

Enzymes

third edition

MALCOLM DIXON Sc. D., F. R. S.
Emeritus Professor of Enzyme
Biochemistry,
University of Cambridge,
Honorary Fellow of King's College,
Cambridge

and

EDWIN C. WEBB M. A., Ph. D.,
Hon. D. Sc., F. R. A. C. I.
Vice-Chancellors, Macquarie
University
Emeritus Professor of Biochemistry,
University of Queensland

assisted by

C. J. R. Thorne M. A., Ph. D.
Lecturer in Biochemistry,
University of Cambridge
Fellow of St Catharine's College,
Cambridge

and

K. F. Tipton M. A., Ph. D.
Professor of Biochemistry,
Trinity College, Dublin

0535084-1

**М. ДИКсон
Э. Уэбб**

Ферменты 2

В трех томах

**Перевод с английского
доктора хим. наук Л. М. Гинодмана
и
канд. биол. наук М. И. Левянт
под редакцией
доктора хим. наук В. К. Антонова
и
акад. А. Е. Браунштейна**



Москва «Мир» 1982

Диксон М., Уэбб Э.

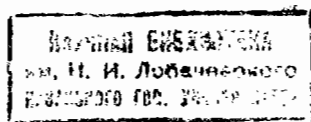
Д45 Ферменты: Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Т. 2—515 с., ил.

Фундаментальная работа по биологии и химии ферментов, написанная крупными английскими биохимиками; отчасти уже известна советскому читателю по переводам двух предыдущих изданий (М.: ИЛ, 1961 и М.: Мир, 1966). Перевод третьего английского издания выходит в трех томах.

Второй том содержит главы о механизме действия ферментов, об их ингибиторах, активаторах и коферментах, а также о структуре ферментов.

Для энзимологов, биохимиков, химиков, студентов, аспирантов и преподавателей биологических и химических факультетов.

Редакция литературы по биологии



Д 2007020000—090
041(01)—82 — подп. изд-е, 82, ч. 1

- © Longman Group Ltd. 1979. This edition of ENZYMES by M. Dixon and E. C. Webb is published by arrangement with Longman Group Limited
- © Перевод на русский язык, «Мир», 1982

Глава 7

Механизм действия ферментов

Можно без преувеличения сказать, что наиболее фундаментальной проблемой энзимологии является выяснение механизма действия ферментов. Ферменты являются замечательными катализаторами, осуществляющими с большой скоростью и 100%-ным выходом такие химические реакции, которые трудно провести в лаборатории, и механизм их действия интересует как химиков, так и биологов.

Как и следовало ожидать, выяснение механизма, благодаря которому сложные белковые соединения осуществляют столь специфичный и эффективный катализ, является очень трудной задачей, решение которой часто требует использования данных, полученных в результате применения различных подходов. Для подавляющего большинства ферментов механизм катализа специфических реакций во многом остается неясным, хотя по этому поводу высказано большое число в той или иной мере правдоподобных предположений. В настоящее время можно утверждать, что нет такого фермента, механизм действия которого был бы твердо установлен. В литературе приводится много схем, поясняющих, каким образом химические группы активных центров ферментов взаимодействуют с молекулами субстратов, вызывая наблюдаемые реакции. Однако почти всегда эти схемы рассматриваются как «гипотетические» или «согласующиеся с имеющимися данными», и нет оснований считать, что они отражают истинный процесс.

Для двух групп ферментов, однако, установлены структура активного центра и характер их взаимодействий с субстратом, что создает относительно надежную основу для выяснения механизма действия этих ферментов. К первой группе относятся ферменты, трехмерная структура которых определена с помощью рентгеноструктурного анализа (см. гл. 10). Для некоторых из них установлена также структура фермент-субстратного комплекса, в результате чего удастся определить положение субстрата в активном центре, природу групп активного центра, связывающих субстрат, и идентифицировать группы субстрата, взаимодействующие с каждой из групп активного центра. Этот метод

позволяет выяснить размеры, форму и положение активного центра в молекуле фермента, а также изменения, которые могут происходить при взаимодействии с субстратом. Такие исследования могут быть выполнены, конечно, только на тех ферментах, которые образуют кристаллы, удовлетворяющие требованиям рентгеноструктурного анализа.

Ко второй группе (несколько более многочисленной) относятся те ферменты, в активном центре которых находятся либо особые простетические группы (например, пиридоксальфосфат, флаavin, гем и т. д. — особенно такие, которые имеют характерный спектр поглощения; см. гл. 9), либо атом металла. Часто удается установить, какие изменения претерпевают эти простетические группы в процессе реакции, или идентифицировать соединения, которые они образуют с субстратами. Во многих случаях это помогает выяснить механизм реакции. В последние годы достигнут значительный прогресс в установлении механизма каталитического действия обеих групп ферментов.

Следует отметить, что понятие «механизм ферментативной реакции» используется некоторыми авторами в ином смысле, чем тот, который оно имеет в данной книге. Под механизмом они понимают кинетический механизм, т. е. порядок присоединения субстратов к данному ферменту — связывается ли субстрат А с ферментом ранее, чем субстрат В, или они взаимодействуют неупорядоченно. Мы же, употребляя этот термин, имеем в виду то, как именно функционирует фермент, почему под действием определенного ансамбля аминокислот в активном центре фермента субстрат претерпевает специфическое химическое превращение, короче говоря — что происходит в фермент-субстратном комплексе после его образования. Кинетический «механизм» не дает ответа на эти вопросы, хотя в ряде случаев может помочь в их решении.

Главной особенностью ферментативной реакции является то, что она протекает в составе активного комплекса, образованного в результате связывания субстрата с определенным участком молекулы фермента (активным центром, или центром связывания), к которому субстрат обладает специфическим сродством. Это взаимодействие обычно стабилизируется образованием ряда связей между группировками молекулы субстрата и определенным образом расположенными группами фермента (см., например, рис. 10.23). Взаимодействие между ферментом и субстратом может осуществляться с помощью ковалентных и водородных связей, электростатических и гидрофобных сил и т. д. Активный центр является, следовательно, весьма сложной структурой, которая может составлять существенную часть молекулы фермента; часто он имеет форму щели, в которой размещается субстрат (см. гл. 10). Поскольку фрагменты субстрата связываются с конкретными участками активного центра фермента, субстрат

фиксируется на ферменте, принимая определенную конфигурацию.

Конечно, в реакции могут участвовать разные субстраты; они специфически связываются с расположенными поблизости участками активного центра и удерживаются в такой взаимной ориентации, которая наиболее благоприятна для их взаимодействия друг с другом.

Связывание субстрата с активным центром фермента должно быть достаточно легко обратимым, в противном случае активный центр окажется заблокированным первой же присоединившейся молекулой субстрата, и каталитический цикл не сможет осуществиться. Из этого следует, что, несмотря на значительные различия в эффективности фермент-субстратных взаимодействий в различных системах, связывание между группами фермента и соответствующими группами субстрата должно быть довольно слабым. В то же время наличие большого числа одновременно взаимодействующих групп обеспечивает достаточно высокое сродство. Для этого различные группы фермента должны быть расположены надлежащим образом, чтобы связывание их с группами субстрата могло осуществляться одновременно. Это является основой специфичности фермента, соответствия между ферментом и субстратом по типу «замок — ключ».

Можно легко показать, что реакции, катализируемые подавляющим большинством ферментов, обратимы, т. е. данный фермент катализирует реакцию в обоих направлениях. Отсюда следует, что активный центр фермента может специфически связывать как субстрат, так и продукт; связанный реактант активируется и оказывается способным к соответствующему превращению. Молекулы субстрата и продукта несколько различаются по форме, и напрашивается вывод, что при превращении одного в другой образуется соединение, имеющее «промежуточную» форму. Весьма заманчиво предположить, что активный центр фермента комплементарен именно этому интермедиату. Активный центр не может одновременно точно соответствовать и субстрату, и продукту без некоторого изменения своей структуры; при взаимодействии с активным центром субстрат или продукт приближаются по своей конформации к интермедиату и, таким образом, активируются для определенной трансформации. Чтобы различные группы субстрата (или продукта), участвующие в связывании, могли взаимодействовать с соответствующими группами фермента, должно произойти некоторое изменение конформации как субстрата, так и фермента; масштаб этих изменений зависит от жесткости химических структур молекул фермента и субстрата. В изменении конформации активного центра, в который входят группировки из различных участков пептидной цепи, сближенные благодаря ее характерной укладке (см. гл. 10), определена роль играет гибкость всей белковой молекулы.

Концепция, изложенная выше в общих чертах, послужила основанием для создания целого ряда теорий механизма действия ферментов — от «теории напряжения» Холдейна [1749, с. 182, 1930 г.] до теории «индуцированного соответствия» Кошланда [2564, 1958 г.]. В основе первой теории лежит представление о возникновении в молекуле субстрата напряжения, обусловленного взаимодействием с активным центром, а во второй основное внимание уделяется изменению конформации в области активного центра вследствие взаимодействия с субстратом. Термин «индуцированное соответствие» предполагает, что активный центр фермента в отсутствие субстрата не комплементарен субстрату и что именно взаимодействие с молекулой субстрата индуцирует формирование комплементарной конфигурации (см. с. 344—347).

Изменения конфигурации активного центра при взаимодействии с субстратом были подтверждены в нескольких случаях методом рентгеноструктурного анализа путем сопоставления пространственных структур фермента и фермент-субстратного комплекса (см. рис. 10.24). Полученные данные свидетельствуют о том, что происходящие изменения представляют собой не крупномасштабные изменения структуры фермента, а небольшие смещения определенных связывающих групп. Поскольку свободный активный центр способен присоединять субстрат, естественно, конечно, полагать, что изменения конформации активного центра при связывании относительно невелики.

Для современных представлений о химических аспектах ферментативных реакций характерна четко выраженная тенденция опираться на химические свойства самого субстрата. Это вполне естественно: несмотря на всю сложность, в действии ферментов нет ничего таинственного и в основе ферментативных реакций, несомненно, лежат обычные химические процессы. При этом, однако, следует понимать, что по существу речь идет о свойствах не свободного субстрата, а совершенно другого соединения — фермент-субстратного комплекса, который может обладать (и обычно действительно обладает) новыми свойствами. В составе комплекса группы субстрата взаимодействуют с определенными группами фермента, конформация субстрата в комплексе может отличаться от той, которую он имеет в свободном состоянии в растворе, и в нем могут возникать внутренние напряжения. В связи с этим судить о химическом поведении субстрата в составе комплекса на основании его свойств в растворе нужно с осторожностью.

Ситуация, однако, отчасти упрощается в тех случаях, когда составной частью активного центра фермента является специализированная структура — простетическая группа (например, пиридоксальфосфат), которая взаимодействует с субстратом. Если такое соединение и его производное могут быть исследованы в

растворе и если оно может взаимодействовать с субстратом и в отсутствие фермента, то с помощью спектроскопических или каких-либо других методов удастся идентифицировать промежуточные формы, образующиеся в ходе ферментативной реакции. В этом случае исследование химических свойств свободной протетической группы и ее комплексов с субстратом может дать важную информацию о механизме ферментативного катализа.

Помимо протетических групп органической природы ферменты могут содержать ионы некоторых металлов (один или несколько атомов), участвующие в каталитическом процессе; при этом ионы часто претерпевают изменения (например, меняется их валентность), которые могут быть обнаружены физическими методами. Так, молекула одного из весьма сложных ферментов, ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2), содержит одну молекулу флавина, один атом молибдена, четыре атома железа, соединенные с лабильными атомами серы (два атома железа находятся в одном состоянии, два — в другом), и полисульфидную группу. Все эти компоненты принимают участие в катализе, и изучение поведения различных компонентов в ходе реакции создает благоприятные возможности для выяснения ее механизма.

АКТИВНЫЙ ЦЕНТР

Очевидно, что важным этапом при исследовании механизма действия фермента является определение размеров и топографии активного центра. В этом направлении за последние несколько лет достигнуты большие успехи благодаря развитию методов определения химической и пространственной структуры молекул ферментов (см. гл. 10).

В 1960 г., рассматривая вопрос о протяженности активного центра и критериях, которыми можно руководствоваться при решении вопроса о наличии в нем тех или иных групп, Кошланд [2566] предложил выделить несколько групп аминокислот в структуре фермента. (а) Группа «контактных» аминокислот; они локализованы на расстоянии около 2 Å от субстрата и, следовательно, как можно полагать, находятся в контакте с субстратом в том смысле, что один или несколько атомов этих аминокислот оказываются на расстоянии, равном длине химической связи (около 2 Å) от одного или нескольких атомов молекулы субстрата. (б) «Дополнительные» аминокислоты, которые могут и не находиться в контакте с субстратом, но играют определенную роль в функционировании фермента; их можно рассматривать как часть активного центра, поскольку они в какой-то мере определяют его свойства и структуру. Входящие в активный центр аминокислоты групп (а) и (б) могут быть значительно удалены друг от друга на уровне первичной структуры, однако благодаря тому, что полипептидная цепь складывается определенным образом (третичная структура), эти аминокислоты сближаются. Ами-

нокислоты групп (а) и (б) связаны с группой (в) «вспомогательных» аминокислот, которые непосредственно не участвуют в катализе, но образуют стабильный «каркас» активного центра. Наконец, в ферменте можно иногда выделить группу (г) «инертных» аминокислот, которые не принимают в катализе даже косвенного участия, поскольку при их удалении не изменяется ни реакционная способность, ни специфичность фермента.

Следует отметить, что Кошланд высказал свои положения еще до того, как развитие методов рентгеноструктурного анализа позволило установить структуру активных центров некоторых ферментов и характер взаимодействия субстрата с группами центра. В тех случаях, когда была получена соответствующая информация, удалось идентифицировать «контактные» аминокислоты группы (а) и с известной степенью вероятности также некоторые из «дополнительных» аминокислот, принадлежащих к группе (б). По этим данным можно составить представление о протяженности активного центра. Необходимо, однако, подчеркнуть, что такой подход ограничен теми немногими случаями, когда фермент-субстратный комплекс достаточно стабилен в кристаллическом состоянии и может быть исследован методом рентгеноструктурного анализа. С первого взгляда кажется, что такая ситуация крайне маловероятна, и тем не менее в ряде случаев удается получить стабильные ES-комплексы либо путем выбора соответствующих условий (например, pH), при которых скорость реакции снижается практически до нуля, либо путем добавления к ферменту, катализирующему двухсубстратную реакцию, только одного субстрата. Однако тот факт, что реакция не идет, может свидетельствовать об отсутствии нормальной активной структуры.

Для большинства ферментов трехмерная структура ES-комплекса не установлена и для идентификации групп, входящих в состав активного центра, приходится прибегать к косвенным методам.

Основным подходом, позволяющим установить, участвует ли в катализе та или иная группа активного центра, является обработка фермента химическим реагентом, который специфически атакует данную группу, образуя стабильное соединение. Если группа является существенным компонентом активного центра, то модифицированный фермент оказывается неактивным; природа модифицированной группы и ее положение в белковой цепи могут быть определены обычными методами установления аминокислотной последовательности. Эта задача облегчается при использовании радиоактивного реагента.

Очевидной трудностью, с которой сопряжен этот подход, является выбор реагента, специфичного к одной определенной группе. Идентифицируемая группа — это, по-видимому, боковая цепь какой-либо аминокислоты, а в белковой молекуле может

присутствовать несколько остатков данной аминокислоты, причем большинство из них не находятся в области активного центра. Скорее всего используемый реагент будет специфичен к данной аминокислоте вообще, а не к индивидуальному остатку, так что в ферменте окажется несколько меченых остатков и будет трудно решить, какой из них находится в активном центре, т. е. установить, модификация какого именно остатка вызывает ингибирование.

Известны, однако, реагенты, специфичные к конкретным остаткам, они реагируют только с теми из них, которые находятся в определенном окружении. Например, диизопропилфторфосфат (DFP) очень легко реагирует со строго определенным остатком серина в молекуле фермента, а иодацетамид реагирует с существенно разной скоростью с различными остатками цистеина в белках. Следует все же отметить, что только в немногих случаях реагенты оказываются достаточно высоко специфичными к индивидуальным остаткам и с их помощью удастся идентифицировать группы активных центров. Однако эти трудности можно преодолеть, если использовать способность субстрата защищать функциональную группу активного центра. В условиях насыщения фермента субстратом до обработки реагентом в результате взаимодействия с субстратом группы субстратсвязывающего участка окажутся заблокированными, в то время как другие группы такого типа, не находящиеся в активном центре, будут вступать в реакцию с реагентом. Если затем избыток реагента и субстрата удалить путем диализа, а фермент снова обработать реагентом, но на этот раз радиоактивным, то группы, не находящиеся в активном центре, не смогут реагировать, поскольку они уже блокированы нерадиоактивным реагентом, группы же активного центра вступят в реакцию, так как они теперь не защищены субстратом. В результате радиоактивная метка окажется включенной только в группы, находящиеся в области активного центра, и их локализация в белковой цепи может быть установлена обычными методами. Этот подход с использованием меченого DFP (см. с. 440) применен в работе [812] при исследовании ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7).

Вместо субстрата в ряде случаев подобным образом можно использовать аналоги субстрата или конкурентные ингибиторы, которые взаимодействуют с субстратсвязывающим участком. Некоторые аналоги субстратов могут быть также использованы по принципу «аффинной метки». Аффинная метка — это конкурентный ингибитор, имеющий активную группу, обычно галоидсодержащую, которая необратимо (ковалентно) связывается с ферментом. Благодаря своей специфичности фермент взаимодействует с субстрат-подобной частью реагента в активном центре, и последний оказывается меченым в результате необратимой ре-

Подход, который был применен при исследовании некоторых ферментов (например, химотрипсина), образующих ковалентные интермедиаты, получил название фотомаркировки. Субстрат с диазоацильной группой (вместо обычной ацильной) образует диазоацилфермент. При освещении ультрафиолетовым светом диазоацильная группа превращается в очень реакционноспособную карбеновую группу, при взаимодействии которой со многими соседними боковыми группами образуются соответствующие карбоксиметильные производные. Анализ и идентификация смеси продуктов позволяют получить определенную информацию о природе групп, окружающих связывающую ацильный фрагмент группу активного центра.

Различные подходы, использующиеся при идентификации групп субстратсвязывающих участков ферментов, рассмотрены в работе [4724]. Эти подходы дают, однако, фрагментарную картину — они позволяют выяснить природу лишь некоторых групп активного центра; для получения же общего представления о строении всего центра необходимо суммировать результаты, полученные с помощью различных методов. Рассмотренные подходы не могут, следовательно, заменить метод рентгеноструктурного анализа, который позволяет установить полную трехмерную структуру активного центра. С другой стороны, эти подходы оказываются весьма эффективными при изучении многих ферментов, которые еще не могут быть исследованы рентгеноструктурным методом.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

Для выяснения механизма действия фермента необходимо сопоставить информацию различного рода. Ниже мы суммируем основные сведения, которые позволяют получить достаточно полное представление о механизме действия фермента.

Прежде всего нужны детальные данные о первичной и третичной структуре фермента, особенно в области активного центра; такие данные были получены для ряда ферментов с помощью рентгеноструктурного анализа и метода определения аминокислотной последовательности (см. гл. 10). Для ферментов, которые не могут быть исследованы обоими этими методами, некоторую информацию удастся получить с помощью рассмотренных в предыдущем разделе методов, основанных на использовании разного рода ингибиторов (см. гл. 8). Необходима также информация о строении, физических и химических свойствах простетической группы фермента (если она имеется), в том числе о ее спектре поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях (см. гл. 9),

а также о каталитически важных атомах металла (см. гл. 8), в частности об их спектрах ЭПР. Изучение мутантных форм фермента тоже может служить источником информации о влиянии на активность замены определенных аминокислот и, таким образом, способствовать выяснению каталитического механизма (см. гл. 12).

Необходимо также располагать данными о структуре субстрата, чтобы сравнить его исходную конфигурацию с той, которую он принимает в фермент-субстратном комплексе. Такие же данные желательно иметь и о продукте. Если для реакции необходимы какие-либо другие компоненты, например активаторы, то нужно иметь представление о характере их действия (см. гл. 8 и 9), о природе взаимодействия с ферментом, о том, какие изменения конфигурации фермента и особенно его активного центра происходят при связывании этих компонентов и какие химические изменения претерпевают они в процессе реакции.

Важно иметь как можно более полную трехмерную картину фермент-субстратного комплекса — такую, какая была получена для ряда ферментов с помощью рентгеноструктурного анализа. Далее следует установить, как происходит связывание молекулы субстрата в активном центре, какие группы участвуют в связывании и каким образом субстрат удерживается в надлежащей для протекания реакции ориентации. Сравнение структуры свободных субстрата и фермента со структурой их в составе фермент-субстратного комплекса позволяет судить об изменении конформации молекулы субстрата в результате связывания с активным центром и конформации фермента при связывании субстрата; это помогает установить, какие напряжения возникают в ферменте и субстрате при образовании комплекса, а также высказать предположения об их роли в осуществлении реакции. Возможно, удастся выяснить также характер микроокружения различных групп и различных частей молекулы субстрата, например выявить наличие локальных электростатических полей, обусловленных сближением заряженных групп, которые могут играть важную роль в катализе.

В отсутствие рентгеноструктурных данных ценную информацию о конфигурационных взаимоотношениях между активным центром и субстратом можно получить, изучая влияние модификации структуры субстрата на его сродство к ферменту, т. е. исследуя специфичность (см. гл. 6), а также на основании аналогичных исследований с конкурентными ингибиторами, сходными по структуре с субстратом (см. гл. 8). Для установления собственно механизма реакции используется несколько методов. Интермедиаты, имеющие характерные спектры поглощения в видимой или ультрафиолетовой областях, спектры ЯМР, ЭПР, ДОВ и т. д., идентифицируют с помощью методов регистрации быстрых реакций (см. гл. 4), при этом наиболее эффективным оказы-

вается метод быстрого замораживания, позволяющий остановить реакцию через определенные промежутки времени. Для выявления связи, по которой происходит расщепление в ходе реакций гидролиза и переноса групп, используют изотопы, в частности ^{18}O . По наличию или отсутствию оптической инверсии можно судить, как протекает реакция — в одну или две стадии. Используя дейтериевую метку, можно установить, в какой форме происходит перенос восстановительных эквивалентов, и определить взаимное расположение донора и акцептора в ходе окислительно-восстановительных реакций. Свидетельства в пользу того, что реакция протекает по механизму двухстадийного переноса, могут быть получены путем кинетических исследований.

При изучении ферментов, активируемых металлами (например, Zn , Mg , Co), ценную информацию о механизме реакции может дать определение расстояний между атомом металла и ядром данного атома субстрата, а также сведения об изменении этих расстояний при взаимодействии субстрата с ферментом [3158]. «Эффективным методом установления расстояния между атомом металла и субстратом в соответствующих комплексах с ферментом является определение влияния парамагнитного иона металла переходной группы на время продольной релаксации ядра со спином $1/2$ в молекуле субстрата». Такими ядрами могут служить ^1H , ^{31}P , ^{13}C и ^{19}F ; на основании полученных данных Миллдан предлагает схемы вероятных механизмов действия алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) [4324], пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) [3156, 3158], креатинкиназы (КФ 2.7.3.2) [3156], фосфоглюкомутазы (КФ 2.7.5.1) [1356], щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) [3156], фруктозо-бисфосфатазы (КФ 3.1.3.11) [3156], АТРазы $[(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-активируемой}]$ (КФ 3.6.1.3) [3156], фосфоенолпируват-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) [3156], аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3) [4900], манделатрацемазы (КФ 5.1.2.2) [2929], енолазы (КФ 4.2.1.11) [3158, 3486], ДНК-полимеразы (КФ 2.7.7.7) [4323] и пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) [1482].

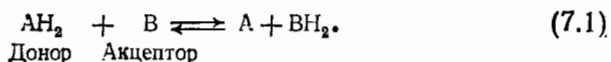
Едва ли нужно говорить о том, что ни один из ферментов не изучен столь подробно, как это предусматривается приведенным выше перечнем возможных путей исследования, и мы еще далеки от полного понимания механизма катализа, осуществляемого каким-либо ферментом. Приходится признать, что исключительно высокая каталитическая активность многих ферментов еще не получила объяснения. Ясно также, что никакого общего механизма ферментативного катализа не существует, напротив, имеется значительное число разных механизмов.

Далее мы рассмотрим вопросы, касающиеся механизма действия различных классов ферментов (в той последовательности, в которой они приведены в Списке ферментов), а также соответствующие методы их исследования.

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Этот класс, наиболее обширный из числа представленных в Списке, включает ферменты, катализирующие реакции между двумя субстратами, из которых один (часто называемый донором) восстанавливает (т. е. при этом сам окисляется) другой (акцептор). Термины «донор» и «акцептор» введены потому, что реакция по существу является реакцией переноса восстановительных эквивалентов (обычно двух) от одного субстрата к другому; эти термины используют применительно к различным формам переноса восстановительных эквивалентов (например, при переносе атомов водорода, электронов, гидрид-ионов и т. д.). Очень часто при окислении донора происходит превращение

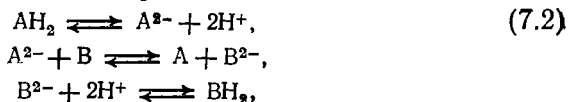
—СНОН-группы в >C=O -группу или —СН₂·СН₂-группы в —СН=СН-группу в результате отщепления двух атомов водорода. Другими словами, суммарная реакция является реакцией дегидрирования донора, и соответствующий фермент называется дегидрогеназой, а общее уравнение реакции может быть записано в следующем виде:



Многие из этих реакций являются обратимыми, что затрудняет наименование индивидуальных ферментов, поскольку в качестве главного можно выбрать любое из направлений реакции и донором можно считать либо АН₂, либо ВН₂. Обычно, однако, фермент специфичен преимущественно к одному из реактантов в обеих формах (например, АН₂ и А); этот реактант и рассматривается как собственно субстрат. Другой реактант (В и ВН₂) является обычно относительно неспецифичным в том смысле, что он может взаимодействовать сходным образом с рядом разных ферментов. Выбирая название для фермента, в таком случае основываются на наименовании специфического субстрата, и фермент называют «АН₂-дегидрогеназа». В немногих случаях, особенно когда равновесие сильно смещено влево, за основу берут обратное направление реакции, и фермент несколько условно называют «А-редуктаза».

В прошлом широкая дискуссия, связанная с действием оксидоредуктаз, касалась главным образом вопроса о форме переноса восстановительных эквивалентов от донора к акцептору, т. е. вопроса о том, как следует говорить, — «перенос электронов» или «перенос водорода». Ясно, что суммарная реакция (7.1) является реакцией переноса водорода, однако не следует полагать, что окислительно-восстановительный процесс осуществляется именно путем переноса такого типа. Часто необоснованно предполагают, что суммарная реакция отражает механизм процесса, хотя в дей-

ствительности она ничего не говорит об истинном механизме промежуточных стадий, и нет оснований полагать, что на собственно окислительно-восстановительной стадии участвует именно форма ВН_2 . Различные возможности возникают в связи с тем обстоятельством, что некоторые атомы водорода, участвующие в переносе, могут находиться в ионизированном состоянии; вполне возможно, что с активным центром реагирует одна из ионных форм. Например, в процессе могут участвовать полностью ионизированные формы АН_2 и ВН_2 . В этом случае суммарный процесс при низком рН состоит из трех стадий



и собственно окислительно-восстановительная стадия осуществляется в результате переноса электронов. Первая и третья стадии протекают в растворе вне связи с ферментом, ферментативной реакцией является вторая стадия. Сумма трех стадий — это суммарная реакция (7.1). Способность АН_2 и ВН_2 к ионизации означает, что эти реагенты при изменении рН находятся в растворе в различных формах и, следовательно, характер суммарной окислительно-восстановительной реакции зависит от рН. В кислом растворе донор находится (преимущественно) в виде АН_2 и его окисление представляет собой дегидрирование. В щелочном растворе преобладающей формой является А^{2-} ; эта форма окисляется в результате переноса электронов на В. Если константы диссоциации АН_2 и ВН_2 значительно различаются, то имеется пять областей рН, для каждой из которых характерна своя суммарная реакция (табл. 7.1).

В области 1 окислительно-восстановительная реакция является реакцией переноса водорода, в области 5 — реакцией переноса электронов, а в области 3 — реакцией переноса гидрид-иона (Н^-); в областях, промежуточных между рассмотренными выше, характер реакции не может быть описан в столь простой форме.

Уравнение суммарной реакции, конечно, ничего не говорит о действительном механизме самой окислительно-восстановительной стадии; оно отражает лишь общий характер процесса, а именно: какие формы имеются в исходном и конечном состояниях при данном рН. Не нужно считать, особенно в случае ферментативных реакций, что имеется 5 разных каталитических процессов и что активный центр активировывает различные формы субстрата в соответствии с рН раствора. Более разумно (и, конечно, более удобно) полагать, что фермент всегда активировывает только одну форму субстрата; последняя образуется из ионных форм, находящихся в растворе в соответствии с обычным ионизационным равновесием (см. с. 202). В таком случае суммарный

Таблица 7.1

Влияние pH на природу реакции $AI_2 + B = A + BI_2$

pK определены следующим образом:

$$AH_2 \xrightleftharpoons[pK_1^A]{pK_1^A} AH^- \xrightleftharpoons[pK_2^A]{pK_2^A} A^{2-}$$

$$BH_2 \xrightleftharpoons[pK_1^B]{pK_1^B} BH^- \xrightleftharpoons[pK_2^B]{pK_2^B} B^{2-}$$
Если $pK^A > pK^B$

		Преобладающая форма:		Реакция	Характер переноса
pH	pK	Донор	Акцептор		
0		AH_2	BH_2	$AH_2 + B = A + BH_2$	2 атома водорода
	pK_1^B		BH^-	$AH_2 + B = A + BH^- + H^+$	
	pK_1^A	AH^-		$AH^- + B = A + BH^-$	1 гидрид-ион
		AH^-	BH^-	$AH^- + B = A + B^{2-} + H^+$	
14	pK_2^B		B^{2-}	$A^{2-} + B = A + B^{2-}$	2 электрона
	pK_2^A	A^{2-}			

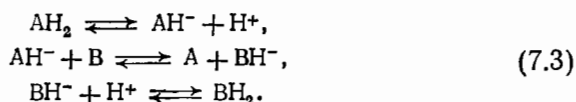
Если $pK_1^A < pK_1^B$ В зоне 2: $H^+ + AH^- + B = A + BH_2$ Если $pK_1^A < pK_2^B$ В зоне 4: $H^+ + A^{2-} + B = A + BH^-$

Примечание: один атом $H=1$ восстановительный эквивалент
 один $e=1$ восстановительный эквивалент
 один ион $H=2$ восстановительных эквивалента

процесс можно представить в виде совокупности трех стадий: (а) ионизации субстрата в соответствии с равновесным процессом, определяемым его pK и pH раствора; (б) окислительно-восстановительной реакции, катализируемой ферментом, использующим определенную форму субстрата, к которой он специфичен и которая пополняется (до равновесия) за счет других ионных форм; (в) распределения ионных форм продукта в соответствии с их pK и pH раствора. Эти стадии соответствуют отдельным стадиям (7.2), при этом окислительно-восстановительный процесс может протекать путем переноса электронов (область 1).

Следует подчеркнуть, что уравнения, приведенные в табл. 7.1 для данных областей pH , являются суммарными, т. е. представляют собой результат суммирования уравнений, соответствующих трем указанным стадиям, и не характеризуют механизма окислительно-восстановительной стадии. Нет необходимости считать, что на этой стадии реагирует именно та форма субстрата, доля которой при данном pH наибольшая. Для каждой из обла-

стей можно написать фактически любой из трех механизмов. Например, перенос гидрид-иона в области 1 мог бы протекать по следующему пути:



Среднее уравнение определяет механизм, а область рН — суммарное уравнение.

Поскольку наблюдаемая суммарная реакция не дает никакой информации о механизме окислительно-восстановительной стадии в процессах, катализируемых ферментами, а другие четкие данные о механизме во многих случаях отсутствуют, то в прошлом выбор соответствующей точки зрения и терминологии был в достаточной мере субъективным. В соответствии с тремя типами переноса, представленными в последней колонке табл. 7.1, можно выделить три «школы». Первая из них говорит об «акцепторах водорода», «донорах водорода», «переносчиках водорода», «транспорте водорода»; вторая — об «акцепторах электронов», «донорах электронов», «транспорте электронов» и т. д.; третья, сформировавшаяся сравнительно недавно и представленная менее широко, чем другие, использует преимущественно термины, относящиеся к переносу гидрид-иона. Возможные механизмы реакций в промежуточных областях рН (табл. 7.1) привлекли меньше внимания.

Наиболее простой путь записи уравнений дегидрогеназных реакций — использование формул неонизированных форм реагентов, как в уравнении (7.1); это не вызывает возражений до тех пор, пока принимается во внимание, что данное уравнение не обязательно отражает реальные формы реагентов, участвующие в окислительно-восстановительном процессе. Фактически такая практика давно уже используется при написании уравнений биохимических реакций; например, формулу молочной кислоты записывают в виде $\text{CH}_3\text{CHONCOOH}$, хотя обычно эта кислота присутствует в виде аниона.

Частое применение терминов «перенос электрона», «перенос гидрид-иона» и т. д. приводит к тому, что создается впечатление, будто происходит транспорт через раствор свободных электронов или гидрид-ионов от одной молекулы к другой. Это представление не нашло подтверждения, особенно в случае ферментативных реакций, когда реакция протекает в составе комплексов субстрата и акцептора или субстрата и простетической группы фермента, т. е. по существу в пределах единой молекулы. Как уже отмечалось выше, весьма вероятно, что комплекс удерживается на активном центре в конфигурации, промежуточной между конфигурацией исходных и конечных реагентов; в такой ситуации различия между типами переноса сглаживаются. Пе-

ремещение связей, происходящее в процессе реакции, может, например, рассматриваться как перемещение электронов, приводящее либо к переносу двух атомов водорода, либо к переносу одного гидрид-иона и одного водородного иона. В свою очередь перенос гидрид-иона можно рассматривать как процесс, включающий перенос одного атома водорода и одного электрона, и то обстоятельство, что перенос этих частиц происходит одновременно, еще не говорит о том, что переносится «гидрид-ион», или о том, что такая частица реально существует в системе. Приведенные рассуждения относятся к области терминологии, и отсюда не следует, что механизм реакций биологического окисления не может быть установлен.

В подавляющем большинстве таких реакций происходит перенос двух восстановительных эквивалентов в той или иной форме, в первую очередь потому, что при разрыве ковалентной связи образуются два «конца» и для восстановления их требуется два эквивалента, как в случае акцептора В в реакции (7.1) ($\text{В} - \text{ВН}_2$). Присоединение только одного Н приведет к образованию продукта, являющегося свободным радикалом (обычно его обозначают как $-\text{ВН}$ или $\cdot\text{ВН}$).

Некоторые акцепторы действительно переходят в такие «полувосстановленные» состояния; это касается в первую очередь флавиновых групп, особенно если они играют роль простетических групп флавопротеидных ферментов (см. гл. 9), которые часто участвуют в одноэквивалентных окислительно-восстановительных реакциях. Некоторые флавопротеиды могут подвергаться полному восстановлению в результате либо одной двухэквивалентной стадии



где F — окисленная форма флавопротеида, либо двух последовательных независимых одноэквивалентных стадий



Катализ при участии флавопротеидов во многих случаях (но не всегда) протекает с образованием $-\text{FН}$ -форм (называемых семихинонами). Обнаружено, что семихиноны образуют и ряд других, обычно используемых акцепторов, а в последние годы накапливаются данные о том, что в некоторых случаях, рассматриваемых как типичные двухэквивалентные окислительно-восстановительные реакции, процесс может протекать в две стадии.

Весьма интересен случай, когда в качестве акцептора выступает молекулярный кислород. Присоединение двух атомов Н, переносимых от субстрата, должно было бы приводить к образованию перекиси водорода



а присоединение двух электронов — к образованию аниона



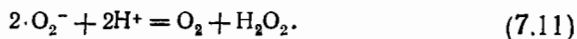
Присоединение только одного атома водорода (или электрона) должно привести к образованию пероксидного радикала



или его аниона



Давно известно, что при взаимодействии многих флавопротеидных ферментов с их субстратами происходит образование H_2O_2 за счет O_2 в соответствии с реакцией (7.7); предполагали, что этот процесс представляет собой прямое двухэквивалентное восстановление молекулы кислорода. Однако в 1969 г. Мак-Корд и Фридович [3067] получили данные, согласно которым при функционировании ксантиноксидазы [КФ 1.2.3.2] кислород сначала превращается в $\cdot\text{O}_2^-$ в результате одноэквивалентного восстановления; такого же рода данные были получены позднее для ряда других флавопротеидных ферментов и ферредоксинов. В ходе превращения ксантина под действием ксантиноксидазы в присутствии кислорода восстанавливается цитохром *c*; это могло бы свидетельствовать о том, что как цитохром *c*, так и кислород выступают в качестве акцепторов восстановительных эквивалентов. Однако восстановление цитохрома происходит только в присутствии O_2 . Было показано, что цитохром восстанавливается не ферментом, а $\cdot\text{O}_2^-$, образующимся в процессе ферментативной реакции. В ходе реакции, катализируемой металлопротеидом пероксид-дисмутазой (КФ 1.15.1.1), из среды с очень большой скоростью удаляется $\cdot\text{O}_2^-$:



Эта реакция протекает и в отсутствие фермента. Введение в систему пероксид-дисмутазы, которая является высокоспецифичным ферментом, предотвращает восстановление цитохрома в ходе превращения ксантина под действием ксантиноксидазы в присутствии кислорода; в настоящее время ингибирование исследуемых реакций небольшими количествами этой дисмутазы рассматривается как доказательство того, что эти реакции осуществляются при участии $\cdot\text{O}_2^-$ [3068].

Весьма вероятно, что в обсуждаемых системах одновременно осуществляется как одно-, так и двухэквивалентное восстановление O_2 ; при этом происходит образование и $\cdot\text{O}_2^-$, и H_2O_2 . Их относительные количества зависят от условий: образованию $\cdot\text{O}_2^-$ благоприятствуют щелочная среда и (по крайней мере в случае ксантиноксидазы) низкая концентрация субстрата. [1413]. Имеются основания полагать, что при окислении семихинонной фор-

мы фермента ($\cdot\text{FH}$) образуется $\cdot\text{O}_2^-$, в то время как при окислении полностью восстановленной формы (FH_2) сразу образуется H_2O_2 . При катализе функционирует семихинонная форма флавина и образуется $\cdot\text{O}_2^-$; однако если исследовать окисление полностью восстановленной формы фермента кислородом (O_2) как изолированную реакцию, то обнаружится, что главным продуктом является H_2O_2 , количество образующегося $\cdot\text{O}_2^-$ незначительно и пероксид-дисмутаза не оказывает влияния на этот процесс [3531].

Эти результаты согласуются с данными о том, что при взаимодействии семихинонной формы менадиона с O_2 образуется $\cdot\text{O}_2^-$, в то время как в случае окисления полностью восстановленной формы образуется H_2O_2 [3181].

Ксантиноксидаза является сложным ферментом, который к настоящему времени изучен весьма детально (см. [3017, 3532]). Помимо ксантин-активирующего участка каждая субъединица содержит одну группу FAD, один атом молибдена и четыре железо-серные группы (представленные группами двух типов). Активированный субстрат восстанавливает молибден; последний быстро восстанавливает Fe/S-группы, и, наконец, по всей вероятности, флавин восстанавливает кислород (хотя было высказано предположение, что на последней стадии участвует также железо). Если удалить из фермента флавиновую группу, то фермент утрачивает способность реагировать с O_2 , однако катализирует окисление ксантина другими акцепторами при участии молибдена и железа. Лишенный флавиновой группы фермент не катализирует образование $\cdot\text{O}_2^-$, и дисмутаза не оказывает действия на его активность. Добавление FAD восстанавливает нормальную активность фермента [2532].

В одноэквивалентных окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в биологических системах, могут участвовать не только соединения, образующие семихиноны, но также группировки, содержащие атомы металла. Интересно отметить, что флавопротеиды, которые рассматриваются в первую очередь как соединения, участвующие в образовании $\cdot\text{O}_2^-$, содержат железо. Можно полагать, что железо восстанавливает флавин путем одноквивалентной реакции в семихинон, который осуществляет одноэквивалентное восстановление O_2 . Возможно также, что в ксантиноксидазе атомы железа выступают как посредники между флавиновой группой и O_2 , так что $\cdot\text{O}_2^-$ образуется в результате реакции железо — кислород. Рассматривая действие ксантиноксидазы и учитывая, что при взаимодействии с O_2 как ферредоксины, являющиеся железосодержащими белками, так и флаводоксин, являющийся флавопротеидом, образуют $\cdot\text{O}_2^-$ [3181], следует отметить, что действие фермента более сходно с действием ферредоксина. Этот вопрос, однако, еще не решен окончательно.

Наряду с флавопротеидными оксидазами другим важным классом окислительно-восстановительных систем, в которых происходят одноэкивалентные реакции, являются системы с участием цитохромов дыхательной цепи; однако остаются некоторые сомнения в вопросе о том, какой продукт образуется в результате реакции цитохромоксидазы с кислородом. Механизм восстановления и окисления цитохрома с рассматривается в гл. 9.

При действии некоторых оксигеназ, функционирующих с участием цитохрома Р-450, также образуется $\cdot\text{O}_2^-$.

Возникает вопрос, каким образом одновалентный акцептор может окислить субстрат, если при этом должно быть перенесено два эквивалента. Было предложено два возможных механизма этого процесса. Согласно одному из них, роль интермедиата играет флавиновая группа, т. е. первичным акцептором является флавин, который принимает два эквивалента и переходит в полностью восстановленное состояние. Далее он окисляется конечным акцептором в результате двух одноэкивалентных стадий, при этом в качестве промежуточного продукта образуется семихинон. Другое объяснение, относящееся к случаю, когда одновалентным акцептором является металл, основано на предположении, что фермент содержит два атома металла, одновременно восстанавливаемые субстратом, при этом для восстановления каждого атома требуется один эквивалент. Действительно, атомы металла обнаруживают некоторую тенденцию содержаться в молекулах оксидоредуктазы по два, однако пока это обстоятельство не получило объяснения.

Рассматривая класс оксидоредуктаз, включающий примерно 560 ферментов, из которых около 100 приходится на долю оксигеназ (последние образуют подклассы КФ 1.13.— и 1.14.— и представляют собой ферменты особого типа, рассматриваемые в гл. 9), можно отметить, что из числа остальных 450 (или более) ферментов не менее 85% функционируют в системах с такими важными акцепторами, как NAD (или NADP), цитохромы или O_2 . Наиболее крупный подкласс образуют ферменты, использующие NAD(P) в качестве акцептора (кодовые номера 1.—.1.—, около 290 ферментов) или NAD(P)H в качестве донора (кодовые номера 1.6.—, около 30 ферментов); примерно 15 ферментов (кодovые номера 1.—.2.—) восстанавливают цитохромы и примерно 55 ферментов (кодovые номера 1.—.3.—) являются оксидазами, использующими O_2 . Остальные ферменты относятся к нескольким небольшим подгруппам, использующим различные другие акцепторы.

Механизм восстановления цитохромов вкратце рассмотрен в гл. 9. Способность оксидаз реагировать с O_2 обусловлена наличием у них либо простетической флавиновой группы, либо атомов металла. Процесс восстановления O_2 рассматривался выше;

действие флавиновых групп в качестве кофакторов обсуждается в гл. 9. Весьма детально изучено функционирование NAD; это обусловлено, с одной стороны, тем, что самая многочисленная группа оксидоредуктаз использует его в качестве кофактора, а с другой — тем, что неспособность к ионизации атома водорода, присоединяющегося к NAD в процессе восстановления, позволяет использовать очень интересный изотопный метод исследования механизма окислительно-восстановительного процесса. Химия процесса восстановления NAD, расположение этого акцептора в молекуле дегидрогеназы по отношению к другим субстратам и его поведение как кофактора обсуждаются в гл. 9; ниже мы рассмотрим природу переноса восстановительных эквивалентов от субстрата к NAD в процессе ферментативной реакции.

МЕХАНИЗМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ NAD(P)⁺

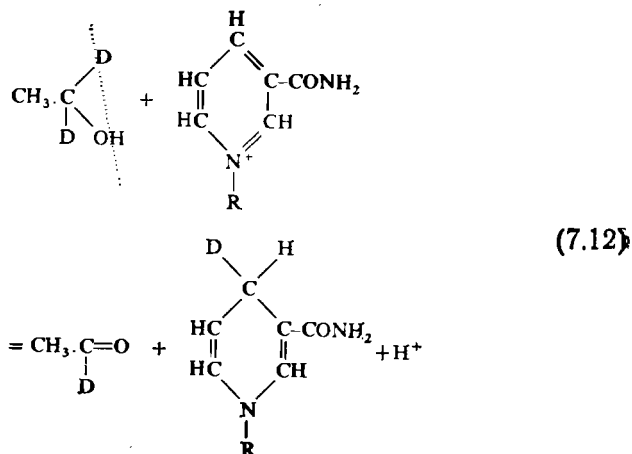
Метод исследования данного механизма основан на очевидном различии окислительно-восстановительных процессов, которые происходят при прямом переносе атомов водорода от донора к акцептору, описываемом уравнением (7.1), и при переносе электронов в соответствии с уравнением (7.2). Это различие заключается в том, что в первом случае атомы водорода, включающиеся в состав продукта BH_2 , — это именно те атомы, которые входили в AH_2 . Для механизма же (7.2) это не так, поскольку совсем не обязательно именно те H^+ -ионы, которые отщепляются от AH_2 на первой стадии, будут присоединяться к B^{2-} на третьей стадии. Действительно, в последнем случае независимо от окислительно-восстановительного процесса атомы водорода AH_2 и BH_2 постоянно обмениваются с водородными ионами среды. Если же атомы водорода AH_2 и BH_2 не ионизируются, то оказывается возможным экспериментально различить рассматриваемые механизмы, заменяя водород в AH_2 на дейтерий и проводя реакцию в H_2O . Используя AD_2 , получают продукт BD_2 , если реакция протекает по механизму (7.1), и BH_2 в случае механизма (7.2).

Этот тест может быть применен и в «обратной» ситуации, когда используют AH_2 и проводят реакцию не в H_2O , а в D_2O ; при этом отпадает необходимость в получении AD_2 , что в некоторых случаях может оказаться затруднительным.

В 1953 г. Веннесланд и др. начали с помощью этих методов исследовать реакции, катализируемые дегидрогеназами и близкими к ним ферментами.

В опытах Фишера и др. [1350] этанол, меченный дейтерием по первому углеродному атому (CH_3CD_2OH), использовался в качестве субстрата для алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1).

Протекающая при этом реакция может быть представлена следующим образом:



Здесь R — остаток молекулы NAD. В этих опытах кофермент был выделен в восстановленной форме. При этом обнаружилось, что он содержит один атом дейтерия на молекулу, так же как и образовавшийся ацетальдегид. Содержащий дейтерий восстановленный кофермент (который мы будем обозначать через NADD) мог быть затем вновь окислен либо алкогольдегидрогеназой (за счет ацетальдегида), либо лактатдегидрогеназой (за счет пирувата). В обоих случаях весь дейтерий удалялся из кофермента, а лактат, образовавшийся из пирувата, содержал один атом дейтерия на молекулу.

На основании этих наблюдений можно сделать ряд интересных заключений.

1. Данная реакция осуществляется путем прямого переноса атомов водорода (или дейтерия) от одной молекулы к другой; так как реакция проводилась в H_2O , а не в D_2O , то перенос электронов, если бы он имел место, должен был бы сопровождаться поглощением ионов водорода, а не ионов дейтерия. Первоначально атомы дейтерия имелись только в субстрате, и эти атомы были перенесены на кофермент без прохождения какой-либо стадии, на которой они могли бы быть обменены на ионы или атомы водорода.

2. Относительная ориентация субстрата и кофермента во время реакции всегда сохраняется неизменной; атом водорода (или дейтерия), присоединенный к углероду, всегда переносится в положение 4 кольца кофермента, но в это положение не попадает атом водорода гидроксильной группы. Если бы в положение 4 переносился другой атом водорода, то NADD содержал бы меньше одного атома дейтерия и некоторое количество дейтерия терялось бы в виде D^+ -ионов.

3. Реакция характеризуется стереохимической специфичностью, т. е. в ней участвует только одна сторона кольца кофермента. Связи, соединяющие атомы D и H с углеродом кольца NADD, образуют прямой угол с плоскостью кольца. Чтобы нагляднее представить себе это, допустим, что плоскость кольца совпадает с плоскостью чертежа; в таком случае атом H будет расположен под кольцом, а атом D над ним. Мы можем представить себе дело таким образом, что этанол и NAD^+ располагаются рядом на молекуле фермента и взаимодействуют между собой. Одна сторона никотинамидного кольца обращена при этом к субстрату, а повороту кольца препятствует взаимодействие его амидной группы с ферментом; в результате атомы H или D из молекулы этанола всегда переходят в определенное положение в кольце (см. ниже). Если бы амидная группа отсутствовала, так что обе стороны кольца были бы эквивалентными, или если бы субстрат мог реагировать с любой из сторон кольца, то в восстановленном коферменте атомы D были бы равномерно распределены между двумя возможными положениями и только половина дейтерия могла бы быть удалена при последующем ферментативном окислении. Другими словами, дейтерий «разбавлялся» бы водородом, уже присоединенным ранее к углеродному атому в положении 4. Тот факт, что удаляется весь дейтерий, показывает, что он сосредоточен только в одном положении. Интересно, что если кофермент восстанавливается неферментативным путем, а именно гидросульфитом в D_2O , то восстановленный кофермент также содержит один атом D на молекулу, но дейтерий распределяется в этом случае между двумя положениями¹. Если такой NADD, меченный в обоих положениях, окисляется затем пируватом при участии лактатдегидрогеназы, то удаляется только около половины дейтерия, и это свидетельствует о том, что ферментативная реакция затрагивает только одно положение (в отличие от действия гидросульфита).

4. Субстраты обеих дегидрогеназ (алкоголь- и лактатдегидрогеназы) реагируют с одной и той же стороной кольца, так что атомы D, присоединившиеся в результате действия одной из этих дегидрогеназ, могут быть удалены под действием другой. Однако не все дегидрогеназы реагируют с одной и той же стороной никотинамидного кольца; многие из них реагируют с противоположной его стороной. В системе, содержащей две дегидрогена-

¹ Правда, даже и при неферментативном восстановлении NAD (в противоположность тому, что наблюдается при восстановлении простых никотинамидных соединений) распределение дейтерия между обоими положениями не бывает совершенно одинаковым. Из наблюдений Пулмена и др. [3763] и Фишера и др. [1350] следует, что при восстановлении NAD гидросульфитом в D_2O всегда образуется больше «формы А» (см. ниже), нежели «формы В», хотя точное соотношение количеств двух образующихся форм разными авторами оценивается по-разному.

зы и NAD вместе с меченым восстановленным субстратом одной из этих дегидрогеназ и окисленным субстратом другой, дейтерий будет переноситься от одного субстрата к другому, если оба фермента реагируют с одной и той же стороной никотинамидного кольца, но он будет задерживаться в молекуле кофермента, если дегидрогеназы реагируют с противоположными сторонами. Это вооружает нас удобным методом для выяснения вопроса о том, к какой из двух групп принадлежит исследуемая дегидрогеназа.

Для форм NADD, которые образуются при действии алкогольдегидрогеназы и β -гидроксистероид—дегидрогеназы, были предложены названия «форма А» и «форма В» соответственно [4068]. С помощью фосфатазы, которая отщепляет 2'-фосфатную группу без изменения конфигурации кольца, две формы NADPD могут быть сопоставлены с соответствующими формами NADD. Из формы NADPD образуется форма А NADD, следовательно, формы А обоих коферментов имеют одинаковую конфигурацию [3350]. Абсолютная конфигурация форм А и В была определена Корнфортом и др. [884]. Если молекулу расположить так, как показано на схеме (7.12), то у формы А атом D будет находиться над плоскостью листа, а атом H — под ней.

Были определены формы восстановленных коферментов, образуемые более чем ста ферментами [2332]; некоторые из полученных данных приведены в табл. 7.2. Отметим, что в этой таблице только два фермента помещены одновременно в двух колонках; это ферменты, которые могут функционировать как с одним, так и с другим коферментом и которые, как этого и следовало ожидать, образуют с обоими коферментами одинаковые формы. Если фермент действует на ряд субстратов (примером может служить алкогольдегидрогеназа), то он всегда образует одну и ту же форму NADD (независимо от того, из какого источника этот фермент получен). Фактором, определяющим, какая именно сторона кольца участвует в реакции, должно быть относительное расположение молекул субстрата и кофермента в активном центре фермента; корреляции со структурой субстрата или характером окислительного процесса обнаружить не удалось. Ценная информация по рассматриваемому вопросу была получена с помощью рентгеноструктурных исследований (см. гл. 9), однако все же мы не можем утверждать, что нам известно, как именно протекает реакция.

Опыты с использованием дейтериевой метки показывают, что окислительно-восстановительные реакции, катализируемые NAD-зависимыми дегидрогеназами, осуществляются не путем простого переноса пары электронов от донора к акцептору (в том смысле, какой несет понятие «транспорт электронов»). Однако метод не позволяет различить перенос атомов водорода и гидрид-ионов, поскольку в обоих случаях атомы водорода (или дейтерия),

Таблица 7.2

Стереоспецифичность восстановления NAD^+ и $NADP^+$
[1159, 2219, 2791, 2792, 3350, 4480]

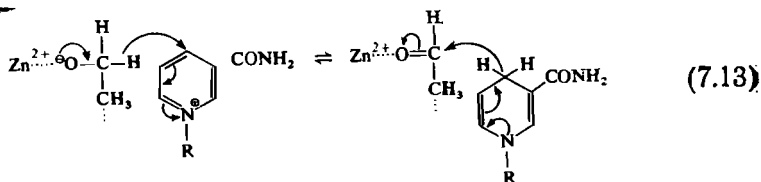
Образует указанную форму с NAD^+	Образует указанную форму с $NADP^+$
1. Ферменты, образующие форму А	
1.1.1.1 Алкогольдегидрогеназа (печень)	1.1.1.42 Изоцитратдегидрогеназа ($NADP^+$) (сердце)
1.1.1.27 Лактатдегидрогеназа (сердечная мышца)	
1.1.1.28 D-лактатдегидрогеназа	
1.1.1.29 Глицератдегидрогеназа (шпинат)	
1.1.1.37 Малатдегидрогеназа (сердце, зародыш пшеницы)	
1.2.1.3 Арил-альдегид—дегидрогеназа (печень)	
1.3.3.1 Дигидро-оротат—дегидрогеназа (бактерии)	
1.6.2.2 Цитохром b_5 -редуктаза (печень)	
2. Ферменты, образующие форму В	
1.1.1.8 Глицерол-3-фосфат—фосфатдегидрогеназа (NAD^+) (мышца)	1.1.1.44 Фосфоглюконатдегидрогеназа (дрожжи)
1.1.1.35 3-Гидроксиацил-СоА—дегидрогеназа (сердце)	1.1.1.49 Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа (дрожжи)
1.1.1.47 Глюкозодегидрогеназа (печень)	
1.1.1.50 3 α -Гидроксистероид-дегидрогеназа (бактерии)	
1.1.1.51 β -Гидроксистероид-дегидрогеназа (бактерии)	
1.1.1.62 Эстрадиол—17 β -дегидрогеназа (плацента)	
1.2.1.12 Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (дрожжи, мышца)	
1.4.1.3 Глутаматдегидрогеназа [$NAD(P)^+$] (печень)	1.4.1.3 Глутаматдегидрогеназа [$NAD(P)^+$] (печень)
1.6.1.1 $NAD(P)^+$ -трансгидрогеназа (бактерии)	
1.6.4.2 Глутатионредуктаза [$NAD(P)H$] (дрожжи, бактерии)	1.6.4.2 Глутатионредуктаза [$NAD(P)H$] (дрожжи, бактерии)

которые находились в субстрате, оказываются в восстановленном коферменте, не обмениваясь с растворителем.

Во всяком случае, прямой перенос связанного с углеродом водородного атома субстрата в положение 4 кольца NAD хорошо согласуется со структурой комплекса, полученной на основании рентгеноструктурных данных (см. рис. 9.3). Судьба атома водорода гидроксильной группы менее ясна. Простое соображение, согласно которому он вначале переносится на атом N кольца кофермента, а затем покидает его с зарядом «+» в виде H^+ -ио-

на, по-видимому, исключается, так как расстояние между соответствующими группами слишком велико, как это видно из рисунка (по крайней мере для лактатдегидрогеназы). Полагают, что водород гидроксильной группы переносится на соседнюю гистидиновую группу (His-195) фермента, которая выступает в роли акцептора протона; предполагается далее, что заряд переносится на His-195 через кольцо NAD, а затем через субстрат [37], хотя, конечно, в этом переносе могут участвовать и другие группы. Очевидно, что до конца этот вопрос еще не выяснен.

