



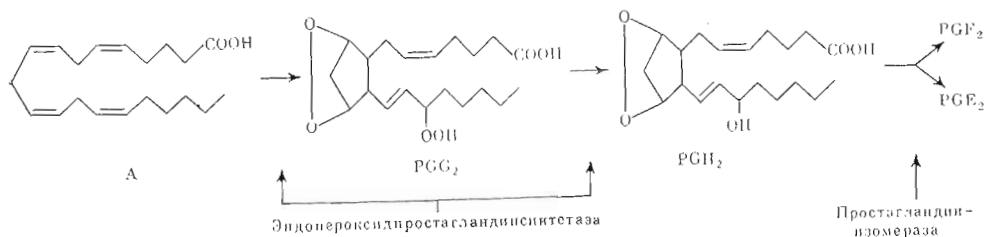
УДК 577.159.3

ПРОСТАГЛАНДИНСИНТЕТАЗА

ИНАКТИВАЦИЯ ЭНДОПЕРОКСИДПРОСТАГЛАНДИНСИНТЕТАЗЫ —
ЛИМИТИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА СИНТЕЗА ПРОСТАГЛАНДИНОВ*Мевх А. Т., Вржещ П. В., Швядас В. Ю.-Б.,
Варфоломеев С. Д.**Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова**Мяжкова Г. Ш., Якушева Л. А.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Количественно изучена первая стадия биоспецифического синтеза простагландинов, катализируемая эндопероксидпростагландинсинтетазой. Проведено изучение интегральной кинетики поглощения кислорода при окислении арахидоновой кислоты. Исследован эффект инактивации эндопероксидпростагландинсинтетазы в процессе реакции. Анализируются возможные механизмы инактивации: мономолекулярная инактивация фермента, фермент-субстратного комплекса, бимолекулярные механизмы инактивации субстратом и продуктом реакции. На основании анализа кинетических параметров инактивации показано, что основной вклад в этот процесс вносит реакция с кислородом, катализируемая геминном. Получены (или оценены) параметры реакции: K_m по арахидоновой кислоте, кислороду, донорам электронов, наблюдаемая константа инактивации фермента в процессе реакции ($1,6 \pm 0,2 \text{ мин}^{-1}$), определены также константа диссоциации комплекса апофермент — гемин и каталитическая константа реакции.

Полиферментный комплекс синтеза простагландинов из везикулярных желез барапа осуществляет превращение арахидоновой кислоты (А) в простагландины (PGE_2 и PGF_2) и включает в себя по крайней мере два фермента: эндопероксидпростагландинсинтетазу (КФ 1.14.99.1) [1, 2] и простагландинизомеразу (КФ 5.3.99.3):



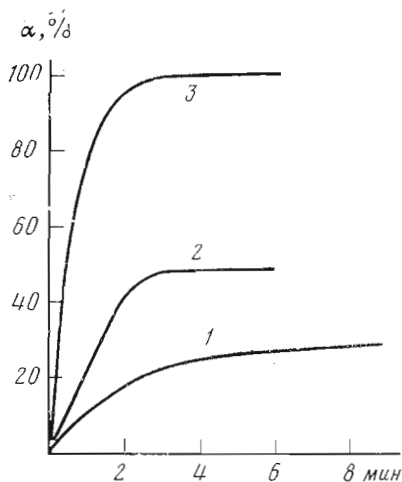


Рис. 1

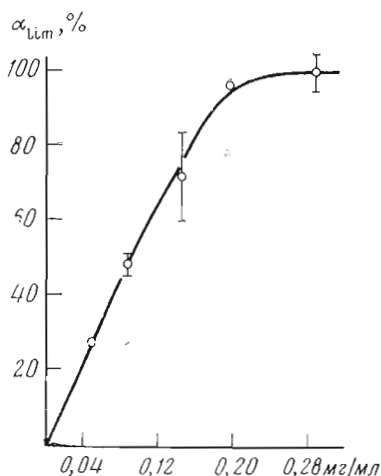


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость степеней конверсий кислорода в эндопероксидпростагландинсинтетазной реакции от времени при концентрации фермента 0,048 (1), 0,096 (2), 0,196 (3) мг микросомного белка на 1 мл. Арахидоновая кислота $5 \cdot 10^{-4}$ М, гидрохинон $2,8 \cdot 10^{-4}$ М, гемин $3,3 \cdot 10^{-6}$ М, твин-20 0,4%

