

УДК 577.152.1

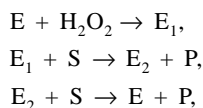
ВЛИЯНИЕ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА НА КИНЕТИКУ РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕРРОЦИАНИДА КАЛИЯ

О. В. Лебедева

(кафедра химической энзимологии)

Рассмотрено влияние никотинамидадениндинуклеотида восстановленного на реакцию пероксидазного окисления ферроцианида калия. Показано, что он является конкурентным ингибитором данной реакции. Константы ингибирования составляют 1,2 и 0,82 мМ при значениях рН 5,5 и 7,5 соответственно. Обсуждается вопрос об участии функциональных групп белка в процессе связывания различных субстратов с пероксидазой.

Кинетические особенности реакций пероксидазного окисления различных субстратов подробно изучали в течение длительного времени. Результаты этих исследований обобщены в обзорах [1, 2, 3]. Для объяснения кинетических закономерностей реакций пероксидазного окисления используют известную схему Чанса



где E – нативный фермент, E₁ и E₂ – промежуточные формы фермента, S – восстанавливающий субстрат, P – продукт. Последняя стадия (регенерации нативного фермента) лимитирует общую скорость реакции.

Известно, что субстратами пероксидазы являются соединения, резко различающиеся по структуре и химическим свойствам. Для объяснения широкой субстратной специфичности этого фермента были сделаны многочисленные попытки классификации субстратов по различным признакам (реакционная способность, органические и неорганические, доноры атомов водорода и доноры электронов). При этом считалось, что структура субстрата определяет характер его взаимодействия с ферментом, а именно, неорганические субстраты взаимодействуют с гемом пероксидазы, а органические – с другим центром на ферменте (не по гему). Были также отмечены различия в кинетических закономерностях реакций пероксидазного окисления субстратов, относящихся к двум различным группам: разный характер рН-зависимостей каталитических констант и разное отношение к действию активаторов (пероксидазное окисление органических субстратов активируется нуклеофильными агентами, а пероксидазное окисление неорганических субстратов не активируется) [4].

Однако последние исследования показали, что объяснение механизма действия пероксидазы на основании описанной выше «двухцентровой модели» является неполным. По данным ЯМР-спектроскопии, невозможен непосредственный контакт с гемом пероксидазы ни для органических субстратов, ни для неорганических ионов [5]. Известны эффекты взаимного ингибирования при совместном окислении ЭДТА и иодид-иона, ЭДТА и тиоцианат-иона – субстратов, предположительно взаимодействующих

с различными центрами на ферменте [6]. Кроме того, в работах [7, 8, 9] показано, что один из органических субстратов пероксидазы – никотинамидадениндинуклеотид (NADH) имеет такой же характер рН-зависимостей кинетических констант, как при пероксидажном окислении неорганических ионов, а его пероксидазное окисление, так же как и пероксидазное окисление неорганических ионов, не активируется нуклеофилами. [7]. Эти данные позволяют предположить, что при пероксидажном окислении совершенно различных по структуре субстратов могут реализоваться сходные механизмы и, возможно, имеет место одинаковый характер взаимодействия с ферментом.

В связи с этим интересно рассмотреть кинетические закономерности системы, где пероксидаза функционирует в смеси двух восстанавливающих субстратов различной химической природы. В данной работе подобное исследование проведено для случая, когда одним субстратом пероксидазы является физиологически активное соединение NADH, а другим – неорганический ион (ферроцианид).

Экспериментальная часть

Пероксидаза хрена, RZ-2,8 – коммерческий препарат («Биолар», Латвия), NADH («Reanal», Венгрия), 70%-й водный раствор H₂O₂ («Реохим», Россия). Другие реагенты имели марку «х.ч.» или были дважды перекристаллизованы.

Пероксидазу растворяли в 0,05 М Na-фосфатном буферном растворе (рН 7,0). Концентрацию определяли спектрофотометрически (E₄₀₃ = 9,6·10⁵ М⁻¹·см⁻¹) [1]. Навеску NADH растворяли в щелочной компоненте фосфатного буфера. Растворы ферроцианида готовили в воде по навеске. H₂O₂ разбавляли водой и определяли концентрацию спектрофотометрически (E₂₃₀ = 72,7 М⁻¹·см⁻¹ [10]).

Кинетические кривые регистрировали на спектрофотометре «Hitachi 150–20» (Япония) по увеличению A₄₂₀ (E₄₂₀ = 1050 М⁻¹·см⁻¹ для феррицианида [4]) для реакции пероксидазного окисления ферроцианида и по уменьшению A₃₄₀ (максимум поглощения NADH) E₃₄₀ = 6,23·10³ М⁻¹·см⁻¹ [11] для реакции пероксидазного окисления NADH.