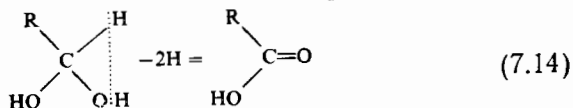
Имеющиеся данные показывают, что структура NAD-связывающих участков различных дегидрогеназ во многом сходна (см. гл. 9), чего нельзя сказать о других участках этих молекул. Следует, однако, отметить, что в структуре активных центров различных дегидрогеназ имеются и существенные различия. Алкогольдегидрогеназы из дрожжей и из печени содержат атом Zn, который локализован около пиридинового кольца NAD и связанной молекулы спирта (субстрата). Этим они отличаются от лактатдегидрогеназы, которая не содержит атомов металла. Атом Zn играет существенную роль в катализе, однако механизм его функционирования не вполне ясен. При обсуждении механизма действия алкогольдегидрогеназ Грей [1637, с. 115—117] предположил, что гидроксильная группа спирта занимает место одного из лигандов металла и что на этой стадии она теряет протон. Дальнейшее превращение можно представить следующей схемой [1637]:



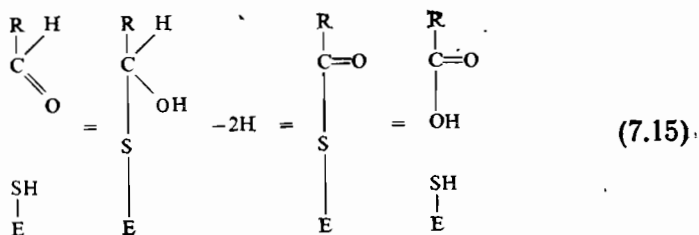
Некоторые дегидрогеназы катализируют вторичные реакции. Отметим, что в ряде случаев (например, при действии ферментов КФ 1.1.1.22, 1.1.1.23, 1.1.1.34, 1.1.1.88) дегидрогеназы катализируют две последовательные реакции дегидрирования, используя две молекулы NAD(P). Это свидетельствует о том, что продукты, как и исходные субстраты, отвечают требованиям специфичности ферментов, что само по себе не является неожиданным, поскольку для обратного направления первичных реакций их продукты выступают в качестве субстратов и, следовательно, связываются с активными центрами. Аналогичная ситуация наблюдается также в случае ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2), которая окисляет гипоксантин до ксантина, а затем ксантин до мочевиной кислоты; на каждой стадии происходит двухэквивалентное окисление. Еще одной характерной чертой функционирования ферментов КФ 1.1.1.34 и 1.1.1.88 является сопряжение про-

цесса окисления с ацилированием CoA. Согласно предполагаемому механизму, сначала мевалонат окисляется до мевальдата, при этом его альдегидная группа взаимодействует с сульфгидрильной группой фермента с образованием полумеркаптала; на второй стадии последний окисляется, а продукт затем переносится от —SH-группы фермента на —SH-группу CoA [1637].

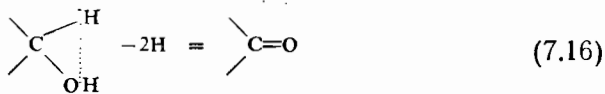
Среди других вторичных реакций следует отметить реакции присоединения или образования молекул воды. Например, альдегиды легко образуют гидраты или соединения с —SH-группами; весьма вероятно, что окисление альдегидов ферментами подкласса КФ 1.2.1 происходит либо после их гидратации



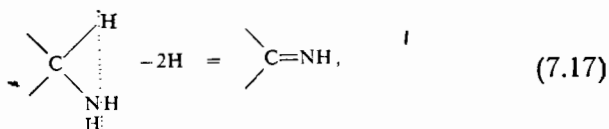
либо после образования полумеркаптала (в результате взаимодействия с —SH-группой фермента или CoA)



Можно отметить близкое сходство этого процесса с окислением спирта



При окислении аминокислот ферментами подгрупп КФ 1.4.1 и 1.4.3 в качестве первичного продукта, вероятно, образуются иминокислоты

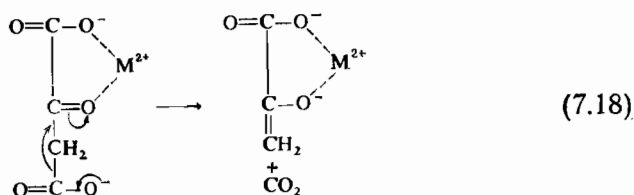


а далее при участии воды образуются аммиак и кетокислота.

Окисление малата или изоцитрата соответствующими дегидрогеназами может сопровождаться декарбоксилированием. В то время как малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37) просто окисляет

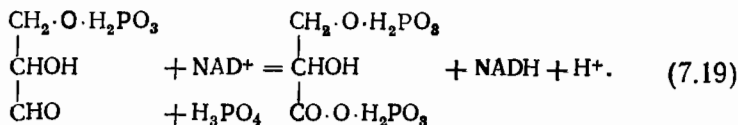
свой субстрат до оксалоацетата, малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.38, 1.1.1.39 и 1.1.1.40) окисляют малат до пирувата и CO_2 . Подобным образом обе изоцитратдегидрогеназы, КФ 1.1.1.41 и 1.1.1.42, окисляют изоцитрат до 2-оксоглутарата и CO_2 . Для процесса декарбоксилирования (но не для окисления) необходимы Mn или Mg . Еще не ясно, протекают ли эти реакции в две стадии (т. е. сначала дегидрирование до 2-оксокислоты, а затем декарбоксилирование) или же процесс осуществляется в одну стадию. Рассматриваемые ферменты различаются своим «отношением» к соответствующим 2-оксокислотам; ферменты КФ 1.1.1.38 и 1.1.1.40 в присутствии Mn декарбоксилируют оксалоацетат с образованием пирувата и CO_2 (это указывает на наличие двух отдельных стадий), в то время как фермент КФ 1.1.1.39 в этих условиях не способен катализировать декарбоксилирование. Аналогично фермент КФ 1.1.1.42 в отличие от фермента КФ 1.1.1.41 декарбоксилирует оксалосукцинат.

Для случая, когда в результате первой стадии в качестве интермедиата образуется оксокислота, участие металла в декарбоксилировании можно представить в виде следующей схемы:



При присоединении водородного иона к «нижнему» кислороду образуется енольная форма пирувата.

Большое внимание исследователей привлекла глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12), поскольку она участвует в окислительном фосфорилировании (т. е. играет важную роль в биоэнергетике), сопрягая окисление альдегидной группы с фосфорилированием продукта, в результате чего образуется «богатый энергией» карбоксилфосфатный ангидрид. Уравнение суммарной реакции имеет вид



Механизм этой реакции (обоснование его дано на с. 121—124 работы [1637]) имеет много общего с механизмом реакций, катализируемых ферментом КФ 1.1.1.88 (в последнем случае роль CoA играет фосфат), и с механизмом (7.15) (здесь $\text{R} = \text{CHONCH}_2\text{OH}_2\text{PO}_3$). В активном центре фермента находится сульфгидрильная группа, с которой взаимодействует субстрат;

при окислении альдегидной группы образуется тиоэфир. Он является, однако, относительно стабильным, и в отсутствие фосфата дальнейших превращений практически не претерпевает. Другими словами, стадия образования тиоэфира не является «каталитической» и стехиометрически связана с количеством фермента; она напоминает быстрое начальное ацетилирование химотрипсина, рассмотренное на с. 264. Однако при добавлении фосфата ацильная группа переносится на него от $-SH$ -группы фермента с образованием продукта и свободного фермента; таким образом осуществляется каталитический процесс.

Рассматриваемый фермент обладает определенной активностью по отношению к ацетальдегиду как к субстрату ($R=CH_3$), и если использовать для окисления ацетальдегида NAD^+ (в отсутствие фосфата) большое количество фермента, ацетилфермент может быть выделен в значительном количестве. Было показано, что в ферменте ацетируется та же $-SH$ -группа, которая участвует в окислении глицеральдегидфосфата; она принадлежит остатку Cys-148, расположенному в области активного центра (см. гл. 10 и [980]). Эта $-SH$ -группа очень легко реагирует с иодацетатом, который является мощным ингибитором фермента.

Фермент из тканей животных катализирует также реакцию трансацилирования, например перенос ацетата от ацетилфосфата на различные $-SH$ -соединения или от одного $-SH$ -соединения на другое, а также расщепление ацетилфосфата путем арсенολиза. Эти реакции, подобно обычному окислению, ингибируются $-SH$ -реагентами, но не цианидом. Фермент катализирует, кроме того, прямой гидролиз ацетилфосфата; $-SH$ -реагенты не влияют на этот процесс, но он ингибируется 10^{-5} М цианидом. Если удалить из фермента весь NAD^+ (путем обработки активированным углем), дегидрогеназа оказывается способной катализировать медленный гидролиз *n*-нитрофенилацетата. Эта реакция (в отличие от гидролиза ацетилфосфата) ингибируется DFP и $-SH$ -реагентами, но не цианидом [3606]. Следовательно, путем соответствующей обработки можно превратить дегидрогеназу в ацетилтрансферазу, фосфатазу или эстеразу. Характеристики соответствующих реакций приведены в табл. 7.3.

При исследовании механизма действия оксидоредуктаз дегидрогеназы привлекли особое внимание, так как механизм их действия может быть изучен с помощью дейтериевой метки. В этом случае, как отмечалось выше, метод оказывается эффективным, поскольку атомы водорода, переносимые от субстрата к NAD , не обмениваются с растворителем. В случае флавопротеидов водородные атомы переносчика оказываются способными к обмену, поэтому переносимые на него атомы дейтерия утрачиваются. Окончившиеся неудачей опыты по выявлению прямого переноса дейтерия от субстрата на флавопротеид привели к выводу, что

Таблица 7.3

Ферментативная активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [1796, 3606]

Реакция	Относительная скорость	Оптимум pH	Влияние иодуксусной кислоты	Влияние цианида	Присоединение NAD ⁺ к ферменту
Дегидрогеназная	100	8	Ингибирует	Не влияет	Необходимо для реакции
Ацетилтрансферазная	0,006—0,02	8	»	То же	То же
Эстеразная	0,018	8	»	» »	Ингибирует реакцию
Ацилфосфатазная	0,023	7	Не влияет	Ингибирует	Необходимо для реакции

при функционировании флавопротеидов происходит перенос электронов, а не водорода; очевидно, однако, что этот вывод нельзя считать обоснованным и указанные неудачи обусловлены просто потерей дейтериевой метки в результате обмена.

В некоторых случаях, однако, обмен происходит достаточно медленно и удается обнаружить прямой перенос дейтерия «через» флавиновую группу. При функционировании глутатионредуктазы скорость переноса дейтерия от NADD на глутатион через флавиновую группу в 35 раз превышает скорость потери дейтерия флавиновой группой за счет прямого обмена с водой [4480]. Далее, в случае цитохром *b*₅-редуктазы (КФ 1.6.2.2) дейтерий от NADD переносится на флавиновую группу, а затем может быть перенесен на аналог NAD⁺; эти данные свидетельствуют о том, что восстановление и окисление флавопротеидов осуществляются путем прямого переноса водорода в пределах активных комплексов.

Другие основные типы оксидоредуктаз, содержащих специфические простетические группы, обсуждаются в последующих главах; флавопротеидные ферменты и гемопротеиды (цитохромы) рассматриваются в гл. 9, а металлопротеидные ферменты — в гл. 8.

ТРАНСФЕРАЗЫ

В ходе многих биохимических реакций осуществляется перенос группы от одной молекулы к другой. Реакции такого рода можно представить в виде следующей общей схемы:



Группа X, являющаяся частью субстрата AX, переносится от A на B. С другой стороны, процесс можно рассматривать как атаку субстрата AX молекулой B, что приводит к замещению A на B;

в этом случае А можно назвать «уходящей группой». Обычно удобнее рассматривать эти процессы как реакции переноса групп, а катализирующие их ферменты — как трансферазы. Строго говоря, оксидоредуктазы тоже являются трансферазами, поскольку они переносят восстановительные эквиваленты от одной молекулы к другой, однако, учитывая особые свойства и функции этих ферментов, целесообразно рассматривать их как отдельный класс. В зависимости от природы переносимой группы Х трансферазы разделены на ряд подклассов; вторая цифра в кодовом номере фермента указывает на характер этой группы: например, ферменты, переносящие фосфат, имеют кодовые номера 2.7.—.—. При рассмотрении механизма действия той или иной трансферазы прежде всего необходимо ответить на два вопроса. (а) Какая часть молекулы субстрата АХ представляет собой переносимую группу Х, другими словами, какая именно связь разрывается в процессе реакции? Этот вопрос относится также к тем гидролазам класса 3, которые способны катализировать реакции переноса. (б) Как осуществляется перенос — в одну стадию путем прямого переноса Х от А к В или же в результате двухстадийного процесса. В последнем случае сначала Х переносится на фермент с образованием соединения ЕХ и освобождением А, а затем в ходе самостоятельной второй стадии происходит перенос Х от фермента на В.

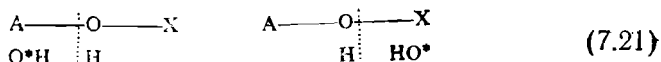
ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЯЗИ, РАСЩЕПЛЯЕМОЙ В ХОДЕ РЕАКЦИИ

Мы рассмотрим этот вопрос как для трансфераз, так и для гидролаз. При исследовании реакций, в которых имеет место расщепление молекул субстрата на две части, не всегда легко определить, где именно произошло расщепление. Две части молекулы обычно соединены связующим атомом, чаще всего — атомом кислорода, и расщепление может происходить либо по одну, либо по другую сторону от этого атома. Например, при гидролизе сахарозы разрыв может произойти между связующим атомом О и глюкозной частью молекулы (в этом случае кислород должен остаться в составе свободной молекулы фруктозы) или может быть расщеплена связь между кислородом и фруктозной частью молекулы. При гидролизе фосфорных эфиров может расщепляться либо связь С—О, либо связь Р—О. Вопрос о том, какая именно связь расщепляется, очень важен для установления механизма действия ферментов, особенно в сочетании с данными об оптических инверсиях (см. ниже).

Этот вопрос изучали изотопными методами с применением ^{18}O (особенно много работала в данной области М. Кон [829]). Наиболее прямой подход состоит в том, чтобы синтезировать

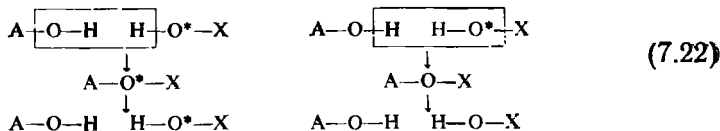
субстрат, у которого место связывающего атома занимает ^{18}O , и затем определить, какая часть молекулы содержит ^{18}O после реакции. Однако такой синтез может представлять известные трудности; поэтому используют также и два других, значительно более простых метода.

Первый метод основан на следующем. Если гидролиз немецкого субстрата проводится в H_2^{18}O , то ясно, что в зависимости от места расщепления ^{18}O будет обнаружен либо в одной, либо в другой части молекулы. Рассмотрим гидролиз молекулы $\text{A}-\text{O}-\text{X}$. Очевидно, здесь возможен разрыв в одном из двух положений:



В первом случае ^{18}O будет присутствовать в АОН, во втором — в ХОН. Этот метод использовали Полани и Забо [3707] при изучении щелочного гидролиза сложного эфира. (Для удобства изотопные атомы отмечены звездочкой.)

Во втором методе используется обычная вода, а к раствору, содержащему фермент, добавляют АОН и X^{18}OH . При этом во время обратной реакции (т. е. реакции синтеза), которая всегда в известной степени катализируется ферментом, образуется — в зависимости от места расщепления — либо меченый ($\text{A}-^{18}\text{O}-\text{X}$), либо немеченый ($\text{A}-\text{O}-\text{X}$) продукт:



В результате ферментативного гидролиза (на схеме — вторая стадия) в первом случае будет образовываться X^{18}OH , как и в исходном состоянии, а во втором — немеченый ХОН (поскольку реакция протекает в обычной воде). Следовательно, если время позволит реакции пройти в прямом и обратном направлениях достаточное число раз, то во втором случае X^{18}OH потеряет практически весь свой ^{18}O , тогда как в первом случае не будет наблюдаться потери ^{18}O . В исследованиях, в которых был применен этот метод, роль ХОН играла ортофосфорная кислота $\text{H}_3\text{P}^{18}\text{O}_4$, в молекуле которой все атомы кислорода были мечеными. В ходе каждой отдельной реакции удалялось не более одного атома ^{18}O , но так как все OH -группы $\text{H}_3\text{P}^{18}\text{O}_4$ принимали участие в реакции с равной вероятностью, то при достаточном числе оборотов удалялись все атомы ^{18}O .

Этот метод можно использовать также при изучении реакций переноса, например при изучении действия фосфолипаз: в этом

Таблица 7.4

Связи, расщепляемые при ферментативном и неферментативном гидролизе

Катализатор	Расщепляемая связь (указана стрелкой)	Субстрат
Кислота	$\downarrow$ C—O—P	Глюкозо-1-фосфат
Кислота	$\downarrow$ C—O—P	Триметилфосфат
Щелочь	$\downarrow$ C—O—P	Триметилфосфат
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12)	$\downarrow$ C—O—P	Ацетилфосфат
Гликогенфосфорилаза (КФ 2.4.1.1)	$\downarrow$ C—O—P	Гликоген-Фосфат
Сахарозофосфорилаза (КФ 2.4.1.7)	$\downarrow$ C—O—P	Глюкозо-1-фосфат-Фосфат
Рибонуклеаза I (КФ 3.1.4.22)	$\downarrow$ C—O—P	Полиуклеотид
Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1)	$\downarrow$ C—O—P	Глюкозо-1-фосфат
Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1)	$\downarrow$ C—O—P	Фенилфосфат
Кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2)	$\downarrow$ C—O—P	Глюкозо-1-фосфат
Фосфодиэстераза I (КФ 3.1.4.1)	$\downarrow$ C—O—P	Полиуклеотид

случае $\text{H}_3\text{P}^{18}\text{O}_4$ выполняет роль акцептора В [реакция (7.20)]. Если группа X (в данном случае гликозильная группа) переносится в форме $\text{X}-\text{O}-$, то ^{18}O в молекуле В будет замещен на O ; если же перенос происходит в форме $\text{X}-$, то В будет сохранять свою метку.

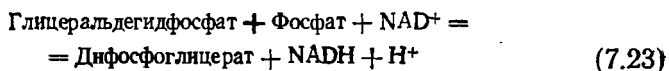
Ряд данных, полученных этими методами, приведен в табл. 7.4. Эти данные можно сопоставить с данными по неферментативному гидролизу карбоксильных эфиров. При неферментативном гидролизе может разорваться любая из связей (какая именно, это зависит от условий гидролиза и от природы данного сложного эфира), хотя расщепление связи ацил—кислород наблюдается наиболее часто (см., например, [2138, гл. 14]). Установлено, что все фосфатазы атакуют связь $\text{P}-\text{O}$, а фосфорилазы — связь $\text{C}-\text{O}$.

Опыты с ферментами убедительно показывают, что при ферментативном гидролизе разрывается связь, расположенная с той стороны связывающего атома, к которой примыкает «специфический участок» молекулы субстрата, т. е. участок, в отношении которого фермент проявляет наибольшую специфичность [2571]; таким образом, разрыв происходит настолько близко к переноси-

мой группе, насколько это возможно. Фосфатазы специфичны по отношению к фосфатной части молекулы, и обе фосфатазы могут переносить фосфатные группы на другие молекулы, так что разрыв происходит непосредственно за атомом фосфора; фосфорилазы же, переносящие гликозильные группы, специфичны по отношению к глюкозной части молекулы, и в этом случае разрыв происходит непосредственно за атомом углерода глюкозы.

Подтверждение этому было получено Кошландом и Штейном [2571] при изучении действия дрожжевой инвертазы (фруктофуранозидазы) на сахарозу. Этот фермент специфичен по отношению к фруктозной части молекулы и может катализировать перенос фруктозильных групп на другие молекулы. Выяснилось, как этого и следовало ожидать, что расщеплению подвергается связь, расположенная ближе к фруктозной части молекулы.

М. Кон [830, 831] изучала также действие глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.12) и фосfogлицераткиназы (КФ 2.7.2.3). При проведении суммарной дегидрогеназной реакции



с использованием $\text{H}_3\text{P}^{18}\text{O}_4$ М. Кон не обнаружила изменения содержания ^{18}O в фосфатной группе. Так же обстояло дело и в том случае, когда реакция проходила в обратном направлении. Это указывает, что в реакцию вовлекается связь $\text{C}-\text{O}$, а не связь $\text{P}-\text{O}$ (результат, вполне согласующийся с тем фактом, что фермент специфичен по отношению к альдегиду). В то же время при действии фосфокиназы расщепляется связь $\text{P}-\text{O}$, а это согласуется с тем, что данный фермент переносит фосфатные группы. Если в фосфокиназной реакции



в качестве субстрата используется дифосfogлицерат, образованный в рассмотренной выше дегидрогеназной реакции (и поэтому содержащий атомы ^{18}O в фосфатной группе, находящейся в положении 1), то в образующейся молекуле фосfogлицерата содержится CO^{18}OH -группа, потому что связующий атом O , который первоначально принадлежал фосфатной группе, остается связанным с атомом C при разрыве связи $\text{P}-\text{O}$. Следовательно, в результате функционирования этой двухферментной системы один из атомов O фосфатной группы переносится на карбоксил. Реакция в целом, однако, обратима, так что атом O из карбоксила может перейти обратно в фосфатную группу; но так как оба атома в COOH -группе в химическом отношении эквивалентны, то перейти в фосфатную группу может любой из них. Как было показано в опытах Кон, это приводит в итоге к разведению ^{18}O в фосфатной группе и притом только тем количеством ^{18}O ,

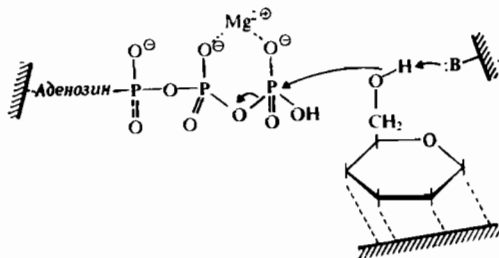


Рис. 7.1. Предполагаемый механизм действия гексокиназы [1637]. В — основная группа активного центра фермента. Было показано, что практически все фосфат-переносящие ферменты, а не только киназы, активируются Mg^{2+} .

которое первоначально было связано с данным атомом С фосфоглицерата.

Аналогичные исследования [831] показали, что при действии дрожжевой гексокиназы (КФ 2.7.1.1) и аденилаткиназы (КФ 2.7.4.3) расщепляется связь Р—О; имеющиеся разрозненные данные позволяют предполагать, что известные 130 киназ действуют таким же образом. Рассматривая механизм, предложенный для гексокиназы (рис. 7.1), нетрудно понять, почему расщепляется именно данная связь.

ОДНО- ИЛИ ДВУХСТАДИЙНЫЙ ПЕРЕНОС?

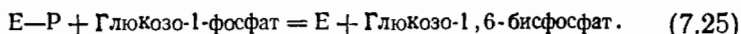
Известен ряд подходов, с помощью которых можно попытаться ответить на вопрос, как происходит катализируемый ферментом перенос группы, — непосредственно от одного субстрата к другому в одну стадию или же в две стадии, сначала от первого субстрата на фермент, а затем с фермента на второй субстрат.

Весьма полезными здесь могут оказаться кинетические исследования, поскольку, как отмечалось на с. 142 и далее, двухстадийный перенос обладает рядом легко выявляемых признаков. Однако наличие таких признаков еще не является само по себе убедительным свидетельством в пользу данного механизма, поскольку они могут быть обусловлены другими причинами.

В некоторых благоприятных случаях прямым доказательством переноса группы X на фермент является выделение и идентификация промежуточного комплекса, если ковалентный комплекс ЕХ достаточно стабилен.

При изучении действия фосфоглюкомутазы (КФ 2.7.5.1) было прямо продемонстрировано образование соединения фосфат—фермент [3073, 3760]. Если добавить к глюкозо-1-фосфату достаточно большое количество кристаллического фермента, то

немедленно образуется глюкозо-1,6-бисфосфат и притом в количестве, которое зависит от количества добавленного фермента. Из этого следует, что при выделении фермента его получают частично или полностью в фосфорилированном состоянии и что фосфатная группа может переноситься с фермента на глюкозо-фосфат:

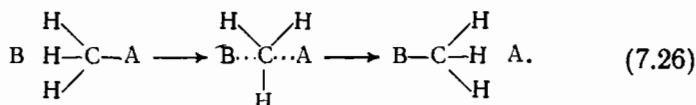


Образующийся свободный фермент может затем вновь фосфорилироваться глюкозобисфосфатом с образованием эквивалентного количества глюкозо-6-фосфата. Аналогичные результаты были получены в опытах с кристаллической фосfogлицеромутазой из мышц (КФ 2.7.5.3) [3690].

Авторам работы [4891] удалось выделить методом хроматографии на колонке с карбоксиметилцеллюлозой комплекс диоксиацетон — трансальдолаза. Это говорит о том, что реакция осуществляется путем переноса диоксиацетоновой группы от субстрата на фермент, с которого, как это было показано, она затем переносится на соответствующий акцептор. Комплекс диоксиацетон — фермент представляет собой шиффово основание, образованное ϵ -аминогруппой лизинового остатка фермента [1640].

В некоторых случаях соответствующая группа субстрата переносится не на белковую часть молекулы фермента, а на связанную с белком простетическую группу. Так, при изучении действия транскетолазы было установлено, что образуется соединение гликольальдегид—тиаминпирофосфат (см. гл. 9). Другим примером может служить выделение соединения биотин- CO_2 при действии карбоксилаз подгруппы КФ 6.4. В качестве простетической группы многих ферментов, которые действуют на аминокислоты, образуя с ними шиффовы основания, выступает пиридоксальфосфат.

Когда молекула субстрата оптически активна, можно регистрировать оптическую инверсию в процессе реакции переноса. Рассмотрим, например, перенос метильной группы от А к В, т. е. реакцию (7.20) при $X = \text{CH}_3$; считая эту реакцию реакцией замещения, мы можем представить ее в виде следующей схемы:



В данном случае замещение происходит у углеродного атома метильной группы, и В приближается со стороны, противоположной А. Когда В подходит ближе к атому С, А удаляется от этого атома и в то же время и С—Н-связи также постепенно

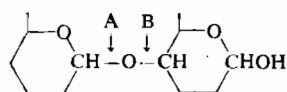
меняют свое расположение; в промежуточном состоянии системы эти связи располагаются в одной плоскости, образуя прямые углы с осью А—В, как это показано на схеме в центре. Затем они перемещаются еще дальше и в конце процесса замещения оказываются на стороне, противоположной В. Результатом этого процесса является обращение конфигурации при атоме С, как показано на схеме справа.

Если замещение произошло у оптически активного атома, другими словами, если три рассматриваемые связи относятся к трем разным группам, то ясно, что перенос должен сопровождаться оптической инверсией, так как в результате его образуется соединение, представляющее собой по расположению групп зеркальное отражение исходного. Эта оптическая инверсия — характерная особенность реакции замещения.

Кошланд [2563] считает, что по наличию или отсутствию оптической инверсии в ходе ферментативной реакции можно судить о механизме этой реакции. Если происходит только один перенос группы (или нечетное число последовательных переносов), то результатом его будет оптическая инверсия; если же имеют место два последовательных переноса (или четное их число), то влияние этих переносов будет компенсироваться и инверсии наблюдаться не будет. Следовательно, если реакция осуществляется путем прямого переноса группы от одного субстрата на другой в соответствии с уравнением (7.27), то будет иметь место инверсия группы Х. Если же происходит образование промежуточного соединения и группа Х соединяется с ферментом в соответствии с уравнениями (7.28) и (7.29), то, хотя перенос Х от А на фермент также будет сопровождаться инверсией, эта первая инверсия будет компенсироваться второй, происходящей при переносе Х от фермента к В, и первоначальная конфигурация В, таким образом, будет восстанавливаться.

Следует, однако, помнить, что инверсия может происходить только у определенного атома, а именно у того, у которого происходит замещение. Поэтому очень важно знать, какая именно связь вовлекается в реакцию (см. с. 426). При действии фосфатазы, например, никакой инверсии не наблюдается. На первый взгляд это можно принять за указание на двухстадийный механизм. Однако было обнаружено, что при действии фосфатазы в группировке С—О—Р разрывается связь Р—О, т. е. что в данном случае вообще не происходит замещения у атома С. В этих случаях инверсия у углеродного атома невозможна, потому что связь между этим атомом и атомом кислорода сохраняется, а следовательно, и все другие связи атома С должны сохранять свое относительное расположение. Таким образом, отсутствие инверсии в рассматриваемом случае не дает указаний относительно природы механизма реакции; каков бы ни был этот механизм, инверсия здесь произойти не может.

По той же причине в случае, когда субстратом реакции служит дисахарид



одновременная инверсия *обеих* гексоз невозможна. Если разрывается связь А, то не может произойти инверсии в остатке гексозы, расположенном справа, хотя она может произойти у С-1 левой гексозы; если же разрывается связь В, то должна сохранить свою конфигурацию гексоза, расположенная слева, хотя в другом остатке гексозы может произойти инверсия у С-4.

Сравнив теперь действие сахарозофосфорилазы и мальтозофосфорилазы, мы увидим, что рассмотренный выше метод приводит к результатам, хорошо согласующимся с данными метода изотопного обмена. Мы видели, что в реакцию вовлекается связь, расположенная между углеродным атомом глюкозида и атомом кислорода. Это означает, что в другой части молекулы дисахарида не должно наблюдаться инверсии, и эксперимент подтверждает это. Мы видели также, что, по данным изотопных исследований, механизм действия двух названных ферментов различен. В случае сахарозофосфорилазы сначала на фермент переносится α -глюкоза, вероятно с инверсией в β -форму; затем последняя переносится от фермента на фосфат (или какую-либо другую молекулу), что должно вызывать вторую инверсию с образованием α -глюкозо-1-фосфата; именно так оно и происходит в действительности. В случае мальтозофосфорилазы данные изотопных исследований указывают на прямой перенос α -глюкозы на фосфат, и происходящая при этом инверсия должна приводить к образованию β -глюкозо-1-фосфата; наблюдения подтверждают и этот вывод.

Другим примером может служить действие амидофосфорибозилтрансферазы (КФ 2.4.2.14); отсутствие включения меченого пирофосфата в фосфорибозилпирофосфат говорит о том, что в ходе реакции не происходит образования фосфорибозилфермента. Следовательно, процесс должен осуществляться путем прямого переноса и приводить к инверсии; действительно, α -фосфорибозилпирофосфат превращается в β -фосфорибозиламин [1806].

Однако в случае гликогенфосфорилазы имеется необъяснимое расхождение между данными, полученными с помощью двух упомянутых методов. Этот фермент сходен с мальтозофосфорилазой в том отношении, что он не способен катализировать соответствующую реакцию изотопного обмена. Это как будто свидетельствует о прямом переносе. Такой перенос должен был бы сопровождаться инверсией, как в случае действия мальтозофосфорилазы, однако в действительности инверсии не происхо-

зи, образуется α -глюкозо-1-фосфат. Следует надеяться, что дальнейшие исследования обнаружат причину этого расхождения. Система, вероятно, в действительности сложнее, чем это представляется в настоящее время. Активный центр фермента содержит пиридоксальфосфат [282], и действие фермента зависит от наличия фосфатсодержащей группы, фосфат которой может быть удален и вновь присоединен ферментативным путем. Если бы было известно, как функционирует эта группа, то, вероятно, стала бы ясной и причина отсутствия инверсии.

Другим ценным методом выяснения вопроса о пути трансферной реакции (одно- или двухстадийный перенос) является исследование катализируемой ферментом реакции изотопного обмена.

Если перенос происходит в одну стадию



то реакция изотопного обмена будет наблюдаться только при наличии в системе обоих субстратов, AX и B . Если же перенос происходит в две стадии



то для осуществления первой стадии (7.28) достаточно присутствия одного субстрата, и если к ферменту добавить AX при полном отсутствии B , то в результате обратимой реакции будет образовываться небольшое количество свободного A (не превышающее в эквивалентном отношении количества присутствующего фермента). Если теперь добавить, помимо AX , еще и некоторое количество меченого A , т. е. A^* , то мы должны будем ожидать вслед за реакцией (7.28) обратной реакции

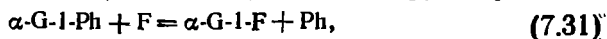


И хотя количество присутствующего фермента может быть в стехиометрическом отношении очень мало, этот процесс будет протекать до тех пор, пока не установится изотопное равновесие. Другими словами, в отсутствие акцептора B фермент будет катализировать реакцию изотопного обмена, затрагивающую ту часть молекулы субстрата, которая не переносится ферментом. Подобный эксперимент можно провести и с продуктом реакции; если добавить к ферменту BX и B^* в отсутствие A , то фермент будет катализировать изотопный обмен B . Если же ввести в систему X^* , то ни в одном из случаев не будет происходить изотопного обмена.

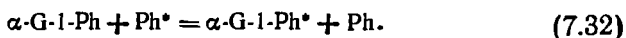
Этот метод весьма эффективен при исследовании реакций, которые протекают с промежуточным переносом группы на фермент, и в последнее время он все шире входит в употребление.

Ниже мы приведем несколько случаев, в которых с помощью этого метода удалось достаточно полно раскрыть механизм реакции.

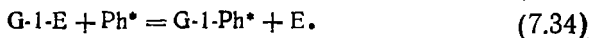
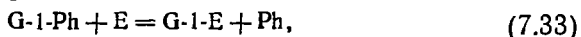
Сахарозофосфорилаза (КФ 2.4.1.7) катализирует реакцию



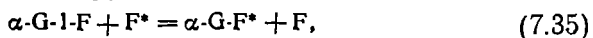
где Ph — фосфат, G — глюкоза, F — фруктоза, $\alpha\text{-G-1-F}$ — сахароза. Реакция представляет собой, следовательно, обратимый перенос остатка глюкозы от фосфата на фруктозу. Если добавлен только глюкозофосфат (либо вместе со свободным фосфатом, либо без него), то, очевидно, никакой химической реакции протекать не должно, так как в отсутствие фруктозы нет акцептора для фосфата. Однако было обнаружено [1144], что в среде, содержащей $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ и глюкозофосфат, фермент катализирует быструю реакцию изотопного обмена



Это указывает, что фермент соединяется с остатком глюкозы, освобождая фосфат; изотопный обмен в таком случае осуществляется следующим образом:

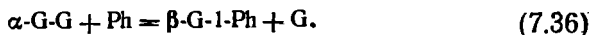


Позднее это было подтверждено путем использования фруктозы, меченной ^{14}C (обозначим ее через F^*) [5142]. В отсутствие фосфата фермент катализирует обмен



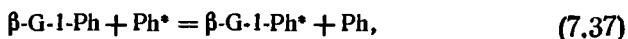
который возможен только в том случае, если фермент образует соединение с остатком глюкозы, т. е. именно с той частью молекулы, по отношению к которой он специфичен и которую он переносит на другие молекулы. Данный фермент, следовательно, не является истинной фосфорилазой, так как фосфат не обязательно участвует в реакции. Фермент может переносить остатки глюкозы на разные другие молекулы, и это обстоятельство дает дальнейшее подтверждение правильности указанного гипотетического механизма. Другие доказательства промежуточного переноса остатка глюкозы на фермент приведены на с. 431—432.

Если обратиться к мальтозофосфорилазе (КФ 2.4.1.8), то положение окажется совершенно иным. Катализируемая реакция может быть изображена в этом случае следующим образом:

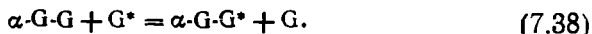


То обстоятельство, что в результате реакции происходит оптическая инверсия, является указанием на прямой перенос, а не на перенос с образованием промежуточного соединения (комплекса с ферментом). В соответствии с этим рассматриваемый

фермент не катализирует изотопный обмен ни по реакции [1358]



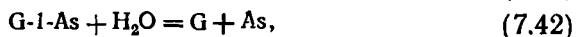
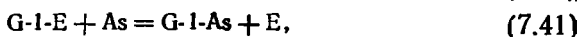
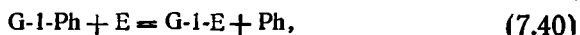
ни (в отсутствие фосфата) по реакции



В присутствии фосфата катализируется реакция (7.38), но это объясняется просто обратимостью реакции (7.36).

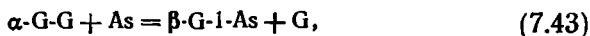
Таким образом, имеющие данные показывают, что в этом случае соединение фермент—глюкоза не образуется и транс-гликозилирование осуществляется путем прямого переноса остатка глюкозы от одного субстрата к другому в соответствии с уравнением (7.27). Гликогенфосфорилаза (КФ 2.4.1.1) также не способна катализировать реакцию изотопного обмена (7.32) [834].

Эти результаты согласуются с поведением ферментов в присутствии арсената. В опытах с сахарозофосфорилазой добавление арсената вызывает быстрый гидролиз сахарозы с образованием свободной глюкозы и фруктозы и гидролиз глюкозо-1-фосфата с образованием свободной глюкозы и фосфата. Причина этого заключается в том, что арсенат может участвовать в реакции вместо фосфата, образуя крайне нестабильный глюкозо-арсенат, который спонтанно распадается с большой скоростью. Следовательно, после реакций (7.39) и (7.40) будут идти реакции (7.41) и (7.42):



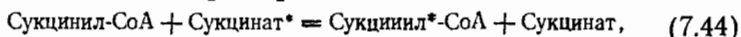
где As — это H_3AsO_4 .

С другой стороны, мальтозофосфорилаза, которая не образует промежуточного соединения фермент—глюкоза, не способна катализировать гидролиз β -глюкозо-1-фосфата в присутствии арсената, и это согласуется с ее неспособностью катализировать реакцию (7.37). Однако, как и следовало ожидать, этот фермент катализирует гидролиз мальтозы в присутствии арсената, так как данный процесс может осуществляться в результате прямого переноса остатка глюкозы на арсенат



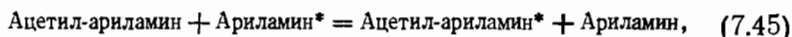
после чего следует реакция (7.42). Приведенные результаты убедительно подтверждают различие в механизме действия двух указанных ферментов, которое было установлено методом изотопного обмена.

Подобным образом были исследованы и некоторые другие ферменты. СоА-трансфераза 3-кетокислот (КФ 2.8.3.5) катализирует реакцию обмена [2901]

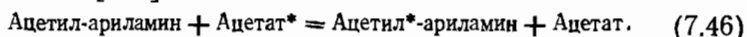


и это указывает, что данный фермент также образует промежуточное соединение с группой, которую он переносит, т. е. с СоА.

Ариламин-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.5) катализирует реакцию обмена



но не реакцию [404]



Следовательно, и в данном случае с ферментом соединяется именно транспортируемая (ацильная) группа, а не ариламин.

В то же время имеющиеся данные указывают, например, на то, что при действии фосфокиназ транспортируемая фосфатная группа не образует промежуточного соединения фермент—фосфат. Было показано [3978], что ацетаткиназа (КФ 2.7.2.1) не катализирует включения меченого ADP в ATP (если только не добавлен также и ацетат), меченого ацетата в ацетилфосфат (если только не добавлен также и ADP) или, наконец, меченого фосфата в ATP (даже если добавлен ацетат). Если бы образовывалось соединение фермент—фосфат, то в первых двух случаях следовало бы ожидать включения. По аналогии с этим пируваткиназа (КФ 2.7.1.40) не катализирует включения меченого пирувата в фосфопируват, если только одновременно не добавлен ADP [513]. На основании ряда других данных был предложен гипотетический механизм действия фосфоглицераткиназы и пируваткиназы, который согласуется с упомянутыми наблюдениями (см. ниже).

Было показано [5287], что одна из гидролаз, NAD(P)⁺-нуклеозидаза (КФ 3.2.2.6), катализирует обменную реакцию



где N — никотинамид, R — остаток молекулы кофермента. Это указывает на следующий механизм гидролиза:



В ряде случаев о механизме реакции можно судить, опираясь на некоторые особенности в поведении систем. Так, например, при действии фосфатаз (КФ 3.1.3.1 — 3.1.3.2), которые могут катализировать и гидролиз, и перенос, Мортон [3272] обнаружил явную конкуренцию между водой и акцептором фосфата

за удаляемый из субстрата фосфат. Это легче всего объяснить, если допустить существование начальной (лимитирующей) стадии, в ходе которой фосфат переносится от субстрата на фермент, а затем связанный с ферментом фосфат распределяется между водой и акцептором в соответствии с их концентрациями и константами скорости соответствующих реакций. Такое объяснение согласуется с уже упоминавшимися выше результатами изотопных исследований. Поскольку разрывается связь $P-O$, фермент должен катализировать включение ^{18}O из $H_2^{18}O$ в фосфат; было показано, что такое включение действительно происходит [4473]. В случае щелочной фосфатазы был выделен промежуточный комплекс ЕХ; это удалось сделать при низких значениях рН, так как в этих условиях удаление фосфата из комплекса происходит сравнительно медленно. Было показано, что фосфат фосфорилирует в комплексе остаток серина [1259, 4158].

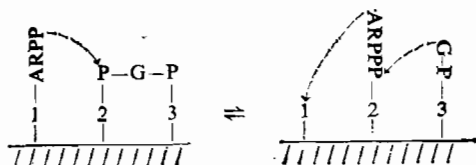
Указанные фосфатазы специфичны по отношению к фосфатной группе и сравнительно неспецифичны по отношению к остальной части молекулы. Имеются, однако, и другие фосфатазы, специфичные по отношению к молекуле субстрата в целом (например, ферменты КФ 3.1.3.5 и 3.1.3.11). Для этих ферментов не было получено никаких указаний на перенос фосфата [3272].

Для выяснения механизма действия фосфоглицераткиназы (КФ 2.7.2.3), которая катализирует обратимый перенос фосфата от карбоксильной группы бисфосфоглицерата на АДФ, Бюхером [610] был использован другой тип конкурентных отношений. Эта реакция может быть представлена следующим образом:



где PG — 3-фосфоглицерат, A , R и P — аденин, рибоза и фосфатные группы АДФ и АТФ, так что $ARPPP$ обозначает АТФ.

Бюхер обнаружил, что в данной системе АТФ не конкурирует с АДФ; это указывает, что они соединяются с разными участками фермента. Однако и АТФ, и АДФ конкурируют с бисфосфоглицератом. Для объяснения этого Бюхер предлагал следующую схему процесса:



Здесь 1, 2 и 3 представляют три участка молекулы фермента: участок 1 может соединяться с адениновым концом молекулы АДФ, участок 2 — либо с АТФ (с его концевой фосфатной группой), либо с фосфатом бисфосфоглицерата, находящимся у пер-

вого углеродного атома, и участок 3 — с фосфатом фосфоглицерата или бисфосфоглицерата, находящимся у третьего углеродного атома. Следовательно, бисфосфоглицерат может соединяться с участками 2 и 3 одновременно. Переносимая фосфатная группа соединяется с участком 2, и реакцию можно представить как взаимодействие концевой фосфата ADP с этой фосфатной группой, приводящее к вытеснению глицерата из связи с этой группой. В итоге АТР оказывается присоединенным к участку 2, а фосфоглицерат — к участку 3, как показано на приведенной выше схеме. Процесс можно рассматривать как прямое замещение того же типа, что и реакция (7.27).

Подобный механизм представляется весьма вероятным, хотя доказательства, основанные на обнаружении конкуренции, нельзя считать окончательными. С помощью этого механизма можно объяснить конкуренцию между АТР и бисфосфоглицератом, но он лишь частично объясняет отсутствие конкуренции между АТР и ADP, ибо неясно, почему АТР не может связываться с участком 1 так же, как и ADP; кроме того, так как ADP конкурирует с бисфосфоглицератом столь же эффективно, как и АТР, то естественно предположить, что ADP и АТР должны соединяться с участком 2, а следовательно, должны конкурировать между собой. Быть может, объяснение заключается в различии средств у разных реагентов к рассматриваемым трем участкам.

Механизм действия пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) изучали Бойер и др. [1825, 3905]. Они получили следующие данные: ADP не конкурирует с фосфоенолпируватом (PEP). АТР конкурирует с ADP и с PEP, пируват в слабой степени конкурирует с PEP, АМР не вызывает ингибирования реакции. Это говорит о том, что один из участков активного центра фермента присоединяет либо ADP, либо АТР, а другой присоединяет либо пируват, либо PEP. Конкуренция между АТР и PEP обусловлена наличием у обоих соединений фосфорильной группы, которая переносится в ходе реакции. Конкуренцию АТР с ADP и PEP удалось подтвердить прямым определением эффективности связывания; было показано, что K_m для ADP и PEP приблизительно равны K_s , полученным в опытах по ингибированию.

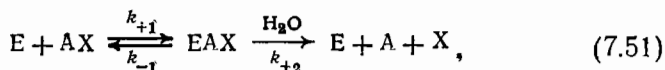
Кинетика действия аденилаткиназы (КФ 2.7.4.3) была изучена Каллаганом и Вебером [657]. Они установили, что когда реакция идет в одном направлении, то АТР и АМР конкурируют с ADP, а когда она идет в обратном направлении, то ADP конкурирует с АТР и АМР, но что ни в том, ни в другом случае АТР не конкурирует с АМР. По мнению авторов, эти данные свидетельствуют о том, что в активном центре фермента имеется один участок, который вначале присоединяет какой-либо из трех субстратов, так что образуется комплекс, а затем уже этот комплекс реагирует с соответствующим вторым субстратом. Определенные для трех субстратов значения K_m оказались равными

значениям K_i , полученным в опытах, в которых эти соединения выступали как конкурентные ингибиторы.

Помимо наиболее полно исследованных трансфераз, переносящих фосфатные и гликозильные группы, известны также трансферазы, переносящие различные другие группы; однако почти во всех этих реакциях происходит перенос групп на специфические протестические группы или кофакторы. Этот вопрос обсуждается в гл. 9.

ГИДРОЛАЗЫ

Этот класс ферментов является предметом более интенсивных исследований, чем какой-либо другой. Многие гидролазы, особенно те, которые действуют вне клетки, являются относительно простыми молекулами; однако этот класс включает также более сложные ферменты, например аллостерический фермент фруктозо-бисфосфатазу (КФ 3.1.3.11). Поскольку одним из субстратов гидролитической реакции является вода, то катализируемую реакцию часто можно охарактеризовать следующим общим уравнением:



и если учесть, что концентрация воды высока и постоянна, то во многих случаях кинетику процесса можно описать с помощью простого уравнения Михаэлиса для одностратной реакции

$$v = \frac{k'_{+2}e}{\frac{K_M}{s} + 1}, \quad (7.52)$$

где k'_{+2} равно k_{+2} , умноженному на эффективную концентрацию воды.

Внеклеточные гидролазы были изучены весьма детально, поскольку они являются относительно простыми ферментами и легко могут быть отделены от клеточных компонентов. В настоящее время известны трехмерные структуры многих из этих ферментов (см. гл. 10) и для многих из них предложены детальные химические механизмы действия. Данные об этих механизмах в свою очередь оказали большое влияние на формирование современных представлений о факторах, которые определяют механизм действия ферментов, катализирующих более сложные реакции. Так, в механизмах, предложенных для некоторых гидролаз, предусматривается кооперативное действие ряда различных каталитических групп, локализованных на поверхности фермента, и реакции осуществляются в условиях окружения, которое отличается от окружения, создаваемого простым водным раствором. Кроме того, при исследовании ряда гидролаз были получены

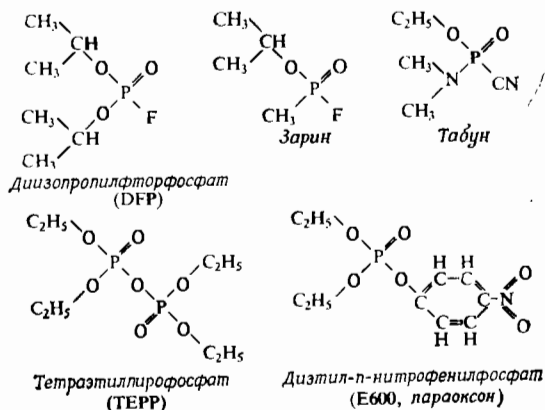


Рис. 7.2. Структурные формулы некоторых фосфорорганических ингибиторов.

данные об индуцированных конформационных изменениях в ферменте, сопровождающих связывание субстрата (индуцированное соответствие), и о напряжении, индуцируемом в субстрате.

Поскольку сведения о механизме действия гидролаз весьма обширны, мы не можем здесь детально рассмотреть все гидролазы, поэтому выбраны отдельные представители главных классов этих ферментов, с тем чтобы проиллюстрировать различные типы наблюдаемых для них химических механизмов.

ЭСТЕРАЗЫ И ПРОТЕИНАЗЫ, В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ КОТОРЫХ УЧАСТВУЮТ АКТИВНЫЕ ОСТАТКИ СЕРИНА И ЦИСТЕИНА

Было показано, что ряд гидролаз чрезвычайно чувствителен к ингибированию диизопропилфторфосфатом (DFP) и некоторыми родственными фосфорорганическими соединениями (рис. 7.2); в каждом случае при гидролизе ингибированного фермента было установлено, что ингибитор реагирует с одним и тем же остатком серина в молекуле фермента [811, 1799, 1800, 3537]; определение последовательности аминокислот показало, что остатки, соседние с серином, сходны у ряда ферментов млекопитающих (см. табл. 7.5).

Указанные ферменты значительно различаются по специфичности, однако всем им присуща общая черта — они способны катализировать гидролиз эфиров; было высказано предположение, что эти ферменты произошли от общей исходной эстеразы, при этом эволюционные изменения привели к различиям в специфичности ферментов, но мало затронули химический механизм

Таблица 7.5

Аминокислотные последовательности, включающие активный остаток серина, для некоторых эстераз и протеиназ [1017]

Фермент	Последовательность
Химотрипсин А (КФ 3.4.21.1)	Cys Met Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
Трипсин (КФ 3.4.21.4)	Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val
Папаин (КФ 3.4.21.11)	Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu His
Тромбин (КФ 3.4.21.5)	Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
Ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7)	Glu Ser Ala
Холинэстераза (КФ 3.1.1.8)	Phe Gly Glu Ser Ala Gly (Ala Ala Ser)
Аланинэстераза (печень быка) (КФ 3.1.1.1)	Gly Glu Ser Ala Gly Ala Glu Ser
Субтилизин (<i>B. subtilis</i>) (КФ 3.4.21.14)	Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His

катализируемой реакции [1799, 3904, 4973]. Поскольку в каждом из ферментов DFP реагирует только с одним остатком серина и поскольку свободный и находящийся в составе пептидов серин не реагирует с заметной скоростью с DFP, было высказано предположение, что этот уникальный остаток серина каким-то образом активирован. Эта активация обусловлена, вероятно, особенностями трехмерной структуры рассматриваемых ферментов, поскольку ни химотрипсиноген, ни денатурированный мочевиной трипсин не реагируют с фосфорорганическими ингибиторами [1791]. Хотя имеются данные о том, что остаток серина в рассматриваемых эстеразах активирован, можно полагать, что главным фактором, определяющим его высокую реакционную способность по отношению к DFP, является сходство последнего с эфирными субстратами, позволяющее ему специфически связываться с ферментом и действовать как «ингибитор, направленный на активный центр» (см. гл. 8); локальная концентрация ингибитора в области серинового остатка оказывается очень высокой в результате образования первоначально нековалентного фермент-ингибиторного комплекса [2947, 3222].

Ингибирование рассматриваемых ферментов под действием DFP еще не является доказательством того, что специфический остаток серина непосредственно участвует в катализе, поскольку присоединение объемистой диизопропилфосфорильной группы к остатку в области, близкой к активному центру, может привести

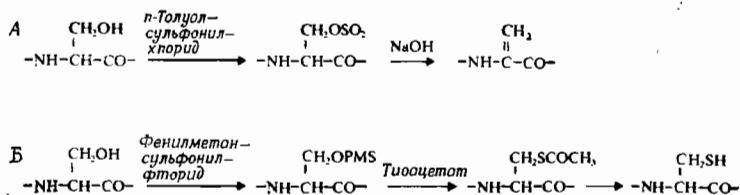
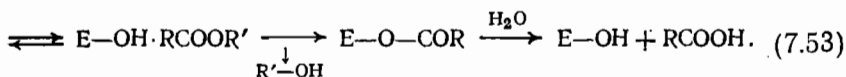


Рис. 7.3. Химическая модификация остатков серина в ферментах. А. Превращение Ser-195 в химотрипсине в остаток дегидроаланина [4546]. Б. Превращение Ser-220 в субтилизине в остаток цистеина [3384].

к ингибированию в результате блокирования доступа субстрата к активному центру фермента. В случае химотрипсина, однако, показано, что превращение этого остатка серина (Ser-195) химическим путем в остаток дегидроаланина (рис. 7.3, А) приводит к полной инактивации фермента без нарушения связывания субстрата или обратимого ингибитора [4546]. Подобные результаты были получены с субтилизином, у которого остаток серина был химическим путем трансформирован в остаток цистеина [3384] (рис. 7.3, Б).

Более прямые данные о роли этого остатка были получены при исследовании катализируемого химотрипсином гидролиза *p*-нитрофенилацетата (см. гл. 4). Установлено, что ацетилферментный интермедиат, образующийся в этой реакции [см. уравнение (4.303)], является стабильным в области низких pH [268]; после кислотного гидролиза было показано, что ацетильная группа связана с остатком активного серина. Эти результаты позволяют считать, что каталитическая реакция осуществляется путем нуклеофильной атаки на карбонильную группу субстрата с образованием ацетилфермента, который затем гидролизуетс водой. *p*-Нитрофенилацетат является, однако, очень плохим и неспецифическим субстратом химотрипсина, поэтому необходимо было показать, что и специфические субстраты гидролизуются по механизму, включающему стадию образования ацилфермента, как это отражено в уравнении (7.53) для гидролиза эфирного субстрата:



Результаты ряда исследований различного характера свидетельствуют о том, что хорошие субстраты химотрипсина также гидролизуются по приведенному выше механизму. Было показано, что химотрипсин способен катализировать обмен ^{18}O между водой и рядом специфических карбоновых кислот [1126, 4422]

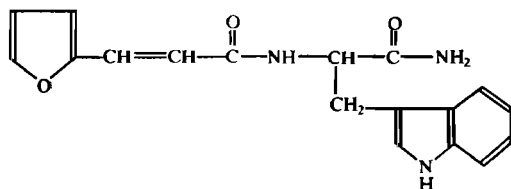
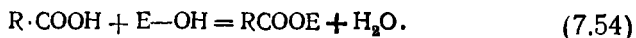
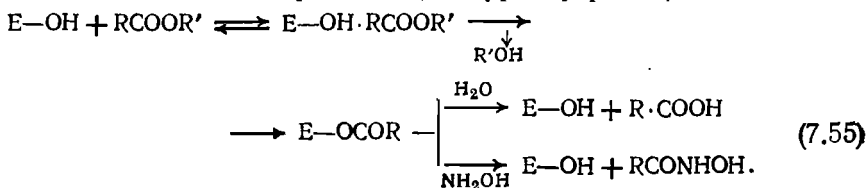


Рис. 7.4. Структурная формула фурилакритоилтриптофанамида.

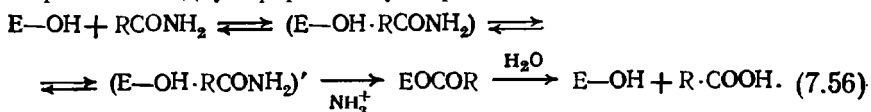
в результате реакции, которая аналогична конечной стадии реакции (7.53):



Показано также, что фермент способен функционировать как трансфераза в присутствии гидросиламина или спирта, при этом вместо кислотного продукта образуется гидроксамат или эфир [1268, 5300]. Согласно данным работы [1268], в присутствии гидросиламина отношение концентраций образующихся гидроксамата и кислотного продукта оказывается постоянным для ряда разных эфиров гиппуровой кислоты; это позволяет предполагать, что в каждом случае вода и гидросиламин конкурируют за один и тот же интермедиат (гиппурил-фермент):



Исследование гидролиза ряда эфирных субстратов методом остановленной струи показало, что при образовании спиртового продукта наблюдается начальный всплеск [394, 530]; эти данные согласуются с представлением о том, что лимитирующей является стадия, следующая за стадией образования ацилферментного интермедиата. Исследование катализируемого химотрипсином гидролиза фурилакрилоилтриптофанамида (рис. 7.4) методами температурного скачка и остановленной струи, проведенное Гессом и его сотрудниками [1933], свидетельствует о том, что до образования ацилфермента происходит последовательное образование двух фермент-субстратных комплексов:



Образование таких комплексов было зафиксировано также при исследовании кинетики предстационарной стадии для гидро-

лиза трипсином ряда фурилакрилоильных производных специфических эфирных субстратов.

Исследования, проведенные со специфическими ингибиторами трипсина и химотрипсина, действие которых направлено на активный центр, — тозиллизинхлорметаном и тозилфенилаланинхлорметаном (табл. 8.5), показали, что в каждом ферменте вблизи от активного центра находится остаток гистидина (His-57 и His-46 соответственно для α -химотрипсина и трипсина); данные об участии гистидина в каталитическом процессе были получены при исследовании зависимости скорости катализируемых реакций от pH [1759, 1933] и при изучении влияния химической модификации на активность фермента [2572].

Поскольку в протонированном состоянии серин является плохим нуклеофилом, было высказано предположение [933, 4417], что участвующий в катализе остаток гистидина функционирует как общее основание, оттягивая протон от серинового остатка и частично превращая его таким образом в более реакционноспособную алкоксидную форму. Результаты рентгеноструктурных исследований химотрипсина и его производных, обсуждаемые в гл. 10, показывают, что His-57 на самом деле локализован около Ser-195 и находится в таком положении, что один из атомов имидазольного кольца может действовать предполагаемым образом; кроме того, вблизи другого атома азота имидазольного кольца этого гистидина расположен остаток аспартата (Asp-102). Этот остаток находится в неполярном окружении и, следовательно, протонируется при нормальных значениях pH. Блоу, Биркгофт и Хартли [467] высказали предположение, что рассматриваемый остаток аспартата выступает как общее основание, оттягивая протон от гистидина; такая ситуация благоприятствует поляризующему действию гистидина на остаток серина. Это взаимодействие трех остатков, которое, как полагают, обеспечивает перенос отрицательного заряда от остатка аспартата, находящегося в неполярной области фермента, к сериновому остатку, превращая его частично в алкоксидную форму, получило название «система с переносом заряда» [467].

