

УДК 547.963.4:633.35

## ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕГОГЛОБИНА КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ (*Vicia faba* L.) ПО ОТНОШЕНИЮ К ГИДРОПЕРОКСИДУ *трет*-БУТИЛА

© 2022 г. О. В. Космачевская<sup>1</sup>, Э. И. Насыбуллина<sup>1</sup>, А. Ф. Топунов<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: aftorunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.07.2021 г.

После доработки 30.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Легоглобин (**Lb**) – гемоглобин клубеньков бобовых растений, как и многие другие гемоглобины, проявляет пероксидазную активность и может окислять различные вещества с участием  $H_2O_2$  или органических перекисей. Исследована пероксидазная активность Lb, выделенного из клубеньков бобов (*Vicia faba* L.), в реакции с гидропероксидом *трет*-бутила – аналогом органических гидроперекисей, и *о*-дианизидином в качестве восстанавливающего субстрата. Реакция, катализируемая Lb, описывалась классическим уравнением Михаэлиса-Ментен ( $V_{max} = 1.3$  моль/мин · мМ гема,  $K_m = 0.8$  мМ). Определены концентрации субстратов, не лимитирующие скорость пероксидазной реакции, – 0.8 мМ для *о*-дианизидина и 1 мМ для гидропероксида *трет*-бутила. При снижении pH с 9.0 до 6.0 пероксидазная активность Lb увеличивалась почти в 2 раза, что может иметь значение для клубеньков *in vivo*, например, при их старении, когда снижается pH и увеличивается содержание окисленного Lb. Несмотря на то, что по пероксидазной активности Lb уступает истинным пероксидазам, он может обеспечить дополнительную антиоксидантную защиту при окислительном стрессе, учитывая его высокую концентрацию в клубеньке.

**Ключевые слова:** легоглобин, гемоглобин, миоглобин, пероксидаза корней хрена, псевдопероксидазная активность, пероксид *трет*-бутила

**DOI:** 10.31857/S0555109922010044

Легоглобин (**Lb**) – кислородпереносящий гемопротеид клубеньков бобовых растений, в которых он поддерживает кислородные условия на уровне, оптимальном для процесса азотфиксации. Lb содержится в цитоплазме инфицированной клетки в очень высокой концентрации:  $1-5 \times 10^{-4}$  М [1] и обеспечивает градиент концентрации  $O_2$  от десятков мкМ у плазмалеммы до нескольких нМ в центральной части клетки (у мембраны бактериоида) [2, 3]. Легоглобин – мономерный белок с молекулярной массой ~16.5 кДа, содержащий гем (протопорфирин IX). Lb структурно и функционально подобен миоглобину (**Mb**) и эритроцитарному гемоглобину (**Hb**), поскольку все эти белки происходят от общего предка [4, 5].

Кроме связывания и транспорта молекулярного кислорода и оксида азота (NO), многие гемоглобины способны проявлять различные каталитические активности, среди которых и пероксидазная [6, 7]. По своим каталитическим свойствам гемоглобины, как правило, уступают “классическим” ферментам и не всегда очевидна биологическая целесообразность этих свойств. По этой причине

гемоглобины относят к так называемым ферментомиметикам.

Серьезные исследования взаимодействия Hb и Mb с  $H_2O_2$  начались в 1950 гг. [8, 9]. Позже было показано, что и другие гемоглобины способны проявлять пероксидазную активность. Hb полихеты *Amphitrite* с помощью  $H_2O_2$  окисляет галофенолы до менее токсичных хинонов [10], а флавогемоглобин *E. coli* восстанавливает алкилгидропероксида до спиртов [11]. Пероксидазной активностью также обладают нейроглобины и цитоглобины [12]. Интерес к пероксидазной активности гемоглобинов обусловлен еще и тем, что они представляют собой удобную для кинетических исследований модель, поскольку с  $H_2O_2$  реагируют значительно медленнее, чем истинные пероксидазы и каталазы.

Поскольку константа скорости пероксидазной реакции, катализируемой гемоглобинами, намного ниже констант скоростей истинных пероксидаз, то обычно применяют термин “псевдопероксидазная активность”, тем самым подчеркивая второстепенность этой функции для белков – переносчиков кислорода [6, 13–15].

Еще в конце 1970-х гг. было показано, что Lb может катализировать окисление электрон-донорных субстратов перекисью водорода [16, 17]. Также известно, что Lb в качестве окисляющего субстрата может использовать этил-гидропероксид [16]. Поскольку Lb образует гемовые комплексы с алифатическими кислотами [18], не исключена возможность взаимодействия его с небольшими алкилгидропероксидами, такими, как гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH). Интерес к алкилгидропероксидам, как к субстратам пероксидаз, вызван тем, что эти соединения образуются при окислительном стрессе и вызываемом им перекисном окислении липидов. Кроме того, они достаточно устойчивы и могут накапливаться в организме, в отличие от пероксида водорода.

Цель работы – исследование пероксидазной активности Lb по отношению к *t*-BOOH.

### МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: фенилметилсульфонилфторид (PMSF) – производства “AppliChem” (Германия), пероксидаза из корня хрена тип RZ (HRP), морфолино-2-этансульфоновая кислота (МЭС), гидропероксид *трет*-бутила, *o*-дианизидин, пиридин, аскорбат натрия – “Sigma-Aldrich” (США), Servacel DEAE GS – “Serva” (Германия), ультрогель AcA 54 – “LKB” (Швеция), Трис – “ICN” (США). Остальные реактивы производства “Реахим” (Россия), квалификации “х. ч.” или “ос. ч.”.