В типичном эксперименте к 1,79 мл 0,05 М Na-фосфатного буферного раствора добавляли по 0,1 мл ра-

створа ферроцианида и пероксидазы. После быстрого перемешивания регистрировали изменение оптической плотности и добавляли 10 мкл H_2O_2 , продолжая регистрацию в течение 2–3 мин. В кинетических экспериментах по изучению влияния NADH на реакцию пероксидазного окисления ферроцианида использовали 1,69 мл того же буферного раствора, затем добавляли по 0,1 мл ферроцианида, пероксидазы и NADH. Далее типичный эксперимент проводили так же, как и в отсутствие NADH. Начальную скорость реакции измеряли по тангенсу угла наклона кинетической кривой, описывающей изменение оптической плотности во времени, экстраполированному к $t = 0$.

Для изучения влияния ферроцианида калия на реакцию пероксидазного окисления NADH регистрировали

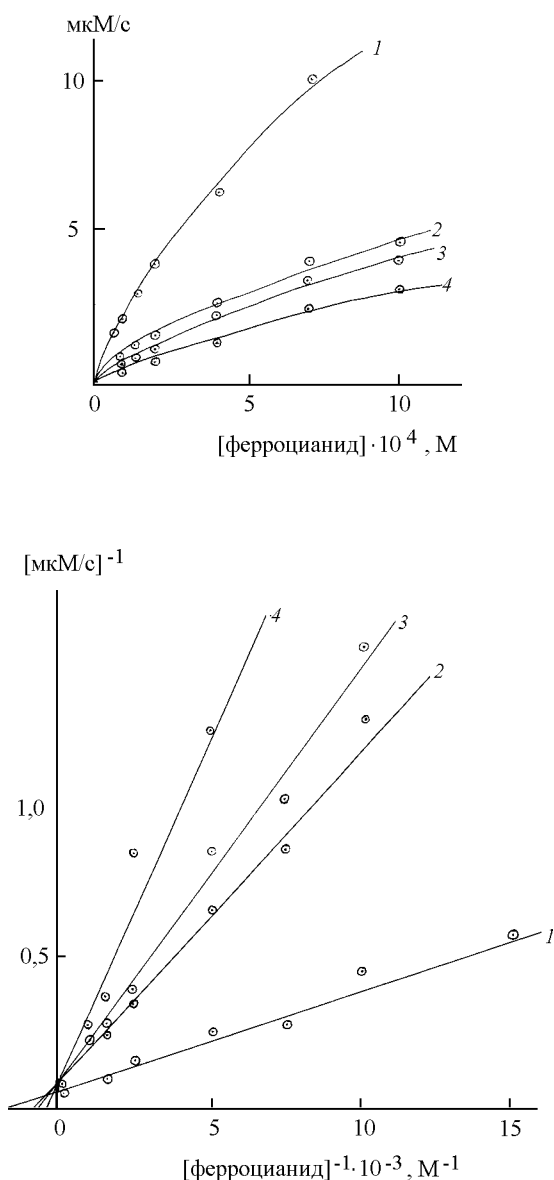


Рис. 1. *a* – Зависимости начальной скорости реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия от его начальной концентрации при различных концентрациях NADH; C_{NADH} , мМ: 1 – 0, 2 – 1, 3 – 2, 4 – 5 (25; pH 5,5; 0,05 М Na-фосфатный буферный раствор. $C_{\text{пер}} = 0,1$ мкМ, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,5$ мМ); *b* – то же в координатах Лайнуивера – Берка

кинетические кривые реакции 1) индивидуального пероксидазного окисления ферроцианида калия, как это описано выше, за исключением того, что регистрацию проводили при 340 нм ($E_{340} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) для феррицианида [12]; 2) индивидуального пероксидазного окисления NADH; 3) окисления NADH в присутствии ферроцианида калия. При этом типичный эксперимент и определение начальной скорости проводили так же, как и при индивидуальном окислении NADH, за исключением того, что используемый буферный раствор содержал необходимую концентрацию ферроцианида калия. Затем определяли начальные скорости реакций 1, 2 и 3, как это описано выше, и проводили сравнение суммарной величины скоростей 1 и 2 с величиной скорости 3.

Результаты и их обсуждение

Известно, что скорость реакции пероксидазного окисления NADH не зависит от концентрации пероксида водорода в интервале 0,1–0,5 мМ [7], а скорость реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия в интервале 0,5–1 мМ [13]. Поэтому во всех кинетических экспериментах использовали концентрацию пероксида водорода, равную 0,5 мМ.

