



УДК 577.158.52.02

**СТАБИЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА
ПРИ АЦЕТИЛИРОВАНИИ ФЕРМЕНТА
И В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ***Кутузова Г. Д., Угарова И. Н.**Кафедра химической энзимологии Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Проведена модификация пероксидазы хрена искусственным ангидридом и показано, что степень модификации NH_2 - и OH -групп зависит от избытка ангидрида и температуры. Изучено влияние степени модификации и природы модифицируемых групп на активность и термостабильность фермента. Модификация 3-4 NH_2 -групп существенно увеличивает термостабильность пероксидазы, модификация поверхностных OH -групп не влияет, а внутренних — уменьшает термостабильность. Предполагается, что по доступности модифицирующим агентам и вкладу в стабилизацию структуры нативного фермента можно выделить три типа функциональных групп. Модификация которых не влияет, увеличивает или уменьшает термостабильность фермента. Показано, что термостабильность нативной и ацетилированной пероксидазы увеличивается в присутствии добавок ионов Ca^{2+} , а значительное повышение ионной силы раствора дестабилизирует как нативную, так и ацетилированную пероксидазу. Сделан вывод о важной роли электростатических взаимодействий в стабилизации нативной и ацетилированной пероксидазы.

Химическая модификация и введение в среду специфических ионов широко используются для повышения термостабильности ферментов. Детальное исследование этих воздействий на свойства ферментов позволяет не только выявить оптимальные для стабильности условия, но и выяснить механизм стабилизации нативного или модифицированного фермента и оценить относительный вклад модификации различных функциональных групп и различных физико-химических взаимодействий в стабилизацию нативной структуры фермента.

Одной из задач настоящей работы являлось детальное исследование влияния степени модификации и природы модифицируемых функциональных групп на каталитическую активность и термостабильность фермента на примере ацетилирования пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7).

С другой стороны, изучение совместного влияния различных стабилизирующих или дестабилизирующих воздействий (химической модификации, солей, специфических ионов металлов) на ферменты позволяет выяснить, сколь аддитивны эти воздействия. Аддитивность следует ожидать в том случае, когда оба фактора действуют на различные участки молекулы фермента независимо друг от друга.

Как было недавно показано, молекула пероксидазы содержит два иона Ca^{2+} , которые можно удалить только в присутствии хлоргидрата гуанидина и EDTA, при этом заметно уменьшается термостабильность фермента [1].

В связи с этим мы изучили влияние добавок ионов Ca^{2+} на термоста-

Число и химическая природа ацелированных функциональных групп пероксидазы

Препарат	Условия модификации, рН 8,0		Число модифицированных групп		
	[ангидрид], [фермент] моль/моль	t, °C	NH ₂ -группы	ОН-группы (кроме остатков Тур)	ОН-группы остатков Тур
0*	—	—	6*	150*	5*
1	12	0	3,2	1	0
2	36	0	3,5	3	0
3	240	0	4,1	12	0
4	900	0	4,0	30	1
5	840	22	2,7	20	1
6	960	40	2,9	20	2

* Препарат нативного фермента; указано исходное содержание соответствующих немодифицированных групп.

бильность нативной и ацелированной пероксидазы, что позволило сделать предположения о механизме стабилизации фермента при химической модификации и в присутствии ионов Ca²⁺.

Влияние концентрации реагентов и температуры на степень модификации и химическую природу ацелированных функциональных групп фермента. Пероксидаза хрена (изофермент С) содержит 6 ε-NH₂-группы лизиновых остатков, 50 ОН-группы остатков серина и треонина, 5 ОН-группы остатков тирозина и около 100 ОН-групп в восьми углеводных цепях фермента [2].

В зависимости от соотношения концентраций уксусный ангидрид — фермент и от температуры реакции мы получили препараты пероксидазы с различным количеством модифицированных NH₂- и ОН-групп. N-Ацетилимидазол образуется только в специальных условиях [3], и в используемых нами условиях модификации имидазольного остатка гистидина не могло происходить. Как показано в табл. 1, при 0° С степень модификации как NH₂-, так и ОН-групп повышается при увеличении избытка уксусного ангидрида, причем уже при 12-кратном избытке ангидрида модифицируются 3 NH₂-группы, а при 240-кратном — все 4 NH₂-группы, доступные в пероксидазе при 0° С [4]. Степень модификации ОН-групп при небольших избытках ангидрида мала (1—3 группы) и возрастает до 31 только при использовании большого избытка реагента. Следовательно, реакционная способность NH₂-групп при 0° С гораздо выше, чем ОН-групп пероксидазы.

Модификация ОН-группы остатка тирозина при 0° С происходит лишь при больших избытках ангидрида (препарат 4, табл. 1).

