

## Аннотация

Разработана методика титрования PGHS гемом и исследована кинетика образования и диссоциации холофермента PGHS. Показано, что при низких концентрациях фермента (не выше 20 нМ) образование холофермента хорошо описывается простейшей моделью (кинетическая константа скорости присоединения гемовой группы к апоферменту –  $2,76 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ , кинетическая константа скорости диссоциации холофермента –  $3,86 \cdot 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$ , равновесная константы диссоциации – 14 нМ), однако при более высоких концентрациях фермента наблюдаются отклонения от простейшей схемы (зависимость доли холофермента от концентрации гема содержит участок с порядком больше единицы и точку перегиба), которые объясняются при наличии положительной кооперативности между субъединицами димера.

Для ингибитора индометацина нами в прямых экспериментах подтверждено наличие быстрой обратимой стадии и последующей медленной обратимой стадии, проведено описание кинетики в рамках двухстадийной модели. Для ингибиторов напроксена, ибупрофена и толметина было показано, что взаимодействие с ферментом описывается кооперативной моделью, учитывающей взаимодействие между активными центрами. Анализ показал, что зависимость относительной активности от концентрации ингибитора в данных случаях описывается одной и той же формулой (с коэффициентами, имеющими различный физический смысл) как для кооперативной модели, так и для двухстадийной модели.

В ходе исследования аллостерического влияния связывания кофактора гема на связывание обратимых ингибиторов циклооксигеназы (напроксена, индометацина и диклофенака) показано практически полное отсутствие связывания этих ингибиторов апоферментом PGHS.

Для всех механизмов получены аналитические уравнения и проведен численный анализ.

## Результаты, полученные в 2019 г.

(в скобках – ссылки на файл с приложением)

Для экспериментальных исследований использовали фермент PGHS-1 из везикулярных желёз барана. Была разработана оригинальная методика очистки препарата фермента с использованием FPLC (AKTA Purifier System) в присутствии избытка гема, позволяющая получить белок высокой чистоты с минимальными потерями активности. Из нативного холофермента (комплекса белка с гемовой группой - ферропротопорфирином IX) получали апофермент методом восстановления гемового железа дитионитом натрия в анаэробных условиях и дальнейшего окисления кислородом. Циклооксигеназную реакцию окисления арахидоновой кислоты исследовали амперометрическим методом (при помощи анализаторов кислорода HansaTech OxyGraph, Эксперт-ДК-1 и полярографа Эксперт-001-4-МТХ) по изменению концентрации растворенного кислорода. Измерения проводили при 25°C в 50 мМ трис-HCl буфере, pH = 8.0, 0,1% твин-20, 1 мМ ферроцианида калия, 270 мкМ кислорода, 100 мкМ арахидоновой кислоты (AA) (если не указано иное) и 2 мкМ гемина (хлорида феррипротопорфирина IX) (если не указано иное). Полученные экспериментальные данные обрабатывали и аппроксимировали с помощью программных пакетов MATLAB и Origin.

### 1) Исследование кинетических механизмов кооперативных взаимодействий между субъединицами в составе димера PGHS при связывании кофактора гема

Механизм связывания кофактора гема с апоферментом PGHS в литературе исследован недостаточно. Считается, что к одному мономеру фермента присоединяется одна молекула гема, но при этом в некоторых работах утверждалось, что сродство гема к одной из субъединиц гораздо выше, чем к другой. Предполагалось, что асимметрия мономеров может быть либо приобретённой в ходе связывания гема (вследствие кооперативных взаимодействий, функциональная гетерогенность), либо изначально заложенной в ходе синтеза белка (предсуществующая гетерогенность). Достоверно установлен обратимый характер образования комплекса апофермента с гемом, однако оценки равновесной константы диссоциации приводятся с широким разбросом (от 5 до 1600 нМ). Более подробно механизм связывания не исследовался, и кинетические константы скоростей образования и диссоциации холофермента не определялись.

В данном проекте исследована кинетика связывания апофермента PGHS с кофактором гемом в режиме ассоциации (когда в реакционную систему добавляли апофермент и гемин, инкубировали некоторое время и затем инициировали реакцию арахидоновой кислотой) и диссоциации (заранее готовили препарат холофермента, после чего быстро разбавляли полученный препарат, инкубировали некоторое время и затем инициировали реакцию арахидоновой кислотой). Концентрацию холофермента оценивали по ферментативной активности (начальной скорости циклооксигеназной реакции).

Экспериментальные данные, полученные в режиме ассоциации и диссоциации, представлены на рис. 1. Для описания полученных результатов использовали простейшую одностадийную модель (рис. 2). Зависимость доли холофермента от концентрации свободного гема в состоянии равновесия будет описываться гиперболическим уравнением (формула 1a). Поскольку на рис. 1 равновесная доля холофермента составляет около 50%, можно оценить верхний предел равновесной константы диссоциации (не более 30 нМ). Далее для уточнения равновесной константы и корректного определения кинетических констант определяли концентрацию PGHS в системе по концентрации гемсвязывающих

сайтов с помощью разработанной методики титрования PGHS гемом. Зная верхний предел константы диссоциации холофермента, титрование осуществляли в концентрированном состоянии смеси, чтобы значение концентрации фермента было существенно выше верхнего предела значения равновесной константы диссоциации комплекса фермента с титрантом. Отбирали аликвоты титруемого препарата в режиме диссоциации (реакцию инициировали добавлением указанной аликвоты в реакционную систему, содержащую арахидоновую кислоту). Диссоциацией холофермента при определении начальной скорости циклооксигеназной реакции можно пренебречь вследствие низкой скорости диссоциации комплекса (см. рис. 1).

