

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ

©2006 г.

И. Г. ГАЗАРЯН,
Д. М. ХУШПУЛЬЯН, В. И. ТИШКОВ*

*Кафедра химической энзимологии МГУ им. М.В.Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Классификация гем-содержащих пероксидаз и реакционный цикл. III. Структура пероксидаз и механизм расщепления перекиси водорода. IV. Проблема субстратной специфичности пероксидаз. V. Окисление индолил-3-уксусной кислоты пероксидазами растений и возможное существование у этих ферментов второго субстрат-связывающего центра. VI. Роль кальция в структуре и активности пероксидаз. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В 2007 году исполняется 150 лет со дня рождения одного из основателей российской биохимии академика А.Н.Баха. Работы А.Н.Баха, выполненные в конце 19- начале 20-х веков, получили всемирное признание. Одним из его научных достижений является формулировка и экспериментальное доказательство совместно с Р.Шодой перекисной теории биологического окисления. Основные положения этой теории были представлены в 1902 г. в работе «Исследования о роли перекисей в химии живой клетки» (Bach, A., Chodat, R., (1903). Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. Ber. Deutsch. Chem. Gesell. 36), а также в серии последующих работ, опубликованных в 1902–1904 г.г. При выполнении этой работы А.Н.Бахом и Р.Шодой в 1903 г. и были получены частично очищенные препараты пероксидазы из корней хрена. При

Принятые сокращения: HRP (horseradish peroxidase) – пероксидаза из корней хрена; MnP – марганецпероксидаза; LIP – лигнинпероксидаза; ABTS – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония; IAA – индолил-3-уксусная кислота; ВНА – бензгидроксамовая кислота; RZ – отношение A_{403}/A_{280} , характеризующее процент включения гема в апо-пероксидазу, k – константа скорости.

*Адрес для корреспонденции: vit@enz.chem.msu.ru, dmh@m9com.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 04-04-48286.

выделении ферментных препаратов, катализирующих окисление органических молекул, они неожиданно получили не одну, а две активные фракции. Первая фракция получила название оксигеназы, а вторая – пероксидазы [Bach, A., Chodat, R., 1903. Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. IV. Ueber Peroxydase. Ber. Deutsch. Chem. Gesell. 36, 600–605]. Гомогенный препарат пероксидазы из корней хрена был получен несколько десятилетий спустя Вильшаттером и Теореллом, а ее аминокислотная последовательность была установлена Карин Велиндер в 1979 г. [1].

Несмотря на вековую историю, интерес к изучению и использованию пероксидаз не ослабевает. Пероксидаза корней хрена (HRP) является наиболее широко используемым ферментом в иммуноферментных диагностических наборах со спектрофотометрической детекцией. В конце 80-х – начале 90-х годов прошлого века фирма Амершам (Amersham, Великобритания) внедрила хемилюминесцентный анализ с использованием HRP, пользующийся исключительной популярностью, так же как и флюоресцентный анализ с помощью набора Амплекс Ред. В настоящее время на основе рекомбинантных пероксидаз разрабатываются высокочувствительные биосенсоры для определения различных соединений в сложных многокомпонентных смесях, в том числе и при анализе загрязнений в окружающей среде.

В последние годы на рынке появились препараты пероксидаз из новых источников. К ним относятся: грибная пероксидаза *Coprinus cinereus* (старое название *Arthromyces ramosus*), производимая в коммерческих масштабах в нативной и рекомбинантной формах фирмой Novo Nordisk (Дания); пероксидаза из отходов производства соевых бобов (Коламбас, Огайо, США) и пероксидаза из суперпродуцирующей культуры клеток батата (фирма Дусан, Южная Корея) [2]. Следует отметить, что наиболее перспективным ферментом для практического применения является рекомбинантный вариант грибной пероксидазы [3], отличающийся высокой стабильностью в экстремальных условиях. Чрезвычайно высокой термостабильностью отличаются пероксидазы пальм, которые были получены на химическом факультете Московского государственного университета И.Ю. Сахаровым [4].

II. КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕМ-СОДЕРЖАЩИХ ПЕРОКСИДАЗ И РЕАКЦИОННЫЙ ЦИКЛ

Гем-содержащие пероксидазы (КФ 1.11.1.X, где X определяется природой биологического восстановителя) подразделяются на 2 суперсемейства: пероксидазы растений и пероксидазы животных. Эти

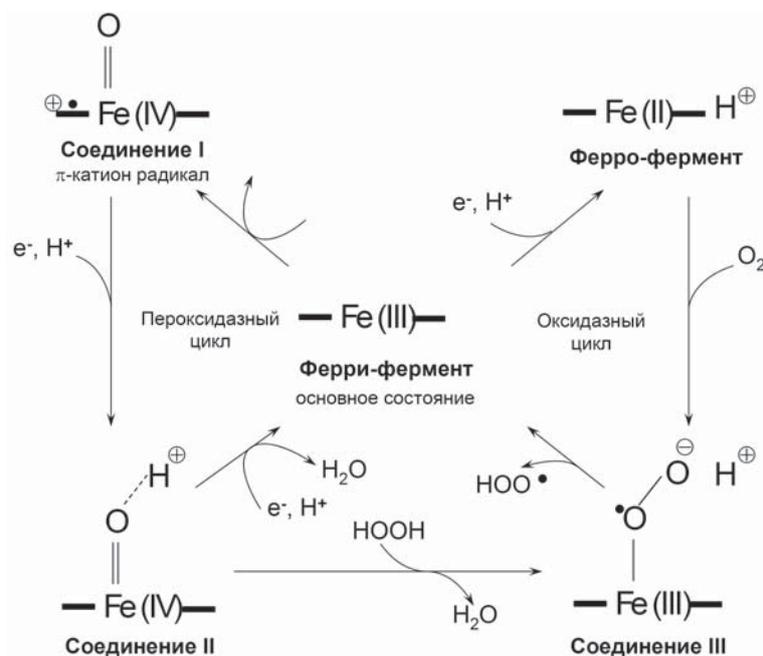


Рис. 1. Пять различных состояний активного центра пероксидаз растений.

Основное состояние представлено ферри-ферментом, который при одноэлектронном восстановлении образует ферро-форму; последняя присоединяет молекулу кислорода и образует т.н. Соединение III. Каталитический цикл пероксидазной реакции включает Соединение I, которое образуется при двухэлектронном окислении железа активного центра и предстает собой феррил-форму и катион-радикал на порфириновом кольце, и Соединение II, продукт одноэлектронного восстановления Соединения I. Под действием избытка перекиси Соединение II образует Соединение III, однако при таком способе образования оно быстро разлагается под действием избытка перекиси (не показано).

