

ПЕРОКСИДАЗА ИЗ КОРНЕЙ ХРЕНА: МОДУЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЫ И ГЕМА

©2011 г. Г. С. ЗАХАРОВА^{1,3}, И. В. УПОРОВ²,
В. И. ТИШКОВ^{1,2,3*}

¹Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
Москва

³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва

I. Введение. II. Краткая характеристика пероксидазы хрена. III. Исследование пероксидазы с помощью мутагенеза. IV. Химическая модификация белковой глобулы. V. Химическая модификация протетической группы. VI. Моделирование структуры HRP с модифицированными производными гема. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Пероксидазы (КФ 1.11.1.X) относятся к ферментам класса оксидоредуктаз. Они катализируют окисление широкого спектра субстратов под действием пероксида водорода. Молекулярная масса ферментов этого типа колеблется от 17 до 84 кДа, а длина полипептидной цепи – от 153 до 753 аминокислотных остатков. Белковая глобула обычно образована 10–11 α -спиралями, β -складки либо отсутствуют, либо представлены слабо. В большинстве случаев в молекуле различают два структурных домена, между которыми в гидрофобном кармане расположена протетическая группа – гем (комплекс железа с протопорфирином IX (рис. 1) [1]).

Принятые сокращения: HRP – изофермент С пероксидазы из корней хрена; n-HRP – нативная HRP; rs-HRP – реконструированный фермент; БФСА – бифункциональные сшивающие агенты; ФГ – фенилгидразин; ФЭГ – фенилэтилгидразин; ЭГ – этилгидразин; МГ – метилгидразин; ППДР – площадь поверхности, доступная для растворителя; СПГ – синтетические производные гема; АБТС – 2,2-азино-диэтилбензтиазолинсульфонат.

*Адрес для корреспонденции: vitishkov@gmail.com

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00887а.

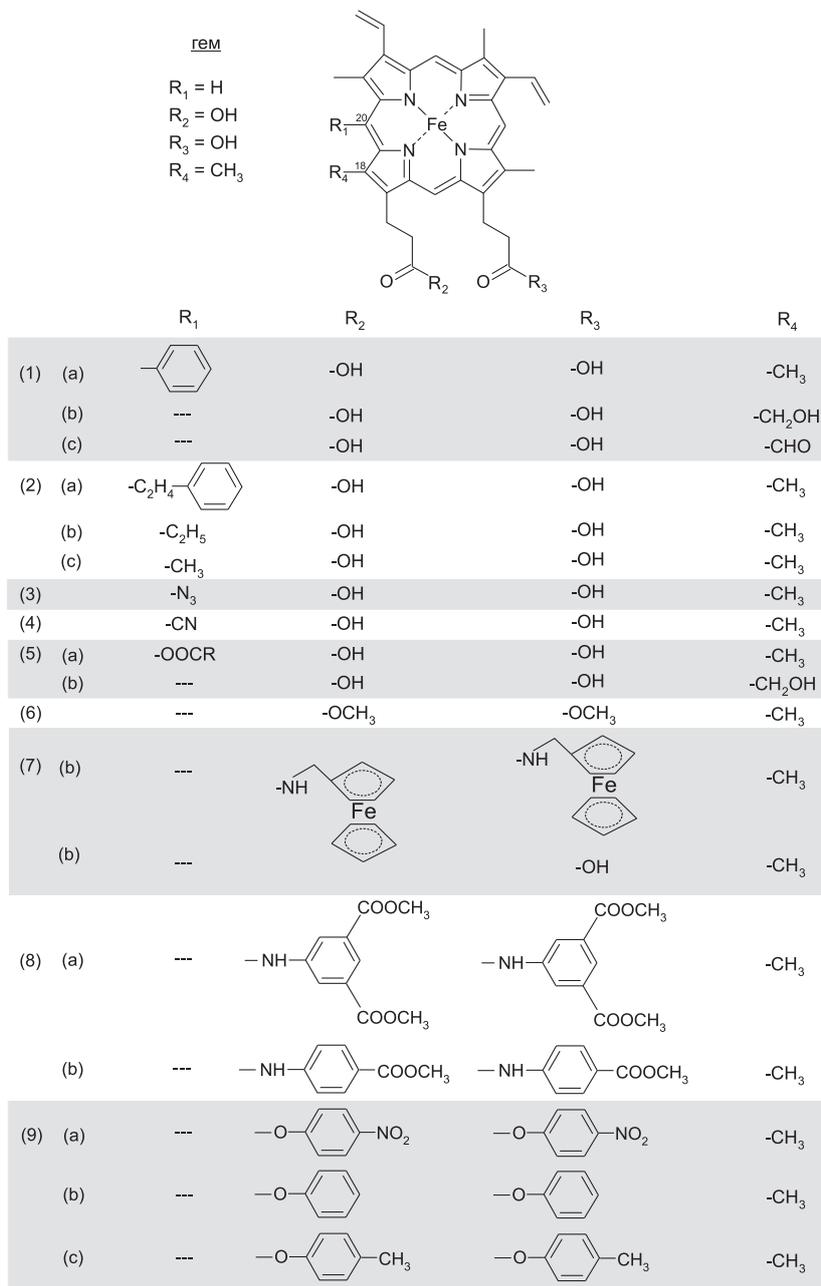


Рис.1. Подпись см. на сл. стр.

Рис. 1. Структура гема и продуктов его химической модификации.

Соединения 1–4 образовывались в результате каталитического окисления различных субстратов: 1 – фенилгидразина [87]; 2а - фенилэтилгидразина, 2б – этилгидразина, 2в – метилгидразина [88]; 3 – азида натрия [89]; 4 – цианида калия [90]. Соединения 5а и 5б – в результате инкубации в ацетатном буфере (рН = 4,4) или с другими кислотами (н-гексановой и фенилуксусной, при аналогичном значении рН) [91]. Соединения 6–9 – производные протопорфирина, полученные путём химического синтеза [97, 98, 101, 102].

Согласно общепринятой классификации, предложенной в 1992 г. [2], пероксидазы подразделяются на два больших суперсемейства: животные пероксидазы и растительные. Суперсемейство растительных пероксидаз в свою очередь включает в себя 3 класса. Эта классификация изначально основывалась на сопоставлении аминокислотных последовательностей ферментов, полученные впоследствии данные рентгеноструктурного анализа для представителей разных классов пероксидаз подтвердили правильность подобного деления.

Первый класс растительных пероксидаз включает внутриклеточные ферменты, такие как аскорбатпероксидаза, дрожжевая цитохром *c* пероксидаза и бактериальная каталаза-пероксидаза. Эти белки не гликозилированы и не содержат ни дисульфидных связей, ни ионов кальция. Ко второму классу относятся секретлируемые грибные пероксидазы. Наиболее хорошо изученные представители этого класса – лигнинпероксидаза и марганецпероксидаза, принимающие участие в окислении лигнина, а также пероксидаза из *Coprinus cinereus* (навозник обыкновенный, предыдущее название *Arthromyces ramosus*). Эти ферменты являются мономерными гликопротеидами, для которых характерно наличие четырёх дисульфидных связей и двух консервативных кальций-связывающих доменов. Третий класс представлен секретлируемыми пероксидазами растений. Эти ферменты также являются мономерными гликопротеидами, имеют четыре дисульфидные связи и два кальций-связывающих центра, однако расположение дисульфидных связей и «укладка» полипептидной цепи в пероксидазах второго и третьего классов несколько различаются.

Изофермент С пероксидазы из корней хрена хрена (HRP – horseradish peroxidase) является безусловным лидером по популярности среди растительных пероксидаз. В настоящее время он рассматривается как модельный для третьего класса растительных пероксидаз. Несмотря на то, что по многим параметрам HRP уступает другим известным пероксидазам, этот фермент наиболее широко используется на практике. Накопленные за десятилетия данные позволили эффективно использовать этот фермент при создании иммунологических тестов [3, 4], различных биосенсоров [5–7], мар-

керов для гистологических исследований [8], использовать в генной терапии [9, 10] и органическом синтезе [11, 12].

Исследования механизма действия HRP с целью улучшения или изменения её свойств активно ведутся и в настоящее время, при этом в основном используется метод направленного мутагенеза. В представленном обзоре будут рассмотрены и проанализированы данные, полученные с использованием другого подхода – химической модификации как аминокислотных остатков фермента, так и порфиринового кольца гема.

II. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

В корнях хрена (*Armoracia rusticana*) содержится множество различных пероксидаз, но основная доля приходится на изофермент С, характеризующийся изоэлектрической точкой $pI = 9$ и проявляющий максимальную активность при $pH = 6-8$. Молекулярная масса HRP составляет около 44 кДа, 18–22% приходится на углеводную часть. Из девяти остатков Asn, по которым возможно присоединение углеводных цепей, как правило, гликозилированы восемь остатков (Asn 13, 57, 158, 186, 198, 214, 255 и 268) [13]. Состав углеводной части молекулы гетерогенен и зависит от многих факторов, например, от стадии и условий роста. Олигосахариды оказывают стабилизирующее воздействие на фермент. Они защищают фермент от протеолиза и модификации полипептидной цепи под действием свободных радикалов, образующихся в ходе реакции [14–17].

На протяжении длительного времени третичная структура HRP была неизвестна. Установить её стало возможно только после получения рекомбинантного фермента [18], так как все попытки кристаллизации нативной HRP из-за гетерогенности гликозилирования не увенчались успехом. Рекомбинантный негликозилированный фермент был получен в результате экспрессии в клетках *E. coli* синтетического гена, HRP, синтезированного по аминокислотной последовательности, установленной Карин Велиндер [19]. В настоящее время установлена трехмерная структура еще шести других растительных пероксидаз – из арахиса [20], ячменя [21], *Arabidopsis thaliana* [22], сои [23], табака (И.Г.Газарян, персональное сообщение) и королевской пальмы [24].

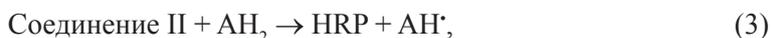
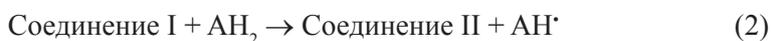
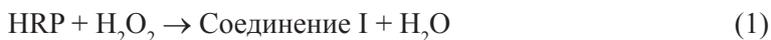
Данные рентгеноструктурного анализа HRP показали, что полипептидная цепь, состоящая из 308 аминокислотных остатков, образует 13 α -спиралей и 3 β -складки [25]. Правильная конформация молекулы поддерживается четырьмя дисульфидными связями (между остатками Cys 11–91, 44–49, 97–301 и 177–209). В структуре белковой

глобулы имеются два домена – дистальный и проксимальный. Каждый из них содержит сайт связывания кальция, в которых катионы кальция удерживаются семью координационными связями. Важная структурная роль Ca^{2+} подтверждена многочисленными экспериментальными данными [26–32] и результатами компьютерного моделирования [33]. Так как центры связывания катионов кальция соединены системой водородных связей с активным центром фермента, удаление Ca^{2+} влечёт за собой серьёзные изменения в свойствах фермента [31]. Дистальный катион связан менее прочно, чем проксимальный [1]. Его удаление приводит к падению каталитической активности приблизительно в 2 раза и снижению термостабильности фермента, а также стабильности при экстремальных значениях pH и при хранении. Третичная структура молекулы при удалении дистального Ca^{2+} претерпевает малые изменения [28]. Полная потеря катионов кальция приводит к инактивации фермента вследствие серьёзных конформационных изменений в активном центре [29–31].

В активном центре фермента расположена простетическая группа – гем (комплекс трехвалентного железа с протопорфирином IX, рис. 1). Ион Fe^{3+} имеет 4 координационные связи внутри гема, пятое координационное положение занимает атом азота имидазольного кольца проксимального остатка His170. Шестое координационное положение в релаксированном состоянии фермента свободно, но в процессе катализа происходит присоединение пероксида водорода к атому железа, и комплекс становится шестикоординационным [34].

Пероксидаза хрена способна окислять большой спектр субстратов, однако типичными субстратами являются фенолы, индолы, ароматические амины и сульфонаты. В процессе окисления ароматических субстратов происходит их полимеризация, что можно использовать, в частности, для очистки воды от загрязнений подобными соединениями [35, 36].

Каталитический цикл HRP включает следующие стадии:



где АН_2 – электрон-донорный субстрат, АН^\bullet – радикальный продукт реакции.

На первой стадии в результате взаимодействия HRP с пероксидом водорода от молекулы фермента отщепляются два электрона (один от атома железа и один из порфиринового кольца). В результате обра-

зуется катион-радикал, который получил название Соединения I. Его восстановление донором электронов до исходного ферри-фермента протекает в две стадии через образование Соединения II. Таким образом, превращение субстрата протекает по механизму пинг-понг (Соединение I реагирует с первой молекулой субстрата с образованием Соединения II, которое в свою очередь взаимодействует со второй молекулой субстрата). Более подробно механизм катализа рассмотрен в обзорах [15, 37–39].

III. ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ С ПОМОЩЬЮ МУТАГЕНЕЗА

Этот высокоэффективный метод позволяет выявить аминокислотные остатки, играющие ключевую роль в катализе, поддержании структуры и стабильности фермента. С его помощью удаётся получить ферменты с повышенной стабильностью [40, 41], изменённой субстратной специфичностью [42]. Результаты таких исследований активно используются на практике для получения ферментов с заданными свойствами. В нашей лаборатории таким образом были получены биокатализаторы с уникальными свойствами на основе формиатдегидрогеназы и оксидазы D-аминокислот [43–47].

Для введения аминокислотных замен в молекулу фермента можно использовать методы неупорядоченного (направленная эволюция, генная мозаика и др.) и направленного мутагенеза. Последний подход часто называют рациональным дизайном, поскольку точечное введение замен выполняют на основе анализа аминокислотных последовательностей или структуры фермента. В случае пероксидазы в основном используется рациональный дизайн. Это связано с тем, что в клетках *E.coli* HRP экспрессируется в нерастворимой форме и для получения активного фермента проводится рефолдинг из телец включения [18]. В лаборатории Ф.Арнольд были предприняты попытки с помощью направленной эволюции ввести в молекулу HRP точечные замены, которые позволили бы экспрессировать активный рекомбинантный фермент в клетках *E.coli* [48] и в метилотрофных [49] и пекарских [50] дрожжах. Однако в случае *E.coli* эксперименты были неудачными, а в дрожжах происходило гипергликозилирование – молекулярная масса углеводной части достигала до 60 кДа, в то время как в природном ферменте она равна всего 10 кДа.

Направленный мутагенез HRP был использован для выяснения роли аминокислотных остатков в связывании гема в дистальной области активного центра, изучения механизма взаимодействия с

H_2O_2 и каталитического окисления субстрата, поиска потенциальных сайтов связывания различных типов субстратов, а также для оценки роли катионов кальция в фолдинге и каталитическом действии HRP. Приведём основные выводы этих экспериментов:

1) дистальные остатки His42 и Arg38 играют основную роль в связывании молекулы H_2O_2 и гетеролитическом расщеплении связи O-O [51–53];

2) остаток Phe41 участвует в координации гема, в контролировании доступа к феррильному кислороду в Соединении I, влияет на субстратную специфичность [51, 54–57];

3) водородные связи между остатками His42, Asn70 и Glu64 соединяют дистальный кальций-связывающий участок и активный центр фермента. По-видимому, это необходимо для обеспечения правильной ориентации имидазольного кольца His42 по отношению к порфирину [58–60];

4) прочность связывания гема в активном центре обеспечивается наличием координационной связи между железом гема и проксимальным остатком His170 [61];

5) роль остатка Asp247, возможно, состоит в усилении основности His170, что позволяет поддерживать комплекс железа в пятикоординатном состоянии [25];

6) остатки Phe179 и Phe142 играют ключевую роль в связывании ароматических субстратов [62–64];

7) остаток Trp117 участвует в миграции энергии внутри молекулы и влияет на фолдинг фермента и его стабильность [65, 66];

8) остаток Thr171 важен для поддержания правильной конформации фермента, т.к. он соединяет гем с проксимальным кальций-связывающим центром [67];

9) неструктурированные участки полипептидной цепи играют важную роль в стабильности фермента. Аминокислотные замены в этих участках (Thr102Ala, Gln106Arg, Gln107Asp, Thr110Val, Ile180Phe) снижали температурную стабильность фермента [68];

10) замена в рекомбинантном белке остатков Asn13 и Asn268 (которые в нативной HRP гликозилированы) на остатки Asp приводит к увеличению термостабильности и устойчивости к инактивации пероксидом водорода [17].

С подробным описанием введенных точечных мутаций и результатов, к которым приводили замены аминокислотных остатков, можно ознакомиться в обзорах [15, 37–39].

