



УДК 577.152.1+577.112.854

## КАТАЛИТИЧЕСКАЯ ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ФЕРРИТИНА ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩЕГО КРИСТАЛЛИТА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ И ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ГЕПТАНЕ

© 1999 г. Г. С. Арапова, А. Н. Еремин, Д. И. Метелица\*

Институт биоорганической химии НАН Белоруссии, 220141, Минск, ул. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 03.06.98 г. Принята к печати 21.10.98 г.

Проведено сравнительное исследование каталитических свойств выделенного из ферритина селезенки лошади железосодержащего кластера ( $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита) и цельного ферритина в реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) пероксидом водорода в ацетатном буфере, содержащем 10% DMF, и в обращенных мицеллах аэрозоля ОТ (АОТ) в гептане. В водной среде каталитическая активность ферритина во много раз выше, чем активность  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера, что подтверждает важнейшую роль апоферритина в реализации пероксидазной функции этого биокатализатора. В мицеллах АОТ в гептане активности  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита и цельного ферритина соизмеримы и в существенной степени определяются степенью гидратации мицелл  $W_0$ . Зависимости начальной скорости окисления ТМВ от  $W_0$  характеризуются одним максимумом при  $W_0$  35 для  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита и тремя максимумами при  $W_0$  10, 20 и 40 для цельного ферритина. Обсуждена роль  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита в координации и активации  $\text{H}_2\text{O}_2$  и возможная роль апоферритина в связывании и ориентации ТМВ вблизи активных  $\text{Fe}^{3+}$ -содержащих центров ферритина.

*Ключевые слова:* ферритин;  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллит ферритина, каталитическая активность; 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; пероксид водорода; обращенные мицеллы.

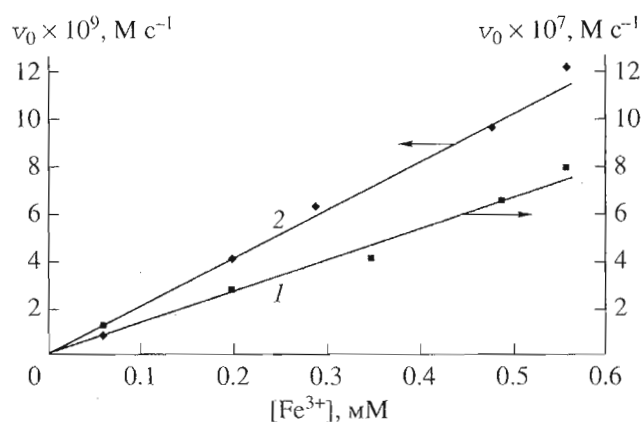
Водорастворимый, содержащий железо белок – ферритин широко распространен в животном и растительном мире [1–5]. Молекула ферритина имеет внешний диаметр 120–130 Å и внутреннюю полость диаметром 70–80 Å, заполненную кристаллитом железа среднего состава  $(\text{FeOOH})_8(\text{FeO}(\text{PO}_3\text{H}_2))$  [1, 2, 6]. К настоящему времени наиболее полно изучены ферритины из селезенки лошади и человека [1, 2, 5]. В зависимости от природного источника молекулярная масса апоферритина меняется в пределах 430–490 кДа [2]. Апоферритин состоит из 24 субъединиц разного состава: Н-субъединицы имеют молекулярную массу ~21 кДа, а L-субъединицы – ~19 кДа [7]. Главная функция ферритинов состоит в запасании ионов  $\text{Fe}^{3+}$ , максимальное содержание которых может составлять до 4500 на одну молекулу ферритина; однако белок, как правило, не насыщается железом полностью, а содержит обычно 1500–2000 и менее ионов железа [1–4, 8]. В насто-

ящее время считается, что молекула ферритина имеет между субъединицами 6 каналов, внешний диаметр которых ~17–20, а внутренний – ~9–12 Å, что позволяет ионам  $\text{Fe}^{2+}$  свободно проникать внутрь полости ферритина, где они окисляются молекулярным кислородом до  $\text{Fe}^{3+}$  и превращаются в оксогидроксикомплексы, в виде которых сохраняются [2]. Ионы железа покидают внутреннюю полость ферритина только после их восстановления до  $\text{Fe}^{2+}$ .

Долгое время считали, что единственная функция ферритина состоит в запасании ионов железа в живом организме, его хранении и транспорте с участием другого белка – гемосидерина – для обеспечения биосинтеза гемсодержащих белков [9]. Однако в последнее время показано, ферритин может быть биокатализатором важных окислительно-восстановительных процессов: ферритин ускоряет дисмутацию ионов  $\text{O}_2^-$  до  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2$ , т.е. обладает супероксиддисмутазной активностью [10, 11]. Апоферритин в значительной степени ускоряет окисление ионов  $\text{Fe}^{2+}$  молекулярным кислородом до  $\text{Fe}^{3+}$  с участием аминокислотных остатков Н-субъединиц [12, 13], т.е. проявляет феррокси-

Сокращения: АОТ – аэрозоль ОТ или натриевая соль ди-(2-этилгексилэпокси)эфира сульфоянтарной кислоты; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФЕРР – ферритин из селезенки лошади.

\* Автор для переписки (факс: (0172) 63-72-74; e-mail: ibochbel@ns.igs.ac.by).