Предполагаемая схема катализируемого химотрипсином гидролиза эфирных субстратов приведена на рис. 7.5; гидролиз амидов и пептидов, как полагают, также происходит по приведенному механизму. Следует, однако, отметить, что рассматриваемый механизм, несмотря на всю его привлекательность, нельзя считать установленным. В работе [3709] высказано соображение, что остаток Asp-102 не участвует в системе с переносом заряда и что функция его состоит в стабилизации (путем образования водородной связи) имидазольного иона, возникающего при образовании тетраэдрического интермедиата.

Весьма вероятно, что большинство других сериновых протеиназ действуют по такому же механизму, как химотрипсин, не-

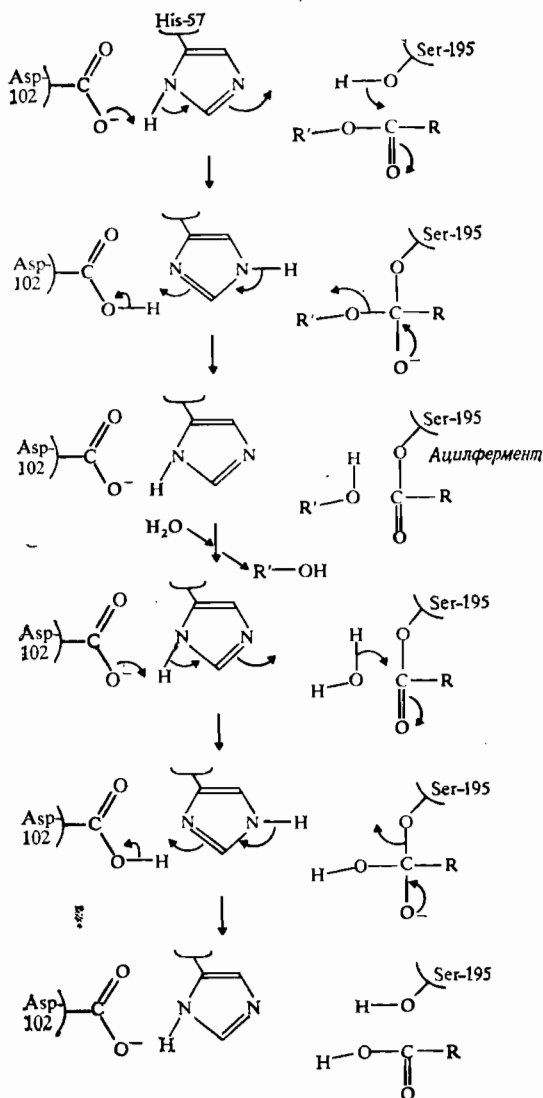


Рис. 7.5. Предполагаемый механизм действия химотрипсина с участием системы с переносом заряда.

смотря на большие различия в специфичности этих ферментов [4265, 4544]. Структурные исследования показывают, что у трипсина, тромбина и эластазы расположение остатков, участвующих в предполагаемой системе с переносом заряда, сходно. Подобная система, по-видимому, имеется и у бактериальной про-

теиназы субтилизина, хотя этот фермент по структуре (аминокислотная последовательность, пространственная структура) значительно отличается от химотрипсина [2587].

Механизм действия холинэстераз изучен менее полно, однако во многих отношениях действие этих ферментов и сериновых протеиназ сходно. Исследования с использованием DFP показали, что в катализе участвует остаток серина и в процессе реакции, вероятно, образуется ацилферментный интермедиат. Кроме того, характер влияния рН на скорость реакции сходен с тем, который наблюдается у химотрипсина, хотя кинетические исследования действия холинэстеразы (КФ 3.1.1.8) осложнены тем, что графики двойных обратных величин оказываются нелинейными [187]. Как отмечено выше, механизм действия этих ферментов и сериновых протеиназ, вероятно, сходен, однако Крупка [2612] предложил несколько иной механизм, в котором наряду с активным серином участвуют два остатка гистидина.

Активность ряда протеиназ, нечувствительных к ингибированию DFP, по-видимому, связана с высокореакционноспособной сульфгидрильной группой. К числу этих ферментов относятся растительные протеиназы — папаин (КФ 3.4.22.2) и фицин (КФ 3.4.22.3). Третичная структура папаина установлена методом рентгеноструктурного анализа (см. гл. 10). Эти ферменты содержат в молекуле один остаток цистеина, который обладает необычно высокой реакционной способностью по отношению к ртутьсодержащим соединениям и алкилирующим агентам [1342, 2455]. Лоув [2873] отметил, что последовательность аминокислот, включающая указанный остаток цистеина в фицине и папаине, сходна с последовательностью, включающей реакционноспособный остаток серина в трипсине; это позволяет высказать предположение, что протенназы данного класса произошли в процессе эволюции от общего предшественника.

Путь катализируемой папаином реакции, по-видимому, сходен с таковым для химотрипсина, но в случае папаина в качестве ковалентного интермедиата образуется тиаоацилфермент. Данные об образовании такого интермедиата получены спектроскопическими [588, 2687, 2875] и кинетическими методами. Поскольку максимальные скорости гидролиза папаином ряда эфиров гиппуровой кислоты одинаковы [2876], можно полагать, что на пути гидролиза этих эфиров имеется одна и та же лимитирующая стадия, однако этой стадией не обязательно является распад ацилферментного интермедиата. Подобные результаты были получены и при изучении гидролиза ряда эфиров *N*- α -карбобензоксиг-L-лизина [588]. *N*-транс-циннамоилимидазол, соединение, которое, как было показано, быстро реагирует с Ser-195 в химотрипсине, подобным же образом реагирует с цистеином (Cys-25) в папаине [588]. Был выделен *N*-транс-циннамоилпапаин и изучена кинетика его деацилирования [588].

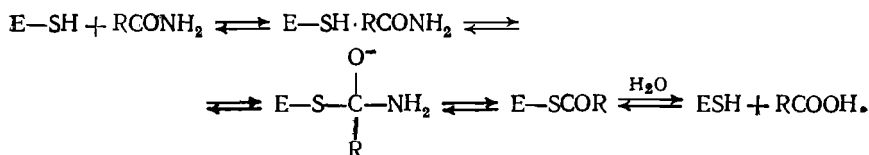


Рис. 7.6. Путь реакции, катализируемой папаином; в ходе реакции образуется тетраэдрический интермедиат в результате атаки активированного цистеина на карбонильную группу амидного субстрата. Предполагается, что в рассматриваемом процессе протон тиоловой группы переходит на соседний гистидин, подобно тому, как это происходит при функционировании химотрипсина (см. рис. 7.5).

Наличие остатка гистидина (His-158) вблизи активного цистеина было установлено в результате рентгеноструктурных исследований (см. гл. 10), а также на основании экспериментов, которые показали, что этот гистидин можно химически связать с Cys-25 с помощью бифункционального реагента 1,3-дибромацетона [2098]. В результате исследований влияния pH на активность фермента сделан вывод, что pK этого гистидина равно примерно 4; это обусловлено, по-видимому, тем, что он частично находится в гидрофобном окружении, создаваемом молекулой фермента [1153]. Остаток His-158 может играть роль общего основного катализатора, активируя цистеин путем частичного оттягивания от него протона [1326, 1481]. Однако система с переносом заряда, в которую входит карбоксильная группа, в папаине не обнаружена, поскольку ближайший остаток аспарагиновой кислоты локализован слишком далеко от остатка гистидина, чтобы играть роль общего основного катализатора по отношению к последнему [2874]. Модельные построения показывают, что имеются благоприятные предпосылки для образования тетраэдрического интермедиата в результате атаки субстрата Cys-25 (рис. 7.6), поскольку в фермент-субстратном комплексе субстрат находится в напряженном состоянии и это напряжение может быть снято при образовании тетраэдрического интермедиата [2877]. Было обнаружено, что при гидролизе специфических амидных и анилидных субстратов, например N-бензоиларгининамида, лимитирующей стадией является превращение тетраэдрического интермедиата в ацилфермент (рис. 7.6) [2878, 3526].

ДРУГИЕ ПРОТЕИНАЗЫ

Многие протеолитические ферменты не содержат высокореакционноспособных остатков серина или цистеина. Ниже будут рассмотрены два фермента этого класса, карбоксипептидаза А (КФ 3.4.17.1) и пепсин А (КФ 3.4.23.1), поскольку только их пространственная структура исследована достаточно детально с помощью рентгеноструктурного метода.

Карбоксипептидаза А

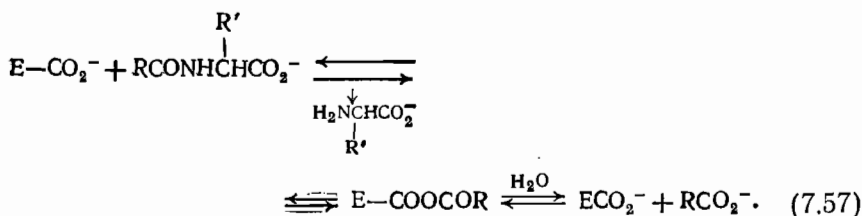
Этот фермент содержит один прочно связанный атом цинка на молекулу; удаление цинка путем диализа при низких значениях рН или против растворов, содержащих хелатообразующие соединения, приводит к полной утрате каталитической активности [4866, 4868]. Активность может быть восстановлена путем добавления ионов цинка или других переходных металлов, в том числе Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} [841, 4029]. Ионы Hg^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} также способны заменять цинк, однако в этом случае восстанавливается активность по отношению к эфирным, но не к пептидным субстратам; вероятно, это обусловлено некоторым «растяжением» активного центра, вызываемым связыванием более объемистых ионов металлов [840].

Исследования по влиянию рН [189, 620] и химической модификации [1824, 3659] на активность фермента привели к предположению о том, что существенную роль в функционировании фермента играет остаток глутаминовой кислоты. Результаты опытов по химической модификации фермента различными реагентами выявили также важную роль одного или нескольких остатков тирозина [3931—3932, 3970, 4295, 4389] и остатка аргинина [4867].

Определение пространственной структуры фермента методом рентгеноструктурного анализа (см. гл. 10) показало, что ион цинка координационно связан с тремя остатками, His-69, Glu-72 и His-196. В свободном ферменте четвертой координационной связью к цинку присоединена молекула воды; при образовании же комплекса с «плохим» субстратом, глицил-L-тирозином, молекула воды вытесняется карбонильным кислородом остатка глицина [1811, 3856]. Эти данные позволяют предполагать, что роль иона цинка состоит в усилении поляризации карбонильной группы. Около атакующей связи в фермент-субстратном комплексе находятся остатки Tyr-248, Arg-145 и Glu-270.

В гл. 10 обсуждается, какие именно конформационные изменения претерпевает карбоксипептидаза при связывании субстрата. В ходе этого процесса Arg-145 перемещается примерно на 2 Å из положения, в котором он образовывал водородную связь с карбонильной группой остатка 155, по направлению к С-концевой карбоксильной группе субстрата, с которой образует ионную связь; фенольная группа Tyr-248 перемещается примерно на 12 Å (в результате поворота на 120°) из положения, в котором она взаимодействовала с Glu-249 в свободном ферменте, в положение, находящееся на расстоянии 2 Å от атакующей пептидной связи. Помимо этого, при связывании глицил-L-тирозина из области активного центра фермента вытесняется связанная молекула воды.

Липскомб и др. [1811] рассмотрели два возможных химических механизма действия карбоксипептидазы; согласно одному из них Glu-270 действует как нуклеофил, атакующий карбонильную группу субстрата с образованием интермедиата ангидридной природы; согласно другому Glu-270 играет роль общего основного катализатора, способствующего атаке молекулы воды на карбонильную группу субстрата. Ниже приведена схема реакции с образованием ангидридного интермедиата:



Из этого уравнения следует, что между водой и продуктом реакции (аминокислотой) должен происходить обмен ^{18}O согласно реакции



и данные об отсутствии такого обмена [548] являются важным аргументом против рассматриваемого реакционного пути.

Предполагаемый механизм, в рамках которого Glu-270 действует как общий основной катализатор, представлен на рис. 7.7. В этом механизме (как и в механизме с образованием ангидридного интермедиата) Tyr-248 поставляет протон пептидной связи и получает его затем от тетраэдрического интермедиата. Как полагают, роль остатка аргинина ограничена тем, что он определяет специфичность фермента к карбоксильному концу субстрата.

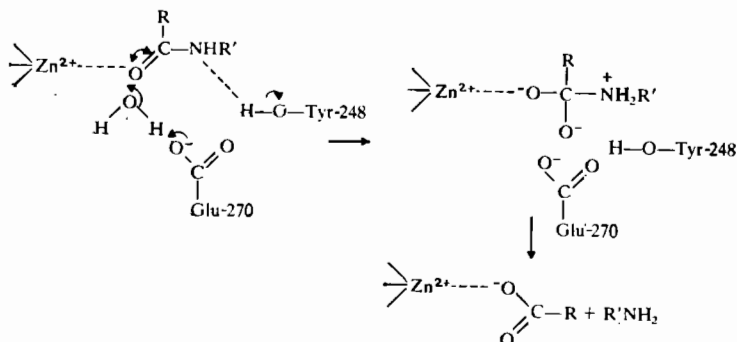
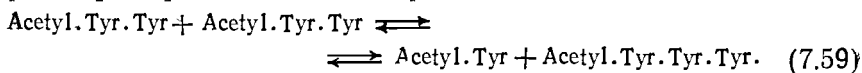


Рис. 7.7. Предполагаемый механизм действия карбоксипептидазы.

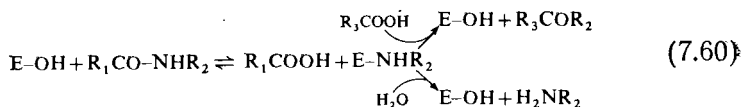
Пепсин

Хотя третичная структура пепсина и сходного с ним пенициллопепсина определена методом рентгеноструктурного анализа (с низким разрешением) [120, 4558], механизм действия этого фермента остается в значительной мере невыясненным. Пепсин А (КФ 3.4.23.1) имеет оптимум рН между 2 и 3; результаты исследования влияния на активность фермента [887, 1055] в совокупности с данными по влиянию химической модификации [327, 1044, 1812, 2896] показали, что существенными для катализа являются две карбоксильные группы остатков Asp-32 и Asp-215; при этом в активной форме фермента Asp-32 находится в ионизированном, а Asp-215 — в неионизированном состоянии. Данные химической модификации указывают также на вероятное участие в каталитическом процессе остатка тирозина [1922, 2798, 3680].

Пепсин катализирует ряд реакций транспептидации; так, при инкубации фермента с N-ацетил-L-тирозил-L-тиозином образуются N-ацетил-L-тирозин и N-ацетил-L-тирозил-L-тирозил-L-тирозин [3403] в соответствии с реакцией



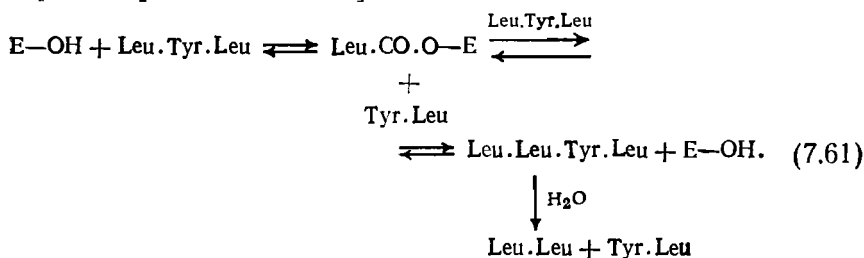
Постулируют, что в ходе этой реакции в качестве интермедиата образуется аминокфермент, в котором аминокгруппа переносимого фрагмента субстрата ацилирована ферментом. Предположение об образовании такого аминокферментного интермедиата получило дополнительную аргументацию, когда было показано, что аминокислота-акцептор конкурирует с водой за интермедиат в соответствии с реакцией [135, 4743]



и с помощью радиоактивного карбобензоксиг-L-тирозил-L-тирозина зафиксировано образование интермедиата и установлено, что в нем нет эфирной группировки [53].

Поскольку фермент катализирует обмен ^{18}O между водой и ацилированной аминокислотой, например N-ацетил-L-фенилаланином [2574, 4220] [см. уравнение (7.54)], было высказано предположение об образовании в ходе реакции ацилферментного интермедиата. Еще одним аргументом в пользу этого является обнаружение при гидролизе L-лейцил-L-тирозил-L-лейцина в качестве одного из продуктов реакции L-лейцил-L-лейцина, который может образоваться только в результате реакции ацильного

переноса [3412, 4640, 4983]:



Таким образом, можно предполагать, что один фрагмент субстрата при связывании с ферментом образует аминокфермент, а другой — ацилфермент. Возможный механизм действия пепсина, предложенный Бендером и Кежди [353], представлен на рис. 7.8;

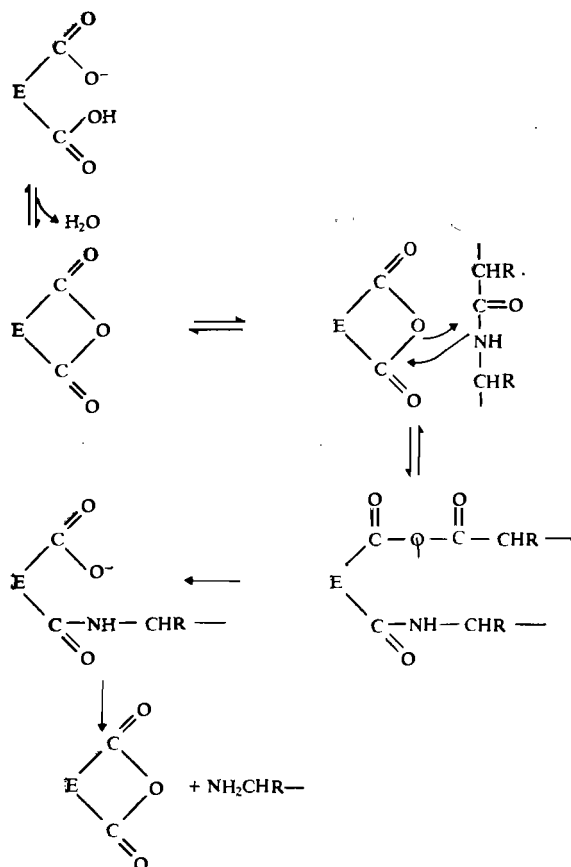


Рис. 7.8. Предполагаемый механизм действия пепсина.

в нем учтены рассмотренные выше данные. Согласно этому механизму, две карбоксильные группы фермента, взаимодействуя, образуют ангидрид; при реакции последнего с субстратом образуются ацилфермент и аминфермент; при этом ацилфермент является смешанным ангидридом, который может спонтанно гидролизаться, освобождая карбоксильную группу; последняя атакует аминфермент, что приводит к освобождению второго продукта и регенерации ангидрида на ферменте. В настоящее время, однако, предлагаемый механизм нельзя рассматривать как твердо установленный.

ЛИЗОЦИМ

Из числа ферментов, которые гидролизуют гликозидные связи, наиболее полно был изучен лизоцим; третичная структура фермента из яичного белка была установлена методом рентгеноструктурного анализа (см. гл. 10). Природными субстратами этого фермента являются полисахариды клеточной стенки бактерий, однако фермент гидролизует также 1,4-β-N-ацетилглюкозаминилигосахариды, расщепляя гликозидную связь между четвертым и пятым остатками сахара с нередуцирующего конца, как показано на рис. 7.9.

Рентгеноструктурные данные, обсуждающиеся в гл. 10, показывают, что активный центр образует глубокую щель на поверхности фермента, и вдоль этой щели связывается субстрат. Исследования на молекулярных моделях с целью экстраполяции данных, полученных при изучении структуры комплекса, образуемого ферментом с тримером (1,4-β-N-ацетилглюкозамин)₃, (NAG)₃, позволили локализовать участки связывания индивидуальных остатков сахаров, входящих в состав более длинных олигосахаридов; было показано также, что единственными аминокислотными остатками, расположенными достаточно близко к гидролизуемой связи, являются остаток глутамата (Glu-35) и остаток аспартата (Asp-52) [437, 439, 440]. Оказалось, что остаток глутамата находится в неполярном, а остаток аспартата — в полярном окружении на разных сторонах щели. Данные о ха-

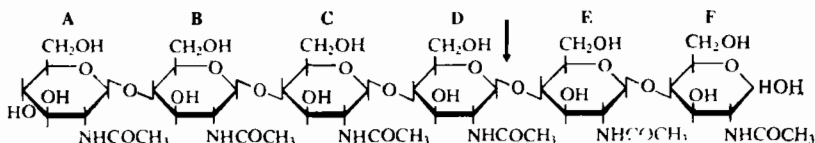


Рис. 7.9. Синтетический субстрат лизоцима, гекса-1,4-β-N-ацетилглюкозамин [(NAG)₆]. Стрелка показывает место расщепления. Остатки сахара обозначены буквами, которые соответствуют связывающим участкам фермента, идентифицированным методом рентгеноструктурного анализа.

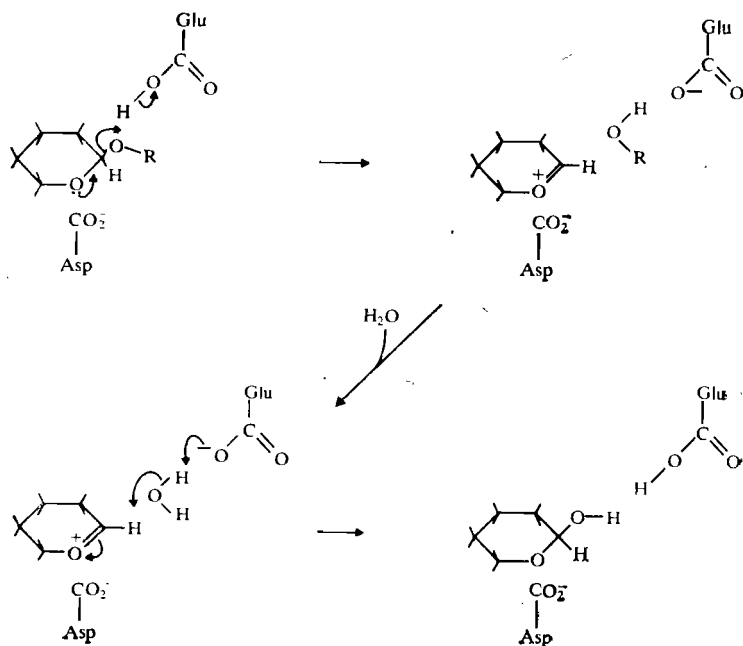


Рис. 7.10. Предполагаемый механизм действия лизоцима.

рактуре окружения остатков позволяют полагать, что в активном ферменте, оптимум pH которого лежит в области 5—8, Glu-35 находится в неионизированном, а Asp-52 — в ионизированном состоянии.

Механизм действия лизоцима, предложенный Верноном [4894], схематически представлен на рис. 7.10. Протонированная карбоксильная группа Glu-35 действует как общий кислотный катализатор, поставляя протон кислороду гликозидной связи. Это приводит к образованию интермедиата, являющегося по химической природе карбониевым ионом, стабилизируемым ионизированной карбоксильной группой Asp-52. Последующие превращения этого интермедиата являются по существу обращением первой стадии, при этом место первого продукта (ROH) занимает молекула воды.

Данные о важности двух рассматриваемых карбоксильных групп для каталитического процесса получены при исследовании pH-зависимости активности фермента [3711]; опыты с использованием необратимого ингибитора — триэтоксифторбората, который реагирует только с ионизированными карбоксильными группами, — позволили установить, что pK Asp-52 и Glu-35 равны 4,5 и 5,9 соответственно [3612]. Показано, что восстановление

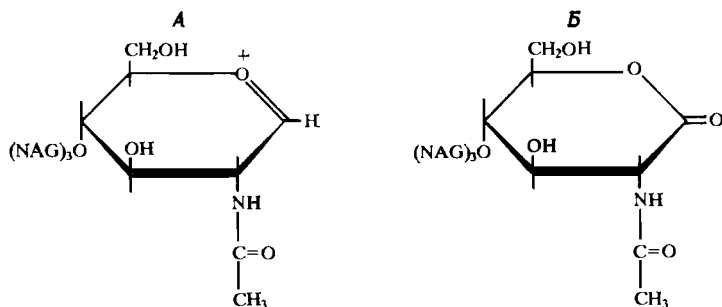


Рис. 7.11. А. Предполагаемая структура переходного состояния для реакции, катализируемой лизоцимом. Б. Аналог переходного состояния.

карбоксильной группы Asp-52 до спиртовой с образованием остатка гомосерина приводит к полной потере активности [1282]; дополнительные аргументы в пользу важности карбоксильных групп для каталитического процесса были получены при модификации другими химическими реагентами [2822]. Участие в каталитическом процессе карбониевого иона в качестве интермедиата подтверждается результатами определения изотопных эффектов [946, 4353], а также данными о том, что аналог переходного состояния, представленный на рис. 7.11, связывается с ферментом более прочно, чем (NAG)₄ [4177].

Менее бесспорным в рассматриваемом механизме действия лизоцима является предположение о напряжении в кольце четвертого остатка сахара (кольцо D, рис. 7.9). Основываясь на данных, полученных с помощью молекулярных моделей, Блейк и др. [437, 439, 440] сделали вывод, что это кольцо, находясь в нормальной конформации кресла, не может хорошо вписаться в область связывающего участка, если же кольцо примет напряженную конформацию полукресла, то будет достигнуто достаточно точное соответствие (рис. 7.12). Поскольку считали, что интермедиат — карбониевый ион — находится в конформации полукресла, было высказано предположение, согласно которому субстрат принимает конформацию переходного состояния вследствие напряжения, возникающего при связывании его с ферментом; это приводит к увеличению эффективности процесса катализа. То обстоятельство, что (NAG)₃ является очень плохим субстратом лизоцима, в рамках предложенной модели можно было объяснить тем, что взаимодействие остатка сахара с участком связывания D-кольца на ферменте энергетически невыгодно и связывание (NAG)₃ в области каталитического центра оказывается крайне маловероятным. Исследования по связыванию аналога переходного состояния (рис. 7.11) также можно было интерпретировать в рамках данной модели [4177]. Однако ре-

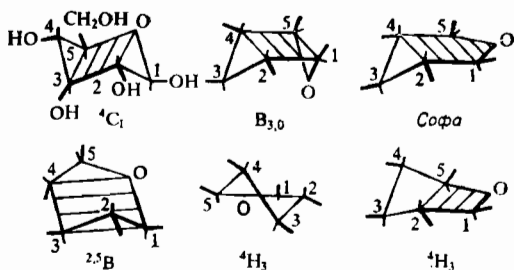


Рис. 7.12. Некоторые возможные конформации кольца глюкозы. Показаны конформации кресла (С), лодки (В), полукресла (Н) и софы. Углеродные атомы кольца пронумерованы в соответствии с общепринятыми правилами: в положении 1 находится редуцирующая группа. Атом кислорода в кольце занимает «нулевое» положение. В заштрихованной плоскости находятся четыре углеродных атома кольца. Атомы, лежащие над плоскостью кольца, указаны индексами вверху слева от буквы, а лежащие под плоскостью кольца — индексами внизу справа.

результаты рентгеноструктурных исследований комплекса лизоцима с этим аналогом свидетельствуют о том, что аналог принимает конформацию софы [1396], а не истинную конформацию полукресла. Детальные расчеты энергетики процесса связывания субстрата с ферментом привели Левитта [2777] к выводу, что при связывании с ферментом остаток D не изменяет конформацию и что если бы это и происходило, то выигрыш энергии оказался бы небольшим. Он предполагает, что неблагоприятный энергетический баланс при связывании кольца D может быть обусловлен вытеснением двух молекул воды, локализованных около Asp-52.

Значительно меньше известно о механизме действия других гликозидных гидролаз. Для функционирования α -амилаз необходим ион Cu^{2+} [1406, 4869], однако неясно, участвует ли он в катализе или же в поддержании надлежащей конформации фермента. При действии β -амилаз происходит обращение конфигурации аномерного углерода, в то же время в реакциях, катализируемых α -амилазами, обращения конфигурации не наблюдается. Эти результаты позволяют предполагать, что реакция, катализируемая β -амилазами, является реакцией двухстадийного переноса, в то время как реакция, катализируемая α -амилазами, протекает в одну стадию; эти представления подтверждаются результатами исследования изотопного обмена [1144, 1358]. Несмотря на отмеченные различия, высказывается предположение, что механизм действия обеих этих амилаз и лизоцима сходен [4720]; следует, однако, отметить, что убедительных данных в пользу такого предположения нет.

РИБОНУКЛЕАЗА И НУКЛЕАЗА МИКРОКОККОВ

Хотя панкреатическая рибонуклеаза (КФ 3.1.27.5) катализирует гидролиз полирибонуклеотидов, ее долгое время относили к классу трансфераз, поскольку в ходе реакции происходит обратимый перенос фосфатной группы из 5'-положения одного нуклеотидного остатка в 2'-положение соседнего остатка с образованием 2',3'-циклического фосфата, при гидролизе которого образуется 3'-фосфатный эфир. Схема катализируемой реакции приведена на рис. 7.13. Пространственная структура фермента и его комплексов с ингибиторами была установлена методом рентгеноструктурного анализа [2339, 5172; см. гл. 10]. В этих исследованиях было показано, что вблизи гидролизуемой связи расположены два остатка гистидина, His-12 и His-119, а ранее было установлено, что остатки гистидина существенны для активности фермента.

Исследование влияния pH на активность фермента выявило важную роль групп с pK 5,2 и 6,8 [1921], а результаты этих исследований в растворах, содержащих органические кислоты, показало, что обе идентифицированные группы являются катионными кислотами и что они, вероятно, принадлежат остаткам гистидина [1340]. Значения pK рассматриваемых остатков гистидина были определены также методом ЯМР [3093]. В гл. 8 упоминается о том, что иодацетат может реагировать с любым из указанных остатков гистидина в составе рибонуклеазы, и это приводит к потере активности; отмечено также, что иодацетат

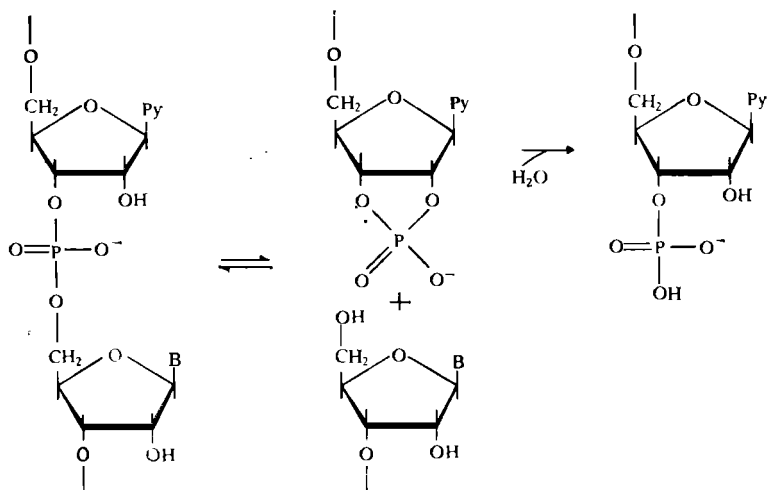


Рис. 7.13. Схема реакции, катализируемой рибонуклеазой. Py — пиримидин, В — пурий или пиримидин.

не может реагировать одновременно с двумя рассматриваемыми остатками в одной молекуле [916]. Данные о роли остатков гистидина в функционировании рибонуклеазы были получены также в опытах по фотоокислению [2409, 5028].

В работах [3910, 4909] было показано, что при контролируемом гидролизе субтилизином (КФ 3.4.21.14) в рибонуклеазе расщепляется одна пептидная связь без утраты активности. Модифицированный в этих условиях фермент можно разделить на два пептида, один из которых (S-пептид) содержит 20 аминокислотных остатков с N-конца белка, а другой (S-белок) — остальные 104 остатка. Ни один из этих пептидных фрагментов не обладает каталитической активностью, однако если их смешать, то происходит реассоциация с восстановлением активности фермента. Исследования, в которых были использованы некоторые химически синтезированные аналоги S-пептида [1988, 3911], показали, что пептид, содержащий только 14 остатков с N-конца, эффективно реактивирует S-белок, взаимодействуя с ним в отношении 1:1; пептид, содержащий первые 13 аминокислотных остатков, способен реактивировать S-белок, но только в условиях большого избытка над последним. Пептид, содержащий 12 остатков, также восстанавливает активность S-белка, но связывается с ним еще слабее. Пептиды, у которых остаток гистидина в положении 12 либо отсутствует, либо заменен другим остатком, не способны восстанавливать активность S-белка; эти данные подтверждают представление о непосредственном участии этого остатка в катализе.

В ходе исследований, в которых проводили химическую модификацию и деградацию фермента, было установлено, что для его активности, вероятно, важны также остатки Lys-41 и Asp-121 [1964, 3729]. Согласно рентгеноструктурным данным, эти остатки находятся весьма близко к связанному в активном центре субстрату. Роль этих остатков в катализе остается еще не вполне ясной; в механизме, предложенном Рабином [1020, 1339], предполагается, что важными в каталитическом отношении группами являются два остатка гистидина, остаток же лизина взаимодействует с фосфатной группой субстрата. Этот механизм представлен на рис. 7.14, он включает сочетанный кислотно-основный каталитический процесс, причем основная имидазольная группа взаимодействует с 2'-гидроксильной группой, в то время как протонированная имидазольная группа поставляет протон уходящей группе. Расщепление циклического эфира происходит в результате обращения рассмотренных выше стадий при участии воды, которая, как предполагается, связана водородными связями с карбонильным кислородом пиримидина и одним из остатков гистидина. Этот механизм согласуется с большинством известных данных о рибонуклеазе и подтверждается сведениями, полученными методом рентгеноструктурного анализа и методом ЯМР о

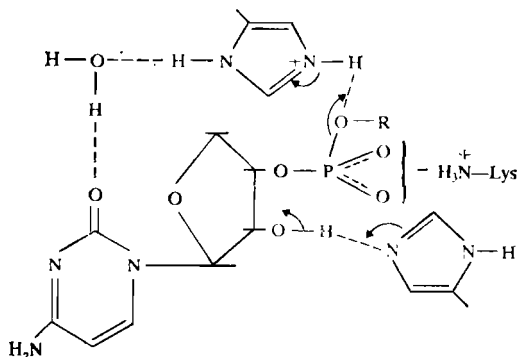


Рис. 7.14. Предполагаемый механизм действия рибонуклеазы, включающий образование циклофосфатного интермедната [1020].

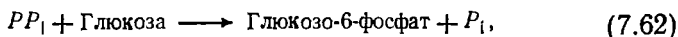
природе комплекса фермента с 3'-CMP [3944]. Рассматриваемый механизм еще нельзя, однако, считать бесспорно установленным, предложен также ряд других механизмов [1793, 4978, 5128].

Третичная структура эндонуклеазы микрококков *Staphylococcus aureus* (КФ 3.1.31.1) установлена методом рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением [896], но механизм действия фермента не вполне ясен. Для активности фермента необходимы ионы Ca^{2+} [932], и показано, что молекула фермента содержит по крайней мере два кальцийсвязывающих участка [926], хотя по данным рентгеноструктурных исследований с ферментом связан только один ион кальция [896]. Ион кальция, по-видимому, необходим как для связывания субстрата, так и для катализа [124]. Показано, что замена иона Ca^{2+} на ион Sr^{2+} изменяет специфичность фермента [925]. Методами рентгеноструктурного анализа и химической модификации установлено, что для активности фермента важен остаток тирозина [124, 896], однако роль его в каталитическом механизме не установлена.

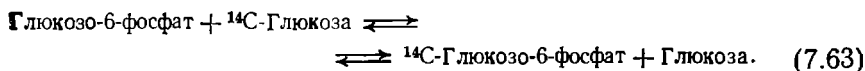
ФОСФАТАЗЫ

Ни об одной из фосфатаз нельзя сказать, что ее пространственная структура установлена методом рентгеноструктурного анализа с достаточным разрешением. В качестве примера ферментов этого класса мы вначале рассмотрим глюкозо-6-фосфатазу (КФ 3.1.3.9), поскольку ее механизм действия изучен весьма обстоятельно, хотя этот фермент и не получен в гомогенном состоянии. Результаты фракционирования субклеточных компонентов показали, что фермент ассоциирован с микросомной фракцией. Наряду с гидролизом глюкозо-6-фосфата фермент катали-

зирует перенос фосфатной группы от неорганического пирофосфата на глюкозу [1826]:



и реакцию обмена между радиоактивной глюкозой и глюкозо-6-фосфатом [3458, 4493]:



Кинетические исследования гидролитической, трансферазной и обменной реакций, катализируемых этим ферментом, показали, что реакция осуществляется по механизму двухстадийного переноса, в котором в качестве интермедиата образуется фосфорилфермент [3459, 3614]; было показано, что переносимая фосфатная группа связывается с остатком гистидина фермента [1316]. О важности этого остатка гистидина свидетельствуют также данные по изучению влияния pH на активность фермента [3461]. Для активности фермента, по-видимому, необходим катион двухвалентного металла. Согласно предложенному механизму, ион металла связывается с отрицательно заряженной фосфатной группой субстрата, а остаток гистидина осуществляет нуклеофильную атаку на атом фосфора, что приводит к образованию фосфорилфермента, который далее подвергается нуклеофильной атаке водой [3457].

Не все фосфатазные реакции протекают с образованием фосфорилфермента, в котором фосфорилирован остаток гистидина. В процессе функционирования щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) из тканей млекопитающих и из бактерий фосфорилированию подвергается остаток серина [1260, 4158]. Определена последовательность аминокислот, включающая фосфорилируемый остаток серина: Thr.Asp.Ser.Ala.Ala [4157]. Эта последовательность сходна с таковой для сериновых протеиназ млекопитающих (см. табл. 7.5), однако вряд ли щелочная фосфатаза функционирует по такому же механизму, что и указанные протеиназы. Установлено, что щелочная фосфатаза содержит ионы цинка, необходимые для ее активности [3699, 4632], остатки же гистидина, по-видимому, для катализа несут существенны [4632]. По мнению Шварца [4156], механизм действия щелочной фосфатазы в известной мере сходен с тем, который предложен для глюкозо-6-фосфатазы; отличие состоит в том, что атом фосфора атакуется не гистидиновым, а сериновым остатком, причем электрон-дефицитность фосфора возрастает в результате взаимодействия со связанным с ферментом атомом цинка, образующим комплекс с отрицательно заряженной фосфатной группой. Для реализации такого механизма необходимо, чтобы остаток серина был каким-то образом активирован, т. е. являлся бы более эффек-

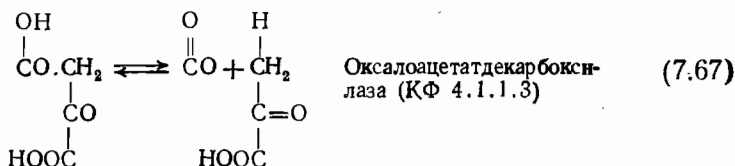
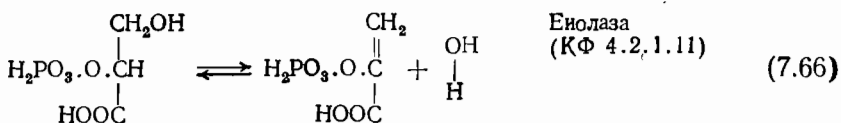
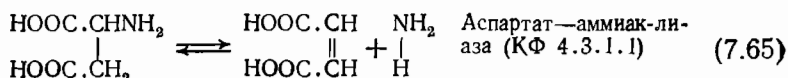
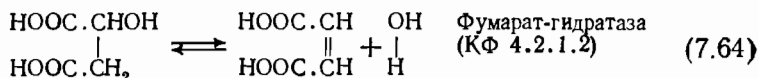
тивным нуклеофилом, однако как это может происходить — пока неясно.

Что касается некоторых других фосфатаз, в том числе фруктозо-бисфосфатазы (КФ 3.1.3.11) и дрожжевой пирофосфат — фосфогидролазы (КФ 3.6.1.1), то данные об образовании фосфорилированного фермента для них отсутствуют [645, 3717], т. е. реакция, возможно, протекает по одностадийному согласованному механизму, а не по механизму двухстадийного переноса.

ЛИАЗЫ

К этому классу относятся ферменты, при действии которых определенные группы (например, H_2O , NH_3 , CO_2 , альдегид) удаляются из субстратов не путем гидролиза или окисления, а путем простого отщепления, при этом в молекуле продукта остается, если так можно сказать, «шрам» в форме двойной связи. Поскольку реакции являются обратимыми, эти ферменты можно рассматривать так же, как ферменты, катализирующие присоединение групп по двойным связям. Лиазы образуют весьма большой класс, содержащий около 240 ферментов.

Ниже приведено несколько типичных реакций, катализируемых лиазами.



Первичная лиазная реакция, описываемая уравнением, в левой части которого находится одна молекула, а в правой две, иногда оказывается связанной со вторичными реакциями, маскирующими природу процесса; поэтому, глядя на суммарное уравнение реакции, не всегда можно сказать, протекает ли в ходе суммарного процесса лиазная реакция. Например, один из

реагентов может оказаться связанным с молекулой фосфата или СоА, продукт может подвергаться дальнейшему изменению (например, расщеплению на две части, циклизации, изомеризации, полимеризации) и т. д.

Нет оснований полагать, что механизм действия всех лиаз одинаков, особенно если учесть, что многие из них не являются простыми белками и функционируют в комплексе с простетическими группами или кофакторами. Почти все лиазы, которые действуют на аминокислоты, нуждаются в пиридоксальфосфате (это справедливо и в отношении других действующих на аминокислоты ферментов, а не только лиаз); лиазы, действующие на кетосоединения, на CO_2 и на оксокислоты, нуждаются в тиаминдифосфате, биотине и СоА соответственно; некоторые лиазы содержат кобамидные производные и другие кофакторы (они рассмотрены в гл. 9). Ряд лиаз нуждается в ионах различных металлов. Таким образом, лиазы объединены в один класс на основе характера катализируемых реакций, а не по принципу сходства структуры.

Первый вопрос, который возникает при рассмотрении механизма действия лиаз, состоит в том, как происходит отщепление удаляемой части субстрата — в одну стадию (в виде целой молекулы) или поэтапно. Как, например, отщепляется от малата молекула воды в ходе реакции, катализируемой фумаратгидратазой, — в виде целой молекулы или же в виде ионов гидроксила и водорода? Механизм действия этого фермента был детально исследован Хансенom, Диново и Бойером [1771] путем определения скоростей ряда реакций изотопного обмена. В состоянии равновесия при высокой концентрации субстрата (и продукта) относительные скорости обмена меченых атомов малата были следующими:

^{18}O	из группы $\text{H}-\overset{\textstyle }{\underset{\textstyle }{\text{C}}}-^{18}\text{OH}$	с водой	4,0
D	из группы $\text{H}-\overset{\textstyle }{\underset{\textstyle }{\text{C}}}-\text{D}$	с водой	1,0
^{14}C	превращение малата в фумарат		2,5

Наиболее быстрой реакцией является удаление гидроксильного иона из малата или присоединение гидроксильного иона к интермедиату с образованием малата; эта реакция протекает существенно быстрее, чем превращение малата в фумарат (по данным обмена ^{14}C). Удаление иона дейтерия происходит значительно медленнее, чем две указанные выше реакции. По мере увеличения концентрации субстрата скорости суммарного превращения и дейтериевого (или тритиевого) обмена становятся одинаковыми. На каждую молекулу малата, превратившуюся в

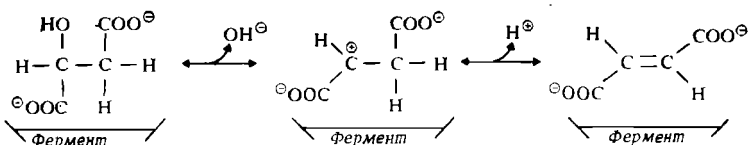


Рис. 7.15. Механизм фумаратгидратазной реакции [1771].

фумарат, в раствор переходит только один атом дейтерия; это показывает, что дейтерий переходит в раствор не в результате простой ионизации, а только в процессе превращения малата в фумарат. В среде H_2^{18}O существенное количество ^{18}O включается в непрореагировавший малат; это означает, что малат, потерявший свой гидроксил в ходе первой быстрой стадии, переходит в интермедиат, который не обязательно далее переходит в фумарат, а может присоединять гидроксил и переходить обратно в малат. На основании этих и других данных Хансен и др. предложили для реакции механизм, представленный на рис. 7.15.

В этом механизме в результате первой быстрой стадии, на которой происходит удаление гидроксила, образуется интермедиат — карбониевый ион; наличие положительного заряда на атоме углерода приводит к уходу водородного иона и образованию двойной связи. В суммарной реакции лимитирующей является вторая стадия. Весьма интересно, что освобождение водородного иона в раствор протекает относительно медленно; было высказано предположение (которое пока не получило подтверждения), что происходит перенос водородного иона на некую трудно ионизирующуюся группу фермента. Фермент проявляет строгую стереохимическую специфичность; было показано, что присоединение соответствующих групп к фумарату по двойной связи происходит по *транс*-типу (ранее предполагали, что оно осуществляется по *цис*-типу) [123, 1512], что фермент специфичен к фумарату (не действует на малеинат) и к L-малату (не действует на D-малат). Результаты исследования влияния pH на скорость отдельных стадий [381] согласуются с предложенным механизмом и подтверждают, что удаление гидроксильного иона является наиболее быстрым процессом, однако авторы не считают, что все другие механизмы следует исключить из рассмотрения. На рис. 7.16 приведена схема строения активного центра фумарат-гидратазы. На этой схеме В'Н — это протонированная основная группа, которая присоединяет гидроксил, В — непротонированная основная группа; две не обозначенные буквами положительно заряженные группы взаимодействуют с $-\text{COO}^-$ -группами малата или фумарата.

Фермент енолаза, как и фумарат-гидратаза, — это гидро-лиаза, однако механизм его действия существенно отличается от такового для фумарат-гидратазы [1095]. В этом случае наиболее

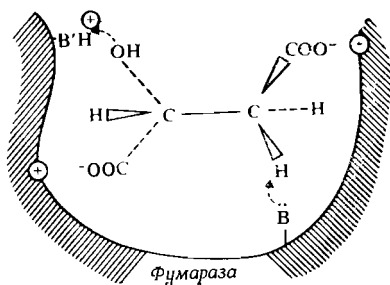


Рис. 7.16. Схема строения активного центра фумарат-гидратазы со связанным субстратом [381].

быстрой является стадия освобождения иона водорода (или дейтерия) (наблюдается четко выраженный первичный изотопный эффект). Освобождение гидроксильного иона осуществляется медленно, и не исключено, что оно происходит даже после освобождения продукта реакции — фосфопирувата. Таким образом, механизм действия енолазы является «обратным» тому, который был рассмотрен для фумарат-гидратазы; интермедиатной формой является не карбониевый ион, а карбанион. В отличие от фумарат-гидратазы, енолаза нуждается в Mg^{2+} , что, несомненно, связано с наличием в субстрате фосфатной группы.

Особенностью, характерной для механизма действия обеих гидро-лиаз, является то, что вода освобождается не в виде целой молекулы, а в виде последовательно уходящих водородного и гидроксильного ионов. Однако существенные различия в действии рассматриваемых ферментов показывают, что предложить общий механизм катализа лиазами нельзя.

С фумарат-гидратазой во многом сходна аспарат — аммиак-лиаза; оба фермента присоединяют к фумарату соответствующие группы по двойной связи и имеют одинаковую стереохимическую специфичность [2586]. Если провести в D_2O реакцию превращения фумарата в аспарат под действием аспарат — аммиак-лиазы, а затем из образовавшегося дейтероаспартата путем обработки азотистой кислотой получить дейтеромалат, то окажется, что последний идентичен дейтеромалату, образуемому непосредственно из фумарата в ходе реакции, катализируемой фумарат-гидратазой. Однако механизм удаления аминогруппы аммиак-лиазой еще не выяснен.

Весьма обстоятельно изучен фермент карбонат-дегидратаза (КФ 4.2.1.1), для которого известно несколько форм. Трехмерная структура фермента установлена методом рентгеноструктурного анализа [2816]. В каждом активном центре находится один атом цинка, который расположен на дне глубокой щели (см. рис. 10.12, 10.13, 10.17 и 10.21); на стенках этой щели локализованы 5 остатков гистидина, причем три из них являются лигандами атома цинка. Данные ЯМР позволяют пред-

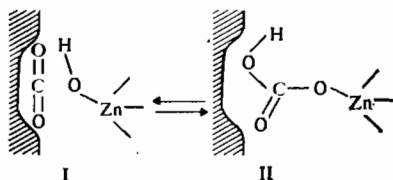


Рис. 7.17. Механизм действия карбонат-дегидратазы [3923].

положить, что четвертым лигандом цинка является молекула воды или гидроксильная группа; есть основания считать, что эта молекула воды (или гидроксильная группа) участвует в ферментативной реакции.

Методом разностной инфракрасной спектроскопии [3923] получены данные, которые позволили сделать определенные выводы относительно механизма реакции. Одиночная молекула субстрата CO_2 , связываясь в активном центре, располагается в гидрофобной полости фермента, но не является лигандом Zn . В то же время бикарбонат связывается через свой отрицательно заряженный атом кислорода с Zn ; молекула этого соединения расположена так, что относительно нейтральные атом O и группа OH находятся в полости. Азид-ион (N_3^-), являющийся ингибитором, образует с Zn координационную связь; он вытесняет CO_2 из области активного центра. Бикарбонат в свою очередь вытесняет как N_3^- , так и CO_2 . Механизм действия карбонат-дегидратазы схематически представлен на рис. 7.17.

Авторы работы [3923] пишут: «...в ходе реакции дегидратации расщепление $\text{C}-\text{O}$ связи должно сопровождаться переносом протона, при этом OH^- -группа остается координационно-связанной с Zn , поскольку нам известно, что в результате реакции в гидрофобной полости остается только CO_2 . В ходе же реакции гидратации в соответствии с принципом микроскопической обратимости ион OH^- , координационно-связанный с Zn , атакует связанную молекулу CO_2 с образованием HCO_3^- ».

Карбонат-дегидратаза катализирует гидратацию не только CO_2 , но и ряда других карбонильных соединений, например гидратацию альдегидов (в частности, ацетальдегида) [3702].

Обсуждался механизм действия и многих других лиаз, однако большинство из предложенных механизмов являются весьма гипотетическими и в ряде случаев для одного и того же фермента построено две и более альтернативных схем. Действие многих лиаз, однако, зависит от определенного кофактора, и это в какой-то мере облегчает установление механизма. Так, большинство лиаз, действующих на аминокислоты, нуждаются в пиридоксальфосфате, и почти достоверно известно, что реагирующей формой является шиффово основание (см. с. 718). Более подробно вопрос о механизме действия ряда лиаз рассмотрен в работе [1637].

ИЗОМЕРАЗЫ

Эти ферменты катализируют изомеризацию, т. е. реакцию, в ходе которой изменяется конфигурация молекулы субстрата. Известны различные виды изомерии, и имеется соответственно ряд групп изомераз с разными механизмами действия.

Как это ни парадоксально, о механизмах каталитического действия ферментов этого класса известно меньше, чем о ферментах других классов, хотя изомеразные превращения представляются относительно простыми и, казалось бы, установить их механизм не составляет особого труда.

Возможные механизмы действия некоторых изомераз в большинстве случаев являются сугубо предположительными. Установление механизма действия затрудняется еще и отсутствием рентгеноструктурных данных о строении этих ферментов. Изомеразы первой группы (КФ 5.1.—.—) связаны с D-L-изомеризацией, т. е. с инверсией в оптически активных центрах (обычно являющихся асимметрическими атомами углерода). Их называют рацемазами, если субстрат содержит только один такой центр, и эпимеразами, если он помимо центра, в котором происходит инверсия, содержит другие асимметрические центры. Субстрат превращается не просто в противоположный изомер, а в равновесную смесь обоих изомеров; так, из L-субстрата образуется смесь D- и L-форм.

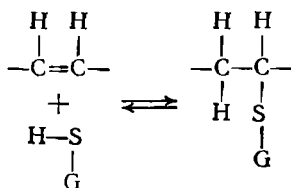
Это свидетельствует о том, что фермент обратимо превращает субстрат в симметричный интермедиат; последний располагается в активном центре таким образом, что его обратное превращение в субстрат является стерически неспецифическим. Если, например, от асимметрического атома углерода отщепляется водород с образованием интермедиата, имеющего двойную связь, то фермент должен удерживать интермедиат в таком положении, при котором атом водорода может присоединиться к углероду с любой стороны. Многие (а возможно, и все) рацемазы аминокислот нуждаются в пиридоксальфосфате, и, несомненно, что интермедиатом является шиффово основание (см. рис. 9.14). Активный центр фермента должен содержать как набор групп, определяющих его специфичность к определенной аминокислотной боковой цепи, так и функциональные группы, благодаря которым он является именно рацемазой, а не аминотрансферазой или декарбоксилазой аминокислот, поскольку при функционировании всех этих ферментов образуются комплексы аминокислота — пиридоксальфосфат. Природа этих групп, однако, неизвестна.

Диаминопимелинат-эпимераза (КФ 5.1.1.7) действует на субстрат, в котором две асимметричные группы находятся на значительном расстоянии друг от друга. Стереохимическая специфичность фермента исследована в работе [134]. Фермент ката-

лизирует превращение L,L-формы в L,D- или мезо-форму, но не способен вызывать взаимопревращение L,D- и D,D-форм. Это свидетельствует о том, что фермент имеет два связывающих участка, первый из них связывается с концом субстрата, имеющим L-конфигурацию, но не вызывает никаких превращений, второй — с другим концом субстрата (независимо от конфигурации) и вызывает рацемизацию.

Из числа эпимераз, действующих на углеводы (КФ 5.1.3.—), особый интерес представляет альдоза—1-эпимераза (КФ 5.1.3.3): асимметрический центр, на который она действует, представляет собой редуцирующую группу сахара. Механизм действия этого фермента исследован в работе [358]. Было показано, что в ходе реакции не происходит ни обмена атома водорода при C-1 на дейтерий из D₂O, ни потери ¹⁸ОН из глюкозы-1-¹⁸O. Замена атома водорода при C-1 на D не оказывает влияния на скорость реакции. Эти данные исключают любой механизм, основанный на процессах дегидратации или дегидрирования, затрагивающих водород, связанный с C-1, а также механизм одиночного замещения с участием ОН⁻. Наиболее вероятным механизмом является перенос водорода, приводящий к образованию интермедиата — альдегида с открытой цепью.

Обратимся теперь к ферментам, которые не связаны с D-L-переходом, и в качестве примера рассмотрим *цис-транс*-изомеразы. Эти ферменты катализируют изменения расположения групп в плоских молекулах. Некоторым из них в качестве кофактора необходим глутатион. Присоединение глутатиона по двойной связи приводит к образованию насыщенного соединения и позволяет осуществляться свободному вращению:



Если при последующем элиминировании глутатиона отщепляется не тот атом водорода, который присоединился первоначально, то происходит изомеризация. Известно, что именно таким образом глутатион катализирует неферментативное взаимопревращение фумарата и малеината. Подобный механизм, однако, должен был бы приводить к включению дейтерия при проведении реакции в D₂O. Между тем такого включения не наблюдалось ни в реакции, катализируемой малеилпируват-изомеразой (КФ 5.2.1.4), ни в соответствующей неферментативной реакции, катализируемой глутатионом. Эти данные пока не получили удовлетворительного объяснения.

Остальные изомеразы можно рассматривать как ферменты, катализирующие превращение одного вещества в другое, а не взаимное превращение стереоизомеров. Такие реакции сходны с теми, которые были рассмотрены в предыдущих разделах, однако они вовлекают в реакцию две части одной и той же молекулы субстрата, а не два отдельных субстрата. К таким реакциям относятся внутримолекулярные окислительно-восстановительные реакции, в ходе которых одна часть молекулы субстрата окисляет другую, внутримолекулярный перенос групп и внутримолекулярные лизазные реакции, в результате которых происходит разрыв молекулы (обычно при раскрытии кольцевой структуры).

Большинство внутримолекулярных оксидоредуктаз (КФ 5.3.1.—) катализирует взаимопревращение альдоз и кетоз (так называемые кетол-изомеразы). В какой форме реагирует сахар — открытой или циклической — неясно, однако обычно, записывая соответствующие уравнения, приводят открытую форму. Схематически реакцию можно изобразить следующим образом:



В результате реакции концевая альдегидная группа обратимо восстанавливается соседней —CHОН-группой. Что касается природы процесса переноса водорода от одной группы к другой, то опыты с использованием изотопов дают неоднозначные результаты: они свидетельствуют о том, что имеет место как прямой перенос атомов водорода, так и обмен с растворителем.

Эксперименты Ридера и Роуза [3922] показывают, что реакция, катализируемая триозофосфат-изомеразой (КФ 5.3.1.1), осуществляется не путем прямого внутримолекулярного переноса водорода, поскольку при проведении реакции в T_2O наблюдается включение одного атома трития. Авторы предложили механизм, в котором в качестве интермедната выступает связанный с ферментом ион енолата. Они показали также, что триозофосфат-изомераза отщепляет от $-\text{CH}_2\text{OH}$ -группы не тот атом водорода, который отщепляется альдолазой (КФ 4.1.2.13).