Таким образом, методы генной инженерии предоставляют широкие возможности исследователю в получении фермента с новыми

свойствами, однако влиять на характеристики фермента можно не только путем введения мутаций в белок. Не менее эффективным средством служит введение химических модификаций. Пример подобного подхода – модификация экспонированных в раствор аминокислотных остатков.

IV. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЫ

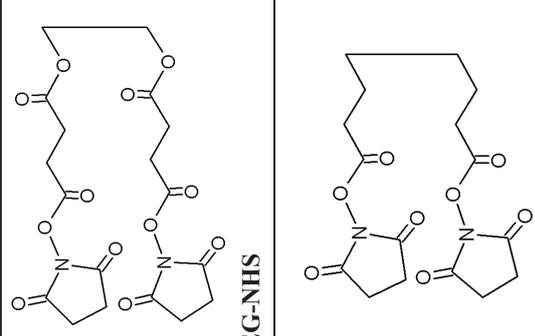
Эксперименты по химической модификации проводили как с нативной пероксидазой хрена (n-HRP), имеющей олигосахаридную часть, так и с рекомбинантным негликозилированным ферментом. В большинстве случаев использовали n-HRP, поскольку в этом случае сохраняется возможность её иммобилизации и конъюгирования с другими белками (в частности, антителами) её углеводной части. Кроме того, гликозилированный фермент более стабилен и доступен.

Химическая модификация остатков His [69–71], Tyr, Arg, Asp и Glu [72] или не влияет на свойства фермента, или приводит к их ухудшению. Оказалось, что из 3 остатков His (40, 42 и 170) для модификации доступны только два, так как His170 участвует в координации гема [71]. Модификация остатка His42 приводит к потере активности фермента, однако при этом такой фермент сохраняет способность связывать ароматические субстраты и образовывать Соединение I [70, 71]. Эти результаты служат подтверждением ключевой роли остатка His42 в процессе переноса энергии от субстрата к протетической группе.

Положительные результаты были получены только после модификации остатков лизина. Поэтому именно они и выступали чаще всего в качестве мишени [73–84]. Шесть остатков лизина в молекуле HRP (Lys 65, 84, 149, 174, 232 и 241 [19]) в разной степени подвержены модификации. Показано, что наиболее реакционно способен остаток Lys232, в меньшей степени – Lys241 и Lys174, а остатки Lys65, 84 и 149 практически не модифицируются [77]. Эти данные хорошо согласуются с результатами других работ, в которых было установлено, что на 1 молекулу пероксидазы приходится 3 модифицированных остатка Lys [75, 77, 78, 80–84].

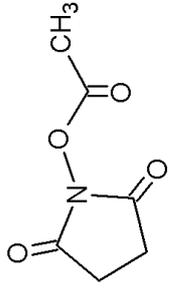
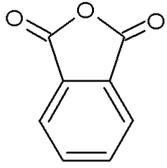
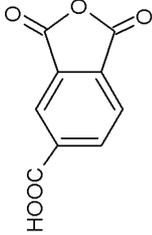
Для модификации остатков Lys использовали как би-, так и монофункциональные реагенты (см. табл. 1). Исследования показали, что взаимодействие с бифункциональными сшивающими агентами (БФСА) оказывало стабилизирующий эффект. Например, скорость инактивации EG-NHS-HRP (здесь и далее первая часть сокращённого названия фермента относится к названию модифицирующего агента в

Таблица 1
Химическая модификация остатков лизина в пероксидазе хрена*

Реагент	Lys	Термоста- бильность		Активность в органических растворителях	Активность в органических растворителях		Каталитическая активность		Ссылка	
		t, °C	Δ		растворитель	t, °C	Δ	S		Δ
 <p>EG-NHS</p> <p>SA-NHS</p>	2	3	4	растворитель	5	6	7	8	9	10
	4-5	65	+	метанол	25	~	ТМБ	~	[74, 77]	
	3	72,5	+	ДМФА	25	+	ТМБ	~		
				ТГФ	60	+	ТМБ	~		
				метанол	25	~	ТМБ	~	[74]	
		н.д.	н.д.	ДМФА	25	+	ТМБ	~		
				ТГФ	60	+	ТМБ	~		
				метанол	25	~	ТМБ	~		
				ТГФ	60	+	ТМБ	~		
				метанол	25	~	ТМБ	~		

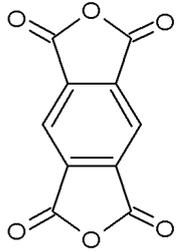
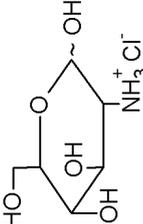
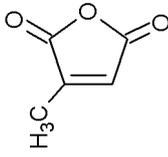
Продолжение табл. 1 см. на сл. стр.

Продолжение табл. 1.

		2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	 AA-NHS	3	65	+	метанол	25 60	~ +	ТМБ	~	[74, 75]
					ДМФА	25 60	+			
					ТГФ	25 60	+			
					метанол	60	+	ТМБ	~	[78-80]
					ДМФА	25 30	+	Ф АФ	+	
					ТГФ	60	+	МФ НФ	+	
					АЦН	65 30 60	+			
					н.д.	н.д.	н.д.	ТМБ	-	[79]
2	 PA	3	50	+	метанол	60	+	ТМБ	~	[78-80]
		2	60	+	ДМФА	25 30	+	Ф АФ	+	
2	 TMA	2	65	~	н.д.	н.д.	н.д.	ТМБ	-	[79]

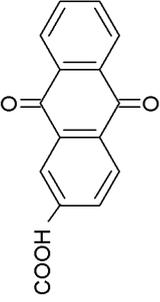
Продолжение табл. 1 см. на сл. стр.

Продолжение табл. 1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
 РМА	2	65	~	н.д.	н.д.	н.д.	ТМБ	-	[79]
	3	50	+	н.д.	н.д.	н.д.	Ф	+	[78]
 GA	3	50	+	ДМФА	25	+	Ф	~	[82, 83]
		70	+	ТГФ	25	+			
				ДМСО	25	+			
 СА									

Окончание табл. 1 см. на сл. стр.

Окончание табл. 1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
 MA	3	50	+	ДМФА	25	+	н.д.	н.д.	[82]
				ТГФ	25	+			
				ДМСО	25	+			
 AQ	3	50	~	н.д.	н.д.	н.д.	Ф	+	[81, 84]
		75	+						

* Обозначения: Δ – эффект (изменение свойства по сравнению с немодифицированным ферментом), S – субстрат; EG-NHS – этиленгликольбис-(N-гидроксиsuccинимидилsuccинат); SA-NHS – субериновой кислоты бис-(N-гидроксиsuccинимидный эфир); AA-NHS – уксусной кислоты N-гидроксиsuccинимидный эфир; PA – фталевый ангидрид; TMA – тримеллитовый ангидрид; PMA – пиромеллитовый ангидрид; GA – глюкозамина гидрохлорид; CA – цитраконовый ангидрид; MA – малеиновый ангидрид; AQ – антрахинон-2-карбоновая кислота; ДМФА – диметилформамид; ТГФ – тетрагидрофуран; АЦН – ацетонитрил; ДМСО – диметилсульфоксид; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; Ф – фенол; АФ – 4-аминофенол; МФ – 4-метилфенол; НФ – 4-нитрофенол; н.д. – нет данных.

соответствии с табл. 1) при 65°C была в 4 раза меньше по сравнению с нативным ферментом [77]. **EG-NHS-HRP** и **SA-NHS-HRP** также были более устойчивы в диметилформамиде (ДМФА), метаноле, тетрагидрофуране (ТГФ), а каталитическая активность модифицированных ферментов оставалась на уровне нативной HRP.

