

На правах рукописи

Цаплина Людмила Александровна

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЦИКЛООКСИГЕНАЗНОЙ И
ПЕРОКСИДАЗНОЙ РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ
ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗОЙ

Специальность 03.00.02. - "Биофизика"

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2007

Работа выполнена на биологическом факультете и факультете биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Вржещ Петр Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Алесенко Алиса Владимировна

доктор физ.-мат. наук, профессор
Шайтан Константин Вольдемарович

Ведущая организация: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
г. Москва

Защита состоится " " _____ 2007 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория "Новая".

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан: " " _____ 2007 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Т. Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS, К.Ф.1.14.99.1) катализирует одну из ключевых реакций каскада арахидоновой кислоты - превращение арахидоновой кислоты в простагландин H_2 , исходное соединение в биосинтезе всех простагландинов, тромбоксана и простациклина в организме большинства млекопитающих, в том числе человека. PGHS имеет два активных центра, на которых протекает циклооксигеназная (окисление арахидоновой кислоты до простагландина G_2) и пероксидазная (восстановление перекисной группы простагландина G_2 до спиртовой с образованием простагландина H_2) реакции.

Фермент PGHS – димер, состоящий из одинаковых субъединиц с молекулярным весом 72 кДа. Для проявления обеих активностей ферменту необходим гемин в качестве протетической группы. Существует две изоформы PGHS: конституционная, PGHS-1 и индуцибельная, PGHS-2. В настоящей работе исследовались свойства PGHS-1 из везикулярных желез (семенных пузырьков) барана.

Между двумя активностями PGHS существуют довольно сложные взаимоотношения: циклооксигеназная реакция не протекает в отсутствие перекисей, пероксидазная реакция идет как в присутствии, так и в отсутствие арахидоновой кислоты, а также в присутствии ингибиторов циклооксигеназы. Обе реакции PGHS сопровождаются быстрой и необратимой инактивацией фермента в процессе реакции.

До настоящего времени не существовало адекватной модели, описывающей кинетику PGHS. Бифункциональный характер PGHS является причиной того, все предложенные механизмы принципиально не подходят для описания работы этого фермента, так как предполагают использование уравнения материального баланса по сумме промежуточных форм фермента, участвующих в циклооксигеназной и пероксидазной реакциях. Такие механизмы характеризуются конкуренцией между реакциями, что противоречит экспериментальным данным. Адекватных моделей, описывающих инактивацию фермента, тоже нет. Систематически инактивация двух активностей PGHS не исследовалась, поэтому остается непонятной взаимосвязь инактивационных процессов в ходе обеих реакций. Этот круг вопросов и предстояло исследовать в данной диссертационной работе.

Цель исследования. Разработать методологические подходы для экспериментального исследования кинетических закономерностей катализа и

инактивации фермента PGHS. Разработать кинетическую модель действия фермента PGHS, учитывающую его бифункциональный характер, предполагающую независимое, но взаимовлияющее, протекание реакций на одной молекуле фермента. Разработать кинетические модели инактивации фермента PGHS.

Задачи исследования:

- 1) Разработать экспериментальные подходы для исследования взаимовлияния реакций PGHS, инактивации в процессе реакции и инактивации при прединкубации с перекисями циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS, а также для получения очищенных препаратов фермента.
- 2) Исследовать кинетические закономерности взаимодействия и взаимовлияния пероксидазной и циклооксигеназной реакций PGHS.
- 3) Исследовать кинетику инактивации циклооксигеназной активности в ходе протекания циклооксигеназной и пероксидазной реакций, и кинетику инактивации пероксидазной активности в ходе протекания циклооксигеназной и пероксидазной реакций.
- 4) Исследовать кинетику инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS при прединкубации с перекисными субстратами пероксидазной реакции.
- 5) Разработать кинетические модели катализа и инактивации бифункционального фермента PGHS, учитывающие все особенности его действия и состояние его двух активных центров, основываясь на моделях многосубстратной ферментативной реакции, ферментативной реакции, подвергающейся необратимой инактивации и двумерной модели бифункционального фермента.

Научная новизна. На основе обобщенной двумерной модели действия бифункционального фермента, а также модели многосубстратной ферментативной реакции предложена кинетическая схема действия бифункционального фермента PGHS, которая в отличие от представленных в литературе схем, предусматривает

независимое протекание двух ферментативных реакций на одной молекуле фермента и взаимное влияние этих реакций.

Предложен подход, заключающийся в исследовании кинетики инактивации обеих активностей PGHS в ходе протекания как циклооксигеназной, так и пероксидазной реакций.

Показано, что при прединкубации фермента с перекисью водорода инактивация каждой активности протекает как минимум в две стадии. При прединкубации PGHS с исследуемыми перекисями концентрация последних в широком диапазоне не влияет на константу скорости инактивации пероксидазной активности. Для циклооксигеназной активности наблюдается зависимость константы скорости инактивации от концентрации перекиси, с которой проводили прединкубацию. Исследование инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS в различных условиях свидетельствует о том, что инактивация этих активностей имеет разные химические механизмы.

На основе обобщенной модели ферментативной реакции, подвергающейся необратимой инактивации, предложены модели, которые с помощью минимального количества параметров описывают наши и известные из литературы данные по инактивации PGHS.

Практическая значимость. Проведенные исследования позволили подробнее изучить свойства PGHS и расширить наши представления о механизме функционирования этого фермента.

Представленные в работе кинетические модели (двумерная модель действия бифункционального фермента, кинетическая модель инактивации в ходе реакции) могут быть использованы для анализа механизма действия конкретных бифункциональных ферментов.

Знание механизмов протекания реакций PGHS, важного фармакологического объекта, дает возможность скорректировать разработку новых лекарственных препаратов и способов контроля каскада арахидоновой кислоты *in vivo*.

Полученные в работе результаты, заключения и выводы могут быть использованы для подготовки по специализациям биофизика, катализ, биохимия и биотехнология.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на Международной конференции "Ломоносов-2004" (Москва, 2004 г.), Международной молодежной

конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2005 г.), Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2006 г.), Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пушино, 2006 г). Работа также докладывалась на семинарах кафедр биофизики, биоинженерии и биохимии биологического факультета МГУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 в научных российских журналах (по списку ВАК), 5 в тезисах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Количество страниц , ссылок , рисунков , таблиц .

Сокращения, принятые в работе. PGHS – простагландин-Н-синтаза, Tyr* - тирозил-радикал, PGG₂ - простагландин G₂, PGH₂ - простагландин H₂, AA – арахидоновая кислота, D – донор электронов, PPIX – протопорфирин IX.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В главе говорится о биологической роли и месте PGHS в

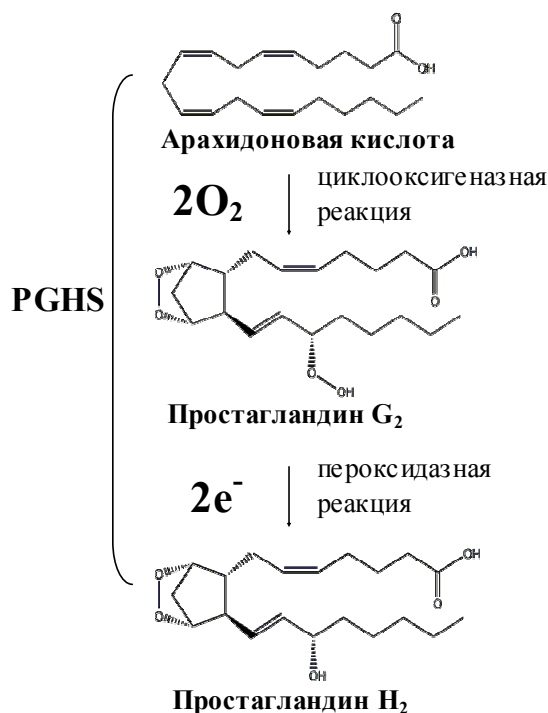


Схема 1. Схема реакций, осуществляемых ферментом простагландин-Н-синтазой (PGHS).

цепи синтеза простагландинов. Подробно рассмотрена доменная структура PGHS, структура пероксидазного и циклооксигеназного активных центров. Также подробно описаны каталитические свойства PGHS: циклооксигеназная и пероксидазная реакции, химические превращения, происходящие в ходе этих реакций. Описаны кинетические особенности действия PGHS, дан критический анализ схем, предложенных для описания этих особенностей различными авторами. Рассмотрено влияние различных ингибиторов на цикло-

оксигеназную активность фермента. Рассмотрены имеющиеся в литературе сведения по инактивации PGHS в процессе катализируемых им реакций и проанализированы кинетические схемы, предложенные другими авторами. Рассмотрены кинетические особенности бифункциональных ферментов, представлен критический анализ предложенных механизмов для описания бифункциональных ферментов, многосубстратных реакций и инактивации ферментов.

