

УДК 575+533.15

СТАБИЛЬНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ИСТОЧНИКАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ И МОЩНОСТИ. РОЛЬ МУТАЦИЙ В ИЗМЕНЕНИИ КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ

М.А. Орлова, Д.М. Хушпульян, А.П. Орлов

(кафедра радиохимии; e-mail: orlova.radiochem@mail.ru)

В обзорной статье кратко рассмотрены особенности растительных пероксидаз и использования метода радиоинактивации на непрерывных (γ) и импульсных (X-, X-нейтронных и γ -нейтронных) источниках с величиной импульса от 1нс до 65 мс для изучения стабильности и изменения конформационного состояния этих ферментов, а также приведены результаты, полученные для новых мутантных форм пероксидазы табака.

Ключевые слова: растительные пероксидазы; нативные, рекомбинантные, мутантные формы; стабильность; радиационная инактивация; импульсные источники, X-облучение, γ -облучение.

Растительные пероксидазы – достаточно хорошо изученные ферменты, класс которых постоянно пополняется. Обладая высокой гомологичностью [1], они имеют разную стабильность (термическую, радиационную и т.д.). Очевидно, причина таких изменений заключается в точечных “перемещениях” в аминокислотном составе (в ряде случаев они кажутся незначительными), которые, однако, способны приводить к вариациям в конформационном состоянии фермента (изменяя и доступную поверхность глобулы) и как следствие к изменению в свойствах. Пероксидазы принадлежат к гем-содержащим белкам и содержат простетическую группу – Fe-протопорфирин IX и 2 атома кальция, кроме того, в каталитическом акте участвует молекула воды. У ряда пероксидаз растений при высокой гомологии и практически одинаковом фолдинге глобулы подвижность дистального кальция может отличаться в широких пределах, что влияет на каталитическую активность и стабильность препаратов фермента. Пероксидазы способны либо связывать кислород (как гемоглобин), либо активировать его (как цитохром-С), либо расщеплять пероксид водорода (как большинство пероксидаз растений). В процессе каталитического цикла эти ферменты окисляются в промежуточные состояния с изменением формальной степени окисления железа (соединение I, соединение II, соединение III, вариации времени жизни которых часто определяют каталитические “пристрастия” конкретного фермента). Таким

образом, пероксидазы растений принадлежат к оксидоредуктазам и являются двухсубстратными ферментами, используя пероксид водорода в качестве донора электронов [2, 3]. Анализ кристаллических структур позволяет сделать вывод, что пероксидазы имеют 10 α -спиралей, два домена, между которыми нековалентно связывается гем. Кроме того, пероксидазы содержат единственный остаток Trp ($\lambda_{\text{возб.}} = 290$ нм). Он может служить флуоресцентной меткой, чувствительной к конформационному состоянию молекулы [4], и играет существенную роль в процессе катализа [5], участвуя в цепи передачи электрона [6]. Согласно предложенной гипотезе [6], при некоторых физико-химических воздействиях (в частности, при облучении) происходит образование π -радикала и поворот ароматического кольца индольного заместителя в остатке триптофана, что изменяет (или нарушает) цепь переноса и влияет на стабильность и активность фермента. Наблюдение образования радикала на остатке триптофана в лигнинпероксидазе [7] косвенно подтверждает эту гипотезу.

Огромное значение в понимании строения и каталитического механизма пероксидаз имеет получение рекомбинантных белков с последующим исследованием методом радиационной инактивации. Наиболее часто это связано с экспрессией в *E. coli*. Такая система экспрессии синтезирует негликозилированный фермент и требует проведения рефолдинга [8]. При этом существует промежуточное состояние (возмож-

но, не единичное), аналогичное образующемуся при фолдинге *in vivo*, называемое *molten globule* [9], которое является гарантом правильного сворачивания глобулы. Похожее состояние (обычно достаточно устойчивое) появляется и при инактивации (в частности, радиационной) фермента.

При экспрессии в растениях, как правило, получается активный фермент, хотя гликозилирование может быть более гетерогенным, чем у нативного. При экспрессии пероксидазы табака в трансгенных томатах (ТТОР), как оказалось, степень гликозилирования значительно ниже, чем при гомологичной экспрессии в растениях табака. Это вызывает ухудшение стабильности при использовании фермента в иммуноферментном анализе, а именно при проведении его модификации при pH 9,5 [10]. Радиационная инактивация показывает различия в таком ферменте, имеющем разные степени гликозилирования (рис. 1). Видно, что по отношению к ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазо-

лин-6-сульфонат)аммония) наблюдается инактивация, в то время как по отношению к гваяколу во всех случаях имеет место активация. Это говорит о том, что субстрат-связывающий центр гваякола гораздо менее доступен, чем путь переноса электронов на ABTS. Кроме того, очевидно, что важна не столько степень гликозилирования, сколько качество (состав и гетерогенность).

