

УДК 577.151.01

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КИСЛОРОД (СУБСТРАТ ЦИКЛООКСИГЕНАЗНОЙ РЕАКЦИИ) В КИНЕТИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФЕРМЕНТА ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ*

© 2007 г. И.С. Филимонов^{1,2}, П.В. Вржещ^{1,3**}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ
им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва; факс: (495)939-4218,
электронная почта: peter@genebee.msu.ru

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
117997 Москва, ул. Косыгина, 4; факс: (495)137-4101,
электронная почта: asp@sky.chph.ras.ru

³ Международный биотехнологический центр МГУ
им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва; факс: (495)939-5022

Поступила в редакцию 31.03.07
После доработки 26.05.07

Определен характер зависимостей скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в отсутствие и в присутствии донора электронов. В качестве модели использована двумерная кинетическая схема, в которой учтено независимое протекание и взаимное влияние циклооксигеназной и пероксидазной реакций, а также иерархия скоростей этих реакций. В рамках этой модели показано, что механизм циклооксигеназной реакции между пунктами донирования субстратов включает в себя необратимые стадии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: простагландин-Н-синтаза, бифункциональный фермент, циклооксигеназная активность, кинетический механизм, кислород, арахидоновая кислота, адреналин.

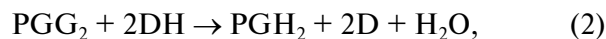
Фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS, К.Ф.1.14.99.1) осуществляет первый этап биосинтеза всех простагландинов, а также тромбксана и простаглицлина, катализируя превращение молекулы арахидоновой кислоты в простагландин H_2 . Простагландины – модуляторы сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной, почечной и репродуктивной систем, а также медиаторы боли, воспаления, повышения температуры, аллергии. Поэтому фермент, катализирующий их биосинтез, представляет собой исключительно важную фармакологическую мишень [1, 2]. Терапевтический эффект воздействия всех нестероидных противовоспалительных средств обусловлен ингибированием PGHS [3, 4].

Принятые сокращения: PGHS – простагландин-Н-синтаза, PGG_2 – простагландин G_2 , PGH_2 – простагландин H_2 , DH – восстановленная форма донора электронов, D – окисленная форма донора электронов, AA – арахидоновая кислота, ROOH – перекись, PP – протопорфирин IX, Tug – остаток тирозина, ДЭДТК – диэтилдитиокарбамат.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 07-088,

** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

$PGHS$ – Бифункциональный фермент, катализирующий циклооксигеназное окисление арахидоновой кислоты двумя молекулами кислорода с образованием PGG_2 и пероксидазное восстановление перекисной группы PGG_2 в присутствии донора электронов с образованием PGH_2 [5]:



Обе реакции идут на одной молекуле белка на двух близкорасположенных активных центрах. Эти реакции гемзависимы и сопровождаются необратимой инактивацией фермента [6].

Наряду с арахидоновой кислотой в циклооксигеназной реакции (1) принимают участие две молекулы кислорода. Между тем работ по исследованию влияния концентрации этого субстрата на ферментативную реакцию практически нет. В работе [7] была оценена константа Михаэлиса K_m циклооксигеназной реакции по кислороду (5 мкМ), и, судя по полученным результатам, значение K_m не зависело от концент-

рации арахидоновой кислоты. В работе [8] проведено исследование чувствительности конверсии меченой арахидоновой кислоты в PGH_2 за 1 мин к концентрации растворенного кислорода. И в результате получено, что $K_m = 10$ мкМ.

Для определения кинетического механизма ферментативной реакции в случае такого сложного объекта, как PGHS, этих данных явно недостаточно. Само понятие «константа Михаэлиса» для катализируемой бифункциональным ферментом многосубстратной ферментативной реакции довольно условно, так как зависимость этой величины от концентрации других реагентов всегда сложная. Необходимо исследовать зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода (субстрата циклооксигеназной реакции), а также определить влияние изменения концентраций других субстратов катализируемых PGHS реакций на эти зависимости.

Цель настоящей работы – исследование влияния концентрации растворенного молекулярного кислорода на кинетику циклооксигеназного окисления арахидоновой кислоты при изменении концентраций арахидоновой кислоты и различных доноров электронов, а также построение кинетической модели действия PGHS.

Во всех известных в настоящее время достаточно полных кинетических моделях PGHS предусмотрен общий материальный баланс по всем интермедиатам фермента, осуществляющим циклооксигеназную и пероксидазную реакции [9, 10]. Это автоматически влечет за собой такие последствия, как конкуренция между двумя активностями, т.е. подавление циклооксигеназной реакции при протекании пероксидазной и наоборот подавление пероксидазной реакции при протекании циклооксигеназной. Однако имеются достаточно веские свидетельства прямо противоположного: в присутствии донора электронов скорость циклооксигеназной реакции существенно увеличивается [11, 12]. Становится очевидным, что использование моделей с общим материальным балансом здесь принципиально не возможно.

В работе [13] нами предложена двумерная кинетическая схема для бифункционального фермента, в которой предусмотрено независимое протекание двух реакций, не исключающее взаимного влияния этих реакций. Применение этой модели для PGHS позволяет объяснить все экспериментально наблюдаемые зависимости, однако «платой» за это становится появление неоправданно сложных выражений для общего вида зависимости скорости реакций от концентраций реагентов в виде дробно-рациональных функций.

Характерные особенности представленных в данной статье экспериментальных результатов – относительная простота полученных зависимостей скорости циклооксигеназной реакции от концентрации субстратов и сохранение качественного вида этих зависимостей как в присутствии, так и в отсутствие донора электронов (субстрата пероксидазной реакции). В статье [14] показано, что подобные результаты могут быть получены на основе двумерной схемы [13] с учетом иерархии скоростей отдельных элементарных реакций, составляющих реакционный механизм.

