



УДК 577.158.52.02

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА  
ВОДОРАСТВОРИМЫМИ КАРБОДИИМИДАМИ И НУКЛЕОФИЛАМИ.  
РОЛЬ ДОСТУПНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП  
В ПЕРОКСИДАЗНОМ КАТАЛИЗЕ

Угарова Н. Н., Кутузова Г. Д., Рогожин В. В.,  
Савицкий А. П., Скурда Л. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
кафедра химической энзимологии.

Карбоксильные группы пероксидазы хрена модифицировали водорастворимыми карбодиимидами в отсутствие и в присутствии нуклеофильных агентов: аминов, диаминов и гидроксилamina. С помощью карбодиимида, содержащего хромофор (подметилат-*N-n*-фенилазофенил-*N'*-(*N,N*-диметиламинопропил)карбодиимид), показано, что модификация одной COOH-группы уменьшает каталитическую активность пероксидазы на 35%, а дальнейшее увеличение числа модифицированных групп не влияет на активность. Продукт реакции пероксидазы с этим карбодиимидом неустойчив и при хроматографии на СМ-целлюлозе (рН 5,0) разлагается с образованием фермента. Этот продукт, по-видимому, является производным не *N*-ацпл-, а *O*-ацпл-мочевины. При совместном действии карбодиимидов и мононитрофенилированных диаминов происходит не только ковалентное присоединение последних к COOH-группам пероксидазы, но и сорбция их на ферменте. Показано, что диамины в присутствии карбодиимидов действуют на пероксидазу как монофункциональные агенты.

Изучены каталитические свойства модифицированных препаратов в реакциях раздельного и совместного окисления *o*-данизидина и ферроцианида калия ( $3,5 \leq \text{pH} \leq 9$ ). Показано, что модификация COOH-групп не сказывается на величине  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  при окислении ферроцианида, и на  $K_m$  — при окислении *o*-данизидина, однако в последнем случае  $k_{\text{кат}}$  уменьшается в 2–10 раз в зависимости от структуры карбодиимида. Наблюдаемое изменение  $k_{\text{кат}}$  обусловлено сильным уменьшением констант скоростей переноса электронов на промежуточные соединения пероксидазы  $E_1$  и  $E_2$ . В то же время при модификации улучшается связывание *o*-данизидина с ферментом. Присоединение нуклеофильных агентов не влияет на каталитические свойства пероксидазы, модифицированной карбодиимидами. Обсуждается роль карбоксильных групп в пероксидазном катализе.

Химическая модификация групп ферментов позволяет установить структуру их активных центров и роль отдельных функциональных групп в каталитическом процессе [1]. Природа групп, входящих в активный центр пероксидазы хрена, в настоящее время не выяснена. Ранее было показано, что аминогруппы остатков лизина и поверхностные, т. е. расположенные на поверхности фермента и легко доступные модифицирующим агентам при наиболее компактной конформации его молекулы, OH-группы тирозина, серина, треонина и углеводных остатков непосредственно не входят в активный центр пероксидазы [2]. В то же время известно, что во взаимодействии соединения II пероксидазы ( $E_2$ ) с органическими субстратами участвуют группы с рК 6,5 и 8,6 [3]. Можно предположить, что группа с рК 6,5 — это карбоксильная группа остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты, имеющая аномальное значение рК. Молекула изофермента С пероксидазы хрена содержит 32 карбоксильные группы, включая С-концевую и две, принадлежащие пропипонатным остаткам гема [4]. В литературе отсутствуют данные о роли этих групп в функционировании активного центра и поддержании третичной структуры пероксидазы.

Целью настоящей работы было выяснение роли доступных в обычных условиях (22° С, рН 5,0) карбоксильных групп пероксидазы хрена в каталитическом процессе окисления органического субстрата — *o*-данизи-

