

Роль 4-гідрокси-ТЕМПО в реакції окислення лінолевого спирту 5-ліпоксигеназою з бульб картоплі

О. В. Харченко, М. Г. Казачков, Т. Д. Скатерна, І. А. Бутович

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
Вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна

Досліджено 5-ліпоксигеназне окислення лінолевого спирту в присутності 4-гідрокси-ТЕМПО, який ефективно блокує неферментативні вільно-радикальні реакції, але не впливає на функціональні групи ферменту та не конкурує з субстратом за активний центр ферменту. Результати кінетичних експериментів вказують на існування механізму реакції, при якому 4-гідрокси-ТЕМПО ефективно перехоплює радикали, що дисоціювали з активного центра 5-ліпоксигенази, змінюючи при цьому профіль продуктів загальної реакції.

Вступ. Ліпоксигенази — це ферменти ліпідного обміну, які каталізують реакцію окислення поліненасичених жирних кислот. Продукти цієї реакції — гідропероксида та їхні похідні лейкотриєни — потужні медіатори запальних та алергічних процесів; їхня гіперпродукція обумовлює симптоми різноманітних захворювань [1]. Субстратами 5-ліпоксигенази є ліолева кислота [2—4], арахідонова кислота [5, 6], дигомо- γ -ліноленова кислота [7], метиловий ефір ліолевої кислоти [8]. У Центрі молекулярної токсикології Пенсильванського Університету (США) І. А. Бутовичем та співавторами [9, 10] були розпочаті дослідження окислення нового субстрату 5-ліпоксигенази — ліолевого спирту. В результаті проведених досліджень були ідентифіковані первинні продукти окислення ліолевого спирту — 9- та 13-гідропероксиліолеві спирти. Вивчено кількісний та якісний склад продуктів реакції та вплив на нього уловлювача вільних радикалів — 4-гідрокси-ТЕМПО. Встановлено, що суттєва частка кінцевого продукту створюється внаслідок неензиматичного вільнорадикального шляху перетворення ліолевого спирту. Неферментативна трансформація первинних продуктів окислення ліолевого спирту у суміш позиційних та просторових ізомерів ефективно блокується 4-гідрокси-ТЕМПО, в присутності якого в основному утворюються продукти ферментативного перетворення субстрату — 9(*S*)-гідроперокси-10*E*, 12*Z*-октадекадієн-1-ол та 13(*S*)-гідроперокси-9*Z*, 11*E*-октадекадієн-1-ол (продукт зворотної орієнтації субстрату в активному центрі ферменту). Метою даної роботи було детальне вивчення кінетичного механізму аеробного окислення ліолевого спирту 5-ліпоксигеназою з картоплі в присутності неіонного детергенту Lubrol PX, активатора ферменту — додецилсульфату натрію (DS-Na) та уловлювача вільних радикалів — 4-гідрокси-ТЕМПО.

Матеріали і методи. Використовували такі реактиви та матеріали: ліолеву кислоту, ліолевий спирт, Lubrol PX («Sigma», США), DS-Na («Fluka», Швейцарія), 4-гідрокси-ТЕМПО («Aldrich», США). 5-Ліпоксигеназу з бульб картоплі виділяли за методом [11]. Кінетичні вимірювання проводили на спектрофотометрі «Specord M-40» («Carl Zeiss», Німеччина). Стандартна реакційна суміш об'ємом 2,5 мл містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин, pH 6,3, 0,02 % Lubrol PX, 0,075—0,30 мМ ліолевий спирт, 0,1 мМ DS-Na. Реакцію ініціювали 5—10 мкг 5-ліпоксигенази та проводили при постійній температурі $25 \pm 0,1$ °C. За перебігом реакції спостерігали, реєструючи збільшення оптичної густини реакційної суміші при $\lambda = 235$ нм, що відповідає максимальному поглинанню супряженого дієнового хромофору в молекулі гідроперокси-ТЕМПО.

