

ISSN 0027-1403

**БЮЛЛЕТЕНЬ
МОСКОВСКОГО ОБЩЕСТВА
ИСПЫТАТЕЛЕЙ
ПРИРОДЫ**

**отдел
биологический**

**том 112
выпуск 1**

приложение № 1

2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

Хроника МОИП	3
Садчиков А.П. МЕЖДУНАРОДНОМУ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ ЦЕНТРУ – 20 ЛЕТ	6
Болдырев А.А. 20 ЛЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ КАРНОЗИНА В МБЦ МГУ	9
Арзуманян Е.С. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГОМОЦИСТЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСМОТИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ	15
Багаутдинов И.И. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ КАРНОЗИНА В РОССИИ	17
Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н., Татарина Н.Ю. ОКИСЛЕНИЕ СУЛЬФИДА ФОТОТРОФНОЙ БАКТЕРИЕЙ ESTOTHIORHODOSPIRA SHAROSHNIKOVII	23
Зинченко В.В., Белавина Н.В., Глазер В.М., Женавчук О.Ф., Кряжов С.В., Лучкин П.В., Паничкин В.Б. СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА НА ИЗМЕНЕНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ У ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>SYNECHOCYSTIS</i> SP. PCC 6803	30
Казаков Л.К., Маторин Д.Н., Алексеев А.А. ЛАНДШАФТНОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ БИОИНДИКАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ СОСТОЯНИЯ И ДИНАМИКИ ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМ В ЗОНАХ ХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ	37
Кирик И.А., До Т.Т., Жаворонков А.А., Бабыкин М.М. ОПЕРОН <i>prqR-prqA</i> ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, КОНТРОЛИРУЮЩИЙ УСТОЙЧИВОСТЬ К ИНДУКТОРУ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА МЕТИЛВИОЛОГЕНУ, ВОВЛЕЧЕН В АДАПТАЦИЮ КЛЕТОК К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ	41
Козлов О.В., Садчиков А.П. СТРАТЕГИЯ РАЗВИТИЯ ПРОМЫСЛА РАКООБРАЗНЫХ В МАЛЫХ ОЗЕРАХ ИШИМСКОЙ РАВНИНЫ	48
Кислых В.В., Дариенко А.Е. ПОЛУЧЕНИЕ КОАГУЛЯНТА ИЗ ПРИРОДНЫХ АЛЮМОСИЛИКАТОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД	55
Лысак Л.В., Лапыгина Е.В., Бакулина Е.А., Звягинцев Д.Г. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ ПОСЛЕ ШОКОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ	63
Маторин Д.Н., Осипов В.А., Алексеев А.А., Ващанов Г.А. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ	67

Михеева Л.Е., Карбышева Е.А., Шестаков С.В. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ФОТОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА	70
Новокрещенова М.Г., Солдатов О.П., Ежова Т.А. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНА <i>NFZ24</i> , КОНТРОЛИРУЮЩЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ	74
Пикуленко М.М., Булычев А.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ГЕНЕРАЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ В МЕМБРАНАХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ	80
Рябов В.Б., Кондратьева И.А., Смуров А.В., Смурова Т.Г., Румак В.С., Хуонг Д.Т. ИММУННЫЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ГИДРОБИОНТОВ ЗАЛИВА НЯЧАНГ (ВЬЕТНАМ) ИЗ РАЙОНОВ С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ.	85
Савицкая И.С. МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС КИШЕЧНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ	96
Симонов В.С., Кулемяков С.Н. ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕЗИМОВКИ НЕКОТОРЫХ ФОРМ СЛИВЫ В МОСКОВСКОЙ И ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТЯХ В 2005-2006 гг.	100
Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Беляев М.С., Степанова М.С., Булыгина Е.Р., Тюлина О.В., Болдырев А.А. КАРНОЗИН: НОВЕЙШАЯ ИСТОРИЯ ДАВНО ИЗВЕСТНОГО ВЕЩЕСТВА	107
Столба Н.В., Хомяков Д.М. ПОЧВЕННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОГОЛОЛЕДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ	124
Траоре В., Глазер В.М., Костромина Н.В., Котелевцев С.В. АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ МУТАГЕННЫХ И КАНЦЕРОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКОСИСТЕМЕ РЕКИ НИГЕР В РАЙОНЕ БОМАКО (МАЛИ) С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА ЭЙМСА	127
Тыныбаева Т.Г., Кураков А.В. МОНИТОРИНГ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СОСОВЫХ СОЛОНЧАКОВ И НАСЫПНЫХ ГРУНТОВ ПЛОЩАДОК С ОБОРУДОВАНИЕМ НА ГАЗО-НЕФТЯНОМ МЕСТОРОЖДЕНИИ СЕВЕРНЫЕ БУЗАЧИ (КАЗАХСТАН)	129
Уланова А.Ю., Ильяш Л.В., Осипов В.А., Маторин Д.Н., Рубин А.Б. ДИНАМИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПАРАМЕТРОВ МОРСКИХ ПЛАНКТОННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ <i>Tetraselmis</i> <i>viridis</i> , <i>Thalassiosira weissflogii</i> и <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> ПРИ	

АССИМИЛЯЦИИ МИНЕРАЛЬНЫХ И ОРГАНИЧЕСКИХ ФОРМ АЗОТА	140
Умаров М.М. АЗОТФИКСАЦИЯ В БИОСФЕРЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ДИАЗОТРОФОВ	150
Филимонов И.С., Цаплина Л.А., Вржеш П. В. ОБОБЩЕННАЯ МОДЕЛЬ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ С УЧЕТОМ ИЕРАРХИИ БЫСТРЫХ И МЕДЛЕННЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КИСЛОРОД В КИНЕТИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ	155
Хайдарова Н.В., Слепцова Л.А., Родригес-Бланко А.В., Дичева М.А., Сесина Н.И., Андреева Л.Е. ВЬЮН <i>Misgurnus fossilis</i> L. КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ С РАЗЛИЧНЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ	184
Цветкова Е.А., Куликова Н.А., Каршук Л.А., Перминова И.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛКОКСИСИЛИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ГРУНТОВЫХ ВОД ОТ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ	188
Черткова З.А., Карагодина В.П., Глазер В.М., Костромина Н.В. Полякова О.В., Котелевцев С.В. АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ (ЛИПИДЫ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И РЫБ)	194
Шпилев А.В., Глазер В.М., Белафина Н.В., Гримм Б., Локштейн Х., Зинченко В.В. РОЛЬ ФИТИЛЬНОЙ ЦЕПИ МОЛЕКУЛЫ ХЛОРОФИЛЛА <i>a</i> В СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ АППАРАТА ФОТОСИНТЕЗА	200
Оглавление	209

**ОБОБЩЕННАЯ МОДЕЛЬ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ФЕРМЕНТОВ С УЧЕТОМ ИЕРАРХИИ БЫСТРЫХ И
МЕДЛЕННЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ:
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КИСЛОРОД В КИНЕТИЧЕСКОМ
МЕХАНИЗМЕ ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ**

Филимонов И.С., Цаплина Л.А., Вржещ П. В.
Международный биотехнологический центр МГУ им. М.В.
Ломоносова 119992 Москва; peter@genebee.msu.ru

ВВЕДЕНИЕ

В природе бифункциональные (полифункциональные) ферменты возникают, по-видимому, в ходе эволюции путем объединения генов, кодирующих функционально тесно связанные ферменты [48,39]. Бифункциональные ферменты и бифункциональные ферментные комплексы содержат как минимум два активных центра и катализируют, как правило, две последовательные реакции [31,22]. Эти особенности потенциально позволяют бифункциональным ферментам проявлять ряд новых специфических свойств. Во-первых, это возможный дрейф интермедиата (продукт первой реакции, он же субстрат второй реакции) между двумя активными центрами, без выхода интермедиата в раствор [22,34,36]. Во вторых, состояние активного центра первой реакции может влиять на кинетические свойства активного центра второй реакции, и наоборот, состояние активного центра второй реакции может влиять на кинетические свойства активного центра первой реакции [31,22]. Для ферментов тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы из *L. major* [31], тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы из *T. gondii* [42], триптофансинтазы из *S. typhimurium* [38], диметилглицин оксидазы из *A. globiformis* [30] установлено наличие эффекта дрейфа интермедиата, в то время как для

таких ферментов, как тимидилатсинтаза-дигидрофолатредуктаза из *C. hominis* [11], ацетилтрансфераза-уридилтрансфераза из *E. coli* [21] такой дрейф отсутствует. Для ферментов тимидилатсинтаза-дигидрофолатредуктаза из *L. major* [31], карбамоилфосфатсинтетазы из *E. coli* [35], глутамин фосфорибозилпирофосфат амидотрансфераза из *E. coli* [26] показан эффект влияния протекания одной реакции на кинетику другой реакции, в то же время как для ферментов тимидилатсинтаза-дигидрофолатредуктаза из *C. hominis* [11] и из *T. gondii* [23] такое влияние не обнаружено.

