

На правах рукописи



Филимонов Иван Сергеевич

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ КАТАЛИЗА И ИНАКТИВАЦИИ
ФЕРМЕНТА ПРОСТАГЛАНДИН Н СИНТАЗЫ

Специальность 03.01.02. – "Биофизика"

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Международном учебно-научном биотехнологическом центре МГУ имени М.В.Ломоносова и Институте биохимической физики имени Н.М.Эмануэля РАН.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Вржещ Петр Владимирович

Официальные оппоненты: доктор физ.-мат. наук, профессор
Вавилин Василий Александрович

доктор физ.-мат. наук, профессор
Шайтан Константин Вольдемарович

Ведущая организация: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
г. Москва

Защита состоится "23" сентября 2010 г. в 14 часов 00 минут на заседании Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория "Новая".

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан: "19" августа 2010 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук



М. Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фермент простагландин H синтаза (PGHS, К.Ф.1.14.99.1) катализирует одну из ключевых реакций каскада арахидоновой кислоты – превращение арахидоновой кислоты в простагландин H_2 , исходное соединение в биосинтезе всех простагландинов, тромбоксана и простациклина в организме млекопитающих, в том числе человека. PGHS имеет два активных центра, в которых протекает циклооксигеназная (окисление арахидоновой кислоты до простагландина G_2) и пероксидазная (восстановление перекисной группы простагландина G_2 до спиртовой с образованием простагландина H_2) реакции.

Изоферменты простагландин H синтазы являются значимыми фармакологическими мишенями (действие всех нестероидных противовоспалительных средств обусловлено ингибированием PGHS), однако механизм действия фермента до конца не установлен, что обуславливает актуальность данной темы.

PGHS – многосубстратный бифункциональный фермент, подвергающийся необратимой инактивации в ходе катализируемых им реакций. Для исследования кинетических свойств таких сложных ферментов требуется разработка новых теоретических подходов, учитывающих независимое протекание и взаимное влияние катализируемых реакций.

Наряду с арахидоновой кислотой в циклооксигеназной реакции принимают участие две молекулы кислорода. Между тем работ, посвященных кинетическим исследованиям участия этого субстрата в ферментативной реакции, практически нет. Исследование концентрационных зависимостей по кислороду интересно также потому, что внутриклеточная концентрация кислорода сильно варьирует и отличается от концентрации растворенного молекулярного кислорода при атмосферном давлении.

Для детального исследования явления инактивации фермента PGHS необходимо разработать методы получения концентрационных зависимостей параметров инактивации, в том числе в области низких концентраций субстратов ферментативной реакции, где скорость реакции снижается вследствие расходования субстрата.

Химические механизмы инактивации фермента PGHS в ходе катализируемых реакций до сих пор не установлены. Современные методы масс-спектрометрии могут оказаться полезными для выявления возможных химических модификаций на молекулярном уровне, приводящих к инактивации фермента в ходе катализируемых реакций. Применение этих методов требует разработки и оптимизации способа пробоподготовки.

Эти актуальные вопросы и предстояло решить в данной диссертационной работе.

Цель исследования. Определить кинетический механизм катализа и инактивации в ходе катализируемых реакций бифункционального фермента простагландин H синтазы.

Задачи исследования:

- 1) Определить условия применения квазистационарного приближения для ферментов, подвергающихся необратимой инактивации в ходе катализируемых реакций. Получить выражения для описания экспериментально наблюдаемых величин.
- 2) Провести экспериментальное исследование кинетических закономерностей катализа и инактивации PGHS в случае циклооксигеназной и пероксидазной реакций.
- 3) Разработать кинетическую модель катализа бифункционального фермента PGHS, учитывающую состояние двух его активных центров, основываясь на двумерной кинетической модели действия для бифункциональных ферментов.
- 4) Разработать и обосновать теоретические и практические подходы для определения зависимости константы инактивации от концентрации субстрата путем анализа интегральной кривой в условиях истощения по субстрату.
- 5) Разработать оптимальный способ пробоподготовки и анализа фермента PGHS методами масс-спектрометрии.

Научная новизна. Проанализирована обобщенная кинетическая схема для ферментов, подверженных необратимой инактивации в ходе катализируемых реакций. Выявлены условия применимости квазистационарного приближения для инактивирующихся ферментов.

Предложен теоретический подход и разработан метод определения зависимости константы инактивации фермента от концентрации субстрата из

интегральных кинетических кривых при условии существенного расходования субстрата.

Экспериментально определены зависимости кинетических параметров циклооксигеназной и пероксидазной реакций PGHS от концентраций субстратов этих реакций. Показано, что циклооксигеназная реакция строго следует кинетике Михаэлиса-Ментен в широком диапазоне концентраций кислорода в отсутствие донора электронов, и не следует кинетике Михаэлиса-Ментен в присутствии донора электронов. В кинетических механизмах циклооксигеназной и пероксидазной реакций проведена локализация положения необратимых стадий.

На основании обобщенной двумерной кинетической модели действия для бифункциональных ферментов разработана кинетическая модель действия фермента PGHS. Получено выражение для скорости циклооксигеназной реакции, описывающее весь набор экспериментальных фактов.

Экспериментально определены зависимости параметров инактивации фермента PGHS в ходе циклооксигеназной и пероксидазной реакций от концентраций субстратов реакций.

Разработана и оптимизирована методика пробоподготовки для исследования фермента PGHS методами масс-спектрометрии. Получены масс-спектры PGHS для нативного фермента и для фермента, принимавшего участие в катализе циклооксигеназной и пероксидазной реакций.

Практическая значимость. Проведенные исследования позволили подробнее изучить свойства PGHS и расширить наши представления о механизме функционирования этого фермента.

Представленные в работе кинетические модели могут быть использованы для анализа механизма действия конкретных бифункциональных ферментов.

Знание механизмов протекания реакций PGHS, важного фармакологического объекта, даст возможность скорректировать разработку новых лекарственных препаратов и способов контроля каскада арахидоновой кислоты *in vivo*.

Полученные в работе результаты, заключения и выводы могут быть использованы для подготовки по специальностям биофизика, катализ, биохимия и биотехнология.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на Международной конференции "Ломоносов-2004" (Москва, 2004 г.), Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2005 г.), Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2006 г.), Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2008 г.), Международной конференции "Ломоносов-2009" (Москва, 2004 г.). Работа также докладывалась в рамках семинаров ИБХФ РАН и факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 в научных российских журналах по списку ВАК, 7 в тезисах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Количество страниц ____, ссылок ____, рисунков ____, таблиц ____.

Сокращения, принятые в работе. PGHS – простагландин H синтаза, Tyl* – радикал аминокислотного остатка тирозина, PGG₂ – простагландин G₂, PGN₂ – простагландин H₂, AA – арахидоновая кислота, DH – донор электронов, PPIX – протопорфирин IX, ТХУ – трихлорусусная кислота, ПААГ – полиакриламидный гель.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Свойства фермента PGHS

В главе говорится о биологической роли и месте PGHS в цепи синтеза простагландинов, тромбоксана и простациклина (схема 1).

ФОСФОЛИПИДЫ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

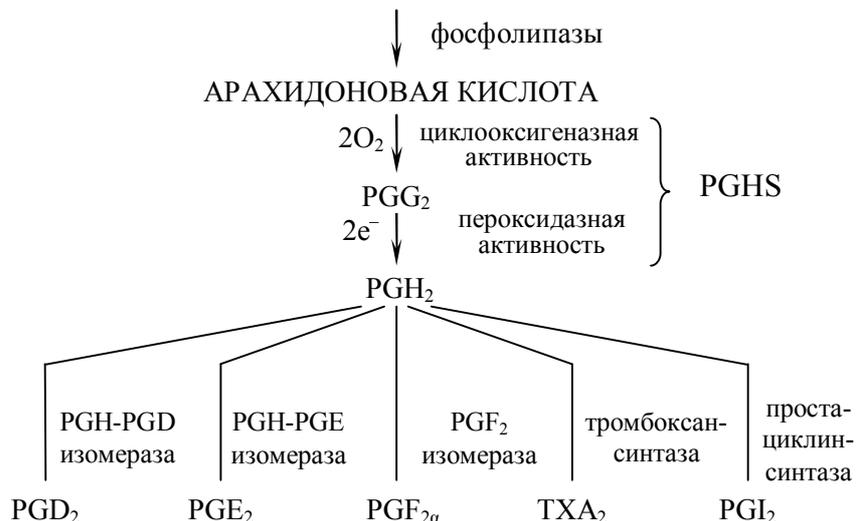


Схема 1. Биосинтез простагландинов, тромбоксана и простациклина

Подробно рассмотрена доменная структура PGHS, структура пероксидазного и циклооксигеназного активных центров (рис.1). Описаны каталитические свойства PGHS: циклооксигеназная и пероксидазная реакции, химические превращения, происходящие в ходе этих реакций.