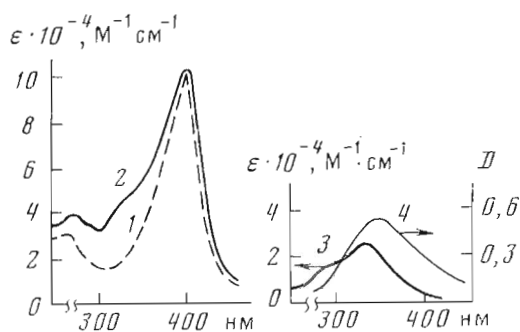


Рис. 1

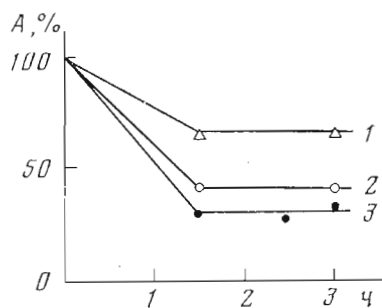


Рис. 2

Рис. 1. Спектр поглощения пероксидазы нативной (1), модифицированной PDP-карбодимидом (2), и PDP-карбодимида (4); 3 – разностный спектр нативной и модифицированной пероксидазы (рН 6,0, 22° С, 0,05 М NaCl)

Рис. 2. Зависимость относительной активности пероксидазы от инкубации с PDP- (1), EDP- (2) и SME-карбодимидом (3). Активность определяли в растворе, содержащем 0,01 М Na-фосфат, 0,1 М KNO<sub>3</sub>, 0,2–0,4 мМ пероксидазу, 0,65 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 0,17 мМ *o*-диавизидин, при рН 7,0 и 22° С

дина и неорганического – ферроцианида калия ферментом. Для этого использовали модификацию данных групп водорастворимыми карбодимидами в присутствии и в отсутствие нуклеофильных агентов. Как известно, карбодимиды активируют карбоксильные группы так, что они приобретают способность реагировать с нуклеофилами [5]. Карбодимиды, однако, могут сами выступать в качестве модифицирующих агентов, давая лабильные производные *O*-ацилмочевины, перегруппировка которых приводит к образованию устойчивых производных *N*-ацилмочевины [5, 6]. Кроме карбоксильных групп карбодимиды могут модифицировать в белках сульфгидрильные [7], фенольные [8] и аминогруппы (при рН > 9,5) [9]. Peroксидаза не содержит сульфгидрильных групп, а из пяти OH-групп тирозина в обычных условиях модифицируется только одна, причем активность фермента при этом не изменяется [2].

Реакцию с карбодимидами проводили в условиях, в которых происходит модификация главным образом карбоксильных групп фермента (рН 5,0; 22° С) [5]. В работе использовали водорастворимые карбодимиды: *n*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимида (SME-карбодимид), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDP-карбодимид) и подметилат *N*-*n*-фенилазофенил-*N'*-(*N,N*-диметиламинопропил)карбодимида (PDP-карбодимид). Последний имеет хромофорную группу, позволяющую определять число остатков, присоединенных к ферменту [10]. В качестве нуклеофильных агентов применяли окрашенные амины: моно-динитрофенилгексаметилендиамин (DPG-диамин), моно-динитрофенилпропилендиамин (DPP-диамин), моно-динитрофенилдодекадиамин (DPD-диамин), а также пропилендиамин (Pг-диамин), гексаметилендиамин (GM-диамин) и гидроксиламин.

Спектры свободного и связанного с ферментом PDP-карбодимида различаются (рис. 1); это свидетельствует об образовании химического соединения карбодимида с белком. Через 1,5 ч инкубации с PDP-карбодимидом в отсутствие аминов активность пероксидазы падает до 65%, при действии EDP-карбодимида – до 40% и в присутствии SME-карбодимида до 30% (рис. 2). Удлинение инкубации не изменяет активности фермента, хотя общее число модифицированных групп может возрастать. Таким образом, за 1,5 ч в реакцию вступают все COOH-группы, влияющие на каталитическую активность пероксидазы. Аналогичные результаты были получены при увеличении избытка PDP-карбодимида. В этих опытах было показано, что падение активности обусловлено реакцией с карбодимидом единственной функциональной группы фермента (рис. 3).

Полученные данные показывают, что падение активности пероксидазы обусловлено исключительно модификацией ее карбоксильных групп.

