

УДК 541.14+577.158.52+542.971.2

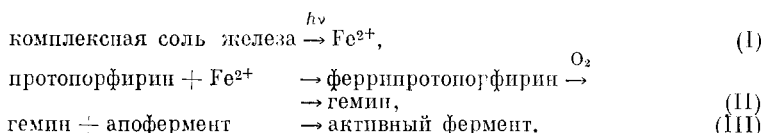
ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ,
А. П. САВИЦКИЙ, Н. Н. УГАРОВА

**ИНИЦИИРОВАННАЯ СВЕТОМ
РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕМИНСОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ**

Ранее (^{1, 2}) были предложены ряд ферментативных систем, активность катализаторов в которых иницируется действием света. Известные светочувствительные ферментативные системы основаны на реакции шптрапс-изомеризации циннамоильных производных протеолитических ферментов. В данной работе рассматривается возможность иницирования светом активности нового класса ферментов — окислительно-восстановительных ферментов, активность которых обусловлена присутствием в их молекулах простетической геминовой группы — феррипротопорфирина IX, нековалентно связанного с белком. В кислом растворе (рН < 2,3) такие геминсодержащие белки диссоциируют на гемин и каталитически неактивный апофермент, а при нейтральных рН наблюдается рекомбинация гемина и апофермента, приводящая к восстановлению активности (^{3, 4}).

Предложенная нами схема иницирования светом активности геминсодержащих белков и ферментов имеет вид:



В соответствии с данной схемой, квант света иницирует синтез простетической группы и фермента из апофермента, протопорфирина и светочувствительной комплексной соли железа. По реакции (I) комплекс железа фотолизуется с образованием ионов двухвалентного железа, которые по реакции (II) реагируют с протопорфирином, образуя железопорфирин, переходящий в гемин в присутствии кислорода воздуха. При взаимодействии полученного гемина с апоферментом (реакция (III)) реконструируется активный фермент.

В качестве объекта исследования в настоящей работе выбрана пероксидаза из хрена. Выбор фермента обусловлен его высокой каталитической активностью, широкой субстратной специфичностью и значительной термостабильностью. В отличие от протеолитических ферментов, пероксидаза не подвергается автолизу и сохраняет свою каталитическую активность в широком диапазоне рН. В работе использовали пероксидазу фирмы «Реанал», очищенную как описано ранее (⁵), $D_{403}/D_{278}=3,3$. Апопероксидазу получали по методу (⁵), ферриоксалат калия синтезировали (⁶) и тщательно очищали двойной кристаллизацией от ионов железа. Другие исходные вещества описаны ранее (⁷).

Генерация светом ионов Fe²⁺. Светочувствительная комплексная соль железа — ферриоксалат калия — фотолизуется, образуя ионы Fe²⁺ с квантовым выходом, близким к единице (⁸). Ионы Fe²⁺ в нейтральных и щелочных растворах быстро окисляются до ионов Fe³⁺, поэтому фотолиз ферриоксалата калия проводят при рН 1,0. Как следует из данных (⁸), при рН 1,0 в растворе ферриоксалата калия железо присутствует в основном в форме монооксалат-иона FeC₂O₄⁺, который разлагается под действием света по реакции



В растворе, содержащем эквимолекулярную смесь FeCl_3 и $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, при pH 1,0 также в основном присутствуют светочувствительные ионы FeC_2O_4^+ . Как показано на рис. 1, наблюдается прямая пропорциональность между концентрацией ионов Fe^{2+} , образующихся при фотолизе эквимолекулярной смеси FeCl_3 и $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, и временем облучения раствора, причем квантовый выход фотолиза, как и в случае ферриоксалата калия, близок к единице⁽⁸⁾. В связи с этим в нашей работе для генерации светом ионов Fe^{2+} мы использовали как ферриоксалат калия, так и эквимолекулярную смесь $\text{FeCl}_3 + \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Преимущества второй системы будут обсуждены ниже.