**Объект исследований и условия выращивания растений.** Растения бобов (*Vicia faba* L.) сорта “Русские черные” (иногда употребляется название *Faba bona* Medik.) выращивали в полевых условиях Московской области (Россия). Растения инокулировали клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, производственный штамм CIAM 1026 из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Россия). Стерилизацию семян для всех опытов проводили розовым раствором перманганата калия в течение 30 мин с последующей промывкой водой. Доза инокулята составляла не менее  $10^9$  клеток на семя. Клубеньки собирали на стадии бутонизации – начала цветения, когда содержание Lb максимально.

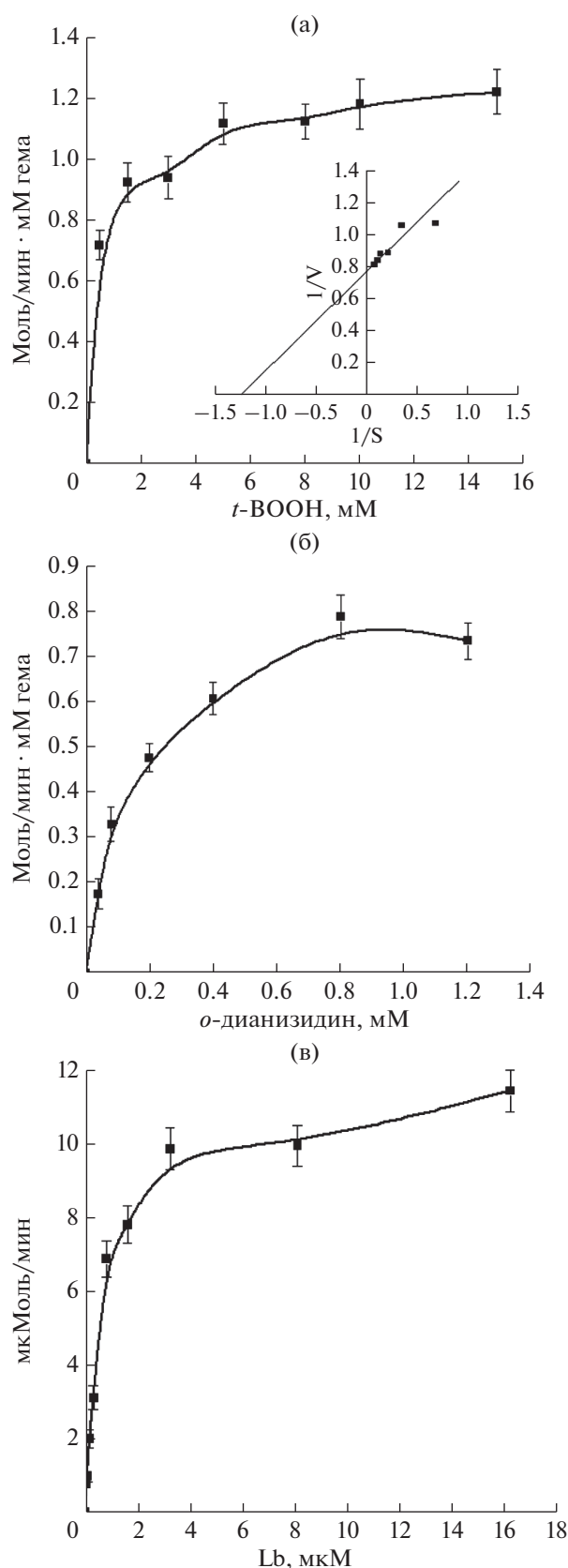
**Выделение и очистка Lb из клубеньков бобов.** Клубеньки, отделенные от корней бобов, заливали холодным 0.1 М К–фосфатным буфером (pH 7.2), содержащим 0.2 М аскорбат натрия, 1%-ный высокомолекулярный поливинилпирролидон, 50 мкМ PMSF и 1 мМ MgCl<sub>2</sub>. Соотношение клубеньков и буфера составляло 1 : 2 по массе. Затем клубеньки тщательно растирали в агатовой ступке, фильтровали через 2 слоя капронового полотна. Фильтрат центрифугировали с

охлаждением в течение 10 мин при 1000 g для удаления из экстракта загрязнений и крупных частиц растительной ткани. Lb-содержащую фракцию получали высаливанием белков супернатанта сульфатом аммония при насыщении 40–80%. Для поддержания pH 6.8–7.0 к супернатанту добавляли 10%-ный раствор аммиака.

Осадок, содержащий Lb, растворяли в минимальном количестве 0.02 М К-фосфатного буфера pH 7.2, центрифугировали при 23000 g в течение 20 мин, после чего супернатант наносили на колонку (60 × 1.0 см) с носителем Ultrogel AcA-54 (“LKB”, Швеция), уравновешенным 0.02 М К-фосфатным буфером (pH 7.2). Выход фракций с колонки регистрировали спектрофотометрически при 280 нм. Последующую очистку Lb проводили на анионообменнике Servacel DEAE GS (7 × 2 см), уравновешенном 0.01 М К-фосфатным буфером (pH 7.2). Фракционирование Lb проводили элюцией линейным градиентом NaCl от 0 до 1.0 М в 0.01 М К-фосфатном буфере (pH 7.2). Фракция Lb выходила с колонки в диапазоне 0.2–0.4 М NaCl. Элюат, полученный с колонки Servacel DEAE GS, окисляли раствором феррицианида калия для перевода Lb в окисленную мет-форму (*metLb*) и диализовали в 0.02 М К-фосфатном буфере (pH 7.2). Белок концентрировали на мембране Millipore (Merk, Германия) в ячейке для ультрамембранного концентрирования под током аргона. Lb, выделенный из клубеньков бобов, представлял собой сумму его компонентов (изоформ). Все процедуры по очистке Lb проводили на холоду (5°C).