Применение результатов работы [14] позволило нам редуцировать общую двумерную схему действия бифункционального фермента PGHS, упростить теоретические выражения для скоростей ферментативной реакции и описать отклонение циклооксигеназной реакции от кинетики Михаэлиса–Ментен, увеличение скорости циклооксигеназной реакции в присутствии донора электронов, появление линейных зависимостей в двойных обратных координатах, зависимость константы Михаэлиса по кислороду для циклооксигеназной реакции от концентрации донора электронов и ряд других экспериментальных фактов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были использованы Tris, Tween-20, L-адреналин, диэтилдитиокарбамат («MP Biomedicals Inc.», Германия), ферроцианид («Merck», Германия), арахидоновая кислота, гемин, перекись водорода («Sigma-Aldrich», США), а также реактивы высокой степени чистоты, произведенные в России.

PGHS в виде солюбилизованного препарата выделяли из микросом семенных пузырьков (везикулярных желез) барана (племзавод «Русь», Россия) методом, описанным в работе [15], с незначительными изменениями. Препарат фермента находился в буферном растворе, содержавшем Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДЭДТК, 1%-ный (по объему) Tween-20.

Во всех экспериментах по измерению циклооксигеназной активности фермента использовали стандартный буферный раствор (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,1%-ный (по объему) Tween-20), который обычно применяется при исследовании кинетики PGHS [16–18]. Ферментативную реакцию проводили в термостатируемой поларографической ячейке при 25°. В буферный раствор добавляли реагенты, реакцию инициировали добавлением фермента. Раствор арахидоновой кислоты (10–150 мМ) готовили и до-

бавляли в реакционную смесь в виде раствора в этиловом спирте; 0,1 М раствор адреналина готовили растворением адреналина в 0,1 М растворе соляной кислоты; раствор ферроцианида калия (0,1 М) готовили в стандартном буферном растворе; раствор гемина готовили по навеске (растворяли ее в небольшом количестве 0,1 М NaOH, затем разводили в 20 раз стандартным буферным раствором). Для определения концентрации аликвоту раствора гемина смешивали с 20%-ным пиридином в 0,1 М NaOH с добавлением дитионита натрия. Концентрацию гемина определяли спектрофотометрическим методом с использованием известных коэффициентов поглощения для восстановленного комплекса гемина с пиридином [19].

Поглощение растворенного кислорода в ходе циклооксигеназной реакции измеряли амперометрическим методом с использованием анализатора кислорода Экотест-120/АТС («Эконикс», Россия), снабженным газодиффузионным платиново-серебряным электродом Кларка [20]. Этот метод наблюдения позволяет получить полную кинетическую кривую в реальном времени. Объем реакционной смеси составлял 3,3 мл, объем добавляемого раствора фермента (с концентрацией белка 4,5 мг/мл) – 10 мкл.

Для получения пониженных концентраций растворенного кислорода в реакционной среде последний частично замещали аргоном. Для этого 8 мл стандартного буферного раствора, содержащего в необходимых концентрациях гемин и адреналин (ферроцианид), помещали в снабженную магнитной мешалкой круглодонную колбу объемом 100 мл, удаляли газовую фазу с помощью водоструйного насоса и создавали атмосферу аргона. Цикл вакуумирование–заполнение аргоном повторяли несколько раз. Полученной смесью заполняли полярографическую ячейку, и проводили реакцию, как описано выше.

Скорость циклооксигеназной реакции определяли как тангенс угла наклона интегральной кривой поглощения кислорода в начальный момент времени.

Математическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета для обработки данных Origin 6.1 (Microcal Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние типа донора электронов на качественный вид зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентраций кислорода. На рис. 1 приведены зависимости скорости катализируемой PGHS циклооксигеназной реакции в двой-

ных обратных координатах при различных условиях. Зависимость в первом приближении является линейной при использовании в качестве донора электронов L-адреналина (органический донор электронов) и ферроцианида (неорганический донор электронов), а также в отсутствие добавляемого донора электронов.

Следует отметить, что наличие в реакционной смеси донора электронов влияет на наклон прямой, на K_m и на максимальную скорость циклооксигеназной реакции (рис. 1). Донор электронов не участвует непосредственно в циклооксигеназной реакции, но участвует в восстановлении PGG₂ в ходе пероксидазной реакции.

Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода при различных концентрациях арахидоновой кислоты. Мы провели серию экспериментов, в которых изменяли концентрацию двух субстратов циклооксигеназной реакции (кислорода и арахидоновой кислоты). Подобные эксперименты были проведены в отсутствие в среде донора электронов, а также в присутствии в среде адреналина или ферроцианида. В отсутствие в среде донора электронов зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода при различных концентрациях арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах представляет собой серию прямых, в первом приближении параллельных (рис. 2, а). Присутствие в среде ферроцианида повлияло на наклон прямых, но параллельность сохранилась (рис. 2, б).

Аналогичные эксперименты с использова-

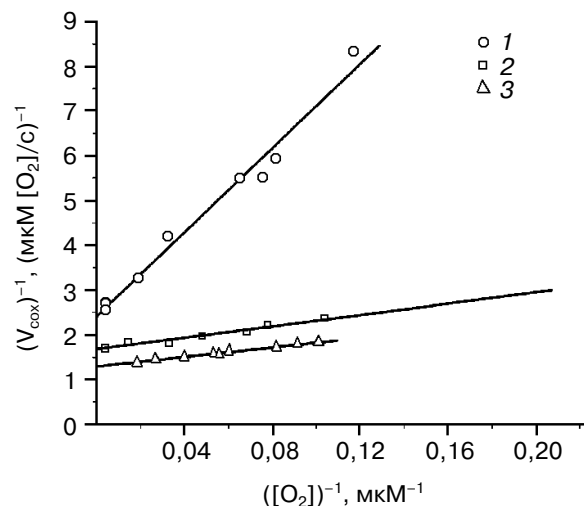


Рис. 1. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах. Стандартный буферный раствор содержал 2 мкМ гемина, 33 мкМ АА. 1–3 – без добавления донора электронов, с добавлением 1 мМ ферроцианида и 1 мМ адреналина соответственно. Здесь и на рис. 2, 3, 5 сплошные линии – линейная аппроксимация экспериментальных данных