Реакция ионов Fe^{2+} с протопорфирином. Ионы Fe^{3+} , как известно^(9, 10), практически не реагируют с протопорфирином, в отличие от ионов двухвалентного железа, для которых полупериод реакции при pH 8,0 составляет несколько часов. В работах^(9, 10) было установлено, что ионы Fe^{2+} реагируют с заметной скоростью с протопорфирином при pH 8,0. В присутствии кислорода при pH 8,0 ионы Fe^{2+} быстро окисляются до ионов Fe^{3+} ⁽¹¹⁾. В связи с этим перед смешением раствор порфирина в буфере pH 8,0 и раствор, содержащий ионы Fe^{2+} в 0,1 N HCl, мы обезгаживали путем трехкратного замораживания, откачивания в вакууме до 10^{-4} мм рт. ст. и последующего размораживания растворов. Мы показали, что наблюдается прямая пропорциональность между концентрацией ионов Fe^{2+} и количеством железопорфирина, образующегося при взаимодействии протопорфирина с ионами Fe^{2+} за 120 мин. инкубирования смеси при pH 8,0 и 40°. Ионы Fe^{2+} вводили в реакционную смесь в виде FeSO_4 (рис. 2, 1), либо получали при фотолизе эквимолекулярной смеси FeCl_3 и $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (рис. 2, 2), или же при фотолизе ферриоксалата калия (рис. 2, 3). Во всех случаях концентрация гемина, образующегося в стандартных условиях (см. выше) по реакции (II), пропорциональна концентрации ионов Fe^{2+} , однако выход продукта существенно отличается при использовании различных источников ионов Fe^{2+} . При реакции протопорфирина с FeSO_4 более 7% ионов Fe^{2+} превращается в гемин. При реакции протопорфирина с фотолизованной смесью $\text{FeCl}_3 + \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ выход гемина в тех же условиях составляет 3,3%, а при реакции с фотолизированным раствором ферриоксалата калия выход гемина уменьшается до 0,6%. Следовательно, если в реакцию с протопорфирином вводится не сульфат железа, а комплексные соли железа, подвергнутые фотолизу, то образуются гораздо меньшие количества гемина. Понижение выхода гемина в реакции протопорфирина с фотолизированными комплексными солями железа может быть обусловлено ингибирующим действием анионов оксалата. Это подтверждается тем, что избыток оксалата, добавленного в реакционную смесь, заметно понижает выход гемина в реакции протопорфирина с фотолизированным раствором ферриоксалата калия (рис. 2, 4). Кроме того, при pH 8,0 комплексные соли железа, не подвергшиеся фотолизу, разлагаются с образованием осадка гидроксида железа, при этом может происходить частичное соосаждение ионов Fe^{2+} и протопорфирина, что должно приводить к снижению концентрации реагирующих веществ в растворе и, следовательно, к уменьшению выхода гемина.

Как следует из уравнений фотолиза комплексных солей железа⁽⁸⁾, при фотолизе каждой молекулы ферриоксалата калия, помимо ион-радикала оксалата (см. реакцию (Ia)), образуются два иона оксалата, ингибирующие реакцию (II). Вследствие этого более высокие выходы гемина достигаются в том случае, когда источником ионов Fe^{2+} является эквимо-

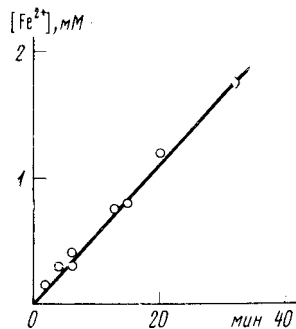


Рис. 1. Зависимость концентрации ионов Fe^{2+} , образующихся при фотолизе эквимолекулярной смеси $\text{FeCl}_3 + \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (6 мМ) от времени облучения раствора. Условия фотолиза: 0,1 N HCl, $\lambda = 313$ нм, 20°

лекулярная смесь хлорного железа и оксалата калия, подвергнутая фотолизу. При этом за 120 мин. инкубирования реакционной смеси при 40° 3,3% ионов Fe^{2+} реагируют с протопорфирином, образуя гемин. Отметим, что выход гемина можно повысить при более длительном инкубировании смеси либо при использовании более высоких концентраций порфирина.

