



УДК 577.152.9'133

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ ПРОСТЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТЕТАЗЫ

*Мевх А. Т., Голуб Н. Б., Варфоломеев С. Д.,
Лузгина В. Н.*, Филиппович Е. И.*, Евстигнеева Р. П.**

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;

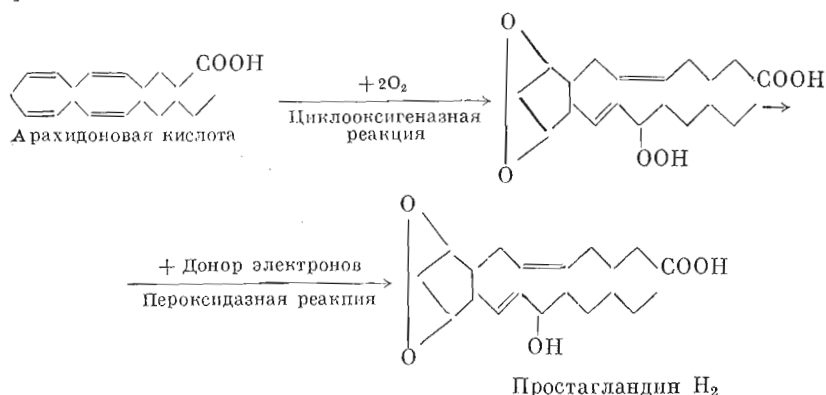
** Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Изучено влияние винильных групп протогемина IX на его кофакторные свойства по отношению к простагландин-Н-синтетазе. Показано, что замена винильных групп на этильные или атом водорода не влияет ни на эффективность связывания простетической группы с апоферментом, ни на каталитические свойства холопростагландин-Н-синтетазы. Замена винильных групп на заместители большого объема (оксиптил- или ацетилные группы) существенно уменьшает стабильность и каталитическую активность холофермента.

На основании сравнения кофакторных свойств протопорфириновых и гематопорфириновых макроциклов с различными центральными ионами (Fe^{3+} , Mn^{2+} , $2H^{+}$ в случае протопорфирина и Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} в случае гематопорфирина) показано, что присутствие ионов железа строго обязательно для проявления простагландин-Н-синтетазной активности.

Исследования модификации структур кофактора не влияли на константу скорости инактивации холопростагландин-Н-синтетазы в процессе реакции.

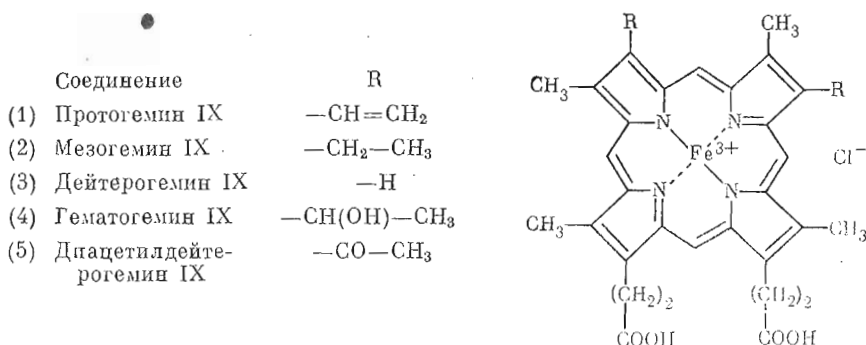
Простагландин-Н-синтетаза (КФ 1.14.99.1) — скоростьлимитирующий фермент биферментной системы синтеза простагландинов и тромбоксанов — катализирует превращение арахидоновой кислоты в простагландин H_2 . Катализируемая реакция — трехсубстратная (полиненасыщенная жирная кислота, кислород, донор электронов) и двухстадийная (циклооксигеназная и пероксидазная активности проявляются последовательно и могут быть определены независимо). Фермент проявляет активность в присутствии легко отщепляемой простетической группы — протогемина IX [1–4]:



Ранее нами было показано [5], что модификация одной карбоксильной группы протогемина IX увеличивает константу диссоциации образующегося с ним холофермента, но практически не влияет на его каталитические свойства и константу скорости инактивации в процессе реакции. При модификации обеих карбоксильных групп протогемина IX не только значительно ухудшается его связывание с апоферментом, но и значительно падает каталитическая активность.