**Определение количества гемов.** Для определения концентрации гемовых групп получали пиридингемохромоген по методу [19]. К 150 мкл раствора белка добавляли 450 мкл раствора пиридина (пиридин в 0.1 н растворе NaOH в соотношении 1 : 3), после перемешивания общий объем разделяли на две части, в одной из которых пиридингемохромоген восстанавливали дитионитом натрия, а в другой – окисляли феррицианидом калия. После этого измеряли оптическое поглощение восстановленного пиридингемохромогена против окисленного при 556 и 539 нм. Определяли разницу  $\Delta D = (D_{556\text{red}} - D_{556\text{oxi}}) - (D_{539\text{red}} - D_{539\text{oxi}})$  и рассчитывали концентрацию гемовых групп, используя значение коэффициента миллимолярной экстинкции  $\Delta E = 4.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , определенное нами для данного  $\Delta D$  [20]. В качестве стандартного белка использовали Mb.

**Определение пероксидазной активности.** Пероксидазную активность гемопротеидов измеряли с использованием в качестве донора электронов *o*-дианизидина по методу [21] с модификациями. Продукт окисления *o*-дианизидина определяли при длине волны 454 нм ( $\epsilon_{454} = 30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Состав реакционной смеси: 0.1 М К-фосфатный бу-



**Рис. 1.** Зависимость начальных скоростей пероксидазной реакции, катализируемой Lb клубеньков бобов, от концентрации *t*-BOOH (а), от концентрации *o*-дианизида (б), от концентрации Lb (в).

фер (рН 7.5), 0.8 мМ *o*-дианизидин, 8 мкМ гемопротеид, 0.5 мМ *t*-BOOH. Измерения проводили при температуре 25°C на спектрофотометре “Cary” (“VarianBio”, США).

При определении рН-зависимости пероксидазной активности Lb, измерения проводили в различных буферных системах, оптимальных для поддержания рН в разных диапазонах: МЭС (рН 6.0), К-фосфатный буфер (рН 6.8 и 7.5), карбонатный буфер (рН 8.5 и 9.0).

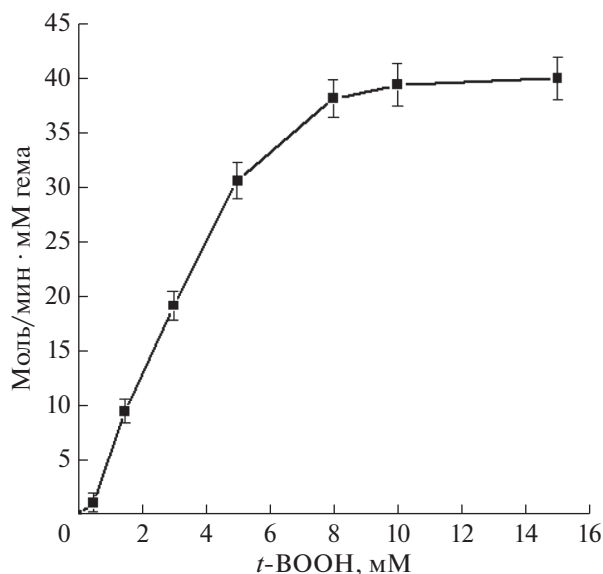
Все эксперименты были выполнены не менее, чем в трех повторностях. На графиках представлены средние величины. Статистическая обработка данных проводилась исходя из 3–4 аналитических повторностей в программе Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Пероксидазная активность Lb в зависимости от концентрации субстратов.** Пероксидазную активность выделенного Lb определяли с использованием *t*-BOOH и *o*-дианизида в качестве восстанавливающего субстрата.

Исследование пероксидазных свойств Lb проводили в сравнении с пероксидазой корня хрена (HRP) — наиболее изученной и широко используемой в биохимии истинной гемсодержащей пероксидазой [22]. В качестве восстанавливающего субстрата был применен искусственный донор электронов *o*-дианизидин, который ранее был использован в качестве субстрата для выявления пероксидазной активности Hb в плазме крови в совместной работе с Институтом физико-химической медицины (Москва, Россия), Белорусским государственным университетом и Научно-практическим центром “Кардиология” (Минск, Республика Беларусь) [14].

Были проведены измерения начальной скорости реакции для ряда концентраций *t*-BOOH (рис. 1а). Кинетическая схема реакции описывается классическим уравнением Михаэлиса-Ментен. Для определения константы Михаэлиса ( $K_m$ ) и максимальной скорости реакции ( $V_{max}$ ) данные были представлены в координатах Лайнуивера-Берка (пример показан на врезке рис. 1а). Были рассчитаны максимальная скорость реакции, константа Михаэлиса и субстратная константа ( $K_s$ ), характеризующая взаимодействие фермента с субстратом в равновесных условиях (табл. 1). Показано, что зависимость начальной скорости реакции от концентрации восстановителя — *o*-дианизида (рис. 1б) соответствует классической кинетике Михаэлиса. Была измерена зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента (рис. 1в). При концентрации Lb 3.0 мМ скорость пероксидазной реакции достигала максимального значения и выходила на плато.



**Рис. 2.** Зависимость начальной скорости пероксидазной реакции, катализируемой пероксидазой корней хрена, от концентрации *t*-BOOH.

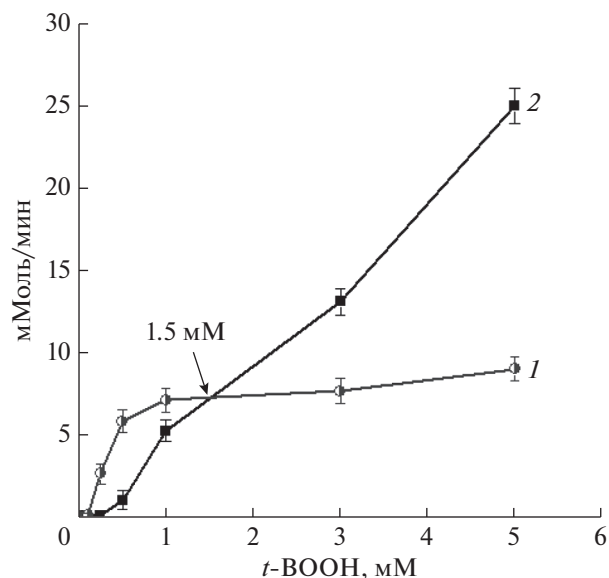
Анализ результатов, представленных на рис. 1, позволил выбрать концентрации *t*-BOOH и *o*-данизида, не лимитирующие скорость реакции, — 1.0 mM и 0.8 mM соответственно.

