

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ПРОТОПОРФИРИНА С ТЕТРАМЕРНЫМ ФЕРМЕНТОМ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗОЙ

Дудинова О.Н., Собчук А.Н., Плавский В.Ю.

Институт физики имени Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Интерес к изучению комплексов свободных (безметалльных) порфиринов с биополимерами обусловлен выявленной в последние годы способностью указанных тетрапирролов выступать в качестве эндогенных фотосенсибилизаторов, определяющих гибель микробных клеток при воздействии излучения синей области спектра. Считается, что активные формы кислорода, и прежде всего синглетный кислород, являются обязательными интермедиатами данного процесса. При этом вопрос об молекулах-мишенях, фотоповреждение которых инициирует гибель патогенов, остается открытым. Не вызывает сомнения, что вследствие короткого времени жизни синглетного кислорода в первую очередь будут повреждаться те молекулы, возле которых сенсибилизатор локализован, т.е. находится с ним в комплексе.

В настоящей работе исследовались закономерности комплексообразования динатриевой соли протопорфирина (PrIX) с лиофилизированной алкогольдегидрогеназой (АДГ), выделенной из дрожжей. Фермент представляет собой тетрамер молекулярной массой 141 кДа, содержащий 4 одинаковые субъединицы. Растворы готовились в 0,001 М фосфатном буфере, рН 7,4, дистиллированной воде и в диметилсульфоксиде. Изучение образования комплексов молекул фермента с сенсибилизатором проводилось спектрофотометрическими, спектрально-люминесцентными, кинетическими и поляризационными методами.

Образование прочных равновесных комплексов АДГ-PrIX подтверждается следующими данными: длинноволновым смещением ($\Delta\lambda = 14$ нм) полосы Соре спектра поглощения протопорфирина при встраивании в белковую глобулу; тушением порфирином триптофановой флуоресценции фермента при практически неизменной ее длительности затухания (статическое тушение); появлением для растворов АДГ-PrIX полосы с максимумом в области 280 нм (соответствующей максимуму в спектре поглощения АДГ) в спектре возбуждения флуоресценции порфирина (индуктивно-резонансный перенос энергии электронного возбуждения с триптофанилов на PrIX); практически двукратным увеличением квантового выхода и батохромным смещением ($\Delta\lambda = 14$ нм) спектра флуоресценции PrIX при встраивании в структуру белка. Отмечается также некоторое увеличение степени поляризации флуоресценции красителя ($p = 0,11$) при встраивании в белковую глобулу. Вместе с тем такое увеличение p представляется не столь значительным при связывании красителя с достаточно большой белковой молекулой. По всей видимости, относительно низкое значение степени поляризации флуоресценции красителя при комплексообразовании с АДГ обусловлено достаточно большим значением длительности затухания флуоресценции тетрапиррола ($\langle\tau\rangle = 14,4$ нс), а также высокой сегментарной подвижностью локусов фермента, в которых локализован краситель.

Исследования показали, что каждая субъединица, входящая в состав тетрамерной молекулы АДГ, образует комплекс с одной молекулой протопорфирина; константа ассоциации $K_{ac} = 8,7 \cdot 10^4$ М⁻¹. Выраженных пигмент-пигментных взаимодействий между молекулами, связанными с различными субъединицами одной макромолекулы, не обнаружено. Используя водные растворы PrIX, в которых тетрапиррол находится в агрегированном состоянии из-за низкого значения рН, показано, что взаимодействие с ферментом сопровождается дезагрегацией красителя.