

УДК 543.42

РЕЗОНАНСНОЕ КОМБИНАЦИОННОЕ РАССЕЯНИЕ СВЕТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ФЛАВИНОВ И ФЛАВОБЕЛКОВ

Иванова Т. М.

Рассмотрено применение методов спонтанной и нелинейной спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния в исследованиях флавинов и флавобелков. Дан краткий обзор биологических функций флавиновых систем. Описаны параметры спектров резонансного комбинационного рассеяния и их связи с электронной структурой изоаллоксазинового кольца в различных состояниях окисления. Обсуждены возможности идентификации флавинового хромофора в белковом окружении, комплексах с переносом заряда и в модифицированных системах.

Библиография — 115 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Методы линейной и нелинейной спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния света	322
II. Структура и функции флавобелков	325
III. Спектроскопия резонансного комбинационного рассеяния флавинов и флавобелков	329

I. МЕТОДЫ ЛИНЕЙНОЙ И НЕЛИНЕЙНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ РЕЗОНАНСНОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Резонансное комбинационное рассеяние света (РКР) было обнаружено в 50-е гг. еще до появления универсальных источников возбуждения КР — лазеров. «Резонанс» в этом случае означает совпадение частоты возбуждающего света с одной из частот электронного перехода молекулы. Впервые такой термин был применен для описания большого увеличения интенсивности некоторых линий КР ароматических нитросоединений при возбуждении вблизи длинноволновой полосы поглощения [1]. В последующих работах [2—4] были описаны все характерные особенности РКР: высокие коэффициенты интенсивности, в 10^3 — 10^9 раз превышающие интенсивность обычного КР; избирательное усиление лишь некоторых нормальных колебаний из числа актуальных для данной электронной полосы поглощения; появление в некоторых случаях в спектре рассеяния прогрессий интенсивных обертонов, связи интенсивности линий РКР с параметрами электронно-возбужденного состояния. Эти свойства позволили значительно расширить наши представления о взаимодействии света с веществом, получить новую информацию о строении молекул и открыли аналитические возможности, недоступные традиционному методу КР. Изобретение и внедрение в конце 60-х гг. в практику исследований лазеров привело к бурному росту применений КР, и в особенности РКР, для решения самых разнообразных проблем в физике, химии и биологии [5, 6]. В то же время были обнаружены многообразные нелинейные эффекты, возникающие в веществе под действием когерентных лучей лазеров и заложены основы принципиально новой области — нелинейной оптики и одного из ее направлений, нелинейной спектроскопии рассеяния.

В отличие от традиционного спонтанного КР, возникающего на флуктуационных (тепловых) колебаниях, в нелинейной спектроскопии рассеяния рассматриваются взаимодействия с вынужденными внутримолекулярными колебаниями, которые при определенных условиях возбуждаются в достаточно большом объеме вещества мощными световыми полями лазеров. Важно подчеркнуть, что основную роль в этих процессах играет совпадение фаз (сфазированность) вынужденных колебаний, то-

гда как их амплитуды в самых сильных световых полях остаются на 2--3 порядка меньше флуктуационных (спонтанных) изменений нормальных ядерных координат. Первым из таких явлений было обнаружено вынужденное комбинационное рассеяние (ВКР) [7], которое, хотя само и имеет весьма ограниченные спектроскопические возможности, послужило физической основой целого ряда методов нелинейной спектроскопии КР, разработанных в последующее десятилетие [8] и базирующихся на измерениях амплитуды, поляризации и фазы когерентных волн, «рассеянных» на вынужденных колебаниях [9, 10]. Хотя многие из этих процессов не являются рассеянием в традиционном значении этого слова, их интерпретация может быть основана на классических представлениях о модуляции поляризуемости нормальными колебаниями ядер, широко используемых в спектроскопии спонтанного КР и восходящих еще к Плачеку [11], а параметры спектров нелинейного рассеяния — интенсивность, форма, полуширина и положение сигналов могут быть сопоставлены с данными спонтанного КР.

Быстрый прогресс в технике лазеров с перестраиваемой частотой позволил перевести вначале уникальные измерения в разряд рутинных [12]. Ниже кратко описаны получившие в настоящее время наибольшее практическое применение два метода нелинейной спектроскопии рассеяния, для которых изучены и варианты, аналогичные спонтанному РКР.

Спектроскопия когерентного антистоксова (стоксова) рассеяния света (КАРС и КСРС). Два когерентных луча ω_1 и ω_2 , при условии совпадения разности $\omega_1 - \omega_2$ с одной из частот внутримолекулярных колебаний ω_r могут возбуждать и фазировать в среде колебания частоты ω_r ; тогда третья (пробная) волна, взаимодействуя с вынужденными колебаниями, рассеивается и дает интенсивные когерентные компоненты в антистоксовой и в стоксовой областях [8]:

$$\omega_{a, c} = \omega \pm (\omega_1 - \omega_2)$$

Наиболее распространен вариант этой методики, когда одна из волн накачки используется в качестве пробной, $\omega = \omega_1$:

$$\omega_a = 2\omega_1 - \omega_2$$

Очевидно, что меняя разность $\omega_1 - \omega_2$, можно получить все частоты, соответствующие спектру спонтанного КР молекулы. Широко распространенные сейчас в зарубежной литературе аббревиатуры КАРС и КСРС были введены в работе [13]; однако еще раньше Ахманов и соавт. (см. [10]) предложили для этого процесса термин «активная спектроскопия КР» (АСКР), которым мы также будем пользоваться в дальнейшем изложении.

В спектроскопии КАРС в настоящее время активно изучается аналог спонтанного РКР, когда частота когерентной накачки ω_1 близка к частоте электронного (однофотонного) перехода молекулы ω_e . При уменьшении разности $\omega_1 - \omega_e$ в спектрах КАРС наблюдалось резкое увеличение интенсивности когерентного сигнала [14, 15]. В области однофотонного резонанса линии КАРС и КСРС имеют весьма сложные контуры, обусловленные интерференцией нескольких вкладов — электронных и колебательных (см., например, [9, 10]). Это обстоятельство первоначально привело к ошибочной интерпретации наблюдаемого явления как инверсного КР [15] (см. ниже). Теоретический анализ в рамках квантовой механики представлений показывает [16], что при сканировании ω_1 в области широкой электронной полосы поглощения, контур антистоксовой линии может меняться от положительного лоренцева через дисперсионный до отрицательного лоренцева, в зависимости от соотношения параметров: частот ω_1 , ω_e , ω_r и констант затухания Γ_e и Γ_r электронного и колебательного осциллятора. При одинаковых значениях $\omega_1 - \omega_e$ сигналы КАРС и КСРС имеют разную форму (рис. 1). Это наблюдалось на опыте для цитохрома *c* [15], витамина B_{12} [15], β -каротина [17] и некоторых других биологически активных веществ [9].

Спектроскопия инверсного КР. КАРС и КСРС являются четырехфотонными процессами. В 60-е гг. был также обнаружен нелинейный процесс более низкого порядка — двухфотонный. При взаимодействии двух когерентных лучей ω_1 (интенсивная накачка) и ω_2 (более слабая пробная волна) со средой Джонс и Стойчев [18] наблюдали ослабление интенсивности пробного луча, когда разность частот $\omega_2 - \omega_1$ совпадала с частотой колебательного перехода ω_r :

$$\omega_2 - \omega_1 \sim \omega_r; \quad \omega_1 < \omega_2$$

Это явление было названо инверсным Раман-эффектом [18]. Вместо ослабления пробной высокочастотной волны в поле мощной низкочастотной накачки можно использовать другую схему и наблюдать усиление пробной низкочастотной волны ω_2 под воздействием интенсивной вы-

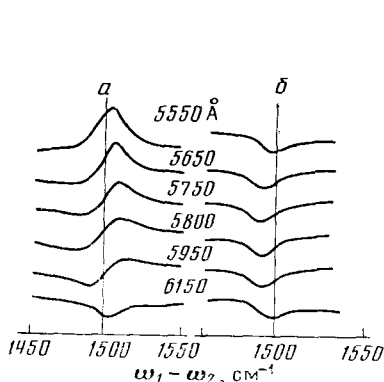


Рис. 1

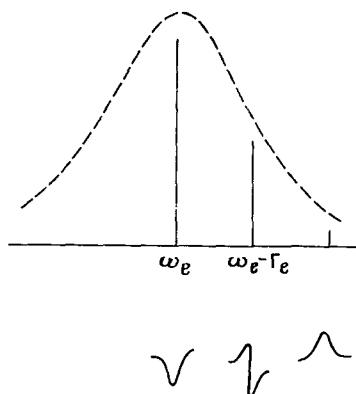


Рис. 2

Рис. 1. Модельный расчет контуров линий КАРС (а) и КСРС (б) при резонансном возбуждении [16]; величины параметров имитируют случай витамина В₁₂: $\omega_e = 18\,000\text{ см}^{-1}$, $\omega_r = 1500\text{ см}^{-1}$, $\Gamma_e = 500$, $\Gamma_r = 10$

Рис. 2. Контур сигнала инверсного КР (внизу) при возбуждении в области полосы поглощения (показана пунктиром); модельный расчет [24]

сокочастотной накачки ω_1 [19]. В отечественной литературе были предложены соответственно термины: вынужденное КР (ВКР) усиления и обращенное КР (ОКР) ослабления [10]. Эти методы иногда называют модуляционными, имея в виду изменение оптических свойств среды на частоте пробной волны [10].

В спектроскопии инверсного КР также исследован случай «двойного резонанса» — колебательного и электронного (однофотонного). Этот метод имеет ряд преимуществ, из которых существенно отсутствие интенсивного постоянного фона, связанного с нерезонансной электронной восприимчивостью и создающего серьезные помехи в спектрах КАРС и КСРС (вдали от однофотонного резонанса) [9, 10]. Предполагалось также, что в схеме усиление — ослабление, в отличие от АСКР, можно получить спектры, полностью соответствующие спонтанному КР, в том числе и по форме сигнала [19, 20]. В первом эксперименте резонансного инверсного КР измерялось непосредственно поглощение [21]. Впоследствии были предложены различные модуляционные схемы [22, 23], позволившие существенно улучшить пределы детектирования [24]. Опыты по возбуждению инверсного КР в области широких электронных полос поглощения показали [24], что форма сигнала меняется в зависимости от соотношения ω_1 , ω_e и Γ_e . Результаты модельного параметрического расчета контура линии резонансного инверсного КР приведены на рис. 2.

Неоднократно отмечались преимущества спектроскопии когерентного КР в изучении разреженных газов, диагностике плазмы, быстрых процессов горения и т. д. [8, 10, 12]. Сопоставляя возможности спонтанного РКР и его когерентных аналогов в исследованиях строения сложных

молекул в конденсированных фазах, следует в первую очередь отметить трудности, связанные с извлечением информации из спектров когерентного КР в области однофотонного резонанса; обработка данных спонтанного РКР в этом случае значительно более проста. Расчет спектров АСКР и инверсного КР осуществляется на ЭВМ путем параметрической подгонки. В то же время сложность формы когерентного сигнала и ее изменения в области резонанса, обусловленные интерференцией нескольких вкладов, позволяют с помощью параметрического анализа получить ряд дополнительных сведений, в частности оценить величины констант затухания электронного и колебательного осциллятора, определить значения частот в возбужденном состоянии молекулы и уточнить положение 0—0-перехода. Все эти вопросы, однако, еще недостаточно исследованы.

Как известно, возбуждение в области резонанса у сложных молекул и в особенности биологических, часто приводит к появлению интенсивной флуоресценции, полностью исключающей наблюдение спонтанного РКР. Поскольку сигналы КАРС и инверсного КР располагаются в антистоксовой области, а флуоресценция — в стоксовой, то они предоставляют уникальную возможность регистрации спектров КР при наличии флуоресценции. Отметим также, что средний уровень мощности облучения образца в когерентной спектроскопии на 1—2 порядка ниже, чем при съемке спектров спонтанного КР, что важно для фотолabileльных веществ.

Таким образом, методы нелинейной спектроскопии КР существенно дополняют методы спонтанной спектроскопии, а иногда являются единственным средством наблюдения спектров КР. В последнее десятилетие в рамках нелинейной спектроскопии быстро развивается еще одно, чрезвычайно важное для биологии направление, связанное с исследованиями нестационарных процессов и получением динамических характеристик короткоживущих промежуточных состояний (см., например, [10], гл. 5). Прогресс в технике генерирования коротких и сверхкоротких (пикосекундных, 10^{-12} с) импульсов и создание адекватных методов регистрации [25—27] позволили изучать быстротекающие биологические процессы, в том числе конформационные перестройки в активных центрах гемопroteinов [28] и в зрительных пигментах [29].

О масштабах, которые приняли в биологии исследования, выполненные с помощью линейной и нелинейной спектроскопии РКР, можно судить по появлению терминов «резонансная спектроскопия КР гемопroteinов» [30], «резонансная спектроскопия КР зрительных пигментов» [31] и др. Наименее изученной в этом плане является сравнительно новая, однако быстро развивающаяся область флавобелков [32—34]. В обзоре обсуждены данные РКР, полученные для флавинов и флавобелков в связи с их структурой и функциями; приводится также краткий обзор последних представлений о роли флавобелков в живой природе и некоторых механизмах их действия.

II. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ФЛАВОБЕЛКОВ

Флавины и флавобелки. Малая изученность этого важнейшего класса природных соединений объясняется, по-видимому, как причинами исторического порядка¹, так и рядом других факторов: большой сложностью молекул, трудностью выделения, низким содержанием в природных объектах, и главное, необыкновенным разнообразием функций флавинодержавших соединений в природе: в высших животных, растениях и микроорганизмах. Флавобелки являются в большинстве случаев ферментами с простетической группой, содержащей замещенное изоаллоксазиновое кольцо (рис. 3), обычно в виде флавиномононуклеотида (ФМН), флавиноаденидинуклеотида (ФАД) или рибофлавина. Высокосопряженная трициклическая система изоаллоксазина, обладающая, благодаря наличию четырех атомов азота и фрагментов, аналогичных амидной группе, раз-

¹ Первое природное флавиновое соединение — рибофлавин, было идентифицировано в 1935 г., а важнейшая простетическая группа, флавиноаденидинуклеотид — лишь в 1954 г.

носторонними возможностями для электронных перестроек, и является центром многочисленных биохимических превращений. Включенная в разнообразнейшее белковое окружение — от сравнительно небольших полипептидных цепей (флаводоксины, ~130—170 аминокислотных остатков [35]) до огромных димерных молекул (глутатионредуктаза, ~480 остатков в каждой субъединице [36, 37]), флавиновая система осуществляет ферментативный катализ окислительно-восстановительных превращений огромного числа субстратов, в том числе аминов, спиртов, аминокислот, дитиолов и т. д. [34]. Не менее разнообразны реакции флавопротеинов с молекулярным кислородом. В некоторых окислительных процессах один атом кислорода молекулы O_2 переносится на субстрат, а другой включается в молекулу воды; в других реакциях молекулярный кислород восстанавливается с образованием супероксида O_2^- .