Матеріали і методи. Використовували такі реактиви та матеріали: ліолеву кислоту, ліолевий спирт, Lubrol PX («Sigma», США), DS-Na («Fluka», Швейцарія), 4-гідрокси-ТЕМПО («Aldrich», США). 5-Ліпоксигеназу з бульб картоплі виділяли за методом [11]. Кінетичні вимірювання проводили на спектрофотометрі «Specord M-40» («Carl Zeiss», Німеччина). Стандартна реакційна суміш об'ємом 2,5 мл містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин, pH 6,3, 0,02 % Lubrol PX, 0,075—0,30 мМ ліолевий спирт, 0,1 мМ DS-Na. Реакцію ініціювали 5—10 мкг 5-ліпоксигенази та проводили при постійній температурі $25 \pm 0,1$ °C. За перебігом реакції спостерігали, реєструючи збільшення оптичної густини реакційної суміші при $\lambda = 235$ нм, що відповідає максимальному поглинанню супряженого дієнового хромофору в молекулі гідропер-

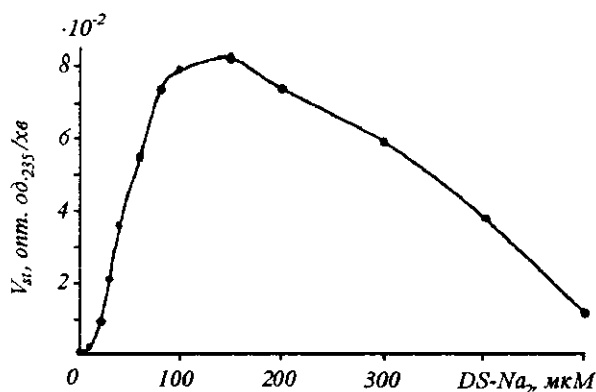


Рис. 1. Залежність стаціонарної швидкості реакції (V_{st}) ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту від концентрації DS-Na при постійній концентрації лінолевого спирту 0,15 мМ

роксида лінолевого спирту, молярний коефіцієнт поглинання якого дорівнює $23000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12]. Стандартна реакційна суміш для визначення ефекту 4-гідрокси-ТЕМПО містила 0,1 М натрій-фосфатний буфер, рН 6,3; 0,02 % Lubrol PX; 75–300 мкМ лінолевий спирт та 0,002–0,1 мМ 4-гідрокси-ТЕМПО. Для побудови рН-залежностей стаціонарних швидкостей реакції 5-ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту використовували буферні розчини: рН 4–5 — 0,1 М натрій-ацетатний буферний розчин; рН 5–6,5 — 0,1 М МЕС-NaOH; рН 6–8 — 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин; рН 8–8,5 — 0,1 М трис-HCl.

Результати і обговорення. 5-Ліпоксигеназа (КФ 1.13.11.12) — фермент, що функціонує в живій клітині у тісному контакті з клітинною мембраною, компонентами якої є іонні та неіонні ліпіди [13–15]. Субстратами 5-ліпоксигенази є гідрофобні сполуки, нерозчинні у водних розчинах при оптимальних для роботи ферменту значеннях рН 5,7–6,6. Тому вивчення кінетичних параметрів 5-ліпоксигеназної реакції *in vitro* можливе лише за умов сольобілізації цих сполук у присутності, зокрема, неіонного детергенту Lubrol PX, який сприяє утворенню змішаних міцел детергент/субстрат [16, 17]. Такий склад реакційної суміші дозволяє в експерименті врахувати ефекти, обумовлені наявністю, крім водної, ще й іншої фази — ліпідних міцел.

Реакцію 5-ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту досліджували в системі, що містила змішані міцели лінолевого спирту, Lubrol PX та

DS-Na, який значно прискорює перебіг цієї реакції. Так, у присутності 0,1–0,15 мМ DS-Na в реакційній суміші стаціонарна швидкість реакції окислення лінолевого спирту підвищується майже в 200 разів (рис. 1).