Метод радиоэнзимологии, включающий в себя метод радиационной инактивации [11] совместно с традиционно используемыми в энзимологии кинетическими методами и методами генной инженерии (направленный мутагенез), позволяет на основании анализа дозового ответа на облучение (при вариации субстратов, величин pH, буферных растворов, концентрационной зависимости и т.д.) оценивать различия в конформационном состоянии ферментов. В частности, такие эксперименты проводили и на примере различных пероксидаз растений и их форм (нативные, рекомбинантные, мутантные) [12, 13]. Радиационная инактивация может осуществляться в кинетическом (или непрерывном) режиме [14], когда доза при постоянной сравнительно невысокой мощности набирается в течение промежутка времени, и в импульсном режиме, когда доза при чрезвычайно высокой мощности набирается однократно, за очень короткое время импульса [15]. Эти режимы могут давать принципиально различную информацию и требуют соответствующего анализа. Предлагается использовать не привычную величину поглощенной дозы (D), а произведение (PD) мощности дозы (P) на дозу. Мы считаем, что эту величину можно рассматривать как дозовое "давление" на систему. Например, если система в наших экспериментах получила поглощенную дозу 1 Гр, то в непрерывном режиме (где мощность дозы составляет 0,05 Гр/с) произведение $PD = 0,05 \text{ Гр}^2/\text{с}$, а в импульсном (где мощность дозы на установке типа плазменный фокус равна 10^4 Гр/с) $PD = 10^4 \text{ Гр}^2/\text{с}$. Таким образом, видно, что нагрузка на систему во втором случае на 6 порядков больше при одной и той же поглощенной дозе. Это особенно важно в случае малых доз (уровня фоновых), когда доза является безопасной, в то время как "дозовое давление" на систему может быть значительным. Результат такого воздействия плохо предсказуем. Принципиальным различием между непрерывным и импульсным облучением является образование в последнем случае в небольшом объеме гораздо более высокой плотности активных продуктов радиолитического распада воды. Так как облучению подвергаются разбавленные растворы фермен-

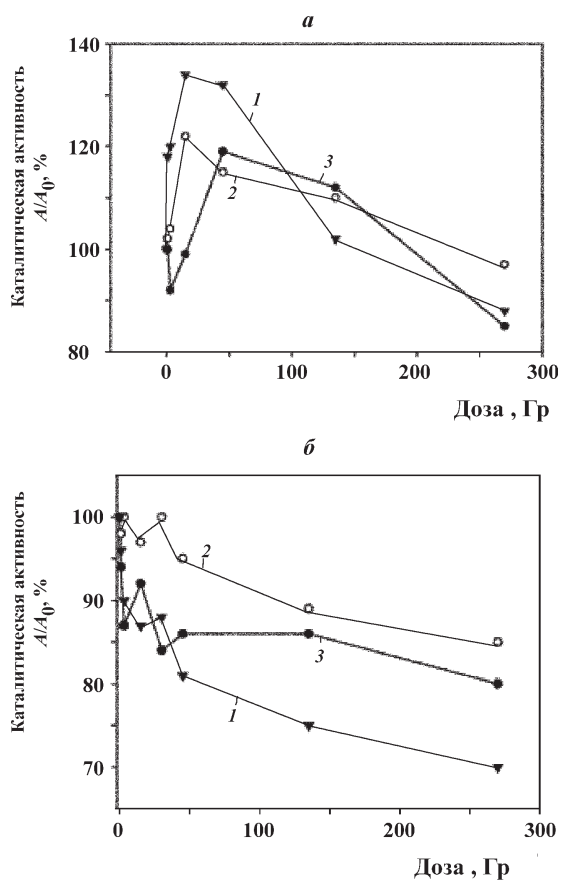


Рис. 1. Рекомбинантная пероксидаза табака, экспрессированная в клетках томата (10^{-7} M ; $0,005 \text{ M Tris-HCl}$; pH 7,0; субстраты: а – гваякол, б – ABTS, при разных уровнях гликозилирования, кДа: 1 – 37; 2 – 36,5; 3 – 36 (в соответствии с уменьшением величины активации).

Непрерывный режим (γ -400)

тов, реализуется косвенное действие излучения, где, как считается, наибольшее воздействие на фермент оказывают ОН-радикалы и e_{aq}^- . Особенно “опасным” для стабильности фермента является мягкое X-излучение [16].

Наиболее изученным методом радиоэнзимологии представителями пероксидаз являются пероксидаза хрена [8, 12, 13] и пероксидаза табака [17, 18]. В качестве источников излучения использовали γ -излучатель (γ -400) с мощностью дозы $P_\gamma = 0,05$ Гр/с (непрерывный режим) [19], импульсный источник типа плазменный фокус (ПФ) [20] (время импульса $\tau = 1$ нс) с возможностью изменения спектра поглощения за счет применения фильтров [21, 22], нейтронный импульсный генератор (ИНГ) с $\tau = 20$ нс, позволяющий проводить облучение образцов только нейтронным потоком (нейтронный выход $2 \cdot 10^{11}$ $n/4\pi$ за импульс, энергия нейтронов 14 Мэв) и полем (нейтроны + жесткий рентген), и реактор “Барс”, работающий в непрерывном и в импульсном режиме с $\tau_{имп} = 65$ мс, обеспечивая γ -нейтронное поле.