Заслуживает также внимания сообщение [18] о преимущественной конверсии эндогенного интермедиата (простагландина G₂) микросомальным бифункциональным ферментом простагландин-Н-синтазой и исчезновении этого эффекта в случае применения очищенного фермента.

Указанные особенности кинетического поведения бифункциональных ферментов должны иметь адекватное кинетическое описание. Попытки описать кинетические особенности бифункциональных ферментов предпринимались неоднократно. В работах [16,17] решалась проблема описания величин лаг-периода и концентрации промежуточных продуктов при протекании последовательных реакций, катализируемых бифункциональными ферментами и дискриминации механизмов, включающих дрейф интермедиата между активными центрами. В работах [31,23,32] проводилось кинетическое описание работы бифункционального фермента тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы в случае, когда протекание одной реакции влияет на кинетику другой реакции. В работах [12,27] предпринимались попытки описания кинетических закономерностей бифункционального фермента простагландин Н-синтазы. Следует отметить, что во всех указанных случаях при кинетическом описании не принимался во внимание факт независимого одновременного протекания двух катализируемых бифункциональным ферментом реакций, а рассматривались по сути модифицированные «одномерные» кинетические модели. Такое рассмотрение абсолютно не адекватно, так как наличие двух активных центров предусматривает независимое протекание двух реакций, что приводит к необходимости в кинетических схемах одновременно учитывать состояние первого и второго активного центра, и, как следствие, интермедиаты в кинетических схемах должны характеризоваться двумя индексами (по одному индексу для определения состояния каждого активного центра). Учет независимого изменения величин двух индексов превращает кинетические схемы в «двумерные». Ранее в работе [5] нами было рассмотрено стационарное приближение для обобщенных моделей многосубстратного бифункционального фермента, включая и

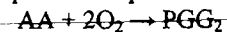
двумерную схему. Показано, что выражения для скорости ферментативных реакций в этом случае являются сложными зависимостями от концентраций субстратов и продуктов катализируемых реакций, что должно приводить к существенному отклонению от часто встречающихся на практике гиперболических зависимостей типа уравнения Михаэлиса-Ментен. Проблема чрезмерно сложных кинетических выражений является общей для ферментативной кинетики [2,7,13]. Практика показывает, что учет иерархии скоростей частных реакций позволяет в ряде случаев существенно упрощать системы уравнений и получать хорошо согласующиеся с экспериментом кинетические выражения. Это относится к нашедшему свое обоснование в теореме Тихонова [8] широко распространенному квазистационарному приближению в химической кинетике (т.н. принцип стационарности Боденштейна), а также к квазиравновесному приближению в ферментативной кинетике [13].

Задача данной работы – рассмотреть обобщенную кинетическую двумерную модель бифункционального фермента [5] и определить условия, при которых наличие иерархии быстрых и медленных каталитических циклов позволяет двумерную модель редуцировать до одномерных циклических схем, анализ которых проведен в работах [6,3,4,47].

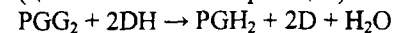
Мы применили результаты данной теории на практике, для реального объекта – фермента простагландин-Н-синтазы.

Фермент простагландин Н-синтаза (PGHS, К.Ф.1.14.99.1) осуществляет первый этап в биосинтезе всех простагландинов, а также тромбксана и простаглицлина, катализируя превращение молекулы арахидоновой кислоты в простагландин H₂. Простагландины – модуляторы сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной, почечной и репродуктивной систем, они являются медиаторами боли, воспаления, повышения температуры, аллергии, и поэтому фермент, катализирующий их биосинтез, представляет собой исключительно важную фармакологическую мишень [43,28]. Терапевтический эффект всех нестероидных противовоспалительных средств обусловлен ингибированием PGHS [45,46].

PGHS – бифункциональный фермент, он катализирует 2 реакции – циклооксигеназное окисление арахидоновой кислоты двумя молекулами кислорода с образованием PGG₂ и пероксидазное восстановление перекисной группы PGG₂ в присутствии донора электронов с образованием PGH₂ [37]:



(циклооксигеназная реакция)



(пероксидазная реакция)

Обе реакции идут на одной молекуле белка на двух близко расположенных активных центрах. Обе реакции гемзависимы и сопровождаются необратимой инактивацией фермента в процессе реакции [40].

Наряду с арахидоновой кислотой в циклооксигеназной реакции принимают участие две молекулы кислорода. Между тем работ, посвященных исследованию влияния концентрации этого субстрата на ферментативную реакцию практически нет. В работе [29] была оценена константа Михаэлиса циклооксигеназной реакции по кислороду (5 мкМ). Судя по результатам [29], значение этой величины не зависело от концентрации арахидоновой кислоты. В работе [24] проведено исследование чувствительности конверсии меченой арахидоновой кислоты в PGH₂ за 1 минуту к концентрации растворенного кислорода, на основании чего авторы приводят оценку константы Михаэлиса (10 мкМ).

Характерными особенностями представленных в данной статье экспериментальных результатов являются относительная простота полученных зависимостей скорости циклооксигеназной реакции от концентрации субстратов и сохранение качественного вида этих зависимостей, как в присутствии донора электронов (субстрата пероксидазной реакции), так и в отсутствие донора электронов. Подобные результаты могут быть получены на основе двухмерной схемы [5] при учете иерархии скоростей отдельных элементарных реакций, составляющих реакционный механизм.

Применение теоретических результатов для фермента PGHS позволило нам редуцировать общую двухмерную схему действия бифункционального фермента, упростить теоретические выражения для скоростей ферментативной реакции и описать такие явления, как 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 (субстрата пероксидазной реакции) и ряд других экспериментальных фактов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трис(гидроксиметил)метиламин, твин-20, L-адреналин, диэтилдитиокарбамат были приобретены в MP Biomedicals Inc. (ФРГ), ферроцианид - в Merck (ФРГ), арахидоновая кислота, гемин, перекись водорода были приобретены в Sigma-Aldrich (США). Остальные реактивы высокой степени чистоты были произведены в России.

Фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS) в виде солубилизованного препарата выделяли из микросом семенных

пузырьков (везикулярных желез) барана (полученных с племзавода "Русь") по методу, описанному в работе [44] с незначительными изменениями. Препарат фермента находился в следующем буферном растворе: трис-HCl, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДЭДТК, 1% по объему твин-20 (т.е. в 1000 мл буферного раствора содержится 10 мл твин-20).

Во всех экспериментах по измерению циклооксигеназной активности фермента использовали стандартный буферный раствор: 50 мМ трис HCl, pH=8.0, 0.1% по объему твин-20, использование которого является обычным при исследовании кинетики PGHS [33,25,15]. Ферментативную реакцию проводили в термостатируемой полярографической ячейке при температуре 25°C. В буферный раствор добавляли реагенты, реакцию инициировали добавлением фермента. Раствор арахидоновой кислоты (10 - 150 мМ) готовили и добавляли 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 буфере. Раствор гемина готовили по навеске, растворяя ее в небольшом количестве 0,1 М NaOH, затем разводили в 20 раз стандартным буферным раствором. Для определения концентрации аликвоту этого раствора смешивали с 20% пиридином в 0,1 М NaOH с добавлением дитионита натрия. Концентрацию гемина определяли спектрофотометрически, используя известные коэффициенты экстинкции для восстановленного комплекса гемина с пиридином [19].

За протеканием циклооксигеназной реакции наблюдали амперометрически по изменению концентрации растворенного кислорода с использованием анализатора кислорода «Экотест-120/АТС» (ООО НПП «Эконикс», Россия), снабженным газодиффузионным платино-серебряным электродом Кларка [9]. Этот метод наблюдения позволяет снимать полную кинетическую кривую в реальном времени. Объем реакционной смеси составлял 3,3 мл, объем добавляемого раствора фермента (с концентрацией белка 4,5 мг/мл) составлял 10 мкл.

Для создания 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).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

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

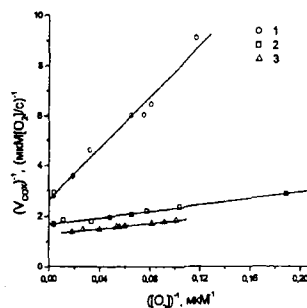


Рис.1. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах. Стандартный буферный раствор, [гемин]=2 мкМ, [AA]=33 мкМ. Без добавления донора электронов (1), ферроцианид 1мМ (2), адреналин 1мМ (3). Сплошные линии – линейная аппроксимация экспериментальных данных.