**Рис. 1.** Зависимости скорости окисления ТМВ (3.0 мМ) пероксидом водорода (50 мМ) при 20°C в буфере А (см. "Эксперимент. часть"), содержащем 10% DMF, от концентрации ионов Fe<sup>3+</sup> при катализе реакции ферритином (1) и его Fe<sup>3+</sup>-кристаллитом (2).

дазную активность, эффективность которой в терминах  $k_{cat}/K_m$  равна  $9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [12].

В нашей лаборатории впервые показано, что ферритин селезенки человека проявляет пероксидазные свойства и эффективно окисляет типичный субстрат пероксидазы – орто-дианизидин в присутствии пербората натрия как окислителя [14]. Совсем недавно мы показали, что ферритин селезенки лошади в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или гидропероксидов кумила и трет-бутила еще более эффективно окисляет многие ароматические амины – бензидин, орто-толидин, орто-фенилендиамин и тетраметилбензидин (ТМВ) [15, 16].

Механизм действия ферритина как биокатализатора представляет большой интерес, в особенности возможная роль его апобелка в процессе окислительно-восстановительного катализа. Недавно мы показали, что пероксидазная активность ферритина в окислении ТМВ сильно зависит от состояния апоферритина, на который воздействовали термически, заряженными поверхностно-активными веществами и диметилформамидом, сильно изменяющим вторичную структуру апоферритина [17].

Известно, что в физиологических условиях ферритин чаще всего функционирует не в изолированном состоянии, а в гликозилированной форме или даже мембранно-связанном виде [18, 19]. С другой стороны, учитывая строение и размеры ферритина [1, 2, 6], его можно рассматривать как мицеллоподобную структуру, в которой субъединицы апоферритина окружают железосодержащий кристаллит. Так как многие свойства биологических мембран удачно имитируются обращенными мицеллами ПАВ в органических растворителях, которые можно рассматривать как модели биомембран [20–22], мы изучили катали-

тические пероксидазные свойства ферритина в обращенных мицеллах аэрозоля ОТ в гептане и показали, что в сочетании с органическими гидропероксидами ферритин проявляет относительно высокую пероксидазную активность в окислении орто-фенилендиамин и ТМВ [23]. С использованием обращенных мицелл АОТ в гептане, содержащих солюбилизированный ими ферритин, нами разработан оригинальный способ выделения железосодержащего кристаллита ферритина (Fe<sup>3+</sup>-кристаллит) без предварительного восстановления ионов железа [23] и с полным удалением субъединиц апоферритина. Это открыло возможность корректного сравнения пероксидазной активности цельного ферритина и его Fe<sup>3+</sup>-кластера, что, как мы считаем, является важным шагом в понимании роли Fe<sup>3+</sup>-кристаллита и апоферритина в реализации пероксидазной функции этого белка.

Цель настоящей работы – сравнение количественных характеристик пероксидазной активности выделенного из ферритина Fe<sup>3+</sup>-кристаллита и цельного ферритина в окислении тетраметилбензидина пероксидом водорода в 0.1 М ацетатном буфере, pH 4.2 и в обращенных мицеллах АОТ в гептане. Важно подчеркнуть, что для количественной характеристики пероксидазной активности в обоих случаях использован обычный инструментальный ферментативной кинетики – каталитические константы  $k_{cat}$ , константы Михаэлиса  $K_m$  и их отношения  $k_{cat}/K_m$ , однако  $k_{cat}$  и отношения  $k_{cat}/K_m$  были условно определены в расчете на один ион Fe<sup>3+</sup> цельного ферритина или Fe<sup>3+</sup>-кристаллита, так как нам не известно общее содержание каталитических активных Fe<sup>3+</sup>-центров в кристаллите или цельном ферритине. Совершенно очевидно, что из всех ионов Fe<sup>3+</sup> в ферритине или его железосодержащем кластере лишь небольшая их часть активно участвует в катализе окисления ТМВ пероксидом водорода, поэтому величины  $k_{cat}$  и  $k_{cat}/K_m$  носят эффективный характер и сильно занижены по сравнению с истинными характеристиками каталитической активности ферритина и его Fe<sup>3+</sup>-кристаллита.

**Окисление ТМВ пероксидом водорода в 0.1 М ацетатном буфере, pH 4.2 с участием Fe<sup>3+</sup>-кристаллита ферритина.** Из зависимостей начальной скорости окисления ТМВ от начальной концентрации ферритина и Fe<sup>3+</sup>-кристаллита виден (рис. 1) первый порядок реакции по концентрации катализатора, однако скорость реакции с участием Fe<sup>3+</sup>-кристаллита почти на два порядка ниже, чем при участии цельного ферритина.

