



УДК 577.152.193.04

СТРОЕНИЕ КОМПЛЕКСА МИКРОПЕРОКСИДАЗЫ-11
С *L*-ГИСТИДИНОМ И ЕГО КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Разумас В. И., Казаускайте Ю. Д., Кулис Ю. Ю.

Институт биохимии Академии наук ЛитССР, Вильнюс

Микропероксидаза-11 (МР-11) образует с *L*-гистидином стехиометрический комплекс с переносом заряда. Комплексообразование определяется двумя ионогенными группами с pK_a 4,3 и 8,9. Константы ассоциации равны 78,3; 4,5 и 1,2 мМ^{-1} в кислой, нейтральной и щелочной среде соответственно. Ассоциация с *L*-гистидином приводит к ингибированию пероксидазной активности МР-11. В нейтральной среде аминокислота по отношению к *o*-диазизидину и ферроцианиду является ингибитором смешанного типа. При рН 7,0 *L*-гистидин уменьшает скорость окисления МР-11 перекисью водорода приблизительно в 75 раз.

Широкий спектр реакций, катализируемых гемсодержащими белками, определяется главным образом окружением гема. Электрон-транспортные белки отличаются от ферментов шестым аксиальным лигандом железа порфиринового кольца. В переносчиках электронов это имидазольное кольцо гистидина или тиоэфирный остаток метионина, в ферментах — более слабый нуклеофил — молекула воды, которая в ходе каталитического акта замещается молекулой перекиси водорода или кислородом.

Гемсодержащий ундекапептид (Val-Gln-Lys-Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Gly) получают при гидролизе цитохрома *c* пепсином [1]. Пептидная цепь связана с протопорфирином IX посредством двух остатков цистеина. Ундекапептид обладает в 350 раз большей пероксидазной активностью по сравнению с цитохромом *c*, поэтому он назван микропероксидазой-11 (МР-11) [2]. Превращение электрон-транспортной функции цитохрома *c* в пероксидазную при отщеплении значительной части полипептидной цепи, по-видимому, обусловлено отсутствием метионина в качестве шестого аксиального лиганда.

Известно, что гемовое железо МР-11 способно образовывать координационную связь с пиридином [1], имидазолом [1, 3] и гистидином [4]. Однако структура комплексов, их термодинамические параметры и влияние комплексообразования на каталитические свойства МР-11 не изучены.

Цель настоящей работы — исследовать методом спектрофотометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света структуру комплекса МР-11 с *L*-гистидином и выявить влияние комплексообразования на каталитическую функцию МР-11.

В микромолярных концентрациях МР-11 при рН 7,0 обладает максимумом полосы поглощения Core при 395 нм. В дифференциальных спектрах поглощения смесей МР-11 с *L*-гистидином присутствуют максимумы 395 и 410 нм и изобестическая точка при 403 нм (рис. 1).

Кажущуюся константу ассоциации ($K_{ac}^{наж}$) МР-11 с гистидином рассчитывали по уравнению Клотца и Ханстона [5]

$$1/\Delta A = 1/\Delta A_{\infty} + 1/(K_{ac}^{наж} \Delta A_{\infty} c), \quad (1)$$

где ΔA — регистрируемое изменение поглощения раствора при образовании комплекса, ΔA_{∞} — изменение поглощения в условиях полного насыщения МР-11 гистидином, c — молярная концентрация гистидина. Обработка данных рис. 1 в координатах ($1/\Delta A$, $1/c$) приводит (при рН 7,0) к величине $K_{ac}^{наж} = 3,27 \pm 0,18 \text{ мМ}^{-1}$. Строгая линейность зависимости в обратных координатах указывает на образование комплекса в соотно-

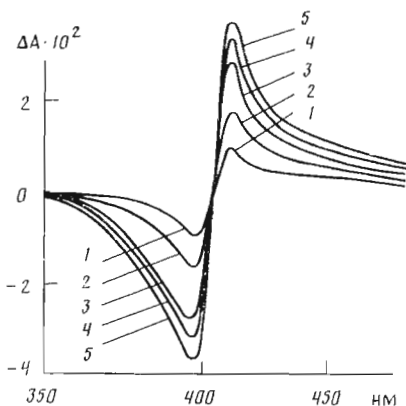


Рис. 1. Дифференциальные спектры титрования МР-11 (1,95 мкМ) *L*-гистидином при его концентрации в конечной смеси 0,05 (1), 0,146 (2), 0,455 (3), 0,652 (4) и 1 мМ (5) в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0 (25° С)