Для данной экспериментальной серии общая концентрация мономеров фермента составляет 27 нМ. Используя уравнение зависимости концентрации холофермента от времени инкубации PGHS с гемом (формула 1б), выведенное для простейшей одностадийной схемы, можно определить кинетическую константу скорости присоединения гемовой группы к апоферменту ( $2,76 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ ), кинетическую константу скорости диссоциации холофермента ( $3,86 \cdot 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$ ), и значение равновесной константы диссоциации (14 нМ).

Однако при увеличении концентрации фермента в экспериментах по исследованию формирования холофермента наблюдаются отклонения от простейшей схемы (рис. 3а). Видно, что при 90 нМ фермента в диапазоне 0-100 нМ гема скорость реакции имеет по гемину порядок больше 1. Аналогичные результаты для более высоких концентраций фермента представлены на рис. 3б.

Анализ уравнений, описывающих простейшую схему (рис. 2), показывает, что в рамках этой схемы порядок больше 1 невозможен. Для наглядности это подтверждено результатами симуляции для простейшей схемы в широком диапазоне концентраций фермента (продемонстрировано для 10 и 250 нМ, рис. 4).

Одним из возможных объяснений полученного результата является механизм кооперативных взаимодействий между субъединицами в составе димера, когда сродство гема к мономеру фермента изменяется, если соседний мономер уже связан с гемом (рис. 5а). Доля холофермента в данном случае определяется по формуле 2. При положительной кооперативности ( $K_1 > K_2$ ) зависимость доли холофермента от концентрации гема имеет порядок больше единицы, и, соответственно, точку перегиба (примеры на рис. 5б).

Очевидно, что необходимо дальнейшее исследование возможных кооперативных взаимодействий при связывании гема.

## **2) Кооперативный и двухстадийный механизмы связывания PGHS с ингибиторами**

Исследование интегральной кинетики реакции в условиях образования фермент-ингибиторных комплексов и инактивации фермента в процессе реакции требует рассмотрения соответствующих кинетических схем. Рассчитаны одностадийная и двухстадийная схема ингибирования на фоне инактивации в процессе реакции (рис. 6), в частности, зависимость активности от концентрации ингибитора и времени инкубации (формула 3).

Для ингибитора индометацина нами в прямых экспериментах подтверждено наличие быстрой обратимой стадии, проявляющейся при инициации реакции ферментом (рис. 7а), а также медленной стадии, проявляющейся при инициации реакции арахидоновой кислотой после инкубации с ингибитором (рис. 7б). Таким образом, взаимодействие фермента с индометацином описывается двухстадийной схемой ингибирования.

Для ингибиторов напроксена, ибупрофена и толметина нами ранее было показано, что взаимодействие с ферментом описывается кооперативной моделью, учитывающей взаимодействие между активными центрами (рис. 8а), но при этом не описывается простейшей моделью (рис. 8б). Кооперативность была показана в результате аппроксимации экспериментальных данных в условиях достижения равновесия. Анализ кинетических схем показал, что зависимость относительной активности от концентрации ингибитора в данных случаях описывается одной и той же формулой (с коэффициентами, имеющими различный физический смысл) как для кооперативной модели (формула 4а), так и для двухстадийной модели (формула 4б). Соответственно, из значений параметров, полученных для кооперативной модели, можно получить значения параметров для двухстадийной модели (см. табл. 1; для наглядности туда включены и данные по индометацину, где параметры кооперативной модели получены из параметров двухстадийной модели). Далее для напроксена, ибупрофена и толметина были аппроксимированы зависимости относительной активности от времени инкубации (при различных концентрациях ингибитора; концентрация АА составляла 100 мкМ) с помощью кооперативной и двухстадийной моделей. Результаты приведены в табл. 2.

Можно заметить, что коэффициенты для двухстадийной модели (формула 4б), в отличие от кооперативной модели (формула 4а), зависят от концентрации субстрата, а также от констант, характеризующих быстрые стадии взаимодействия фермента с субстратом и ингибитором ( $K_m$  и  $K_i$ ). Это наблюдение может позволить проводить дальнейшую дискриминацию упомянутых моделей.

### **3) Аллостерические взаимодействия при связывании холофермента и апофермента PGHS с ингибиторами**

Фермент PGHS катализирует две последовательные реакции - циклооксигеназную и пероксидазную. Ранее было установлено, что связывание кофактора гема влияет на необратимое ацилирование фермента аспирином. В ходе исследования возможного аллостерического влияния связывания кофактора гема на связывание обратимых ингибиторов циклооксигеназы (напроксена, индометацина и диклофенака) показано практически полное отсутствие связывания этих ингибиторов апоферментом PGHS (рис. 9), что свидетельствует о наличии аллостерического взаимодействия между сайтом связывания гема и циклооксигеназным активным центром (табл. 3).

Если пренебречь наличием быстрой обратимой стадии при связывании с ингибитором (для индометацина она практически не проявляется при малых концентрациях ингибитора вследствие высокого значения  $K_i$ , см. табл. 1) и возможным наличием кооперативных взаимодействий при связывании гема, то простейшая кинетическая схема аллостерических взаимодействий при связывании гема и ингибитора будет выглядеть следующим образом (рис. 10) и может служить основой для дальнейших исследований.

### **4) Теоретические модели, описывающие аллостерические и кооперативные взаимодействия для димерного бифункционального фермента PGHS**

В данном проекте разработали теоретические модели, описывающие аллостерические и кооперативные взаимодействия для фермента PGHS с учётом его димерной природы и

бифункциональности. Кинетические схемы рассчитаны в рамках стационарной и предстационарной кинетики, в том числе с помощью метода графов.