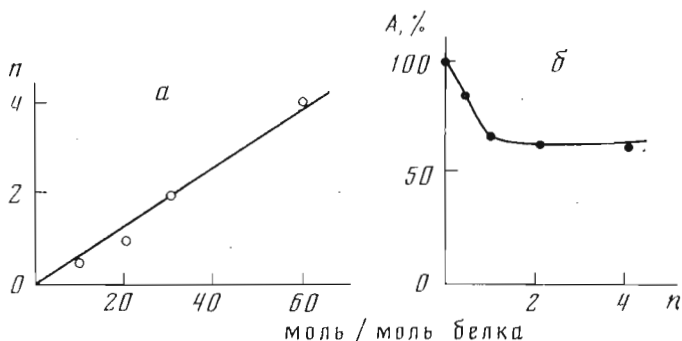


Рис. 3. Модификация пероксидазы PDP-карбодиимидом (1,5 ч): а – зависимость числа присоединенных остатков ( $n$ ) от избытка реагента; б – зависимость относительной активности пероксидазы от числа присоединенных остатков (условия определения активности см. подпись к рис. 1)

1. Поскольку спектры модифицированной и нативной пероксидазы тождественные, можно исключить денатурацию фермента.

2. Обработка модифицированной пероксидазы 1 М раствором гидроксиламина (рН 7,5; 22° С, 22 ч), обычно используемая для регенерации модифицированных ОН-групп тирозина [11], не приводит к восстановлению активности фермента. Следовательно, падение активности не связано с модификацией ОН-групп тирозина.

3. Падение активности не связано с модификацией  $\epsilon$ -аминогрупп лизиновых остатков, так как ранее было показано, что модификация всех шести аминогрупп не влияет на каталитическую активность пероксидазы [12]. Действительно, падение активности пероксидазы при обработке карбодиимидами не зависит от предварительного ацелирования всех доступных аминогрупп. Этот результат одновременно показывает, что падение активности не связано с возможным образованием внутримолекулярных сшивок.

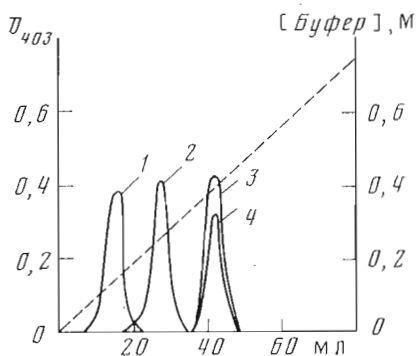
4. При действии на пероксидазу СМЕ- и ЕDP-карбодиимидов образуется 15–20% димеров, которые отделяли от мономеров фермента гель-хроматографией на сефадексе G-100. Активность димеров была такая же, как у мономеров; следовательно, падение активности при модификации пероксидазы не связано с образованием межмолекулярных сшивок.

Можно ожидать, что в препаратах пероксидазы, обработанных карбодиимидами в отсутствие нуклеофильных агентов, модифицированные карбоксильные группы превращены в ацилмочевинные; при этом общий положительный заряд молекулы фермента должен увеличиться. Это подтверждается уменьшением подвижности пероксидазы, модифицированной СМЕ- и ЕDP-карбодиимидами, при ее хроматографии на СМ-целлюлозе (рис. 4). Активность препаратов после хроматографии не изменялась; это указывает на устойчивость производных фермента, по-видимому обусловленную перегруппировкой лабильных О-ацилмочевин в N-ацилмочевины. Согласно предположению Тимковича [6], подобная перегруппировка, а не гидролиз, характерна для тех карбоксильных групп, которые мало доступны молекулам воды после образования О-ацилмочевины, т. е. для групп, частично маскированных в глобуле.

Напротив, при хроматографии на СМ-целлюлозе пероксидазы, модифицированной PDP-карбодиимидом, элюируемый белок не содержал остатков карбодиимида, и подвижность его была точно такая же, как у нативного фермента. Продукт же превращения карбодиимида элюировался с колонки только растворами высокой ионной силы и имел максимум поглощения при 335 нм (как и остатки карбодиимида в модифицированной пероксидазе). Активность пероксидазы в элюате полностью восстанавливалась, что свидетельствует о регенерации карбоксильных групп фермента.

По-видимому, О-ацилмочевинные группы, образующиеся при взаимодействии пероксидазы с PDP-карбодиимидом, не перегруппировываются

Рис. 4. Хроматография на СМ-целлюлозе пероксидазы нативной (1), модифицированной EDP-карбодиимидом (2) и EDP-карбодиимидом в присутствии Pг-диамина (3), GM-диамина (4). Пунктиром показан градиент буферного раствора



в N-ацилмочевинные и подвергаются гидролизу в присутствии СМ-целлюлозы. В этой связи можно отметить, что остатки PDP-карбодиимида, связанные с пероксидазой, по положению максимума полосы поглощения (335 нм) отличаются как от соответствующих модельных N-ацилмочевин, так и от пепсина, модифицированного этим карбодиимидом (325 нм [10]).