ферменты катализируют окисление различных электрон-донорных субстратов перекисью водорода. Каталитический цикл начинается с быстрого взаимодействия фермента и H_2O_2 с образованием так называемого Соединения I, которое содержит 2 окислительных эквивалента: оксиферрил-гем и свободный радикал. Соединение I восстанавливается донором электронов с образованием Соединения II, а затем нативного фермента, как показано на рис. 1. В дополнение к пероксидазной пероксидаза проявляет и оксигеназную активность. Оксигеназный цикл, как предполагается, действует при окислении гормона роста растений, индолилуксусной кислоты (см. ниже).

Суперсемейство пероксидаз растений подразделяется на 3 класса на основе гомологии аминокислотных последовательностей и особенностей пост-трансляционной модификации [5]. Класс I включает микробные пероксидазы, бактериальные каталазы-пероксидазы (КФ 1.11.1.6), дрожжевую цитохром С пероксидазу (КФ 1.11.1.5) и аскорбатпероксидазы растений (КФ 1.11.1.11). Класс II – это пероксидазы грибов, включающие лигнинпероксидазу (LIP), марганецпероксидазу (MnP) и секреторные пероксидазы растительного типа. Класс III – это классические пероксидазы растений. Пероксидазы двух последних классов (КФ 1.11.1.7) гликозилированы, содержат 4 дисульфидные связи и 2 катиона кальция на молекулу фермента.

III. СТРУКТУРА ПЕРОКСИДАЗ И МЕХАНИЗМ РАСЩЕПЛЕНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

Прогресс белковой инженерии гем-содержащих пероксидаз и установление их кристаллической структуры (цитохром С пероксидаза [6], аскорбатпероксидаза гороха [7], лигнин- [8, 9] и Mn-пероксидазы [10] *Phanerochaete chrysosporium*, грибная пероксидаза *Coprinus cinereus* (*Arthromyces ramosus*) [11, 12], пероксидаза арахиса [13], рекомбинантная пероксидаза хрена (HRP) [14], пероксидаза ячменя, [15], сои [16] и две изоформы фермента из *Arabidopsis thaliana* [17–19]) позволили предложить постадийный механизм, описывающий гетеролитическое расщепление H_2O_2 в активном центре и его последующее восстановление молекулой фенольного субстрата (рис. 2).

Главную роль в гетеролитическом расщеплении перекиси играют дистальные остатки His42 и Arg38. Пероксидаза содержит три остатка гистидина в положениях 40, 42 и 170. Последний является проксимальным лигандом железа (см. рис. 3). Химической модификации подвергаются только остатки His40 и His42 [20].

Проксимальный остаток His170 отвечает за прочное связывание гема в активном центре. При его замене на остаток аланина константа скорости образования Соединения I уменьшается на 5 порядков. Добавление имидазола позволяет увеличить эту константу в 1500 раз, восстанавливая при этом лишь одну сотую от величины активности нативного фермента [21]. Полагают, что проксимальный лиганд гема His170 образует водородную связь с остатком Asp247. Это увеличивает его основность, облегчает стабилизацию заряда в окисленных формах пероксидазы и позволяет поддерживать атом железа с координационным числом 5 [14].

Дистальный или, как его еще называют, каталитический His42 отвечает за расщепление H_2O_2 . Механизм образования Соединения I включает переходное образование комплекса трехвалентного железа и пероксианиона при протонировании дистального остатка гистидина (рис. 2). Перенос протона с His42 на гидроксильную группу и образование молекулы воды генерирует оксиферрил-гем и катион-радикал на порфириновом кольце – Соединение I. Водородная связь между феррильным кислородом и дистальным остатком гистидина в Соединениях I и II не обнаружена [22].

При замене His42 на остатки Ala, Leu, Val константа скорости первой стадии реакции у мутантных ферментов уменьшается на много порядков по сравнению с ферментом дикого типа [23, 24]. Например, при введении в положение 42 остатка лейцина происходит уменьшение бимолекулярной константы скорости взаимодействия фермента с H_2O_2 на 5 порядков по сравнению с нативной HRP и рекомбинантным ферментом дикого типа, а константа первого порядка гетеролитического расщепления O–O связи при образовании Соединения I снижается на 4 порядка. В случае мутанта HPR His42Ala добавление в реакционную среду 2-замещенных имидазолов частично восстанавливало каталитическую активность, благодаря образованию альтернативного центра связывания протонов. Двойная замена Phe41His/His42Ala восстанавливает каталитическую активность фермента [25]. Мутант HPR His42Glu [26] (эта замена имитирует в молекуле пероксидазы корней хрена активный центр хлоропероксидазы) при взаимодействии с H_2O_2 на 4 порядка менее активен, чем фермент дикого типа. При этом, в отличие от хлоропероксидазы, присутствие дистального остатка аргинина является критическим (двойной мутант HPR His42Glu/Arg38Ser неактивен).

Важной структурной особенностью в молекуле HPR является наличие системы водородных связей от His42 к Asn70 [27] и далее к Glu64 и дистальному Ca^{2+} -связывающему центру, как показано на рис. 3. Предполагается, что для максимальной эффективности пероксидазного катализа требуется совершенно определенная ориентация имидазольного кольца His42 по отношению к порфириновому кольцу, которая и реализуется посредством водородной связи между His42 и Asn70 [27, 28]. При замене Asn70 на остаток валина [27, 29] эта водородная связь разрушается и мутантный фермент демонстрирует очень низкую каталитическую активность.