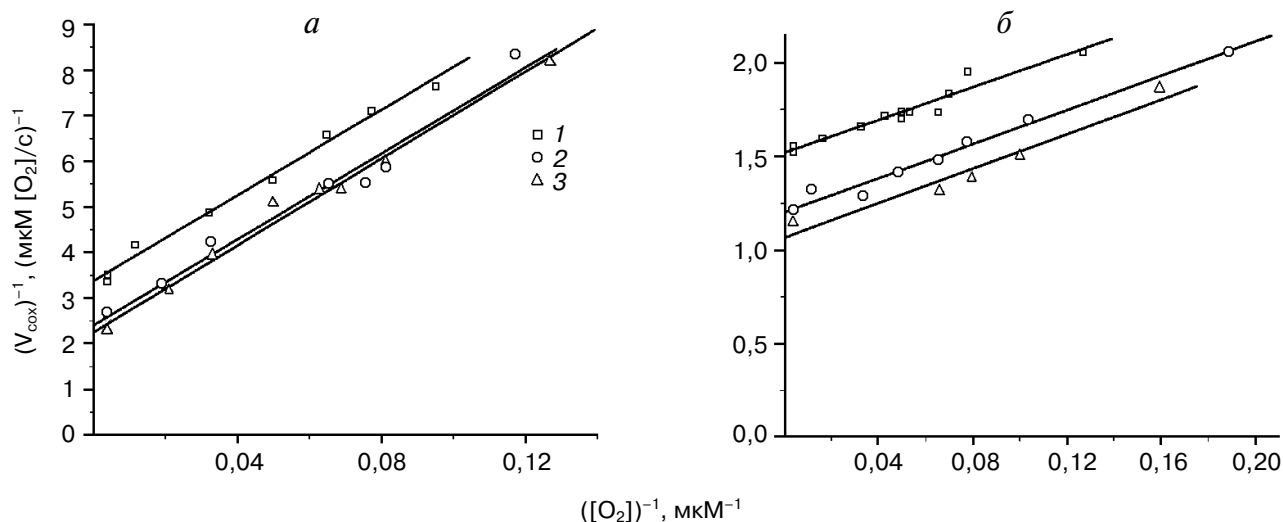


Рис. 2. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах в отсутствие (а) и в присутствии (б) доноров электронов, при разных концентрациях АА. Стандартный буферный раствор содержал 2 мкМ гемина, 10, 33 и 100 мкМ АА (1–3 соответственно)

нием адреналина в качестве донора электронов показали, что 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 небольшое (10% максимального значения скорости), но воспроизводимое отклонение от линей-

ности (рис. 3). При этом постоянным остается расстояние между кривыми. Максимальное значение скорости достигается при 50 мкМ кислорода. Однако в присутствии ферроцианида и в отсутствие донора электронов подобные отклонения не наблюдались. Вероятно, такое отклонение от линейности связано со свойствами адреналина и не является характерной особенностью зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода.

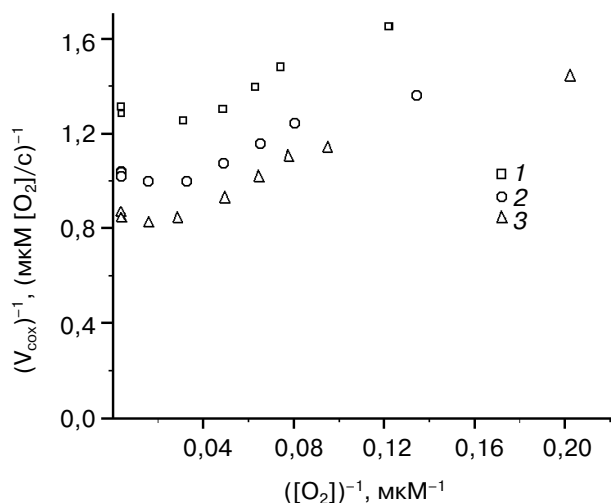


Рис. 3. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах в присутствии донора электронов (адреналин), при разных концентрациях АА. Стандартный буферный раствор содержал 2 мкМ гемина, 1 мМ адреналина, 10, 33 и 100 мкМ АА (1–3 соответственно)

Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода при разных концентрациях 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 (рис. 4). В результате линейной аппроксимации экспериментальных данных получена серия прямых, пересекающихся в одной точке во втором квадранте.

Нелинейный участок зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах, который замечен при концентрации адреналина 1 мМ (рис. 3), исчезает при снижении концентрации последнего (рис. 4).

Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты в присутствии и в отсутствие донора электронов. На рис. 5 приведены зависимости скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от кон-

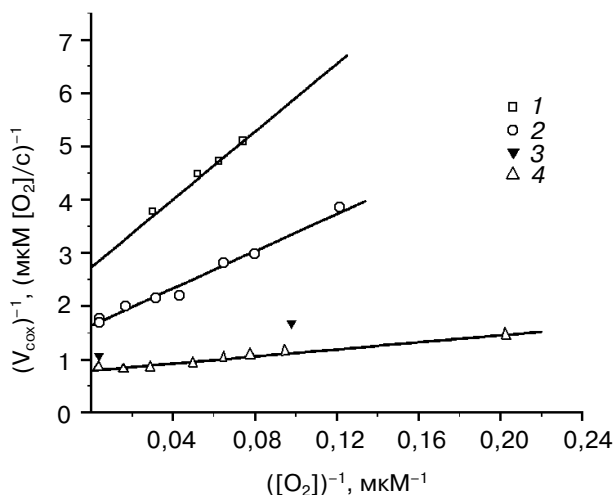


Рис. 4. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах, при разных концентрациях донора электронов (адреналин). Стандартный буферный раствор содержал 2 мкМ гемина, 100 мкМ АА, 0, 30, 200, 1000 мкМ адреналина (1–4 соответственно)

центрации 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 постоянной в области концентраций от 10 до 300 мкМ арахидоновой кислоты (рис. 5).

ПОСТРОЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

В самом простейшем случае кинетика фермента подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен, зависимость скорости реакции от концентрации субстрата линейная в двойных обратных координатах. Для бифункциональных многосубстратных ферментов такая линейность может нарушаться, в двойных обратных координатах может наблюдаться квадратичная, S-образная или какая-либо еще зависимость. На рис. 1 видно, что зависимость скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации кислорода в первом приближении линейная в двойных обратных координатах. Линейность сохраняется в отсутствие и в присутствии различных по химической природе доноров электронов, но при этом меняются наклон пря-

мых, наблюдаемая константа Михаэлиса по кислороду и максимальная скорость циклооксигеназной реакции. Таким образом, обусловленное присутствием донора электронов протекание пероксидазной реакции не влияет на качественный вид кинетических кривых для циклооксигеназной реакции, но меняет количественные параметры этих кривых. Это утверждение справедливо для всего набора наших экспериментальных данных. Если зависимость была линейной в присутствии донора электронов, то она остается линейной и в отсутствие донора электронов (рис. 1). Если наблюдалось отклонение от линейности в присутствии донора электронов, то оно также сохраняется и в отсутствие донора электронов (рис. 5).

Таким образом, кинетическая модель действия фермента простагландин-Н-синтазы должна удовлетворять следующим требованиям:

учитывать независимое протекание и взаимное влияние циклооксигеназной и пероксидазной реакций. Качественные кинетические свойства модели циклооксигеназного окисления арахидоновой кислоты должны быть одними и теми же как в присутствии, так и в отсутствие донора электронов;

задавать относительно простые теоретические зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации субстратов циклооксигеназной реакции, сохраняющие свой качественный вид как в отсутствие, так и в присутствии пероксидазной реакции;

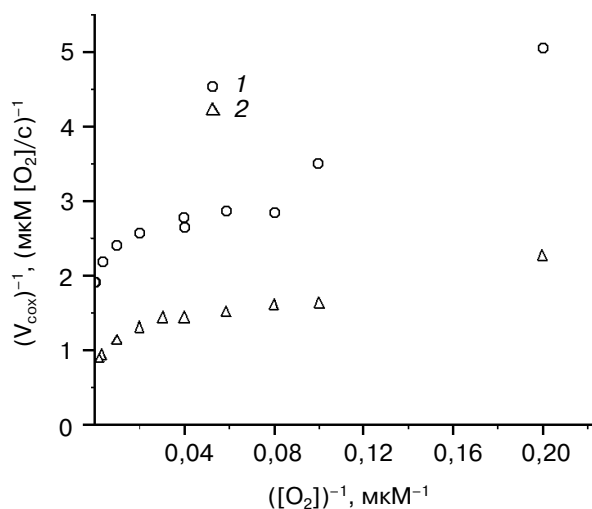


Рис. 5. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции в присутствии и в отсутствие донора электронов от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах. Стандартный буферный раствор содержал 2 мкМ гемина, 260 мкМ O₂, 0 и 1000 мкМ адреналина (1 и 2 соответственно)

соответствовать следующему набору экспериментальных фактов: линейной зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в отсутствие донора электронов в двойных обратных координатах (рис. 1), сохранению наклона прямых при варьировании концентрации арахидоновой кислоты (рис. 2, а); линейной зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в присутствии донора электронов в двойных обратных координатах (рис. 1), сохранению наклона прямых при варьировании концентрации арахидоновой кислоты (рис. 2, б); образованию пучка прямых, пересекающихся в одной точке во втором квадранте, линейными зависимостями скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода при варьировании концентрации донора электронов в двойных обратных координатах (рис. 4); в двойных обратных координатах постоянному расстоянию между кривыми, описывающими зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты в присутствии и в отсутствие доноров электронов, остается постоянным (рис. 5).

Двумерная кинетическая схема, предложенная в работе [13] для бифункциональных ферментов, в том числе для PGHS, заведомо удовлетворяет перечисленным выше требованиям, но ее использование приводит к излишне сложным выражениям. Однако использование такой двумерной схемы единственно возможно для адекватного описания кинетики любых бифункциональных ферментов. Выход состоит в упрощении общей схемы с учетом реальных свойств конкретного фермента.

Вначале рассмотрим случаи протекания частных реакций.

Случай 1. Протекает только циклооксигеназная реакция, пероксидазная не идет (в среде отсутствует донор электронов). Кинетический механизм такой реакции должен включать в себя основные стадии [21], приведенные на схеме 1.

При протекании циклооксигеназной реакции меняется состояние Tyr385, который играет ключевую роль в работе фермента [21]. Образование тирозинового радикала (Tyr*) в ходе пероксидазной реакции необходимо для инициации циклооксигеназной реакции. Поэтому мы ввели на схеме следующие обозначения, характеризующие состояние циклооксигеназного ак-

тивного центра: $C_1 = [\text{Tyr}^*]$ (форма фермента с радикалом на Tyr385), $C_2 = [\text{Tyr}^*]\text{AA}$, $C_3 = [\text{Tyr}]\text{AA}^*$ (радикал арахидоновой кислоты по 11-му положению), $C_4 = [\text{Tyr}]\text{AAO}_2^*$ (11-пероксирадикал арахидоновой кислоты), $C_5 = [\text{Tyr}]\text{AAO}_2$ (радикал эндопероксида арахидоновой кислоты по 15-му положению), $C_6 = [\text{Tyr}]\text{AAO}_2\text{O}_2^*$ (15-пероксирадикал PGG₂ по 15-му положению), k_i — константы скоростей. В результате расчета скорости циклооксигеназной реакции для этой схемы в стационарном состоянии получена квадратичная зависимость скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах (П.1). При этом параметры параболы зависели от концентрации арахидоновой кислоты. Эти факты находятся в противоречии с реальными экспериментальными зависимостями, представляющими собой серию прямых, в первом приближении параллельных (рис. 2, а). Соответствие между экспериментальными и теоретическими результатами достигается в предположении существования необратимых стадий между пунктами донирования субстратов [22] в схеме 1. В этом случае на схеме 1 константы k_{-2} и k_{-4} равны нулю и теоретическая и экспериментальная зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода хорошо согласуются (П.2). Равенство нулю константы k_{-4} обеспечивает линейность зависимости скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах, а равенство нулю константы k_{-2} обеспечивает параллельность этих прямых.

