

УДК 577.152.1

РОЛЬ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В РЕАКЦИЯХ ОКИСЛЕНИЯ БЫСТРО И МЕДЛЕННО ОКИСЛЯЕМЫХ СУБСТРАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ

В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина

(Якутская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра агробиохимии,
vrogozhin@mail.ru)

Изучена стационарная кинетика пероксидазного окисления *o*-дианизидина, гидрохинона и ферроцианида калия в присутствии индолил-3-уксусной кислоты, катализируемое пероксидазой хрена. Определены величины каталитических констант и констант ингибирования в интервале рН 4,5-7,5. Показано, что ауксин ингибирует пероксидазу в реакции окисления *o*-дианизидина по конкурентному типу, тогда как в реакциях окисления гидрохинона при кислых значениях рН проявляется неконкурентный характер ингибирования, переходящий при рН > 6,5 в смешанный тип. Присутствие ауксина не влияло на пероксидазное окисление ферроцианида калия. Предложены механизмы ингибирования ауксином реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина и гидрохинона.

Пероксидаза (ПО) катализирует реакции оксидазного и пероксидазного окисления неорганических и органических соединений перекисью водорода. Субстратами пероксидазы могут быть биологически активные вещества (НАДН, индолил-3-уксусная кислота (ИУК), аскорбиновая кислота, флавоноиды, фенотиазины и др.). В реакциях совместного окисления с участием быстро и медленно окисляемых субстратов отмечаются эффекты активирования окисления одного из субстратов, исследование которых позволит понять функциональную роль фермента в биогенных системах [1]. Известно [2, 3], что оксидазное окисление ИУК пероксидазой протекает через образование тройного комплекса фермент–ИУК–кислород. Исследование механизма окисления ИУК пероксидазой растений показало, что на поверхности белковой глобулы должен располагаться участок связывания ауксина [4–6], который может находиться в составе дистального домена фермента [7]. При этом считается, что в катализе пероксидазы принимает участие остаток Trp-117, удаленный на 8–9 Å от атомов азота порфиринового цикла, т.е. находящийся в зоне туннелирования электронов. При этом субдомен, включающий структурно сходные участки в дистальном домене пероксидазы, формируется в направлении от активного центра к поверхности дистального домена. Таким образом, центр связывания ИУК может располагаться вдали от активного центра пероксидазы

[7]. Причем оксидазное окисление ИУК может возрастать в присутствии гидрофобных аминокислот, тогда как полярные аминокислоты почти не оказывают влияния на каталитический процесс окисления ауксина. Установлена прямая корреляция между гидрофобностью аминокислот и степенью их влияния на скорость окисления ИУК [5]. Однако в литературе отсутствуют данные по влиянию ИУК на пероксидазное окисление различных неорганических и органических субстратов, катализируемое пероксидазой растений. Возможно, что проведение таких исследований позволило бы определить место локализации и протяженность активного центра фермента на поверхности белковой глобулы, установить участки их индивидуального связывания на ферменте, а также раскрыть причины широкой субстратной специфичности пероксидазы.

Для изучения влияния ИУК на катализируемые пероксидазой реакции окисления неорганических и органических соединений с участием перекиси водорода в качестве субстратов были выбраны *o*-дианизидин, гидрохинон и ферроцианид калия. Последний является медленно окисляемым субстратом пероксидазы, тогда как *o*-дианизидин и гидрохинон – быстро окисляемые субстраты этого фермента. Причем ранее было показано, что при совместном окислении гидрохинон и *o*-дианизидин могут конкурировать за место связывания в активном центре фермента [8].

Причем предварительное связывание *o*-дианизида улучшает последующее связывание гидрохинона, ускоряя процесс его пероксидазного окисления. Тогда как при совместном окислении гидрохинона и ферроцианида окисление последнего не происходит до тех пор, пока не окислится весь гидрохинон. На основании полученных данных было высказано предположение, что *o*-дианизидин и гидрохинон имеют разные участки связывания в области активного центра пероксидазы. Для подтверждения выявленных закономерностей было изучено влияние индолил-3-уксусной кислоты на реакции пероксидазного окисления *o*-дианизида, гидрохинона и ферроцианида калия в широком диапазоне pH, а также исследован механизм пероксидазного окисления выбранных субстратов в присутствии ИУК.