Присутствие в среде аминов, содержащих динитрофенильную группу [13], не сказывается на степени инактивации пероксидазы при ее обработке 0,1 М раствором EDP-карбодиимида. Связывание DPG-диамина с пероксидазой наблюдается лишь при его значительном избытке (300 моль/моль белка). После отделения реагентов гель-фильтрацией на сефадексе G-25 модифицированный препарат, по спектрофотометрическим данным, содержит около 1,3 динитрофенильных остатков на молекулу белка, из которых примерно половина может быть отделена последующей хроматографией на СМ-целлюлозе или же повторной гель-фильтрацией после 3-часовой инкубации в 1 М ацетатном буфере (рН 5). Таким образом, есть основания полагать, что EDP-карбодиимид наряду с ковалентным связыванием DPG-диамина вызывает и его сорбцию белком. Аналогичные результаты получены при использовании DPP-диамина и особенно DPD-диамина (табл. 1). Эффект сорбции, по-видимому, обусловлен разрыхлением белковой глобулы под влиянием высокой концентрации карбодиимида и низких значений рН. В работе [14], в частности, описано связывание белком DPG-диамина при инкубации в растворе детергента (бридж-35).

При использовании в качестве нуклеофильных агентов Pг- и GM-диаминов (0,1 М EDP-карбодиимида, 340 моль диамина на 1 моль белка) степень связывания этих диаминов оценивали, определяя количество аминокрупп в белке титрованием тринитробензолсульфонатом [15]. В случае Pг-диамина пероксидазная активность уменьшилась на 70%, причем фермент содержал 3 моль диамина на 1 моль белка. Несколько меньшие потери активности и связывание диамина наблюдались при применении GM-диамина (см. табл. 1). Модифицированный фермент по своим спектральным характеристикам не отличался от нативного.

Присутствие в среде диаминов не сказывается на количестве димеров фермента, образующихся при действии на пероксидазу EDP-карбодиимида (15—20%). В то же время связывание диаминов заметно уменьшает подвижность модифицированного белка при его хроматографии на СМ-целлюлозе (рис. 4). Естественно предположить, что в данных опытах диамины подвергались только моноацилированию, т. е. не образовывали меж- или внутривещных сшивок.

При действии на пероксидазу EDP-карбодиимида в присутствии гидроксилamina, по-видимому, происходит перегруппировка Лоссеня [16], поскольку в модифицированном ферменте обнаруживается больше аминокрупп, чем в нативном. По данным титрования тринитробензолсульфонатом, в аминокруппы превращаются семь COOH-групп на молекулу белка. В спектре модифицированного фермента уширяются полосы поглощения гема, так что он становится похож на спектр денатурированной

Взаимодействие пероксидазы (0,025 мМ) с EDP-карбодимидом (0,1 М) и нуклеофильными реагентами, рН 5,0, 22° С, 1,5 ч

Реагенты	Концентрация, моль/моль белка	Связывание реагента, моль/моль белка		Активность, % от исходной
		после гелефильтрации	после хроматографии на СМ-целлюлозе	
Контроль	—	—	—	40
DPG-диамин	50	0	0	40
DPG-диамин	300	1,3	0,6	35
DRP-диамин	300	1,6	1	35
DRD-диамин	300	2,9	0,7	37
Г-диамин	340	3,0	3,0	30
GM-диамин	340	2,5	2,5	40
NH <sub>2</sub> OH	40 000	7	7	30

Таблица 2

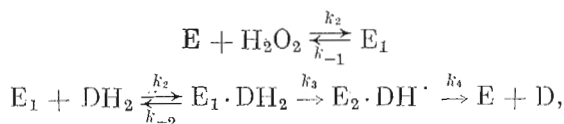
Кинетические параметры реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина. Рассчитаны из данных об окислении смеси *o*-дианизидина и ферроцианида калия; условия см. подпись к рис. 6; рН 5,0

Препарат	$k_3 \cdot 10^{-3}, \text{с}^{-1}$	$k_4 \cdot 10^{-3}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{М}$
Нативная пероксидаза	20	2,9	5,5
Пероксидаза, модифицированная EDP-карбодимидом	2,5	1,7	2,6

пероксидазы. Вероятно, сильное увеличение положительного заряда молекулы пероксидазы приближает ее конформацию к конформации денатурированного белка. Активность такого препарата составляет 30% от исходной, т. е. примерно такая же, как у пероксидазы, модифицированной EDP-карбодимидом в отсутствие гидроксилamina (табл. 1).