В настоящей работе проведено дальнейшее исследование влияния структуры протестической группы на свойства холопростагландин-Н-синтетазы.

Протогемин IX модифицировали путем замены винильных групп на радикалы различной природы:



Влияние центрального атома макроцикла на свойства холофермента исследовали, сравнивая кофакторные свойства протопорфиринов с Fe^{3+} , Mn^{2+} , H^+ и гематопорфиринов с Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} .

Для использованных соединений определяли наблюдаемую константу диссоциации их комплексов с апоферментом ($K_{\text{дис}}$) и наблюдаемую максимальную скорость ферментативной реакции при насыщении апофермента соответствующим соединением ($V_{\text{нак}}$). Последний параметр имеет смысл активности холофермента с модифицированной протестической группой. Величину $V_{\text{нак}}$ выражали относительно активности апофермента при насыщении протогемин IX (принятой за единицу). При обнаружении активности апопростагландин-Н-синтетазы в присутствии аналога протогемина IX изучали зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации металлопорфирина. Обработку результатов с целью получения $K_{\text{дис}}$ и $V_{\text{нак}}$ проводили так, как описано нами ранее [5]. Из кинетической кривой накопления продукта ферментативной реакции, полученной в условиях насыщения металлопорфирином, получали, кроме того, константу инактивации модифицированного холофермента в ходе реакции (k_{in}).

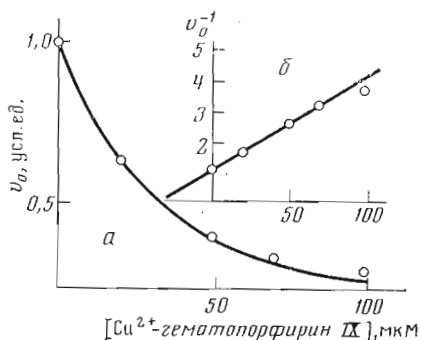
В присутствии некоторых из изученных соединений апопростагландин-Н-синтетаза не проявляла сколько-нибудь заметной активности. Очевидно, этот факт может быть интерпретирован двояко: как каталитическая неактивность образующегося комплекса апофермента с исследуемым соединением ($V_{\text{нак}}=0$) и как невозможность его образования ($K_{\text{дис}} \rightarrow \infty$). В этом случае изучали ингибирование простагландин-Н-синтетазной реакции в присутствии небольших (0,05–0,1 мкМ) концентраций протогемина IX высокими концентрациями его неактивного аналога. Типичные результаты приведены на рисунке. Ингибирование, если имело место, являлось конкурентным относительно протогемина IX и снималось его высокими концентрациями (данные не приведены). Ввиду конкурентного характера ингибирования справедливо следующее выражение для концентрации неактивного аналога, вызывающей 50%-ное ингибирование (I_{50}):

$$I_{50} = K_{\text{дис}} \left(1 + \frac{[\text{протогемин IX}]}{K_{\text{дис, протогемин IX}}} \right).$$

С использованием известных величин концентрации протогемина IX и константы диссоциации его комплекса с белком вычисляли параметр $K_{\text{дис}}$ для неактивного аналога протогемина IX (рисунок, б).

Замена винильной группы в протогемине IX (1) на этильную или на атом водорода (соед. 2, 3) практически не сказывается ни на эффективности связывания протестической группы с апоферментом, ни на каталитической активности простагландин-Н-синтетазы (таблица). Однако заме-

Зависимость начальной скорости простагландин-Н-синтеза от концентрации Cu^{2+} -гематопорфирина IX (а) и ее линеаризация в координатах Диксона (б). Концентрация протогемина IX 0,1 мкМ



на винильной группы более объемистыми заместителями (соед. 4, 5) существенно ухудшает стабильность комплекса и уменьшает реакционную способность образующегося холофермента. Диацетилдейтерогемин (5) практически не связывается белком, и комплекс не обладает детектируемой энзиматической активностью. Видимо, для образования холофермента необходимо проникновение протопорфиринового макроцикла в весьма узкую полость в белке. Поэтому присутствие объемистых заместителей вместо винильных групп уменьшает возможность образования такого комплекса.