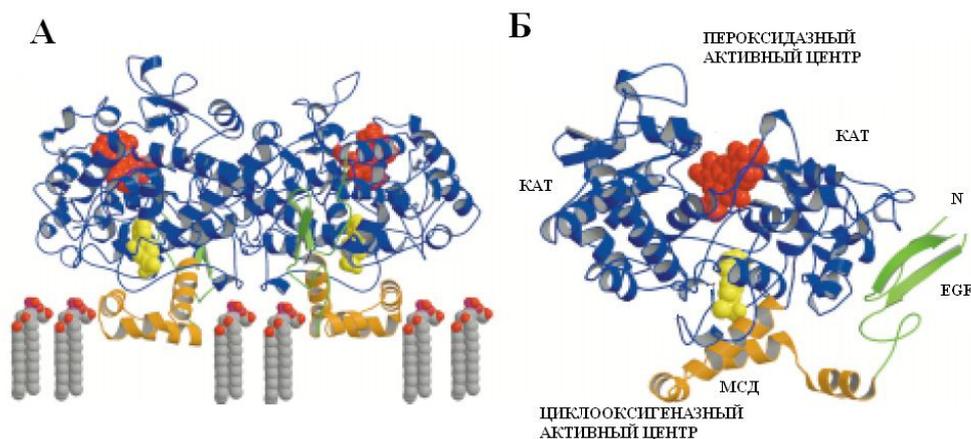


Рис.1 Ленточная диаграмма пространственной структуры димера (А) и мономера (Б) фермента PGHS-1 барана со связанным обратимым ингибитором флурбипрофеном в гидрофобном канале циклооксигеназного активного центра (желтый) [Smith, 2000]. КАТ – каталитический домен (красным отмечена молекула гемина), МСД – мембрансвязывающий домен, EGF – EGF-подобный домен, N – N-конец белковой молекулы.

Глава 2. Критический анализ современного состояния проблемы

Описаны кинетические особенности действия PGHS, дан критический анализ схем, предложенных для описания катализа PGHS различными авторами. Рассмотрены имеющиеся в литературе сведения по инактивации PGHS в процессе катализируемых им реакций и проанализированы кинетические схемы, предложенные другими авторами. Рассмотрена проблема исследования кинетики бифункциональных ферментов. Представлен критический анализ предложенных механизмов для инактивации фермента PGHS. Рассмотрены современные методы масс-спектрометрии и перспективы использования этих методов для исследования химического механизма инактивации фермента PGHS в ходе катализируемых реакций.

Глава 3. Материалы и методы

1) Солюбилизированный препарат PGHS выделяли из везикулярных желез барана по методу [Van der Ouderaa et.al., 1977] с изменениями.

2) Очистку солюбилизированного препарата PGHS проводили методом колоночной хроматографии на носителе DEAE Sepharose. Электрофоретическая чистота полученного препарата PGHS более 95%.

3) Концентрацию белка в препаратах фермента определяли с помощью колориметрических методов [Lowry et.al., 1951, Bradford, 1976].

4) Концентрирование белка для электрофореза в полиакриламидном геле осуществляли путем осаждения белка при помощи ТХУ или ацетона.

5) Электрофорез в ПААГ проводили в денатурирующих условиях с добавлением детергента додецилсульфата натрия по методу Лэмли [Laemmli, 1970].

6) Гидролиз белка в ПААГ проводили с использованием трипсина в течение 3 часов при 37°C, останавливали добавлением свежеприготовленного 0,5% (об/об) раствора муравьиной кислоты в воде.

7) Масс-спектры белка и смеси пептидов, образующихся после обработки белка трипсином, получали на MALDI-TOF масс-спектрометре MicroFlex с использованием стандартной мишени – MSP target polished steel (Bruker, Германия). Масс-спектры получены в рефлекторной моде, детектировались положительные ионы.

8) Измерение концентрации кислорода для слежения за ходом циклооксигеназной реакции PGHS осуществляли амперометрически с использованием полярографа «АКПМ-02-05» (ООО «Фирма «Альфа БАССЕНС», Россия), снабженным газодиффузионным платино-серебряным электродом Кларка.

9) Измерение концентрации окисленной формы донора электронов для слежения за пероксидазной реакцией PGHS осуществляли с помощью спектрофотометра «Cary 100» («Varian Inc», США).

10) Методика обработки экспериментальных данных. Для получения значений констант экспериментальные данные аппроксимировали согласно полученным формулам методом нелинейной регрессии с использованием программы Origin 7.0 фирмы Microcal.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 4. Теоретические основы обработки результатов

Глава посвящена выявлению критериев применимости квазистационарного приближения для многосубстратных ферментов, подверженных необратимой инактивации в ходе катализируемой реакции. В качестве иллюстрации выбран механизм неразветвленной многосубстратной ферментативной реакции, интермедиаты которой могут подвергаться необратимой инактивации (схема 2) [Вржеш, 1985]

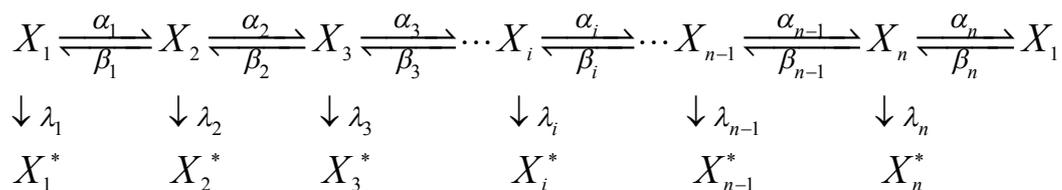


Схема 2. Обобщенная модель неразветвленной ферментативной реакции, сопровождающейся необратимой инактивацией фермента в процессе реакции.

Здесь X_j ($j = \overline{1, n}$) – каталитически активные промежуточные формы фермента (интермедиаты), X_j^* – инактивированные формы фермента, α_j и β_j ($j = \overline{1, n}$) – константы скорости реакций первого (псевдопервого) порядка для реакций взаимопревращения интермедиатов ($\alpha_j > 0$, $\beta_j \geq 0$, $j = \overline{1, n}$). Полагали, что субстрат принимает участие в реакции на стадии l , то есть $\alpha_l = k_l \cdot S$, концентрации остальных субстратов существенно не меняются. Считали, что ферментативная реакция содержит хотя бы одну необратимую стадию, для определенности $\beta_n = 0$.

Мы включили в рассмотрение важный, с теоретической и практической точек зрения случай, когда расходование субстрата в ходе реакции приводит к существенному изменению скорости ферментативной реакции, сравнимому с изменением скорости реакции в процессе инактивации фермента.

Схема 2 описана следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dX_j}{dt} = \alpha_{j-1} \cdot X_{j-1} + \beta_j \cdot X_{j+1} - (\alpha_j + \beta_{j-1} + \lambda_j) \cdot X_j & \text{(I)} \\ \frac{dX_j^*}{dt} = \lambda_j \cdot X_j & \text{(II)} \\ \frac{dS}{dt} = \beta_1 \cdot X_{1+1} - k_1 \cdot S \cdot X_1 & \text{(III)} \end{cases} \quad (1)$$

$$E_0 = X^* + X \quad \left(X^* = \sum_j X_j^*; \quad X = \sum_j X_j \right)$$

$$t = 0: \quad X_j = X_j^0, \quad X_j^* = 0, \quad S = S_0, \quad (j = \overline{1, n})$$

В этой системе выделили три типа уравнений: (I) – уравнения, описывающие изменение концентраций каталитически активных промежуточных форм фермента (интермедиатов) X_j ; (II) – уравнения, описывающие изменение концентраций инактивированных форм фермента X_j^* ; (III) – уравнения, описывающие изменение концентраций субстратов (в данном случае одного субстрата S).

