



УДК 577.112.854:577.152.1

## РОЛЬ СТЕПЕНИ ГИДРАТАЦИИ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРРИТИНА И ИММУНОКОМПЛЕКСОВ КОРТИЗОЛЬНЫХ КОНЪЮГАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ

© 1999 г. А. Н. Еремин<sup>#</sup>, Г. С. Арапова, Д. И. Метелица

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

Поступила в редакцию 28.11.98 г. Принята к печати 09.02.99 г.

Изучено влияние степени гидратации ( $W_0$ ) обращенных мицелл аэрозоля ОТ (АОТ) и его смеси с Тритоном X-45 в гептане на пероксидазную активность ферритина селезенки лошади в реакциях окисления разных субстратов пероксидом водорода и органическими гидропероксидами, а также на активность растворенных или иммобилизованных иммунных комплексов конъюгата пероксидазы хрена с кортизолом (ПХ-КОР). На зависимостях “пероксидазная активность– $W_0$ ” обнаружены максимумы при значениях  $W_0$ , равных 8–14 и 19–22, которые нельзя соотносить с диссоциацией иммунокомплексов на их компоненты или ферритина на субъединицы. Обсуждена возможность стабилизации обращенными мицеллами конформеров олигомерных белков и влияние ассоциации мицелл на пероксидазную активность иммунокомплексов ПХ-КОР и ферритина. Предложен способ выделения железосодержащего кластера из молекулы ферритина без восстановления ионов  $Fe^{3+}$ .

*Ключевые слова:* пероксидаза хрена; иммобилизованные антитела; иммунокомплексы; ферритин; обращенные мицеллы; ферменты в неводных средах.

Считается, что ферменты и белки, солюбилизованные в обращенных мицеллах АОТ, проявляют максимальную функциональную активность, когда размер внутренней полости мицелл соответствует или близок размеру солюбилизованного белка [1–7]. В этом случае на экспериментальных зависимостях “активность ( $v_0$ )–степень гидратации мицелл ( $W_0$ )” обнаруживается максимум. Иногда зависимости  $v_0$ – $W_0$  имеют вид кривой с насыщением [8–12], что обусловлено возможной стабилизацией белка в микрогетерогенной системе за счет ассоциации его молекул друг с другом. В ряде работ показано [8–13], что обращенные мицеллы АОТ способны влиять на процессы ассоциации и реассоциации белков в зависимости от их полярности или мембранной активности, которую можно оценить из наклона

прямых в координатах “активность– $[ПАВ]_0$ ” при постоянной концентрации воды [4, 6].

Для некоторых олигомерных ферментов в обращенных мицеллах АОТ на кривых “активность– $W_0$ ” наблюдается несколько максимумов [4, 14–19]. А.В. Левашов и сотр. [4, 14, 15, 17] объясняют их появление включением в мицеллы разного размера активных субъединиц фермента и/или их разных олигомеров. Седиментационный анализ подтвердил эту точку зрения [4, 14, 15, 17–19]. Однако не для всех олигомерных ферментов в мицеллах АОТ характерно наличие нескольких максимумов на зависимости  $v_0$ – $W_0$ –каталаза [20, 21], уреазы [10, 22] и *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа из *E. coli* [23] обнаружили лишь один максимум активности. Особый интерес представляют данные по влиянию степени гидратации обращенных мицелл АОТ на пероксидазную активность конъюгатов пероксидазы хрена (далее – пероксидаза) с тироксином [24] и стероидами [9, 25], а также на иммунные комплексы пероксидазы и ее конъюгатов с антителами против самого фермента или стероидов [9, 25]. В этих случаях на зависимостях  $v_0$ – $W_0$  обнаружено от двух до пяти максимумов, число и величина которых определяется природой антигена, количеством связанных с ферментом молекул стероида,

Сокращения: анти-КОР – антитела против кортизола; АОТ – аэрозоль ОТ или натриевая соль ди(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты; АТ – антитела; АЦБ – ацетатный буфер; БКБ – бикарбонатный буфер; НРТ – гидропероксид Тритона X-45; КОР – кортизол; ПАВ – поверхностно-активное вещество; ПХ – пероксидаза хрена; ПХ-КОР – конъюгат пероксидазы хрена с кортизолом; НРТВ – гидропероксид трет-бутила; PDA – орто-фенилендиамин; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (0172) 63-72-74; e-mail: lando@ns.iboch.ac.by).

**Таблица 1.** Оптимальные значения степени гидратации обращенных мицелл АОТ ( $W_0$ ), обеспечивающие максимальные активности биокатализаторов

Система	Биокатализаторы*	Субстраты	Оптимальные значения $W_0$			Ссылки <sup>5*</sup>	
			Эксперимент		Расчет		
1	ПХ-КОР-12 : анти-КОР	PDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14	21–22	24–33	36.5 <sup>2*</sup>	ДР
2	ПХ-КОР-6 : анти-КОР	PDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.9	20.9	26.4		[25]
3	ПХ-КОР-12 : анти-КОР	PDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.9	19	–		[25]
4	ПХ-КОР-12 : анти-КОР	Люминол, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.5	–	–	36.5 <sup>3*</sup>	[26]
5	Пероксидаза : моноклональные АТ	PDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12.5	20	27.5	36.5 <sup>2*</sup>	[9]
6	ПХ-КОР-12 : анти-КОР-целлюлоза	PDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.5	19	23–29		ДР
7	Ферритин	PDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9	20	40	41 <sup>3*</sup>	ДР
8	Ферритин	TMB, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12	20	40	41 <sup>3*</sup>	ДР
9	Ферритин	TMB, НРТВ	11	–	–	41 <sup>3*</sup>	ДР
10	Каталаза	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7–9	–	–	40 <sup>2*</sup>	[21]
11	Каталаза	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	–	–	40 <sup>2*</sup>	[20]
12	Уреаза <sup>4*</sup>	Мочевина		18–20	–	62 <sup>2*</sup>	[10]
13	Уреаза <sup>4*</sup>	Мочевина		23	–	62 <sup>2*</sup>	[22]

\* Цифра у конъюгатов ПХ-КОР показывает число молекул кортизола на одну молекулу пероксидазы.