Экспериментальная часть

Реактивы. В работе использовали пероксидазу хрена ("Reanal", Венгрия) со спектральным показателем чистоты $RZ = 1,0$. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при $\lambda = 403$ нм ($\epsilon = 100 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [9]) и по пиридингеохромогену [10]. Использовали гидрохинон и индолил-3-уксусную кислоту ("Serva", Германия), ферроцианид калия ("Реахим", Россия); *o*-дианизидин марки "ч." очищали возгонкой в вакууме. Концентрацию перекиси водорода ("Реахим", Россия) определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения при 230 нм $72,7 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [11].

Методы. Реакцию окисления *o*-дианизида (17,2–172 мкМ), гидрохинона (0,1–0,5 мМ) или ферроцианида калия (0,36–1,44 мМ) перекисью водорода (0,64 мМ) проводили при 23°C в среде 0,1 М натрий-ацетатного (pH 4,5–6,0) или 0,1 М натрий-фосфатного (pH 6,0–7,5) буферов объемом 2,5 мл при разных значениях концентрации пероксидазы хрена. Окисление *o*-дианизида регистрировали по возрастанию поглощения при 460 нм ($\epsilon = 30 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [12]), ферроцианида калия – при 420 нм ($\epsilon = 1050 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [13]). За окислением гидрохинона наблюдали по уменьшению поглощения при 290 нм ($\epsilon = 2,2 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [8]).

Ингибирование пероксидазного окисления *o*-дианизида и гидрохинона индолил-3-уксусной кислотой изучали путем добавления в кювету вместе с субстратами (при насыщающей концентрации одного из

субстратов) пероксидазы ингибитора. Кинетические кривые снимали на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S ("Varian", США). За единицу активности фермента принимали его количество, окисляющее 1 мкмоль субстрата (*o*-дианизида, гидрохинона и ферроцианида калия) за 1 мин. Кажущиеся константы скорости окисления субстратов пероксидазы определяли по данным стационарной кинетики [14].

Результаты и их обсуждение

Известно, что ИУК является оксидазным субстратом пероксидазы, окисление которого возможно в реакциях с участием кислорода (при концентрации фермента 10^{-5} – 10^{-6} М), сопровождаемых характерными изменениями поглощения в ультрафиолетовой области. Поэтому предварительными исследованиями было показано, что в выбранных нами условиях (в диапазоне концентраций фермента в реакционной смеси 0,3–4,0 нМ) не наблюдаются реакции пероксидазного окисления ИУК при всех изученных значениях pH.

В дальнейшем было исследовано влияние индолил-3-уксусной кислоты на пероксидазное окисление *o*-дианизида, гидрохинона и ферроцианида калия, катализируемое пероксидазой хрена. Показано, что при pH 4,5–7,0 зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления *o*-дианизида в присутствии ИУК в координатах Лайнуивера–Берка имели вид пучка прямых, пересекающихся на оси ординат,

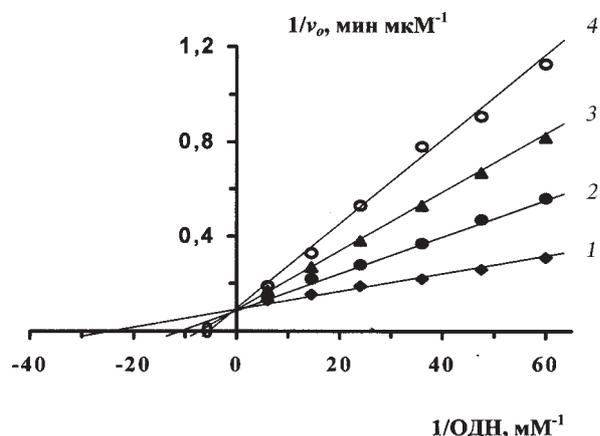


Рис. 1. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизида от его концентрации в двойных обратных координатах при разных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1 – 0, 2 – 10, 3 – 20, 4 – 30 (пероксидаза 0,56 нМ; перекись водорода 0,64 мМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7)