Следует отметить, что пероксидаза табака (ТОР) принципиально отличается от других пероксидаз растений большей стабильностью к инактивации перекисью водорода, что, возможно, связано с ее строением (рис. 2) по сравнению, например, с пероксидазой хрена (HRP), у которой активный центр формируется

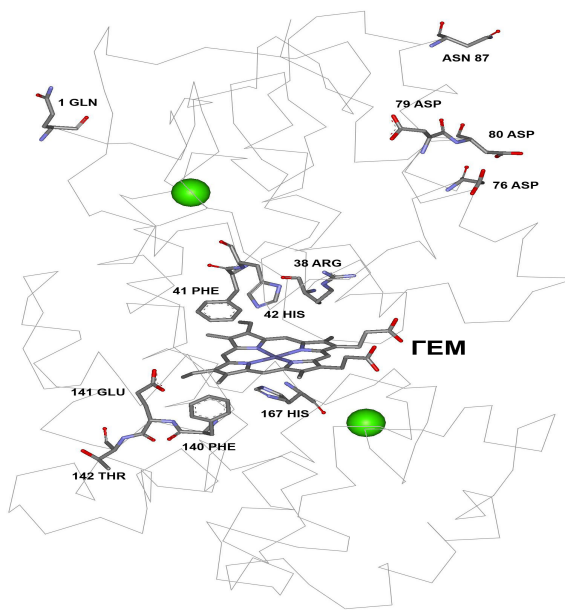


Рис. 2. Модель пероксидазы табака, полученная методом гомологичного моделирования по кристаллической структуре HRP C. Моделирование осуществлено канд. физ.-мат. наук И.В. Упоровым с помощью программы Insight II (version 95,0, Biosym/MSI, San Diego, CA, USA)

четырьмя остатками фенилаланина – 142, 143, 179, 68. Последний остаток имеет конформацию крышки, которая при связывании ингибитора бензгидроксамовой кислоты «закрывается» [35].

Кроме того, ТОР намного стабильнее, чем HRP, как при хранении в растворе, так и во время реакций [17]. Особенно это заметно при экстремально низких значениях pH в присутствии ионов кальция, и проявляется в наличии ферментативной активности по отношению к вератровому спирту при $pH < 2$ [23]. Ионы кальция в большинстве случаев оказывают положительное влияние на стабильность растительных пероксидаз, хотя бывают и исключения, как, например, пероксидаза сои (SBP), которая при добавлении ионов кальция теряет свою устойчивость при дозах < 360 Гр [24]. По сравнению с HRP пероксидаза табака практически неактивна по отношению к иодиду, но на порядок более активна по отношению к неорганическому субстрату (ферроцианиду) [25]. Иодид является двухэлектронным донором электронов и взаимодействует непосредственно с активным центром пероксидазы. Наличие отрицательного заряда на входе в активный центр (рис. 2) может вызывать электростатическое отталкивание субстрата, в результате чего становится невозможным его взаимодействие с активным центром [26]. Этим отчасти объясняется и низкая активность по отношению к фенолу.

В принципе каждый фермент имеет свой собственный профиль субстратной специфичности, и пока нет надежной возможности предвидеть активность фермента по отношению к выбранному донору электронов. Субстраты пероксидаз растений можно условно разделить на три группы. К первой относятся двухэлектронные доноры электронов, для которых принципиальным является связывание вблизи активного центра (иодид-ион) или даже проникновение внутрь него (тиоанизол) [27]. Вторая группа – достаточно простые одноэлектронные ароматические субстраты, которые связываются вблизи активного центра, и третья – субстраты, окисляющиеся по цепи переноса электронов (ABTS).

Метод направленного мутагенеза чрезвычайно важен для получения информации о строении и свойствах ферментов вообще и пероксидаз растений в частности. Для пероксидазы хрена и табака было получено большое число мутантных форм [5, 11, 28–30], изучение которых разными методами позволило достаточно четко представить себе каталитический акт. Например, было найдено, что именно остаток

Phe179 [31] в молекуле HRP связывает ароматические субстраты. Методом введения тотальной тритиевой метки удалось установить, что нативная и рекомбинантная формы HRP имеют разную доступность многих аминокислотных остатков, в частности His (что особенно важно, так как эти остатки поддерживают структуру гема) и Arg [13].

В последнее время были получены [32, 33] мутантные формы рекомбинантной TOP с целью выявления фермента с максимальной стабильностью, для чего в молекулу вместо некоторых поверхностных (и *a priori* малозначимых для катализа) аминокислотных остатков были введены дополнительные Trp- и Tyr-остатки: Thr151Trp, Gln116Trp, Leu157Trp, Phe140Tyr и двойной мутант Phe140TyrThr151Trp. Изучена их радиационная стабильность. На рис. 3, 4 приведены результаты (непрерывный режим, γ -400) для некоторых мутантных форм по отношению к разным субстратам. Наиболее стабильным оказался мутант