Таким образом, уже на первом этапе исследования стало ясно, что пероксидазная активность ферритина в водном растворе сильно зависит от апобелка. Зависимости начальной скорости окис-

**Таблица 1.** Кинетические параметры\* окисления ТМВ пероксидом водорода в обращенных мицеллах АОТ (0.2 М) в гептане с разной степенью гидратации ( $W_0$ ) и в 0.1 М ацетатном буфере, рН 4.2 (АЦБ) с участием ферритина (0.3 мкМ или 0.435 мМ  $Fe^{3+}$ ) и  $Fe^{3+}$ -кристаллита (0.145 мМ  $Fe^{3+}$ )

$W_0$	Ферритин			$Fe^{3+}$ -кристаллит (КР)			$\frac{(k_{cat}/K_m)_{ФЕРР}}{(k_{cat}/K_m)_{КР}}$	$\frac{(k_{cat})_{ФЕРР}}{(k_{cat})_{КР}}$
	$k_{cat} \times 10^4, c^{-1}$	$K_m, мМ$	$(k_{cat}/K_m) \times 10^3, M^{-1} c^{-1}$	$k_{cat} \times 10^4, c^{-1}$	$K_m, мМ$	$(k_{cat}/K_m) \times 10^3, M^{-1} c^{-1}$		
20	1.34	3.50	31	1.56	5.55	28	1.10	0.85
35				6.27	5.56	112		
40	0.98	1.90	51	1.80	2.50	72	0.71	0.54
АЦБ	11.51	3.40	338	0.52	77.0	0.67	504.4	22.13

\* Все кинетические параметры получены при 20°C из зависимостей начальной скорости окисления ТМВ от начальной концентрации  $H_2O_2$  в расчете на 1 г-атом  $Fe^{3+}$ .

**Таблица 2.** Кинетические характеристики\* окисления ТМВ пероксидом водорода с участием ферритина (0.1 мкМ) и его  $Fe^{3+}$ -кластера: 20°C, 0.1 М ацетатный буфер, рН 4.2, содержащий 10% диметилформамида

Катализатор	$[Fe^{3+}], мМ$	$k_{cat} \times 10^4, c^{-1}$	$K_m, мМ$	$(k_{cat}/K_m) \times 10^3, M^{-1} c^{-1}$
Ферритин	0.145	23.0	1.18	1940
$Fe^{3+}$ -кристаллит	0.240	0.3	2.27	13
Отношения: ФЕРР/КР	0.60	76.6	0.52	150

\* Кинетические параметры получены из зависимостей начальной скорости окисления ТМВ от начальной концентрации ТМВ в расчете на 1 г-атом  $Fe^{3+}$ .

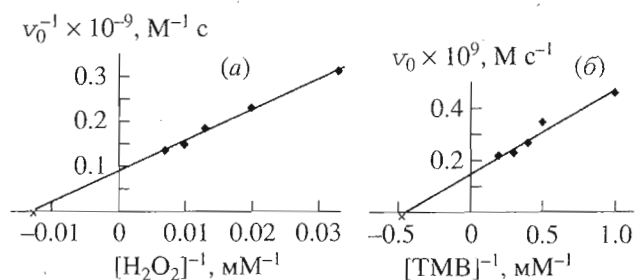
ления ТМВ в присутствии  $Fe^{3+}$ -кристаллита от начальной концентрации  $H_2O_2$  и от начальной концентрации субстрата описываются уравнением Михаэлиса–Ментен (рис. 2). По данным рис. 2 вычислены эффективные величины  $k_{cat}$  и  $K_m$ , приведенные в табл. 1. Таким образом, процесс окисления ТМВ пероксидом водорода; катализируемый  $Fe^{3+}$ -кристаллитом в водном растворе, формально подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен, т.е. имеет признаки ферментативной реакции.

Сравнение кинетических параметров, полученных из зависимостей  $v_0/[H_2O_2]_0$  в водной среде для  $Fe^{3+}$ -кристаллита и цельного ферритина (табл. 1), показывает, что отношение каталитических констант в окислении ТМВ около 22 в пользу цельного ферритина, а отношение эффективностей катализаторов в окислении ТМВ, выраженное в терминах  $k_{cat}/K_m$ , равняется ~500, т.е. пероксидазная активность цельного ферритина в водной среде во много раз превышает активность выделенного из ферритина  $Fe^{3+}$ -кластера.

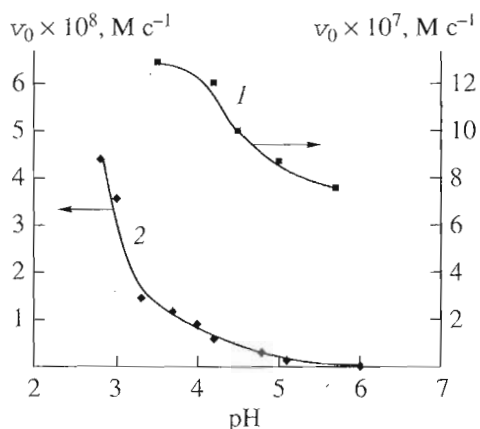
В табл. 2 проведено сравнение кинетических характеристик ферритина и  $Fe^{3+}$ -кристаллита, полученных из зависимостей  $v_0/[ТМВ]_0$  в буферном растворе. В этом случае отношение каталитических констант составляет ~76, а отношение эффективностей биокатализаторов 150 в пользу цельного ферритина. Кинетические параметры  $k_{cat}$ ,  $K_m$  и их отношения, полученные в двух сериях экспериментов (ср. табл. 1 и 2), различаются между собой, что связано с двумя маршрутами расхо-

дования пероксида водорода: окислитель расходует продуктивно на трансформацию ТМВ и непродуктивно, распадаясь на радикалы, окисляющие цельный ферритин и разрушающие его структуру. При увеличении концентрации пероксида водорода второй непродуктивный путь его расходования становится преобладающим; по этой причине  $k_{cat}$  и  $K_m$  в двух сериях экспериментов с участием ферритина не могут совпадать в принципе. Аналогичная картина наблюдается при пероксидазном окислении ТМВ и других ароматических аминов [24].