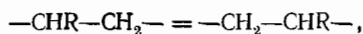
Аналогичные результаты получил Топлер [4779] в опытах с глюкозофосфат-изомеразой (КФ 5.3.1.9); этот автор также постулирует образование в ходе реакции связанного с ферментом иона енолата. Он показал, что глюкозофосфат-изомераза и маннозофосфат-изомераза (КФ 5.3.1.8) удаляют разные атомы водорода из $-\text{CH}_2\text{OH}$ -группы фруктозо-6-фосфата. Позже Роуз и О'Коннел [3979], подтвердив результаты Топлера, показали, что фруктозо-6-фосфат, меченный тритием по C-1, превращается под действием глюкозофосфат-изомеразы в глюкозо-6-фосфат, меченный по C-2. Таким образом, наряду с включением водорода из среды, происходит также прямой перенос его от C-1

к С-2 в пределах одной молекулы. При низких температурах перенос водорода происходит значительно быстрее, чем включение из среды. Поэтому авторы предлагают несколько иной механизм, предусматривающий перенос связанного с углеродом атома водорода; освобождающийся при образовании енолатного иона водород переносится на определенную группу фермента, которая сравнительно медленно обменивается им со средой. Затем этот же атом водорода может быть перенесен с фермента к соседнему углеродному атому той же молекулы субстрата.

Стероид-Δ-изомеразы (КФ 5.3.3.1) катализируют перемещение двойной связи из положения 4,5 в положение 5,6, что предполагает миграцию атома водорода из положения 6 в положение 4. Механизм действия бактериального фермента исследован в работе [4657], авторы которой изучали также неферментативный катализ соответствующего превращения, осуществляемого H^+ - и OH^- -ионами. Если неферментативный процесс проводят в D_2O , наблюдается включение дейтерия в молекулу стероида, тогда как ферментативная реакция, которая протекает с такой же скоростью, как и в H_2O , не приводит к включению дейтерия. Это говорит о том, что фермент катализирует прямой внутримолекулярный перенос атома водорода от С-6 к С-4.

Однако в опытах с ферментом из тканей млекопитающих были получены противоположные результаты; тритий переходил в раствор из положения 4 [5053], а при проведении реакции в D_2O дейтерий включался как в положение 4, так и положение 6 [3527]. На этом основании было высказано предположение, что при функционировании данного фермента водород (или дейтерий) перемещается из положения 4 в положение 6 при участии водородпереносящей группы фермента, которая обменивается водородом с растворителем.

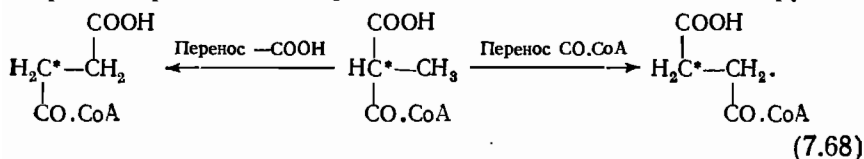
Говоря о внутримолекулярных трансферазах (КФ 5.4. —), следует отметить, что большинство из них нуждается в кобальт-содержащем кобамидном коферменте (он относится к витаминам группы B_{12}). Свойства этого кофермента вкратце рассмотрены на с. 729. Среди интересных свойств кофермента следует отметить, в частности, способность атома кобальта образовывать связи $Co-C$, например с метильной группой; кофермент участвует в ряде реакций, при которых происходит перенос группы от данного атома углерода к соседнему. Эти реакции можно записать в виде следующей схемы:



где R — переносимая группа. Перенос R-группы сопровождается, конечно, переносом атома водорода в противоположном направлении. Этот атом водорода не обменивается с растворителем, поэтому можно предполагать, что он переносится непосред-

ственно от одного атома углерода к другому (подчеркнем, однако, что это не доказано).

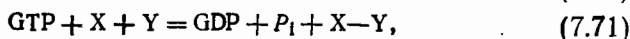
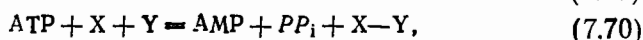
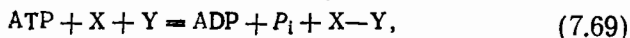
В ходе реакции, катализируемой метилмалонил-СоА-мутазой (КФ 5.4.99.2) при участии кобамидного кофермента, происходит преобразование метилмалонил-СоА в сукцинил-СоА. При этом, как показали Эггерер и др. [1209], осуществляется внутримолекулярный перенос (ранее предполагали другой механизм). В принципе возможны два варианта переноса при рассматриваемом превращении: может переноситься либо $-\text{COOH}-$, либо $-\text{CO}\cdot\text{CoA}$ -группа. Установить, какой из вариантов реализуется, позволили опыты, в которых в качестве субстрата использовался меченый по С-2 метилмалонил-СоА. Было показано, что образуется меченый по С-3 сукцинил-СоА, поэтому процесс следует рассматривать как перенос $-\text{CO}\cdot\text{CoA}$ -, а не $-\text{COOH}$ -группы:



ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ)

Механизм действия этих ферментов представляет большой интерес, во-первых, в связи с необычной природой катализируемых ими реакций, а во-вторых, вследствие той важной роли, которую играют эти реакции в биосинтезе и функционировании живых организмов. Так, биосинтез белков, в том числе ферментов, осуществляется в основном именно под действием ферментов этого класса.

В ходе типичной синтетазной реакции происходит синтез, сопряженный с распадом. Синтез представляет собой соединение двух молекул, X и Y, с образованием молекулы X—Y; одновременно происходит распад — гидролиз пирофосфатной связи в нуклеозидтрифосфате, обычно АТР, но иногда ГТР или СТР. Ни одна из этих двух реакций в отдельности не катализируется ферментом, ферментативный процесс является совокупностью реакций, которую можно записать в следующем виде:

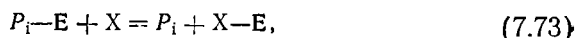
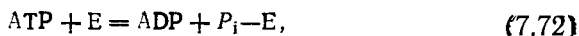


где P_i — неорганический фосфат, PP_i — пирофосфат. В ходе реакции (7.69) фермент расщепляет связь между второй и третьей фосфатными группами, в ходе реакции (7.70) — связь между второй и первой группами. Равновесие реакции $\text{X} + \text{Y} = \text{XY}$, ко-

нечно, сдвинуто влево, а реакции $ATP = ADP + P_i$ сильно сдвинуты вправо. Следовательно, если бы эти реакции не были сопряжены, то в целом система пришла бы в состояние «распада»; однако в результате сопряжения ATP расщепляется, а $X-Y$ синтезируется.

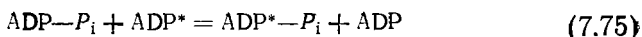
Уравнения (7.69—7.71) описывают трехсубстратные реакции, которые в принципе могут протекать по разным путям. Здесь еще остается много неясного, известно только, что механизм разных реакций различается. Реакции рассматриваемого типа могут осуществляться в результате совместного действия киназы и фосфорилазы. Например, киназа может фосфорилировать X с образованием $X-P$ и ADP , а X -трансфераза («фосфорилаза») — переносить X на Y с освобождением фосфата. В данном варианте процесс осуществлялся бы в результате действия двухферментной системы. Этот вариант, однако, для синтетаза можно исключить, поскольку многие из них выделены в настоящее время в виде индивидуальных белков, представляющих собой часто одну полипептидную цепь (некоторые из них, правда, состоят из двух или нескольких субъединиц).

Активные центры лигаз должны иметь достаточно большие размеры, поскольку они содержат специфические связывающие участки для каждого из трех субстратов, связывающихся с молекулой (или субъединицей) фермента. Имеются данные о том, что некоторые синтетазы функционируют по механизму трехстадийного переноса, который может быть представлен следующим образом:

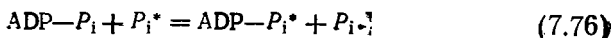


Первая стадия, как и прежде, представляет собой перенос фосфатной группы от первого субстрата, ATP , на фермент; вторая стадия состоит в переносе фермента от фосфата на X , или, другими словами, в замещении присоединенного фосфата на X , третья стадия представляет собой перенос X от фермента на Y .

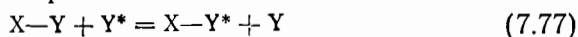
Этот механизм выведен на основании следующих наблюдений (для ясности ATP записывается как $ADP-P_i$). Фермент способен катализировать реакцию изотопного обмена



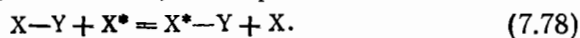
в отсутствие X , Y и $X-Y$, но не способен катализировать реакцию



Он катализирует также реакцию



в отсутствие ADP, P_i и $ADP-P_i$, но не реакцию



Реакция (7.75) может протекать в результате повторных обращений реакции (7.72), а реакция (7.77) — в результате повторных обращений реакции (7.74). Неспособность фермента катализировать реакции (7.76) и (7.78) согласуется с правилом, которое гласит, что связанная с ферментом группа не обменивается, так как она не переходит в свободное состояние. Если, однако, наряду с $ADP-P_i$ и P_i^* добавить X , то реакция (7.76) будет катализироваться, так как она теперь может идти путем повторных обращений реакций (7.72) и (7.73). Подобно этому, добавление P_i к смеси фермента, $X-Y$ и X^* обеспечивает протекание реакции (7.78), так как теперь она может осуществляться через реакции (7.73)—(7.74).

Для подтверждения приведенного механизма можно привлечь также некоторые данные по ингибированию. Так, добавление X способствует осуществлению реакции (7.76), но наряду с этим тормозит реакцию (7.75) вследствие уменьшения концентрации P_i-E . Сходным образом добавление ADP , P и Y тормозит реакции (7.78), (7.77) и (7.76) вследствие уменьшения концентраций P_i-E , $X-E$ и $X-E$ соответственно.

Этот метод позволяет довольно точно идентифицировать связываемые с ферментом группы и определять последовательность переносов. С его помощью были получены интересные данные о механизме различных синтетазных реакций, в которых роль $A-B$ играет АТФ. В различных случаях детали механизма могут быть совершенно различными. В частности, любая из двух пирогосфатных связей АТФ может быть использована как источник энергии для синтеза, так что АТФ может реагировать либо как $AMP-PP_i$, либо как $ADP-P_i$. Более того, любая часть молекулы может (по крайней мере теоретически) присоединяться к ферменту, т. е. играть роль B . Следовательно, теоретически возможны четыре различных случая, хотя образование $E-PP_i$ в качестве интермедиата не было постулировано ни в одном реальном случае; три других случая представлены в табл. 7.6 с указанием соответствующих обменных реакций и ингибиторных эффектов. Следует отметить, что только немногие из этих эффектов наблюдались для какой-либо синтетазы.

На основании опубликованных данных можно предположить, что некоторые синтетазы действительно функционируют по одному из приведенных в таблице механизмов. Следует, однако, отметить, что метод изотопного обмена крайне чувствителен к наличию примесей как в ферменте, так и в субстратах, поскольку

**Механизмы трехстадийного переноса для синтетазных реакций
и соответствующие реакции изотопного обмена**

Случай а — промежуточным продуктом служат $E-P_i$

- (7.6 а) $ADP-P_i + E = ADP + E-P_i$
 (7.6 б) $E-P_i + X = E-X + P_i$
 (7.6 в) $E-X + Y = E + X-Y$
 (7.6 г) $ADP-P_i + ADP^* = ADP^* - P_i + ADP$
 Е катализирует, X ингибирует
 (7.6 д) $ADP-P_i + P_i^* = ADP - P_i^* + P_i$
 Е+Х катализирует, Y ингибирует
 (7.6 е) $X-Y + Y^* = X - Y^* + Y$
 Е катализирует, P_i ингибирует
 (7.6 ж) $X-Y + X^* = X^* - Y + X$
 Е+ P_i катализирует, ADP ингибирует

Случай б — промежуточным продуктом служит $E-ADP$

- (7.6 з) $ADP-P_i + E = P_i + E-ADP$
 (7.6 и) $E-ADP + X = E-X + ADP$
 (7.6 к) $E-X + Y = E + X-Y$
 (7.6 л) $ADP-P_i + P_i^* = ADP - P_i^* + P_i$
 Е катализирует, X ингибирует
 (7.6 м) $ADP-P_i + ADP^* = ADP^* - P_i + ADP$
 Е+Х катализирует, Y ингибирует
 (7.6 н) $X-Y + Y^* = X - Y^* + Y$
 Е катализирует, ADP ингибирует
 (7.6 о) $X-Y + X^* = X^* - Y + X$
 Е+ADP катализирует, P_i ингибирует

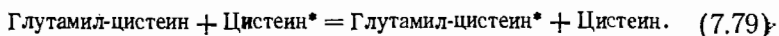
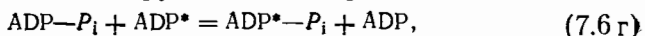
Случай в — промежуточным продуктом служит $E-AMP$

- (7.6 п) $AMP-PP_i + E = PP_i + E-AMP$
 (7.6 р) $E-AMP + X = E-X + AMP$
 (7.6 с) $E-X + Y = E + X-Y$
 (7.6 т) $AMP-PP_i + PP_i^* = AMP - PP_i^* + PP_i$
 Е катализирует, X ингибирует
 (7.6 у) $AMP-PP_i + AMP^* = AMP^* - PP_i + AMP$
 Е+Х катализирует, Y ингибирует
 (7.6 ф) $X-Y + Y^* = X - Y^* + Y$
 Е катализирует, AMP ингибирует
 (7.6 х) $X-Y + X^* = X^* - Y + X$
 Е+AMP катализирует, PP_i ингибирует

заключение о характере механизма часто зависит от того, происходит ли определенная реакция обмена в отсутствие того или иного реактанта. Иногда реакции обмена, протекающие под действием недостаточно очищенных препаратов фермента, не идут при использовании более очищенных препаратов; известны случаи, когда обмен фосфат—АТР был обусловлен присутствием следовых количеств ADP в АТР, а обмен ADP—АТР — следовых количеств фосфата.

Реакция, катализируемая γ -глутамилцистеинсинтетазой (КФ 6.3.2.2), может служить примером случая (а), хотя по этому по-

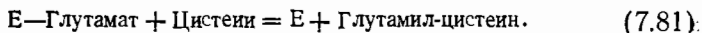
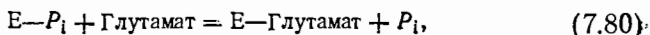
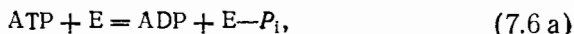
воду имеются некоторые разногласия. Было показано [5017], что этот фермент катализирует обменные реакции



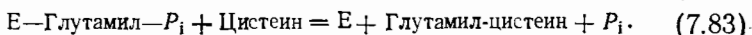
В присутствии глутамата (только при этом условии!) фермент катализирует обменную реакцию



Добавление глутамата замедляет реакцию (7.6 г), а добавление цистеина замедляет реакцию (7.6 д). Все это указывает, что механизм действия данного фермента относится к случаю (а) и может быть представлен в следующем виде:



Обменная реакция (7.6 д) показывает, что фермент соединяется с фосфатной группой АТР, а обменная реакция (7.79) — что он соединяется с глутаматом ($=X$). Тот факт, что для обменной реакции (7.6 д) необходим глутамат, показывает, что глутамат освобождает фосфатную группу из соединения с ферментом: это согласуется с уравнением (7.80) и, между прочим, свидетельствует о том, что $\text{Е} - P_i$ представляет собой весьма прочное соединение, которое спонтанно не гидролизуется. Ингибирующее влияние, которое глутамат оказывает на реакцию (7.6 г) и на включение АДР^* в АТР, объясняется уменьшением концентрации $\text{Е} - P_i$ и, следовательно, замедлением реакции, обратной реакции (7.6 а); присутствие цистеина ($=Y$), уменьшая концентрацию комплекса $\text{Е} - \text{глутамат}$, замедляет реакцию, обратную (7.80), и, следовательно, также реакцию (7.6 д). Все это позволяет предполагать, что рассматриваемая система функционирует по механизму трехстадийного переноса типа (а); с другой стороны, Струмейер и Блок [4545] установили, что добавление глутамата не приводит к освобождению фосфата, пока не добавлен также цистеин. Это указывает на образование в качестве интермедиата глутамилфосфата и на вытеснение из него фосфата цистеином; поэтому реакции (7.80) и (7.81) следует заметить на (7.82) и (7.83):

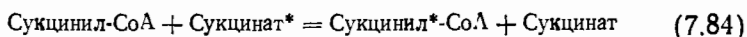


Процесс остается трехстадийным переносом (перенос фосфата от АТР на фермент, затем от фермента на связанный глутамат и далее перенос глутамата от фосфата на цистеин), однако

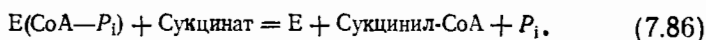
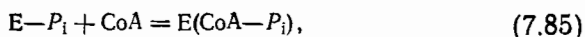
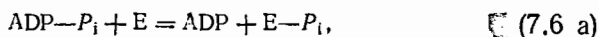
в рассматриваемом случае образуется тройной комплекс, содержащий фермент, глутамат и фосфат.

Было высказано предположение, что подобным же образом функционирует и глутатионсинтетаза (КФ 6.3.2.3); поскольку, однако, не удалось обнаружить фосфорилирования фермента [3230] и было установлено участие в процессе низкомолекулярной РНК [318], механизм процесса должен быть другим.

Высказывалось также предположение, что механизм действия сукцинил-СоА — синтетазы (образующей ADP) из растений (КФ 6.2.1.5) очень близок к приведенному выше механизму действия глутамилцистеинсинтетазы, если в реакциях (7.82) и (7.83) заменить глутамат на СоА, а цистеин — на сукцинат. Реакция обмена

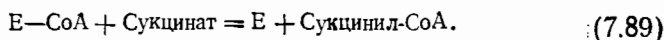
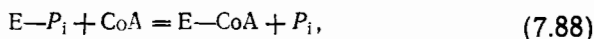
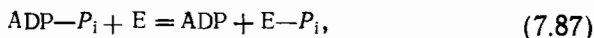


катализируется ферментом только в присутствии фосфата, что позволяет высказать предположение о наличии механизма типа (а) с сукцинатом в качестве X. Однако было обнаружено, что обменная реакция (7.6д), которая должна была бы катализироваться ферментом в присутствии сукцината, требует также кофермента А. Для объяснения этой ситуации Кауфман [2354] предложил следующий механизм:



Альтернативные возможности — образование в качестве интермедиатов сукцинилфосфата или СоА-фосфата — были исключены.

Однако недавно Мойер и др. [3285, 3811], используя высокоочищенный фермент из *E. coli*, получили результаты, которые не согласуются с приведенным выше механизмом и указывают на наличие следующих стадий:

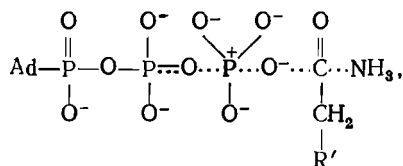


В пользу приведенной схемы, но не схемы Кауфмана, свидетельствуют следующие данные. (а) Обменная реакция (7.84) в отличие от данных Кауфмана не зависит от фосфата. Это показывает, что на третьей стадии не происходит освобождения фосфата. (б) Реакция обмена $\text{ADP} - P_i + P_i^* = \text{ADP} - P_i^* + P_i$ не за-

висит от сукцината, это означает, что свободный фосфат освобождается из АТФ в результате протекания первых двух реакций. (в) Был выделен (в небольшом количестве) макроэргический интермедиат; показано, что он имеет структуру $E-CoA$, т. е. является продуктом соединения фермента с CoA , не содержащим сукцината, фосфата и ADP ; молекула CoA связана с гистидиновым остатком фермента. Показано также, что макроэргический интермедиат реагирует с фосфатом, образуя $E-P_i$ [реакция (7.88)], и с фосфатом плюс ADP , образуя ATP [реакции (7.88) и (7.87)]. Эти результаты однозначно показывают, что фермент относится к типу (а) в табл. 7.6, где X — это CoA , а Y — сукцинат.

В системах, приведенных в табл. 7.6, в качестве интермедиатов выступают двойные комплексы, т. е. в каждый данный момент времени фермент связывает только один реактант. Можно, однако, предположить, что синтетазные реакции протекают с участием тройных или даже четверных комплексов; в частности, выше уже отмечалось, что по механизму подобного типа, вероятно, функционирует глутамилцистеинсинтетаза.

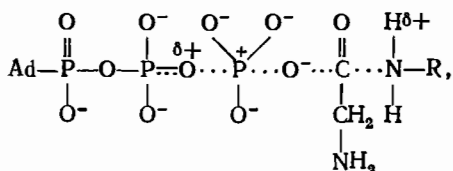
Глутаминсинтетаза (КФ 6.3.1.2) катализирует образование глутамина из глутамата и аммиака, сопряженное с расщеплением ATP до ADP и фосфата. В присутствии ATP , глутамата и Mg , но в отсутствие аммиака фермент образует комплекс, содержащий глутамат, ADP и фосфат; в присутствии аммиака из этого комплекса образуются глутамин, ADP , фосфат и освобождается свободный фермент. Для связывания ферментом глутамата необходим ATP , а в случае обратной реакции для связывания глутамина необходим ADP [2608]. При использовании глутамата, меченного ^{18}O по карбоксильной группе, наблюдается включение ^{18}O в образующийся фосфат [514], что указывает на образование в качестве интермедиата глутамилфосфата. Отсюда следует, что в ходе реакции происходит образование четверного комплекса



где R' — боковая группа глутамата.

Интересно сопоставить эти представления с теми, которые Хартман и Буханан [1807] предложили для фосфорибозилглицинамид—синтетазы (КФ 6.3.4.13). Собственно синтетазная стадия осуществляется в пределах четверного комплекса, содержащего все субстраты и фермент. Реакция, рассматриваемая

как сочетанная атака, может быть представлена следующим образом:

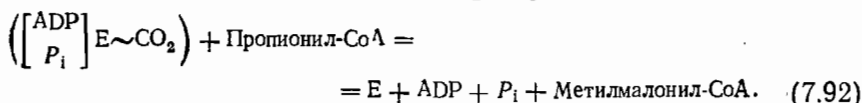
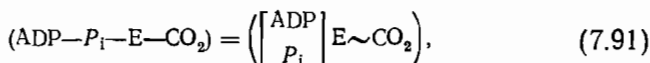
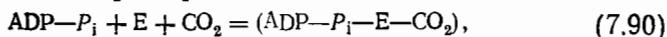


где Ad — аденозин, R — фосфорибозильная группа. Электрофильная атака карбоксильной группы фосфатом АТР облегчает нуклеофильную атаку, осуществляемую аминогруппой фосфорибозиламина, что приводит к линейному смещению электронов с образованием связи CO—NH и одновременным расщеплением связи ADP—P_i. Хартман и Буханан предполагают, что этот механизм может быть весьма распространенным; Линен и др. [2900] рассмотрели под этим углом зрения действие метилкротонил-СоА—карбоксилазы (КФ 6.4.1.4). В этом случае роль R.NH₂ в приведенной выше схеме может, очевидно, играть связанный с ферментом биотин.

В связи с изучением глутаминсинтетазы из мозга особый интерес представляет новый метод, предложенный Гассом и Майстером [1503]; в отсутствие рентгеноструктурных данных о строении активного центра этот метод позволяет, говоря словами авторов, «описать активный центр математически». С помощью ЭВМ, используя специальную программу, они проанализировали большое число данных по стереоспецифичности, проявляемой ферментом по отношению ко многим субстратам, аналогам субстратов и ингибиторам, с учетом известных данных о размерах и конфигурации соответствующих молекул. В результате авторы смогли охарактеризовать относительные положения и ориентацию субстратов в активном комплексе и групп фермента, взаимодействующих с ними. Они приводят много стереодиаграмм, которые позволяют понять ряд свойств фермента и механизм реакции. Глутамат удерживается в активном центре в вытянутой конфигурации в результате взаимодействия групп фермента с α- и γ-COOH- и α-NH₂-группами субстрата; α-водородный атом глутамата направлен в сторону окружающего раствора. В активном центре имеется особый (по-видимому, гидрофобный) связывающий участок для незаряженного NH₃, последний локализован около γ-COOH-группы и концевого фосфата АТР. Этот фосфат удерживается между ADP и γ-COOH-группой; его не удастся «вписать» в исходную комбинацию компонентов, но он очень хорошо «вписывается» в структуру промежуточного активированного состояния. Результаты анализа позволяют высказать предположения о скорости реакции и согласуются с гипотезой об образовании четверного комплекса.

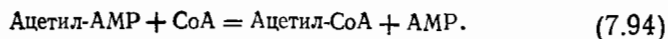
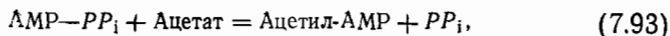
Для установления природы групп активного центра, связывающих субстрат, необходима информация об аминокислотной последовательности пептидной цепи и ее укладке.

Промежуточные комплексы, включающие все реактанты, образуются также в тех случаях, когда фермент содержит простетическую группу, которая связывает один из реактантов (например, биотин у карбоксилаз подгруппы КФ 6.4.; см. также с. 716). Два таких фермента были детально изучены Линеном [2900] и Очоа и др. [2368]. В этих работах в отличие от прежних данных показано, что обменные реакции фосфат—АТР и АДФ—АТР зависят от присутствия всех реактантов, за исключением конечного акцептора карбоксила. Для пропионил-СоА—карбоксилазы (АТР-гидролизующей) (КФ 6.4.1.3) предложен следующий механизм [2368]:



Здесь E — биотинсодержащий фермент, $E \sim \text{CO}_2$ — фермент, содержащий карбоксибиотин. Стадия (7.91), на которой происходит расщепление АТР с одновременной энергизацией соединения фермент— CO_2 , является самой важной в синтетазной реакции.

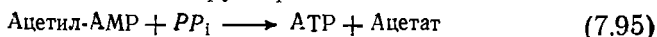
Рассматривая синтетазы, которые катализируют образование АМР и пирогосфата, а не АДФ и фосфата, отметим, что наиболее существенным отличием их от рассматриваемых выше синтетаз является то, что для образования богатого энергией производного субстрата они используют «другой конец АТР». Синтетазы, расщепляющие АТР до АДФ и фосфата, присоединяют фосфатную группу к одному из субстратов и, если можно так сказать, «выбрасывают» АДФ при образовании богатого энергией фосфорильного соединения. В данном же случае при образовании богатого энергией производного к субстрату присоединяется АМР, а «выбрасывается» пирогосфат. Механизм, предложенный впервые Бергом [366, 367] для ацетил-СоА—синтетазы (КФ 6.2.1.1), включает образование в качестве интермедиата соединения ацил-АМР:



Такой механизм согласуется, во-первых, с тем, что и ацетат, и СоА необходимы для осуществления обмена АМР—АТР, и,

во-вторых, с тем, что для реакции обмена ацетат — ацетил-СоА необходимы АМР и пирогосфат. Ни одним из механизмов, приведенных в табл. 7.6, эти факты объяснить нельзя.

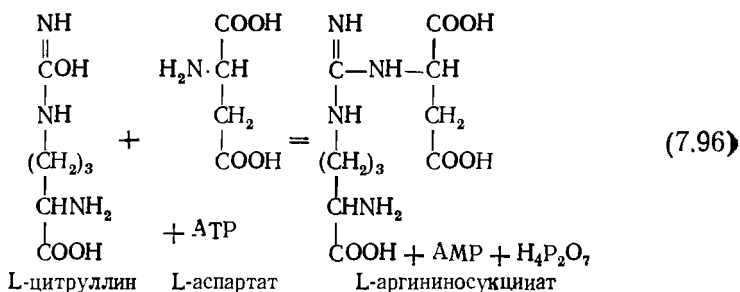
Ацетил-АМР получен химическим путем и показано, что ацетил-СоА — синтетаз катализирует реакцию



приблизительно с такой же скоростью, как и обмен PP_1 —АТР в присутствии ацетата. Фермент катализирует также образование ацетил-СоА из ацетил-АМР.

Следует отметить еще одно отличие рассматриваемых реакций от реакций, в ходе которых образуется АТР, а именно: АТР реагирует непосредственно с субстратом, а не путем двухстадийного переноса с участием определенной группы фермента.

Аргининосукцинат-синтетаз (КФ 6.3.4.5) катализирует реакцию, которая (принимая во внимание, что ферменты часто «не различают» =O- и =NH- группы) весьма сходна с реакцией образования пептидной связи.



Механизм этой реакции, предложенный Греем [1637], приведен на рис. 7.18.

Хотя некоторые из синтетаз группы КФ 6.3.2 синтезируют из аминокислот пептиды (примерами такого рода могут служить рассмотренные выше глутамилцистеинсинтетаз и глутатионсинтетаз), синтез пептидной цепи со специфической последовательностью (как это происходит при биосинтезе ферментов и других белков) осуществляется совершенно другим образом. Участвующая в этом процессе сложная система описана в гл. 11. Для ее действия абсолютно необходим набор специальных синтетаз, входящих в группу КФ 6.1.1.; механизм действия этих синтетаз рассмотрен в гл. 11.

Каждой из аминокислот соответствует собственный фермент из этой группы, который высокоспецифичен по отношению к ней; функция каждого из ферментов заключается в присоединении именно «своей» аминокислоты к той транспортной РНК (тРНК), которая содержит антикодон, соответствующий кодону данной аминокислоты. Это приводит к синтезу такой белко-

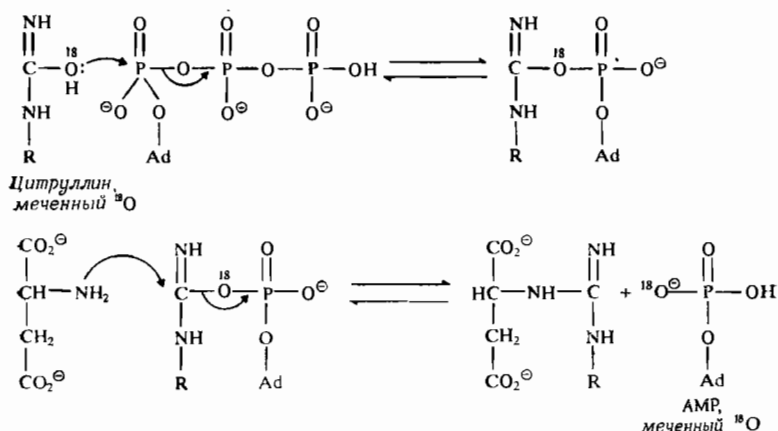


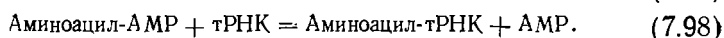
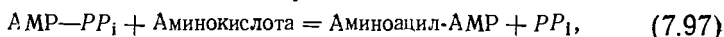
Рис. 7.18. Механизм реакции, катализируемой аргининосукцинат-синтетазой, иллюстрирующий судьбу метки ^{18}O .

вой цепи, аминокислотная последовательность которой определяется последовательностью кодонов в молекуле нуклеиновой кислоты. Поскольку этот процесс является основой механизма жизнедеятельности, роль рассматриваемой группы синтетаз чрезвычайно велика. Следует подчеркнуть, что эти ферменты не участвуют непосредственно в образовании пептидных связей белка, их функция заключается в том, чтобы присоединять использующиеся при синтезе белка аминокислоты только к специфическим для них тРНК.

Молекулярная структура этих ферментов обеспечивает реализацию генетического кода. В активном центре каждого фермента имеются три связывающих участка; один из них специфически взаимодействует с молекулой определенной аминокислоты, другой — с АТР, а третий — с соответствующей тРНК, к которой проявляется очень высокая специфичность. тРНК является относительно крупным субстратом (по размеру она соответствует половине молекулы фермента или субъединицы). Молекулы разных тРНК имеют практически одинаковую форму, но различаются по своей химической структуре (см. рис. 11.5), к которой (или по крайней мере к части которой) ферменты и проявляют специфичность; очевидно также, что специфически связывается с ферментом не та часть молекулы тРНК, в которой находится кодон. По-видимому, нет особых химических предпосылок, объясняющих, почему данный кодон соответствует определенной аминокислоте или почему данная синтетаза должна быть специфичной к тРНК, несущей определенный кодон. Функционирование всей системы биосинтеза белка обеспечивается просто тем, что молекулярная структура каждой из синтетаз

специфична, с одной стороны, к определенной аминокислоте, а с другой — к структуре тРНК, в которой находится соответствующий кодон.

Механизм действия синтетаз этой группы до конца не ясен и, вероятно, он не вполне одинаков у разных ферментов. Действительно, нет оснований полагать, что все они функционируют совершенно одинаково. В то же время имеются многочисленные данные, свидетельствующие о том, что механизм их действия можно представить в виде следующей общей схемы:



Более подробно этот вопрос рассматривается в гл. 11.

Весьма интересно, что очень высокая специфичность реакций, катализируемых рассматриваемыми ферментами, обусловлена не только специфичностью связывающих участков к аминокислоте и тРНК, но также и процессом переноса на тРНК. Например, изолейцил-тРНК—синтаза *E. coli* (КФ. 6.1.1.5) не вполне специфична на стадии связывания: она может связывать либо изолейцин, либо валин на одном участке и либо нормальную, либо несколько модифицированную лейциновую тРНК на другом. Фермент катализирует образование как изолейцил-АМР, так и валил-АМР, так что первая стадия процесса не является специфичной. При взаимодействии изолейциновой тРНК с изолейцил-АМР образуется изолейцил-тРНК, если же изолейциновую тРНК инкубировать с валил-АМР, то образуются валин и АМР; происходит, следовательно, гидролиз валил-АМР и предотвращается «ошибка» в синтезе белка. Гидролиз не осуществляется в отсутствие изолейциновой тРНК. Более того, для гидролиза необходимо, чтобы тРНК была «правильной» для данного фермента; так, хотя модифицированная тРНК связывается с ферментом, она не катализирует гидролиз валил-АМР и не акцептирует изолейцин от изолейцил-АМР. Благодаря рассмотренным выше особенностям системы обеспечивается ее специфичность (см. [257]).

Глава 8

Ингибирование и активация ферментов

А. ИНГИБИТОРЫ

Отравление какого-либо фермента, участвующего в важном метаболическом процессе, приостанавливает весь процесс и оказывает глубокое, а иногда и летальное действие на организм. Подобную инактивацию какого-нибудь определенного ключевого фермента Петерс [1511] назвал биохимическим повреждением. В качестве наглядного примера фатальных последствий, к которым может привести специфическое отравление определенного фермента, сошлемся на токсическое действие цианида, проявляющееся в подавлении активности цитохромоксидазы; это влечет за собой остановку аэробных окислительных процессов, в результате чего через несколько минут наступает смерть организма.

Более глубокое исследование таких явлений способствовало тому, что учение об ингибиторах ферментов из второстепенного раздела кинетики ферментов превратилось в важную отрасль знания, имеющую фундаментальное значение для фармакологии и токсикологии. Оно находит непосредственное практическое применение, в том числе и в военном деле; «нервные газы», например, представляют собой по существу специфические ингибиторы ферментов. В последнее время в качестве инсектицидов все чаще используются соединения, родственные ингибиторам ферментов, и это послужило основой для создания крупной, усиленно развивающейся отрасли промышленности. Изучение действия токсических веществ *in vitro* с целью выяснить, не являются ли эти вещества ингибиторами ферментов, оказывается полезным при разработке противоядий к определенным ядовитым веществам. И хотя вся эта область исследования сравнительно молодая и до сих пор лишь для относительно небольшого числа ядов удалось показать, что они подавляют активность определенных ферментов, тем не менее имеющиеся сведения дают основания надеяться, что со временем на этом пути будут получены интересные результаты.

Однако даже в тех случаях, когда действие лекарственного препарата или токсического вещества можно с уверенностью связать с его влиянием на определенный фермент, не всегда легко выяснить, как именно возникают те или иные физиологи-

ческие изменения; неизвестно, например, почему вещества, отравляющие тиоловые ферменты, вызывают возникновение серии электрических импульсов в нервных волокнах роговицы, приводящее к слезотечению. Подобный пробел в наших знаниях там, где речь идет о связи между первичным биохимическим механизмом и конечным физиологическим эффектом, не представляет собой чего-либо исключительного; так же обстоит, например, дело и с учением об авитаминозах, хотя биохимическая роль витаминов известна.

В чисто академическом плане специфические ингибиторы ферментов часто находят «практическое» применение как орудие исследования. Например, многие из промежуточных продуктов гликолиза и дрожжевого брожения были открыты главным образом благодаря использованию ингибиторов, блокирующих последовательные стадии процесса, так как в результате такого блокирования соответствующие промежуточные продукты накапливаются в количествах, достаточных для их выделения и идентификации. Использование малоната—конкурентного ингибитора сукцинатдегидрогеназы—позволило обнаружить существование цикла лимонной кислоты.

ТИПЫ ОБРАТИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ

Простое необратимое разрушение фермента, например денатурация под влиянием тепла, сильной кислоты или какого-либо иного воздействия, обычно не рассматривается как ингибирование. Ингибиторы в обычном смысле, т. е. вещества, действующие определенным химическим путем, могут по характеру своего действия (обратимое или необратимое ингибирование) подразделяться на так называемые обратимые и необратимые. Слово «обратимые» употреблялось, однако, в литературе в двух различных значениях. Мы будем подразумевать под ним, что активность фермента восстанавливается при простом удалении свободного ингибитора диализом или каким-либо иным способом. Такое восстановление активности указывает на существование равновесия между свободным ингибитором и ферментом. В противоположность этому при действии необратимых ингибиторов равновесие не устанавливается и активность фермента не удается восстановить диализом. Термин «обратимые» применяется, однако, также и в другом смысле — в тех случаях, когда ингибирующую группу, присоединившуюся к ферменту и не диссоциирующую спонтанно, можно удалить путем какой-либо химической реакции. «Необратимость» в этом смысле означает, что все попытки удалить ингибирующую группу химическими средствами остались безуспешными, хотя этим и не исключается возможность того, что ингибирование окажется «обратимым», когда соответствующее средство будет, наконец, найдено. Для

подобных случаев, т. е. для удаления ингибирующей группы в результате химической реакции, мы будем употреблять термин «реактивация», а не «обращение».

Обратимое ингибирование характеризуется равновесием между ферментом и ингибитором, причем константа равновесия служит мерой их сродства. Эффективность действия ингибитора обычно выражают этой константой K_i , которая есть величина, обратная сродству фермента и ингибитора. В системе подобного типа степень ингибирования зависит от концентрации ингибитора. Эта характерная для данной системы степень ингибирования обычно достигается довольно быстро, после чего она уже не зависит от времени, при условии, что ингибитор стабилен.

Необратимое ингибирование, напротив, непрерывно усиливается со временем, так что в конце концов наступает полное ингибирование даже при очень низкой концентрации ингибитора, если только ингибитор присутствует в избытке по сравнению с ферментом. Эффективность действия ингибитора в этом случае выражается не константой равновесия, а константой скорости, которая определяет долю фермента, подвергшегося ингибированию за данный период времени при определенной концентрации ингибитора [75].

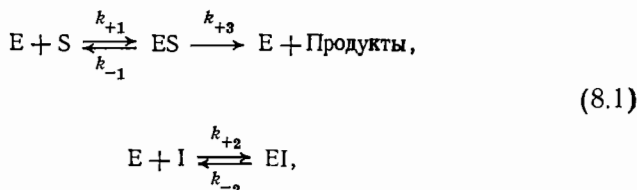
Примером необратимого ингибирования может служить действие цианида на ксантиноксидазу (КФ 1.2.3.2) и действие «нервных газов» на холинэстеразы (КФ 3.1.1.7—3.1.1.8). Что касается обратимого ингибирования, то примеры его весьма многочисленны; среди прочих можно назвать действие цианида на цитохромоксидазу (КФ 1.9.3.1) и малоната на сукцинатдегидрогеназу (КФ 1.3.99.1). Мы будем рассматривать главным образом случаи обратимого ингибирования.

Подобно другим факторам, влияющим на скорость ферментативных реакций, ингибиторы, вызывающие обратимое ингибирование, могут действовать либо на кажущуюся K_m , либо на V , либо на обе константы. Ингибиторы, действие которых проявляется в увеличении эффективной K_m , принято называть конкурентными, ингибиторы, не оказывающие влияния на K_m , а просто уменьшающие V , называют неконкурентными (noncompetitive). Ингибиторы, которые изменяют обе величины, K_m и V , подразделяют в свою очередь на два класса, называемые смешанными и бесконкурентными (uncompetitive) ингибиторами (см. табл. 4.4). Каждый из классов будет рассмотрен ниже более подробно на примере простой односубстратной реакции (см. гл. 4).

Конкурентное ингибирование

Тип 1а: полное конкурентное ингибирование. Как отмечалось выше, действие конкурентных ингибиторов проявляется в увеличении кажущейся K_m реакции. Наиболее простой случай кон-

курентного ингибирования можно представить в виде следующей схемы:



где константа диссоциации комплекса фермент—ингибитор (k_{-2}/k_{+2}) называется *ингибиторной константой* (K_i).

Из этой схемы видно, что степень ингибирования зависит от относительных количеств ингибитора и субстрата. Если при постоянной концентрации ингибитора ввести в систему достаточное количество субстрата, то можно вытеснить весь ингибитор из комплекса с ферментом в результате образования фермент-субстратного комплекса. Следовательно, V (активность в условиях, при которых весь фермент находится в составе комплекса ES) не будет изменяться в присутствии ингибитора. Поскольку, однако, равновесие в системе фермент—ингибитор смещается, для достижения V , а следовательно, также и $1/2 V$ следует создать в системе большую концентрацию субстрата; другими словами, кажущаяся K_M в присутствии конкурентного ингибитора увеличивается.

Это обстоятельство можно представить математически, выведя уравнение скорости для механизма (8.1) в стационарных условиях. Пусть x —концентрация ES , y —концентрация EI , e —полная концентрация фермента, а s и i —концентрации субстрата и ингибитора соответственно. Тогда

$$k_{+1}s(e - x - y) = (k_{-1} + k_{+3})x, \tag{8.2}$$

$$k_{+2}i(e - x - y) = k_{-2}y, \tag{8.3}$$

$$v = k_{+3}x. \tag{8.4}$$

Отсюда

$$v = \frac{k_{+3}e}{1 + \frac{k_{-1} + k_{+3}}{k_{+1}s} \left(1 + \frac{k_{+2}i}{k_{-2}} \right)}. \tag{8.5}$$

Заменяя $(k_{-1} + k_{+3})/k_{+1}$ на K_M и k_{-2}/k_{+2} на K_i , находим, что

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s} \left(1 + \frac{i}{K_i} \right)}. \tag{8.6}$$

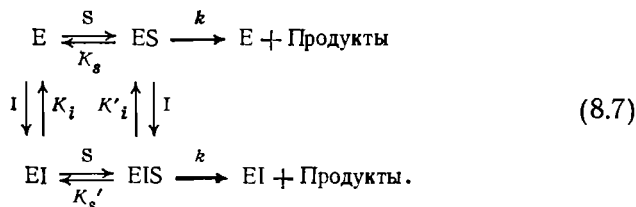
Если рассматривать систему (8.1) в равновесных условиях, результирующее уравнение скорости будет аналогично (8.6), но вместо K_M будет стоять K_s (т. е. k_{-1}/k_{+1}). Конкурентный ингибитор вызывает, следовательно, кажущееся увеличение K_M в $(1 + i/K_i)$ раз, не влияя на V .

«Конкурентный» тип ингибирования может наблюдаться иногда и при действии необратимых ингибиторов, если субстрат способен частично предохранять фермент от действия ингибитора, уменьшая константу скорости ингибирования. Однако обратимо связывающийся субстрат никогда не сможет предотвратить полного ингибирования, наступающего в конце концов при действии необратимого ингибитора, так как в равновесии всегда должно оставаться небольшое количество *свободного* фермента и этот свободный фермент будет подвергаться необратимой атаке со стороны ингибитора. Кроме того, если уж такое ингибирование произошло, оно не может быть обращено в результате добавления субстрата. Подобный «конкурентный» эффект наблюдается в том случае, когда ингибитор соединяется с субстратсвязывающим участком в активном центре, и, следовательно, этот эффект обусловлен в основном той же причиной, что и обратимое конкурентное ингибирование.

За исключением отмеченного выше случая, при рассмотрении конкурентного ингибирования предполагается, что ингибитор связывается с тем же самым центром фермента, что и субстрат. Другой возможный путь конкурентного ингибирования был рассмотрен в работе Моно, Шанжё и Жакоба [3214]; эти авторы отмечают, что в том случае, когда субстрат и ингибитор, связываясь с разными участками фермента, вызывают в последнем такие конформационные изменения, в результате которых связывание ингибитора препятствует связыванию субстрата, и наоборот, связывание субстрата препятствует связыванию ингибитора, будет наблюдаться конкурентное ингибирование. Поскольку в механизме Моно, Шанжё и Жакоба ингибитор не обязательно должен быть похож на субстрат, стали называть такой ингибитор *аллостерическим* (от греч. «другой формы»), чтобы отличить его от классических конкурентных ингибиторов, которые обычно сходны с субстратом и являются, следовательно, *изостерическими*. Как будет, однако, видно ниже, в понятие «аллостерический» вкладывается более широкий смысл.

Тип 1б: частичное конкурентное ингибирование. В разд. 1а предполагалось, что EI не претерпевает дальнейших превращений и что комплекс EIS образоваться не может. При частичном конкурентном ингибировании ингибитор только уменьшает сродство фермента к субстрату, но не предотвращает полностью свя-

зывание субстрата. Этот случай схематически представлен ниже.



Предполагается, что ингибирование влияет только на сродство фермента к субстрату, так что комплексы ES и EIS распадаются с одинаковой скоростью; следовательно, распад обоих комплексов характеризует одна и та же константа скорости k , и полная скорость равна сумме скоростей этих двух реакций. Если бы это было не так, то следовало бы признать, что ингибитор действует двумя путями, т. е. влияет как на V , так и на K_m .

Обозначив константы равновесия реакций (8.7) через K_s , K_i , K'_s и K'_i соответственно, а концентрации ES, EI и EIS — через x , y и z , получаем уравнения

$$(e - x - y - z)s = K_s x, \quad (8.8)$$

$$(e - x - y - z)i = K_i y, \quad (8.9)$$

$$ys = K'_s z, \quad (8.10)$$

$$xi = K'_i z, \quad (8.11)$$

$$v = k(x + z). \quad (8.12)$$

Решая эти уравнения относительно v , имеем

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s}{s} \cdot \frac{\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{i}{K_i} \cdot \frac{K_s}{K'_s}\right)}} \quad (8.13)$$

Если $i=0$, то эти уравнения упрощаются до обычных уравнений Михаэлиса (4.11) и (4.22). Если же i очень велико, то уравнение (8.13) сводится к

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K'_s}{s}}. \quad (8.14)$$

Другими словами, в результате действия ингибитора образуется новый фермент EI, характеризующийся иным сродством к субстрату, а именно $1/K'_s$. Эта система совершенно неотличима от системы с полным конкурентным ингибированием 1а при графическом изображении по методу Лайнуивера — Бэрка (см.

с. 503), если изменять концентрацию субстрата, сохраняя концентрацию ингибитора постоянной.

Однако такое разграничение можно провести, если изменять концентрацию ингибитора и сохранять неизменной концентрацию субстрата, ибо в этом случае ингибирование не увеличивается неограниченно с увеличением концентрации ингибитора, как это характерно для систем типа 1а, а возрастает лишь до определенного предела — до того момента, как весь фермент окажется связанным с ингибитором. Те же соображения применимы к кажущейся константе Михаэлиса.

Следует отметить, что в данном случае с помощью простых графических методов невозможно определить K_i . Это объясняется отчасти тем, что при изменении концентрации субстрата эффективное сродство фермента к ингибитору изменяется от $1/K_i$ до $1/K'_i$. Связывание фермента с субстратом должно влиять на сродство фермента к ингибитору в такой же мере, как связывание фермента с ингибитором влияет на сродство фермента к субстрату, так как из определений констант равновесия следует, что

$$\frac{K_i}{K'_i} = \frac{K_s}{K'_s}. \quad (8.15)$$

Кроме того, зависимость $1/v$ от i для данного случая не является линейной в отличие от того, что имеет место при полном конкурентном или неконкурентном ингибировании.

Поскольку имеет место соотношение (8.15), результирующее уравнение будет содержать только три константы равновесия из четырех, представленных на схеме (8.7); поэтому уравнение (8.13) может быть записано в виде

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s}{s} \frac{(1 + i/K_i)}{(1 + i/K'_i)}}. \quad (8.16)$$

Очевидно, что при $K_i = K'_i$ и, следовательно, при $K_s = K'_s$ [см. соотношение (8.15)] ингибирование будет отсутствовать.

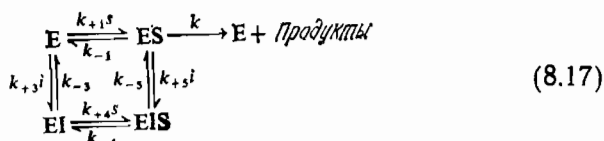
Как и в случае неконкурентного ингибирования (с. 489), анализ системы (8.7) в стационарных условиях приводит к уравнению скорости, которое содержит концентрации ингибитора и субстрата во второй степени, и, следовательно, к нелинейному графику в двойных обратных координатах.

Неконкурентное ингибирование

Неконкурентные ингибиторы не влияют на связывание субстрата с ферментом, а изменяют только V . В таком случае имеются две возможности: либо комплекс EIS совсем не распадается (тип IIa) и скорость реакции целиком определяется

распадом ES (влияние ингибитора эквивалентно влиянию уменьшения количества активного фермента), либо комплекс EIS распадается со скоростью, отличной от скорости распада комплекса ES (типа IIб), и полная скорость равна сумме скоростей обеих этих реакций.

Тип IIа: полное неконкурентное ингибирование. Эта система может быть представлена схематически в следующем виде:



Если система функционирует в равновесных условиях, то следует оперировать только двумя константами диссоциации, поскольку по определению связывание фермента либо с S, либо с I не влияет на его сродство к другому реагенту. Следовательно,

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{k_{-4}}{k_{+4}},$$

$$K_i = \frac{k_{-3}}{k_{+3}} = \frac{k_{-5}}{k_{+5}}.$$

Таким образом,

$$(e - x - y - z)s = K_s x, \quad (8.18)$$

$$(e - x - y - z)i = K_i y, \quad (8.19)$$

$$ys = K_s z, \quad (8.20)$$

$$xi = K_i z, \quad (8.21)$$

$$v = kx. \quad (8.22)$$

Из этих уравнений находим

$$v = \frac{\frac{ke}{1 + \frac{i}{K_i}}}{1 + \frac{K_s}{s}}. \quad (8.23)$$

Следовательно, в присутствии ингибитора величина V уменьшается в $(1 + i/K_i)$ раз, а K_s остается неизменной. Если величина i становится бесконечно большой, то V стремится к нулю; таким образом, нельзя устранить действие неконкурентного ингибитора путем увеличения концентрации субстрата. Если в ходе исследования необратимых ингибиторов зависимость скорос-

ти от концентрации субстрата при различных концентрациях ингибитора анализируют с помощью графиков двойных обратных величин, то нередко наблюдается кажущееся неконкурентное ингибирование. Это обусловлено тем, что результат любого воздействия, который уменьшает только количество активного фермента в растворе, состоит в уменьшении кажущейся величины V , константа же K_M при этом не изменяется. Можно привести множество примеров подобного анализа данных по необратимому ингибированию, однако этот подход является необоснованным, и рассчитанные величины « K_i » оказываются лишены смысла.

Анализ системы (8.17) в стационарных условиях приводит к уравнению следующего вида [501, 1872]:

$$v = \frac{(C_1s + C_2s^2 + C_3si)e}{C_4 + C_5s + C_6i + C_7i^2 + C_8si + C_9s^2 + C_{10}si^2 + C_{11}s^2i} \quad (8.24)$$

Оно сходно с уравнением для двухсубстратной реакции, протекающей по неупорядоченному механизму в стационарных условиях (гл. 4); $C_1, \dots, C_{11}$ — сложные комбинации констант скорости.

Поскольку в выражении имеются члены, содержащие концентрации субстрата и ингибитора во второй степени, можно ожидать, что графики двойных обратных величин будут нелинейными. Поскольку относительная значимость квадратичных членов зависит от отношений различных констант скорости, при некоторых условиях вклад этих членов становится незначительным и уравнение (8.24) упрощается до уравнения вида (8.23). Несколько таких случаев были детально проанализированы в работах [501, 1420, 1872].

При постоянной концентрации I уравнение (8.24) может быть представлено в виде

$$v = \frac{as^2 + bs}{us^2 + vs + w}, \quad (8.25)$$

где a, b, u, v и w — сложные константы, зависящие от i .

Уравнение вида (8.25) приводит к нелинейным графикам двойных обратных величин, т. е. зависимость v от s не является гиперболической. Типы кривых, которые получаются для уравнений такого вида, были рассмотрены в работе [1872]. Фриден [1420] отметил, что при постоянных и относительно больших i и при достаточно малых s члены уравнения (8.24), содержащие s^2 , становятся пренебрежимо малыми и график двойных обратных величин, построенный в координатах $\left\{ \frac{1}{a}; \frac{1}{v} \right\}$, оказывается линейным.

Другой возможный механизм неконкурентного ингибирования был рассмотрен Уэсли [5057]. Он основан на предположении, что у некоторых олигомерных ферментов в каждый данный момент времени каталитически активной является только часть центров (см. с. 589—591). Если между олигомерным и мономерным состояниями фермента устанавливается равновесие, причем каждый мономер является активным, а в олигомере активностью обладает только часть субъединиц, то любое соединение, которое вызывает ассоциацию, будет влиять на V , но не на K_M , и, следовательно, будет действовать как неконкурентный ингибитор. Однако механизм ингибирования такого типа пока не обнаружен ни для одного фермента.

Тип IIб: частичное неконкурентное ингибирование. При данном типе ингибирования комплекс EIS в системе (8.17) может распадаться с образованием продуктов. Константа скорости этого процесса равна k' , и вместо уравнения (8.22) в таком случае имеем

$$v = kx + k'z. \quad (8.26)$$

В равновесных условиях уравнение скорости будет иметь вид

$$v = \frac{ke + k' \frac{i}{K_i} e}{1 + \frac{i}{K_i} + \frac{K_s}{1 + \frac{i}{K_i}}}, \quad (8.27)$$

или в относительных величинах

$$\varphi = \frac{\sigma + R\omega}{(1 + \sigma)(1 + \omega)}, \quad (8.28)$$

где $R = k'/k$. При избытке субстрата скорость будет равна ke в отсутствие ингибитора, а при избытке ингибитора — $k'e$; таким образом, скорость уменьшается не до нуля, а до определенного предела. Если k' равно нулю, уравнение (8.27) упрощается до (8.23); если $k' > k$, то I является активатором фермента.

Уравнение (8.27) можно записать в виде

$$v = \frac{ke}{\left(1 + \frac{K_s}{s}\right) \frac{\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{i}{K_i} \cdot \frac{k'}{k}\right)}}. \quad (8.29)$$

Сравнивая это уравнение с (8.13), следует отметить, что в оба уравнения входит одна и та же функция i , но отношение величин сродства субстрата к E и EI в (8.13) заменено в (8.29) от-

ношением «активностей» E и EI ; в последнем случае ингибитор влияет не на K_s , а на V . Как и раньше, определить K_i обычными методами весьма трудно; в частности, методы построения графиков зависимости $\frac{1}{v}$ от i (с. 504) здесь оказываются непри-

менимыми, поскольку график зависимости $\frac{1}{v}$ от i не является линейным: он представляет собой кривую с насыщением. Графики зависимости длин отрезков, отсекаемых графиками двойных обратных величин, от i также являются кривыми с насыщением. Если, однако, K'_s или k' (как это бывает в некоторых случаях) определены независимым путем по данным измерений кажущегося сродства или максимальной скорости в присутствии избытка ингибитора, то K_i можно определить с помощью подхода, рассмотренного на с. 508.

Как и в случае ингибирования типов 1б и 1а, уравнение скорости для рассматриваемого типа ингибирования в стационарных условиях является очень сложным; графики двойных обратных величин могут быть линейными только при некоторых особых условиях [501, 1420, 1872].

Смешанное ингибирование

Тип 11а: полное смешанное ингибирование. В случае конкурентного и неконкурентного ингибирования прямые, построенные в двойных обратных координатах, пересекаются в точке, лежащей на одной из осей; учитывая это обстоятельство, ингибирование считают смешанным, если соответствующие прямые пересекаются слева от оси $1/v$ в точке, не лежащей на оси $1/s$. Типичные графики для смешанного ингибирования приведены на рис. 8.2 и 8.4. Следовательно, смешанный ингибитор изменяет как K_m , так и V . Кажущаяся K_m может либо увеличиваться, либо уменьшаться, а V всегда уменьшается. Этот тип ингибирования может наблюдаться в разных ситуациях, и привести для него общую схему реакции не представляется возможным. Общее уравнение скорости для смешанного конкурентного и неконкурентного ингибирования в стационарных условиях было выведено Боттсом и Моралесом [501]; это уравнение весьма сложно и соответствующий график двойных обратных величин не является линейным. Фриден [1420] рассмотрел условия, при которых эти графики могут быть линейными.

Теоретический анализ случая, когда полное неконкурентное ингибирование сочетается с частичным конкурентным для равновесных условий, был проведен Фриденвальдом и Менгвин-Девисом [1427]. Они рассматривают данный случай как общий, хотя фактически из сделанных ими предположений следует, что ингибитор не только влияет на взаимодействие фермента и суб-

страта, но и полностью предотвращает распад фермент-субстратного комплекса.