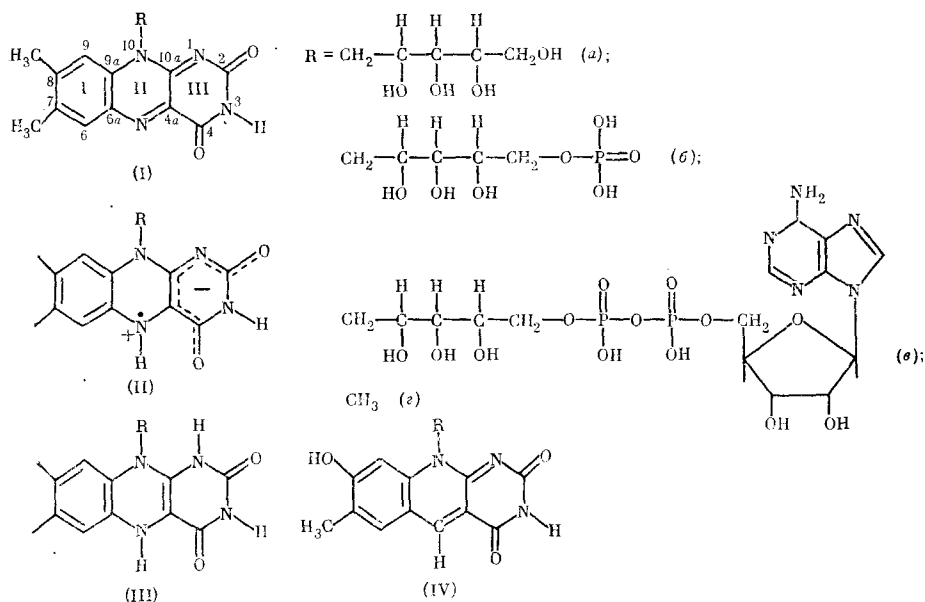


Рис. 3. Простетические флавиновые группировки и нумерация атомов в изоаллоксазининовом кольце (I): а — рибофлавин, (б) — флавиномононуклеотид, (в) — флавинаденидинуклеотид, (г) — люмифлавин; (II) — семихинонная форма; (III) — полностью восстановленная форма; (IV) — 5-деаза-8-гидроксифлавин

Помимо жизненно-обеспечивающих функций в организмах и растениях, флавиновые ферменты играют огромную роль в круговороте элементов в природе, который осуществляется микроорганизмами, в частности в глобальном круговороте углерода [38]. В процессе эволюции почвенные бактерии выработали разнообразные ферменты — монооксидазы, катализирующие разложение остатков высших растений, главным образом устойчивого природного полимера — лигнина [38]. Столь же важна функция флавиновых ферментов в метаболизме азота и в особенности серы, для которой по оценкам [39] осуществляемая бактериями биологическая циркуляция составляет 75% общего содержания серы на Земле.

Обширны биомедицинские аспекты применения этих соединений. В организме высших животных важнейшим источником поддержания нормального уровня флавобелков является рибофлавин, который поступает вместе с пищей и затем переносится специальными транспортирующими белками к тканям, где связывается уже в виде кофакторов ФМН и ФАД с другими белками [40]. По-видимому, можно ожидать, что в ближайшее время удастся приблизиться к пониманию некоторых молекулярных аспектов заболеваний (в том числе некоторых наследственных поражений мозга и периферической нервной системы), связанных с дефицитом и нарушениями метаболизма флавопротеинов в организме [41].

Об этом свидетельствует также появление лекарственных антигипертензивных средств и психотропных препаратов (производных фенотиазина и трициклических антидепрессантов), структура которых близка к структуре рибофлавина; их действие, по-видимому, основано на ингибировании превращений рибофлавина в ФМН и ФАД в организме [42]. Сейчас выяснены также определяющие функции флавопротеинов в различных детоксификационных процессах, включающих разнообразные ароматические соединения, серусодержащие производные и ртуть.

Множественность функций флавиновых ферментов стала очевидной лишь в последнее время. На основе накопленных к настоящему времени, в основном биохимических данных Масси и Хеммерих [43] предложили выделить 5 главных классов флавопротеинов в соответствии с особенностями их каталитических циклов.

Область флавинов и флавобелков быстро развивается. Обнаружены и исследованы необычные флавиновые системы-ферменты, содержащие модифицированное изоаллоксазиновое кольцо, в том числе флавины с «двойной модификацией» цикла, 5-деаза-8-гидроксипроизводное (см. рис. 3), так называемый кофактор F-420 метановых бактерий [44, 45]. В отличие от гемопротеинов, флавиновая группировка в большинстве случаев не образует ковалентных связей с белком и удерживается в активном центре, главным образом, с помощью прочных водородных связей, выгодных электростатических взаимодействий и т. д. Однако сейчас идентифицирован целый ряд флавопротеинов, в которых изоаллоксазиновое кольцо оказалось ковалентно связанным с апобелком, чаще всего в положении С(8) через мостик CH_2 с остатками гистидина, цистеина или тирозина [46].

Тем не менее, несмотря на бесспорный прогресс, развитие области флавобелков происходит пока еще в основном экстенсивно, по пути накопления новых данных, оставляя многие вопросы неразрешенными. Для целого ряда распространенных в тканях животных и растений флавобелков истинные природные субстраты неизвестны; не выяснены и биологические функции многих флавобелков, в том числе одного из первых идентифицированных соединений — «старого желтого фермента». Неизвестна биологическая роль ковалентной связи изоаллоксазинового хромофора с белком у ковалентно-связанных флавопротеинов. Все биологические окислительно-восстановительные цепи содержат по крайней мере один флавопротеин, который осуществляет трансформацию двухэлектронного переноса в одноэлектронный перенос к «одноэлектронному» акцептору (цитохрому или серусодержащему белку). Уникальный механизм такого переключения $2e^-/1e^-$ остается пока еще неясным.

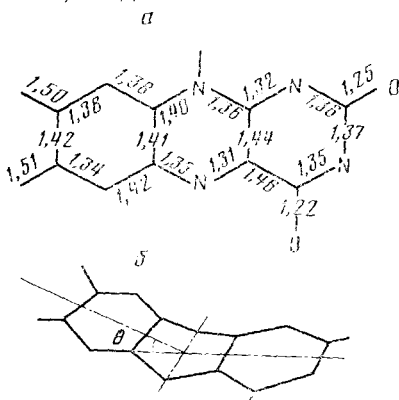
Огромную роль в функционировании флавиновых ферментов играет белок. Именно непосредственное белковое окружение изоаллоксазинового кольца определяет в конечном счете его конкретную функцию в ферменте. Однако наши сведения в этой области еще очень ограничены и структура (даже первичная) многих жизненно-важных флавоферментов остается неизвестной. К настоящему времени получены рентгеноструктурные данные лишь для представителей трех классов флавопротеинов: флаводоксина [47], глутатионредуктазы [36] и *n*-гидроксibenзоатгидроксилазы [48]. Между тем очевидно, что только знание деталей пространственной структуры активного центра (в некоторых случаях даже статической) позволит сделать обоснованные выводы о механизме катализа и характере промежуточных стадий. Показателен с этой точки зрения пример глутатионредуктазы; по данным рентгеноструктурного анализа [36, 37], ближайшее окружение ФАД в этом ферменте предопределяет его функцию как переносчика двух электронов и блокирует структуры, необходимые для переноса одного электрона. Этот пример, однако, является исключительным и большая часть предлагаемых механизмов биохимических превращений флавопротеинов остается сугубо умозрительной. Для объяснения механизма и идентификации промежуточных стадий прибегают к традиционным методам биохимии, в частности таким, как образование искусственных комплексов фермента с ингибиторами. Дру-

гой способ «зондирования» активного центра основан на легкости отделения флавинового хромофора от апобелка [49], который затем может быть соединен с изоаллоксазином, химически модифицированным к точкам, предположительно «ключевых» для кинетических и термодинамических параметров катализа. Для суждения об окружении изоаллоксазинового хромофора в белке привлекается и косвенная физическая информация. Известно, например, что сильная флуоресценция, присущая флавионам, оказывается потухшей при присоединении к некоторым белкам. Высказывалось предположение, что это может происходить лишь в случае, когда изоаллоксазиновое кольцо взаимодействует с пространственно

сближенными с ним остатками тирозина и триптофана в активном центре белка [35].

Электронные спектры поглощения и структурные параметры изоаллоксазинового кольца. Три основных биологических функции изоаллоксазинового хромофора (де)гидрирование (только $2e^-$), активация молекулярного кислорода ($2e^-$ или $1e^-$) и «чистый» перенос электрона ($1e^-$), возможны благодаря электронным перестройкам с образованием трех устойчивых форм (рис. 3): окисленной, наполовину восстановленной (семихинон; радикал) и полностью восстановленной. Для двух последних форм, кроме того, возможны различные состояния ионизации и протонирования.

Структурные параметры изоаллоксазинового кольца показаны на рис. 4. Конформационные возможности сопряженной



ке. По этой же причине, по-видимому, для семихинонной формы в белковом окружении предпочтительной оказывается плоская структура [52].

Флавиновый хромофор имеет интенсивные полосы поглощения в длинноволновой области спектра: одну $20\,000\text{--}25\,000\text{ см}^{-1}$ и вторую с центром $\sim 26400\text{ см}^{-1}$ [53], относящиеся к двум нижним $\pi\rightarrow\pi^*$ -переходам [54] и обозначенные впоследствии как α и β (рис. 5) [55]. Поляризационные измерения поглощения в кристаллах [55] и более ранние исследования ориентированных пленок и поляризации флуоресценции модельных флавинов позволили установить, что соответствующие переходы линейно поляризованы в плоскости флавинового кольца, с направлением, близким к оси, параллельной плоскости кольца и перпендикулярной оси $N(5)\text{--}N(10)$ [55].

III. СПЕКТРОСКОПИЯ РЕЗОНАНСНОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ФЛАВИНОВ И ФЛАВОБЕЛКОВ

Нелинейная и спонтанная спектроскопия РКР флавинов. Для флавиновых систем, как и для некоторых белков других классов, спектроскопия РКР является по существу единственным (за исключением рентгеноструктурного анализа) источником наиболее подробной информации о строении активного центра. Действительно, до недавнего времени об электронных перестройках изоаллоксазинового кольца в процессе функционирования флавобелка можно было судить лишь по одному параметру — изменению положения и интенсивности длинноволновых $\pi\rightarrow\pi^*$ -переходов [43]. Применение спектроскопии ЯМР помимо обычных ограничений в этом случае осложняется еще и тем, что кроме малонформативных сигналов протонов двух метильных групп в положениях 7, 8 и связей СН в положениях 6 и 9, изоаллоксазиновое кольцо содержит единственный протон при N(3); низкое относительное содержание флавинового фрагмента в белках затрудняет применение спектроскопии ЯМР ^{13}C . Полученные к настоящему времени данные ЯМР относятся в основном к рибитильному фрагменту ФМН и ФАД [56].

Флавиновый хромофор в свободном состоянии (ФМН, рибофлавин) обладает сильнейшей флуоресценцией, на несколько порядков ($\sim 10^4$) превосходящей интенсивность линий комбинационного рассеяния. Первые спектры РКР для ФАД и ФАД-содержащего белка (глюкозооксидазы) были получены путем «пространственного» разделения рассеяния и флуоресценции с применением метода антистоксовой АСКР (КАРС) при возбуждении в области α -полосы [57]. В качестве частоты накачки использовалась $\omega_1 \sim 480,0\text{ нм}$, предположительно совпадающая с $0\text{--}0$ -переходом (ω_{00}) [54]. Дальнейшее усовершенствование техники эксперимента (введение второго монохроматора в оптический путь сигнала) позволило уменьшить фоп вблизи частоты накачки и получить резонансные спектры КАРС для ФАД и двух ФАД-содержащих белков, глюкозооксидазы и рибофлавин-связывающего белка (рис. 6) в некоторых случаях начиная с 300 см^{-1} [58].

Как уже отмечалось, наибольшие трудности при резонансном возбуждении КАРС связаны с изменением контура сигнала в зависимости от соотношения величин ω_1 , ω_0 , ω_r и ряда других параметров [16]. Контур линии ФАД $\omega_r \sim 1635\text{ см}^{-1}$ при изменении частоты ω_1 в области α -полосы показан на рис. 7 [59]. Как видно из этих данных, приближенные оценки по полуклассической модели [16, 60] достаточно хорошо соответствуют опыту (см. также рис. 1). При $\omega_1 \simeq \omega_0$ наблюдается положительный лоренцев контур; при более высоких и более низких энергиях ($\omega_1 \sim \omega_{00} \pm \omega_r/2$) сигнал становится дисперсионным и имеет отрицательный лоренцев контур при $\omega_1 \sim \omega_{00} - \omega_r$. Заметим, что при тех же условиях возбуждения для линий $\omega_r \sim 601\text{ см}^{-1}$ наблюдался только положительный лоренцев контур, что авторы связывают с большим вкладом франк-кондоновских факторов [59]. В соответствии с модельными расчетами [16], для когерентного стокова сигнала наблюдались только дисперсионные контуры линий. Таким образом, в резонансных спектрах КАРС точное определение частот может вызвать затруднения. Единственным практи-

ческим способом остается пока съемка серии спектров при разных значениях частоты накачки с тем, чтобы выявить чисто дисперсионный или чисто лоренцев контур.

Почти одновременно с этими работами появились сообщения о спектрах спонтанного РКР флавинов. Группа японских авторов² [61] воспользовалась давно отмеченным свойством белковой матрицы значительно ослаблять флуоресценцию изоаллоксазинового хромофора и получила спектры двух рибофлавин-связывающих белков: из желтка и белка куриного яйца, а также присоединенных к апобелку 3-CH₃,

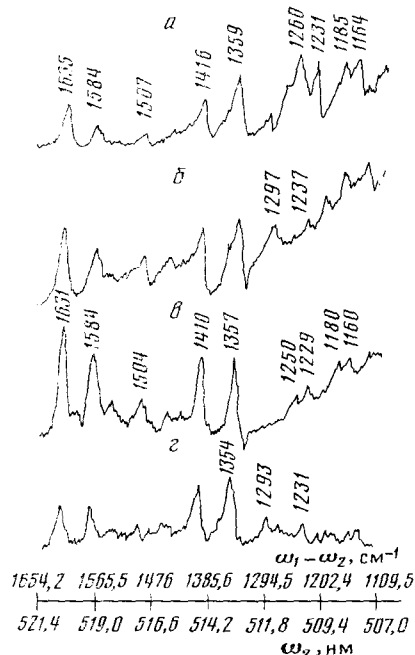


Рис. 6

Рис. 6. Спектры резонансного КАРС флавинадениндуклеотида: *a* — в H_2O , *б* — в D_2O и рибофлавин-связывающего белка: *в* — в H_2O , *г* — в D_2O pH 7; $\omega_1 = 480$ нм [58]

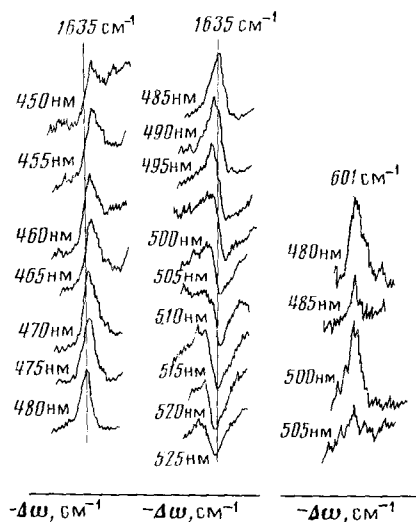


Рис. 7

Рис. 7. Контуры линий $\omega_2 \sim 1635$ и 601 см^{-1} в спектрах резонансного КАРС; значения ω_1 указаны на рисунке [59]

2-SH₂COOH- и 7,8-Cl-производных рибофлавина. В дальнейшем были получены спектры РКР еще нескольких флавобелков и самих простетических групп ФМН и ФАД; для устранения мешающего фона флуоресценции использовались разнообразные приемы: возбуждение линиями более длинноволновыми (600 нм; в предрезонансной области) [63] или более коротковолновыми (λ 363,8; 351,1; 337,1 и 257,3 нм, в зоне высокоэнергетических электронных переходов хромофора), а также добавление тушителей, главным образом KI [64, 65].