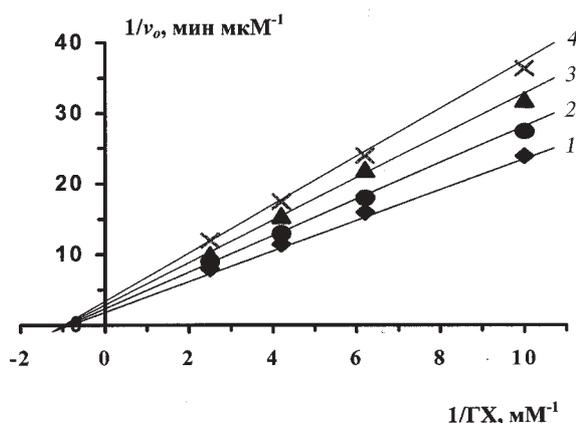


Рис. 2. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления гидрохинона от его концентрации в координатах Лайнуивера–Берка при разных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1 – 0, 2 – 20, 3 – 40, 4 – 60 (пероксидаза 4,0 нМ; перекись водорода 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5)

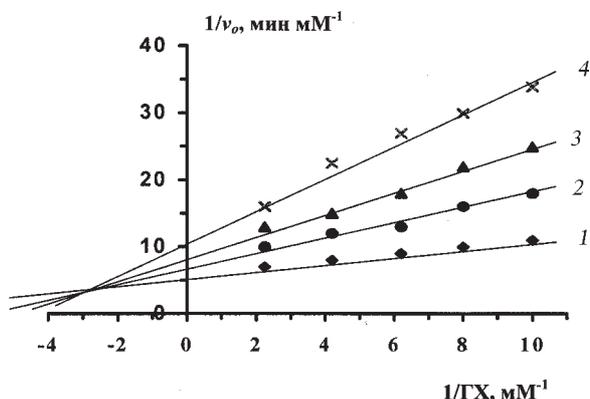


Рис. 3. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления гидрохинона от его концентрации в двойных обратных координатах при разных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1 – 0, 2 – 20, 3 – 40, 4 – 80 (пероксидаза 4,0 нМ; перекись водорода 0,64 мМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,5)

что соответствует конкурентному типу ингибирования (рис. 1).

Графики зависимостей обратных начальных скоростей пероксидазного окисления гидрохинона в присутствии ИУК при рН 4,5–6,5 имели вид семейства прямых, пересекающихся на оси абсцисс, что указывает на неконкурентный характер ингибирования (рис. 2). При рН 7,0–7,5 характер зависимостей изменяется и соответствует смешанному типу ингибирования, при котором кривые пересекаются в общей точке в левом верхнем квадранте (рис. 3).

Индолил-3-уксусная кислота в концентрации 10–300 мкМ не влияет на пероксидазное окисление ферроцианида калия при рН 4,5–7,0.

Известно, что пероксидаза катализирует окисление неорганических и органических соединений, различающихся между собой по строению. Широкая субстратная специфичность фермента позволяет предположить наличие разных механизмов пероксидазного окисления, реализуемых ферментом [15]. К числу неорганических субстратов пероксидазы относятся ферроцианид-, сульфит-, нитрит-, тиоцианат- и другие ионы, тогда как в группу органических соединений входят НАДН, аскорбиновая кислота, *o*-дианизидин, гидрохинон, фенотиазин и др. [16]. В реакциях индивидуального окисления субстраты пероксидазы могут подразделяться на медленно и быстро окисляемые. При этом величины констант Михаэлиса различаются незначительно при наибольшей разнице в величинах каталитических констант. В группу медленно окисляемых субстратов входят как неорганические, так и органические соединения – доноры электронов. Доноры водорода являются быстро окисляемыми субстратами пероксидазы. При рассмотрении механизма действия пероксидазы в реакциях окисления разных субстратов применяется модель, в которой действие пероксидазы объясняется в рамках представления о ферменте как белке-проводнике, реализующем несколько каналов транспорта электронов с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы, на железо гема [15]. Однако вопрос об участке связывания субстратов в активном центре пероксидазы остается пока не выясненным, хотя с помощью компьютерных методов показано, что аминокислотные последовательности пероксидаз растений и ауксин-связывающих белков содержат близкие по структуре участки. При этом пять из шести структурно сходных участков находятся в составе дистального домена пероксидаз и формируют субдомен, который включает последовательность, координирующую гем с дистальной стороны активного центра [7]. Поэтому проведенные исследования по влиянию ИУК на пероксидазное окисление субстратов пероксидазы позволяют высказать некоторые предположения о местах связывания субстратов на поверхности фермента.