Модификация HRP монофункциональными реагентами также дала положительные результаты. **AA-NHS-HRP** была в 5 раз более стабильна при 65°C и значительно более активна в органических растворителях (метаноле, ДМФА и ТГФ), чем n-HRP [75]. Модификация фталевым ангидридом (**PA**) [78–80], гидрохлоридом глюкозамина (**GA**) [78] и антрахинон-2-карбоновой кислотой (**AQ**) [81, 84] позволила получить не только более стабильные, но и более каталитически эффективные (высокое значение k_{cat}/K_m) ферменты в реакциях окисления фенола и его производных (4-амино-, 4-метил- и 4-нитрофенола). Модификация **AQ** привела к улучшению как каталитической константы k_{cat} , так и константы Михаэлиса K_m фермента к фенолу. Кроме того, **AQ** успешно выполняла роль медиатора электронного переноса между пероксидазой и электродом, увеличивая общую эффективность процесса. Каталитическая активность **PA-HRP** была изучена как в водном растворе, так и в присутствии ДМФА. В водном растворе в отношении всех перечисленных субстратов **PA-HRP** демонстрировала более высокую каталитическую активность (k_{cat}) и более низкое значение K_m по сравнению с n-HRP. В растворе ДМФА величины K_m для модифицированного фермента (за исключением 4-нитрофенола) были лучше, однако каталитическая константа была немного ниже. Тем не менее, во всех случаях эффективность **PA-HRP** (k_{cat}/K_m) была выше, чем у n-HRP. Термостабильность **PA-HRP** также значительно повысилась: после инкубации в течение 90 минут при 50°C фермент сохранял около 80% активности. По отношению к n-HRP время полужизни $\tau_{1/2}$ модифицированного фермента при 50°C увеличилось в 10 раз (при 65°C – в 4 раза). Возросла и устойчивость к органическим растворителям (метанолу, диметилформамиду, ацетонитрилу, тетрагидрофурану).

Аналогичное повышение стабильности было достигнуто и для ферментов, модифицированных цитраконовым и малеиновым ангидридами (**CA-HRP** и **MA-HRP** соответственно) [82, 83]. При комнатной температуре возросла их стабильность в диметилсульфоксиде (ДМСО), ТГФ и ДМФА. Время полужизни полученных ферментов при 70°C увеличилось примерно в 3 раза, а активность после инкубации в течение 3 часов при 50°C составляла 82, 74 и 30% от исходной для **MA-HRP**, **CA-HRP** и n-HRP соответственно. Для **TMA-HRP** и

РМА-HRP существенных изменений в термостабильности не наблюдали, поэтому дальнейшее изучение их свойств не проводили [79].

Таким образом, можно выделить два различных подхода к химической модификации поверхности HRP – с использованием бифункциональных и монофункциональных реагентов. В первом случае происходит образование внутримолекулярных сшивок. Установлено, что на одну молекулу фермента приходится лишь одна сшивка в проксимальном домене (между Lys232 и Lys241), при этом остаток Lys174 также подвергается модификации. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными [77] о доступности для модификации аминокислотных остатков лизина и их взаимном расположении, определяющем возможность образования между ними сшивки при использовании бифункциональных агентов известной длины. Вероятно, в этом случае стабилизирующий эффект связан с увеличением «жесткости» молекулы в области проксимального кальций-связывающего домена, что может препятствовать диссоциации иона кальция, имеющего важное структурное значение [77].

Работы по модификации HRP монофункциональными реагентами в свою очередь можно разделить на приводящие к 1) нейтрализации положительного заряда остатков Lys (например, ацетилирование фермента с помощью AA-NHS [74]); 2) смене положительного заряда остатков Lys на отрицательный (например, модификация фталевым альдегидом [78–80]). Отдельно стоит выделить реагенты, выступающие в качестве медиаторов переноса электронов (например, антрахинон-2-карбоновую кислоту [81, 84]), так как в этом случае основной целью модификации является не повышение стабильности фермента, а увеличение эффективности переноса электронов между HRP и электродом. С точки зрения повышения стабильности фермента, наиболее сильный эффект наблюдался при введении с заместителем одного отрицательного заряда на один модифицированный остаток Lys. При модификации фермента **ТМА** и **РМА** количество вводимых отрицательных зарядов на один остаток лизина возрастало до двух и трёх соответственно, но стабилизирующий эффект при этом не наблюдался. Как полагают ряд авторов, изменения в характере электростатических взаимодействий в молекуле фермента могут приводить к его стабилизации [77, 79, 83].

Таким образом, путём химических модификаций остатков лизина можно добиться существенных улучшений свойств пероксидазы хрена. Однако и мутагенез, и химическая модификация аминокислотных остатков затрагивают лишь белковую часть фермента. Альтернативным подходом является внесение изменений в простетическую группу - гем.

V. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРОСТЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

Гем в глобуле пероксидазы связан нековалентно, и давно существуют хорошо отработанные методики как его удаления для получения апофермента, так и реконструкции холо-формы HPR из апофермента и гема [85, 86]. Последний способ активно используется при рефолдинге рекомбинантной HPR из телец включения [57]. Те же методики были использованы и для изучения влияния модификации порфирина на свойства пероксидазы.

В области исследования химической модификации гема можно выделить два основных направления: 1) исследование механизма возникновения модификаций протопорфирина в результате его взаимодействия с образующимися в ходе реакции радикалами (автокаталитическая модификация) и влияние этих модификаций на свойства фермента, и 2) направленная химическая модификация гема с целью изучения свойств HPR с измененным протопорфирином. На рис. 1 приведена структура гема и варианты его модификации, изученные различными авторами. Нумерация представленных производных протопорфирина будет использоваться далее для сокращения названий комплексов апо-белка с соответствующим модифицированным гемом.

Представленные на рис. 1 соединения **1–5** образуются в результате автокаталитической модификации гема [87–91] и, в основном, являются его δ -мезо-производными (δ -атом углерода по номенклатуре Фишера соответствует C_{20} по номенклатуре ИЮПАК). Введение заместителей в это положение, как правило, сопровождается необратимой потерей активности фермента. Исключением является реакция с метилгидразином (МГ): после очистки с помощью гель-фильтрации фермента, содержащего δ -мезо-метилгем в качестве простетической группы (соединение **2c**, рис. 1), от субстратов и продуктов реакции наблюдалось медленное восстановление каталитической активности, однако степень реактивации фермента не была указана [88].

При модификации гема радикалы, образующиеся в процессе катализа, должны взаимодействовать и с белковой глобулой, что также может служить причиной инактивации HPR. Возникновение химических модификаций в полипептидной цепи было подтверждено экспериментально путём введения радиоактивных меток в соответствующие субстраты. Оказалось, что в зависимости от типа субстрата соотношение доли модификации в протопорфирине и в белковой глобуле сильно варьирует. Например, при использовании в качестве субстрата фенилгидразина (ФГ) атаке радикалов в

наибольшей степени подвергается именно белковая глобула, а не протетическая группа [87]. При использовании в качестве субстрата фенилэтилгидразина (ФЭГ), этилгидразина (ЭГ), метилгидразина (МГ) [88] и азид-иона [89] наблюдалась обратная ситуация. Чтобы разделить вклады модификаций белка и протетической группы в инактивацию фермента, были проведены опыты по выделению гема из модифицированных HRP и его последующему встраиванию в немодифицированный апо-белок. Было показано, что такие реконструированные ферменты обладали крайне низкой каталитической активностью или были неактивными [90, 91]. Отсюда можно заключить, что модификация гема является одним из основных факторов, ответственных за потерю ферментативной активности. С другой стороны, полученные данные свидетельствуют о доступности части гема в области C₁₈–C₂₀ и о важной роли именно этой области для проявления каталитической активности фермента.

Интересно отметить следующие характерные особенности процесса автокаталитической модификации. Во всех случаях скорость инактивации фермента напрямую зависела от концентрации субстратов, однако наибольшая потеря активности достигалась при различных соотношениях фермент:субстрат – на 1 молекулу фермента 11–13 молекул ФГ, 11 ФЭГ, 32 ЭГ и 80 молекул МГ. В случае инактивации азидом натрия было необходимо использовать значительно больший избыток субстрата. При соотношении азид:фермент 60:1 остаточная пероксидазная активность составляла 20%. Дальнейшее увеличение соотношения азид:фермент давало очень слабый эффект. Для снижения остаточной активности до 5% от исходной требовался уже 600-кратный молярный избыток азиды по отношению к ферменту. Полной инактивации фермента азидом (как и ФГ) удалось достичь лишь после его очистки с помощью гель-хроматографии и повторной его инкубации с азидом и пероксидом водорода. Авторы видят возможное объяснение данного эффекта в наличии в реакционной смеси неуставленного продукта реакции, который связывается с ферментом и таким образом препятствует дальнейшей его атаке радикалами [87, 89].

Ацетат-ион также может модифицировать HRP в присутствии пероксида водорода. Например, после инкубации фермента в 50 мМ ацетатном буфере (рН = 4,4) со 150-кратным молярным избытком H₂O₂ в течение 20 минут остаточная активность HRP составляла $5,6 \pm 3,4\%$ [91]. Более детальное исследование процесса показало, что наряду с образованием модифицированного гема происходило и его последующее разрушение. Кроме этого наблюдалась прямая

деструкция интактного гема. Поэтому для достижения максимального выхода модифицированного гема реакцию проводили в присутствии высоких концентраций ацетата при минимальном времени проведения процесса. При замене ацетата на *n*-гексановую или фенилуксусную кислоту были получены идентичные результаты. Инкубация же в цитратном буфере не приводила к образованию модифицированного протопорфирина [91]. Таким образом, модификация гема наблюдалась только в случае алкилкарбоновых кислот.