Остаток Arg38 в дистальной части белковой глобулы играет важную роль на всех ступенях катализа [30–32]. Замена его на остаток лизина уменьшает скорость образования Соединения I в 500 раз, а

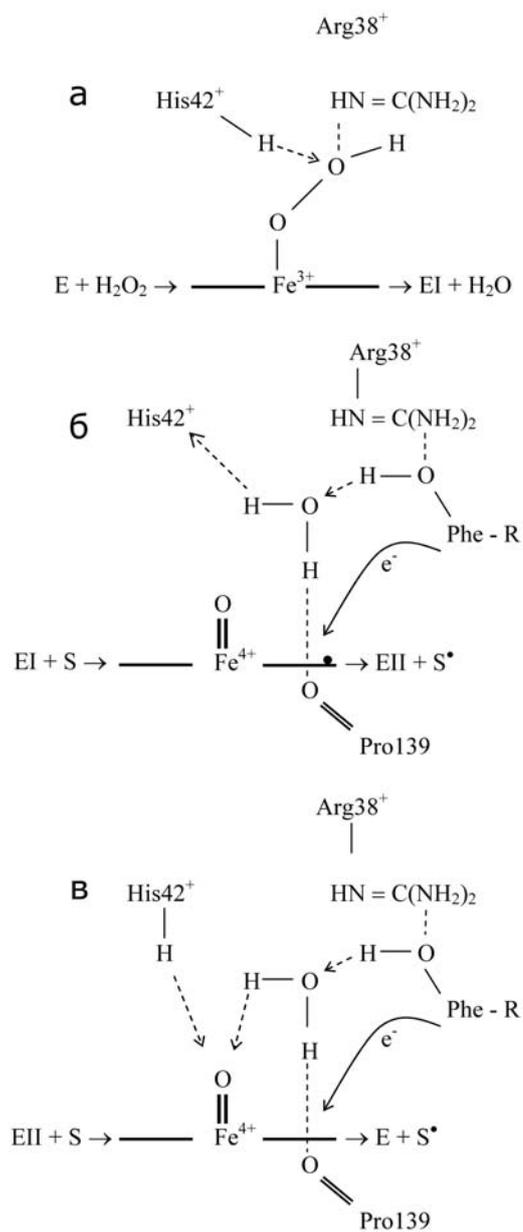


Рис. 2. Участие Arg-38 и His-42 в образовании молекулы воды (а). Восстановление Соединений I (б) и II (в) фенольным субстратом, иллюстрирующее возможную роль молекулы воды активного центра [22].

замена на остаток Leu – в 1200 раз. Исследование мутантной HPR Arg38Leu спектральными методами показало, что в ходе реакции образуется дополнительное промежуточное соединение, предшествующее Соединению I и имеющее спектр, отличный от Соединения 0. Образование этого промежуточного соединения наблюдалось при низкой температуре, и, как полагают авторы, оно обусловлено связыванием пероксианиона. Изучение квантовых моделей электронных спектров предполагаемых переходных промежуточных соединений показало, что наиболее вероятной функцией этого нового интермедиата является нейтральное связывание перекиси в активном центре фермента. Замена Arg38Leu уменьшала на три порядка константу скорости образования комплекса фермент–H₂O₂ и вызывала 6-кратное снижение величины константы скорости распада этого комплекса с образованием Соединения II. Эти данные согласуются с предположением, что Arg38 выполняет две функции при каталитическом образовании Соединения I. Во-первых, он участвует в связывании H₂O₂ и тем самым стимулирует перенос протона с H₂O₂ к имидазольной группе His42 для облегчения связывания пероксид-аниона с гемом и, во-вторых, перераспределяет электронную плотность между атомами кислорода при гетеролитическом разрыве O–O связи, то есть способствует как правильной ориентации перекиси водорода в активном центре, так и ее гетеролитическому расщеплению.

Остаток аргинина в положении 38 участвует в стабилизации Соединения I, образуя водородную связь с кислородом феррилла [22]. По данным направленного мутагенеза, Arg38 в отличие от His42 принимает участие в связывании ароматических субстратов. Замена

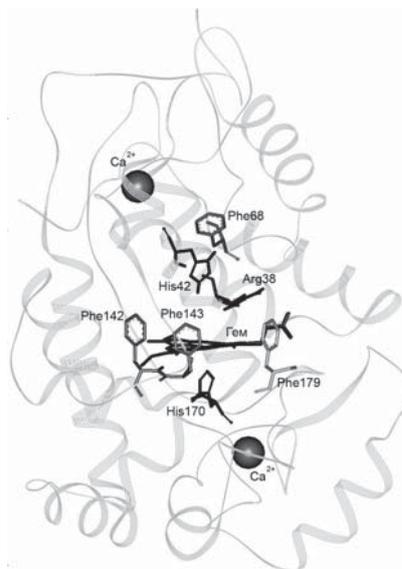


Рис. 3. Общий вид молекулы пероксидазы хрена со стороны входа в активный центр, формируемого четырьмя остатками фенилаланина – 142, 143, 179, 68. Последний остаток имеет конформацию крышки, которая при связывании ингибитора бензгидроксамовой кислоты «закрывается» (см. рис. 5).

в молекуле HRP Arg38Leu привела к значительному уменьшению константы связывания пероксидазы с бензгидроксамовой кислотой [33], гваяколом и п-крезолом [30]. По данным рентгеноструктурного анализа комплекса пероксидазы хрена с цианидом и феруловой кислотой (см. ниже) этот остаток напрямую участвует в связывании субстратов пероксидазы. Таким образом, помимо контролирования реакционной способности пероксидазы в отношении пероксида водорода, остаток Arg38 играет важную роль в связывании и ориентировании доноров электронов в активном центре фермента.

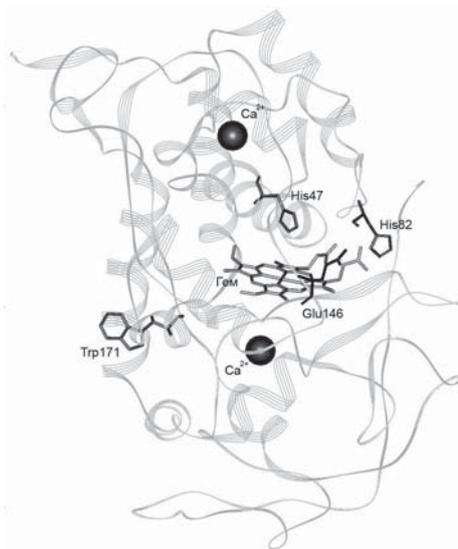
Молекула воды, обнаруженная в активном центре HRP и ее комплексах с феруловой кислотой и цианидом, также имеется в кристаллических структурах других пероксидаз растений [34] и отсутствует в грибных и микробиальных пероксидазах. Остаток пролина, кислород которого образует водородную связь с молекулой воды активного центра, присутствует во всех пероксидазах суперсемейства растений. Основываясь на кристаллических структурах вышеупомянутых комплексов HRP [34], авторы предложили механизм окисления субстратов с участием молекулы воды активного центра [22] (рис. 2). Сначала Arg38 образует водородную связь с фенольным кислородом субстрата-восстановителя. Это помогает переносу протона с фенольного кислорода на His42 при участии молекулы воды активного центра, удерживаемой в нужном положении водородной связью с кислородом Pro139. Перенос электрона происходит на порфириновое кольцо гема. При восстановлении Соединения II перенос протона, синхронный переносу электрона, также может происходить через молекулу воды активного центра (рис. 2).