Случай 2. Протекает только пероксидазная реакция, циклооксигеназная не идет (в среде присутствуют субстраты пероксидазной реакции перекись водорода и донор электронов и отсутствует арахидоновая кислота). Кинетический механизм пероксидазной реакции должен включать в себя основные стадии [21], приведенные на схеме 2.

При протекании пероксидазной реакции меняется степень окисления железа ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{4+}$), входящего в состав гема — необходимого элемента (кофактора) для проявления каталитической активности PGHS [21]. Также на одной из стадий пероксидазной реакции образуется радикал на протопорфириновом кольце гема ($\text{PP} \rightarrow \text{PP}^*$) [21]. Поэтому мы ввели следующие обозначения, характеризующие состояние пероксидазного активного центра: $P_1 - [(\text{PP})\text{Fe}^{3+}]$,

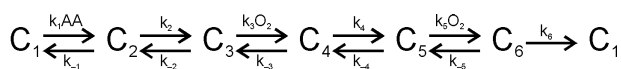


Схема 1. Циклооксигеназная реакция

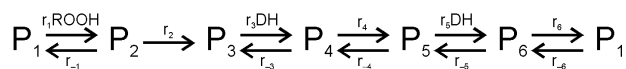


Схема 2. Пероксидазная реакция

$P_2 - [(PP)Fe^{3+}]ROOH$, $P_3 - [(PP^*)^+ Fe^{4+}O]$, $P_4 - [(PP^*)^+ Fe^{4+}O]DH$, $P_5 - [(PP) Fe^{4+}O]$, $P_6 - [(PP) Fe^{4+}O]DH$, r_j – константы скоростей. В результате расчета скорости пероксидазной реакции для этой схемы в стационарном состоянии получена квадратичная зависимость скорости от концентрации донора электронов в двойных обратных координатах (П.3). При этом параметры параболы зависят от $[ROOH]$. Эти факты находятся в противоречии с реальными экспериментальными зависимостями, представляющими собой серию прямых, в первом приближении параллельных [23]. Соответствие между экспериментальными и теоретическими данными достигается в предположении существования необратимых стадий между пунктами донирования субстратов [22]. В этом случае на схеме 2 константы r_{-4} и r_{-6} равны нулю, теоретическая и экспериментальная зависимости скорости пероксидазной реакции от концентрации донора электронов хорошо согласуются (П.4). Равенство нулю константы r_{-4} обеспечивает линейность зависимости скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах, а равенство нулю константы r_{-6} обеспечивает параллельность этих прямых.

Мы рассмотрели два случая, в каждом из которых фермент проявлял только одну из своих активностей, и сделали выводы о необратимости некоторых стадий циклооксигеназной и пероксидазной реакций. Логично предположить, что механизм (обратимость—необратимость) каждой из реакций сохранится и в случае их одновременного протекания.

Рассмотрим вариант, когда фермент катализирует протекание обеих реакций. Тогда двумерная схема для бифункциональных ферментов [13] применительно к PGHS, с учетом сформулированных выше выводов о необратимости некоторых стадий примет вид схема 3, где сохранены обозначения, введенные ранее (схемы 1 и 2), но одновременно отображается состояние двух активных центров (циклооксигеназного и пероксидазного) на одной молекуле фермента.

Влияние циклооксигеназной реакции на пероксидазную можно считать пренебрежимо малым, так как пероксидазная реакция протекает в отсутствие арахидоновой кислоты или в присутствии ингибиторов циклооксигеназы. Добавление в реакционную смесь для проведения пероксидазной реакции нестероидных противовоспалительных препаратов, которые ингибируют циклооксигеназную активность PGHS, практически не влияет на начальную скорость пероксидазной реакции [24, 25] и лишь незначительно уменьшает скорость потери пероксидазной активности в процессе реакции [25]. Тог-

да константы скоростей элементарных стадий пероксидазной реакции r_j не будут зависеть от состояния активного центра циклооксигеназной реакции, что нашло свое отражение на схеме 3.

Так как присутствие донора электронов влияет на параметры циклооксигеназной реакции, 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 1 стадий циклооксигеназной реакции, например на четвертую, т.е. k_4 зависит, а k_1, k_2, k_3, k_5, k_6 не зависят от состояния активного центра пероксидазной реакции. Соответственно для константы скорости четвертой стадии циклооксигеназной реакции вводится второй индекс, отображающий состояние пероксидазного активного центра (схема 3).

Анализ литературы по кинетике PGHS [12, 26–28] и наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что пероксидазная активность PGHS существенно превышает циклооксигеназную. Поэтому логично предположить, что стационарное состояние, устанавливающееся для интермедиатов пероксидазной реакции, достигается быстро по сравнению с временем установления стационара по интермедиатам циклооксигеназной реакции и не меняется в ходе протекания циклооксигеназной реакции. Тогда согласно сделанным в работе [14] выводам можно упростить схему 3, заменив все k_{4j} ($j = 1, \dots, 6$) на одну константу $k_{4эф}$, которая выражается через константы скоростей элементарных стадий и концентрации субстратов пероксидазной реакции (r_j и $[ROOH], [DH]$), а также константы скоростей четвертой стадии циклооксигеназной реакции k_{4j} ($j = 1, \dots, 6$) (П.7). Тогда схема 3 трансформируется в схему 4.

