



УДК 577.152.9

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП  
ПРОТОГЕМИНА IX НА СВОЙСТВА  
ЭНДОПЕРОКСИДПРОСТАГЛАНДИНСИНТЕТАЗЫ

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

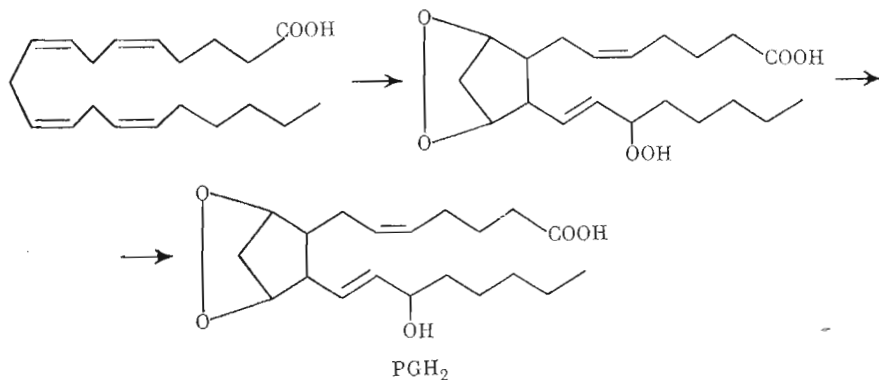
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Филиппович Е. И., Макаров В. А., Евстигнеева Р. П.

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

Изучено влияние протогемина IX и его аналогов с модифицированными карбоксильными группами (моно- и диметилового эфиров, а также моноамидов с Val-Phe-OCH<sub>3</sub> и Leu-His-OCH<sub>3</sub>) на активность эндопероксидпростагландинсинтетазы (КФ 1.14.99.1), выделенной в виде апофермента (PGH-синтетазы) из везикулярных желез барана. Для холоферментов с перечисленными соединениями в качестве протетической группы определены наблюдаемые константы диссоциации, относительные активности и константы скорости инактивации в процессе реакции. Для холоферментов с протогеминем IX и его моно- и диметиловыми эфирами изучено влияние твина-20 на эти параметры. Показано, что модификация одной карбоксильной группы протогемина IX заметно увеличивает константу диссоциации соответствующего холофермента и практически не влияет на его каталитическую активность. Модификация обеих карбоксильных групп протогемина IX значительно ухудшает его связывание с апоферментом и заметно уменьшает каталитическую активность холофермента.

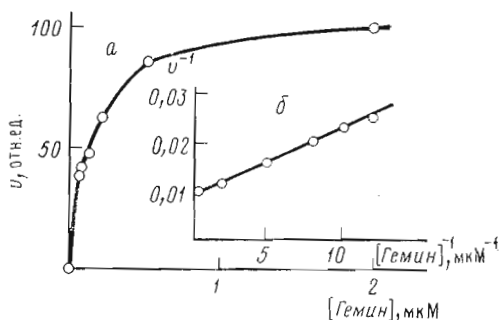
Эндопероксидпростагландинсинтетаза (КФ 1.14.99.1) является ключевым ферментом синтеза простагландинов и тромбоксанов. Этот фермент катализирует стадии реакции, общие для биосинтеза этих физиологически активных соединений — превращение арахидоновой кислоты в простагландин H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>):



Одно из необходимых условий для проявления активности эндопероксидпростагландинсинтетазы — присутствие протогемина IX, легко отщепляемой протетической группы фермента [1–4]. Роль протогемина IX могут играть также некоторые гемсодержащие белки, например миоглобин и гемоглобин, и ряд аналогов протогемина IX, например Mn-протопорфирина IX, мезогемин, гем а [5]. Протогемин IX не может быть заменен неорганическим железом или свободным порфирином [5].