Схему 2 анализировали с привлечением характеристических времен: τ_E – характеристическое время изменения X_j ; τ_S – характеристическое время расходования S ; τ_{inact} – характеристическое время накопления инактивированной формы фермента X^* .

С использованием теоремы Тихонова было показано, что для фермента, подверженного необратимой инактивации в ходе катализируемой реакции (схема 2), необходимым условием установления квазистационарного состояния по активным формам фермента для процесса расходования субстрата и инактивации в ходе реакции является выполнение соотношений

$$\varepsilon \ll 1, \quad \mu_j \ll 1, \quad (j = \overline{1, n}) \quad (2)$$

где $\varepsilon = E_0/S_0$, $\mu_j = \lambda_j / (\alpha_j + \beta_{j-1} + \lambda_j)$ – безразмерные параметры.

Дальнейший анализ системы показал, что:

а) если $\tau_S \gg \tau_{inact}$, происходит полная инактивация фермента при малой конверсии субстрата за время протекания реакции. В этом случае текущее значение стационарной скорости v изменяется согласно следующему уравнению:

$$v = v_0 \exp(-\Lambda \cdot t) \quad (3)$$

где v_0 – начальная стационарная скорость ферментативной реакции, Λ – эффективная константа скорости инактивации фермента (далее константа инактивации).

Кинетика накопления продукта P ферментативной реакции (схема 2) описывается уравнением:

$$P = P_{\infty} (1 - \exp(-\Lambda \cdot t)) \quad (4)$$

Предельный выход продукта ферментативной реакции P_{∞} (концентрация продукта реакции после прекращения реакции вследствие полной инактивации фермента) связан с величинами v_0 и Λ уравнением:

$$P_{\infty} = v_0 / \Lambda \quad (5).$$

Определение параметров инактивации по данным интегральной кинетики с использованием уравнений (3–5) в условиях, при которых расходом субстрата можно пренебречь, далее будем называть «метод-1».

б) если $\tau_S \ll \tau_{inact}$, происходит полная конверсия субстрата при малой инактивации фермента за время протекания реакции. В этом случае из интегральной кинетики можно определить каталитические параметры фермента. При исследовании кинетики фермента PGHS этот случай трудно реализуем, так как фермент полностью инактивируется за 1–2 минуты, инактивационные процессы влияют на форму интегральной кривой уже с первых секунд реакции

в) если $\tau_S \approx \tau_{inact}$, скорость ферментативной реакции снижается как вследствие инактивации, так и по причине снижения концентрации субстрата. В работе показано, что путем обработки интегральных кривых в этом случае можно получить зависимость константы инактивации Λ от концентрации субстрата

$$\Lambda(S) = -\frac{d}{dt} \ln \left(\frac{v}{f(S)} \right) \quad (6)$$

Где $f(S)$ – функция зависимости стационарной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, v – текущая скорость ферментативной реакции, определяемая из интегральной кинетической кривой накопления продукта от времени.

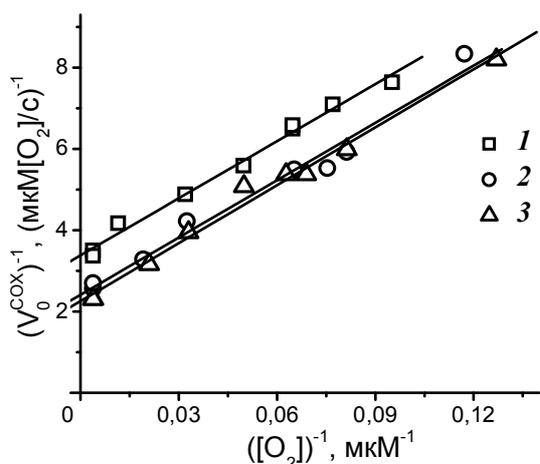
Этот случай имеет важное прикладное значение. Уравнение (6) легло в основу метода определения из интегральных кинетических кривых зависимости константы инактивации фермента от концентрации субстрата при условии существенного расходования субстрата (алгоритм изложен в главе 7). Определение параметров инактивации с использованием уравнения (6), когда расходом субстрата в ходе реакции пренебречь нельзя, далее будем называть «метод-2».

Глава 5. Кинетические закономерности циклооксигеназной и пероксидазной реакций, катализируемых ферментом PGHS

Глава посвящена экспериментальному исследованию кинетических закономерностей циклооксигеназной и пероксидазной реакций с использованием «метода-1».

В отсутствие в среде донора электронов в широком диапазоне концентраций кислорода зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода строго линейна в двойных обратных координатах. При различных концентрациях арахидоновой кислоты такие зависимости собой серию прямых, в первом приближении параллельных (рис. 2а). Однако в присутствии донора электронов (представлены эксперименты с использованием адреналина в качестве донора электронов) зависимость скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах можно считать линейной лишь в первом приближении. В области концентраций кислорода от 30 до 270 мкМ наблюдается воспроизводимое отклонение от линейности (рис. 2б). Максимальное значение скорости достигается при 50 мкМ кислорода.

а



б

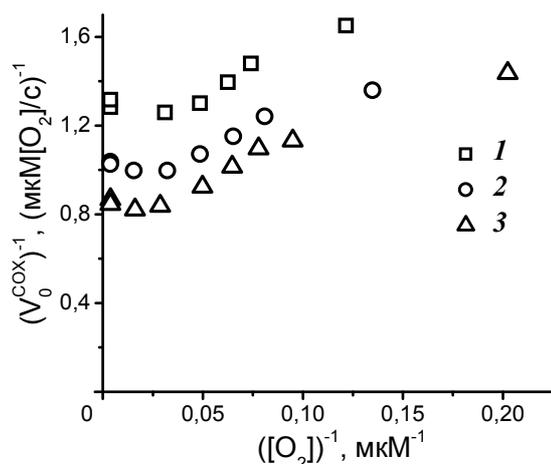


Рис.2 Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах в отсутствие донора электронов (а) и в присутствии донора электронов (б), при разных концентрациях АА. Стандартный буферный раствор содержал 2мкМ гемина, 10, 33 и 100 мкМ АА (1–3 соответственно), а – без донора электронов, б – 1 мМ адреналина

Зафиксировав концентрацию арахидоновой кислоты, мы исследовали, как изменяется вид зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах при варьировании концентрации адреналина. Результаты представлены на рис.3. В результате линейной аппроксимации экспериментальных данных получена серия прямых, пересекающихся в одной точке во втором квадранте.

На рис.4 приведены зависимости скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах. Мы наблюдали нелинейную зависимость в области как низких (данные не приведены), так и высоких концентраций, что свидетельствует о сложной кинетике реакции. Подобные результаты получены как в присутствии, так и в отсутствие донора электронов, причем разница между кривыми оставалась приблизительно постоянной в области концентраций от 10 до 300 мкМ арахидоновой кислоты (рис.4).

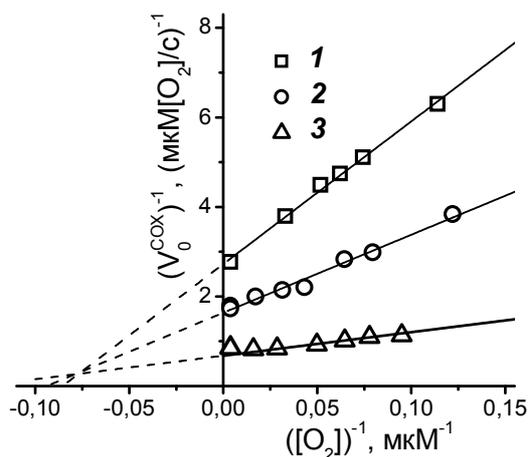


Рис.3 Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах, при разных концентрациях донора электронов (адреналин). Стандартный буферный раствор содержал 2 мкМ гемина, 100 мкМ АА, 0, 30, 1000 мкМ адреналина (1–3 соответственно).

