

人锰超氧化物歧化酶的紫外可见吸收光谱研究

李连之^{*1} 欧阳砥² 邱晓航² 胡绪英² 周永洽² 申泮文²⁽¹⁾ 聊城师范学院化学系, 聊城 252059⁽²⁾ 南开大学化学系, 天津 300071

研究了重组人锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 的紫外可见吸收光谱。经光学电负性和摩尔吸收系数分析, 重新归属了酶中 Mn(III) 的可见光谱, 首次报道了酶中 Mn(II) 的电荷转移光谱。研究表明, MnSOD 中显示的电荷转移谱带全部是由 His 咪唑基 π 轨道向金属轨道的 LMCT 跃迁。

关键词: 锰超氧化物歧化酶 紫外可见光谱 电荷转移光谱 光学电负性
分类号: O614.24

在金属酶和金属蛋白研究中, 锰中心的研究尚处于初步阶段^[1,2]。分离自原核生物^[3,4]的锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 金属中心的结构曾被详细研究过。Wagner 等人^[5]对人 MnSOD 和嗜热菌 MnSOD 进行了 X-射线单晶分析, 分辨率为 8.0~3.2 Å。Borgstahl 等人^[6]的人线粒体 MnSOD X-射线单晶分析, 分辨率达到 2.2 Å。人线粒体 MnSOD 活性中心取三角双锥结构, 与锰离子配位的基团在赤道平面上为 His-74、His-163 和 Asp-159, 在轴向为 His-26 和一个 H₂O 分子。配位原子在赤道平面上为两个组氨酸的咪唑氮和一个天门冬氨酸的羧基氧。轴向为一个组氨酸的咪唑氮和一个来自水分子的氧原子。

Keele 等人^[3]从大肠杆菌分离得到了仅含 Mn(III) 的 MnSOD, 他们观察到在 420nm 附近有一条谱带, 在长波长一侧有明显肩峰。他们把此谱带归属为 Mn-L 的电荷转移跃迁。植物 MnSOD 的光谱研究^[7]表明, 在 370~400nm 附近和 571~606nm 附近观察到一对肩峰。前者可能为 Mn-L 电荷转移峰, 后者可能为 $d-d$ 跃迁。Whittaker 等人^[8]同样由大肠杆菌分离得到 MnSOD, 在 400~667nm 附近观察到一个带肩峰的宽峰, 经 Gaussian 分解, 把这组峰都归属为高自旋 Mn(III) 的 $d-d$ 跃迁, 分别由 d_{z^2} 轨道向 $d_{x^2-y^2}$ 、 d_{xy} 、 d_{xz} 和 d_{yz} 跃迁。很容易看出, Keele^[3]和 Whittaker^[8]的实验光谱是基本相同的, 他们对光

谱的解释却完全不同。近期, Whittaker 等人^[9]又研究了 MnSOD 的单晶偏振光谱, 将 500nm 附近的强偏振光谱归属为 Mn 配体天门冬氨酸的羧基氧到 Mn(III) 的电荷转移光谱 (LMCT)。另一点值得注意的是, MnSOD 中 Mn(II) 中心的光谱从未见有报道。因此, 我们研究了重组人 MnSOD 的紫外可见吸收光谱和示差光谱, 利用光学电负性和摩尔吸收系数数据分析, 重新归属了 Mn(III) 的谱带, 首次报道了 Mn(II) 的电荷转移光谱。

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器

羧甲基纤维素 (CM-52) (Serva 产品), 二乙基胺基乙基纤维素 (DEAE-52) (Whatman 产品), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (A. R., 华美生物工程公司), 脲、EDTA、邻苯三酚等均为分析纯试剂。

UV-240 紫外可见分光光度计 (日本岛津), DU-8B 紫外可见分光光度计 (Beckman), pHs-2C 型精密酸度计 (上海雷磁仪器厂)。

1.2 MnSOD 的制备

采用文献^[10]的方法, 并进行改进^[11]。将含有重组人 MnSOD 质粒的 *E. coli* 菌进行发酵, 离心收集菌体, 破碎细胞并离心得含酶上清液。在上清液中加入 MnCl₂ 使其浓度为 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用水浴迅速加