Конкурентный тип ингибирования реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина ИУК позволяет предположить, что ОДН и индолил-3-уксусная кислота связываются в одном и том же месте активного центра фермента. При этом связывание ИУК пре-

пятствует как связыванию, так и превращению *o*-дианизида. В случае гидрохинона тип ингибирования несколько иной. ИУК и гидрохинон связываются в разных местах активного центра, однако если индолил-3-уксусная кислота связывается на поверхности фермента, то дальнейшее превращение гидрохинона становится невозможным. Это объясняется удаленностью мест связывания эффектора и субстрата или конформационными изменениями глобулы фермента при связывании ингибитора [17]. Причем при pH 4,5–6,5 тип ингибирования неконкурентный, однако при увеличении pH он меняется и становится смешанным. При этом значение α увеличивается ($\alpha > 1$), а β – уменьшается ($\beta < 1$). Связывание субстрата ухудшается в 2,8–4,2 раза, т.е. при наличии ИУК понижается сродство гидрохинона к активному центру фермента. Однако если все-таки произошло связывание гидрохинона в активном центре, то дальнейшее его превращение ухудшается в 1,7–5,3 раза. Связывание ИУК с пероксидазой зависит от pH среды. Так, в реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизида величина K_i при pH 4,5–7,0 изменяется в диапазоне от 9,6 до 0,72 мкМ, т.е. с возрастанием pH сродство ингибитора к ферменту может повышаться в 13,3 раза, тогда как в реакциях окисления гидрохинона величина K_i в этом же диапазоне pH изменяется от 113 до 17 мкМ, т.е. константа ингибирования понижается в 6,6 раза. При этом эффективность связывания ИУК с пероксидазой (например, при pH 4,5 и 7,0) выше, чем с *o*-дианизидом (в 4,2 и 20,8 раз) и с гидрохиноном (в 5,8 и 8,8 раз соответственно). В реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизида связывание ИУК с ферментом при pH 4,5 и 7,0 было соответственно в 11,8 и 23,6 раза эффективнее, чем в реакциях окисления гидрохинона. По-видимому, на сродство ингибитора к ферменту оказывает влияние природа субстрата. Причем субстраты, имеющие близкую с ИУК полярность, значительно повышают эффективность связывания ингибитора с пероксидазой. Аналогичные зависимости были получены при изучении связывания ИУК в присутствии гидрофобных и полярных аминокислот [5]. Показано, что увеличение гидрофобности аминокислоты повышает сродство ауксина к ферменту. Поэтому преимущественным местом связывания ИУК и *o*-дианизида в активном центре пероксидазы должна быть, по-видимому, гидрофобная

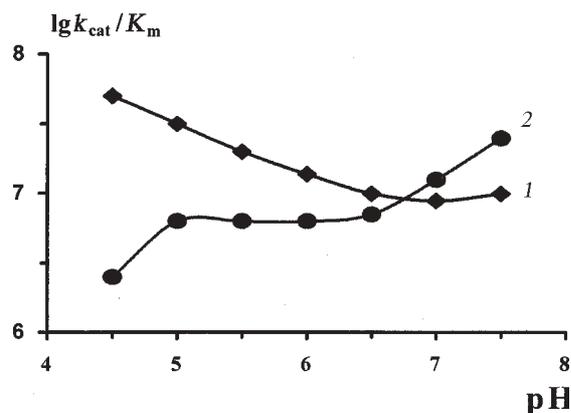


Рис. 4. pH-Зависимости $\lg(k_{cat}/K_m)$ для реакций пероксидазного окисления *o*-дианизида (1) и гидрохинона (2)

область. Тогда как для гидрохинона местом связывания является область на поверхности фермента, содержащая большее число полярных или заряженных аминокислотных остатков. Подтверждением вышесказанному служат данные по совместному пероксидазному окислению этих субстратов. Пероксидазное окисление *o*-дианизида и гидрохинона происходит дифференцированно. При этом окисление *o*-дианизида не наблюдается до полного превращения гидрохинона. Скорость окисления гидрохинона в присутствии *o*-дианизида превышает скорость его индивидуального окисления в 3–10 раз. Механизм совместного окисления субстратов проявляется в том, что предварительное связывание *o*-дианизида улучшает последующее связывание гидрохинона, ускоряя процесс его пероксидазного окисления [8].