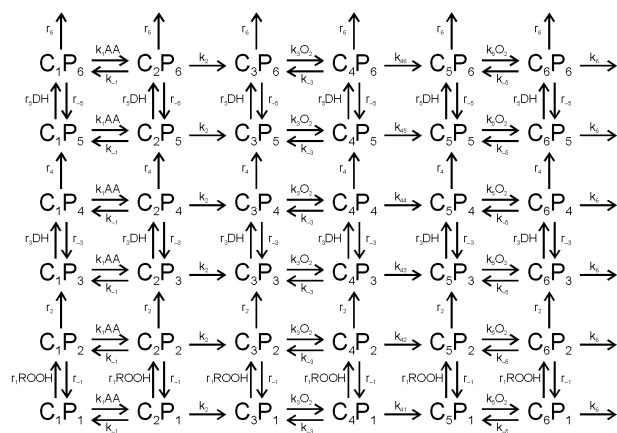


Схема 3. Циклооксигеназная и пероксидазная реакции

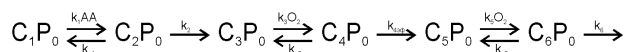


Схема 4. Циклооксигеназная и пероксидазная реакции после упрощений

В результате расчета схемы 4 в стационарном состоянии с учетом всех сделанных предположений получено следующее уравнение для скорости циклооксигеназной реакции:

$$\frac{C_0}{V_{COX}} = \frac{\eta}{[AA]} + \left(\theta + \frac{\rho}{[DH] + \mu} \right) \frac{1}{[O_2]} + \frac{\nu\rho}{[DH] + \mu} + \omega, \quad (3)$$

где η , θ , ρ , μ , ν , ω выражаются через константы элементарных стадий пероксидазной, циклооксигеназной реакций и концентрацию ROOH ((П.11)–(П.16)).

Проанализируем полученное уравнение (3) для скорости циклооксигеназной реакции. Коэффициенты θ , ρ , μ , ω зависят от концентрации ROOH, поэтому они не являются константами. Однако данные работы [29] свидетельствуют о том, что перекись в значительно меньшей степени влияет на параметры циклооксигеназной реакции, чем донор электронов. Это позволяет предположить, что коэффициенты θ , ρ , μ , ω в первом приближении можно считать константами. Если принять это предположение, то уравнение (3) хорошо согласуется со всеми экспериментальными данными, представленными на рис. 1–5.

Одним из упрощений при выводе уравнения (3) было предположение о том, что протекание пероксидазной реакции влияет только на константу скорости четвертой стадии циклооксигеназной реакции. Однако нетрудно показать, что только в том случае, когда влияние пероксидазной реакции сказывается на четвертой или на шестой стадиях (схема 3), становится возможным теоретическое описание пересечения прямых на рис. 4 в одной точке (П.17).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Когда один из субстратов дважды принимает участие в реакции, можно ожидать появления квадратичной зависимости скорости реакции от концентрации этого субстрата в двойных обратных координатах. Если же в двойных обратных координатах наблюдается линейная зависимость, это свидетельствует о наличии необратимой стадии между пунктами донирования такого субстрата [22].

Результаты представленных в данной работе экспериментов (рис. 2, а) свидетельствуют о наличии необратимой стадии в циклооксигеназной реакции между пунктами донирования кислорода, дважды принимающего участие в реакции. Возможно, необратимая стадия между пунктами донирования кислорода (четвертая стадия на схеме 1) соответствует существенному изменению конформации субстрата [21] после образования эндопероксидного мостика между 8-м и 12-м атомами углерода в ходе превращения 11-пероксиарахидинового интермедиата в радикал С-15.

Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах линейна. В то же время зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты нелинейна (рис. 5). Это не может быть объяснено в рамках нашей кинетической модели действия PGHS, но и не противоречит ей. Тот факт, что расстояние между кривыми, описывающими зависимости скоростей циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты в присутствии и в отсутствие субстратов пероксидазной реакции в двойных обратных координатах, остается постоянным (рис. 5), хорошо согласуется с уравнением (3). Нелинейный участок зависимости на рис. 5 может описываться уравнением (3) в предположении, что η не константа и является функцией от концентрации арахидоновой кислоты.

Наблюдаемые в наших экспериментах отклонения от линейной зависимости в области низких концентраций (< 3 мкМ) арахидоновой кислоты были описаны ранее [11]. В работе [23] показано, что этот эффект снижается или полностью исчезает при добавлении в реакционную смесь органической перекиси. Наблюдаемая в настоящей работе активация избытком субстрата (рис. 5) описывается впервые. Упоминания о подобных эффектах для PGHS в научной литературе найти не удалось. Возможно, активация циклооксигеназной реакции избытком арахидоновой кислоты связана с влиянием арахидоновой кислоты при высоких концентрациях на мицеллообразование в реакционной смеси.

Как отмечено выше, с формальной точки зрения совпадение экспериментальных и теоретических результатов достигается тогда, когда влияние пероксидазной реакции сказывается на четвертой или на шестой стадиях циклооксигеназной реакции (схема 3). В этой связи отметим, что влияние состояния пероксидазного активного центра на шестую стадию представляется более вероятным, так как на этой стадии происходит окисление Туг радикалом PGG₂, и, поскольку Туг-385 находится непосредственно

вблизи гемовой группы, состояние гемовой группы может оказывать влияние на этот процесс [21]. Процессы, описываемые четвертой стадией, протекают без участия Туг и вдали от пероксидазного активного центра.