收稿日期: 2002-01-21。收修改稿日期: 2002-04-05。

* 通讯联系人。E-mail: lilianzhi@263.net

第一作者: 李连之, 男, 39 岁, 博士后, 副教授; 研究方向: 生物无机化学和化学生物学。

热至 60℃, 并保温 1h, 整个过程中不断搅拌。迅速冷至 4℃, 离心将上清液浓缩后对 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.8 的磷酸盐缓冲液透析。将透析液上 DEAE-52 柱, 用 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.8 的磷酸盐缓冲溶液洗脱, 收集 MnSOD 活性组分, 再超滤浓缩并对 $40\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.5 的 KAc-HAc 缓冲液透析。透析后上预先用此缓冲液平衡的 CM-52 柱, 用 $40 \sim 200\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.5 的 KAc-HAc 缓冲溶液进行梯度洗脱。收集 MnSOD 的高活性组分, 超滤浓缩、透析、冷冻干燥, 制得电泳纯 MnSOD。

酶活性测定采用邻苯三酚自氧化法^[12], 测得 MnSOD 的比活为 $3216\text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

1.3 MnSOD 溶液的配制

将电泳纯 MnSOD 配成浓度 (以 Mn 含量计) 为 $7.20 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH 7.80, $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液。在 MnSOD 活性中心, 按 Mn(II)/Mn(III) 的比为 2/3^[8], 折算成 Mn(II) 中心浓度为 $2.88 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mn(III) 中心浓度为 $4.32 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.4 脱辅基 MnSOD (Apo-MnSOD) 溶液配制

Apo-MnSOD 的制备^[13]: 将含 $5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MnSOD 的 pH 7.5, $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液对含 $8\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脲, $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH 3.7 (HAc 调节) 的溶液在 4℃ 下透析 12h。所得无色溶液再对含 $8\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脲, $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 pH 7.5, $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液透析 6~8h, 然后再对仅含 $0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的相同缓冲液透析, 即可制得 Apo-MnSOD。

按 MnSOD 溶液的配制条件, 配制成与 MnSOD 溶液相同蛋白浓度的 Apo-MnSOD 的参比溶液。

1.5 光谱的扫描

文献报道^[3, 7, 8], MnSOD 中 Mn(III) 中心的吸收光谱在 400~600nm 附近, 我们用 DU-8B 紫外可见分光光度计在 380~700nm 间以配制样品的缓冲液为参比, 扫描试样溶液的光谱, 5cm 比色池。试样溶液以 Apo- 蛋白溶液为参比扫描示差光谱。光谱扫描均在室温下进行。

2 结果与讨论

2.1 摩尔吸收系数和谱带归属

过渡金属的电子吸收光谱一般包括 *d-d* 跃迁光谱和电荷转移光谱。由于 *d* 轨道有内禀的 *g* 对称

性, 因此, *d-d* 跃迁是宇称禁阻的, 它们产生的谱带都很弱。即使对于不含对称中心的物种, 宇称禁阻被解除了, 但由于宇称性并不依赖于对称中心, 宇称禁阻的解除是不完全的, 这类谱带仍然比较弱。一般来说, *d-d* 跃迁光谱谱带较弱, 其摩尔吸收系数一般小于 $200\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 吸收波长一般在 400~800nm 间。电荷转移光谱分为金属中心向配体轨道的电荷转移 (MLCT) 和配体轨道向金属中心的电荷转移 (LMCT), 电荷转移光谱一般都比较强, 摩尔吸收系数一般在 10^3 到 $10^4\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 之间, 谱带经常位于可见区或紫外区, 在近紫外观察到的机会较多, 但可见区甚至近红外区也经常能观察到。

金属蛋白或酶是生物大分子, 试样的浓度比较低, 研究摩尔吸收系数不大于 $10^3\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的 *d-d* 跃迁, 显然远不如研究摩尔吸收系数经常在 $10^3 \sim 10^4\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 间的电荷转移光谱更方便些。金属蛋白或酶的蛋白肽链部分多数在 280~260nm 附近有强吸收, 它们来自芳香氨基酸残基的 $\pi-\pi^*$ 跃迁或 $n-\pi^*$ 跃迁。实验时, 如果用脱辅基蛋白的同浓度溶液作参比, 上述强吸收常能得到补偿或基本补偿, 电荷转移跃迁即使位于紫外区也能观察到。总之, 只要金属离子与配体分子配位, 电荷转移跃迁总是存在, 用它们来研究金属中心结构值得优先选择。