Использование одинакового ~900-кратного избытка уксусного ангидрида при 0, 22 и 40° С дало возможность проследить влияние температуры на процесс модификации (препараты 4—6, табл. 1). При 0° С модифицируются 4, а при 22 и 40° С — лишь 3 NH₂-группы. Наблюдается уменьшение и числа модифицируемых ОН-групп (кроме гидроксильных групп тирозиновых остатков): от 30 групп при 0° С до 20 групп при 22 и 40° С. Снижение степени модификации при повышении температуры и изменение соотношения между количеством модифицированных NH₂- и ОН-групп связано скорее с неустойчивостью реагента и кинетическими особенностями реакции различных групп с ангидридом, а не с уменьшением доступности функциональных групп пероксидазы при повышении температуры. Этот вывод подтверждается тем, что другой модифицирующий агент — тринитробензолсульфокислота модифицирует при 40° С все 6 NH₂-групп пероксидазы [4].

В пероксидазе хрена титруется только 1 остаток тирозина с нормальным рК, а остальные 4 остатка расположены внутри глобулы [5]. При 0

и 22° С укусным ангидридом модифицируется 1 остаток тирозина, а при 40° С — 2. Это подтверждает сделанные ранее выводы о том, что при 40° С пероксидаза имеет более рыхлую структуру [4], из-за чего повышается доступность внутренних функциональных групп модифицирующим агентам. Возможно, что при 40° С кроме остатков тирозина модифицируются внутренние ОН-группы остатков серина и треонина. Таким образом, препарат 6 отличается от препаратов 1—5 модифицированной пероксидазы тем, что в нем модифицированы и внутренние ОН-группы белка. Именно модификация внутренних функциональных групп оказывает наиболее драматическое воздействие на свойства фермента, как это было показано ранее [4, 6—8]. Это подтверждают и результаты, приводимые ниже.

Устойчивость ковалентных связей, образованных при модификации пероксидазы укусным ангидридом. Ацилированные ангидридами монокарбоновых кислот NH₂-группы белков устойчивы в широком диапазоне рН и температур [9]. Инкубируя в течение 3 ч при 70° С и рН 7,0 препарат 4 с наибольшим числом ацилированных ОН-групп, мы не наблюдали уменьшения их количества. Следовательно, в нейтральных растворах О-ацетильные производные пероксидазы устойчивы даже при высокой температуре. Однако в присутствии гидроксилamina О-ацетильные группы лабильны [9, 10]. С помощью гидроксилamina при рН 6,7 мы проводили гидролиз О-ацетилтирозининовых остатков, а при рН 12,2 снимали ацетильные группы со всех модифицированных ОН-групп пероксидазы. N-Ацетильные производные были устойчивы в присутствии гидроксилamina [10]. Таким образом, при обработке гидроксилaminом препаратов 1—6 при рН 6,7 мы получали пероксидазу, где были модифицированы NH₂- и ОН-группы, кроме гидроксильных групп остатков тирозина, а при рН 12,2 — фермент, где были модифицированы только NH₂-группы. Сравнение свойств и термостабильности модифицированной пероксидазы до и после обработки гидроксилaminом позволило изучить отдельно влияние модификации NH₂- и ОН-групп на свойства фермента.

Спектры поглощения препаратов 1—5 ацилированной пероксидазы при 260—700 нм практически совпадают со спектром нативного фермента, лишь несколько уширяется плечо в области 385 нм. Для препарата 6 наблюдается некоторое увеличение коэффициента экстинкции ниже 380 нм и выше 550 нм без изменения положения максимума.

Каталитическая активность модифицированной пероксидазы при рН 7,0 не отличается от активности нативного фермента для препаратов 1—5 независимо от того, были они обработаны гидроксилaminом или нет. Каталитическая же активность препарата 6 составляет всего 31% от исходной. После снятия ацетильных групп с ОН-групп остатков тирозина активность увеличивается до 52% от исходной, а после полного дезацетилирования ОН-групп активность увеличивается до 65% от исходной. Следовательно, только при модификации внутренних функциональных групп пероксидазы наблюдается значительное уменьшение активности фермента. Эти группы, особенно тирозиновый остаток, по-видимому, играют важную роль в формировании каталитического центра фермента, а возможно, и в его функционировании.

Термостабильность ацилированной пероксидазы при рН 7,0. На рис. 1 показана зависимость константы скорости инактивации фермента (60° С) от числа модифицированных NH₂-групп для препаратов пероксидазы, у которых модифицированы: 1) NH₂- и ОН-группы; 2) только NH₂-группы. Для всех препаратов, кроме шестого, $k_{ин}$ не зависит от степени модификации ОН-групп при одной и той же степени модификации NH₂-групп (ср. препараты 1 и 2, 3 и 4). Следовательно, степень ацилирования поверхностных ОН-групп не влияет на термостабильность пероксидазы. Это верно и для других температур инактивации в диапазоне 60—75° С (данные не приведены). Таким образом, только модификация заряженных при рН 7,0 NH₂-групп пероксидазы стабилизирует фермент