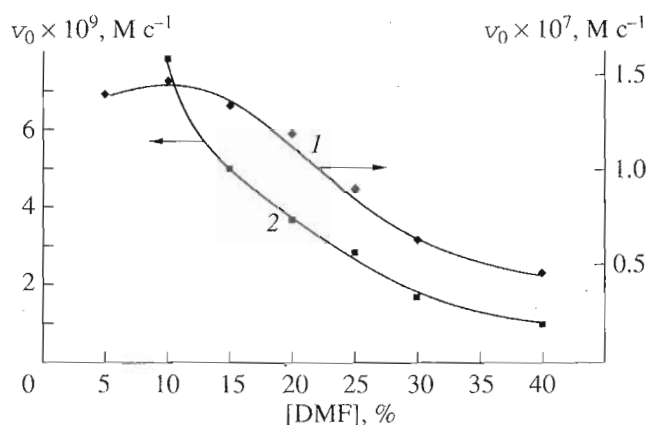
Из сравнения зависимостей начальной скорости окисления ТМВ пероксидом водорода от зна-



**Рис. 2.** Зависимости скорости реакции окисления ТМВ пероксидом водорода при участии  $Fe^{3+}$ -кристаллита от концентрации  $H_2O_2$  (а) и ТМВ (б) в обратных координатах. Условия определения: см. рис. 1;  $[Fe^{3+}] = 0.24 мМ$ ; (а):  $[ТМВ] = 3.0 мМ$ , (б):  $[H_2O_2] = 50 мМ$ .



**Рис. 3.** Зависимости начальной скорости окисления ТМВ (3.0 мМ) пероксидом водорода от величины рН 0.1 М ацетатного буфера, содержащего 10% DMF, при участии 1 мкМ ферритина (1) и  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита (0.27 мМ по  $\text{Fe}^{3+}$ ) (2).  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 25$  (1) и 50 мМ (2).



**Рис. 4.** Зависимости начальной скорости окисления ТМВ пероксидом водорода в ацетатном буфере, рН 4.2 от содержания DMF с участием 0.5 мкМ ферритина (1) и  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита (0.30 мМ по  $\text{Fe}^{3+}$ ) (2). Условия определения: 1 – 0.02 М буфер, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5.0 мМ ТМВ; 2 – 0.1 М буфер, 50 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3.0 мМ ТМВ.

чений рН водного раствора для ферритина и его  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера (рис. 3, кривые 1 и 2) видно, что в обоих случаях скорость реакции возрастает с уменьшением рН, что можно связать с появлением новых координационных вакансий в железосодержащем кластере в кислой среде, как показано нами ранее [15, 16]. По этим свободным местам координируется пероксид водорода, что является первым неизменным условием активации окислителя [15–17]. Из рис. 3 следует, что роль рН сводится, в первую очередь, к воздействию возрастающей концентрации ионов  $\text{H}^+$  на  $\text{Fe}^{3+}$ -кластер как в составе ферритина, так и в изолированном состоянии, хотя изменение рН естественно влияет также на апоферритин в цельном биокатализаторе.

На рис. 4 показано влияние возрастающего содержания DMF на начальные скорости окисления ТМВ в водном растворе в присутствии ферритина (1) или  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера (2): начиная с 10% DMF характер снижения скорости реакции с ростом содержания органического соразтворителя в обоих случаях совершенно одинаков. Тормозящее действие DMF на окисление ТМВ связано с акцептированием активных свободных радикалов, окисляющих субстрат: константа скорости взаимодействия DMF с радикалами  $\text{HO}^\cdot$  при рН 5.5 равна  $1.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , т.е. близка к частоте соударений в растворе при комнатной температуре [25]. Как показано нами ранее, растущие концентрации DMF влияют на четвертичную и вторичную структуру цельного ферритина [17], что также сказывается на его каталитической активности. Введение в водный раствор SDS в концентрациях 30–150 мкМ снижает скорости окисления ТМВ пероксидом водорода с участием ферритина и  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера в  $\sim 2$  раза, что скорее всего связано с образованием прямых мицелл, включающих труднорастворимый в воде ТМВ в их гидрофобную внутреннюю полость и, таким образом, снижающих доступность субстрата для окисляющих агентов.

**Окисление ТМВ пероксидом водорода с участием  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита ферритина в обращенных мицеллах АОТ в гептане с разной степенью гидратации.** На рис. 5а показана зависимость в обратных координатах начальной скорости окисления ТМВ от концентрации пероксида водорода при участии  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита и при степени гидратации мицелл АОТ, равной 35. Аналогичные зависимости получены для значений  $W_0$  20 и 40. Во всех случаях вычислены кинетические параметры окисления ТМВ в обращенных мицеллах АОТ в гептане, приведенные в табл. 1. На рис. 5б представлены зависимости начальной скорости окисления ТМВ пероксидом водорода с участием  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита в среде мицелл АОТ с разной степенью гидратации от концентрации ТМВ: во всех случаях наблюдается четко выраженный первый порядок реакции по восстанавливаемому субстрату, а насыщение не наблюдается несмотря на широкий интервал концентраций ТМВ от 5 до 120 мМ, т.е. комплексообразование ТМВ с катализатором кинетически не проявляется в отличие от процесса с участием цельного ферритина [15, 16].