Реконструкция пероксидазы. При взаимодействии полученного по реакции (II) гемина с апопероксидазой при pH 7,0 мы получили

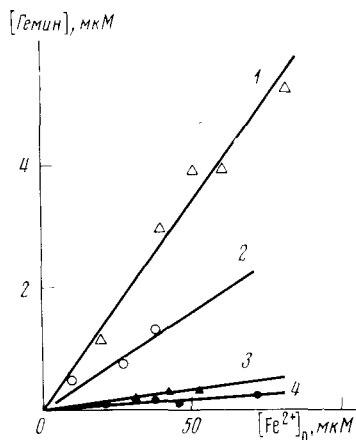


Рис. 2

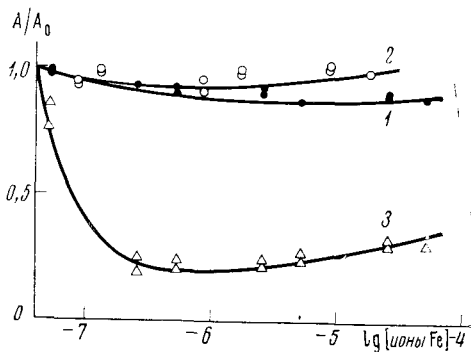


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость концентрации образовавшегося гемина от концентрации ионов Fe^{2+} при использовании различных источников ионов Fe^{2+} (все растворы в 0,1 *N* HCl): $FeSO_4$ (1), фотолиз смеси 6 мМ $FeCl_3$ и 6 мМ $K_2C_2O_4$ (2), фотолиз 6 мМ раствора ферриоксалата калия (3), фотолиз смеси 6 мМ ферриоксалата калия и 14 мМ оксалата калия (4). Условия получения гемина: 38,1 мкМ протопорфирин в 0,1 *M* буфере трис- CH_3COOH , 0,1 *M* NaCl, pH 8,0 и 0,1 мл раствора, содержащего ионы Fe^{2+} ; после обезгаживания и смешения инкубировали при 40° 120 мин. в отсутствие кислорода

Рис. 3. Влияние ионов железа на активность нативной (1), реконструированной (3) пероксидазы и гемина (2) при pH 7,0. Условия опытов: 1 — 0,24 мкМ пероксидазы, 2 — 8,5 мкМ гемина, 3 — 0,51 мкМ апопероксидазы и 0,16 мкМ гемина в 0,01 *M* Na-фосфатном буфере, 0,1 *M* KNO_3 , pH 7,0

фермент, активность которого измеряли по стандартной реакции окисления *o*-дианизидина перекисью водорода (7). Мы сравнили активность пероксидазы, полученной при взаимодействии апопероксидазы с нативным геминном и с геминном, синтезированным нами по реакции (II). Оказалось, что в наших условиях активность пероксидазы составляет лишь 30% от активности фермента, полученного из нативного гемина. Понижение активности реконструированной пероксидазы может быть обусловлено тем, что в растворе присутствуют не вступившие в реакцию протопорфирин и ионы железа, которые снижают активность реконструированной пероксидазы. Мы исследовали влияние протопорфирина и ионов железа на активность гемина и нативной и реконструированной пероксидазы. Оказалось, что протопорфирин не влияет на активность гемина и нативной пероксидазы, в то время как ионы железа заметно понижают активность реконструированного фермента. На рис. 3 приведены зависимости активности гемина, а также активности нативной и реконструированной пероксидазы от концентрации ионов железа в растворе, где проводят реконструкцию пероксидазы. Видно, что ионы железа оказывают незначительное влияние на активность гемина и нативного фермента. Присутствие же в растворе в момент реконструкции 0,3 мкМ соли железа понижает на 70% активность реконструированной пероксидазы. По-видимому, ионы железа определенным образом модифицируют апопероксидазу, следствием чего яв-

ляется уменьшение каталитической активности реконструированного фермента.