Для исследования взаимодействия фермента с гемом и фермента с ингибиторами рассчитаны простейшая и кооперативная модели (п. 1, 2). Показано наличие аллостерических взаимодействий при связывании холофермента и апофермента с обратимыми ингибиторами, разработана теоретическая схема (п. 3). Также рассчитана двухстадийная модель ингибирования с быстрой и медленной стадиями, и показано, что в равновесных условиях выражение для зависимости активности от концентрации ингибитора совпадает с аналогичным выражением для кооперативной модели (п. 2).

Для исследования взаимодействия фермента с ингибиторами была разработана оригинальная методика определения кинетических параметров ингибирования из интегральных кривых (зависимостей продукта от времени реакции), с учётом инактивации фермента в ходе реакции. Методика применена для одностадийной и двухстадийной схем ингибирования (рис. 6). Рассчитаны теоретические зависимости продукта реакции от времени для обеих схем (формула 5).

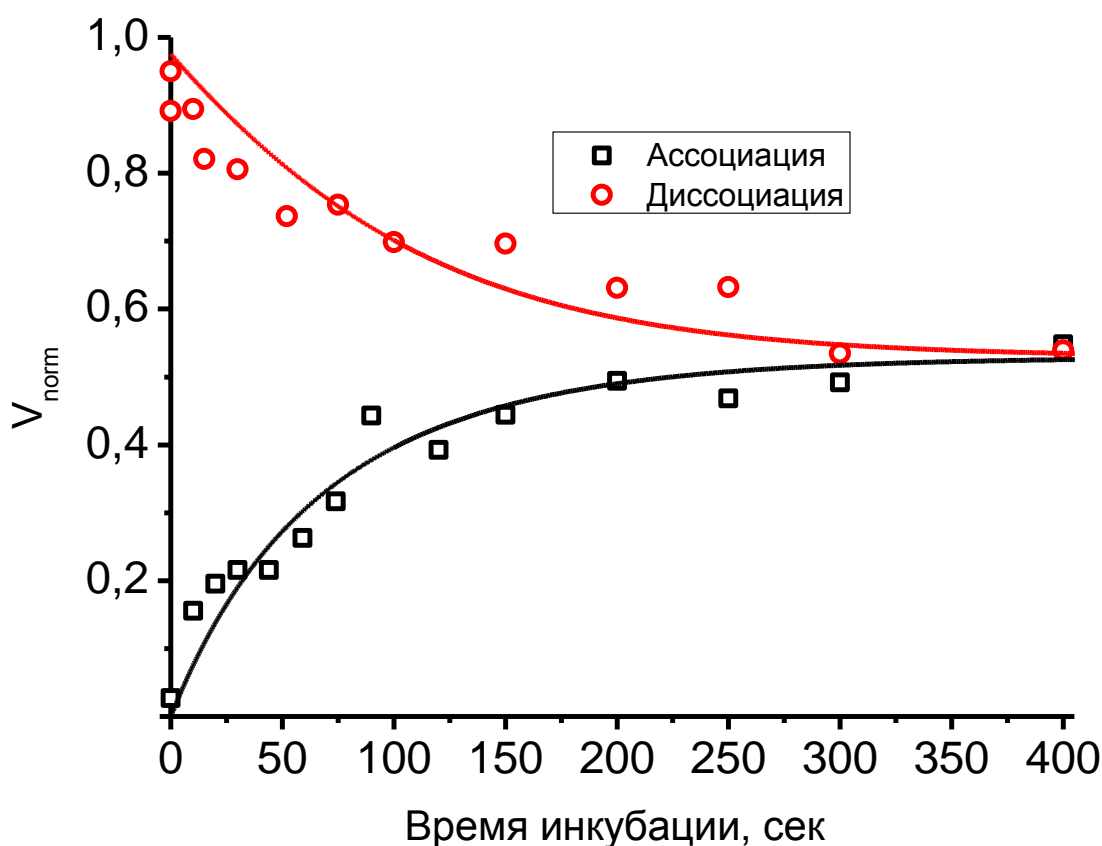
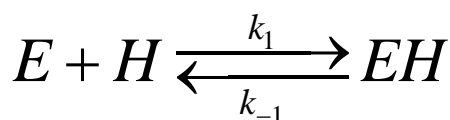


Рис. 1. Зависимость относительной активности от времени инкубации апофермента с гемом в режиме ассоциации и диссоциации. Относительная активность определялась как отношение начальной скорости реакции в данной экспериментальной точке к начальной скорости реакции при 100% доле холофермента (в условиях эксперимента насыщение фермента гемом достигается при концентрации гема 2 мкМ в реакционной системе). Общая концентрация гема в реакционной системе составляет 30 нМ, общая концентрация белка – около 700 мкг/мл. Начальная скорость реакции при 100% доле холофермента равна 1,62 мкМ/сек. Данные совместно аппроксимированы по формуле 1б.



$$K_{дис} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Рис. 2. Простейшая одностадийная схема взаимодействия апофермента PGHS с гемом. EH – концентрация холофермента, E – концентрация апофермента, H – концентрация свободного (не связанного с ферментом) гема,  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константы скорости образования и диссоциации холофермента соответственно,  $K_{дис}$  – равновесная константа диссоциации.

