



УДК 577.156.2+541.128

МАГНИТНЫЙ КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ Co^{2+} -КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ: МНОЖЕСТВЕННЫЙ ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭФФЕКТОРОВ С АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ ФЕРМЕНТА*Блесов А. А., Вэлли Б. Л.**Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова;**Лаборатория биофизических исследований Гарвардской медицинской школы,
Бостон, Массачусетс, США*

При наложении внешнего магнитного поля в спектре КД Co^{2+} -карбоксипептидазы появляется оптически активная полоса при 577 нм, интенсивность которой линейно возрастает при увеличении напряженности магнитного поля от 0 до 47 кГс. Добавление субстратов и ингибиторов (Gly-L-Тур, карбобензоксиглицина, β -фенилпропионата и L-фенилаланина) не изменяет существенно ни общую форму, ни знак полосы магнитного КД, что указывает на сохранение тетраэдрической структуры комплекса металла в активном центре фермента при связывании с указанными эффекторами. Однако влияние эффекторов на тонкую структуру спектров магнитного КД различно, что свидетельствует о сложной топографии активного центра карбоксипептидазы и подтверждает множественный характер взаимодействия различных эффекторов с ферментом.

Замещение иона металла в активном центре металлофермента зачастую более мягкий процесс, чем большинство органохимических модификаций. Не менее существенным представляется и то, что подобное замещение является обычно и более специфическим (см. [1—5]). В химической металлоэнзимологии наиболее изучены производные двухвалентного кобальта, полученные, как правило, замещением цинка в активном центре [2—4], так как цинк в отличие от кобальта диамагнитен, не содержит неспаренных электронов и не является хромофором в видимой области, наиболее удобной для спектральных исследований.

Замещение иона цинка на ион кобальта в активном центре карбоксипептидазы А приводит к увеличению каталитической активности фермента примерно в 2 раза [4], а также характеризуется появлением полос оптического поглощения в видимой области (рис. 1а). В спектре имеется плечо около 500 нм и максимумы при 555 и 572 нм. Полоса поглощения при 572 нм существенна для Co^{2+} -карбоксипептидазы, так как становится оптически активной в магнитном поле. Этот эффект можно обнаружить с помощью метода магнитного КД (см. ниже). Спектры обычного КД, сигнализирующие о наличии оптически активного хромофора в ферменте, эту полосу не выявляют (рис. 1б). Отнесение полос оптического поглощения и КД Co^{2+} -карбоксипептидазы и сопоставление их со спектральными характеристиками низкомолекулярных, модельных комплексных соединений подробно обсуждаются в работах [2, 3, 6].

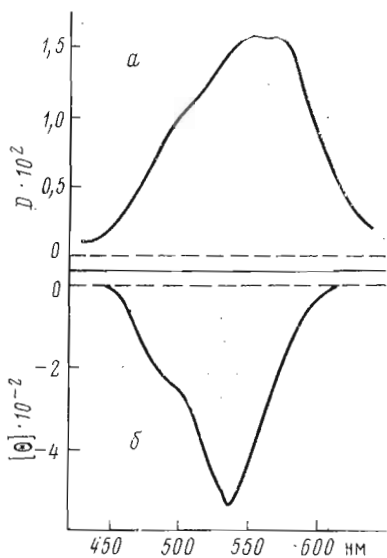


Рис. 1

Рис. 1. Спектры оптического поглощения (а) и КД (б) Co^{2+} -карбокисептидазы. Условия: рН 7,1 (0,005 М Трис-буфер, 1 М NaCl), 23°; концентрация фермента: 1 (а) и 3 мМ (б)

Рис. 2. Кривая разности спектров КД Co^{2+} -карбокисептидазы при напряженности магнитного поля 40000 Гс и в отсутствие его

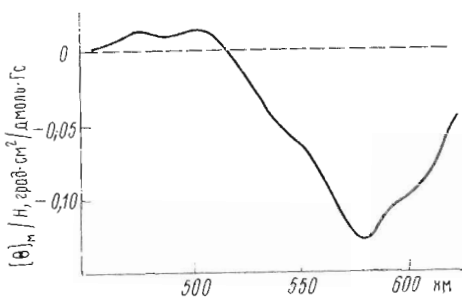


Рис. 2

При наложении внешнего магнитного поля в спектре КД Co^{2+} -карбокисептидазы появляется интенсивная оптически активная полоса при 577 нм, которая была оптически неактивной в отсутствие магнитного поля (рис. 2). Интенсивность сигнала магнитного КД Co^{2+} -карбокисептидазы линейно возрастает при увеличении напряженности магнитного поля до 47 кГс (это предел возможностей прибора Сагу-61, использованного в настоящей работе). Полоса при 577 нм в данном магнитном поле необычайно интенсивна: превосходит в 15 раз полосу максимальной интенсивности при 538 нм в спектре обычного КД.