Каталитические свойства пероксидазы, модифицированной карбодимидами, были изучены в реакциях окисления *o*-дианизидина, ферроцианида калия и их смеси. При окислении *o*-дианизидина перекисью водорода рН-зависимости  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  ( $3,5 \leq \text{pH} \leq 9$ ) одинаковы у исходных и модифицированных препаратов. Следовательно, модифицируемые карбоксильные группы не ответственны за уменьшение активности, наблюдаемое при увеличении рН. Данные рис. 5 показывают, что модификация карбоксильных групп карбодимидами приводит к резкому уменьшению  $k_{\text{кат}}$  при незначительном изменении  $K_m$ .

Процесс окисления *o*-дианизидина протекает в несколько стадий [3]:



где E, E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> — пероксидаза и ее окисленные формы, а DH<sub>2</sub>, DH' и D — *o*-дианизидин и продукты его частичного и полного окисления. Поэтому  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  при насыщающих концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> являются функциями констант скоростей элементарных стадий [3]:

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_3 k_4}{k_3 + k_4}; \quad K_m = \frac{k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_2 (k_3 + k_4)}.$$

Ясно, что непосредственно из данных о величине  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  трудно понять, на какие индивидуальные стадии окисления влияет модификация карбоксильных групп пероксидазы. Можно лишь сделать общий вывод

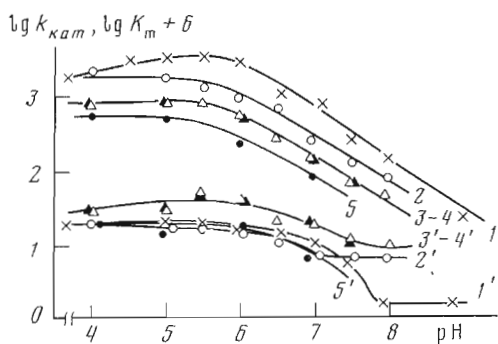


Рис. 5

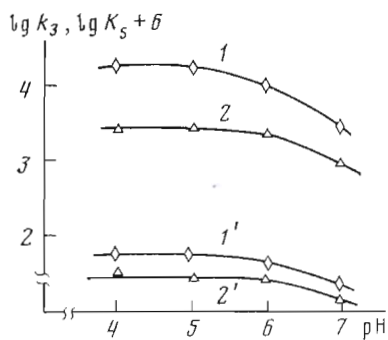


Рис. 6

Рис. 5. pH-зависимости каталитических констант  $k_{кат}$  (1–5) и  $K_m$  (1'–5') окисления *o*-дианизидина в присутствии пероксидазы нативной (1, 1'), модифицированной PDP- (2, 2'), EDP (3, 3') и СМЕ-карбодимидом (5, 5'), а также EDP-карбодимидом в присутствии DPG-диамина (4, 4'). Условия определения: 0,01 М буфер (рН 3,7–5,5 – Na-ацетатный, рН 6,0–8,0 – Na-фосфатный), 0,1 М  $KNO_3$ , 0,65 мМ  $H_2O_2$ , 0,2–0,4 мМ пероксидазы, 5–170 мкМ *o*-дианизидин

Рис. 6. pH-зависимости величин  $lg k_3$  и  $lg K_s$  (номера кривых со штрихом) окисления *o*-дианизидина, найденных из данных о совместном окислении перекисью водорода ферроцианида калия и *o*-дианизидина: 1 – нативная пероксидаза; 2 – пероксидаза, модифицированная EDP-карбодимидом (условия определения см. подпись к рис. 5; концентрация ферроцианида калия – 0,1 мМ)

о том, что она сказывается на скорости окисления донора водорода промежуточными формами пероксидазы  $E_1$  и  $E_2$ .