Влияние ферроцианида калия на реакцию пероксидазного окисления NADH

Влияние ферроцианида калия на реакцию пероксидазного окисления NADH было изучено при значениях pH 5,5 и 7,5. Ввиду того, что ферроцианид является субстратом пероксидазы, а продукт его окисления – феррицианид – обладает значительной экстинкцией на длине волны 340 нм [12], при изучении его влияния на пероксидазное окисление NADH необходимо учитывать собственное окисление этого соединения (см. экспериментальную часть). Результаты представлены в табл. 1, откуда видно, что при изученных значениях pH сумма скоростей реакций 1 и 2, в пределах ошибки эксперимента, равна скорости реакции 3. Таким образом, ферроцианид калия не влияет на скорость реакции пероксидазного окисления NADH.

Влияние NADH на реакцию пероксидазного окисления ферроцианида калия

Было обнаружено, что в интервале значений pH 4,0–8,0 имеет место ингибирование реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия в присутствии NADH. В данной работе было также показано, что ингибирование наблюдается в условиях, когда собственное пероксидазное окисление NADH не имеет места.

Определение величин $k_{\text{кат}}$ и $K_{\text{м}}$ реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия при различных концентрациях NADH

Влияние NADH на реакцию пероксидазного окисления ферроцианида калия было изучено при значениях pH 5,5 и 7,5. На рис. 1, *a* показаны зависимости начальной скорости реакции окисления ферроцианида калия от его начальной концентрации при различных концентрациях NADH при значении pH 5,5. Спрямление этих кривых в координатах Лайнуивера–Берка рис. 1, *b* позволяет сде-

Т а б л и ц а 1

Влияние ферроцианида калия на реакцию пероксидазного окисления NADH (25°, 0,05 М Na-фосфатный буферный раствор, $\lambda=340$ нм; $C_{\text{пер}} = 1$ мкМ, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 500$ мкМ)

Реакция	рН					
	5,5			7,5		
	$C_{\text{фер}}$, мМ	C_{NADH} , мкМ	v_o , ед.Д/мин	$C_{\text{фер}}$, мМ	C_{NADH} , мкМ	v_o , ед.Д/мин
1	1	0	0,65±0,05	1	0	0,31±0,03
2	0	50	-0,02±0,004	0	50	-0,011±0,003
3	1	50	0,61±0,05	1	50	0,32±0,03

лать вывод о том, что пероксидазное окисление ферроцианида калия в присутствии NADH также подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Аналогичные результаты были получены и при значении рН 7,5. Величины $k_{\text{кат}}$ и K_m реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия в присутствии и отсутствие NADH представлены в табл. 2. Из приведенных на рис. 2 и в табл. 2 данных видно, что присутствие в реакционной смеси NADH мало меняет величину $k_{\text{кат}}$ реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия, в то время как величина K_m с увеличением концентрации NADH растет. Таким образом, характер ингибирования, по-видимому, близок к конкурентному.

Для случая конкурентного ингибирования в литературе приводятся следующие выражения для зависимостей $k_{\text{кат}}^i$ и K_m^i от концентрации ингибитора [14]

$$k_{\text{кат}} = k_{\text{кат}}^i ; K_m^i = K_m (1 + [I] / K_i),$$

где $k_{\text{кат}}^i$ и K_m^i – каталитическая константа и константа Михаэлиса в присутствии ингибитора; $[I]$ – концентрация ингибитора, в данном случае NADH; $K_i = k_{-i} / k_i$ – константа ингибирования.

Обработка данных, представленных в табл. 2 в координатах K_m^i – $[NADH]$, показала, что при изученных значениях рН (5,5 и 7,5) имеют место прямолинейные зависи-

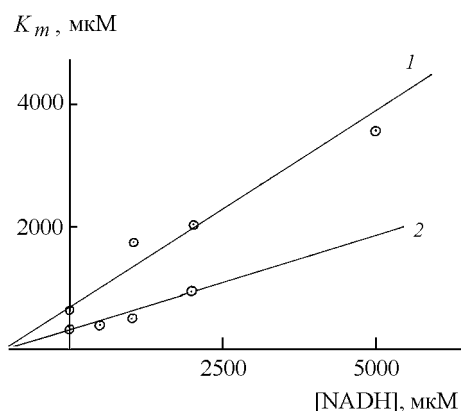


Рис. 2. Зависимость K_m^i от концентрации NADH

мости констант Михаэлиса реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия в присутствии NADH от концентрации NADH (рис. 2). Это дало возможность рассчитать значения K_p , которые составляют 1,2 и 0,82 мМ соответственно. Таким образом, K_i реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия при различных значениях рН составляют, примерно, одну и ту же величину.