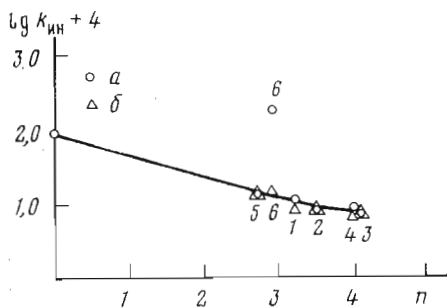


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость константы скорости термоинактивации ($k_{ин}$) ацелированных препаратов пероксидазы 1–6 (табл. 1) при 60°C от числа модифицированных NH_2 -групп (n) до (а) и после (б) деацелирования OH -групп этих препаратов с помощью гидроксиламина при pH 12,2. Цифры обозначают номер препарата модифицированной пероксидазы (табл. 1)

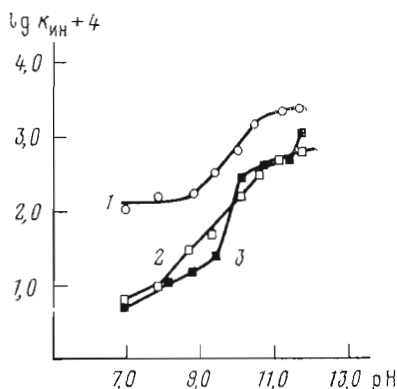


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость $k_{ин}$ при 60°C от pH для нативной (1) и модифицированной укусным ангидридом пероксидазы (2, 3). Обозначения: 2 – модифицированы 4 NH_2 -группы, 0-деацелированный препарат 3 (табл. 1); 3 – модифицированы 4 NH_2 - и 12 OH -групп (препарат 3, табл. 1)

(рис. 1). Препарат 6 по термостабильности (как и по активности) резко отличается от других препаратов. Термостабильность его меньше, чем нативной пероксидазы, при 60°C (рис. 1) и при 65°C (в 10 раз). Однако после деацелирования всех модифицированных OH -групп термостабильность препарата 6 практически не отличается от термостабильности других препаратов с той же степенью модификации NH_2 -групп. Следовательно, при 40°C модифицируются те же поверхностные NH_2 -группы, что и при 0°C , так как модификация внутренних NH_2 -групп должна была бы заметно уменьшить термостабильность фермента [7, 8]. Таким образом, дестабилизирующее влияние в случае препарата 6 оказывает именно ацелирование внутренних OH -групп фермента.

pH-Зависимость термостабильности ацелированной пероксидазы. Ацелирование при 0°C 4 NH_2 -групп пероксидазы не изменяет формы pH -зависимости термостабильности пероксидазы, измеренной при 60°C в интервале pH 7,0–12,0 (рис. 2). Как и для нативного фермента, проявляется группа с pK 9,8 (при 60°C), депротонирование которой увеличивает $k_{ин}$. По всей вероятности, 4 поверхностные NH_2 -группы не участвуют в процессе щелочной термоинактивации пероксидазы. pH -Профиль термостабильности несколько изменяется, если в пероксидазе кроме 4 NH_2 -групп модифицированы 12 OH -групп. Для этого препарата при pH 11,0 начинает проявляться еще одна группа, депротонирование которой настолько увеличивает $k_{ин}$, что при pH 14,7 термостабильности нативной и ацелированной пероксидазы почти совпадают (рис. 2, 1 и 3). Следовательно, ацелирование поверхностных OH -групп не влияет на термостабильность фермента при pH , близких к нейтральным, но дестабилизирует фермент при экстремальных значениях pH . Возможно, что модифицируются те OH -группы, которые принимают участие в стабилизации фермента по отношению к щелочной инактивации.

Влияние добавок ионов Ca^{2+} на термостабильность нативной и ацелированной пероксидазы. Для нативной и ацелированной (препарат 3) пероксидазы были определены константы скорости инактивации ($k_{ин}$) в интервале температур 60 – 75°C в отсутствие и в присутствии $0,5 \text{ мМ}$ Ca^{2+} . Зависимости $\lg k_{ин}$ от обратной температуры приведены на рис. 3, а рас-

Термодинамические активационные параметры для необратимой термоинактивации нативной и ацетилированной пероксидазы в отсутствие и в присутствии ионов Ca^{2+} при pH 7,0 в интервале температур 60–75° С

Препарат	ΔH^\ddagger , ккал/моль	ΔS^\ddagger , кал/моль·град	Стабилизация по отношению к нативному ферменту при 60° С *
Нативная пероксидаза	30±1	14±2	1
Нативная пероксидаза + 0,5 мМ Ca^{2+}	51±2	76±4	4
Ацетилированная пероксидаза **	64±2	110±5	11
Ацетилированная пероксидаза ** + +0,5 мМ Ca^{2+}	48±2	61±3	40

* Константа термоинактивации нативной пероксидазы при 60° С и pH 7,0 равна $7,1 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$.