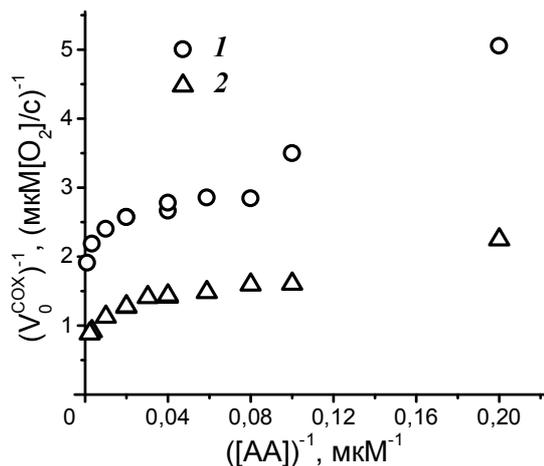


Рис.4 Зависимость скорости циклооксигеназной реакции в присутствии и в отсутствие донора электронов от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах. Стандартный буферный раствор содержал 2мкМ гемина, 260 мкМ O₂, 0 и 1000 мкМ адреналина (1 и 2 соответственно).

Ниже приведена сводная таблица значений K_M и V_M по кислороду для циклооксигеназной активности фермента простагландин Н синтаза.

[адреналин], мкМ [AA], мкМ		0	30	1000
		$K_{M(O_2)}$, мкМ	14±2	–
10	$V_{M(O_2)}$, мкМ/сек	0,3±0,05	–	0,9±0,1
33	$K_{M(O_2)}$, мкМ	19±2	–	6±1
	$V_{M(O_2)}$, мкМ/сек	0,4±0,05	–	1,2±0,1
100	$K_{M(O_2)}$, мкМ	21±3	11±2	8±1
	$V_{M(O_2)}$, мкМ/сек	0,45±0,05	0,6±0,05	1,5±0,1

Табл. 1 Кинетические параметры циклооксигеназной реакции (экспериментально наблюдаемая константа Михаэлиса по кислороду и максимальная скорость реакции).

Для экспериментов, в которых варьировали концентрацию двух субстратов пероксидазной реакции (перекиси водорода и донора электронов TMPD), зависимость скорости пероксидазной реакции от концентрации TMPD при различных концентрациях перекиси водорода в двойных обратных координатах представляет собой серию прямых, в первом приближении параллельных (рис. 5). Аналогичные результаты получали для зависимости скорости пероксидазной реакции от концентрации перекиси водорода для различных концентраций TMPD (данные не приведены).

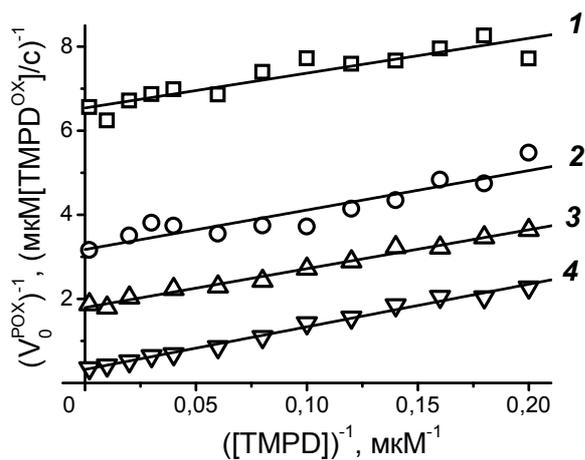


Рис.5 Зависимость скорости пероксидазной реакции от концентрации донора электронов TMPD в двойных обратных координатах. Стандартный буферный раствор содержал 270 мкМ O_2 , 2000, 350, 200 и 105 мкМ H_2O_2 (1–4 соответственно).

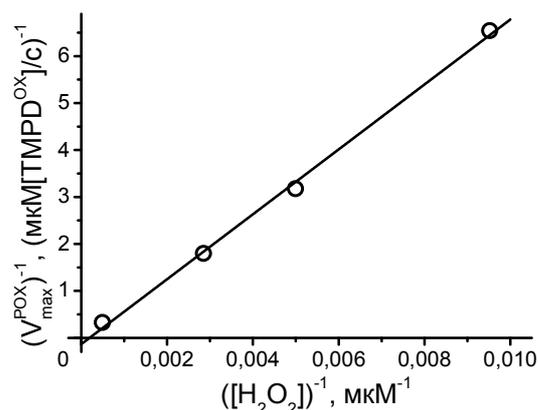


Рис.6 Зависимость максимальной скорости пероксидазной реакции по донору электронов от концентрации H_2O_2 в двойных обратных координатах.

На рис.6 представлена зависимость максимальной скорости пероксидазной реакции по TMPD от концентраций субстрата партнера – перекиси водорода в двойных обратных координатах. Видно, что прямая, приближающая получившиеся зависимости (рис.6), проходит через начало координат. Это свидетельствует о том, что в доступном диапазоне концентраций субстратов величины констант скоростей псевдопервого порядка гораздо меньше величин констант скоростей первого порядка для мономолекулярных реакций в механизме действия фермента PGHS.

Глава 6. Построение кинетической модели бифункционального фермента PGHS

В этой главе на основании обобщенной двумерной кинетической модели действия для бифункциональных ферментов с учетом экспериментальных кинетических закономерностей разрабатывается кинетическая модель действия фермента PGHS.

В качестве базовой была выбрана двумерная кинетическая схема для бифункциональных ферментов. Использование двумерной схемы единственно возможно для адекватного описания кинетики бифункциональных ферментов, так как необходимо одновременно учитывать состояния двух отдельных активных центров.

Были рассмотрены случаи протекания частных реакций.

Случай 1. Протекает только циклооксигеназная реакция, пероксидазная не идет (в среде отсутствует донор электронов) (схема 3).



Схема 3. Циклооксигеназная реакция PGHS. Приведен механизм с минимальным количеством интермедиатов.

Введены следующие обозначения, характеризующие состояние циклооксигеназного активного центра: $C_1 = [Tyr^*]$ (форма фермента с радикалом на Tyr385), $C_2 = [Tyr^*]AA$, $C_3 = [Tyr]AA^*$ (радикал арахидоновой кислоты по 11-му положению), $C_4 = [Tyr]AAO_2^*$ (11-пероксирадикал арахидоновой кислоты), $C_5 = [Tyr]AAO_2$ (радикал эндопероксида арахидоновой кислоты по 15-му положению), $C_6 = [Tyr]AAO_2O_2^*$ (15-пероксирадикал PGG₂ по 15-му положению), k_i – константы скоростей. На основании имеющихся литературных данных стадию отщепления продукта реакции PGG₂ считали необратимой ($k_{-6} = 0$).

Расчет скорости циклооксигеназной реакции для схемы 3 в квазистационарном приближении привел к получению квадратичной зависимости скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах. Это находится в противоречии с реальными экспериментальными зависимостями, представляющими собой серию прямых, в первом приближении параллельных. Соответствие между экспериментом и теорией достигается в предположении существования необратимых стадий между пунктами донирования субстратов. В этом случае на схеме 3 константы

k_{-2} и k_{-4} равны нулю и теоретическая и экспериментальная зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода хорошо согласуются.

Случай 2. Протекает только пероксидазная реакция, циклооксигеназная не идет (в среде присутствуют субстраты пероксидазной реакции перекись водорода и донор электронов и отсутствует арахидоновая кислота) (схема 4).



Схема 4. Пероксидазная реакция PGHS. Приведен механизм с минимальным количеством интермедиатов.