Влияние модификации карбоксильных групп фермента на кинетику окисления перекисью водорода неорганического субстрата – ферроцианида калия – мы изучили на примере пероксидазы, обработанной EDP-карбодимидом. Значения  $k_{кат}$  и  $K_m$  после модификации практически не изменяются в диапазоне рН 4,0–8,0 и совпадают с данными для нативной пероксидазы, которые приведены в работе [17]. Таким образом, модификация карбодимидом карбоксильных групп пероксидазы не сказывается на окислении ферроцианида.

Изучение кинетики окисления смеси двух субстратов, *o*-дианизидина и ферроцианида калия, при рН 4,0–8,0 дало возможность определить константы индивидуальных стадий окисления *o*-дианизидина (рис. 6) (метод предложен в [17]). После обработки пероксидазы EDP-карбодимидом в оптимуме каталитической активности при рН 5 в 8 раз уменьшается  $k_3$ , т. е. константа скорости переноса первого электрона с *o*-дианизидина на  $E_1$ , и примерно в 2 раза –  $k_4$ , т. е. константа скорости окисления *o*-дианизидина промежуточной формой пероксидазы  $E_2$  (табл. 2). В то же время в 2 раза уменьшается  $K_s = k_{-2}/k_2$ , т. е. улучшается связывание *o*-дианизидина с  $E_1$ . Ранее было найдено, что при пероксидазном окислении *o*-дианизидина  $k_3 \approx 10 k_4$  и поэтому  $k_{кат} \approx k_4$ . Иными словами, лимитирующей стадией здесь является окисление *o*-дианизидина промежуточной формой пероксидазы  $E_2$  [3, 17]. В случае пероксидазы, обработанной EDP-карбодимидом, значения  $k_3$  и  $k_4$  оказываются сравнимыми по величине (табл. 2), и, следовательно, для модифицированного фермента в отличие от нативного экспериментально определяемая величина  $k_{кат}$  является функцией констант  $k_3$  и  $k_4$ . Таким образом, константы скорости окисления *o*-дианизидина формами  $E_1$  и  $E_2$  после модификации карбоксильных групп не только уменьшаются, но и становятся сравнимыми по величине.

В отдельных опытах было показано, что присутствие в среде аммиака, диаминов и гидроксилamina при обработке пероксидазы EDP-карбодимидом не сказывается на значениях  $k_{кат}$  и  $K_m$ , свойственных ферменту, модифицированному одним EDP-карбодимидом. Таким образом, эти кинетические характеристики изменяются непосредственно в результате взаимодействия пероксидазы с карбодимидом.

Полученные данные показывают, что лишь несколько из 32 имеющихся в пероксидазе карбоксильных групп доступны модифицирующим агентам. Остальные находятся, вероятно, внутри глобулы.

Изучение каталитических свойств пероксидазы, обработанной карбодимидами, показало, что модифицируемые ими частично маскированные карбоксильные группы не входят непосредственно в активный центр фермента, но расположены вблизи участка фермента, ответственного за связывание органического субстрата. Объемистые ацилмочевинные остатки экранируют активный центр; следствием этого является уменьшенные константы скоростей переноса электрона с донора водорода — *o*-дианизидина — на окисленные формы пероксидазы  $E_1$  и  $E_2$ . В то же время усиливается связывание *o*-дианизидина с ферментом. Неорганические субстраты взаимодействуют с пероксидазой по иному механизму: реакция окисления происходит при непосредственном контакте с гемом [17]. Возможно, поэтому модификация карбоксильных групп, функционально важных для окисления *o*-дианизидина, не влияет на окисление ферроцианида калия. Дополнительная модификация трех — семи экспонированных в раствор карбоксильных групп пероксидазы нуклеофильными агентами не влияет на каталитические свойства фермента.

### Экспериментальная часть

В работе использовали изофермент С пероксидазы хрена, выделенный из коммерческого препарата (Reanal, ВНР) по методу [18]. Очищенный фермент характеризовался величиной  $D_{403}/D_{280}=3,2$ . Без дополнительной очистки использовали *n*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимида (Sigma, США), 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодимид (Serva, ФРГ), иодметилат *N-n*-фенилазофенил- $N'$ (*N,N*-диметиламинопропил)карбодимида (представлен проф. В. М. Степановым), пропилендиамин и гексаметилендиамин (Koch-Light, Англия), тринитробензолсульфокислоту (Sigma, США). Динитрофенилпропилендиамин, динитрофенилгексаметилендиамин, динитрофенилдодекандиамин получали динитрофенилированием соответствующих диаминов с последующей перекристаллизацией из 6 М HCl; *o*-дианизидин марки ч. очищали возгонкой в вакууме; солянокислый гидроксилламин дважды перекристаллизовывали. Остальные реактивы соответствовали квалификации ос.ч. Для приготовления растворов использовали трижды перегнанную в стекле воду.