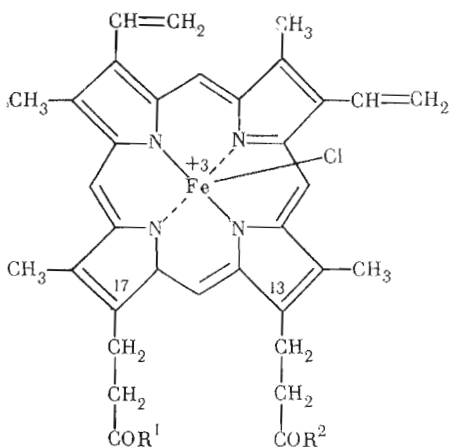
Эффективным методом исследования гемпротеинов является изучение связи между функцией белка и структурой гема. Этот метод был успешно применен для изучения пероксидазы [6, 7] и метмиоглобина [8]. В настоящей работе мы провели кинетическое исследование влияния мо-

Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации протогемина IX в прямых (а) и обратных (б) координатах. Скорость реакции выражена в % относительно активности фермента в стандартных условиях. Концентрация твина-20 — 1%



дификации карбоксильных групп протогемина IX на следующие характеристики эндопероксидпростагландинсинтетазы: константу диссоциации холофермента, его каталитическую активность и константу инактивации в процессе ферментативной реакции. За ходом ферментативной реакции следили по окисленной форме *L*-адреналина. В качестве аналогов протогемина IX (I) изучали соединения (II) — (V)\*.

R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>: -OH, -OH (I); -OH, -OCH<sub>3</sub> (II);  
-OH, -Val-Phe-OCH<sub>3</sub> (III); -OH, -Leu-  
His-OCH<sub>3</sub> (IV); -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub> (V)



Используемые в работе препараты эндопероксидпростагландинсинтетазы, выделенной в виде апофермента (PGH-синтаза), практически не проявляли активности в отсутствие экзогенного гемина.

Типичная зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации протогемина IX показана на рисунке. Эта зависимость описывается уравнением типа уравнения Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{V_{\text{каж}} [\text{гемин}]}{K'_{\text{дис}} + [\text{гемин}]}, \quad (1)$$

где  $v$  — начальная скорость реакции,  $K'_{\text{дис}}$  — наблюдаемая константа диссоциации холофермента,  $V_{\text{каж}}$  — наблюдаемая максимальная скорость реакции.

Найдено, что фермент способен проявлять активность при замене протогемина IX на его аналоги с модифицированными карбоксильными группами. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации аналога гемина (I) также может быть описана уравнением (1). Из зависимостей, полученных экспериментально, в обратных координатах находили параметры  $V_{\text{каж}}$  и  $K'_{\text{дис}}$ .

Параметр  $V_{\text{каж}}$  можно интерпретировать как активность PGH-синтетазы при насыщении протогеминем IX или его производным, т. е. как активность холофермента или модифицированного холофермента. Значения этих параметров, полученные при концентрации твина-20, равной 1%

\* Номенклатура производных гемина дана по рекомендации IUPAC [9].

Влияние модификации карбоксильных групп протогемина IX на наблюдаемую константу диссоциации холофермента, на его активность и константу инактивации в процессе ферментативной реакции  $K_{in}$   
Концентрация твина-20 — 1%

Простетическая группа холофермента	$K_{дис}$ , мкМ	$V_{каж}$ , отн. ед.	$k_{in}$ , мин <sup>-1</sup>
(I)	0,18	108	0,20
(II)	0,5	91	0,17
(III)	0,7	101	0,13
(IV)	1,3	97	0,21
(V)	1,0	15	0,10

Примечание. Активность фермента выражена в % относительно активности в стандартных условиях.

Таблица 2

Влияние концентрации твина-20 на наблюдаемую константу диссоциации и относительную активность холоферментов (I), (II) или (V) в качестве простетической группы

Концентрация твина-20, %	Простетическая группа холофермента					
	(I)		(II)		(V)	
	$K'_{дис}$ , мкМ	$V_{каж}$ , отн. ед.	$K'_{дис}$ , мкМ	$V_{каж}$ , отн. ед.	$K'_{дис}$ , мкМ	$V_{каж}$ , отн. ед.
0,05	0,013	146	0,06	154	—	—
0,1	0,025	135	0,08	131	1,1	49
0,5	0,1	119	—	—	—	—
1,0	0,18	108	0,5	91	1,0	15

Примечание. Активность фермента выражена в % относительно активности в стандартных условиях.