Попередніми дослідженнями [9, 10] встановлено, що до складу продуктів 5-ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту входять позиційні (9- та 13-) та просторові (цис, транс-, транс, транс-, R- та S-) ізомери гідропероксидів лінолевого спирту (продукти ферментативного перетворення лінолевого спирту зображено на рис. 2). В той же час у присутності уловлювача вільних радикалів 4-гідрокси-ТЕМПО спостерігалось істотне зниження частки неферментативно трансформованих первинних продуктів окислення лінолевого спирту — (транс, транс)-ізомерів та (R)-стереоізомерів гідропероксидів (рис. 3) Отже, утворення ізомерів ефективно блокується уловлювачем вільних радикалів 4-гідрокси-ТЕМПО, в присутності якого, в основному, виявлено продукти ферментативного

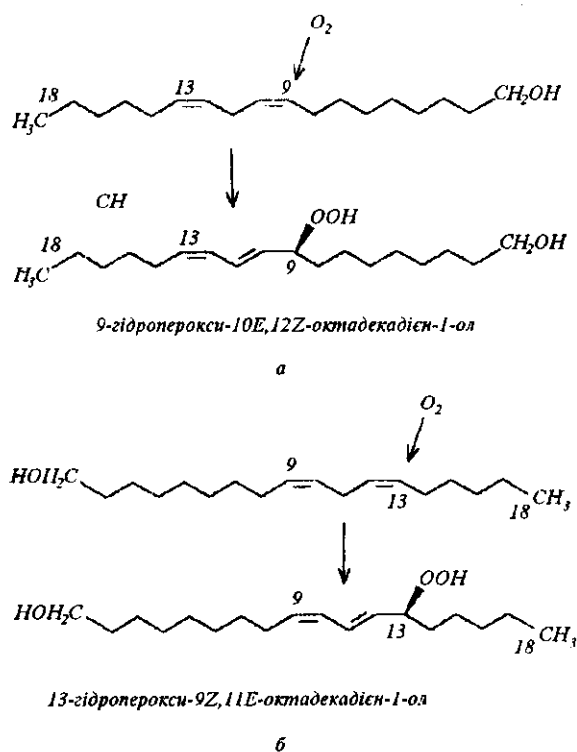


Рис. 2. Нормальна (а) та зворотна (б) орієнтації молекули субстрату в активному центрі ліпоксигенази з картоплі [9]

перетворення субстрату — 9(*S*)-гідроперокси-10*E*, 12*Z*-октадекадієн-1-ол та 13(*S*)-гідроперокси-9*Z*, 11*E*-октадекадієн-1-ол (продукт зворотної орієнтації субстрату в активному центрі ферменту). Головний продукт — 9-гідропероксид лінолевого спирту, що становив основну частку сумарного кінцевого продукту, складався на 88 % з (*S*)- та на 12 % — з (*R*)-стереоізомерів. Другий продукт — 13-гідропероксид лінолевого спирту являв собою суміш 58 % (*S*)- та 42 % (*R*)-стереоізомерів. Ці результати свідчать про те, що молекули лінолевого спирту можуть зв'язуватися з каталітичним центром ліпоксигенази як у нормальній (омега-метильна група перша), так і в оберненій (гідроксильна група перша) орієнтації, причому взаємодія за останньою схемою відбувається значно рідше. Основна частка 13-гідропероксиду утворюється неферментативно, у той час як високий ступінь хіральності 9-гідропероксиду лінолевого спирту передбачає його утворення у ферментативній реакції. Було доведено, що за досліджених умов DS-Na не впливає на профіль продуктів реакції.

Для з'ясування кінетичного механізму впливу 4-гідрокси-ТЕМПО на 5-ліпоксигеназу було вивчено залежності стаціонарних швидкостей 5-ліпоксигеназної реакції від кількості уловлювача віль-