IV. ПРОБЛЕМА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ

Вышеприведенные схемы протекания пероксидазной реакции предполагают взаимодействие протонов субстрата с дистальным остатком Arg, присутствующим во всех пероксидазах, последовательности которых определены к настоящему времени. Однако проблема субстратной специфичности классических пероксидаз растений до сих пор не решена. Каждый фермент имеет свой собственный профиль субстратной специфичности, и в настоящее время, к сожалению, нельзя заранее предсказать, какова будет активность фермента по отношению к выбранному донору электронов. Прокариотические и грибные пероксидазы в дополнение к классическим искусственным донорам электронов (ABTS, о-фенилендиамин и

Рис. 4. Общий вид молекулы лигнинпероксидазы.

Показаны 2 катиона кальция, гем, дистальный гистидин-47. Вход в активный центр контролируется водородной связью His82-Glu146, которая определяет низкий рН-оптимум действия фермента. Остаток триптофана-171 является субстрат-связывающим центром специфического субстрата лигнинпероксидазы – вератрового спирта.



т.д.) имеют свои специфические субстраты. В лигнинпероксидазе Trp171 играет роль специфического центра связывания вератрового спирта (модельный субстрат, имитирующий часть молекулы лигнина) [35]. Мутант Mn-пероксидазы Ser168Trp, имитирующий лигнинпероксидазу, активен по отношению к вератровому спирту [36]. Эти данные свидетельствуют о существовании цепи переноса электронов между гемом активного центра лигнинпероксидазы и Trp171, расположенным от него на расстоянии 16 Å (рис. 4).

СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЦЕНТР ЛИГНИНПЕРОКСИДАЗЫ

При изучении кристаллических структур двух изоферментов LiP из белого гриба *Phanerochaete chrysosporium* была обнаружена значительная электронная плотность у β атома углерода Trp171 [37]. Детальный анализ показал, что эта электронная плотность обусловлена гидроксильной группой. Гидроксилирование β -атома углерода у Trp171 является автокаталитической реакцией, для которой требуется лишь небольшой избыток H_2O_2 и небольшое число оборотов фермента [38]. Модификация рекомбинантного фермента происходит буквально в течение нескольких первых каталитических циклов.

Было высказано предположение о существовании в молекуле LiP двух различных субстрат-связывающих центров. Прямыми доказательствами в пользу этого предположения являются данные

рентгеноструктурного анализа нативного фермента, отсутствие модификации Trp171 у рекомбинантного фермента и полная потеря активности по вератровому спирту у мутантов LIP Trp171Phe и Trp171Ser при сохранении активности по другим донорам электронов [35]. Первый (неспецифический) субстрат-связывающий центр находится на границе гем-связывающей области, а второй (специфический) – вблизи Trp171 (рис. 4), который необходим для окисления вератрового спирта и проявления медиаторных свойств.

Скорость-лимитирующим этапом реакции восстановления Соединения II LIP вератровым спиртом является перенос электрона. Был предложен механизм взаимодействия катион-радикального комплекса LIP-вератровый спирт с дополнительной молекулой вератрового спирта. Ключевым моментом этого механизма является стабилизация катион-радикала белковым микроокружением [39]. Изучение кристаллической структуры LIP показывает, что ближайшее окружение Trp171 является электроотрицательным и может вносить свой вклад в стабилизацию катион-радикала вератрового спирта.

Субстратом Mn-пероксидазы (MnP) служит ион двухвалентного марганца, локализованный внутри молекулы фермента [10, 40]. Направленный мутагенез остатков, координирующих ион марганца, находящегося на расстоянии 11 Å от железа гема, снижает каталитическую активность фермента [41–43]. Изящная работа по направленному мутагенезу Mn-пероксидазы, выполненная в лаборатории проф. Оста [44], показала что замена остатка Ser168, занимающего в MnP позицию аналогичную остатку Trp171 в лигнинпероксидазе, на остаток триптофана позволяет создать центр связывания вератрового спирта в Mn-пероксидазе. В отличие от нативного и рекомбинантного фермента дикого типа, мутантная форма MnP Ser168Trp не только полностью сохраняет активность по отношению к Mn²⁺, но и окисляет многочисленные субстраты LIP – как небольшие молекулы, так и полимеры. Введенный в молекулу MnP остаток триптофана стал центром для эффективного окисления различных субстратов LIP, которые для нативной формы MnP являются плохими субстратами или не являются таковыми вообще. Функциональное подобие между мутантной формой MnP Ser168Trp и лигнинпероксидазой служит доказательством исключительной роли Trp171 в субстратной специфичности LIP [44].

СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЦЕНТРЫ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

В настоящее время сложилось мнение, что субстраты классических пероксидаз растений можно разбить на 3 группы. К первой относят

двухэлектронные доноры электронов, для которых главным является связывание вблизи активного центра (у плоскости гема, иодид-ион) или даже проникновение внутрь активного центра (тиоанизол, стирол – прямой перенос кислорода с феррилла гема) [45]. Вторая группа представляет собой достаточно простые одноэлектронные ароматические субстраты, которые (как это было показано для феруловой кислоты) связываются вблизи активного центра HRP. Третья группа – это субстраты, окисляющиеся по цепи переноса электронов (ABTS, IAA).

В случае первой группы субстратов, механизм их окисления включает перенос феррильного кислорода на субстрат, для которого необходимо прямое взаимодействие субстрата с феррильным кислородом. Повышенная активность переноса кислорода в мутантах HRP His42Ala [23, 24], His42Glu и в двойном мутанте His42Val/Arg38His служит прямым доказательством большей открытости дистального кармана при введении указанных мутаций [46].

Субстраты второй группы связываются вблизи активного центра фермента. Результаты белковой инженерии HRP и определение кристаллической структуры комплексов фермента с ингибитором и одним из субстратов (см. ниже) указывают на доступность активного центра для фенольных субстратов.