(табл. 1), свидетельствуют о том, что модификация одной карбоксильной группы протогемина IX оказывает существенное влияние на связывание его с апоферментом. Каталитическая активность холофермента при этом практически не изменяется. Модификация обеих карбоксильных групп протогемина IX не только значительно ухудшает его связывание с апоферментом, но и приводит к потере ферментативной активности холофермента.

Зависимости начальной скорости реакции от концентрации гемина (I) и его моно- и диметилового эфиров (II, V) были изучены при нескольких концентрациях твина-20, получены соответствующие значения  $K'_{дис}$  и  $V_{каж}$  (табл. 2). Характерно сильное ингибирование твином-20 связывания протогемина IX и его монометилового эфира с апоферментом и отсутствие этого эффекта в случае диметилового эфира.

Зависимости  $K'_{дис}$  от концентрации твина-20 могут быть описаны уравнением

$$K'_{дис} = K_{дис} \left( 1 + \frac{[твин-20]}{K_i} \right), \quad (2)$$

где  $K_{дис}$  — константа диссоциации холофермента в условиях  $[твин-20] \rightarrow 0\%$ ,  $K_i$  — константа ингибирования твином-20 связывания простетической группы с апоферментом.

Из зависимости  $K'_{дис}$  от концентрации твина-20 в соответствии с уравнением (2) определены значения параметров  $K_i$  (только для (I) и (II)) и  $K_{дис}$  (табл. 3).

Параметр  $K_{дис}$  можно интерпретировать как константу диссоциации холофермента (с нативной или модифицированной простетической груп-

Влияние степени замещения карбоксильных групп протогемина IX на константу диссоциации холофермента в отсутствие твина-20 и на константу ингибирования твином-20 связывания простетической группы с апоферментом

Простетическая группа холофермента	$K_{дис}$ , мМ	$K_i$ , г/л
(I)	0,005	0,4
(II)	0,03	0,8
(V)	1	>10

пой) в отсутствие поверхностно-активного вещества. Непосредственное определение этой константы затруднено, поскольку PGN-синтетазы может находиться в растворе только в присутствии поверхностно-активного вещества.

Из данных табл. 2, 3 видно, что при уменьшении концентрации твина-20 происходит резкая дифференциация констант диссоциации холоферментов, содержащих в качестве простетической группы гемин (I) или его моно- и диметилловый эфиры, т. е. проявляется ярко выраженная корреляция между числом свободных карбоксильных групп простетической группы и прочностью ее связывания с апоферментом. Аналогичная зависимость связывает, по-видимому, число свободных карбоксильных групп простетической группы с параметром  $K_i$ .

Сложный характер имеет зависимость наблюдаемых максимальных скоростей ферментативной реакции от концентрации твина-20 (табл. 2). В этом случае также наблюдается ингибирование твином-20. При уменьшении концентрации детергента происходит нивелирование максимальных скоростей и соответственно каталитических констант модифицированных холоферментов. Так, при концентрации твина-20, равной 1%, отношение максимальных скоростей реакций, катализируемых PGN-синтетазой в присутствии гемин (II) и (I), составляет 0,84, а при концентрации твина-20, равной 0,1%, — уже 0,96. Аналогично это отношение для реакций с ферментом, имеющим в качестве простетической группы соединения (V) и (I), возрастает с 0,14 до 0,36. Эти данные свидетельствуют о том, что при низких концентрациях твина-20 различие каталитических констант модифицированных холоферментов невелико.