**Сравнение пероксидазной активности Lb и пероксидазы хрена.** В аналогичных условиях (см. Методика) была изучена способность пероксидазы корней хрена взаимодействовать с *t*-BOOH. Реакция, катализируемая HRP, как и в случае Lb, соответствует классической кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 2). HRP — истинная пероксидаза была использована для сравнения с Lb, который является псевдопероксидазой. Для HRP были определены параметры реакции (табл. 1). Максимальная скорость реакции, катализируемой HRP, в 57 раз превышала  $V_{max}$  для Lb (табл. 1). Константа Михаэлиса HRP в 10.8 раза превосходила такую для Lb.

Несмотря на то, что HRP была гораздо более активным катализатором разложения *t*-BOOH, структурные особенности этого фермента не благоприятствуют его взаимодействию с алифатиче-

**Таблица 1.** Кинетические параметры пероксидазной реакции с участием леоглобина клубеньков бобов и пероксидазы корней хрена

Параметр	Lb	HRP
$V_{max}$ , М/мин · mM гема	1.3	70.5
$K_m$ , mM	0.8	8.7
$K_s$ , mM	0.4	8.0



**Рис. 3.** Зависимость начальной скорости пероксидазной реакции, катализируемой суммарным препаратом Lb клубеньков бобов и пероксидазой корней хрена, от концентрации *t*-BOOH. 1 — Lb, 2 — HRP.

скими гидропероксидами, поскольку гем в этом ферменте расположен в узкой полости, что исключает возможность проникновения даже относительно небольших молекул [22]. Напротив, в структуре леоглобинов заложена способность к связыванию крупных лигандов [18, 23, 24]. Кроме того, проявлению пероксидазных свойств Lb также способствуют гидрофобное окружение гема, конформационная лабильность имидазольного кольца дистального гистидина и порфирина, а также наличие аргинина и аспарагина в дистальной области гемового кармана. Можно предположить, что функционально Lb занимает промежуточное положение между другими гемоглобинами и пероксидазами. Действительно, пероксидазная активность Lb на порядок выше, чем у Mb, но на несколько порядков ниже, чем у истинных пероксидаз [16].

Можно предположить, что несмотря на низкие скорости реакции, Lb все же способен вносить заметный вклад в элиминацию пероксидов за счет своего высокого содержания в инфицированных клетках клубенька — 0.1–0.5 mM, а в очень активных клубеньках — до 2–3 mM [1, 25]. Проведено сравнение зависимости начальных скоростей реакций от концентраций *t*-BOOH, катализируемых Lb и HRP, взятых в разных концентрациях: 8 мкM Lb и 0.8 мкM HRP (рис. 3). Анализ представленных на рис. 3 кривых показал, что при низких концентрациях *t*-BOOH ( $\leq 1.5$  mM) Lb по своей пероксидазной активности даже несколько превосходил HRP. Возможно, это связано с большей способностью гемового кармана Lb взаимодействовать с крупными соединениями.

Однако в отличие от истинных пероксидаз, большие концентрации пероксидов вызывают окислительное повреждение белка, вследствие чего снижается его каталитическая активность.

#### рН-зависимость пероксидазной активности Lb.

Известно, что пероксидазные свойства гемоглобинов зависят от рН раствора [6, 26, 27], поэтому было проверено, как меняется пероксидазная активность Lb в диапазоне рН от 6.0 до 9.0. При снижении рН с 9.0 до 6.0 пероксидазная активность Lb увеличивалась почти в 2 раза (на 85%) (рис. 4). Как известно, рН внутри клубенька находится в диапазоне 6.4–6.8, и только при старении снижается до 6.0 [28], поэтому изменение пероксидазной активности Lb в физиологическом диапазоне рН будет незначительным (~6%). Эти результаты хорошо соотносятся с данными по Mb, пероксидазная активность которого увеличивается при физиологическом снижении рН с 7.4 до 6.1 [27].

Зависимость разложения пероксидов от рН объясняется тем, что при низком значении рН оксоферрильный интермедиат (порфирин–Fe<sup>IV</sup>=O) протонируется с образованием интермедиата феррилгидроксила (порфирин–Fe<sup>IV</sup>–OH<sup>-</sup>) со значением рК = 3.5 (реакция 1) [6, 26]. Из-за нестабильности феррилгидроксила электронно

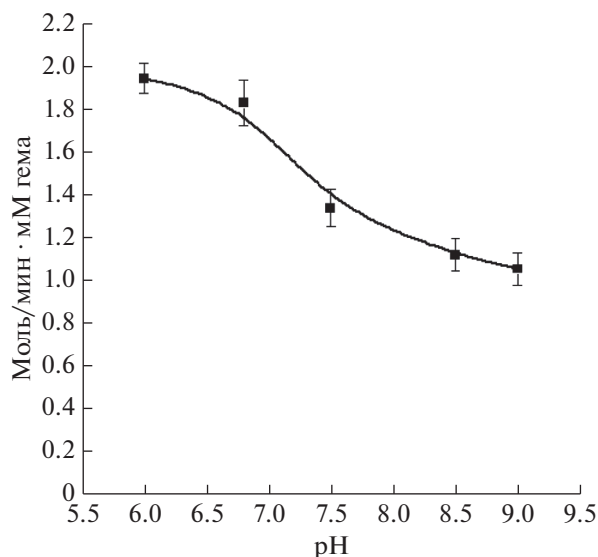
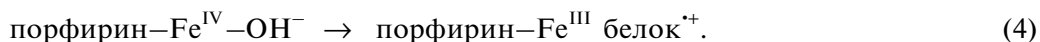
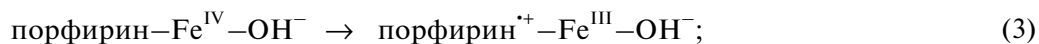
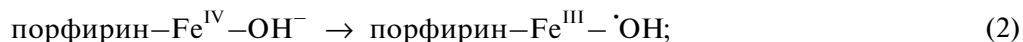