Методы исследования. 1) Солубилизированный препарат PGHS выделяли из везикулярных желез барана по методу [Van der Ouderaa et.al., 1977] с изменениями: во избежание существенных потерь фермента не добавляли твин-20 в буферный раствор для отмывки микросом.

2) Очистку солубилизированного препарата PGHS проводили методом колоночной хроматографии на носителе DEAE Sepharose. Электрофоретическая чистота полученного препарата PGHS более 95%.

3) Концентрацию белка в препаратах фермента определяли с помощью колориметрических методов [Lowry et.al., 1951, Bradford, 1976].

4) Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в денатурирующих условиях с добавлением детергента додецилсульфата натрия по методу Лэмли [Laemmli, 1970].

5) Измерение концентрации кислорода для слежения за ходом циклооксигеназной реакции PGHS осуществляли амперометрически с использованием полярографа «АКПИМ-02-05» (ООО «Фирма «Альфа БАССЕНС», Россия), снабженным газодиффузионным платино-серебряным электродом Кларка.

6) Измерение концентрации окисленной формы донора электронов для слежения за пероксидазной реакцией PGHS осуществляли с помощью спектрофотометра «Cary 100» («Varian Inc», США).

7) Методика обработки экспериментальных данных. Для получения значений констант экспериментальные данные аппроксимировали согласно полученным формулам методом нелинейной регрессии с использованием программы Origin 6.0 фирмы Microcal.

Результаты и обсуждение.

Анализ обобщенных схем. Фермент PGHS катализирует две многосубстратные реакции, каждая из которых протекает на своем активном центре

(схема 1, рис.1). Обе активности подвергаются необратимой инактивации, причем в процессе циклооксигеназной реакции может инактивироваться как циклооксигеназная, так и пероксидазная активности, а в процессе пероксидазной реакции может инактивироваться как пероксидазная, так и циклооксигеназная активности. Поэтому кинетическую схему действия PGHS целесообразно рассмотреть в общем виде, так как комбинаторный перебор всех возможных вариантов дает большое количество схем. Эта работа проведена с использованием разработанных ранее подходов [Вржещ, 1996]. Для создания кинетических моделей катализа и инактивации бифункционального фермента PGHS необходимо проанализировать модели многосубстратной ферментативной реакции, бифункционального фермента, и ферментативной реакции, подвергающейся необратимой инактивации.

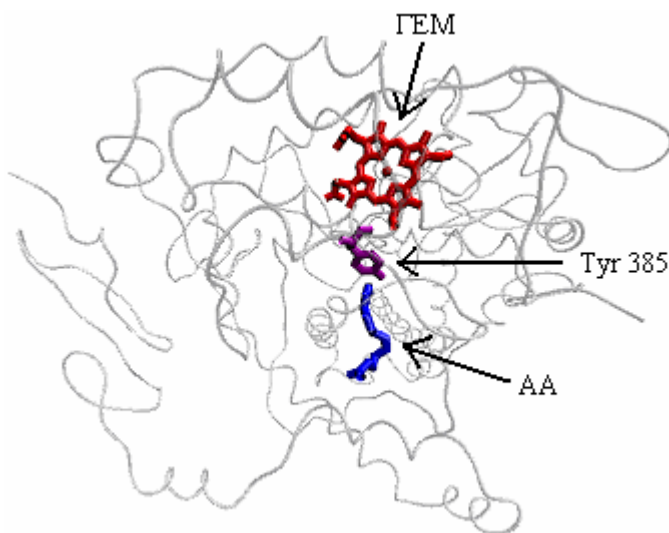


Рис.1. Ленточная диаграмма мономера PGHS-1 с арахидоновой кислотой (АА), связанной в циклооксигеназном активном центре. ГЕМ (протопорфирин IX) – активный центр пероксидазной реакции. Также на рисунке показан тирозин 385. Кристаллическая структура взята из PDB банка, ID = 1U67 [Harman et. al., 2004]. Диаграмма выполнена с помощью программы VMD (Visual Molecular Dynamics), Beckman Institute for Advanced Science and Technology.

На схеме 2 представлен механизм неразветвленной ферментативной реакции.

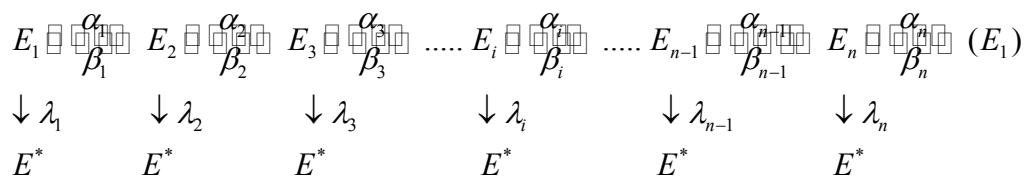


Схема 2. Обобщенная модель неразветвленной ферментативной реакции, сопровождающейся необратимой инактивацией фермента в процессе реакции.

E_i ($1 \leq i \leq n$) - каталитически активные промежуточные формы фермента (интермедиааты), α_i и β_i ($1 \leq i \leq n$) - константы скорости реакций первого (псевдопервого) порядка для реакций взаимопревращения интермедиаатов.

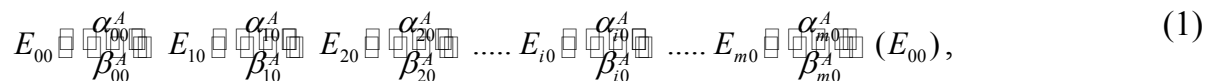
Взаимодействие субстрата с промежуточной формой фермента E_i выражается в том, что константа скорости α_i является константой скорости псевдопервого порядка и равна константе скорости второго порядка прямой реакции, умноженной на

концентрацию этого субстрата. Взаимодействие продукта с промежуточной формой фермента E_{i+1} и отщепление продукта от промежуточной формы фермента E_i выражается в том, что константа скорости β_i является константой псевдопервого порядка, и равна константе скорости второго порядка обратной реакции, умноженной на концентрацию этого продукта.

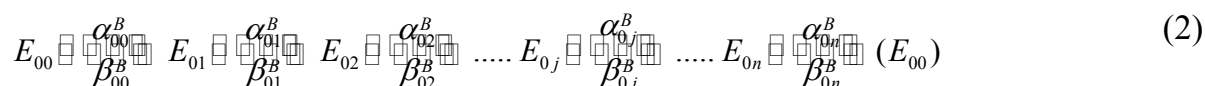
Предусмотрено, что каждая промежуточная форма фермента E_i может подвергаться необратимой инактивации (E^* - инактивированные формы фермента). Процессы необратимой инактивации интермедиатов E_i характеризуются константами скорости первого (псевдопервого) порядка $\lambda_i \geq 0$ ($1 \leq i \leq n$). В данной работе проанализированы уравнения, описывающие подобные схемы (схема 2) и определены качественные критерии кинетического поведения таких схем, необходимых для построения кинетической схемы PGHS.

Бифункциональный фермент катализирует протекание двух необратимых реакций (А и В). Кинетика реакций описывается в рамках механизма упорядоченной (неразветвленной) многосубстратной ферментативной реакции ((1) и (2)).

Реакция А:



Реакция В:



Наличие у фермента двух активных центров приводит к необходимости в кинетических схемах одновременно учитывать состояние первого и второго активного центра, интермедиаты в кинетических схемах должны характеризоваться двумя индексами. Учет независимого изменения величин двух индексов превращает кинетические схемы в «двумерные».

При одновременном присутствии компонентов реакций А и В и независимом одновременном протекании реакций А и В суммарный механизм процесса будет иметь двумерный характер и может быть представлен в виде матрицы, фрагмент которой на примере промежуточной формы E_{kl} показан на схеме 3.

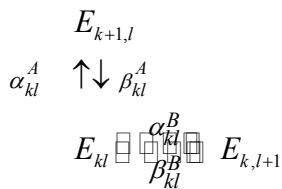


Схема 3. Фрагмент обобщенной двумерной модели действия бифункционального фермента.

Предусматривается, что в результате завершения цикла в вертикальном направлении происходит один оборот реакции А, в результате завершения цикла в горизонтальном направлении происходит один оборот реакции В. Зависимости стационарных скоростей v^A и v^B от концентраций субстратов S^A и S^B имеют вид дробно-рациональных функций (3), (4):

$$v^A = \frac{c_1[S^A] + c_2[S^A]^2 + \dots + c_{n+1}[S^A]^{n+1}}{d_0 + d_1[S^A] + d_2[S^A]^2 + \dots + d_{n+1}[S^A]^{n+1}} \quad (3)$$

$$v^B = \frac{h_0 + h_1[S^B] + h_2[S^B]^2 + \dots + h_{m+1}[S^B]^{m+1}}{g_0 + g_1[S^B] + g_2[S^B]^2 + \dots + g_{m+1}[S^B]^{m+1}} \quad (4)$$

Аналогичным образом выглядят уравнения для v^B .