图 1 为 MnSOD 的可见吸收光谱, 它存在着明显的肩峰。为初步观察这个谱带有多少个吸收峰叠加而成, 我们扫描了其 1 阶导数光谱, 见图 2。由 1 阶导数光谱图可初步判断吸收光谱是由四个吸收带组

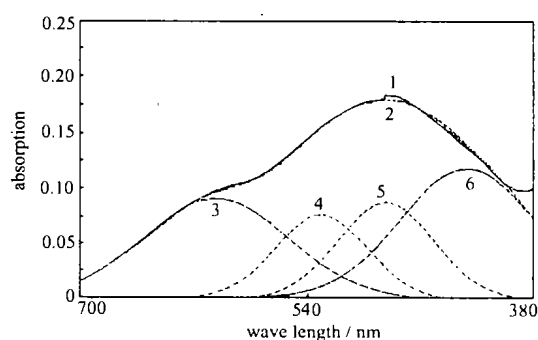


图 1 重组人 MnSOD 的可见吸收光谱和高斯分解图

Fig. 1 Visible absorption spectra and its Gaussian deconvolution of recombinant human MnSOD

1 visible absorption spectrum; 2 simulated spectrum obtained as a sum of the individual Gaussian curves; 3, 4, 5, 6 Gaussian deconvolution curves

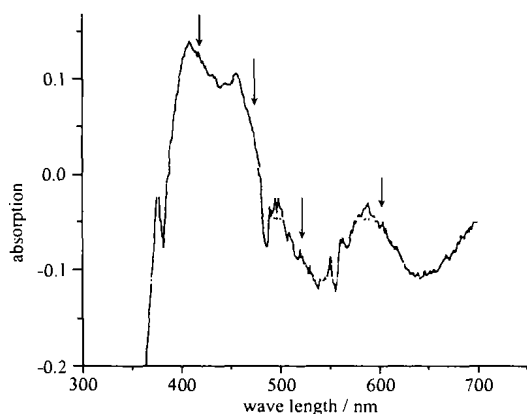


图 2 重组人 MnSOD 的一阶导数光谱

Fig. 2 First derivative spectrum of recombinant human MnSOD

成的, 吸收峰位置如图上箭头所示。

为试图检测 Mn(II)中心的光谱, 必须用去掉锰离子的脱辅基蛋白作参比溶液进行测量。因为预计谱带位置应在紫外区, 可能与蛋白紫外区的强吸收峰交叠, 用脱辅基蛋白作参比可扣除其影响。图 3 为试样溶液以 Apo-MnSOD 蛋白溶液为参比扫描所得示差光谱图。由图 3 可见, 吸光度为零的基线以上有两个吸收峰, 一个在 234nm 附近, 应为酶蛋白的芳香氨基酸残基 $\pi-\pi^*$ 跃迁或 $n-\pi^*$ 跃迁峰的残余。另一个在 280~292nm 附近, 有明显的肩峰, 这组峰可能为 Mn(II)中心的 Mn-L 电荷转移跃迁, 也可能是 L-Mn 电荷转移跃迁。这两组峰所以有一部分在基线以下, 234nm 附近所以有残余峰, 都可能是因为 Apo- 操作导致酶蛋白构象的变化, 使光谱扫描补偿不完全所造成的; 也可能是由于 MnSOD 与 Apo-MnSOD 的蛋白浓度有微小差别造成的。若如此, 但也并不影响在 280~292nm 处得到了差谱, 否