Для холоферментов с модифицированной простетической группой, как и для холофермента, содержащего протогемин IX, наблюдается характерная инактивация в ходе ферментативной реакции. Кинетические кривые имеют экспоненциальный характер. Константы скорости инактивации ( $k_{in}$ ) фермента в ходе реакции, полученные в условиях насыщения апофермента по простетической группе, при замене протогемина IX на его производные меняются незначительно (табл. 1).

Таким образом, из результатов работы следует, что модификация карбоксильных групп протогемина IX приводит к значительному ухудшению его связывания с PGN-синтетазой и слабо сказывается на каталитической константе и константе скорости инактивации холофермента. Это позволяет сделать вывод о том, что карбоксильные группы протогемина IX играют важную роль в связывании с апоферментом, но не принимают участия ни в каталитическом акте, ни в процессах инактивации фермента в ходе реакции.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали арахидоновую кислоту (Fluka, Швейцария), L-адrenalин (Merck, ФРГ), натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), протогемин IX, дитионит натрия, диэтилдитиокарбамат натрия (Sigma, США), твин-20 (Ferak, Зап. Берлин), трис(оксиметилден)-

аминометан (трис) — отечественный препарат марки ч. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L 100/160 мкм (ЧССР). Состав фракций, а также гомогенность синтезированных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol (ЧССР). Пиридин марки ч. дважды перегоняли над щелочью. Остальные реактивы были отечественного производства марки х. ч. В качестве источника фермента использовали везикулярные железы барана, полученные на Алма-Атинском мясоконсервном комбинате. Железы хранили при  $-40^{\circ}\text{C}$ .

*13(17)-Монометиловый эфир протогемина IX (II).* К раствору 500 мг протогемина IX в 30 мл абс. пиридина, охлажденному до  $0^{\circ}\text{C}$ , приливали в течение 20 мин 0,12 мл пивалоилхлорида. Реакционную массу перемешивали 5 мин при  $0^{\circ}\text{C}$  и добавляли 10 мл абс. метанола. Через 15 мин перемешивания при  $20^{\circ}\text{C}$  растворитель удаляли, остаток растворяли в 500 мл хлороформа и промывали 0,1 н. HCl ( $3 \times 250$  мл) и водой ( $2 \times 300$  мл). Хлороформный раствор сушили сульфатом натрия, растворитель удаляли, остаток хроматографировали на колонке ( $4 \times 40$  см) в системе хлороформ — метанол — триэтиламин, 9:1:0,1. Целевую фракцию собирали, разбавляли хлороформом до 250 мл и промывали 0,1 н. HCl ( $3 \times 150$  мл) и водой ( $2 \times 150$  мл), после чего хлороформный слой энергично встряхивали с насыщенным раствором NaCl, доведенным до pH 5, сушили сульфатом натрия, растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 25 мл хлороформа и осаждали гексаном. Осадок промывали 20 мл гексана и сушили в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и парафином. Выход 220 мг (33%),  $R_f$  0,33 (гексан — хлороформ — метанол, 1:1:0,3),  $R_f$  0,45 (хлороформ — метанол, 9:1). Найдено, %: C 63,32; H 5,19; N 8,75.  $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{FeClN}_4\text{O}_4$ . Вычислено, %: C 63,12; H 5,15; N 8,41.

*Метиловый эфир N<sup>α</sup>[протогемин IX—13<sup>3</sup>(17<sup>3</sup>)]валилфенилаланина (III).* К раствору 0,5 г протогемина IX в 30 мл абс. пиридина при  $0^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин приливали 0,17 мл пивалоилхлорида и выдерживали 10 мин при  $0^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляли метиловый эфир валилфенилаланина, полученный прибавлением 0,07 мл триэтиламина к 0,121 г трифторацетата метилового эфира валилфенилаланина. Реакционную массу перемешивали 20 мин и приливали 10 мл воды. Растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и наносили на колонку ( $4 \times 40$  см), элюируя хлороформом и смесью хлороформа с метанолом. Фракцию, содержащую целевой продукт, упаривали, растворяли в хлороформе и хлороформный раствор промывали насыщенным раствором NaCl. Растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Выход 0,346 г (50,9%).  $R_f$  0,40 (хлороформ — метанол, 4:1),  $R_f$  0,64 (бензол — метанол — ацетон, 8:2:1). УФ-спектр (хлороформ),  $\nu_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon \cdot 10^{-5}$ ): 395 (80,5), 511 (8,35), 542 (7,25); ИК-спектр (хлороформ),  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3300 (NH), 1740 (CO сложного эфира), 1710 (CO в COOH), 1670 (амид I), 1540 (амид II). Найдено, %: C 66,19; H 5,95; N 9,51.  $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{FeN}_6\text{O}_7$ . Вычислено, %: C 66,15; H 6,11; N 9,26. Аминокислотный анализ: Val 0,94 (I); Phe 1,03 (I).