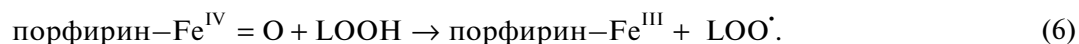
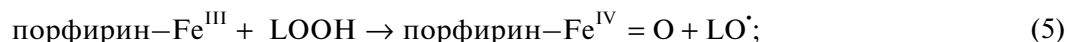
Рис. 4. рН-зависимость начальной скорости пероксидазной реакции, катализируемой Lb.

эквивалентен трехвалентному гему и радикалу на гидроксильном лиганде (реакция 2), порфирине (реакция 3) или белке (реакция 4):



Самовосстановление протонированной формы феррила происходит за счет отрыва электрона от порфиринового кольца, белка или другого субстрата. Эта форма обеспечивает быструю регенерацию белка до метформы (порфирин–Fe<sup>III</sup>), что и объясняет увеличение активности пероксидазы гемопротеидов при кислых значениях рН [6].

Кислая среда способствует не только элиминации перекисей, но и перекисному окислению ненасыщенных жирных кислот [29, 30], в результате которого образуются алкоксильные (RO<sup>•</sup>) и алкилпероксильные (ROO<sup>•</sup>) радикалы и гидроперекиси липидов (LOOH) [15, 26].



Аналогичные данные были получены и для Mb, который является структурным аналогом Lb. В случае Mb повышенное перекисное окисление липидов наблюдалось при рН 5.0–5.5 [29]. Эти реакции миоглобина имеют последствия при патологических процессах, сопровождающихся ацидозом: воспалении, ишемии/реперфузии миокарда и острой почечной недостаточности.

**Возможные механизмы пероксидазной активности гемоглобинов.** Пероксидазы (КФ 1.11.1.X) катализируют окисление широкого спектра субстратов под действием пероксида водорода и других пероксидов [22]. Их можно разделить на две группы: 1) ферменты, которые по своей природе являются пероксидазами (истинные пероксидазы), и 2) ферменты, которые превращаются в пе-

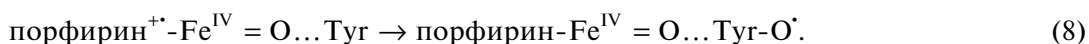
роксидазы в результате активации (псевдопероксидазы) [31].

Истинные пероксидазы устроены так, чтобы белковая часть не подвергалась повреждению оксоферрильными интермедиатами, являющимися окислителями субстратов. Наиболее яркая особенность таких пероксидаз — наличие ковалентных связей между гемом и белком, предотвращающих его деградацию, высвобождение и участие в неконтролируемых редокс-превращениях [32–34]. Кроме того, истинные пероксидазы не содержат окисляемых аминокислот в непосредственной близости от гема. Ковалентные связи между гемом и белком могут быть результатом действия специальных сшивающих ферментов или автокаталитического созревания. Например, сложноэфирные связи в пероксидазах млекопитающих — это результат автокаталитического созревания [35].

Каталитический цикл гем-содержащих пероксидаз начинается с быстрого взаимодействия фермента и  $H_2O_2$  с образованием Соединения I (порфирин<sup>++</sup>-[Fe<sup>IV</sup>=O]), которое содержит 2

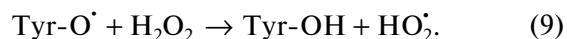
окислительных эквивалента: оксоферрил-гем и свободный радикал, локализованный в  $\pi$ -системе гема. Соединение I восстанавливается донором электронов, что приводит к образованию Соединения II, а затем нативного фермента [26, 36].

Взаимодействие Hb с  $H_2O_2$  или органическими пероксидами также приводит к двухэлектронному окислению белка с образованием феррильного интермедиата (порфирин-Fe<sup>IV</sup>=O) с катион радикалом на порфириновом кольце, аналогичного Соединению II истинных пероксидаз [15, 26]. Однако в отличие от пероксидаз, этот радикал мигрирует на аминокислоту (тирозин, триптофан, гистидин, цистеин), расположенную вблизи гемового кармана [15, 26]. В Lb обычно образуется феноксильный радикал тирозина [17, 18, 37]. Эти белковые радикалы участвуют в образовании межмолекулярных и внутримолекулярных сшивок гем-белок [18, 37, 38], поэтому участие Lb в пероксидазном каталитическом цикле, как правило, сопровождается окислительной инактивацией белка [17]:

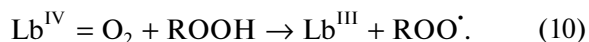


Легоглобины сои, гороха, фасоли, бобов содержат три остатка тирозина в позициях 25, 30 и 132 (133 у соевого Lb). Lb люпина содержит только один остаток тирозина в позиции 132, Тур-30 заменен на фенилаланин [39]. Тур-30 контактирует с гемом, а Тур-25 с крупными заряженными лигандами в шестом координационном положении гема. Остаток Тур-132 взаимодействует с винильной группой пиррольного кольца. На Тур-132, вероятнее всего, и образуется феноксильный радикал. Радикал может локализоваться и на остатке Тур-30, который также контактирует с гемом и, следовательно, с кислородом оксоферрильного интермедиата Lb-Fe<sup>IV</sup>=O [18]. У Mb и Hb, как правило, свободный радикал также локализуется на остатке тирозина [40].