Концентрацию пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм ( $\epsilon_{403}=102 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [19]) или с использованием пиридингеохромогена [20].

Спектральные измерения выполняли на двухлучевом спектрофотометре В-2-25 (Beckman, США); рН измеряли на рН-метре РНМ-64 (Radiometer, Дания).

*Модификацию пероксидазы карбодимидами* проводили по методу Кошланда [5]. В 2,9 мл 0,05 М раствора NaCl (22° С) вносили 58 мг EDP-карбодимида или 127 мг СМЕ-карбодимида (0,1 М), затем добавляли 0,1 мл 0,25 мМ раствора пероксидазы (концентрация в реакционной смеси 0,025 мМ). В ходе реакции (1,5–3,0 ч) рН 5,0 поддерживали добавлением 1 М HCl. Избыток реагентов удаляли гель-фильтрацией раствора через колонку (1×30 см) с сефадексом G-25, уравновешенным с 0,05 М раствором NaCl. Аналогично проводили обработку пероксидазы 0,25–1,5 мМ PDP-карбодимидом.

Число остатков PDP-карбодимида, присоединенных к пероксидазе, определяли по их поглощению при 335 нм, определяемому из разностного спектра модифицированной и нативной пероксидазы, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{335}=20\,000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  [10].

*Модификацию пероксидазы аминами, диаминами и гидроксилламином в присутствии 0,1 М EDP-карбодимида* проводили аналогично, вводя дополнительно в реакционную смесь 7,5 мМ (300 моль/моль пероксидазы).

DPG-, DPP- или DPD-диамина; 8,6 мМ Рг- или GM-диамина или 1 М гидроксилламина.

Число остатков DPG-, DPP- или DPD-диамина, присоединенных к пероксидазе ( $n$ ), определяли из данных о поглощении модифицированного фермента при 360 нм, используя формулу

$$n = \frac{D_{360} - \epsilon^E \cdot c}{\epsilon}$$

где  $\epsilon^E$  — молярный коэффициент поглощения пероксидазы при 360 нм, равный  $45\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $c$  — концентрация пероксидазы,  $\epsilon$  — молярный коэффициент поглощения динитрофениламиновых остатков, равный  $15\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [13].

Число присоединившихся остатков диаминов и число COOH-групп, модифицированных гидроксилламином, определяли по увеличению количества аминогрупп в ферменте, оцениваемому по данным титрования тринитробензолсульфокислотой [15].

Хроматографию нативной и модифицированной пероксидазы на CM-целлюлозе проводили, нанося 5 мл раствора фермента (1 мг/мл) в 5 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5,0) на колонку с CM-целлюлозой (1×12 см), предварительно уравновешенную с тем же буфером. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации ацетатного буфера (pH 5,0) от 0,005 до 1,5 М (объем смесителя 160 мл, скорость элюции 22 мл/ч).

Гель-хроматографию нативной и модифицированной пероксидазы проводили пропусканием растворов через колонку с сефадексом G-100 (1×30 см), уравновешенным с 0,05 М раствором NaCl, откалиброванную по стандартным белкам: рибонуклеазе ( $M\ 12\,000$ ), пероксидазе ( $M\ 40\,000$ ), сывороточному альбумину быка ( $M\ 69\,000$ ) и  $\gamma$ -глобулину ( $M\ 140\,000$ ).

Каталитическую активность нативной и модифицированной пероксидазы при окислении *o*-дианизидина и ферроцианида калия определяли как описано в работах [3, 12, 17].

Обработку нативной и модифицированной пероксидазы гидроксилламином проводили, инкубируя 24 ч 0,01 мМ раствор фермента в 1 М гидроксиллаmine при pH 7,5 и 25° С. Избыток реагента удаляли гель-фильтрацией раствора через колонку (1×30 см) с сефадексом G-25, уравновешенную 0,05 М NaCl.