Только в том случае, если протекание одной реакции не меняет величину кинетических констант другой реакции, и наоборот, реакции А и В протекают строго независимо и могут быть описаны отдельно как две независимые ферментативные реакции (1) и (2).

Бифункциональный характер фермента проявляется в отклонении от гиперболичности скорости одной ферментативной реакции в случае присутствия в реакционной среде компонентов другой реакции, а также к появлению зависимости скорости одной ферментативной реакции от концентрации субстрата другой реакции.

Необходимо также рассмотреть инактивацию бифункционального фермента. Каждый промежуточный интермедиат (схема 3) может обладать или двумя различными активностями, или одной, или не обладать активностью. В общем виде рассматривать инактивацию обеих активностей фермента нецелесообразно. Элементы общей схемы инактивации для частного случая рассмотрены при обсуждении конкретных экспериментов (схема 7).

Исследование взаимовлияния реакций. Исследовали влияние субстратов циклооксигеназной реакции PGHS и обратимого ингибитора циклооксигеназы

напроксена на начальную скорость пероксидазной реакции, а также субстратов пероксидазной реакции на начальную скорость циклооксигеназной реакции.

Влияние доноров электронов, субстратов пероксидазной реакции, на циклооксигеназную реакцию PGHS. Получены зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации доноров электронов TMPD, ABTS, L-адреналина, ферроцианида калия (рис.2, 3).

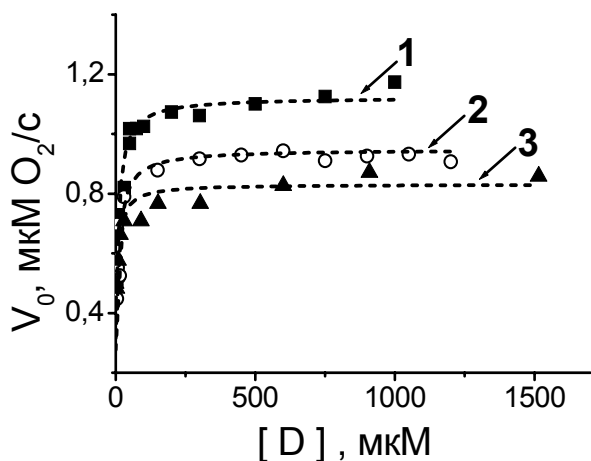


Рис.2: Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации донора электронов. Концентрация арахидоновой кислоты – 100 мкМ, гемина – 2 мкМ. Кривые построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (6). 1 – ABTS, $K_6 = 0$, $V_1/V_2 = 2,2$, $K_1/K_2 = 28$, $V_2 = 0,58$; 2 – L-адреналин, $K_6 = 0$, $V_1/V_2 = 1,6$, $K_1/K_2 = 3$, $V_2 = 0,52$; 3 – ферроцианид калия, $K_6 = 0$, $V_1/V_2 = 1,8$, $K_1/K_2 = 15$, $V_2 = 0,5$.

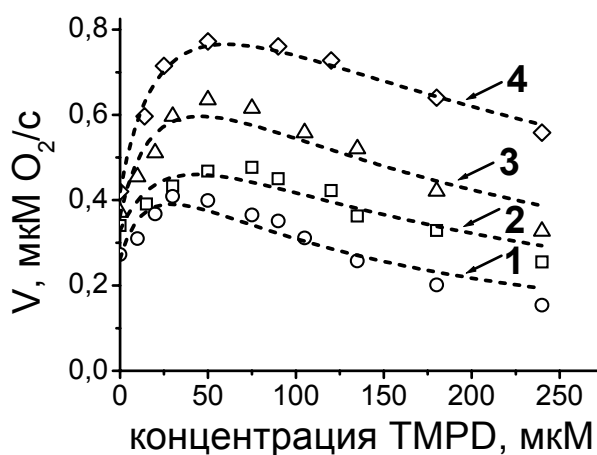


Рис.3: Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации TMPD при концентрациях арахидоновой кислоты 40, 75, 100, 180 мкМ (1 - 4 соответственно). Кривые построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (6). $V_{1cp.} = 0,66$; $V_{2cp.} = 0,22$, $K_{1cp.} = 12$; $K_{2cp.} = 0,81$; $K_{3cp.} = 1,3$; $K_{4cp.} = 0,44$.

В отсутствие донора электронов циклооксигеназная реакция протекает, однако, в присутствии донора электронов скорость циклооксигеназной реакции увеличивается. Для доноров электронов ABTS, L-адреналина и ферроцианида калия наблюдается зависимость «с насыщением» без ингибирования (Рис.2).

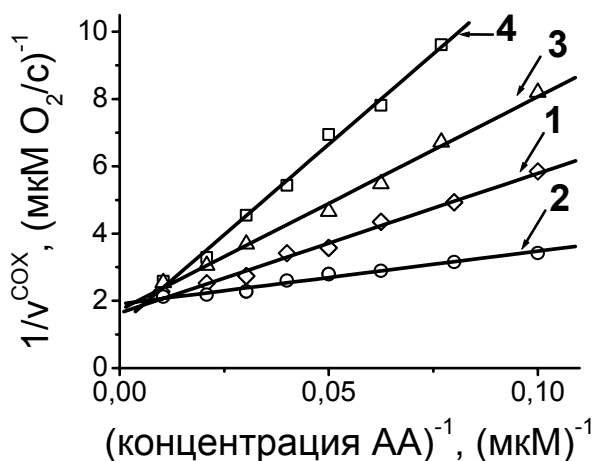


Рис.4. Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции при фиксированных концентрациях TMPD 20, 60, 90, 135 мкМ (1 – 4 соответственно) от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах. Сплошные линии построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (6). $K_1/K_2 = 2$, $V_1 = 0,75$, $V_2 = 0,22$, $K_3 = 1,3$, $K_4 = 0,44$

Увеличение концентрации донора электронов TMPD до определенного значения повышает скорость циклооксигеназной реакции, а при дальнейшем увеличении концентрации TMPD – понижает (Рис.3). Характер рисунков 3 и 4 говорит о конкурентных отношениях донора электронов TMPD и арахидоновой кислоты за центр связывания субстрата циклооксигеназной реакции, по крайней мере, неконкурентные отношения в чистом виде отсутствуют (рис.4). Так как зависимость (рис.4) является линейной в двойных обратных координатах, механизм взаимодействия фермента с арахидоновой кислотой в первом приближении можно описать в рамках модели Михаэлиса-Ментен.

Влияние перекиси водорода, субстрата пероксидазной реакции, на циклооксигеназную реакцию PGHS.

В отдельных экспериментах было показано, что добавление перекиси водорода к смеси для проведения циклооксигеназной реакции PGHS (как в отсутствие, так и в присутствии донора электронов) уменьшает начальную скорость циклооксигеназной реакции на 15-20%, и увеличивает константу скорости инактивации циклооксигеназной активности на 20-25%.

Влияние напроксена, ингибитора циклооксигеназной реакции PGHS, на циклооксигеназную и пероксидазную реакции. Напроксен относится к нестероидным противовоспалительным препаратам и является хорошо известным быстрым обратимым конкурентным ингибитором циклооксигеназной реакции PGHS. Добавление напроксена вызывает быстрое и практически полное подавление циклооксигеназной активности PGHS (рис.5).

Присутствие напроксена во время протекания пероксидазной реакции (рис.6) практически не влияет на начальную скорость, а лишь незначительно уменьшает

константу скорости инактивации PGHS в ходе пероксидазной реакции при добавлении напроксена до начала пероксидазной реакции по сравнению с контролем.

Влияние арахидоновой кислоты, субстрата циклооксигеназной реакции PGHS, на пероксидазную реакцию. В присутствии арахидоновой кислоты, добавленной до начала пероксидазной реакции, одновременно протекают пероксидазная и циклооксигеназная реакции (рис.7). Начальная скорость пероксидазной реакции практически не меняется. Добавление напроксена в эту систему также не отражается на начальной скорости пероксидазной реакции.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что активный центр пероксидазной реакции практически не чувствителен к состоянию активного центра циклооксигеназной реакции. Реализуется случай, когда протекание одной реакции не влияет на протекание другой.