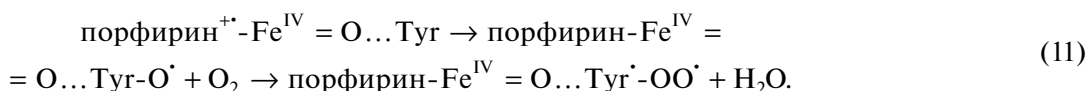
Феноксильный радикал тирозина может взаимодействовать с другой молекулой гидропероксида водорода:



В условиях высокой концентрации органических пероксидов они могут выступать в роли восстановителей оксоферрильной формы Lb, что сопровождается образованием пероксильных радикалов, которые усиливают окислительные повреждения:



Пероксильные радикалы могут образовываться на аминокислотных остатках самого белка, чаще всего на остатках триптофана, тирозина и цистеина, когда молекулярный кислород реагирует с радикалом аминокислоты [26]:



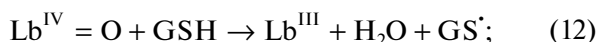
Радикалы аминокислот могут окислять другие молекулы: или субстраты, или сам белок. В первом случае окисляются крупные молекулы, которые не имеют доступа к гемовому карману [26, 41], во втором — происходит межмолекулярный пере-

нос электронов, сопровождающийся образованием белковых олигомеров.

Феррилформы Hb, Mb и Lb и радикалы, образовавшиеся на остатках аминокислот в белке,

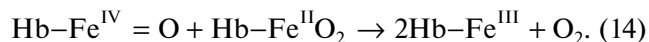
индуцируют реакции свободнорадикального окисления липидов мембран. Под действием образующихся при этом алкоксильных ( $RO\cdot$ ) и алкилпероксильных ( $ROO\cdot$ ) радикалов и гидропероксидов липидов (LOOH) [15, 26] происходит окислительная модификация Hb, приводящая к деградации гема и высвобождению ионов железа. Ионы железа катализируют образование свободных радикалов в реакциях Фентона и Хабера–Вайса [42]. Именно это отличает пероксидазы-гемоглобины от истинных пероксидаз, окислительная активность которых направлена на определенные субстраты. То же самое, скорее всего, происходит и с окисленными интермедиатами Lb.

Lb может функционировать в пероксидазном каталитическом цикле только при наличии веществ, восстанавливающих феррильный интермедиат до metLb. Одним из эффективных восстановителей  $Lb-Fe^{IV}=O$  является глутатион (GSH), присутствующий в больших концентрациях в растительных клетках клубеньков бобовых [43]. В результате этой реакции образуется окисленный дисульфид GSSG и тиольный радикал ( $GS\cdot$ ) согласно реакциям:



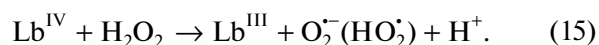
Другими физиологическими восстановителями ferrylLb могут быть НАДН, НАДФН, флавины, аскорбат и липоевая кислота [27, 44, 45], поэтому наличие достаточных количеств восстанавливающих субстратов может предотвратить как инактивацию Lb, так и перекисное окисление липидов.

Для Hb обсуждается еще один способ быстрого превращения оксоферрильного интермедиата в метформу – реакция конпропорционирования, когда окислителем и восстановителем является один и тот же химический элемент в разных степенях окисления [46]:



Эта реакция происходит за счет межмолекулярного переноса электронов между остатками тирозина молекул Hb [46].

В отличие от оксоферрилгемоглобина, феррилгемоглобин (гем- $Fe^{IV}$ ) вызывает не двух-, а одноэлектронное окисление  $H_2O_2$ :

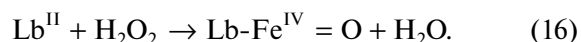


В ходе этой реакции образуется супероксид и далее происходит деградация гема [47].

Lb взаимодействует с  $H_2O_2$  не только в окисленной, но и в оксигенированной форме. В этом случае гемовая группа разрушается, высвобождая

$Fe^{2+}$ , который восстанавливает  $H_2O_2$  до высокоактивных гидроксильных радикалов.

Участвовать в пероксидазном каталитическом цикле может и deoxyLb, количество которого в клубеньках велико ~70–80% [48, 49]:



**Биологическая роль пероксидазной активности Lb.** Если биологическая функция истинных пероксидаз заключается в свободнорадикальном окислении различных органических субстратов пероксидом водорода и другими пероксидами, а также в антиоксидантной защите, то биологическое значение пероксидазных свойств гемоглобинов двояко: они катализируют и образование, и разложение пероксидазов [29, 30, 50]. Поэтому биологические последствия пероксидазной реакции гемоглобинов зависят от баланса между элиминацией пероксида (антиоксидантная защита) и продукцией свободных радикалов (окислительное повреждение). Этот баланс зависит от восстановительного статуса клеток, а именно от концентрации низкомолекулярных антиоксидантов: глутатиона, аскорбиновой и мочевиной кислот [12, 51].

Гемоглобины изначально не предназначены для взаимодействия с гидропероксидами. Они проявляют пероксидазную активность только тогда, когда меняются характеристики их активного центра. Это может происходить либо из-за изменения внешних условий (рН, окислительно-восстановительное состояние), либо как результат действия веществ-активаторов (посттрансляционные модификаторы аминокислотных остатков, гемовые лиганды). Например, в цитоглобинах такими активаторами служат анионные липиды, которые запускают структурные перестройки белка, ведущие к его переходу из гексакоординированного состояния в пентакоординированное, делая гем доступным для гидропероксидной группы ROOH [52].