Рис. 2. Зависимость предельной степени конверсии кислорода в эндопероксидпростагландинсинтетазной реакции от концентрации фермента. Условия см. рис. 1

Процесс, осуществляемый эндопероксидпростагландинсинтетазой, представляет собой образование двойной эндоперекиси с изомеризацией углеводородной цепи ненасыщенной кислоты (PGG_2) и последующее восстановление перекисной группы в положении 15 (PGH_2). При этом каталитическая активность фермента проявляется в присутствии трех субстратов: арахидоновой кислоты, кислорода и донора электронов. Реакция, катализируемая первым ферментом цепи, является, по-видимому, наиболее сложным и медленным процессом, определяющим скорость образования простагландинов. Об этом свидетельствует тот факт, что стационарная концентрация продукта этой реакции PGH_2 в биферментной системе близка к нулю и в реакционной смеси PGH_2 практически не обнаруживается [3, 4].

Наши интересы по исследованию процессов биоспецифического синтеза простагландинов определяются изучением кинетических закономерностей поведения полиферментных систем [5]. Простагландинсинтетаза является удобным модельным объектом для подобных исследований. Большой интерес вызывает также весьма сложный специфический и высокоорганизованный каталитический процесс, протекающий в активном центре фермента. Этот интерес стимулируется потенциальными возможностями разработки практически важных методов синтеза некоторых простагландинов на основе использования ферментов и ферментных систем.

В большом числе работ по изучению биоспецифического синтеза простагландинов отмечается факт инактивации фермента в процессе реакции [1, 4, 6–10], причем быстрая потеря активности происходит как в случае полиферментного комплекса, выделяемого в виде ацетонпентаанового порошка [6, 7], и полиферментной системы, содержащейся в микросомах [1, 4, 8, 9], так и в случае практически гомогенных препаратов фермента [10].

Выяснение причин инактивации эндопероксидпростагландинсинтетазы представляет как теоретический, так и практический интерес. В связи с этим в настоящей работе проведен анализ механизма инактивации эндопероксидпростагландинсинтетазы в процессе реакции на основе рас-

рассмотренных ранее моделей [11]. Определены также кинетические характеристики ферментативной реакции превращения арахидоновой кислоты в PGH_2 с учетом процесса инактивации фермента.

В работе исследованы кинетические закономерности действия эндопероксициклооксигеназы по динамике истощения кислорода. Из рис. 1 видно, что предельная степень конверсии субстрата (α_{lim}) зависит от концентрации вводимого в реакцию фермента. Это указывает на то, что в системе имеет место либо сильное обратимое ингибирование продуктом реакции, либо необратимая инактивация фермента в ходе ферментативной реакции. В отдельных экспериментах было показано, что в данном случае уменьшение скорости реакции до нулевого уровня связано с инактивацией фермента. Так, при введении новой порции фермента в прореагировавшую реакционную смесь реакция возобновляется с исходной начальной скоростью.

Зависимость предельного превращения субстрата (предельного выхода продукта, α_{lim}) от концентрации фермента имеет вид кривой с насыщением (рис. 2). Чтобы установить, по какому механизму протекает инактивация фермента — мономолекулярно через свободную форму фермента (механизм I), фермент-субстратный комплекс (механизм II) или бимолекулярно через взаимодействие с субстратом (механизм III) или продуктом реакции (механизм IV), — были проведены эксперименты по исследованию кинетики реакции при малых степенях конверсии кислорода и опыты по предынкубации фермента с компонентами реакционной смеси.

Как следует из данных работы [11], кинетика изменения степени конверсии кислорода (накопления продукта) α (при $\alpha_{\text{lim}} < 0,2$) для всех рассмотренных случаев описывается максимально простыми экспоненциальными уравнениями. Величина α_{lim} достаточно надежно определяется как предел изменения концентраций продукта или субстрата. Представляя экспериментальные данные в полулогарифмических координатах, можно найти величину $k_{\text{набл}}$ — кинетический параметр, определяющий протекание во времени инактивации фермента.