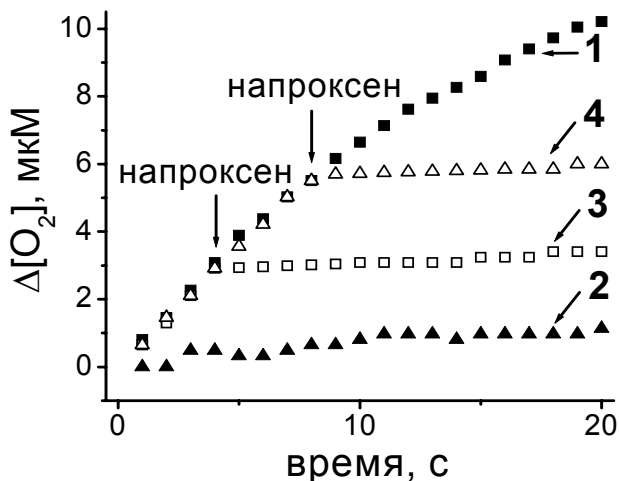


Рис.5: Влияние напроксена на кинетику циклооксигеназной реакции. 1 – контроль (ABTS – 750 мкМ, АА – 150 мкМ, гемин – 2 мкМ, PGHS – 15 мкг/мл); 2 - контроль +напроксен (1 мМ, добавлен до внесения фермента); 3 - контроль + напроксен (1 мМ, добавлен на пятой секунде реакции); 4 - контроль + напроксен (1 мМ, добавлен на десятой секунде реакции).

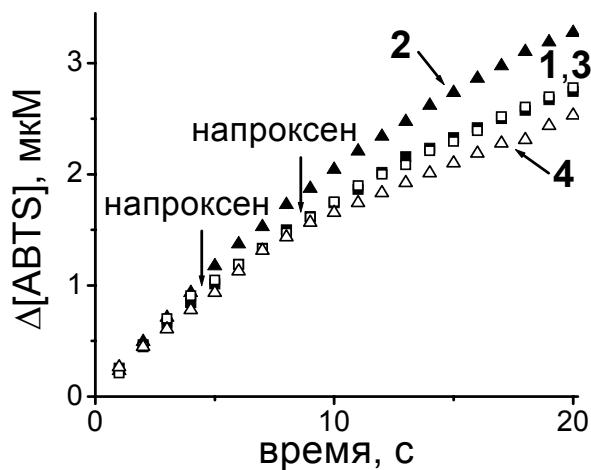


Рис.6: Влияние напроксена на кинетику пероксидазной реакции. 1 – контроль (ABTS - 750 мкМ, H₂O₂ - 1,5 мМ, PGHS - 5,4 мкг/мл); 2 - контроль + напроксен (1 мМ, добавлен до внесения фермента); 3 - контроль + напроксен (1 мМ, добавлен на 5 секунде реакции); 4 - контроль + напроксен (1 мМ, добавлен на 10 секунде реакции).

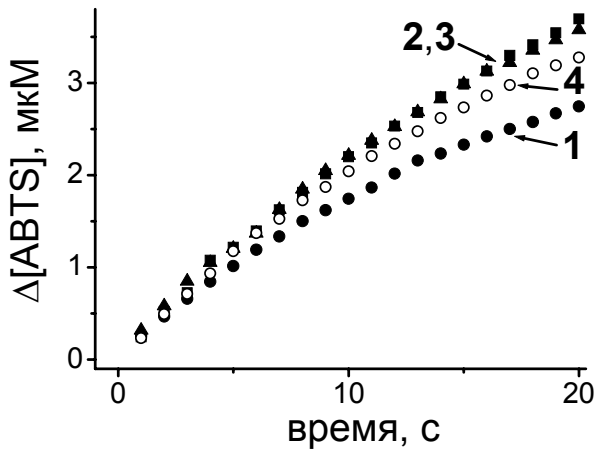


Рис.7: Влияние арахидоновой кислоты и напроксена на протекание пероксидазной реакции. 1 – контроль (ABTS - 750 мкМ, H₂O₂ - 1,5 мМ, PGHS - 5,4 мкг/мл); 2 - контроль+ арахидоновая кислота (150 мкМ, добавлена до внесения фермента); 3 - контроль+ арахидоновая кислота (150 мкМ) и напроксен (1 мМ), добавлены до внесения фермента; 4 - контроль + напроксен (1 мМ, добавлен до внесения фермента).

Кинетическая модель действия PGHS.

Требования к кинетической модели действия PGHS. Протекание пероксидазной реакции PGHS не зависит от протекания циклооксигеназной реакции. Напротив, из литературы известно, что для протекания циклооксигеназной реакции необходимы следовые количества перекиси [Hemler et. al., 1978] (в отсутствие перекисей наблюдается лаг-период). В этом случае протекает пероксидазная реакция, и происходит образование тирозил-радикала, играющего роль исходного окислителя в свободнорадикальном механизме циклооксигеназной реакции (схема.4). Скорость циклооксигеназной

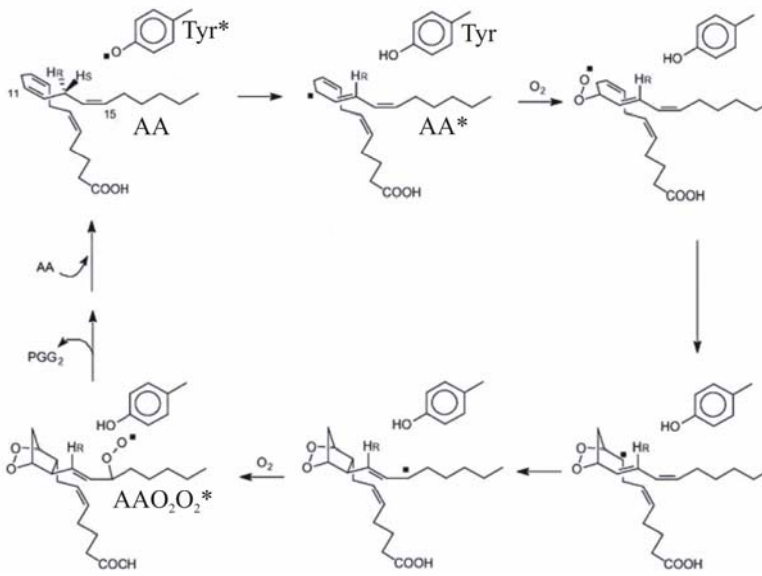


Схема 4. Этапы превращения арахидоновой кислоты в PGG₂ во время протекания циклооксигеназной реакции [Kulmacz et. al., 2003].

реакции увеличивается в присутствии донора электронов, субстрата пероксидазной реакции. Донор электронов TMPD конкурирует с субстратом циклооксигеназы за центр связывания. Циклооксигеназная и пероксидазная реакции идут одновременно, и нет явных признаков конкурентных взаимоотношений между ними.

Предполагаемая схема действия PGHS. На основании теоретических разработок обобщенной двумерной модели действия бифункционального фермента

(схема 3) нами предложена кинетическая схема действия PGHS, предусматривающая независимое протекание двух ферментативных реакций на одной молекуле фермента, допускающая взаимовлияние этих реакций (схема 5).

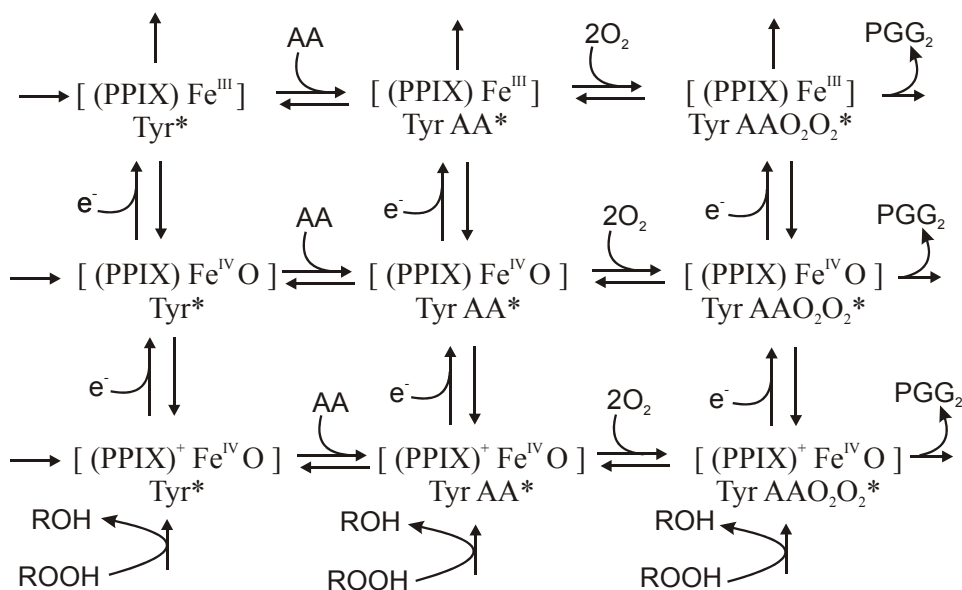


Схема 5. Схема действия PGHS.