Мы наблюдали, что концентрация донора электронов существенно влияет на количественные параметры кислородных зависимостей циклооксигеназной реакции. Например, при концентрации кислорода 5–10 мкМ, что срав-

нимо с внутриклеточными концентрациями растворенного кислорода [8], скорость циклооксигеназной реакции в отсутствие донора электронов была в 6–8 раз меньше таковой 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Расчет скорости циклооксигеназной реакции для схемы 1 в стационарном состоянии:

$$\frac{[C_0]}{V_{COX}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}(k_6+k_{-5})}{k_1k_2k_3k_4k_5k_6} \frac{1}{[O_2]^2[AA]} + \frac{k_{-1}k_{-2}(k_4+k_{-3})}{k_1k_2k_3k_4} \frac{1}{[O_2][AA]} + \frac{k_{-3}k_{-4}(k_2+k_3)(k_6+k_{-5})}{k_2k_3k_4k_5k_6} \frac{1}{[O_2]^2} + \frac{k_2+k_{-1}}{k_1k_2} \frac{1}{[AA]} + \frac{k_5k_6(k_2+k_3)(k_4+k_{-3})+k_2k_3(k_{-4}+k_4)(k_6+k_{-5})}{k_2k_3k_4k_5k_6} \frac{1}{[O_2]} + \frac{k_4k_6+k_2k_6+k_2k_4}{k_2k_4k_6} \quad (П.1)$$

Если $k_{-2} = 0$ и $k_{-4} = 0$, тогда

$$\frac{[C_0]}{V_{COX}} = \frac{k_2+k_{-1}}{k_1k_2} \frac{1}{[AA]} + \left(\frac{k_4+k_{-3}}{k_3k_4} + \frac{k_6+k_{-5}}{k_5k_6} \right) \frac{1}{[O_2]} + \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_6} \quad (П.2)$$

Расчет скорости пероксидазной реакции для схемы 2 в стационарном состоянии:

$$\frac{P_0}{V_{PER}} = \frac{r_{-3}r_{-4}r_{-5}r_{-6}(r_2+r_{-1})}{r_1r_2r_3r_4r_5r_6} \frac{1}{[DH]^2[ROOH]} + \frac{r_{-3}r_{-4}(r_6+r_{-5})}{r_3r_4r_5r_6} \frac{1}{[DH]^2} + \frac{r_{-5}r_{-6}(r_{-4}+r_4)(r_2+r_{-1})}{r_1r_2r_4r_5r_6} \frac{1}{[DH][ROOH]} + \frac{r_5r_6(r_4+r_{-3})+r_3(r_{-4}+r_4)(r_6+r_{-5})}{r_3r_4r_5r_6} \frac{1}{[DH]} + \frac{(r_6+r_{-6})(r_2+r_{-1})}{r_1r_2r_6} \frac{1}{[ROOH]} + \frac{r_4r_6+r_2r_6+r_2r_4}{r_2r_4r_6} \quad (П.3)$$

Если $r_{-4} = 0$ и $r_{-6} = 0$, тогда

$$\frac{P_0}{V_{PER}} = \frac{r_5r_6(r_4+r_{-3})+r_3r_4(r_6+r_{-5})}{r_3r_4r_5r_6} \frac{1}{[DH]} + \frac{(r_2+r_{-1})}{r_1r_2} \frac{1}{[ROOH]} + \frac{1}{r_2} + \frac{1}{r_4} + \frac{1}{r_6} \quad (П.4)$$

Расчет $k_{4эф}$ (схема 3):

$$k_{4эф} = \frac{k_{41}[C_4P_1]+k_{42}[C_4P_2]+k_{43}[C_4P_3]+k_{44}[C_4P_4]+k_{45}[C_4P_5]+k_{46}[C_4P_6]}{[C_4P_0]} \quad (П.5)$$

$$[C_4P_0] = \sum_{i=1}^6 [C_4P_i] \quad (П.6)$$

$$k_{4эф} = \frac{k_{41}a[DH]+(k_{42}b+k_{44}d+k_{46}f)[ROOH][DH]+(k_{43}c+k_{45}e)[ROOH]}{a[DH]+(b+d+f)[ROOH][DH]+(c+e)[ROOH]} \quad (П.7)$$

$$a = r_3r_4r_5r_6(r_2+r_{-1}), \quad b = r_1r_3r_4r_5r_6,$$

$$c = r_1r_2r_5r_6(r_4+r_{-3}), \quad d = r_1r_2r_3r_5r_6, \quad (П.8)$$

$$e = r_1r_2r_3r_4(r_6+r_{-5}), \quad f = r_1r_2r_3r_4r_5.$$

Расчет скорости циклооксигеназной реакции для схемы 4 в стационарном состоянии:

$$\frac{[C_0]}{V_{COX}} = \frac{k_2+k_{-1}}{k_1k_2} \frac{1}{[AA]} + \left(\frac{k_{-3}}{k_3} \frac{1}{k_{4эф}} + \frac{1}{k_3} + \frac{k_6+k_{-5}}{k_5k_6} \right) \frac{1}{[O_2]} + \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_{4эф}} + \frac{1}{k_6} \quad (П.9)$$

Подставим выражение для $k_{4эф}$ (П.7) в (П.9) и преобразуем уравнение для скорости циклооксигеназной реакции к виду

$$\frac{C_0}{V_{COX}} = \frac{\eta}{[AA]} + \left(\theta + \frac{\rho}{[DH] + \mu} \right) \frac{1}{[O_2]} + \frac{\nu\rho}{[DH] + \mu} + \omega, \quad (П.10)$$

$$\eta = (k_2+k_{-1})/k_1k_2, \quad (П.11)$$

$$\theta = \frac{k_{-3}}{k_3} \frac{a+(b+d+f)[ROOH]}{k_{41}a+(k_{42}b+k_{44}d+k_{46}f)[ROOH]} + \frac{1}{k_3} + \frac{k_6+k_{-5}}{k_5k_6}, \quad (П.12)$$

$$\rho = \frac{k_{-3}}{k_3} \frac{(k_{43}c + k_{45}e)[\text{ROOH}]}{k_{41}a + (k_{42}b + k_{44}d + k_{46}f)[\text{ROOH}]}$$

$$\left[\frac{c + e}{k_{43}c + k_{45}e} - \frac{a + (b + d + f)[\text{ROOH}]}{k_{41}a + (k_{42}b + k_{44}d + k_{46}f)[\text{ROOH}]} \right], \quad (\text{П.13})$$

$$\mu = \frac{(k_{43}c + k_{45}e)[\text{ROOH}]}{k_{41}a + (k_{42}b + k_{44}d + k_{46}f)[\text{ROOH}]}, \quad (\text{П.14})$$

$$v = k_3/k_{-3}. \quad (\text{П.15})$$

$$\omega = \frac{a + (b + d + f)[\text{ROOH}]}{k_{41}a + (k_{42}b + k_{44}d + k_{46}f)[\text{ROOH}]} + \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_6}, \quad (\text{П.16})$$

где a, b, c, d, e, f выражаются через константы скоростей элементарной пероксидазной реакции (П.8).