Предложенный в данной работе метод фотоиницированной реконструкции геминсодержащих ферментов в конкретном случае пероксидазы и в используемых нами условиях позволяет получать из каждого моля соли двухвалентного железа, образовавшегося при фотолизе, 0,01 моля активной пероксидазы. Первичный квантовый выход фотолиза, протекающего с образованием ионов двухвалентного железа, близок к 1. Образующиеся при фотолизе ионы Fe^{2+} обладают каталитической активностью

(табл. 1), однако их каталитическая активность при pH 6,0 в $2,5 \cdot 10^7$ раз ниже, чем активность пероксидазы. Как показано в табл. 1, различие в каталитической активности пероксидазы и ионов железа еще более возрастает с увеличением pH среды. Такая чрезвычайно высокая активность пероксидазы по сравнению с активностью ионов железа позволяет весьма эффективно использовать предложенный метод для фотоиницированного получения катализатора окислительно-восстановительных реакций, несмотря на то что лишь один процент образующихся при фотолизе ионов Fe^{2+} в наших условиях превращается в активную пероксидазу. За счет протекания вторичных реакций (II) и (III) каталитическая активность первоначально образовавшихся ионов Fe^{2+} возрастает в $2,5 \cdot 10^5$ раз. Согласно (2), эффективный квантовый выход фотоиницированных каталитических реакций определяется главным образом кинетическими характеристиками каталитической стадии. Величина каталитической константы для пероксидазы при pH 6,0 в реакции окисления *o*-дианизидина перекисью водорода равна 812 сек^{-1} . Таким образом, за счет темновой каталитической стадии происходит образование 812 мол. продукта в секунду на каждый моль активного фермента. Следует подчеркнуть существенное различие в каталитической активности фотообразовавшихся молекул фермента и ионов железа ($2,5 \cdot 10^7$ раз). Параметры обсуждаемой фотоиницированной реакции позволяют использовать ее как эффективный «усилитель» слабых световых воздействий на химическую систему.

Авторы выражают благодарность Р. П. Евстигнеевой и А. Ф. Миронову (Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова) за любезно предоставленный препарат протопорфирина.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
4 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Маргинец, ДАН, т. 193, № 4, 932 (1970).
² И. В. Березин, Н. Ф. Казанская, Р. Б. Айсина, ДАН, т. 207, № 6, 1383 (1972).
³ T. Yonetani, T. Asakura, J. Biol. Chem., v. 244, 537 (1969). ⁴ H. Theorell, A. C. Machly, Acta chem. scand., v. 4, 422 (1950). ⁵ И. В. Березин, Н. Н. Угарова и др., Биохимия, т. 75, № 2 (1975). ⁶ Дж. Дж. Калаверт, Дж. Питтс, Фотохимия, «Мир», М., 1968.
⁷ И. В. Березин, Н. Н. Угарова, В. М. Кершенгольц, ДАН, т. 214, № 3, 701 (1974).
⁸ V. Balzani, V. Carassiti, Photochemistry of Coordination Compounds, London — N. Y., 1970. ⁹ R. Tokunaga, S. Sano, Biochim. et biophys. acta, v. 264, 263 (1972). ¹⁰ R. J. Kassner, H. Walchak, Biochim. et biophys. acta, v. 304, 294 (1973). ¹¹ D. C. Harris, Ph. Aisen, Biochim. et biophys. acta, v. 329, 156 (1973).

Таблица 1

Относительная каталитическая активность * ионов Fe, гемина и пероксидазы из хрена в реакции окисления *o*-дианизидина H_2O

Катализатор	pH 6,0	pH 8,0
Ионы железа	1	0,01
Гемин	10^3	130
Пероксидаза **	$2,5 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^6$

* Условия определения каталитической активности: 0,12 ммоль перекиси водорода, 0,06 ммоль *o*-дианизидина, при pH 6,0 0,05 М Na-ацетатный буфер, при pH 8,0 0,05 М буфер трис-HCl, т-ра 20°.

** Величина каталитической константы для пероксидазы при pH 6,0 составляет 812 сек^{-1} .