Уже в первых работах [57, 58] было отмечено, что резонансно усиливаются только колебания, локализованные в изоаллоксазиновом кольце, и как можно было предполагать, не происходит усиления колебаний, связанных с заместителями при N (10): рибозой (в рибофлавине), фосфорибозой (в ФМН) или аденозиндифосфатрибозой (в ФАД). Типичные спектры ФАД показаны на рис. 6. Отметим, что значения некоторых частот в этой работе отличаются от полученных впоследствии данных спектров спонтанного РКР (табл. 1). Учитывая, что при частоте накачки $\omega_1 \sim 480,0$ нм получают положительные контуры линий КАРС [58], а при частоте $\omega_1 \sim 495$ нм отрицательные [66], совпадение частот в табл. 1 можно считать удовлетворительным. Впоследствии было показано, что при одинаковых условиях возбуждения спектры РКР рибофлавина, ФМН

² В более ранней работе [62] сообщалось о наблюдении единственной линии изоаллоксазина при возбуждении ультрафиолетовым лазером.

и ФАД в области выше 1100 см^{-1} (для которой имеются надежные данные) практически идентичны, за исключением небольших различий относительно интенсивности ряда полос [64].

Отнесение колебательных частот. В самых первых работах были сделаны попытки сопоставить частоты спектра РКР со структурными элементами изоаллоксазинового кольца. Корреляции основывались вначале на единственном эксперименте по изотопозамещению: замене обменивающегося протона $\text{N}(3)\text{H}$ на дейтерий [58, 61, 63], а также на данных по 7,8-Cl-замещенным [61] и интуитивных догадках. Вскоре, однако, появилась фундаментальная работа Китагавы и соавт. [67], в которой были получены спектры РКР изотопозамещенных рибофлавина [$2\text{-}^{13}\text{C}$], [$4a\text{-}^{13}\text{C}$], [$10a\text{-}^{13}\text{C}$], [$2,4,4a,10a\text{-}^{13}\text{C}$], [$5\text{-}^{15}\text{N}$][$1,3\text{-}^{15}\text{N}$] и [$1,3,5\text{-}^{15}\text{N}$] для форм $\text{N}(3)$ и $\text{N}(3)\text{D}$. Для устранения флуоресценции авторы воспользовались отмеченным выше свойством некоторых белков оказывать «тушащее» действие на флуоресценцию изоаллоксазина и легкостью образования его комплексов с апобелком; соответственно были получены комплексы всех указанных производных с рибофлавин-связывающим протеином из белка куриного яйца. Работа [67] подготовила основу для надежного расчета нормальных колебаний флавиновой системы, однако этот богатейший материал практически остался пока неиспользованным. Единственный выполненный к настоящему времени расчет колебательного спектра 10-метилизоаллоксазина (люмифлавина) [68] можно рассматривать лишь как предварительный. В работе [68] силовые постоянные валентных связей и углов, а также постоянные взаимодействия, были в основном перенесены из молекул бензола, пиримидина и урацила с учетом корреляции длина связи — силовая постоянная (см. ссылки в [68]). На первый взгляд, составленное таким образом силовое поле в принципе могло отражать специфику флавиновой системы; большие по величине постоянные взаимодействия связей (до 15% от диагональной силовой постоянной) характерны для молекул с высокой степенью делокализации электронной плотности. Тем не менее почти все вычисленные в таком приближении частоты значительно отличаются от экспериментальных, а в некоторых случаях, в том числе для наиболее интенсивных полос, различия достигают $80\text{—}100\text{ см}^{-1}$. Более существенно однако то, что расчетные данные не воспроизводят сдвигов линий при изотопозамещении [67]. Это особенно явно для полос ~ 1250 и 1160 см^{-1} , более всего смещающихся при дейтерировании и в некоторых изотопозамещенных образцах. Среди причин неудачи расчета одна из основных, по-видимому, заключается в неправильном первоначальном отнесении некоторых частот. Малоудачным оказался и выбор силового поля, в котором некоторые важные взаимодействия, например, связей $\text{N}(5)\text{—C}(4a)$ и $\text{C}(10a)\text{N}(1)$ вовсе не учитывались (см. рис. 3). Заметим, что выбранное авторами начальное приближение оказалось мало пригодным и для урацила, где расчет также неудовлетворительно воспроизвел повышение частот в области 1250 см^{-1} при дейтерировании [69]. Таким образом, относительно природы отдельных полос РКР флавинов можно сделать пока лишь заключения предварительного характера, основываясь главным образом на данных по изотопозамещению [61, 64, 67].

Полоса I. Наиболее высокочастотную полосу 1630 см^{-1} в большинстве работ относят к колебаниям с преимущественным участием бензольного кольца, главным образом на основании значительного понижения этой частоты при замещениях атомами галогена в положениях 7, 8 [61, 70]. Эта линия КР оказалась практически нечувствительной к изотопозамещению в положениях 2, 4a, 5, 1, 3 [67]; она почти не смещается в 1,3- и 5-деазпроизводных [71] и не усиливается при резонансном возбуждении в длинноволновой (α) полосе поглощения. Все полученные к настоящему времени данные показывают, что симметричное (ν_s) и антисимметричное (ν_{as}) колебания карбонильных групп $\text{C}(2)=\text{O}$ и $\text{C}(4)=\text{O}$ не проявляются в спектре РКР.

Полоса II (1548 см^{-1}). Наиболее заметно меняется при изотопозамещении в кольце II — атомов $\text{N}(5)$, $\text{C}(4a)$ и $\text{C}(10a)$ [67] и исчезает в

Таблица 1

Частоты линий РКР простетических флавиновых группировок (см^{-1})

Обозначения полос	ФАД [58] ^а		ФАД [63] ^б		ФАД [64] ^в	ФМН [63] ^в		ФМН [66] ^г		ФМН [64] ^д
	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O
<i>I</i>	1635 с	1634 с	1633 сл	1628 сл	1629	1633	1628	1629	1628	1626
<i>II</i>	1584 ср	1584 ср	1585 ср	1584 ср	1582	1584	1584	1582	1580	1583
<i>III</i>	—	—	1551 ср	1548 ср	1548	1551	1548	—	—	1549
<i>IV</i>	1507 сл	1507 ср	1504 ср	1502 ср	1500	1503	1502	1503	1504	1500
<i>V</i>	—	—	1468 сл	1469 ср	1461	1469	1468	—	—	1459
<i>VI</i>	1416 с	1416 с	1412 с	1410 с	1408	1413	1411	1412	1414	1405
<i>VII</i>	1359 с	1359 с	1356 ос	1351 ос	1353	1355	1351	1355	1357	1350
<i>VIII</i>	—	—	—	—	1280	—	—	—	—	1278
<i>X</i>	1260 ср	1297 ср	1261 ср	1300 ср	1255	1261	1300	1261	1300	1256
<i>XI</i>	—	—	1234 с	1233 ср	1228	1233	1230	1233, 1192	—	1228
<i>XII</i>	1185 сл	1179 сл	1190 сл	1171 ср	1182	1187	1172	1170	—	1183
<i>XIII</i>	1164 сл	1144 сл	1166 ср	1147 ср	1160	1166	1149	1151	—	1158

^а ҚАРС, $\omega_1=480$ нм; ^б спонтанное КР, λ 600 нм; ^в рН 8,5 с добавкой 5 М КІ, спонтанное КР, $\lambda=488$ нм; ^г в H₂O, ҚАРС $\omega_1=495$ нм; ^д в H₂O с добавкой 6 М КІ; спонтанное КР, λ 514,5 нм; с — сильная, о. с — очень сильная, ср — средняя, сл — слабая.

Таблица 2

Сдвиги линий РКР в изотопозамещенных образцах рибофлавина для форм N(3)H [67]

ν , см ^{-1a}	¹³ C			¹⁵ N		
	2-	4a-	2,4,4a,10a-	5-	1,3-	1,3,5-
1631 (1630)	2	1	2	1	1	2
1584 (1582)	3	8	13	4	1	5
1548 (1548)	6	5	21	3	2	4
1503 (1409)	3	2	7	1	2	4
1465 (1462)	5	6	8	1	3	6
1407 (1406)	3	5	12	1	4	6
1355 (1351)	4	3	15	0	1	1
1302 —	0	2	5	0	0	2
1282 —	0	2		0	0	0
1252 (1295)	14	0	17	0	10	10
1229 (1232)	0	3	4	0	2	2
1179 (1181)	3	4	8	2	4	6
1161 (1147) (1138)	1	2	5	1	1	2
1073 —	3	3	3	-1	4	2
994 (990)	2	0	4	0	1	3
834 (832)	2	0	2	5	5	10
789 (772)	2	0	4	2	2	6
740 (744)	1	0	2	1	0	2
633 (629)	1	-1	0	-1	1	2
605 (602)	4	1	4	1	1	4
576 —	3	4	5	9	2	9
521 (522)	1	1	2	4	1	7
496 (474)	1	2	—	1	2	4
429 (427)	2	2	2	3	0	6

^a В скобках даны значения частот для формы N(3)D.

5-деаза-ФМН [71]. Однако о значительном участии других координат свидетельствует смещение этой полосы в N(3)-замещенных [71]. При резонансном возбуждении в β -полосе (370 нм) удавалось наблюдать только эту линию [62].

Полоса III. Для линии невысокой интенсивности 1548 см⁻¹ наблюдались большие изотопные сдвиги (21 см⁻¹ в 2,4,4a,10a-¹³C-замещенном; табл. 2).

Полосы IV, V, VI. Слабые полосы 1500 (IV) и 1462 см⁻¹ (V) и интенсивная полоса 1407 см⁻¹ (VI) примерно одинаково чувствительны к изотопозамещению. Колебание 1407 см⁻¹ значительно делокализовано; смещения этой полосы велики при изотопозамещении ¹³C и ¹⁵N в кольце III и составляют ~10 см⁻¹ в 7,8-дихлорпроизводных [61].

Полоса VII. Полоса 1355 см⁻¹ — одна из наиболее интенсивных в спектре РКР. Замечено, что она усиливается при резонансе с электронной α -полосой поглощения (450 нм) и является самой интенсивной при возбуждении в пререзонансной области [63]. Как видно из табл. 2, соответствующее колебание имеет большую чувствительность к замещению ¹³C и малую — к замещению ¹⁵N. Этот факт, однако, не находится в каком-либо «противоречии» с понижением частоты этой линии в деазапроизводных [71], так как при замене N(1) и N(5) на атомы углерода образуется иная система сопряженных связей.

Полосы VIII, IX. Очень слабые линии 1302 (VIII) и 1282 (IX) см⁻¹, практически нечувствительны к изотопозамещению.

Полосы X, XI, XII, XIII (1255, 1228, 1182 и 1160 см⁻¹). В этой группе полос происходят наибольшие изменения при замене протона N(3)H на дейтерий, отмеченные в самых ранних работах [58]; при этом существенно меняются не только частоты линий, но и их относительные интенсивности (см. рис. 6). Очевидно, что аналогом интенсивной полосы 1255 см⁻¹ в дейтерированном образце является ν 1295 см⁻¹. Повышение частоты более чем на 40 см⁻¹ обычно объясняют, вслед за Китагавой [61], нарушением «резонансного» взаимодействия валентного колебания

C—N (предположительно находящегося при 1290 см^{-1}) с плоским деформационным колебанием NH, понижающим эту частоту в недеитерированном образце³. Заметим, однако, что для объяснения наблюдаемых изменений вовсе не требуется привлекать представления о «резонансных» взаимодействиях колебаний. Очевидно, что повышение обсуждаемой частоты может происходить за счет даже небольшого участия достаточно жесткой связи N—D при значительной амплитуде валентного колебания атома дейтерия. Если это предположение верно, то замена водорода N(3)H на метильную группу должна приводить к повышению частоты, что и наблюдалось на опыте для N(3)-метил-люмифлавина [70]. Из этих представлений очевидно, что изменение частоты 1255 см^{-1} может служить критерием силы водородного связывания N(3)H флавина с растворителем или с аминокислотными остатками в активном центре белка; повышение частоты должно происходить за счет роста эффективной жесткости угла C—N(3)—H вследствие дополнительного связывания атома водорода (см. ниже).

Из остальных полос этой группы наиболее «делокализованному» колебанию соответствует, по-видимому, линия 1179 см^{-1} . Пара линий $1179/1160\text{ см}^{-1}$ значительно меняет свою относительную интенсивность при изотопозамещении [67] и в N(3)-производных [61], а также при замещении тяжелыми атомами в положениях 7,8 [61]. Очевидно, что сколь-нибудь достоверные отнесения в этой области без надежного расчета нормальных колебаний невозможны; предложенная в [64] схема смещений частот при дейтерировании представляется (за исключением обсуждавшегося выше сдвига $1255 \rightarrow 1290\text{ см}^{-1}$) мало обоснованной. Были получены также данные для области ниже 1100 см^{-1} [67]; наибольшие изотопные сдвиги, по-видимому локализованные в кольце II, наблюдались для линии 834 см^{-1} , а наибольшие смещения при дейтерировании — для частот 789 и 496 см^{-1} .

Водородные связи изоаллоксазинового кольца в активных центрах. Поскольку простетическая флавиновая группировка в большинстве известных случаев не образует ковалентной связи с апобелком, водородное связывание имеет важное значение для стабилизации структуры. Изменение распределения электронной плотности в изоаллоксазиновом кольце при образовании водородных связей очевидно из изменений электронных спектров поглощения в модельных системах (см. [73, 74] и ссылки в последней работе). Как уже отмечалось, в спектрах РКР чувствительными к водородным связям оказываются частоты и интенсивности полос в области $1160\text{—}1300\text{ см}^{-1}$. Экспериментально водородное связывание флавинов исследовано в работе [64], где сопоставлены спектры модельных флавинов в H_2O (сильный донор и акцептор водородных связей), диметилсульфоксиде (ДМСО) (полярный растворитель, более слабый акцептор, чем H_2O) и ацетонитриле (полярный растворитель). Для подавления флуоресценции использовались добавки KI. При переходе от водных растворов к ДМСО было отмечено изменение относительной интенсивности полос II и X и понижение частоты X. В последующем обсуждении в качестве «индикатора» водородного связывания была использована также слабая полоса 1281 см^{-1} ; однако, как показывают данные [67], соответствующее колебание нечувствительно к какому-либо изотопозамещению в кольцах III и II, т. е. в местах локализации водородных связей.