*Диметиловый эфир протогемина IX (V)* получали по методу [10].

*Метиловый эфир N<sup>α</sup>[протогемин IX—13<sup>3</sup>(17<sup>3</sup>)]лейцилгистидина (IV)* получали по методу [11].

Раствор протогемина IX в буфере, содержащем 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8,0) и 1% твина-20, готовили по методике [12]. Для определения концентрации аликвоту полученного раствора объемом 10—20 мкл вводили в 2 мл 20% пиридина в 0,1 н. NaOH в присутствии дитионита натрия. Затем измеряли поглощение при 557 нм.

Коэффициент молярного поглощения образующегося гемохрома равен  $34\,400\ \text{M}^{-1}\ \text{см}^{-1}$  [12]. Полученный раствор разбавляли до концентрации 0,2 мМ тем же буфером. Раствор хранили в темноте при  $4^{\circ}\text{C}$  не более недели.

Водные растворы солибутилизированных производных протогемина IX в буфере, содержащем 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8,0) и 1% твина-20, готовили, растворяя производные в ацетоне, добавляя затем указанный буфер и удаляя ацетон отдувной воздухом при  $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Концентрацию полученных растворов (10—20 мкМ) определяли по описан-

ной выше методике, увеличивая аликвоты до 100–300 мкл. Постоянное значение поглощения при 557 нм устанавливалось через 5 мин для диметиллового эфира протогемина IX и через 1 мин для его монопроизводных. После этого спектр поглощения в области 415–600 нм совпадал с описанным для протогемина IX [12]. Коэффициент молярного поглощения принимали равным  $34\,400\text{ M}^{-1}\text{ см}^{-1}$ . Экспериментальный коэффициент молярного поглощения производных протогемина IX, найденный при использовании приготовленных по навеске ацетоновых растворов, отличался от указанного значения не более чем на 4%.

Выделение солиобилизованного фермента из везикулярных желез барана проводили по методу [2] с некоторыми изменениями.

Железы (130–150 г) измельчали в жидком азоте. Дальнейшие операции проводили при 0–4° С. Порошок суспендировали в 450 мл буфера (рН 8,0), содержащего 50 мМ трис-НСl, 10 мМ EDTA, 1 мМ диэтилдитиокарбамат натрия и 0,1% твина-20. Полученный гомогенат центрифугировали при 8000 *g* в течение 10 мин. Супернатант профильтровывали через два слоя марли для удаления жира и центрифугировали 2 ч при 105 000 *g*. Осадок микросом ресуспендировали в 120 мл буфера (рН 8,0), содержащего 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 мМ EDTA, 0,5 мМ диэтилдитиокарбамат натрия, 0,1 М  $\text{NaClO}_4$ , и центрифугировали 1 ч при 200 000 *g*. Осадок промытых перхлоратом микросом ресуспендировали в буфере (рН 8,0), содержащем 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 мМ EDTA, 0,1 мМ диэтилдитиокарбамат натрия, 1% твина-20, и центрифугировали 1 ч при 200 000 *g*. Полученный супернатант — солиобилизованный фермент — представлял собой почти бесцветный прозрачный раствор. Фермент хранили при –40° С. Перед использованием размороженный раствор фермента инкубировали 6 ч при 20° С. Концентрация белка в различных выделениях фермента варьировалась в пределах 1–2 мг/мл, удельная активность — в пределах 1–2,5 мкмоль адrenoхрома/мин · мг белка.