Эффект магнитного КД возникает в том случае, когда при прохождении циркулярно поляризованного света через вещество наложение внешнего магнитного поля приводит к различному поглощению левой и правой световых компонент. Другими словами, магнитный КД — это КД, индуцированный внешним магнитным полем. Хотя методы измерения обычного и магнитного КД почти идентичны, информация, которую они дают, совершенно разная. При изучении комплексных соединений обычная оптическая активность отражает молекулярную асимметрию окружения хромофора, в то время как спектры магнитного КД сигнализируют о координационной геометрии металла в комплексном соединении. Важно то, что магнитное поле может перевести оптически неактивный хромофор в оптически активный, результирующий сигнал которого дает информацию о координационной геометрии комплексов металлов.

Как известно, получить данные о координационной геометрии комплексов двухвалентного кобальта довольно трудно при использовании спектров оптического поглощения или КД. Дело в том, что эти методы весьма чувствительны к искажению геометрии комплекса и приводят к широкой вариации соответствующих спектров. Напротив, спектры магнитного КД являются в основном характеристическими для комплексов металлов определенной координационной геометрии и не очень чувствительны к искажению симметрии в координационной сфере атома металла [7—9]. Так, для октаэдрических комплексов двухвалентного кобальта, таких, как $\text{Co}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$, $\text{Co}^{2+}(\text{NH}_3)_6$, $\text{Co}^{2+}(\text{Gly-Gly})_2$, спектры магнитного КД имеют одну слегка структурированную, отрицательную полосу приблизительно при 510 нм с величиной молекулярной магнитной эллиптичности $[\theta]_m$ в интервале от $-0,006$ до $-0,028$ град·см²/дмоль Гс [9]. Спектры

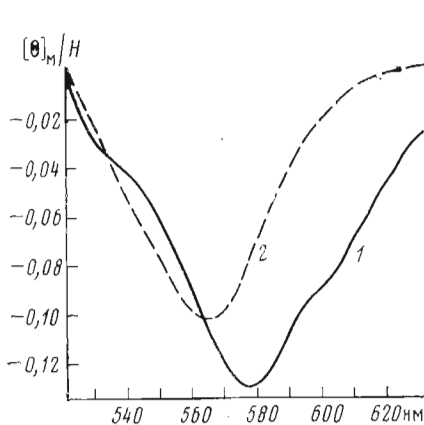


Рис. 3

Рис. 3. Спектры магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы в отсутствие (1) и в присутствии Gly-L-Тур при концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ М (2)

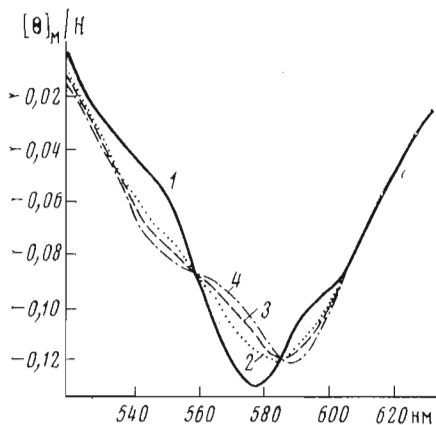


Рис. 4

Рис. 4. Спектры магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы в отсутствие (1) и в присутствии β -фенилпропионата при концентрации последнего 0,72 (2), 1,44 (3) и 6,71 мМ (4)

магнитного КД тетраэдрических комплексов двухвалентного кобальта, таких, как $\text{Co}(\text{OH})_4^{2-}$ или $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$, характеризуются интенсивной отрицательной полосой приблизительно при 600 нм (с $[\theta]_M$ между $-0,02$ и $-3,0$) и более слабой положительной полосой при более коротких длинах волн (~ 530 нм). Наконец, спектры пентакоординационных соединений, таких, как дибромид комплекса двухвалентного кобальта с трис-(2-диметиламиноэтил)амином, более сложны и состоят из двух отрицательных структурированных полос магнитного КД с максимумами ~ 600 и 500 нм (с величинами $[\theta]_M$ в интервале от $-0,06$ до $-0,2$) и иногда слабой положительной полосы при более коротких длинах волн [9].