Введены следующие обозначения, характеризующие состояние пероксидазного активного центра: $P_1 - [(\text{PP})\text{Fe}^{3+}]$, $P_2 - [(\text{PP})\text{Fe}^{3+}]\text{ROOH}$, $P_3 - [(\text{PP}^*)^+ \text{Fe}^{4+}\text{O}]$, $P_4 - [(\text{PP}^*)^+ \text{Fe}^{4+}\text{O}]\text{DH}$, $P_5 - [(\text{PP}) \text{Fe}^{4+}\text{O}]$, $P_6 - [(\text{PP}) \text{Fe}^{4+}\text{O}]\text{DH}$, r_j – константы скоростей. На основании имеющихся литературных данных стадию отщепления продукта реакции PGH_2 (либо продукта восстановления другой перекиси) считали необратимой ($r_{-2} = 0$).

Расчет скорости пероксидазной реакции для схемы 4 в квазистационарном приближении привел к получению квадратичной зависимости скорости от концентрации донора электронов в двойных обратных координатах. Это находится в противоречии с реальными экспериментальными зависимостями, представляющими собой серию прямых, в первом приближении параллельных. Соответствие между экспериментом и теорией достигается в предположении существования необратимых стадий между пунктами донирования субстратов. В этом случае на схеме 4 константы r_{-4} и r_{-6} равны нулю, и теоретическая и экспериментальная зависимости скорости пероксидазной реакции от концентрации донора электронов хорошо согласуются.

Рассмотрим вариант, когда фермент катализирует протекание обеих реакций, тогда двумерная схема для бифункциональных ферментов применительно к PGHS, с учетом сформулированных выше выводов о необратимости некоторых стадий примет вид схемы 5, где сохранены обозначения, введенные ранее (схемы 3 и 4), но одновременно отображается состояние двух активных центров (циклооксигеназного и пероксидазного) на одной молекуле фермента. Так как присутствие донора электронов влияет на параметры циклооксигеназной реакции (скорость циклооксигеназной реакции возрастает при увеличении концентрации донора электронов, изменяются значения K_M и V_M , см.табл.1), то константы скоростей элементарных стадий такой реакции должны зависеть от состояния пероксидазного

активного центра. Для простоты будем считать, что пероксидазная реакция оказывает влияние только на одну из шести указанных нами на схеме 3 стадий циклооксигеназной реакции, например, на четвертую, то есть k_4 зависит от состояния активного центра пероксидазной реакции, тогда как k_1, k_2, k_3, k_5, k_6 не зависят. Соответственно для константы скорости четвертой стадии циклооксигеназной реакции вводится второй индекс, отображающий состояние пероксидазного активного центра (схема 5).

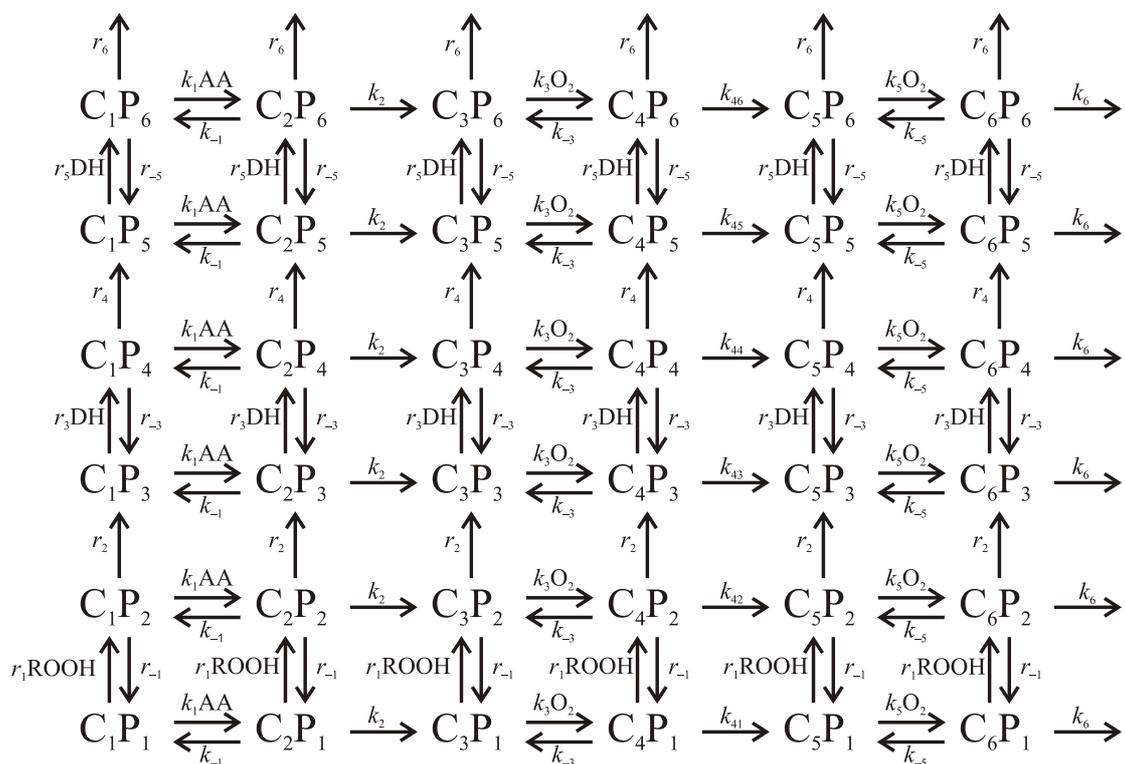


Схема 5. Циклооксигеназная и пероксидазная реакции.

Анализ литературы по кинетике PGHS и наши экспериментальные данные позволили предположить, что квазистационарное состояние, устанавливающееся для интермедиатов пероксидазной реакции, достигается быстро по сравнению с временем установления квазистационара по интермедиатам циклооксигеназной реакции и не меняется в ходе протекания циклооксигеназной реакции. Тогда с учетом иерархии скоростей пероксидазной и циклооксигеназной реакций можно получить выражение для скорости циклооксигеназной реакции:

$$\frac{C_0}{V_{\text{COX}}} = \frac{\eta}{[AA]} + \left(\theta + \frac{\rho}{[DH] + \mu} \right) \frac{1}{[O_2]} + \frac{\nu\rho}{[DH] + \mu} + \omega, \quad (7)$$

где $\eta, \theta, \rho, \mu, \nu, \omega$ выражаются через константы элементарных стадий пероксидазной, циклооксигеназной реакций и концентрацию ROOH. Это выражение удовлетворительно описывает все полученные нами экспериментальные данные.

Мы наблюдали, что концентрация донора электронов существенно влияет на количественные параметры кислородных зависимостей циклооксигеназной реакции. Так, например, при концентрациях кислорода 5–10 мкМ, что сравнимо с внутриклеточными концентрациями растворенного кислорода, скорость циклооксигеназной реакции в отсутствие донора электронов была в 6–8 раз меньше, чем в присутствии донора электронов. Это может играть существенную роль в функционировании клетки, особенно при гипоксии, и этот факт, несомненно должен учитываться при моделировании внутриклеточных процессов и создании новых лекарственных препаратов.

Глава 7. Методы определения параметров инактивации фермента PGHS.

Практическое применение результатов теории

Данная глава посвящена оптимизации методов определения параметров инактивации фермента, основы которых заложены в главе 4, с учетом реальных свойств фермента PGHS. Подробно изложен алгоритм действий при обработке экспериментальных данных. Показано, что «метод-2» (см.гл.4), учитывающий при расчетах снижение скорости вследствие конверсии субстрата, позволяет более точно определять параметры инактивации при условии существенного расходования субстрата, в то же время результаты применения «метода-2» и «метода-1» совпадают в случае, когда расходом субстрата можно пренебречь (рис.7а, 7б).