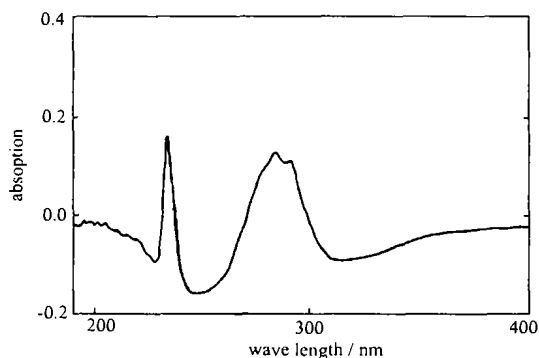


图 3 重组人 MnSOD 的差式紫外吸收光谱

Fig. 3 UV difference absorption spectrum of recombinant human MnSOD

则 234nm 处的差谱值会远大于 280~292nm 的差谱值, 因为在蛋白中 230nm 处的吸收值远大于 280nm 的吸收值。图 1 上谱带最大吸收峰 $\lambda_{\max}$ 处的吸光度 $A=0.184$, 图 3 上谱带最大吸收峰 $\lambda_{\max}$ 处的吸光度 $A=0.131$ 。如果把它们分别归属为 Mn(III)和 Mn(II)中心的 M-L 电荷转移谱带或 L-M 电荷转移谱带, 分别用 Mn(III)和 Mn(II)中心的浓度计算它们的摩尔吸收系数, 得到其摩尔吸收系数分别为 851.9 和 $4.55 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 都有 10^3 数量级, 把它们归属为电荷转移跃迁比较合适。Whittaker 等人^[8]把 400~600nm 的谱带 (相当于图 1 的谱带) 归属为 $d-d$ 跃迁, 如果他们的归属正确, 这确实是十分少见的强 $d-d$ 吸收峰。问题是, 我们的归属还需要辨明是 LMCT 还是 MLCT 跃迁, 更重要的是要有理论数据的支持。

2.2 Jorgensen 公式^[14]

Jorgensen 引入轨道光学电负性的概念, 认为电荷转移跃迁的能量 (谱带位置) 取决于跃迁涉及的两个轨道的光学电负性。光学电负性的数值实际上与 Pauling 定义的电负性相当, 但数值上已经用一般跃迁能量大致为 30000 cm^{-1} 作了校定。Jorgensen 用如下公式计算电荷转移跃迁的能量, 对 MLCT 和 LMCT 跃迁的公式分别为:

$$E(\text{MLCT}, \text{cm}^{-1}) = 30000[\chi(\text{M}) - \chi(\text{L})] + \Delta\text{OE} + \Delta\text{SPE} \quad (1)$$

$$E(\text{LMCT}, \text{cm}^{-1}) = 30000[\chi(\text{L}) - \chi(\text{M})] + \Delta\text{OE} + \Delta\text{SPE} \quad (2)$$

公式中的 $\chi(\text{M})$ 和 $\chi(\text{L})$ 分别是金属和配体上非键轨道的光学电负性。 ΔSPE 是自旋成对能校正项。光学电负性对非键轨道定义, 是为便于使它的数值具有通用性, 应用时只要条件许可, 有时要参考分子轨道能级图, 用跃迁电子实际涉及的轨道再作校正, 这就是 ΔOE 项的由来。但这一项通常不大, 作估算时可以忽略。

在应用时, ΔSPE 用自旋成对能参数 D 表示。对 d 电子跃迁, D 约等于 $7B$, B 是 Racah 参数。对 Mn(III)中心, 在 MLCT 跃迁前后自旋角动量量子数 S 从 2 变成 $3/2$ (d^4 变成 d^3 , 高自旋), $\Delta\text{SPE} = 2D \approx 14B$ ^[15]。在 LMCT 跃迁中, 如电子跃迁到最高未占轨道, S 从 2 变成 $5/2$, $\Delta\text{SPE} = -18.7B$, 谱带很可能出现在近红外区, 不属于我们讨论的范围。如电子跃迁到已占轨道, S 从 2 变成 $3/2$, $\Delta\text{SPE} = 16.3B$ 。对

Mn(III)中心, 在 LMCT 中, S 从 $5/2$ 变成 2 , $\Delta\text{SPE} = 18.7 B$, 对 LMCT, S 变化相同, $\Delta\text{SPE} = 18.7 B$ 。

2.3 Mn(III)中心的光谱

文献^[3, 7, 8]普遍报道图 1 的光谱属于 Mn(III)中心。我们先来讨论这组谱带。由图 2 看出, 这组谱带可能包含有 4 个峰。我们用吸收光谱的 Gaussian 分解程序对谱带作 Gaussian 分解, 结果也显示在图 1 中。有关数据见表 1。这一分解结果与文献^[8]基本相同。