<sup>2\*</sup>, <sup>3\*</sup> Рассчитано по уравнениям (I) или (II), соответственно.

<sup>4\*</sup> Из-за методических осложнений зависимости  $v_0$ – $W_0$  получены для условий  $W_0 > 12$ .

<sup>5\*</sup> ДР – данная работа.

концентрацией конъюгатов, температурой и природой субстратов, использованных при определении пероксидазной активности [9, 25, 26].

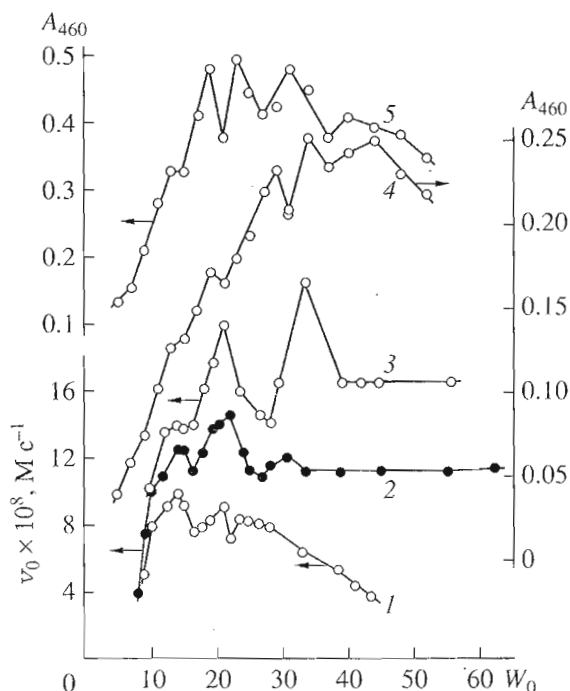
Эмпирическое уравнение  $W_0 = (0.083 - 0.008)\sqrt{M}$  (I), где  $M$  – молекулярная масса белка, предсказывает оптимальную величину  $W_0$ , при которой размер внутренней полости мицелл равен размеру белковой молекулы [27]. По уравнению I можно рассчитывать, при каких значениях  $W_0$  следует ожидать максимальной активности фермента, если он функционирует как единая молекула или если его субъединица способна проявлять функциональную активность независимо. Для каталазы [20, 21], уреазы [10, 22], иммунных комплексов пероксидазы [9, 25] рассчитанные значения оптимальных  $W_0$  существенно отличались от полученных экспериментально (табл. 1).

Несовпадения оптимальных экспериментальных значений  $W_0$  с расчетными могут быть обусловлены потенциальной возможностью некоторых белков изменять свою конформацию в зависимости от мицеллярного окружения без разрушения нековалентных связей между субъединицами фермента или антигена и антитела. Полезную информацию можно получить при сравнительном изучении одного и того же типа ферментативной активности, носители которой обладают высокой молекулярной массой, прочными нековалентными связями между белковы-

ми компонентами, но значительно различаются своей белковой структурой. В связи с этим в качестве объектов для изучения пероксидазной активности в обращенных мицеллах с разной степенью гидратации  $W_0$  мы избрали иммунные комплексы кортизольных конъюгатов пероксидазы, образующиеся в результате нековалентных взаимодействий антиген–антитело, а также ферритин из селезенки лошади – олигомерный железосодержащий белок, состоящий из 24 субъединиц и обладающий пероксидазной активностью в окислении ароматических аминов пероксидом водорода и органическими гидропероксидами [28–31].

Цель работы – сравнительное изучение зависимостей “пероксидазная активность– $W_0$ ” для иммунокомплексов, содержащих пероксидазные конъюгаты и сформированных в растворе или на твердом целлюлозном носителе, а также для ферритина, катализирующего окисление ароматических аминов пероксидом водорода и мембраноактивными органическими гидропероксидами *трет*-бутила и Тритона X-45.

На рис. 1 представлены профили каталитической активности при разных значениях  $W_0$  для иммунокомплексов, сформированных при 25°C в водном растворе (кривые 1–3) или при 37°C на целлюлозном иммуносорбенте (кривые 4 и 5). Разные значения  $W_0$  достигнуты путем изменения содержания воды в системе при постоянной концентрации ПАВ, равной 0.2 М. Кривые “актив-



**Рис. 1.** Peroксидазная активность растворенных (1–3) и иммобилизованных на целлюлозном сорбенте (4, 5) иммунных комплексов [ПХ-КОР-12 : анти-КОР] в обращенных мицеллах 0.2 М АОТ в гептане в зависимости от степени их гидратации при 25 (1), 46 (2), 52 (3) и 20–23°C (4, 5). Условия: [ПХ-КОР] = 72 (1–3), 3 (4) и 15 нМ (5); [анти-КОР] = 25 мкг/мл (1–3) или 83.3 мкг/диск (4, 5). Peroксидазную активность иммунных комплексов измеряли как начальную скорость окисления PDA (кривые 1–3) или в терминах оптического поглощения продукта окисления PDA ( $A_{460}$ ) (4, 5). Остальные условия см. в “Эксперимент. части”.