<p>а)</p> $\frac{EH}{E_0} = \frac{H}{K_{\text{дис}} + H}$	<p>б)</p> $[EH](t) = \frac{A + B \exp(k_1 Ct)}{D + E \exp(k_1 Ct)}$ $A = 2E_0H_0 + EH_{t=0} \cdot (-H_0 - E_0 - K_{\text{дис}} - C)$ $B = -2E_0H_0 - EH_{t=0} \cdot (-H_0 - E_0 - K_{\text{дис}} + C)$ $C = \sqrt{(H_0 + E_0 + K_{\text{дис}})^2 - 4E_0H_0}$ $D = -2EH_{t=0} + H_0 + E_0 + K_{\text{дис}} - C$ $E = 2EH_{t=0} - H_0 - E_0 - K_{\text{дис}} - C$
---	---

Формула 1. а) Теоретическая зависимость равновесной доли холофермента от общей концентрации гема и равновесной константы диссоциации для простейшей одностадийной схемы (случай  $E_0 \ll H_0$ ). б) Теоретическая зависимость концентрации холофермента от времени инкубации PGHS с гемом для простейшей одностадийной схемы.  $E_0$  – общая концентрация фермента в реакционной системе,  $H_0$  – общая концентрация гема,  $EH_{t=0}$  – концентрация холофермента в реакционной системе при нулевом времени инкубации.

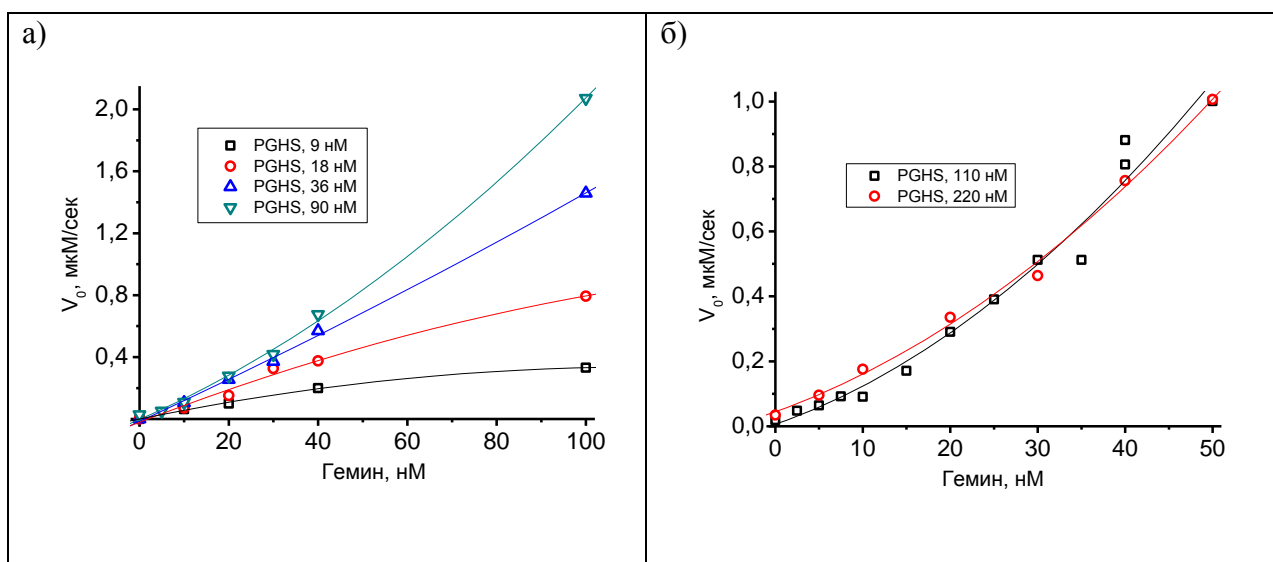


Рис. 3. Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации гемина в режиме ассоциации для различных концентраций фермента. Каждая серия аппроксимирована гладкой функцией. Время инкубации апофермента с гемом – 60 сек (а), 55 сек (б).

а)	б)
----	----

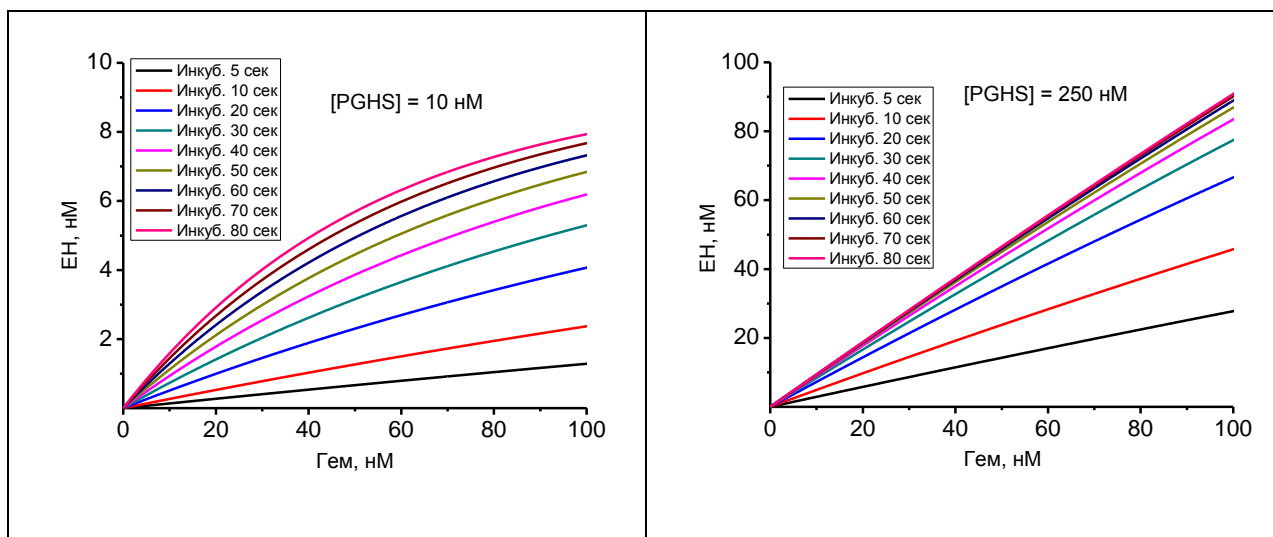


Рис. 4. Теоретические зависимости концентрации холофермента от концентрации гема при различном времени инкубации апофермента с гемом для 10 нМ PGHS (а) и 250 нМ PGHS (б), рассчитанные из простейшей одностадийной схемы и значений кинетических констант (рис. 1).