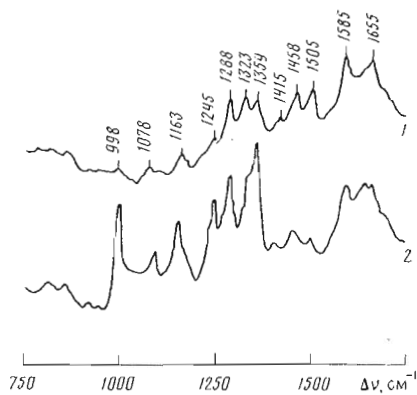


Рис. 2. Спектры КР водных растворов *L*-гистидина (1) и его смеси с микропероксидазой-11 (2). Концентрация гистидина в конечной смеси — 0,2 М (1, 2), МР-11 — 3,5 мкМ (2), рН 7,0. $\lambda_{\text{возб}}$ 488 нм, ширина щели 6 см⁻¹ (25° С)

пении 1 : 1. $K_{\text{ас}}^{\text{каж}}$ не зависит от ионной силы раствора. Поэтому можно заключить, что геминное железо МР-11 координирует с нейтральной формой имидазольного цикла гистидина, а не зависящая от степени ионизации гистидина константа равновесия $K_{\text{ас}} = K_{\text{ас}}^{\text{каж}} (1 + ([\text{H}^+]/K)) = 3,6 \pm 0,2 \text{ мМ}^{-1}$, где K — константа диссоциации протонированной формы гистидина, равная 10^{-6} М [6].

Аналогичным образом установлено, что при рН 7,0 $K_{\text{ас}}$ восстановленной формы МР-11 с гистидином ($K_{\text{ас}}^{\text{вост}}$) равна $0,75 \pm 0,09 \text{ мМ}^{-1}$. Отсюда, используя формулу

$$\Delta E = E_{\text{к}}^0 - E^0 = (RT/F) \ln (K_{\text{ас}}^{\text{вост}}/K_{\text{ас}}) \quad (2)$$

($E_{\text{к}}^0$ — стандартный потенциал комплекса, $E^0 = -0,19$ В [4] — стандартный потенциал МР-11, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — константа Фарадея), получаем, что комплексообразование приводит к уменьшению потенциала МР-11 на 40 мВ.

Детальное исследование комплекса МР-11 с гистидином выполнено методом спектроскопии КР (рис. 2). Линии в спектре гистидина при 998, 1323 и 1359 см⁻¹ отвечают деформационным колебаниям (δR) скелета нейтрального имидазольного цикла [7]. Максимумы при 1163, 1245, 1585 и 1655 см⁻¹ вызваны смещением деформационных колебаний и связи N3-H имидазола, а смешанные деформационные колебания и связи C2-H имидазола наблюдаются при 1078 и 1505 см⁻¹. Деформационные колебания связей C2-H и N3-H проявляются при 1288 и 1458 см⁻¹ соответственно. Линия при 1415 см⁻¹ отвечает симметричным деформационным колебаниям ионизированной карбоксильной группы. В спектре КР смеси аминокислоты с МР-11 не наблюдается новых линий по сравнению со спектром гистидина. Спектр КР 3,5 мкМ водного раствора МР-11 совпадает с фоном. Однако в спектре смеси интенсивность максимумов, относящихся к колебаниям δR , $\delta R + \delta$ (N3-H) и $\delta R + \delta$ (C2-H), сильно возрастает. Этот эффект связан с резонансным усилением КР (РКР), которое обусловлено образованием между МР-11 и гистидином комплекса с переносом заряда (КПЗ). Положение линий в спектрах КР и РКР зависит от свойств основного электронного состояния [8].

Поскольку положения линий в спектрах гистидина и его комплекса с МР-11 практически идентичны, можно заключить, что при комплексообразовании распределение электронной плотности в имидазоле гистидина не претерпевает существенных изменений. В свою очередь интенсивность линий в спектре РКР коррелирует со свойствами возбужденного элект-