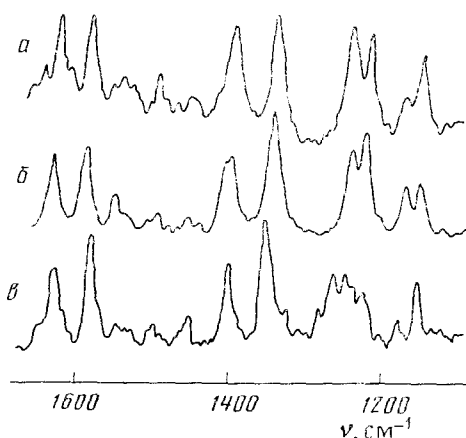
На основании этих модельных исследований авторы попытались рассмотреть водородные связи в активных центрах трех ФАД-содержащих флавобелков различных классов и пришли к следующим выводам: 1) ацил-КоА-зависимая общая дегидрогеназа жирных кислот характеризуется «несколько уменьшенным» водородным связыванием по сравнению с ФАД в H_2O ; 2) ацил-КоА-оксидаза не образует вообще или образует очень слабые водородные связи во всех потенциальных центрах

³ Как уже отмечалось, это смещение имеет аналогию с наблюдающимися в КР спектре урацила [72]; в последнем, однако, повышение частоты при дейтерировании составляет всего 16 см^{-1} .

водородного связывания N(1), N(5), C(2)=O, C(4)=O и N(3); 3) глутатионредуктаза связана в такой же степени, как свободная группа ФАД в воде.

Рассмотрение данных [64] рис. 8 однако показывает, что реальная ситуация значительно сложнее этой упрощенной картины. В случае ацил-КоА-дегидрогеназы, полоса 1253 см^{-1} имеет необычно высокую интенсивность, что может быть результатом сильного водородного связывания. Рентгеноструктурные данные для ацил-КоА-оксидазы еще не получены, однако парадоксальный вывод об отсутствии водородного связывания у флавинов этого класса противоречит как всему опыту пространственных исследований флавобелков [34], так и данным УФ-спектров [74]. В работе [74] сделана попытка оценить влияние водородного связывания на

Рис. 8. Спектры РКР водных растворов некоторых флавобелков [64]; а — ацил-КоА-зависимая общая дегидрогеназа жирных кислот, рН 8,4; λ 488 нм; б — ацил-КоА-оксидаза жирных кислот, рН 8,0; λ 488,0 нм; в — глутатионредуктаза (из дрожжей), рН 7,6; λ 514,5 нм



энергии электронных переходов и интенсивности полос поглощения, моделируя в расчете ССП МО водородную связь гетероатома изоаллоксазинового кольца (О или N) вариациями величины потенциала ионизации валентного состояния. Авторы рассчитали таким способом все возможные варианты водородного связывания; в свете этих результатов экспериментальные данные электронных спектров для оксидаз должны соответствовать сильной водородной связи при N(5) [74]. Спектр РКР глутатионредуктазы в области $1300\text{—}1200\text{ см}^{-1}$ имеет сложный контур из четырех неполностью разрешенных полос [64], совершенно отличающийся от картины для свободного ФАД в водном растворе. Данные РКР относятся к глутатионредуктазе из дрожжей; недавно была определена с высоким разрешением трехмерная структура глутатионредуктазы из эритроцитов [36, 37]; в этом сложном белке изоаллоксазиновое кольцо осуществляет контакт между субъединицами путем водородного связывания протона N(3)H ФАД одной субъединицы с остатком гистидина основной цепи другой субъединицы; атомы N(1) и N(5) образуют прочные водородные связи с аминокислотными остатками активного центра. Поскольку глутатионредуктаза содержит два домена ФАД, вполне возможно, что сложный контур спектра РКР объясняется некоторыми различиями в ориентации и прочности водородных связей двух изоаллоксазиновых колец.

Флаводоксины. Флаводоксины — наименьшие по размерам ФМН-содержащие белки; как длинные (~ 170 аминокислотных остатков) [75], так и «короткие» (138 [35] и 148 [76] остатков) флаводоксины выполняют одинаковые биологические функции: они осуществляют перенос одного электрона к другим флавиновым системам, белкам с центрами Fe/S или гемопротеннам. Два одноэлектронных окислительно-восстановительных потенциала этих молекул существенно различаются, что позволяет охарактеризовать три формы: окисленную, семихинон (радикал) и восстановленную, и делает флаводоксины удобными модельными соединениями. Для представителей двух классов флаводоксинов, выделенных из бактерий *Clostridium* и *Desulfovibrio*, которые отличаются ами-

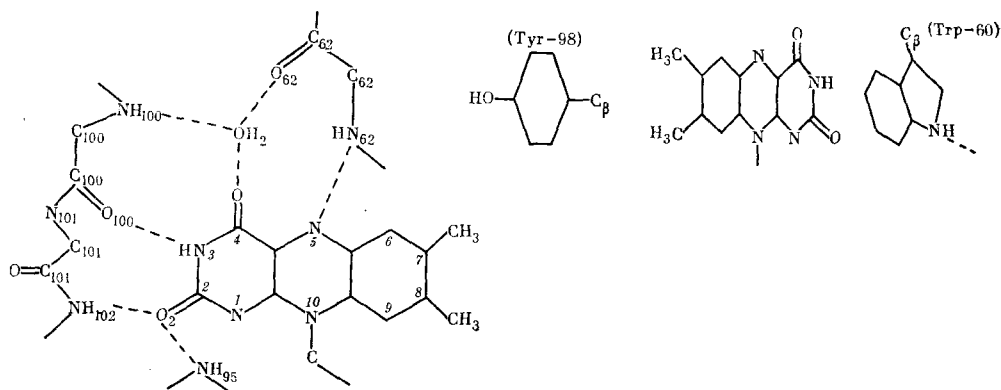


Рис. 9. Предположительная система водородных связей изоаллоксазинового кольца в активном центре флаводокина *Desulfovibrio vulgaris* [76]; цифры обозначают нумерацию аминокислотных остатков в белковой цепи; при небольшом повороте остатка 62 возможно образование водородной связи с атомом N(5); вверху показана ориентация флавина относительно остатков триптофана и тирозина

нокислотной последовательностью, электронными спектрами и способностью связывать рибофлавин [77], были получены резонансные спектры КАРС при возбуждении в длинноволновой полосе поглощения [66, 78]. Для этих же белков имеются рентгеноструктурные данные высокого разрешения [35, 76, 79], что позволяет сопоставить возможные взаимодействия с параметрами спектров РКР. Как было показано для флаводокинов обоих типов, рибитильная часть «утоплена» в белковом окружении, с которыми она образует прочные водородные связи. Плоское изоаллоксазиновое кольцо расположено ближе к поверхности глобулы, однако его контакты с растворителем или с донором электронов строго лимитируются белковым окружением, «закрывающим» пиримидиновое и центральное пиразиновое кольцо, так что доступной для внешних контактов оказывается только диметилбензольная часть. На рис. 9 показана система водородных связей, предполагаемая для ФМН, в активном центре флаводокина *Desulfovibrio vulgaris* [76]. Видно, что за исключением N(1), все донорные и акцепторные атомы оказываются водородно связанными, т. е. ситуация в данном случае аналогична ФМН в водном окружении. Тем не менее при сопоставлении спектра КАРС (табл. 3) этого флаводокина со спектром ФМН в H_2O авторы [66] отметили изменение частот ($см^{-1}$): 1629 (свободный) — 1624 (связанный); 1582—1573; 1412—1407; 1261—1251; 1233—1227; 1192—1185. Еще более значительно, чем частоты, меняются интенсивности некоторых полос, что особенно заметно в области 1100—1300 $см^{-1}$. Как уже отмечалось, низкая частота 1251 $см^{-1}$ и малая интенсивность этой линии наиболее вероятно указывают на уменьшение водородного связывания на участке C(2)O—N(3)—C(4)O. Из остальных различий наиболее существенным представляется понижение частоты и уменьшение интенсивности полосы 1571 $см^{-1}$; учитывая чувствительность соответствующего колебания к изотопозамещению [67], можно предполагать изменение электронной плотности в кольце II за счет связывания N(5). Однако существует и другая возможность; в активном центре флаводокина изоаллоксазиновое кольцо пространственно сближено с индольным циклом остатка триптофана-60 и ароматическим кольцом тирозина-98 (см. рис. 9). Известно, что интенсивная флуоресценция ФМН в флавинодокинах полностью потушена; в качестве механизма тушения предлагалось стопочное взаимодействие изоаллоксазинового кольца с триптофаном [79]. Не исключено, что изменение интенсивности полосы 1573 $см^{-1}$ связано с взаимодействием такого типа. Отметим, однако, что флавиновое и индольное кольца в данном случае некопланарны и составляют угол 45° , что делает взаимодействие с переносом заряда проблематичным. С помощью РКР был изучен также другой флаводокин того же класса *Desulfovibrio* (*Desulfovibrio gigas*) [66], трехмерная структура которого неизвестна. При

Частоты (см^{-1}) в спектрах РКР некоторых флавобелков

Обозначения полос	РФБ [67] ^а	Флаводоксины			ГО [58] ^д	КоА [164] ^е	КоА [64] ^ж	ГР [64] ^з
		<i>gigas</i> [66] ^б	<i>vulgaris</i> [66] ^в	Cl. МР [78] ^г				
I	1631	1624	1626	1628	1626	1624	1698	1627
II	1584	1573	1571	1577	1578	1583	1586	1580
III	1548	1545	—	—	—	1544	1551	—
IV	1503	1501	1501	1505	1501	1496	1498	—
V	1465	—	—	—	—	1454	1460	—
VI	1407	1407	1407	1409	1404	1407	1412	1402
VII	1355	1352	1354	1356	1364, 1345	1352	1351	1353
VIII	1302	—	—	—	—	—	—	1281
IX	1282	—	—	1279	—	—	—	1261
X	1252	1251	1254	1257	—	1253	1251	1246
XI	1229	1227	1223	1231	1230	1231	1233	1224
XII	1179	1173	1185	1179	1182	1182	1182	1180
XIII	1161	1163	1164	1165	1158	1162	1162	1155

^а РФБ — рибофлавин-связывающий протеин из белка куриного яйца; pH 7, λ 488,0 нм; ^б КАРС, $\omega_1=480$ нм; ^г *Clostridium* МР, pH 7,3 КАРС, $\omega_1=480$ нм; ^д глюкозооксидаза, КАРС, $\omega_1=480$ нм; ^е ацил-КоА-зависимая дегидрогеназа жирных кислот; здесь и далее спонтанное КР λ 488,0 нм; pH 8,4; ^ж ацил-КоА-оксидаза (из дрожжей), pH 8, λ 488,0 нм; ^з глутатионредуктаза (из дрожжей), pH 7,6 λ 514,5 нм.

близком аминокислотном составе флаводоксинов *gigas* и *vulgaris*, отмечалась их разная способность к связыванию ФМН [75]. Спектры КАРС однозначно показывают, что ближайшее окружение ФМН в активном центре двух рассматриваемых белков должно быть совершенно одинаковым [66].

Представитель другого класса флаводоксинов (*Clostridium*), выполняющий аналогичные биологические функции, при общей гомологии трехмерной структуры с рассмотренными выше белками типа *Desulfovibrio* и очень похожим связыванием рибитилфосфатной части, существенно отличается во многих деталях окружения изоаллоксазинового кольца [35, 79]. Однако несмотря на различия химической последовательности, в активном центре для белков этих классов существует большая аналогия пространственной структуры, что, по-видимому, и играет определяющую роль в их функционировании. В флаводоксине *Clostridium* также «закрыты» пиримидиновое и пиразиновое кольцо, с пиримидиновой частью сближен остаток триптофана-90 (под углом 27°), а ориентация остатка Gly-57, взаимодействие с которым предположительно стабилизирует семихинонную форму (см. ниже), эквивалентна ориентации Gly-61 в флаводоксине *Desulfovibrio* [76]. Спектр КАРС флаводоксина *Clostridium* [78] имеет общее сходство со спектрами белков *Desulfovibrio*, полученными при тех же условиях возбуждения ($\omega_1=480$ нм [66]); в этом случае также наблюдается понижение частоты и уменьшение интенсивности линии 1577 см^{-1} (предположительно отнесенное к взаимодействиям флавины — триптофан), однако изменения относительных интенсивностей полос в области $1100\text{—}1300\text{ см}^{-1}$ свидетельствуют об ином характере водородного связывания в активном центре флаводоксина *Clostridium*. Следует отметить высокое качество спектра КАРС [78], в котором авторам удалось получить достоверные данные в области ниже 1000 см^{-1} . Характер низкочастотного участка спектра оказался существенно иным, чем у свободного ФМН [63]. Несомненно, что анализ низких частот позволит в дальнейшем получить дополнительную информацию об электронных перестройках и взаимодействиях простетической флавиновой группировки в активных центрах белков.

Семихинонная форма. Ключевым свойством флавобелков — переносчиков одного электрона является термодинамическая стабилизация ⁴ промежуточного радикального состояния, так называемой семихинонной

⁴ Об энергетической предпочтительности ассоциации семихинонной формы с белком по сравнению с окисленной формой см., например, ссылки в работе [35].