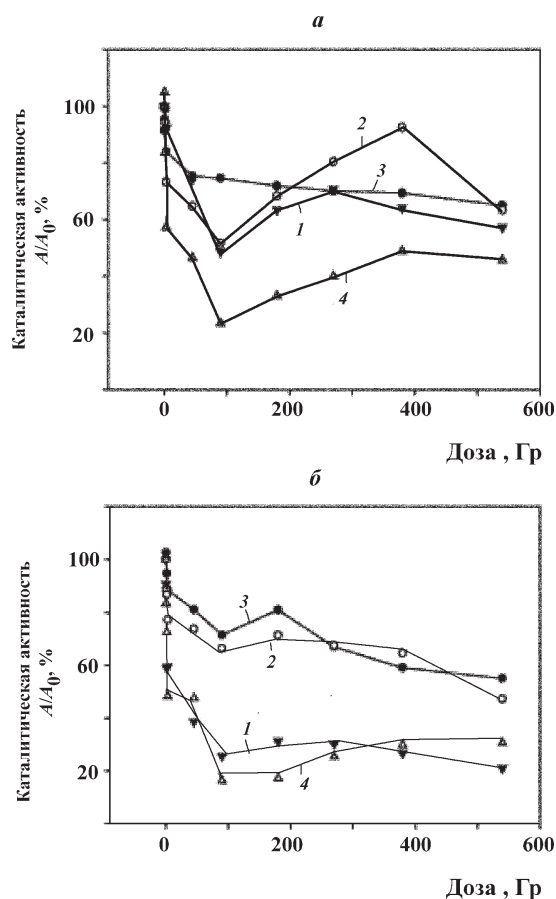


Рис. 3. Радиационная стабильность (γ -400) мутантных форм TOP (10^{-7} M, pH 7,0; 0,025M К-фосфатный буфер) по отношению к: ABTS (а), *o*-дианизидину (б). Thr151Trp (1), Phe140TyrThr151Trp(2), Phe140Tyr (3), Thr151Trp (4). Данные для Thr151Trp представлены для двух разных методик рефолдинга и очистки

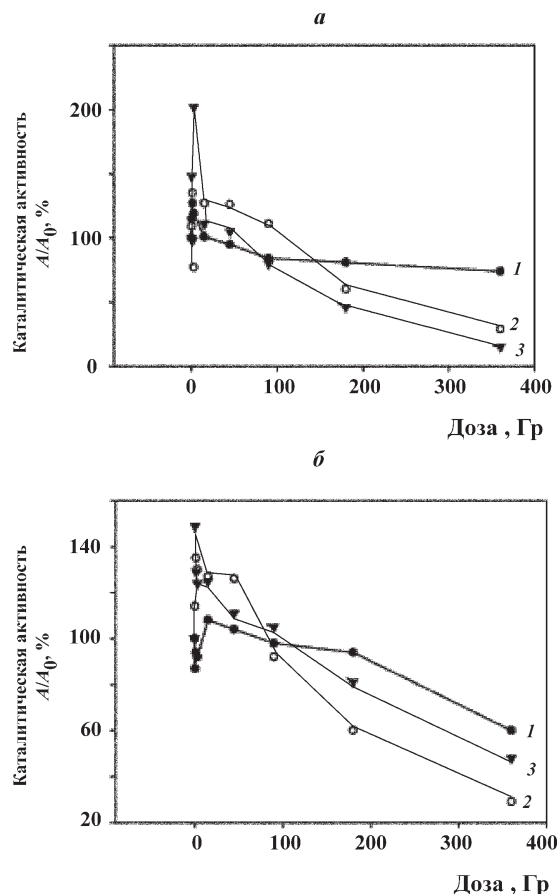


Рис. 4. Радиационная стабильность мутантных форм TOP по отношению к: ABTS (а), гваяколу (б) (10^{-7} M; 0,005M Tris-HCl; pH 7,0): Thr151Trp (1), Gln116Trp (2), Leu157Trp (3). Источник – γ -400

Thr151Trp, который устойчив практически до 100 Gr по отношению к гваяколу, а по отношению к ABTS имеет небольшую активацию при малых дозах, превращаясь в радиационно-устойчивую форму с потерей 25–30% каталитической активности. Процесс активации не является положительным для стабильности ферментов, вызывая впоследствии (при более длительном времени или при хроническом воздействии), как правило, увеличение скорости инактивации. Активация показывает изменение доступной площади поверхности молекулы фермента в месте связывания субстрата или в области переноса электрона. Возможно, что появление дополнительного остатка Trp в некоторых случаях способно создавать дополнительные пути переноса электрона на ABTS. Если это справедливо, то для Thr151Trp этот процесс не принципиален (активация невелика), в то время как для Leu157Trp такой процесс вызывает повышение эффективности катализа (в 2 раза) при сравнительно небольших дозах с последующим резким увеличени-

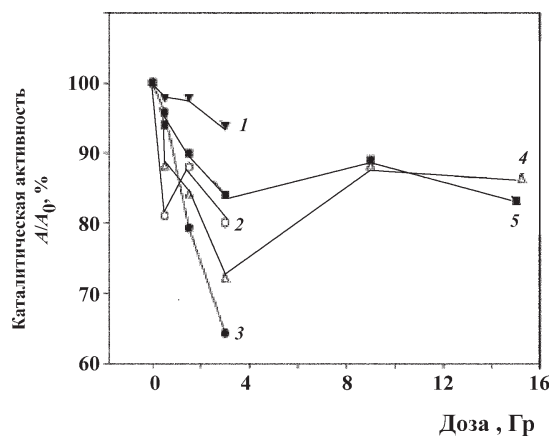


Рис. 5. Радиационная стабильность нативной (1) по отношению к АВТС и рекомбинантной ТОР (WT) по отношению к АВТС (2, 3, 4, разный рефолдинг) и гваяколу (5). Источник γ -400, начальный участок дозовой кривой. Условия: 10^{-7} М; рН 7,0; 0,005 М Tris-HCl буфер

ем скорости инактивации. По отношению к гваяколу стабильность уменьшается в ряду



Стабильными оказались Phe140Tyr (мутант с введенным остатком Tyr) и Phe140TyrThr151Trp (двойной мутант). Последний вел себя аналогично Thr151Trp по отношению к АВТС и аналогично Phe140Tyr по отношению к *o*-дианизидину, на основании чего можно сделать соответствующие выводы о его строении.