Следовательно, данные предположения носят такой же характер, что и в случае ингибирования типа Iб [уравнение (8.7)], но имеется одно различие: в механизме (8.7) распадаются и ES, и EIS, причем с одинаковой скоростью (константа скорости равна k), а в механизме (8.30) распадается только ES. Таким образом, уравнения (8.8) — (8.11) остаются справедливыми, а (8.12) заменяется на

$$v = kx. \quad (8.31)$$

Решая эти уравнения, получаем

$$v = \frac{V}{\frac{K_s}{s} \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{i}{K_i'}\right)}. \quad (8.32)$$

Отметим, что в схеме (8.30) фигурируют четыре константы диссоциации, а в уравнение (8.32) входят только три из них; это обусловлено тем, что система симметрична, поэтому, зная любые три константы, мы можем найти четвертую [см. (8.15)]. Уравнение (8.32) может быть записано в виде

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{i}{K_i} \left(\frac{K_s}{s} + \frac{K_s}{K_s'} \right)} \quad (8.33)$$

или

$$v = \frac{V}{1 + \frac{i/K_i'}{(1 + i/K_i)} \frac{K_s}{s}}. \quad (8.34)$$

Уравнение (8.34) сходно с уравнением (8.23), но содержит дополнительный член, влияющий на K_s . При $K_i = K_i'$ (8.34) упрощается до (8.23), характерного для истинно неконкурентного ингибирования. График Лайнуивера — Бэрка в случае ингибирования смешанного типа отличается от соответствующих графиков для чисто конкурентного или неконкурентного ингибирования тем, что при наличии ингибитора изменяются длины отрезков, отсекаемых от обеих осей. При $K_i < K_i'$ кажущаяся K_m увеличивается, и прямые пересекаются выше оси $1/s$; при $K_i > K_i'$ кажущаяся K_m уменьшается, и прямые пересекаются ниже оси $1/s$, как показано на рис. 8.4, А и Б соответственно.

Различные типы «смешанного» ингибирования могут наблюдаться и в других случаях, например, когда ингибитор связывается не с исходным фермент-субстратным комплексом, а с одним из интермедиатов реакции. В работе [2614] рассмотрено действие ингибитора ацетилхолинэстеразы, который замедляет гидролиз ацетилированного фермента, и показано, что наблюдается ингибирование смешанного типа.

Тип IIIб: частичное смешанное ингибирование. Наряду с простым механизмом (8.30) встречается случай, аналогичный типу IIб неконкурентного ингибирования, когда комплекс EIS может распадаться (с константой скорости k'), но медленнее, чем комплекс ES.



Уравнение скорости для этой системы имеет вид

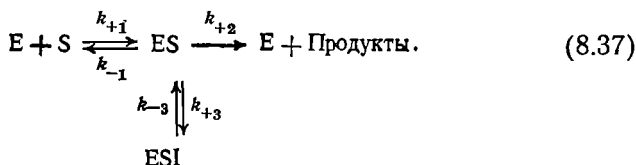
$$v = \frac{ke(1 + k_i'/kK_i')}{1 + \frac{K_s}{s} \cdot \frac{(1 + i/K_i')}{(1 + i/K_i')}} \quad (8.36)$$

При насыщающих концентрациях субстрата в отсутствие ингибитора максимальная скорость равна ke , а при насыщающих концентрациях ингибитора — $k'e$. Как и в случае IIб, графики двойных обратных величин при ряде фиксированных концентраций ингибитора являются линейными, однако вторичные графики зависимости от i длин отрезков, отсекаемых первичными графиками, а также графики зависимости скорости от i не являются линейными: они представляют собой кривые с насыщением.

Бесконкурентное ингибирование

Тип IVa: полное бесконкурентное ингибирование. Бесконкурентный ингибитор в одинаковой мере уменьшает K_M и V . Графики двойных обратных величин для таких систем (при фиксированных концентрациях ингибитора) являются прямыми, параллельными прямой, полученной в отсутствие ингибитора. Из рассмотренных выше данных по смешанному ингибированию следует, что в стационарных условиях в предельном случае при $k_{-1} \ll k_{+2}$, т. е. при $K_M \rightarrow k_{+2}/k_{+1}$, ингибитор, влияющий только на распад комплекса ES, вызывает пропорциональные изменения K_M и V . Однако довольно трудно предложить схему, позво-

ляющую объяснить такое поведение, и вводится более общее предположение, состоящее в том, что ингибитор может присоединяться только к фермент-субстратному комплексу, но не к свободному ферменту:



Ясно, что связывание ингибитора уменьшает количество фермента, находящегося в составе комплекса ES, при распаде которого образуются продукты, и, следовательно, снижает V ; при связывании ингибитора снижается также опосредованно скорость освобождения из комплекса ES свободного фермента и субстрата и, следовательно, уменьшается кажущаяся K_s . Пусть e , x и y — концентрации свободного фермента и комплексов ES и ESI; тогда

$$(e - x - y)s = K_s x, \quad (8.38)$$

$$xi = K_i y, \quad (8.39)$$

$$v = k_{+2}x. \quad (8.40)$$

Отсюда

$$v = \frac{\frac{k_{+2}e}{(1 + i/K_i)}}{1 + \frac{K_s}{(1 + i/K_i)} \cdot \frac{1}{s}}. \quad (8.41)$$

Из этого уравнения видно, что ингибитор вызывает пропорциональные изменения K_s и V . В стационарном приближении для механизма (8.37) получаем следующие уравнения:

$$k_{+1}s(e - x - y) + k_{-3}y = (k_{-1} + k_{+2} + k_{+3}i)x, \quad (8.42)$$

$$k_{+3}ix = k_{-3}y, \quad (8.43)$$

$$v = k_{+2}x. \quad (8.44)$$

Отсюда

$$v = \frac{\frac{k_{+2}e}{(1 + i/K_i)}}{1 + \frac{K_M}{(1 + i/K_i)} \cdot \frac{1}{s}}, \quad (8.45)$$

где K_M равно $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$, а $K_i = k_{-3}/k_{+3}$. Уравнения (8.41) и

(8.45) можно преобразовать к виду

$$v = \frac{V}{\frac{K_M}{s} + (1 + i/K_i)} \quad (8.46)$$

Поскольку величина i в знаменателе уравнения Михаэлиса входит только в член, определяющий длину отрезка, который отсекает от соответствующей оси прямая, построенная в двойных обратных координатах (см. табл. 8.1), то очевидно, что ингибиторы рассматриваемого типа увеличивают длину указанного отрезка в $(1 + i/K_i)$ раз и не влияют на наклон прямой.

Фриден [1420] отметил частный случай ингибирования смешанного типа, представленного схемой (8.35), при котором $K_i/K'_i = k/k'$, т. е. отношение констант диссоциации комплексов EI и ESI с освобождением I равно отношению констант скоростей распада комплексов ES и EIS с образованием продуктов. Кинетический анализ этого механизма для равновесных условий приводит к уравнению

$$v = \frac{\frac{ke(1 + k'i/kK_i')}{(1 + i/K_s')}}{1 + \frac{K_s}{s} \frac{(1 + k'i/kK_i')}{(1 + i/K_i')}} \quad (8.47)$$

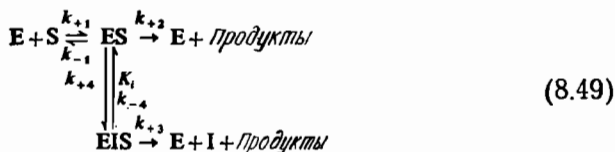
Преобразовав это уравнение, получим

$$v = \frac{\frac{ke}{K_s} + \frac{(1 + i/K_i')}{(1 + k'i/kK_i')}}{\frac{1}{s} + \frac{(1 + i/K_i')}{(1 + k'i/kK_i')}} = \frac{ke}{\frac{K_s}{s} + \frac{(1 + i/K_i')}{(1 + k'i/kK_i')}} \quad (8.48)$$

Из этого уравнения видно, что при указанных выше условиях может иметь место бесконкурентное ингибирование.

В случае односубстратных реакций бесконкурентное ингибирование наблюдается крайне редко, оно было описано при действии L-фенилаланина на щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1) из кишечника крысы [1536]. Напомним, что гидролитические ферменты обычно считаются односубстратными, поскольку полагают, что концентрация второго субстрата, воды, достаточна для полного насыщения фермента.

Тип IVб: частичное бесконкурентное ингибирование. Этот случай может быть представлен схемой



Здесь, как и раньше $k_{+3} < k_{+2}$. Поскольку в данном случае по определению ингибитор не связывается со свободным ферментом, то предполагается, что он освобождается из комплекса EIS одновременно с продуктом. Такой механизм не был обнаружен ни для одного односубстратного фермента, однако на его основе можно объяснить более сложные ферментативные реакции.

В условиях равновесного связывания субстрата и ингибитора уравнение скорости имеет вид

$$v = \frac{k_{+2}e}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{i}{K_i}} + \frac{k_{+3}e}{1 + \frac{K_i}{i} \left(1 + \frac{K_s}{s}\right)} = \frac{\left(\frac{K_s}{1 + \frac{(k_{+3}/k_{+2})i}{K_s}}\right) \frac{1}{s} + \frac{(1 + i/K_i)}{\left(1 + \frac{(k_{+3}/k_{+2})i}{K_i}\right)}}{k_{+2}e}. \quad (8.50)$$

Уравнение, обратное данному, запишется в виде

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_s}{1 + \frac{(k_{+3}/k_{+2})i}{K_i}}\right) \frac{1}{k_{+2}e} \cdot \frac{1}{s} + \left(\frac{1 + i/K_i}{1 + \frac{(k_{+3}/k_{+2})i}{K_i}}\right) \frac{1}{k_{+2}e}. \quad (8.51)$$

Следовательно, графики двойных обратных величин при фиксированных концентрациях i будут представлять собой прямые, наклон которых уменьшается при увеличении i ; прямые пересекаются в точке, лежащей выше оси $+1/s$, абсцисса которой равна $(1 - k_{+3}/k_{+2}) / (K_s k_{+3}/k_{+2})$, а ордината $-1/k_{+2}e$ (рис. 8.1). Таким образом, при низких концентрациях субстрата (справа от точки пересечения) i выступает в роли активатора, а при более высоких концентрациях субстрата — в роли ингибитора. При

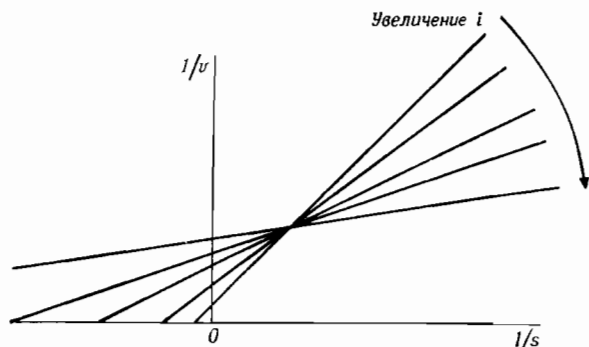


Рис. 8.1. График двойных обратных величин для системы с частичным бесконечным ингибированием.

очень высоких концентрациях ингибитора график двойных обратных величин приближается к прямой, параллельной оси $1/s$, и, следовательно, скорость реакции стремится к некой конечной величине. При $k_{+3}=k_{+2}$ I действует как активатор, снижающий K_s и не влияющий на V ; в этом случае прямые пересекаются в точке, лежащей на оси $1/v$.

Для механизма (8.49) в стационарном приближении кинетическое уравнение в обратной форме имеет вид

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_{+2}e} \left[\frac{K_M + i/K_i'}{1 + \frac{k_{+3}}{k_{+2}} \frac{i}{K_i}} \right] \frac{1}{s} + \left[\frac{1 + i/K_i}{1 + \frac{k_{+3}}{k_{+2}} i/K_i} \right] \frac{1}{k_{+2}e}, \quad (8.52)$$

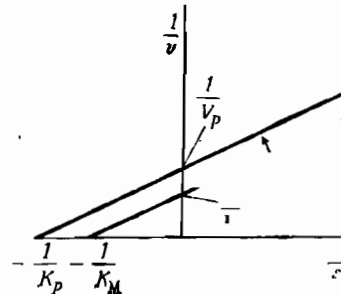
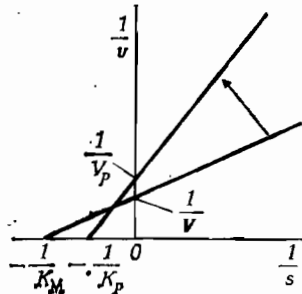
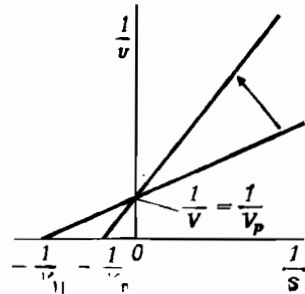
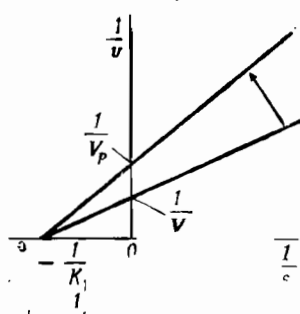
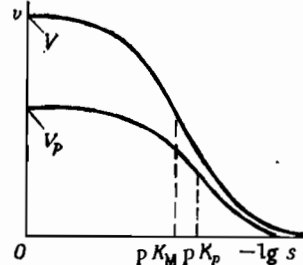
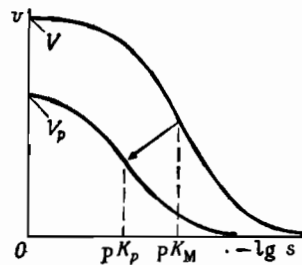
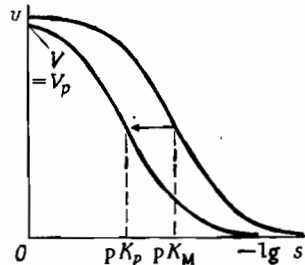
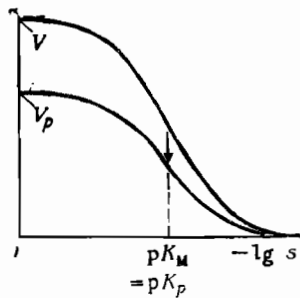
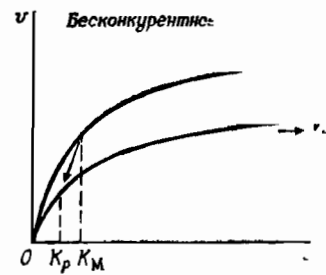
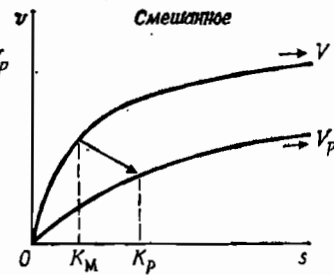
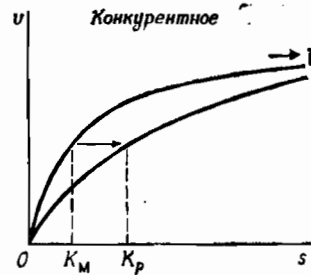
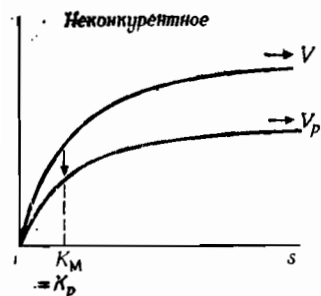
где $K_i = \frac{k_{-4} + k_{+3}}{k_{+4}}$, $K_i' = \frac{k_{+1}(k_{-4} + k_{+3})}{k_{+4}k_{+3}}$. Из этого уравнения следует, что зависимость $1/v$ от $1/s$ должна быть линейной; такой же, согласно уравнению (8.51), должна быть и зависимость $1/v$ от i .

СВОДКА, ИЛЛЮСТРИРУЮЩАЯ РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ

Влияние ингибиторов различных типов при пяти разных способах графического изображения уравнения Михаэлиса представлено на рис. 8.2. В каждом случае стрелка показывает направление, в котором график смещается в присутствии ингибитора. Типы а представлены теми же графиками, что и типы б, потому что направление смещения в обоих случаях одинаково, хотя для типов б с увеличением концентрации ингибитора это смещение достигает определенного предела, а для типов а нет.

Пять рядов графиков, приведенных на рис. 8.2, соответствуют пяти методам графического изображения уравнения Михаэлиса, представленным на рис. 4.12. Метод построения по Лайнуиверу—Бэрку (третий ряд сверху) применяется особенно широко для определения типов ингибирования. При чисто конкурентном ингибировании прямые пересекаются в точке, лежащей на оси ординат, а при чисто неконкурентном — на оси абсцисс. В случае ингибирования смешанного типа точка пересечения прямых лежит ниже или выше оси абсцисс, при бесконкурентном ингибировании прямые параллельны.

Графический анализ не всегда позволяет легко отличить один тип ингибирования от другого. Так, в случае смешанного ингибирования точка пересечения может лежать очень близко к одной из осей, и бывает трудно исключить конкурентное или неконкурентное ингибирование. При бесконкурентном же ингибировании нужна достаточно высокая точность, чтобы показать, что прямые действительно параллельны, а не образуют некоторый угол. Поскольку данные по ингибированию часто используют



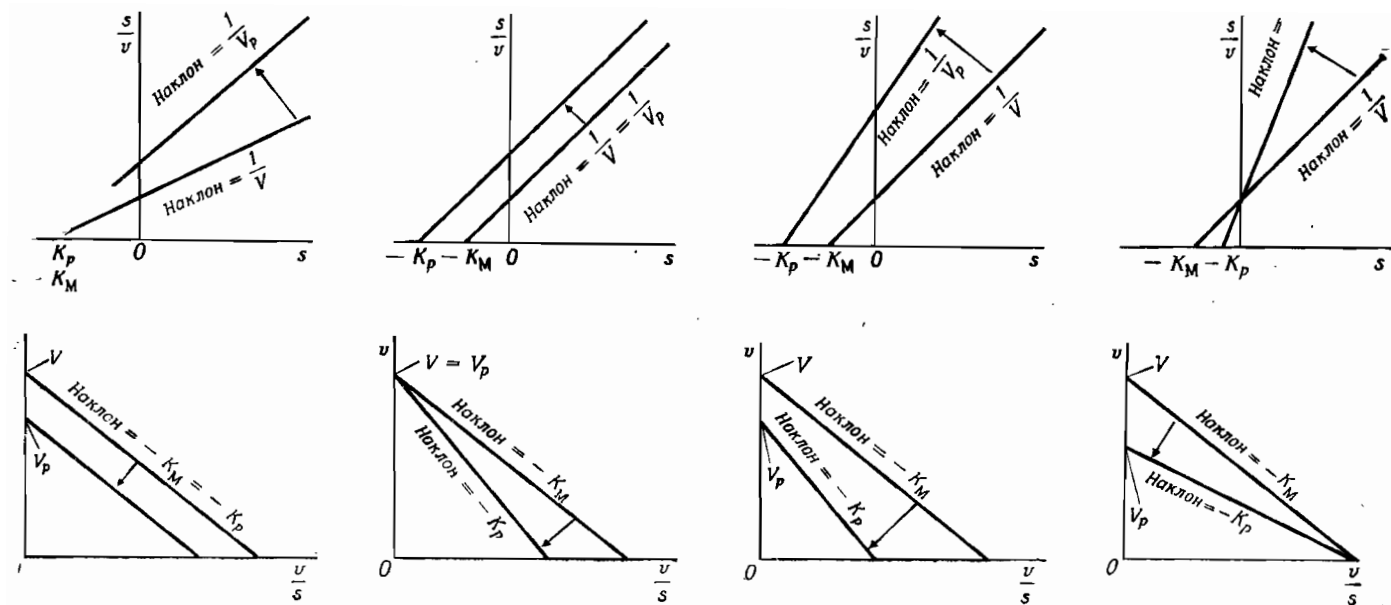


рис. 8.2. Влияние ингибиторов различных типов на пять форм графиков, описывающих зависимость между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции. K_p и V_p — это величины K_M и V , наблюдаемые в присутствии ингибитора.

ют для выбора кинетического механизма, по которому функционирует фермент (гл. 4), важно однозначно определить тип ингибирования, а для этого необходимо провести измерения в широком диапазоне концентраций ингибитора.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРНЫХ КОНСТАНТ

1. Величины K_i можно определить методом Лайнуивера — Бэрка, зная длины отрезков, отсекаемых соответствующими графиками от осей координат в присутствии и в отсутствие ингибитора. Выражения, определяющие длину отрезков, отсекаемых от обеих осей при различных типах ингибирования, могут быть получены из приведенных выше уравнений; для удобства эти выражения суммированы в табл. 8.1.

При конкурентном ингибировании в отсутствие и в присутствии ингибитора точки пересечения графиков с осью абсцисс дают $1/K_M$ и $1/K_p$ соответственно, где $K_p = K_M(1 + i/K_i)$ — эффективная константа Михаэлиса в присутствии ингибитора (концентрация i). Таким образом, константа K_i может быть определена из выражения

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_M} - 1}. \quad (8.53)$$

При неконкурентном ингибировании точки пересечения графиков с осью абсцисс дают $1/V$ и $1/V_p$ соответственно, где $V_p = V/(1 + i/K_i)$. Тогда

$$K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1}. \quad (8.54)$$

В случае частичного ингибирования выражения для K_i имеют следующий вид:

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_s} - 1} \left(1 - \frac{K_p}{K_s'} \right) \quad (\text{случай Iб}) \quad (8.55)$$

$$K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1} \left(1 - \frac{V'}{V_p} \right) \quad (\text{случай IIб}),$$

где V' — скорость в присутствии избытка ингибитора и субстрата, K_s' — константа Михаэлиса в присутствии избытка ингибитора. Обе эти величины должны быть получены независимо друг от друга путем экстраполяции V_p и K_p к $i \rightarrow \infty$.

Выражения, определяющие длину отрезков, отсекаемых на осях координат
при построении графиков в двойных обратных координатах

Ингибирование	Длина отрезка, отсекаемого от оси ординат	Длина отрезка, отсекаемого от оси абсцисс	Наклон
Ia — полное конкурентное [уравнение (8.6)]	$\frac{1}{V}$	$\frac{1}{K_M(1+i/K_i)}$	$\frac{K_M(1+i/K_i)}{V}$
Iб — частичное конкурентное [уравнение (8.13)]	$\frac{1}{V}$	$\frac{1+iK_s/K_tK'_s}{K_s(1+i/K_i)}$	$\frac{K_s(1+i/K_i)}{V(1+iK_s/K_tK'_s)}$
IIa — полное неконкурентное [уравнение (8.23)]	$\frac{1+i/K_t}{V}$	$\frac{1}{K_s}$	$\frac{K_s(1+i/K_t)}{V}$
IIб — частичное неконкурентное [уравнение (8.27)]	$\frac{1+i/K_t}{V+V'i/K_i}$	$\frac{1}{K_s}$	$\frac{K_s(1+i/K_t)}{V+V'i/K_i}$
IIIa — смешанное [уравнение (8.32)]	$\frac{(1+i/K'_i)}{V}$	$\frac{(1+i/K'_i)}{K_s(1+i/K_i)}$	$\frac{K_s(1+i/K_i)}{V}$
IIIб — частичное смешанное [уравнение (8.36)]	$\frac{(1+i/K'_i)}{(1+k'i/kK'_i)} \cdot \frac{1}{ke}$	$\frac{(1+i/K'_i)}{(1+i/K_i)K_s}$	$\frac{K_s}{ke} \cdot \frac{(1+i/K'_i)}{(1+k'i/kK'_i)}$
IVa — бесконкурентное [урав- нение (8.46)]	$\frac{(1+i/K_i)}{V}$	$\frac{(1+i/K_i)}{K_M}$	$\frac{K_M}{V}$
IVa — бесконкурентное [урав- нение (8.48)]	$\frac{(1+i/K'_i)}{(1+i/K_i)} \cdot \frac{1}{ke}$	$\frac{(1+i/K'_i)}{(1+i/K_i)K_s}$	$\frac{K_s}{ke}$
Vб — частичное бесконкурентное [уравнения (8.50) и (8.51)]	$\left(\frac{(1+i/K_i)}{1+\frac{(k_{+3}/k_{+2})i}{K_i}} \right) \cdot \frac{1}{k_{+2}e}$	$\frac{(1+i/K_i)}{K_s}$	$\left(\frac{K_s}{1+\frac{(k_{+3}/k_{+2})i}{K_i}} \right) \cdot \frac{1}{k_{+2}e}$

В случаях смешанного полного и частичного ингибирования выражения для K_i и K'_i можно записать в виде

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p(1+i/K'_i)}{K_s} - 1} \quad \text{и} \quad K'_i = \frac{i}{\frac{v}{V_p} - 1} \quad (\text{случай IIIa}),$$

$$K'_i = \frac{i}{\left(\frac{V - V_p}{V_p - V'}\right)} \quad (\text{случай IIIб}).$$
(8.56)

Для бесконкурентного ингибирования, если выполняется уравнение (8.46), то

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_M}{K_p} - 1};$$
(8.57)

если же справедливо уравнение (8.48), то K_i будет определяться выражением (8.56), т. е.

$$K_i = \frac{i}{\frac{V_p}{V} \left(1 + \frac{i}{K'_i}\right) - 1}.$$

2. Более точно, однако, K_i можно определить с помощью графиков двойных обратных величин, построенных для ряда фиксированных концентраций ингибитора. Если построить зависимости наклонов или длин отрезков для этих графиков от концентраций ингибитора, то часто удастся определить K_i непосредственно. Результаты, получаемые при построении таких графиков, приведены в табл. 8.2.

Эти графики позволяют также выявить случаи частичного ингибирования; гиперболические функции зависимости длин отрезков или наклонов от i , содержащие член $(1+i/K'_i)/(1+i/K_i)$, становятся независимыми от i при i/K_i и $i/K'_i \gg 1$. Бесконкурентное ингибирование, описываемое уравнением (8.48), также приводит к гиперболической зависимости длин отрезков от i , и его можно, следовательно, отличить от бесконкурентного ингибирования, описываемого уравнением (8.46). При бесконкурентном частичном ингибировании (8.50) график зависимости наклонов от i представляет собой выпуклую кривую, а график зависимости длин отрезков от i имеет минимум.

3. Диксон [1110] предложил простой графический метод, который позволяет определять K_i непосредственно. Если определять скорость реакции в условиях постоянной концентрации субстрата и различных концентраций ингибитора, то график зависимости $1/v$ от i будет представлять собой прямую, как показано на рис. 8.3. В этом можно убедиться при рассмотрении

Таблица 8.2

Графическое определение ингибиторных констант

Ингибирование	График	Длина отрезка, отсекаемого от оси абсцисс
Линейное ингибирование		
Ia Полное конкурентное [уравнение (8.6)]	Зависимость наклона от i	K_i
IIa Полное неконкурентное [уравнение (8.23)]	Зависимость длины отрезка, отсекаемого от вертикальной оси, от i	K_i
IIa Смешанное [уравнение (8.32)]	Зависимость наклона от i Зависимость длины отрезка, отсекаемого от вертикальной оси, от i	K_i K_i'
IVa Бесконкурентное [уравнение (8.46)]	Зависимость длины отрезка, отсекаемого от вертикальной оси, от i	K_i
Нелинейное ингибирование		
б Частичное конкурентное [уравнение 8.13)]	Зависимость наклона от i	График отклоняется от линейности вниз и достигает предельного значения, равного K_s'/k_e
Iб Частичное неконкурентное [уравнение (8.27)]	Зависимость длины отрезка, отсекаемого от вертикальной оси, от i Зависимость наклона от i	График отклоняется от линейности вниз и достигает предельного значения, равного $1/V'$ График отклоняется от линейности вниз и достигает предельного значения, равного K_s/V'
IIб Частичное смешанное [уравнение (8.36)]	Зависимость длины отрезка, отсекаемого от вертикальной оси, от i Зависимость наклона от i	График отклоняется от линейности вниз и достигает предельного значения, равного $1/k'e$ График отклоняется от линейности вниз и достигает предельного значения $K_s K_i'/K_i k'e$
Va Бесконкурентное [уравнение (8.48)]	Зависимость длины отрезка от i	График отклоняется от линейности вниз и достигает предельного значения, равного $K_i/K_i k'e$
Vб Бесконкурентное	Зависимость длины отрезка от i	График отклоняется от линейности вниз и достигает предельного значения, равного $1/k_{+3e}$

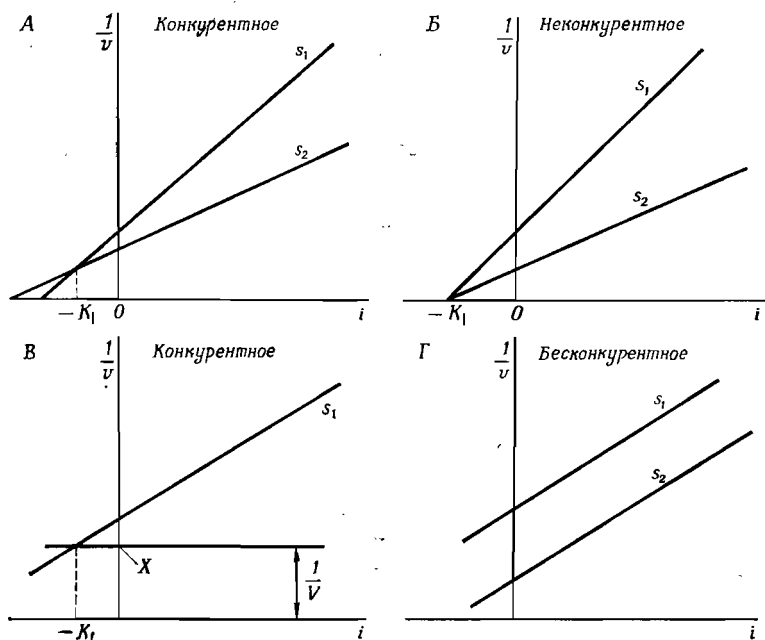


Рис. 8.3. Графическое определение ингибиторных констант (метод Диксона).
Во всех случаях $s_2 > s_1$.

уравнений (8.6) и (8.23), решенных относительно $1/v$. Из уравнения (8.6) находим для конкурентного ингибирования

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V s} + \frac{1}{V} + \frac{K_M}{V s} \cdot \frac{i}{K_i}. \quad (8.58)$$

Если получить второй ряд экспериментальных точек при другой концентрации субстрата (s_2), то вторая прямая пересечет первую в точке $-K_i$, как показано на рис. 8.3, А.

Проверка может быть произведена следующим образом. В точке пересечения величины $1/v$ и i должны быть одними и теми же для обоих графиков; так как ингибирование является конкурентным, то одинаковой должна быть также и величина V . Поэтому

$$\frac{K_M}{s_1} + 1 + \frac{K_M}{s_1} \cdot \frac{i}{K_i} = \frac{K_M}{s_2} + 1 + \frac{K_M}{s_2} \cdot \frac{i}{K_i} \quad (8.59)$$

ИЛИ

$$\frac{1}{s_1} \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) = \frac{1}{s_2} \left(1 + \frac{i}{K_i} \right). \quad (8.60)$$

Уравнение (8.60) может быть справедливо только в том случае, если либо $s_1 = s_2$ (что не имеет места в рассматриваемом случае), либо $i = -K_i$.

Если K_m уже была определена в отсутствие ингибитора, то в этом случае опыты в присутствии ингибитора достаточно провести только при одной концентрации субстрата, так как точка, определяющая K_i , имеет ординату $1/V$, в чем можно убедиться, подставив $i = -K_i$ в уравнение (8.58) (это значение ординаты указано точкой X на рис. 4.12, В). Таким образом, необходимо только провести через точку на оси $1/v$ прямую, параллельную оси абсцисс, как показано на рис. 4.12, В, и она пересечет прямую, описывающую процесс в присутствии ингибитора, в точке $-K_i$. Применимость этого метода, однако, ограничивается случаями конкурентного ингибирования.

Наряду с K_i по графику, изображенному на рис. 8.3, В, можно определить и K_m , так как каждая прямая пересекает ось абсцисс в точке $-K_i \left(\frac{s}{K_m} + 1 \right)$.

Рассматриваемый метод можно применять также и к случаям некоинкурентного ингибирования, как это иллюстрирует рис. 8.3, Б. Прямые по-прежнему пересекаются в точке $-K_i$, но теперь эта точка лежит на оси абсцисс. В этом можно убедиться, если в уравнение для случая некоинкурентного ингибирования (8.23) подставить $1/v = 0$:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_m}{s} \right) \left(1 + \frac{i}{K_i} \right). \quad (8.61)$$

График, описывающий эту зависимость, представляет собой прямую.

Для бесконкурентного ингибирования, характеризующегося уравнением (8.46), графики зависимости $1/v$ от i при ряде фиксированных концентраций субстрата образуют серию параллельных прямых (рис. 8.3, Г); их наклон равен $1/VK_i$, а длины отсекаемых от оси $1/v$ отрезков — $(1 + K_m/s)/V$. Следовательно, в данном случае рассматриваемый подход неприменим. Относительно систем с бесконкурентным ингибированием, которые описываются уравнением вида (8.48), в работе [647] отмечалось, что графики двойных обратных величин являются линейными, хотя зависимость $1/v$ от i имеет вид

$$\frac{1}{v} = \frac{(1 + i/K'_i)}{V(1 + i/K_i)} + \frac{K_m}{Vs} \quad (8.62)$$

и, следовательно, соответствующие графики не являются прямыми; они отклоняются от линейности вниз, а при i/K'_i и $i/K_i \gg 1$ не зависят от i . Таким образом, этот подход, как и анализ зависимости длины отрезков, получаемых по методу Лайнуивера—Бэрка, от i (см. табл. 8.2), позволяет сделать выбор между двумя

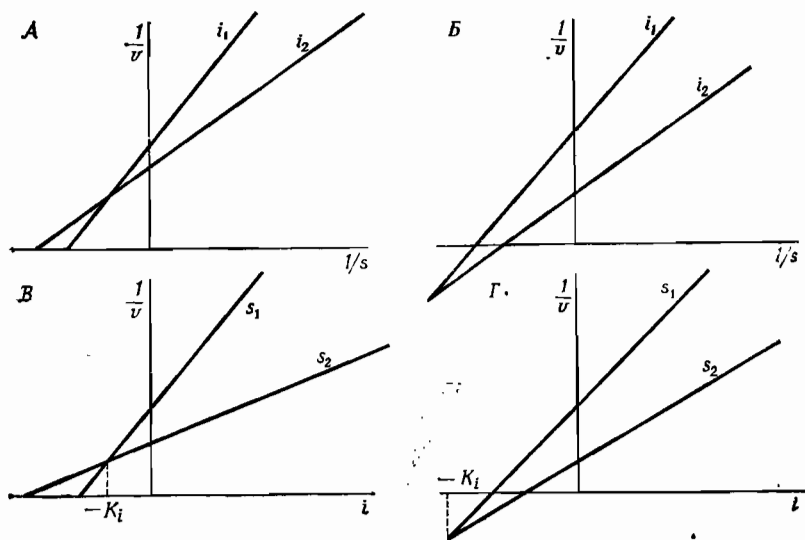


Рис. 8.4. Графическое представление системы со смешанным ингибированием. А и Б. $K_i < K'_i$. Б и Г. $K_i > K'_i$. Во всех случаях $s_2 > s_1$ и $i_1 > i_2$.

рассматриваемыми механизмами бесконкурентного ингибирования.

Для смешанного ингибирования, описываемого схемой (8.30), уравнение (8.32) можно преобразовать к виду

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_s} (1 + i/K_i) + \frac{1}{V} (1 + i/K'_i). \quad (8.63)$$

Решая это уравнение при двух разных концентрациях субстрата, мы получим, что графики зависимости $1/v$ от i пересекаются при $i = K_i$ (см. рис. 8.4).

В работе [3766] было отмечено, что ордината точки пересечения прямых, лежащей на оси $1/v$, равна $(1 - K_i/K'_i) \cdot 1/V$ и что положение этой точки зависит от соотношения между K_i и K'_i [3766]. Если K_i меньше, чем K'_i , прямые пересекаются в точке, лежащей выше оси i , и, следовательно, рассматриваемый случай смешанного ингибирования неотличим от конкурентного; если же K_i больше K'_i , прямые пересекаются в точке, лежащей ниже оси i . Эти два случая приведены на рис. 8.4; очевидно, что при $K_i = K'_i$ имеет место истинно неконкурентное ингибирование.

Поскольку при частичном ингибировании фермент сохраняет некоторую активность в присутствии избытка ингибитора, графики зависимости $1/v$ от i не будут линейными, они будут отклоняться от линейности вниз по гиперболическому закону, приближаясь к величине, соответствующей предельной скорости,

которая определяется скоростью распада комплекса EIS (см. табл. 8.2). Корниш-Боуден [885] показал, что, если метод Диксона не позволяет найти кинетические константы, можно воспользоваться графиком зависимости s/v от i . В случае смешанного ингибирования уравнение (8.63) можно преобразовать к виду

$$\frac{s}{v} = \frac{K_M}{V} (1 + i/K_i) + \frac{s}{V} (1 + i/K'_i) \quad (8.64)$$

т. е. следовательно, график зависимости s/v от i будет линейным; прямые, полученные для двух разных концентраций субстрата, пересекутся в точке, лежащей либо выше, либо ниже оси i , с абсциссой — K'_i . Ордината точки пересечения равна $(1 - K_i/K'_i)/V$; эта точка будет лежать выше оси i при $K_i > K'_i$ и ниже этой оси при $K_i < K'_i$. Преобразуя соответствующим образом уравнение (8.46), получим

$$\frac{s}{v} = \frac{K_M}{V} + \frac{s}{V} (1 + i/K_i). \quad (8.65)$$

Следовательно, при бесконкурентном ингибировании прямые пересекаются над осью i , а абсцисса точки пересечения равна — K_i . Преобразуя аналогичным образом уравнение (8.58) для случая конкурентного ингибирования, найдем, что прямые, по-

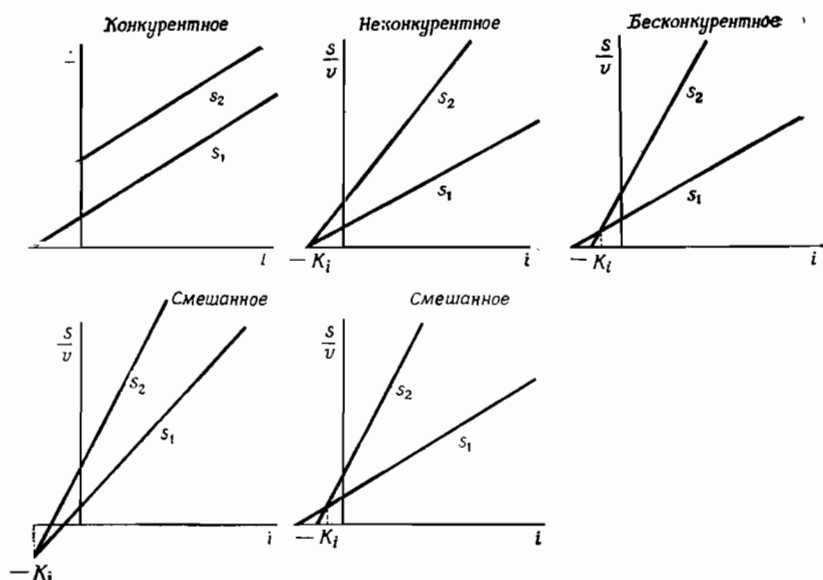


рис. 8.5. Графическое определение ингибиторных констант (метод Корниш-Боудена). Во всех случаях $s_1 > s_2$.

лученные при разных концентрациях субстрата, будут параллельными и, следовательно, данным методом нельзя определить K_i .

Графики, получаемые этим методом, приведены на рис. 8.5; используя его наряду с методом Диксона, можно однозначно установить тип ингибирования, а также определить значения всех ингибиторных констант.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРНЫХ КОНСТАНТ ДЛЯ СИСТЕМ С ЧАСТИЧНЫМ ИНГИБИРОВАНИЕМ

Как мы уже говорили, при частичном ингибировании наблюдаются гиперболические кривые, поскольку с увеличением концентрации ингибитора скорость снижается до некой предельной величины. Однако для определения K_i можно прибегнуть к преобразованиям, позволяющим получать линейные графики. Например, в случае частичного конкурентного ингибирования наклон графиков зависимости $1/v$ от $1/s$ по данным табл. 8.1 [см. также уравнение (8.15)] определяется следующим выражением:

$$\text{Наклон} = \frac{K_s(1 + i/K_i)}{V(1 + iK_s/K_iK'_s)} = \frac{K_s(1 + i/K_i)}{V(1 + i/K'_i)}. \quad (8.66)$$

Следовательно, график зависимости наклона от i будет равнобочной гиперболой, как показано на рис. 8.6, Б; отметим, что при $i=0$ наклон кривой равен K_s/V . Эту кривую можно превратить в равнобочную гиперболу, которая проходит через начало координат, используя величину, равную изменению наклона ($\Delta_{\text{накл}}$). Эта величина определяется как

$$\Delta_{\text{накл}} = \frac{K_s(1 + i/K_i)}{V(1 + i/K'_i)} - \frac{K_s}{V} = \frac{K_si/K_i - K_si/K'_i}{V + Vi/K'_i}. \quad (8.67)$$

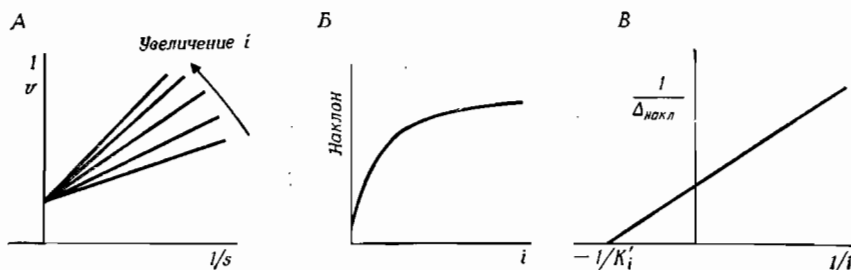


Рис. 8.6. Графический анализ частичного конкурентного ингибирования.

Преобразуя выражение (8.67), получим

$$1/\Delta_{\text{накл}} = \frac{VK_i'K_i}{K_s(K_i' - K_i)} \cdot \frac{1}{i} + \frac{VK_i}{K_s(K_i' - K_i)}. \quad (8.68)$$

Следовательно, график зависимости $1/\Delta_{\text{накл}}$ от $1/i$ является прямой, которая пересекает ось $1/i$ в точке с абсциссой, равной $-1/K_i'$ (рис. 8.6, В). Таким же путем можно линейаризовать зависимости наклонов и длин отрезков от концентрации ингибитора и в других случаях частичного ингибирования (см. табл. 8.2).

ИНГИБИРОВАНИЕ В ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМАХ С НЕСКОЛЬКИМИ СУБСТРАТАМИ

Типы ингибирования, которые могут наблюдаться для ферментативных реакций с участием нескольких субстратов, подробно рассматривались в гл. 4. Уравнения начальной скорости для таких систем весьма сложны, и хотя данное соединение может вызывать ингибирование определенного типа в отношении одного из субстратов, в целом механизм ингибирования может быть более сложным, поэтому ингибирование бесконкурентного и смешанного типов в полисубстратных системах наблюдается гораздо чаще, чем в односубстратных системах.

При этом оказываются более сложными и способы определения K_i . Рассмотрим, например, двухсубстратную реакцию, подчиняющуюся уравнению (4.86), ингибитор которой является конкурентным по отношению к субстрату А. Уравнение скорости будет иметь вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} (1 + i/K_i) + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} (1 + i/K_i)}. \quad (8.69)$$

В этом случае наклон графиков зависимости $1/v$ от $1/a$ определяется выражением

$$\frac{(K_M^A + K_s^A K_M^B/b) (1 + i/K_i)}{V}$$

и, следовательно, вторичные графики зависимости этого наклона от i будут прямыми, которые пересекают ось абсцисс в точке $-K_i$. Однако такое простое соотношение не будет выполняться в том случае, когда величина K_i , входящая в (8.69) совместно с K_M^A , отличается от той, которая входит в это выражение совместно с $K_s^A K_M^B$. Из уравнения (8.69) следует, что по отношению к субстрату В будет наблюдаться ингибирование смешан-

ного типа; наклон графика двойных обратных величин определяется выражением

$$\left[K_M^B + \frac{K_s^A K_M^B}{a} (1 + i/K_i') \right] \frac{1}{V},$$

а длина отрезка, отсекаемого от оси ординат, равна

$$\left[1 + \frac{K_M^A}{a} (1 + i/K_i) \right] \frac{1}{V}.$$

Следовательно, вторичные графики зависимости наклонов от i будут пересекать ось абсцисс в точке $-(1 + a/K_s^A)K_i'$, а вторичные графики зависимости длин отрезков от i — в точке $-(1 + a/K_M^A)K_i$. Если K_i и K_i' , входящие в приведенные выражения, различаются и a , K_s^A и K_M^A известны, то вторичные графики зависимости наклонов можно использовать для расчета ингибиторной константы, входящей в уравнение (8.69) совместно с K_s^A , а вторичные графики для длин отрезков — для расчета соответствующей константы, входящей в это уравнение совместно с K_M^A .

НАЛИЧИЕ ИНГИБИТОРА В ПРЕПАРАТЕ СУБСТРАТА

При наличии ингибитора в препарате субстрата увеличение концентрации субстрата в исследуемой системе сопровождается параллельным увеличением концентрации ингибитора. Нередко при определении активности стереоспецифического фермента используют DL-субстрат. Если «неактивный» изомер является ингибитором фермента, то не достаточно просто рассчитать концентрацию «активного» изомера субстрата. В работе [2072] этот простой случай рассмотрен на примере химотрипсина. В случае DL-субстрата, содержащего равные количества субстрата и ингибитора ($i=s$), вместо стандартного уравнения для конкурентного ингибирования (8.6) можно воспользоваться уравнением

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s} \left(1 + \frac{s}{K_i} \right)} \quad (8.70)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V s} + \left(1 + \frac{K_M}{K_i} \right) \frac{1}{V}. \quad (8.71)$$

Таким образом, наклон графика двойных обратных величин не изменяется при наличии в системе конкурентного ингибитора, а кажущиеся V и K_M уменьшаются в $(1 + K_M/K_i)$ раз.

Более общий случай, когда концентрация конкурентного ингибитора не равна концентрации субстрата, проанализирован в работах [958, 960, 4815]. Если выразить концентрацию инги-

битора в препарате субстрата через $i=xs$ и подставить это выражение в (4.6), то в обратной форме это уравнение будет иметь вид

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V} \frac{1}{s} + \left(1 + \frac{xK_M}{K_i}\right) \frac{1}{V}. \quad (8.72)$$

Следовательно, как и в рассмотренном выше простом случае, при наличии в препарате субстрата конкурентного ингибитора график двойных обратных величин будет представлять собой прямую, параллельную прямой, которая получена в отсутствие ингибитора; при этом кажущиеся V и K_M уменьшатся в $(1 + xK_M/K_i)$ раз. Степень наблюдаемого ингибирования будет зависеть от отношения K_M/K_i ; при $K_i \ll K_M$ ингибирование будет существенным даже при очень небольшом содержании ингибитора в препарате субстрата. Дальциль показал, что в некоторых препаратах NAD имеются примеси, действующие как конкурентные ингибиторы, и вывел уравнение для случая двухсубстратных ферментов, используя в качестве основы уравнение (8.69) и полагая, что конкурентный ингибитор содержится в препарате субстрата А:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left[K_M^B + K_s^A K_M^B \left(\frac{1}{a} + \frac{x}{K_i} \right) \right] \frac{1}{b} + \left(\frac{K_M^A x}{K_i} + \frac{K_M^A}{a} + 1 \right) \frac{1}{V}. \quad (8.73)$$

Из уравнения следует, что в этом случае действие ингибитора будет аналогично таковому для «простого» рассмотренного выше случая при изменении концентрации субстрата А; если же изменяется концентрация субстрата В, то будут увеличиваться и наклон графика двойных обратных величин, и длина отсекаемого им отрезка.

Когда ингибитор, присутствующий в препарате субстрата, является неконкурентным, подстановка $xs=i$ в уравнение (8.23) дает [958]

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_s}{s}\right) \left(1 + \frac{xs}{K_i}\right)} \quad (8.74)$$

или в обратной форме

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{xK_s}{K_i} + \frac{xs}{K_i}\right) + \frac{K_s}{V} \frac{1}{s}. \quad (8.75)$$

Очевидно, что уравнению (8.75) соответствует нелинейный график двойных обратных величин; такой график приведен на рис. 8.7. Этот график можно сопоставить с тем, который получают в случае ингибирования высокими концентрациями субстрата (гл. 4). Экстраполяция линейного участка кривой при $s \rightarrow 0$ (когда величиной xs/K_i можно пренебречь) дает точку

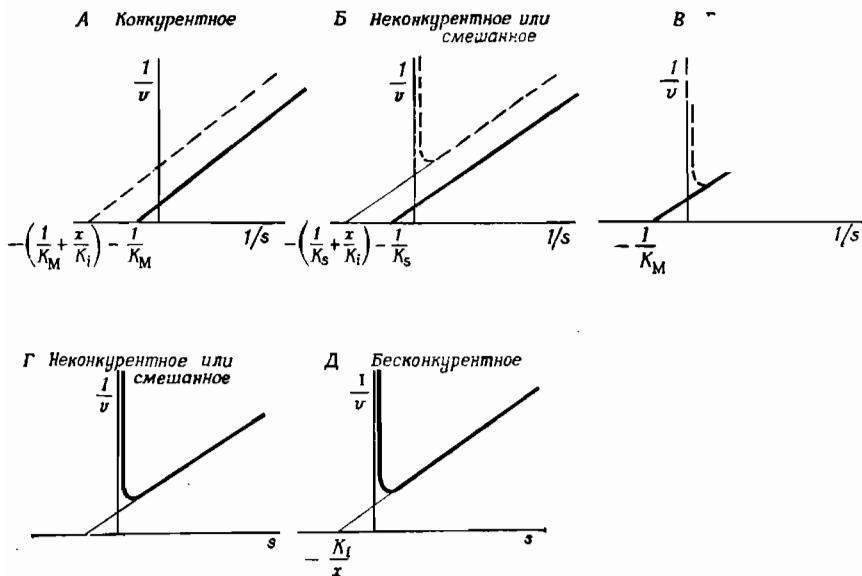


Рис. 8.7. Графики, иллюстрирующие влияние примеси ингибитора в препарате субстрата. На графиках двойных обратных величины сплошная кривая соответствует результатам, полученным с чистым субстратом, а пунктирная — с субстратом, содержащим ингибитор. Линейный участок кривой экстраполирован до пересечения с осью абсцисс, от которой он отсекает отрезок $-(K_s + K_i/x)$ в случае конкурентного ингибирования и $-K_i'(1/x + K_s/K_i)$ в случае смешанного ингибирования.

пересечения с осью $1/v$ с ординатой $1/V(1 + xK_s/K_i)$; при этом наклон оказывается таким же, как и в отсутствие ингибитора (т. е. кажущаяся K_s уменьшается в $1 + xK_s/K_i$ раз).

Строя график зависимости $1/v$ от s для данных при высоких концентрациях субстрата (когда можно пренебречь членом K_s/s), получим, что длина отрезка, отсекаемого соответствующим графиком от оси $1/v$, равна $1/V(1 + xK_s/K_i)$, а наклон $-x/VK_i$; следовательно, длина отрезка, отсекаемого от оси s , будет равна $K_s + K_i/x$.

Подставляя $xs = i$ в уравнение (8.32) в случае смешанного ингибирования, находим

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{xK_s}{K_i} + \frac{xs}{K_i'}} \quad (8.76)$$

или в обратной форме [804]

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{Vs} + \left(\frac{K_s x}{K_i} + \frac{xs}{K_i'} + 1 \right) \frac{1}{V}. \quad (8.76 \text{ а})$$

Это уравнение аналогично (8.75) и, следовательно, должно наблюдаться кажущееся ингибирование при высоких концентрациях субстрата. В случае двухсубстратных ферментативных реакций смешанное ингибирование в отношении одного из субстратов наиболее часто обусловлено действием ингибитора, который оказывается конкурентным по отношению к другому субстрату. Так, в системе, представленной уравнением (8.69), ингибитор, являющийся конкурентным по отношению к субстрату А, будет смешанным по отношению к субстрату В. Уравнение двойных обратных величин можно получить для данного случая из (8.73).

Если в препарате субстрата присутствует бесконкурентный ингибитор, подстановка $xs=i$ в уравнение (8.46) дает

$$v = \frac{V}{1 + \frac{xs}{K_i} + \frac{K_M}{s}} \quad (8.76 б)$$

или в обратной форме [804]

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{Vs} + \frac{1}{V} \left(1 + \frac{xs}{K_i} \right). \quad (8.76 в)$$

Следовательно, в данном случае графики двойных обратных величин будут сходны с теми, которые наблюдаются для неконкурентного ингибирования; кажущиеся V и K_M , получаемые при экстраполяции в область малых s (когда величиной xs/K_i можно пренебречь), не изменяются, а график зависимости $1/v$ от s при высоких концентрациях субстрата (когда можно пренебречь величиной K_M/s) отсекает от оси s отрезок длиной $-K_i/x$. Уравнение (8.73) совпадает по виду с уравнением (4.219), характеризующим ингибирование высокими концентрациями самого субстрата.

Производя соответствующую подстановку в уравнение (4.86), получаем для двухсубстратной реакции следующее уравнение:

$$\frac{1}{v} = \left[\frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^B}{b} + \frac{K_s^A K_M^B}{ab} + \left(1 + \frac{xa}{K_i} \right) \right] \frac{1}{V}. \quad (8.76 г)$$

Следовательно, присутствие ингибитора, бесконкурентного по отношению к одному из субстратов, не повлияет на графики двойных обратных величин при низких концентрациях этого субстрата ($xa/K_i \ll 1$), но приведет к кажущемуся ингибированию высокими концентрациями субстрата.

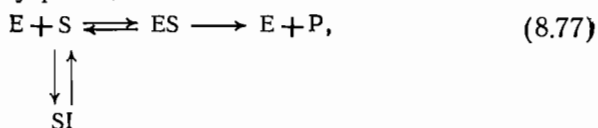
Поскольку при наличии в препарате субстрата неконкурентного, смешанного или бесконкурентного ингибитора могут наблюдаться эффекты, кинетически неотличимые от простого ингибирования высокими концентрациями субстрата, в тех случаях, когда такого типа ингибирование наблюдается, следует принимать специальные меры с целью тщательной очистки

субстратов. Хоуслей и Типтон [2061] показали, что наблюдаемое при окислении бензиламина аминоксидазой (КФ 1.4.3.4) ингибирование высокими концентрациями субстрата обусловлено наличием в последнем примеси продукта — бензальдегида; авторы приводят уравнения ингибирования (обусловленного примесью в субстратах) двухсубстратных ферментов, функционирующих по механизму двухстадийного переноса. Клеланд и др. [804] рассмотрели вопрос о действии примесей, вызывающих частичное ингибирование в односубстратных реакциях.

ДРУГИЕ ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ

Все типы ингибирования, которые мы обсуждали до сих пор, предусматривают прямое соединение ингибитора с ферментом; однако ингибирование будет вызываться также веществами, которые соединяются с субстратом, коферментом или активатором, блокируя их, т. е. делая недоступными для фермента. Такое ингибирование оказывается возможным лишь в том случае, если концентрация блокирующего вещества есть величина того же порядка, что и концентрация блокируемого субстрата или кофактора; добавление большого количества субстрата или кофактора снимает это ингибирование.

Рассмотрим схему реакции



в которой комплекс SI не может взаимодействовать с ферментом. В этом случае концентрацию свободного субстрата (s_f) можно выразить через полную концентрацию субстрата (s) и концентрацию комплекса SI (z):

$$s_f = s - z, \quad (8.78)$$

и, поскольку

$$z = \frac{s_f i}{K_i}, \quad (8.79)$$

концентрация свободного субстрата определится выражением

$$s_f = \frac{s}{(1 + i/K_i)}. \quad (8.80)$$

Если подставить это выражение в обычное уравнение Михаэлиса, то получим

$$v = \frac{V}{\frac{K_M}{s} (1 + i/K_i) + 1}. \quad (8.81)$$

Это выражение идентично уравнению для простого конкурентного ингибирования (8.6) и, следовательно, рассматриваемый тип ингибирования неотличим от него при обычных кинетических исследованиях. Целесообразно поэтому предварительно проверить, не происходит ли взаимодействие ингибитора с субстратом, прежде чем делать заключение о том, что наблюдаемое конкурентное ингибирование обусловлено конкуренцией ингибитора за участок связывания на ферменте. Одним из случаев, когда конкурентное ингибирование вызвано соединением ингибитора не с ферментом, а с субстратом, является ингибирование РНК-полимеразы этидиумбромидом; последний соединяется с субстратом — ДНК [2420].

НЕЛИНЕЙНАЯ КИНЕТИКА ИНГИБИРОВАНИЯ

Мы уже говорили о том, что, как правило, при частичном ингибировании графики зависимости обратной скорости от обратной концентрации являются линейными, однако вторичные графики зависимости наклонов или длин отрезков (в зависимости от механизма ингибирования) от i отклоняются от линейности вниз; такого же типа графики наблюдаются и для зависимости $1/v$ от i . Кроме того, известны случаи ингибирования, когда соответствующие кривые отклоняются от линейности вверх по параболическому закону. Эти типы ингибирования наблюдаются в тех случаях, когда к одной и той же форме (интермедиату) фермента может присоединяться не одна молекула ингибитора, а две или больше. Хотя для односубстратных ферментов подобная ситуация маловероятна, в более сложных ферментных системах она вполне возможна. Тем не менее целесообразно рассмотреть этот вопрос на примере односубстратной системы. Три возможные, однако маловероятные, системы, в которых две молекулы ингибитора связываются с одной и той же формой фермента, приведены вместе с соответствующими уравнениями в табл. 8.3. Эти уравнения для равновесных и для стационарных условий выведены с помощью методов, аналогичных рассмотренным выше. Их следует сопоставить с уравнениями для более простых механизмов, которые рассмотрены на с. 483—497. Для всех систем, приведенных в табл. 8.3, величины K_s , K_m и V равны k_{-1}/k_{+1} , $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ и k_{+2} соответственно, а K_i и K'_i равны k_{-3}/k_{+3} и k_{-4}/k_{+4} соответственно.