ность– $W_0$ ” характеризуются 3–5 максимумами, четко выраженными для иммунных комплексов в жидкой фазе (1–3) и менее отчетливо – для иммобилизованных на носителе (4, 5). С повышением температуры максимум при  $W_0 = 21$ –22 на зависимостях 1–3 значительно возрастает по сравнению с максимумом при  $W_0 = 14$ . Третий максимум также изменяется и смещается в сторону больших  $W_0$ : от 24 до 33.3 (ср. кривые 1 и 3). Для иммунных комплексов, сформированных на целлюлозном иммуносорбенте, третий максимум смещается в сторону меньших  $W_0$  при увеличении концентрации ПХ-КОР (4 и 5). В ту же сторону сдвигаются четвертый и пятый максимумы. Независимо от условий формирования иммунных комплексов и их состояния (в растворе или на твердой матрице), положения первых трех максимумов близки или практически совпадают (табл. 1, системы 1 и 6).

С повышением температуры от 25 до 52°C пероксидазная активность иммунных комплексов возрастает (рис. 1, кривые 1–3). Сохранение активности фермента в этих условиях обусловлено за-

щитой белковой глобулы от растворителя молекулами АОТ. При 25°C максимальная активность пероксидазы в составе иммунного комплекса наблюдается при  $W_0$  14, а с ростом  $W_0$  отмечается снижение активности фермента (рис. 1, 1). Конъюгат ПХ-КОР, связанный в иммунный комплекс на целлюлозном иммуносорбенте, дополнительно защищен носителем от инактивирующего влияния органического растворителя, поэтому фермент в составе такого иммобилизованного иммунного комплекса проявляет возрастающую каталитическую активность в большем диапазоне  $W_0$ , чем в случае того же иммунного комплекса в растворе (ср. кривые 1 и 3, 4). С повышением температуры растворимость АОТ в водной микрофазе увеличивается, возрастает ассоциация микрокапелек воды в неполярном растворителе [2], что, вероятно, приводит к росту активности фермента при 52°C и  $W_0 > 15$  (кривая 3).

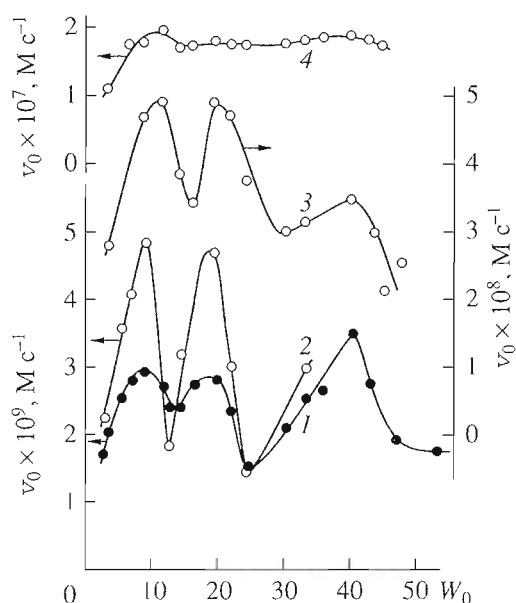
Ассоциация белоксодержащих мицелл друг с другом полностью исключается, когда иммунные комплексы иммобилизованы на целлюлозном носителе, однако остается возможной ассоциация между белок- и субстратсодержащими мицеллами. Поэтому чем меньше размер мицелл, включающих субстраты, тем легче для них доступ к мицеллам с ферментом на носителе. С ростом плотности иммунных комплексов на сорбенте при увеличении начальной концентрации конъюгата ПХ-КОР ухудшается их доступность для субстратсодержащих мицелл из-за стерических затруднений (рис. 1, кривая 5). Именно по этим причинам максимумы на кривой 5 смещаются в сторону меньших  $W_0$ . Обратная картина наблюдалась, когда плотность иммунных комплексов на сорбенте была относительно небольшой (рис. 1, 4).

Процесс ассоциации мицелл в системах, не содержащих белков или других биополимеров, хорошо известен и описан количественно [2, 32, 33]. Ассоциация мицелл значительно возрастает с ростом их концентрации, длины углеводородной цепи молекул алифатического растворителя и степени гидратации [2, 32, 33]. На основании полученных нами данных [9, 25] можно предположить, что ассоциация мицелл, включающих конъюгаты ПХ-КОР или их иммунные комплексы, в существенной степени зависит от модификации пероксидазы стероидом, регулирующей мембранную активность биокатализатора, и молекулярной массы солюбилизированной белковой частицы. Структурирование микрогетерогенной системы сильно сказывается также на активности немодифицированной пероксидазы [4, 5]. При формировании в системе “бридж 96–вода–октан” жидкокристаллической мезофазы с кубической упаковки молекул ПАВ активность пероксидазы увеличивается в несколько раз [4, 5].