Изучение взаимодействия пероксидазы хрена с ингибитором бензгидроксамовой кислотой (ВНА) [47, 48] показало, что мутантная HRP His42Leu связывает ее в 1000 раз слабее, чем нативный или рекомбинантный фермент дикого типа. Замена как остатка His42, так и остатка Arg38 резко ослабляет связывание ВНА.

Кристаллическая структура комплекса пероксидазы хрена с бензгидроксамовой кислотой [47] часто рассматривается как модель связывания H_2O_2 в активном центре пероксидазы, хотя ВНА является специфическим ингибитором именно пероксидазы хрена, но не других пероксидаз, в частности фермента табака. Очень интересным является тот факт, что в комплексе с ВНА остаток Phe68 в молекуле HRP образует «крышку» гидрофобного кармана (рис. 5), что приводит к принципиально другой кристаллической структуре этого комплекса по сравнению со свободным рекомбинантным ферментом. Если свободный рекомбинантный фермент образует кристаллическую ячейку с переменным числом молекул, то его комплекс с ВНА представляет собой высокоупорядоченную структуру с двумя молекулами на кристаллическую ячейку. Эти данные хорошо соотносятся с результатами, полученными в нашей лаборатории при изучении поведения димерной формы рекомбинантной пероксидазы

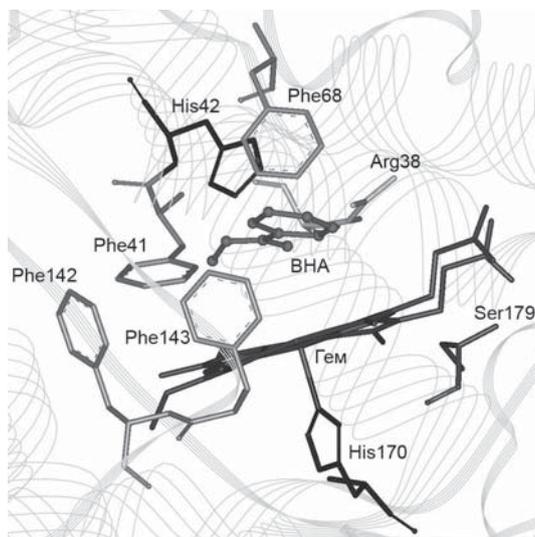


Рис. 5. Связывание бензгидроксамовой кислоты в активном центре пероксидазы хрена с заменой Phe179Ser, открывающей доступ к железу гема. Характерна измененная позиция кольца Phe68, которое как крышка закрывает активный центр сверху.

хрена в обращенных мицеллах [49]. Было показано, что в системе обращенных мицелл субстраты влияли на равновесие мономер-димер рекомбинантной HRP.

Феруловая кислота [(3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-пропионовая кислота)] является субстратом растительных пероксидаз *in vivo*. В работе [34] представлены кристаллические структуры двойного комплекса пероксидазы хрена с феруловой кислотой (рис. 6) и тройного – HRP с феруловой кислотой и цианидом. Присутствие цианида в качестве шестого лиганда создает стерические затруднения в дистальном кармане гема и в некоторой степени этот эффект подобен присутствию феррильного кислорода в Соединениях I и II. Анализ структуры этих комплексов свидетельствует о гибкости и динамичном характере центра связывания ароматических субстратов в пероксидазе хрена. Авторы выделяют роль дистального остатка аргинина (Arg38) как в процессе окисления субстрата, так и связывании лиганда. Этот остаток образует водородные связи с цианидом, стабилизируя таким образом комплекс пероксидаза-цианид. По мнению авторов, Arg38 участвует в стабилизации переходного состояния и последующем расщеплении O–O связи, а также вовлечен в сеть водородных связей между дистальным гистидином, молекулой воды и Pro139.

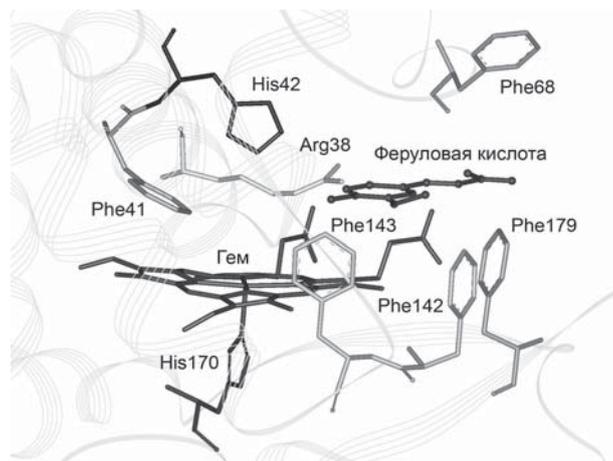


Рис. 6. Структура активного центра пероксидазы хрена в комплексе с феруловой кислотой.

Перекись водорода проникает в активный центр по каналу, размер и гидрофобность которого контролируют доступ к железу гема. В случае HRP канал образуют множественные остатки Phe (41, 68, 142, 143, 179) (рис. 3). Методом направленного мутагенеза Phe179 был идентифицирован как остаток, связывающий ароматические молекулы [50]. Замена его на остаток аланина привела к 80-кратному уменьшению константы связывания цианокомплекса фермента с бензгидроксамовой кислотой. Замена Phe179 на остаток серина также отрицательно сказалась на эффективности связывания, а вот замена на остаток гистидина не привела к столь резкому падению константы связывания ВНА с цианокомплексом HRP. Роль Phe68 и Phe142 в образовании тройного комплекса оказалась гораздо менее значимой. Полученные результаты служат первым прямым экспериментальным доказательством участия Phe179 в связывании ароматических молекул. Таким образом, один из центров связывания субстратов пероксидазы хрена находится вблизи остатка Phe179.

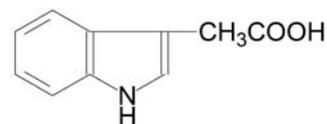
В нашей лаборатории был получен мутант пероксидазы хрена Phe143Glu с измененной субстратной специфичностью. По сравнению с рекомбинантным ферментом дикого типа активность мутантной HRP с иодидом и фенолом снизилась, но ее значение возросло по отношению к аминокфенолам и бензидинам [51]. Таким образом, были получены доказательства роли остатка Phe143 в контроле доступа субстратов к железу гема.