** В ацетилированной пероксидазе (препарат 3, табл. 1) модифицированы 4 NH_2 -группы и 12 OH -групп.

считанные из этих зависимостей термодинамические активационные параметры, ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger , процесса термоинактивации даны в табл. 2. Добавки Ca^{2+} повышают термостабильность нативного фермента при $t < 75^\circ \text{C}$. При 60° С $k_{\text{ин}}$ уменьшается в 4 раза. Эффект стабилизации нативного фермента ионами Ca^{2+} обусловлен увеличением энтальпии активации ΔH^\ddagger в 1,7 раза, что перекрывает дестабилизирующее влияние увеличения энтропии активации ΔS^\ddagger (табл. 2). Термостабильность ацетилированной пероксидазы при $t < 80^\circ \text{C}$ выше, чем нативной (рис. 3, ср. 1 и 3). При 60° С модифицированный фермент в 11 раз стабильнее нативного (табл. 2). Для модифицированной пероксидазы ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger процесса термоинактивации увеличиваются в 2 и 7 раз соответственно. Следовательно, стабилизация ацетилированного фермента обусловлена увеличением ΔH^\ddagger процесса термоинактивации в 2 раза. В присутствии ионов Ca^{2+} термостабильность ацетилированной пероксидазы возрастает во всем изученном интервале температур за счет значительного понижения энтропии активации (рис. 3, ср. 3 и 4). Величина $k_{\text{ин}}$ ацетилированной пероксидазы при 60° С уменьшается в 3,6 раза в присутствии 0,5 мМ соли Ca^{2+} . Таким образом, после химической модификации и под влиянием ионов Ca^{2+} термостабильность фермента увеличивается в 40 раз при 60° С по сравнению с нативным ферментом в отсутствие добавок ионов Ca^{2+} . Сравнивая влияние ионов Ca^{2+} на $k_{\text{ин}}$ пероксидазы, в которой ацетилированы 4 NH_2 -группы и 12 OH -групп (препарат 3 табл. 1), и на $k_{\text{ин}}$ пероксидазы, в которой ацетилированы только 4 NH_2 -группы, мы нашли, что для обоих препаратов как в отсутствие, так и в присутствии 0,5 мМ Ca^{2+} аррениусовские зависимости совпадают. Следовательно, химическая модификация уксусным ангидридом и добавки ионов Ca^{2+} при 60° С действуют аддитивно, причем модификация ни NH_2 -, ни OH -групп не оказывает существенного влияния на взаимодействие Ca^{2+} с пероксидазой. По-видимому, изменения структуры фермента при взаимодействии с ионами Ca^{2+} и при ацетилировании происходят на различных участках макромолекулы и мало зависят друг от друга.

Аддитивность воздействий стабилизирующих влияний ионов Ca^{2+} и ацетилирования проявляется явно при 60° С, а при более высоких температурах она неполная, как можно видеть из значений ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger для процесса термоинактивации нативной и ацетилированной пероксидазы в присутствии и в отсутствие ионов Ca^{2+} (табл. 2). В случае полной аддитивности следовало ожидать увеличения ΔH^\ddagger ацетилированной пероксидазы в присутствии Ca^{2+} . Однако дополнительный эффект стабилизации

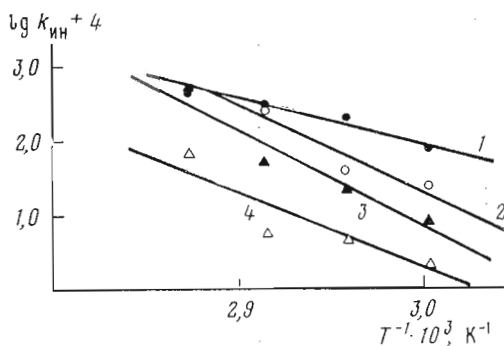


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $\lg k_{ин}$ от обратной температуры для нативной (1, 2) и ацелированной (3, 4) пероксидазы (препарат 3, табл. 1) в отсутствие (1, 3) и в присутствии (2, 4) 0,5 мМ Ca^{2+}

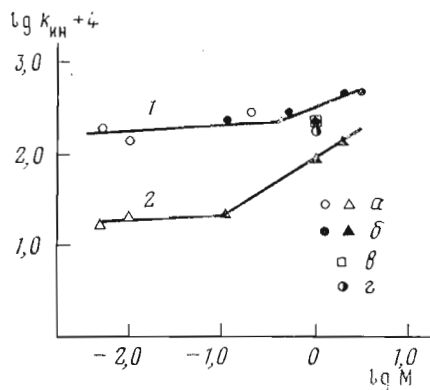
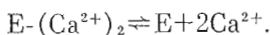


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость $\lg k_{ин}$ от логарифма концентрации соли в 0,01 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, и 65°С для нативной (1) и ацелированной (2) пероксидазы. Используются соли: α - Na-фосфат; β - 0,01 М Na-фосфат, содержащий KNO_3 ; γ - 0,01 М Na-фосфат, содержащий 1 М NaCl; ζ - 0,01 М Na-фосфат, содержащий 1 М KCl