Как видно из табл. 1, в водной среде каталитическая активность цельного ферритина многократно выше, чем активность кластера в окислении одного и того же субстрата, т.е. апоферритин несомненно участвует в биокатализе. Его возможная роль в реализации пероксидазной функции ферритина сводится к взаимодействию с субстратом (ТМВ), в то время как  $\text{H}_2\text{O}_2$  координируется по

вакантным местам активных ионов  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера вблизи к связанному восстанавливающему субстрату в одном из каналов цельного ферритина. Выделение  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера из ферритина сопровождается разрушением связей апобелка с поверхностью кластера и нарушением ориентации ТМВ по отношению к активным центрам, что приводит к резкому падению активности кластера в окислении ТМВ в водной среде.

В отличие от водной среды в мицеллярной системе каталитические характеристики  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера и цельного ферритина вполне сопоставимы при  $W_0$  20, а при увеличении степени гидратации до 40 ферритин даже проигрывает  $\text{Fe}^{3+}$ -кластеру по своей активности. Максимальная каталитическая активность  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера наблюдается при степени гидратации мицелл, равной 35 (рис. 6).

С повышением температуры до 40–50°C становится весьма значительным окисление ТМВ в мицеллах АОТ в гептане при отсутствии  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера за счет каталитического влияния поверхности мицелл на окислитель –  $\text{H}_2\text{O}_2$ , который заметно активируется, как и органические гидропероксиды в тех же мицеллах АОТ в гептане, что было установлено нами ранее [26].

Ключевую роль в модуляции реакционной способности биокатализаторов, солюбилизированных обращенными мицеллами ПАВ в органических растворителях, играет степень гидратации мицелл  $W_0$  [20–22, 27–33]. Из рис. 6 видно, что окисление ТМВ пероксидом водорода в обращенных мицеллах АОТ в гептане при участии  $\text{Fe}^{3+}$ -кластера имеет один четко выраженный максимум (1, 2), в то время как в случае цельного ферритина проявляются три максимума активности, соответствующие степеням гидратации мицелл 10, 20 и 40 (3).

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что, как правило, определенному максимуму на зависимостях  $v_0/W_0$  соответствует строго определенная форма биокатализатора (фермента), размер которого равен или близок к размеру мицелл, определяемому значением  $W_0$  в точке максимума [20, 22, 27–33]. При таком подходе с каждым из максимумов на рис. 6 можно соотнести частицу определенного размера, так как между размерами мицелл АОТ и степенью их гидратации установлена эмпирическая связь [34]:  $r_m$  (Å) = 4 + 1.5  $W_0$  (1).

В соответствии с уравнением (1) экспериментально полученным степеням гидратации мицелл АОТ, солюбилизировавших ферритин, в точках максимума должны соответствовать приведенные ниже радиусы мицелл (или включенных в них частиц): 19 (для  $W_0 = 10$ ), 34 (для  $W_0 = 20$ ) и 64 Å (для  $W_0 = 40$ ).

Вычисленные по уравнению (1) радиусы обращенных мицелл АСТГ соответствуют размерам

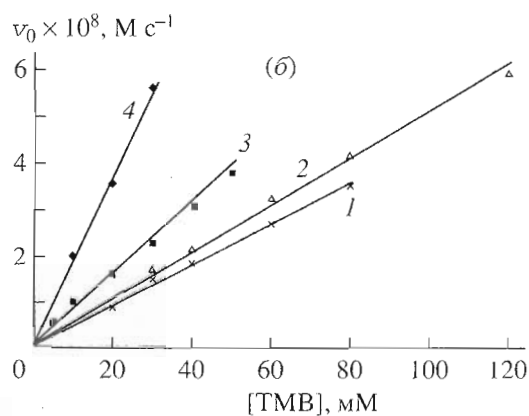
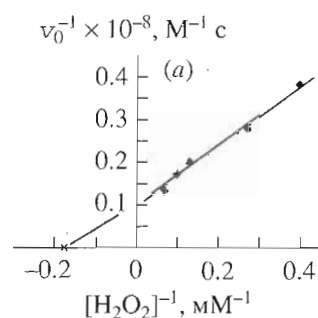


Рис. 5. Зависимости начальной скорости окисления ТМВ пероксидом водорода с участием  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а) и от начальной концентрации ТМВ (б) в обращенных мицеллах 0.2 М АОТ в гептане. Условия определения:  $[\text{Fe}^{3+}] = 0.145$  мМ; (а):  $[\text{ТМВ}] = 3.0$  мМ,  $W_0$  35; (б):  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10$  мМ,  $W_0 = 20$  (1), 40 (2), 30 (3), 35 (4).

