



УДК 577.152.111*127.042

ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА N-ЭТИЛАМИДОМ *o*-СУЛЬФОБЕНЗОИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

© 2000 г. В. В. Рогожин, Г. Д. Кутузова*, Н. Н. Угарова*#

Якутская государственная сельскохозяйственная академия, 677002, Якутск;

*Кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова,
119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 02.02.99 г. Принята к печати 28.05.99 г.

Проведена химическая модификация карбоксильных групп пероксидазы хрена водорастворимым *n*-толуолсульфонатом 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида по методу Кошланда. Изучены каталитические свойства нативной и модифицированной пероксидазы в присутствии *N*-этиламида *o*-сульфобензоилуксусной кислоты (EASBA) при pH 5.0–7.5. Показано, что EASBA в реакции окисления *o*-дианизидина является конкурентным ингибитором пероксидазы, модифицированной карбодиимидом, а для нативного фермента наряду с увеличением K_m несколько увеличивает и V_m . Полученные данные показывают, что по крайней мере одна из модифицированных карбодиимидом карбоксильных групп расположена в области активного центра пероксидазы.

Ключевые слова: пероксидаза хрена; *o*-дианизидин; *N*-этиламид *o*-сульфобензоилуксусной кислоты; *n*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида.

Пероксидаза хрена (КФ 1.11.12.7) катализирует реакции окисления разнообразных неорганических и органических соединений перекисью водорода. Причины широкой субстратной специфичности фермента до сих пор не до конца раскрыты [1]. Ранее было показано, что во взаимодействии промежуточного соединения пероксидазы E_2 с таким органическим субстратом, как *o*-дианизидин, участвуют функциональные группы фермента с рК 6.5 и 8.6 [2]. рК 6.5 может отвечать карбоксильной группе аспарагиновой или глутаминовой кислоты [3] или пропионовокислому остатку гема [4], имеющему аномальное значение рК. Цель настоящей работы – исследование влияния аналога субстрата пероксидазы *N*-этиламида *o*-сульфобензоилуксусной кислоты (EASBA) на каталитические свойства нативной и модифицированной СМЕ-карбодиимидом пероксидазы хрена и выявление роли карбоксильных групп в механизме действия фермента.

Ингибиторы могут различным путем влиять на скорость реакций, катализируемых пероксидазой [5]. Ионы цианида, фторида и азида подавляют каталитическую активность пероксидазы за счет образования прочных комплексов по шестому координационному положению железа гема,

предотвращая реакцию с H_2O_2 . Ряд органических соединений ингибирует пероксидазу, реагируя с ее промежуточными соединениями E_1 и E_2 . Некоторые из них, такие как аскорбиновая кислота [6], NADH [7], сахара [8], тиомочевина [5], относятся к медленно окисляемым субстратам пероксидазы, ингибирующий эффект которых в реакции окисления *o*-дианизидина достигается за счет их прочного связывания в активном центре фермента. Некоторые вещества, реагируя с пероксидазой, инактивируют фермент. Так, необратимое инактивирующее действие фенилгидразина связано с модификацией функциональных групп пероксидазы (предположительно, остатка триптофана) свободнорадикальными продуктами его некаталитического и каталитического окисления, образующимися при инкубировании с пероксидазой [9]. Это приводит к изменению конформации активного центра фермента, частичному экспонированию гема в раствор и его последующей деструкции. Тиомочевина является не только конкурентным обратимым ингибитором пероксидазного окисления *o*-дианизидина, но способна модифицировать фермент, что приводит к его инактивации.

Для однозначной интерпретации результатов, полученных при изучении влияния EASBA на каталитические свойства пероксидазы, прежде всего было выяснено, не связано ли изменение каталитической активности фермента с побочными действиями ингибитора: 1) инактивацией и модификацией пероксидазы амидом; 2) реакцией ингибитора с субстратами пероксидазы – переки-

Сокращения: EASBA – *N*-этиламид *o*-сульфобензоилуксусной кислоты; СМЕ-карбодиимид – *n*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида; DA – *o*-дианизидин.

Автор для переписки (e-mail: unn@enzyme.chem.msu.ru; тел.: (095) 939-26-60).

