



Биолог. журн. Армении, 4 (60), 2008

СТРОЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПЕЧЕНОЧНОЙ АРГИНАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ II. СУБСТРАТЫ И ИНГИБИТОРЫ

М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН

*Ереванский государственный университет, научно-исследовательская
лаборатория биохимии, E-mail bio_chm@ysu.am*

В работе обобщены результаты собственных исследований и имеющиеся в литературе данные об альтернативных субстратах и ингибиторах печеночной аргиназы млекопитающих. В настоящее время обнаружены новые субстраты и значительное количество синтезированных ингибиторов, проявляющих очень высокое сродство к ферменту. Синтезированное производное аргинина - L-тиоаргинин является субстратом, кинетические характеристики которого совпадают с таковыми для аргинина. 1-нитро-3-гуанидинобензен и его производные также гидролизуются аргиназой и используются для хромофорного определения активности аргиназы.

Ряд синтезированных производных аргинина и индоспицина, содержащих N^{ω} -ОН группу, а также борсодержащие аминокислоты АВН и ВЕС являются эффективными ингибиторами печеночной аргиназы, у которых величина K_i более чем в 1000 раз меньше, чем величина K_m для аргинина. Большинство исследователей считает, что новые синтезированные ингибиторы аргиназы сходны по структуре с промежуточными тетраэдрическими соединениями, образующимися в ходе каталитической реакции аргиназы при взаимодействии субстрата с двухмарганцевым кластером фермента.

*Аргиназа - структура активного центра – альтернативные
субстраты – ингибиторы*

Աշխատանքում ամփոփված են սեփական հետազոտությունների արդյունքները և գրականության տվյալները կաթնասունների լյարդի արգինազի այլընտրանքային սուբստրատների և արգելակիչների մասին: L-թիոարգինինը՝ սինթեզված սուբստրատ է, որը կինետիկ հատկություններով նման է L-արգինինին: Որոշ այլ սուբստրատներ (1-նիտրո-3-գուանիդինոբենզեն և ածանցյալներ) օգտագործվում են արգինազի ակտիվությունը քրոմոֆորային մեթոդով որոշելու համար:

Սինթեզված նոր արգելակիչները ցուցաբերում են բարձր հակվածություն ֆերմենտի նկատմամբ: N^{ω} -ОН խումբ պարունակող արգինինի և ինդոսպինգինի ածանցյալները, ինչպես նաև բոր պարունակող АВН և ВЕС ամինաթթուները էֆեկտիվ արգելակիչներ են, որոնց համար K_i արժեքը ավելի քան 1000 անգամ փոքր է արգինինի համար K_m -ի արժեքից: Գիտնականների մեծամասնությունը ենթադրում է, որ այդ արգելակիչների արտակարգ բարձր հակվա-

ծությունը արգինազի ակտիվ կենտրոնի նկատմամբ կապված է այդ միացությունների կառուցվածքային առանձնահատկությունների հետ՝ դրանք կրկնօրինակում են տետրաէդրիկ միջանկյալ միացություններին, որոնք առաջանում են կատալիտիկ ռեակցիայի ընթացքում արգինինի և ֆերմենտի երկմանգանային կլաստերի փոխազդեցության արդյունքում:

Արգինազ - ակտիվ կենտրոնի կառուցվածք - այլընտրանքային սուբստրատներ - արգելակիչներ

The results of our investigation and literature data about alternative substrates and inhibitors of mammalian liver arginase are represent in this work. New substrates and inhibitors, which have the high affinity to this enzyme have been synthesized recently.

1-nitro-3-guanidinobenzene (NGB) and its analogs are used for chromophoric arginase assay. L-thioarginine, the compound with the bridging guanidinium nitrogen of L-arginine replaced with sulfur, functions as efficiently as the natural substrate.

N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA), an intermediate in the biosynthesis of NO from L-arginine, and some N_ω-hydroxy-L-α-aminoacids have been shown to act as potent inhibitors of arginase with K_i values in the 20-50 μM range. Nor-NOHA, nor-NOHI (nor-indospicine) and 2(S)-amino-6-borohexanoic acid (ABH) are most potent inhibitors of arginase. The investigators proposed, that the new inhibitors of arginase could be of transition state analog type and N-OH group being able to replace the hydroxo ligand in the arginase Mn-cluster.