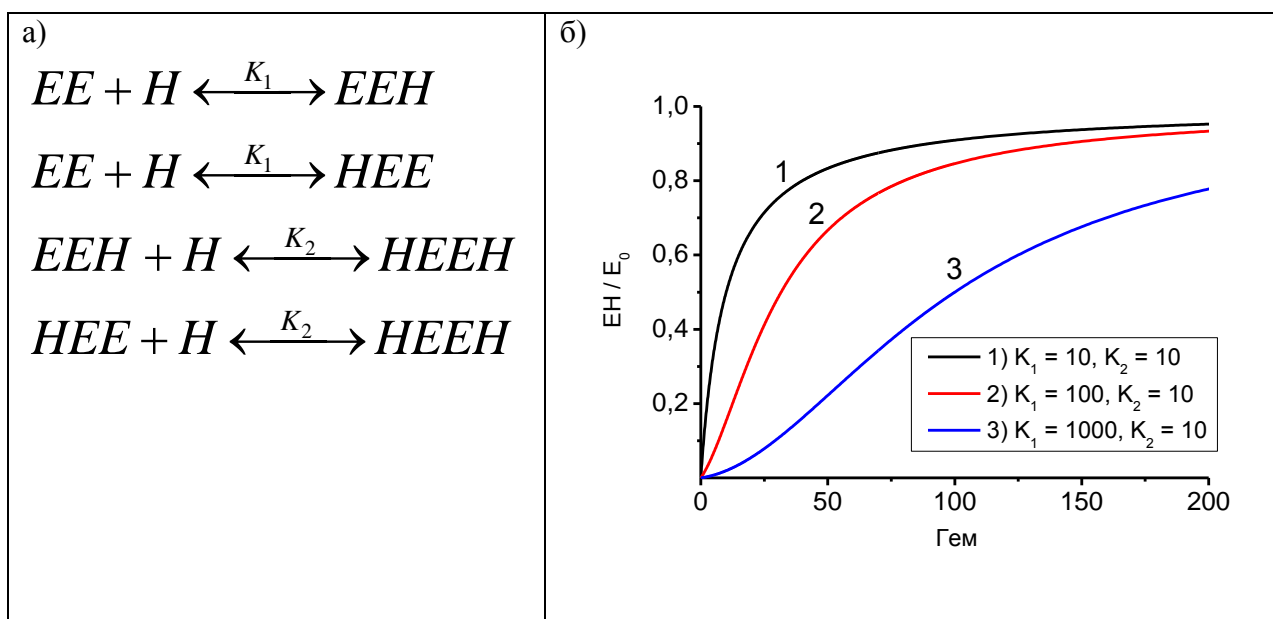


Рис. 5. а) Модель взаимодействия гомодимерного фермента с гемом, учитывающая возможные кооперативные взаимодействия между мономерами.  $K_1, K_2$  – равновесные константы диссоциации комплекса фермент-гем для взаимодействия гема с димером фермента, свободным от гема, и с димером, в котором одна из субъединиц связана с гемом, соответственно. б) Теоретические зависимости равновесной доли холофермента от концентрации гема, построенные по формуле 2 согласно механизму, учитывающему кооперативные взаимодействия между мономерами.



$$EH = EEH + HEE + 2EEH$$

$$E_0 = 2EE_0$$

$$\frac{EH}{E_0} = \frac{H_0^2 + K_2 \cdot H_0}{H_0^2 + 2K_2 \cdot H_0 + K_1 \cdot K_2}$$

Формула 2. Теоретические уравнения для концентрации холофермента и равновесной доли холофермента согласно механизму, учитывающему кооперативные взаимодействия между мономерами (рис. 5а, случай  $EE_0 \ll H_0$ ).  $EE_0$  – общая концентрация димеров фермента.