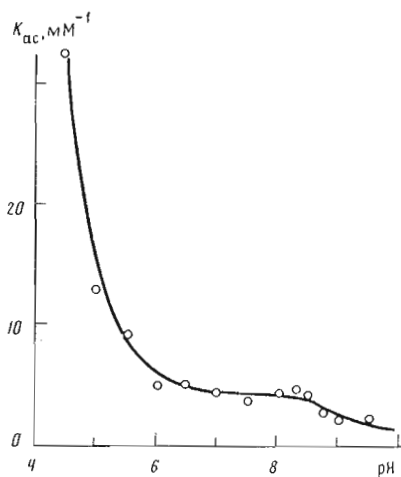


Рис. 3

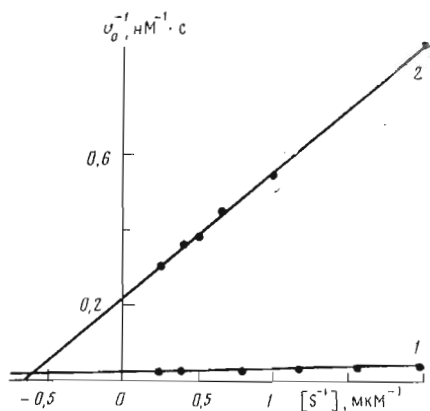


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость константы ассоциации микропероксидазы-11 с *L*-гистидином от pH. Точки — экспериментальные данные, кривая — аппроксимация данных для трех форм МР-11 с pK_a 4,33 и 8,90 и величин констант ассоциации 78,33; 4,53 и 1,17 mM^{-1}

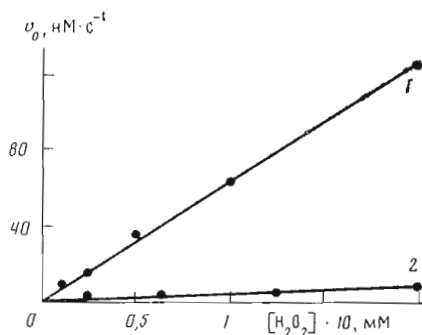
Рис. 4. Зависимость начальной скорости окисления *o*-дианизидина перекисью водорода при действии микропероксидазы-11 (1) и ее комплекса с *L*-гистидином (2). Концентрация МР-11 — 0,1 μM (1, 2), H_2O_2 — 0,25 mM (1, 2), гистидина — 2 mM (2) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0 (25° С). Все концентрации компонентов приведены для конечной смеси

ронного состояния [8]. Поэтому из-за того, что в спектре комплекса усиливаются колебания, связанные с деформацией скелета имидазольного цикла, в возбужденном состоянии комплекса происходит сильное перераспределение электронной плотности между имидазолом гистидина и гемовым железом, а комплексообразование протекает с участием атома N1. Именно поэтому колебания $\delta\text{N3-H}$ при 1450 cm^{-1} и $\delta\text{C2-H}$ при 1288 cm^{-1} существенно не усиливаются. При сравнении спектров КР гистидина и РКР смеси также выявляется, что в линии при 1078 , 1163 и 1245 cm^{-1} основной вклад вносят колебания типа δR . С другой стороны, максимумы при 1505 , 1585 и 1655 cm^{-1} обусловлены главным образом деформационными колебаниями связей C2-H и N3-H.

Поскольку K_{ac} не зависит от ионной силы раствора и при больших концентрациях гистидина (избыток в $6 \cdot 10^4$ раз) МР-11 в смеси полностью входит в комплекс, сравнивая интенсивность линий δR при 998 cm^{-1} в спектрах КР и РКР, можно заключить, что комплексообразование приводит к резонансному усилению в 10^5 . Столь значительное усиление может быть достигнуто в том случае, если полипептидная цепь способствует благоприятной ориентации для эффективного перекрытия орбиталей лиганда и металла. Исходя из аналогии комплекса пентацианоферрата с имидазолом [9], наиболее вероятно, что в КПЗ МР-11 с гистидином образуется донорная π -связь $\text{His}(\pi_2) \rightarrow \text{Fe}(d_\pi)$, где π_2 — низшая орбиталь лиганда с симметрией π , а d_π — t_{2g} -орбитали железа.

Константа ассоциации окисленной формы МР-11 K_{ac} зависит от pH (рис. 3). Экспериментальные точки хорошо описываются теоретической кривой, если принять, что МР-11 в интервале pH 4,5—9,5 существует в трех формах, характеризующихся двумя pK_a ионогенных групп — $4,33 \pm 0,06$ (pK_a) и $8,90 \pm 0,27$ (pK_a). Не зависящие от pH константы K'_{ac} , K''_{ac} и K'''_{ac} равны $78,33 \pm 2,21$, $4,53 \pm 0,02$ и $1,77 \pm 0,22 \text{ mM}^{-1}$ в кислой, нейтральной и щелочной областях соответственно. Расчеты этих величин провели, полагая $K'_{ac}/K_{ac} = 1 + (K_a/[\text{H}^+]) + (K_a K'_a/[\text{H}^+]^2)$, $K''_{ac}/K_{ac} = 1 + ([\text{H}^+]/K_a) + (K'_a/[\text{H}^+])$, а $K'''_{ac}/K_{ac} = 1 + ([\text{H}^+]/K'_a) + ([\text{H}^+]^2/K_a K'_a)$ [10].

