

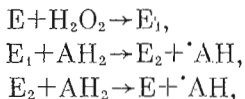


УДК 577.158.52

**ПОЛУЧЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНОГО СОЕДИНЕНИЯ E<sub>1</sub>  
ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ХРЕНА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФЕРМЕНТА  
С N-БРОМСУКЦИНИМИДОМ***Савицкий А. П., Плотицына Е. В., Угарова Н. Н.**Кафедра химической энзимологии Московского государственного  
университета им. М. В. Ломоносова*

Изучено взаимодействие N-бромсукцинимида с пероксидазой из хрена при рН 4,1 и 7,0. На основании спектральных данных и измерения каталитической активности фермента показано, что при рН 4,1 происходит модификация ряда аминокислот белка и деструкция гема, приводящая к потере ферментативной активности. При рН 7,0 в ходе реакции сохраняется каталитическая активность фермента и наблюдается образование промежуточного соединения E<sub>1</sub> пероксидазы, которое в отличие от аналогичного соединения, получаемого при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на фермент, обладает повышенной стабильностью. Обсуждаются причины повышенной стабильности соединения E<sub>1</sub> пероксидазы, получаемого при действии N-бромсукцинимида.

Пероксидаза из хрена — двухсубстратный фермент, катализирующий окисление перекисью водорода различных органических и неорганических веществ, причем в процессе реакции фермент превращается в промежуточные соединения E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub>, где железо имеет степень окисления выше 3 [1]. Механизм действия пероксидазы можно выразить следующей схемой [1]:



где E — нативный фермент; E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> — промежуточные соединения, окисленные формы фермента; AN<sub>2</sub> — субстрат, донор водорода.

Промежуточные соединения E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> имеют характеристичные спектры, вид которых не зависит от природы окисляющего или восстанавливающего агента, используемого для их получения [1—4].

Ранее была показана возможность замены перекиси водорода для пероксидазы из хрена на некоторые другие виды окислителей: HOCl, HOBr, HClO<sub>2</sub>, ClO<sub>2</sub>, KBrO<sub>3</sub>, а также надуксусную кислоту и гидроперекиси алкилов [2—4]. Для цитохром-с-пероксидазы — ближайшего аналога пероксидазы из хрена в качестве окислителя был использован N-бромсукцинимид (NBS), при этом было получено промежуточное соединение фермента, где железо находится в высокоокисленном состоянии [5]. Для ряда ферментов известно, что их обработка N-бромсукцинимидом в определенных условиях приводит к потере ферментативной активности, что связывают с модификацией различных аминокислотных остатков белка [6, 7]. В свете

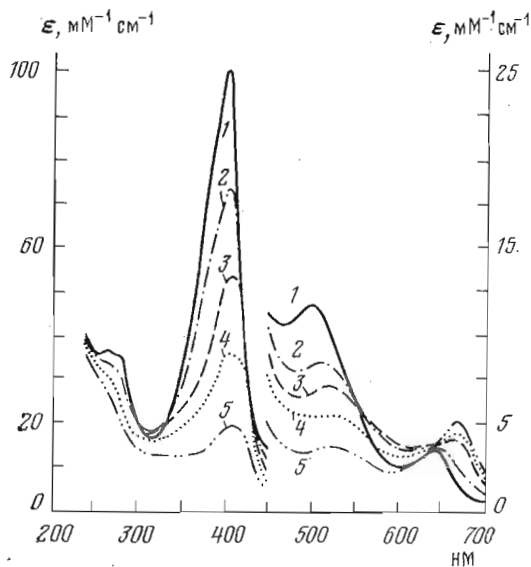


Рис. 1. Спектры поглощения нативной пероксидазы из хрена (1) и Nbs-модифицированного фермента, полученного при соотношении концентраций  $[Nbs]/[E]$ : 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5). Условия: 4 мкМ фермент; 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,4; 20° С; N-бромсукцинимид в переменных количествах