Таким образом, характер изменения активности свободных и иммобилизованных иммунокомплексов в зависимости от условий (рис. 1) указывает на ассоциацию обращенных мицелл в системе. В результате этого процесса изменяется общий ход зависимостей “активность– $W_0$ ” (рис. 1). Однако ассоциацией белок- и субстратсодержащих мицелл трудно объяснить наличие максимумов пероксидазной активности на кривых “активность– $W_0$ ”. Скорее всего изменение размера мицелл вследствие роста  $W_0$  привело к диссоциации иммунных комплексов или к стабилизации в мицеллярной системе нескольких конформеров недиссоциированного иммунокомплекса, для каждого из которых характерно свое оптимальное значение  $W_0$ . Определить, какое из этих предположений более вероятно, можно при исследовании в мицеллах олигомерного белка с прочными нековалентными связями между субъединицами. Таким модельным белком может служить ферритин селезенки лошади (далее – ферритин).

Ферритин характеризуется высокой стабильностью и имеет большую молекулярную массу. Внешний диаметр ферритина равен 120–130 Å, а диаметр его внутренней полости 70–80 Å. Эта полость заполнена кристаллитом железа со средним составом  $(\text{FeOOH})_8(\text{FeO} : \text{OPO}_3\text{H}_2)$  [34, 35]. В зависимости от природного источника молекулярная масса апоферритинов меняется в пределах 430–490 кДа [36]. Ферритин состоит из 24 субъединиц Н- и L-типа с молекулярными массами ~21 и ~19 кДа соответственно [37]. Субъединицы белка склонны к самосборке до исходного олигомерного состояния белковой молекулы. Максимальное содержание железа в ферритине составляет ~4500 атомов на одну молекулу белка, но обычно ферритин содержит около 2000 (или менее) атомов железа в виде  $\text{Fe}^{3+}$  [34, 35, 38]. Между субъединицами ферритина имеется 6 каналов, внешний диаметр которых 17–20, а внутренний – 9–12 Å [35]. Кроме запаса, хранения и транспорта ионов железа ферритин может ускорять дисмутацию ионов  $\text{O}_2^-$  до  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2$  [39] и катализировать окисление ионов  $\text{Fe}^{2+}$  молекулярным кислородом до  $\text{Fe}^{3+}$  [40]. Кроме того, ферритин селезенки человека и лошади обнаружил пероксидазную активность [28–31].

Ферритин проявляет пероксидазные свойства не только в водных средах [29–31], но и в мицеллярных системах. Как видно из рис. 2, при окислении PDA (1, 2) и TMB (3) пероксидом водорода (1–3) на зависимостях  $v_0$ – $W_0$  проявляются три максимума при  $W_0$ , равных 9–12, 20 и ~40. Замена пероксида водорода на мембраноактивный гидрофобный НРТВ при окислении TMB (кривая 4) привела к значительному увеличению скорости



**Рис. 2.** Влияние степени гидратации обращенных мицелл на начальные скорости окисления 3 мМ PDA (1, 2) и 3 мМ TMB (3, 4) пероксидом водорода (1–3) и НРТВ (4) с участием 0.3 мкМ ферритина в мицеллах 0.2 М АОТ (1, 3, 4) и 66.7 мМ АОТ + 133.3 мМ Тритон X-45 (2) в гелтане при 20°C. Условия определения: АЦБ, рН 4.2 (1), 4.5 (2), 4.0 (3, 4);  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 25$  (1, 2) и 20 мМ (3);  $[\text{НРТВ}] = 50$  мМ;  $[\text{DMF}] = 0$  (1, 2) и 2.2% (3, 4).

окисления этого амина и практически нивелировала два максимума (ср. зависимости 3 и 4).

Между размером мицелл АОТ и  $W_0$  установлена эмпирическая связь [41]:  $r_m(\text{Å}) = 4 + 1.5W_0$  (II). В соответствии с этим уравнением, экспериментально полученным значениям оптимальных величин  $W_0$  мицелл АОТ, содержащих ферритин, в точках максимума должны соответствовать следующие радиусы мицелл АОТ: 17.5–20.5 Å (для  $W_0$  9–11), 34 Å ( $W_0$  20) и 65.5 Å ( $W_0$  41). Вычисленные радиусы обращенных мицелл АОТ формально совпадают по своим величинам с радиусами субъединицы ферритина (17–20 Å), железосодержащего кластера (35–36 Å) и цельной молекулы белка (61–62.5 Å) [34, 35]. Не вызывает возражений только соотношение третьего максимума на рис. 2 с цельной молекулой, в то время как первый максимум никак не может характеризовать активность субъединицы ферритина, поскольку последняя лишена каталитической активности из-за отсутствия ионов железа – потенциальных носителей этой активности.

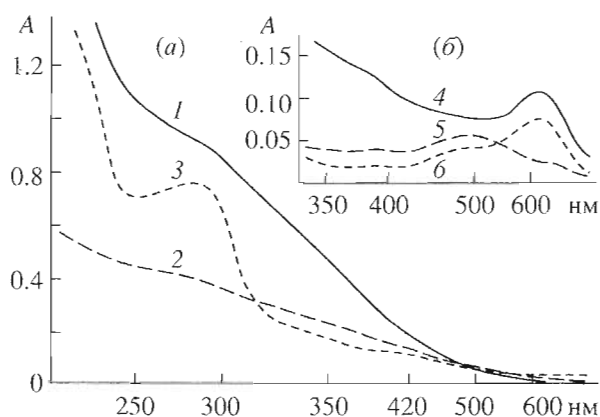
Для решения вопроса о соотношении второго максимума на рис. 2 с Fe-кристаллитом ферритина была изучена диссоциация белка в мицеллярной среде с высвобождением Fe-кластера из молекулы. Оказалось, что ни в 5% водном растворе додецилсульфата натрия в отсутствие восстановителя

**Таблица 2.** Кинетические характеристики\* окисления ароматических аминов (3 мМ) гидропероксидами с участием ферритина (0.3 мкМ) при 20°C в обращенных мицеллах 0.2 М АОТ в гептане

Система	Гидропероксид	Амин	$W_0$	$K_m$ , мМ	$k_{cat} \times 10^2$ , с <sup>-1</sup>
1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PDA	9	35.7	3.8
			20	7.0	1.2
			40	3.8	1.2
2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ТМВ	12	5.5	24.9
			20	3.5	19.5
			40	1.9	14.2
3	НРТВ	ТМВ	12	83.3	107.5
4	НРТ	ТМВ	12	0.08	18.7
				0.33	30.9

\* Определены из зависимостей начальной скорости реакции от концентрации гидропероксидов в координатах Лайнуивера–Берка.