Рис. 5. Зависимость начальной скорости окисления *o*-дианизидина микропероксидазой-11 (1) и ее комплексом с *L*-гистидином (2). Концентрация МР-11 — 0,2 мкМ (1), 1 мкМ (2), *o*-дианизидина — 1 мкМ (1, 2), гистидина — 20 мМ (2). Другие условия см. рис. 4. Концентрации компонентов приведены для конечной смеси



Октапептид микропероксидаза-8 (МР-8), отличающийся от МР-11 отсутствием N-концевой аминокислотной последовательности Val-Gln-Lys, также содержит две ионогенные группы с $pK_a = 4,43$ и $pK_a' = 8,90$ [11]. Эти величины определяются протонированием аксиального лиганда полипептидной цепи — гистидина (pK_a) и второго аксиального лиганда — молекулы воды (pK_a'). Близость значений pK_a и pK_a' МР-11 и МР-8 указывает на одинаковую природу рН-зависимых форм этих полипептидов. При $pH < 4,33$ протонированный имидазол гистидина полипептидной цепи не образует координационной связи с гемовым железом, а положения аксиальных лигандов занимают две молекулы воды ($H_2O-Fe-OH_2$). Нейтральная форма имидазольного цикла гистидина вытесняет одну молекулу воды из координационной сферы железа ($His-Fe-OH_2$), а в щелочной области рН имеет место депротонирование молекулы воды ($His-Fe-OH^-$). Большая величина $K'_{сc}$ в кислой среде может быть объяснена изменением конформации полипептидной цепи и свободным замещением молекулы воды гистидином из раствора. Замещение молекулы воды в нейтральной форме МР-11 — $His-Fe-OH_2$ протекает труднее, а ассоциация гистидина в щелочной области рН дополнительно затруднена высокой нуклеофильностью гидроксила.

В интервале концентраций H_2O_2 0,02—0,25 мМ окисление *o*-дианизидина, катализируемое МР-11 и ее комплексом с гистидином, протекает по схеме Михаэлиса — Ментен (рис. 4). При концентрации H_2O_2 0,25 мМ каталитические константы скорости ($k_{кат}$) и константы Михаэлиса (K_m) для МР-11 и комплекса равны $4,70 \pm 0,06$ и $0,045 \pm 0,003$ с⁻¹; $0,51 \pm 0,15$ и $1,44 \pm 0,34$ мкМ соответственно (рН 7,0). Окисление ферроцианида с участием МР-11 при той же концентрации H_2O_2 и рН характеризуется $k_{кат} = 27,3 \pm 2,0$ с⁻¹ и $K_m = 1,76 \pm 0,20$ мкМ. Комплексование МР-11 с гистидином приводит к уменьшению $k_{кат}$ окисления ферроцианида в 5,8 и увеличению K_m в 2,1 раза. Следовательно, гистидин по отношению к *o*-дианизидину и ферроцианиду выступает в качестве ингибитора смешанного типа [12]. Поскольку ферроцианид окисляется с большей скоростью по сравнению с *o*-дианизидином, можно заключить, что в отличие от окисления, катализируемого пероксидазой хрена [12], окисление под действием МР-11 протекает по другому механизму.

В присутствии насыщающих концентраций *o*-дианизидина скорость его окисления под действием МР-11 линейным образом зависит от концентрации H_2O_2 (рис. 5). При комплексации МР-11 с гистидином скорость уменьшается. При условии, что на образование продукта требуется по две молекулы субстрата и H_2O_2 [13], рассчитанные бимолекулярные константы скорости окисления равны $(6,33 \pm 0,28) \cdot 10^3$ и 85 ± 16 М⁻¹·с⁻¹ для МР-11 и ее комплекса с гистидином соответственно. Полученная константа для МР-11 совпадает с константой для МР-8 [14]. Следовательно, каталитические свойства этих полипептидов определяются природой аксиальных лигандов железа порфиринового цикла.

Авторы выражают благодарность Г. Видугирису и Ю. Веножинскому за помощь при выполнении спектроскопических измерений и проведение расчетов.