Разграничение механизмов инактивации возможно при изучении зависимости $k_{\text{набл}}$ и α_{lim} от начальных концентраций фермента и субстрата. В то время как предельный выход для механизмов I—III линейно зависит от концентрации фермента, для механизма инактивации при взаимодействии с продуктом выход линейно зависит от $\sqrt{[E]_0}$. Показатель экспонент, описывающих временную функцию инактивации для механизма IV, также зависит от концентрации фермента, в то время как для механизмов I—III наблюдаемая константа скорости не является функцией начальной концентрации фермента. Таким образом, на основании этих критериев может быть идентифицирован механизм IV.

Результаты исследования кинетики окисления арахидоновой кислоты в условиях $\alpha_{\text{lim}} \ll 1$ приведены на рис. 3а. Степень конверсии кислорода представляет собой экспоненциальную функцию времени, при этом $k_{\text{набл}}$, определенная как тангенс угла наклона прямой из рис. 3б и равная $1,6 \pm 0,2 \text{ мин}^{-1}$, не зависит от концентрации фермента (рис. 4). Предельная степень конверсии линейно увеличивается с ростом начальной концентрации фермента (рис. 5). Для сравнения на рис. 5 приведены также данные зависимости α_{lim} от $\sqrt{[E]_0}$.

Анализ данных работ [4, 9] показывает, что аналогичные зависимости наблюдаются и для ферментов из других источников. Представление о том, что продукт реакции — циклоперекись PGG_2 — является инактивирующим фермент агентом, обсуждалось в литературе [12]. Однако полученные кинетические результаты позволяют исключить из рассмотрения механизм инактивации IV, согласно которому фермент инактивируется продуктом реакции — одной из образующихся перекисей (PGG_2 или PGH_2). Исключив из рассмотрения предполагаемых механизмов инак-

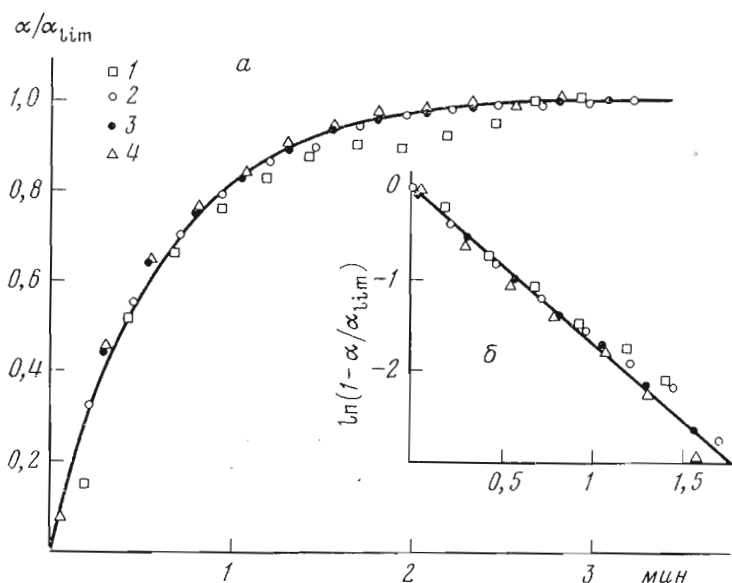


Рис. 3. Зависимость степени конверсии кислорода в эндопероксидпростагландинсинтетазной реакции от времени при концентрации фермента 0,016 (1), 0,032 (2), 0,048 (3), 0,096 (4) мг микросомного белка на 1 мл. Арахидоновая кислота $1 \cdot 10^{-3}$ М, адреналин $9,8 \cdot 10^{-4}$ М, гемин $3,8 \cdot 10^{-6}$ М, твин-20 0,8%

тивации механизм IV (инактивацию продуктом реакции), мы провели опыты по предынкубации фермента с различными компонентами системы для того, чтобы сделать выбор в пользу одного из механизмов I–III.

Как следует из данных, приведенных ранее [11], фермент, мономолекулярно инактивирующийся по механизму I, в отсутствие субстрата должен менять свою активность экспоненциально, при этом $k_{набл}$ должна быть равна k_1 .

Для бисубстратных реакций инкубацию можно провести отдельно с каждым из субстратов. Это позволяет дискриминировать механизмы II и III.