добавками Ca^{2+} для ацелированной пероксидазы обеспечивается уменьшением ΔS^{\ddagger} , а не увеличением ΔH^{\ddagger} , как для нативной. Энергетика взаимодействия ионов Ca^{2+} с нативной и ацелированной пероксидазой различается, что указывает на некоторую взаимосвязь этих процессов. Увеличение термостабильности нативной и ацелированной пероксидазы в присутствии добавок Ca^{2+} можно объяснить тем, что процесс термоинактивации определяется не только диссоциацией гем-белкового комплекса [11], но и диссоциацией комплекса фермента с ионами Ca^{2+} :



5000-кратный избыток ионов Ca^{2+} будет сдвигать равновесие этой реакции влево. Кроме того, добавляемые в раствор ионы Ca^{2+} могут взаимодействовать с карбоксильными и карбонильными группами белка, образуя довольно прочные хелаты [12—14], что может вносить дополнительный вклад в стабилизацию фермента. На это указывает увеличение ΔH^{\ddagger} для нативной пероксидазы в присутствии ионов Ca^{2+} . Вполне вероятно, что механизм стабилизации пероксидазы ионами Ca^{2+} включает оба эти процесса.

Влияние высоких концентраций солей на термостабильность нативной и ацелированной пероксидазы. Увеличение концентрации фосфата от 0,005 до 0,1 М не оказывает влияния на $k_{ин}$ нативной и ацелированной пероксидазы, а при увеличении концентрации KNO_3 от 0,1 до 3,0 М стабильность понижается как для нативной, так и, даже в большей степени, для ацелированной пероксидазы (рис. 4). Эффект дестабилизации практически не зависит от природы катиона (Na^+ или K^+) и аниона (H_2PO_4^- — HPO_4^{2-} , Cl^- или NO_3^-), т. е. изученные соли не оказывают специфического влияния на термостабильность пероксидазы (рис. 4). Дестабилизирующее влияние высоких концентраций солей связано в первую очередь с экранированием благоприятных для стабилизации фермента электростатических взаимодействий, в частности с нарушением специфических взаимодействий связанных ионов Ca^{2+} с ферментом. Кроме того, при высоких концентрациях солей может происходить разворачивание глобулы фермента и увеличение степени доступности внутренних амидных и гидрофобных групп белка растворителю [15]. Большая чувствительность ацелированной пероксидазы к концентрированным растворам соли может

Влияние заряда остатка, вводимого при ацилировании пероксидазы, на термостабильность фермента при 60° С и pH 7,0

Препарат	$k_{ин} \cdot 10^4, \text{мин}^{-1}$	Стабилизация по отношению к нативной пероксидазе при 60° С
Нативная пероксидаза $E-(NH_3^+)_4$	70	1
Пероксидаза, в которой 4 NH_2 -группы модифицированы метилацетимидатом $E-(NH-C(=NH_2^+)_4$	36	2
 CH_3 уксусным ангидридом $E-(NHCOCH_3)_4$	6,3	11
янтартным ангидридом $E-(NHCOCH_2CH_2COO^-)_4$	2,5	28

свидетельствовать о большей роли электростатических взаимодействий в стабилизации структуры модифицированного фермента. В концентрированных растворах соли стабилизирующее влияние ацелирования почти элиминируется.

Относительная роль числа, химической природы и локализации модифицируемых функциональных групп в изменении термостабильности модифицированного фермента. Результаты настоящей работы и имеющиеся в литературе данные для различных белков и ферментов [16—22] позволяют высказать предположение о существовании в них трех типов функциональных групп, модификация которых оказывает различное влияние на структуру и стабильность макромолекулы.

Функциональные группы I типа расположены на поверхности глобулы и не принимают участия в стабилизации белка (при данном pH), поэтому их модификация с введением не слишком гидрофобных остатков практически не сказывается на стабильности фермента. В пероксидазе к группам I типа можно отнести поверхностные OH-группы, которые легко модифицируются при 0° С (табл. 1), и 2 NH_2 -группы, модификация которых не влияет на термостабильность фермента [8].

Поскольку группы I типа расположены на поверхности белка и контактируют с ионами раствора, изменение заряда этих групп при модификации может практически не влиять на термостабильность фермента. Например, термостабильность пероксидазы не зависит от того, модифицированы ли поверхностные NH_2 - и OH-группы уксусным или янтартным ангидридом. После модификации группы I типа стабильность фермента может и повыситься, если введенные остатки способны образовать энергетически выгодные нековалентные связи с соседними группами белка [19].