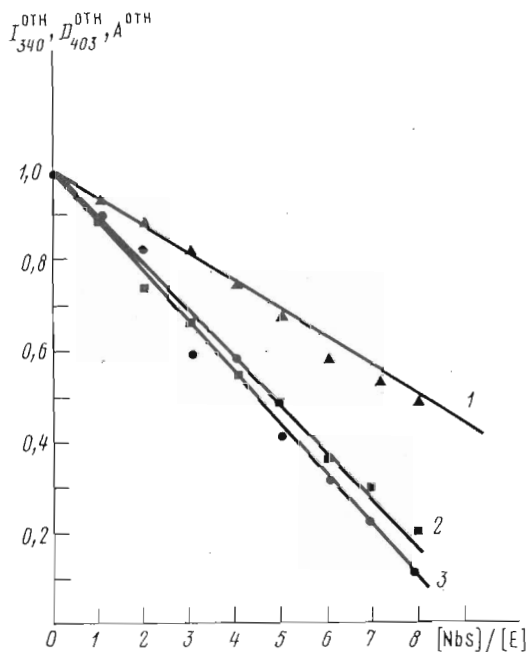


Рис. 2. Относительные изменения интенсивности флуоресценции триптофана при 340 нм (1), поглощения пероксидазы при 403 нм (2) и ее ферментативной активности (3), вызываемые при добавлении N-бромсукцинимида. Условия: см. подпись к рис. 1

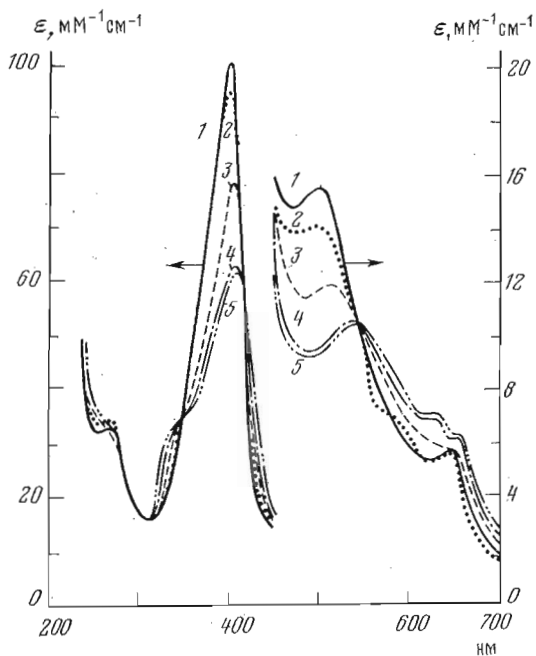


Рис. 3

Рис. 3. Спектр поглощения нативной пероксидазы из хрена (1) и Nbs-модифицированного фермента, полученного при соотношении концентраций  $[Nbs]/[E]$ : 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5). Условия: 4 мкМ фермент; 5 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,0; 20° С; атмосфера аргона

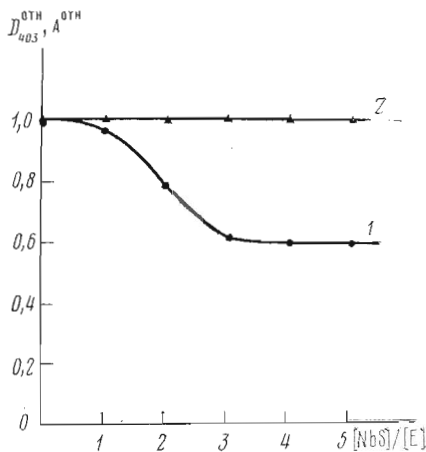


Рис. 4

Рис. 4. Относительные изменения поглощения пероксидазы при 403 нм (1) и ее ферментативной активности (2), вызываемые добавлением N-бромсукцинимида. Условия: см. подпись к рис. 3

изложенных данных представляло интерес исследование взаимодействия N-бромсукцинимида с пероксидазой из хрена.

В литературе предложена методика для окисления N-бромсукцинимидом аминокислотных остатков гемового белка цитохрома с, согласно которой реакцию проводили при pH 4,1 [8]. Добавление N-бромсукцинимида к пероксидазе из хрена при pH 4,1 приводит к модификации фермента, что видно из результатов спектрофотометрического титрования (рис. 1). Значительные изменения в УФ, видимой области спектра и на полосе Soret фермента (уменьшение коэффициента экстинкции на полосе Soret, уменьшение поглощения в УФ-области, уширение полос в видимой области), а также уменьшение интенсивности флуоресценции триптофана при  $\lambda$  340 нм свидетельствуют о модификации белковой части молекулы, а также о разрушении гема (рис. 2). Ферментативная активность модифицированной в данных условиях пероксидазы падает в 10 раз при добавлении восьмикратного избытка N-бромсукцинимида. Столь значительные наблюдаемые изменения спектральных характеристик и активности пероксидазы связаны, по-видимому, с частичным разворачиванием белковой глобулы при pH 4,1, что способствует модификации N-бромсукцинимидом различных групп белка и гема.