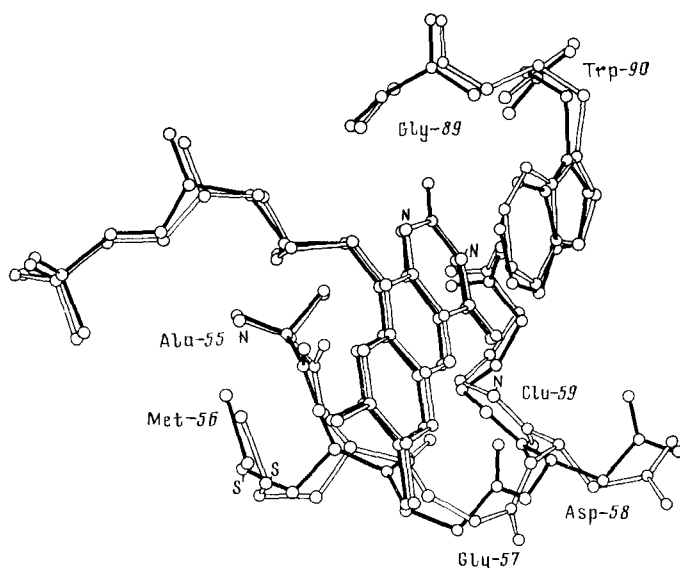


Рис. 10. Ориентация аминокислотных остатков 55—59 и 89—90 относительно изоаллоксазинового кольца в активном центре окисленной (светлые линии) и семихинонной (темные линии) форм флаводоксина *Clostridium MP* [35]

формы (см. рис. 3). Электронные спектры поглощения модельных систем и флавобелков со стабилизированной семихинонной формой содержат интенсивные полосы $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов в области 500—600 нм (см. рис. 5) [55], что указывает на сохранение изоаллоксазиновым циклом плоскостного строения, характерного для окисленной формы; об этом же свидетельствуют и данные спектров электронно-ядерного двойного резонанса (ENDOR) [80]. Эти выводы были полностью подтверждены данными рентгеноструктурного анализа [35]⁵. Из рис. 10, где показано расположение ближайших к флавинову аминокислотных остатков в активном центре для окисленного и семихинонного состояния флаводоксина следует, что образование семихинонной формы не сопровождается какими-либо радикальными изменениями ориентации изоаллоксазинового кольца в активном центре. Вместе с тем, конформационные перестройки некоторых аминокислотных остатков, в особенности на участке Gly-57—Asp-58 оказываются, по-видимому, решающими для стабилизации семихинона. Особая роль отводится [35] изменению ориентации остатка Gly-57 на $\sim 180^\circ$; в результате в семихиноне создаются условия для образования водородной связи N(5)...O (Gly-57) и разрушения возможной в окисленной форме водородной связи O(4)...NH (Asp-58). Связывание N(5)...O (Gly-57), по мнению авторов [35], является решающим стабилизирующим фактором⁶; смещение атомов других остатков в активном центре (за исключением Asp-58) составляет в среднем 0,5 Å; ориентация остатка триптофана относительно плоскости изоаллоксазинового кольца также несколько меняется. Заметим, что эти конформационные перестройки полностью отвечают величине 3,4 ккал/моль — предпочтительной энергии ассоциации семихинонной формы по сравнению с окисленной. Исследуя поляризационные спектры поглощения кристаллов флаводоксина, авторы [55] показали, что и в окисленной, и в семихинонной форме электронные переходы α и β (в обозначениях [55]) являются линейно-поляризованными в плоскости флавинового кольца с направлением момента перехода более близким к оси N(5)—N(10) (см. рис. 6), как для α -, так и для β -полосы. Наиболее интересный вывод работы [55] заключается в том, что в электронных спектрах семихинонной структуры оба

⁵ Угол «складывания» относительно оси N(5)—N(10) (рис. 5) составляет в семихиноне $2,5^\circ$ [35].

⁶ В флаводоксинах класса *Desulfovibrio* [76] эту роль выполняет остаток Gly-61; в окисленной форме белка возможна связь H(62)—O(4).

низкоэнергетических $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода происходят между орбиталями того же типа, что и в окисленном ФМН. Эту гипотезу, по-видимому, подтверждают следующие экспериментальные наблюдения [55]: 1) близкие величины отношений поляризации полос; 2) сходные контуры β -полос и близкие частоты, наблюдающиеся в размытой колебательной структуре α -полосы (переходы $0 \rightarrow 0$ и $0 \rightarrow 1$ соответственно 21000 и 22000 см^{-1} для окисленной формы и 16200 и ~ 17300 см^{-1} для семихиноновой); 3) близкие величины соответствующим образом нормированных интенсивностей. В пользу такого предположения могут свидетельствовать одинаковые знаки для α - и β -полос, наблюдавшиеся в спектрах кругового дихроизма обеих форм, и близкие значения анизотропии переходов [81]. Таким образом, если эта гипотеза справедлива, образование семихиноновой структуры следует представить как добавление одного электрона на незаполненную π -орбиталь окисленной формы без существенного перераспределения электронной плотности.

Помимо информации об изменении электронной плотности в семихиноне, идентификация этой структуры по данным РКР может оказаться особенно полезной еще и потому, что проявления семихиноновой формы в электронных спектрах флаво-белков часто сходны с наблюдаемыми при образовании комплексов с переносом заряда (см., например, [43] и ссылки в этой работе). К настоящему времени получены данные РКР для семихиноновой формы двух белков: флаводоксина [78] и рибофлавин-связывающего белка [82], а также для семихиноновых форм ФМН и ФАД, стабилизированных метилированием атома N(5) [83]. Как и можно было предполагать, изменение порядков связей в кольце II привело к изменениям практически всех колебательных частот флавиновой си-

Таблица 4

Частоты линий РКР семихиноновых структур флавинов^а

Флавины	ν, см ⁻¹										Ссылки	
РСВ ₆ (H ₂ O) » (D ₂ O)	1617 с 1618	1582 сл 1585	1553 сл 1535	—	1407 сл 1407	1393 сл 1387	1350 ср 1353	—	1273 сл	1230 ср	1160 о. сл 1082 сл 1089, 1060	[82] [82]
Флаводоксин ^в (H ₂ O) » (D ₂ O)	1611 с 1611	—	—	—	—	1391 с 1386	1378 ср	1333 сл	1269 ср	1232 с	—	[78]
5-Мс-ФАД ^г » д	1611 о. с 1611 ср	1590 ср 1590 ср	— 1516 ср	1476 сл 1432 ср	—	1372 сл 1372 о. с	1351 ср	1330 ср 1330 о. с	1278 сл 1278 сл	1224 сл 1224 ср	— 1174 ср	[83]
5-Мс-ФМН ^е (H ₂ O) » (D ₂ O)	1613 ср 1611 ср	1590 ср 1588 ср	1516 сл 1514 сл	1443 о. сл 1446 сл	—	1376 о. с 1372 о. с	—	1334 о. с 1334 о. с	1282 о. сл 1256 о. сл	1224 ср 1204 сл	1179 ср 1178 ср	[83] [83]
8-Cl-5-Мс-ФМН ^е	1613 сл	1590 ср	1516 сл	1443 сл	—	1378 о. с	—	1334 с	—	1226 сл	1170 ср	[83]

^а для области выше 1000 см^{-1} ; ^б λ 514,5 нм; ^в КАРС, $\omega_1=620$ нм; Γ λ 514,5 нм; Δ λ 647,1 нм; ϵ λ 611,7 нм.

стемы (табл. 4). При возбуждении в области β -перехода семихинона (λ 514,5 нм; рис. 11) в спектре доминирует линия 1611 см^{-1} [83]; при приближении к α -переходу ее интенсивность уменьшается [82] и при возбуждении на длинноволновом склоне α -полосы поглощения наиболее интенсивными оказываются линии $\sim 1340\text{--}1370\text{ см}^{-1}$ [83]. Высказывались предположения [78, 83], что интенсивная линия 1611 см^{-1} семихинона является аналогом линии 1580 см^{-1} окисленной формы и локализована преимущественно в кольце II. Однако учитывая понижение порядка связей в кольце II, а также вывод неподеленной пары атома азота N(5) из системы сопряжения при образовании семихинонной структуры, можно было бы ожидать понижения (причем достаточно большого) соответствующей частоты. Кроме того, линия 1611 см^{-1} оказывается практически

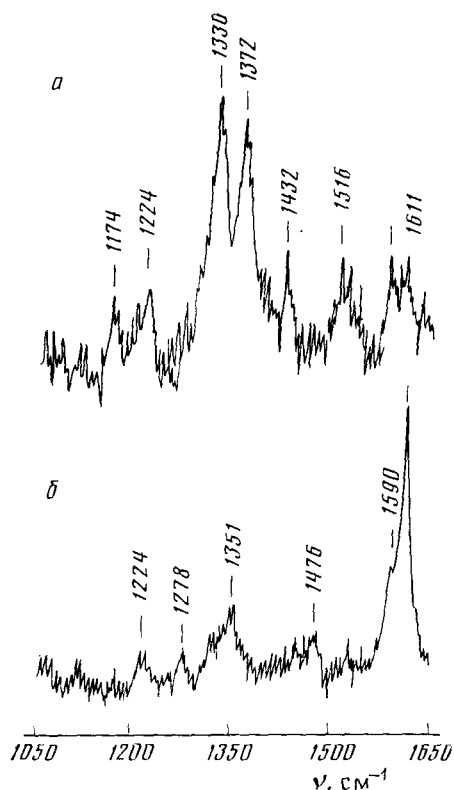


Рис. 11. Спектры N(5)-метил-ФАД в семихинонной форме: спонтанное РКР, возбуждение: а — 647,1 нм; б — 514,5 нм [83]

нечувствительной ни к метилированию N(5) [83], ни к дейтерированию семихинонных структур, в которых при N(5) находится обменивающийся протон [78, 82]. Таким образом, спектры РКР могут применяться в качестве надежного критерия при идентификации семихинонной структуры, что и было использовано [84] в исследованиях комплекса НАДФ с аденодоксинредуктазой. Однако полученные до сих пор данные РКР не могут служить ни подтверждением [78, 83], ни опровержением гипотезы Итона [55]. Для решения этого вопроса необходимы подробные исследования зависимости линий РКР от возбуждающей частоты (спектров возбуждения) в области α - и β -электронных переходов семихинона. Что же касается предложенных корреляций частот линий РКР семихинонной и окисленной структур [83], то они могут быть надежно установлены только на основании данных по изотопозамещенным образцам.

Восстановленные флавины.

Полностью восстановленное изоаллоксазиновое кольцо имеет электронные переходы в значи-

тельно более коротковолновой области, чем окисленная и семихинонная формы (рис. 12), с чем и связаны трудности получения спектров РКР. Последние были получены сравнительно недавно лишь для структур, где восстановленная форма образует комплекс по типу переноса заряда. В работах [85—88] исследовались так называемые «пурпурные комплексы», образующиеся на промежуточных стадиях реакции оксидазы D-аминокислот (ДАО) с D-аланином и D-пролином. Эти комплексы имеют характерное длинноволновое поглощение, простирающееся до ~ 750 нм. При возбуждении в области длинноволновой полосы наблюдалось резонансное усиление линий как субстратов (аланин и пролин), так и активного центра фермента (ФАД). Используя многочисленные варианты изотопозамещения в изоаллоксазиновом кольце и в молекулах субстратов, авторы [85—88] исключительно надежно выполнили отнесение частот и показали, что: 1) в пурпурном комплексе изоаллоксазиновое кольцо находится в полностью восстановленной форме; 2) колебание $\sim 1605\text{ см}^{-1}$ флавина, более других усиливающееся в полосе

переноса заряда, локализовано во фрагменте $C(10a)-C(4a)-C(4)=O$; 3) полосы 1692 см^{-1} в комплексе с *D*-аланином и 1658 см^{-1} в комплексе с *D*-пролином относятся к валентным колебаниям $C=N^7$ аминокислот, которые таким образом участвуют в комплексообразовании в имино-форме. Интересной, пока еще не объясненной особенностью комплексов с *D*-аланином является чувствительность линии $\sim 1540\text{ см}^{-1}$ к изотопозамещению как в молекуле субстрата, так и в ФАД [88].

Полученные данные РКР дают непосредственное свидетельство того, что в пурпурном комплексе фрагмент $C(10a)-C(4a)-C(4)=O$ восстановленного ФАД находится в близком контакте с плоскостью $HN=C-SO_3^-$ субстрата, обеспечивая взаимодействие по типу переноса заряда.

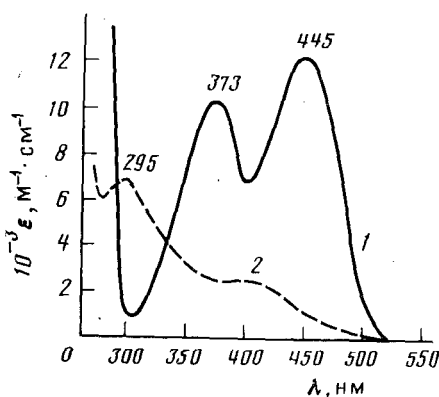


Рис. 12

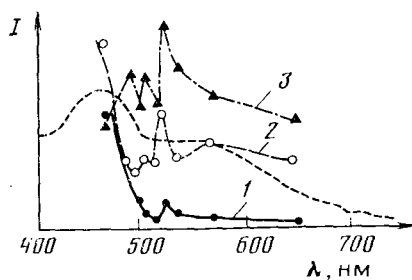


Рис. 13

Рис. 12. Электронные спектры поглощения полностью окисленной (1) и полностью восстановленной (2) форм ФМН [43]

Рис. 13. Зависимость интенсивности некоторых линий спонтанного РКР от частоты возбуждающего света комплекса старого желтого фермента с пентахлорфенолом; видно усиление линий флавиновой части: 1628 (1), 1588 (2) и лиганда 1475 см^{-1} (3); пунктиром показан контур полосы поглощения [92]

Комплексы с переносом заряда. Одной из важнейших особенностей, по-видимому, необходимой для функционирования многих флавиновых систем, является их способность образовывать комплексы с переносом заряда (КПЗ); такие комплексы образуют практически все флавоферменты, содержащие пиридин-нуклеотид [89]. Полученные недавно данные о трехмерной структуре глутатионредуктазы [36, 37] подтвердили, что кольцо НАДФ в активном центре действительно располагается над изоаллоксазиновым кольцом в конформации, благоприятной для образования комплекса с переносом заряда. Известна способность некоторых флавобелков взаимодействовать по типу переноса заряда и с другими субстратами, в частности производными бензола [89]. Механизмы образования, строение и каталитическая значимость подобных комплексов пока еще во многом остаются неясными. Обычно об образовании КПЗ флавинов судят по появлению длинноволнового поглощения в области $500-700\text{ нм}$, которое сопровождается, как правило, уменьшением интенсивности α - и β -полос, однако эти изменения, как уже указывалось, весьма сходны с наблюдающимися для семихинонных флавиновых структур. В последнее время были получены данные РКР для ряда модельных КПЗ флавобелков: сейчас уже очевидно, что спектры РКР позволяют надежно идентифицировать КПЗ флавинов и в принципе могут дать уникальную информацию об их строении и локализации переноса заряда.

Первой моделью для исследования КПЗ флавинов был так называемый старый желтый фермент (СЖФ), содержащий простетическую группу ФМН. В природе этот белок существует в «зеленой» форме, в виде

⁷ Изменения этих частот в дейтерированных образцах свидетельствуют о значительном участии в колебании $\delta(NH)$.

комплекса с *n*-оксibenзальдегидом [90]; он способен также образовывать искусственные комплексы с разнообразными ароматическими и гетероароматическими производными, содержащими гидроксильные группы [43, 90]. Японскими авторами [91, 92] были исследованы спектры РКР продуктов взаимодействия СЖФ с набором замещенных фенолов при возбуждении в длинноволновой полосе поглощения. Анализ полученных ими данных показывает, что, прежде всего, в исследованных комплексах флавинов находится в окисленном состоянии; линии 1628, 1585, 1548, 1415, 1356, 1260 и 1160 см^{-1} , присутствующие во всех образцах, практически имеют те же частоты, что и в спектрах ФМН и рибофлавина. Вместе с тем, в спектрах РКР наблюдается резонансное усиление линий (особенно в низкочастотном участке), специфических для замещенного субстрата: 477, 390, 475, 386 и 547 см^{-1} соответственно для *n*-CH₃, *n*-Cl, *n*-F, *n*-NO₂ и незамещенного фенола. В высокочастотной области также можно идентифицировать линии, относящиеся к фенольной части, что особенно явно для комплексов с пентахлор- и пентафторфенолами [92]. Исследования частотной зависимости некоторых линий РКР в полосе переноса заряда [92] показывают, что наибольший вклад в колебательную структуру длинноволновой электронной полосы поглощения вносят частоты 1588 см^{-1} изоаллоксазина и 1475 и 454 см^{-1} фенола (рис. 13).