Уравнение (П.10) можно преобразовать к виду

$$\frac{C_0}{V_{\text{COX}}} = \left(\theta + \frac{\rho}{[\text{DH}] + \mu} \right) \left(\frac{1}{[\text{O}_2]} + v \right) + \frac{\eta}{[\text{AA}]} + \omega - v\theta. \quad (\text{П.17})$$

При варьировании $[\text{DH}]$ это уравнение дает серию прямых в координатах $V_{\text{COX}}^{-1}([\text{O}_2]^{-1})$, пересекающихся в одной точке (ср. $y = p \cdot (x - x_0) + y_0$, где $p = (\theta + \rho / ([\text{DH}] + \mu))$, $x_0 = -v = -k_3/k_{-3}$, $y_0 = \eta/[\text{AA}] + \omega - v\theta$). Видно, что координаты точки пересечения (x_0, y_0) не зависят от $[\text{DH}]$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van der Donk, W.A., Tsai, A.L., and Kulmacz, R.J. (2002) *Biochemistry*, **41**, 15451–15458.
2. Kurumbail, R.G., Kiefer, J.R., and Marnett, L.J. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 752–760.
3. Vane J.R., Bakhle, Y.S., and Botting, R.M. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 97–120.
4. Vane, J.R., and Botting, R.M. (1997) *Semin. Arthritis Rheum.*, **26**, 2–10.
5. Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2629–2636.
6. Smith, W.L., and Marnett, L.J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1083**, 1–17.
7. Lands, W.E.M., Sauter, J., and Stone, G.W. (1978) *Biochem. Prostaglandins and Medicine*, **1**, 117–120.
8. Juranek, I., Suzuki, H., and Yamamoto, S. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1436**, 509–518.
9. Bakovic, M., and Dunford, H.B. (1994) *Biochemistry*, **33**, 6475–6482.
10. Kulmacz, R.J., Pendleton, R.B., and Lands, W.E.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 5527–5536.
11. Swinney, D.C., Mak, A.Y., Barnett, J., and Ramesha, C.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12393–12398.
12. Kulmacz, R.J., Pendleton, R.B., and Lands, W.E. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 5527–5536.
13. Вржеш П.В. (1999) *Биохимия*, **64**, 502–512.
14. Вржеш П.В. (2007) *Биохимия*, **72**.
15. Van der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H., and van Dorp, D.A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 315–331.
16. Mason, R.P., Kalyanaraman, B., Tainer, B.E., and Eling, T.E. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 5019–5022.
17. Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 313–320.
18. Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 321–328.
19. Falk, J.E. (1964) in *Porphyrins and Metalloporphyrins*, vol. 2, Elsevier Amsterdam, New York–London, p. 181.
20. Франк Г.М., Кондрашова М.Н., Мохова Е.Н., Ротенберг Ю.С. (1973) *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, Наука, Москва.
21. Garavito, R.M., and Mulichak, A.M. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 183–206.
22. Вржеш П.В. (1996) *Биохимия*, **61**, 2069–2083.
23. Vrzheschch, P.V., Batanova, E.A., Mevkh A.T., Varfolomeev, S.D., Gazaryan, I.G., and Thorneley, R.N.F. (2003) *Biochemical J.*, **372**, 713–724.
24. Wu, G., Vuletich, J.L., Kulmacz, R.J., Osawa, Y., and Tsai, A.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 19879–19888.
25. Цаплина Л.А., Каратасо Ю.О., Филимонов И.С., Вржеш П.В. (2006) *Биохимия*, **71**, 1534–1543.
26. Kulmacz, R.J., Tsai, A.-L., and Wei, C. (1995) *Biochemistry*, **34**, 8499–8512.
27. Vambai, B., and Kulmacz, R.J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 27608–27614.
28. Song, I., Ball, T.M., and Smith, W.L. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 869–875.
29. Eling, T.E., Glasgow, W.C., Curtis, J.F., Hubbard, W.C., and Handler, J.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 12348–12355.

**THE MOLECULAR OXYGEN (THE SUBSTRATE
OF A CYCLOOXYGENASE REACTION) IN THE KINETIC
MECHANISM OF THE BIFUNCTIONAL ENZYME
PROSTAGLANDIN H SYNTHASE**

I. S. Filimonov^{1, 2}, P. V. Vrzheshch^{1, 3}

¹ *Department of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia; fax: (495)939-4218, E-mail: peter@genebee.msu.ru*

² *N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygin 4, Moscow 117997, Russia; fax: (495)137-4101, E-mail: asp@sky.chph.ras.ru*

³ *International Research Centre for Biochemical Technology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia; fax: (495)939-502*

Received March 31, 2007

Revision received May 26, 2007

The molecular oxygen is the substrate of a cyclooxygenase reaction. This substrate takes part in one catalytic cycle twice. The deficiency of kinetic experimental data for oxygen resist of building the kinetic model for prostaglandin H synthase PGHS. We have determined the dependence of the cyclooxygenase reaction rate on the oxygen concentration: it is linear on double-reciprocal plots in case of the electron donor absence and presence; a slope is not depended on concentration of the arachidonic acid; a slope is depended on the concentration of an electron donor, all such lines have a common cross point in second quadrant. An additional increase of the cyclooxygenase reaction rate with the increase of the arachidonic acid concentration above 300 μM have been demonstrated. A bidimensional kinetic scheme was used as the model for PGHS functioning. This scheme may describe the simultaneously realization of cyclooxygenase and peroxidase enzymatic activities, and their mutual influence on each other, and their rate hierarchy.

Key words: prostaglandin-H-synthase, bifunctional enzyme, cyclooxygenase activity, kinetic mechanism, oxygen, arachidonic acid, adrenalin