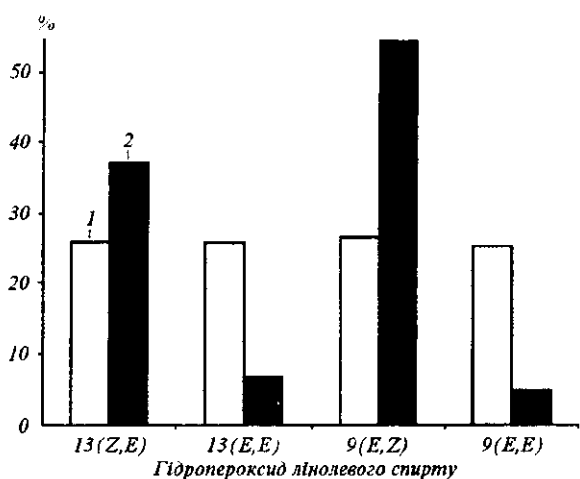


Рис. 3. Вплив 4-гідрокси-ТЕМПО на профіль продуктів ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту: 1 — у відсутності 4-гідрокси-ТЕМПО; 2 — за його присутності. По осі ординат — частка гідропероксиду в сумарному продукті

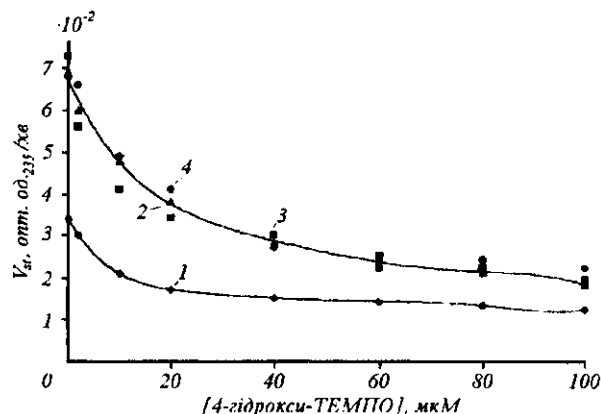


Рис. 4. Залежність стаціонарної швидкості реакції (V_{st}) ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту від концентрації 4-гідрокси-ТЕМПО при постійній концентрації DS-Na 0,1 мМ та при різних концентраціях лінолевого спирту: 1 — 0,075; 2 — 0,15; 3 — 0,225; 4 — 0,3 мМ

них радикалів при різних концентраціях субстрату — лінолевого спирту (рис. 4). Було встановлено, що 4-гідрокси-ТЕМПО справляє незалежну від кількості субстрату в реакційній суміші пригнічуючу дію на активність 5-ліпоксигенази. Тобто за даних умов не спостерігалось субстратного захисту ферменту від дії інгібітора. Значення концентрацій 4-гідрокси-ТЕМПО, що зумовлювали зниження стаціонарної швидкості реакції в два рази (IC_{50}), становили 34, 32, 28 та 34 мкМ при різних кількостях лінолевого спирту в реакційних сумішах — 75, 150, 220 та 300 мкМ відповідно. Таким чином, при підвищенні концентрації лінолевого спирту не спостерігалось істотних змін у значеннях IC_{50} , що свідчить про відсутність конкуренції між інгібітором та субстратом за функціональні групи ферменту, з якими зв'язується лінолевий спирт.

Було вивчено вплив 4-гідрокси-ТЕМПО на значення коефіцієнта Хілла, що вказує на кількість зайнятих субстратом місць на молекулі ферменту. На рис. 5 наведено залежності стаціонарної швидкості реакції ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту від концентрації субстрату у відсутності та в присутності 40 і 400 мкМ 4-гідрокси-ТЕМПО. Сигмоїдна форма кривих свідчить, що ферменту властива позитивна кооперативність щодо лінолевого спирту. Необхідно відмітити, що 5-ліпоксигеназа також проявляє позитивну кооперативність до лінолевої кислоти — природного субстрату ферменту [18]. Підвищення концентрації 4-гідрокси-ТЕМПО суттєво не впливало на значення коефіцієнта Хілла (h), обчислені за рівнянням