ионов Fe<sup>3+</sup>, ни в обращенных мицеллах АОТ в гептане при комнатной температуре железосодержащий кристаллит ферритина не освобождается из белка. Разрушить ферритин удалось лишь при нагревании обращенно-мицеллярной системы ( $W_0$  40) в кипящей воде в течение 5 мин. В этих же условиях, но при  $W_0$  10 или 20 Fe-кластер не освобождается от апоферритина. Из спектральных данных (рис. 3) следует, что субъединицы апоферритина, отделенные от Fe-кластера, не содержат ионов Fe<sup>3+</sup>, а сам кластер не содержит даже следов белка, так как отсутствует характерное поглощение белкового комплекса с кумасси G-250 на длине волны 620 нм [42]. Таким образом, из приведенных данных следует, что в условиях, при которых получены зависимости  $v_0$ – $W_0$  (рис. 2), Fe-кристаллит не освобождается из ферритина.



**Рис. 3.** Спектры поглощения водных растворов ферритина (2.2 мкМ) (1), кристаллита железа (0.016% Fe<sup>3+</sup>) (2), апоферритина (0.067% белка) (3) (а) и, соответственно, комплексов кумасси G-250 с ферритином (4), кристаллитом железа (5) и апоферритином (6) (б). Толщина кювет: 0.1 (1, 4), 0.2 (2, 5) и 0.5 см (3, 6).

Сравнение профилей зависимостей 1 и 3 (рис. 2) свидетельствует о том, что природа субстрата-восстановителя влияет только на величину третьего максимума, в то время как первый и второй максимумы на этих зависимостях мало чувствительны к природе окисляемого амина (ср. кривые 1–3). Возможно, разная полярность двух ароматических аминов (PDA и ТМВ) сказывается на скорости обмена содержащих их мицелл с белоксодержащими мицеллами АОТ при высоких значениях  $W_0$  (~40). Заметим, что ранее при исследовании пероксидазной активности иммунокомплексов конъюгатов ПХ-КОР в мицеллярных системах нами было показано влияние природы субстрата на характер зависимостей  $v_0$ – $W_0$  [25, 26].

В табл. 2 приведено сравнение кинетических характеристик, полученных при исследовании окисления двух аминов с участием ферритина и окислителей разной природы. С увеличением степени гидратации мицелл АОТ в гептане прослеживается тенденция к снижению величин  $k_{cat}$  и  $K_m$  при окислении PDA и ТМВ пероксидом водорода. Считая, что эффективные значения  $K_m$  в некоторой степени отражают прочность комплексов окислителей с ферритином, можно расположить их в ряд по средству к ферритину в обращенных мицеллах АОТ: НРТ > H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > НРТВ (табл. 2, системы 2–4). Надо заметить, что разным интервалам концентраций НРТ–Тритон X-45 соответствуют два набора значений  $k_{cat}$  и  $K_m$ : формально это означает возможную реализацию двух типов связывания этого гидропероксида с ферритином.

Полученные нами экспериментальные данные о влиянии природы субстрата-восстановителя на характер зависимостей “пероксидазная активность– $W_0$ ” при использовании в качестве биокатализатора иммунокомплексов, содержащих пероксидазу [25, 26], а также о влиянии природы субстрата-окислителя на зависимости “активность– $W_0$ ” при окислении ароматических аминов

с участием ферритина показывают, что субстраты могут изменять величину максимумов активности белков на зависимостях  $v_0-W_0$  до полного нивелирования их (рис. 2, ср. 1–3 с 4). Однако присутствие субстратов не изменяет местоположения пиков пероксидазной активности (табл. 1, рис. 2).

ПХ-КОР, связанный с антителами против кортизола, обнаруживает максимумы пероксидазной активности при  $W_0 = 9.5-14$ ,  $19-22$  и  $23-33$ , первые из которых весьма далеки от рассчитанного оптимального значения  $W_0$  (рис. 1, табл. 1). Ферритин имеет максимумы каталитической активности при  $W_0 = 9-12$  и  $20$ , которые совпадают с оптимальными  $W_0$  для ПХ-КОР-комплексов. Иммунокомплексы ПХ-КОР в зависимости от условий характеризуются константами диссоциации, равными  $10^{-10}-10^{-8}$  М, что указывает на их высокую устойчивость [9, 25]. Как следует из приведенных выше и литературных данных [34, 35], ферритин обладает стабильной четвертичной структурой и прочно удерживает железный кластер. Следовательно, максимумы пероксидазной активности этих разных белков в диапазонах  $W_0 = 9-14$  и  $19-22$  не могут быть соотнесены с диссоциацией ферритина на субъединицы и иммунокомплексов – на составляющие их компоненты.