При pH 7,0 N-бромсукцинимид более избирательно действует на пероксидазу. Спектральные изменения заканчиваются при добавлении трехкратного избытка модификатора по отношению к ферменту, что свидетельствует об окончании модификации в области гема (рис. 3). Ферментативная активность по перекиси водорода и *o*-данизидину не изменяется в ходе модификации пероксидазы N-бромсукцинимидом (рис. 4). До-

**Положения максимумов в спектрах поглощения и значения коэффициентов экстинкции пероксидазы и ее производных**

Препарат фермента	Условия получения	Спектральные характеристики $\lambda$ , нм ( $\epsilon$ , $\text{мм}^{-1} \text{ см}^{-1}$ )
Нативная	5 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,0; 20° C	403 (102), 498 (11,25), 640 (3,23)
Nbs-модифицированная	5 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,0; 20° C; Nbs/E- -3:1	408 (60,2), 528, 585 пл., 635, 656
E <sub>1</sub>	5 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,0; 20° C; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /E=1	406 (62,4), 530, 582 пл., 635, 652
E <sub>1</sub> [9]	0,01 M Na-фосфатный буфер, pH 6,0; 0° C; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /E=1	400 (53,8), 525 пл., 577, 622, 651

бавление избытка аскорбиновой кислоты к Nbs-модифицированной пероксидазе вызывает полную регенерацию спектра нативной пероксидазы. Восстановленный образец фермента вновь окисляли N-бромсукцинимидом, этот цикл повторили несколько раз. В ходе каждого цикла происходило полное восстановление спектра нативной пероксидазы. На основании этого факта сделано предположение о регенерации фермента в процессе измерения каталитической активности, т. е. при добавлении перекиси водорода и *o*-дианизидина.

Для определения числа окислительных эквивалентов у Nbs-модифицированной пероксидазы провели восстановление окисленного образца ферроцианидом калия, одноэлектронным восстановителем. На реакцию восстановления расходуется 2 экв. ферроцианида калия. Следовательно, Nbs-окисленная пероксидаза, как и промежуточное соединение E<sub>1</sub> [1], содержит 2 окислительных эквивалента.

Для сравнения спектров поглощения соединения E<sub>1</sub> и Nbs-окисленной пероксидазы мы окислили пероксидазу перекисью водорода в условиях образования Nbs-модифицированного фермента.

Как видно из таблицы, спектральные характеристики этих двух промежуточных соединений пероксидазы совпадают, хотя и несколько отличаются от литературных [9]. По-видимому, это связано с различиями в условиях получения соединения E<sub>1</sub> в нашей работе и работе [9] (см. таблицу).

Интересно, что соединение E<sub>1</sub>, получаемое путем непосредственного окисления фермента перекисью водорода, нестабильно [1]. При окислении же пероксидазы N-бромсукцинимидом получается стабильное соединение E<sub>1</sub> (инкубация его в течение 24 ч почти не изменяет спектра поглощения). Следовательно, обработка пероксидазы N-бромсукцинимидом является удобным методом получения стабильного соединения E<sub>1</sub>, что особенно ценно при изучении физико-химических свойств последнего.

Для объяснения различия в стабильности соединений E<sub>1</sub>, полученных при окислении пероксидазы перекисью водорода и N-бромсукцинимидом, можно сделать следующее предположение. Переход соединения E<sub>1</sub> в E<sub>2</sub> без добавления субстратов пероксидазы — доноров водорода может происходить за счет реакции E<sub>1</sub> с аминокислотными остатками фермента, обладающими восстановительными свойствами. N-Бромсукцинимид наряду с окислением пероксидазы до E<sub>1</sub>, по-видимому, окисляет и эти группы белка, причем константы скоростей этих двух процессов, вероятно, сравнимы по величине. Это предположение подтверждают полученные нами следующие экспериментальные данные. Нативную пероксидазу спектрофотометрически титровали N-бромсукцинимидом до получения соединения E<sub>1</sub>, на что потребовался трехкратный избыток окислителя по отношению к концентрации фермента. Затем провели спектрофотометрическое титрование E<sub>1</sub> ферроцианидом калия до получения спектра исходного