Важной характеристикой гемсодержащих белков служит присутствие в спектре поглощения полосы с максимумом около 403 нм (полоса Soret). Изменения в интенсивности и положении максимума полосы Soret отражают изменения в структуре фермента в области активного центра [92]. Во всех упомянутых выше случаях автокаталитической модификации гема (за исключением ацетилирования) потеря активности сопровождалась заметным снижением интенсивности полосы Soret и сдвигом максимума в длинноволновую область.

Эксперименты, аналогичные описанным выше, проводились и с другими гем-содержащими ферментами и белками. Например, реакция с фенилгидразином приводила к инаktivации цитохрома P-450 [93], миоглобина [94] и каталазы [95, 96]. Для последней также наблюдали инаktivацию в присутствии азид-иона. Однако химической модификации гема в этих случаях не происходило. Вместо этого в реакцию с радикалами вступал атом железа, и причиной инаktivирования фермента являлось образование прочного шестикординатного комплекса, что препятствовало его взаимодействию с H_2O_2 .

Оценка величины площади поверхности, доступной для растворителя (ППДР), показывает, что практически весь гем в HRP экранирован от растворителя белковой глобулой, за исключением области $C_{18}-C_{20}$ атомов (для C_{18} ППДР составляет $3,2 \text{ \AA}^2$; для C_{20} – $2,4 \text{ \AA}^2$). Это говорит о «закрытости» активного центра пероксидазы хрена для проникновения относительно больших молекул и, следовательно, о невозможности их взаимодействия с атомом железа.

Таким образом, из приведенных выше данных по автокаталитической модификации можно сделать следующие выводы: 1) гем в HRP расположен в узкой полости, исключающей возможность проникновения даже относительно небольших молекул; 2) атаке радикалами и, как следствие, модификации подвергается единственный относительно открытый участок протопорфирина (δ -кромка гема); 3) этот процесс приводит к потере ферментативной активности.

Перейдём к рассмотрению второй группы модифицированных по гемму ферментов, получаемых путём встраивания синтетических производных гема (СПГ) в апо-белок. Их структуры представлены на рис. 1 (соединения **6–9**). Все указанные СПГ были получены посредством химической модификации пропионовых групп гема и различаются лишь природой заместителей. Для получения реконструированных HRP (**rs-HRP**) применялась стандартная методика (с небольшими изменениями, например, с увеличением времени инкубации) [97, 102]. При внесении СПГ в раствор апобелка за счет их встраивания в белковую глобулу происходило восстановление каталитической активности фермента. Добавление к раствору **rs-HRP** немодифицированного гема не приводило к дальнейшему увеличению ферментативной активности, что может служить подтверждением полноты встраивания СПГ в полость фермента, а сходство спектров поглощения для **rs-HRP** и **n-HRP** – подтверждением специфичности процесса.

Введение заместителей в гем приводило к изменению как структуры белковой глобулы, так и в свойств фермента в сравнении с нативной HRP. В большинстве случаев происходила компактизация молекулы (за исключением **6-rs-HRP**, в этом случае существенных изменений не наблюдалось; см. табл. 2; в таблице и далее в тексте в обозначении HRP с модифицированным гемом цифра соответствует номеру структуры гема на рис. 1). Более плотной упаковкой можно объяснить тот факт, что термостабильность **8-** и **9-rs-HRP** была выше, чем у **n-HRP** – время полужизни $\tau_{1/2}$ увеличилось в 2–4 раза [97, 98]. Помимо повышения термостабильности в некоторых случаях произошло увеличение и стабильности фермента в органических растворителях. Устойчивость **8a-rs-HRP** к ацетонитрилу, диметилсульфоксиду и метанолу значительно превосходила устойчивость **n-HRP** (**8b-rs-HRP** также была более устойчива, но в меньшей степени). Структуры **9a-**, **9b-** и **9c-rs-HRP** были более стабильны в растворе диметилформамида (ДМФА) при 60°C [98].

Введение заместителей в гем приводило также и к изменению спектральных характеристик ферментов. Флуоресценция белков обусловлена остатками Trp, Tyr и Phe. В молекуле HRP присутствует один остаток триптофана (Trp117), 5 остатков тирозина а также 20 остатков фенилаланина [19]. При длине волны возбуждения 295 нм флуоресценция триптофана преобладает в суммарном спектре флуоресценции фермента [99]. Максимум излучения флуоресценции остатка Trp в **n-HRP** находится на 328 нм. Спектр флуоресценции HRP зависит от миграции энергии возбуждения Trp117 на гем. Следовательно, изменения структуры фермента в области связывания

Таблица 2
Содержание вторичных структур в HRP дикого типа и ферментах, полученных после реконструкции апоформы модифицированным гемом

Фермент	WT	6*, [101]	7*, [102]		8*, [97]		9*, [98]		
			а	б	а	б	а	б	в
α -спирали	37	32,4	—	—	55	44	50	41	61
β -структуры	13	17,6	—	—	9	12	10	13	7
петли	49	50	—	—	36	44	40	45	32

* указаны номера структур синтетических производных гема в соответствии с рис. 1.

гема, приводящие к изменению расстояния или пространственной ориентации Trp117 относительно плоскости гема, а также изменения в окружении Trp, влияют на спектр его излучения [100]. В случае реконструированных ферментов с СПГ наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции и сдвиг максимума в длинноволновую сторону. Это служит дополнительным подтверждением изменений в структуре **rs**-HRP, которые, по-видимому, связаны с увеличением расстояния между гемом и остатком Trp, а также усилением полярности его окружения [97, 98].

Во всех случаях каталитическая активность **rs**-HRP отличалась от таковой для *n*-HRP. Так для **6-rs**-HRP наблюдалось сильное падение активности с гваяколом, тиоцианатом и иодидом. При этом способность связывать гваякол сохранилась на уровне нативной пероксидазы, а для комплекса с тиоцианатом произошло 20-кратное падение константы диссоциации [101]. Фермент **7b-rs**-HRP не проявлял каталитической активности по отношению к 2,2-азино-диэтилбензтиазолинсульфонату (АБТС) и ферроценам. Активность же **7b-rs**-HRP по отношению к ферроценам увеличилась, но в реакции окисления АБТС упала в 3 раза по сравнению с *n*-HRP. При этом способность связывать АБТС сохранилась на уровне нативной пероксидазы. Авторы связывают изменение субстратной специфичности с возникновением нового центра связывания, включающего остаток ферроцена [102]. Для **8-rs**-HRP наблюдалось снижение значения K_m в реакциях окисления фенола и его *para*-производных (*n*-гидроксibenзойной кислоты, 4-аминофенола) [97], что, возможно, связано с усилением гидро-

фобных взаимодействий между ароматическими субстратами и бензольным кольцом заместителя в положении R₂ (рис. 1).

Синтетические производные гема (СПГ), образующиеся в результате этерификации *para*-производных фенола с карбоксильными группами гема, оказывали различное влияние на каталитические свойства фермента. Активность и сродство **9a-rs**-HRP по отношению к фенолу возросли, в то время как **9b-** и **9c-rs**-HRP демонстрировали ухудшение каталитических свойств. Такое изменение свойств связывают с различиями в донорно-акцепторных свойствах заместителей: акцепторы электронов (*n*-нитрофенол) снижают электронную плотность порфиринового кольца, таким образом повышая скорость восстановления Соединения II до нативного фермента [98].

Таким образом, из экспериментов по получению реконструированной пероксидазы хрена с модифицированным гемом можно сделать следующие выводы: 1) встраивание СПГ в апобелок протекает достаточно эффективно даже при использовании для модификации пропионовых групп объёмных заместителей; 2) полученные реконструированные ферменты в большей или меньшей степени сохраняют каталитическую активность (в отношении некоторых субстратов активность rs-HRP может заметно превосходить активность n-HRP); 3) на каталитические свойства HRP можно влиять путём варьирования вводимых в гем заместителей.