Образование тирозил-радикала не показано, так как этот процесс происходит относительно быстро (спустя 1–2 секунды после начала реакции) [Marshall et. al., 1987], а мы рассматриваем работу фермента в стационарном приближении и характерные времена составляют десятки секунд. Правомерность такого рассмотрения подтверждается отсутствием лаг-периода в наших экспериментах.

Завершение цикла в вертикальном направлении (схема 5) соответствует одному акту катализа пероксидазной реакции, завершение цикла в горизонтальном направлении – одному акту катализа циклооксигеназной реакции. Принципиальное отличие этой схемы от всех предлагавшихся ранее состоит в том, что материальный баланс ведется отдельно по всем возможным промежуточным состояниям фермента, и реакции могут протекать по разным маршрутам.

Для схемы (схема 5) зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации донора электронов в стационарном режиме выражается следующим образом:

$$v^{\text{cox}} = \frac{e_0 + e_1[D] + e_2[D]^2 + e_3[D]^3 + e_4[D]^4 + e_5[D]^5 + e_6[D]^6}{d_0 + d_1[D] + d_2[D]^2 + d_3[D]^3 + d_4[D]^4 + d_5[D]^5 + d_6[D]^6} \quad (5)$$

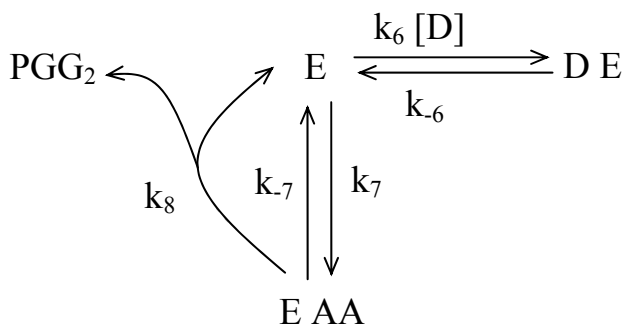
где [D] – концентрация донора электронов, константы e_i и d_i выражаются через константы скоростей элементарных стадий и концентрации других участников реакции, причем $e_i \neq 0$ ($0 \leq i \leq 4$), $d_i \neq 0$ ($0 \leq i \leq 4$). В уравнении (5) присутствует

шестая степень, за счет того, что донор электронов дважды принимает участие в механизме реакции.

Такая зависимость, при определенных соотношениях между константами e_i и d_i описывает стимулирование циклооксигеназной реакции с увеличением концентрации донора электронов. Уравнением (5) можно описать не только увеличение скорости циклооксигеназной реакции при малых концентрациях донора электронов, но и уменьшение при больших. Однако способность ингибировать циклооксигеназную реакцию зависит от природы донора электронов и не присуща всем донорам. Поэтому это явление необходимо описать отдельно.

Так как протекание пероксидазной реакции не зависит от циклооксигеназной, все кинетические константы у реакций, протекающих в вертикальном направлении, соответственно равны друг другу. В горизонтальном направлении лимитирующей стадией является стадия отщепления атома водорода от арахидоновой кислоты [Hamberg et. al., 1974], представленная на схеме 5 стадией присоединения арахидоновой кислоты.

Для описания ингибирования циклооксигеназной реакции донором электронов TMPD проведено экспериментально обоснованное упрощение схемы 5 и предложена схема 6.



На схеме 6: E – молекула фермента с тирозил-радикалом, D – донор электронов TMPD, который может конкурентно взаимодействовать с центром связывания арахидоновой кислоты.

Схема 6. Схема циклооксигеназной реакции.

Рассчитав схему 6, получим

следующую зависимость наблюдаемой стационарной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты и TMPD:

$$v_{\text{cox}} = \frac{K_1 V_2 + K_2 V_1 [D]}{K_1 + K_2 [D]} \cdot \frac{[AA]}{[AA] + K_3 (1 + K_4 [D])} \quad (6)$$

где K_1, K_2, K_3, K_4 – функции констант скоростей реакций. Экспериментально показано, что скорость циклооксигеназной реакции увеличивается при добавлении донора электронов (рис.2, 3). При этом увеличивается доля восстановленного

фермента, следовательно восстановленные формы фермента более каталитически активны по отношению к циклооксигеназной реакции.

Схема 5 и уравнение (6) описывают полученные нами экспериментальные данные (рис.2, 3, 4). Согласно уравнению (6) зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты линейна в двойных обратных координатах, что согласуется с экспериментальными данными (рис. 4).

Инактивация циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS в процессе катализа. Для исследования механизмов инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS нами был разработан методологический подход, заключающийся в том, что мы сравнивали скорость инактивации циклооксигеназной активности PGHS, обусловленной протеканием самой циклооксигеназной реакции (т.е. инактивации в процессе реакции), со скоростью инактивации пероксидазной активности PGHS, обусловленной протеканием циклооксигеназной реакции. И наоборот: сравнивали скорость инактивации пероксидазной активности PGHS, обусловленной протеканием самой пероксидазной реакции (т.е. инактивации в процессе реакции) со скоростью инактивации циклооксигеназной активности PGHS, обусловленной протеканием пероксидазной реакции.

Влияние времени инкубации фермента PGHS в условиях протекания циклооксигеназной реакции на пероксидазную и циклооксигеназную активности. Фермент инкубировали в присутствии субстратов циклооксигеназной реакции (арахионовая кислота, растворенный кислород) в стандартном буферном растворе.

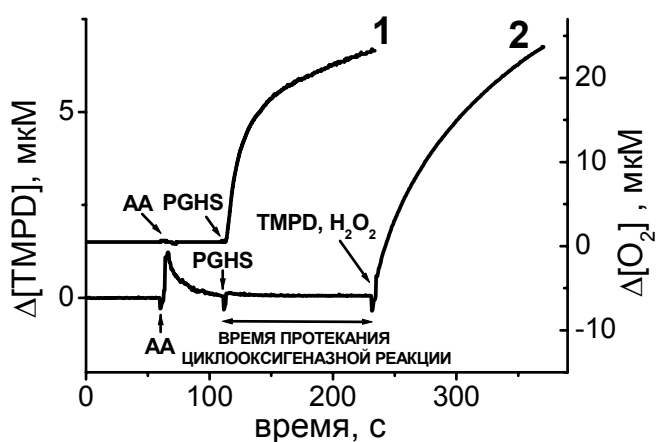


Рис.8. Кинетика изменения концентрации кислорода (кривая 1) и концентрации донора электронов (на примере TMPD) (кривая 2) в процессе инкубации PGHS с субстратами пероксидазной и циклооксигеназной реакций. 1 – Детекция концентрации кислорода, AA - 150 мкМ, PGHS – 75 мкг/мл; 2 – детекция концентрации окисленной формы TMPD, AA - 150 мкМ, PGHS – 18 мкг/мл, перекись водорода – 1,5 мМ, TMPD - 60 мкМ. Стрелками указаны моменты добавления реагентов.

После заданного времени протекания циклооксигеназной реакции с целью определения пероксидазной активности PGHS в ту же реакционную смесь

одновременно добавляли перекись водорода и донор электронов. За происходящими процессами следили с помощью полярографической и спектрофотометрической методик. Полярографически наблюдали изменение концентрации кислорода (рис.8, кривая 1), которое после добавления PGHS соответствует циклооксигеназной реакции. Спектрофотометрически следили за накоплением окисленной формы донора электронов (рис.8, кривая 2). Как видно из рис.8, после добавления донора электронов и перекиси водорода наблюдается изменение концентрации окисленной формы донора электронов вследствие пероксидазной реакции. Определяли начальную скорость пероксидазной реакции, а в качестве количественной характеристики пероксидазной активности использовали относительную активность (рис 9а, квадраты, кружки). Относительная циклооксигеназная активность представлена как функция времени протекания циклооксигеназной реакции (рис.9а, треугольники, ромбы).

Полученные экспериментальные зависимости описывали с помощью эмпирического уравнения (7), по которому определяли значения констант скорости инактивации (Λ) (аппроксимации не показаны).

$$V = V_{\infty} + V_1 e^{-\Lambda t} \quad (7)$$

Величина Λ пероксидазной активности (рис.9а) составляет 5 мин^{-1} , Λ текущей скорости циклооксигеназной активности $4,5 \div 5,5 \text{ мин}^{-1}$ (рис.9а). Аппроксимация экспериментальных данных по эмпирическому уравнению (7) дает возможность сравнивать скорости представленных процессов друг с другом и делать предположения о кинетических механизмах. В отдельных экспериментах было показано (например, рис.9а, треугольники, ромбы), что значения Λ не зависят от концентрации PGHS. На рисунках 9а, 9б и 10 представлены аппроксимации по уравнениям (9), (10). Эти уравнения получены в результате рассмотрения схемы 7 и описаны далее.