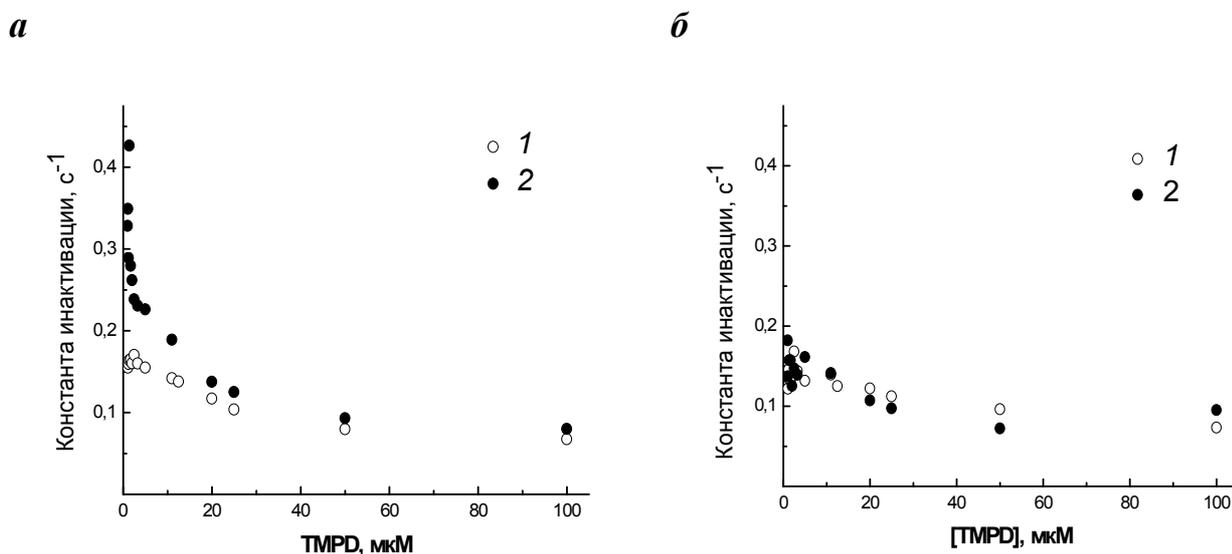


Рис. 7 Зависимость константы инактивации фермента в ходе пероксидазной реакции от концентрации TMPD, рассчитанная без учета (а) и с учетом (б) снижения скорости реакции за счет расходования субстрата (а – «метод-1», б – «метод-2»). Стандартный буферный раствор содержал 2 мМ H₂O₂, 2 и 10 нМ фермента PGHS (1 и 2 соответственно).

Кроме того, «метод-2» позволяет воспроизводить непрерывную зависимость константы инактивации от концентрации субстрата путем обработки интегральной кинетической кривой (рис.8).

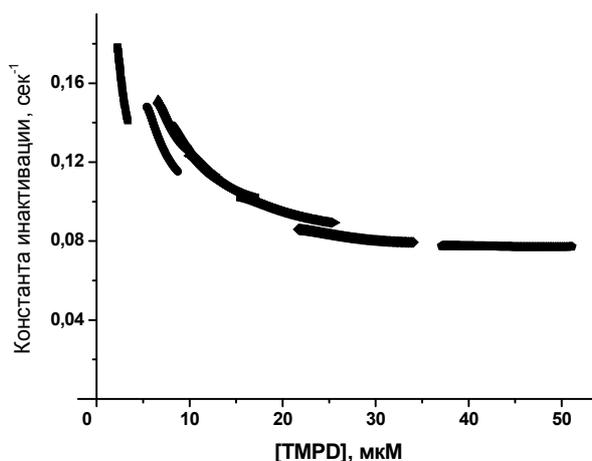


Рис. 8 Зависимость текущего значения константы инактивации от концентрации донора электронов TMPD. Расчет выполнен по «методу-2». Стандартный буферный раствор содержал 2 мМ H₂O₂, 10 нМ фермента PGHS.

Глава 8. Кинетические закономерности инактивации фермента PGHS в ходе циклооксигеназной и пероксидазной реакций

В главе представлены экспериментально полученные зависимости параметров инактивации фермента PGHS в ходе циклооксигеназной и пероксидазной реакций от концентраций субстратов этих реакций. Зависимости проанализированы в терминах связности интермедиатов фермента.

Показано, что если инактивация идет через те же интермедиаты, что и катализ, то возможны три случая, которым соответствуют три типа зависимостей значений константы инактивации и предельного выхода продукта реакции от концентраций субстратов. Подробный анализ зависимостей показал, что знаменатели в дробно-рациональных выражениях для скорости реакции и для константы инактивации должны совпадать, а выражение для предельного выхода продукта реакции должно быть либо равно константе, либо прямо пропорционально концентрации субстрата, либо совпадать по виду с уравнением Михаэлиса-Ментен. Большая часть экспериментальных данных описывается в рамках этой концепции (рис.9).

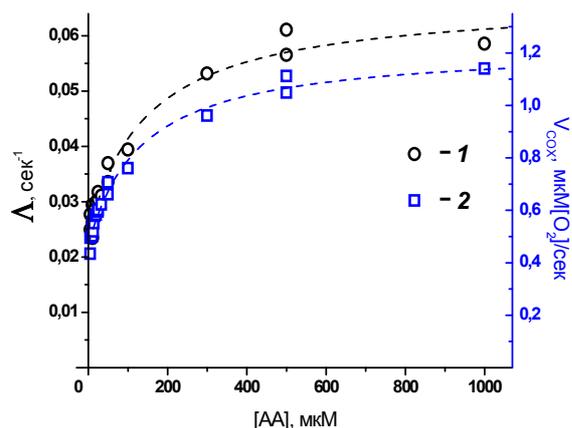
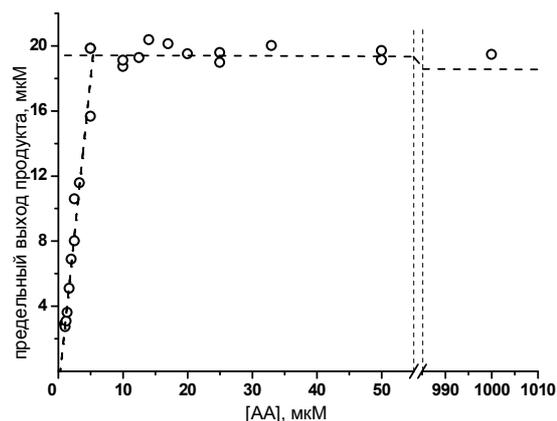
a**б**

Рис.9 Зависимость экспериментально наблюдаемой константы инактивации (а, кривая 1) фермента в ходе циклооксигеназной реакции, скорости циклооксигеназной реакции (а, кривая 2) и предельного выхода продукта (б) циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации арахидоновой кислоты. Расчитанно по «методу-2» (см. главу 4). Стандартный буферный раствор содержал 2 мкМ гемина, 270 мкМ кислорода, 1000 мкМ адреналина.

Исключением являются концентрационные зависимости значений константы инактивации и предельного выхода продукта пероксидазной реакции от перекиси водорода (рис.10). Механизм инактивации в этом случае другой, инактивации подвергаются интермедиаты, не входящие в каталитический цикл.

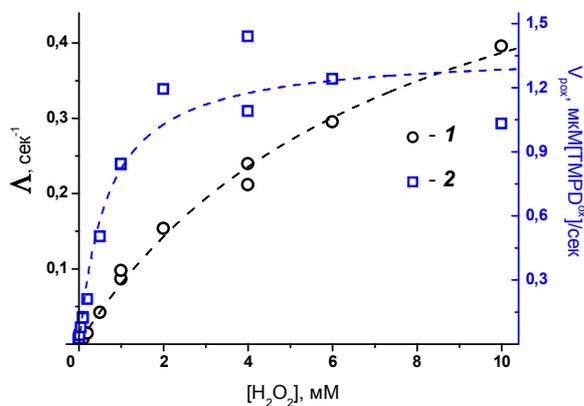
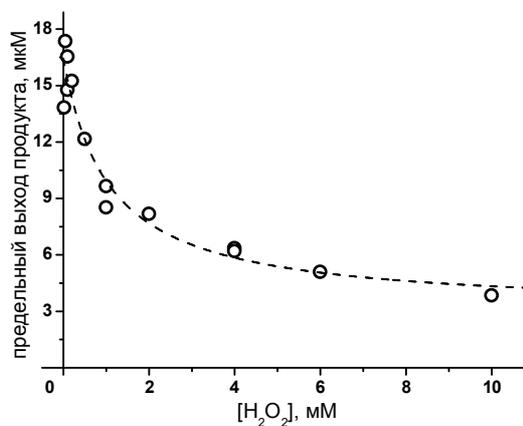
a**б**

Рис.10 Зависимость экспериментально наблюдаемой константы инактивации (а кривая 1) фермента в ходе пероксидазной реакции, скорости пероксидазной реакции (а кривая 2) и предельного выхода продукта (б) пероксидазной реакции фермента PGHS от концентрации перекиси водорода. Расчитанно по «методу-2» (см. главу 4). Стандартный буферный раствор содержал 270 мкМ O₂, 20 мкМ донора электронов TPRD.