VI. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ HRP С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ГЕМА

Для понимания механизма и объяснения эффектов изменения свойств пероксидазы с модифицированными производными гема нами было проведено компьютерное моделирование пространственных структур комплексов апо-фермент–модифицированный гем. Наиболее интересные, как нам представляется, результаты представлены ниже. Построение моделей производилось с помощью модуля Builder программного комплекса InsightII (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). В качестве начальной выступала структура пероксидазы хрена (PDB код 1ATJ). С использованием инструментов Builder к гему достраивались дополнительные химические группы. Далее проводился визуальный анализ модели для выявления тесных контактов между атомами введённых заместителей и окружающих аминокислотных остатков. Если такие имелись, то варьированием торсионных углов боковой цепи аминокислотных остатков атомы раздвигались друг от друга на приемлемое расстояние (данная процедура имела место в отношении

остатка Pro141 в случае **1a-** и **2a-HRP** и остатка Arg31 в случае **9a-**, **9b-** и **9c-rs-HRP**). После этого структура подвергалась 500 шагам энергетической минимизации с применением программы Discover_3 пакета InsightII с целью приведения белковой структуры к равновесию. Использование энергетической минимизации оправдано, когда начальное возмущение структуры может быть устранено за счёт небольших смещений атомов в локальной области белковой молекулы. В ряде случаев такие возмущения оказались весьма существенны или вообще неустранимы энергетической минимизацией. К примеру, в случае фермента **1a-HRP** бензольное кольцо в положении R₁ пересекается с остатком Pro141, образуя неустранимый дефект. Для его устранения было проведено поэтапное моделирование: сначала в положение R₁ вводилась метильная группа, после чего структура подвергалась минимизации; затем метильная группа удалялась, а вместо неё вставлялось бензольное кольцо. В полученной структуре имелись тесные контакты между атомами бензольного кольца и белковой глобулой, но они не препятствовали проведению энергетической минимизации. Следующим этапом стало применение метода молекулярной динамики, как более эффективной процедуры приведения белковых структур к равновесию. Был применён стандартный протокол молекулярной динамики при постоянной температуре (T = 300 K) в вакууме (два катиона кальция и молекулы связанной воды, присутствующие в кристаллической структуре, были включены в систему). Шаг интегрирования составлял 1 фс, длина траектории – 20 пс. Для всех расчётов использовалось силовое поле CVFF [103]. Во всех случаях наибольшие структурные изменения происходили в первые 5 пс что свидетельствует о стабильности полученных структур.

На рис. 2 представлены результаты моделирования **1a-HRP**. Исходная структура представлена более светлым цветом, а модельная – более темным. Как видно из рис. 2, наибольшие структурные изменения произошли в районе аминокислотных остатков 140–143. Введение бензольного заместителя в гем приводит к тому, что эта группа оказывается в том месте, где в нативном ферменте расположен остаток Pro141. Для снятия стерических затруднений в структуре модифицированного фермента произошел небольшой поворот порфиринового кольца относительно оси Fe–His170 и общее «заглубление» гема в занимаемой полости. Изменения также затронули остатки Phe68 и Phe142, участвующие в связывании ароматических субстратов, и каталитические остатки His42 и Arg38, играющие ключевую роль в расщеплении пероксида водорода.

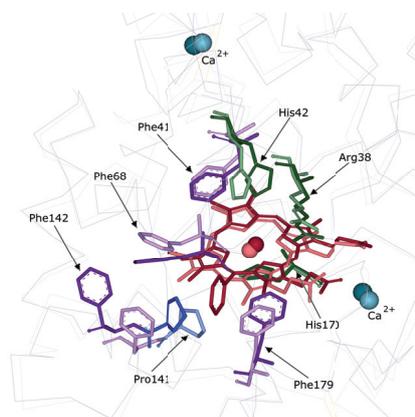


Рис. 2. Сравнение структур пероксидаз, содержащих нативный и модифицированный гем (соединение **1a** на рис. 1) (указаны светлыми и темными цветами, соответственно).

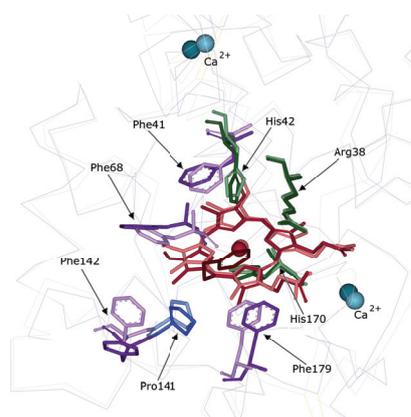


Рис. 3. Сравнение структур пероксидаз, содержащих нативный и модифицированный гем (соединение **2a** на рис. 1) (указаны светлыми и темными цветами, соответственно).

Согласно экспериментальным данным, **1a**-HRP реагировала с H_2O_2 с образованием Соединения I, но не восстанавливалась до Соединения II при добавлении электрон-донорного субстрата. Полученная компьютерная модель хорошо согласуется с высказанным ранее предположением [87], что отсутствие каталитической активности **1a**-HRP по отношению к гваяколу может быть объяснено возникновением стерических препятствий для контакта субстрата с гемом. Возможно, определённую роль играют и изменения в положении остатков Phe142 и Phe68.

В случае **2a**-HRP (рис. 3), где бензольное кольцо не столь «жёстко» связано с протопорфирином, смещение остатков 140–143 менее выражено. Кроме того, тесного контакта введённого заместителя с Phe141 удастся избежать без сдвига гема. В остальном картина схожа с предыдущим случаем, и причиной потери активности фермента, вероятно, также состоит в том, что объёмный заместитель в δ -мезоположении блокирует для субстратов доступ к активному центру.

Структура комплекса диметилового эфира протопорфирина с апобелокком (**6-rs**-HRP), полученная с помощью компьютерного моделирования, практически совпадает со структурой рекомбинатного фермента (на рис. не показано). Однако данные спектроскопического анализа говорят о структурных изменениях в гем-связывающей области: наблюдался сдвиг максимума пика Soret реконструирован-

ной пероксидазы на 6 нм в длинноволновую область и уменьшение его интенсивности [101]. Фермент также демонстрировал низкую активность по отношению как к ароматическим субстратам (например, гваяколу), так и к небольшим двухэлектронным донорам электронов (например, иодид-иону) [101]. Авторы связывают наблюдавшееся падение каталитической активности с изменением положения гема в полости фермента из-за нарушения сети водородных связей между белковой глобулой и этерифицированными карбоксильными группами. Кроме того, нейтрализация их отрицательных зарядов в результате модификации может снижать эффективность восстановления пероксида водорода, приводя к уменьшению скорости образования Соединения I. Кинетические константы для всех стадий катализа в работе [101] не были определены. Поэтому для более точного объяснения низкой активности **6-rs**-HRP необходимы дальнейшие исследования.

Введение объёмных заместителей в положения R_2 и R_3 приводит к заметным конформационным изменениям в молекуле. Значительно меняется положение аминокислотных остатков, примыкающих к модифицированным пропионовым группам гема (таких, как Arg31, Arg75, Asp174, Gln176, Leu218). Заместители как бы расталкивают их и достаточно свободно «встают» в образующуюся полость. При этом порфириновое кольцо не сильно меняет своё положение (в случае **9a-rs**-HRP происходит слабое углубление гема внутрь глобулы (рис. 4а); в случае **9c-rs**-HRP – небольшой разворот порфиринового кольца вокруг оси Fe–His170 (рис. 5)). Заметны изменения в расположении остатков Phe68 и Phe142, однако эти остатки в исходной структуре имеют высокие значения В-фактора, что объясняет их высокую подвижность в процессе молекулярно-динамического моделирования. Область активного центра (Arg38, His42, Phe41) изменения практически не затронули. Экспериментальные данные о «возгорании» флуоресценции триптофана по сравнению с **n**-HRP говорят о более сильных структурных изменениях в случае **9c-rs**-HRP по сравнению с **9a-rs**-HRP [98]. Из рисунков 4 и 5 видно, что в полученных компьютерных моделях данных ферментов изменения в положении аминокислотных остатков, окружающих Trp117, действительно в большей степени отличается от структуры немодифицированного фермента в случае **9c-rs**-HRP.