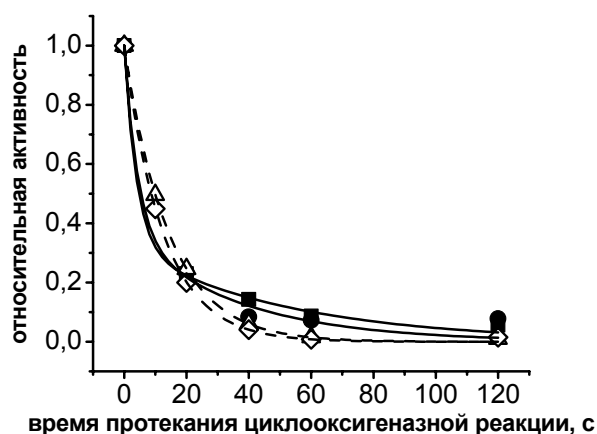


Рис.9а. Зависимость относительной пероксидазной активности ($B_{отн.}$) (квадраты, кружки) и относительной циклооксигеназной активности ($A_{отн.}$) (треугольники, ромбы) PGHS от времени протекания циклооксигеназной реакции. Квадраты - PGHS – 18 мкг/мл, AA (здесь и далее 150 мкМ), O_2 , перекись водорода (здесь и далее 1,5 мМ), TMPD (60 мкМ); кружки - PGHS – 9 мкг/мл, AA, O_2 , перекись водорода, ABTS (750 мкМ); треугольники - PGHS 45 мкг/мл, AA, O_2 ; ромбы - PGHS (75 мкг/мл), AA, O_2 . Сплошные линии построены при аппроксимации экспериментальных данных (квадраты, кружки) согласно уравнению (9), пунктирные (треугольники, ромбы) – согласно уравнению (10).

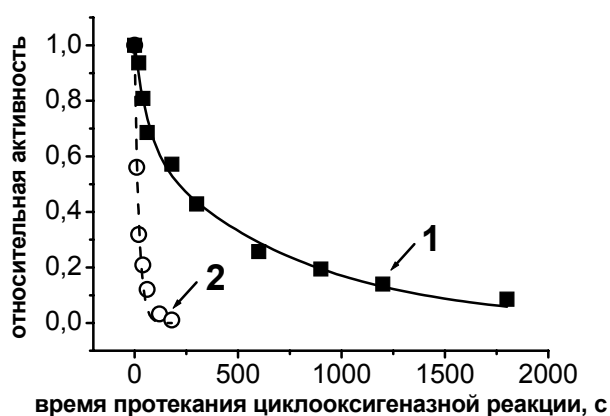


Рис.9б. Зависимость относительной пероксидазной активности ($B_{отн.}$) (1) и относительной циклооксигеназной активности ($A_{отн.}$) (2) PGHS от времени протекания циклооксигеназной реакции в присутствии донора электронов ABTS. 1 - PGHS – 9 мкг/мл, AA (150 мкМ), O_2 , ABTS (750 мкМ), перекись водорода (1,5 мМ). 2 - PGHS – 15 мкг/мл, AA (150 мкМ), ABTS (750 мкМ), O_2 . Сплошная линия построена при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (9), пунктирная – согласно уравнению (10).

Инкубация PGHS с арахидоновой кислотой, представленная на рис.9а, проводилась в отсутствие донора электронов. На рис.9б показана инактивация обеих активностей в ходе циклооксигеназной реакции в присутствии донора электронов. Значение λ пероксидазной реакции PGHS, полученное по уравнению (7) равно $0,2 \text{ мин}^{-1}$, а λ циклооксигеназной реакции - $2,9 \text{ мин}^{-1}$ (рис. 9б).

Добавление донора электронов во время протекания циклооксигеназной реакции (рис.9б) приводит к уменьшению величины λ пероксидазной и циклооксигеназной активностей PGHS, причем донор электронов предохраняет пероксидазную активность от инактивации в существенно большей степени, чем циклооксигеназную. При полной инактивации циклооксигеназной активности, сохраняется 70% пероксидазной активности (рис.9б). Можно сделать вывод о том, что инактивация пероксидазной и циклооксигеназной активностей в условиях протекания циклооксигеназной реакции идет по различным механизмам.

Влияние времени инкубации фермента PGHS в условиях протекания пероксидазной реакции на циклооксигеназную и пероксидазную активности. Фермент инкубировали в присутствии субстратов пероксидазной реакции (перекись

водорода, донор электронов). После заданного времени протекания пероксидазной реакции (время варьировали) с целью определения циклооксигеназной активности в ту же реакционную смесь добавляли арахидоновую кислоту. За происходящими процессами следили с помощью спектрофотометрической и полярографической методик. Спектрофотометрически наблюдали изменение концентрации окисленной формы донора электронов, которое после добавления PGHS соответствует пероксидазной реакции. Полярографически наблюдали изменение концентрации кислорода и определяли начальную скорость циклооксигеназной реакции. На рис. 10 представлена относительная циклооксигеназная активность, а также относительная пероксидазная активность как функция времени протекания пероксидазной реакции.

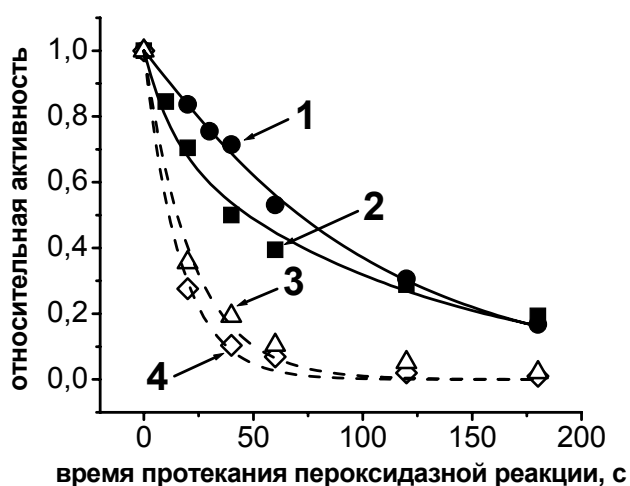


Рис.10. Зависимость относительной циклооксигеназной активности очищенного (*Вотн.*) (1, 2) и относительной пероксидазной активности солюбилизованного (*Аотн.*) препарата PGHS (3, 4) от времени протекания пероксидазной реакции. 1 - PGHS (5 мкг/мл), гемин (2 мкМ), ферроцианид калия (1,5 мМ), перекись водорода (здесь и далее 1,5 мМ), АА (150 мкМ). 2 - PGHS (5,3 мкг/мл), гемин (2 мкМ), TMPD (60 мкМ), перекись водорода, АА (150 мкМ). 3 - PGHS (216 мкг/мл), ферроцианид калия (1,5 мМ), перекись водорода. 4 - PGHS (18 мкг/мл), TMPD (60 мкМ), перекись водорода. Сплошные линии построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (9), пунктирные – согласно уравнению (10).

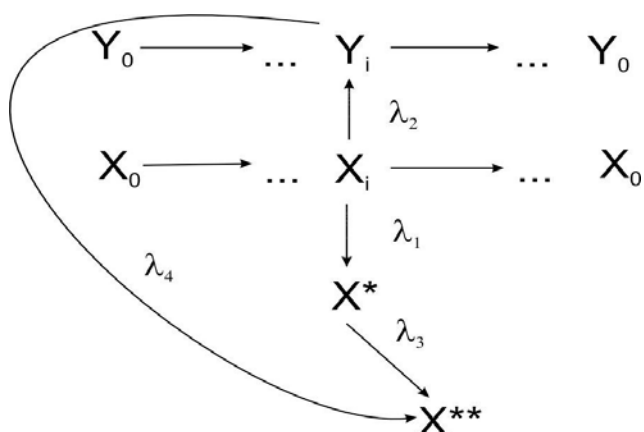
Получены значения λ для двух доноров электронов. При использовании в качестве донора электронов TMPD величина λ циклооксигеназной активности PGHS, полученная по уравнению (7), равна 1,1-1,4 мин⁻¹, а λ пероксидазной активности - 3-3,9 мин⁻¹. Для донора электронов ферроцианида калия величина λ циклооксигеназной реакции PGHS, полученная по уравнению (7), равна 0,5-1 мин⁻¹, а λ пероксидазной реакции - 2-2,7 мин⁻¹ (рис. 10).

Инактивация циклооксигеназной активности в процессе протекания пероксидазной реакции идет медленнее, чем инактивация пероксидазной, причем при использовании ферроцианида калия значения λ обеих активностей меньше, чем при использовании TMPD. При полной инактивации пероксидазы сохраняется 30-40% циклооксигеназной активности (рис.10). Можно сделать вывод о том, что инактивация пероксидазной и циклооксигеназной активностей в условиях протекания пероксидазной реакции идет по различным механизмам.