В третьей группе субстратов, если предполагать отсутствие специфических взаимодействий субстрата с активным центром, очевидно, что субстратная специфичность должна определяться редокс-потенциалами субстратов и окисленных форм фермента и их стабильностью [52], поскольку каталитический процесс представляет собой окислительно-восстановительную реакцию. Тривиальное мнение о контроле субстратной специфичности окислительным потенциалом Соединений I и II основано на данных Данфорда [53] о возрастании констант скорости восстановления Соединений I и II с ростом восстановительного потенциала в ряду замещенных аминов и фенолов [54]. Скорости реакций таких субстратов HRP, как фенолы и производные индолил-3-уксусной кислоты (IAA), с Соединением I хорошо соотносятся с восстановительными потенциалами соответствующих катион-радикальных продуктов [55]. Константы скорости реакции второго порядка восстановления Соединений I и II HRP фенолами были интерпретированы в рамках теории электронного переноса Маркуса [56]. Более низкая активность Соединения II объяснялась большим расстоянием электронного переноса (от железа гема к субстрату) по сравнению с таковым в Соединении I (от катион-радикала порфирина к субстрату). Однако такой подход хорошо объясняет только поведение субстратов внутри одной и той же структурной группы, отличающихся лишь природой заместителя, но неприменим для сравнения субстратов различного химического строения.

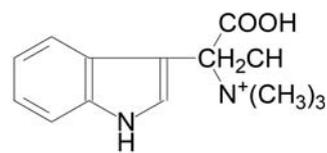
V. ОКИСЛЕНИЕ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ ПЕРОКСИДАЗАМИ РАСТЕНИЙ И ВОЗМОЖНОЕ СУЩЕСТВОВАНИЕ У ЭТИХ ФЕРМЕНТОВ ВТОРОГО СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА

В нашей лаборатории был установлен механизм окисления природного гормона индолил-3-уксусной кислоты (IAA) молекулярным кислородом [57]. Первой стадией реакции является образование тройного комплекса фермент–кислород–субстрат, в котором затем генерируются супероксид-анион радикал и катион-радикал субстрата, декарбоксилирующийся в кислой среде с образованием радикала скатола. Последний при взаимодействии с кислородом образует пероксирадикал и далее, отрывая водород от субстрата, превращается в перекись скатола [58]. Перекись скатола расщепляется в активном центре с образованием индолметанола, который далее окисляется одноэлектронно и блокирует активный центр. Только

в присутствии избытка IAA или любого другого «хорошего» (с высоким восстанавливающим потенциалом) субстрата пероксидазы происходит высвобождение индолметанола, сопряженное с окислением введенного второго субстрата. Ситуация очень сильно напоминает действие простагландинсинтазы, которой для завершения ферментативного цикла необходимо присутствие второго субстрата, а центр связывания арахидоновой кислоты находится на расстоянии 12 Å от гема [59]. Аналогия с этим ферментом позволила высказать предположение о наличии вто-



Индолил-3-уксусная кислота



Гипофорин

Рис. 7. Структурное сходство индолил-3-уксусной кислоты

рого центра связывания в молекуле пероксидаз растений. Сравнение аминокислотных последовательностей пероксидаз растений и ауксин-связывающих белков привело к обнаружению 5 гомологичных участков. Анализ пространственного расположения этих линейных участков в молекуле пероксидазы хрена выявил компактный субдомен в составе дистального домена фермента [60]. Субдомен включает активный центр и высококонсервативные (лишь у пероксидаз растений) остатки His40 и Trp117 [60]. Последний остаток, как было показано в нашей лаборатории методом направленного мутагенеза, является ключевым для фолдинга молекулы пероксидазы, роль же His40 в настоящее время исследуется методом направленного мутагенеза.

Японская группа исследователей пришла к выводу о существовании специфического центра связывания индолилуксусной кислоты в молекуле пероксидазы. Этот вывод был сделан при исследовании влияния природного антагониста ауксина грибного происхождения – гипофорина (бетаинтриптофана) (рис. 7) – на генерацию супероксид-радикала в ходе оксигеназной реакции [61] и стабильность Соединения III при добавлении ауксина [62]. Конкурентный характер ингибирования обоих процессов гипофорином был интерпретирован авторами в рамках предложенной нами модели оксигеназного цикла, предполагающего существование специфического центра связывания IAA, поскольку в присутствии пероксида водорода и ауксин, и гипофорин окисляются пероксидазой и последний не является ингибитором пероксидазного цикла. Предложенный нами механизм окисления IAA в сочетании с собственными данными был использован Т.Кавано (Т. Kawano) для выдвижения гипотезы о IAA-пероксидазном сигнальном пути в растениях [63].

Таким образом, пероксидазы могут иметь как специфические центры связывания субстратов, так и способны окислять доноры электронов по внутримолекулярным цепям переноса электронов. Именно это свойство позволяет наблюдать явление прямого переноса электронов с электрода на фермент (см. [64–66]).

VI. РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ

В ранних исследованиях было показано, что молекула HRP содержит два иона Ca^{2+} , и их удаление приводит к дестабилизации и инактивации фермента [67–70]. Изучение эффектов, вызванных замещением кальция на другие двухвалентные металлы и Ln^{3+} , продемонстрировало неэквивалентность проксимального и дистального кальций-связывающих центров [68]. Последний центр оказался менее специфичным к природе металла, и именно он теряет кальций в первую очередь. Применение современных физических методов позволило еще раз подтвердить важность проксимального кальция для поддержания общей структуры фермента и седлообразной конформации гема, обеспечивающей выполнение им каталитических функций [71]. Дистальный Ca^{2+} в большей степени критичен для стабильности структуры дистального домена фермента. Высокая подвижность этого домена при потере иона Ca^{2+} приводит к инактивации фермента при хранении или при экстремальных значениях pH. В обоих случаях присутствие в растворе 1 мМ кальция предохраняет HRP от инактивации [72].

Катионная пероксидаза арахиса значительно менее активна и стабильна, чем пероксидаза хрена, и причиной этого, по-видимому, является низкая константа связывания иона кальция в дистальном центре. Ca^{2+} необходим для стабилизации даже концентрированных препаратов фермента, и только его присутствие способствует поддержанию постоянного значения RZ при их длительном хранении [73].