Мы предполагаем, что в обращенных мицеллах АОТ в зависимости от их размера происходит стабилизация некоторых конформеров олигомерных белков. Если связи между субъединицами олигомерного белка непрочны, в мицеллах АОТ происходит его диссоциация на мономеры [4, 14–19]. В случае олигомерных белков с прочной четвертичной структурой в обращенных мицеллах АОТ возможна стабилизация ряда конформеров белка. Из наших данных следует, что обычно число каталитически наиболее активных конформеров колеблется в пределах 1–3 (рис. 1 и 2, табл. 1). При иммобилизации олигомерного белка их число возрастает (рис. 1, кривые 4, 5), а при изменении люмена обращенной мицеллы АОТ путем включения в него мембраноактивных соединений (например, НРТВ) можно уравнивать каталитическую активность нескольких конформеров белка (рис. 2, кривая 4).

Максимум функциональной активности белков при  $W_0 8-14$  (табл. 1) отражает их способность эффективно формировать вокруг себя мицеллу, комплементарную белковой поверхности, так как в этих условиях ( $W_0 8-10$ ) завершается гидратация молекул АОТ, а “активность” воды достигает максимума [2]. При  $W_0 18-22$  молекулы АОТ в наибольшей степени влияют на межсубъединичные и межмолекулярные взаимодействия в олигомерных белках. В случае ферритина (рис. 2, кривые 1–3) это отражается на взаимодействии

его субъединиц с  $Fe^{3+}$ -кластером, что, как показано нами ранее [30, 31], весьма важно для проявления им пероксидазной активности. Воздействие молекул АОТ на структуру олигомерного белка при  $W_0 18-22$  увеличивается с ростом температуры. Это хорошо видно на примере иммунных комплексов ПХ-КОР (рис. 1, кривые 1–3). При высоких значениях  $W_0$  влияние люмена обращенной мицеллы и молекул АОТ на олигомерные белки существенно уменьшается.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали лиофилизированный ферритин из селезенки лошади (Reanal, Венгрия), концентрацию которого рассчитывали по его молекулярной массе [29], а содержание железа и апоферритина рассчитывали, используя коэффициенты поглощения  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 100$  (при 420 нм, железо) и 9.0 (при 280 нм, белок) [38]. Ферритин содержал около 1450 атомов железа на молекулу белка, что соответствовало 15.8% по весу. Применяли пероксидазу хрена (КФ 1.11.1.7) с  $RZ 2.9$  (Биолар, Латвия). Конъюгаты ПХ-КОР синтезировали по методике, описанной нами ранее в работах [9, 25, 26]. По усредненным данным конъюгат содержал ~12 молекул кортизола на одну молекулу фермента (ПХ-КОР-12). Концентрацию пероксидазы и ПХ-КОР определяли спектрофотометрически на приборе Specord UV VIS (Германия), используя молярный коэффициент поглощения фермента в максимуме полосы Core, равный  $102000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [9, 25, 26]. Антисыворотка против кортизола (Опытное производство ИБОХ НАН Беларуси, Минск) характеризовалась константой ассоциации с [ $^{125}\text{I}$ ]кортизолом, равной  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Содержание белка в анти-КОР определяли по методу Лоури. При иммобилизации анти-КОР использовали плотные, узкопористые целлюлозные фильтры (Filtrak, Германия) в форме дисков диаметром 0.6 см.

В работе использовали аэрозоль ОТ, Тритон X-100 и кумасси G-250 (Serva, Германия), Тритон X-45 (Sigma, США), метапериодат натрия (Reanal, Венгрия). В качестве окислителей в пероксидазных реакциях применяли разбавленный пергидроль (Реахим, Россия), 95% НРТВ, предоставленный нам к.х.н. Г.С. Былиной (Институт физико-органической химии НАН Беларуси) и 0.4 М раствор Тритона X-45 в гептане, содержащий 2.2 мМ гидропероксид. В качестве субстратов-восстановителей использовали ТМВ (Serva, Германия) и PDA (Ереванский завод химреактивов, Армения) после его возгонки в вакууме. Остальные реактивы производства Реахим (Россия).

**Приготовление иммуносорбента.** Целлюлозные диски окисляли 0.1 М  $\text{NaIO}_4$  ( $25^\circ\text{C}$ , 1.5 ч), а за-

тем отмывали дистиллированной водой. К активированному носителю добавляли контактный раствор (0.15 мл на один диск), содержащий 0.1 М БКБ, pH 9 и 1.0 мг/мл анти-КОР, выдерживали 3 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем контактный раствор удаляли, иммуносорбент промывали 10 мМ БКБ, pH 9 и образовавшиеся азометиновые связи восстанавливали боргидридом натрия (2 мг/мл, 1 ч) в 0.1 М БКБ, pH 9. Иммуносорбент последовательно отмывали в 0.1 М Трис-НСI-буфере, pH 8 с 0.2 М NaCl и 0.5% Тритоном X-100 (1 ч) и дистиллированной водой. Иммуносорбент хранили при  $\sim 7^\circ\text{C}$  в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4. Для определения количества связавшегося с носителем белка использовали метод Седмака [42]. Белок осаждали из контактного раствора ацетоном. Содержание иммобилизованного белка на диске рассчитывали по разнице его концентраций в контактном растворе до и после иммобилизации. Иммуносорбент содержал 83.3 мкг анти-КОР/диск.