Таким образом, показано, что существуют два механизма инактивации фермента PGHS: инактивация, тесно связанная с актом катализа и инактивация, не связанная напрямую с актом катализа. В последнем случае инактивация может быть описана, как инактивация комплекса молекулы белка с молекулой перекиси.

Глава 9. Масс-спектрометрические исследования PGHS

В этой главе разрабатываются методы пробоподготовки для исследования инактивации фермента PGHS методами масс-спектрометрии. Для полученных образцов проводятся измерения на масс-спектрометре.

Мы провели циклооксигеназную, пероксидазную, а также обе эти реакции одновременно, после чего определили масс-спектр фермента PGHS до и после протекания реакции. Из рис.11 видно, что масса белка возрастает после протекания реакций, причем увеличение массы различно для разных реакций. Масса наиболее распространенного изотопа белка PGHS-1 составила около 71 кДа для нативного фермента, около 72 кДа после циклооксигеназной реакции, и 73 кДа после одновременного протекания циклооксигеназной и пероксидазной реакций.

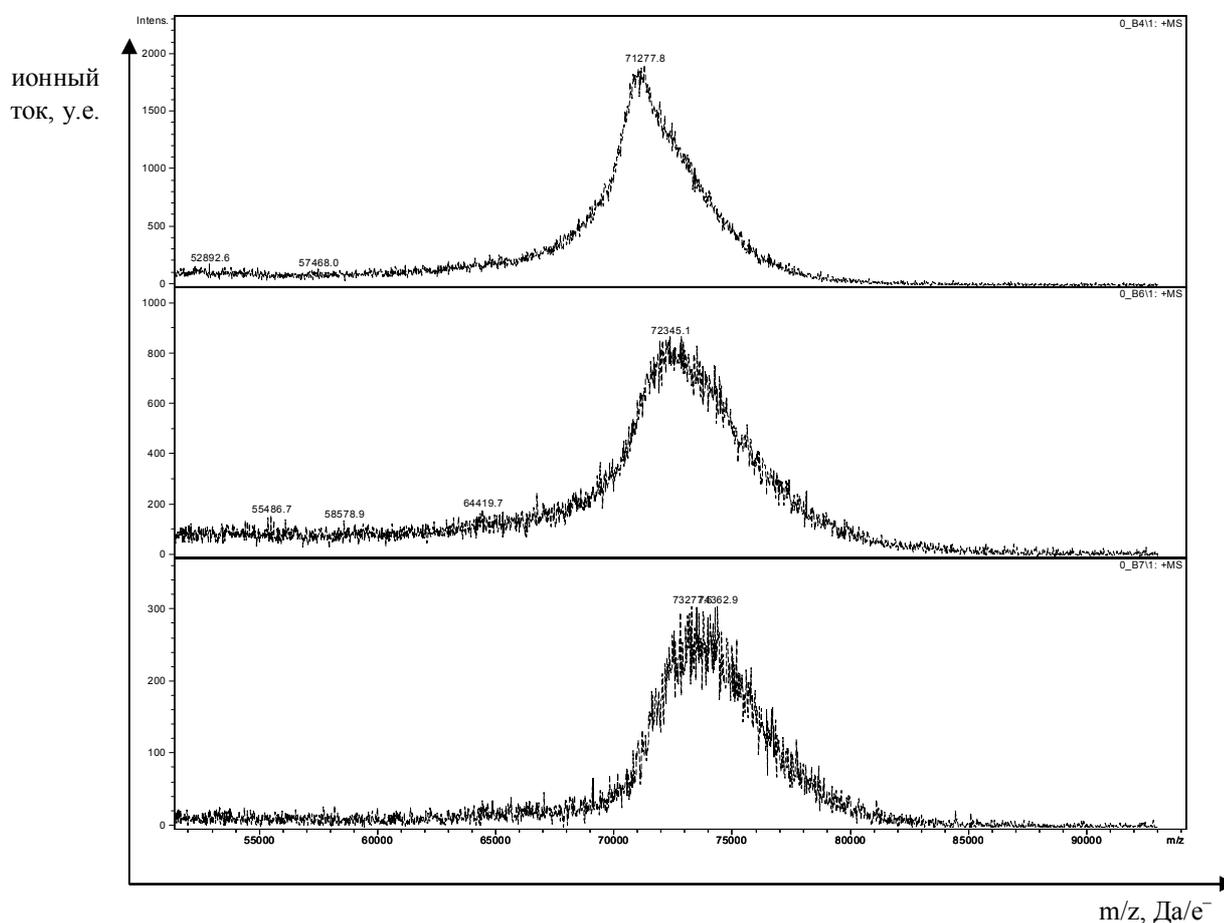


Рис.11 Масс-спектр фермента PGHS до реакции (сверху), после циклооксигеназной реакции (середина), после циклооксигеназной и пероксидазной реакций (внизу).

В таблице 2 приведены сводные результаты анализа масс-спектров обработанного трипсином фермента PGHS (нативного и модифицированного в ходе катализируемых им циклооксигеназной и пероксидазной реакций).

Номера а/к в белке	Посл-ть а/к	Масса/ заряд	П1		П2		П3		П4		П5	
			А	В	А	В	А	В	А	В	А	В
181–184	FLLR	548	+		+		+		+		+	
308–311	EHNR	555	+		–	568	–	568	–	568	–	568
50–54	FGLDR	607	+		+		–		+		+	615
110–114	DTLMR	635	+		–		–	650, 666	+	639, 649, 666	–	637
312–317	VCDLLK	690	+		+		–		+		+	
115–120	LVLTVR	700	–	704	+		–		+		+	
241–245	QYQLR	707	+		+		–		+	704	+	704
216–222	MGPQFTK	737	–	742	–		–		–		–	
151–157	ILPSVPR	781	+		+		–		+		+	
567–573	LVCLNTK	790	+		–		–		–		–	
55–61	YQCDCR	888	–	893	–	877, 913	–	877, 913	–	913	–	861, 877, 913
158–166	DCPTPMGTK	949	–		–		–		–		–	
334–342	LILIGETIK	1000	–		–		–		+	1022	+	1022
460–467	LQPFNEYR	1067	+		+		+		+		+	1088
170–179	QLPDAEFLSR	1176	+	1139, 1158	+		+		+	1158, 1194, 1283	+	1139, 1158, 1194
547–560	ASTFGGEVGFNLVK	1426	+	1303, 1380, 1399, 1439	+	1303, 1399, 1439	–	1305, 1415, 1439, 1460	+	1303, 1305, 1380, 1399, 1439, 1460	+	1303, 1305, 1380, 1399, 1439
574–586	TCPYVSHVDPDR	1518	+	1503	+	1503	–	1476, 1497, 1503	+	1475, 1487, 1503	–	1475, 1503
98–109	WLWDFVNATFIR	1568	+		+		–	1561, 1566	+	1561	+	
533–546	GLLGNPICSPEYWK	1577	+	1588, 1595	–	1588, 1595	–	1588	–	1588, 1595	–	1588, 1595
587–600	QEDRPGVERPPTL	1623	+	1605, 1608, 1647	+	1605, 1608	+	1626, 1631	+	1605, 1608	+	1605, 1608
439–453	NIDHHILHVAVDVIK	1723	+		+	1696	–	1716	+	1696	+	1696, 1716
361–374	FDPELLFGAQFQYR	1731	+		+		–		+	1738	+	1770, 1791
470–485	FGMKPYTSFQELTGEK	1863	+	1841, 1879	+	1841, 1879	–	1815	+	1841	+	
318–333	AENPTWGDEQLFQTAR	1886	+	1900, 1907	+	1901, 1907	+		+	1878, 1901, 1907	+	1878
223–240	ALGHGVDLGHIIYGDNLE R	1936	+	1918, 1923, 1974	+	1959, 2010	+		+	1959	+	1959, 2010
62–79	TGYSGPNCTIPEIWTWLR	2094	–	2044, 2080	–	2044, 2080	–		+	2044, 2080	–	2044
80–97	TTLRSPSPFIHFMLTHGR	2098	–		–		–		–		–	
343–360	IVIEEYVQQLSGYFLQLK	2170	–		–		–		–		–	
512–532	CHPNSIFGESMIEMGAPF	2295	–	2305	–	2305	–	2383	–	2305, 2383	–	2383
377–396	IAMEFNQLYHWHPLMPD SFR	2532	+	2548	+	2548	–		+	2548, 2564	+	2468, 2509, 2548, 2581
25–49	ADPGAPAPVNPCCYYPC QHQ GICVR	2659	+	2655	+	2655	–		+	2655	+	2655, 2677, 2704, 2716
254–277	YQMLNGEVYPPSVVEEAP VLM HYPR	2819	+	2799, 2835, 2840, 2857	+	2799, 2835, 2893	–		+	2835, 2850	+	2835, 2893