Отметим, что во все уравнения входят члены, содержащие i^2 , а величина s входит в эти уравнения (кроме случая «неконкурентно-конкурентного» механизма в стационарных условиях) только в первой степени. Следовательно, графики зависимости $1/v$ от $1/s$ будут линейными, а графики зависимости от i — параболическими. Например, для конкурентного ингибирования

Таблица 8.5

Кинетические уравнения для ферментных систем, в которых могут образовываться комплексы вида EI

Тип ингибирования	Кинетическое уравнение	
	в равновесных условиях	в стационарных условиях
1. Конкурентный $E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$ $k_{+3} \updownarrow k_{-3} \quad EI$ $k_{+4} \updownarrow k_{-4} \quad EI_2$	$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s} \left(1 + \frac{i}{K_i} + \frac{i^2}{K_i K'_i} \right)}$	Аналогичное, но K_s заменено на K_m
2. Неконкурентно-конкурентный $E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$ $k_{+3} \updownarrow k_{-3} \quad k_{+4} \updownarrow k_{-4} \quad EI \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} EIS$ $k_{+4} \updownarrow k_{-4} \quad EI_2$	$v = \frac{\frac{V}{(1 + i/K_i)}}{1 + \frac{K_s}{s} \frac{(1 + i/K_i + i^2/K_i K'_i)}{(1 + i/K_i)}}$	Очень сложное; см. с. 48 ^г
3. Бесконкурентный $E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$ $k_{+3} \updownarrow k_{-3} \quad EIS$ $k_{+4} \updownarrow k_{-4} \quad EI_2 T$	$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{i}{K_i} + \frac{i^2}{K_i K'_i}}$	Аналогичное, но K_s заменено на K_m

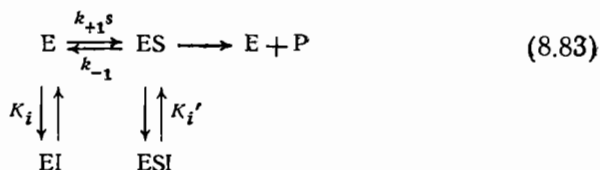
наклон графика зависимости $1/v$ от i будет равен

$$\text{Наклон} = \frac{K_M}{K_i} \frac{1}{s} \left(1 + \frac{i}{K_s'} \right) i, \quad (8.82)$$

т. е. он будет увеличиваться быстрее, чем i . В этих случаях, как и при частичном ингибировании, обычные графики двойных обратных величин для ряда фиксированных концентраций i являются линейными, поэтому для обнаружения отклонений от простых механизмов необходимо строить графики зависимости от i .

Графики, характеризующие действие ингибитора, не являются линейными и при неконкурентном (или смешанном) ингибировании в стационарных условиях; как обсуждалось выше (с. 490—491), в этом случае как i , так и s входят в кинетическое уравнение во второй степени, и, следовательно, графики двойных обратных величин и вторичные графики зависимости наклонов от i , а также графики зависимости $1/v$ от i не будут линейными (отклоняются вверх).

Для механизмов, в которых с разными промежуточными формами фермента связываются две или более молекул ингибитора, графики двойных обратных величин остаются линейными; например, для механизма



уравнение скорости в стационарных условиях имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s} \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) + \frac{i}{K_i'}}. \quad (8.84)$$

Оно получено в результате простого сложения эффектов, к которым приводит наличие в системе конкурентного и бесконкурентного ингибиторов [уравнения (8.6) и (8.46)]. Графики двойных обратных величин при ряде фиксированных концентраций i будут характерными для смешанного ингибирования.

Исходя из всего сказанного, можно сформулировать ряд общих принципов анализа данных по ингибированию.

1. Если с ферментом связывается только одна молекула ингибитора, то график Лайнуивера — Бэрка и график зависимости $1/v$ от i будут линейными, за исключением систем с частичным ингибированием или неупорядоченным связыванием ингибитора и субстрата с ферментом в стационарных условиях. Примерами последнего случая могут служить неконкурентное и смешанное

ингибирование с неупорядоченным связыванием реагентов с ферментом. В таких системах для стационарных условий получают уравнение, в которое входят как i^2 , так и s^2 и, следовательно, график двойных обратных величин и график зависимости $1/v$ от i могут оказаться нелинейными (см. также с. 625—642).

2. Если имеет место частичное ингибирование, т. е. если при связывании ингибитора образуется форма фермента, частично сохраняющая свою активность, то график двойных обратных величин будет линейным, но график зависимости $1/v$ от i будет отклоняться от линейности вниз, за исключением случая частичного бесконкурентного ингибирования (8.50), когда картина является более сложной (с. 503).

3. Если с одной и той же формой фермента связывается более одной молекулы ингибитора, графики двойных обратных величин будут линейными, а графики зависимости $1/v$ от i — параболическими.

4. Если ни одна из отдельно взятых форм фермента не может связать более одной молекулы ингибитора, графики двойных обратных величин и зависимости $1/v$ от i будут линейными, и наблюдаемое ингибирование будет отражать простое «сложение» отдельных типов ингибирования.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИНГИБИРОВАНИЯ

На активность фермента сильное влияние могут оказывать такие условия среды, как pH и ионная сила (см. гл. 4). В то время как возможное изменение pH среды при добавлении ингибитора обычно строго контролируется, на изменения ионной силы часто не обращают внимания. Следует, однако, иметь в виду, что в отличие от специфического обратимого ингибирования, наблюдаемое при увеличении ионной силы ингибирование обычно не характеризуется простой зависимостью от «концентрации» ингибитора; поэтому, сделав измерения при разных концентрациях ингибитора, можно показать, что величина K_i в действительности не является постоянной. Другой подход состоит в проведении исследований при достаточно высокой ионной силе; при этом изменения ионной силы, вызываемые добавлением ингибитора, оказываются незначительными.

ИНГИБИТОРЫ С ОЧЕНЬ ВЫСОКИМ СРОДСТВОМ

Для получения заметного эффекта ингибирования количество ингибитора в большинстве случаев должно быть очень большим по сравнению с количеством взятого фермента. Следовательно, количество ингибитора, связанного ферментом, всегда будет составлять лишь незначительную долю всего количества

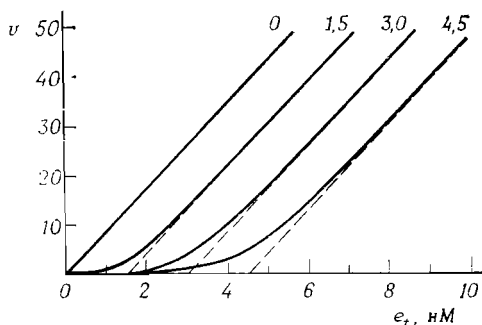


Рис. 8.8. Теоретические графики зависимости начальной скорости от суммарной концентрации фермента (e_t) в отсутствие ингибитора и при различных концентрациях прочно связывающегося ингибитора [3257]. Приведены данные для двухсубстратного фермента, функционирующего по механизму (8.69). $K_M^A=1,5$ мкМ; $K_i^A=0,5$ мкМ; $K_M^B=5$ мкМ; $V=10$ мкМ/мин на 1 нмоль фермента; $a=100$ мкМ; $b=30$ мкМ; $K_i=0,01$ нМ. Суммарные концентрации ингибитора (в нМ) указаны около каждой кривой. Пунктирные прямые — асимптоты, полученные расчетным путем (в присутствии ингибитора).

ингибитора, и в этих условиях концентрацию свободного ингибитора можно считать равной его полной концентрации. Из этого же допущения (аналогично допущению, которое обычно делают для концентрации субстрата при изучении кинетики действия ферментов) мы исходили и при выводе уравнений ингибирования.

В то же время ряд ингибиторов, например ингибиторы окислительного фосфорилирования рутамицин и бонгкрековая кислота [1899], антитела к специфическим ферментам [2436], аналоги переходного состояния [5136] и мощные ингибиторы холинэстераз [3309], имеют K_i порядка 10^{-9} М или меньше, так что молярности ингибитора и фермента могут быть величинами одного порядка. В этом случае связывание ингибитора ферментом может значительно уменьшить концентрацию свободного ингибитора, так что в уравнения, при выводе которых концентрация свободного ингибитора принималась равной его полной концентрации, придется ввести поправку. Детально проанализировав влияние прочно связывающихся ингибиторов, Голдштейн [1605] показал, что при $e_t/K_i \geq 0,001$, где e_t — полная концентрация фермента) положения теории Михаэлиса оказываются неприменимыми. Моррисон [3257] рассмотрел теоретические кривые, иллюстрирующие влияние концентрации фермента на начальную скорость реакции в присутствии различных количеств прочно связывающегося ингибитора; эти кривые приведены на рис. 8.8.

Кривые такого типа обсуждались ранее, и по виду графиков зависимости v от e_t в присутствии и в отсутствие ингибитора можно судить о наличии в системе прочно связывающегося

ингибитора. Асимптота кривой пересекает ось e_t в точке, соответствующей числу связанных молекул ингибитора. Следовательно, в условиях, при которых связывается практически весь ингибитор, этот подход может быть использован для определения концентрации связывающих участков фермента. Однако точность такого определения зависит от соотношения между концентрацией фермента и величиной K_i . Как видно из рис. 8.8, наклон кривой при более высоких концентрациях E и I отличается от наклона асимптоты, поскольку концентрация свободного ингибитора становится существенной.

Моррисон вывел также общее уравнение, описывающее влияние прочно связывающегося ингибитора на начальную скорость ферментативной реакции. Запишем уравнение скорости ферментативной реакции в виде

$$v = \frac{N e_t}{D}, \quad (8.85)$$

где в N входят константы скорости и концентрации субстратов, которые определяют V , а величина D в знаменателе является суммой членов, отражающих распределение фермента между разными его формами (свободным ферментом и его комплексами) [4922]. Тогда мы получим общее кинетическое уравнение, которое применимо при любом механизме, независимо от его сложности и числа участвующих в реакции субстратов. При наличии в системе ингибитора знаменатель уравнения (8.85) будет иметь в общем случае вид $D + N_i(i/K_i)$, а если ингибитор связывается не с одной, а с несколькими формами фермента, то $D + i \sum N_i/K_i$. Уравнение скорости при наличии прочно связывающегося ингибитора может быть выражено через полные концентрации ингибитора и фермента (i_t и e_t) следующим образом:

$$v^2 + N \left[\frac{1}{\sum \left(\frac{N_i}{K_i} \right)} + \frac{i_t - e_t}{D} \right] v - \frac{N^2 e_t}{D \sum \left(\frac{N_i}{K_i} \right)} = 0,$$

откуда

$$v = \frac{N}{2} \left[\sqrt{\left(\frac{1}{\sum \left(\frac{N_i}{K_i} \right)} + \frac{i_t - e_t}{D} \right)^2 + \frac{4 e_t}{D \sum \left(\frac{N_i}{K_i} \right)}} - \left(\frac{1}{\sum \left(\frac{N_i}{K_i} \right)} + \frac{i_t - e_t}{D} \right) \right]. \quad (8.86)$$

В N_i входят концентрация ингибитора и константы скорости, которые определяют долю фермента, находящегося в составе фермент-ингибиторного комплекса. Это уравнение было использо-

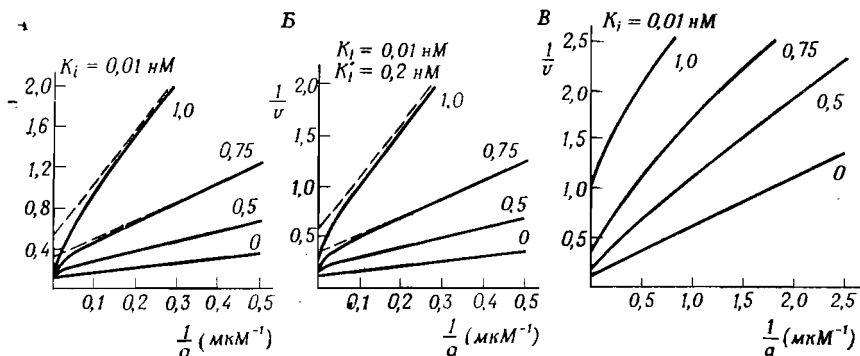


рис. 8.9. Теоретические графики двойных обратных величин для систем с прочно связывающимся ингибитором; концентрация фермента 1 нМ [3257]. Числа кривых — значения константы K_i . Рассматривается та же система, что и на рис. 8.8. А. Конкурентное ингибирование. Б. Смешанное ингибирование. В. Бесконкурентное ингибирование.

иано Моррисоном в качестве основы для вывода уравнений, описывающих влияние прочно связывающихся ингибиторов в системах с различными кинетическими механизмами. Он показал, что графики зависимости обратной скорости от обратной концентрации субстрата могут существенно отклоняться от прямой при наличии в системе прочно связывающегося ингибитора (см. рис. 8.9).

Гендерсон [1899], используя общее уравнение Моррисона, получил уравнение скорости односубстратной реакции в присутствии ингибитора:

$$v_i = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{K_M}{s}\right) + \frac{i}{s} \left(\frac{N_i}{K_i}\right)}, \quad (8.87)$$

где v_i и v_0 — начальные скорости в присутствии и в отсутствие ингибитора, i — концентрация свободного ингибитора. Это общее уравнение применимо ко всем односубстратным системам независимо от механизма ингибирования при условии, что с ферментом (с любым из его центров) связывается только одна молекула ингибитора.

Используя соотношение

$$i_t = \sum (EI) + i, \quad (8.88)$$

уравнение (8.87) можно преобразовать к виду

$$\frac{i_t}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = e + \left(\frac{K_M + s}{\sum \frac{N_i}{K_i}} \right) \frac{v_0}{v_i}. \quad (8.89)$$

Таблица 8.4

Кинетические уравнения для прочно связывающихся ингибиторов

Ингибирование	N_i/K_i	Кинетическое уравнение
Конкурентное	K_M/K_i	$\frac{i_t}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = e + K_i \left(\frac{s + K_M}{K_M} \right) \frac{v_0}{v_i}$
Неконкурентное	$(s + K_M)/K_i$	$\frac{i_t}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = e + K_i \left(\frac{v_0}{v_i} \right)$
Смешанное	$\frac{s}{K'_i} + \frac{K_M}{K_i}$	$\frac{i_t}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = e + \left(\frac{s + K_M}{\frac{K_M}{K_i} + \frac{s}{K'_i}} \right) \frac{v_0}{v_i}$
Бесконкурентное	s/K_i	$\frac{i_t}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = e + K_i \left(\frac{s + K_M}{s} \right) \frac{v_0}{v_i}$

Видно, что график зависимости $i_t/(1-v_i/v_0)$ от v_0/v_i является линейным и позволяет определить e_t , или, точнее, концентрацию связывающих участков фермента непосредственно по длине отсекаемого отрезка.

Выражения для N_i/K_i , которые аналогичны рассмотренным выше (с. 484—497), можно подставить в (8.89); в табл. 8.4 приведены эти выражения и полные кинетические уравнения для различных типов ингибирования.

Легко видеть, что характер семейств прямых, получаемых при построении графиков зависимости $i_t/(1-v_i/v_0)$ от v_0/v_i для разных концентраций s , будет указывать на тип ингибирования. В случае конкурентного ингибирования получают семейство прямых, которые проходят через общую точку e_t на оси ординат, причем их наклон увеличивается при увеличении s . Бесконкурентному ингибированию отвечает аналогичное семейство прямых, но наклон их уменьшается при увеличении s . При неконкурентном ингибировании наклон получаемой прямой не зависит от s . Примеры таких графиков и вторичных графиков зависимости наклонов прямых от s приведены на рис. 8.10. Преимущество метода состоит в том, что графики являются линейными. Был проведен детальный статистический анализ систем, подчиняющихся уравнению (8.89), и опубликованы программы

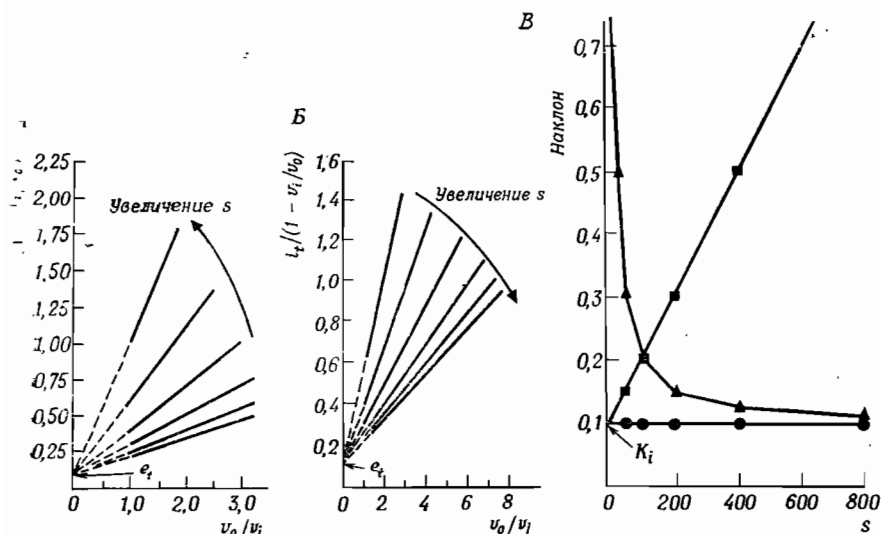


Рис. 8.10. Анализ действия прочно связывающегося ингибитора по методу Гендерсона [1899]. Графики построены по соответствующим уравнениям, приведенным в табл. 8.4, для простых односубстратных систем. При расчете использованы следующие значения приведенных ниже величин: $K_M=100$, $e_i=0,1$, $K_i=0,1$. Концентрация ингибитора (i_i) изменялась от 0,025 до 1,0, фиксированные концентрации субстрата составляли 25, 50, 100, 200, 400, 800. А. Конкурентное ингибирование. Б. Бесконкурентное ингибирование. В. Вторичные графики зависимости наклонов прямых на графиках А и Б от s для конкурентного (■), бесконкурентного (▲) и неконкурентного (●) ингибирования.

для ЭВМ, позволяющие оценить стандартные ошибки определяемых кинетических параметров [1900].

В случае ингибирования смешанного типа характер изменения наклонов графиков зависимости $i_i(1-v_i/v_0)$ от v_0/v_i при изменении концентрации субстрата зависит от относительных значений K_i и K'_i . Вторичные графики зависимости наклонов от s или от $1/s$ не являются линейными; однако обе ингибиторные константы можно определить путем экстраполяции линейных участков полученных кривых, поскольку при $s \rightarrow \infty$ величиной K_M/K_i можно пренебречь, и мы получим соотношение

$$\frac{i_i}{1-v_i/v_0} = e + \left(K'_i + \frac{K_M K'_i}{s} \right) \frac{v_0}{v_i}. \quad (8.90)$$

При $s \rightarrow 0$ можно пренебречь величиной s/K'_i , и тогда мы будем иметь

$$\frac{i_t}{1 - v_i/v_0} = e + \left(\frac{K_{is}}{K_M} + K_i \right) \frac{v_0}{v_i}. \quad (8.91)$$

Гендерсон отметил, что общее уравнение

$$\frac{i_t}{1 - v_i/v_0} = e + \left(\frac{D}{\sum \frac{N_i}{K_i}} \right) \frac{v_0}{v_i} \quad (8.92)$$

применимо и в тех случаях, когда имеет место взаимодействие прочно связывающихся ингибиторов не с одним, а с несколькими центрами фермента.

Диксон [1114] предложил графический метод анализа систем с конкурентным и неконкурентным ингибированием, который сходен с его же методом, разработанным для кинетических систем с прочно связывающимися субстратами (см. гл. 4). Рассматривается график зависимости v от i , который представляет собой кривую, начинающуюся из точки v_0 при $i=0$ и спадающую при увеличении i . Исходная скорость (v_0) не обязательно должна быть максимальной (V) — можно пользоваться и графиком ингибирования, полученным при ненасыщающей концентрации субстрата.

Для конкурентного ингибирования, осуществляющегося в соответствии с уравнением (8.1) в равновесных условиях, обозначим концентрацию комплекса ES через x , концентрацию комплекса EI — через y , концентрацию свободного фермента — через e_f :

$$v = k_{+2}x, \quad V = k_{+2}e_t \quad (8.93)$$

$$e_t = e_f + x + y, \quad (8.94)$$

$$i_t = i + y, \quad (8.95)$$

$$v_0 = \frac{V}{1 + K_M/s}. \quad (8.96)$$

Решая эти уравнения обычным путем, получим

$$\frac{i_t}{V - v \left(1 + \frac{K_M}{s} \right)} = \frac{K_{is}}{vK_M} + \frac{1}{k_{+2}}. \quad (8.97)$$

График зависимости v от i имеет вид, представленный на рис. 8.11, А. Выберем на кривой точку, соответствующую такому n , что

$$v' = \frac{v_0}{n} = \frac{V}{n(1 + K_M/s)}. \quad (8.98)$$

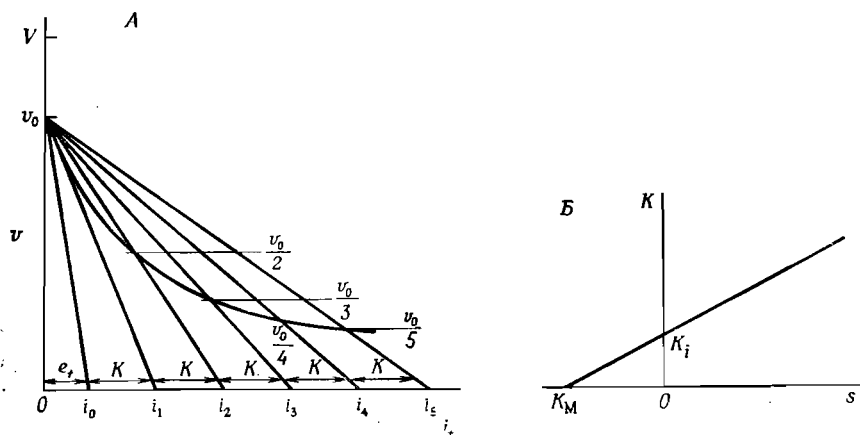


Рис. 8.11. Графическое определение K_i для ингибитора с сильным сродством по методу Диксона [1114]. А. По оси ординат отложена скорость ферментативной реакции, по оси абсцисс — суммарная концентрация ингибитора. Для неконкурентного ингибитора $K=K_i$, для конкурентного ингибитора K_i можно определить из зависимости K от s , как показано на рис. Б.

Для этой точки

$$\frac{i_t'}{v - v' \left(1 + \frac{K_M}{s}\right)} = \frac{i_t'}{v \left(1 - \frac{1}{n}\right)} = \frac{i_t'}{V} \cdot \frac{n}{n-1} = K_i \frac{s}{K_M} \cdot \frac{n}{v_0} + \frac{1}{k_{+2}}, \quad (8.99)$$

где i_t' равно i_t в точке n .

Если провести прямую из точки v_0 через точку $\frac{v_0}{n}$, то горизонтальную ось она пересечет в точке i_n , откуда из геометрических соображений получим

$$i_n = \left(\frac{n}{n-1}\right) i_t' \quad (8.100)$$

и, следовательно,

$$i_n = nK_i \frac{s}{K_M} \cdot \frac{V}{v_0} + e_i = nK_i \left(1 + \frac{s}{K_M}\right) + e_i. \quad (8.101)$$

Таким образом, расстояния между точками на горизонтальной оси, полученными при пересечении ее семейством прямых, для которых n отличается на единицу (т. е. проведенными через точки кривой $v_0/2, v_0/3, v_0/4$ и т. д.), будут одинаковыми. Это расстояние (обозначим его через K) равно

$$K = i_n - i_{n-1} = K_i \left(1 + \frac{s}{K_M}\right). \quad (8.102)$$

Следовательно, если K_M известно, легко найти K_i . Вследствие

«конкурентного» действия субстрата величина K , конечно, зависит от его концентрации, и если K_M неизвестна, то, определив K при разных концентрациях субстрата и отложив ее в зависимости от s , мы получим прямую, которая пересекает оси в точках K_i и K_M (рис. 8.11, Б).

Для определения концентрации фермента через точки на кривой, соответствующие $v=v_0/2$, $v_0/3$ и т. д., и точку v_0 следует провести прямые, затем из абсциссы точки пересечения i_2 вычесть K и найти точку с абсциссой i_1 , через которую проходит касательная к начальной части графика (рис. 8.11); далее нужно вычесть K из абсциссы i_1 и найти тем самым искомую концентрацию e .

Для систем с неконкурентными ингибиторами, описываемых (8.17), уравнение ингибирования имеет вид

$$\frac{i_i}{v-v\left(\frac{1+K_M}{s}\right)} = \frac{K_i s}{V(K_M+s)} + \frac{1}{k_{+2}}. \quad (8.103)$$

Это уравнение аналогично (8.97), но вместо s/K_M в него входит $s/(K_M+s)$. Анализ ингибирования по методу, рассмотренному выше для конкурентного ингибирования, приводит к уравнению

$$i_n = nK_i \frac{s}{K_M+s} \cdot \frac{V}{v_0} + e_i. \quad (8.104)$$

Подставляя

$$\frac{V}{v_0} = \frac{K_M+s}{s}, \quad (8.105)$$

получаем

$$i_n = nK_i + e_i, \quad (8.106)$$

откуда

$$K = i_n - i_{n-1} = K_i. \quad (8.107)$$

Таким образом, в данном случае K_i определяется непосредственно из графика.

Диксон показал, как с помощью данного метода можно прямым путем определить концентрации всех присутствующих в системе компонентов (см. рис. 8.12). При анализе конкурентного ингибирования для этого нужно провести прямые из точки i_0 через точки v_0 и $V_{\max}$ и определить концентрации реагентов так, как это показано на рисунке. В случае неконкурентного ингибирования, поскольку

$$\frac{y}{z} = \frac{e_f}{x} = \frac{K_M}{s} = \frac{V_{\max} - v_0}{v_0}. \quad (8.108)$$

(где z — концентрация комплекса ESI), следует провести еще

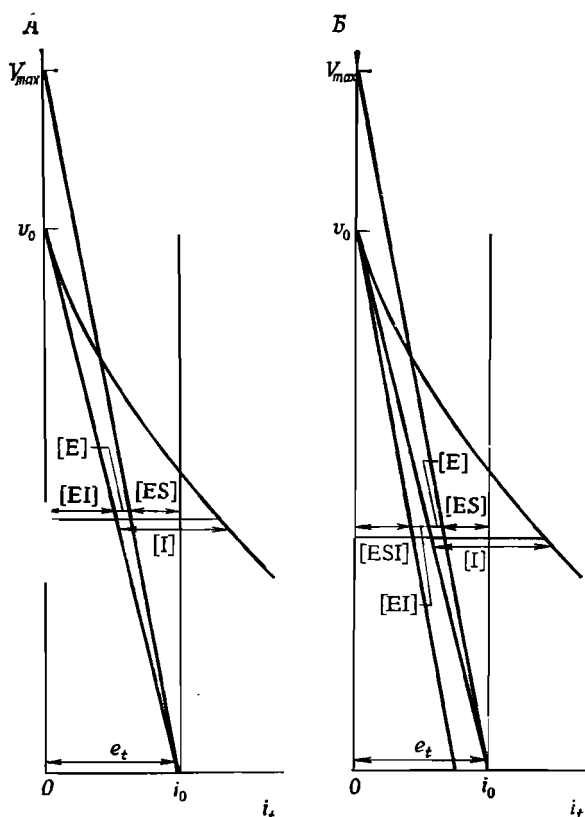


Рис. 8.12. Метод определения концентраций компонентов в различных точках графика зависимости скорости от концентрации ингибитора [1114]. Приведена часть рис. 8.11, А в увеличенном масштабе. А. Конкурентное ингибирование. Б. Неконкурентное ингибирование.

одну прямую из точки v_0 , параллельную прямой, соединяющей $V_{\max}$ и i_0 , и по графику определить все шесть концентраций.

Метод Диксона имеет ряд преимуществ. Он весьма прост и не требует много времени: необходимо провести лишь несколько прямых на обычном графике зависимости v от i . Никакие математические выкладки [уравнения (8.93)–(8.102)] при определении искомых величин не используются. Метод достаточно универсален, поскольку он в равной мере применим в случаях как «обычных», так и прочно связывающихся ингибиторов; таким образом, он позволяет избежать ошибок, связанных с предположением, согласно которому $i = i_t$. Наконец, с помощью этого метода можно определить концентрации различных форм фермента в любой точке кривой ингибирования, если ингибитор

является прочно связывающимся. Если же он не является таковым, то точка i_0 приближается к нулю; это показывает, что концентрации форм фермента пренебрежимо малы по сравнению с концентрацией ингибитора. Не следует, однако, думать, что с помощью этого метода (как и других графических методов) можно получить столь же точные данные, как и при использовании более сложных статистических методов. Подобно всем графическим методам, метод Диксона нельзя применять для анализа систем с очень сложной кинетикой, которые трудно охарактеризовать такими параметрами, как K_m или K_i .

ВЛИЯНИЕ pH НА ИНГИБИРОВАНИЕ

Характер ингибирования ферментов может заметно изменяться в зависимости от pH; в случае необратимого ингибирования эти изменения бывают иногда выражены не менее сильно, чем в случае обратимого ингибирования. При необратимом ингибировании скорость взаимодействия ингибитора с ферментом может зависеть от pH либо потому, что различные ионные формы фермента реагируют с ингибитором с разными скоростями, либо потому, что сам ингибитор подвергается ионизации. Количественный анализ в этом случае может быть проведен таким же путем, как и при выяснении влияния pH на k_{+2} [уравнение (4.254) и последующие].

В случае обратимого ингибирования влияние pH может проявляться по-разному в зависимости от механизма действия самого ингибитора. Если ингибитор действует, уменьшая V , то pH может влиять на ингибирование либо через уменьшение $\tilde{k}_{+2}$, либо через изменение K_{es1} или K_{es2} [уравнение (4.256)]. Влияние только на $\tilde{k}_{+2}$ будет иметь место, если скорость распада активных ионных форм EIS окажется меньшей, чем скорость распада активных ионных форм ES; эффективная величина $\tilde{k}_{+2}$ будет тогда занимать промежуточное положение между $\tilde{k}_{+2}$ для ES и $\tilde{k}_{+2}$ для EIS. Обе эти величины не зависят от pH, но эффективная величина $\tilde{k}_{+2}$ будет изменяться с pH, если под влиянием pH K_i изменяется. Следовательно, при изменении pH эффективная величина $\tilde{k}_{+2}$ может изменяться от $\tilde{k}_{+2}$ для ES до $\tilde{k}_{+2}$ для EIS.

На K_{es1} и K_{es2} ингибитор может влиять либо в результате прямого соединения с кислотной или основной группой в активном центре, либо в результате соединения с группой, расположенной по соседству. И в этом случае эффективные значения этих констант будут лежать между соответствующими величинами для ES и EIS, а характер изменения кривой pH — активность будет таким же, как при неспецифическом действии анионов (см. с. 564; ср. рис. 8.27). Влияние pH на ингибирование будет в этом случае весьма заметным; сдвиг кривой pH — ак-

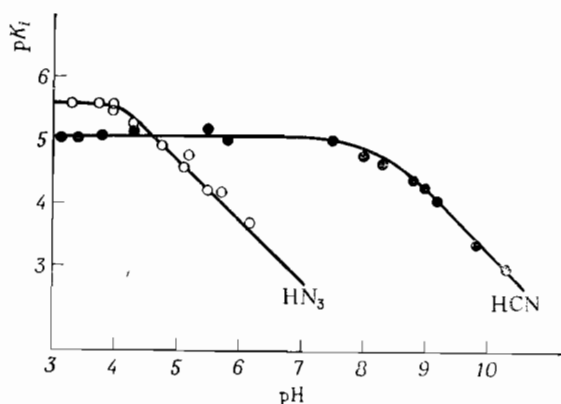


Рис. 8.13. Влияние pH на ингибирование каталазы под действием NH_3 и HCN [727].

тивность может даже указывать, что данное вещество, действующее как ингибитор при одном pH, при другом значении pH будет действовать как активатор.

При ингибировании конкурентного типа комплекс EIS не образуется, но эффективная константа Михаэлиса K_p может изменяться с pH, если изменяется либо K_m , либо K_i , потому что если при изменении pH изменяется сродство фермента к субстрату или к ингибитору, то и степень ингибирования должна измениться. Интерпретация влияния pH на K_m с учетом величин pK для групп, у которых при соединении фермента с субстратом изменяется степень ионизации, уже обсуждалась в гл. 4. Там же было отмечено, что подобный анализ применим и к интерпретации влияния pH на K_i с учетом величин pK для групп, у которых степень ионизации изменяется при соединении фермента с ингибитором [уравнения (4.269) — (4.270)]. На графике зависимости rK_i от pH величины pK этих групп определяются по положению точек перегиба; правила, изложенные на с. 222—223, применимы также и к этому графику. В качестве иллюстрации на рис. 8.13 приведены кривые зависимости rK_i от pH, заимствованные из работы Чанса [727], для ингибирования каталазы азотоводородной и синильной кислотами. Точка перегиба на каждой кривой приблизительно соответствует pK ингибитора. Форма кривых указывает на то, что соединение со свободной кислотой происходит без какого-либо изменения заряда, тогда как соединение с анионом ингибитора приводит к образованию нейтрального соединения и исчезновению отрицательного заряда.

Массей ([3012], рис. 2 и 3) опубликовал ряд кривых зависимости rK_i от pH для ингибирования фумаратгидратазы раз-

личными двухосновными кислотами. Эти данные наглядно иллюстрируют, как велика роль рН при ингибировании ферментов, и показывают, в чем она может проявляться; следует только учесть, что действие фумаратгидратазы осложняется наличием анионных эффектов (подробнее об этом см. ниже). К сожалению, очень мало других ингибиторов изучалось под таким углом зрения. Между тем подобное изучение могло бы пролить свет на природу активного центра ферментов и на механизм действия конкурентных ингибиторов. В связи с этим следует отметить, что определение K_i имеет преимущество перед определением K_m , ибо первая из этих величин всегда представляет собой истинную константу равновесия, характеризующую сродство фермента и ингибитора, и не содержит кинетического элемента, который может оказывать влияние на K_m .

НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

В том случае, когда ингибирование обусловлено связыванием одной молекулы необратимого ингибитора на молекулу фермента, реакцию можно представить в следующем виде:



Если обозначить концентрацию $E-I$ через z , то уравнение скорости его образования будет представлять собой уравнение второго порядка

$$\frac{dz}{dt} = k(e-z)(i-z).$$

После интегрирования получим

$$kt = \frac{1}{i-e} \ln \frac{i(e-z)}{e(i-z)}. \quad (8.110)$$

Методы анализа таких уравнений второго порядка рассматривались в гл. 4.

Для упрощения системы обычно считают, что количество ингибитора значительно превышает количество фермента; тогда получается уравнение псевдопервого порядка (с. 268), и интегральное уравнение упрощается до

$$k't = \ln(e-z) - \ln e \quad (8.111)$$

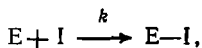
где k' — константа скорости псевдопервого порядка, которую можно определить из наклона графика зависимости $\ln(e-z)$ от t .

Выше уже отмечалось, что действие необратимых ингибиторов можно ошибочно принять за действие неконкурентных ингибиторов; в таких случаях рассчитанное значение K_i не имеет

смысла, поскольку отсутствует диссоциация фермент-ингибиторного комплекса. Очевидно, что величина « K_i », рассчитанная для системы с необратимым ингибитором, будет зависеть от концентрации фермента, продолжительности инкубации фермента и ингибитора (до начала определения активности фермента) и в тех случаях, когда субстрат защищает фермент от ингибирования, от концентрации субстрата; в то же время истинная константа K_i не зависит от всех этих параметров. Следовательно, прежде чем пытаться определять K_i , необходимо доказать, что ингибитор обратимо взаимодействует с ферментом. Наиболее простой путь — это показать, что ингибирование можно обратить путем диализа или гель-фильтрации. Можно также исследовать, происходит ли восстановление активности при разведении, поскольку только при обратимом ингибировании разведение смеси будет вызывать некоторую диссоциацию комплекса фермент—ингибитор.

Признаком необратимости ингибирования нередко является увеличение во времени степени ингибирования, однако этот признак не может рассматриваться как однозначное доказательство данного механизма. Например, нелинейный график хода реакции может быть обусловлен тем, что при связывании ингибитора с продуктом реакции образуется обратимый ингибитор [4749]. Увеличение во времени степени ингибирования может наблюдаться также в том случае, когда добавленное к системе соединение само не является эффективным ингибитором, однако превращается в обратимый ингибитор под действием фермента [4749].

Если необратимый ингибитор взаимодействует с какой-то группой активного центра, то присутствие субстрата или конкурентного ингибитора будет защищать фермент от ингибирования, замедляя этот процесс. По эффективности защитного действия можно определить константу диссоциации комплекса фермента с «защитающим» соединением [3157]. Рассмотрим систему



где A — либо субстрат, либо конкурентный ингибитор фермента; по условию необратимый ингибитор может связываться только со свободным ферментом. Можно записать, что

$$e = e_f + x + z, \quad x = \frac{e_f a}{K_s}, \quad (8.113)$$

где e и e_f — полная концентрация фермента и концентрация свободного фермента соответственно, x — концентрация комп-

лекса EA , z — концентрация необратимо ингибированного фермента ($E-I$). Решая уравнение (8.113) относительно e_f , получаем

$$e_f = \frac{(e-z)K_s}{K_s + a}. \quad (8.114)$$

Поскольку необратимый ингибитор соединяется только со свободным ферментом, то

$$-\frac{de_f}{dt} = ke_f i = k' e_f, \quad (8.115)$$

где i — концентрация необратимого ингибитора; предполагается, что реакция протекает в соответствии с кинетикой псевдопервого порядка.

В отсутствие A (8.115) можно записать в виде

$$-\frac{de_f}{dt} = k' (e-z), \quad (8.116)$$

а при наличии A , подставляя (8.114) в (8.115), находим

$$-\frac{de_f}{dt} = \frac{k'K_s}{K_s + a} (e-z). \quad (8.117)$$

Уравнение (8.117) можно записать в виде

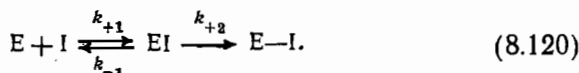
$$-\frac{de_f}{dt} = k'_{\text{каж}} (e-z), \quad (8.118)$$

где $k'_{\text{каж}}$ — кажущаяся константа скорости реакции псевдопервого порядка, которую можно определить по графику зависимости $\ln(e-z)$ от времени. Поскольку

$$\frac{1}{k'_{\text{каж}}} = \frac{1}{k'} + \frac{a}{K_s k'}, \quad (8.119)$$

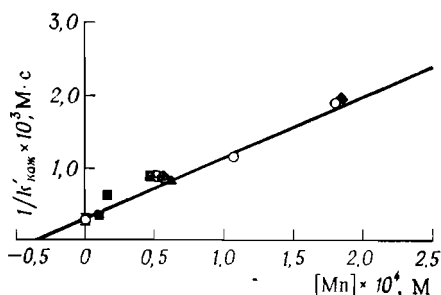
то график зависимости $1/k'_{\text{каж}}$ от a будет иметь наклон $1/K_s k'$ и отсекает от оси $1/k'_{\text{каж}}$ отрезок длиной $1/k'$, а от оси a — отрезок длиной $-K_s$. Рис. 8.14 иллюстрирует применение этого метода на практике. Милдван и Лейг [3157], использовали необратимый ингибитор, n -хлормеркурибензоат, для определения константы диссоциации комплекса пируваткиназы (K_F 2.7.1.40) с Mn^{2+} .

Реакцию связывания необратимого ингибитора с ферментом можно рассматривать как процесс, на первом этапе которого образуется нековалентный комплекс (EI), а на втором происходит ковалентное связывание фермента с ингибитором:



В ряде случаев удается исследовать каждую из стадий по отдельности [250, 2480]. Стадию обратимого взаимодействия фер-

Рис. 8.14. Определение константы диссоциации комплекса пироваткиназы с Mn^{2+} [3157]. Приведена зависимость величины, обратной константе скорости псевдопервого порядка ($K'_{каж}$), от концентрации Mn^{2+} для необратимого ингибирования фермента *n*-хлормеркурибензоатом.



мента и ингибитора можно изучать, определяя влияние, которое оказывает изменение концентрации ингибитора на скорость необратимого ингибирования. Скорость второй стадии (необратимое ингибирование) зависит от концентрации нековалентного комплекса EI (y):

$$\frac{dz}{dt} = k_{+2}y, \quad (8.121)$$

где y и z — концентрации комплексов EI и $E-I$ соответственно. В том случае, когда превращение EI в $E-I$ происходит относительно медленно по сравнению с распадом EI на свободный фермент и ингибитор ($k_{+2} \ll k_{-1}$), первая стадия реакции будет находиться в равновесии, поэтому можно записать

$$K_i = \frac{(e-y)i}{y}, \quad (8.122)$$

и, следовательно,

$$y = \frac{e}{1 + K_i/i}. \quad (8.123)$$

Подставляя (8.123) в (8.121), находим

$$\frac{dz}{dt} = \frac{k_{+2}e}{1 + K_i/i} \quad (8.124)$$

и после интегрирования получаем

$$k_{набл}t = \ln(e - z), \quad (8.125)$$

где

$$k_{набл} = \frac{k_{+2}}{1 + K_i/i}. \quad (8.125 а)$$

Следовательно, зависимость наблюдаемой константы скорости первого порядка ($k_{набл}$) от i будет иметь гиперболический характер. Если (8.125 а) представить в обратной форме

$$\frac{1}{k_{набл}} = \frac{1}{k_{+2}} + \frac{K_i}{i} \cdot \frac{1}{k_{+2}}, \quad (8.126)$$

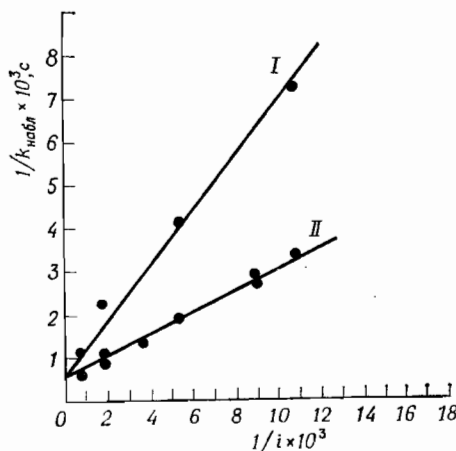
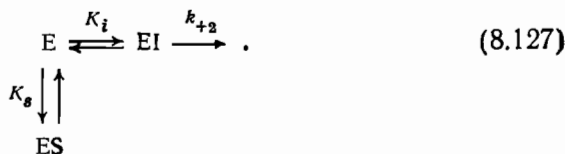


Рис. 8.15. График зависимости $1/k_{\text{набл}}$ от $1/i$ для системы, подчиняющейся уравнениям (8.126) и (8.129) [2480]. Ингибирование ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) (3-гидроксифенил)триметиламмонийдид-метаисульфатом в присутствии (I) и в отсутствие (II) конкурентного ингибитора — тетраметиламмонийиодида (2,4 мМ).

то из графика зависимости $1/k_{\text{набл}}$ от $1/i$ можно будет определить k_{+2} и K_i . Пример такого графика приведен на рис. 8.15. Следует отметить, что в том случае, когда процесс ингибирования протекает без образования нековалентного комплекса, а в соответствии с уравнением (8.106), константа скорости реакции псевдопервого порядка будет линейно возрастать с увеличением концентрации ингибитора.

Если в системе имеется субстрат или конкурентный ингибитор, который препятствует связыванию необратимого ингибитора, то система может быть представлена следующей схемой:



В этом случае

$$k_{\text{набл}} = \frac{k_{+2}}{1 + \frac{K_i}{i} \left(1 + \frac{s}{K_s}\right)} \quad (8.128)$$

или в обратной форме

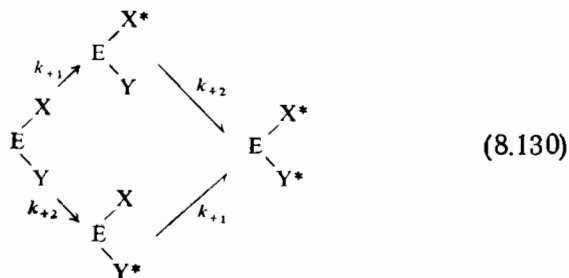
$$\frac{1}{k_{\text{набл}}} = \frac{1}{k_{+2}} + \frac{K_i}{k_{+2}} \left(1 + \frac{s}{K_s}\right) \frac{1}{i}. \quad (8.129)$$

Это уравнение можно сопоставить с уравнением (8.119), описывающим систему, в которой конкурентный ингибитор также защищает фермент, однако отсутствует стадия образования нековалентного комплекса ингибитора с ферментом. Из уравнения

(8.129) следует, что график зависимости $1/k_{\text{набл}}$ от $1/i$ имеет наклон $K_i(1+s/K_s)/k_{+2}$ и отсекает от оси $1/k_{\text{набл}}$ отрезок длиной $1/k_{+2}$ (рис. 8.15). Если построить ряд таких графиков при нескольких фиксированных концентрациях s , а затем построить вторичный график зависимости наклонов первичного графика от s , то наклон этого вторичного графика будет равен $K_i/k_{+2}K_s$, а длины отрезков, отсекаемых от оси наклонов и оси s , будут равны K_i/k_{+2} и $-K_s$ соответственно; в результате могут быть определены все три константы, входящие в уравнение (8.129).

Используя соединения, которые необратимо реагируют с остатками определенных аминокислот в ферменте, можно получить информацию о природе тех остатков, которые участвуют в каталитическом процессе. Известно большое число соединений, специфически реагирующих с боковыми группами определенных аминокислотных остатков в белках; подробный перечень таких соединений приведен в работах [814, 3094, 4465]. К сожалению, лишь немногие из этих реагентов являются абсолютно специфичными по отношению к одному типу боковых групп аминокислот, а те, которые обладают такой специфичностью, обычно реагируют с боковыми группами нескольких одноименных аминокислот. Следовательно, нужен метод, позволяющий устанавливать корреляцию между утратой ферментативной активности и степенью модификации боковых групп индивидуальных аминокислот в ферменте.

Кинетический метод анализа данных такого рода предложили Рей и Кошланд [3841]. Фермент инкубируют с избытком ингибитора, так что модификация протекает как реакция псевдопервого порядка; через заданные интервалы времени определяют остаточную активность и степень модификации всех атакуемых остатков. Очевидно, что в том случае, когда модифицируется только одна аминокислота и ее модификация приводит к потере активности, изменение активности описывается уравнением типа (8.111). Если для активности важны два остатка (X и Y) и они модифицируются реагентом с разной скоростью (обозначим константы скорости соответствующих процессов через k_{+1} и k_{+2}), то систему можно представить в следующем виде:



(звездочками обозначены модифицированные остатки). По-

сколько потеря активности происходит при модификации любого из остатков, можно записать

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_A t} = (e^{-k_{+1} t}) (e^{-k_{+2} t}), \quad (8.131)$$

где A и A_0 — активности фермента в момент времени t и t_0 , а k_A — константа скорости псевдопервого порядка процесса потери активности. Это выражение можно записать также в виде

$$\ln(A_0 - A) = k_A t = k_{+1} t + k_{+2} t. \quad (8.132)$$

Следовательно, константа скорости псевдопервого порядка процесса потери активности равна сумме констант скоростей реакции модификации важных для активности остатков. Для фермента, содержащего n таких остатков, реагирующих с ингибитором, уравнение (8.131) переходит в

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_A t} = (e^{-k_{+1} t}) (e^{-k_{+2} t}) \dots (e^{-k_{+n} t}). \quad (8.133)$$

Примеры системы, в которой имеются четыре остатка, реагирующих с разными скоростями, рассмотрены на рис. 8.16; видно, что сумма констант скоростей первого порядка для реакции двух из этих остатков (k_{+1} и k_{+2}) равна константе скорости процесса потери активности (k_A); это свидетельствует о том, что модификация любого из этих остатков приводит к потере активности. Хотя константа скорости модификации третьего остатка (k_{+3}) меньше k_A и в рассматриваемом гипотетическом случае $k_{+1} + k_{+2} = k_A$, неизбежные ошибки эксперимента при определении констант скорости не позволяют исключить возможности, что модификация третьего остатка также приводит к потере активности. В то же время, поскольку четвертый остаток модифицируется со скоростью k_{+4} , превышающей скорость потери ферментом активности, можно заключить, что модификация этого остатка не может прямым путем вызывать потери активности. Следует отметить, что рассматриваемый метод позволяет также определить, сколько остатков данного типа важны

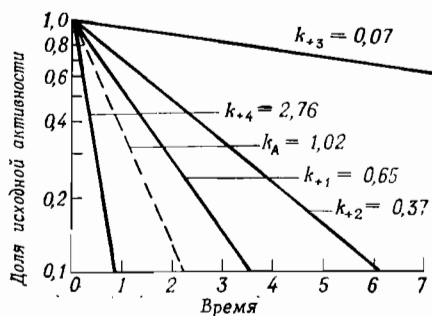


Рис. 8.16. Модификация четырех аминокислотных остатков фермента химическим реагентом; модификация любых двух остатков (константы скорости модификации k_{+1} и k_{+2}) приводит к потере активности ($k_A = k_{+1} + k_{+2}$) [3841].

для активности. Так, если фермент содержит n остатков данной аминокислоты и все они реагируют с модифицирующим реагентом с одинаковой скоростью (k_{+1}), однако только один из них важен для активности, то уравнение для процесса потери активности будет иметь вид

$$\ln(A_0 - A) = k_A t = k_{+1} t. \quad (8.134)$$

Если же для активности важны два остатка, уравнение процесса потери активности будет иным:

$$\ln(A_0 - A) = k_A t = 2k_{+1} t. \quad (8.135)$$

Рей и Кошланд [3841]¹ рассмотрели ряд других возможных механизмов потери активности вследствие модификации боковых групп аминокислотных остатков. Так, в системе (8.130) обе

формы, $E \begin{smallmatrix} X^* \\ \backslash \\ Y \end{smallmatrix}$ и $E \begin{smallmatrix} X \\ \backslash \\ Y^* \end{smallmatrix}$, могут быть полностью активными, в

то время как форма $E \begin{smallmatrix} X^* \\ \backslash \\ Y^* \end{smallmatrix}$ — неактивной. Тогда

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_A t} = e^{-k_{+1} t} + e^{-k_{+2} t} - e^{-(k_{+1} + k_{+2}) t}. \quad (8.136)$$

При этом график зависимости $\ln \frac{A}{A_0}$ от t не является линейным, а имеет вид, представленный на рис. 8.17; наклон кривой, определяемый меньшей из констант (k_{+2}), становится постоянным лишь при очень больших t . Другая, более сложная ситуация наблюдается в том случае, когда модификация остатка приводит

к частичной инактивации фермента. Так, если форма $E \begin{smallmatrix} X^* \\ \backslash \\ Y \end{smallmatrix}$ об-

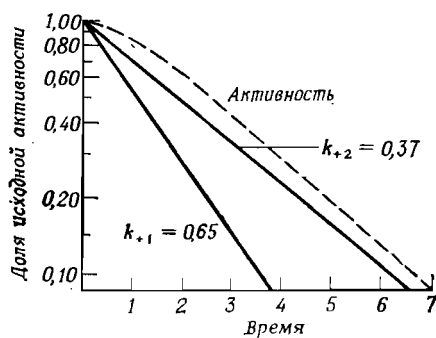


Рис. 8.17. Кинетические кривые ингибирования для системы, подчиняющейся уравнению (8.136), полученные расчетным путем [3841].



Рис. 8.18. Кинетическая кривая ингибирования для системы, подчиняющейся уравнению (8.137), полученная расчетным путем [3841].

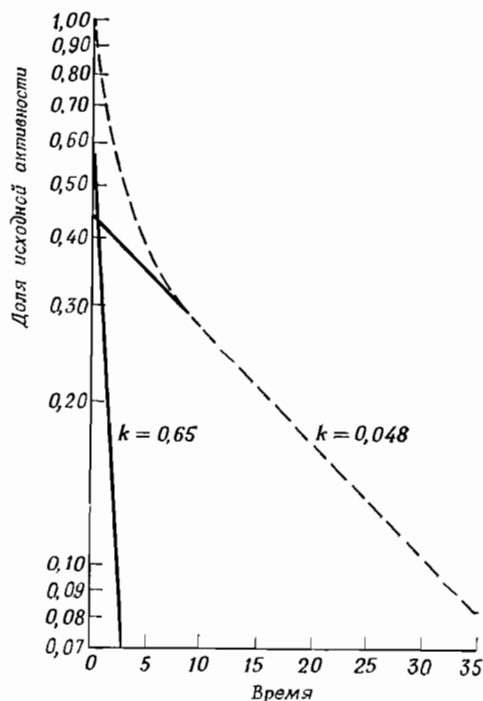
ладает неполной активностью (A'), а формы $E \begin{matrix} \nearrow X \\ \searrow Y^* \end{matrix}$ и $\begin{matrix} \nearrow X^* \\ \searrow Y^* \end{matrix}$ неактивны, то уравнение для процесса потери активности имеет вид

$$\frac{A}{A_0} = (1 - A') e^{-(k_{+1} + k_{+2})t} + A' e^{-k_{+2}t}. \quad (8.137)$$

График зависимости $\ln \frac{A}{A_0}$ от t не будет линейным; если две константы скорости значительно различаются, он будет состоять из двух участков, как это показано на рис. 8.18; отметим, что наклон кривой при больших t определяется меньшей из двух констант скорости, а начальный наклон равен $(k_{+1} + k_{+2} - A'k_{+1})$.

Нелинейные графики для модификации определенного типа остатков наблюдаются также в том случае, когда эти остатки реагируют с разными скоростями; если при этом константы скорости модификации значительно различаются, то при больших t наклон кривой определяется только наименьшей из констант скорости. Экстраполируя линейный участок при $t \rightarrow 0$, можно определить долю остатков, скорость модификации которых характеризуется данной константой скорости; далее, вычитая соответствующие величины из суммарной кривой, можно найти константу скорости более быстрой реакции, как показано на рис. 8.19.

Рис. 8.19. Сложная модификация 13 остатков одного типа, 7 из которых реагируют с константой скорости $k=0,65$, а 6 — с константой скорости $k=0,048$. По наклону кривой при больших t путем экстраполяции определяют меньшую константу скорости и долю остатков, реагирующих с данной скоростью; вычитая соответствующие величины из суммарной кривой, получают константу скорости модификации остатков первой группы. Отрезки на оси ординат, равные $7/13$ и $6/13$, указывают числа остатков в соответствующих группах.



Рей и Кошланд рассмотрели также некоторые другие механизмы реакций модификации, приводящих к потере активности; предложенный ими метод анализа нашел применение для идентификации аминокислотных остатков, необходимых для активности индивидуальных ферментов [2572]. Метод применим в тех случаях, когда реагенты модифицируют остатки аминокислот достаточно медленно, чтобы можно было проследить за динамикой уменьшения активности; кроме того, реагенты должны вводиться в систему в достаточно большом количестве, чтобы процесс протекал в соответствии с кинетикой псевдопервого порядка.

Другой подход к установлению корреляции между степенью модификации специфических аминокислотных остатков и активностью ферментов был предложен Тсоу [4801]. В рамках этого подхода не нужно определять скорости реакций модификации и ингибирования, необходимы только данные о степени модификации различных аминокислотных остатков и об активности фермента на разных этапах процесса. В наиболее простом случае модифицируется лишь один тип остатков и все остатки данного типа одинаково реакционноспособны. Если некоторые из этих остатков необходимы для активности и модификация любого из

них приводит к полной потере активности, то доля молекул фермента, у которых все важные для активности группы интактны, будет соответствовать остающейся доле активности (a). Если из общего числа L реакционноспособных групп для активности важны n групп, то (при условии, что все L групп одинаково реакционноспособны) доля оставшихся немодифицированными необходимых для активности групп (l_e) будет равна доле всех немодифицированных групп данного вида (l) и активными будут только те молекулы, у которых интактны все важные для активности группы. Следовательно,

$$a = l_e^n, \quad \text{или} \quad a^{1/n} = l_e, \quad (8.138)$$

и

$$a^{1/n} = l. \quad (8.139)$$

Таким образом, если построить график зависимости $\lg a$ от $\lg l$, то наклон полученной прямой будет указывать число групп, необходимых для активности фермента (n). Можно также построить графики зависимости a , $\sqrt[n]{a}$, $\sqrt[n]{a}$ и т. д. от l и, выбрав тот из них, который наиболее близок к прямой, определить тем самым n .