Следует отметить, что наличие в реакционной смеси донора электронов влияет на наклон прямой, на константу Михаэлиса, и на максимальную скорость циклооксигеназной реакции (рис.1), хотя донор электронов не принимает непосредственного участия в циклооксигеназной реакции, а принимает участие 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 варьировали концентрацию двух субстратов циклооксигеназной реакции (кислорода и арахидоновой кислоты). Подобные эксперименты были проведены в

отсутствие в среде донора электронов, при наличии в среде органического донора электронов (адреналин), а также при наличии в среде неорганического донора электронов (ферроцианид). 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).

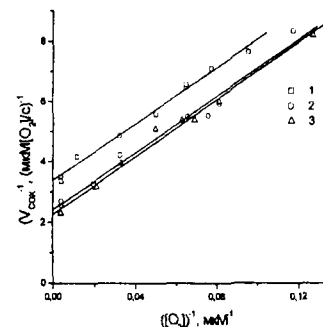


Рис.2. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах в отсутствие донора электронов, при разных концентрациях AA. Стандартный буферный раствор, [гемин]=2мкМ, в отсутствие донора электронов, [AA]=10 мкМ (1), [AA]=33 мкМ (2), [AA]=100 мкМ (3). Сплошные линии – линейная аппроксимация экспериментальных данных.

Присутствие в среде ферроцианида, неорганического донора электронов, повлияло на наклон прямых, но параллельность сохранилась (рис.3).

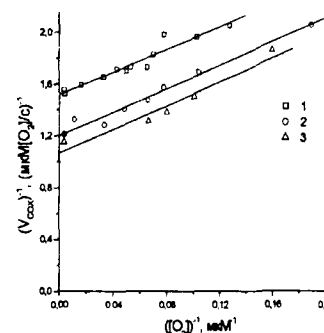


Рис.3. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах в присутствии донора электронов (ферроцианида), при разных концентрациях AA. Стандартный буферный раствор, [гемин]=2мкМ, [ферроцианид]=1мМ, [AA]=10 мкМ (1), [AA]=33 мкМ (2), [AA]=100 мкМ (3). Сплошные линии – линейная аппроксимация экспериментальных данных.

Аналогичные эксперименты с использованием 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 (около 5% от максимального значения скорости), но воспроизводимое отклонение от линейности (рис.4), при этом постоянной остается расстояние между кривыми. Максимальное значение скорости достигается при 50 мкМ кислорода.

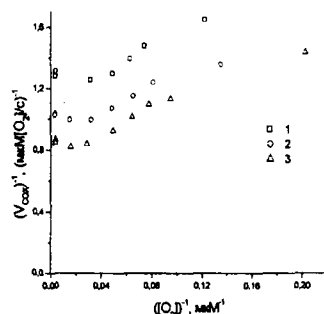


Рис.4. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах в присутствии донора электронов (адреналина), при разных концентрациях АА. Стандартный буферный раствор, [гемин]=2 мкМ, [адреналин]=1 мМ, [АА]=10 мкМ (1), [АА]=33 мкМ (2), [АА]=100 мкМ (3).

Однако в присутствии ферроцианида и в отсутствие донора электронов подобные отклонения не наблюдались. Видимо, такое отклонение от линейности связано со свойствами адреналина и не является характерной особенностью зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода.

Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода при разных концентрациях донора электронов (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.5. Линейная аппроксимация экспериментальных данных дает серию прямых, пересекающихся в одной точке во втором квадранте.

Отклонение от линейности в двойных обратных, которое заметно при концентрации донора электронов (адреналина), равной 1 мМ (рис.4), явно уменьшается с понижением концентрации адреналина (рис.5).

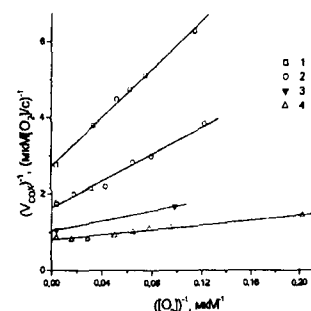


Рис.5. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах, при разных концентрациях донора электронов (адреналина). Стандартный буферный раствор, [гемин]=2 мкМ, [АА]=100 мкМ, [адреналин]=0 мкМ (1), [адреналин]=30 мкМ (2), [адреналин]=200 мкМ (3), [адреналин]=1000 мкМ (4). Сплошные линии – линейная аппроксимация экспериментальных данных.

Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты в присутствии и в отсутствие донора электронов. На рис.6 приведены зависимости скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах. Заметное отклонение от линейности наблюдается как в области низких (данные не приведены), так и в области высоких концентраций, и свидетельствует о сложной кинетике реакции. Подобные результаты мы наблюдаем как в присутствии донора электронов, так и в отсутствие донора электронов, причем разница между кривыми оставалась постоянной в области концентраций от 10 мкМ до 300 мкМ арахидоновой кислоты (рис.6).

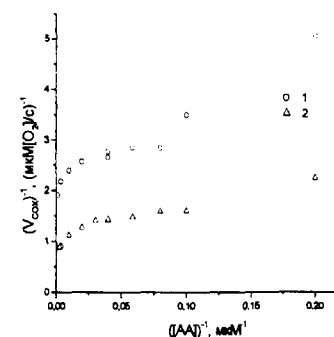
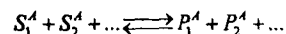


Рис.6. Зависимость скорости циклооксигеназной реакции в присутствии и в отсутствие донора электронов от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах. Стандартный буферный раствор, [гемин]=2 мкМ, [О₂]=260 мкМ, [адреналин]=0 мкМ (1), [адреналин]=1000 мкМ (2).

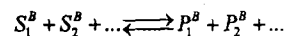
Описание двумерной кинетической модели бифункционального фермента в общем виде

Рассмотрим механизм действия бифункционального фермента [5] в общем виде. Такое рассмотрение, несмотря на некоторую громоздкость, имеет свои преимущества, так как априори нельзя точно сказать, сколько и каких различных промежуточных фермент-субстратных комплексов имеется в механизме действия того или иного фермента.

Пусть бифункциональный фермент E катализирует две реакции, реакцию A :

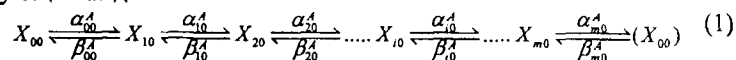


и реакцию B :



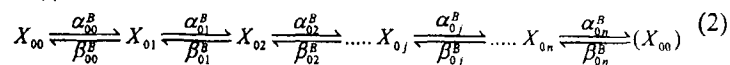
где S_i^A и P_i^A - субстраты и продукты реакции A , соответственно, S_i^B и P_i^B - субстраты и продукты реакции B , соответственно. Один из продуктов катализируемой бифункциональным ферментом E реакции A может являться субстратом реакции B . В данной работе рассматривается случай, когда бифункциональный фермент E имеет два активных центра (на которых осуществляется катализ реакций A и B), причем реакции A и B могут протекать независимо. Возникающие в ходе катализа промежуточные формы бифункционального фермента E будем обозначать символами X_{ij} , в которых первый индекс отражает состояние активного центра реакции A , а второй индекс отражает состояние активного центра реакции B .

Предусматривается, что реакции A и B протекают по одномолекулярным механизмам. Механизм реакции A в отсутствие компонентов (т.е. субстратов и продуктов) реакции B будет иметь тогда следующий вид:



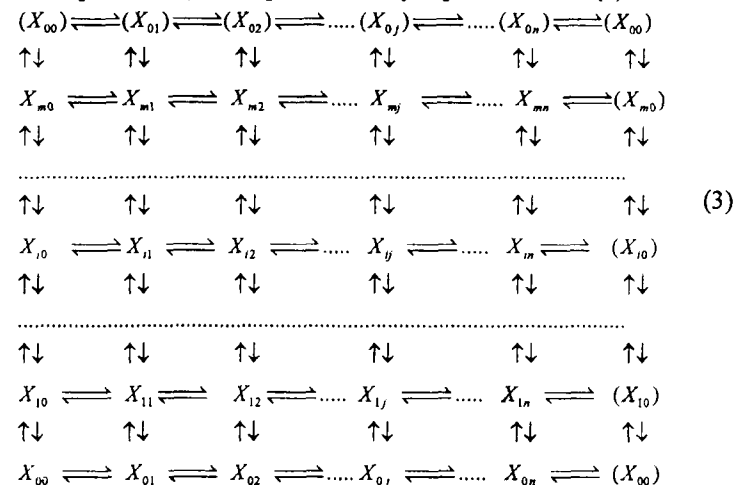
В данной записи состоянию активного центра реакции B присвоен индекс 0 (численное значение этого индекса не принципиально, принципиально то, что этот индекс не изменяется).