Табл.2 Масс-лист обработанного трипсином фермента PGHS. П1 – нативный фермент; П2 – нативный фермент, разбавленный буфером и осажденный ТХУ (контроль); П3 – образец фермента после циклооксигеназной реакции; П4 – образец фермента после пероксидазной реакции; П5 – образец фермента после циклооксигеназной и пероксидазной реакций. А – наличие/отсутствие (+/–) в масс-спектре ионов, совпадающих по массе с пептидами, которые теоретически должны появляться в ходе обработки простагландин Н синтазы трипсином; В – массы ионов, присутствующие в полученном масс-спектре, отличающиеся от масс пептидов, которые теоретически должны появляться в ходе обработки простагландин Н синтазы трипсином.

Масс-спектры фермента PGHS, обработанного трипсином, отличаются для нативного фермента и фермента после циклооксигеназной и пероксидазной реакций. В масс-спектре нативного фермента PGHS и фермента после циклооксигеназной и пероксидазной реакций присутствует ион полипептида, содержащего каталитически важный аминокислотный остаток Tyr385. Количество ионов, представленных в масс-листе, но не совпадающих по массе с полипептидами, которые должны образовываться в ходе трипсинолиза, существенно возрастает после протекания реакций фермента PGHS, по сравнению с нативным белком, что может быть свидетельством химических модификаций в процессе катализа и инактивации.

ВЫВОДЫ

1. Проведено экспериментальное исследование кинетики катализа фермента PGHS. Показано, что циклооксигеназная реакция строго следует кинетике Михаэлиса-Ментен в широком диапазоне концентраций кислорода в отсутствие донора электронов, и не следует кинетике Михаэлиса-Ментен в присутствии донора электронов. Показано, что в присутствии донора электронов циклооксигеназная реакция ингибируется избытком кислорода. Показано, что зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты не линеаризуется в двойных обратных координатах, как в отсутствие донора электронов, так и в присутствии донора электронов.

2. Показано, что в механизмах циклооксигеназной и пероксидазной реакций присутствуют необратимые стадии между пунктами донирования субстратов. Показано, что кинетические закономерности катализа фермента PGHS могут быть объяснены в рамках двумерной кинетической модели для многосубстратных бифункциональных ферментов. Показано, что в доступном диапазоне концентраций субстратов величины констант скоростей псевдопервого порядка в механизме пероксидазной реакции гораздо меньше величин констант скоростей первого порядка для мономолекулярных реакций в механизме действия фермента PGHS.

3. Проведено теоретическое исследование обобщенной модели многосубстратной ферментативной реакции, интермедиаты которой могут подвергаться необратимой инактивации в ходе реакции. С применением теоремы Тихонова о предельном переходе в дифференциальных уравнениях с малым параметром при старшей производной определены условия применимости квазистационарного приближения. Проанализировано квазистационарное решение исходной системы. Дискриминированы решения для каталитических и инактивационных процессов. Определены экспериментально наблюдаемые характеристики для катализа и инактивации.

4. Разработан метод определения константы инактивации из интегральной кинетической кривой накопления продукта ферментативной реакции в условиях истощения по субстрату. Показано, что метод позволяет рассчитывать константу инактивации для всего диапазона концентраций варьируемого субстрата, а также позволяет воспроизводить непрерывную зависимость константы инактивации от концентрации субстрата путем обработки интегральной кинетической кривой.

5. Показано, что существуют два механизма инактивации фермента PGHS: инактивация, тесно связанная с актом катализа циклооксигеназной и пероксидазной реакций, и инактивация, обусловленная дополнительным взаимодействием фермента с перекисью водорода.

6. Показано, что масса нативного фермента PGHS меньше, чем масса фермента PGHS после катализа циклооксигеназной и пероксидазной реакций. Масс-спектры фермента PGHS, обработанного трипсином, отличаются для образца нативного фермента и образцов фермента после протекания циклооксигеназной и пероксидазной реакций. Это может быть свидетельством химических модификаций в процессе катализа и инактивации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Цаплина Л.А., Каратассо Ю.О., **Филимонов И.С.**, Вржещ П.В. Кинетический механизм действия фермента простагландин-Н-синтазы. Влияние доноров электронов на циклооксигеназную реакцию. **Биохимия**, 2006, том 71, № 11, с.1534–1543.
2. **Филимонов И.С.**, Вржещ, П.В. Молекулярный кислород (субстрат циклооксигеназной реакции) в кинетическом механизме бифункционального фермента простагландин-Н-синтаза. **Биохимия**, 2007, том 72, № 9, с.944–953.
3. Цаплина Л.А., **Филимонов И.С.**, Вржещ П.В. Обобщенная модель бифункциональных ферментов с учетом иерархии быстрых и медленных каталитических циклов: молекулярный кислород в кинетическом механизме простагландин-Н-синтазы. **Бюллетень Московского общества испытателей природы, отдел биологический**, 2007, том 112, № 1, Прил.1., с.155–184.
4. Трушкин Н.А., **Филимонов И.С.**, Вржещ П.В. Ингибирование циклооксигеназной активности фермента простагландин-Н-синтазы-1 избытком субстрата (молекулярного кислорода). **Биохимия**, 2010, том 75, № 11.

Тезисы

1. Каратассо Ю.О., **Филимонов И.С.**, Цаплина Л.А. Кинетическая модель бифункционального многосубстратного фермента в стационарном приближении. Тезисы докладов 11-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004", секция Физика, 2004. М.: МГУ. – С.105.
2. Цаплина Л.А., Каратассо Ю.О., **Филимонов И.С.** Ферментативный синтез простагландинов. Кинетический механизм действия фермента простагландин-Н-синтазы. Тезисы докладов 11-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004", секция Биология, 2004. М.: МГУ. – С.168.
3. **Филимонов И.С.** Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции фермента простагландин-Н-синтазы от концентрации кислорода // Тезисы

докладов V международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика». – 2005. С.34–35.

4. **Филимонов И.С.** Инактивация фермента простагландин-Н-синтазы в ходе катализируемых реакций // Тезисы докладов VI международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика». – 2006. С.267–269

5. **Филимонов И.С.,** Вржещ П.В. Исследование инактивации фермента простагландин-Н-синтазы методами масс-спектрометрии // Тезисы докладов VIII международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика». – 2008. С.231–234

6. Бархатов В.И., **Филимонов И.С.** Кинетика пероксидазной реакции фермента простагландин-Н-синтазы // Тезисы докладов 16-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2009", секция Биоинженерия и биоинформатика, 2009.

7. **Филимонов И.С.,** Бархатов В.И. Расчет параметров инактивации фермента простагландин-Н-синтазы с учетом снижения скорости реакции за счет конверсии субстрата в ходе ферментативной реакции // Тезисы докладов 16-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2009", секция Физика, 2009.