Спектры простых комплексных соединений с известной координационной геометрией [9] можно рассматривать как эталонные и сопоставлять их со спектрами магнитного КД металлоферментов, содержащих ион двухвалентного кобальта в активном центре. Необходимо еще раз подчеркнуть, что в отличие от спектров оптического поглощения и КД, которые резко усложняются при переходе от простых комплексов металлов к металлоферментам, форма спектра магнитного КД характеризует только общую геометрию координационной сферы комплексов двухвалентного кобальта. Так, спектр магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы (рис. 2) имеет два экстремума (отрицательный при 577 нм и менее интенсивный, положительный, при 500 нм) и подобен спектрам магнитного КД тетраэдрических комплексов двухвалентного кобальта. Анализ спектров магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы и сопоставление их со спектрами модельных комплексных соединений приводит к выводу о том, что координационное число кобальта в активном центре карбоксипептидазы равно четырем (см. [9]). Этот вывод подтверждается результатами рентгеноструктурного анализа карбоксипептидазы, согласно которым цинк активного центра фермента координационно связан с атомами азота двух остатков гистидина-69 и -196 и с карбоксильной группой глутаминовой кислоты-72, в то время как четвертый координационный центр металла занят молекулой воды или гидроксильным ионом [10].

Как было показано недавно [9], взаимодействие псевдосубстрата Gly-L-Тур с Co^{2+} -карбоксипептидазой не изменяет ни общую форму, ни знак полосы магнитного КД фермента. По-видимому, Gly-L-Тур, взаимодействуя с ионом кобальта своей депротонированной α -аминогруппой [5], замещает один из лигандов металла активного центра фермента, не изме-

няя его координационного числа. При этом происходит лишь некоторый гипсохромный сдвиг полосы магнитного КД с уменьшением ее интенсивности (рис. 3).

В предыдущей работе [5] нами были получены данные, отражающие множественный характер взаимодействия эффекторов (субстратов, ингибиторов и активаторов) с активным центром карбоксипептидазы. Топография активного центра данного фермента сложна и включает в качестве функциональных, или «якорных», групп ион металла, по меньшей мере три гидрофобных сорбционных участка, три положительно заряженных остатка аргинина (71, 127 и 145) и один отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты-270. Этим и объясняется многообразие способов связывания эффекторов с активным центром карбоксипептидазы [5]. Чтобы подтвердить индивидуальность способов связывания различных эффекторов с активным центром фермента, показанную в работе [5], метод магнитного КД был использован также для изучения взаимодействия ряда соединений с Co^{2+} -карбоксипептидазой.

β -Фенилпропионат является ингибитором ферментативной активности карбоксипептидазы и, как можно заключить из данных спектрального титрования арсанилазотирозин-248-карбоксипептидазы [5], при связывании взаимодействует своей карбоксильной группой с ионом металла активного центра фермента. На рис. 4 показано изменение спектра магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы под действием β -фенилпропионата. Как видно, общая форма спектра не изменяется при взаимодействии фермента с ингибитором, но характер влияния β -фенилпропионата на спектр магнитного КД существенно отличается от влияния Gly-L-Тур (рис. 3). Максимальная интенсивность спектра при 577 нм почти не изменяется, имеются две изобестические точки при 559 и 586 нм. При увеличении концентрации β -фенилпропионата от 0,72 до 6,7 мМ спектральный максимум смещается от 577 до 588 нм (рис. 4).

Влияние L-фенилаланина на спектр магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы (рис. 5) отличается от влияния как Gly-L-Тур, так и β -фенилпропионата. Происходит уменьшение интенсивности спектральной полосы (при длинах волн, меньших 607 нм) без существенных сдвигов и при сохранении общей формы спектра. Можно полагать, что отличия в спектральном влиянии данного ингибитора (ср. рис. 3—5) вызваны тем, что L-фенилаланин практически не взаимодействует с ионом металла активного центра при связывании с ферментом [5].

Карбобензоксиглицин в отличие от первых трех эффекторов является активатором пептидазной и ингибитором эстеразной активности и взаимодействует с гидрофобным участком активного центра своей N-ацильной группой [5]. При постепенном добавлении карбобензоксиглицина к Co^{2+} -карбоксипептидазе происходит существенное возрастание отрицательной магнитной эллиптичности (при длинах волн выше 542 нм) и максимум полосы магнитного КД сдвигается с 577 нм для свободного фермента до 586 нм (рис. 6), плечо между 580 и 600 нм исчезает (ср., например, рис. 5 и 6).