сью водорода и *o*-дианизидином – в ходе каталитического процесса. Добавление EASBA снижало активность фермента, однако последующее инкубирование фермента в присутствии ингибитора не приводило к дальнейшему изменению активности пероксидазы. Присутствие в среде субстрата пероксидазы – *o*-дианизидина несколько уменьшало влияние EASBA на активность фермента. Специальными экспериментами было показано, что исследуемый амид не реагирует ни с H_2O_2 , ни с *o*-дианизидином (исследовались спектр поглощения в присутствии H_2O_2 и изменение концентрации H_2O_2 при ее инкубировании с амидом при концентрациях EASBA 0.05 М и H_2O_2 8 мМ). Активность пероксидазы определяли по *o*-дианизидину, используя H_2O_2 в концентрации в 4 раза меньше насыщающей. Установлено, что ни спектр EASBA, ни концентрация H_2O_2 в инкубируемой смеси не изменялись в течение часа. Кроме того, при инкубировании *o*-дианизидина в присутствии 0.16 мМ H_2O_2 и 10 мМ EASBA не происходило окисления *o*-дианизидина в отсутствие пероксидазы, т.е. не наблюдалось увеличения скорости фоновой реакции, которая составляла в данном случае менее 3%. Следовательно, изменение активности пероксидазы в присутствии EASBA, можно объяснить его ингибирующим влиянием на фермент, но не инактивацией фермента.

Обратимость ингибирующего действия EASBA на пероксидазу была проверена методом разбавления: при разбавлении смеси пероксидаза–амид в 10 раз при pH 5.0 активность фермента понижалась в 8 раз, а при pH 7.5 – только в 5 раз. Следовательно, процесс взаимодействия пероксидазы с EASBA обратим и зависит от pH. Кинетика пероксидазного окисления *o*-дианизидина нативной и модифицированной СМЕ-карбодиймидом пероксидазой [10] как в присутствии, так и в отсутствие EASBA подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен (рис. 1). Точка пересечения пучка прямых лежит в правом верхнем квадранте, что свидетельствует о сложном механизме влияния амида на нативную пероксидазу [11]. Действительно, с ростом концентрации EASBA увеличиваются как V_m , так и K_m фермента, однако отношение степеней их изменения меньше 1, поэтому можно рассматривать EASBA как ингибитор нативной пероксидазы.

Из экспериментальных данных, представленных как зависимость кинетических констант от концентрации EASBA в координатах

$$\frac{1}{V_{m(\text{каж})}/V_m - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{\alpha K_i}{(\beta - 1)[I]} \quad (1)$$

$$\frac{1}{K_{m(\text{каж})}/K_m - 1} = \frac{1}{\alpha - 1} + \frac{\alpha K_i}{(\alpha - 1)[I]} \quad (2)$$

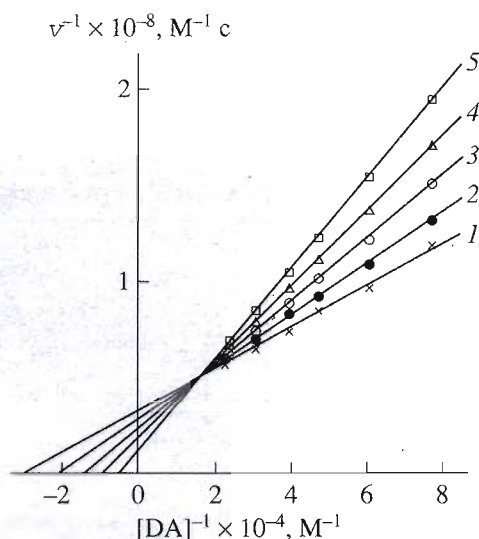


Рис. 1. Зависимость начальной скорости окисления нативной пероксидазой *o*-дианизидина от его концентрации в присутствии EASBA. Концентрации: пероксидаза – 0.04 мМ; *o*-дианизидин – 0.012–0.18 мМ; H_2O_2 – 0.64 мМ; EASBA – 0 (1); 10 (2); 20 (3); 40 (4); 60 (5) мкМ; 0.01 М Na-фосфат, 0.1 М KNO_3 , pH 6.0.

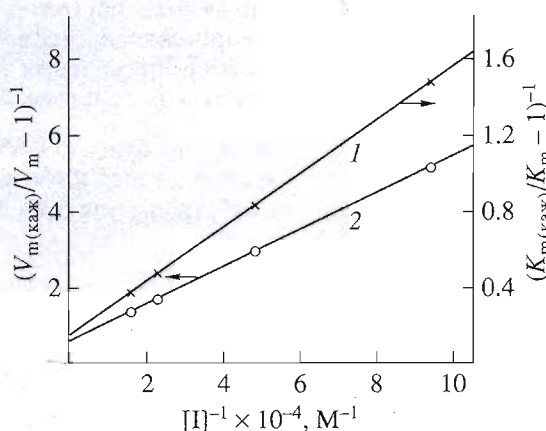


Рис. 2. Определение констант α (1) и β (2) (уравнения 1, 2) для процесса ингибирования пероксидазы в присутствии EASBA при окислении *o*-дианизидина. Условия те же, что на рис. 1.