фермента и вновь окислили восстановленный образец фермента модификатором до соединения  $E_1$ , для чего потребовался уже двукратный его избыток. По-видимому, избыточное количество N-бромсукцинимид, расходуемое на окисление нативной пероксидазы по сравнению с ревосстановленной, окисляет на белке группы, обладающие восстановительными свойствами, что способствует переходу соединения  $E_1$  в  $E_2$ . При использовании в качестве окислителя пероксидазы перекиси водорода такого окисления аминокислотных остатков не происходит. Это подтверждается стехиометрией реакции пероксидазы с  $H_2O_2$ , где пероксидаза и перекись водорода взаимодействуют в эквимолекулярном отношении [4]. Вероятно, константа скорости реакции окисления их перекисью водорода значительно меньше константы скорости реакции образования  $E_1$ .

### Экспериментальная часть

Использовали очищенный по описанной ранее методике [10] изофермент с пероксидазы из хрена  $D_{403}/D_{280}=RZ=3,3$ . Концентрацию пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм ( $\epsilon_{403} 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ ) [9]. N-Бромсукцинимид, препарат марки х.ч., дважды перекристаллизовали из воды и использовали свежеприготовленный раствор в соответствующем буферном растворе. Другие реактивы имели марку ос.ч. или были очищены соответствующим образом [11].

При действии N-бромсукцинимид на пероксидазу к 2,5 мл 4 мкМ раствора фермента в 5 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) при непрерывной продувке реакционной смеси аргоном последовательно прибавляли малые объемы (50 мкл и менее) 2,5 мМ раствора N-бромсукцинимид в том же буфере. После каждого добавления контролировали поглощение при 403 нм и отбирали пробы для измерения активности пероксидазы. Соединение  $E_1$  получали аналогично, используя вместо N-бромсукцинимид раствор  $H_2O_2$ . Активность пероксидазы определяли по реакции пероксидазного окисления *o*-дianизидина перекисью водорода [11].

Восстановление Nbs-модифицированного фермента ферроцианидом калия проводили, добавляя последовательно малые объемы 2,5 мМ раствора восстановителя к 2,5 мл 4 мкМ раствора Nbs-модифицированной пероксидазы.

Опыты при рН 4,1 проводили, используя 0,1 М Na-ацетатный буфер.

Спектры поглощения и кинетику реакции снимали на двухлучевом спектрофотометре Б-25 (Beckman, США). Спектры флуоресценции снимали на решетчатом спектрофлуориметре МРФ-4 «Hitachi».

### ЛИТЕРАТУРА

1. Dunford H. B., Stillman J. S. (1976) *Coord. Chem. Rev.*, **19**, 187—251.
2. Chance B. (1949) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **22**, 224—230.
3. Mardlund S. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **21**, 348—355.
4. George P. (1953) *J. Biol. Chem.*, **201**, 413—419.
5. Coulson A. F. W., Jonetani T. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2389—2396.
6. Kapoor M., MacLean S. (1976) *J. Biochem.*, **7**, 49—57.
7. Ohnishi M., Hiromi K. (1976) *J. Biochem.*, **79**, 11—16.
8. Myer Y. P. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4195—4203.
9. Schonbaum G. R., Lo S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3353—3360.
10. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бронко Л. Ю. (1975) *Биохимия*, **40**, 267—301.
11. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. (1977) *Биохимия*, **42**, 1372—1379.

Поступила в редакцию  
11.III.1979

После доработки  
9.IV.1979

**FORMATION OF INTERMEDIATE COMPOUND E<sub>1</sub> HORSE-RADISH  
PEROXIDASE TREATMENT WITH N-BROMOSUCCINIMIDE**

SAVITSKII A. P., PLOTITSYNA E. V., UGAROVA N. N.

*Chemistry Department, M.V. Lomonosov State University, Moscow*

The interaction of horse-radish peroxidase (HRP) with N-bromosuccinimide has been studied at pH 4.1 and 7.0. As was inferred from the spectral data and from determination of enzyme activity, modification of a number of amino acid residues along with the heme destruction took place at pH 4.1 resulting in abolishing of the enzymic activity. At pH 7.0 the catalytic activity was preserved and the formation of intermediate compound E<sub>1</sub> of peroxidase was observed, which in contrast to the analogous compound E<sub>1</sub> resulting from HRP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was stable. The possible reasons of higher stability of N-bromosuccinimide produced E<sub>1</sub> intermediate were discussed.

---