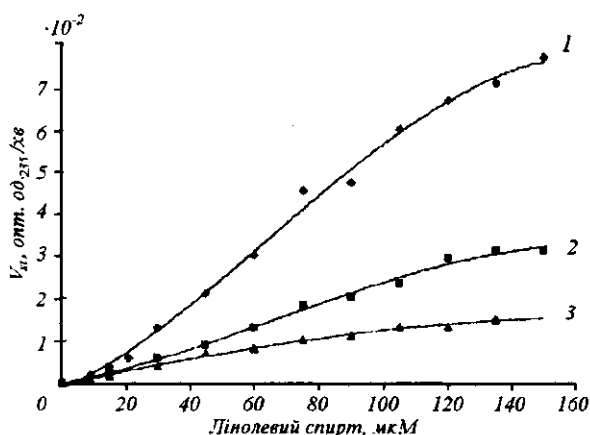


Рис. 5. Залежність стаціонарної швидкості реакції (V_{st}) ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту від концентрації лінолевого спирту при постійній концентрації DS-Na 0,1 мМ та різних концентраціях 4-гідрокси-ТЕМПО: 1 — 0; 2 — 0,04; 3 — 0,4 мМ

Хілла [19], та призводило до зменшення максимальної швидкості реакції (V_{max}) 5-ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту. Так, значення цих параметрів ліпоксигеназної реакції окислення лінолевого спирту у відсутності уловлювача вільних радикалів становили: $h = 1,6$; $V_{max} = 0,13$ опт. од.₂₃₅/хв (оптична густина реакційної суміші при $\lambda = 235$ нм за 1 хв); а при 40 та 400 мкМ 4-гідрокси-ТЕМПО — відповідно $h = 1,5$ та 1,4; $V_{max} = 0,062$ та 0,022 опт. од.₂₃₅/хв. Таким чином, як за наявності уловлювача вільних радикалів, так і без нього в присутності 100 мкМ DS-Na з молекулою 5-ліпоксигенази зв'язувалося до двох молекул лінолевого спирту, тобто 4-гідрокси-ТЕМПО не перешкоджав зв'язуванню субстрату з молекулою ферменту.

Нарешті, досліджено вплив 4-гідрокси-ТЕМПО на залежність стаціонарної швидкості 5-ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту від рН реакційної суміші. Дзвоноподібна форма кривих 1 та 2 на рис. 6 вказує на участь у реакції двох іоногенних груп ферменту з уявними значеннями pKa $5,24 \pm 0,15$ та $6,67 \pm 0,12$, які суттєво не змінюються при протіканні реакції в присутності 4-гідрокси-ТЕМПО та відповідно становлять $5,51 \pm 0,16$ та $6,75 \pm 0,15$. Отже, форма залежності V_{st} від рН реакційної суміші та положення рН-оптимуму реакції в присутності уловлювача вільних радикалів 4-гідрокси-ТЕМПО практично не змінюються, що є свідченням відсутності впливу цієї речовини на іоногенні групи ферменту. Стаціонарні

швидкості реакції окислення лінолевого спирту 5-ліпоксигеназою без уловлювача вільних радикалів та в його присутності при оптимальному значенні рН відповідно склали $0,131 \pm 0,016$ та $0,058 \pm 0,009$ опт. од.₂₃₅/хв. Наведені значення pKa та (V_{st})_{opt} розраховані у відповідності з (f) рН-функцією Міхаеліса [19] за рівнянням $V_{st} = (V_{st})_{opt} / (1 + [H^+] / K_1 + K_2 / [H^+])$, де (V_{st})_{opt} — стаціонарна швидкість реакції при оптимальному значенні рН; $[H^+]$ — концентрація протонів; K_1 та K_2 — константи дисоціації іоногенних груп ферменту.