Для сравнения на рис. 5 приведены данные для нативной и рекомбинантной (*Wild-type* разного рефолдинга и очистки) форм ТОР по отношению к разным субстратам. Как видно, в зависимости от способа рефолдинга меняется радиационная (а следовательно, и термическая, и др.) стабильность. Однако эти изменения при хорошей очистке фермента носят в большинстве случаев количественный, но не качественный характер, так как вид кривой не меняется. Скорее всего, это говорит о наблюдающейся разнице в плотности упаковки глобулы при более-менее одинаковом пути ее сворачиваемости. Учитывая концепцию конформации молекулы фермента как совокупности допустимых конформационных состояний [5, 6], а также математический подход [34] к нативной конформации фермента как совокупности возможных энергетических состояний (энергетический ландшафт), которые могут состояться в зависимости от энергетической выгоды в конкретных условиях, можно предположить, что такие вариации являются результатом реализации разных возможных (допустимых) состояний фермента. Величина D_{80} (доза, при которой сохраня-

ется 80% каталитической активности) для нативной ТОР находится в области доз ~ 50 Гр, в то время как для WT ТОР она составляет 2 Гр в случае АВТС и 15 Гр для гваякола. При этом в обоих случаях наблюдается более или менее выраженная инактивация при дозе ~ 3 Гр. По отношению к *o*-дианизидину (по сравнению с АВТС и гваяколом) WT ТОР чуть менее устойчив при дозах < 50 Гр, но значительно выигрывает в стабильности при длительном облучении (> 200 Гр). При почти полной потере каталитической активности фермента по отношению к АВТС и гваяколу при $D = 600$ Гр, по отношению к *o*-дианизидину сохраняется 50% активности, что говорит о высокой общей стабильности центра его связывания.

При сравнении стабильности рекомбинантной ТОР, полученной экспрессией в томате (ТТОР) и в *E. coli* (WT), видны различия, которые следует отнести именно к разнице в экспрессии. В частности, когда ТТОР по отношению к гваяколу активизируется, WT ТОР сразу претерпевает инактивацию, являясь значительно менее устойчивой.

Для того чтобы оценить вариабельность стабильности пероксидаз растений, на рис. 6 приведены данные по радиационной инактивации различных представителей растительных пероксидаз. Как видно, первенство по стабильности (и радиационной, и термической) пока принадлежит пероксидазе из листьев африканской пальмы (ОАРР) и пероксидазе сои (SBP). При этом для ОАРР наблюдается длительная, но невысокая активация в области доз до 600 Гр, в случае SBP имеет место длительный лаг-период до 400 Гр. По величинам D_{80} ОАРР и SBP почти в 50 и 40 раз, соответственно, превосходят HRP. Катионная пероксидаза арахиса менее активна и стабильна, и причиной этого, по-видимому, является большая подвижность дистального кальция. Кальций необходим для стабилизации даже концентрированных препаратов этого фермента, и только его присутствие способствует поддержанию значения RZ (величина, характеризующая насыщение препарата геминном) при длительном хранении.

В настоящее время неясны структурные особенности ферментов ОАРР и SBP, вызывающие столь высокую устойчивость. Следует отметить также, что пока только ОАРР может катализировать синтез полианилина, и, хотя пероксидаза арахиса наиболее близка по гомологии и некоторым свойствам к ОАРР, она к этой реакции не способна.

Импульсные источники позволяют исследовать поведение ферментов при очень низких (фоновых)

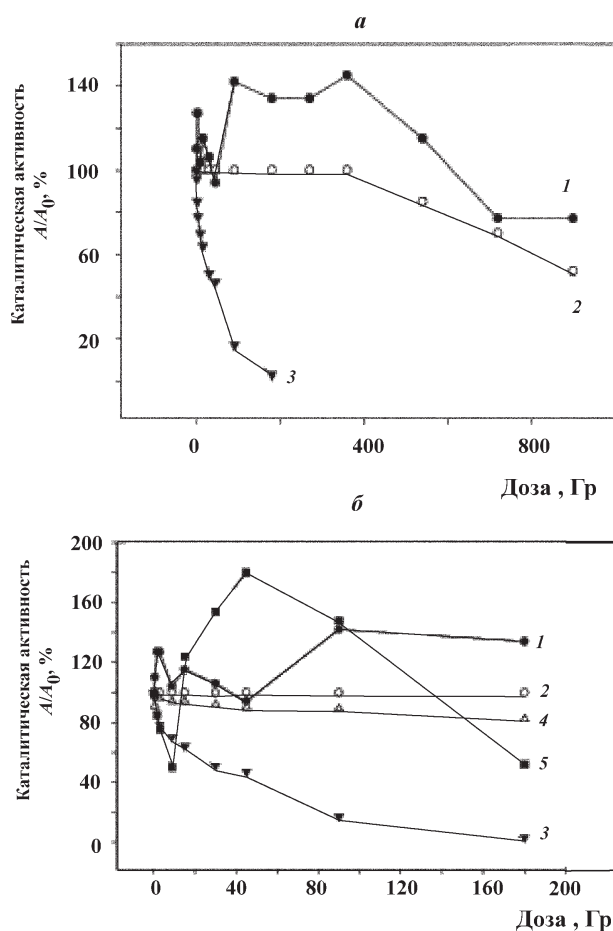


Рис. 6. Дозовые кривые (источник γ -400) для нативных пероксидаз: африканской пальмы (OAP, 1), сои (SBP, 2), хрена (HRP, 3), арахиса анионной (4), арахиса катионной (5): а – полная дозовая кривая, б – интервал доз 0-180 Гр. Субстрат – АВТС; 0,005 М Tris-HCl; pH 7,0; 10^{-7} М. Peroксидаза OAP любезно предоставлена докт. хим. наук И.Ю. Сахаровым, пероксидазу арахиса любезно предоставил д-р Ван Хьюсти (Канада)