Механизм реакции B в отсутствие компонентов реакции A будет иметь вид:

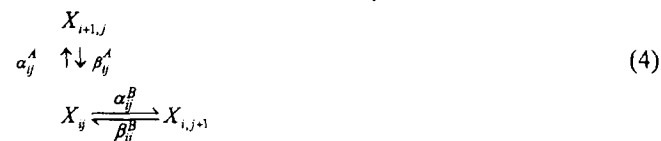


В данной записи неизменному состоянию активного центра реакции A присвоен индекс 0. При совместном присутствии

компонентов реакций A и компонентов реакции B обе реакции (реакция A и реакция B) будут протекать одновременно, и суммарный механизм процесса будет отражаться двумерной схемой (3):



Предусматривается, что в результате завершения цикла в вертикальном направлении происходит 1 оборот реакции A , в результате завершения цикла в горизонтальном направлении происходит 1 оборот реакции B . Направлением реакции считается движение в сторону увеличения значений подстрочных индексов. Очевидно, что при таком определении ни одна из констант скорости α не равна нулю, в то время как некоторые из констант скорости β могут принимать нулевые значения. Обозначения констант скорости реакции (3) (на примере промежуточной формы X_{ij}) следующие:



Рассмотрим кинетику реакций, протекающих в соответствии с механизмом (3), в случае установления стационарного состояния по промежуточным формам фермента. Анализ стационарного состояния кинетической схемы (3) может быть существенно облегчен за счет применения теории графов, центральным понятием которой является граф - совокупность точек (вершин) и соединяющих их линий (ветвей) [1]. Здесь под вершинами подразумеваются промежуточные интермедиаты X_{ij} , а каждая ветвь графа отражает элементарную химическую реакцию, и этой ветви приписывается численное значение,

равное константе скорости первого (псевдопервого) порядка для соответствующей химической реакции. В нашем случае это α_{ij}^A , β_{ij}^A , α_{ij}^B , β_{ij}^B . Для анализа кинетических схем с помощью теории графов вводится понятие базового дерева. Для любой произвольной вершины графа X_{ij} (назовем ее базой) совокупность ветвей, проходящих через все вершины графа (за исключением X_{ij}) и направленных к базе, составляет базовое дерево. Базовое дерево не содержит циклов. Величина базового дерева равна произведению величин ветвей, составляющих это базовое дерево. Базовый определитель определяется как совокупность всех базовых деревьев данной базы, величина базового определителя (D_{ij}) равна сумме величин всех базовых деревьев данной базы X_{ij} . Важным свойством базового дерева, вытекающим из определения базового дерева, является то, что каждое базовое дерево содержит ровно по одной ветви, выходящей из каждой вершины графа (за исключением, разумеется, вершины, которая является базой). Соотношение стационарных концентраций любых промежуточных форм фермента X_{ij} и X_{0j} равно соотношению величин соответствующих базовых определителей D_{ij} и D_{0j} [1]:

$$\frac{[X_{ij}]}{[X_{0j}]} = \frac{D_{ij}}{D_{0j}} \quad (5)$$

и, соответственно, стационарная концентрация любой промежуточной формы фермента, X_{ij} , будет равна:

$$[X_{ij}] = E_0 \frac{D_{ij}}{\sum_j \sum_i D_{ij}}, \quad (6)$$

где E_0 - общая концентрация фермента (сумма концентраций всех промежуточных форм фермента E).

Стационарные скорости реакции A (v^A) и реакции B (v^B) для механизма (3) могут быть записаны следующим образом:

$$v^A = \sum_j (\alpha_{mj}^A [X_{mj}] - \beta_{mj}^A [X_{0j}]) \quad (7)$$

$$v^B = \sum_i (\alpha_{in}^B [X_{in}] - \beta_{in}^B [X_{0i}]) \quad (8)$$

Или, пользуясь понятиями теории графов и уравнением (6):

$$v^A = E_0 \frac{\sum_j (\alpha_{mj}^A D_{mj} - \beta_{mj}^A D_{0j})}{\sum_j \sum_i D_{ij}} \quad (9)$$

$$v^B = E_0 \frac{\sum_i (\alpha_{in}^B D_{in} - \beta_{in}^B D_{0i})}{\sum_j \sum_i D_{ij}} \quad (10)$$

Пусть субстрат реакции A (S^A) взаимодействует со всеми промежуточными формами фермента E_{ij} , где k - фиксировано

($0 \leq k \leq m$), а j пробегает все значения $0 \leq j \leq n$, субстрат реакции B (S^B) взаимодействует со всеми промежуточными формами фермента E_{il} , где l - фиксировано ($0 \leq l \leq n$), а i пробегает все значения $0 \leq i \leq m$. Это означает, что в отсутствие компонентов реакции B субстрат реакции A (S^A) принимает участие в каталитическом цикле 1 раз, взаимодействуя с единственной промежуточной формой фермента E_{00} . В присутствии компонентов реакции B субстрат реакции A (S^A) взаимодействует в каталитическом цикле с $(n+1)$ промежуточными формами фермента E_{ij} , $0 \leq j \leq n$. В отсутствие компонентов реакции A субстрат реакции B (S^B) принимает участие в каталитическом цикле 1 раз, взаимодействуя с единственной промежуточной формой фермента E_{0i} , в присутствии компонентов реакции A субстрат реакции B (S^B) взаимодействует в каталитическом цикле с $(m+1)$ промежуточными формами фермента E_{il} , $0 \leq i \leq m$.

Чтобы составить представление о характере зависимости скоростей реакций A и B от концентрации субстратов, рассмотрим частный случай, когда реакции A и B протекают необратимо. Отсутствие обратной реакции может достигаться, например, при отсутствии в реакционной среде одного из продуктов прямой реакции. Необратимость предусматривает равенство нулю по меньшей мере 1 константы скорости обратной реакции в ферментативном механизме. Для определенности пусть $\beta_{mj}^A = 0$ для всех $0 \leq j \leq n$, $\beta_{in}^B = 0$ для всех $0 \leq i \leq m$.

В этом случае в отсутствие компонентов реакции B стационарная скорость ферментативной реакции A (v^A) как функция концентрации S^A представляет собой простую гиперболу:

$$v^A = \frac{a^A [S^A]}{b^A + [S^A]}, \quad (11)$$

а в отсутствие компонентов реакции A стационарная скорость ферментативной реакции B (v^B) как функция концентрации S^B также представляет собой простую гиперболу:

$$v^B = \frac{a^B [S^B]}{b^B + [S^B]} \quad (12)$$

Это справедливо, постольку в отсутствие компонентов альтернативной реакции механизмы реакций A и B представляют собой одномолекулярные механизмы необратимой ферментативной реакции [4].

В случае одновременного присутствия в реакционной смеси всех компонентов реакции A и всех компонентов реакции B целесообразно рассмотреть 2 крайних случая:

а) протекание одной реакции не меняет величину кинетических констант другой реакции, т.е. для реакции А справедливо:

$$\alpha_{ij}^A = \alpha_{ij}^A \quad (13)$$

$$\beta_{ij}^A = \beta_{ij}^A$$

для всех $0 \leq i \leq m, 0 \leq j \leq n,$

для реакции В справедливо:

$$\alpha_{ij}^B = \alpha_{ij}^B \quad (14)$$

$$\beta_{ij}^B = \beta_{ij}^B$$

для всех $0 \leq i \leq n, 0 \leq j \leq m,$

В этом случае реакции А и В протекают строго независимо, кинетика протекания этих реакций формально описывается в рамках механизмов (1) и (2), зависимости v^A и v^B от концентраций субстратов S^A и S^B имеют вид (11) и (12) соответственно, v^A не зависит от концентрации S^B , v^B не зависит от концентрации S^A .

б) протекание одной реакции меняет величину кинетических констант для другой реакции, т.е. условия (13) и (14) нарушаются.

В этом случае зависимости v^A и v^B от концентраций субстратов S^A и S^B имеют вид дробно-рациональных функций:

$$v^A = \frac{c_1[S^A] + c_2[S^A]^2 + \dots + c_{n+1}[S^A]^{n+1}}{d_0 + d_1[S^A] + d_2[S^A]^2 + \dots + d_{n+1}[S^A]^{n+1}} \quad (15)$$

$$v^B = \frac{e_0 + e_1[S^A] + e_2[S^A]^2 + \dots + e_{n+1}[S^A]^{n+1}}{d_0 + d_1[S^A] + d_2[S^A]^2 + \dots + d_{n+1}[S^A]^{n+1}} \quad (16)$$

$$v^B = \frac{f_1[S^B] + f_2[S^B]^2 + \dots + f_{m+1}[S^B]^{m+1}}{g_0 + g_1[S^B] + g_2[S^B]^2 + \dots + g_{m+1}[S^B]^{m+1}} \quad (17)$$

$$v^A = \frac{h_0 + h_1[S^B] + h_2[S^B]^2 + \dots + h_{m+1}[S^B]^{m+1}}{g_0 + g_1[S^B] + g_2[S^B]^2 + \dots + g_{m+1}[S^B]^{m+1}} \quad (18)$$

В уравнениях (15-18) положительные параметры c_i ($1 \leq i \leq n+1$), d_i , e_i ($0 \leq i \leq n+1$) зависят от концентрации S^B , положительные параметры f_i ($1 \leq i \leq m+1$), g_i , h_i ($0 \leq i \leq m+1$) зависят от концентрации S^A .