Функциональные группы II типа находятся на или вблизи поверхности белка. В нативном ферменте они имеют неблагоприятное окружение (заряженные группы в достаточном гидрофобном окружении или в окружении одноименно заряженных ионов) и дестабилизируют белковую глобулу. Модификация таких групп со снятием заряда будет стабилизировать фермент. В пероксидазе к группам II типа относятся 3-я и 4-я (в соответствии с порядком модификации) NH_2 -группы, снятие заряда с которых при ацилировании стабилизирует фермент, а умеренная гидрофобизация таких групп приводит к дополнительной стабилизации [7, 8]. Модификация этих же NH_2 -групп пероксидазы ацетимидозэфиром (положительный заряд на NH_2 -группе сохраняется) почти не увеличивает стабильности фермента (табл. 3). При их модификации янтартным ангидридом замена положительного заряда на отрицательный приводит к еще большей стабилизации фермента (табл. 3).

Функциональные группы III типа несколько удалены от поверхности глобулы и образуют внутримолекулярные солевые или водородные связи, стабилизирующие фермент, которые разрушаются при модификации этих групп, вследствие чего фермент дестабилизируется. Модификация таких внутренних групп белка, как правило, происходит либо при повышенной температуре, либо при крайних значениях pH, а модифицированный фермент приобретает более рыхлую, близкую к денатурированной структуру, что отражается и на его активности. В пероксидазе к функциональным группам III типа можно отнести внутренние OH- и NH₂-группы, которые модифицируются только при 40°С, при этом стабильность фермента уменьшается.

Следовательно, в зависимости от того, какую роль в поддержании нативной структуры фермента играют те или иные функциональные группы, модификация этих групп либо не влияет на термостабильность (группы I типа), либо стабилизирует (группы II типа), либо дестабилизирует фермент (группы III типа). Для каждого конкретного фермента соотношения между количеством групп каждого типа различно, поэтому при разработке методов стабилизации ферментов путем химической модификации необходимо изучать зависимость термостабильности от степени модификации и от природы модифицируемых функциональных групп. Накопление экспериментальных данных по взаимосвязи между степенью модификации и химической природой модифицируемых групп, с одной стороны, и термостабильностью фермента — с другой, позволит оценить, сколь близки высказанные выше предположения к действительности; в настоящее время они являются еще достаточно гипотетичными.

Взаимное влияние различных факторов на термостабильность фермента. Исследование совместного влияния нескольких факторов на термостабильность фермента показывает, сколь сложен механизм регулирования его термостабильности при различных воздействиях на биокатализатор: при изменении концентрации солей, добавлении ионов металлов, химической модификации. Величины эффектов изменения термостабильности ферментов зависят от числа и природы модифицированных групп, температуры, pH, поэтому часто делаемые в литературе выводы о механизме стабилизации без исследования температурных зависимостей или без определения степени модификации являются случайными или приближенными. Для изученного фермента — пероксидазы — полученные результаты имеют как практический, так и теоретический интерес. С практической точки зрения аддитивность влияния добавок ионов Ca²⁺ и ацетилирования, зависимость эффекта стабилизации от степени модификации и природы модифицированных групп могут быть использованы для оптимизации условий, в которых данный фермент будет наиболее стабилен. С теоретической точки зрения становится понятным, что модификация поверхностных NH₂- и OH-групп не затрагивает групп, которые взаимодействуют с Ca²⁺. Как показывает изучение эффекта солей, в модифицированном ферменте стабилизация обусловлена в значительной мере усилением электростатических взаимодействий. Таким образом, можно сделать вывод, что именно модификация *специфических* (другими словами, «ключевых» [18]) групп в ферменте либо химически, либо за счет комплексообразования с ионами металлов позволяет значительно стабилизировать фермент. Нахождение таких *специфических* групп — одна из основных задач при разработке методов стабилизации растворимых ферментов.

Экспериментальная часть

Использовали изофермент С пероксидазы хрена, выделенный из продажного препарата фирмы Reanal (ВНР) по методу [23], с $D_{403}/D_{278} = 3,2$; свежеперегнаный уксусный ангидрид, дважды перекристаллизованный солянокислый гидроксилламин. Метилацетимидат и ацетгидрокса-

мовую кислоту синтезировали по методам [24, 25] соответственно. Другие реактивы соответствовали квалификации ос.ч. Для приготовления растворов применяли трижды перегнанную воду. Концентрацию нативной и модифицированной пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм ($\epsilon_{403} = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [26]) и по пиридиномохромогену [27].

Модификацию уксусным ангидридом проводили по методу [28]. К 2 мл 0,1 мМ раствора пероксидазы в 0,05 М NaCl после доведения pH до 8,0 с помощью 0,1 н. NaOH добавляли в течение 1 ч небольшими порциями уксусный ангидрид. Соотношение количеств использованного ангидрида и фермента в различных опытах варьировали от 12 до 960. Модификацию проводили при 0, 22 и 40° С. В ходе модификации поддерживали pH 8,0 с помощью 3 М NaOH. После окончания реакции модифицированную пероксидазу отделяли от низкомолекулярных реагентов гель-фильтрацией раствора через сефадекс G-25, тонкий (колонка 1×30 см), уравновешенный 0,05 М NaCl.