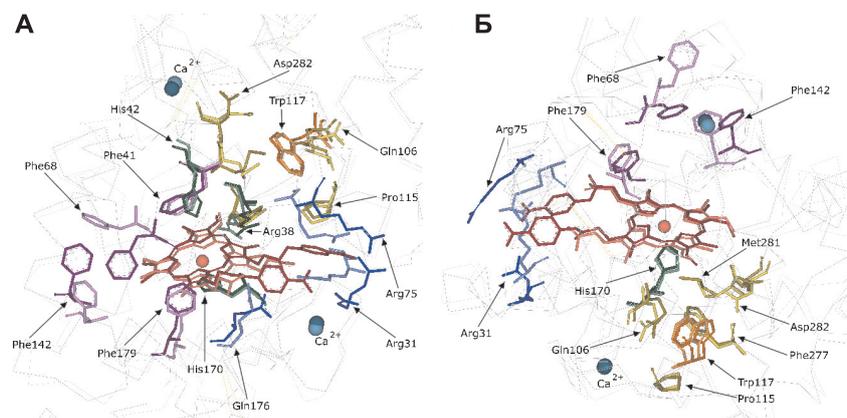


Рис. 4. Сравнение структур пероксидаз, содержащих нативный и модифицированный гем (соединение **9a** на рис. 1) (указаны светлыми и темными цветами, соответственно). Для наглядности структуры представлены в двух проекциях.

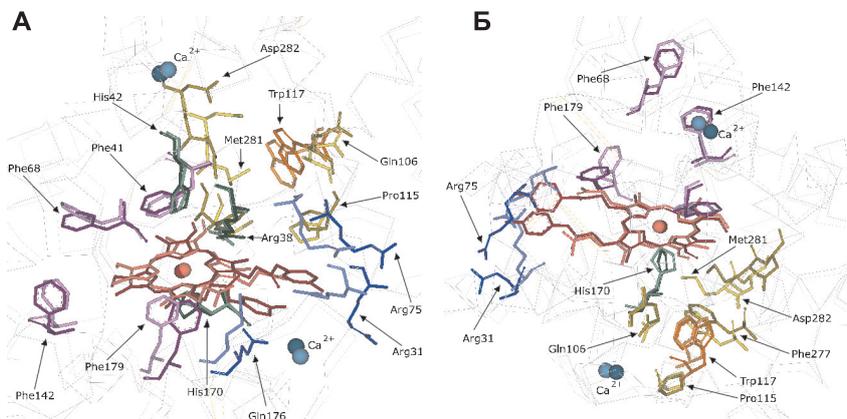


Рис. 5. Сравнение структур пероксидаз, содержащих нативный и модифицированный гем (соединение **9c** на рис. 1) (указаны светлыми и темными цветами, соответственно). Для наглядности структуры представлены в двух проекциях.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как уже отмечалось выше, методы генетической инженерии и белкового дизайна являются доминирующими при изучении механизма действия фермента и получении биокатализаторов с заданными свойствами. Однако хорошо известные методы химической модификации с использованием структурных данных также остаются актуальными. В некоторых случаях они позволяют получить ферменты с такими свойствами, которые невозможно создать с помощью генетической инженерии. Ярким тому примером служит получение производных HPR, модифицированных антрахинон-2-карбоновой кислотой, которая выполняла роль медиатора при переносе электронов с активного центра на электрод. Фактически такие препараты позволяют создавать безреагентные биосенсоры третьего поколения. Результаты компьютерного моделирования структуры HPR с химическим модифицированным гемом хорошо согласуются с экспериментальными данными. Поэтому в дальнейшем компьютерное моделирование может быть использовано не только для объяснения, но и для планирования экспериментов по модификации гема.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banci, L. (1997) *J. Biotechnol.*, **53**, 253–263.
2. Welinder, K.G. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 388–393.
3. Zhang, S., Zou, J., Yu, F. (2008) *Talanta*, **76**, 122–127.
4. Song, Z., Yuan, R., Chai, Y., Zhuo, Y., Jiang, W., Su, H., Che, X., Li, J. (2010) *Chem. Commun. (Camb.)*, **46**, 6750–6752.
5. Yao, H., Hu, N. (2010) *J. Phys. Chem. B*, **114**, 3380–3386.
6. Shan, D., Li, Q.B., Ding, S.N., Xu, J.Q., Cosnier, S., Xue, H.G. (2010) *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 536–541.
7. Korkut, S., Keskinler, B., Erhan, E. (2008) *Talanta*, **76**, 1147–1152.
8. Li, J., Wang, Y., Chiu, S.L., Cline, H.T. (2010) *Front. Neural. Circuits.*, **4**, 6.
9. Greco, O., Rossiter, S., Kanthou, C., Folkes, L.K., Wardman, P., Tozer, G.M., Dachs, G.U. (2001) *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 151–160.
10. Tupper, J., Stratford, M.R., Hill, S., Tozer, G.M., Dachs, G.U. (2010) *Cancer Gene Ther.*, **17**, 420–428.
11. Shogren, R.L., Willett, J.L., Biswas, A. (2009) *Carbohydr. Pol.*, **75**, 189–191.
12. Cruz-Silva, R., Amaro, E., Escamilla, A., Nicho, M.E., Sepulveda-Guzman, S., Arizmendi, L., Romero-Garcia, J., Castillon-Barraza, F.F., Farias, M.H. (2008) *J. Colloid Interface Sci.*, **328**, 263–269.
13. Wuhrer, M., Balog, C.I.A., Koeleman, C.A.M., Deelder, A.M., Hokke, C.H. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1723**, 229–239.
14. Clarke, J., Shannon, L.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 428–442.
15. Veitch, N.C. (2004) *Phytochem.*, **65**, 249–259.
16. Tams, J.W., Welinder, K.G. (1998) *FEBS Lett.*, **421**, 234–236.

17. *Asad, S., Khajeh, K., Ghaemi, N.* (2010) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **164**, 454–463
18. *Smith, A.T., Santama, N., Dacey, S., Edwards, M., Bray, R.C., Thorneley, R.N.F., Burke, J.F.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 13335–13343.
19. *Welinder, K.G.* (1979) *Eur. J. Biochem.*, **96**, 483–502.
20. *Schuller, D.J., Ban, N., Huystee, R.B., McPherson, A., Poulos, T.L.* (1996) *Structure*, **4**, 311–321.
21. *Henriksen, A., Welinder, K.G., Gajhede, M.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2241–2248.
22. *Ostergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O., Petersen, M., Welinder, K.G., Mundy, J., Gajhede, M., Henriksen, A.* (2000) *Plant. Mol. Biol.*, **44**, 231–243.
23. *Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K.G., Gajhede, M.* (2001) *Protein Sci.*, **10**, 108–115.
24. *Watanabe, L., de Moura, P.R., Bleicher, L., Nascimento, A.S., Zamorano, L.S., Calvete, J.J., Sanz, L., Perez, A., Bursakov, S., Roig, M.G., Shmyrov, V.L., Polikarpov, I.* (2010) *J. Struct. Biol.*, **169**, 226–242.
25. *Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., Poulos, T.L.* (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 1032–1038.
26. *Haschke, R.H., Friedhoff, J.M.* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 1039–1042.
27. *Ogawa, S., Shiro, Y., Morishima, I.* (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 674–678.
28. *Howes, B.D., Feis, A., Raimondi, L., Indiani, C., Smulevich, G.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 40704–40711.
29. *Laberge, M., Huang, Q., Schweitzer-Stenner, R., Fidy, J.* (2003) *Biophys. J.*, **84**, 2542–2552.
30. *Laberge, M., Szigeti, K., Fidy, J.* (2004) *Biopolymers*, **74**, 41–45.
31. *Szigeti, K., Smeller, L., Osvath, S., Majer, Z., Fidy, J.* (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1965–1974.
32. *Huang, Q., Laberge, M., Szigeti, K., Fidy, J., Schweitzer-Stenner, R.* (2003) *Biopolymers*, **72**, 241–248.
33. *Banci, L., Carloni, P., Diaz, A., Savellini, G.G.* (1996) *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 264–272.
34. *Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., Hajdu, J.* (2002) *Nature*, **417**, 463–468.
35. *Singh, N., Singh, J.* (2002) *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **32**, 127–133.
36. *Ibrahim, M.S., Ali, H.I., Taylor, K.E., Biswas, N., Bewtra, J.K.* (2001) *Water Environ. Res.*, **73**, 165–172.
37. *Veitch, N.C., Smith, A.T.* (2001) *Adv. Inorg. Chem.*, **51**, 107–162.
38. *Ryan, B.J., Carolan, N., O'Fagain, C.* (2006) *Trends Biotechnol.*, **24**, 355–363.
39. *Газарян, И.Г., Хушпульян, Д.М., Тишков, В.И.* (2006) *Успехи биол. химии*, **46**, 303–322.
40. *Rojkova, A.M., Galkin, A.G., Kulakova, L.B., Serov, A.E., Savitsky, P.A., Fedorchuk, V.V., Tishkov, V.I.* (1999) *FEBS Lett.*, **445**, 183–188.
41. *Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Marchenko, G.N., Egorova, O.A., Sheluho, D.V., Kulakova, L.B., Dementieva, L.A., Egorov, A.M.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 976–981.
42. *Serov, A.E., Popova, A.S., Fedorchuk, V.V., Tishkov, V.I.* (2002) *Biochem. J.*, **367**, 841–847.
43. *Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Fedorchuk, V.V., Savitsky, P.A., Rojkova, A.M., Gieren, H., Kula, M.R.* (1999) *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 187–193.
44. *Тишков В.И., Попов В.О.* (2004) *Биохимия*, **69**, 1537–1554.
45. *Тишков В.И., Хороненкова С.В.* (2005) *Биохимия*, **70**, 51–67.