Arginase – active center structure - alternative substrates - inhibitors

Печеночная аргиназа млекопитающих (уреотелическая аргиназа, аргиназа I) {ЕС 3.5.3.1.}, как известно, цитоплазматический фермент [23]. Неуреотелическая аргиназа (аргиназа II), встречающаяся в экстрагепатических тканях млекопитающих и в ограниченном количестве в печени, локализована главным образом в митохондриях. Эти ферменты кодируются разными генами и имеют заметные различия в структуре. Однако в полипептидных цепях субъединиц обеих форм аргиназы имеются определенные участки, состоящие из тех же аминокислотных остатков (“консервативные остатки”), расположенных в сходной последовательности [23]. Сходные участки аминокислотной последовательности имеются и у аргиназ, выделенных из других организмов. Сравнение полипептидных цепей субъединиц аргиназы печени крыс и человека с ферментами из дрожжей, бактерий и других организмов показало около 40-70% гомологии [18]. Как оказалось, аргиназа I и II млекопитающих сходны только на 53% [23]. Различаются они и по кинетическим и иммунологическим свойствам. Авторы полагают, что хотя 2 формы аргиназы в организме млекопитающих произошли от одного белка предшественника, на определенном этапе развития в связи с различными функциями они разделились и далее эволюционировали самостоятельно [18,23]. Среди консервативных аминокислотных остатков в полипептидных цепях аргиназ печени крыс и человека обнаружены остатки глицина, гистидина, серина, аспартата, пролина, глутамата и др. Роль отдельных аминокислотных остатков в аргиназе активно изучается [23]. Структурно и функционально важные консервативные аминокислотные остатки обеспечивают специфический фолдинг полипептидной цепи, участвуют в образовании координационных связей с катионами марганца и непосредственно в каталитической реакции аргиназы.

Гидролиз L-аргинина аргиназой происходит довольно быстро при простом смешивании ($k_{\text{cat}} \sim 250 \text{ s}^{-1}$) (pH 9) [19]. Кроме аргинина, аргиназа печени крыс катализирует также гидролиз L-аргининамида, L-канаванина, L-гомоаргинина и L-аргининовой кислоты. Величина константы Михаэлиса (K_m) для этих соединений увеличивается примерно в 10 раз по сравнению с аргинином, а скорость реакции уменьшается в 15-340 раз [25]. Специфическая константа k_{cat}/K_m для аргинина равна $2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Для L-гомоаргинина, у которого боковая цепь длиннее на одну метиленовую группу, величина k_{cat}/K_m составляет 0,1% от этой величины для L-аргинина. Аргиназа печени крысы и быка очень медленно гидролизует декарбоксилированное производное аргинина – агматин [25,27]. Скорость реакции по сравнению с аргинином уменьшается в 5000 раз.

Альтернативный субстрат аргиназы 1-нитро-3-гуанидинобензен (NGB) (рис.1) используется для хромофорного определения активности аргиназы [15]. Скорость каталитической реакции для NGB значительно меньше, чем для аргинина, а величины K_m почти совпадают. Синтезированные сравнительно недавно карбоксилсодержащие производные NGB также гидролизуются аргиназой, но величины K_m у них значительно меньше, чем у NGB и аргинина. Это 4-гуанидино-3-нитробензойная кислота (NGBA) и 4-гуанидино-2-нитрофенил-уксусная кислота (NGPA) [15] (рис.1). Величины K_m равны 7 и 10 μM для NGBA и NGPA соответственно, однако скорость реакции значительно меньше, чем при взаимодействии с аргинином. Наиболее эффективным из альтернативных субстратов аргиназы является L-тиоаргинин – синтезированное производное L-аргинина, у которого переходный атом азота N^0 - замещен атомом серы [14] (рис.1). Это соединение взаимодействует с аргиназой как натуральный субстрат, для которого величина K_m равна 0,5 mM [14]. Ряд производных тиоаргинина также гидролизуются аргиназой [15], хотя и менее эффективно. Исследования этих авторов свидетельствуют о том, что атом азота, связывающий гуанидиновую группу в молекуле аргинина, не участвует ни в связывании субстрата, ни в процессах катализа, осуществляемого аргиназой [15].

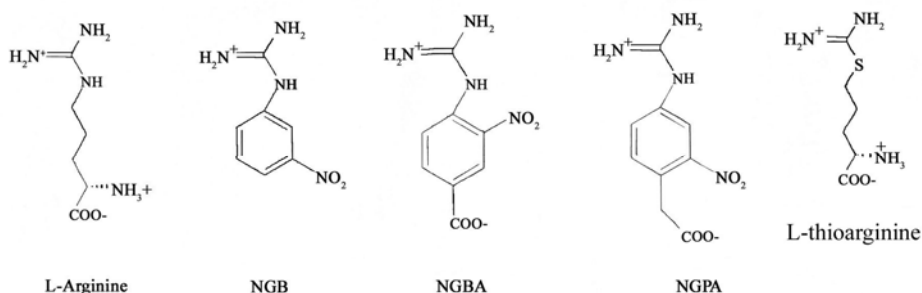


Рис. 1. Структурные формулы некоторых субстратов аргиназы.