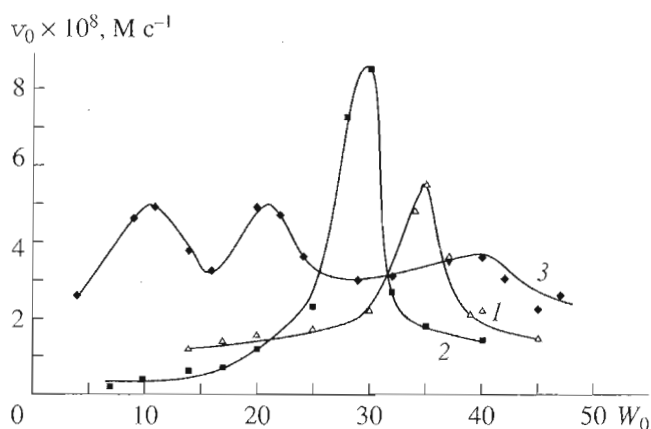


Рис. 6. Влияние степени гидратации обращенных мицелл 0.2 М АОТ в гептане на начальную скорость окисления ТМВ (3.0 мМ) пероксидом водорода с участием  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита (0.145 мМ по  $\text{Fe}^{3+}$ ) (1, 2) и 0.3 мкМ ферритина (3). Условия определения: буфер А, 2.2% DMF, 10 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1, 2); кристаллит после выделения выдержан в воде в течение 3 сут; 0.1 М ацетатный буфер, pH 4.0, 2.2% DMF, 20 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3).

следующих возможных частиц: 64 Å – цельной молекуле ферритина ( $r = 61\text{--}62.5$  Å [1–3]), 34 Å – железосодержащему кластеру ферритина ( $r = 35\text{--}36$  Å) и 19 Å – одной из субъединиц ферритина (17–20 Å). Проведенное сопоставление не оставляет сомнений, что третий максимум на зависимости 3 (рис. 6) соотносится с цельной молекулой ферритина. Как показано нами ранее, субстрат-восстановитель влиял на величину этого максимума [23]. В случае водорастворимого *орто*-фенилендиамина максимум при  $W_0$  40 больше по величине, чем максимумы при  $W_0$  10 и 20 [23], но для ТМВ – третий максимум меньше первых двух (рис. 6, кривая 3). Это свидетельствует о влиянии субстратов на профиль зависимостей  $v_0/W_0$ . По-видимому, при  $W_0 = 40$  в ферритинсодержащих мицеллах имеется несвязанная вода, которая влияет на доступность к белку гидрофобного ТМВ, в то время как в случае водорастворимого *орто*-фенилендиамина таких затруднений меньше [23].

Второй максимум на зависимости 3 (рис. 6) может быть связан с  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллитом ферритина. Можно допустить, что при  $W_0 = 20$  из-за отсутствия свободной воды оболочка гидратированного АОТ напрямую контактирует с апоферритином и в этих условиях  $\text{H}_2\text{O}_2$  и ТМВ встречаются меньше препятствий на своем пути к каталитическим центрам ферритина. В обращенных мицеллах АОТ при  $W_0 = 20$  может происходить частичная или полная диссоциация ферритина на субъединицы с освобождением железосодержащего кластера. Однако наши исследования условий диссоциации ферритина в мицеллярной среде исключают значительные нарушения четвертичной структуры апоферритина при 20°C и  $W_0 = 20$ , хотя нельзя полностью исключить, что в этих конкретных условиях некоторые изменения структуры ферритина могут все же происходить [23].

Максимум каталитической активности изолированного  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита в обращенных мицеллах соответствует степени гидратации  $W_0 = 35$  (рис. 6, кривая 1). Отметим, что если выделенный  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллит выдержать в воде, то профиль зависимости  $v_0/W_0$  показывает положение максимума при  $W_0 = 30$ . В этих условиях  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллит связывает воду, которую мы не можем учесть при расчете степени гидратации мицелл АОТ, т.е. при корректном вычислении степени гидратации положение максимума на зависимости 2 может сместиться до первоначального (с 30 на 35). Максимумы при  $W_0 = 20$  у ферритина и  $W_0 = 35$  у кристаллита могут свидетельствовать о разном микроокружении каталитических центров: в случае изолированного  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита его составляют гидратированные полярные фрагменты АОТ, а в случае ферритина – аминокислотные остатки белка.

Экспериментальные данные настоящей работы показали, что в водных растворах при реализации пероксидазной функции ферритина важнейшую роль играет апобелок, так как изолированный  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллит в буферных растворах многократно уступает цельному ферритину в каталитической активности при окислении тетраметилбензидина пероксидом водорода (табл. 1 и 2). В обращенных мицеллах АОТ в гептане каталитическая активность  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита и ферритина в окислении ТМВ сопоставима между собой, в первую очередь, потому что цельный ферритин в мицеллярной системе сильно теряет свою каталитическую способность в окислении ТМВ, проникновение которого внутрь каналов ферритина к каталитическим центрам затруднено.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** Использовали лиофилизированный ферритин из селезенки лошади (Reanal, Венгрия),  $M$  511 кДа [15]. Содержание железа в ферритине и выделенном из него  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллите рассчитывали, используя коэффициент поглощения при длине волны 420 нм  $A_{1\text{см}}^{1\%\text{Fe}}$  100, а концентрацию апоферритина определяли спектрофотометрически, используя коэффициент поглощения при длине волны 280 нм  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  9.0 [8]. Использованный нами ферритин в среднем содержал около 1450 ионов железа на одну молекулу белка, что соответствовало 15.8% по массе.