Для проведения данного (рис.10) и ряда других экспериментов (рис.11) использовали очищенный препарат PGHS. Свойства солюбилизованного и очищенного препарата одинаковы, за исключением наличия у солюбилизованного препарата каталазной активности, препятствующей измерению циклооксигеназной активности PGHS в присутствии перекиси водорода.

Кинетическая модель инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS в процессе протекания катализируемых им реакций. Так как в свободном состоянии PGHS не подвергается инактивации, и процессы инактивации происходят во время протекания реакций, следовательно, они идут через промежуточные соединения – интермедиаты. Как показывают рисунки 9а, 9б и 10, ход изменения относительных циклооксигеназной и пероксидазной активностей в ряде случаев существенно различается. Следовательно, потеря циклооксигеназной и пероксидазной активностей – различные процессы.

Если предположить, что в первом приближении процессы инактивации в ходе одной и той же инкубации протекают через одни и те же интермедиаты, то схема 2 трансформируется в схему 7. С помощью схемы 7 можно описать процессы потери пероксидазной и циклооксигеназной активностей в процессе протекания как циклооксигеназной, так и пероксидазной реакции. Рассмотрим случай потери обеих активностей в процессе протекания циклооксигеназной реакции. Циклооксигеназную активность обозначим как A , пероксидазную - как B .



На схеме 7 изображен цикл, в котором схематически показано качественное состояние свободной формы фермента и других интермедиатов. Интермедиаты $X_0 \dots X_i \dots$ обладают обеими активностями (A и B). Цикл ($X_0 \dots X_i \dots X_0$) соответствует одному

Схема 7. Кинетическая модель инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS в ходе реакции.

каталитическому циклу реакции.

Предполагается, что инактивация фер-

мента происходит через интермедиат X_i путем превращения его в каталитически неактивные интермедиаты. Циклооксигеназная активность фермента (A) инактивируется путем превращения X_i в X^* с константой скорости λ_1 . Инактивация

пероксидазной активности (B) осуществляется путем превращения интермедиата X_i с константой скорости λ_2 , с образованием интермедиата Y_i . Потерявший пероксидазную активность интермедиат Y_i сохраняет циклооксигеназную активность, то есть способность осуществлять цикл ($Y_0 \dots Y_i \dots Y_0$). Интермедиат Y_i теряет циклооксигеназную активность в результате превращения в лишенную обеих активностей промежуточную форму фермента X^{**} с константой скорости λ_4 . Форма фермента X^* обладает пероксидазной активностью (B) и теряет ее в результате превращения в X^{**} с константой скорости λ_3 . Полагаем, что для интермедиатов X_i и X^* пероксидазная активность одинакова.

Предполагаем, что все интермедиаты X и все интермедиаты Y находятся в стационарном состоянии и в первом приближении обладают одинаковыми каталитическими свойствами (константы скоростей реакции для интермедиатов X равны соответствующим константам скорости реакции для интермедиатов Y). Тогда соотношения $[X_i]/X$ и $[Y_i]/Y$ для подвергающихся инактивации интермедиатов равны друг другу и определяются концентрациями субстратов:

$$\frac{[X_i]}{X} = \frac{[Y_i]}{Y} = \alpha$$

В качестве количественных характеристик активностей удобно использовать относительные активности ($A_{\text{омн}}$) и ($B_{\text{омн}}$), то есть экспериментально наблюдаемые величины, нормированные на их значения в нулевой момент времени. Решив систему дифференциальных уравнений, соответствующих схеме 7, можно выразить $A_{\text{омн}}$ и $B_{\text{омн}}$ следующим образом:

$$A_{\text{омн}} = \frac{\lambda_1 - \lambda_4}{(\lambda_1 + \lambda_2) - \lambda_4} e^{-\alpha(\lambda_1 + \lambda_2)t} + \frac{\lambda_2}{(\lambda_1 + \lambda_2) - \lambda_4} e^{-\alpha\lambda_4 t} \quad (8)$$

$$B_{\text{омн}} = \frac{\alpha\lambda_1}{\alpha(\lambda_1 + \lambda_2) - \lambda_3} e^{-\lambda_3 t} + \frac{\alpha\lambda_2 - \lambda_3}{\alpha(\lambda_1 + \lambda_2) - \lambda_3} e^{-\alpha(\lambda_1 + \lambda_2)t} \quad (9)$$

Так как потеря ферментативной активности в процессе катализа одноименной с этой активностью реакции - это одноэкспонентный процесс (см. рис.9а, 9б, 10 [Smith, Lands, 1972]), предполагаем, что $\lambda_1 = \lambda_4$. Это оправдано, так как λ_1 и λ_4 описывают потерю циклооксигеназной активности формами фермента X_i и Y_i , обладающими одинаковыми каталитическими свойствами. Тогда:

$$A_{\text{омн}} = e^{-\alpha\lambda_1 t} \quad (10)$$

Эти формулы получены в общем виде. В уравнения (9), (10) входят всего три независимые константы, которые полностью описывают различные процессы (потеря активности в процессе протекания одноименной реакции и потеря активности в процессе протекания альтернативной реакции). Для оценки значений констант экспериментальные данные (рис.9а, 9б, 10) аппроксимировали согласно этим формулам методом нелинейной регрессии. Как видно из рисунков, экспериментальные данные хорошо описываются полученными уравнениями.

Влияние времени прединкубации фермента PGHS с перекисью водорода и третбутилпероксидом на пероксидазную и циклооксигеназную активности.

Инкубация PGHS с перекисью водорода приводит к прогрессивному уменьшению циклооксигеназной и пероксидазной активностей (концентрация перекиси водорода, используемая для проведения инкубации с ферментом и для осуществления пероксидазной реакции равна 1,5 мМ) (рис. 11).

Циклооксигеназную активность детектировали как в отсутствие донора электронов (рис. 11, квадраты), так и в присутствии донора электронов (рис. 11, ромбы). Характер указанных зависимостей сходный.

Оценка с помощью уравнения (7) значений λ показывает, что константы скорости инактивации (λ) циклооксигеназной активности при прединкубации с перекисью водорода ($\lambda = 0,7-1,1 \text{ мин}^{-1}$) меньше, чем пероксидазной ($\lambda = 4-6 \text{ мин}^{-1}$). На рисунке 11 представлены аппроксимации по уравнениям (11), (12). Эти уравнения получены в результате рассмотрения схемы 8 и описаны далее.

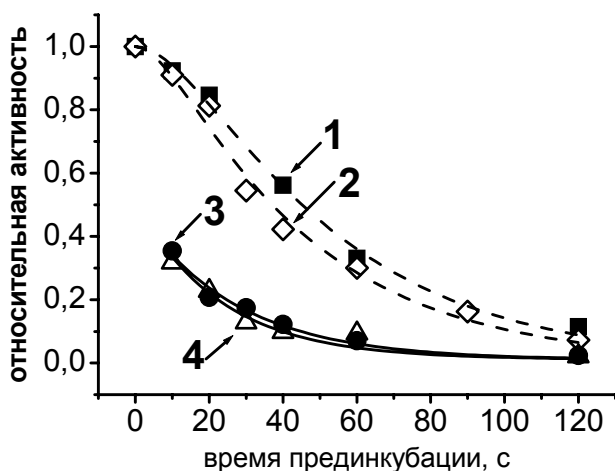


Рис.11. Зависимость относительной циклооксигеназной активности очищенного (1, 2) и относительной пероксидазной активности солюбилизированного препаратов PGHS (3, 4) (Сотн.) от времени прединкубации с перекисью водорода. 1 - PGHS (6,7 мкг/мл), гемин (2 мкМ), перекись водорода (1,5 мМ), АА (150 мкМ). 2 - PGHS (4,7 мкг/мл), гемин (2 мкМ), перекись водорода (1,5 мМ), АА (150 мкМ) и ферроцианида калия (1 мМ). 3 - PGHS (9 мкг/мл), перекись водорода (1,5 мМ), TMPD (60 мкМ). 4 - PGHS (9 мкг/мл), перекись водорода (0,15 мМ). Детекцию пероксидазной активности осуществляли после добавления в реакцию смесь перекиси водорода (1,35 мМ) и TMPD (60 мкМ). Сплошные линии построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (12), пунктирные – согласно уравнению (11).

Нами также были проведены эксперименты по влиянию времени прединкубации PGHS с третбутилпероксидом. В первом приближении третбутилпероксид инактивирует обе активности PGHS, как и перекись водорода.

Основываясь на результатах, представленных на рисунке 11 можно сделать вывод, что инактивация пероксидазной и циклооксигеназной активностей при прединкубации с перекисью водорода идет по различным механизмам.

Кинетическая модель инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS при прединкубации с перекисью водорода. При описании зависимости по влиянию перекиси водорода на циклооксигеназную активность (рис.11, квадраты, ромбы) с использованием уравнения (7) наблюдаются систематические отклонения (рис.12а).