Гуанидинобутират, NG-метил-L-аргинин, гуанидинокапроновая кислота и D-аргинин не гидролизуются аргиназой. Продукты реакции L-орнитин и мочевины ингибируют фермент. Однако если величина константы ингибирования (K_i) для L-орнитина сравнима с величиной K_m для L-аргинина, то связывание с мочевиной значительно слабее ($K_i \sim 1 - 1,28 \text{ M}$).

Еще в 40-х годах прошлого века в экспериментах, проведенных на частично очищенных препаратах аргиназы [16], было показано, что многие аминокислоты являются конкурентными ингибиторами фермента. Это не только аминокислоты, содержащие в боковой цепочке гуанидиновую или аминогруппы, но также и валин, лейцин, изолейцин, пролин и др. (табл.1). Разветвленные аминокислоты, как показали некоторые исследователи [9], ингибируют аргиназу печени человека частично, что указывает на наличие аллостерических участков в молекуле фермента. Авторы полагают, что эти аминокислоты могут участвовать в регуляции процесса гидролиза аргинина в печени.

Эксперименты, проведенные нами на очищенном препарате аргиназы печени быка, показали, что L-норвалин и L- α -аминоизомасляная кислота (АИМК) также конкурентно ингибируют этот фермент (табл.1). L- α -амино-масляная кислота (АМК) является ингибитором смешанного типа, а оксипролин, фенилаланин, серин, γ -аминомасляная кислота, цистеин, норлейцин в тех же концентрациях не влияют на активность этого фермента [3]. В табл. 1 суммированы полученные нами, а также другими исследователями данные об ингибировании аргиназы разными аминокислотами и их производными.

Таблица 1. Ингибирование печеночной аргиназы аминокислотами, их производными и другими соединениями

Соединение	Величина K_i	Соединение	Величина K_i
L-орнитин	3,8 mM [3], 1,3 mM [22], 1 mM [25]	Борат	1 mM (K_{ij} -0,26 mM) [5,25], 0,25 mM [22]
L-лизин	6,4 mM [3], 0,93 mM [25]	Индоспицин	1,49 mM [20]
L-валин	1 mM [3,17]	NOHI	20 μ M [5,28]
L-лейцин	2,4 mM [3,17]	nor-NOHI	$\sim$ 2 μ M [21]
L-изолейцин	1 mM [3,17]	NOHA	10 μ M [12], 42 μ M [5,13]
L-норвалин	3, 4 mM [3,17]	nor-NOHA	0,5 μ M [5,12]
L-пролин	21 mM [3]	N ¹⁰ -OH- L-лизин	4 μ M /pH 7,4/ [5], 90 μ M /pH 9/ [26]
L-АИМК	36 mM [3]	N ¹⁰ -амино-L-аргинин	4,7 mM [13]
L-АМК	28 mM (K_{ij} -3,8 mM) [3]	N ¹⁰ -аллил-L-аргинин	5,8 mM [13]
L-цитруллин	1 mM [19]	АОН	60 μ M [26]
Путресцин	82 mM [27]	ABH	0,1 μ M [5,11]
Кадаверин	194 mM [27]	BEC	0,4-0,6 μ M [7]
NaF	1,3 mM [24], 1,8 mM [29]	ASH	90 μ M [7]
Аденин	0,7 mM [22]	Гидроксиламин	16 mM [2]

Из большого числа анионов, как оказалось [24,29], на активность аргиназы печени быка и крысы влияет только ион F⁻. Он обратимо и неконкурентно ингибирует фермент, причем при pH 7,4 ингибирование на порядок эффективнее, чем при pH 9,4 [24,29]. Добавление марганца делает аргиназу более чувствительной к аниону фтора. Для выяснения способа взаимодействия этого иона с аргиназой требуются дополнительные исследования.

Изучение влияния pH на величину константы ингибирования аргиназы печени быка некоторыми аминокислотами показало, что изменение значений pH раствора от 7 до 10,5 не влияет на степень ингибирования фермента валином, а величина K_i для пролина увеличивается от 4 mM при pH 7,5 до 74 mM при pH 10,5 [1]. На графике зависимости pK_i от pH для пролина обнаруживается кислотная группа с pK_a около 8,7. Зависимости величины pK_i от pH для лизина и орнитина сходны и демонстрируют участие двух ионизирующихся групп в процессах связывания этих ингибиторов с аргиназой. Одна из них имеет значение pK_a , сходное со значением pK_a , полученным из графика зависимости pK_m от pH для аргинина – 8,7. Эта группа должна быть депротонирована для обеспечения взаимодействия ингибитора с активным центром аргиназы. Вторая группа должна быть в протонированном состоянии (pK_i 9,8-10) [1]. По мнению ряда исследователей, активация аргиназы при pH 9,5 может быть связана с изменением ионизационного состояния остатка гистидина 141 [19].