Висновки. Вивчення 5-ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту показало, що 4-гідрокси-ТЕМПО ефективно блокує неферментативні вільнорадикальні реакції, які ведуть до утворення позиційних та просторових ізомерів окислених похідних лінолевого спирту, не змінюючи при цьому основних функціональних властивостей 5-ліпоксигенази. Отже, проведені дослідження дають підставу вважати, що 4-гідрокси-ТЕМПО, в присутності якого утворюється переважна більшість продукту ферментативного перетворення лінолевого спирту — 9(S)-гідроперокси-10E, 12Z-октадекадієн-1-олу — перехоплює незв'язані з активним центром ферменту радикали. Отже, процес блокування неферментативної трансформації первинних

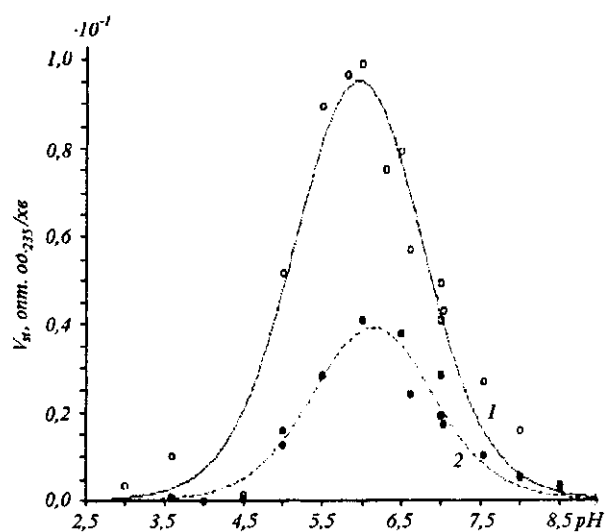


Рис. 6. Залежність стаціонарної швидкості реакції (V_{st}) ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту від рН у відсутності (1) та в присутності 0,04 мМ 4-гідрокси-ТЕМПО (2)

продуктів 5-ліпоксигеназного окислення лінолевого спирту відбувається не на поверхні молекули ферменту, а в розчині.

O. V. Kharchenko, M. G. Kazachkov, T. D. Skaternaya,
I. A. Butovich

The role of 4-hydroxy-TEMPO in the reaction of the linoleyl alcohol oxidation by potato tuber 5-lipoxygenase

Summary

It has been previously shown that the potato tuber 5-lipoxygenase (ptLOX) catalyzes aerobic oxidation of linoleyl alcohol (LAL). In the absence of 4-hydroxy-TEMPO, a major part of the oxidation products is formed in the free radical chain reaction initiated by free radicals dissociated from the enzyme-substrate complex. In the presence of 4-hydroxy-TEMPO, 9(S)-hydroperoxy-10E, 12Z-octadecadien-1-ol and 13(S)-hydroperoxy-9Z, 11E-octadecadien-1-ol are formed. The scavenger does not affect the functional groups of the enzyme, and does not compete with LAL for the active center of ptLOX. The results of the kinetic experiments point toward the reaction mechanism in which the scavenger intercepts free radicals of LAL leaked from the enzyme active center more effectively than the radicals tightly bound to the enzyme, thus changing the product profile of the overall reaction.

O. B. Харченко, М. Г. Казачков, Т. Д. Скатерная,
И. А. Бутович

Роль 4-гідрокси-ТЕМПО в реакції окислення лінолевого спирта 5-ліпоксигеназою із клубнеї картофелі