Апофермент — эндопероксидпростагландинсинтаза в отсутствие гема — инкубировали в аэробных условиях в присутствии арахидоновой кислоты с донором электронов (адреналин) либо с кофактором или с кофактором и адреналином, после чего вносили остальные компоненты, необходимые для протекания реакции, и измеряли начальную стационарную скорость поглощения кислорода.

Из рис. 6 видно, что фермент не инактивируется в отсутствие субстратов и кофакторов (это позволяет исключить из рассмотрения механизм I), а также в присутствии арахидоновой кислоты. Видно, что фермент инактивируется в системе, содержащей гемин и кислород. Константа скорости инактивации, найденная из данных по предынкубации фермента (рис. 6), равна $1,5 \pm 0,3 \text{ мин}^{-1}$, что в первом приближении находится в хорошем соответствии с величиной, найденной в независимой серии экспериментов из интегральной кинетики поглощения кислорода при низких степенях конверсии субстрата (см. рис. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что введение в реакционную смесь донора электронов (адреналина, триптофана, гидрохинона) предотвращает инактивацию фермента в отсутствие арахидоновой кислоты. Однако в присутствии арахидоновой кислоты инактивация фермента протекает по экспоненциальному закону. Этот факт заслуживает дальнейшего детального кинетического исследования.

Представляет интерес определение кинетических характеристик эндопероксидсинтетазной реакции. Проведенное нами исследование позволяет

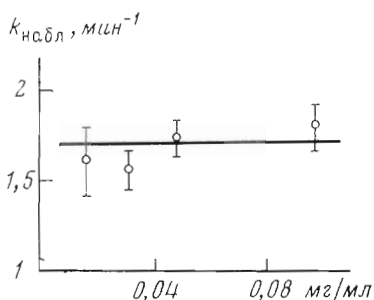


Рис. 4

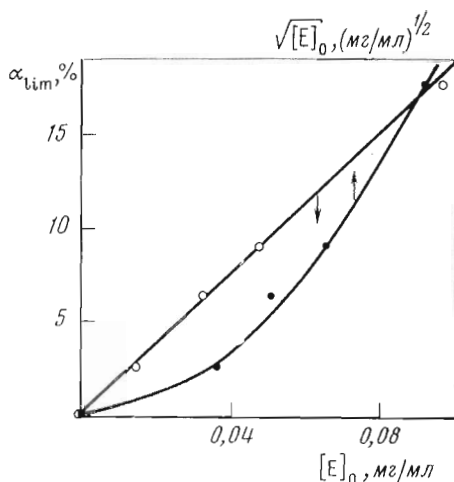


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации эндопероксид-простагландинсинтетазы от концентрации белка в области малых степеней конверсии субстрата. Условия см. рис. 3

Рис. 5. Зависимость предельной степени конверсии кислорода в эндопероксид-простагландинсинтетазной реакции от концентрации белка в условиях малой конверсии субстрата. Условия см. рис. 3

оценить условия, в которых процессом инактивации фермента можно пренебречь и получить истинные параметры реакции.

Методами стационарной кинетики при высоких концентрациях фермента исследовалась зависимость начальной стационарной скорости окисления арахидоновой кислоты от концентрации кислоты, кислорода, донора электронов. По каждому из субстратов реакция описывается уравнением Михаэлиса. В отличие от адреналина при использовании гидрохинона в качестве донора электронов реакция протекает с ингибированием избытком субстрата. Кинетические и равновесные характеристики циклооксигеназной реакции приведены в таблице.

Было также проведено изучение зависимости скорости реакции от концентрации простетической геминной группы и апофермента. Константа диссоциации комплекса апофермент — гемин дана в таблице.

Принципиально важным представляется определение максимальной скорости реакции и вычисление значения константы скорости лимитирующей стадии реакции, которая отражает наиболее медленный кинетический процесс, протекающий в активном центре фермента [5]. Проведение реакции в условиях «насыщения» по субстратам и апоферменту ($[O_2] \gg 2 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация адреналина $\gg 1,3 \cdot 10^{-4}$ М, концентрация апофермента $\gg 1 \cdot 10^{-7}$ М, $[A] \gg 2 \cdot 10^{-5}$ М) позволяет определить максимальную скорость реакции. В этих условиях концентрация активных центров фермента соответствует концентрации гемина в предположении, что на один активный центр приходится одна простетическая группа.