Ингибирование аргиназы аминокислотами изучалось группой ученых с помощью измерения низкотемпературных ЭПР-спектров [19]. На основании полученных данных аминокислоты - ингибиторы были разделены на 2 группы, отличающиеся по характеру взаимодействия с активным центром фермента. Орнитин, цитруллин и изолейцин, входящие в одну группу ингибиторов, по мнению авторов, не связываются непосредственно с марганцевым кластером. Эти соединения не вызывают существенных изменений в спектрах ЭПР аргиназы и взаимодействуют, по-видимому, с α -аминокарбоксилат-узнающими участками активного центра, находящимися ближе к поверхности белка. Лизин, N_ω -OH-L-аргинин (NOHA) и субстрат L-аргинин, входящие во вторую группу соединений, вызывают значительные изменения интенсивности и формы спектров ЭПР и взаимодействуют, по-видимому, непосредственно с двухмарганцевым центром аргиназы. Согласно предлагаемой модели, происходит депротонирование боковой ϵ -аминогруппы лизина или N-аминного атома аргинина путем переноса протона к остатку гистидина 141 (His 141), затем нейтральный атом азота связывается координационной связью с ионом марганца, замещая один из его лигандов [19]. Экспериментальные данные, полученные с помощью изучения свойств His141Asp рекомбинантной формы аргиназы, хорошо согласуются с моделью гидролиза аргинина, которая включает депротонирование гуанидиновой группы субстрата [19].

Изучение влияния различных ингибиторов на активность аргиназы с использованием современных методов исследования показало, что важными участками субстратов и ингибиторов, участвующими в процессах связывания с активным центром аргиназы, являются:

1. α -Карбоксильная группа. Путресцин и кадаверин, которые являются декарбоксилированными производными орнитина и лизина, конкурентно, но очень слабо ингибируют аргиназу печени быка [27]. Величины K_i для кадаверина и путресцина примерно в 30 и 55 раз больше, чем для лизина и орнитина соответственно (табл.1). Авторы полагают, что на ингибиторные свойства аминокислот может влиять увеличение величины pK_a аминогруппы, происходящее при декарбоксилировании [27]. Присоединение карбоксильной группы к альтернативному субстрату аргиназы - NGB (см. выше) увеличивает сродство этого соединения (NGBA) к ферменту в 200 раз [15].

2. α -Аминогруппа. В ряде случаев ее существование предпочтительно, но не обязательно. Так δ -аминолевулилат и δ -аминовалерат ингибируют аргиназу, несмотря на отсутствие α -аминогруппы [17]. Однако в работе [15] показано, что α -аминогруппа необходима для эффективного катализа. Она играет важную роль в ориентации молекулы субстрата или ингибитора в активном центре. При удалении α -аминогруппы из молекулы тию-аргинина скорость гидролиза уменьшается более чем в 20000 раз. Взаимодействие между аминогруппой субстрата и связывающими ее группами в аргиназе ориентирует гуанидиновую группу аргинина относительно связанного с металлом активного иона гидроксида так, что обеспечивается наиболее эффективный контакт [15].

3. Длина аполярной углеродной цепочки. Оптимальная для связывания ингибитора углеродная цепочка содержит 3 атома углерода при ширине аполярной полости фермента, достаточной для связывания 2-х атомов углерода в разветвленной позиции. Хорошими ингибиторами являются валин, изолейцин, лейцин и норвалин, содержащие α -амино-, α -карбоксильную группы и аполярные цепочки достаточной длины (табл.1). Удлинение углеродной цепи аргинина на одну CH_2 -группу (гомоаргинин) приводит к уменьшению эффективности связывания его с ферментом и замедлению реакции более чем в 300 раз [25].

4. Аполярный участок молекул субстратов или ингибиторов, по-видимому, занимает особую область активного центра, где образует водородные связи с окружающими аминокислотными остатками. Боковая цепь валина довольно прочно связывается с аргиназой, очевидно, благодаря образованию водородных связей в этом участке активного центра, о чем свидетельствует отсутствие влияния pH на величину константы ингибирования аргиназы этой аминокислотой [1].