определяли константы α и β (рис. 2). Зависимости ингибирования пероксидазного окисления *o*-дианизидина под действием EASBA были аналогичны в диапазоне pH 5.0–7.5. При увеличении pH от 5.0 до 7.5 величина α возрастает в 4 раза, а β – в 1.5 раза (таблица). Константу ингибирования (K_i) рассчитывали методом Диксона [10]. При pH 5.0 EASBA ингибировал пероксидазу, модифицированную СМЕ-карбодиймидом, по тому же механизму, что и нативный фермент (точка пересечения в верхнем квадранте). При pH > 5.5 на-

Константы Михаэлиса и константы α и β для ингибирования амидом EASBA реакции окисления *o*-дианизидина, катализируемой нативной и модифицированной СМЕ-карбодиимидом пероксидазой при различных рН

рН	Пероксидаза							
	нативная		модифицированная		нативная		модифицированная	
	K_m , мкМ	K_i , мкМ	K_m , мкМ	K_i , мкМ	α	β	α	β
5.0	33 ± 3	250 ± 15	50 ± 5	79 ± 6	4.3 ± 0.2	1.6 ± 0.2	20 ± 2	6 ± 1
5.5	32 ± 3	130 ± 12	н. о.	н. о.	7.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	н. о.	н. о.
6.0	42 ± 4	94 ± 5	35 ± 2	42 ± 3	7.7 ± 0.2	2.4 ± 0.2	н. о.	н. о.
7.0	26 ± 2	62 ± 5	н. о.	н. о.	8.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2	н. о.	н. о.
7.5	15 ± 2	34 ± 2	19 ± 2	24 ± 2	17.7 ± 0.4	2.2 ± 0.2	н. о.	н. о.

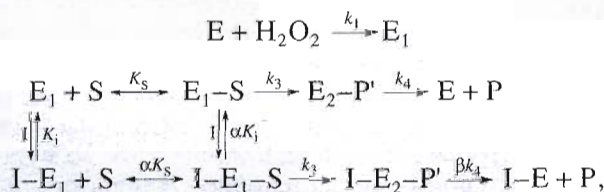
н.о. – не определяли.

блюдался конкурентный тип ингибирования модифицированной пероксидазы (рис. 3).

Изучение рН-зависимости константы ингибирования амидом EASBA нативной пероксидазы показало, что на величину K_i влияет ионизация группы с $pK \sim 6.0$, депротонирование которой улучшает связывание EASBA с пероксидазой (рис. 4), причем в диапазоне рН 5.0–7.5 K_i изменяется почти в 10 раз (таблица). Для пероксидазы, модифицированной СМЕ-карбодиимидом, в том же диапазоне рН K_i изменяется в 3 раза, при этом не проявляется влияния группы с $pK 6.0$ (рис. 4).

Необычный тип ингибирования амидом EASBA нативной пероксидазы показывает, что ингибитор влияет как на связывание субстрата, так и на про-

цесс его превращения. Ингибирование пероксидазы EASBA можно описать следующей схемой [2].



где E, E₁ и E₂ – нативная пероксидаза и ее окисленные формы; S и I – *o*-дианизидин и EASBA; E₁-S, E₂-P', E₁-I, I-E₁-S, I-E₂-P' – комплексы окисленных форм пероксидазы с *o*-дианизидином и промежуточным продуктом его окисления (P') в отсутствие и в присутствии EASBA.

Пероксидаза, модифицированная СМЕ-карбодиимидом, образует с EASBA фермент-ингибиторный комплекс [ME-I], не способный связывать окисляемый субстрат (конкурентное ингибирование). Наблюдаемый тип ингибирования нативной пероксидазы амидом EASBA, по-видимому, можно объяснить наличием обширной субстратсвязывающей площадки в активном центре фермента, где могут разместиться и ингибитор (EASBA), и субстрат (*o*-дианизидин), а также влиянием EASBA на процесс пероксидазного окисления *o*-дианизидина, причем связывание одного из них затрудняет связывание другого, т.к. величина α увеличивается от 4.3 при рН 5.0 до 17.7 при рН 7.5, при этом значения K_m и K_i становятся соизмеримыми (таблица). В то же время скорость окисления *o*-дианизидина в комплексе пероксидаза–EASBA возрастает в 2 раза (константа β увеличивается в 2 раза) (таблица).