Кинетические эксперименты проводили в буфере, содержащем 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 8,0), при 32° С. Активность фермента определяли адrenoхромным методом [13]. В стандартных условиях концентрация арахидоновой кислоты равнялась 0,1 мМ, *L*-адrenalина — 1 мМ, протогемина IX — 2 мкМ, твина-20 — 1%, объем раствора составлял 2 мл. Реакцию инициировали добавлением 20 мкл раствора фермента, изменение поглощения регистрировали при 480 нм. Согласно работе [14], коэффициент молярного поглощения образующегося адrenoхрома равен  $4000\text{ M}^{-1}\text{ см}^{-1}$ . Кинетические эксперименты проводили аналогично. Во всех случаях были постоянны концентрации арахидоновой кислоты (0,1 мМ) и *L*-адrenalина (1 мМ). Концентрации протогемина IX или его аналога и твина-20 варьировали. Начальную скорость определяли как тангенс угла наклона касательной к кинетической кривой в начальный момент времени и выражали в процентах относительно активности фермента в стандартных условиях, что давало возможность сравнивать результаты, полученные для различных порций фермента.

Константу инактивации фермента в ходе реакции определяли из спрямления кинетической кривой по Гугенгейму.

#### 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. Ogino N., Ohki S., Yamamoto S., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 14, p. 5061–5068.
6. Roth G. J., Nachuga E. T., Strittmatter P. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 10, p. 10018–10022.
7. DiNello R. K., Dolphin D. H. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 10, p. 6903–6912.

8. Araiso T., Dunford H. B. Arch. Biochem. and Biophys., 1981, v. 211, № 1, p. 346-351.
9. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) – Eur. J. Biochem., 1980, v. 108, № 1, p. 1-30.
10. Fisher H., Orth H. Die Chemie des Pyrrols. Leipzig: Acad. Verlagsgesellschaft, 1937, B. 11, S. 378.
11. Радюхин В. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. Ж. общ. химии, 1980, т. 50, № 3, с. 673-678.
12. Folk J. E. Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam – New York – London: Elsevier, 1964, v. 2, p. 181.
13. Takeguchi C., Sih C. J. Prostaglandins, 1972, v. 2, № 3, p. 169-184.
14. Green S., Mazur A., Shorr E. J. Biol. Chem., 1956, v. 220, № 1, p. 237-255.

Поступила в редакцию  
30.XII.1982  
После доработки  
9.III.1983

**PROSTAGLANDIN SYNTHETASE. THE EFFECT OF MODIFICATION<sub>1</sub>  
OF CARBOXYLIC GROUPS IN PROTOHEMIN IX ON THE PROSTAGLANDIN  
ENDOPEROXIDE SYNTHETASE ACTIVITY**

MEVKH A. T., GOLUB N. B., VARFOLOMEEV S. D., PHILIPPOVITCH E. I.,  
MAKAROV V. A., EVSTIGNEEVA R. P.

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

The effect of protohemin IX and its modified analogs (monomethyl ester, dimethyl ester, as well as monoamides with Val-Phe-OCH<sub>3</sub> or Leu-His-OCH<sub>3</sub>) has been examined on the activity of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands (PGH-synthetase, EC 1.14.99.1, isolated as apoenzyme). For holoenzymes having the above compounds as prosthetic groups, the dissociation constants, relative activities and the apparent inactivation constants in the course of the reaction have been determined. The effect of Tween 20 on the indicated parameters for holoenzymes with protohemin IX and its mono- and dimethyl esters has been studied. Modification of one of the two carboxylic groups of protohemin IX markedly increases the dissociation constant for the respective holoenzyme and virtually does not affect catalytic activity. Modification of both carboxylic groups of protohemin IX hinders the binding with the apoenzyme and strongly reduces the catalytic activity of the holoenzyme.