5. Участок связывания гуанидинового атома азота или азота аминогруппы ингибитора. Аминокислоты, имеющие в боковой цепи гуанидиновую группу или аминогруппу в δ - или ϵ -положении, легко связываются с азотсвязывающим участком в активном центре аргиназы при наличии других необходимых для связывания условий.

Детальный компьютерный анализ, проведенный группой исследователей, показал необходимость наличия по крайней мере 3-х связывающих участков для осуществления эффективного взаимодействия субстрата или ингибитора с активным центром аргиназы [17]. Природный субстрат – аргинин содержит 4 из таких групп: α -аминогруппу, α -карбоксильную группу, аполярную углеродную цепь подходящей длины и первый атом азота гуанидиновой группы в очень подходящей для связывания позиции [17]. Глутаминовая кислота, кроме α -карбоксильной и α -аминогрупп, содержит боковую цепь подходящей длины и карбонильную группу, которая также может связываться с полярным связывающим участком в ферменте. По данным ряда авторов, эта аминокислота также является ингибитором аргиназы [17].

N^ω -гидрокси-L-аргинин (NOHA) [12], который является промежуточным соединением в биосинтезе NO из аргинина, а также широкий класс L-аминокислот, имеющих в боковой цепочке N-OH группу, являются силь-

ными обратимыми конкурентными ингибиторами аргиназы с K_i в области 20-50 μM [12,19]. Константа ингибирования аргиназы печени крысы NOHA равна 42 μM , тогда как K_m для L-аргинина составляет 1-1,7 mM [13]. Авторы полагают, что эти ингибиторы могут быть аналогами промежуточных состояний, образующихся в ходе каталитической реакции, и N-OH группа способна заменить гидроксильный лиганд в марганцевом кластере аргиназы. N^ω-амино- L-аргинин, дезаминоаргинин, N^ω-аллиларгинин также ингибируют аргиназу, но величина константы ингибирования у этих соединений значительно больше [13] (табл.1).

Некоторые производные аргинина N^ω-амино-L-аргинин, N^ω-метил-L-аргинин и ряд соединений, содержащих гуанидиновую группу, слабо ингибируют или не ингибируют печеночную аргиназу. Однако они необратимо и эффективно ингибируют синтазу окиси азота (NOS) со значениями величины K_i от 3 до 30 μM [4,17]. NOS эффективно ингибируется агматинном и путресцином, канаванин и цитруллин слабо влияют на синтез NO, а NOHA не оказывает влияния на этот фермент. Разница в сродстве этих соединений к аргиназе и NOS в клетках, в которых присутствуют оба фермента, может играть решающую роль в регуляции процессов образования NO, синтеза полиаминов, пролина и др. [4,21].

Добавление CH₂-группы в углеродную цепь NOHA с образованием N^ω-OH-гомо-L-аргинина (homo-NOHA) уменьшает эффективность ингибирования аргиназы печени крысы более чем в 1000 раз [12]. Укорочение же цепи NOHA на одну CH₂-группу с образованием N^ω-OH-нор-L-аргинина (nor-NOHA), согласно данным ряда авторов, уменьшает величину K_i в 20 раз (табл.1). Это производное аргинина, как было показано, не только является эффективным ингибитором аргиназы, но и специфически модифицирует спектр ЭПР этого фермента [12] в отличие от NOHA и homo-NOHA. Авторы полагают, что в результате взаимодействия nor-NOHA с двухмарганцевым кластером аргиназы при замене -OH лиганда ионов марганца -N-OH группой изменяется междумарганцевое расстояние. Аминокислота dinor-NOHA, у которой углеродная цепочка укорочена на две CH₂-группы по сравнению с NOHA, тоже ингибирует аргиназу, но менее эффективно [21] (рис.2). N^ω-OH-L-орнитин в 37 раз слабее ингибирует аргиназу печени крысы, чем N^ω-OH-L-лизин, хотя отличаются они только одной метиленовой группой в боковой цепи аминокислоты [13].