В случае пероксидазы ячменя была показана принципиальная роль кальция в активации фермента. Кристаллы неактивной формы пероксидазы ячменя, полученные при pH 5,5, 7,5 и 8,5, содержали по одному иону Ca^{2+} и Na^+ на молекулу фермента [15]. В отсутствие ионов кальция в дистальном центре каталитический гистидин находится на расстоянии более 8 Å от железа гема и не может принимать участия в катализе расщепления H_2O_2 в активном центре. Только протонирование фермента с последующим встраиванием иона Ca^{2+} в дистальный центр восстанавливает активность пероксидазы по отношению к перекиси водорода [74].

Таким образом, несмотря на наличие у ряда пероксидаз растений при высокой гомологии и практически одинакового фолдинга глобулы, эффективность связывания иона кальция в дистальном центре может колебаться в широких пределах, что влияет на активность и стабильность препаратов фермента.

В случае пероксидаз грибов диссоциация иона кальция из дистального центра имеет роковые последствия. Принципиальное различие между пероксидазами растений и грибов состоит в различной роли одной из дисульфидных связей (Cys49–Cys44 в случае пероксидазы хрена). У пероксидаз растений эта дисульфидная связь поддерживает структуру дистальной области и в отсутствие иона Ca^{2+} , в то время как у пероксидаз грибов она не компенсирует отсутствие иона кальция в дистальном центре и не в состоянии поддерживать структуру белка [75]. Результатом этой структурной особенности является значительно меньшая стабильность грибных ферментов, у которых потеря иона кальция приводит к сильным структурным изменениям и полной потере активности [76].

Важность наличия такой дисульфидной связи для поддержания структуры фермента была показана и для других пероксидаз. Например, введение в Mn-пероксидазу по аналогии с пероксидазами растений дополнительной дисульфидной связи двойной мутацией Ala38Cys/Ala63Cys повышает термостабильность этого фермента [77].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение хочется отметить, что даже вековая история исследований в области катализа пероксидазами растений не поставила всех точек над «i». Например, несмотря на значительный прогресс в понимании деталей механизма пероксидазного катализа, локализации центров связывания специфических субстратов в прокариотических и грибных пероксидазах, остается нерешенной проблема идентификации как субстрат-связывающих центров, так и самих специфических субстратов классических пероксидаз растений. Механизм окисления гормона роста растений – индолил-3-уксусной кислоты, которая может претендовать на роль специфического субстрата пероксидаз растений, все еще является предметом научных споров между сторонниками обычного пероксидазного цикла и сторонниками оксигеназного цикла. До сих пор не разработаны подходы к предсказанию температурной и операционной стабильностей классических пероксидаз на основе строения молекулы. В настоящее время эти параметры определяются только экспериментально. Также очень актуальным является дальнейшее изучение регуляторной

роли ионов металлов типа кальция, калия или натрия. Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют, что механизм и природа такой регуляции характеризуются высокой специфичностью в каждом индивидуальном случае. Формулирование проблем пероксидазного катализа, которое мы даем в заключении, возможно будет способствовать привлечению внимания нового поколения биохимиков к решению поставленных задач.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Welinder, K.G.* (1979) *Eur. J. Biochem.*, **96**, 483–502.
2. *Huh, G.H., Lee, S.J., Bae, Y.S., Liu, J.R., and Kwak, S.S.* (1997) *Mol. Gen. Genet.*, **255**, 382–391.
3. *Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A.H.* (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**, 379–384.
4. *Сахаров И.Ю.* (2004) *Биохимия*, **69**, 1013–1020.
5. *Welinder, K.G.* (1985) *Eur. J. Biochem.*, **151**, 497–504.
6. *Finzel, B.C., Poulos, T.L., and Kraut, J.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 13027–13036.
7. *Patterson, W.R. and Poulos, T.L.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 4331–4341.
8. *Piontek, K., Glumoff, T. and Winterhalter, K.* (1993) *FEBS Lett.*, **315**, 119–124.
9. *Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., and Gold, M.H.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 4429–4440.
10. *Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., and Poulos, T.L.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 32759–32767.
11. *Petersen, J.F., Kadziola, A., and Larsen, S.* (1994) *FEBS Lett.*, **339**, 291–296.
12. *Kunishima, N., Fukuyama, K., Matsubara, H., Hatanaka, H., Shibano, Y., and Amachi, T.* (1994) *J. Mol. Biol.*, **235**, 331–344.
13. *Schuller, D.J., Ban, N., Huystee, R.B., McPherson, A., and Poulos, T.L.* (1996) *Structure*, **4**, 311–321.
14. *Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., and Poulos, T.L.* (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 1032–1038.
15. *Henriksen, A., Welinder, K.G., and Gajhede, M.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2241–2248.
16. *Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K.G., and Gajhede, M.* (2001) *Protein Sci.*, **10**, 108–115.
17. *Nielsen, K.L., Indiani, C., Henriksen, A., Feis, A., Becucci, M., Gajhede, M., Smulevich, G., and Welinder, K.G.* (2001) *Biochemistry*, **40**, 11013–11021.
18. *Ostergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O., Petersen, M., Welinder, K.G., Mundy, J., Gajhede, M., and Henriksen, A.* (2000) *Plant Mol. Biol.*, **44**, 231–243.
19. *Mirza, O., Henriksen, A., Ostergaard, L., Welinder, K.G., and Gajhede, M.* (2000) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **56** (Pt 3), 372–375.
20. *Bhattacharyya, D.K., Bandyopadhyay, U., and Banerjee, R.K.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 22292–22298.
21. *Newmyer, S.L., Sun, J., Loehr, T.M., and Ortiz de Montellano, P.R.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 12788–12795.
22. *Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., and Hajdu, J.* (2002) *Nature*, **417**, 463–468.