**Взаимодействие ПХ-КОР с анти-КОР в растворе и на иммуносорбенте.** В дистиллированной воде готовили смесь, содержащую 72 нМ ПХ-КОР, 25 мкг/мл анти-КОР и выдерживали ее 1 ч при  $25^\circ\text{C}$ . Пероксидазную активность растворенных иммунных комплексов (ПХ-КОР-12 : анти-КОР) определяли в обращенных мицеллах АОТ в гептане, содержащих 0.2 М АОТ, разные объемы водной фазы, 0.3 нМ ПХ-КОР в составе иммунных комплексов, 4 мМ PDA и 2 мМ фосфат-цитратный буфер, pH 4.6. Пробы выдерживали 5 мин и начинали реакцию окисления PDA, добавляя  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 мМ). Пероксидазную активность иммунокомплексов характеризовали начальными скоростями накопления продукта окисления PDA, за поглощением которого следили при 460 нм ( $\epsilon_{460}$  15 600  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [9, 25]).

При проведении иммунохимической реакции ПХ-КОР с иммуносорбентом к 25 дискам добавляли 7.5 мл раствора, содержащего 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.4 с 0.15 М NaCl и 0.6% Тритоном X-100, 3 или 15 нМ ПХ-КОР. Смесь выдерживали 1 ч при  $37^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании. Затем диски последовательно промывали дистиллированной водой, 0.1 М Трис-НСI-буфером, pH 8, с 0.2 М NaCl и 0.5% Тритоном X-100 (1 ч) и снова дистиллированной водой. Пероксидазную активность иммобилизованных иммунокомплексов (ПХ-КОР-12 : анти-КОР-целлюлоза) определяли в обращенных мицеллах АОТ в гептане, содержащих 0.2 М АОТ, разные объемы водной фазы, иммуносорбент, 3 мМ PDA и 0.9 мМ фосфат-цитратный буфер, pH 4.6. Пробы выдерживали 3 мин, а затем начинали реакцию, добавляя  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 мМ). Реакцию проводили 1 ч при  $21\text{--}23^\circ\text{C}$  и перемешивании. Поглощение продукта окисления PDA в

микроэмульсии измеряли при 460 нм на спектрофотометре СФ-46 (Россия).

**Измерение пероксидазной активности ферритина** в обращенных мицеллах АОТ (или АОТ-Тритон X-45) в гептане. Реакционные смеси объемом 2 мл готовили смешением двух растворов А и Б. Раствор А (1 мл) содержал 0.6 мкМ ферритин, 6 мМ PDA (ТМВ), 0.73 мМ соответствующего буфера (рис. 2) и 0.2 М ПАВ. Раствор Б содержал 0.2 М ПАВ и окислитель. Растворы А и Б тщательно перемешивали и выдерживали 1 мин, после чего 1 мл раствора Б вносили в кювету с раствором А и считали это началом реакции окисления. При использовании ТМВ в качестве субстрата микроэмульсия содержала 2.2% DMF. Реакцию окисления ароматических аминов вели от 3 мин (ТМВ) до 2 ч (PDA) при  $20^\circ\text{C}$ , следя за поглощением растворов при 446 нм (PDA) или 680 нм (ТМВ). Начальные скорости окисления рассчитывали из кинетических кривых роста оптического поглощения, используя молярные коэффициенты поглощения продуктов реакции, равные 19 600 и 39 000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  для PDA и ТМВ, соответственно [29].

**Выделение кристаллита железа из ферритина.** Готовили 30 мкМ водный раствор ферритина и солюбилизировали его в микроэмульсии 0.2 М АОТ в гептане при  $W_0$  40: 1 мл микроэмульсии содержал 108 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ , 36 мкл 30 мкМ ферритина, 500 мкл 0.4 М АОТ в гептане и 356 мкл гептана. Полученный прозрачный раствор плотно закрывали в стеклянной пробирке со шлифованной пробкой и помещали на 5 мин в кипящую воду. За это время микроэмульсия расслаивалась и кристаллит железа выпадал в осадок. Смесь центрифугировали 5 мин при 3000 g, супернатант аккуратно удаляли с помощью водоструйного насоса. К осадку добавляли микроэмульсию 0.2 М АОТ в гептане, в 1.2 мл которой содержалось 172.8 мкл воды, 600 мкл 0.4 М АОТ в гептане и 427 мкл гептана. Микроэмульсию перемешивали до полной солюбилизации в ней кристаллита железа и повторяли еще раз процедуру обработки микроэмульсии на кипящей водяной бане. Затем смесь центрифугировали 5 мин при 3000 g, супернатант удаляли. Осадок промывали 2 мл охлажденного ацетона, центрифугировали (15 мин, 3000 g) и супернатант отбрасывали. Промывку осадка ацетоном повторяли еще раз. Осадок диспергировали с помощью ультразвукового облучения в дистиллированной воде. Содержание железа определяли спектрофотометрически на приборе Spexord UV VIS (Германия).

Часть работы выполнена при финансовой поддержке INTAS (Брюссель, Бельгия).