Число ацетилированных NH₂-групп в пероксидазе определяли с помощью тринитробензолсульфокислоты [4].

Число ацетилированных OH-групп в пероксидазе определяли по образованию ацетгидроксамовой кислоты при реакции модифицированного фермента с нейтральным или щелочным раствором гидроксилamina [9, 29]. Гидроксамовые кислоты в кислой среде образуют красно-фиолетовые комплексы с солями трехвалентного железа с максимумом поглощения при 520 нм. Используя в качестве эталона ацетгидроксамовую кислоту, мы определили величину ϵ_{520} этого комплекса при pH 1,0, которая оказалась равной $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Количество ацетилированных остатков тирозина определяли по методу [10], несколько модифицированному нами. Поскольку при 520 нм поглощает и пероксидаза хрена, то при определении количества ацетилированных OH-групп в качестве раствора сравнения использовали раствор нативного фермента той же концентрации, что и модифицированный. К 0,5 мл раствора фермента добавляли 1 мл NH₂OH·HCl, pH 6,7. Нейтральный раствор гидроксилamina получали смешением 2 М NH₂OH·HCl, 3,5 М NaOH и воды в объемных соотношениях 2 : 1 : 1. Растворы фермента инкубировали с гидроксилaminом 10 мин при 25° С, затем добавляли 0,5 мл 3 М HCl и 0,5 мл 0,37 М FeCl₃ в 0,1 М HCl и через 10 мин определяли поглощение при 520 нм для модифицированного фермента по отношению к раствору таким же образом обработанного нативного фермента.

Количество других ацетилированных OH-групп определяли так же, как OH-группы остатков тирозина, но использовали раствор NH₂OH с pH 12,2, который получали, смешивая равные объемы 2 М NH₂OH·HCl и 3,5 М NaOH. Количество модифицированных OH-групп на 1 моль фермента рассчитывали по формуле

$$n = \frac{5 \cdot D_{520}}{\epsilon_{520} [E]_0},$$

где D_{520} — поглощение раствора фермента по отношению к контрольному при 520 нм, $\epsilon_{520} 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, $[E]_0$ — исходная концентрация фермента (в объеме 0,5 мл).

Модификацию пероксидазы янтарным ангидридом проводили как описано ранее [4].

Модификацию пероксидазы метилацетимидатом проводили по методу [30].

Фермент с ацетилированными NH₂- и OH-группами, не содержащий ацетилированных OH-групп тирозиновых остатков, получали, обрабатывая ацетилированную пероксидазу раствором NH₂OH·HCl при pH 6,7, как

описано выше в методе определения числа модифицированных ОН-групп остатков тирозина. После 10 мин инкубирования при 25° С низкомолекулярные вещества отделяли на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М NaCl.

Фермент с ацетилированными NH₂-группами, не содержащий модифицированных ОН-групп, получали аналогично предыдущему, но обработку ацетилированной пероксидазы гидроксиламиноом проводили при pH 12,2.

Каталитическую активность нативной и модифицированной пероксидазы определяли по начальной скорости окисления *o*-дианизидина (0,16 мМ) перекисью водорода (0,61 мМ) при pH 7,0 (0,01 М Na-фосфат, 0,1 М KNO₃) в присутствии 0,01–1,0 нМ фермента [6, 8].

Термостабильность фермента, за меру которой принимали константу скорости мономолекулярной реакции необратимой инактивации фермента ($k_{ин}$) при определенной температуре, изучали, инкубируя 0,1 мкМ фермент в 0,01 М Na-фосфатном буфере, 0,1 М KNO₃, pH 7,0 [7]. Через определенные промежутки времени отбирали пробы 0,05–0,1 мл, инкубировали 1 ч и определяли их активность, добавляя к ним по 10 мл 0,01 М Na-фосфатного буфера, 0,1 М KNO₃, pH 7,0. Измеряемая $k_{ин}$ характеризует необратимую термоинактивацию, поскольку активность отобранных проб не зависела от температуры их последующего инкубирования (20, 30 или 40° С) или от длительности инкубирования (1–24 ч). Это согласуется с данными о том, что реактивация обратимо инактивированной пероксидазы протекает за время менее 1 ч [11]. Величину $k_{ин}$ рассчитывали из экспериментальной зависимости логарифма относительной активности фермента ($\lg A/A_0$) от длительности инактивации [31].

При изучении влияния добавок Ca²⁺ использовали буферные растворы, содержащие 0,5 мМ Ca(NO₃)₂. Поскольку в буфере появлялись только новые ионы Ca²⁺, в статье говорится лишь о влиянии этих ионов.

При изучении влияния солей использовали 0,01 М Na-фосфатный буфер, содержащий соответствующие концентрации добавленных солей (рис. 4).

При изучении pH-зависимости термостабильности фермента применяли 0,01 М Na-карбонатный или Na-фосфатный буферы, содержащие 0,1 М KNO₃.

Спектры поглощения и кинетические измерения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре В-2-25 (Beckman, США); pH измеряли на pH-метре рНМ-64 (Radiometer, Дания).