Этот метод применим и в тех случаях, когда скорости модификации реакционноспособных групп значительно различаются. Пусть, например, имеется l реакционноспособных групп, которые можно разделить на три типа: тип h , группы которого реагируют с модификатором со значительно большей скоростью, чем группы всех других типов, и не являются необходимыми для активности, тип j , группы которого реагируют значительно медленнее, причем n групп этого типа необходимы для активности, и тип $l-h-j$, группы которого реагируют с модификатором медленнее или не реагируют вообще и не являются необходимыми для активности. После модификации определенной части групп, необходимых для активности, соотношение между суммарной долей оставшихся немодифицированными групп ($\tilde{l}$) и долей оставшихся немодифицированными групп, необходимых для активности (l_e), будет определяться выражением

$$\tilde{l} = \frac{l_e + (l - j - h)}{l}. \quad (8.140)$$

После подстановки $a^{1/n}$ вместо l_e и соответствующего преобразования получим

$$a^{1/n} = \frac{l \cdot \tilde{l} - (l - j - h)}{j}. \quad (8.141)$$

Следовательно, график зависимости $a^{1/n}$ от $\tilde{l}$ будет представлять

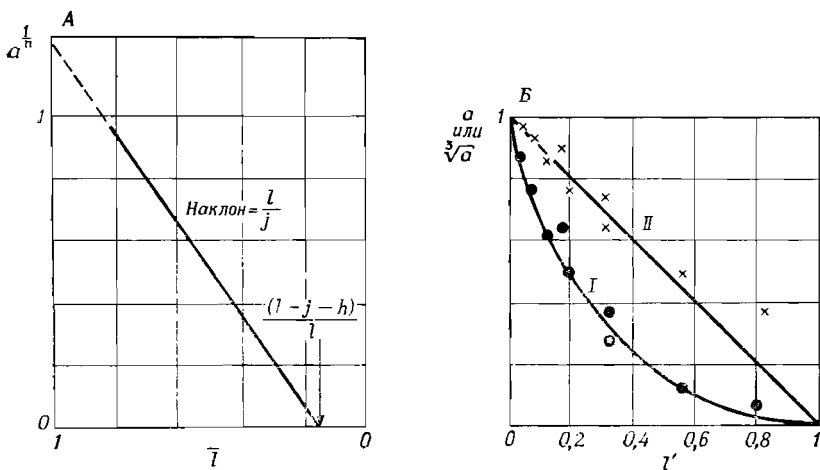


Рис. 8.20. А. Соотношение между долей исходной активности (a) и долей немодифицированных групп (l) для системы модификатор—фермент, описываемой уравнением (8.141). Б. Соотношение между долей исходной активности и числом модифицированных групп на молекулу фермента (l') для системы, описываемой уравнением (8.143). I — график зависимости a от l' , II — график зависимости $\sqrt[3]{a}$ от l' , из которого видно, что имеются три существенные группы, которые подвергаются модификации [4801].

собой прямую с наклоном l/j и с $\tilde{l} = (l-h)/l$ при $a^{1/n}=1$ и $\tilde{l}=1$ при $a^{1/n} = (j+h)/j$. Это позволяет найти j и h , если известно l (см рис. 8.20, А). Если же суммарное число реакционноспособных групп (l) в молекуле неизвестно, то определить долю немодифицированных групп ($\tilde{l}$) нельзя, однако можно найти число модифицированных групп в молекуле (l'). Поскольку

$$\tilde{l} = \frac{l-l'}{l}, \quad (8.142)$$

то, подставляя это выражение в (8.141) и сделав соответствующие преобразования, получим

$$a^{1/n} = \frac{j+h-l'}{j}. \quad (8.143)$$

Следовательно, график зависимости $a^{1/n}$ от l' будет представлять собой прямую с наклоном $-1/j$; величину h можно найти, зная длину отсекаемого от соответствующей оси отрезка. В обоих рассмотренных выше случаях n можно определить путем построения графиков зависимости a , $\sqrt[3]{a}$, $\sqrt[3]{a}$ и т. д. от l' (или $\tilde{l}$) до тех пор, пока не получится прямая, как показано на рис. 8.20, Б.

Тсоу вывел уравнения для ряда других механизмов, при которых модификация групп фермента приводит к потере активности. Его метод является более сложным, чем метод Рея и Кошланда, однако он может оказаться полезен в тех случаях, когда модификация осуществляется слишком быстро и поэтому трудно определить скорость процесса. Метод может быть применен также для анализа систем, в которых проследить динамику процесса модификации во времени удастся, но ингибитор не может быть взят в избытке и тем самым процесс модификации не может считаться реакцией псевдопервого порядка.

Хотя использование рассмотренных выше методов для определения остатков, которые необходимы для активности, нашло широкое применение, получаемые результаты не всегда оказываются однозначными. В ряде случаев бывает недостаточно определить общее число модифицированных остатков на молекулу, поскольку модификация одного из двух остатков, находящихся в непосредственной близости друг от друга в структуре нативного белка, может исключить возможность модификации другого. Именно такая ситуация наблюдается при модификации остатков гистидина в панкреатической рибонуклеазе (КФ. 3.1.27.5) [916]. При обработке рибонуклеазы иодацетатом (рН 5,5) происходит карбоксиметилирование в молекуле фермента только одного остатка гистидина, при этом наблюдается полная потеря активности. Однако оказалось, что представление, согласно которому модификации подвергается только один остаток гистидина, ошибочно, поскольку, как показал анализ продуктов, модификации подвергаются два остатка гистидина — 12 и 119, причем модификация любого из этих остатков вызывает инактивацию фермента. То обстоятельство, что не удается получить препарат фермента, в котором модифицированы оба остатка гистидина, согласуется с общей стехиометрией реакции и показывает, что модификация одного из остатков гистидина предотвращает модификацию другого.

Модификация группы фермента специфическим реагентом, приводящая к утрате активности, не обязательно свидетельствует о том, что данная находящаяся на поверхности фермента группа входит в состав его активного центра. Модификация может вызывать конформационное изменение, сопровождающееся потерей активности, и поэтому при установлении корреляции между утратой активности и модификацией специфического остатка аминокислоты необходимо выяснить, не происходит ли изменение конформации фермента. Следует, конечно, иметь в виду, что, если такое изменение конформации обнаружено, это еще не означает, что оно является единственной причиной инактивации. Например, взаимодействие высокореакционноспособных сульфгидрильных групп, входящих в состав активного центра глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.12), с *n*-хлор-

меркурибензоатом сопровождается конформационным изменением фермента [1242]. Все это затрудняет интерпретацию результатов. Особый случай ингибирования, приводящего к потере активности, наблюдается в системе, в которой фермент находится в двух формах — активной и развернутой неактивной, между которыми существует равновесие (такая ситуация наблюдается в определенных условиях для химотрипсина (КФ 3.4.21.1) [1328]. В этом случае реагент, способный взаимодействовать только с неактивной формой фермента, будет вызывать ингибирование путем смещения равновесия.

Одним из доказательств того, что модифицируемая группа находится в активном центре, может служить защита фермента от необратимого ингибирования при введении в систему субстрата или его аналога. Однако из теории индуцированного соответствия, рассматриваемой в гл. 4 и 10, следует, что сопровождающие связывание субстрата конформационные изменения могут приводить к защите групп, находящихся вне активного центра. Противоположную ситуацию, когда в присутствии субстрата реакционная способность специфических аминокислотных остатков фермента увеличивается, наблюдали в случае химотрипсина [1102].

Если специфический аминокислотный остаток в белке обладает повышенной реакционной способностью по отношению к определенному реагенту, интерпретация результатов необратимого ингибирования упрощается. Соответствующие примеры обсуждаются в гл. 7.

Особая группа специфических необратимых ингибиторов была получена путем введения в аналоги субстратов группировок, способных необратимо реагировать с боковыми цепями аминокислот в активном центре фермента. Эти ингибиторы получили название «ингибиторы, направленные на активный центр», или «аффинные метки». Они детально рассмотрены в работах [249, 4224, 4225]. Эффективность этих соединений обусловлена тем, что благодаря родству к ферменту они вводят реакционноспособную группировку в область активного центра. Примеры аффинных меток активных центров трипсина (КФ 3.4.21.4) и химотрипсина (КФ 3.4.21.1) приведены в табл. 8.5. Утрата ферментом активности при действии этих ингибиторов не всегда, однако, означает, что модифицируемая группа фермента входит в состав его каталитического аппарата; говоря более точно, рассматриваемая группа находится в области активного центра. Это можно проиллюстрировать на примере действия ингибиторов, приведенных в табл. 8.5; так, тозилфенилаланинхлорметан инактивирует химотрипсин в результате реакции с остатком гистидина, который, как свидетельствует ряд данных, необходим для каталитической активности; в то же время 3-фенокси-1,2-поксипропан вызывает ингибирование фермента, реагируя с

Таблица 8.7

Субстраты и направленные на активный центр
специфические ингибиторы трипсина и химотрипсина

Субстрат или ингибитор	Фермент	Модифицируемый остаток
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_2\text{H}_5$ NH—толуолсульфонил Этиловый эфир тозиллизина (субстрат)	Трипсин	—
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4-\underset{\text{NH}-\text{толуолсульфонил}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{Cl}$ Тозиллизинхлорметан (ингибитор)	Трипсин	His-4c
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}-\text{толуолсульфонил}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_2\text{H}_5$ Этиловый эфир тозилфенилаланина (субстрат)	Химотрипсин	—
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}-\text{толуолсульфонил}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{Cl}$ Тозилфенилаланинхлорметан (ингибитор)	Химотрипсин	His-5 ^c
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\text{CH}}-\text{CH}_2$ 3-фенокси-1,2-эпоксипропан (ингибитор)	Химотрипсин	Met-19 ^c
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5)-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{Cl}$ Дифенилкарбамоилхлорид (ингибитор)	Химотрипсин	Ser-19 ^c

остатком метионина, который, вероятно, не участвует в каталитическом процессе, но расположен столь близко к остаткам активного центра, что его модификация приводит к потере активности.

Не все направленные на активный центр ингибиторы модифицируют специфические группы фермента. Особенно интересный случай исследовали Чейз и Туббс [750]; они показали, что аналог субстрата карнитинацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.7) бромацетилкарнитин может вызвать ингибирование в результате реакции с сульфгидрильной группой другого субстрата этого фермента — кофермента А; при этом образуется аналог обоих субстратов, который очень прочно связывается с ферментом. Рассмотренная реакция катализируется ферментом, она происходит также при добавлении к ферменту карнитина и бромацетил-СоА. В отсутствие второго субстрата бромацетилкарнитин вызывает медленное необратимое ингибирование фермента в результате реакции со специфическим остатком гистидина.

АКТИВАТОРЫ

Данное соединение может ускорять катализируемую ферментом реакцию, влияя либо на скорость реакции, либо на положение устанавливающегося равновесия, либо на то и другое одновременно.

ВЛИЯНИЕ НА СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ

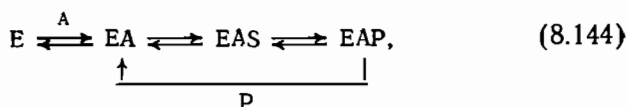
В этом разделе будут рассмотрены только такие соединения, которые обратимо взаимодействуют с компонентами ферментной системы, вызывая увеличение скорости реакции. Системы, характеризующиеся кооперативной кинетикой, мы рассмотрим в этой главе позднее. Если реакция протекает с измеримой скоростью только в присутствии активатора (*необходимый активатор*), то при выводе кинетических уравнений с активатором часто оперируют как с субстратом, но с одной важной оговоркой: активатор не изменяется в ходе реакции. Если же реакция протекает с измеримой скоростью и в отсутствие активатора (*несущественный активатор*), то кинетические уравнения выводят таким же образом, как в случае частичного ингибирования.

Необходимые активаторы

Выше отмечалось, что соединение, которое, взаимодействуя с ферментом или с одним из его комплексов, приводит к осуществлению реакции, может рассматриваться как субстрат, который не подвергается превращению в ходе реакции; следовательно,

но, наблюдаемые эффекты могут быть описаны с помощью уравнений для двухсубстратных реакций, приведенных в гл. 4. Активатор связывается либо с ферментом, либо с фермент-субстратным комплексом, при этом связывание может осуществляться как в равновесных, так и в стационарных условиях. Такими активаторами часто (но, конечно, не всегда) являются ионы металлов.

Если активатор связывается со свободным ферментом, то в случае упорядоченного механизма реакция может быть представлена следующей схемой:



где А — активатор, S и Р — субстрат и продукт соответственно. Такая система обсуждалась на с. 137—139; было отмечено, что в том случае, когда активатор, связавшись с ферментом, не покидает его во время всех последующих циклов, между комплексом EA, с одной стороны, и свободными ферментом и активатором, с другой, устанавливается равновесие; в этой ситуации независимо от того, в каких условиях (равновесных или стационарных) рассматривается кинетика процесса, уравнение скорости будет иметь вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^S}{s} + \frac{K_a K_M^S}{as}} = \frac{V}{1 + \frac{K_M^S}{s} \left(1 + \frac{K_a}{a}\right)}, \quad (8.145)$$

где K_a — константа диссоциации комплекса EA (активаторная константа). В преобразованном виде уравнение (8.145) становится аналогичным уравнению для конкурентного ингибирования (8.6); график зависимости $1/v$ от $1/s$ имеет вид, представленный на рис. 8.21. Прямые, построенные при разных a , пересека-

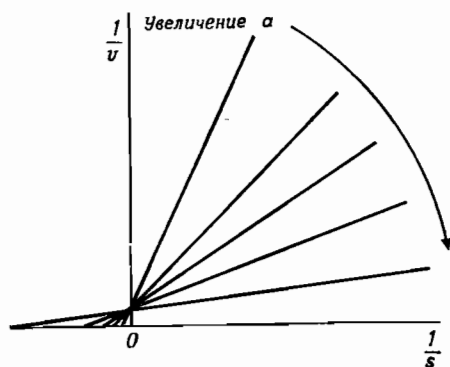
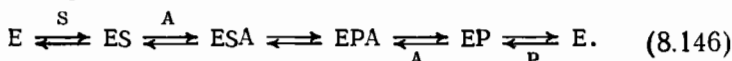


Рис. 8.21. График двойных обратных величин для системы, описываемой уравнениями (8.144) и (8.145).

ются в точке, лежащей на оси $1/v$ (более подробно см. об этом на с. 138). Этот тип активации иногда называют «конкурентная активация», однако данный термин нельзя назвать удачным. Как обсуждалось в гл. 4, графики зависимости обратной скорости от обратной концентрации активатора при разных концентрациях субстрата образуют семейство прямых, которые пересекаются в точке, лежащей выше оси $1/a$; вторичный график зависимости наклонов этих прямых от $1/s$ является прямой, которая проходит через начало координат. Вопросы, связанные с определением констант, входящих в уравнение типа (8.145), подробно обсуждались в гл. 4.

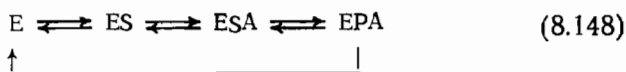
Если активатор связывается не со свободным ферментом, а с фермент-субстратным комплексом, то в случае упорядоченного механизма реакция может быть представлена схемой



В данном случае A не связывается со свободным ферментом и активатор покидает фермент прежде, чем освобождается продукт. Эта система напоминает упорядоченные системы, которые рассматривались в гл. 4, однако здесь A связывается с комплексом ES как активатор, а с комплексом EP — как бесконкурентный ингибитор (см. с. 493). Анализ (8.146) в стационарных условиях приводит к уравнению

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^S}{s} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_s^S K_M^A}{as} + \frac{a}{K_i^A}} \quad (8.147)$$

в котором ни K_M^A , ни K_i^A не являются простыми константами диссоциации. Какой эффект будет наблюдаться — активация или ингибирование — зависит от констант K_M^A и K_i^A . Если K_i^A очень велика, то A практически не будет связываться с комплексом EP ; схема реакции в этом случае примет вид



и (8.147) перейдет в (8.149)

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^S}{s} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_s^S K_M^A}{as}} \quad (8.149)$$

Эта система сходна с простой упорядоченной системой, в которой скорость превращения субстрата определяется в отсутствие продуктов (с. 137); входящие в уравнение константы Михаэлиса можно определить так, как это описано в гл. 4.

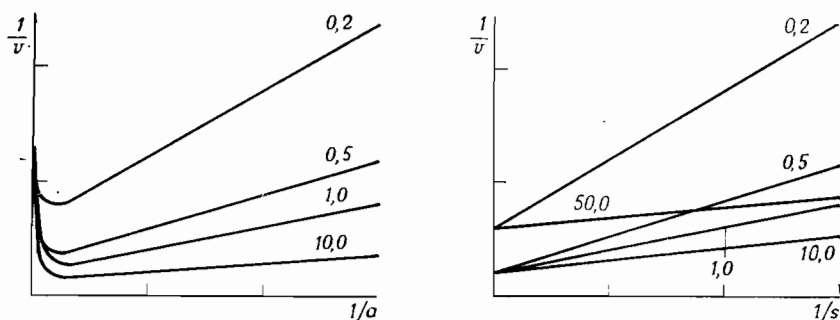
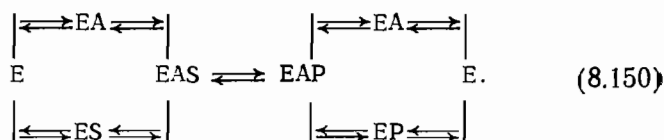


Рис. 8.22. Графики двойных обратных величин для системы, описываемой уравнением (8.147); $K_i^A=10$, $K_M^A=K_M^S=K_s^S=1$. Концентрация второго реактанта указана на кривых.

Если константа K_M^A очень велика, то А будет функционировать как бесконкурентный ингибитор (с. 493—497). При промежуточных значениях K_M^A и K_i^A на скорость влияют обе эти константы. Примеры графиков двойных обратных величин для таких систем приведены на рис. 8.22 (при $K_M^A=0,1 K_i^A$).

Механизм процесса в случае неупорядоченного связывания активатора и субстрата может быть представлен в виде следующей схемы:



Кинетический анализ такого механизма сходен с тем, который используется для неупорядоченных двухсубстратных систем (с. 134—135). Если распад тройного комплекса в прямом направлении происходит достаточно медленно и, следовательно, стадии связывания субстрата и активатора находятся в равновесии, то уравнение скорости будет иметь вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^S}{s} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_s^S K_M^A}{as}} = \frac{V}{1 + \frac{K_M^S}{s} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_s^A K_M^S}{as}}, \quad (8.151)$$

где K_s^S и K_s^A — константы диссоциации S и А из соответствующих двойных комплексов, а K_M^S и K_M^A — константы их диссоциации из тройных комплексов. Константы, входящие в уравнение (8.151), можно определить, построив первичные и вторичные графики (см. гл. 4). Если константы диссоциации тройных комплексов отличны от констант диссоциации двойных комплексов, то при изменении концентрации А будет изменяться как

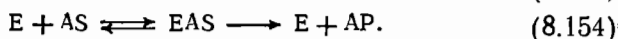
наклон графиков двойных обратных величин, так и длина отсекаемых ими отрезков; в таком случае активацию можно назвать смешанной по аналогии со смешанным ингибированием (с. 491—493). Когда связывание субстрата не влияет на связывание активатора (и наоборот) ($K_s^A = K_M^A$ и $K_s^S = K_M^S$), уравнение (8.151) принимает вид

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_s^A}{a}\right) \left(1 + \frac{K_s^S}{s}\right)}, \quad (8.152)$$

и активацию называют «неконкурентной», поскольку при повышении концентрации активатора v увеличивается, а K_s^S не изменяется (см. с. 487).

Как уже отмечалось выше, в случае двухсубстратных реакций и реакций ингибирования, описываемых уравнением вида (8.150), анализ в стационарном приближении приводит к кинетическим уравнениям, которые в общем случае слишком сложны, чтобы их можно было использовать на практике (см. с. 490—491 и гл. 4, с. 135—137).

Нередко активатор проявляет свое действие в результате связывания не с ферментом, а с субстратом, например АТР находится в клетке преимущественно в виде комплекса с ионами Mg^{2+} и было показано, что комплекс $MgATP$ является субстратом многих ферментов [832], в том числе гексокиназы (КФ 2.7.1.1) [3765], пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) и карбамоил-фосфатсинтазы (аммиак) (КФ 2.7.2.5) [1235]. Уравнения односубстратной реакции, для которой истинным субстратом является комплекс активатор — субстрат, могут быть записаны в следующем виде:



Если допустить, что реакция (8.153) протекает достаточно быстро и, следовательно, является равновесной при всех условиях, то концентрация истинного субстрата (as) будет равна

$$as = \frac{a \cdot s}{K_a}, \quad (8.155)$$

где a и s — концентрация свободных активатора и субстрата, K_a — константа диссоциации комплекса AS . Следовательно, кинетическое уравнение для простой односубстратной реакции (8.154) как в равновесных, так и в стационарных условиях должно быть преобразовано к виду

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{AS} K_a}{a \cdot s}}. \quad (8.156)$$

Это приводит к довольно неожиданному результату, ибо показывает, что максимальная скорость, достигаемая при увеличении a или s , оказывается одной и той же при условии, что s или a соответственно сохраняются постоянными. Следовательно, создается впечатление, что фермент может быть насыщен субстратом даже при низкой концентрации субстрата, если повысить концентрацию активатора. В действительности, однако, это не так. Дело в том, что в приведенные выше уравнения входят концентрации *свободных* активатора и субстрата, и, для того чтобы при увеличении концентрации активатора поддерживать постоянной концентрацию свободного субстрата (s), необходимо значительно увеличить общую концентрацию субстрата, а это равнозначно насыщению фермента его истинным субстратом путем увеличения концентрации комплекса активатор—субстрат. Важность расчета концентраций свободных активатора и субстрата для анализа таких систем подчеркивают Рабин и Крук [3778], а также другие авторы, однако во многих работах все еще оперируют общими концентрациями активатора и субстрата.

Из графика зависимости обратной скорости от обратной концентрации либо свободного субстрата, либо свободного активатора можно определить V и сложную константу Михаэлиса. Константы Михаэлиса при изменяющихся s и a равны соответственно

$$K_{M, \text{каж}}^s = \frac{K_M^{AS} K_a}{a}, \quad (8.157)$$

$$K_{a, \text{каж}} = \frac{K_M^{AS} K_a}{s}.$$

Определить либо K_M^{AS} , либо K_a по отдельности не представляется возможным. Следует отметить, что величина $K_{M, \text{каж}}$ для субстрата при фиксированной концентрации активатора идентична $K_{a, \text{каж}}$ для активатора при таких же фиксированных концентрациях субстрата.

Эта система кинетически отличается от системы, представленной схемой (8.144) и уравнением (8.145), в том отношении, что в данном случае графики зависимости обратной скорости от обратной концентрации либо субстрата, либо активатора при ряде фиксированных концентраций другого реактанта образуют семейство прямых, которые пересекаются в точке, лежащей на оси $1/v$. Кроме того, вторичные графики зависимости наклонов от обратной концентрации фиксированного компонента являются прямыми, которые проходят через начало координат в *обоих* случаях.

Скорость реакции можно выразить через полные концентрации субстрата и активатора (s_t и a_t соответственно), подставляя в уравнение (8.153) следующие выражения для s и a :

$$s = s_t - as, \quad (8.158)$$

$$a = a_t - as. \quad (8.159)$$

Отсюда получаем (поскольку as не может быть больше a_t или s_t , какая бы из этих величин ни была меньшей) уравнение

$$v = \frac{V}{1 + \frac{2K_M^{AS}}{(K_a + a_t + s_t) - \sqrt{[(K_a + a_t + s_t)^2 - 4a_t s_t]}}}. \quad (8.160)$$

Отсюда для данных значений констант и полных концентраций можно легко рассчитать v ; однако это уравнение нельзя преобразовать к обычному виду, с тем чтобы получить простые алгебраические выражения, определяющие эффективные значения констант Михаэлиса для субстрата и активатора.

Ясно, что в этом случае, как и в более простом выражении (8.156), замена a_t на s_t или s_t на a_t не изменяет выражения. Следовательно, сделанное выше заключение о тождественности кажущихся констант Михаэлиса для активатора и субстрата (см. уравнение (8.157)) будет применимо также и при использовании полных концентраций. Такого рода данные были получены экспериментально в опытах с креатинкиназой. Асконас [172] и Кьюби и др. [2620] обнаружили, что «кажущееся» сродство фермента к данному иону металла при определенной концентрации ADP было таким же, как и сродство фермента к ADP при концентрации металла, равной концентрации ADP в первом случае. На рис. 8.23 приведены результаты опытов Ас-

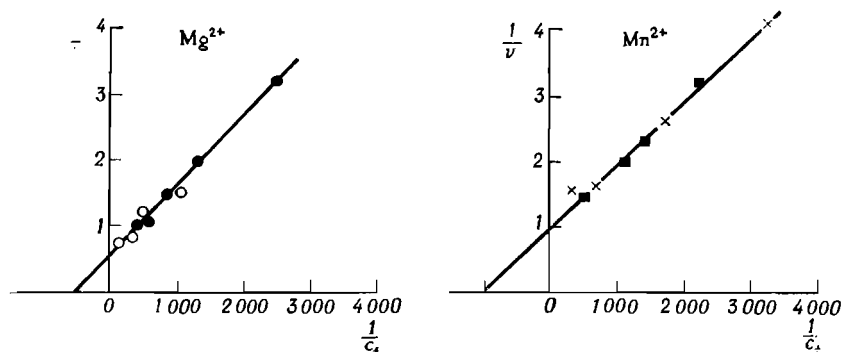


рис. 8.23. Эквивалентность «кажущихся» величин сродства креатинкиназы КФ 2.7.3.2) к активирующему металлу и субстрату [172]. Графики двойных обратных величин построены для реакции между ADP и креатинфосфатом: — полная молярная концентрация: ● ADP (+0.005 M Mg^{2+}), ○ Mg^{2+} (+0.003 M ADP), ■ ADP (+0.005 M Mn^{2+}), × Mn^{2+} (+0.003 M ADP).

конаса, характеризующие зависимость скорости реакции от полной концентрации Mg^{2+} и Mn^{2+} в присутствии 0,003 М ADP или от полной концентрации ADP в присутствии 0,005 М Mg^{2+} или Mn^{2+} . Из этих графиков видно, что K_M для ADP в присутствии Mg^{2+} отличается от K_M для ADP в присутствии Mn^{2+} , но каждая из этих констант близка к K_M для соответствующего металла. Эти экспериментально полученные константы Михаэлиса являются, вероятно, сложными функциями K_M^{AS} и K_a , о чем можно судить по уравнению (8.160), однако если a и s достаточно велики по сравнению с K_a , то уравнение (8.160) упрощается до

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{AS}}{s}}. \quad (8.161)$$

Следовательно, константа Михаэлиса для истинного субстрата может быть определена из зависимости скорости реакции от концентрации добавленного субстрата при достаточно высокой концентрации активатора. В системе, представленной уравнениями (8.153) и (8.154), истинным субстратом фермента является комплекс активатор—субстрат, и вполне возможно, что взаимодействие фермента с AS осуществляется — по крайней мере частично — через активатор. В таком случае весьма вероятно, что фермент может взаимодействовать не только с AS-комплексом, но и со свободным активатором, при этом, однако, сродство к рассматриваемым реактантам не обязательно должно быть одинаковым. Следовательно, наряду с реакциями (8.153) и (8.154) нужно учитывать реакцию



Анализ такого механизма как в равновесных, так и в стационарных условиях приводит к следующему уравнению скорости:

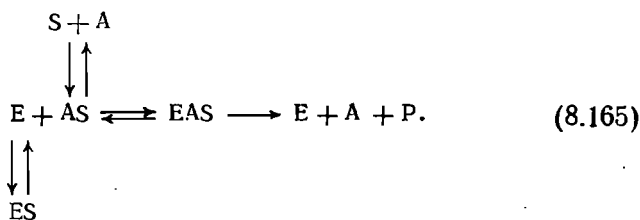
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{AS} K_a}{as} \left(1 + \frac{a}{K_i^A} \right)}, \quad (8.163)$$

где K_i^A — константа диссоциации комплекса EA. Если использовать суммарные концентрации субстрата и активатора, то уравнение примет вид

$$v = \frac{V}{\left(1 - \frac{K_M^{AS}}{K_i^A} \right) + \left(1 + \frac{a_t}{K_i^A} \right) \frac{2K_M^{AS}}{(K_a + a_t + s_t) - V[(K_a + a_t + s_t)^2 - 4a_t s_t]}}. \quad (8.164)$$

В отличие от уравнений для предыдущего случая уравнения (8.163) и (8.164) несимметричны относительно a и s , и получаемые константы Михаэлиса для субстрата и активатора являются различными сложными функциями констант равновесия и полных концентраций соответствующих реагентов. Следует отметить, что графики зависимости $1/v$ от $1/s$ при ряде фиксированных концентраций A образуют семейство прямых, которые пересекаются в точке, лежащей на оси $1/v$, а графики зависимости $1/v$ от $1/a$ при ряде фиксированных концентраций S образуют семейство прямых, которые пересекаются в точке, лежащей выше оси $1/a$. В последнем случае вторичный график зависимости наклонов прямых от $1/s$ является прямой, проходящей через начало координат, и, следовательно, в этом смысле рассматриваемая система неотличима от системы, описываемой уравнениями (8.144) и (8.145). Однако в данном случае делается неявное предположение, что A и AS конкурируют за фермент. Поэтому в условиях избытка активатора при графическом анализе с использованием суммарных концентраций будет наблюдаться конкурентное ингибирование. Действительно, нередко при увеличении концентрации металла-активатора скорость реакции вначале увеличивается до максимума, а затем по мере дальнейшего увеличения концентрации металла снижается.

Свободный субстрат может образовывать с ферментом тупиковый комплекс:



Уравнения скорости для такой системы аналогичны уравнениям (8.163) и (8.164), например (8.163) принимает вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_a K_M^{AS}}{a \cdot s} \left(1 + \frac{s}{K_i^S} \right)}, \quad (8.166)$$

где K_i^S — константа диссоциации комплекса ES . Если фермент вообще не взаимодействует со свободным субстратом, константа K_i^S является бесконечно большой величиной и (8.166) упрощается до (8.156). Кажущиеся константы Михаэлиса, которые получают из графиков двойных обратных величин для системы,

описываемой уравнением (8.166), равны

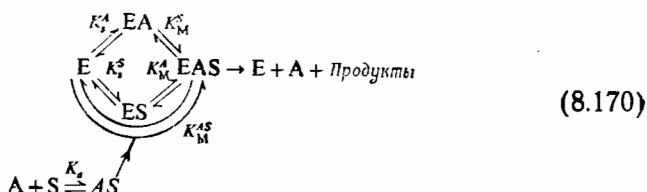
$$K_{M, \text{каж}}^S = \frac{K_M^{AS}}{\frac{a}{K_a} + \frac{K_M^{AS}}{K_i^S}}, \quad (8.167)$$

$$K_{a, \text{каж}} = K_a \left(\frac{K_M^{AS}}{s} + \frac{K_M^{AS}}{K_i^S} \right). \quad (8.168)$$

Если использовать суммарные концентрации, а не концентрации свободных форм, то уравнение (8.166) примет вид

$$v = \frac{V}{\left(1 - \frac{K_M^S}{K_i^S}\right) + \left(1 + \frac{s_t}{K_i^S}\right) \frac{2K_M^S}{(K_a + a_t + s_t) - \sqrt{[(K_a + a_t + s_t)^2 - 4a_t s_t]}}}. \quad (8.169)$$

Общий случай, при котором и свободный субстрат, и свободный ион металла связываются с ферментом, включает все частные случаи, рассмотренные выше, и может быть представлен в виде следующей схемы:



Уравнение скорости в стационарных условиях является слишком сложным для того, чтобы его можно было использовать на практике; в равновесных условиях

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_a K_M^{AS}}{a \cdot s} \left(1 + \frac{a}{K_s^A} + \frac{s}{K_s^S}\right)}, \quad (8.171)$$

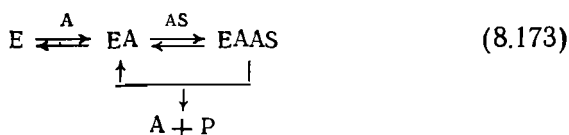
где

$$K_M^A K_s^S = K_M^S K_s^A = K_a K_M^{AS}. \quad (8.172)$$

Соответствующее (8.171) уравнение, в котором используются суммарные концентрации, является слишком сложным.

Иногда ионы металла-активатора выполняют двойную функцию — они связываются как с ферментом, так и с субстратом. Следовательно, истинным субстратом является комплекс активатор — субстрат, который в свою очередь образует активный

комплекс с комплексом фермент—активатор. Уравнения скорости для таких систем сходны с уравнениями, описывающими рассмотренные выше системы, в которых происходит образование комплексов фермент—активатор и субстрат—активатор. Так, для системы



уравнение скорости как в стационарных, так и в равновесных условиях имеет вид

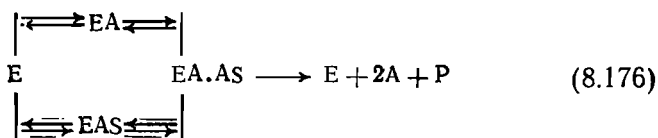
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{AS}}{as} + \frac{K_s^A K_M^{AS}}{as \cdot a}}, \quad (8.174)$$

где K_s^A — константа диссоциации комплекса EA. Если использовать концентрации свободных A и S, то, делая соответствующие подстановки в (8.155), найдем

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{AS} K_a}{a \cdot s} + \frac{K_s^A K_M^{AS} K_a}{a^2 \cdot s}}. \quad (8.175)$$

Таким образом, зависимость v от концентрации *свободного* активатора не является гиперболической, поскольку активатор взаимодействует с ферментом дважды, в том числе один раз в составе комплекса с субстратом (увеличение a при фиксированном значении s увеличивает как as , так и a).

При неупорядоченном связывании активатора и комплекса активатор—субстрат по механизму



уравнение скорости в стационарных условиях является очень сложным, а в равновесных условиях оно имеет такой же вид, как и уравнение (8.151):

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{AS}}{as} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_s^A K_M^{AS}}{as \cdot a}}. \quad (8.177)$$

Если использовать концентрации свободных форм субстрата и активатора, то

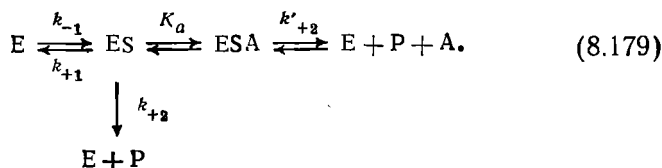
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{AS} K_a}{a \cdot s} + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_s^A K_M^{AS} K_a}{a^2 \cdot s}}. \quad (8.178)$$

В этом случае зависимость v от концентрации свободного активатора также не является гиперболической.

Кинетический анализ обеих систем — (8.173) и (8.176) — лучше всего проводить на основании уравнений (8.174) или (8.177), записанных с помощью концентраций свободного активатора и комплекса AS. Если концентрации истинных субстратов (в данном случае A и AS) использовать не удастся, то при построении графиков зависимости скорости реакции от концентрации одного или обоих субстратов (в рассмотренных выше случаях изменяется концентрация свободного A, а исходное количество S остается постоянным) могут получаться S-образные кривые. Поскольку подобное поведение нередко ошибочно связывают с наличием кооперативных эффектов, ниже мы остановимся на этом вопросе более подробно.

Несущественные активаторы

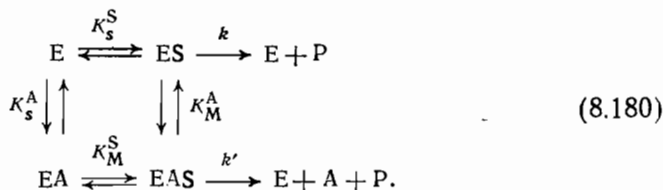
Несущественные активаторы могут проявлять свое действие в результате связывания либо с ферментом, либо с субстратом (либо с обоими) и отличаются от необходимых активаторов тем, что фермент обладает некоторой активностью и в их отсутствие. Уравнения скорости для систем, в которых несущественный активатор связывается с ферментом, сходны с уравнениями, полученными для систем с частичным ингибированием. В простой упорядоченной системе (8.146) будет наблюдаться частичная активация, если комплекс ES распадается с образованием продуктов:



Эта система аналогична системе (8.49), в которой наблюдается бесконкурентное ингибирование, за тем исключением, что в данном случае $k'_{+2} > k_{+2}$. Анализ системы (8.179) в стационарных или равновесных условиях приводит к уравнениям вида (8.50) — (8.52); графики двойных обратных величин при ряде фиксированных концентраций A образуют семейство прямых, которые

пересекаются в точке, лежащей выше оси $+1/s$ (как показано для действия ингибитора на рис. 8.1). Было установлено, что по типу системы (8.179) функционирует лактозосинтаза (КФ 2.4.1.22) [3260].

Как и в случае частичного ингибирования, механизм частичной активации можно представить в виде следующей общей схемы [ср. со схемами (8.7) и (8.35)]:



Анализ такой системы в стационарном приближении приводит к сложному уравнению, содержащему члены с a^2 и s^2 (см. с. 489), однако случаю равновесного связывания субстрата отвечают более простые уравнения. Если $k=k'$, то получается уравнение, аналогичное (8.13); при этом имеет место частичная конкурентная активация. В том случае, когда $K_s^S=K_M^S$, $K_s^A=K_M^A$ и $k < k'$, наблюдается частичная неконкурентная активация, а соответствующее уравнение имеет вид (8.29). Наконец, при $K_s^S \neq K_M^S$, $K_s^A \neq K_M^A$ и $k < k'$ имеет место частичная смешанная активация, а уравнение скорости аналогично (8.36); в такой системе при наличии особых условий, обсуждавшихся при рассмотрении уравнений (8.47) и (8.48), может наблюдаться бесконкурентное ингибирование.

В равновесном приближении для системы (8.180) получим уравнение

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_s^S}{a} \left(1 + \frac{a}{K_s^A}\right) + \frac{a}{K_M^A}} + \frac{k'e}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_M^S}{s} + \frac{K_s^S K_M^A}{a \cdot s}}, \quad (8.181)$$

или

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{ke \frac{s}{K_s^S} + k'e \frac{a \cdot s}{K_M^A K_s^S}}{1 + \frac{s}{K_s^S} + \frac{a}{K_s^A} + \frac{as}{K_M^A K_s^S}} = \\
 &= \frac{ke}{\left(1 + \frac{a}{K_M^A}\right) + \frac{K_s^S \left(1 + \frac{a}{K_M^A}\right)}{\left(1 + \frac{k'}{k} \frac{a}{K_M^A}\right) + \left(1 + \frac{k'}{k} \frac{a}{K_M^A}\right) \frac{1}{s}}}. \quad (8.182)
 \end{aligned}$$

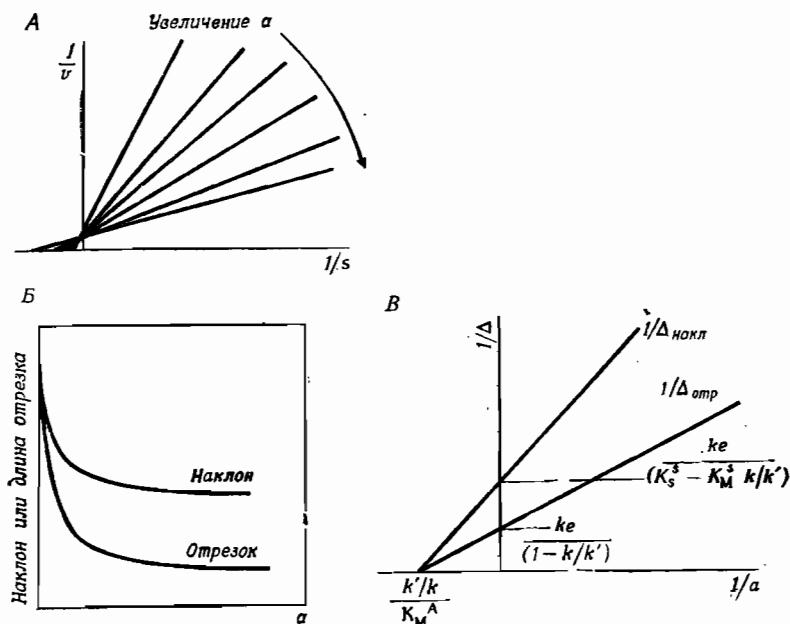
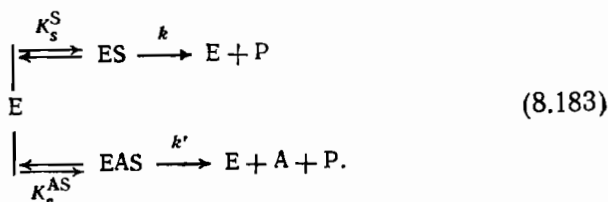


Рис. 8.24. Кинетические свойства системы с частичным активированием, описываемой уравнениями (8.181) и (8.182). А. График двойных обратных величин при ряде фиксированных концентраций активатора. Б. Зависимость наклонов прямых графика А и отрезков, отсекаемых ими от оси $1/v$, от концентрации активатора. В. График зависимости $1/\Delta_{\text{накл}}$ и $1/\Delta_{\text{отр}}$ от $1/a$.

Следовательно, график зависимости $1/v$ от $1/s$ будет линейным, а график зависимости $1/v$ от $1/a$ — нелинейным: он будет отклоняться от линейности вниз, поскольку при $\alpha \rightarrow 0$ скорость стремится не к нулю, а к величине $k[\text{ES}]$ (где $[\text{ES}]$ — концентрация комплекса ES). График двойных обратных величин $1/v$ — $1/a$, построенный так, что скорость в отсутствие активатора вычтена из соответствующих скоростей, определенных при различных концентрациях активатора, является линейным (см. с. 509). Аналогично, вторичные графики зависимости наклонов прямых $1/v$ — $1/s$ и длин отсекаемых ими отрезков от $1/a$ будут гиперболическими, однако зависимости величин, обратных изменению наклонов ($1/\Delta_{\text{накл}}$) или длин отрезков ($1/\Delta_{\text{отр}}$) от $1/a$ (где $\Delta_{\text{накл}}$ и $\Delta_{\text{отр}}$ получены в результате вычитания соответствующих величин в отсутствие активатора из этих величин в его присутствии), будут описываться уравнениями вида (8.68) и, следовательно, соответствующие графики будут линейными, как показано на рис. 8.24. Поскольку K_s^s и ke можно определить из графика двойных обратных величин в отсутствие активатора, а

$K_s^A K_M^S = K_M^A K_s^S$, то можно найти все четыре константы системы (8.180).

Рассмотрим схему, аналогичную (8.165), включающую стадию связывания активатора с субстратом, для случая частичного активирования, когда и EAS, и ES могут распадаться с образованием продуктов:



В этом случае субстраты S и AS конкурируют за фермент и уравнение скорости в равновесных условиях имеет вид

$$v = \frac{V \frac{as}{K_s^S} + V' \frac{as}{K_s^{AS}}}{1 + \frac{s}{K_s^S} + \frac{as}{K_s^{AS}}}, \quad (8.184)$$

где $V = ke$, $V' = k'e$. Если концентрация свободного A остается постоянной, то можно записать, что $a/K_a = as/s = a = c$ ($c = \text{const}$), т. е. $as = c \cdot s$. В этих условиях график зависимости v от s является равнобочной гиперболой, поскольку после соответствующей подстановки в (8.184) и преобразования получаем

$$v = \frac{V'}{\frac{K_s^S}{s} + \frac{\left(1 + \frac{cK_s^S}{K_s^A}\right)}{\left(\frac{V}{V'} + \frac{cK_s^S}{K_s^A}\right)}}. \quad (8.185)$$

Критерии для определения механизма действия активатора

Из всего сказанного выше об активации ферментов можно сделать следующий вывод: предположение, согласно которому наблюдаемая константа Михаэлиса для активатора является обычной константой Михаэлиса или даже константой диссоциации комплекса фермент — активатор, часто оказывается неправильным.

При исследовании механизма действия активатора весьма полезно иметь дополнительную информацию, помимо данных о

зависимости скорости от концентрации субстрата и активатора. Очень ценной величиной является константа сродства фермента к комплексу активатор—субстрат: с ее помощью можно рассчитать концентрации свободных и связанных компонентов в исследуемой смеси. В ряде случаев, когда активаторами являются ионы металлов, были определены константы стабильности (константы ассоциации комплексов металл—лиганд) для нескольких обычных субстратов; все эти данные сведены в таблицы [421]. Следует, однако, иметь в виду, что прочность связывания часто зависит от условий (рН, температуры); кроме того, активатор может образовывать комплексы «с посторонними» компонентами системы, поэтому константы стабильности следует определять в конкретных экспериментальных условиях. Для определения связывания одного из обычных активаторов, Mg^{2+} , был предложен метод с использованием 8-оксихинолина, который изменяет спектр поглощения при связывании с ионом металла [638].

Основанный на кинетических данных вывод о том, что активация обусловлена взаимодействием активатора и субстрата, получает дальнейшее подтверждение, если независимым путем удается показать, что такое взаимодействие имеет место, и если можно измерить величину K_a . Например, по результатам исследования взаимодействия Mg^{2+} с АТР (см., например, [638, 3566]) была рассчитана константа диссоциации комплекса Mg^{2+} —АТР на Mg^{2+} и АТР, которая оказалась достаточно близкой к величине, полученной из кинетических данных для креатинкиназы [3448]. Это говорит в пользу предположения о том, что комплекс является субстратом креатинкиназы. Моррисон и др. [3263] считают, что поскольку Mg^{2+} связывается с АДФ относительно слабо, то в ходе обратной реакции ($ADP + \text{креатинфосфат} \rightarrow$) комплекс $E-Mg-ADP$ может образовываться в результате соединения компонентов в любой последовательности.

Установление механизма значительно облегчается, если активация фермента зависит от времени. Нередко активация под действием ионов металлов достигает максимума только через несколько часов. В таких случаях для определения активности требуется предварительная инкубация активатора с ферментом, так как взаимодействие активатора с ферментным белком (для которого присутствие субстрата не обязательно) осуществляется относительно медленно. Предварительная инкубация активатора с субстратом в отсутствие фермента не дает эффекта. Ферменты, ведущие себя подобным образом, например аргиназа (КФ 3.5.3.1) [219], активируются, следовательно, по механизму, в котором активной формой фермента является ЕА (в данном случае А — ион металла). Такого рода временные эффекты, видимо, обычны для активации ионами Mn^{2+} или Co^{2+}

пептидаз и некоторых сходных ферментов, действующих на азот-содержащие группировки; у ферментов, активируемых ионами Mg^{2+} , эти эффекты обычно не наблюдаются.

Если константа Михаэлиса для субстрата при определенной концентрации активатора равна константе Михаэлиса для активатора при определенной концентрации субстрата (которая совпадает с использовавшейся в первом случае концентрацией активатора), то весьма вероятно, что металл и субстрат соединяются в комплекс, который и служит истинным субстратом фермента, и что только этот комплекс соединяется с ферментом в сколько-нибудь значительной степени. Это заключение основывается на том соображении, что если свободный металл или свободный субстрат соединяются с ферментом столь же эффективно, как AS , то величины K_m , определенные в указанных выше условиях, не могут быть одинаковыми. Если же с ферментом могут соединяться и свободный металл, и свободный субстрат, и AS и если при этом сродство фермента к металлу и к субстрату одинаково, то для скорости реакции также получается выражение, симметричное относительно концентраций активатора и субстрата. Эта последняя возможность представляется, однако, весьма маловероятной.

РАВНОВЕСНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Образование комплексов активатор—субстрат (в частности, и тех, которые не атакуются ферментом) приводит к изменению константы равновесия катализируемой ферментом реакции; эти изменения, которые зависят от природы и концентрации активатора, будут рассмотрены ниже.

Предположим, что протекает обратимая ферментативная реакция $S_f \rightleftharpoons S_b$ с константой равновесия

$$K = \frac{s_b}{s_f} \quad (8.186)$$

и допустим, что и S_f , и S_b образуют комплексы с активатором A ; обозначим при этом константы диссоциации соответственно через K_{af} и K_{ab} . Тогда

$$K_{af} = \frac{s_f a}{q_f}, \quad (8.187)$$

$$K_{ab} = \frac{s_b a}{q_b},$$

где a — концентрация свободного активатора, s_f и s_b — концентрации свободных S_f и S_b , q_f и q_b — концентрации соответственно AS_f и AS_b .

Суммарные концентрации субстратов будут равны

$$s_{ft} = s_f + q_f, \quad (8.188)$$

$$s_{bt} = s_b + q_b. \quad (8.189)$$

K_t — «кажущаяся» константа равновесия, выраженная через суммарные концентрации добавленных субстратов, — по определению равна

$$K_t = \frac{s_{bt}}{s_{ft}}. \quad (8.190)$$

Подставляя в это выражение (8.186) — (8.189), получаем

$$K_t = K \frac{\left(1 + \frac{a}{K_{ab}}\right)}{\left(1 + \frac{a}{K_{af}}\right)}. \quad (8.191)$$

Это уравнение показывает, как изменяется константа равновесия при изменении концентрации свободного иона металла; из него следует, что если K_{af} отличается от K_{ab} , то наблюдаемая константа равновесия будет отличаться от истинной константы, определяемой в отсутствие металла. Экстраполируя K_t при $a \rightarrow 0$, можно определить величину K . Для этого строят график зависимости между определенными экспериментально значениями константы равновесия и суммарной концентрации добавленного металла-активатора a_t . Из уравнения

$$a_t = a + q_f + q_b \quad (8.192)$$

и предыдущих уравнений находим следующее кубическое уравнение, из которого может быть определена величина a :

$$a^3 + a^2(K_{af} + K_{ab} + s_{ft} + s_{bt} - a_t) + a(K_{af}K_{ab} + K_{af}s_{bt} + K_{ab}s_{ft} - K_{af}a_t - K_{ab}a_t) - K_{af}K_{ab}a_t = 0. \quad (8.193)$$

Решив это уравнение, можно подставить полученное значение a в уравнение (8.191). Это вычисление, однако, весьма трудоемко.

Уравнения значительно упрощаются в том случае, если с металлом соединяется только S_f , так что K_{ab} можно принять равным бесконечности. Тогда уравнение (8.191) принимает вид

$$K_t = \frac{K}{\left(1 + \frac{a}{K_{af}}\right)}, \quad (8.194)$$

и (8.193) сводится к квадратному уравнению

$$a^2 + a(K_{af} + s_{ft} - a_t) - K_{af}a_t = 0, \quad (8.195)$$

следовательно,

$$K_t = K \frac{2K_{af}}{K_{af} + a_t - s_{ft} + \sqrt{[(K_{af} + s_{ft} - a_t)^2 + 4K_{af}a_t]}}. \quad (8.196)$$

Можно ожидать, что это уравнение будет удовлетворительно описывать действие многих киназ. Например, в опытах с креатинкиназой было обнаружено, что АТР имеет значительно большее сродство к Mg^{2+} , чем какой-либо другой компонент системы (хотя при точных расчетах сродство АДФ также нужно учитывать). Связыванием с другими компонентами, например с креатинфосфатом, можно обычно полностью пренебречь. Имея в виду киназы, мы построили в соответствии с уравнением (8.196) кривые, приведенные на рис. 8.25; K_{af} в этом случае принято равным 10^{-5} М [3566], что соответствует последним полученным данным. Видно, что влияние умеренных концентраций Mg^{2+} на K_t очень велико и такого рода эффекты играют весьма важную роль в подобных системах. Влияние данной концентрации металла зависит от концентрации субстрата и уменьшается с повышением этой последней. При низкой концентрации субстрата график, на котором по оси абсцисс отложены логарифмы концентрации металла, представляет собой обычную S-образную кривую, точка перегиба которой соответствует pK_{af} . При более высоких концентрациях субстрата форма кривой искажается, потому что субстрат эффективнее противодействует влия-

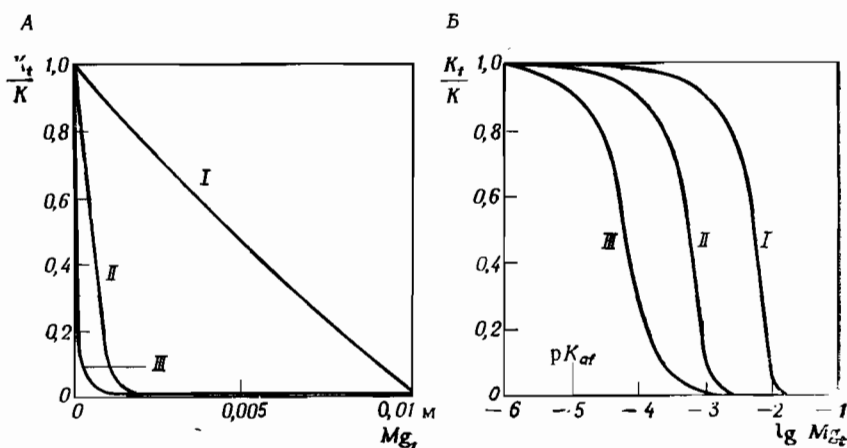


Рис. 8.25. Теоретические кривые, характеризующие зависимость между концентрацией добавленных ионов магния (А) или логарифмом этой концентрации (Б) и константой равновесия при различных концентрациях субстрата. Графики построены по уравнению (8.196). K_{af} принято равным 10^{-5} М. I — $s_{ft} = 0,01$ М; II — $s_{ft} = 0,001$ М; III — $s_{ft} = 0,0001$ М.

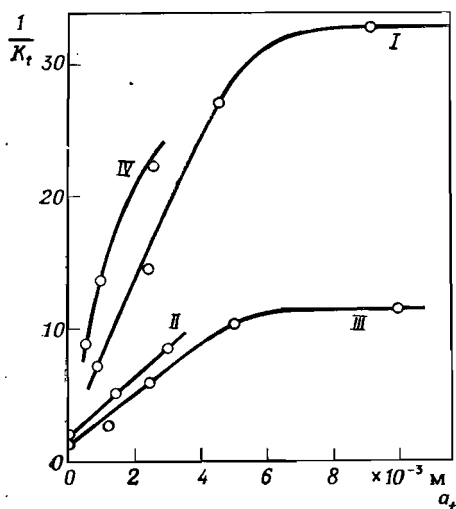


Рис. 8.26. Зависимость константы равновесия реакции, катализируемой креатинкиназой, от полной концентрации активирующего металла (a_t) [172]. I — Mg^{2+} при pH 8,45 в глициновом буфере; II — Mg^{2+} при pH 8,8 в глициновом буфере; III — Mg^{2+} при pH 8,8 в этаноламинном буфере; IV — Mg^{2+} при pH 8,45 в глициновом буфере. $K_t =$

$$= \frac{[ATP][\text{Креатин}]_t}{[ADP][\text{Креатинфосфат}]_t}$$

нию металла при относительно низких концентрациях последнего и точка перегиба кривой значительно смещается.

Подобные кривые, которые следует рассматривать только как первое приближение, можно сопоставить с экспериментальными кривыми, полученными для системы креатинкиназы в работах [172, 3447]. Данные Асконаса [172] приведены на рис. 8.26. Характер полученных в эксперименте кривых в общем согласуется с теоретическими кривыми, если не считать того, что при увеличении концентрации металла величина $1/K_t$ становится постоянной, а не возрастает до бесконечности, как предсказывается простой теорией. Этого, впрочем, и следовало ожидать, потому что при высоких концентрациях металла не только АТР, но и АДФ соединяется с Mg^{2+} . Когда концентрация металла становится достаточно большой для насыщения и АТР, и АДФ, дальнейшее ее повышение уже не оказывает влияния на константу равновесия.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ АНИОНОВ

Как впервые показал Коул [839] в 1904 г., значительное влияние на активность ряда ферментов оказывает присутствие анионов; например, влияние хлорид-иона на α -амилазы животных тканей столь велико, что этот ион рассматривается как естественный активатор данной группы ферментов. Другие одновалентные (но не двухвалентные) анионы также оказывают не-

которое влияние на активность амилаз, причем параллельно изменяются и физические свойства чистого фермента, например растворимость и электрофоретическая подвижность [3307]. Другим классическим примером фермента, чувствительного к анионам, может служить фумаратгидратаза, как это впервые показали Манн и Вульф [2964]; этот фермент активируется, однако, только двухвалентными и трехвалентными анионами. При обычных концентрациях влияние анионов на большинство ферментов незначительно.

Исследование влияния анионов при различных значениях pH показывает, что оно может сводиться к смещению одной или обеих ветвей кривой зависимости скорости реакции от pH, другими словами — к действительному или кажущемуся изменению констант ионизации K_{es1} и K_{es2} (см. гл. 4), которые определяют форму обеих ветвей этой кривой.

На рис. 8.27 приведены результаты, полученные Мирбеком [3314] в опытах с амилазой слюны, а на рис. 8.28 — результаты Массея [3010], полученные с кристаллической фумаратгидратазой. Как и следовало ожидать, соединение фермента с отрицательно заряженными ионами всегда приводит к смещению кривой вправо; при этом может изменяться форма либо одной из ветвей pH-кривой, либо обеих ее ветвей. При действии ионов хлора и брома на амилазу и ионов фосфата, арсената, цитрата и некоторых других ионов на фумаратгидратазу изменяется только K_{es2} , так что влияние сказывается только на правой ветви кривой. Это означает активацию процесса, в особенности при щелочных значениях pH, и сдвиг оптимума pH в щелочную сторону. В то же время действие ионов хлора на фумаратгидратазу отражается только на левой ветви кривой; реакция ингибируется при кислых значениях pH и оптимум pH также смещается, однако по-прежнему в щелочную сторону. Действие ионов иода, нитрата и хлората отражается на обеих ветвях pH-кривой для амилазы, так что смещается вся кривая целиком; это эквивалентно подавлению процесса в кислой области и активации в щелочной области, вследствие чего максимальная скорость изменяется лишь незначительно.