Системы, в которых пероксидаза функционирует в смеси восстанавливающих субстратов, рассматривали и ранее [3]. При этом наблюдали эффекты как взаимной активации, так и ингибирования. Для субстратов с резко различающейся реакционной способностью, как это имеет место для ферроцианида и NADH, (каталитические константы реакций пероксидазного окисления этих субстратов различаются более чем в 500 раз [15, 16]) часто наблюдалось явление субстрат-субстратной активации, а именно стимуляции пероксидазного окисления трудноокисляемого субстрата в присутствии легкоокисляемого. Однако, как было показано в данной работе, аналогичный эффект для пары ферроцианид-NADH не имеет места. В то же время имеет место ингибирование реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия в присутствии NADH, причем характер ингибирования близок к конкурентному. Величины констант ингибирования, которые, по-видимому, являются константами связывания, полученные в данной работе, составляют 1,2 и 0,82 мМ и отличаются от величин K_m реакции пероксидазного окисления NADH 45 и 54 мкМ при тех же значениях рН (5,5 и 7,5 соответственно) [7].

Наличие комплексообразования пероксидазы или ее промежуточных форм (E_1 и E_2) с восстанавливающими субстратами различными методами показано в ряде работ [17, 18, 19]. Кинетические закономерности реакцией пероксидазного окисления ферроцианида калия и NADH в стационарных условиях можно также объяснить исходя из наличия комплексообразования субстратов с промежуточными формами фермента (E_1 и E_2) [15, 16]. Величины констант диссоциации комплексов (пероксидаза – донор водорода), K_d , измеренные методами ЯМР и дифференциальной спектроскопии, составляют, как правило, от 1 до 50 мМ [20, 21, 22] и обычно не совпадают с величинами их констант Михаэлиса (K_m), причем K_m всегда много меньше K_d . Так, константа связывания гваякола с пероксидазой, по разным данным, составляет от 10 до 16 мМ [19, 23, 24], в то время как $K_m = 0,07$ мМ [24]. Аналогично для *n*-крезола эти же величины равны 3,0 мМ и 0,7 мМ, соответственно [24]. K_m реакции соединения пероксидазы E_1 с *n*-крезолом, измеренная в работе [25], составляет величину 0,05 мМ, что в 60 раз меньше величины K_d комплекса пероксидазы с *n*-крезолом [24]. K_d комплекса *o*-дианизидин – пероксидаза составляет примерно ту же величину, что и для гваякола, т. е. 15 мМ [19], в то время как величины K_m реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина варьируют в интервале (1–20) мкМ в зависимости от рН [16]. Различия в значениях величин K_d связывания субстратов с пероксидазой и величин K_m их пероксидазного окисления, также наблюдаемые в данной работе и для NADH, следует, по-видимому, отнести за счет того, что параметр K_m характеризует сродство субстрата не к ферменту, а к одной из ее окисленных форм (E_1 или E_2).

Величины $k_{\text{кат}}$ (с^{-1}) и $K_{\text{м}}$ ($\mu\text{М}$) реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия в присутствии и в отсутствие NADH (условия см. в подписях к рис. 1)

[NADH], мМ	0		0,5		1		2		5	
pH	$k_{\text{кат}}$	$K_{\text{м}}$	$k_{\text{кат}}$	$K_{\text{м}}$	$k_{\text{кат}}$	$K_{\text{м}}$	$k_{\text{кат}}$	$K_{\text{м}}$	$k_{\text{кат}}$	$K_{\text{м}}$
5,5	170±17	670±67	–	–	146±15	1740±170	140±14	1996±200	143±14	3590±360
7,5	54±5	273±27	46±4	306±30	43±4	458±46	46±4	922±90	–	–

Таким образом, величины K_p , полученные в настоящей работе, являются, по-видимому, константами связывания NADH со свободным ферментом и близки к значениям констант связывания других органических субстратов с пероксидазой. Конкуренция различных субстратов пероксидазы наблюдалась и ранее [3]. Относительно области связывания субстратов различной структуры на пероксидазе в литературе имеются некоторые данные. Из кинетических данных следует, что область связывания различных субстратов на пероксидазе одна. Показано наличие конкуренции между парами субстратов: ЭДТА – иодид, ЭДТА – тиоцианат, иодид – тиоцианат, бисульфит–иодид, бисульфит–пирогаллол, иодид–гваякол [26, 27, 28]. Аналогичные данные получены в настоящей работе для системы NADH – ферроцианид. В то же время использование метода химической модификации, а также проведение экспериментов с использованием мутанта пероксидазы, в котором Arg 38 заменен на лейцин, показали, что Arg 38 играет существенную роль в связывании пероксидазы с субстратами любой химической природы, а участие остатка тирозина в этом процессе имеет место только для органических субстратов [19, 24]. Причем органические субстраты (ароматические фенолы и амины с различ-