Резюме

Как показано ранее, 5-липоксигеназа из клубнеї картофелі катализує аеробне окислення лінолевого спирта. В присутстві 4-гідрокси-ТЕМПО основна частина продуктів окислення утворюється внаслідок вільнорадикальної ланцюгової реакції, котра ініціюється вільними радикалами, диссоціюючими із фермент-субстратного комплексу. В присутстві 4-гідрокси-ТЕМПО утворюються 9(S)-гідроперокси-10E, 12Z-октадекадієн-1-ол і 13(S)-гідроперокси-9Z, 11E-октадекадієн-1-ол. Ловушка вільних радикалів не впливає на функціональні групи ферменту і не конкурує з лінолевим спиртом за активний центр 5-ліпоксигенази. Результати кінетических експериментів указують на існування механізму реакції, при котрому ловушка вільних радикалів ефективно перехватює радикали, диссоціюючі із активного центра ферменту, змінюючи профіль продуктів загальної реакції.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Leukotrienes and Lipoxygenases*. Chemical, biological and clinical aspects / Ed. J. Rokach.— New-York: Elsevier, 1989.—Vol. 2.—518 p.
2. Galliard T., Phillips D. R. Lipoxygenase from potato tubers. Partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid // *Biochem. J.*—1971.—124, N 3.—P. 431—438.
3. Chan H. W., Prescott F. A. Specificity of lipoxygenases. Separation of isomeric hydroperoxides by high performance liquid chromatography // *Biochim. et biophys. acta.*—1975.—380, N 1.—P. 141—144.
4. Nikolaev V., Reddana P., Whelan J., Hilderbrandt G., Reddy C. C. Stereochemical nature of the products of linoleic acid oxidation catalyzed by lipoxygenases from potato and soybeans // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1990.—170, N 2.—P. 491—496.
5. Shimizu T., Radmark O., Samuelsson B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 3.—P. 689—693.
6. Shimizu T., Honda Z., Miki I., Seyama Y., Izumi T., Radmark O., Samuelsson B. Potato arachidonate 5-lipoxygenase: purification, characterization, and preparation of 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid // *Meth. Enzymol.*—1990.—187.—P. 296—308.
7. Reddy C. C., Bertler C., Hammarstrom S. Conversion of dihomogamma-linolenic acid to mono- and dihydroxy acids by potato lipoxygenase: evidence for the formation of 8,9-leukotriene A3 // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1990.—279, N 2.—P. 211—217.
8. Бутович И. А., Цысь Е. В., Могилевич Т. В. Окисление линолевой кислоты и метиллинолеата липоксигеназами из картофеля и соевых бобов // *Биохимия.*—1992.—57, № 10.—С. 1472—1480.
9. Butovich I. A., Luk'yanova S. M., Reddy C. C. Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: Kinetics and positional, stereo- and geometrical (cis, trans) specificity of the reaction // *Arch. Biochem. and Biophys.*—2000.—378, N 1.—P. 65—77.
10. Butovich I. A., Luk'yanova S. M., Reddy C. C. Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: possible mechanism and the role of carboxylic group in substrate binding // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1998.—249, N 2.—P. 344—349.
11. Бутович И. А., Бабенко В. М., Ливарчук Л. В., Могилевич Т. В., Кухарь В. П. Активация окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой из клубнеї картофелі под влиянием фосфатидовой кислоты // *Биохимия.*—1991.—56, № 6.—С. 1077—1081.
12. Gibian M., Vanderberger B. Product yield on oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: the value of the molar extinction coefficient in the spectrophotometric assay // *Analyt. Biochem.*—1987.—163.—P. 343—349.
13. Butovich I. A., Kharchenko O. V., Babenko V. M. On the interfacial phenomena in lipoxygenase catalysis // *Adv. Prostaglandin Tromboxane Leukot Res.*—1995.—23.—P. 159—161.
14. Бутович И. А., Паршикова Т. В., Бабенко Т. М., Ливарчук Л. В., Харченко О. В., Кухарь В. П. Регуляторная роль фосфолипидов в реакции окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой // *Биол. мембраны.*—1992.—9, № 6.—С. 611—616.
15. Ford-Hutchinson A. W. FLAP: a novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes // *TIPS.*—1991.—12, N 2.—P. 68—70.
16. Бутович И. А., Цысь Е. В., Могилевич Т. В., Кухарь В. П. Влияние физико-химических факторов на липоксигеназное окисление линолевой кислоты // *Биоорг. химия.*—1991.—17, № 9.—С. 1273—1280.
17. Schilstra M. J., Veldink G. A., Vliegthart J. F. Effect of nonionic detergents on lipoxygenase catalysis // *Lipids.*—1994.—29, N 4.—P. 225—231.
18. Харченко О. В., Кулініченко Г. І., Бутович І. А. Кінетичні механізми окислення лінолевої кислоти 5-ліпоксигеназою із *Solanum tuberosum* // *Укр. біохім. журн.*—1999.—71, № 4.—С. 40—44.
19. Корнши-Бюден Э. Основы ферментативной кинетики.— М.: Мир, 1979.—280 с.

УДК 577.158

Надійшла до редакції 08.06.2000