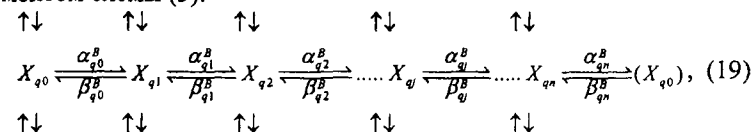
Таким образом, реализация случая б) проявляется в отклонении от гиперболичности скорости ферментативной реакции в случае присутствия в реакционной среде компонентов альтернативной реакции, а также в появлении зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата альтернативной реакции.

Бифункциональные ферменты обычно катализируют сложные многосубстратные реакции, механизмы которых содержат большое количество различных промежуточных форм фермента, см. например [22,36]. Вследствие этого зависимости скорости от концентрации

субстратов (уравнения (15-18)) должны представлять собой сложные дробно-рациональные функции с высокими значениями m и n . Но на практике получаемые в эксперименте зависимости намного проще и зачастую описываются в рамках уравнения Михаэлиса-Ментен даже для тех бифункциональных ферментов, кинетика действия которых характеризуется взаимным влиянием реакций друг на друга [26] (т.е. реализуется рассмотренный выше случай б)). Здесь мы сталкиваемся с общей для кинетики, в том числе ферментативной кинетики, проблемой, когда теоретические зависимости неоправданно сложны, и практика требует введения разумных упрощений. Как указывалось выше, существенный прогресс в этом плане достигался при учете иерархии скоростей отдельных элементарных реакций, составляющих реакционный механизм (квазистационарное приближение в химической кинетике, квазиравновесное приближение в ферментативной кинетике). Имеет смысл проанализировать, позволит ли упростить используемые кинетические схемы факт наличия иерархии скоростей элементарных реакций в механизме действия бифункционального фермента.

Учет иерархии быстрых и медленных циклов

Допустим, что один из циклов реакции В, представленный фрагментом схемы (3):



является быстрым. Вполне оправданным чисто качественным интуитивным представлением о быстром цикле будет являться представление о том, что реакции в этом цикле быстрые по отношению к остальным реакциям, и соотношение концентраций интермедиатов в быстром цикле не зависит от концентраций альтернативной реакции. Анализ уравнений (9-10) показывает, что продуктивными будут следующие строгие и количественные определения «быстрого» и «обратно-быстрого» циклов:

Цикл (19) является «быстрым», если для положительного, но по возможности малого по величине числа ε справедлив следующий набор неравенств для всех $0 \leq j \leq n$:

$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)}{\alpha_{qj}^B} \leq \varepsilon$ $\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)\beta_{qj}^B}{\alpha_{qj}^B \alpha_{q,j+1}^A} \leq \varepsilon$ 	(20)
---	------

$$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A) \beta_{qj}^B \beta_{q,j+1}^B \dots \beta_{q,j+k-2}^B}{\alpha_{qj}^B \alpha_{q,j+1}^B \dots \alpha_{q,j+k-1}^B} \leq \varepsilon,$$

$$\dots$$

$$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A) \beta_{qj}^B \beta_{q,j+1}^B \dots \beta_{q,j-3}^B}{\alpha_{qj}^B \alpha_{q,j+1}^B \dots \alpha_{q,j-2}^B} \leq \varepsilon$$

где $1 \leq k \leq n$, причем, поскольку второй подстрочный индекс пробегает значения от 0 до n , справедливо следующее: $j+k = j+k-n-1$ если $j+k > n$.

Цикл (19) является «обратимо-быстрым», если наряду с набором неравенств (20) выполняются также неравенства (21):

$$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A) \alpha_{q,j-1}^B \alpha_{q,j-2}^B \dots \alpha_{q,j+2}^B}{\beta_{q,j+1}^B \beta_{q,j+2}^B \dots \beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon$$

$$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A) \alpha_{q,j-1}^B \alpha_{q,j-2}^B \dots \alpha_{q,j+3}^B}{\beta_{q,j+2}^B \beta_{q,j+3}^B \dots \beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon$$

$$\dots$$

$$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A) \alpha_{q,j-1}^B \alpha_{q,j-2}^B \dots \alpha_{q,j+k+1}^B}{\beta_{q,j+k}^B \beta_{q,j+k+1}^B \dots \beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon$$

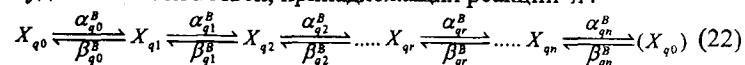
$$\dots$$

$$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)}{\beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon,$$
(21)

где j, k и ε имеют тот же смысл, что и в (20).

Разумеется, значение величины ε является количественным критерием «быстроты» цикла – чем меньше ε , тем «быстрее» цикл.

Для удобства дальнейших рассуждений рассмотрим новый отдельный цикл V_q (22), который формально получается из цикла (19) путем удаления всех ветвей, принадлежащих реакции A :



Цикл V_q (22) представляет собой схему одномолекулярной реакции B , катализируемой ферментом E , в котором состояние активного центра реакции A соответствует индексу q . Любую совокупность ветвей цикла V_q (22), образующих базовое дерево вершины X_{qr} в цикле V_q , будем обозначать как $\{B_{qr}\}$. Разумеется, одному обозначению $\{B_{qr}\}$ соответствует несколько различных базовых деревьев вершины X_{qr} в схеме (22).

Рассмотрим базовый определитель (D_y) произвольной промежуточной формы X_y исходного механизма (3). Базовый определитель D_y содержит деревья базы X_y двух типов. К первому типу относятся деревья базы X_y , включающие в себя какие-либо $\{B_{qr}\}$ ($0 \leq r \leq n$), ко второму типу относятся деревья базы X_y , не включающие в себя никакие $\{B_{qr}\}$ ($0 \leq r \leq n$). Соответственно, величина D_y равна:

$$D_y = (\{\bar{B}_{qr}\})_y + \sum_r (\{B_{qr}\})_y \quad (23)$$

где $(\{B_{qr}\})_y$ – величина всех деревьев базы X_y , включающих в себя какие-либо $\{B_{qr}\}$ ($0 \leq r \leq n$), $(\{\bar{B}_{qr}\})_y$ – величина всех деревьев базы X_y , не включающих в себя ни одного из $\{B_{qr}\}$ ($0 \leq r \leq n$).

Можно показать, что как для быстрого цикла (19), т.е. при выполнении неравенств (20), так и для обратимо-быстрого цикла (19), т.е. при выполнении неравенств (20 - 21), справедливо следующее:

$$\sum_r (\{B_{qr}\})_y < D_y < \sum_r (\{B_{qr}\})_y (1 + \delta), \quad (24)$$

где

$$\delta = P_1 \varepsilon + P_2 \varepsilon^2 + \dots + P_n \varepsilon^n \quad (25)$$

коэффициенты $P_1, P_2, \dots, P_n$ уравнения (25) являются зависящими только от n положительными величинами, в частности,

$$P_1 = \frac{n^2 + n}{2} \quad (26)$$

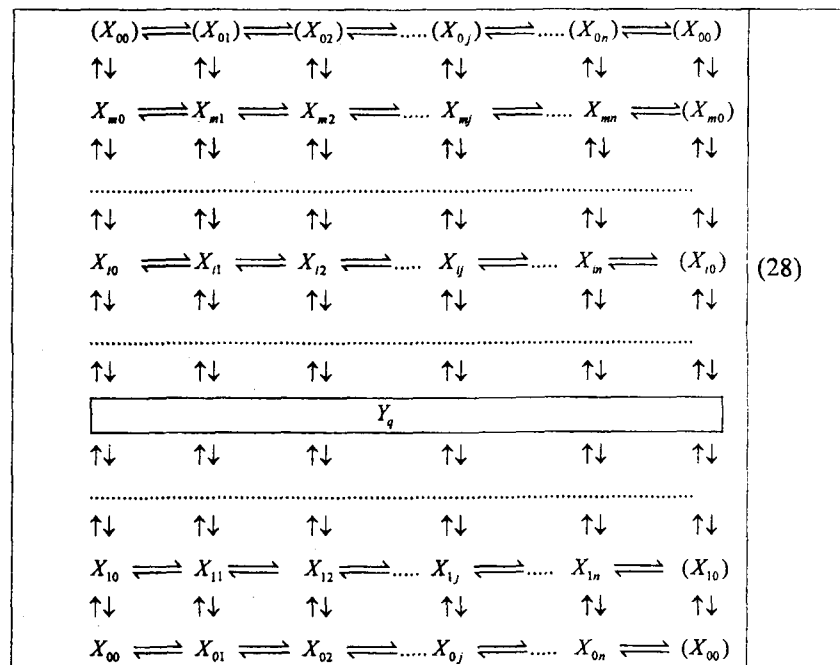
для быстрого цикла (19) (выполняются неравенства (20), и

$$P_1 = \frac{n^2 + n}{4} \quad (27)$$

для обратимо-быстрого цикла (19) (выполняются неравенства (20-21)).