Принципиально важным представляется вопрос о том, как изменятся свойства простетической группы при замене центрального атома железа на другие ионы. Сохранит ли такой аналог способность образовывать комплекс с апопростагландин-Н-синтезой и будет ли холофермент активен.

Из таблицы видно, что активность холофермента сохраняется лишь при замене Fe^{3+} в протогемине IX на Mn^{2+} . Однако при такой замене проявляется только циклооксигеназная активность и не проявляется пероксидазная, т. е. не проявляется полная простагландин-Н-синтезная активность [3]. При этом циклооксигеназная активность холофермента с ионом марганца в макроцикле точно соответствует активности холофермента с протогеминном.

Замещение иона железа в гематогемине IX (4) на ионы водорода, ртути, кадмия или меди (4а)–(4в) приводит к потере простагландин-Н-синтезазной активности. Ухудшается также стабильность холоферментов. Полученные данные свидетельствуют о том, что центральный ион металла простетической группы участвует в стабилизации ее комплекса с апоферментом, что, по-видимому, происходит за счет дополнительного комплексобразования по аксиальному положению.

Влияние замещения винильных групп протогемина IX и центрального иона макроцикла простетической группы на эффективность ее связывание с апопростагландин-Н-синтезой и на каталитическую активность холофермента

Номер соединения	Простетическая группа холофермента	Относительная активность ($V_{\text{каж}}$)	$K_{\text{дис}}$, мкМ
(1)	Протогемин IX (протопорфирин IX – Fe^{3+})	1	0,18
(1а)	Протопорфирин IX – Mn^{2+}	1	0,5
1(б)	» – 2H^+	0	9,0
(2)	Мезогемин IX	1,0	0,37
(3)	Дейтерогемин IX	1,05	0,38
(4)	Гематогемин IX (гематопорфирин IX – Fe^{3+})	0,27	3,0
(4а)	Гематопорфирин IX – Hg^{2+}	0	5,0
(4б)	» – Cd^{2+}	0	10
(4в)	» – Cu^{2+}	0	100
(5)	Диацетилдейтерогемин IX	0	70

Специфическое свойство простагландин-Н-синтетазы — инактивация в процессе реакции, играющая, по-видимому, регуляторную роль [6—8]. В связи с этим во всех случаях проявления активности холоферментом определяли также константу скорости его инактивации в процессе реакции. Однако влияния протетической группы на этот параметр не было обнаружено (данные не приведены).

Экспериментальная часть

Образцы металлических комплексов порфиринов получены известными методами [9—13]. Индивидуальность их доказана методами ТСХ и электронной спектроскопии.

Мезогемин IX, дейтерогемин IX, диацетилдейтерогемин IX получены по методу [9], гематогемин IX — по способу Пауля [10]. Комплекс очищали колоночной хроматографией на силикагеле при элюировании смесью бензол — метанол — муравьиная кислота, 9:10:1 [11]. Выделение продукта контролировали хроматографически и спектрально (в виде хромогена с пиридином по полосе поглощения 410 нм).

Марганцевый комплекс протопорфирина IX получали нагреванием смеси протопорфирина IX, хлорида марганца и ацетата натрия (соотношение солей 1:5) в уксусной кислоте [12]. Ртутный и медный комплексы гематопорфирина выделены в виде динатриевых солей [13]. Кадмиевый комплекс гематопорфирина IX получен кипячением порфирина с ацетатом кадмия в смеси диоксан — метанол в течение 30—40 мин.

Все остальные реагенты — как в работе [5].