Полное конкурентное ингибирование пероксидазы, модифицированной СМЕ-карбодиимидом объясняется, по-видимому, введением в область активного центра фермента остатка карбодиимида, что создает пространственные затруднения для связывания *o*-дианизидина с комплексом пероксидаза–ингибитор. Изменение профиля рН-зависимости K_i для модифицированной пероксидазы при

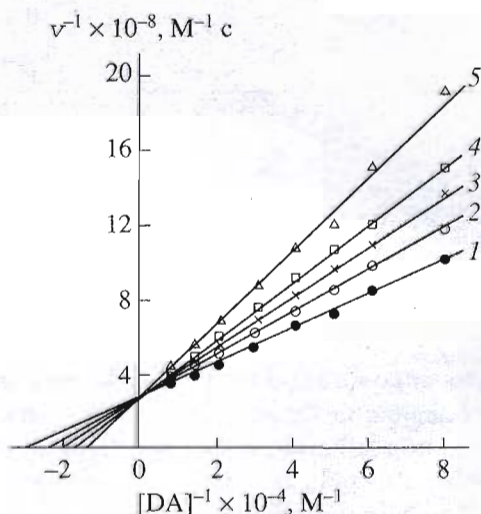


Рис. 3. Зависимость начальной скорости окисления *o*-дианизидина пероксидазой, модифицированной СМЕ-карбодиимидом, от его концентрации в присутствии EASBA. Концентрации: модифицированная пероксидаза – 0.2 нМ; *o*-дианизидин – 12–180 мкМ; H₂O₂ – 0.64 мМ; EASBA – 0 (1); 10 (2); 20 (3); 40 (4); 80 (5) мкМ, 0.01 М Na-фосфат, 0.1 М KNO₃, рН 6.0.

pH < 6.0 (см. рис. 4) может быть обусловлено изменением заряда в области активного центра пероксидазы вследствие модификации карбодиимидом карбоксильных групп, расположенных вблизи активного центра фермента.

Таким образом, в области активного центра нативной пероксидазы имеется протяженная субстратсвязывающая площадка, где могут одновременно связываться и ингибитор, и субстрат, причем связывание одного из них затрудняет связывание другого. В то же время в комплексе фермент–ингибитор–субстрат процесс превращения субстрата несколько ускоряется ($\beta > 1$). В модифицированной пероксидазе в области субстратсвязывающей площадки, по-видимому, находится по крайней мере один остаток карбодиимида, в результате чего возникают стерические затруднения для одновременной посадки ингибитора и субстрата. Однако их индивидуальное связывание модифицированной пероксидазой несколько улучшается. Полученные данные показывают, что по крайней мере одна из модифицируемых COOH-групп пероксидазы располагается в области активного центра фермента. Модификация этой группы оказывает влияние на процесс связывания субстратов – доноров водорода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали изофермент С пероксидазы хрена, выделенный из коммерческого препарата (Reanal, Венгрия) по методу [12]. Очищенный фермент имел величину RZ 3.2. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 403 нм (ϵ 100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [13]) и по пиридингемохромогену [14]. Использовали *N*-этиламид *o*-сульфобензоилуксусной кислоты и *n*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолинэтил)карбодиимида (Sigma, США); *o*-дианизидин (марки “ч.”) очищали возгонкой в вакууме. Концентрацию H_2O_2 (Реахим, Россия) определяли спектрофотометрически (ϵ 72.7 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ при 230 нм [15]). Остальные реактивы соответствовали квалификации “ос. ч.” Для приготовления растворов использовали трижды перегнанную в стекле воду.

Методы. Модификацию пероксидазы карбодиимидом проводили по методу Кошланда [16]. В 2.9 мл 0.05 М раствора NaCl вносили 127 мг СМЕ-карбодиимида (до концентрации 0.1 М), затем добавляли 0.1 мл 0.75 мМ пероксидазы в 0.05 М NaCl (до концентрации в реакционной смеси 0.025 мМ). В ходе реакции (1.5–3.0 ч) pH 5.0 поддерживали добавлением 0.1 М NaOH. Избыток реагентов удаляли гель-фильтрацией раствора через колонку (1 × 30 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0.05 М раствором NaCl.