Авторы выражают благодарность проф. А.В. Левашову (МГУ) за критический анализ работы и ценные замечания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левашов А.В. // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1986. С. 112–156.
2. Luisi P.L., Giomini M., Pileni M.P., Robinson B.H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. V. 947. P. 209–246.
3. Метелица Д.И., Еремин А.Н. // Успехи биол. химии. 1988. Т. 28. С. 145–173.
4. Клячко Н.Л. Регуляция ферментов структурой и природой матрицы в микрогетерогенных системах на основе агрегатов поверхностно-активных веществ: Дис. ... докт. хим. наук. М.: МГУ, 1990. 223 с.
5. Клячко Н.Л., Левашов А.В., Пшежецкий А.В., Богданова Н.Г., Кабанов А.В., Березин И.В., Хмельницкий Ю.Л., Жаринова И.Н., Мартинек К. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 289. С. 1266–1270.
6. Пшежецкий А.В., Кабанов В.А., Клячко Н.Л., Березин И.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. С. 1263–1266.
7. Клячко Н.Л., Пшежецкий А.В., Кабанов А.В., Вакула С.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. С. 467–472.
8. Han D., Walde P., Luisi P.L. // *Biocatalysis.* 1990. V. 4. P. 153–161.
9. Карасева Е.И., Чередникова Т.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 322–335.
10. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 826–834.
11. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1874–1882.
12. Пучкаев А.В., Гирина Н.В., Власов А.П., Метелица Д.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1171–1181.
13. Hagen A.G., Hatton T.A., Wang D.J.C. // *Biotechnol. Bioenging.* 1990. V. 35. P. 966–975.
14. Клячко Н.Л., Меркер М., Вакула С.В., Иванов М.В., Березин И.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. С. 1479–1481.
15. Kabanov A.V., Nametkin S.N., Evtushenko G.M., Chernov N.N., Klyachko N.L., Levashov A.V., Martinek K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. V. 966. P. 147–152.
16. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 410–417.
17. Клячко Н.Л., Угольников А.В., Иванов М.В., Левашов А.В. // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1048–1054.
18. Бурлакова А.А., Курганов Б.И., Чеботарева Н.А., Дебабов В.Г. // Биол. мембраны. 1996. Т. 13. С. 504–511.
19. Kurganov B.I., Burlakova A.A., Chebotareva N.A., Debabov V.G. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. V. 41. P. 547–554.
20. Артемчик В.Д., Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 293–298.
21. Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1672–1686.
22. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 45–54.
23. Левашов П.А. Изучение межсубъединичных взаимодействий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из *E. coli*: Автореферат дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1997. 17 с.
24. Кабанов А.В., Хруцкая М.М., Будивари М.И., Еремин С.А., Клячко Н.Л., Левашов А.В. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. С. 1253–1256.
25. Еремин А.Н., Карасева Е.И., Метелица Д.И. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35. С. 549–552.
26. Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35. С. 1100–1104.
27. Курганов Б.И., Цейтлин Л.Г., Малахова Э.А., Чеботарева Н.А., Ланкин В.З., Левашов А.В., Глебова Г.Д., Березовский В.М., Мартинек К., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. С. 1263–1267.
28. Денисов В.Н., Метелица Д.И. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 1248–1257.
29. Метелица Д.И., Арапова Г.С. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 308–321.
30. Метелица Д.И., Арапова Г.С., Еремин А.Н. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 460–470.
31. Арапова Г.С., Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1663–1673.
32. Johansson R., Almgren M. // *Progr. Colloid Polym. Sci.* 1991. V. 84. P. 72.
33. Koper G.J.M., Sager W.F.C., Bedeaux D. // *J. Phys. Chem.* 1995. V. 99. P. 13291–13300.
34. Харрисон П.М., Хой Т.Г. // Неорганическая биохимия / Ред. Г.М. Эйхгорн. М.: Мир, 1978. Т. 1. С. 300–330.
35. Munro H.N., Linder M.C. // *Physiol. Reviews.* 1978. V. 58. P. 317–396.
36. Treffy A., Harrison P.M., Cleton M.J., de Bruijn W.C. // *J. Inorg. Biochem.* 1987. V. 31. P. 1–6.
37. Bomford A., Conlon-Hollingshead C., Munro H.N. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 948–955.
38. Treffy A., Harrison P.M. // *Biochem. J.* 1978. V. 171. P. 313–320.
39. Bolann B.J., Ulvik R.J. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 193. P. 899–904.
40. Sun S., Chasteen N.D. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 25160–25166.
41. Eicke H.F., Rehak J. // *Helv. Chim. Acta.* 1976. V. 59. P. 2883–2891.
42. Sedmak G.G., Grossberg S.E. // *Anal. Biochem.* 1977. V. 79. P. 544–552.



## The Role of the Degree of Hydration of Reversed Micelles of Surfactants in the Regulation of the Peroxidase Activity of Ferritin and Immunocomplexes of Cortisol–Peroxidase Conjugates

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

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

The effect of the degree of hydration ( $W_0$ ) of reversed micelles of Aerosol OT (AOT) and its mixture with Triton X-45 in heptane on the peroxidase activity of horse spleen ferritin in the oxidation of various substrates by hydrogen peroxide and organic hydroperoxides and on the activity of solubilized or immobilized immunocomplexes of horseradish peroxidase–cortisol conjugates (HP-COR) was studied. The peroxidase activity versus  $W_0$  plot has maxima at  $W_0$  8–14 and 19–22, which cannot be attributed to dissociation of immunocomplexes into its components or of ferritin into its subunits. The possibility of the stabilization of the conformers of oligomeric proteins by reversed micelles and the effect of the self-association of micelles on the peroxidase activity of the HP-COR immunocomplexes and ferritin were discussed. A procedure for the isolation of the iron-containing cluster from the ferritin molecule without reduction of the  $Fe^{3+}$  ions was suggested.

*Key words: horseradish peroxidase, immobilized antibodies, immunocomplexes, ferritin, reversed micelles, enzymes in nonaqueous media*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (0172) 63-7274; e-mail: lando@ns.iboch.ac.by.