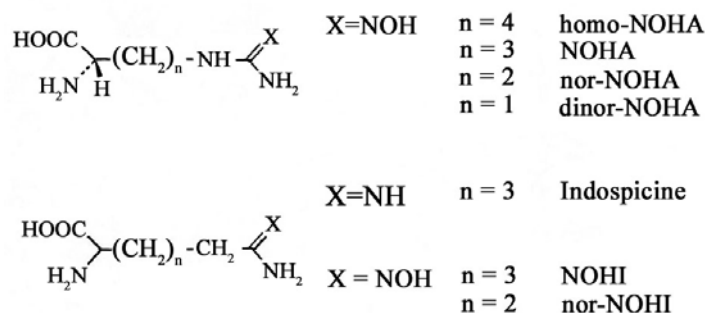


Рис. 2. Формулы некоторых ингибиторов аргиназы

Экспериментальные данные, полученные при изучении взаимодействия ингибитора *por*-NOHA с аргиназой печени крысы различными методами (термодинамическим, кристаллографическим и др.), позволили заключить, что в активном центре этого фермента имеются два полярных аминокислотных остатка – глутамат 277 (Glu 277) и гистидин 141 (His 141), которые являются консервативными. Остаток Glu 277 находится в глубине полости активного центра на расстоянии 4,5 Å от иона Mn_A^{2+} . Отрицательно заряженная боковая цепь Glu 277, по-видимому, образует связь (ионную или водородную) с гуанидиновой группой субстрата, ориентируя электрофильный гуанидиновый углерод аргинина прямо над мостиковой –ОН группой кластера, участвующей в катализе. Остаток гистидина His 141, как отмечалось ранее, локализован почти на половине расстояния наружу от расщелины активного центра и, по-видимому, участвует в реакции как переносчик протона.

Аминокислота индоспицин (L-2-амино-6-амидиногогексановая кислота) также является конкурентным ингибитором аргиназы (табл.1), (рис.2). У этой аминокислоты переходная –NH-группа аргинина заменена –CH₂-группой, а величина K_i равна 1,49 mM [20]. Однако синтезированные недавно производные этого соединения N^ω-ОН-индоспицин (NOHI) и особенно N^ω-ОН-*por*-индоспицин (*por*-NOHI) имеют очень высокое сродство к аргиназе (табл.1), (рис.2) [21]. Подробное исследование, проведенное с различными ингибиторами аргиназы, позволило заключить, что в процессах связывания аминокислоты в активном центре аргиназы решающую роль играет число атомов в боковой цепи между α-атомом углерода и терминальной N^ω-ОН группой. Их должно быть 4. Так, оба лучших ингибитора печеночной аргиназы *por*-NOHA и *por*-NOHI [21] имеют 4 атома в цепочке между α-атомом углерода и N^ω-ОН группой гуанидина [21], так же как и N^ω-ОН-L-лизин (табл.1) (рис.2). Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что δ-NH-группа субстрата или ингибитора, видимо, не участвует ни в связывании аминокислоты в активном центре фермента, ни в процессах катализа (см. выше).

Борат и гидроксилламин, которые структурно отличаются от аминокислот-ингибиторов, предположительно связываются с разными участками на поверхности молекулы аргиназы. Тетраэдрический анион бората является неконкурентным ингибитором аргиназы печени крысы [25] и быка [22] и, как полагают многие исследователи, может замещать связанную с металлом молекулу воды, ответственную за нуклеофильную атаку на гуанидиновый углерод субстрата [25]. Как показано в работе [25], борат и мочевины связываются с аргиназой во взаимоисключающей манере, тогда как орнитин и борат могут связываться одновременно. Изучение кристаллической структуры тройного комплекса, образующегося при связывании с аргиназой одновременно орнитина и бората, показало, что орнитин легко отделяется от аргиназы, так как взаимодействует с внешней сферой марганцевого центра [5]. Лизин же связывается с активным центром более тесно.

Борсодержащий аналог аргинина L-2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH) является обратимым и наиболее эффективным из известных в настоящее время конкурентных ингибиторов аргиназы [5,11]. Это соединение взаимодействует с марганцевым кластером фермента, образуя комплекс, который, как полагают авторы, моделирует переходное состоя-

ние, образующееся в процессе гидролиза аргинина [11]. Чем ближе структурная аналогия между ингибитором и каталитическим переходным состоянием, тем крепче связывается ингибитор [5].

С целью изучить участки связывания субстратов и ингибиторов в активном центре аргиназы были синтезированы аминокислоты, содержащие альдегидную группу в боковой цепи, в которой электрофильная $C=O$ связь изостерична по отношению к $C=N$ связи L-аргинина (рис.3).

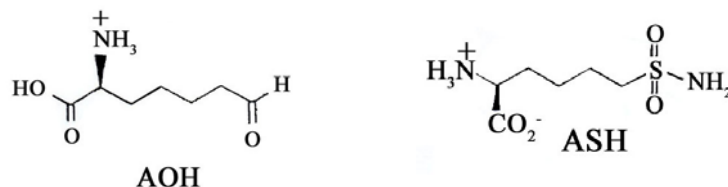


Рис. 3. Формулы новых синтезированных ингибиторов аргиназы, содержащих карбонильную (АОН) и сульфонамидную (ASH) группы.