Экспериментальная часть

В работе использовали натриевую соль МР-11 из цитохрома с сердца лошади (Sigma, США). Концентрацию полипептида определяли спектрофотометрически — $\epsilon_{395} = 1,76 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [15]. *L*-Гистидин (Reanal, ВНР) дважды перекристаллизовывали из бидистиллированной воды. При изучении рН-зависимости ассоциации МР-11 с гистидином и каталитической функции использовали 0,1 М буферные растворы: натрий-ацетатный (рН 4,0—5,5), калий-фосфатный (рН 6,0—7,5), натрий-боратный (рН 7,5—8,75) и натрий-карбонатный (рН 9,0—9,5). Восстановление МР-11 проводили 10-кратным молярным избытком дитионита натрия.

При изучении каталитической функции МР-11 и ее комплекса с гистидином использовали ферроцианид калия марки х. ч., *o*-дианизидин марки ч., перекристаллизованный из ацетона, и перекись водорода (медицинская, 31%). Растворы *o*-дианизидина готовили в этаноле. Концентрацию перекиси водорода определяли спектрофотометрически — $\epsilon_{230} = 72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [13]. Комплекс МР-11 готовили, добавляя в ее раствору *L*-His до 1000-кратного молярного избытка в конечной смеси. За кинетикой пероксидазной реакции следили, измеряя начальную скорость (v_0) окисления *o*-дианизидина при λ 460 нм ($\epsilon = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) или ферроцианида при λ 420 нм ($\epsilon = 1050 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [13].

Все эксперименты проводили при $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

В работе использовали спектрофотометр Hitachi-557 (Япония). Спектры комбинационного рассеяния (КР) света регистрировали с применением автоматизированного на базе микро-ЭВМ ДВК-1 спектрометра ДФС-12 (кафедра общей физики и спектроскопии факультета физики Вильнюсского государственного университета). Для возбуждения спектров КР использовали аргоновый лазер ПА-120 (ГДР) с λ 488 нм и мощностью 200 мВт. Спектральная ширина щели 6 см^{-1} .

Аппроксимацию экспериментальных результатов проводили с использованием микро-ЭВМ РС-ХТ фирмы «IBM» (США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harbury H. A., Loach P. A. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. № 12. P. 3646—3653.
2. Kroehenbuhl J. P., Galardy R. E., Jamieson J. D. // J. Exp. Med. 1974. V. 139. № 1. P. 208—223.
3. Baumgartner C. P., Sellers M., Nassif S. R., May L. // Eur. J. Biochim. 1974. V. 46. № 3. P. 625—630.
4. Harbury H. A., Loach P. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1959. V. 45. № 9. P. 1344—1359.
5. Klotz J. M., Hunston D. L. // Biochemistry. 1971. V. 10. № 15. P. 3065—3068.
6. Лекинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. С. 85.
7. Caswell D. S., Spiro T. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 21. P. 6470.
8. Кэру И. Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. М.: Мир, 1985. С. 48—53.
9. Walters M. A., Spiro T. G. // Inorg. Chem. 1983. V. 22. № 26. P. 4014—4017.
10. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Иностран. лит., 1961. С. 113—128.
11. Baldwin D. A., Marques H. M., Pratt J. M. // J. Inorg. Biochem. 1986. V. 27. № 4. P. 245—254.
12. Угарова Н. Н., Лебедева О. В., Курилина Т. А., Березин И. В. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 9. С. 1577—1584.
13. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 8. С. 1377—1379.
14. Baldwin D. A., Marques H. M., Pratt J. M. // J. Inorg. Biochem. 1987. V. 30. № 3. P. 203—217.
15. Paleus S., Ehrenberg A., Tuppy H. // Acta chem. scand. 1955. V. 9. № 2. P. 365—374.

Поступила в редакцию 17.XI.1988

THE STRUCTURE OF THE COMPLEX OF MICROPEROXIDASE-11 AND *L*-HISTIDINE AND ITS CATALYTIC PROPERTIES

RASTUMAS V. J., KAZLAUSKAITE J. D., KULYS J. J.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vilnius

Microperoxidase-11 (MP-11) and *L*-histidine form a stoichiometric charge transfer complex defined by two ionogenic groups with pK_a 4.3 and 8.9, the association constants being 78.3, 4.5 and 1.2 mM^{-1} in acid, neutral and alkaline media, respectively. Association with *L*-histidine leads to inhibition of the peroxidase activity of MP-11. Under neutral conditions the amino acid acts as a mixed type inhibitor with respect to *o*-dianisidine and ferrocyanide. At pH 7.0 *L*-histidine decreases the rate of MP-11 oxidation by hydrogen peroxide by a factor of 75.