23. Newmyer, S.L., and Ortiz de Montellano, P.R. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 19430–19438.
24. Newmyer, S.L., and de Montellano, P.R. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 14891–14896.
25. Savenkova, M.I., Newmyer, S.L., and Montellano, P.R. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 24598–24603.
26. Tanaka, M., Ishimori, K., Mukai, M., Kitagawa, T., and Morishima, I. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9889–9898.
27. Tanaka, M., Nagano, S., Ishimori, K., and Morishima, I. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9791–9798.
28. Nagano, S., Tanaka, M., Watanabe, Y., and Morishima, I. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 417–423.
29. Nagano, S., Tanaka, M., Ishimori, K., Watanabe, Y., and Morishima, I. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14251–14258.
30. Rodriguez-Lopez, J.N., Smith, A.T., and Thorneley, R.N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 4023–4030.
31. Rodriguez-Lopez, J.N., Smith, A.T., and Thorneley, R.N. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 389–395.
32. Rodriguez-Lopez, J.N., Lowe, D.J., Hernandez-Ruiz, J., Hiner, A.N., Garcia-Canovas, F., and Thorneley, R.N. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11838–11847.
33. Smulevich, G., Paoli, M., Burke, J.F., Sanders, S.A., Thorneley, R.N., and Smith, A.T. (1994) *Biochemistry*, **33**, 7398–7407.
34. Henriksen, A., Smith, A.T., and Gajhede, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35005–35011.
35. Doyle, W.A., Blodig, W., Veitch, N.C., Piontek, K., and Smith, A.T. (1998) *Biochemistry*, **37**, 15097–15105.
36. Timofeevski, S.L., Nie, G., Reading, N.S., and Aust, S.D. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 147–153.
37. Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K.H., and Piontek, K. (1999) *J. Mol. Biol.*, **286**, 809–827.
38. Blodig, W., Doyle, W.A., Smith, A.T., Winterhalter, K., Choinowski, T., and Piontek, K. (1998) *Biochemistry*, **37**, 8832–8838.
39. Khindaria, A., Yamazaki, I., and Aust, S. D. (1996) *Biochemistry*, **35**, 6418–6424.
40. Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., and Poulos, T.L. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 17574–17580.
41. Kishi, K., Kusters-van Someren, M., Mayfield, M.B., Sun, J., Loehr, T.M., and Gold, M.H. (1996) *Biochemistry*, **35**, 8986–8994.
42. Kishi, K., Hildebrand, D.P., Kusters-van Someren, M., Gettemy, J., Mauk, A.G., and Gold, M. H. (1997) *Biochemistry*, **36**, 4268–4277.
43. Kusters-van Someren, M., Kishi, K., Lundell, T., and Gold, M.H. (1995) *Biochemistry*, **34**, 10620–10627.
44. Timofeevski, S.L., Nie, G., Reading, N.S., and Aust, S.D. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 500–504.
45. Harris, R.Z., Newmyer, S.L., and Ortiz de Montellano, P.R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 1637–1645.
46. Meunier, B., Rodriguez-Lopez, J.N., Smith, A.T., Thorneley, R.N., and Rich, P.R. (1998) *Biochem. J.*, **330 (Pt 1)**, 303–309.
47. Henriksen, A., Schuller, D.J., Meno, K., Welinder, K.G., Smith, A.T., and Gajhede, M. (1998) *Biochemistry*, **37**, 8054–8060.
48. Gilfoyle, D.J., Rodriguez-Lopez, J.N., and Smith, A.T. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **236**, 714–722.
49. Gazaryan, I.G., Klyachko, N.L., Dulkis, Y.K., Ouporov, I.V., and Levashov, A.V. (1997) *Biochem. J.*, **328 (Pt 2)**, 643–647.

50. Veitch, N.C., Gao, Y., Smith, A.T., and White, C.G. (1997) *Biochemistry*, **36**, 14751–14761.
51. Gazaryan, I.G., Doseeva, V.V., Galkin, A.G., and Tishkov, V.I. (1994) *FEBS Lett.*, **354**, 248–250.
52. Rodriguez-Lopez, J.N., Gilabert, M.A., Tudela, J., Thorneley, R.N., and Garcia-Canovas, F. (2000) *Biochemistry*, **39**, 13201–13209.
53. Dunford, H.B., and Adeniran, A.J. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 536–542.
54. Van Haandel, M.J., Claassens, M.M., Van der Hout, N., Boersma, M.G., Vervoort, J., and Rietjens, I.M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1435**, 22–29.
55. Candeias, L.P., Folkes, L.K., and Wardman, P. (1997) *Biochemistry*, **36**, 7081–7085.
56. Folkes, L.K., and Candeias, L.P. (1997) *FEBS Lett*, **412**, 305–308.
57. Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., Ashby, G.A., and Thorneley, R.N. (1996) *Biochem. J.*, **313 (Pt 3)**, 841–847.
58. Gazarian, I.G., Lagrimini, L.M., Mellon, F.A., Naldrett, M.J., Ashby, G.A., and Thorneley, R.N. (1998) *Biochem. J.*, **333 (Pt 1)**, 223–232.
59. Malkowski, M.G., Ginell, S.L., Smith, W.L., and Garavito, R.M. (2000) *Science*, **289**, 1933–1937.
60. Savitsky, P.A., Gazaryan, I.G., Tishkov, V.I., Lagrimini, L.M., Ruzgas, T., and Gorton, L. (1999) *Biochem. J.*, **340 (Pt 3)**, 579–583.
61. Kawano, T., Kawano, N., Hosoya, H., and Lapeyrie, F. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 546–551.
62. Kawano, T., Kawano, N., and Lapeyrie, F. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 553–559.
63. Kawano, T. (2003) *Plant Cell Reports*, **21**, 829–837.
64. Shipovskov, S., Ferapontova, E.E., Gazaryan, I., and Ruzgas, T. (2004) *Bioelectrochemistry*, **63**, 277–280.
65. Abad, J.M., Velez, M., Santamaria, C., Guisan, J.M., Matheus, P.R., Vazquez, L., Gazaryan, I., Gorton, L., Gibson, T., and Fernandez, V.M. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12845–12853.
66. Ferapontova, E., and Gorton, L. (2002) *Bioelectrochemistry*, **55**, 83–87.
67. Haschke, R.H., and Friedhoff, J.M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 1039–1042.
68. Morishima, I., Kurono, M., and Shiro, Y. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 9391–9399.
69. Shiro, Y., Kurono, M., and Morishima, I. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 9382–9390.
70. Ogawa, S., Shiro, Y., and Morishima, I. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 674–678.
71. Howes, B.D., Feis, A., Raimondi, L., Indiani, C., and Smulevich, G. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 40704–40711.
72. Wright, P.J., and English, A.M. (2001) *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**, 348–358.
73. Van Huystee, R.B., Xu, Y., and O'Donnel, J.P. (1992) *Plant Physiology & Biochemistry*, **30**, 293–297.
74. Rasmussen, C.B., Hiner, A.N., Smith, A.T., and Welinder, K.G. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2232–2240.
75. Nie, G., Reading, N.S., and Aust, S.D. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 328–334.
76. Timofeevski, S.L., and Aust, S.D. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 169–175.
77. Reading, N.S., and Aust, S.D. (2000) *Biotechnol. Prog.*, **16**, 326–333.