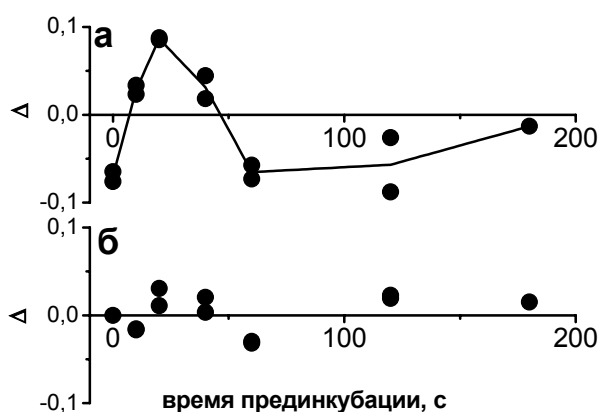


Рис.12 Разница между экспериментальными значениями относительной скорости циклооксигеназной реакции, полученной при прединкубации PGHS с перекисью водорода и теоретическими значениями, полученными в результате аппроксимации (Δ). *а* – аппроксимация по уравнению (7); *б* – аппроксимация по уравнению (11).

Кинетика изменения циклооксигеназной активности PGHS при прединкубации с перекисью водорода (рис.11) представляет собой характерную кривую с лаг-периодом, которую невозможно описать одной экспонентой. Это свидетельствует о том, что механизм потери циклооксигеназной активности содержит, по меньшей мере, две последовательные стадии, последняя из которых приводит к инактивации.

Кинетика изменения пероксидазной активности PGHS при прединкубации с перекисью водорода в тех же условиях имеет двухфазный характер и представляет собой быструю ($\ll 10$ сек) потерю $\sim 50\%$ пероксидазной активности, вслед за которой можно наблюдать процесс медленной потери оставшейся пероксидазной активности PGHS (рис.11).

Приведенные выше закономерности хорошо описываются следующей простейшей схемой (схема 8):

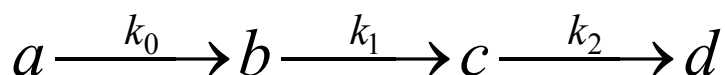


Схема 8. Кинетическая модель инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS при прединкубации с перекисью водорода.

На схеме 8 отражены превращения, которые происходят с молекулой белка, где a , b , c , d – интермедиаты PGHS, которые образуются в результате воздействия перекиси водорода. a – исходная форма фермента. Превращение a в b с константой скорости первого порядка k_0 отражает быстрый ($\ll 10$ сек) процесс потери 50% пероксидазной активности, превращение b в c с константой скорости k_1 отражает более медленный процесс потери оставшейся пероксидазной активности. Интермедиаты b и c в схеме 8 обладают 100%-й циклооксигеназной активностью. Превращение c в d с константой скорости k_2 отражает процесс потери циклооксигеназной активности.

В результате анализа схемы 8 для $t < 10$ сек, были получены уравнения для относительной циклооксигеназной активности ($C_{\text{омн}}^{\text{CO}}$, уравнение (11)) и относительной пероксидазной активности ($C_{\text{омн}}^{\text{PO}}$, уравнение (12)), описывающие инактивацию циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS при прединкубации с перекисью водорода (рис.11).

$$C_{\text{омн}}^{\text{CO}} = \frac{k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}}{k_2 - k_1} \quad (11)$$

$$C_{\text{омн}}^{\text{PO}} = 0,5 \cdot e^{-k_1 t} \quad (12)$$

Отклонения для аппроксимации зависимости по влиянию перекиси водорода на циклооксигеназную активность (рис.11, квадраты, ромбы) по уравнению (11) случайно распределены вокруг нулевого среднего значения (рис.12 б). Схема 8 с использованием двух параметров (k_1 и k_2) хорошо описывает процессы потери как циклооксигеназной, так и пероксидазной активностей PGHS при прединкубации с перекисью водорода.

ВЫВОДЫ.

1. Показано, что активный центр пероксидазной реакции PGHS не чувствителен к состоянию активного центра циклооксигеназной реакции, так как характеристики пероксидазной реакции не зависят от наличия в реакционной смеси арахидоновой кислоты и ингибитора циклооксигеназы.

2. Разработан подход для изучения инактивации фермента, заключающийся в исследовании кинетики изменения обеих активностей PGHS в ходе протекания как

циклооксигеназной, так и пероксидазной реакций; получены очищенные препараты фермента. Показано, что после полной инактивации циклооксигеназной активности сохраняется пероксидазная активность, после полной инактивации пероксидазной активности – циклооксигеназная. Проведенные исследования инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS в различных условиях показали, что химические механизмы инактивации этих активностей различны.

3. Показано, что при прединкубации фермента с перекисью водорода инактивация каждой активности PGHS протекает как минимум в две стадии. При прединкубации PGHS с исследуемыми перекисями показано, что концентрация последних в широком диапазоне не влияет на константу скорости инактивации пероксидазной активности. Для циклооксигеназной активности наблюдается зависимость константы скорости инактивации от концентрации перекиси, с которой проводили прединкубацию фермента. Изучение инактивации циклооксигеназной и пероксидазной активностей PGHS при прединкубации с перекисями показало, что инактивация этих активностей имеет разные химические механизмы. Экспериментальные данные описаны с помощью кинетической модели.

4. На основе обобщенной двумерной модели действия бифункционального фермента разработана кинетическая схема действия PGHS, которая, в отличие от предложенных в литературе схем, предусматривает учет материального баланса по всем возможным интермедиатам бифункционального фермента в ходе одновременного катализа двух реакций. Схема предусматривает независимое протекание двух ферментативных реакций на одной молекуле фермента, учитывая их взаимное влияние, и описывает полученные в настоящей работе и известные из литературы экспериментальные факты.

5. На основании проанализированных моделей (обобщенной двумерной модели действия бифункционального фермента, модели многосубстратной ферментативной реакции и ферментативной реакции, подвергающейся необратимой инактивации) разработана кинетическая модель инактивации обеих активностей бифункционального фермента в процессе катализируемых им реакций, которая описывает экспериментальные данные и может быть использована для описания инактивации других бифункциональных ферментов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

ДИССЕРТАЦИИ.

1. Цаплина Л.А., Каратассо Ю.О., Филимонов И.С., Вржещ П.В., Кинетический механизм действия бифункционального фермента простагландин-Н-синтазы. Влияние доноров электронов на циклооксигеназную реакцию // Биохимия. - 2006.-Т. 71. - № 11. - С.1534-1543.
2. Цаплина Л.А., Вржещ П.В., Потеря циклооксигеназной и пероксидазной активностей простагландин-Н-синтазы в процессе катализа // Биохимия. – 2007. – Т. 72. - № 6. – С.774-784.
3. Вржещ П.В., Цаплина Л.А., Сахарова И.С., Кинетические модели процессов изменения циклооксигеназной и пероксидазной активностей простагландин-н-синтазы в процессе катализа // Биохимия. – 2007. – Т. 72. - № 8. – С.1018-1026.
4. Филимонов И.С., Цаплина Л.А., Вржещ П.В., Обобщенная модель бифункциональных ферментов с учетом иерархии быстрых и медленных каталитических циклов: молекулярный кислород в кинетическом механизме простагландин-Н-синтазы // Бюллетень Московского общества испытателей природы, отдел биологический. – 2007. - Т. 112. – Вып. 1. - Прил. 1. - С.155-184.
5. Цаплина Л.А., Каратассо Ю.О., Филимонов И.С., Ферментативный синтез простагландинов. Кинетический механизм действия фермента простагландин-Н-синтазы // Тезисы докладов 11-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004", секция Биология. М.: МГУ. – 2004. - С.168.
6. Каратассо Ю.О., Филимонов И.С., Цаплина Л.А., Кинетическая модель бифункционального многосубстратного фермента в стационарном приближении // Тезисы докладов 11-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004", секция Физика. М.: МГУ. – 2004. - С.105.
7. Цаплина Л.А., Рязанцева Е.Н., Вржещ П.В., Ферментативный синтез простагландинов Оценка каталазной активности фермента простагландин-Н-синтазы // Тезисы докладов V международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» 2005. -2005. - С. 44.
8. Цаплина Л.А., Вржещ П.В. Влияние гемина, сульфата аммония и додецилсульфата натрия на кинетику инактивации в процессе реакции фермента

простагландин-Н-синтазы // Тезисы докладов VI международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» 2006. – 2006. - С.269.

9. Цаплина Л.А., Каратассо Ю.О., Вржещ П.В., Кинетическая модель ингибирования фермента простагландин-Н-синтазы тетраметил-п-фенилендиамином. Инактивация фермента в ходе циклооксигеназной и пероксидазной реакций // Тезисы докладов I международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». М.: МаксПресс. - 2006. - С.18.