Кинетические и равновесные характеристики реакции
0,05 М трис-НСI-буфер (рН 8,5), 1% твин-20, 32° С

k_i , мин ⁻¹	K_m , М				$K_{дис}^*$, М	$k_{кат}$, мин ⁻¹ (рН 8,0)
	по арахидо- новой кислоте	по адrena- лину	по гидро- хинону	по кисло- роду		
0,3–1,5	$2 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-7}$	30

* Константа диссоциации комплекса гемин — апофермент.

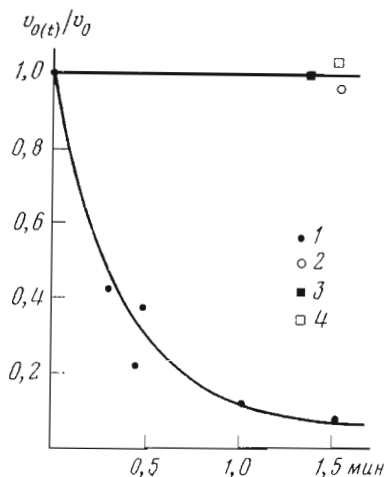


Рис. 6. Кинетика инактивации эндопероксидаглицеролипидсинтетазы при предынкубации в аэробных условиях с различными компонентами системы. Предынкубационная смесь содержит кроме белка (0,016 мг/мл) гемин (1), гемин и адреналин (2), адреналин (3), арахидоновую кислоту (4). Условия определения активности см. рис. 3

Из предельной максимальной скорости реакции определена константа скорости лимитирующей стадии $k_{кат}$ 30 мин^{-1} , представляющая собой число «оборотов» геминовой группы в единицу времени.

Таким образом, в данной работе количественно изучена эндопероксидаглицеролипидсинтетазная реакция — первая стадия биоспецифического синтеза простагландинов, получены (или оценены) наиболее важные параметры этой трехсубстратной реакции. Полученная информация является весьма важной с точки зрения количественного расчета скорости биосинтетической реакции и оптимизации ее протекания. Детальный химический механизм инактивации требует дальнейшего изучения, однако имеющиеся данные позволяют ставить задачу направленного поиска путей элиминирования этого неблагоприятного процесса. Полученные результаты создают научные основы разработки биоспецифических катализаторов синтеза простагландинов, имеющих большое практическое значение.

Интересным представляется сопоставление количественных характеристик процесса инактивации и каталитической активности эндопероксидаглицеролипидсинтетазы. Фермент до момента инактивации «успевает» превратить всего лишь около 100 молекул субстрата ($k_{кат}/k_i \cong 100$). Инактивация фермента в процессе реакции может служить одним из механизмов регуляции синтеза простагландинов — физиологически активных веществ, действующих в исключительно низких концентрациях.

Экспериментальная часть

В работе использовали арахидоновую кислоту — препарат Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (чистота препарата, по данным ГЖХ, 99,8%), адреналин — препарат ВНИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов. Гидрохинон применяли после очистки перекристаллизацией из эфира. Гемин — препарат фирмы «Sigma» (США), Твин-20 — фирмы «Merck» (ФРГ).

Источник выделения фермента — везикулярные железы баранов — получали на Алма-Атинском и Ярославском мясокомбинатах.

Микросомную фракцию, содержащую полиферментный комплекс, выделяли из везикулярных желез барана по методу [10] с дополнительной экстракцией балластных белков раствором перхлората натрия по методу [13] и использовали в виде суспензии в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 8, либо проводили дополнительную очистку, экстрагируя белок в том же буфере, содержащем 1% твина-20 [13]. Белок определяли по методу Лоури.

Ферментативную активность определяли по уменьшению concentra-

ции кислорода в реакционной смеси полярографическим методом с использованием полярографа LP-7e (ЧССР) с электродом Кларка. Реакционная смесь объемом 1 мл содержала белок в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 8,0, субстраты и гемин. Активность фермента вычисляли как начальную скорость по кривой поглощения кислорода и выражали в молях арахидиновой кислоты на 1 мг белка в мин, считая, что при превращении 1 моль кислоты потребляется 2 моль кислорода и что начальная концентрация кислорода в реакционной смеси равна $2,4 \cdot 10^{-4}$ М [14].