Несколько иной механизм имеет место при совместном окислении ферроцианида калия и гидрохинона. Окисление ферроцианида не происходит до тех пор, пока полностью не окислится весь гидрохинон, поскольку оба субстрата связываются в одном и том же месте. Поэтому предварительное связывание гидрохинона препятствует последующему связыванию, а следовательно, и окислению ферроцианида. ИУК не оказывает влияния на пероксидазное окисление ферроцианида калия, что, возможно, обусловлено удаленностью участка связывания субстрата от области связывания ИУК.

Как показано на рис. 4, кривые pH-зависимостей $\lg k_{cat}/K_m$ для *o*-дианизида и гидрохинона имеют сложный характер, так что трудно определить природу ионогенных групп в активном центре фермента.

По-видимому, ионогенные группы, принимающие участие в каталитическом процессе пероксидазы, находятся в окружении гидрофобных аминокислотных остатков, что затрудняет определение pK_a этих функциональных групп по pH-зависимостям каталитических констант, поскольку сами субстраты содержат функциональные группы с высокими значениями pK_a и в исследованном диапазоне pH могут находиться только в протонированной форме (например, pK_a групп гидрохинона равны 9,85 и 11,4 [18], а *o*-дианизидина – 3,6 и 4,7 [19]). Вышесказанное подтверждается исследованиями по антигенному картированию пероксидазы хрена [20]. Выявленные эпитопы содержат несколько функционально важных остатков (His-42 и Arg-38), входящих в активный центр пероксидазы, вблизи которых находятся гидрофобные аминокислотные остатки (Phe-142 и 143), формирующие канал доступа ароматических субстратов к активному центру фермента.

На основании pH-зависимостей $\lg K_i$ в реакциях окисления определяются ионогенные группы: две в случае *o*-дианизидина ($pK_a = 4,69$ и $pK_a = 6,49$) (рис. 5, кривая 1) и одна в случае гидрохинона ($pK_a = 6,8$) (рис. 5, кривая 2). Проявление этих групп вызвано, по-видимому, наличием в составе молекулы индоллил-3-уксусной кислоты карбоксильной группы с $pK_a = 4,54$ [18]. Протонирование и депротонирование этой группы позволяют выявить ионогенные функциональные группы активного центра пероксидазы, принимающие участие в пероксидазном окислении: две в случае *o*-дианизидина и одну в случае гидрохинона.

Известно, что в области активного центра пероксидазы располагаются несколько ионогенных групп, принимающих участие в катализе. Так, например, в пероксидазном окислении *n*-крезола, ферроцианида и йодида выявлены участвующие в каталитическом процессе ионогенные группы фермента со значениями pK_a , равными 5,7 и 8,6 [21]. В комплексеобразовании пероксидазы с N-этилаид *o*-сульфобензоилуксусной кислоты принимают участие две ионогенные группы ($pK_a = 3,5$ и $pK_a = 5,5$), протонирование и депротонирование которых влияло на

спектральные характеристики фермент-субстратного комплекса [22]. В работе [12] высказывается предположение, что некоторое расхождение в величинах pK_a для групп активного центра пероксидазы можно объяснить, по-видимому, тем, что окисленное состояние железа гема оказывает сильное влияние на диссоциации близлежащих групп. Поэтому группы со значениями pK_a , равными 3,5 и 5,7, а также 5,5 и 8,6, проявляемые в нативной и окисленной формах пероксидазы, можно отнести к двум разным группам активного центра фермента. Одной из них может быть карбоксильная группа [22], а другой – имидазол гистидина [23]. Эти же группы проявляют себя в реакциях ингибирования пероксидазы ИУК в реакциях окисления *o*-дианизидина и гидрохинона.

Выявленные закономерности имеют важное биологическое значение, поскольку раскрывают роль пероксидазы в процессах прорастания семян. На основании полученных данных можно предположить, что ИУК, будучи связана в составе дистального домена активного центра фермента, способна ингибировать протекание пероксидазных реакций, переключая их на оксидазные. При этом пероксидаза будет выполнять роль высокоспецифичной оксидазы ауксина.