В качестве субстрата-восстановителя применяли 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Serva, Германия), исходные растворы которого концентрацией 0.1 М готовили в свежеперегнанном диметилформамиде. В качестве окислителя использовали разбавленный пергидроль (Реахим, Россия), определяя концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  спектрофотометрически ( $\epsilon_{230}$  72.4  $\text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$  [35]).

В качестве мицеллообразователей использовали аэрозоль ОТ (АОТ) и SDS (Serva, Германия). Исходный раствор АОТ (0.4 М) готовили в свежеперегнанном гептане. Применяли DMF и гептан, а для приготовления буферных растворов – соли, основания и кислоты (Реахим, Россия).

**Выделение железосодержащего кластера ( $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита) из ферритина.** Готовили 30 мкМ раствор ферритина (15.3 мг/мл) в бидистиллированной воде и выдерживали его в течение 1 сут, затем ферритин солюбилизировали в 0.2 М АОТ в гептане со степенью гидратации  $W_0$  40: микроэмульсия объемом 2 мл содержала 72 мкл исходного раствора ферритина, 216 мкл воды, 712 мкл гептана и 1 мл 0.4 М АОТ в гептане. Микроэмульсию в стеклянной пробирке, плотно закрытой шлифованной пробкой, выдерживали дважды по 5 мин на кипящей водяной бане. На дне

пробирки накапливался оранжевый осадок, а микроэмульсия расслаивалась и обесцвечивалась. Затем смесь центрифугировали (5 мин, 3700 g), супернатант удаляли с помощью водоструйного насоса. К осадку приливали 2.2 мл микроэмульсии, содержащей 316.2 мкл воды, 781 мкл гептана и 0.98 мл 0.4 М АОТ в гептане. Смесь встряхивали до полной солюбилизации кристаллита железа и повторяли еще раз процедуру обработки микроэмульсии на кипящей водяной бане, центрифугировали 5 мин при 3700 g, супернатант удаляли. Осадок дважды промывали 2 мл ацетона и дважды центрифугировали по 15 мин при 3700 g. К осадку прибавляли 2 мл дистиллированной воды (или 0.2 М АОТ в гептане) и суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. Для расчета выхода железа из ферритина сравнивали светопоглощение изолированного  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита и раствора 1.08 мкМ ферритина. В разных случаях выход железа составлял 76–85%.

**Определение каталитической активности  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита в 0.1 М ацетатном буфере, рН 4.2, содержащем 10% DMF.** Реакционная смесь объемом 1.2 мл содержала 240 мкл раствора кристаллита в бидистиллированной воде, 36 мкл 6 мМ ТМВ в DMF, 84 мкл DMF, 708 мкл воды, 120 мкл 1.0 М натрий-ацетатного буфера, рН 4.2 (буфер А) и 12 мкл 6 М  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Реакцию начинали добавлением раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  и вели ее при 20°C в кювете фотоэлектроколориметра КФК-2-УХЛ 4.2 (Россия), следя за увеличением светопоглощения оксидата при длине волны 670 нм. Начальные скорости окисления ТМВ рассчитывали по линейным участкам кинетических зависимостей роста светопоглощения, используя молярный коэффициент поглощения продукта реакции, равный  $39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [16].

**Определение каталитической активности  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита в обращенных мицеллах АОТ в гептане.** Реакционная смесь состояла из тщательно перемешанных при 20°C растворов А и Б. Раствор А объемом 1 мл включал 200 мкл кристаллита в 0.2 М АОТ в гептане, 60 мкл 6 мМ ТМВ в DMF, 400 мкл 0.4 М АОТ в гептане и 340 мкл гептана. Раствор Б объемом 1.2 мл содержал 0.2 М АОТ в гептане, 20 или 40 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1.46 мМ буфера А; конечное содержание DMF составляло 2.2% и учитывалось при расчетах как компонент неполярной фазы мицеллярной системы. Раствор Б (1 мл) добавляли к 1 мл раствора А, считая это началом реакции окисления; реакционную смесь энергично встряхивали 30 с и переносили в термостатируемую кювету фотоэлектроколориметра. Реакцию вели от 3 до 30 мин в зависимости от ее скорости. Поглощение продукта окисления ТМВ регистрировали при длине волны 670 нм. Расчет начальных скоростей окисления ТМВ в мицеллярной системе проводили так же, как в водной среде.