Водный раствор солиобилизованных металлопорфиринов и протопорфирина IX готовили, растворяя навеску в небольшом количестве 0,1 М NaOH и быстро разбавляя буфером, содержащим 20 мМ KH_2PO_4 (рН 8,0) и 1% твин-20. Металлопорфирины, полученные в виде натриевых солей, растворяли непосредственно в указанном буфере.

Выделение солиобилизованной простагландин-Н-синтетазы из везикулярных желез барана и определение активности фермента проводили согласно [5]. Кинетические эксперименты осуществляли при 32°С в том же буфере в присутствии арахидоновой кислоты (0,1 мМ) и *L*-адреналина (1 мМ). Концентрацию аналога протопорфирина IX варьировали. Эксперименты по ингибированию проводили в присутствии указанных компонентов, а также 0,05—0,1 мкМ протогемина IX в постоянной концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miyamoto T., Ogino N., Yamamoto S., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 9, p. 2629—2636.
2. Van der Ouderaa F. J., Buytenhek M., Nugteren D. H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 487, № 2, p. 315—331.
3. Ogino N., Ohki S., Yamamoto S., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 1978, v. 254, № 3, p. 829—836.
4. Van der Ouderaa F. J., Buytenhek M., Slikkerveer F. J., Van Dorp D. A. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 572, № 1, p. 29—42.
5. Мевх А. Т., Голуб Н. Б., Варфоломеев С. Д., Филиппович Е. Ш., Макаров В. А., Евстигнеева Р. П. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1056—1062.
6. Мевх А. Т., Вржечиц Н. В., Шаядас В. К., Варфоломеев С. Д., Мягкова Г. Ш., Якушева Л. А. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 695—701.
7. Мевх А. Т., Басевич В. В., Ярсинг И., Варфоломеев С. Д. Биохимия, 1982, т. 47, № 11, с. 1852—1858.
8. Варфоломеев С. Д. Биохимия, 1984, т. 49, № 5, с. 723—735.
9. Falk J. E. Porphyrins and metalloporphyrins. Amsterdam — London — New York: Elsevier Publ., 1964, p. 135.
10. Paul K. Acta chem. scand., 1950, v. 4, p. 1221—1225.
11. Lamson D., Yonetani T. Analyt. Biochem., 1973, v. 52, p. 647—651.
12. Smith K. M. Porphyrins and metalloporphyrins. Amsterdam — Oxford — New York: Elsevier Publ. Co. 1975. p. 797.
13. Пат. 3 004 985 (США), 1961; Пат. 17 489 (Япония), 1962.

Поступила в редакцию
12.XII.1984
После доработки
23.I.1985

THE EFFECT OF PROSTHETIC GROUP STRUCTURE ON PROSTAGLANDIN H SYNTHETASE CATALYTIC PROPERTIES

MEVKH A. T., GOLUB N. B., VARFOLOMEEV S. D., LUZGINA V. N*.,
PHILIPPOVICH E. I.*, EVSTIGNEYEVA R. P.*

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow; *Moscow Institute
of Fine Chemical Technology, Moscow*

The effect of vinyl groups of protohemin IX on its cofactor properties with respect to prostaglandin H synthetase has been studied. It was shown that substitution of ethyl groups or a hydrogen for vinyl groups affects neither binding of the prosthetic group to the apoenzyme nor catalytic properties of holo-prostaglandin H synthetase. Replacement of vinyl groups with bulkier substituents (hydroxyethyl or acetyl groups) decreases holoenzyme stability and catalytic activity. By comparison of the cofactor properties of protoporphyrin and hematoporphyrin macrocycles with different central ions (Fe^{3+} , Mn^{2+} , 2H^{+} in the case of protoporphyrin, and Fe^{3+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} in the case of hematoporphyrin), the presence of Fe^{3+} ions was shown to be mandatory for prostaglandin H synthetase activity. It was demonstrated that the cofactor structure modifications do not affect the holo-prostaglandin H synthetase inactivation rate constant in a reaction.