При добавлении всех изученных эффекторов к Co^{2+} -карбоксипептидазе общая форма спектра магнитного циркулярного дихроизма сохраняется, что указывает на сохранение тетраэдрической структуры комплекса металла в активном центре фермента. Однако различное влияние эффекторов на тонкую структуру спектров магнитного КД свидетельствует о сложной топографии активного центра карбоксипептидазы и подтверждает множественный характер взаимодействия различных эффекторов с ферментом.

Теория спектров магнитного КД еще не достаточно разработана, и детальная интерпретация их пока не представляется возможной. Для более полного анализа эффекта Фарадея необходимо, в частности, изучение температурной зависимости спектров магнитного КД. Однако вариация температуры на несколько десятков градусов, необходимая для корректного проведения анализа, требует применения неводных растворителей,

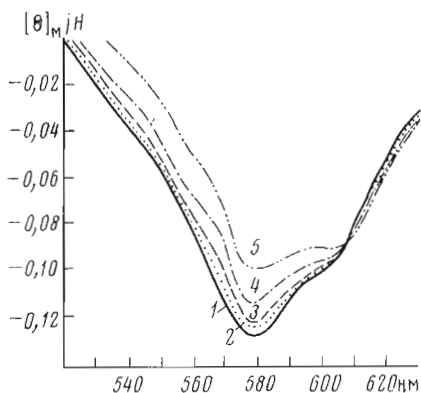


Рис. 5

Рис. 5. Спектры магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы в отсутствие (1) и в присутствии *L*-фенилаланина при концентрации последнего 1,19 (2), 2,35 (3), 4,62 (4), 9,91 мМ (5)

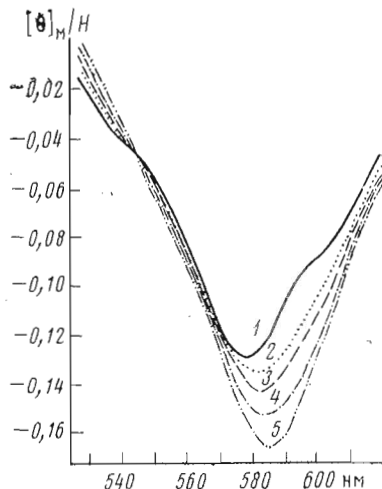


Рис. 6

Рис. 6. Спектры магнитного КД Co^{2+} -карбоксипептидазы в отсутствие (1) и в присутствии карбобензоксиглицина при концентрации последнего 6,44 (2), 12,8 (3), 18,9 (4), 31 мМ (5)

что в свою очередь ставит ряд дополнительных вопросов, касающихся влияния растворителя как на конформацию фермента, так и на сами спектры. Обе эти проблемы пока не решены. Имеющиеся данные показывают, что применение магнитного КД на его настоящем теоретическом уровне и инструментальном оформлении позволяет определять координационную геометрию комплексов двухвалентного кобальта, а также выявлять различия в характере взаимодействия эфффекторов с активным центром металлоферментов.

Экспериментальная часть

Карбоксипептидаза A_7 , выделенная по методу Ансона [11], была получена в виде водной суспензии кристаллов от фирмы Worthington Biochemical Corp. (США). Кристаллы промывали 3 раза деионизованной дистиллированной водой и растворяли при pH 7,5 (1 М NaCl + 0,05 М Трис-буфер). Все растворы обрабатывали 0,1% дитизоном в четыреххлористом углероде [12] для устранения следов металлов. Стеклопосуду и пипетки предварительно обрабатывали смесью (1 : 1) азотной и серной кислот и тщательно промывали дистиллированной водой, свободной от следов металлов.

Методика замены металла в Zn^{2+} -карбоксипептидазе на Co^{2+} подробно описана в работе [4]. Полученный кристаллический препарат фермента содержал ~ 3% остаточного цинка, как было показано методом атомной абсорбционной спектроскопии [13]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 278 нм, используя коэффициент молярной экстинкции $6,42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [14].