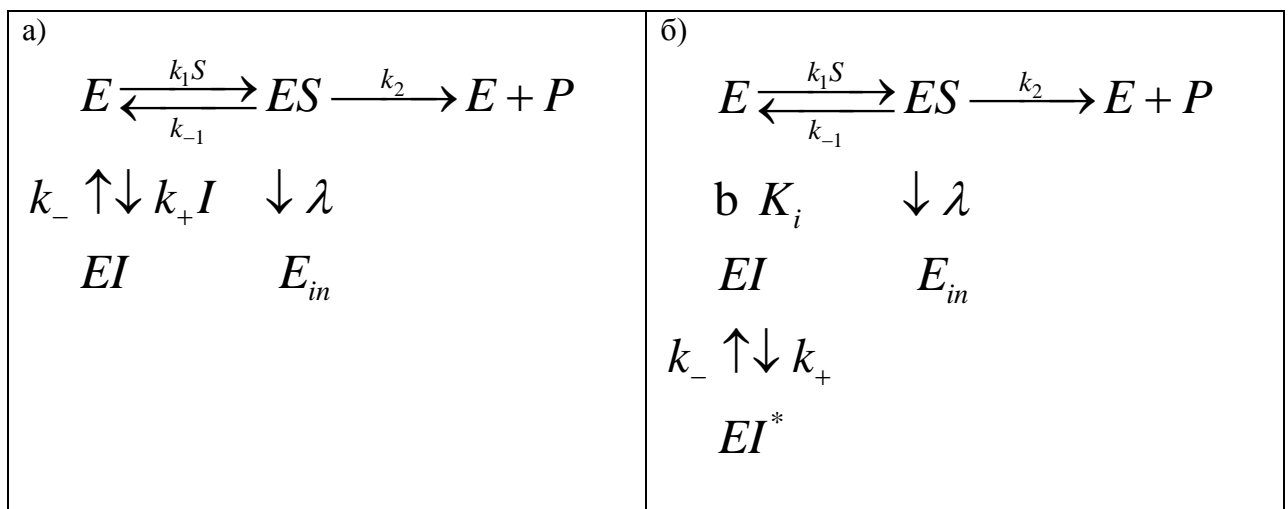


Рис. 6. Схема ингибирования фермента на фоне инактивации в процессе реакции в случае 1-стадийного медленного ингибирования (а) и 2-стадийного ингибирования с быстрой и медленной стадиями (б).  $k_1, k_{-1}$  – константы образования и распада фермент-субстратного комплекса соответственно,  $k_2$  – каталитическая константа (константа образования продукта реакции),  $\lambda$  – константа необратимой инактивации фермент-субстратного комплекса,  $K_i$  – константа ингибирования для быстрой стадии ( $K_i = \frac{E \cdot I}{EI}$ ),  $k_+, k_-$  – кинетические константы медленной стадии ингибирования.

$$V_0 = \frac{V_m \cdot S}{K_m \cdot (1 + \frac{I}{K_i}) + S} \cdot (1 - \frac{I}{K(I + K_i) + I} \cdot (1 - \exp(-(k_- + k_+ \cdot \frac{I}{I + K_i}) \cdot t)))$$

$$V_{norm} = \frac{V_0}{V_{I=0, S=100}}$$

Формула 3. Зависимость начальной скорости реакции и относительной активности от концентрации ингибитора и времени инкубации в случае 2-стадийного ингибирования с быстрой и медленной стадиями (фермент инкубируют с ингибитором в реакционной

системе и через некоторое время инициируют реакцию арахидоновой кислотой; в случае нулевого времени инкубации реакцию инициируют добавлением фермента).  $K$  – равновесная константа диссоциации для медленной стадии ингибирования.  $V_{I=0, S=100}$  – начальная скорость реакции в реперной точке (без ингибитора, AA = 100 мкМ).

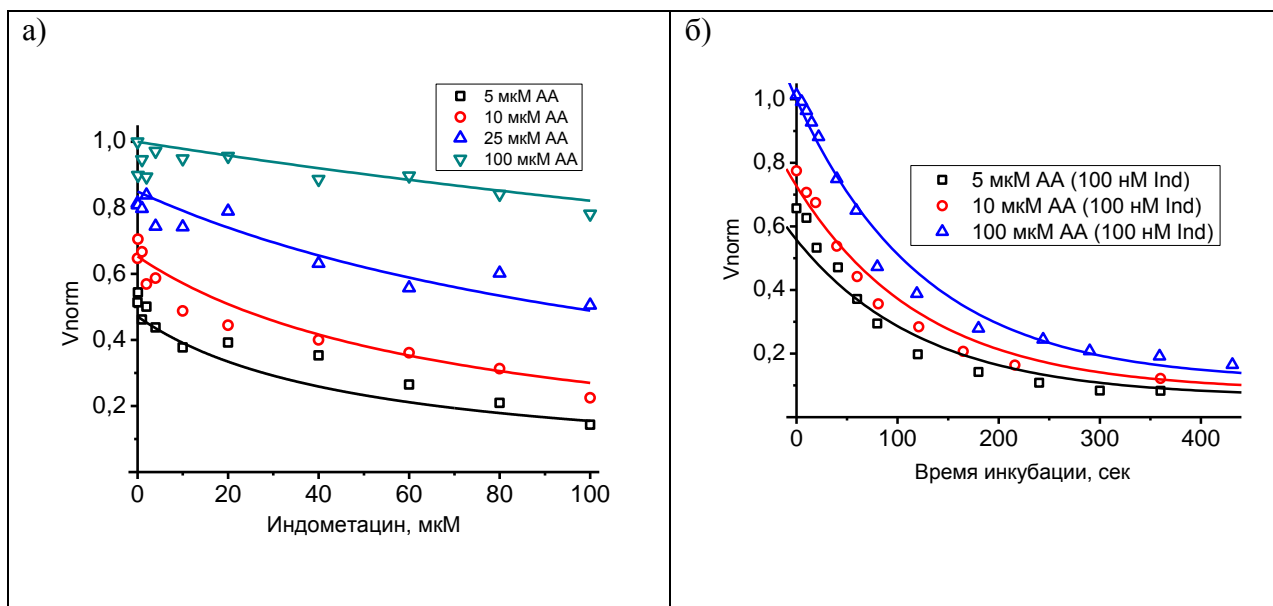


Рис. 7. Зависимость относительной активности от концентрации индометацина при инициации реакции ферментом для различных концентраций субстрата (а) и от времени инкубации фермента с ингибитором (концентрация 100 нМ) для различных концентраций субстрата (б).