Величины констант ингибирования аргиназы печени крысы этими соединениями находятся в области микромолярных концентраций [26]. Так, величина K_i для (S)-2-амино-7-оксогептановой кислоты (АОН) равна 60 μM (табл.1). Результаты этих исследований показывают, что в стабилизации переходного состояния, образующегося при связывании аргиназы с аргинином, так же, как и с этими ингибиторами, участвует карбоксильная группа остатка Glu 277 (водородная связь). Сходные связи образуются при связывании в активном центре и другого ингибитора аргиназы – АВН. В последнем случае, однако, имеет место двойное координационное взаимодействие и образование дополнительной водородной связи, в результате чего сродство АВН к активному центру фермента увеличивается [26]. Модель предполагаемого взаимодействия аргинина и АВН с активным центром аргиназы показана на рис. 4.

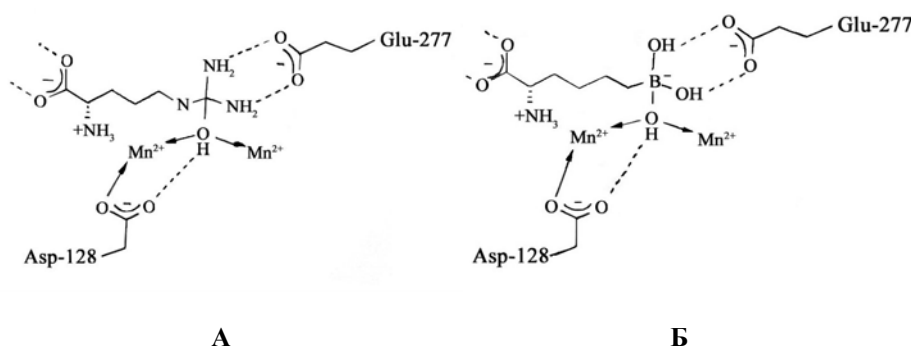


Рис.4. А. Предполагаемое промежуточное соединение, образующееся при гидролизе аргинина аргиназой в результате нуклеофильной атаки связанного с металлом иона гидроксида на гуанидиновый углерод аргинина.

Б. Предполагаемое промежуточное соединение, образующееся при взаимодействии аналога аргинина АВН в гидратированной форме с активным центром аргиназы.

Синтезированные теми же исследователями сульфонамидные аминокислоты тоже эффективно ингибируют печеночную аргиназу [7]. Боковые цепи этих соединений содержат тетраэдрические сульфонамидные группы, которые образуют координационную связь с ионами марганца и остатком Glu 277 аргиназы. Величина K_i для (S)-2-амино-6-сульфонамидогексановой кислоты (ASH) равна - 90 μ M (табл.1), (рис.3). Как полагают авторы, ионизирующаяся сульфонамидная группа является прекрасным связывающим лигандом в образующемся фермент-ингибиторном комплексе. Еще одна аминокислота S-(2-боро-этил)-L-цистеин (BEC) [7] (табл.1) также является эффективным ингибитором аргиназы. Обе борсодержащие аминокислоты АВН и БЕС связываются с активным центром аргиназы печени крысы при щелочных рН. Однако, хотя эти ингибиторы имеют высокое сродство к ферменту, они сравнительно легко удаляются из активного центра аргиназы в отличие от более прочно связывающихся NOHA и *pro*-NOHA [10].

Кристаллографическое изучение комплексов синтезированных аминокислот-ингибиторов с аргиназой показало, что карбоксильная и аминокислотные группы различных ингибиторов образуют водородные связи с разными окружающими аминокислотными остатками в активном центре фермента, что, по мнению исследователей, изменяет ориентацию их полярных групп относительно марганцевого кластера аргиназы и в конечном счете влияет на величину K_i [7] (табл.1). Эти обнаруженные сравнительно недавно ингибиторы проявляют значительно более высокое сродство к аргиназе, чем сам аргинин. Большинство исследователей объясняет это явление тем, что новые аминокислоты-ингибиторы, связываясь с активным центром фермента, образуют тетраэдрические соединения, копирующие промежуточные переходные состояния, возникающие при катализе [7].

Эффективные ингибиторы аргиназы, повышая уровень аргинина в клетках, способствуют NO-зависимой релаксации тканей гладких мышц, повышая возможность использования аргинина NOS. В связи с этим в последнее время появился большой интерес к использованию ингибиторов аргиназы как возможных терапевтических агентов в устранении различных гастроэнтерологических и сексуальных нарушений функций гладкой мускулатуры [7,10,11].