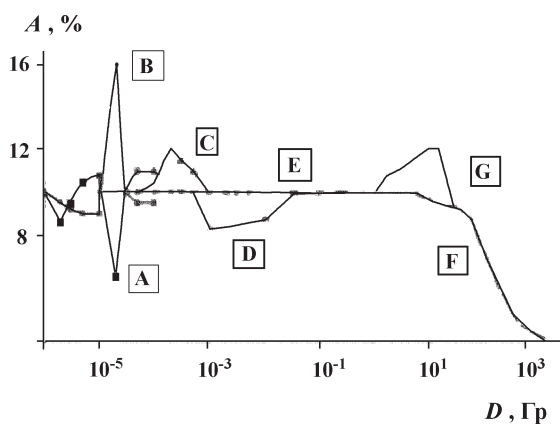


Рис. 7. Изменение каталитической активности 10^{-8} М АПФ (В на источнике ПФ, G на γ -400) и нативной 10^{-7} М HRP (А на источнике ПФ, F на γ -400) в зависимости от источника и дозы облучения

дозах, которые сегодня зачастую используются (или предполагаются к использованию) в медицине. На рис. 7 приведены данные по поведению нативной HRP в сравнении с растворимой формой ангиотензин-превращающего фермента из легких быка (АСЕ) при облучении различными источниками, включая импульсные (ПФ) [15, 19]. При очень низких дозах в районе 10^{-5} Гр (при этом дозовое давление PD составляет 0,1 Гр²/с) для обоих ферментов на установке ПФ заметен эффект, если применялся медный фильтр, содержащий в спектре мягкую X-компоненту (8,98 кэВ). Установка Al-фильтра, который отсекает эту линию, устраняет и эффект. При этом эффекты на разных ферментах разные, хотя и наблюдаются при одной и той же дозе. Если у АСЕ появлялась активация, то у HRP – инактивация. Это является следствием разницы в сложности данных ферментов, т.е. гораздо более высокой защищенности от внешних воздействий физиологически важного АСЕ. Инактивация при дозах $\sim 0,5 \times 10^{-5}$ Гр наблюдалась и при облучении в этих условиях WT TOP, однако в целом сверхмалые дозы

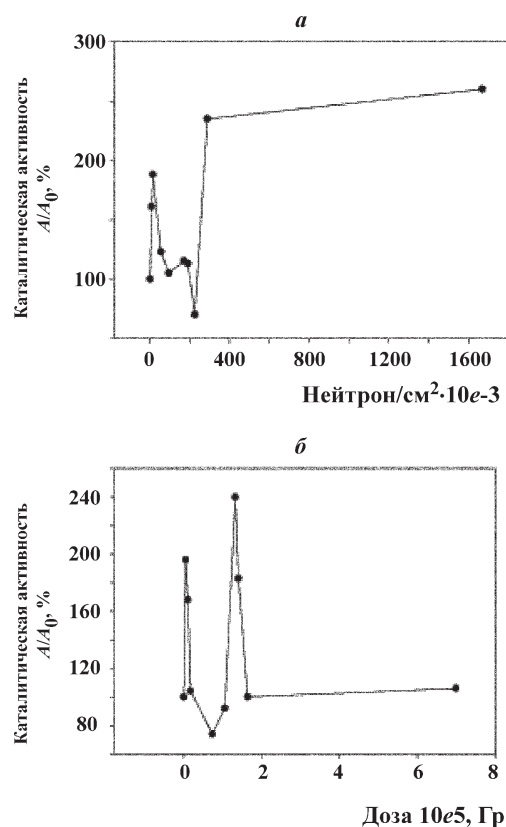


Рис. 8. Результаты: а – нейтронного (в присутствии свинцового экрана) и б – X-нейтронного облучения (установка ИНГ) ТТОР (10^{-7} М растворы; pH 7,0; фосфатный буфер). Субстрат АВТС. Ошибка $\pm 10\%$

вызывали активацию цепи переноса электрона на АВТS. Для ТТОР (табл.1) при облучении на установке ПФ заметна активация при дозах $\sim 15 \times 10^{-5}$ Гр. Воздействие короткими нейтронными импульсами (в присутствии свинцового экрана для защиты от жесткого рентгена) и импульсным X-нейтронным полем на установке ИНГ вызывает периодическую (в зависимости от величин дозы и соответственно произведения PD) активацию (рис. 8 а, б) в области доз $< 2,5 \times 10^{-5}$ Гр. Наблюдаемая периодичность может говорить о резонансных процессах, связанных с возбуждением атома металла и ароматических остатков, в частности остатка Грр. Сравнение X-нейтронного и только нейтронного воздействия показывает существенное влияние нейтронов на появление активации.