ЛИТЕРАТУРА

1. Haschke R. H., Friedhoff J. M. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 1039–1042.
2. Welinder K. G. (1976) *FEBS Lett.*, **72**, 19–23.
3. Schonbaum G. R., Welinder K., Smillie L. B. (1971) in: *Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes* (Chance B., Jonetani T., Mildvan A. S., eds), vol. 2, pp. 533–543, Acad. Press, N. Y.
4. Угарова Н. Н., Рожкова Г. Д., Васильева Т. Е., Березин И. В. (1978) *Биохимия*, **43**, 793–797.
5. Phelps Ch., Forlani L., Antonini E. (1971) *Biochem. J.*, **124**, 605–614.
6. Угарова Н. Н., Рожкова Г. Д., Березин И. В. (1978) *Биохимия*, **43**, 1242–1250.
7. Угарова Н. Н., Рожкова Г. Д., Березин И. В. (1978) *Биохимия*, **43**, 1382–1389.
8. Ugarova N. N., Rozhkova G. D., Berezin I. V. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **570**, 31–42.
9. Riordan J. F., Vallee B. L. (1972) in: *Methods in Enzymology*, vol. 25, part B, pp. 494–500, Acad. Press, N. Y.
10. Gounaris A. D., Perlmann G. E. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 2739–2745.
11. Lu A. T., Whitaker J. R. (1974) *J. Food Sci.*, **39**, 1173–1178.
12. Greenberg D. M. (1944) in: *Advances in Protein Chemistry*, vol. 1, pp. 121–149, Acad. Press, N. Y.
13. Williams R. J. P. (1979) *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 481–509.
14. Неорганическая биохимия, под ред. М. Е. Вольпина и К. Б. Яцимирского (1978) т. 1, гл. 4, «Мир», М.

15. Структура и стабильность биологических макромолекул, под ред. М. В. Волькенштейна (1973) с. 330–387, «Мир», М.
16. Woodward I., Wiseman A. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **527**, 8–16.
17. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю., Березин И. В. (1979) *Биохимия*, **14**, 2033–2338.
18. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berczin I. V., Klivanov A. M., Martinek K. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **567**, 1–11.
19. Sekiguchi T., Oshiro S., Goingo E. M., Nosoh Y. (1979) *J. Biochem.*, **85**, 75–78.
20. Clark J. F., Gurd F. R. N. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3257–3264.
21. Habeeb A. F. S. A. (1967) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **121**, 652–664.
22. Urabe I., Nanjo H., Okada H. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **302**, 73–79.
23. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. (1975) *Биохимия*, **40**, 297–301.
24. McElvain S. M., Nelson J. W. (1942) *J. Amer. Chem. Soc.*, **64**, 1825–1827.
25. Синтезы органических препаратов, под ред. Б. А. Казанского (1949) т. 2, с. 87, Изд-во иностр. лит., М.
26. Schonbaum G. R., Lo S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3353–3360.
27. Falk J. E. (1964) *Porphyrins and Metalloporphyrins*, p. 236, Elsevier, Amsterdam – New York – London.
28. Habeeb A. F. S. A., Cassidi M. G., Singer S. J. (1958) *Biochim. et biophys. acta*, **29**, 587–593.
29. Lipmann F., Tuttle L. (1945) *J. Biol. Chem.*, **159**, 21–26.
30. Reynolds J. H. (1968) *Biochemistry*, **7**, 3131–3136.
31. Угарова Н. Н., Бровко Л. Ю., Рожкова Г. Д., Березин И. В. (1977) *Биохимия*, **42**, 1212–1220.

Поступила в редакцию
4.IV.1980

STABILIZATION OF HORSERADISH PEROXIDASE ACHIEVED BY ACETYLATION OF THE ENZYME OR IN PRESENCE OF CALCIUM IONS

KUTUZOVA G. D., UGAROVA N. N.

*Chemistry Department, Division for Chemical Enzymology, M.V.
Lomonosov State University, Moscow*

Chemical modification of horseradish peroxidase by acetic anhydride has been performed. The degree of modification has been shown to depend on the excess of anhydride and the reaction temperature. The effect of the modification degree and the nature of modified groups on the activity and thermostability of the enzyme have been studied. Modification of three or four NH_2 -groups considerably increases thermostability of peroxidase. Modification of surface OH-groups has no effect, whereas that of inner OH-groups decreases thermostability. It has been proposed that concerning their accessibility to the modifier and their role in stabilizing the native enzyme structure, three types of functional groups may be distinguished: i) their modification does not affect, ii) increases, and iii) decreases the enzyme stability. It has been shown that Ca^{2+} ions augment the thermostability of native and acetylated peroxidases, whereas a considerable increase in the ionic strength of the solution destabilizes both native and acetylated enzymes. A conclusion has been drawn that electrostatic interactions play an important role in stabilization of native and acetylated peroxidases.