



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.11*4.99.1'134

О ПРИРОДЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП,
КОНТРОЛИРУЮЩИХ КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
ЭНДОПЕРОКСИДПРОСТАГЛАНДИНСИНТЕТАЗЫ

Голуб Н. Б., Мевх А. Т., Варфоломеев С. Д.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Структура активного центра эндопероксидпростагландинсинтетазы (PGH-синтетаза, КФ 1.14.99.1) мало изучена. Известно лишь, что активный центр фермента содержит остаток серина, который ацилируется аспирином — специфическим ингибитором PGH-синтетазы [1].

Нами была предпринята попытка выяснения природы функционально-важных групп PGH-синтетазы методом химической модификации фермента. В работе исследовали влияние ϵ -NH₂-групп лизина, SH-групп цистеина и имидазольных групп гистидина. Соответственно в качестве модификаторов были выбраны карбонильные соединения (пиридоксальфосфат и уксусный альдегид), *n*-хлормеркурибензойная кислота и диэтилпрокарбонат.

В работе использовали частично очищенный препарат апо-PGH-синтетазы из везикулярных желез барана (солюбилизированный фермент), полученный по ранее описанной методике [2], а также гомогенный препарат апо-PGH-синтетазы (гомогенный фермент), полученный ионообменной хроматографией. Во всех экспериментах использовали буферный раствор (рН 8,0), содержащий 20 мМ КН₂РО₄ и 1% твина 20. Определение активности проводили в присутствии 2 мкМ гемина, 0,1 мМ арахидоновой кислоты и 1 мМ донора электронов — адреналина по методике [2]. Кинетику ферментативной реакции регистрировали спектрофотометрически (для окисленной формы адреналина ϵ_{430} 4000 М⁻¹·см⁻¹). Во избежание возможного взаимодействия модификатора с адреналином в экспериментах с пиридоксальфосфатом, уксусным альдегидом и диэтилпрокарбонатом вместо адреналина использовали 10 мМ К₄Fe(CN)₆ (для окисленной формы ϵ_{420} 1000 М⁻¹·см⁻¹). В экспериментах с пиридоксальфосфатом из-за высокого оптического поглощения раствора кинетику ферментативной реакции регистрировали по расходу кислорода полярографически с помощью электрода Кларка с полиэтиленовой мембраной. Модификацию фермента проводили непосредственно в спектрофотометрической кювете или полярографической ячейке перед измерением активности. Модификацию заканчивали введением всех реагентов, необходимых для измерения активности, и регистрировали кинетику ферментативной реакции. За ходом модификации следили по измерению активности PGH-синтетазы.

Инкубация апо-PGH-синтетазы с пиридоксальфосфатом или уксусным альдегидом в концентрации 10 мМ в течение 10–50 мин не приводит к изменению активности PGH-синтетазы.

Взаимодействие апо-PGH-синтетазы с *n*-хлормеркурибензоатом приводит к потере активности фермента. При концентрации бензоата 100 мкМ кинетика инактивации описывается экспоненциальным законом. Константа скорости инактивации 1-го порядка не зависит от присутствия гемина и субстратов. При концентрации гомогенного фермента 5·10⁻⁴ мг/мл и 100 мкМ РСМВ константы скорости инактивации составляют (мин⁻¹) : 0,87

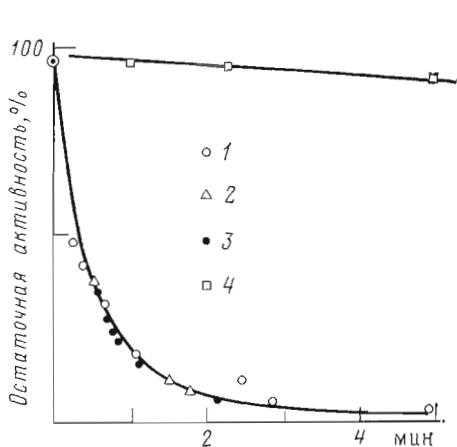


Рис. 1

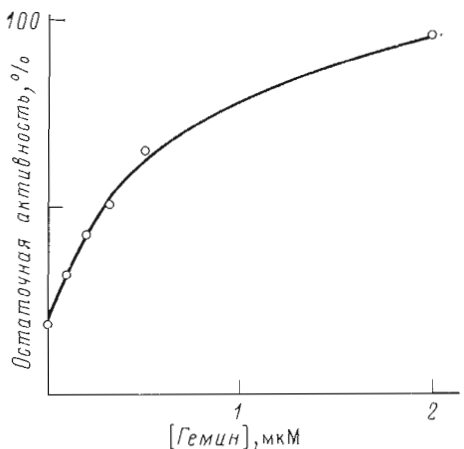


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика инактивации РGH-синтетазы в присутствии диэтилпирокарбоната: 1 — апофермент, 2 — апофермент + 0,1 мМ арахидоновая кислота, 3 — апофермент + 10 мМ $K_4Fe(CN)_6$, 4 — холофермент (апофермент + 2 мкМ гемин) + 10 мМ $K_4Fe(CN)_6$. Концентрация солилилизированного фермента 0,035 мг суммарного белка / мл, концентрация диэтилпирокарбоната 150 мкМ