Результаты облучения на реакторе в импульсном режиме (табл. 2) коррелируют с результатами на γ -400, так как находятся в одной области доз, а им-

пульс слишком длинный по сравнению с установками ИНГ и ПФ. Полученные данные по импульсному облучению показывают необходимость дальнейшего его изучения на более сложных биологических объектах. В целом, как и на источнике ИНГ, в присутствии нейтронного поля усиливаются процессы активации, особенно на недостаточно стабильном WT ТОР и в условиях непрерывного режима.

Таким образом, совмещение метода направленного мутагенеза, радиационной инактивации на источниках разной природы, мощности, а также применение непрерывного и импульсного облучения дает широкую возможность для изучения конформационного состояния ферментов, среди которых пероксидазы растений занимают важное место в связи с разнообразием, относительной простотой (по сравнению, например, с ACE) и доступностью получения мутантных форм.

Таблица 1

Изменение каталитической активности (по отношению к исходной, %) ТТОР и нативной HRP (г. Ярославль, без дополнительной очистки) при облучении на установке ПФ. Условия: pH 7,0; 10^{-7} М; 0,025 М фосфатный буфер

Доза, Гр $\times 10^5$	Каталитическая активность A/A_0			
	субстраты			
	АВТS		гваякол	
	ТТОР	Нативная HRP	ТТОР	Нативная HRP
0	100	100	100	100
0,07	97 \pm 10	76 \pm 6	126 \pm 10	54 \pm 5
0,48	102 \pm 10	92 \pm 8	170 \pm 12	54 \pm 5
0,51	97 \pm 10	94 \pm 8	100 \pm 10	38 \pm 3
0,78	90 \pm 8	76 \pm 5	137 \pm 11	100 \pm 10
11,9	90 \pm 8	104 \pm 10	134 \pm 12	85 \pm 7
13,7	128 \pm 10	96 \pm 9	124 \pm 10	123 \pm 10
14,5	107 \pm 10	106 \pm 10	136 \pm 12	92 \pm 8
21,4	93 \pm 9	103 \pm 10	133 \pm 12	177 \pm 12
22,6	95 \pm 8	108 \pm 10	140 \pm 12	180 \pm 12
35,2	109 \pm 9	110 \pm 10	142 \pm 10	85 \pm 8

Т а б л и ц а 2

Изменение каталитической активности WT TOP, HRP (нативной) и TTOP при облучении на реакторе "Барс" (г. Обнинск) в непрерывном и импульсном режимах: γ -нейтронное поле, импульсный режим ($\tau = 65$ мс). Субстраты: ABTS, гваякол. Условия: 10^{-7} М; pH 7,0; 0,025 М фосфатный буфер

Импульсный режим реактора						
Доза, Гр	Каталитическая активность по отношению к исходной, %					
	субстраты					
	ABTS			гваякол		
	HRP	WT TOP	TTOP	HRP	WT TOP	TTOP
0	100	100	100	100	100	100
$\sim 10^{-2}$	112 \pm 9	182 \pm 11	77 \pm 6	80 \pm 5	54 \pm 4	92 \pm 7
0.5	98 \pm 4	180 \pm 10	84 \pm 8	71 \pm 6	116 \pm 10	86 \pm 7
1	105 \pm 5	175 \pm 10	80 \pm 8	59 \pm 4	56 \pm 3	85 \pm 6
1,9	95 \pm 5	129 \pm 9	69 \pm 7	61 \pm 8	76 \pm 5	75 \pm 5
50	99 \pm 6	120 \pm 10	75 \pm 7	57 \pm 7	85 \pm 6	75 \pm 6
Непрерывный режим реактора						
Доза, Гр	Каталитическая активность по отношению к исходной, %					
	субстраты					
	ABTS			гваякол		
	HRP	TTOP	HRP	TTOP	HRP	TTOP
0	100	100	100	100	100	
$\sim 10^{-2}$	67 \pm 6	145 \pm 12	123 \pm 11	103 \pm 10		
0,5	71 \pm 7	119 \pm 12	176 \pm 13	100 \pm 10		
1	79 \pm 7	113 \pm 12	119 \pm 12	98 \pm 10		
1,9	83 \pm 8	117 \pm 11	125 \pm 12	116 \pm 12		
50	68 \pm 7	86 \pm 9	104 \pm 10	105 \pm 10		

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Welinder K.G. // Curr. Opin. Structural Biol. 1992. 2. P. 388.
2. Газарян И.Г. Итоги науки и техники. Биотехнология. 1992. 36. С. 168.
3. Gazaryan I.G. // Recent Research Developments in Biophysical Chemistry. 2000. 1. P. 73.
4. Савицкий А.П. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1979.