Обсуждается вклад псевдопероксидазной активности гемоглобинов в антиоксидантную защиту. Например, пероксидазная активность Mb может быть частью антиоксидантной системы сердечных и скелетных мышц, особенно в условиях интенсивной работы или при гипоксии [27, 53]. Причем за счет пероксидазной реакции Mb может участвовать в детоксикации этанола и ацетальдегида, восстанавливающих ferrylMb. Имеются данные, свидетельствующие о способности внеклеточного Hb (deoxyHb и metHb) защищать клетки от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями  $H_2O_2$  [54, 55]. Цитоглобин и нейроглобин также могут вносить свой вклад в антиоксидантную защиту клеток, устраняя избыток пероксидов [56].

Пероксидазная активность Lb может иметь биологическое значение при старении корневых клубеньков, когда повышается концентрация metLb

[16, 23, 37, 57]. Старение клубеньков также сопровождается смещением рН в кислую сторону [58], что способствует усилению пероксидазной активности Lb и связанного с этим перекисного окисления липидов. Кроме того, в результате старения клубеньков возрастает количество гемового комплекса Lb с никотиновой кислотой (NA) — Lb<sup>III</sup>-NA [23]. Образование Lb<sup>III</sup>-NA в стареющих клубеньках предотвращает развитие окислительных процессов, вызванных metLb, поскольку этот комплекс не подвергается окислению пероксидом водорода до оксоферрильных интермедиатов [17].

Возможно существование механизмов, повышающих пероксидазную активность Lb при окислительном стрессе. Например, в Mb ковалентное связывание гема с белком (Mb-X) под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> увеличивает пероксидазную активность [53]. Хотя Lb во многом подобен миоглобину, неизвестно, происходит ли активация его пероксидазной функции таким же способом, хотя при взаимодействии с пероксидами в Lb также происходит пришивка гема к белку через остаток тирозина. Это приводит к образованию зеленого соединения со спектральными характеристиками, отличными от феррил- и мет-формы Lb, так называемого леглобина. Это соединение отличается от обратимого Mb-X, поскольку не восстанавливается аскорбатом [59].

Таким образом, Lb может функционировать как пероксидаза по отношению к органическому гидропероксиду — пероксиду *трет*-бутила. Органические гидроперекиси в больших количествах могут образовываться в клетках клубенька при развитии окислительного стресса [60]. Несмотря на то, что по каталитической активности Lb значительно уступает истинным пероксидазам, учитывая высокую концентрацию этого гемопротеида в клетках клубенька, он может обеспечить дополнительную антиоксидантную защиту в этих условиях. К тому же включение Lb в пероксидазный каталитический цикл может быть более эффективным и быстрым клеточным ответом на окислительный стресс, чем синтез *de novo* истинных цитоплазматических пероксидаз.

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verma D.P.S., Bal A.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 11. P. 3843–3847.
2. Layzell D.B., Atkins C.A. // In: *Plant Metabolism.* / Eds. D.T. Dennis et al. Harlow, Essex, UK: Longman, 1997. P. 495–505.

3. Topunov A.F., Rozov F.N., Petrova N.E. // Russian J. Plant Physiol. 1998. V. 45. № 6. P. 814–819.
4. Vinogradov S.N., Hoogewijs D., Bailly X., Mizuguchi K., Dewilde S., Moens L., Vanfleteren J.R. // Gene. 2007. V. 398. № 1. P. 132–142.
5. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 6. P. 627–653.
6. Reeder B.J., Wilson M.T. // Free Radic. Biol. Med. 2001. V. 30. P. 1311–1318.
7. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. № 12–13. P. 1575–1593.
8. Keilin D., Hartree E.F. // Nature. 1950. V. 166. № 4221. P. 513–514.
9. George P., Irvine D.H. // Biochem. J. 1952. V. 52. P. 511–517.
10. Franzen S., Gilvey L.B., Belyea J. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1. P. 1718–2294.
11. D’Angelo P., Lucarelli D., della Longa S., Benfatto M., Hazemann J. L., Feis A., Smulevich G., Ilari A., Bonamore A., Boffi A. // Biophys. J. 2004. V. 86. P. 3882–3892.
12. Ferreira J.C., Marcondes M.F., Icimoto M.Y., Cardoso T.H.S., Tofanello A., Pessoto F.S., Miranda E.G.A., Prieto T., Nascimento O.R., Oliveira V., Nantes I.L. // PLoS ONE. 2015. V. 10. № 8. e0136554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136554>
13. Gorbunov N.V., Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 6689–6699.
14. Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Sokolov A.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Buko I.V., Konstantinova E.E., Chherenkevich S.N., Panasenko O.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. V. 155. № 1. P. 118–121.
15. Reeder B.J. // Antioxid. Redox Signal. 2017. V. 26. P. 763–776.
16. Sievers G., Rönnberg M. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 533. № 2. P. 293–301.
17. Puppo A., Rigaud J., Job D., Ricard J., Zeba B. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 614. № 2. P. 303–312.
18. Davies M.J., Puppo A. // Biochem. J. 1992. V. 281. № 1. P. 197–201.
19. Riggs A. // Methods in Enzymology. 1981. V. 76. P. 5–29.
20. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. № 3. P. 313–319.
21. Лебедева О.В., Узарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1977. V. 42. № 8. P. 1372–1379.
22. Захарова Г.С., Упоров И.В., Тишков В.И. // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. С. 37–64.
23. Klucas R.V., Appleby C.A. // Plant Physiol. 1991. V. 95. № 2. P. 551–555.
24. Singh S., Varma A. // In: *Rhizobium Biology and Biotechnology.* Eds. / A.P. Hansen Luxembourg: Springer, 2017. P. 309–330.
25. Davies M.J., Mathieu C., Puppo A. // Adv. Inorg. Chem. 1999. V. 46. P. 495–542.
26. Svistunenko D.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1707. P. 127–155.
27. Mannino M.H., Patel R.S., Eccardt A.M., Perez Mag-nelli R.A., Robinson C.L.C., Janowiak B.E., Warren D.E., Fisher J.S. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2019. V. 234. P. 9–17.
28. Appleby C.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. V. 188. P. 222–229.