46. Tishkov, V.I., Popov, V.O. (2006) *Biomol. Eng.*, **23**, 89–110.
47. Тишков В.И., Савин С.С., Хороненкова С.В. (2008) *Изв. Акад. Наук Сер. Химическая*, **57**, 1014–1022.
48. Lin, Z., Thorsen, T., Arnold, F.H. (1999) *Biotechnol. Prog.*, **15**, 467–471.
49. Morawski, B., Lin, Z., Cirino, P., Joo, H., Bandara, G., Arnold, F.H. (2000) *Protein Eng.*, **13**, 377–384.
50. Morawski, B., Quan, S., Arnold, F.H. (2001) *Biotechnol. Bioeng.*, **76**, 99–107.
51. Smulevich, G., Paoli, M., Burke, J.F., Sanders, S.A., Thorneley, R.N.F., Smith, A.T. (1994) *Biochemistry*, **33**, 7398–7407.
52. Rodriguez-Lopez, J.N., Smith, A.T., Thorneley, R.N.F. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 4023–4030.
53. Newmyer, S.L., deMontellano, P.R.O. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 14891–14896.
54. Smith, A.T., Sanders, S.A., Thorneley, R.N., Burke, J.F., Bray, R.R. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **207**, 507–519.
55. Veitch, N.C., Williams, R.J., Bray, R.C., Burke, J.F., Sanders, S.A., Thorneley, R.N., Smith, A.T. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **207**, 521–531.
56. Heering, H.A., Smith, A.T., Smulevich, G. (2002) *Biochem. J.*, **363**, 571–579.
57. Gazaryan, I.G., Doseeva, V.V., Galkin, A.G., Tishkov, V.I. (1994) *FEBS Lett.*, **354**, 248–250.
58. Tanaka, M., Nagano, S., Ishimori, K., Morishima, I. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9791–9798.
59. Nagano, S., Tanaka, M., Watanabe, Y., Morishima, I. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **207**, 417–423.
60. Nagano, S., Tanaka, M., Ishimori, K., Watanabe, Y., Morishima, I. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14251–14258.
61. Newmyer, S.L., Sun, J., Loehr, T.M., deMontellano, P.R.O. (1996) *Biochemistry*, **35**, 12788–12795.
62. Veitch, N.C., Gao, Y., Smith, A.T., White, C.G. (1997) *Biochemistry*, **36**, 14751–14761.
63. Veitch, N.C., Williams, R.J.P., Bone, N.M., Burke, J.F., Smith, A.T. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **233**, 650–658.
64. Howes, B.D., Heering, H.A., Roberts, T.O., Schneider-Belhadadd, F., Smith, A.T., Smulevich, G. (2001) *Biopolymers*, **62**, 261–267.
65. Gazaryan, I.G., Chubar, T.A., Ignatenko, O.V., Mareeva, E.A., Orlova, M.A., Kapeliuch, Y.L., Savitsky, P.A., Rojkova, A.M., Tishkov, V.I. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **262**, 297–301.
66. Игнатенко О.В., Газарян И.Г., Мареева Е.А., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Савицкий П.А., Рожкова А.М., Тишков В.И. (2000) *Биохимия*, **65**, 685–690.
67. Howes, B.D., Brissett, N.C., Doyle, W.A., Smith, A.T., Smulevich, G. (2005) *FEBS J.*, **272**, 5514–5521.
68. Ryan, B.J., O'Connell, M.J., O'Fagain, C. (2008) *Biochimie*, **90**, 1389–1396.
69. Urrutigoity, M., Baboulene, M., Lattes, A. (1991) *Bioorg. Chem.*, **19**, 66–76.
70. Urrutigoity, M., Baboulene, M., Lattes, A., Soupe, J., Seris, J.L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1079**, 209–213.
71. Bhattacharyya, D.K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 22292–22298.
72. O'Brien, A.M. (1997) Chemical modification and characterization of horseradish peroxidase and its derivatives for environmental applications. PhD thesis. Dublin City University, Ireland.
73. Ryan, O., Smyth, M.R., O'Fagain, C.O. (1994) *Enzym. Microb. Technol.*, **16**, 501–505.
74. Miland, E., Smyth, M.R., O'Fagain, C. (1996) *Enzym. Microb. Technol.*, **19**, 63–67.

75. Miland, E., Smyth, M.R., O'Fagain, C. (1996) *Enzym. Microb. Technol.*, **19**, 242–249.
76. Garcia, D., Ortega, F., Marty, J.L. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **27**, 49–54.
77. O'Brien, A.M., O'Fagain, C., Nielsen, P.F., Welinder, K.G. (2001) *Biotechnol. Bioeng.*, **76**, 277–284.
78. Liu, J.Z., Song, H.Y., Weng, L.P., Ji, L.N. (2002) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **18**, 225–232.
79. O'Brien, A.M., Smith, A.T., O'Fagain, C. (2003) *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 233–240.
80. Song, H.Y., Yao, J.H., Liu, J.Z., Zhou, S.J., Xiong, Y.H., Ji, L.N. (2005) *Enzym. Microb. Technol.*, **36**, 605–611.
81. Mogharrab, N., Ghourchian, H. (2005) *Electrochem. Comm.*, **7**, 466–471.
82. Liu, J.Z., Wang, T.L., Huang, M.T., Song, H.Y., Weng, L.P., Ji, L.N. (2006) *Protein Eng. Des. Sel.*, **19**, 169–173.
83. Hassani, L., Ranjbar, B., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Naderi-Manesh, M., Sadeghi, M. (2006) *Enzym. Microb. Technol.*, **38**, 118–125.
84. Mogharrab, N., Ghourchian, H., Amininasab, M. (2007) *Biophys. J.*, **92**, 1192–1203.
85. Teale, F.W.J. (1959) *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 543.
86. Torres, E., Baeza, A., Vazquez-Duhalt, B. (2002) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **19/20**, 437–441.
87. Ator, M.A., deMontellano, P.R.O. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 1542–1551.
88. Ator, M.A., David, S.K., deMontellano, P.R.O. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 14954–14960.
89. deMontellano, P.R.O., David, S.K., Ator, M.A., Tew, D. (1988) *Biochemistry*, **27**, 5470–5476.
90. Chen, Y.R., Deterding, L.J., Tomer, K.B., Mason, R.P. (2000) *Biochemistry*, **39**, 4415–4422.
91. Huang, L.S., Colas, C., deMontellano, P.R.O. (2004) *JACS*, **126**, 12865–12873.
92. Strickland, E.H. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 70–75.
93. Jonen, H.G., Werringloer, J., Prough, R.A., Estabrook, R.W. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 4404–4411.
94. Ringe, D., Petsko, G.A., Kerr, D.E., deMontellano, P.R.O. (1984) *Biochemistry*, **23**, 2–4.
95. Deissero, A., Dounce, A.L. (1970) *Physiol. Rev.*, **50**, 319–375.
96. deMontellano, P.R.O., Kerr, D.E. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 558–563.
97. Feng, J.Y., Liu, J.Z., Ji, L.N. (2008) *Biochimie*, **90**, 1337–1346.
98. Song, H.Y., Liu, J.Z., Weng, L.P., Ji, L.N. (2009) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **57**, 48–54.
99. Ugarova, N.N., Savitski, A.P., Berezin, I.V. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **662**, 210–219.
100. Chattopadhyay, K., Mazumdar, S. (2000) *Biochemistry*, **39**, 263–270.
101. Adak, S., Banerjee, R.K. (1998) *Biochem. J.*, **334**, 51–56.
102. Ryabov, A.D., Goral, V.N., Gorton, L., Csoregi, E. (1999) *Chem. Eur. J.*, **5**, 961–967.
103. Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V.A., Osguthorpe, D.J., Wolff, J., Genest, M., Hagler, A.T. (1988) *Proteins: Struct. Func. Gen.*, **4**, 31–47.