Рис. 2. Защитный эффект гемина по отношению к инактивации РGH-синтетазы диэтилпирокарбонатом. Время инкубации с диэтилпирокарбонатом 1 мин. Концентрация фермента и модификатора как на рис. 1

(в отсутствие гемина и субстратов), 0,83 (в присутствии 2 мкМ гемина и 1 мМ адреналина), 0,89 (в присутствии 0,1 мМ арахидоновой кислоты и 1 мМ адреналина). Однако взаимодействие апо-РGH-синтетазы с дитио-бис(нитробензойной кислотой) (100 мкМ) и иодацетамидом (10 мМ) в течение 30 мин не приводит к изменению активности фермента. Полученные данные не позволяют сделать однозначного вывода о роли SH-групп в работе РGH-синтетазы.

Инкубация апо-РGH-синтетазы с диэтилпирокарбонатом вызывает инактивацию фермента, причем насыщающие концентрации гемина (но не субстратов) полностью стабилизируют фермент (рис. 1). Результаты могут быть описаны в рамках модели, включающей в себя апофермент, взаимодействующий с диэтилпирокарбонатом с полной потерей активности, и холофермент, неспособный к такому взаимодействию. Анализ модели при условии $[РGH-синтетаза] \ll [гемин]$ приводит к следующему уравнению, связывающему остаточную активность после фиксированного времени инкубации с концентрацией гемина:

$$A/A_0 = \exp\{-C/(K_{дис} + [гемин])\},$$

где A/A_0 — степень сохранения активности, $K_{дис}$ — константа диссоциации холофермента, C — параметр, зависящий от концентрации модификатора, константы скорости модификации и времени инкубации.

Приведенное уравнение адекватно описывает экспериментальные результаты (рис. 2). Параметры уравнения были оценены методом наименьших квадратов. Оценка $K_{дис}$, равная 0,17 мкМ, хорошо совпадает с величиной $K_{дис}$, полученной при изучении зависимости активности фермента от концентрации гемина [21]. Это свидетельствует о том, что гемин связывается в одном и том же центре как при образовании активного холофермента, так и при стабилизации фермента к действию диэтилпирокарбоната.

Приведенные результаты позволяют высказать гипотезу о наличии в активном центре РGH-синтетазы остатка гистидина. Эта гипотеза подтверждается характером инактивации под действием диэтилпирокарбоната, а также тем, что для многих гемопротеинов характерна аксиальная координация атома железа гема с имидазолом [3]. Считается, что инактивация РGH-синтетазы в ходе реакции имеет окислительный характер [4].

Поэтому обнаружение важных для проявления активности и легкоокисляемых остатков гистидина, на наш взгляд, представляет несомненный интерес с точки зрения изучения процесса инактивации PGH-синтетазы в ходе реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roth G. J., Siok C. J. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 11, p. 3782—3784.
2. Мевх А. Т., Голуб Н. Б., Варфоломеев С. Д., Филиппович Е. И., Макаров В. А., Евстигнеева Р. П. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1056—1062.
3. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974, с. 437—440.
4. Вржещ П. В. Кинетика и механизм действия PGH-синтетазы. Канд. дис. М.: МГУ, 1983.

Поступило в редакцию
7.IX.1983

ON THE NATURE OF FUNCTIONAL GROUPS CONTROLLING THE PROSTAGLANDIN ENDOPEROXIDE SYNTHETASE ACTIVITY

GOLUB N. B., MEVKH A. T., VARFOLOMEEV S. D.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The influence of some reagents modifying NH_2 -, SH-groups or imidazole moiety, on the prostaglandin endoperoxide synthetase activity was studied. Acetaldehyde, pyridoxal phosphate, dithiobis(nitrobenzoic) acid and iodoacetamide were found not to affect the enzyme activity. The activity was abolished as a result of the interaction with *p*-chloromercuribenzoic acid and diethyl pyrocarbonate. The hemin completely protected the apo-enzyme against the inactivation with diethyl pyrocarbonate. The assumption about the presence of imidazole moiety in the active site of the enzyme was made.