Выполнение неравенства (24) означает, что соотношение стационарных концентраций промежуточных форм фермента X_{qj} ($0 \leq j \leq n$) в механизме (3) при стремлении ε к нулю стремится к соотношению стационарных концентраций промежуточных форм фермента X_{qj} ($0 \leq j \leq n$) в цикле V_q (22), и значение базового определителя произвольной промежуточной формы X_y механизма (3)

стремится к величине $\sum_r (\{B_{qr}\})_y$. В свою очередь это дает возможность для описания реакции A перейти от схемы (3) к более простой схеме (28):



в которой цикл (19) заменен на одно промежуточное соединение Y_q , в остальном структура графа (3) остается неизменной, за исключением того, что значения величин каждой из ветвей, выходящих из Y_q , умножаются на коэффициенты f_q , равные доле той промежуточной формы X_q в стационарном состоянии отдельного цикла B_q (22), из которой они выходят в исходном графе (3):

$$f_q = \frac{[X_q]}{\sum [X_{q'}]} \quad (29)$$

где $[X_{q'}]$ - стационарные концентрации, рассчитанные для отдельного цикла B_q (22). Формулы для расчета стационарных концентраций для отдельно взятых циклов типа цикла B_q (22), приведены в работах [6,3,4].

Стационарные концентрации промежуточных форм фермента X_q , рассчитанные для модифицированной схемы (28), будем обозначать $[X_q]^*$. Легко показать, что при условии выполнения (24) выполняются следующие соотношения:

$$\frac{|[X_q]^* - [X_q]|}{[X_q]} < \delta, \quad (30)$$

где δ определяется выражениями (25-27), $0 \leq i \leq m$, $0 \leq j \leq n$, причем для $i = q$ величины $[X_q]^*$ имеют следующий смысл:

$$[X_q]^* = f_q [Y_q], \quad (31)$$

где величины f_q определены в (29).

При стремлении величины ε к нулю высшими степенями в выражении (25) можно пренебречь, и практическое значение имеет оценка:

$$\delta = P_1 \varepsilon, \quad (32)$$

где P_1 определяется выражениями (26) и (27).

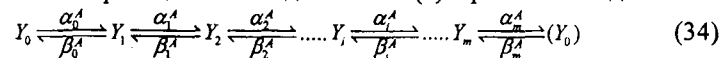
Далее, допустим, что два цикла реакции B в схеме (3) являются одновременно быстрыми (или одновременно обратимо-быстрыми), т.е. для них выполняются соотношения типа (20) или (20 - 21). Тогда, повторяя приведенные выше рассуждения, можно для описания реакции A модифицировать исходную схему (3), заменив в ней каждый быстрый цикл реакции B на одну промежуточную форму по изложенному выше алгоритму.

Точность приближения в этом случае равна $(1+\delta)^2 - 1$, и при стремлении ε к нулю практическое значение имеет оценка:

$$\frac{|[X_q]^{**} - [X_q]|}{[X_q]} < 2\delta, \quad (33)$$

где $[X_q]^{**}$ - стационарные концентрации промежуточных форм фермента X_q , рассчитанные для новой модифицированной схемы. В свою очередь, справедлива также оценка (32).

В том случае, если все циклы реакции B в схеме (3) являются одновременно быстрыми (или одновременно обратимо-быстрыми), то для описания реакции A исходная схема (3) принимает вид:



$$\text{где } \alpha_i^A = \sum_j \alpha_{ij}^A f_{ij} \quad (35)$$

$$\beta_i^A = \sum_j \beta_{ij}^A f_{i+1,j}, \quad (36)$$

где величины f_{ij} определяются по аналогии с (29).

Таким образом, двумерная исходная схема (3) при условии более быстрого протекания реакции B для описания реакции A сводится к одномерной схеме (34), в которой зависимость скорости реакции A от концентрации субстратов и продуктов реакции B отражается зависимостями (35-36).

Точность приближения в этом случае равна $(1+\delta)^n - 1$, и при стремлении δ к нулю практическое значение имеет оценка:

$$\frac{|[X_y]^{***} - [X_y]|}{[X_y]} < n\delta, \quad (37)$$

где величины $[X_y]^{***}$ имеют следующий смысл:

$$[X_y]^{***} = f_y[Y_i] \quad (38)$$

В свою очередь, справедлива также оценка (32).

Таким образом, если реакция B протекает существенно более быстро, чем реакция A (т.е. выполняются соотношения типа (20) или (20 - 21) для всех $m+1$ циклов реакции B , то кинетику протекания реакции A будет описывать один цикл (34), в котором влияние компонентов реакции B учтены в соотношениях (35-36).

Следует отметить, что характер зависимости скорости реакции (34) от концентрации субстратов реакции A будет такой же, как и для скорости реакции A в отсутствие компонентов реакции B , т.е. для механизма (1), и бифункциональный характер фермента E будет проявляться для реакции A только в зависимости констант скорости реакции A (α_i^A и β_i^A) от концентраций компонентов реакции B .

С использованием результатов работы [3] приведем зависимость скорости реакции A для механизма (34) в явном виде как функцию констант скорости α_i^A и β_i^A (39):

$$v^A = E_0 \frac{\alpha_0^A \alpha_1^A \alpha_2^A \dots \alpha_m^A - \beta_0^A \beta_1^A \beta_2^A \dots \beta_m^A}{\sum_i \sum_j b_{ij}}, \quad (39)$$

где

$$\begin{aligned} b_{ij} &= \alpha_0^A \alpha_1^A \alpha_2^A \dots \alpha_{i-1}^A \beta_i^A \beta_{i+1}^A \dots \beta_{j-1}^A 1 \alpha_{j+1}^A \dots \alpha_m^A \\ b_{ij} &= \alpha_0^A \alpha_1^A \alpha_2^A \dots \alpha_{i-1}^A 1 \alpha_{i+1}^A \dots \alpha_m^A \\ b_{ij} &= \beta_0^A \beta_1^A \beta_2^A \dots \beta_{j-1}^A 1 \alpha_{j+1}^A \dots \alpha_{i-1}^A \beta_i^A \beta_{i+1}^A \dots \beta_m^A \end{aligned} \quad (40)$$

Величины α_i^A и β_i^A как функции элементарных констант исходного механизма (3) определены в (35-36).

В том случае, если все циклы реакции B в схеме (3) являются быстрыми (или все являются обратимо-быстрыми), то механизм реакции (3) для описания реакции B будет представлять собой $m+1$ независимых циклов и скорость реакции B будет описываться уравнением (41):

$$v^B = E_0 \sum_i e_i \frac{\alpha_0^B \alpha_1^B \alpha_2^B \dots \alpha_m^B - \beta_0^B \beta_1^B \beta_2^B \dots \beta_m^B}{\sum_j b_{ij}} \quad (41)$$

где

$$\begin{aligned} b_{ij}^i &= \alpha_{i0}^B \alpha_{i1}^B \alpha_{i2}^B \dots \alpha_{i,i-1}^B \beta_{ii}^B \beta_{i,i+1}^B \dots \beta_{i,j-1}^B 1 \alpha_{i,j+1}^B \dots \alpha_m^B & (i < j) \\ b_{ij}^j &= \alpha_{j0}^B \alpha_{j1}^B \alpha_{j2}^B \dots \alpha_{j,j-1}^B 1 \alpha_{j,j+1}^B \dots \alpha_m^B & (i = j) \\ b_{ij}^j &= \beta_{j0}^B \beta_{j1}^B \beta_{j2}^B \dots \beta_{j,j-1}^B 1 \alpha_{j,j+1}^B \dots \alpha_{i,j-1}^B \beta_{ii}^B \beta_{i,i+1}^B \dots \beta_m^B & (i > j) \end{aligned} \quad (42)$$

и

$$e_i = \frac{\sum_j b_{ij}}{\sum_i \sum_j b_{ij}} \quad (43)$$

где b_{ij} определены в уравнении (40), i принимает значения от 0 до m .

Таким образом, если реакция B протекает существенно более быстро, чем реакция A (т.е. выполняются соотношения типа (20) или (20 - 21) для всех $m+1$ циклов реакции B), то общий механизм бифункционального фермента сводится к одному циклу для «медленной» реакции A , и к нескольким независимым циклам для «быстрой» реакции B . Для каждой из этих реакций получены в явном виде уравнения скорости и дана количественная оценка данного приближения.