Измерение магнитного циркулярного дихроизма было проведено с использованием регистрирующего спектрополяриметра Cary-61, снабженного сверхпроводящим магнитом типа Varian V 4145 (США). Напряженность магнитного поля (H) варьировалась от 0 до 47 кГс и при серийных опытах равнялась 40 кГс. Скорость сканирования спектров обычно составляла 0,2 нм/с (диапазон шкалы 0,05 град). Концентрация Co^{2+} -карбоксипептидазы во всех случаях равнялась $7,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, измерения проводили при 23°, pH 7,0 (0,01 М раствор 2-(*N*-морфолин)этансульфоновой

кислоты, 1 M NaCl). При данной концентрации фермента величина оптического поглощения в исследованном спектральном диапазоне не превышала единицы оптической плотности. Для измерения магнитного КД использовали цилиндрические супразимовые кюветы объемом 1 мл и длиной светового пути 1 см. Направление магнитного поля во всех случаях совпадало с направлением светового пути.

Величину эллиптичности в отсутствие магнитного поля (при измерениях обычного КД) выражали в виде молекулярной эллиптичности, $[\Theta] = (\Theta/10) (M/lc)$ в единицах град·см²/дмоль, где Θ — наблюдаемая эллиптичность, град; M — молекулярный вес (34 600 для карбоксипептидазы А); l — длина светового пути, см; c — концентрация фермента, г/мл. Величину эллиптичности в присутствии внешнего магнитного поля выражали в виде молекулярной магнитной эллиптичности $[\Theta]_M$ в град·см²/дмоль·Гс и рассчитывали как разницу в эллиптичности в присутствии и в отсутствие внешнего магнитного поля, отнесенную к величине напряженности поля (H). Детали спектральных измерений, а также калибровка КД и магнитного КД описаны в работе [9]. Спектры оптического поглощения были получены с использованием регистрирующего спектрофотометра Cary-14 при 23°, рН 7,4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vallee B. L., Williams R. J. P. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 59, 498—505.
2. Vallee B. L., Latt S. A. (1970) in Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes (Desnuelle P., Neurath H., Ottesen M., eds.), pp. 144—159, Munksgaard — Copenhagen — Denmark.
3. Vallee B. L. (1972) in Metal Ions in Biological Systems (Dhar S. K., ed.), pp. 1—10, Plenum Publishing Corporation.
4. Клесов А. А., Вэлли Б. Л. (1977) Биоорг. химия, 3, 806—815.
5. Клесов А. А., Вэлли Б. Л. (1977) Биоорг. химия, 3, 964—980.
6. Latt S. A., Vallee B. L. (1971) Biochemistry, 10, 4263—4270.
7. Holmquist B., Vallee B. L. (1974) J. Biol. Chem., 249, 4601—4607.
8. Kaden T. A., Holmquist B., Vallee B. L. (1974) Inorg. Chem., 13, 2585—2590.
9. Holmquist B., Kaden T. A., Vallee B. L. (1975) Biochemistry, 14, 1454—1461.
10. Ludwig M. L., Lipscomb W. N. (1973) in Inorganic Biochemistry (Eichhorn G. L., ed.), vol. 1, pp. 438—487, Elsevier.
11. Anson M. L. (1937) J. Gen. Physiol., 20, 777.
12. Thiers R. E. (1957) Methods Biochem. Anal., 5, 273—335.
13. Fuwa K., Pulido P., McKay R., Vallee B. L. (1964) Anal. Chem., 36, 2407—2411.
14. Simpson R. T., Riordan J. F., Vallee B. L. (1963) Biochemistry, 2, 616—622.

Поступила в редакцию
26.XI.1976

MAGNETIC CIRCULAR DICHROIC SPECTRA OF COBALT (II) CARBOXYPEPTIDASE: MUTUAL CHARACTER OF INTERACTION OF INHIBITORS WITH THE ENZYME ACTIVE CENTER

KLYOSOV A. A., VALLEE B. L.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
Biophysics Research Laboratory, Department of Biological Chemistry,
Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA*

Magnetic circular dichroic (MCD) spectra of cobalt (II) carboxypeptidase are characterized by a pronounced, negative extremum at 577 nm, a region devoid of optical activity in the absence of a magnetic field. The spectral intensity increases linearly as a function of the magnetic field strength from 0 to 47 kG. Addition of substrates and inhibitors such as Gly-*L*-Tyr, Z-Gly, β -phenylpropionate and *L*-Phe neither alters the overall shape nor the sign of the MCD signal of cobalt (II) carboxypeptidase. The spectra of the enzyme, therefore, do not give evidence of a change in coordination geometry of the enzyme substrate (inhibitor) complex when compared with that of the free enzyme. However, in all instances each of these agents affects the fine structure of the cobalt (II)-carboxypeptidase MCD spectra in a manner quite characteristic of each, suggesting that the topography of this enzyme's active center is complex, consistent with other spectroscopic and kinetic data.