В данном случае в спектрах не проявляются частоты, непосредственно относящиеся к фрагменту С—ОН фенола, что характерно, например, для комплексов фенолят-аниона с металлами, где взаимодействие осуществляется локально через фенольный атом кислорода. Характер зависимости интенсивности от частоты возбуждения $I(\nu)$ для линии 1588 см^{-1} [92] дает прямые доказательства переноса заряда на флавиновое кольцо. Поскольку соответствующее колебание связано преимущественно с фрагментом N(5)—C(4a)—C(10a), эти данные позволяют судить о локализации переноса заряда. Для осуществления такого взаимодействия необходима сэндвичевая конформация с параллельными изоаллоксазиновым и фенольным кольцами. Неизменность частоты полосы 1588 см^{-1} (так же, как и остальных частот изоаллоксазинового кольца) свидетельствует о том, что все изменения электронной плотности относятся исключительно к возбужденному состоянию молекул. Наибольший перенос заряда происходит в комплексе с *n*-нитрофенолом, о чем можно судить по изменению распределения интенсивностей в спектре РКР.

В спектрах РКР комплексов с переносом заряда других флавоферментов, полученных к настоящему времени, отмечены те же особенности. При исследовании комплексов КоА-зависимой дегидрогеназы жирных кислот (ФАД-содержащей) с ацетоацетил коэнзимом А авторы обнаружили резонансное усиление линий 1586 и 1550 см^{-1} [94], подтвердив тем самым, что электронный перенос при взаимодействии с самыми различными донорами происходит к центрам N(5) и C(4a) изоаллоксазинового кольца, в согласии с квантово-химическими расчетами [95]. Изучены также искусственные комплексы оксидазы *D*-аминокислот с аминок- и гидроксibenзоатами [96]: последние, как известно, являются эффективными ингибиторами фермента. При возбуждении в длинноволновой полосе поглощения (λ 632,8 нм) комплекса ДАО с *o*-аминобензоатом наблюдались линии 1583 см^{-1} (изоаллоксазиновое кольцо) и 568 см^{-1} (*o*-аминобензоат). Интересно, что резонансное усиление не обнаружено для *мета*- и *пара*-аминобензоатов, что указывает на строгие конформационные ограничения в образовании КПЗ. В реакции ДАО (из почек свиньи) с β -циано-*D*-аланином промежуточные стадии по данным РКР [97], также представляют собой КПЗ окисленного флавина. Отметим, что во всех исследованных комплексах ДАО полоса — «индикатор водородных связей» находится при 1240 см^{-1} ⁸ [96, 97], т. е. значительно сдвинута в сторону низких частот по сравнению с другими флавинами, что свидетельствует о весьма специфических взаимодействиях ФАД с

⁸ Отнесение этой полосы в комплексах ДАО подтверждено сдвигом 1242→1284 см^{-1} при дейтерировании.

апобелком ДАО. Комплексы с переносом заряда были идентифицированы также на промежуточных стадиях анаэробного восстановления аденодоксинредуктазы коферментом НАДФ [98].

Комплексы с металлами. Проблема взаимодействия флавинов с металлами важна для понимания механизмов функционирования флаво-белков, содержащих центры Fe/S, а также молибден [99]. В работах [100, 101] исследованы модельные комплексы ФМН с серебром и рутением [100], и комплексы рибофлавин-связывающего белка (РСБ) и 10-метилизоаллоксазина с Ru^{II} . Электронные спектры поглощения комплекса Ag^+ ФМН содержат слабое плечо ~ 530 нм на длинноволновом склоне α -полосы, тогда как в спектрах комплексов $(NH_3)_4Ru^{II}$ появляется интенсивная полоса ~ 630 нм (рис. 14).

Данные РКР позволяют заключить, что в комплексе Ag^+ ФМН взаимодействие осуществляется по типу переноса заряда. Помимо атома N(5) (о чем можно судить по росту интенсивности линий 1580, 1540 cm^{-1}), во взаимодействии, по-видимому, принимает участие ближайший к N(5) атом кислорода; на это указывают изменения симметричного и антисимметричного колебаний карбонильных групп в ИК-спектре комплекса Ag^+ ФМН [100]. При образовании комплекса $Ru^{II}(NH_3)_4$ с РСБ [101] меняются частоты и относительные интенсив-

ности практически всех линий спектра РКР. Значения частот, и в особенности распределение интенсивностей при возбуждении 647,1 нм (см. рис. 14), более всего сходны с наблюдающимися для семихинонной формы (раздел 5). Это предположение, однако, требует дальнейшей проверки. Интересно, что в РКР-спектре Ru^{II} РСБ, так же как и в спектре модельного комплекса Ru^{II} с 10-метилизоаллоксазином [101] проявляются полосы ~ 1700 — 1710 cm^{-1} , относящиеся к карбонильным группам.

Данные, полученные для модельных металлокомплексов позволили установить [102], что в ЭТФ — дегид-

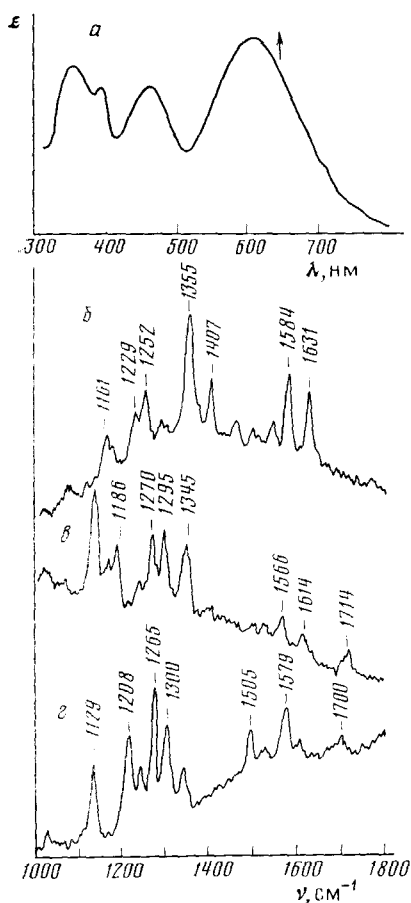


Рис. 14

Рис. 14. Электронный спектр поглощения комплекса рибофлавин-связывающего белка с $Ru^{II}(NH_3)_4$ (а) и спектры спонтанного РКР: (б) комплекса РСБ— $Ru^{II}(NH_3)_4$, (в) комплекса $Ru^{II}(NH_3)_4$ 10-метилизоаллоксазин; в обоих случаях возбуждение λ 647 нм (отмечена стрелкой на спектре поглощения); для сравнения приведен спектр РСБ, λ 488,0 нм (б) [101]

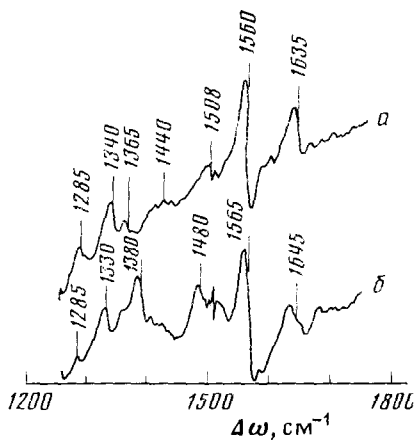
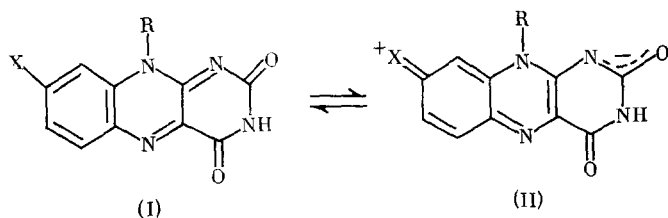


Рис. 15

Рис. 15. Инверсные спектры (резонансное возбуждение) 8-аминорибофлавина (а) и 8-гидроксирибофлавина (б), pH 7,3 [65]

рогеназе⁹, ФАД-содержащем флавобелке, который включает центры Fe/S и функционирует в электрон-транспортной цепи, не происходит непосредственного переноса электрона между кластером Fe/S и флавином, как можно было предполагать на основании спектров ЭПР (см. ссылки в работе [102]).

Модифицированные флавины. Как уже отмечалось, во многих случаях простетическая группа флавина может быть легко отделена от белка без его денатурации, модифицирована введением заместителей и затем вновь соединена с апобелком. Такие модификации широко применяются для получения информации о взаимодействии флавина с белком, главным образом по кинетическим данным — константам связывания, изменениям каталитической активности, а также по изменению электронных спектров и спектров кругового дихроизма. Наиболее часто в этих целях используются 1- и 5-деаза-производные, или же замещения метильных групп в положениях 7 и 8¹⁰. Очевидно, что полученные результаты, как правило, не могут быть интерпретированы однозначно, так как в модифицированном соединении могут одновременно изменяться несколько факторов: конформация некоторых аминокислотных остатков в активном центре (и, следовательно, характер взаимодействий с простетической группой), стерические условия подхода субстрата и, наконец, электронная структура самого изоаллоксазинового кольца. В последнее время получен обширный материал по РКР спектрам модифицированных флавинов, как свободных, так и связанных с различными белками [65, 70, 71, 103, 104], который, в принципе, позволяет дифференцировать эти факторы. Как следует из данных РКР, наличие атомов галогена в положении 7 и 8 мало изменяет распределение электронной плотности в изоаллоксазиновом кольце; изменения в спектрах РКР [70] могут быть объяснены в данном случае эффектом масс. Однако введение в эти положения групп, содержащих неподеленные пары электронов (окси-, амин- или меркаптогруппа), приводит к радикальным изменениям параметров спектров РКР (рис. 15). Ранее на основании данных УФ-спектров (см. [43] и ссылки в этой работе) высказывалось предположение, что для подобных соединений возможны таутомерные превращения типа:

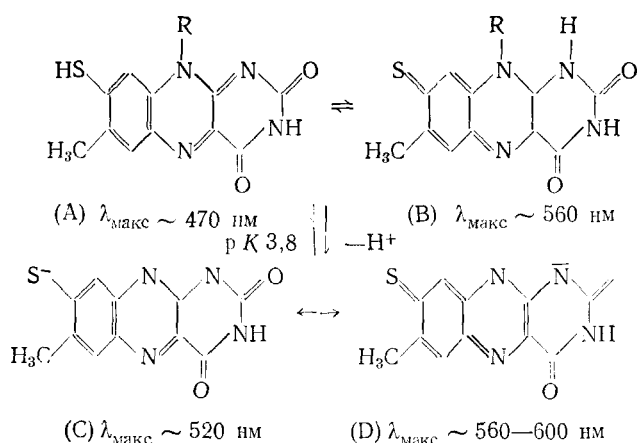


т. е. равновесие между бензойной (I) и хинойной формой (II). Во всех случаях для предполагаемой хинойной структуры отмечался батохромный сдвиг и увеличение интенсивности длинноволновой полосы поглощения.

Для спектров РКР этих производных (табл. 5) характерно большое понижение частот полос II и III (на 30—40 см⁻¹), изменения в области 1400—1200 см⁻¹ и появление ряда новых полос в области 1100—1000 см⁻¹. Особенно велики изменения в спектрах РКР 8-меркаптофлавинов, имеющих длинноволновое поглощение ($\lambda_{\text{макс}}$ 500—600 нм), намного превосходящее по интенсивности поглощение других производных (рис. 16). В соответствии с данными УФ-спектров в зависимости от окружения и потенциала ионизации, для 8-меркаптофлавинов были предложены следующие таутомерные структуры [43]:

⁹ ЭТФ — электрон-транспортующий флавопротеин.

¹⁰ В флавобелках известной структуры [35, 36] изоаллоксазиновое кольцо ориентировано таким образом, что бензольная часть и 7,8-метильные группы находятся на «поверхности» и менее всего контактируют с аминокислотными остатками активного центра. Этим и объясняется, по-видимому, легкость связывания 7,8-модифицированных аналогов с белком.



Спектры РКР меркапторибофлавина в различных состояниях получены в работе [103]. Как следует из этих данных, для протонированной формы (рН 2) частоты линий *I* и *II* понижены (соответственно на 9 и 14 см⁻¹ относительно рибофлавина), однако неизменность положения остальных линий, и, что более существенно, распределения интенсивностей полос свидетельствуют о сохранении «бензойдного» характера электронной плотности, такого же как в галогенпроизводных [70, 104]. По данным РКР именно в этой форме 8-меркапторибофлавин [103] и 8-метилмеркапторибофлавин [104] присоединяются к рибофлавинсвязывающему белку. Переход к условиям образования анионной (тиолатной) формы (C) (сопровождающийся длинноволновым сдвигом полосы поглощения) приводит к радикальным изменениям спектра РКР, в котором доминирующими оказываются полосы 1616 и 1545 см⁻¹; последнюю обычно рассматривают как аналог полосы 1584 см⁻¹ окисленной формы, локализованной на участке N(5)—C(4a)—C(10a) [67], и, соответственно, как индикатор двоевязности этого фрагмента [65, 103]. Большое понижение частоты линии *II* интерпретируется во всех работах как свидетельство уменьшения порядка π -связей на этом участке изоаллоксазинового кольца и как решающий довод в пользу хиноидной структуры (B) и (D). Исследование частотной зависимости 1545 см⁻¹ [103] показывает, что соответствующее нормальное колебание действительно вносит вклад в длинноволновый

Таблица 5

Частоты линий РКР (см⁻¹) модифицированных флавиновых систем

Обозначение полос	РФ [65] ^а	8-ОН-РФ [65] ^б	8-ОСН ₃ -РФ [82]	8-SCН ₃ -РФБ [104]	8-NH ₂ -РФ [65]	8-NHCH ₃ -РФБ [71]	8-N CH ₃ ' ₂ -РФ [65]
<i>I</i>	1631	1635 (1638)	1638	1624	1645	1641	1629
<i>II</i>	1582	1560 (1555)	1578	1564	1565	1567	1558
<i>III</i>	1547	—	1542	1533	—	1537	1519
<i>IV</i>	1501	1508	1506	1505	—	1531	—
<i>V</i>	1462	1440	—	1476	1480	—	—
<i>VI</i>	1407	1365	1413	1405	—	1407	1405
			1387	—	1380	—	1375
<i>VII</i>	1354	1340 (1337)	1358	1348	1330	1360	1335
<i>VIII</i>	1304	—	—	—	—	—	—
<i>IX</i>	1281	1285 (1286)	1276	—	1285	—	1281
<i>X</i>	1250	—	1237	1246	—	—	1251
<i>XI</i>	1228	(1215)	—	—	—	—	1212
<i>XII</i>	1178	—	—	1194	—	—	—
<i>XIII</i>	1161	—	1152	1150	—	1162	1133
<i>XIV</i>	1072	—	1071	1084	—	—	—
				1014	—	—	—

Примечание. РФ — рибофлавин; РФБ — рибсфлавин-связывающий белок; ^а различия с данными [70] для РФБ не превышают —2 см⁻¹; ^б в скобках данные [71].