Построение кинетической модели для фермента PGHS

В самом простейшем случае кинетика фермента подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен, зависимость скорости реакции от концентрации субстрата будет линейной 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. Из рисунка 1 видно, что зависимость скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации кислорода является в первом приближении линейной в двойных обратных координатах. Линейность сохраняется при использовании различных по химической природе доноров электронов (адреналин – органический, ферроцианид – неорганический) и в отсутствие добавляемого донора электронов, но при этом меняется наклон прямых, наблюдаемая константа Михаэлиса по кислороду и максимальная скорость циклооксигеназной реакции. Таким образом, мы видим, что 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 является справедливым 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.6).

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

1) 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 донора электронов, так и в отсутствие донора электронов;

2) давать относительно простые теоретические зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации субстратов циклооксигеназной реакции, сохраняющие свой качественный вид как в отсутствие пероксидазной реакции, так и при наличии пероксидазной реакции;

3) соответствовать следующему набору экспериментальных фактов:

- зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в отсутствие донора электронов в двойных обратных координатах линейна (рис.1), при варьировании концентрации арахидоновой кислоты наклон прямых сохраняется (рис.2);

- зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в присутствии донора электронов в двойных обратных координатах линейна (рис.1), при варьировании концентрации арахидоновой кислоты наклон прямых сохраняется (рис.3);

- линейные зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода при варьировании концентрации донора электронов в двойных обратных координатах образуют пучок прямых, пересекающихся в одной точке во втором квадранте (рис.5);

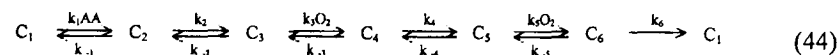
- в двойных обратных координатах расстояние между кривыми, описывающими зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты в присутствии и в отсутствие донора электронов, остается постоянным (рис.6).

Двухмерная кинетическая схема, предложенная в работе [5] для бифункциональных ферментов, в том числе для PGHS, заведомо удовлетворяет перечисленным выше требованиям, но ее использование приводит к излишне сложным выражениям. С другой стороны использование такой двухмерной 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.

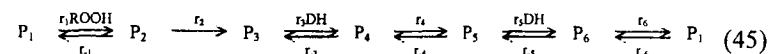
1. Протекает только циклооксигеназная реакция, пероксидазная не идет (в среде отсутствует донор электронов). Кинетический механизм

циклооксигеназной реакции должен включать следующие основные стадии [20]



где введены следующие обозначения, характеризующие состояние циклооксигеназного активного центра $C_1 = [tyr^*]$, $C_2 = [tyr^*]AA$, $C_3 = [tyr]AA^*$, $C_4 = [tyr]AAO_2^*$, $C_5 = [tyr]AAO_2$, $C_6 = [tyr]AAO_2O_2$, k_i – константы скоростей. Расчет скорости циклооксигеназной реакции для этой схемы в стационарном состоянии привел к получению квадратичной зависимости скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах. 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). Соответствие между экспериментом и теорией достигается в предположении существования необратимых стадий между пунктами донирования субстратов [4] в (44). В этом случае в (44) константы k_2 и k_4 равны нулю, и теоретическая и экспериментальная зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода хорошо согласуются. 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.

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 следующие основные стадии [20]

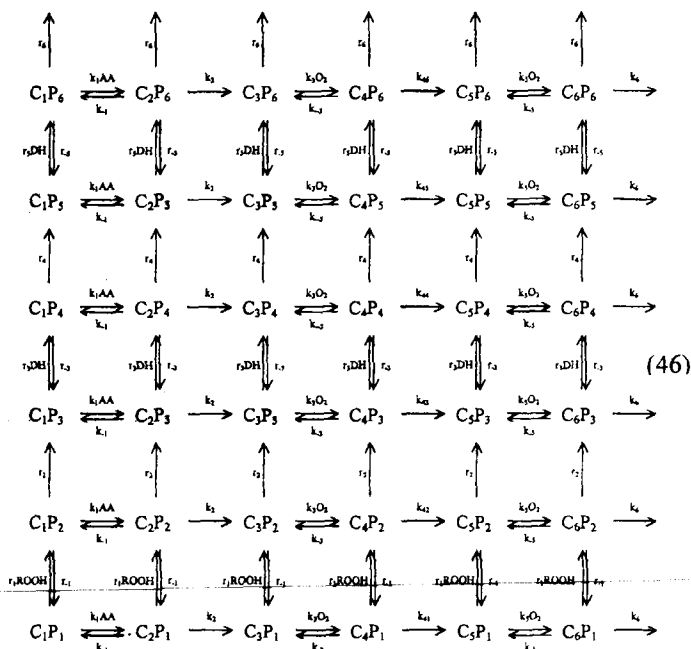


где введены следующие обозначения, характеризующие состояние пероксидазного активного центра $P_1 - [(PP)Fe^{3+}]$, $P_2 - [(PP)Fe^{3+}]ROOH$, $P_3 - [(PP)^+ Fe^{4+}O]$, $P_4 - [(PP)^+ Fe^{4+}O]DH$, $P_5 - [(PP) Fe^{4+}O]$, $P_6 - [(PP) Fe^{4+}O]DH$, r_i – константы скоростей. Расчет скорости пероксидазной реакции для (45) в стационарном состоянии привел к получению квадратичной зависимости скорости от концентрации донора электронов в двойных обратных координатах. При этом параметры параболы зависели от концентрации перекиси (ROOH). Эти факты находятся в противоречии реальными экспериментальными зависимостями, представляющими собой серию прямых, в первом приближении

параллельных [47]. Соответствие между экспериментом и теорией достигается в предположении существования необратимых стадий между пунктами донирования субстратов [22]. В этом случае в (45) константы γ_4 и γ_6 равны нулю, и теоретическая и экспериментальная зависимости скорости пероксидазной реакции от концентрации донора электронов хорошо согласуются. Равенство нулю константы γ_4 обеспечивает линейность зависимости скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах, а равенство нулю константы γ_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 двухмерная схема для бифункциональных ферментов [5] применительно к PGHS, с учетом сформулированных выше выводов о необратимости некоторых стадий примет следующий вид:



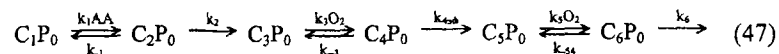
где сохранены обозначения, введенные ранее (44, 45), но одновременно отображается состояние двух активных центров (циклооксигеназного и пероксидазного) на одной молекуле фермента.

Влияние циклооксигеназной реакции на пероксидазную можно считать пренебрежимо малым, так как пероксидазная реакция идет 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 [49,10] и лишь незначительно уменьшает скорость инактивации пероксидазной активности в процессе реакции [10].

Тогда константы скоростей элементарных стадий пероксидазной реакции r_j не будут зависеть от состояния активного центра циклооксигеназной реакции, что нашло свое отражение в (46).

Так как присутствие донора электронов влияет на параметры циклооксигеназной реакции, то константы скоростей элементарных стадий циклооксигеназной реакции должны зависеть от состояния пероксидазного активного центра. Для простоты будем считать, что пероксидазная реакция оказывает влияние только на одну из шести указанных нами в (44) 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 (46).

Наши экспериментальные данные (не приведены) 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 со временем установления стационара по интермедиатам циклооксигеназной реакции, и не меняется в ходе протекания циклооксигеназной реакции. Тогда, согласно теоретическим выводам работы (28, 29), можно упростить (46), заменив все k_{4j} ($j=1, \dots, 6$) на одну константу $k_{4\text{эф}}$, которая выражается через константы скоростей элементарных стадий и концентрации субстратов пероксидазной реакции (r_j и $[ROOH]$, $[DH]$) и константы скоростей четвертой стадии циклооксигеназной реакции k_{4j} ($j=1, \dots, 6$). Тогда (46) трансформируется в (47):



Расчет (47) в стационарном состоянии с учетом всех сделанных предположений дает следующее уравнение для скорости циклооксигеназной реакции:

$$\frac{C_0}{V_{\text{cox}}} = \frac{\eta}{[AA]} + \left(\theta + \frac{\rho}{[DH] + \mu} \right) \cdot \frac{1}{[O_2]} + \frac{\nu \cdot \rho}{[DH] + \mu} + \omega, \quad (48)$$

где η , θ , ρ , μ , ν , ω выражаются через константы элементарных стадий пероксидазной, циклооксигеназной реакций и концентрацию перекиси ROOH.