Определение пероксидазной активности цельного ферритина в буфере А с 10% DMF и в обращенных мицеллах 0.2 М АОТ в гептане, включавшем 2.2% DMF, проводили так же, как и в случае  $\text{Fe}^{3+}$ -кристаллита.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харрисон П.М., Хой Т.Г. // Неорганическая биохимия / Ред. Г.М. Эйхгорн. М.: Мир, 1978. Т. 1. С. 300–330.
2. Munro H.N., Linder M.C. // *Physiol. Reviews*. 1978. V. 58. P. 317–396.
3. Theil E.C. // *Ann. Rev. Biochem.* 1987. V. 56. P. 289–315.
4. Worwood M. // *Clinical Science*. 1986. V. 70. P. 215–220.
5. Fontecave M., Pierre J.L. // *Biochimie*. 1993. V. 75. P. 767–773.
6. Treffy A., Harrison P.M., Cleton M.I., de Bruijn W.C. // *J. Inorg. Biochem.* 1987. V. 31. P. 1–6.
7. Bomford A., Conlon-Hollinghead C., Munro H.N. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 948–955.
8. Treffy A., Harrison P.M. // *Biochem. J.* 1978. V. 171. P. 313–320.
9. Уорд Д.Х., Кушнер Дж.П., Каплан Дж. // Современная гематология и онкология / Ред. В.Ф. Фербенкс. М.: Медицина, 1987. С. 11–57.
10. Bolann B.J., Ulvik R.J. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 193. P. 899–904.
11. Bolann B.J., Ulvik R.J. // *FEBS Lett.* 1993. V. 318. P. 149–152.
12. Sun S., Chasteen N.D. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 25160–25166.
13. Levi S., Santambrogio P., Albertini A., Arosio P. // *FEBS Lett.* 1993. V. 336. P. 309–312.
14. Денисов В.Н., Метелица Д.И. // *Биохимия*. 1987. Т. 52. С. 1248–1257.
15. Метелица Д.И., Арапова Г.С. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. С. 308–321.
16. Метелица Д.И., Арапова Г.С., Еремин А.Н. // *Биохимия*. 1997. Т. 62. С. 460–470.
17. Арапова Г.С., Еремин А.Н., Метелица Д.И. // *Биохимия*. 1997. Т. 62. С. 1655–1665.
18. Moroz C., Lahat N., Biniaminov M., Ramot B. // *Clinical and Experim. Immunol.* 1977. V. 29. P. 30–36.
19. Cragg S.J., Hoy T.G., Jacobs A. // *British Journal of Haematology*. 1984. V. 57. P. 679–684.
20. Левашов А.В. // *Итоги науки и техники. Биотехнология*. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112–158.
21. Метелица Д.И., Еремин А.Н. // *Успехи биол. химии*. 1988. Т. 28. С. 145–173.
22. Клячко Н.Л. Регуляция ферментов структурой и природой матрицы в микрогетерогенных системах на основе агрегатов поверхностно-активных веществ: Дис. ... д-ра хим. наук. М.: МГУ, 1990. 223 с.
23. Арапова Г.С., Еремин А.Н., Метелица Д.И. // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 1400–1409

24. Метелица Д.И., Гирина Н.В., Карасева Е.И., Савенкова М.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1995. Т. 31. С. 617–624.
25. Пичаев А.К., Кабакчи С.А. Реакционная способность первичных продуктов радиолиза воды. Справочник. М.: Энергоиздат, 1982. С. 120.
26. Eryomin A.N., Metelitz D.I. // React. Kinet. Catal. Lett. 1985. V. 27. P. 47–51.
27. Клячко Н.Л., Меркер Ш., Вакула С.В., Иванов М.В., Березин И.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. С. 1479–1481.
28. Kabanov A.V., Nametkin S.N., Evtushenko G.N., Chernov N.N., Klyachko N.L., Levashov F.V., Martinek K. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 966. P. 147–152.
29. Артемчик В.Д., Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 293–298.
30. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 410–417.
31. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 45–54.
32. Клячко Н.Л., Угольников А.В., Иванов М.В., Левашов А.В. // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1048–1054.
33. Бурлакова А.А., Курганов Б.И., Чеботарева Н.А., Дебабов В.Р. // Биол. мембраны. 1996. Т. 13. С. 504–511.
34. Eicke H.F., Rehak J. // Helv. Chim. Acta. 1976. V. 59. P. 2883–2891.
35. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Ленинград: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.

## Catalytic Peroxidase-like Activity of an Iron-containing Crystallite Isolated from Ferritin in Aqueous Solution and Reversed Micelles of Aerosol OT in Heptane

G. S. Arapova, A. N. Eryomin, and D. I. Metelitz<sup>#</sup>

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus*

A comparative study of the catalytic activity of an iron-containing cluster ( $\text{Fe}^{3+}$ -crystallite) from horse spleen ferritin and of whole ferritin in the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) by hydrogen peroxide in acetate buffer containing 10% DMFA and in reversed micelles of Aerosol OT (AOT) in heptane was performed. In an aqueous medium, the catalytic activity of ferritin is much higher than that of the  $\text{Fe}^{3+}$ -cluster. This confirms the extremely important role of apoferritin in the peroxidase function of this biocatalyst. In the AOT micelles in heptane, the activities of  $\text{Fe}^{3+}$ -crystallite and whole ferritin are comparable and, to a large extent, determined by the hydration degree of micelles  $W_0$ . The dependences of the initial rates of the oxidation of TMB on  $W_0$  have one maximum at  $W_0$  35 for  $\text{Fe}^{3+}$ -crystallite and three maxima at  $W_0$  10, 20, and 40 for whole ferritin. The role of  $\text{Fe}^{3+}$ -crystallite in coordination and activation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the possible role of apoferritin in binding and orientation of TMB near the active  $\text{Fe}^{3+}$ -containing sites of ferritin are discussed.

*Key words: ferritin,  $\text{Fe}^{3+}$ -crystallite from ferritin, catalytic activity, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, hydrogen peroxide, reversed micelles*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: (0172) 63-7274; e-mail: ibochbel@ns.igs.ac.by.