Интегральную кинетику поглощения кислорода исследовали также полярографическим методом с учетом неспецифического фонового поглощения кислорода.

Концентрацию гемина определяли спектрофотометрически при 420 нм по поглощению восстановленного комплекса гемина с пиридином [15].

Предынкубацию фермента с компонентами реакционной смеси проводили непосредственно в полярографической ячейке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yoshimoto A., Ito H., Tomita K.* Cofactor requirements of the enzyme synthesis prostaglandins in bovine seminal vesicles.— *J. Biochem.*, 1970, v. 68, p. 487–499.
2. *Ogino N., Ohki S., Yamamoto S., Hayaishi O.* Prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. Inactivation and activation by heme and other metalloporphyrins.— *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, p. 5061–5068.
3. *Chang W.-Ch., Murota S.-I.* Identification of 6-keto-prostaglandin F_1 formed from arachidonic acid in bovin seminal vesicles.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 486, p. 136–144.
4. *Kingston W. P., Greaves M. W.* Factors affecting prostaglandin synthesis by rat skin microsomes.— *Prostaglandins*, 1976, v. 12, p. 51–69.
5. *Березин И. В., Варфоломеев С. Д.* Биокинетика. М.: «Наука», 1979, с. 177–277.
6. *Isakson P. C., Raz A., Denny S. E., Pure E., Needleman P.* A novel prostaglandin in major product of arachidonic acid metabolism in rabbit heart.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 101–105.
7. *Wallach D. P., Daniels E. G.* Properties of a novel preparation of prostaglandin synthetase from sheep seminal vesicles.— *Biochim. et biophys. acta*, 1971, v. 231, p. 445–457.
8. *Takeguchi C., Sih C. J.* A rapid spectrophotometric assay for prostaglandin synthetase application to the study of non-steroidal antiinflammatory agents.— *Prostaglandins*, 1972, v. 2, p. 169–184.
9. *Morita I., Murota S.* Prostaglandin synthetasing system in rat liver.— *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 90, p. 441–449.
10. *Miyamoto T., Ogino N., Yamamoto S., Hayaishi O.* Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes.— *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 2629–2636.
11. *Мевх А. Т., Вржещ П. В., Варфоломеев С. Д.* Полиферментный комплекс синтеза простагландинов. Эндопероксидпростагландинсинтетаза.— В сб.: Полиферментные системы. Вильнюс: ЛитНИИНТИ, 1980, с. 146–179.
12. *Egan R. W., Paxton J., Kuehl F. A.* Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase.— *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 7329–7335.
13. *Van der Ouderaa F. J., Baytenhek M., Nugteren D. H., van Dorp D. A.* Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 487, p. 315–331.
14. Справочник химика. Л.: «Химия», т. 3, с. 316.
15. *Folk J. E.* Porphyrins and metalloporphyrins. New York – London: 1964, v. 2, p. 181.

Поступила в редакцию:
25.VIII.1980

PROSTAGLANDIN SYNTHETASE. INACTIVATION
OF ENDOPEROXIDE-PROSTAGLANDIN SYNTHETASE, A LIMITING ENZYME
IN THE SYNTHESIS OF PROSTAGLANDINS

MEVKH A. T., VRZHESCH P. V., SVIADOS V. Ju.-K.,
VARFOLOMEEV S. D., MYAGKOVA G. I., YAKUSHEVA L. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow; M. V. Lomonosov Institute
of Fine Chemical Technology, Moscow*

A quantitative approach was utilized to investigate the first stage of biospecific synthesis of prostaglandins catalyzed by endoperoxide-prostaglandin synthetase. Integral kinetics of oxygen consumption was examined for the arachidonic acid oxidation. The enzyme inactivation in the course of the reaction was studied.

Possible mechanisms of inactivation were analyzed: monomolecular inactivation of the enzyme or enzyme-substrate complex, as well as bimolecular inactivation by substrate or product. Analysis of the inactivation kinetic parameters revealed that hemin-catalyzed reaction with oxygen contributes mainly to this process. The following parameters were obtained: K_m for arachidonic acid, oxygen, and electron donors; apparent inactivation constant ($1,6 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$). Dissociation constant for the apoenzyme-hemin complex and the reaction catalytic constant were also determined.