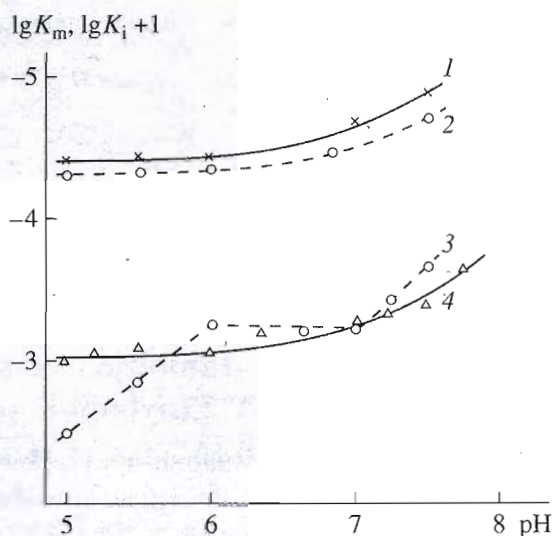


Рис. 4. pH-Зависимости констант Михаэлиса (1, 2) и констант ингибирования амидом EASBA (3, 4) пероксидазного окисления *o*-дианизидина в присутствии нативной (2, 3) и модифицированной СМЕ-карбодиимидом (1, 4) пероксидазы.

Реакцию окисления *o*-дианизидина (12–180 мкМ) перекисью водорода (0.64 мМ) проводили при 22°C в 0.01 М Na-ацетатном (pH 5.0–6.0) или Na-фосфатном (pH 6.0–7.5) буферном растворе, содержащем 0.1 М KNO_3 , в присутствии 0.04–0.2 нМ пероксидазы хрена. Начальную скорость окисления *o*-дианизидина регистрировали по возрастанию поглощения при 460 нм (ϵ 30 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [2]) на двухлучевом спектрофотометре В-2-25 (Beckman, США). За единицу активности фермента принимали его количество, окисляющее 1 мкмоль *o*-дианизидина за 1 мин. Кажущиеся константы скорости окисления субстрата пероксидазы определяли из данных по стационарной кинетике [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. // Изв. АН. Сер. хим. 1996. № 1. С. 25–32.
2. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1372–1379.
3. Hoffman B.M., Roberts J.E., Kang C.H., Margoliash E. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 6556–6564.
4. Угарова Н.Н., Кутузова Г.Д., Рогожин В.В., Савицкий А.П., Скырда Л.А. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. С. 1180–1188.
5. Pettigrew G.W., Aviram I., Schejter A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. V. 68. P. 807–817.
6. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1686–1690.
7. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 249–253.
8. Saunders B.C., Holmes-Siedle A.G., Stark B.P. Peroxidase: the Properties and Uses of a Versatile Enzyme and

- of Some Related Catalysts. Washington: Butterworths, 1964. P. 28–30.
9. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 2235–2244.
 10. Ugarova N.N., Kutuzova G.D., Rogozhin V.V., Berезин I.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 790. P. 22–30.
 11. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: МГУ, 1976.
 12. Березин И.В., Угарова Н.Н., Кершенгольц Б.М., Бровко Л.Ю. // Биохимия. 1975. Т. 40. С. 297–301.
 13. Ogawa S., Shira Y., Morishima I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. P. 674–678.
 14. Falk J.E. Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam; N.Y.; London: Elsevier, 1964.
 15. George P. // Biochem. J. 1953. V. 54. P. 267–276.
 16. Hoare D.G., Koshland D.E. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 2447–2453.

Inhibition of Horseradish Peroxidase by *N*-Ethylamide of *o*-Sulfobenzoylacetic Acid

V. V. Rogozhin*, G. D. Kutuzova**, and N. N. Ugarova***

*Yakutsk State Agricultural Academy, Yakutsk, 677002 Russia

**Moscow State University, Chemical Faculty, Department of Chemical Enzymology,
Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia

The carboxylic groups of horseradish peroxidase were modified by 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate by the Koshland method. The catalytic properties of the native and modified peroxidase were studied in the presence of *N*-ethylamide of *o*-sulfobenzoylacetic acid (EASBA) at pH 5.0–7.5. In the oxidation of *o*-dianisidine, EASBA is a competitive inhibitor of the carbodiimide-modified peroxidase, and it increases both K_m and V_m in the case of the native enzyme. These data show that at least one of the carboxylic groups modified with carbodiimide is located at the area of the peroxidase active site.

Key words: horseradish peroxidase, *o*-dianisidine, *N*-ethylamide of *o*-sulfobenzoylacetic acid, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 939-26-60; e-mail: unn@enzyme.chem.msu.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 2. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.

Сдано в набор 28.10.99 г.

Подписано к печати 30.12.99 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 2.7 тыс.

Уч.-изд. л. 10.5

Бум. л. 5.0

Тираж 254 экз.

Зак. 3279

Свидетельство о регистрации № 0110214 от 08.02.93 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации
Учредители: Российская академия наук, Отделение биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений РАН, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Адрес издателя: 117864, Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6