29. Fantone J., Jester S., Loomis T. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 9408–9411.
30. Rodriguez-Malaver A.J., Leake D.S., Rice-Evans C.A. // FEBS Lett. 1997. V. 406. P. 37–41.
31. Vlasova I.I. // Molecules. 2018. V. 23. 10. P. 2561.
32. Huang L., Wojciechowski G., Ortiz de Montellano P.R. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 18983–18988.
33. Auer M., Nicolussi A., Schütz G., Furtmüller P.G., Obinger C.J. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 45. P. 31480–31491.
34. Singh P.K., Iqbal N., Sirohi H.V., Bairagya H.R., Kaur P., Sharma S., Singh T.P. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2018. V. 133. P. 49–55.
35. de Montellano P.R.O. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 36. P. 21833–21844.
36. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. // Успехи биологической химии. 2006. V. 46. P. 303–322.
37. Moreau S., Davies M.J., Mathieu C., Herouart D., Puppo A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 51. P. 32557–32562.
38. Moreau S., Davies M.J., Puppo A. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1251. № 1. P. 17–22.
39. Arredondo-Petter R., Esamilla E. // Plant Molecular Biology Reporter. 1991. V. 9. № 3. P. 195–207.
40. Svistunenko D.A., Dunne J., Fryer M., Nicholls P., Reeder B.J., Wilson M.T., Bigotti M.G., Cutruzzolà F., Cooper C.E. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 2845–2855.
41. Reeder B.J., Grey M., Silaghi-Dumitrescu R.L., Svistunenko D.A., Bülow L., Cooper C.E., Wilson M.T. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 30780–30787.
42. Reeder B.J., Svistunenko D.A., Cooper C.E., Wilson M.T. // Antioxid. Redox Signal. 2004. V. 6. P. 954–966.
43. Puppo A., Monny C., Davies M.J. // Biochem. J. 1993. V. 289. P. 435–438.
44. Saari L.L., Klucas R.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 912. № 2. P. 198–202.
45. Becana M., Salin M.L., Ji L., Klucas R.V. // Planta. 1991. V. 183. № 4. P. 575–583.
46. Giulivi C., Davies K.J.A. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 19453–19460.
47. Nagababu E., Rifkind J.M. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 12503–12511.
48. Puppo A., Halliwell B. // Planta. 1988. V. 173. P. 405–410.
49. Becana M., Klucas R.V. // Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 1217–1221.
50. Kanner J., Harel S. // Arch. Biochem. Biophys. 1985. V. 237. P. 314–321.
51. Cooper C.E., Silaghi-Dumitrescu R., Rukengwa M., Alayash A.I., Buehler P.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1784. P. 1415–1420.
52. Tejero J., Kapralov A.A., Baumgartner M.P., Sparacino-Watkins C.E., Anthony mutu T.S., Vlasova I.I., Camacho C.J., Gladwin M.T., Bayir H., Kagan V.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1861. № 5. P. 381–401.
53. Mannino M.H., Patel R.S., Eccardt A.M., Janowiak B.E., Wood D.C., He F., Fisher J.S. // Antioxidants. 2020. V. 9. № 6. e549. <https://doi.org/10.3390/antiox9060549>
54. Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P., Vallelian F., Schoedon G., Buehler P.W., Schaer D.J. // Antioxid. Redox Signal. 2010. V. 12. P. 185–198.
55. Schaer D.J., Buehler P.W., Alayash A.I., Belcher J.D., Vercellotti G.M. // Blood. 2013. V. 121. P. 1276–1284.
56. Li D., Chen X.Q., Li W.J., Yang Y.H., Wang J.Z., Yu A.C. // Neurochem. Res. 2007. V. 32. P. 1375–1380.
57. Lee K.-K., Shearman L.L., Erickson B.K., Klucas R.V. // Plant. Physiol. 1995. V. 109. № 1. P. 261–267.
58. Pladys D., Barthe P., Rigaud J. // Plant Sci. 1988. V. 56. P. 99–106.
59. Moreau S., Davies M.J., Puppo A. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1251. № 1. P. 17–22.
60. Evans P.J., Gallesi D., Mathieu C., Hernandez M.J., de Felipe M., Halliwell B., Puppo A. // Planta. 1999. V. 208. P. 73–79.

## Peroxidase Activity of Leghemoglobin of the Bean (*Vicia faba* L.) Nodules in Relation to *tert*-Butyl Hydroperoxide

O. V. Kosmachevskaya<sup>a</sup>, E. I. Nasybullina<sup>a</sup>, and A. F. Topunov<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

Leghemoglobin (Lb) – hemoglobin of legume nodules, like many other hemoglobins, demonstrates peroxidase activity and can oxidize various substances with the participation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or organic peroxides. The peroxidase activity of Lb isolated from bean nodules (*Vicia faba* L.) was studied in reaction with *tert*-butyl hydroperoxide, an analog of organic hydroperoxides, and *o*-dianisidine as a reducing substrate. The reaction catalyzed by Lb had classical Michaelis kinetics ( $V_{\max} = 1.3$  M/min mM of heme,  $K_m = 0.8$  mmol/L). The concentrations of substrates not limited the peroxidase reaction rate were determined – 0.8 mmol/L for *o*-dianisidine and 1 mmol/L for *tert*-butyl hydroperoxide. With pH decrease from 9 to 6, Lb peroxidase activity increased almost twice. This may be important for nodules *in vivo*, for example, during their aging, when pH decreases and oxidized Lb content increases. Although Lb is inferior in peroxidase activity to the true peroxidases, it can provide additional antioxidant protection under oxidative stress, considering its high concentration in nodules.

**Keywords:** leghemoglobin, hemoglobin, myoglobin, horse radish peroxidase, pseudoperoxidase activity, *tert*-butyl hydroperoxide