表 1 重组人锰 SOD 可见吸收光谱的高斯分解数据
Table 1 Data of Gaussian Deconvolution of Visible Absorption Spectrum of Recombinant Human MnSOD

band	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	absorbance	width at half-maximum height/nm
1	603	0.09	60
2	529	0.08	38
3	483	0.09	40
4	426	0.12	56

梁贤振等^[16]在研究牛红细胞 CuZnSOD 时, 曾把有关的电荷转移谱带归属为 LMCT, 根据 Jorgensen 公式作了详细分析, 取得重要结果。他们得到组氨酸咪唑基的 π_1 和 π_2 轨道的光学电负性分别为 2.84 和 3.08~3.14。在分析较低分辨率的光谱时, 可取平均值 $\chi(L) = 3.0$ 。文献上, Mn(III)的光学电负性只有八面体环境中低自旋组态的数值, $\chi(\text{Mn}^{3+}) = 2.0^{[15]}$ 。通常高自旋组态的光学电负性要高于低自旋组态, 一般要高 0.5 左右。低对称性环境的光学电负性要高于高对称性环境。MnSOD 的锰中心有 C_2 对称性, 在这一环境中 Mn(III)的光学电负性要更高些。我们取 $\chi(\text{Mn}^{3+}) = 2.8$, 试着作进一步分析。

在 LMCT 跃迁中, $\Delta\text{SPE} = 16.3 B$, 如果取 $B = 965\text{cm}^{-1}[15]$, 则有 $\Delta\text{SPE} = 15730\text{cm}^{-1}$ 。把以上数据代入公式(2), 得到:

$$E(\text{Mn}^{3+}, \text{LMCT}, \text{cm}^{-1}) = 21730 + \Delta\text{OE}$$

这就是说, 如果忽略轨道能校正项, MnSOD 中 Mn(III)金属中心的 LMCT 跃迁应在 460nm 附近。这个结果与图 1 中吸收峰的最大峰位大致相吻合。Gaussian 分解得到 4 个峰, 在校正轨道能项后, 也不难取得基本符合的结果。这表明, 文献^[8]把相当于图 1 的吸收峰归属为 $d-d$ 跃迁是值得商榷的。摩尔吸收系数的数值和光学电负性分析都不支持他们的归属。文献^[13-7]把谱带归属为 MLCT 也是值得商榷

的。梁贤振^[16]和我们的结果都认为归属为 LMCT 跃迁更为合理, 这与文献^[9]的归属也是一致的。

2.4 Mn(II)中心的光谱

关于 Mn(II)中心, 文献上的光谱工作尚属空白。这是因为 Mn(II)有 d^5 高自旋组态, 它的 $d-d$ 跃迁必然极弱, 人们对此不感兴趣。值得注意的是, Mn(II)的电荷转移谱带应该引起人们的关注, 但至今仍未见报道。

我们认为图 3 中 285nm 附近的谱带属于 Mn(II)中心, 可以归属为这一金属中心的 LMCT 谱带。仍然用公式(2)分析这一谱带, Mn(II)的光学电负性应低于 Mn(III)。通常核电荷降低 1, 在相同环境中光学电负性可以低 0.1~0.5 左右, 我们取 $\chi(\text{Mn}^{2+}) = 2.4$ 。Mn²⁺的 B 值约为 $860\text{cm}^{-1}[15]$ 。 $\Delta\text{SPE} = 18.7 B = 16100\text{cm}^{-1}$ 。把上述数值代入公式(2), 得到:

$$E(\text{Mn}^{2+}, \text{LMCT}, \text{cm}^{-1}) = 34100 + \Delta\text{OE}$$

如果忽略轨道校正项, 谱带应在 293nm 附近。这与图 3 中谱带位置十分接近。这表明, 我们已取得观察到人 MnSOD 中 Mn(II)金属中心 LMCT 谱带的证据, 这在文献中尚属首例报道。

3 结 论

在吸收光谱上 460nm 附近的谱带以及在示差光谱上 285nm 附近的谱带, 很可能分别是 Mn(III)和 Mn(II)金属中心的 LMCT 谱带。这两个谱带都可以取 His 咪唑基 π 轨道的光学电负性 $\chi(L) = 3.0$, Mn(III)和 Mn(II)高自旋组态的光学电负性 $\chi(M)$ 分别取 2.8 和 2.4 得到合理解释。