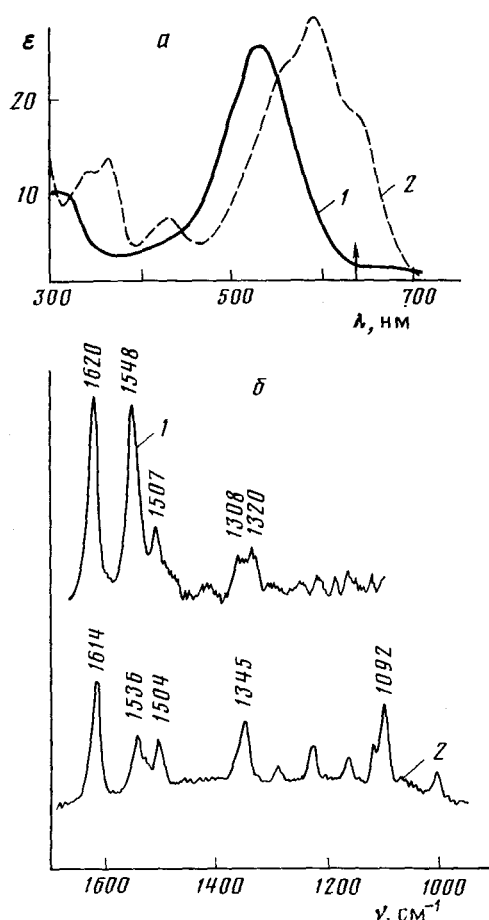


Рис. 16. Электронные спектры поглощения модифицированных флавобелков (а): 8-меркаптофлаводоксина (1); 8-меркаптооксидазы *D*-аминокислот (2) [43] и спектры спонтанного РКР (б): 1 — 8-меркапторибофлавина, pH 8,4, λ 514,5 нм; 2 — 8-меркапто-ФМН-лактатоксидазы, pH 7, λ 632,8 нм [65]

электронный переход. Заметим, однако, что в настоящее время не получено каких-либо убедительных доводов в пользу того, что это колебание локализовано в том же фрагменте, что колебание 1584 cm^{-1} окисленной формы. Ранее отмечалось, что при связывании 8-меркапто-ФМН с некоторыми белками не происходит существенных изменений окраски «красной тиолатной» формы (флаводоксин) [105], тогда как при присоединении модифицированной протетической группы к лактатоксидазе, глюкозооксидазе, оксидазе *D*-амино кислот и старому желтому ферменту красный цвет заменяется глубокой синей окраской (рис. 16) [105]. Поскольку все перечисленные флавобелки относятся к классу оксидаз, было высказано предположение, что оксидазы стабилизируют «голубую бензохинонную» структуру (D), и что в активном центре фермента оксидазы необходимо присутствие аминокислотного остатка, стабилизирующего отрицательный заряд на участке N(1)—O(2) изоаллоксазина:

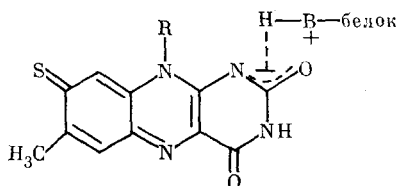


Таблица 6

Частоты (см⁻¹) спектров РКР 8-меркаптофлавинов [65]

РФА ^а	8-SH-РФ ^б	8-SH-ФМН—ЛОВ ^в	8-SH-ФАД—ГО ^г	8-SH-ФМН—СЖФД
1631	1620	1614	1606	1611
1582	1548	1536	1530	1528
1547	1507	1504	1501	1500
1501	—	—	—	—
1462	—	—	—	—
1407	—	—	—	—
1354	1360, 1320	1345	1337	1343
1304	—	—	—	—
1281	—	1292	1263	—
1250	—	1223	1209	1220
—	—	—	—	—
1228, 1178, 1161	—	1161	1159	1168
—	—	1110	—	1111
—	—	1092	1099	1087
1072	—	1063	1079	1039

^а Рибофлавин-связывающий белок, приведен для сравнения; ^б 8-меркапторибофлавин, pH 8,4 с добавлением 3 М КИ; ^в 8-меркапто-ФМН-*L*-лактатоксидаза, pH 7; ^г 8-меркапто-ФАД-глюкозооксидаза, pH 7; ^д 8-меркапто-ФМН — старый желтый фермент, pH 7.

Спектры РКР «голубых бензохинонных» структур были получены Шопфером, Моррисом и соавт. [65] (табл. 6). Спектр 8-меркаптолактоксидазы при возбуждении λ 632 нм (отмечена стрелкой) показан на рис. 16; данные для глюкозооксидазы и старого желтого фермента приведены в табл. 6. Эти результаты показывают, что для всех перечисленных белков характерна одинаковая электронная структура простетической группы 8-меркапто-флавина, значительно отличающаяся от традиционной окси-формы рибофлавина, ФМН и ФАД. Некоторые изменения частот основных полос в пределах каждого спектра отражают, очевидно, специфику конкретных взаимодействий белок — флавин в активном центре фермента. В литературе эти спектры были интерпретированы как относящиеся к «полностью хиноидной» структуре (D) [65], а спектры производных 8-окси-, 8-амино-, 8-меркапто- [65], 8-метиламино- [71], 8-метокси- [70], и 8-метилтио-рибофлавина [104] — к «промежуточным» между типичной хиноидной и типичной бензоидной структурами, с «большим», или «меньшим» хиноидным характером [65]. Помимо ряда несоответствий (различия спектров РКР производных, для которых по электронным спектрам предсказывается одинаковая «доля» хиноидной структуры [43, 65]; существенно «бензоидное» распределение интенсивностей в случае 8-ОСН₃- и 8-SCH₃-производных при больших смещениях полосы II в последнем случае и т. д.), сама концепция описания соответствующих электронных состояний как смеси резонансных структур, а смещений линий РКР — как результата того или иного «процентного содержания» хиноидной формы непродуктивна и не может дать никаких конкретных сведений ни о распределении электронной плотности в изоаллоксазиновом кольце, ни о его взаимодействиях с белком. Мало полезными представляются также корреляции с константами Гаметта [65, 104] положений некоторых полос РКР при неучете влияния масс и кинематических взаимодействий на колебательные частоты (см., например, корреляции для полосы I в [104]). При всей уникальности полученных для модифицированных флавинов данных РКР они остаются практически неиспользованными. Для интерпретации этих результатов необходимы дополнительные эксперименты с изотопозамещенными образцами, которые позволили бы произвести надежные отнесения колебательных частот, а также квантовомеханические расчеты электронной плотности в модифицированных флавинах.

Стопочные взаимодействия флавинов. В литературе неоднократно высказывалось предположение, что свободные группы ФМН и ФАД в растворах при определенных условиях существуют в виде стопочных

комплексов. С взаимодействиями такого типа, в частности, связывались изменения флуоресцентных свойств флавинов. Известно, что флуоресценция ФАД в водном растворе значительно потушена по сравнению с водным раствором ФМН той же концентрации; одной из вероятных причин тушения, по предположениям [106], может быть стопочное взаимодействие изоаллоксазинового и аденинового колец. Обсуждалась возможность образования внутримолекулярной стопочной структуры из изоаллоксазинового и аденинового колец в молекуле ФАД [107]. При добавлении к растворителю 30% диметилсульфоксида (ДМСО) такое взаимодействие существенно ослабляется и флуоресценция ФАД усиливается в 40 раз, приближаясь к флуоресценции ФМН. Предпринимались попытки обнаружить стопочные взаимодействия с помощью РКР. При сопоставлении частот в спектрах водных растворов ФМН при концентрации ~ 60 мМ [63], когда молекулы ФМН должны быть полностью димеризованы, со спектрами КАРС разбавленных водных растворов и растворов в смеси H_2O — ДМСО [66] не было отмечено каких-либо существенных различий. Следует заметить, однако, что эти результаты трудно сопоставимы, поскольку данные [63] относятся к спонтанному РКР практически при нерезонансном возбуждении (λ 600 нм), а данные [66] — к возбуждению антистоксовой АСКР ($\omega_1 = 495$ нм), дающему отрицательный лоренцев контур. Сравнивая спектры КАРС для ФАД в H_2O и водном ДМСО, авторы отметили небольшие изменения некоторых частот [66]. В дальнейшем, однако, было подтверждено, что спектры ФМН в растворах при больших концентрациях, обеспечивающих стопочные взаимодействия (> 50 мМ), не отличаются от спектров разбавленных растворов (< 2 мМ) [64].

Флавоцитохромы. Эти соединения, функционирующие в электрон-транспортных цепях, содержат два центра окислительно-восстановительных превращений: флавин и цитохром (группу гема). Механизм функционирования флавоцитохромов во многом еще не ясен [108]; мало что известно и о их интереснейшей особенности — предполагаемом внутримолекулярном туннелировании от флавина (донор электронов) к цитохрому (акцептор). Между тем исследование такого взаимодействия имеет общее значение для многоцентровых ферментов.

Наиболее подробно в классе цитохромов был изучен флавоцитохром *c*, содержащийся в пурпурных и зеленых фототропных бактериях, которые играют важную роль в биологическом восстановлении сульфатов и в общем круговороте серы на Земле [39]. Флавоцитохром c_{552} , выделенный из *Chromatium vinosum*, состоит из двух неравнозначных субъединиц, одна из которых ($M_r = 21000$) содержит две группы гема *c*, а другая ($M_r = 46000$) — одну группу ФАД [109]. Изоаллоксазиновое кольцо в этом случае ковалентно связано с белком тиозэфирной связью в положении 8 [110]. Согласно данным ЭПР [111], две группы гема *c* неэквивалентны; для одной из групп ближайшее окружение (по-видимому, лиганды) меняются в зависимости от pH. Флавоцитохром c_{552} изучали методом РКР почти одновременно две группы исследователей [112, 113]. Из-за неудачного выбора возбуждающих частот в работе [112] не удалось идентифицировать линии РКР, которые можно было бы отнести к изоаллоксазиновому кольцу. Электронный спектр поглощения фермента (рис. 17) представляет собой суперпозицию интенсивного поглощения гема (полосы *B* (Core), Q_{00} и Q_{01}) и более слабых полос $\sim 450, 480$ нм, относящихся к флавиновому фрагменту. Меняя частоту возбуждающей линии, авторы [113] наряду с интенсивными линиями РКР цитохрома 1645, 1566 и 1366 см^{-1} , близкими к частотам, наблюдавшимся для феррицитохрома *c* лошади (соответственно 1637, 1563, 1316 см^{-1} , [114]), выделили линии 1629, 1346 и 1244 см^{-1} изоаллоксазинового кольца. Последние имеют наибольшую интенсивность при возбуждении λ 476,5 нм, в области полос электронных переходов флавина (рис. 18).

В спектре РКР восстановленной (ферро) формы флавоцитохрома c_{552} присутствуют линии, относящиеся исключительно к группам гема [113]; их число, поляризация и частоты практически такие же, как у других

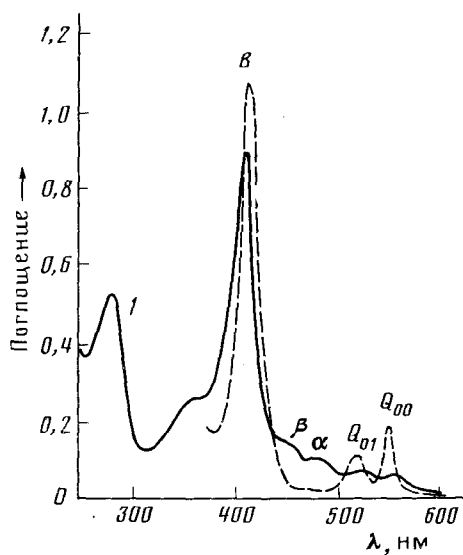


Рис. 17

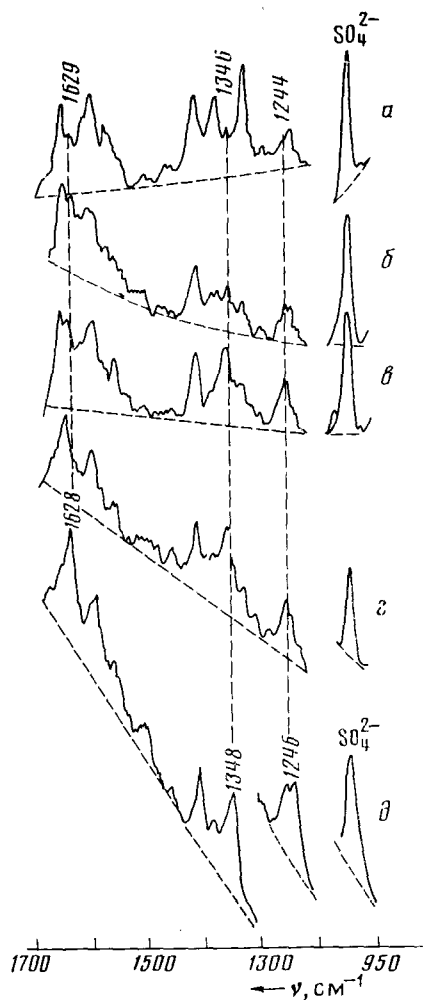


Рис. 18

Рис. 17. Электронный спектр поглощения флавоцитохрома c_{552} в окисленной (1) и восстановленной (2) форме; буквами B , Q_{01} , Q_{00} отмечены полосы поглощения гема c , буквами α и β полосы поглощения флавиновой части [113]

Рис. 18. Спектры РКР флавоцитохрома c_{552} (рН 6,5) при возбуждении линиями 514,5 (а), 501,7 (б); 496,5 (в), 488,0 (г) и 476,5 нм (д); внутренний стандарт — ион SO_4^{2-} (ν 983 cm^{-1}); вертикальные штриховые линии указывают положение линий РКР флавина [113]

ферроцитохромов c [115]. Судя по симметричным контурам резких линий 1588 и 1316 cm^{-1} , обе группы гема в молекуле ферроцитохрома c_{552} должны быть идентичны. Отсутствие полос изоаллоксазинового кольца указывает на то, что флавин в этом случае имеет полностью восстановленную форму, а не семихинонную [113].

С помощью РКР исследован процесс фотовосстановления всего фермента и составляющих его цитохром- и флавиносодержащей субъединиц отдельно, а также взаимодействие с сильными ингибиторами — сульфитом и цианидом [113]. Изменения интенсивностей полос РКР в спектрах комплексов с цианидом и сульфитом позволяют предполагать, что оба аддукта образуются присоединением к атому N(5) изоаллоксазинового кольца, что и является причиной ингибирования фермента. Что касается фотовосстановления, которое в данном случае происходит исключительно в присутствии этилендиамина тетрауксусной кислоты, было показано [113], что первой из простетических групп восстанавливается флавиновая система, и что группы гема не могут быть восстановлены в отсут-

ствие фламина. Эти эксперименты являются первым прямым свидетельством наличия внутримолекулярного переноса от флавиновой группировки к цитохрому в этом классе ферментов.