Проанализируем полученное уравнение (48) для скорости циклооксигеназной реакции. Коэффициенты θ , ρ , μ , ω зависят от концентрации ROOH, поэтому они не являются константами. Однако данные работы [18] свидетельствуют о том, что перекись в значительно меньшей степени влияет на параметры циклооксигеназной реакции, чем донор электронов. Это позволяет сделать предположение о том, что коэффициенты θ , ρ , μ , ω в первом приближении можно считать константами. Если принять это предположение, тогда уравнение (48) хорошо согласуется со всеми экспериментальными данными, представленными на рисунках 1-6. Действительно, то уравнение (48) будет описывать линейную зависимость скорости от концентрации кислорода в двойных обратных координатах. При изменении концентрации AA мы получим серию параллельных прямых в тех же координатах (рис.2, 3). Это справедливо для любой концентрации донора электронов, в том числе и в отсутствие донора.

Одним из наших упрощений при выводе уравнения (48) 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 (46), становится возможным теоретическое описание пересечения прямых на рис 5 в одной точке.

Обсуждение экспериментальных результатов

В том случае, 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 мы наблюдаем линейную зависимость, то это свидетельствует о наличии необратимой стадии между пунктами донирования этого субстрата [4].

Результаты представленных в данной работе экспериментов (рис.2) свидетельствуют о наличии необратимой стадии в

циклооксигеназной реакции между пунктами донирования кислорода, дважды принимающего участие в реакции. Возможно, что необратимая стадия между пунктами донирования кислорода (4-я стадия в (44)) соответствует существенному изменению конформации субстрата [20], после образования эндопероксидного мостика между 8 и 12 атомами углерода в ходе превращения 11-пероксиарахидонового интермедиата в C-15 радикал.

Зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации кислорода в двойных обратных координатах линейна, в то же время зависимость скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты не линейна (рис.6). 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.6), хорошо согласуется с уравнением (48). Само отклонение от линейности может описываться уравнением (48) в предположении, что η не является константой, а является функцией от концентрации арахидоновой кислоты.

Наблюдаемые в наших экспериментах отклонения от линейной зависимости в области низких концентраций (менее 3 мкМ) арахидоновой кислоты были описаны ранее [41]. В работе [14] показано, что этот эффект снижается или полностью исчезает при добавлении в реакционную смесь органической перекиси. Наблюдаемая в настоящей работе активация избытком субстрата (рис.6) 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 уже говорилось, с формальной точки зрения совпадение эксперимента и теории достигается тогда, когда влияние пероксидазной реакции сказывается на четвертой или на шестой стадиях циклооксигеназной реакции (46). В этой связи стоит отметить, что влияние состояния пероксидазного активного центра на шестую стадию представляется более вероятным, так как на этой стадии происходит окисление тирозинового остатка радикалом PGG₂, и, поскольку тирозин-385 находится в непосредственной близости к гемовой группе, состояние гемовой группы может оказывать влияние на этот процесс [20]. Процессы, описываемые четвертой стадией, протекают без участия тирозинового остатка и вдали от пероксидазного активного центра.

Мы наблюдали, что концентрация донора электронов существенным образом влияет на количественные параметры кислородных зависимостей циклооксигеназной реакции. Так, например, при концентрации кислорода 5-10 мкМ, что сравнимо с внутриклеточными концентрациями растворенного кислорода [24], 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.

Итак, нами определены условия, при которых иерархия быстрых и медленных каталитических циклов позволяет упрощать двумерную модель и редуцировать ее вплоть до одномерных циклических схем. Это позволило редуцировать общую двухмерную схему действия бифункционального фермента PGHS, упростить теоретические выражения для скоростей ферментативной реакции и описать известные из литературы и полученные нами экспериментальные данные.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волькенштейн М.В., Гольдштейн Б.Н. (1966) *Биохимия*, **31**, 541-547.
2. Волькенштейн М.В., Магаршак Ю.Б. (1970) *Биофизика*, **15**, 777-784.
3. Вржеш П.В. (1988) *Биохимия*, **53**, 1704-1711.
4. Вржеш П.В. (1996) *Биохимия*, **60**, 2069-2083.
5. Вржеш П.В. (1999) *Биохимия*, **64**, 502-512.
6. Вржеш П.В., Варфоломеев С.Д. (1985) *Биохимия*, **50**, 139-147.
7. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, 1979.
8. Тихонов А.Н. (1952) *Математический сборник*, **31**, 575-586.
9. Франк Г.М., Кондрашова М.Н., Мохова Е.Н., Ротенберг Ю.С. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. Москва, Изд. «Наука», 1973.
10. Цаплина Л.А., Каратасо Ю.О., Филимонов И.С., Вржеш П.В. (2006) *Биохимия*, **71**, 1534-1543.
11. Atreya, C.E., and Anderson, K.S. (2004) *J Biol Chem.* **279**, 18314-18322.
12. Bakovic, M., and Dunford, H.B. (1994) *Biochemistry*, **33**, 6475-6482.
13. Cha, S. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 820-825.
14. Chen, W., Pawelek, T.R., Kulmacz, R.J. (1999) *J Biol Chem.*, **274**, 20301-20306.
15. Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 321-8.
16. Easterby, J.S. (1981) *Biochem. J.*, **199**, 155-161.
17. Easterby, J.S. (1984) *Biochem. J.*, **219**, 843-847.
18. Eling, T.E., Glasgow, W.C., Curtis, J.F., Hubbard, W.C., and Handler, J.A. (1991) *J Biol Chem.* **266**, 12348-12355.
19. Falk, J.E. (1964) in *Porphyrins and metalloporphyrins*. Elsevier Amsterdam, vol 2., N.Y.-L., p. 181.
20. Garavito, R.M., Mulichak, A.M. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 183-206.
21. Gehring, A.M., Lees, W.J., Mindiola, D.J., Walsh, C.T., Brown, E.D. (1996) *Biochemistry*, **35**, 579-585.
22. Huang, X., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2001) *Annu Rev Biochem.* **70**, 149-180.
23. Johnson, E.F., Hinz, W., Atreya, C.E., Maley, F., and Anderson, K.S. (2002) *J Biol Chem.*, **277**, 43126-43136.
24. Juranek I, Suzuki H, Yamamoto S. (1999) *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 509-18.
25. Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 313-320.
26. Kim, J.H., Krahn, J.M., Tomchick, D.R., Smith, J.L., and Zalkin, H. (1996) *J Biol Chem.*, **271**, 15549-15557.
27. Kulmacz, R.J., Pendleton, R.B., and Lands, W.E.M. (1994) *J.Biol. Chem.*, **269**, 5527-5536.
28. Kurumbail, R.G., Kiefer, J.R., Marnett, L.J. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 752-760.
29. Lands, W.E.M., Sauter, J., Stone, G.W. (1978) *Prostaglandins Med.*, **1**, 117-120.
30. Leys, D., Basran, J., and Scrutton, N.S. (2003) *EMBO J*, **22**, 4038-4048.
31. Liang, P.H., and Anderson, K.S. (1998) *Biochemistry*, **37**, 12195-12205.
32. Liang, P.H., and Anderson, K.S. (1998) *Biochemistry*, **37**, 12206-12212.
33. Mason, R.P., Kalyanaraman, B., Tainer, B.E., and Eling, T.E. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 5019-5022.
34. Meek, T.D., Garvey, E.P., and Santi, D.V. (1985) *Biochemistry*, **24**, 678-686.
35. Miles, B.W., Banzon, J.A., and Raushel, F.M. (1998) *Biochemistry* **37**, 16773-16779.
36. Miles, E.W., Rhee, S., and Davies, D.R. (1999) *J Biol Chem.*, **274**, 12193-12196.
37. Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2629-2636.
38. Schneider, T.R., Gerhardt, E., Lee, M., Liang, P.H., Anderson, K.S., and Schlichting, I. (1998) *Biochemistry*, **37**, 5394-5406.
39. Smith, S. (1994) *FASEB J.* **8**, 1248-1259.
40. Smith, W.L., Marnett, L.J. Biochim. (1991) *Biophys. Acta*, **1083**, 1-17.

41. Swinney, D.C., Mak, A.Y., Barnett, J., Ramesha, C.S. (1997) *J Biol Chem.*, **72**, 12393-12398.
42. Trujillo, M., Donald, R. G. K., Roos, D. S., Greene, P. J., and Santi, D. V. (1996) *Biochemistry*, **35**, 6366-6374.
43. Van der Donk, W.A., Tsai, A.L., Kulmacz, R.J. 2002 *Biochemistry*, **41**, 15451-15458.
44. Van der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H., and Van Dorp, D.A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.*, **487**, 315-331.
45. Vane J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 97-120.
46. Vane, J.R., Botting, R.M. (1997) *Semin. Arthritis Rheum.*, **26**, 2-10.
47. 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.
48. Yourno, J., Kohno, T., and Roth, J.R. (1970) *Nature*, **228**, 820-825.
49. Wu, G., Vuletich, J.L., Kulmacz, R.J., Osawa, Y., and Tsai, A.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 19879-19888.