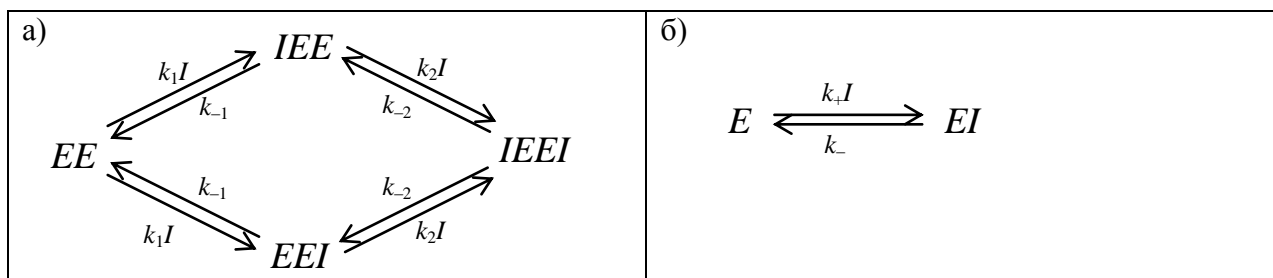


Рис. 8. а) Модель взаимодействия гомодимерного фермента с ингибитором, учитывающая возможные кооперативные взаимодействия между мономерами. б) Простейшая модель независимого обратимого взаимодействия ингибитора с активным центром мономера фермента.

	Кооперативная модель			Двухстадийная модель		
	$K_1$ (мкМ)	$K_2$ (мкМ)	$\gamma$	$K_m$ (мкМ)	$K_i$ (мкМ)	$K$
Напроксен	0.100	9.200	0.307	1.809	0.326	0.182
Ибупрофен	0.736	10.980	0.454	8.119	1.621	0.300
Толметин	0.122	1.291	0.279	20.984	0.437	0.167
Индометацин	0.00629	230.44	0.000228	6.37	27.6	0.000114

Табл. 1. Кинетические константы для различных ингибиторов, определённые по кооперативной модели (в условиях достижения равновесия) и по двухстадийной модели.

<p>a)</p> $V_{norm}(I) = \frac{a \cdot I + b}{I^2 + c \cdot I + b}$ $a = \gamma \cdot K_2$ $b = K_1 \cdot K_2$ $c = 2 \cdot K_2$	<p>б)</p> $V_{norm}(I) = \frac{a \cdot I + b}{I^2 + c \cdot I + b}$ $a = K_i \cdot \frac{K}{K+1} \cdot \frac{K_m + S}{K_m}$ $b = K_i^2 \cdot \frac{K}{K+1} \cdot \frac{K_m + S}{K_m}$ $c = K_i \cdot \left( \frac{K}{K+1} + \frac{K_m + S}{K_m} \right)$
--	--

Формула 4. Зависимость относительной активности от концентрации ингибитора в равновесных условиях для кооперативной модели (а) и двухстадийной модели (б). Концентрация субстрата является постоянной.  $\gamma$  – отношение активности свободного мономера в составе димера, один из активных центров которого занят ингибитором, к активности мономера в составе димера, свободного от ингибитора.

Ингибитор	Кооперативная модель		Двухстадийная модель
	$k_1$ ((мкМ*с) <sup>-1</sup> )	$k_2$ ((мкМ*с) <sup>-1</sup> )	$k_+$ ((мкМ*с) <sup>-1</sup> )
Напроксен	0.0614	0.0180	0.150
Ибупрофен	0.0869	126000	0.404
Толметин	0.0755	0.0592	0.0577

Табл. 2. Константы скорости образования комплексов фермента с ингибитором для напроксена, ибупрофена и толметина. Для расчёта использовались значения констант из табл. 1.