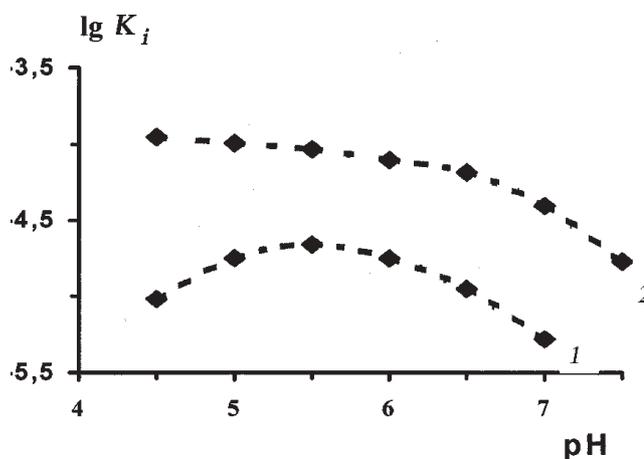


Рис. 5. pH-зависимости константы ингибирования реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина (1) и гидрохинона (2) индоллил-3-уксусной кислотой (кривые являются теоретическими для $pK_{a(ОДН+ИУК)} = 4,69$, $K_{a(lim)} = 23,8$ мкМ; для $pK_{b(ОДН+ИУК)} = 6,49$, $K_{b(lim)} = 22,6$ мкМ; для $pK_{b(ГХ+ИУК)} = 6,80$, $K_{b(lim)} = 104$ мкМ)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидазный катализ многокомпонентных систем. Якутск, 2003.

2. Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A., Thorneley R.N.F. // Biochem. J. 1996. 313. P. 841.

3. Savitsky P.A., Gazaryan I.G., Tishkov V.I., Lagrimini L.M., Ruzgas T., Gorton L. // Biochem. J. 1999. **340**. P. 579.
4. Metodiewa D., Pieres de Melo M., Escobar J.A., Cilento G., Dunford H.B. // Arch. Biochem. Biophys. 1992. **296**. P. 27.
5. Park R.D., Park C.K. // Plant Physiol. 1987. **84**. P. 826.
6. Pieres de Melo M., Escobar J.A., Metodiewa D., Dunford H.B., Cilento G. // Arch. Biochem. Biophys. 1992. **296**. P. 34.
7. Савицкий П.А., Рожкова А.М., Тишков В.И. и др. // Биохимия. 1998. **63**. С. 749.
8. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. // Биохимия. 1999. **64**. С. 219.
9. Ogawa S., Shira Y., Morishima I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. **90**. P. 674.
10. Falk J.E. Porphyrins and metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam. 1964.
11. George P. // Biochem. J. 1953. **54**. P. 267.
12. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1977. **42**. С.1372.
13. Chance B. // Science. 1949. **109**. P. 204.
14. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
15. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. // Изв. АН. Сер. Хим. 1996. № 1. С. 25.
16. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П. Peroxidazный катализ и его применение. М., 1981.
17. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. М., 1981.
18. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. М., 1991.
19. Moller K.M., Ottolenghi P. // Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. 1966. **35**. P. 369.
20. Аммосова Т.Н., Упоров И.В., Рубцова М.Ю. и др. // Биохимия. 1997. **62**. С. 516.
21. Critchlow, J.E., Dunford H.B. // J. Biol. Chem. 1972. **247**. P. 3714.
22. Рогожин В.В. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1984.
23. Jamada H., Jamasaki J. // Arch. Biochem. Biophys. 1974. **165**. P. 728.

Поступила в редакцию 02.02.04

EFFECT OF INDOLYL-3-ACETIC ACID IN OXIDATION REACTION OF SLOWLY AND RAPIDLY OXIDIZABLE PEROXIDAZE SUBSTRATES

V.V. Rogozhin, T.V. Rogozhina

(Yakutsk State Agricultural Academy)

Steady-state kinetics of o-dianisidine, hydroquinone and potassium ferrocyanide oxidation was studied in the presence of indole-3-acetic acid (IAA) catalyzed by horseradish peroxidase. Values of catalytic constant (k_{cat} and K_m) and inhibition constant were determined in the pH range from 4.5 to 7.5. IAA was shown to inhibit peroxidase in the oxidation reaction of o-dianisidine by competitive pattern while incompetitive nature of inhibition converting into mixed pattern at pH>6.5 is displayed in the hydroquinone oxidation reaction at acidic significance of pH. IAA presence didn't affect on the peroxidase oxidation of potassium ferrosyanide. Inhibition mechanisms by auxins of peroxidase oxidation reactions of o-dianisidine and hydroquinone are suggested.