Авторы выражают глубокую благодарность В. М. Степанову и Е. Н. Лысогорской за предоставление препаратов PDP-карбодимиды и за ценные замечания при выполнении и обсуждении результатов данной работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Ред. Ю. А. Овчинников. М.: Мир, 1974, с. 344–386.
2. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 75–85.
3. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Биохимия, 1977, т. 42, № 8, с. 1372–1379.
4. Welinder K. G. FEBS Lett., 1976, v. 72, № 1, p. 19–23.
5. Hoare D. G., Koshland D. E. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 10, p. 2447–2453.
6. Timkovich R. Anal. Biochem., 1977, v. 79, № 1, p. 135–143.
7. Carraway K. L., Triplett R. B. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 200, № 3, p. 564–566.
8. Carraway K. L., Koshland D. E. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 160, № 2, p. 272–274.
9. Riehm J. P., Sheraга H. A. Biochemistry, 1966, v. 5, № 1, p. 99–102.
10. Баландина Г. И., Лысогорская Е. Н., Морозова Е. А., Степанов В. М. Химия природы. соединен. 1975, т. 11, № 2, с. 198–201.
11. Grousselle M., Pades J. Eur. J. Biochem., 1977, v. 74, № 3, p. 471–480.
12. Угарова Н. Н., Рожкова Г. Д., Березин И. В. Биохимия, 1978, т. 43, № 7, с. 1242–1250.
13. Маляш Л. Ф., Оглоблина О. Г., Степанов В. М. Биохимия, 1972, т. 37, № 5, с. 1067–1073.
14. Сова В. В., Елякова Л. А. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1547–1552.
15. Угарова Н. Н., Рожкова Г. Д., Васильева Т. Е., Березин И. В. Биохимия, 1978, т. 43, № 5, с. 793–797.



16. Hoare D. G., Olson A., Koshland D. E. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 90, № 6, p. 1638-1643.
17. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Биохимия, 1981, т. 46, № 7, с. 1202-1209.
18. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. Биохимия, 1975, т. 40, № 2, с. 297-301.
19. Ogawa S., Shiro Y., Morishima I. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, № 2, p. 674-678.
20. Falk J. E. Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam - N. Y. - London: Elsevier, 1964, p. 236.

Поступила в редакцию  
15.III.1982

## CHEMICAL MODIFICATION OF HORSE RADISH PEROXIDASE BY WATER-SOLUBLE CARBODIIMIDES AND NUCLEOPHILES. THE ROLE OF ACCESSIBLE CARBOXYL GROUPS OF THE ENZYME IN CATALYSIS

UGAROVA N. N., KUTUZOVA G. D., ROGOZHIN V. V.,  
SAVITSKY A. P., SKIRDA L. A.

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

Carboxyl groups of horseradish peroxidase were modified by water-soluble carbodiimide in the absence or presence of nucleophiles: diamines, amines, or hydroxylamine. With chromophore-containing carbodiimide, methiodide-N-*p*-phenylazophenyl-N'-(N,N-dimethylaminopropyl)carbodiimide, it was shown that modification of one COOH-group lowers the catalytic activity by 35%, while further increase in degree of modification does not affect it. The product of peroxidase reaction with this carbodiimide was unstable and decomposed during chromatography on CM-cellulose (pH 5.0) to liberate the native enzyme. Therefore, modified enzyme seems to be O-acylurea rather than N-acylurea derivative. Monodinitrophenylated diamines, when used together with carbodiimides, were not only covalently bound to peroxidase COOH-group, but were also adsorbed on the enzyme. Diamines in the presence of carbodiimides attacked peroxidase like monofunctional agents. Catalytic properties of the modified peroxidase preparations were studied in reactions of individual or combined oxidation of *o*-dianisidine and potassium ferrocyanide over a wide pH range (3.5-9.0). Modification of COOH-groups affected neither  $k_{cat}$  and  $K_m$  for ferrocyanide, nor  $K_m$  for *o*-dianisidine, but diminished 2-10 times the  $k_{cat}$  for *o*-dianisidine depending on the carbodiimide structure. The observed shift in  $k_{cat}$  resulted from a marked decrease in the rate constants for electron transfer onto intermediate peroxidase compounds, E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>. The binding constant ( $K_s$ ) for *o*-dianisidine with the enzyme increases. Attachment of nucleophiles is without effect on the catalytic properties of the carbodiimide-modified peroxidase. The role of carboxyl groups in the peroxidase catalysis is discussed.