1}$	Обозначение	Тип симметрии	Отнесение к типу колебаний
350	$\nu_8$	$A_{1g}$	$\delta(C_\beta R)$ , $\nu(C_\alpha C_m)$
389	$2\nu_{35}$	$B_{2g}$	$\delta(C_\beta R)$
417	—	—	$\nu(\text{Fe—N гистидина})$
700	—	—	$\nu(\text{CS})$
761	$\nu_{16}$	$B_{1g}$	$\delta(C_\alpha \text{NC}_\alpha)$ , $\nu(C_\beta R)$
791	$\nu_{32}$	$B_{2g}$	$\delta'(C_\beta R)$ , $\delta(C_\alpha C_m)$
828	—	—	—
939	$\nu_{46}$	$E_u$	$\nu'(C_\beta R)$ , $\delta'(C_\alpha C_m)$
989	$\nu_{45}$	$E_u$	$\nu'(C_\alpha \text{N})$ , $\nu'(C_\alpha C_m)$
1028	$\nu_{23}$	$A_{2g}$	$\nu'(C_\alpha C_\beta)$ , $\nu'(C_\beta R)$
1139	$\nu_{43}$	$E_u$	$\nu'(C_\beta R)$ , $\nu'(C_\alpha \text{N})$
1178	$\nu_{30}$	$B_{2g}$	$\nu'(C_\beta R)$ , $\nu'(C_\alpha \text{N})$
1250	$\nu_{13}$ или Амид-III	$B_{1g}$	$\delta(C_m \text{H})$ , $\nu(C_\alpha C_\beta)$
1328	—	—	$\delta(\text{N—H})$
1378	$\nu_4$	$A_{1g}$	$\delta(\text{R гистидина})$ $\nu(C_\alpha \text{N})$ , $\delta(C_\alpha C_m)$
1441	$\nu_{29}$ или $\delta_{\text{COO}^-}$	$B_{2g}$	$\nu'(C_\alpha C_\beta)$ , $\nu'(C_\beta R)$ $\delta(\text{COO}^-)_{\text{сим}}$
1450	$\nu_{40}$	$E_u$	$\nu'(C_\alpha C_\beta)$ , $\nu'(C_\beta R)$
1522	$\nu_3$	$A_{1g}$	$\nu(C_\alpha C_m)$ , $\nu(C_\alpha C_\beta)$
1597	$\nu_2$	$A_{1g}$	$\nu(C_\beta C_\beta)$ , $\nu(C_\beta R)$
1661	$\nu_{10}$ или Амид-I	$B_{1g}$	$\nu(C_\alpha C_m)$ , $\nu(C_\alpha C_\beta)$ $\nu(\text{C=O})$

Примечание.  $\delta$  и  $\nu$  — деформационные и валентные колебания, симметричные относительно  $C_2$ -оси симметрии пиррольного цикла, а  $\delta'$  и  $\nu'$  — антисимметричные; индексы  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $m$  указывают на альфа-, бета- и мезо-углеродные атомы порфиринового цикла; R — функциональная группа у  $C_\beta$  или цикла имидазола гистидина; сим — симметричные.

к состоянию окисления и, как правило, лежит в области 1358—1377  $\text{см}^{-1}$ . Восстановление атома железа вызывает ее сдвиг в низкочастотную область. Поскольку при адсорбции МР-11 на гидрозоле частота колебания  $\nu_4$  наблюдается при 1378  $\text{см}^{-1}$ , гемовое железо находится в окисленном ( $\text{Fe(III)}$ ) состоянии.

Полоса  $\nu_2$ , обнаруживаемая для большинства гемсодержащих белков в области 1552—1590  $\text{см}^{-1}$ , чувствительна к спиновому состоянию атома железа. Она обладает высокой интенсивностью. Сдвиг частоты в область меньших энергий наблюдается для высокоспинового железа из-за деформации плоскости порфиринового цикла или увеличения расстояния между центральным атомом железа и азотом пиррола. На основании наблюдаемой частоты полосы  $\nu_2$  следует, что  $\text{Fe(III)}$  в адсорбированной МР-11 находится в низкоспиновом состоянии, как и в кристаллическом препарате [5]. На частоту полосы  $\nu_2$  влияют также аксиальные лиганды. Полоса располагается при меньших частотах, когда шестым лигандом является сильный нуклеофил. В случае низкоспинового  $\text{Fe(III)}$ -цитохрома с  $\nu_2$  лежит в области 1582  $\text{см}^{-1}$  [12]. При наличии в качестве шестого лиганда  $\text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{N}_3^-$  наблюдаются также полосы в области 460—670  $\text{см}^{-1}$  [13], которые не обнаруживаются в спектре ГКР МР-11. Поэтому можно заключить, что адсорбированная МР-11 не имеет в качестве шестого аксиального лиганда сильного нуклеофила.

Полосы 1250 и 1661  $\text{см}^{-1}$  могут быть обусловлены колебаниями порфирина  $\nu_{13}$  и  $\nu_{10}$  соответственно. Не исключено, однако, что эти полосы связаны с колебаниями Амид-III и Амид-I полипептида. Амидное колебание III обусловлено деформационным колебанием связи N—H, а коле-

бание Амид-I — валентным колебанием карбонильной связи. Частоты  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры лежат обычно в областях 1265—1300 и 1645—1600, 1230—1240 и 1665—1680  $\text{см}^{-1}$  соответственно, а для конформационно-неупорядоченного состояния — в областях 1240—1260 и 1660—1670  $\text{см}^{-1}$  [8]. Если в спектре ГКР МР-11 полосы 1250 и 1661  $\text{см}^{-1}$  обусловлены колебаниями Амид-III и Амид-I, можно заключить, что полипептид находится в конформационно-неупорядоченном состоянии.