ными заместителями) взаимодействуют с пероксидазой одинаково [29]. Разный характер спектральных изменений, которые они вызывают в спектре пероксидазы при взаимодействии с ферментом, следует отнести за счет образования различных водородных связей между заместителями в бензольном кольце ароматического субстрата и функциональными группами белка [24]. В настоящее время показано, что органические субстраты пероксидазы взаимодействуют с ферментами с дистальной стороны гема, вблизи его края, экспонированного в раствор. Областью связывания является гидрофобная полость, образованная метильной группой гема Arg 38 и Tug 185, а также двумя остатками фенилаланина [24]. При этом протоны ароматического кольца субстрата удалены на (6–10) Å от железа гема. Ключевую роль при связывании неорганических ионов с пероксидазой играет Arg 38 [19].

Относительно характера взаимодействия молекулы NADH с пероксидазой хрена в литературе данных не имеется. Полученные в настоящей работе данные о конкуренции между NADH и ферроцианидом калия в реакции пероксидазного окисления последнего позволяют предположить участие Arg 38 во взаимодействии пероксидазы с молекулой пиридиннуклеотида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dunford H.B., Stillman J.S. // *Coord. Chem. Review.* 1976. **19**. P. 187.
- Sheldon R.A., Vanrantwijk F., Vandeurzen M.P.J. // *Tetrahedron.* 1977. **53**. P. 1383.
- Лебедева О.В., Угарова Н.Н. // *Изв. РАН, сер. хим.* 1996. **1**. С. 25
- Угарова Н.Н., Лебедева О.В. // *Биохимия.* 1978. **43**. № 9. С. 1731
- Arkao M.B., Varon R., Garcia-Canovas F. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1990. **1041**. P. 43.
- Bhattacharya D.K., Adak S., Benerjee B.K. // *Biochem. J.* 1994. **298**. P. 281.
- Лебедева О.В., Угарова Н.Н. // *Биохимия.* 1997. **62**. № 2. С. 249.
- Avigliano L., Zaseni A., Liberatore F. // *Biochem. J.* 1985. **226**. P. 391.
- Mohammea A.R., Dunford H.B. // *Can. J. Biochem. and cell Biol.* 1986. **64**. P. 323.
- George P. // *Biochem. J.* 1953. **54**. P. 267.
- Halliwel B. // *Planta.* 1978. **140**. № 1. P. 81.
- Brickve C.E., Loeffler L.J. // *Anal. Chem.* 1955. **27**. P. 1419.
- Лебедева О.В. // Дисс. ... канд. хим. наук. М., 1980.
- Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
- Ugarova N.N., Lebedeva O.V., Berezin I.V. // *J. Mol. Catalysis.* 1981. **13**. P. 215.
- Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Березин И.В. // *Биохимия.* 1977. **42**. № 9. С. 1577.
- Veiteh N.C. // *Biochem. Soc. Frans.* 1995. **23**. P. 232.
- Gilfoyle D.J. // *Eur. J. Biochem.* 1996. **236**. P. 714.
- Adak S., Mazumder A., Banerjee R.K. // *Biochem. J.* 1996. **314**. P. 985.
- Schejter A., Lanir A., Epstein N. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. **174**. P. 36.
- Paul K.G., Ohlsson P.I. // *Acta Chemica Scandinavica* . 1978. **B 32**. P. 395.
- Schonbaum G.R. // *J. Biol. Chem.* 1973. **248**. P. 502.
- Burnve U., Obinger C. // *FEBS Lett.* 1997. **441**. P. 269.
- Rodriguez-Lopez J.N., Rogve N.F. // *J. Biol. Chem.* 1996. **271**. P. 4023.
- Hewson W.D., Dunford H.B. // *J. Biol. Chem.* 1976. **251**. P. 6036.
- Modi S. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1993. **1162**. P. 121.
- Jen Ren., Hemphill Jr., Sell H.M. // *Can. J. Biochem.* 1971. **49**. P. 162.
- Adak S., Mazumder A., Banerjee R.K. // *J. Biol. Chem.* 1997. **272**. P. 11049.
- Van Haandel, Marjon J.H., Modi S., Behere D.V. // *Biol. Inorg. Chem.* 1996. **1**. P. 460.