Как видно из вышеизложенного, в настоящее время получено немало новых интересных сведений о связывании различных субстратов и ингибиторов в активном центре фермента, помогающих понять неизвестные ранее особенности взаимодействия фермента с субстратом. Дальнейшее использование ингибиторного анализа, сайт-направленного мутагенеза, х-лучевой кристаллографии и других современных методов исследования, возможно, в ближайшем будущем позволят более детально разобраться в процессах, происходящих в ходе каталитической реакции аргиназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян М.Л., Давтян М.А., Григорян А.Г., Уч. Записки ЕГУ, 2, 66-69, 1995.
2. Геворкян М.Л., ДНАН Армении, 105, 1, 71-77, 2005.
М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН
3. Давтян М.А., Геворкян М.Л., Биолог.журн. Армении, 42, 1, 41-48, 1989.
4. Проскуряков С.Я., Конопляников А.Г., Скворцов В.Г., Мандругин А.А., Федосеев В.М., Биохимия, 70, 1, 14-32, 2005.
5. Baggio R., Elbaum D., Kanyo Z.F., Carroll P.J., Cavalli R. Ch., Ash D.E., Christianson D.W., J.Am.Chem.Soc., 119, 34, 8107-8108, 1997.

6. *Bagnost T.,Guillaume Y-C.,Thomassin M., Robert J-F.,Berthelot A., Xichuna A., Andre C.*, J. Chromatography B, 856, 113-120, 2007.
7. *Cama E., Shin H., Christianson D.W.*, J.Am.Chem.Soc., 125, 13052-57,2003.
8. *Cama E., Emig F.A.,Ash D.E., Christianson D.W.*, Biochemistry, 42, 7748-7758, 2003.
9. *Carvajal N., Cederbaum S.D.*, BBA, 870, 2, 181-184, 1986.
10. *Colleluori D.M., Ash D.E.*, Biochemistry, 40, 9356-9362, 2001.
11. *Cox J.D., Kim N.N., Traish A.M., Christianson D.W.*, Nature, Struct Biol., 6, 11, 1043-47, 1999.
12. *Custot J., Moali C., Brollo M., Boucher J.I., Delaforge M.,Mansuy D.,Tenu J.P., Zimmermann J.I.*, J.Am.Chem.Soc., 119, 17, 4086-4087, 1997.
13. *Dagigh F.,Fukuto J.M., Ash D.E.*, B.B.R.C., 202, 1, 174-18-, 1994.
14. *Han S., Viola R.E.*, Anal.Biochem., 295, 117-119, 2001.
15. *Han S., Moore R.A., Viola R.E.*, Bioorg.Chem., 30, 81-94, 2002.
16. *Hunter A., Downs C.E.*, J.Biol.Chem., 157, 2, 427-446, 1945.
17. *Hrabak A., Bajor T., Temesi A.*, Comp.Biochem.Physiol., 113B, 2, 375-381, 1996.
18. *Kawamoto S., Amaya Y., Murakami K., Tokunaga F., Iwanaga S.,Kobayashi K.,Saheki T., Kimura S., Mori M.*, J.Biol.Chem., 262, 13, 6280-83, 1987.
19. *Khangulov S.V., Sossong T.M., Jr., Ash D.E., Dismukes G.Ch.*, Biochemistry, 37, 8539-8550, 1998.
20. *Madsen N.P.,Hegarty M.P.*, Biochem. Pharmacol., 19, 7, 2391-2393, 1970.
21. *Moali C., Brollo M., Sari M-A., Boucher J-I., Stuehr D.J., Mansuy D.*, Biochemistry, 39, 8208-8218, 2000.
22. *Pace C.N., Landers R.A.*, B.B.A., 658, 410-412, 1981.
23. *Perozich J., Hempel J., Morris Jr. S.M.*, B.B.A., 1382, 23-37, 1998.
24. *Pethe S., Boucher J-I., Mansuy D.*, J.Inorg.Biochem., 88, 397-402, 2002.
25. *Reczkowski R.S., Ash D.E.*, Arch. Biochim.Biophys., 312, 1, 31-37, 1994.
26. *Shin H., Cama E., Christianson D.W.*, J.Am.Chem.Soc., 126, 10278-84, 2004.
27. *Subrahmanyam T.S., Reddy S.R.*, Indian J.Biochem.Biophys., 23, 6, 359-361, 1986.
28. *Vadon S., Custot J., Boucher J-I., Mansuy D.*, J.Chem.Soc.Perkin Trans. 1, 7, 645-648, 1996.
29. *Xie X-Y., Wang C.-X., Wang Z-Y.*, J.Therm.Anal.Cal., 77, 1005-12, 2004.

Поступила 29.09.2008