a)	б)
----	----

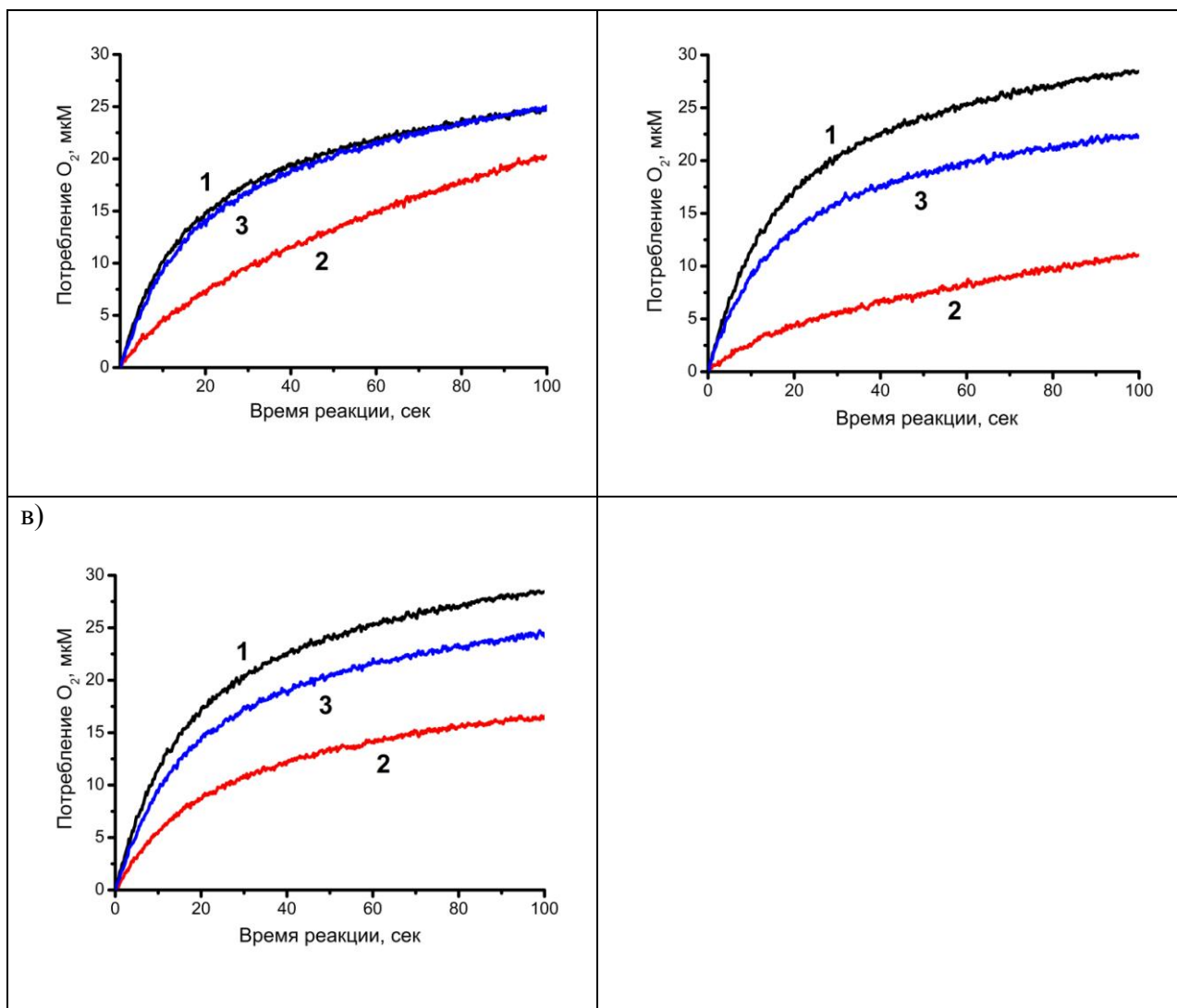


Рис. 9. Зависимость продукта циклооксигеназной реакции от времени при инкубации PGHS с напроксеном (а), индометацином (б) и диклофенаком (в). Реакцию инициировали арахидоновой кислотой после 2-минутной инкубации фермента с ингибитором или без ингибитора в реакционной системе. 1 - инкубация холофермента без ингибитора в присутствии 2 мкМ гемина. 2 - инкубация холофермента с 500 нМ ингибитора в присутствии 2 мкМ гемина. 3 - инкубация апофермента с 500 нМ ингибитора, добавление 2 мкМ гемина в момент инициации реакции.

	Холо-PGHS без инг	Холо-PGHS с инг	Апо-PGHS с инг
Напроксен	1,42	0,56 (39%)	1,29 (91%)
Индометацин	1,45	0,29 (20%)	1,40 (97%)
Диклофенак	1,45	0,66 (46%)	1,22 (84%)

Табл. 3. Начальная скорость (мкМ/сек) при инкубации холофермента и апофермента с ингибитором (в скобках - % от активности 100% холофермента без ингибитора). Условия эксперимента - на рис. 9.

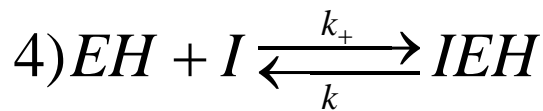
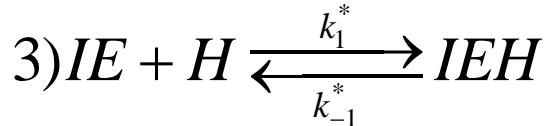
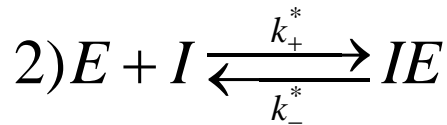
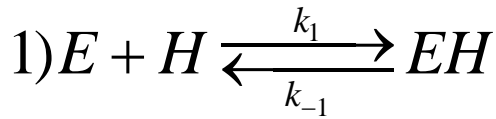


Рис. 10. Простейшая схема аллостерических взаимодействий при связывании гема и ингибитора.  $k_{+}^*$ ,  $k_{-}^*$  – кинетические константы медленной стадии ингибирования апофермента.  $k_{+}$ ,  $k_{-}$  – константы скорости образования и диссоциации комплекса IE с гемом соответственно.

$P(t) = P_{\infty} \cdot \left(1 - \frac{V_{\tau=0}}{V_m} \cdot \frac{\lambda}{\Lambda_2 - \Lambda_1} \cdot \left( \left( \frac{k_{-}}{\Lambda_1} - h \right) \exp(-\Lambda_1 t) - \left( \frac{k_{-}}{\Lambda_2} - h \right) \exp(-\Lambda_2 t) \right) \right)$ $P_{\infty} = \frac{k_2 E_0}{\lambda} = \frac{V_m}{\lambda}$ $\Lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left( \Lambda \mp \sqrt{\Lambda^2 - 4 \frac{V_{\tau=0} k_{-} \lambda}{V_m}} \right)$ $\Lambda = k_{-} + \frac{V_{\tau=0}}{V_m} (b + \lambda)$	
<p>a)</p> $V_{\tau=0} = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S}$ $h = 1 - \frac{I}{K + I} \cdot (1 - \exp(-(k_{-} + k_{+} \cdot I) \cdot \tau))$ $b = k_{+} \cdot \frac{K_m \cdot I}{S}$	<p>б)</p> $V_{\tau=0} = \frac{V_m \cdot S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$ $h = 1 - \frac{I}{K(I + K_i) + I} \cdot (1 - \exp(-(k_{-} + k_{+} \cdot \frac{I}{I + K_i}) \cdot \tau))$ $b = \frac{k_{+} \cdot I \cdot K_m}{K_i \cdot S}$

Формула 5. Теоретические зависимости продукта реакции от времени для одностадийной (а) и двухстадийной (б) схемы ингибирования.  $P_{\infty}$  – предельный выход продукта реакции.  $k_2$  – константа образования продукта из фермент-субстратного комплекса ES.  $\lambda$  – константа

скорости инаktivации комплекса ES.  $V_{\tau=0}$  - начальная скорость реакции при нулевом времени инкубации фермента с ингибитором.