При исследовании спектров ГКР адсорбированных на гидрозоль серебра гемоглобина, цитохромов  $b_5$  и  $c$  наблюдается высвобождение порфирина из белковой глобулы с образованием  $\mu$ -оксо-бисгемина, который в спектре ГКР характеризуется интенсивной полосой при 1489  $\text{см}^{-1}$  [14]. В спектре ГКР МР-11 данной полосы не наблюдается, из чего следует, что при адсорбции МР-11 на гидрозоле гем от полипептида не отщепляется.

Спектр ГКР МР-11 не меняется при дополнительном введении 40 мМ гистидина, хотя известно, что он способен координироваться с гемовым железом в шестом аксиальном положении [4]. Отсюда следует, что МР-11 адсорбируется на серебре необратимо. Порфириновое кольцо, по-видимому, контактирует с поверхностью металла. Об этом свидетельствует усиление главным образом колебаний порфиринового кольца, а также то, что спектр ГКР гистидина не меняется после введения 4,3 мкМ МР-11. Возможно, что полипептидная цепь МР-11, покрывая гемин со стороны раствора, затрудняет ее десорбцию.

Авторы выражают благодарность В. Шаблинскому и В. Алексе за содействие при выполнении спектроскопических измерений.

### Экспериментальная часть

В работе использовали натриевую соль МР-11 (Sigma, США). Концентрацию полипептида определяли спектрофотометрически ( $\epsilon_{238} = 1,57 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [15]). *L*-Гистидин — фирмы Reanal (ВНР). Все остальные реактивы — отечественного производства.

Гидрозоль серебра получали смешиванием водных растворов 2 мМ  $\text{NaBH}_4$  и 1 мМ  $\text{AgNO}_3$  в объемном соотношении 3:1. Гидрозоль выдерживали 2 ч при 20° С, после чего рН доводили до 7,0 концентрированным раствором  $\text{NaOH}$ . Комплексы гидрозоля с МР-11 или гистидином получали, смешивая 4 мл гидрозоля с 0,1 мл 175 мкМ водного раствора полипептида или с 1 мл 0,2 М водного раствора гистидина при рН 7,0.

Спектры поглощения гидрозоля и его комплексов с МР-11 или гистидином регистрировали с помощью спектрофотометра «Specord M-40» (ГДР). Спектры ГКР получали с использованием автоматизированного на базе микро-ЭВМ ДВК-1 спектрометра ДФС-12 (кафедра общей физики и спектроскопии факультета физики Вильнюсского государственного университета). Для возбуждения спектров использовали аргонный лазер ПЛА-120 (ГДР) с длиной волны 488 нм и мощностью 200 мВт. Спектральная ширина щели 6  $\text{см}^{-1}$ .

### ЛИТЕРАТУРА

1. Cotton T. M. // Surface and interfacial aspects of biomedical polymers. V. 2. / Ed. Andrade J. D. N. Y.: Plenum Press, 1985. P. 161—166.
2. Набиев И. Р., Чуманов Г. Д. // Биофизика. 1986. Т. 31. С. 183—190.
3. Разумас В. Й., Видуигурис Г.-Й. А., Кулис Ю. Ю. // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 967—1001.
4. Harbury H. A., Loach P. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1959. V. 45. № 9. P. 1344—1348.
5. Peterson J., Saleem M. M. M., Silver J., Wilson M. T., Morrison I. E. // J. Inorg. Biochem. 1983. V. 19. P. 165—167.
6. Feder N. // J. Histochem. Cytochem. 1970. V. 18. № 12. P. 911—919.
7. Caswell D. S., Spiro T. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 21. P. 6470—6475.
8. Кэпу П. Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. М.: Мир, 1985. 272 с.
9. King F. W., Van-Duyne R. P., Schatz G. C. // J. Chem. Phys. 1978. V. 69. № 10. P. 4472—4480.
10. Abe M., Kitagawa T., Kyogoku Y. // J. Chem. Phys. 1970. V. 69. № 10. P. 4526—4531.
11. Desbois A., Mazza G., Stetzkowski P., Lutz M. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 785. P. 161—176.
12. Spiro T. G., Burker J. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. P. 5482—5489.
13. Desbois A., Lutz M., Banerjee R. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 1510—1518.

14. Smulevich G., Spiro T. G. // J. Phys. Chem. 1985. V. 89. № 24. P. 5168—5175.  
15. Aron J., Baldwin D. A., Marques H. M., Pratt J. M., Adams P. A. // J. Inorg. Biochem. 1986. V. 27. P. 227—230.

Поступила в редакцию  
27.VI.1988

#### SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING OF MICROPEROXIDASE-11

RAZUMAS V. J., KAZLAUSKAITE J. D., VIDUGIRIS G.-J. A., KULYS J. J.

*Institute of Biochemistry, Lithuanian Academy of Sciences, Vilnius*

Analysis of the surface enhanced Raman scattering (SERS) of a hemin-containing undecapeptide of cytochrome *c* (MP-11) shows that MP-11 is adsorbed irreversibly on silver hydrosol with the retention of the covalent bond between the peptide and the porphyrin and in the latter's direct contact with the metal. The iron atom of the adsorbed molecule is in an oxidized low-spin state. Evidently, the polypeptide chain of MP-11 on the silver surface is disordered, thus preventing the desorption of hemin.