Mn(III)中心 $d-d$ 跃迁的摩尔吸收系数至少要比观察到的谱带低 1 个数量级, Mn(II)中心 $d-d$ 跃迁肯定更弱, 文献上没有报道的应是有关的 $d-d$ 跃迁谱带。由于 Mn(III)中心 LMCT 跃迁出现在可见区, 它的摩尔吸收系数高达 $10^3\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 数量级, 观察到 $d-d$ 跃迁的机会是不乐观的。Mn(II)中心电荷转移谱带正好处于蛋白质芳香氨基酸残基的强吸收带范围内, 要观察这一谱带可以用 Apo- 蛋白作参比, 扫描示差谱。

MnSOD 显示的电荷转移谱带全是由 His 咪唑基 π 轨道向金属轨道的 LMCT 跃迁。文献^[13, 4]把有关谱带归属为 MLCT 跃迁难以得到光学电负性的支持。

参 考 文 献

- [1] Becker J. W., Beeke Jr. G. N., Wang J. L. et al *J. Biol. Chem.*, **1975**, **250**, 1513.
- [2] Antanaitis B. C., Brown III R. D., Chasteen N. D. et al *Biochemistry*, **1987**, **26**, 7932.
- [3] Keele Jr. B. B., McCord J. M., Fridovich I. et al *J. Biol. Chem.*, **1970**, **245**, 6176.
- [4] Lumsden J., Cammack R., Hall D. O. et al *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, **438**, 380.
- [5] Wagner U. G., Patridge K. A., Ludwig M. L. et al *Protein Sci.*, **1993**, **2**, 814.
- [6] Borgstahl G. E. O., Parge H. E., Hickey M. J. et al *Cell*, **1992**, **71**, 107.
- [7] Bannister J. V., Hill H. A. *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase*, Elsevier: Amsterdam, **1980**, p185.
- [8] Whittaker J. W., Whittaker M. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, **113**, 5528.
- [9] Whittaker M. M., Ekberg C. A., Edwards R. A. et al *J. Phys. Chem. B*, **1998**, **102**, 4668.
- [10] Beck Y., Bartfeld D., Yavin Z. et al *Bio/Technology*, **1988**, **6**, 930.
- [11] LI Lian-Zhi (李连之) *Thesis for the Doctorate of Nankai University* (南开大学博士论文), **1998**.
- [12] Marklund S. *Eur. J. Biochem.*, **1974**, **47**, 469.
- [13] Brock C. J., Harris J. J., Sato S. *J. Mol. Biol.*, **1976**, **107**, 175.
- [14] Jorgensen C. K. *Prog. Inorg. Chem.*, **1970**, **12**, 101.
- [15] ZHOU Yong-Qia (周永洽) *Analysis of Molecular Structure* (分子结构分析), Beijing: Chemical Industry Press, **1991**.
- [16] LIANG Xian-Zhen (梁贤振), LI Lian-Zhi (李连之), HU Xu-Ying (胡绪英) et al *Zhongguo Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Xuebao* (Chinese J. of Biochem. Mol. Biol.), **1998**, **14**(2), 175.

Investigation of UV-Visible Absorption Spectra of Recombinant Human Manganese Superoxide Dismutase

LI Lian-Zhi^{*1} OUYANG Di² QIU Xiao-Hang² HU Xu-Ying² ZHOU Yong-Qia² SHEN Pan-Wen²

(¹ Department of Chemistry, Liaocheng Teachers University, Liaocheng 252059)

(² Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

The UV-visible absorption spectra of recombinant human manganese superoxide dismutase (MnSOD) were investigated. The visible absorption spectrum of Mn(III) was assigned anew and the charge transfer spectrum of Mn(II) in MnSOD was first reported according to the optical electronegativity and mole absorption coefficient of MnSOD. These results have shown that all the charge transfer spectra displayed in MnSOD are attributed to the ligand metal charge transfer spectra (LMCT) from the π orbitals of imidazole of histidine to metal orbitals.

Keywords: manganese superoxide dismutase UV-visible spectra charge transfer spectra
optical electronegativity