* * *

Таким образом, к настоящему времени получен обширный материал по спектрам РКР флавинов. Очевидно, что метод может быть успешно применен для идентификации и суждений о структуре изоаллоксазинового кольца во всех возможных состояниях окисления и ионизации. В условиях, когда возможности ЯМР весьма ограничены, спектроскопия резонансного комбинационного рассеяния остается по существу единственным методом, заключающим обширную потенциальную информацию об основном и возбужденном состоянии флавиновых систем. Тем не менее, эти данные используют пока лишь в небольшой мере. По сравнению с ювелирными методами выделения и синтеза, например модифицированных образцов, и с исключительно высокой экспериментальной техникой спонтанной и нелинейной спектроскопии РКР результаты интерпретации выглядят скромными. Причина такого положения заключается главным образом в недостаточно развитой теоретической основе в виде анализа нормальных колебаний и квантовомеханических расчетов электронной плотности модельных флавиновых систем. Очевидно, что описание изменений электронного состояния изоаллоксазинового кольца в терминах процентного содержания резонансных структур не может способствовать выявлению реальной ситуации. До сих пор несмотря на обилие материала по изотопозамещенным образцам и модифицированным системам, отсутствует адекватный расчет нормальных колебаний флавинов. При современных развитых методах квантовой химии и колебательной спектроскопии, уровне вычислительной техники и правильном выборе модели получение таких теоретических данных легко осуществимо. На этой основе в полной мере могут быть использованы все сведения о частотах, интенсивностях и поляризациях линий РКР для суждений о состоянии изоаллоксазинового кольца и его взаимодействиях с белковым окружением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шорыгин П. П. Докл. АН СССР, 1952, т. 87, с. 201.
2. Шорыгин П. П., Иванова Т. М. Там же, 1963, т. 150, с. 533.
3. Иванова Т. М., Яновская Л. А., Шорыгин П. П. Оптика и спектроскопия, 1965, т. 18, с. 206.
4. Шорыгин П. П., Иванова Т. М. Там же, 1968, т. 25, с. 200.
5. Spiro T. G., Stein P. Ann. Rev. Phys. Chem., 1977, v. 28, p. 501.
6. Шорыгин П. П. Успехи химии, 1978, т. 67, с. 1697.
7. Woodbury E. J., Ng W. K. Proc. IRE, 1962, v. 50, p. 2367.
8. Maker P. D., Terhune R. W. Phys. Rev., A, 1965, v. 135, p. 801.
9. Non-Linear Raman Spectroscopy and Its Chemical Applications. Proc. of the NATO Advanced Study Institute, Bad Windsheim, West Germany, 1982. D. Reidel Pub. Comp. Dordrecht, Holland, 1982.
10. Ахманов С. А., Коротеев Н. И. Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света. М.: Наука, 1981.
11. Плачек Г. Рэлеевское рассеяние и Раман-эффект. Харьков, 1935.
12. Harvey A. B. Chemical Applications of Nonlinear Raman Spectroscopy, N. Y.: Academic Press, 1981.
13. Byer R. L., Begley R. F., Harvey A. B. Appl. Phys. Letters, 1974, v. 25, p. 387.
14. Chabay J., Klauminzer G. K., Hudson B. S. Ibid., 1976, v. 28, p. 27.
15. Nestor J., Spiro T. G., Klauminzer G. K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 3329.
16. Bloembergen N., Lotem H., Lynch R. T. (Jr). Ind. J. Pure and Appl. Phys., 1978, v. 16, p. 151.
17. Carreira L. A., Goss L. P., Malloy T. B. J. Chem. Phys., 1978, v. 69, p. 855.
18. Jones W. J., Stoicheff B. P. Phys. Rev. Letters, 1964, v. 13, p. 657.
19. Owyang A. Opt. Commun., 1977, v. 22, p. 323.
20. Owyang A., Jones E. D. Opt. Letters, 1977, v. 1, p. 152.
21. Lin S. H., Reid E. S., Tredwell C. J. Chem. Phys. Letters, 1974, v. 29, p. 389.
22. Owyang A. IEEE J. Quantum Electron., 1978, v. QE-14, p. 192.
23. Levine G. P., Bethea C. G. Appl. Phys. Letters, 1980, v. 36, p. 245.

24. *Haushalter J. P., Morris M. D. Anal. Chem.*, 1981, v. 53, p. 21.
25. *Laubereau A., Kaiser W. Rev. Mod. Phys.*, 1978, v. 50, p. 607.
26. Сверхкороткие световые импульсы/Под ред. Шапиро С., М.: Мир, 1981.
27. *Hilinski E. T., Rentzepis P. M. Nature*, 1983, v. 302, p. 481.
28. *Friedman J. M., Rousseau D. L., Ondrias M. R. Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1982, v. 33, p. 471.
29. *El-Sayed M. A. In: Methods in Enzymology*, v. 88, Biomembranes; N. Y.: Acad. Press, 1982, p. 617.
30. *Asher S. A. In Methods in Enzymology*, v. 76, Hemoglobins, N. Y.: Acad. Press, 1981, p. 371.
31. *Lewis A. In Methods in Enzymology*, v. 88, Biomembranes, N. Y.: Acad. Press, 1982, p. 561.
32. *Flavins and Flavoproteins*, Ed. by Kamin H. L.: Butterworth, 1971.
33. *Flavins and Flavoproteins*/Ed. by Singer T. P. Amsterdam: Elsevier, 1976.
34. *Flavins and Flavoproteins*, Devel. Biochem. v. 21/Ed. by Massey V., Williams C. H., North Holland: Elsevier, 1982.
35. *Smith W. W., Burnett R. M., Darling G. D., Ludwig M. L. J. Mol. Biol.*, 1977, v. 117, p. 195.
36. *Pai E. F., Schulz G. E. См. [34]*, p. 3.
37. *Schulz G. E., Schrimmer R. H., Pai E. F. J. Mol. Biol.*, 1982, v. 160, p. 287.
38. *Dagley S. Quart. Rev. Biophys.*, 1978, v. 11, p. 577.
39. *Peck H. D., Bramlett R. N. См. [34]*, p. 851.
40. *Merrill A., Shapiro G., McCormick D. W. in [34]*, p. 402.
41. *Ohishi N., Ohkawa H., Yagi K. Biochem. Int.*, 1981, v. 3, p. 213.
42. *Rivlin R., Pinto Y., Ping Huang, Peliccion N. См. [34]*, p. 415.
43. *Massey V., Hemmerich P. Biochem. Soc. Trans.*, 1980, v. 8, p. 246.
44. *Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. J. Bacteriol.*, 1979, v. 140, p. 20.
45. *Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. Biochemistry*, 1978, v. 17, p. 4583.
46. *Decker K. См. [34]*, p. 465.
47. *Mayhew S. G., Ludwig M. L. In: The Enzymes*/Ed. by Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1975, p. 421.
48. *Hoofsteenge J., Vereijken J. M., Weijer W. J., Beintema J. J., Wierenga R. K., Drenth J. Europ. J. Biochem.*, 1980, v. 113, p. 141.
49. *Massey V., Hemmerich P. См. [34]*, p. 83.
50. *Dixon D. A., Lindner D. L., Branchaud B., Lipscomb W. N. Biochemistry*, 1979, v. 18, p. 5770.
51. *Ludwig M. L., Burnett R. M., Darling G. D., Jordan S. R., Kendall D. S., Smith W. W. См. [47]*, p. 393.
52. *Eriksson L. E. G., Ehrenberg A. Biochim. Biophys. Acta*, 1973, v. 295, p. 57.
53. *Palmer G., Massey V. In Biological Oxidation*/Ed. by Singer T. P. N. Y.: Intersci. p. 239.
54. *Sun M., Moore T. A., Song P.-S. J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, v. 94, p. 1730.
55. *Eaton W. A., Hofrichter J., Makinen M. W., Anderson R. D., Ludwig M. L. Biochemistry*, 1975, v. 14, p. 2146.
56. *Muller F., Moonen Ch. См. [34]*, p. 517.
57. *Dutta P. K., Nestor J. R., Spiro T. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 4146.
58. *Dutta P. K., Nestor J. R., Spiro T. G. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978, v. 83, p. 209.
59. *Dutta P. K., Spiro T. G. J. Chem. Phys.*, 1978, v. 69, p. 3119.
60. *Lynch R. T., Lotem H., Bloembergen N. Ibid.*, 1977, v. 66, p. 4250.
61. *Nishina Y., Kitagawa T., Shiga K., Horiike K., Matsumura Y., Yamano Y. J. Biochem. (Tokyo)*, 1978, v. 84, p. 925.
62. *Tsuboi M. Proc. Int. Conf. Raman Spectrosc.*, V, 1976, p. 135.
63. *Nishimura Y., Tsuboi M. Chem. Phys. Letters*, 1978, v. 59, p. 210.
64. *Schmidt J., Coudron Ph., Thompson A. W., Watters K., McFarland J. Biochemistry*, 1983, v. 22, p. 76.
65. *Schopfer L. M., Haushalter J. P., Smith M., Milad M., Morris M. D. Ibid.*, 1981, v. 20, p. 6734.
66. *Irvin R. M., Visser A., Lee J., Carreira L. Ibid.*, 1980, v. 19, p. 4639.
67. *Kitagawa T., Nishina Y., Kyogoku Y., Yamann T., Ohishi N., Takai A., Yagi K. Ibid.*, 1979, v. 18, p. 1804.
68. *Bowman W. D., Spiro T. G. Ibid.*, 1981, v. 20, p. 3313.
69. *Bowman W. D., Spiro T. G. J. Chem. Phys.*, 1980, v. 73, p. 5482.
70. *Nishina Y., Shiga K., Horiike K., Tojo H., Kasai S., Yanase K., Matsui K., Watari H., Yamano T. J. Biochem. (Tokyo)*, 1980, v. 88, p. 403.
71. *Dutta P. K., Spencer R., Walsh C., Spiro T. G. Biochim. Biophys. Acta*, 1980, v. 623, p. 77.
72. *Lord R. C., Thomas G. J. Spectrochim. Acta*, 1967, v. 23 A, p. 2551.
73. *Yagi K., Ohishi N., Nishimoto K., Choi J., Song P. Biochemistry*, 1980, v. 19, p. 1553.
74. *Nishimoto K., Watanabe Y., Yagi K. Biochim. Biophys. Acta*, 1978, v. 526, p. 34.
75. *Fox J. L., Heumann H. Cm. [34]*, p. 500.
76. *Watenpaugh K. D., Sieker L. C., Jensen L. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, p. 3857.
77. *D'Anna J. A., Tollin G. Biochemistry*, 1972, v. 11, p. 1073.
78. *Dutta P. K., Spiro T. G. Biochemistry*, 1980, v. 19, p. 1590.

79. Burnett R. M., Darling G. D., Kendall D. S., Le Quesne M. E., Mayhew S. G., Smith W. W., Ludwig M. L. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 4383.
80. Eriksson L. E. G., Ehrenberg A. Biochim Biophys. Acta, 1973, v. 295, p. 57.
81. Edmondson D. E., Tollin G. Biochemistry, 1971, v. 10, p. 113.
82. Nishina Y., Shiga K., Horiike K., Tojo H., Kasai S., Matsui K., Watari H., Yamano T. J. Biochem. (Tokyo), 1980, v. 88, p. 411.
83. Benecky M. J., Copeland R. A., Spiro T. G. Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 760, p. 163.
84. Kitagawa T., Sakamoto H., Sugiyama T., Yamano T. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 12075.
85. Nishina Y., Shiga K., Watari H., Miura R., Miyake Y., Tojo H., Yamano T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, v. 106, p. 818.
86. Miura R., Nishina Y., Ohta M., Tojo H., Shiga K., Watari H., Yamano T., Miyake Y. Ibid., 1983, v. 111, p. 588.
87. Miura R., Nishina Y., Shiga K., Tojo H., Watari H., Miyake Y., Yamano T. J. Biochem. (Tokyo), 1982, v. 91, p. 837.
88. Nishina Y., Shiga K., Miura R., Tojo H., Ohta M., Miyake Y., Yamano T., Watari H. Ibid., 1983, v. 94, p. 1979.
89. Massey V., Ghisla S. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, v. 227, p. 446.
90. Abramovitz A. S., Massey V. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 5321.
91. Kitagawa T. K., Nishina Y., Shiga K., Watari H., Matsumura Y., Yamano T. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, p. 3376.
92. Nishina Y., Kitagawa T., Shiga K., Watari H., Yamano T. J. Biochem. (Tokyo), 1980, v. 87, p. 831.
93. Benecky M., Li T. Y., Schmidt J., Frerman F., Walters K. L., McFarland J., Biochemistry, 1979, v. 18, p. 3471.
94. Schmidt J., McFarland J. Cm. [34], p. 627.
95. Dixon D. A., Lindner D. L., Branchaud B., Lipscomb W. N. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 5770.
96. Nishina R., Shiga K., Tojo H., Miura R., Yamano T., Watari H. Cm. [34], p. 550.
97. Miura R., Nishina Y., Shiga K., Tojo H., Watari H., Miyake Y., Yamano T. Cm. [34], p. 179.
98. Sakamoto H., Kitagawa T., Sugiyama T., Miyake Y., Yamano T. Cm. [34], p. 684.
99. Bray R. S. Cm. [34], p. 775.
100. Benecky M., Yu T.-J., Watters K. L., McFarland J. T. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 626, p. 197.
101. Benecky M. J., Dowling M. G., Clarke M. J., Spiro T. G. Inorg. Chem., 1984, v. 23, p. 865.
102. Schmidt J., Beckmann J., Frerman F., McFarland J. T. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1983, v. 113, p. 784.
103. Schmidt J., Lee M.-Y., McFarland J. T. Arch. Biochem. Biophys., 1982, v. 215, p. 22.
104. Schopfer L. M., Morris M. D. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 4932.
105. Massey V., Ghisla S., Moore E. G. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 9640.
106. Sarma R. H., Daunies P., Kaplan N. D. Biochemistry, 1968, v. 7, p. 4359.
107. Voet D., Rich A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, p. 1151.
108. Labeyrie F. Cm. [34], p. 823.
109. Fukumori Y., Yamanaka T. J. Biochem. (Tokyo), 1979, v. 85, p. 1405.
110. Kenney W. C., Singer T. P. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 4767.
111. Strekas T. C. Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 446, p. 179.
112. Ondrias M. R., Findsen E. W., Leroi G. E., Babcock G. T. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 1723.
113. Kitagawa T., Fukumori Y., Yamanaka T. Ibid., 1980, v. 19, p. 5721.
114. Lanir A., Yu N. T., Felton R. H. Ibid., 1979, v. 18, p. 1656.
115. Kitagawa T., Kyogoku Y., Iizuka T., Ikeda-Saito M., Yamanaka T. J. Biochem. (Tokyo), 1975, v. 78, p. 719.