5. Орлова М.А. Дис. ... докт. хим. наук. 2002.
6. Орлова М.А., Чубарь Т.А., Игнатенко О.В., Газарян И.Г. // Изв. АН РФ. Сер. хим. 2002. С. 816.
7. Doyle W.A., Blodig W., Veitch N.C., Piontek K., Smith A.T. // Biochemistry. 1998. **37**. P. 15097.
8. Orlova M.A., Mareeva E.A., Doseeva V.V., Gazaryan I.G. // Russ. Chem. Bull. 1994. **43**. P. 2110
9. Вульфсон А.Н., Тихонов Р.В. // ДАН РФ. 2001. **380**. С. 400.
10. Dzgoev A.B., Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ramanathan K., Danielsson B. // Anal. Chem. 1999. **71**. P. 5258.
11. Orlova M.A. // Russ. Chem. Bull. 1996. **45**. P. 2789.
12. Mareeva E.A., Orlova M.A., Doseeva V.V., Loginov D.V., Galkin A.G., Gazaryan I.G., Tishkov V.I. // Appl. Biochem. and Biotechnol. 1997. **61**. P. 13.
13. Орлова М.А., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Игнатенко О.А., Бадун Г.А., Ксенофонтов А.Л., Упоров И.В., Газарян И.Г. // Биохимия. 2003. **68**. С. 1522.
14. Orlova M.A., Egorov V.A. // Russ. Chem. Bull. 1999. **47**. 659.
15. Orlova M.A., Kost O.A., Gribkov V.A., Gazaryan I.G., Dubrovsky A.V., Egorov A.V., Troshina I. N.N. // Appl. Biochem. and Biotechnol. 2000. **88**. P. 321.
16. Gribkov A.V., Dubrovsky A.V., Orlova M.A., Scholz M. // Res. J. Chem. Environ. 2005. **9**. P. 11.
17. Орлова М.А., Газарян И.Г., Волкова С.В., Чубарь Т.А. // Тез. докл. III съезда по радиац.исслед. М., 1997. С. 21.
18. Orlova M.A., Chubar T.A., Fechina V.A., Gazaryan I.G. // Russ. Chem. Bull. 1998. **46**. P. 505.
19. Gribkov V.A., Orlova M.A. // Radiation and Environment Biophys. 2004. **43**. P. 303.
20. Dubrovsky A.V., Gazaryan I.G., Gribkov V.A., Ivanov Yu.P., Kost O.A., Orlova M.A., Troshina N.N. // J. Russ. Laser Res. 2003. **24**. P. 289.
21. Грибков В.А., Боголюбов Е.Н., Дубровский А.В., Иванов Ю.П., Рыжков В.И., Самарин В.А., Орлова М.А., Бенковска Б., Шольц М. Тез. докл. Межд. конф. "Portable neutron generators and technologies on their basis". М., 2004. С. 81.
22. Dubrovsky A.V., Gribkov V.A., Ivanov Yu.P., Karpinski L., Orlova M.A., Romanova V.M., Scholz M., Volobuev I.V. Nucleonika. 2006. **51**. P. 21.
23. Gazarian I.G., Lagrimini L.M., Mellon F.A., Naldrett M.J., Ashby G.A., Thorneley R.N. // Biochem J. 1998. **333**. P. 223.
24. Orlova M.A., Chubar T.A., Fechina V.A., Gazaryan I.G. Russ. Chem. Bull. 1998. **46**. P. 522.
25. Gazaryan I.G., Lagrimini L.M. Phytochemistry. 1996. **41**. P. 1029.
26. Gazaryan I.G., Doseeva V.V., Galkin A.G., Tishkov V.I., Mareeva E.A., Orlova M.A. // Russ. Chem. Bull. 1995. **44**. P. 362.
27. Harris R.Z., Newmyer S.L., Ortiz de Montellano P.R. // J. Biol. Chem. 1993. **268**. P. 1637.
28. Хушпульян Д.М. Дис. ... канд. хим. наук. М., 2007.
29. Loginov D.B., Gazaryan I.G., Doseeva V.V., Galkin A.G., Tishkov V.I., Mareeva E.A., Orlova M.A. // Russ. Chem. Bull. 1994. **43**. P. 1923.
30. Gazaryan I.G., Chubar T.A., Ignatenko O.A., Mareeva E.A., Orlova M.A., Kapeliuh Yu.L., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Tishkov V.I. // Biochem. Biophys. Res. Com. 1999. **262**. P. 297.
31. Veitch N.C., Gao Y., Smith A.T., White C.G. // Biochemistry. 1997. **36**. P. 14751.
32. Полозников А.А., Савицкий П.А., Хушпульян Д.М., Чубарь Т.А., Газарян И.Г., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. **47**. С. 20.
33. Hushpulyan D.M., Poloznikov A.A., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Chubar T.A., Fechina V.A., Orlova M.A., Tishkov V.I., Gazaryan I.G., Lagrimini L.M. // Biol. Chem. 2007. **388**. P. 373.
34. Крупянский Ю.Ф., Гольданский В.И. // Усп. физ. наук. 2002. **172**. С. 1247.
35. Tanaka M., Nagano S., Ishimori K., Morishima L. // Biochemistry. 1997. **36**. P. 9791.

Поступила в редакцию 19.03.09

DEPENDENCE OF PLANT PEROXIDASES STABILITY ON IRRADIATION OF DIFFERENT SOURCES

M.A. Orlova, D.M. Hushpul'yan, A.P. Orlov

(Division of Radiochemistry)

The role of mutation in the modification of conformation conditions In this brief survey the plant peroxidases peculiarity and the data about new tobacco peroxidase mutant forms was considered. Radioinactivation method on continuous (γ) and impulse (X-, X-neutron and γ -neutron) sources (τ_{impulse} is varied from 1 ns to 65 ms) was used to research a stability and conformation condition of these enzymes.

Key words: plant peroxidases; native, recombinant, mutant enzyme forms; stability; radiation inactivation; pulse sources; gamma-irradiation; X-ray.

Сведения об авторах: Орлова Марина Алексеевна – вед. науч. сотр. кафедры радиохимии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (orlova.radiochem@mail.ru); Хушпульян Дмитрий Михайлович - мл. науч. сотр. кафедры радиохимии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; Орлов Алексей Павлович - студент 4 курса химического факультета МГУ.