Результаты, полученные в опытах с фумаратгидратазой, Массей объясняет присоединением аниона к основной группе, расположенной рядом с одной из двух ионизирующихся групп в активном центре, которые определяют форму pH-кривой. Не имеет значения, какова природа этой ионизирующейся группы активного центра, т. е. является ли она кислой или основной, так как уменьшение положительного заряда соседнего участка и в том и в другом случае будет увеличивать pK ионизирующейся группы и сдвигать кривую титрования в щелочную сторону.

Не все случаи активации анионами можно объяснить влиянием анионов на зависимость скорости реакции от pH. Так, на-

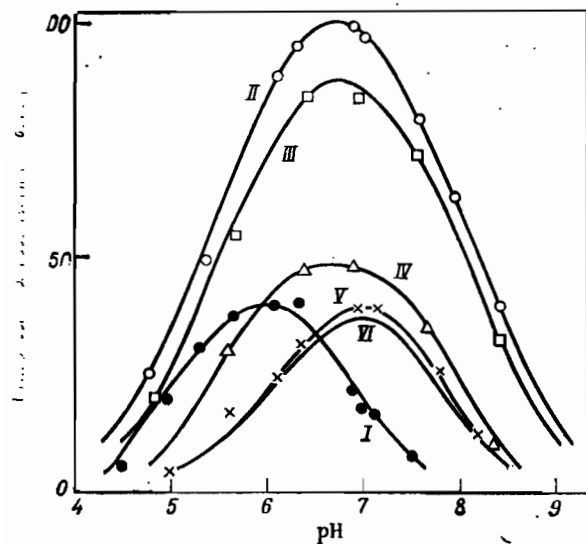


Рис. 8.27. Активация α -амилазы слюны (КФ 3.2.1.1) анионами как функция pH [3314]. I — без добавления анионов (за исключением фосфата); II — ионы хлора (0,005 или 0,04 M); III — ионы брома (0,04 M); IV — ионы йода (0,04 M); V — ионы нитрата (0,1 M); VI — ионы хлората (0,1 M). Во всех случаях концентрация фосфата 0,03 M.

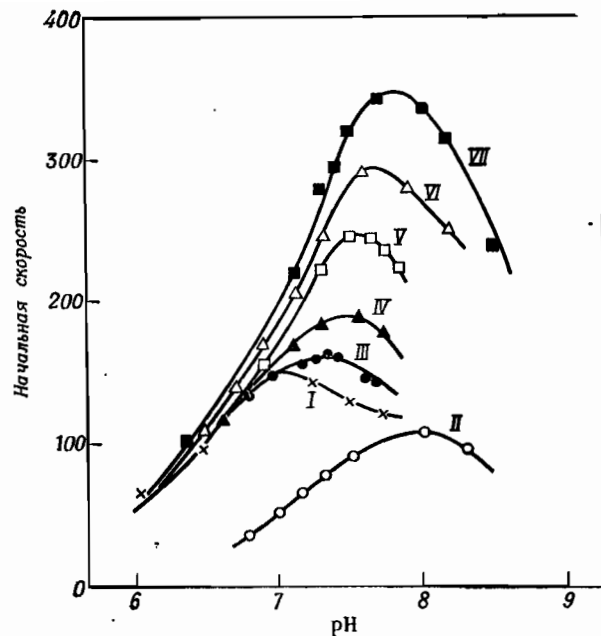
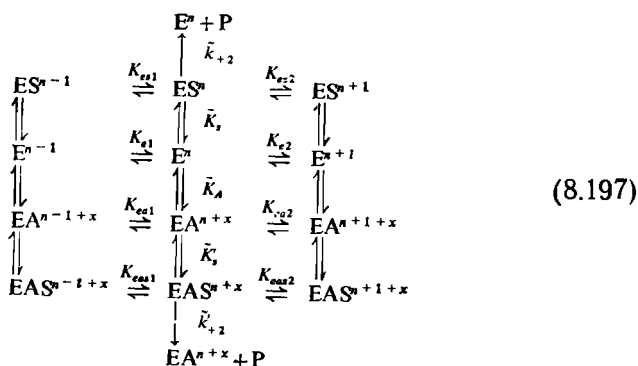


Рис. 8.28. Активация фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2) анионами как функция pH [3010]. I — без добавления анионов; II — ионы хлора (0,1 M); III — ионы селената (0,03 M), или сульфата (0,025 M); IV — ионы арсенита (0,01 M); V — ионы пирата (0,01 M); VI — ионы фосфата (0,06 M); VII — ионы арсената (0,05 M).

пример, Уэбб и Морроу [5012] показали, что хлорид-ион и некоторые другие одновалентные ионы резко стимулируют катализируемый арилсульфатазой В из печени быка гидролиз *n*-нитрофенилацетата (однако не со всеми субстратами наблюдается такой эффект). Графики зависимости скорости реакции от рН в присутствии и в отсутствие хлорида идентичны по своей форме и положению и отличаются только высотой. Хлорид не оказывает влияния на сродство фермента к *n*-нитрофенилацетату, так что, по всей вероятности, в данном случае он влияет непосредственно на $\tilde{k}_{+2}$.

Олберти [63] предложил общий математический анализ влияния солей, входящих в состав буферных растворов, на зависимость максимальной скорости реакции и эффективной константы Михаэлиса от рН. Этот анализ был проведен при допущении, что все виды взаимодействия с ферментом осуществляются достаточно быстро по сравнению с образованием продукта. Равновесия, рассмотренные Олберти, могут быть представлены следующими уравнениями (обозначения те же, какие мы использовали выше):



где $\tilde{K}_s$, как и в гл. 4, — не зависящая от рН константа равновесия, определяемая уравнением (4.266); $\tilde{K}'_1$ — соответствующая константа для соединения с субстратом комплекса ЕА; *n*, как и раньше, — число отрицательных зарядов активной формы фермента; *x* — число отрицательных зарядов аниона. Параметр *x* введен для того, чтобы показать истинную величину заряда комплексов, но эта величина не фигурирует в расчетах. Обсуждать реакции, для которых на схеме не указаны константы равновесия, нет необходимости, так как последние являются производными констант, приведенных на схеме.

Олберти получил выражения для *V* и для *K_M* в присутствии аниона, концентрация которого равна *a*. Выражение для *V* име-

ет следующий вид:

$$V = \frac{\tilde{k}_{+s}e + \tilde{k}'_{+2}e \frac{a\tilde{K}_s'}{\tilde{K}_A\tilde{K}_s'}}{\left(1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}\right) + \frac{a\tilde{K}_s}{\tilde{K}_A\tilde{K}_s'} \left(1 + \frac{H}{K_{eas1}} + \frac{K_{eas2}}{H}\right)}. \quad (8.198)$$

В отсутствие аниона ($a=0$) приведенное выше уравнение упрощается до

$$V = \frac{\tilde{k}_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}}. \quad (8.199)$$

Это последнее уравнение идентично уравнению (4.256), рассмотренному при анализе влияния pH на ферментативную реакцию.

В то же время при очень высокой концентрации аниона уравнение (8.198) упрощается до

$$V = \frac{\tilde{k}'_{+2}e}{1 + \frac{H}{K_{eas1}} + \frac{K_{eas2}}{H}}. \quad (8.200)$$

Следовательно, когда фермент насыщен анионом, получается новая кривая зависимости скорости реакции от pH, определяемая константами диссоциации комплекса EAS.

Уравнение (8.198) удобно выразить через pH-функцию f^- [уравнение (4.228)], относительные концентрации [ср. с уравнением (4.20)] и относительную константу активации $\tilde{r} = \frac{\tilde{K}_s}{\tilde{K}'_s}$ [ср. с уравнением (4.209)]. При этом получаем

$$V = \frac{\tilde{k}_{+2}e + \tilde{k}'_{+2}e\alpha\tilde{r}}{f^-_{es} + \alpha\tilde{r}f^-_{eas}}. \quad (8.201)$$

Выражение Олберти для K_s эквивалентно следующему выражению:

$$K_s = \tilde{K}_s \cdot \frac{\left(1 + \frac{H}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{H}\right) + \frac{a}{\tilde{K}_A} \left(1 + \frac{H}{K_{eas1}} + \frac{K_{eas2}}{H}\right)}{\left(1 + \frac{H}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{H}\right) + \frac{a\tilde{K}_s}{\tilde{K}_A\tilde{K}_s'} \left(1 + \frac{H}{K_{eas1}} + \frac{K_{eas2}}{H}\right)}. \quad (8.202)$$

Если ввести f^- и α , то мы получим

$$K_s = \tilde{K}_s \frac{f^-_e + \alpha f^-_{ea}}{f^-_{es} + \alpha\tilde{r}f^-_{eas}}. \quad (8.203)$$

В отсутствие аниона, когда $\alpha=0$,

$$K_s = \tilde{K}_s \frac{f_e^-}{f_{es}^-}. \quad (8.204)$$

Если $f_s=1$, то уравнение (8.204) оказывается тождественным уравнению (4.267), поскольку сделано допущение, что субстрат не ионизируется. При высокой концентрации аниона K_s достигает предельного значения, определяемого выражением

$$K_s = \tilde{K}_s \frac{f_{ae}}{rf_{eas}^-}. \quad (8.205)$$

Олберти рассмотрел некоторые дополнительные осложнения, возникающие в том случае, когда анион конкурирует с субстратом и одновременно активировать фермент или когда, помимо аниона, присутствует еще и конкурентный ингибитор. Полученные им уравнения в общем согласуются с данными по влиянию фосфата на фумаратгидратазу, приведенными в более ранней работе.

Теорелл и др. [4712] определили влияние анионов на шесть констант скорости, соответствующих отдельным стадиям реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой печени. Они нашли, например, что Cl^- в концентрации 0,15 М понижает скорость соединения фермента с окисленным и восстановленным NAD примерно наполовину, удваивает скорость диссоциации комплекса фермента с восстановленным коферментом и в два раза снижает скорость диссоциации комплекса фермента с окисленным коферментом.

ЛИПОФИЛЬНЫЕ ИОНЫ

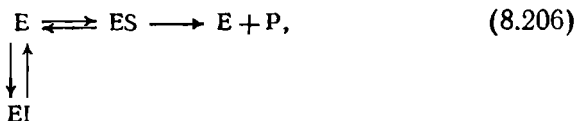
Некоторые ферменты, действующие на водонерастворимые нейтральные вещества, активируются отрицательно заряженными липофильными молекулами. Наиболее хорошо изучена в этом отношении лизофосфолипаза из *Penicillium* (КФ 3.1.1.5). Она эффективно действует на лизофосфоглицериды, но не действует на лецитин, если только не добавлен фосфатидилинозит или анионные детергенты, например додецилсульфат натрия или же дицетилфосфат натрия [274]. Влияние анионных детергентов не обусловлено увеличением поверхности вследствие образования эмульсии, так как аналогичное влияние наблюдается и при действии фермента на монослой субстрата [275]. Присутствие поливалентных катионов и катионных детергентов предотвращает активацию. Было показано, что фермент атакует субстрат только в том случае, если отрицательный электрокинетический потенциал его мицелл превосходит определенную критическую величину.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ И КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Термин «аллостерический фермент» до сих пор не получил достаточно четкого определения и часто используется применительно к любому ферменту, для которого наблюдаются кооперативные эффекты. Под кооперативностью при этом понимают явление, состоящее в том, что связывание с ферментом одной молекулы данного вещества влияет на связывание последующих молекул этого же вещества. Следует, однако, отметить, что кооперативность не является обязательным признаком аллостерических ферментов, хотя у многих из них она действительно наблюдается.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Это понятие было введено Моно, Шанжё и Жакобом [3214] для объяснения конкурентного ингибирования ферментов соединениями, которые существенно отличаются от субстрата. Классический тип конкурентного ингибитора, являющегося структурным аналогом субстрата, может быть определен как *изостерический*, тогда как конкурентный ингибитор, не сходный по своей структуре с субстратом, — как *аллостерический*. Моно и др. предположили, что центры связывания аллостерических ингибиторов отличаются от активного центра фермента и, по-видимому, удалены от него. Аллостерические ингибиторы проявляют конкурентный эффект, вызывая такое конформационное изменение в молекуле фермента, что связывание ингибитора препятствует связыванию субстрата, и наоборот. Эта модель может быть представлена в виде схемы



из которой видно, что соответствующее кинетическое уравнение должно быть идентично уравнению для случая изостерического конкурентного ингибирования (8.6).

Связывание соединения в центре фермента, отличном от активного центра, которое влияет на последний в результате конформационного изменения в молекуле фермента, может, очевидно, приводить к эффектам, отличным от конкурентного ингибирования; так, Кошланд [2567]¹ предположил, что в некоторых случаях этим объясняется неконкурентное ингибирование. Позднее Моно, Уаймен и Шанжё ввели понятие *аллостерический эффектор*, относящееся как к ингибиторам, так и к активаторам всех типов, действующим подобным образом [3217].

Представление об аллостерических ферментах становится, однако, все более сложным, поскольку это понятие стали использовать применительно ко всем ферментам, которые обладают кооперативными свойствами, независимо от того, известны ли для них какие-либо аллостерические активаторы или ингибиторы. Хотя для всех достаточно хорошо изученных кооперативных ферментов действительно обнаружены аллостерические активаторы или ингибиторы, тем не менее, как отмечено выше, фермент, который подвергается аллостерическому ингибированию или активации, может и не обладать кооперативными свойствами.

КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Кооперативные эффекты могут проявляться при связывании молекул субстрата, активатора или ингибитора (все они называются лигандами). Этот термин относится к явлению, при котором связывание ферментом молекулы лиганда влияет на связывание последующих молекул. Кооперативность проявляется в том, что зависимость количества связанного лиганда от концентрации свободного лиганда не изображается графически в виде равнобочной гиперболы. Влияние лиганда на связывание молекул того же лиганда иногда называют *гомотропным эффектом*, влияние же лиганда на связывание молекул другого лиганда — *гетеротропным эффектом* [3217]. Гомотропные эффекты, при которых связывание лиганда приводит к увеличению сродства фермента к последующим молекулам этого же лиганда, часто называют *положительной кооперативностью*, а эффекты, при которых связывание лиганда уменьшает сродство фермента, — *отрицательной кооперативностью* или *антикооперативностью*.

Кооперативные эффекты приводят к характерным изменениям кривых связывания лигандов. Если обозначить степень насыщения фермента лигандом S через $\bar{Y}_s$, где

$$\bar{Y}_s = \frac{s_b}{n e}, \quad (8.207)$$

s_b — концентрация связанного лиганда, e — концентрация фермента, n — число связывающих центров для S на молекулу фермента, то доля незанятых связывающих центров будет составлять $(1 - \bar{Y}_s)$. Заметим, что величина $\bar{Y}_s$ в том виде, как она здесь определена, отличается от величины r , определяемой уравнением (8.195), так как

$$\bar{Y}_s = \frac{r}{n}, \quad (8.208)$$

и, следовательно, $\bar{Y}_s$ в отличие от r не может быть больше единицы.

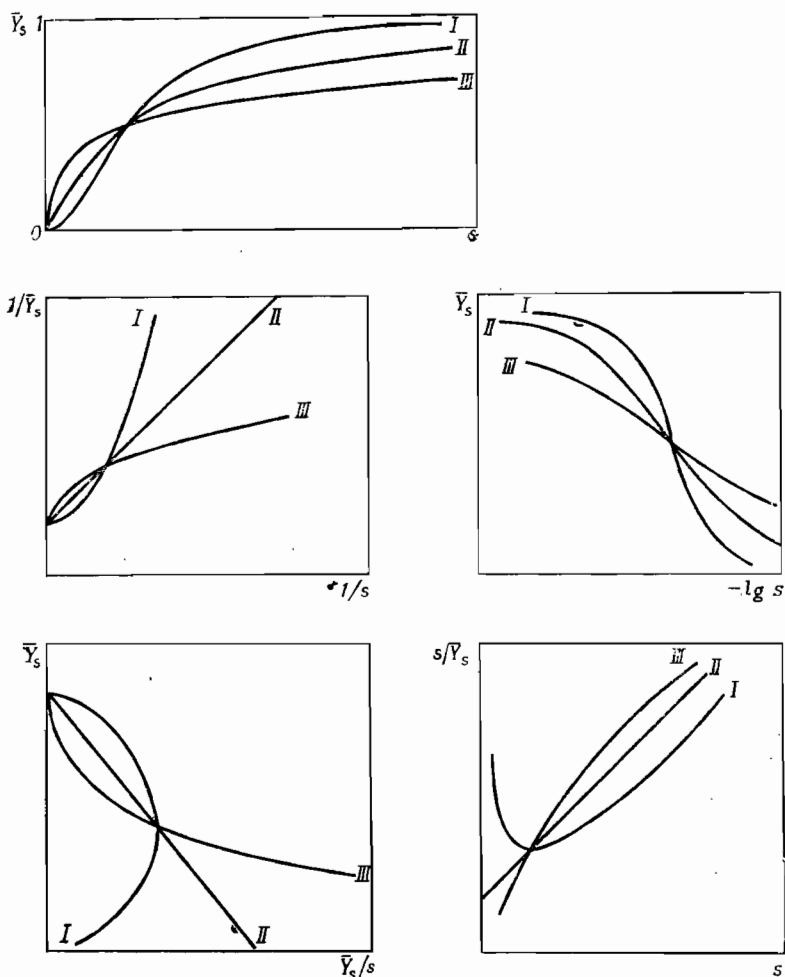


Рис. 8.29. Проявление положительной кооперативности (кривые I) и отрицательной кооперативности (кривые III) на графиках зависимости степени насыщения фермента субстратом от концентрации свободного субстрата в различных координатах. Кривые II относятся к системам, не обладающим кооперативностью. Значение K' , одинаково для каждой серии кривых; коэффициент Хилла [H в уравнении (8.212)] принят равным 2 в случае положительной кооперативности и 0,5 в случае отрицательной кооперативности.

На рис. 8.29 представлены теоретические кривые изменения $\bar{Y}_s$ от концентрации свободного S для систем, которые проявляют положительную, отрицательную и «нулевую» кооперативность. Если скорость реакции пропорциональна степени насыщения, аналогичные кривые будут получены при построении гра-

фика зависимости относительной скорости ϕ [определенной как v/V , см. уравнение (4.21)] от s . Отклонение кривых связывания в случае систем с положительной и отрицательной кооперативностью от простой равнобочной гиперболы будет приводить к нелинейности графиков двойных обратных величин, как показано на рис. 8.29. Системы с положительной кооперативностью характеризуются вогнутыми, а с отрицательной кооперативностью — выпуклыми кривыми; на этом же рисунке приведены графики, построенные и в других, часто используемых координатах. Рассмотрим теперь различные системы, в которых наблюдаются кооперативные эффекты.

Модель Хилла

Для того чтобы могло произойти кооперативное связывание лиганда ферментом, ясно, что последний должен иметь более чем один центр связывания этого лиганда. Для анализа такой системы был построен целый ряд моделей. Одна из наиболее ранних моделей предложена А. Хиллом [1949] для объяснения хода S-образных кривых связывания кислорода гемоглобином. Хилл предположил, что такое связывание можно объяснить в рамках схемы, в которой присоединение H молекул лиганда (S) к ферменту происходит в одну стадию:



Общая константа диссоциации этой реакции (K'_s) равна

$$K'_s = \frac{e_f s^H}{x}, \quad (8.210)$$

где x — концентрация комплекса ES_H , e_f — концентрация свободного фермента. Степень насыщения может быть выражена следующим образом [см. (8.207)]:

$$\bar{Y}_s = \frac{x}{e_f + x}. \quad (8.211)$$

Объединив это уравнение и (8.210) и исключив x , получим

$$\bar{Y}_s = \frac{s^H}{K'_s + s^H}. \quad (8.212)$$

Преобразуем это выражение так, чтобы можно было найти величину H :

$$\frac{\bar{Y}_s}{1 - \bar{Y}_s} = \frac{s^H}{K'_s}. \quad (8.213)$$

Логарифмирование приводит к выражению

$$\lg \frac{\bar{Y}_s}{1 - \bar{Y}_s} = H \lg s - \lg K'_s. \quad (8.214)$$

Построив график зависимости $\lg \frac{\bar{Y}_s}{1 - \bar{Y}_s}$ от $\lg s$, из наклона получившейся прямой мы сможем определить H , а точка пересечения прямой с осью абсцисс даст нам величину $-\lg K'_s$. Данная модель предполагает, что стабильные интермедиаты (т. е. ES_{H-1} , ES_{H-2} и т. д.) в системе отсутствуют и величина H , полученная на основании такого анализа, соответствует числу связывающих центров (т. е. $H=n$). Следовательно, если молекула фермента имеет один центр связывания или несколько независимых центров, величина H должна быть равна 1, и (8.213) является уравнением равнобочной гиперболы. Когда это уравнение было использовано для описания связывания кислорода гемоглобином, значение H оказалось равным 2,8, в то время как молекула гемоглобина содержит четыре центра связывания кислорода. Хотя эта модель не позволяет описать кооперативное поведение гемоглобина, уравнение (8.212), которое часто называют уравнением Хилла, широко используется для анализа явления кооперативного связывания как эмпирический метод оценки степени кооперативности. Применение уравнения Хилла будет обсуждаться ниже.

Модель Эдера

Модель, предложенная Хиллом, была модифицирована Эдером [21], который допустил, что при связывании лиганда ферментом образуются стабильные промежуточные комплексы, содержащие различное число молекул лиганда. Для фермента, имеющего четыре связывающих центра, система может быть представлена следующим образом:



где K_1 , K_2 , K_3 и K_4 — истинные константы диссоциации отдельных стадий; их иногда называют *микроскопическими* константами диссоциации. Эти константы можно было бы непосред-

венно определить, если бы каждую из реакций удалось изучать независимо. Однако для тетрамерного фермента, описанного выше, система усложняется вследствие того, что число связывающих центров, доступных субстрату, не одинаково на разных стадиях. Так, на стадии (8.215) имеется четыре доступных субстрату центра связывания, но, так как на данной стадии может быть заполнен только один из них, S может диссоциировать только из одного центра. Аналогичным образом на стадии (8.216) имеются три доступных центра связывания, но только два центра, из которых молекула субстрата может диссоциировать. Число соответствующих центров для стадий (8.217) равно 2 и 3, а для (8.218) — 1 и 4. Таким образом, *кажущиеся константы диссоциации*, которые могут быть непосредственно определены, являются статистическими, они связаны с микроскопическими константами диссоциации соотношениями, учитывающими доступность центров связывания:

$$\bar{K}_1 = \frac{1}{4} K_1, \quad (8.219)$$

$$\bar{K}_2 = \frac{2}{3} K_2, \quad (8.220)$$

$$\bar{K}_3 = \frac{3}{2} K_3, \quad (8.221)$$

$$\bar{K}_4 = 4K_4, \quad (8.222)$$

где $\bar{K}_1 - \bar{K}_4$ — кажущиеся константы диссоциации реакций (8.215) — (8.218).

Если концентрации свободного фермента и комплексов ES , ES_2 , ES_3 и ES_4 обозначить через e_f , w , x , y и z соответственно, то концентрация центров фермента, заполненных субстратом, будет равна $(w + 2x + 3y + 4z)$ и суммарное число связывающих центров на молекулу фермента будет равно $4e_t$ (где e_t — суммарная концентрация фермента) и, следовательно,

$$4e_t = 4(e_f + w + x + y + z). \quad (8.223)$$

Степень насыщения фермента субстратом будет равна отношению числа заполненных центров к суммарному числу доступных центров [см. (8.211)]:

$$\bar{Y}_s = \frac{w + 2x + 3y + 4z}{4(e_f + w + x + y + z)}. \quad (8.224)$$

Концентрации промежуточных фермент-субстратных комплексов связаны с кажущимися константами связывания отдельных стадий реакции почти таким же образом, как и в случае бо-

лее простых равновесных систем (см. гл. 4):

$$w = \frac{e_f s}{\bar{K}_1}, \quad (8.225)$$

$$x = \frac{ws}{\bar{K}_2}, \quad (8.226)$$

$$y = \frac{xs}{\bar{K}_3}, \quad (8.227)$$

$$z = \frac{ys}{\bar{K}_4}. \quad (8.228)$$

Исключив w из (8.225) и (8.226), получим

$$x = \frac{e_f s^2}{\bar{K}_1 \bar{K}_2}. \quad (8.229)$$

Подстановка полученного выражения в (8.227) приводит к

$$y = \frac{e_f s^3}{\bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3}, \quad (8.230)$$

а подстановка этого выражения в (8.228) в свою очередь дает

$$z = \frac{e_f s^4}{\bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3 \bar{K}_4}. \quad (8.231)$$

Подстановка (8.225), (8.229), (8.230) и (8.231) в (8.224) позволяет исключить концентрацию свободного фермента e_f :

$$\begin{aligned} \parallel \frac{\frac{s}{\bar{K}_1} + \frac{2s^2}{\bar{K}_1 \bar{K}_2} + \frac{3s^3}{\bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3} + \frac{4s^4}{\bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3 \bar{K}_4}}{4 \left(\frac{s}{\bar{K}_1} + \frac{s^2}{\bar{K}_1 \bar{K}_2} + \frac{s^3}{\bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3} + \frac{s^4}{\bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3 \bar{K}_4} + 1 \right)} = \\ = \frac{\bar{K}_2 \bar{K}_3 \bar{K}_4 s + 2 \bar{K}_3 \bar{K}_4 s^2 + 3 \bar{K}_4 s^3 + 4 s^4}{4 (\bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3 \bar{K}_4 + \bar{K}_2 \bar{K}_3 \bar{K}_4 s + \bar{K}_3 \bar{K}_4 s^2 + \bar{K}_4 s^3 + s^4)}. \quad (8.232) \end{aligned}$$

Если все центры связывания идентичны и не взаимодействуют между собой, кажущиеся константы диссоциации могут быть выражены через одну микроскопическую константу диссоциации K_s :

$$K_s = 4 \bar{K}_1 = \frac{3}{2} \bar{K}_2 = \frac{2}{3} \bar{K}_3 = \frac{1}{4} \bar{K}_4. \quad (8.233)$$

Это соотношение можно использовать для упрощения (8.232):

$$\bar{Y}_s = \frac{(K_s)^3 s + 3 (K_s)^2 s^2 + 3 (K_s) s^3 + s^4}{(K_s)^4 + 4 (K_s)^3 s + 6 (K_s)^2 s^2 + 4 (K_s) s^3 + s^4}. \quad (8.234)$$

Разделив на K_s^4 , получаем выражение

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_s} + \frac{3s^2}{(K_s)^2} + \frac{3s^3}{(K_s)^3} + \frac{s^4}{(K_s)^4}}{1 + \frac{4s}{K_s} + \frac{6s^2}{(K_s)^2} + \frac{4s^3}{(K_s)^3} + \frac{s^4}{(K_s)^4}} = \frac{\frac{s}{K_s} \left(1 + \frac{s}{K_s}\right)^3}{\left(1 + \frac{s}{K_s}\right)^4}, \quad (8.235)$$

упрощение которого дает

$$\bar{Y}_s = \frac{s/K_s}{1 + \frac{s}{K_s}} = \frac{1}{1 + \frac{K_s}{s}}. \quad (8.236)$$

Таким образом, связывание субстрата описывается обычной гиперболической зависимостью.

Если микроскопические константы диссоциации для разных центров связывания различаются, будет наблюдаться кооперативность. Последовательное уменьшение значений микроскопических констант диссоциации будет приводить к положительной, а увеличение — к отрицательной кооперативности. Например, из уравнений (8.219) — (8.222) видно, что положительная кооперативность будет наблюдаться, если $\bar{K}_2 < \frac{8}{3}\bar{K}_1$, $\bar{K}_3 < \frac{9}{4}\bar{K}_2$, $\bar{K}_4 < \frac{8}{3}\bar{K}_3$.

Модель, предложенная Эдером [21] и описываемая уравнениями (8.215) — (8.235), рассматривает систему с четырьмя связывающими центрами. Эта модель была построена для объяснения S-образности зависимости для связывания кислорода гемоглобином, однако сходные уравнения могут быть получены для ферментов с любым числом центров связывания. Так, в случае фермента, имеющего два центра:



связывание субстрата описывается следующим уравнением:

$$\bar{Y}_s = \frac{\bar{K}_2 s + 2s^2}{2(\bar{K}_1 \bar{K}_2 + \bar{K}_2 s + s^2)}. \quad (8.238)$$

Такие уравнения показывают на языке математики, почему различия в константах диссоциации для отдельных стадий связывания субстрата приводят к появлению кооперативных эффектов, но не раскрывают механизма кооперативности на молекулярном уровне. Наиболее простой случай, когда могло бы наблюдаться кооперативное связывание, — это наличие у фермента различающихся по микроскопическим константам диссоциации центров связывания рассматриваемого лиганда. Однако во многих теоретических моделях кооперативности предполагается, что у каждой молекулы свободного фермента все центры связыва-

ния данного лиганда идентичны и связывание одной молекулы лиганда вызывает изменение свойств незанятых центров. Это предположение основано на данных о том, что многие кооперативные ферменты состоят из идентичных субъединиц, каждая из которых имеет один центр связывания данного лиганда. С тех пор как кристаллографические исследования показали, что идентичные субъединицы белка, по-видимому, располагаются симметричным образом, стали считать, что в свободном ферменте все центры связывания лиганда являются идентичными.

Модель Полинга и Уаймена

Попытка понять природу кооперативности гемоглобина с точки зрения субъединичной структуры белка была предпринята Полингом [3627], а позже и другими исследователями [701, 4726, 5176]. Полинг отметил, что, если на сродство к субстрату любой субъединицы влияет занятость соседних субъединиц, наблюдаемые эффекты будут зависеть от исходной геометрии фермента. Возможные варианты взаимодействия субъединиц схематически представлены на рис. 8.30, где молекула фермента изображена в виде тетраэдра, квадрата или прямоугольника. В случае тетраэдра ближайшими соседями каждой субъединицы являются все три оставшиеся, а в случае квадрата и прямоугольника — только две. Различие между квадратной и прямоугольной моделями в свою очередь заключается в том, что в случае квадрата влияние двух соседних субъединиц на данную субъединицу одинаково, а в случае прямоугольника различается.

Полинг рассмотрел тетраэдрическую модель, представленную на рис. 8.30. Он предположил, что связывание субстрата с одной субъединицей изменяет сродство соседней субъединицы в постоянное число раз (α) и, следовательно, сродство какой-либо субъединицы зависит от того, сколько субъединиц уже занято. В отличие от модели Эдера используется одна константа диссоциации, однако вводится «фактор взаимодействия» (α).

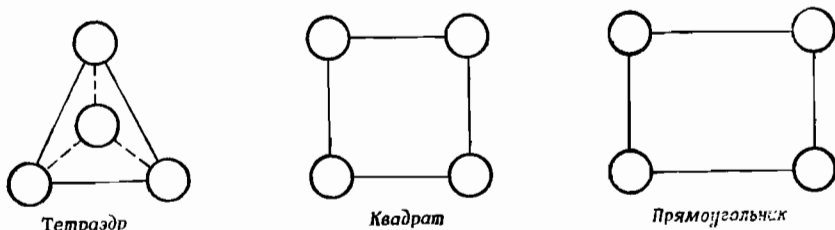


Рис. 8.30. Различное пространственное расположение субъединиц в тетрамерных белках, рассмотренное Полингом [3627] и Уайменом [5176].

Таким образом, в свободном ферменте все четыре субъединицы связывают субстрат с одинаковой константой диссоциации K_s . Если одна из субъединиц связала молекулу субстрата, то константа диссоциации для любой из трех оставшихся субъединиц составляет αK_s ; если две субъединицы связали субстрат, то эта константа становится равной $\alpha^2 K_s$, если три — $\alpha^3 K_s$. При $\alpha < 1$ связывание субстрата субъединицей будет приводить к увеличению сродства к нему соседних субъединиц; при $\alpha > 1$ будет наблюдаться уменьшение сродства рассматриваемой субъединицы к субстрату при связывании его соседней субъединицей, и, наконец, если $\alpha = 1$, субъединицы будут функционировать независимо.

Уравнение связывания для такой модели может быть получено таким же образом, как и для модели Эдера, и оно имеет такой же вид [см. уравнения (8.234) и (8.235)]:

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_s} + \frac{3s^2}{\alpha K_s^2} + \frac{3s^3}{\alpha^3 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha^6 K_s^4}}{1 + \frac{4s}{K_s} + \frac{6s^2}{\alpha K_s^2} + \frac{4s^3}{\alpha^3 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha^6 K_s^4}} = \frac{\alpha^6 K_s^3 s + 3\alpha^5 K_s^2 s^2 + 3\alpha^3 K_s s^3 + s^4}{\alpha^6 K_s^4 + 4\alpha^5 K_s^3 s + 6\alpha^3 K_s^2 s^2 + 4\alpha K_s s^3 + s^4}. \quad (8.239)$$

Модель Полинга была обобщена Уонгом и Эндрени [5147], которые рассмотрели случай, когда величина факторов взаимодействия изменяется по мере заполнения субъединиц субстратом; постулируется, что микроскопическая константа диссоциации равна αK_s , когда занята одна субъединица, $\alpha_2 K_s$ и $\alpha_3 K_s$, когда заняты две и три субъединицы соответственно. Уравнение связывания для такой модели будет иметь следующий вид:

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_s} + \frac{3s^2}{\alpha_1 K_s^2} + \frac{3s^3}{\alpha_1 \alpha_2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3 K_s^4}}{1 + \frac{4s}{K_s} + \frac{6s^2}{\alpha_1 K_s^2} + \frac{4s^3}{\alpha_1 \alpha_2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3 K_s^4}}. \quad (8.240)$$

В «квадратной» модели взаимодействия субъединиц, представленной на рис. 8.31, на сродство к субстрату свободной субъединицы способны влиять только две субъединицы. Таким образом, предполагается, что на сродство данной субъединицы к субстрату не влияет связывание субстрата субъединицей, расположенной по диагонали. При условии, что две соседние субъединицы оказывают одинаковое влияние на данную субъединицу, уравнение связывания имеет вид

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_s} + \frac{s^2}{K_s^2} \left(1 + \frac{2}{\alpha}\right) + \frac{3s^3}{\alpha^2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha^4 K_s^4}}{1 + \frac{4s}{K_s} + \frac{2s^2}{K_s^2} \left(1 + \frac{2}{\alpha}\right) + \frac{4s^3}{\alpha^2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha^4 K_s^4}}. \quad (8.241)$$

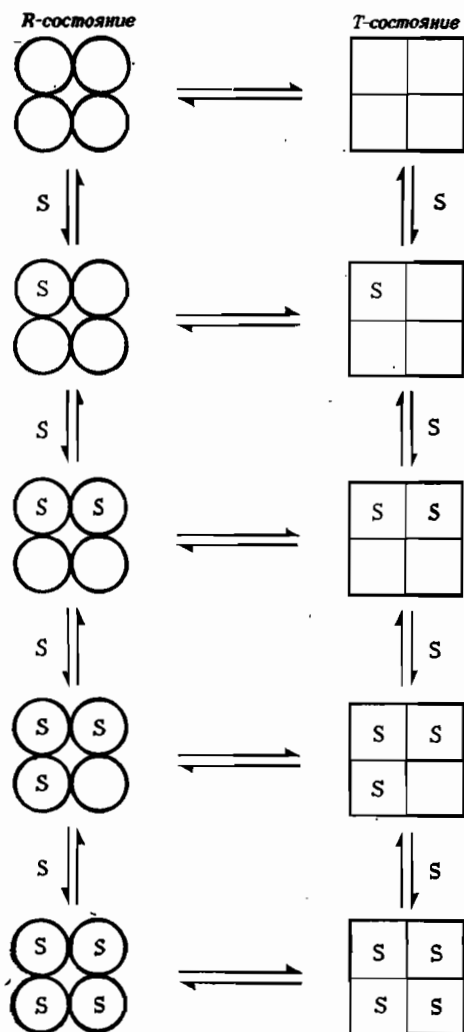


Рис. 8.31. Схематическое изображение модели согласованных конформационных изменений (модель Моно, Уаймена и Шанжэ [3217]) для тетрамерного фермента. $\bigcirc$ и $\square$ — два разных конформационных состояния субъединиц.

Если предположить, что влияние соседних субъединиц различно, мы получим следующее уравнение:

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_s} + \frac{s^2}{K_s^2} \left(1 + \frac{2}{\alpha_1}\right) + \frac{3s^3}{\alpha_2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha_2^2 K_s^4}}{1 + \frac{4s}{K_s} + \frac{2s^2}{K_s^2} \left(1 + \frac{2}{\alpha_1}\right) + \frac{4s^3}{\alpha_2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha_2^2 K_s^4}}. \quad (8.242)$$

Уаймен [5176] рассмотрел прямоугольную модель взаимодействия субъединиц, в которой каждая субъединица соседст-

вует с двумя другими, расположенными на разном расстоянии и влияющими на нее в разной степени. Когда ближайшая к данной субъединица связывает субстрат, константа диссоциации для рассматриваемой субъединицы становится равной $\alpha_1 K_s$. При связывании субстрата более отдаленной субъединицей константа диссоциации равна $\alpha_2 K_s$, а когда заняты обе примыкающие субъединицы — $\alpha_1 \alpha_2 K_s$. Эти соотношения приводят к следующему уравнению связывания:

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_s} + \frac{s^2}{K_s^2} \left(1 + \frac{1}{\alpha_1} + \frac{1}{\alpha_2}\right) + \frac{3s^3}{\alpha_1 \alpha_2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha_1^2 \alpha_2^2 K_s^4}}{1 + \frac{4s}{K_s} + \frac{2s^2}{K_s^2} \left(1 + \frac{1}{\alpha_1} + \frac{1}{\alpha_2}\right) + \frac{4s^3}{\alpha_1 \alpha_2 K_s^3} + \frac{s^4}{\alpha_1^2 \alpha_2^2 K_s^4}}. \quad (8.243)$$

Модель согласованных конформационных переходов (модель Моно, Уаймена и Шанжё)

Первая молекулярная модель, с помощью которой попытались объяснить кооперативность на основе конформационных изменений молекулы фермента, была предложена Моно, Уайменом и Шанжё [3217]. В основе модели лежат следующие предположения.

1. Кооперативные белки представляют собой олигомеры, состоящие из идентичных *протомеров*, которые связаны друг с другом таким образом, что занимают в свободном белке эквивалентные положения. Такой белок обладает по крайней мере одной осью симметрии.

2. Протомер является наименьшей функциональной субъединицей белка, которая содержит один специфический центр связывания для каждого лиганда. (В случае аллостерических белков, которые состоят из субъединиц различного типа, протомер не соответствует какой-либо отдельной субъединице, а построен таким образом, что включает каждую из субъединиц различных типов.)

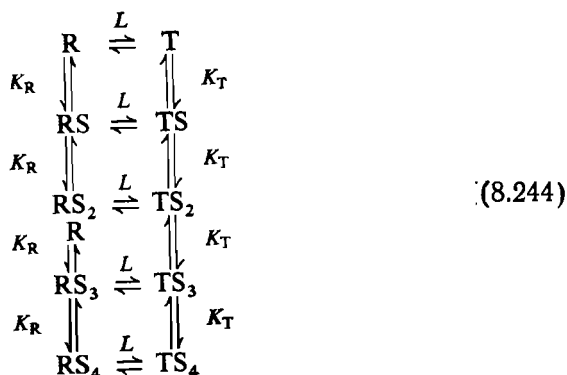
3. Из 1 и 2 следует, что для любого специфического лиганда все связывающие центры молекулы белка идентичны.

4. Взаимодействие протомеров в олигомере накладывает ограничение на конформационное состояние каждого из протомеров. Если связывание лиганда одним протомером вызывает изменение его конформации, то идентичные конформационные изменения должны наблюдаться и для всех других протомеров, входящих в состав белкового олигомера.

5. Свободный белок представлен по крайней мере двумя разными конформационными состояниями, находящимися в равно-

весии. Эти состояния различаются по характеру связи между протомерами, что приводит к различиям в эффективности связывания лигандов. Таким образом, переход из одного состояния в другое приводит к изменению сродства фермента к данному лиганду. Молекулярная симметрия белкового олигомера, однако, не изменяется при переходе из одного состояния в другое.

Согласно рассматриваемой модели, в простейшем случае в равновесии белок может находиться в двух конформационных состояниях — R («расслабленном») и T («напряженном»). На рис. 8.31 представлена такая модель для случая связывания субстрата тетрамерным ферментом. По определению все субстратсвязывающие центры белка как в состоянии R, так и в состоянии T идентичны, следовательно, для определения связывания субстрата ферментом в этих двух состояниях могут быть использованы микроскопические константы диссоциации K_R и K_T . Такая система представляется следующей совокупностью равновесных стадий:



Здесь L — константа равновесия для перехода между двумя состояниями

$$L = T/R; \quad (8.245)$$

иногда ее называют *аллостерической константой*. Если обозначить концентрации форм от R до RS_4 через $x_0, \dots, x_4$, а от T до TS_4 — через $y_0, \dots, y_4$, то выражение для степени насыщения будет иметь вид

$$\bar{Y}_s = \frac{(x_1 + 2x_2 + 3x_3 + 4x_4) + (y_1 + 2y_2 + 3y_3 + 4y_4)}{4[(x_0 + x_1 + x_2 + x_3 + x_4) + (y_0 + y_1 + y_2 + y_3 + y_4)]}. \quad (8.246)$$

Кажущиеся константы диссоциации для каждой стадии этой схемы связаны с микроскопическими константами следующими

соотношениями:

$$\bar{K}_{R1} = \frac{1}{4} K_R, \quad \bar{K}_{T1} = \frac{1}{4} K_T; \quad (8.247)$$

$$\bar{K}_{R2} = \frac{2}{3} K_R, \quad \bar{K}_{T2} = \frac{2}{3} K_T; \quad (8.248)$$

$$\bar{K}_{R3} = \frac{3}{2} K_R, \quad \bar{K}_{T3} = \frac{3}{2} K_T; \quad (8.249)$$

$$\bar{K}_{R4} = 4K_R, \quad \bar{K}_{T4} = 4K_T. \quad (8.250)$$

Концентрации различных форм могут быть выражены через эти кажущиеся константы диссоциации:

$$x_1 = \frac{x_0 s}{\bar{K}_{R1}}, \quad y_1 = \frac{y_0 s}{\bar{K}_{T1}}; \quad (8.251)$$

$$x_2 = \frac{x_1 s}{\bar{K}_{R2}}, \quad y_2 = \frac{y_1 s}{\bar{K}_{T2}}; \quad (8.252)$$

$$x_3 = \frac{x_2 s}{\bar{K}_{R3}}, \quad y_3 = \frac{y_2 s}{\bar{K}_{T3}}; \quad (8.253)$$

$$x_4 = \frac{x_3 s}{\bar{K}_{R4}}, \quad y_4 = \frac{y_3 s}{\bar{K}_{T4}}. \quad (8.254)$$

Объединяя (8.251) и (8.252) для исключения x_1 и y_1 , получаем

$$x_2 = \frac{x_0 s^2}{\bar{K}_{R1} \bar{K}_{R2}}, \quad y_2 = \frac{y_0 s^2}{\bar{K}_{T1} \bar{K}_{T2}}. \quad (8.255)$$

Аналогичным образом, исключив x_2 и y_2 , x_3 и y_3 из уравнений (8.253) и (8.254), получаем

$$x_3 = \frac{x_0 s^3}{\bar{K}_{R1} \bar{K}_{R2} \bar{K}_{R3}}, \quad y_3 = \frac{y_0 s^3}{\bar{K}_{T1} \bar{K}_{T2} \bar{K}_{T3}}; \quad (8.256)$$

$$x_4 = \frac{x_0 s^4}{\bar{K}_{R1} \bar{K}_{R2} \bar{K}_{R3} \bar{K}_{R4}}, \quad y_4 = \frac{y_0 s^4}{\bar{K}_{T1} \bar{K}_{T2} \bar{K}_{T3} \bar{K}_{T4}}. \quad (8.257)$$

Подстановка выражений для соотношений между микроскопическими и кажущимися константами диссоциации [уравнения (8.247) — (8.250)] в уравнения (8.251) и (8.255) — (8.257) дает

$$x_1 = \frac{4x_0 s}{K_R}, \quad y_1 = \frac{4y_0 s}{K_T}; \quad (8.258)$$

$$x_2 = \frac{6x_0 s^2}{K_R^2}, \quad y_2 = \frac{6y_0 s^2}{K_T^2}; \quad (8.259)$$

$$x_3 = \frac{4x_0 s^3}{K_R^3}, \quad y_3 = \frac{4y_0 s^3}{K_T^3}; \quad (8.260)$$

$$x_4 = \frac{x_0 s^4}{K_R^4}, \quad y_4 = \frac{y_0 s^4}{K_T^4}. \quad (8.261)$$

Подстановка этих соотношений в (8.246) приводит к следующему выражению для степени насыщения:

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{4x_0s}{K_R} + \frac{12x_0s^2}{K_R^2} + \frac{12x_0s^3}{K_R^3} + \frac{4x_0s^4}{K_R^4} +}{4 \left[\left(x_0 + \frac{4x_0s}{K_R} + \frac{6x_0s^2}{K_R^2} + \frac{4x_0s^3}{K_R^3} + \frac{x_0s^4}{K_R^4} \right) + \right.} \rightarrow$$

$$\rightarrow \frac{\left. + \frac{4y_0s}{K_T} + \frac{12y_0s^2}{K_T^2} + \frac{12y_0s^3}{K_T^3} + \frac{4y_0s^4}{K_T^4} \right.}{\left. + \left(y_0 + \frac{4y_0s}{K_T} + \frac{6y_0s^2}{K_T^2} + \frac{4y_0s^3}{K_T^3} + \frac{y_0s^4}{K_T^4} \right) \right]} , \quad (8.262)$$

которое можно упростить

$$\bar{Y}_s = \frac{4 \frac{x_0s}{K_R} \left(1 + \frac{3s}{K_R} + \frac{3s^2}{K_R^2} + \frac{s^3}{K_R^3} \right) +}{4 \left[x_0 \left(1 + \frac{4s}{K_R} + \frac{6s^2}{K_R^2} + \frac{4s^3}{K_R^3} + \frac{s^4}{K_R^4} \right) + \right.} \rightarrow$$

$$\rightarrow \frac{\left. + \frac{4y_0s}{K_T} \left(1 + \frac{3s}{K_T} + \frac{3s^2}{K_T^2} + \frac{s^3}{K_T^3} \right) \right.}{\left. + y_0 \left(1 + \frac{4s}{K_T} + \frac{6s^2}{K_T^2} + \frac{4s^3}{K_T^3} + \frac{s^4}{K_T^4} \right) \right]} =$$

$$= \frac{\frac{x_0s}{K_R} \left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^3 + \frac{y_0s}{K_T} \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^3}{x_0 \left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^4 + y_0 \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^4} . \quad (8.263)$$

Так как аллостерическую константу можно определить как $L = y_0/x_0$, используем это выражение для исключения y_0 из уравнения (8.263):

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{x_0s}{K_R} \left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^3 + \frac{Lx_0s}{K_T} \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^3}{x_0 \left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^4 + Lx_0 \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^4} =$$

$$= \frac{\frac{s}{K_R} \left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^3 + \frac{Ls}{K_T} \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^3}{\left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^4 + L \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^4} . \quad (8.264)$$

Аналогичным образом могут быть выведены уравнения для систем с любым числом связывающих центров. Для фермента, имеющего n центров связывания субстрата, выражение для сте-

пени насыщения имеет вид

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_R} \left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^{n-1} + \frac{Ls}{K_T} \left(1 + \frac{s}{K_T}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n + L \left(1 + \frac{s}{K_T}\right)^n}. \quad (8.265)$$

Если ввести обозначения $s/K_R = \alpha$ и $K_R/K_T = c$ и, следовательно, $s/K_T = c\alpha$, уравнение (8.265) сведется к

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n}. \quad (8.266)$$

Моно, Уаймен и Шанжё подробно рассмотрели частный случай этой модели — *исключительное связывание*, при котором фермент может связывать субстрат только в состоянии R. В этом случае $K_T = \infty$, $c = 0$ и уравнение (8.266) упрощается до

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L}. \quad (8.267)$$

Модель исключительного связывания для димерного белка схематически представлена на рис. 8.32.

В ряде случаев уравнение (8.266) сводится к уравнению гиперболы.

а. Если аллостерическая константа бесконечно мала, то в связывании участвует только одна форма фермента. Членами, содержащими L , можно пренебречь, и уравнение (8.266) приобретает вид

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n} = \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{1}{1 + \frac{K_R}{s}}. \quad (8.268)$$

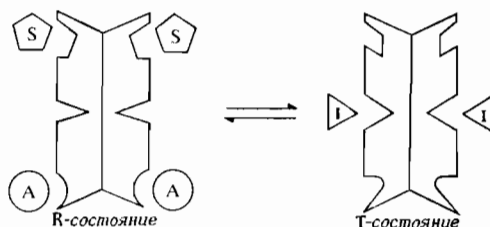


Рис. 8.32. Схематическое изображение модели согласованных конформационных изменений (Моно, Уаймена и Шанжё [3217]) для димерного фермента, в которой субстрат (S) и активатор (A) связываются только ферментом, находящимся в R-состоянии, а ингибитор (I) — ферментом только в T-состоянии [736].

б. Если аллостерическая константа бесконечно велика, то в связывании участвует также только одна форма, и членами, не содержащими L , можно пренебречь, т. е.

$$\bar{Y}_s = \frac{L\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{L(1+\alpha)^n} = \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{1}{1 + \frac{K_T}{s}}. \quad (8.269)$$

в. Если фермент в состояниях R и T обладает одинаковым сродством к субстрату ($K_R = K_T$ и, следовательно, $c = 1$), то уравнение приобретает вид

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+\alpha)^n} = \frac{\alpha(1+L)(1+\alpha)^{n-1}}{(1+L)(1+\alpha)^n} = \frac{\alpha}{1+\alpha}. \quad (8.270)$$

г. Если олигомер имеет только один центр связывания субстрата ($n=1$), то

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha(1+Lc)}{\alpha(1+Lc) + (1+L)} = \frac{\alpha}{\alpha + \frac{1+L}{1+Lc}}. \quad (8.271)$$

Модель Моно, Уаймена и Шанжё способна объяснить не только гомотропные, но и гетеротропные кооперативные эффекты (аллостерические активацию и ингибирование). Можно предположить, что субстрат и аллостерический активатор связываются преимущественно белком в R-состоянии и это связывание увеличивает начальное количество формы с высоким сродством к субстрату. И наоборот, аллостерический ингибитор связывается преимущественно белком в T-состоянии, уменьшая исходное количество формы с высоким сродством к субстрату. Эти эффекты могут быть охарактеризованы изменением величины кажущейся аллостерической константы. Модель димерного фермента, проявляющего исключительное связывание по отношению ко всем лигандам, схематически представлена на рис. 8.32.

При наличии аллостерического активатора аллостерическая константа уменьшается до нового значения (L_A) за счет преимущественного связывания активатора с ферментом в R-состоянии. Если мы обозначим концентрации форм от R до RA_4 через $z_0, \dots, z_4$, а концентрации форм от T до TA_4 — через $w_0, \dots, w_4$, то для модели тетрамерного белка, рассмотренной выше, получим

$$L_A = \frac{w_0 + w_1 + w_2 + w_3 + w_4}{z_0 + z_1 + z_2 + z_3 + z_4}. \quad (8.272)$$

Микроскопические константы диссоциации для каждой стадии можно определить таким же образом, как это было сделано ра-

нее для случая связывания субстрата:

$$z_1 = \frac{4z_0a}{K_{RA}}, \quad w_1 = \frac{4w_0a}{K_{TA}}; \quad (8.273)$$

$$z_2 = \frac{6z_0a^2}{K_{RA}^2}, \quad w_2 = \frac{6w_0a^2}{K_{TA}^2}; \quad (8.274)$$

$$z_3 = \frac{4z_0a^3}{K_{RA}^3}, \quad w_3 = \frac{4w_0a^3}{K_{TA}^3}; \quad (8.275)$$

$$z_4 = \frac{z_0a^4}{K_{RA}^4}, \quad w_4 = \frac{w_0a^4}{K_{TA}^4}. \quad (8.276)$$

Здесь K_{RA} и K_{TA} — микроскопические константы диссоциации комплекса активатора с ферментом в R- и T-состояниях соответственно, a — концентрация активатора.

Подставляя эти выражения в (8.272), получаем

$$L_A = \frac{w_0 + \frac{4w_0a}{K_{TA}} + \frac{6w_0a^2}{K_{TA}^2} + \frac{4w_0a^3}{K_{TA}^3} + \frac{w_0a^4}{K_{TA}^4}}{z_0 + \frac{4z_0a}{K_{RA}} + \frac{6z_0a^2}{K_{RA}^2} + \frac{4z_0a^3}{K_{RA}^3} + \frac{z_0a^4}{K_{RA}^4}} = \frac{w_0 \left(1 + \frac{a}{K_{TA}}\right)^4}{z_0 \left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^4} \quad (8.277)$$

и, так как $L = w_0/z_0$, можно записать, что

$$L_A = L \frac{\left(1 + \frac{a}{K_{TA}}\right)^4}{\left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^4}. \quad (8.278)$$

Поскольку по определению $K_{RA} < K_{TA}$ (т. е. активатор связывается преимущественно R-формой), $a/K_{TA} < a/K_{RA}$ и, следовательно, кажущаяся аллостерическая константа уменьшается. В предельном случае, когда активатор связывается только с ферментом в R-конформации, K_{TA} стремится к бесконечности (следовательно, величиной a/K_{TA} можно пренебречь) и уравнение (8.278) приобретает вид

$$L_A = \frac{L}{\left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^4}. \quad (8.279)$$

При наличии аллостерического ингибитора, который преимущественно связывается с ферментом в T-конформации и увеличивает значение кажущейся аллостерической константы до L_I , получаем выражение, сходное с предыдущим:

$$L_I = L \frac{\left(1 + \frac{i}{K_{TI}}\right)^4}{\left(1 + \frac{i}{K_{RI}}\right)^4}, \quad (8.280)$$

где K_{TI} и K_{RI} — константы диссоциации комплексов ингибитора

с ферментом в Т- и R-состояниях соответственно, i — концентрация ингибитора. Поскольку в этом случае по определению $K_{TI} < < K_{RI}$ и, следовательно, $i/K_{RI} < i/K_{TI}$, то величина кажущейся аллостерической константы увеличивается в присутствии ингибитора. В предельном случае, когда ингибитор связывается только с ферментом в Т-конформации, K_{RI} стремится к бесконечности, следовательно, величиной i/K_{RI} можно пренебречь и уравнение (8.280) сводится к виду

$$L_1 = L \left(1 + \frac{i}{K_{TI}} \right)^4. \quad (8.281)$$

Выражение для кажущейся аллостерической константы L' при наличии одновременно и активатора, и ингибитора в случае фермента, содержащего n связывающих центров для каждого лиганда, имеет вид

$$L' = L \frac{\left(1 + \frac{i}{K_{TI}} \right)^n \left(1 + \frac{a}{K_{TA}} \right)^n}{\left(1 + \frac{i}{K_{RI}} \right)^n \left(1 + \frac{a}{K_{RA}} \right)^n}. \quad (8.282)$$

Если ингибитор связывается только с ферментом в Т-конформации, а активатор — только в R-конформации, уравнение упрощается

$$L' = L \frac{\left(1 + \frac{i}{K_{TI}} \right)^n}{\left(1 + \frac{a}{K_{RA}} \right)^n}. \quad (8.283)$$

Можно также получить уравнения, описывающие влияние активаторов и ингибиторов на степень насыщения субстратом тетрамерного фермента. Заменяя L на L' из уравнения (8.282), получим

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_R} \left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^3 + L \frac{(1 + i/K_{TI})^4 (1 + a/K_{TA})^4}{(1 + i/K_{RI})^4 (1 + a/K_{RA})^4} \frac{s}{K_T} \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^3}{\left(1 + \frac{s}{K_R} \right)^4 + L \frac{(1 + i/K_{TI})^4 (1 + a/K_{TA})^4}{(1 + i/K_{RI})^4 (1 + a/K_{RA})^4} \left(1 + \frac{s}{K_T} \right)^4}. \quad (8.284)$$

Введя обозначения $i/K_{TI} = \beta$, $i/K_{RI} = \beta'$, $a/K_{RA} = \gamma$, $a/K_{TA} = \gamma'$, получим общее уравнение для степени насыщения фермента с n центрами связывания для каждого эффектора в том же виде, что и уравнение (8.266):

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha (1 + \alpha)^{n-1} + L \frac{(1 + \beta)^n (1 + \gamma')^n}{(1 + \beta')^n (1 + \gamma)^n} \alpha (1 + \alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L \frac{(1 + \beta)^n (1 + \gamma')^n}{(1 + \beta')^n (1 + \gamma)^n} (1 + \alpha)^n}. \quad (8.285)$$

Изыщество и простота модели Моно, Уаймена и Шанжё привлекли к ней внимание многих исследователей. От более поздних моделей она отличается тем, что позволяет сделать выводы (по крайней мере в наиболее простой форме), справедливость которых можно проверить экспериментально. Такая проверка будет обсуждаться после рассмотрения некоторых других моделей кооперативности.

Модели диссоциации—ассоциации

Модель, которая на первый взгляд похожа на модель Моно, Уаймена и Шанжё, предполагает, что между формами фермента, различающимися по степени ассоциации, устанавливается равновесие, на которое влияет субстрат. Некоторые аспекты таких моделей рассмотрены Фриденом [1421] и Николем, Джексоном и Винзором [3414]. Эта модель сложнее, чем рассмотренная ранее модель, в которой концентрация белка влияет на положение равновесия между полимерными формами фермента (гл. 4). В простейшем случае димерного фермента



константа равновесия равна

$$L = \frac{e_2}{e^2}. \quad (8.287)$$

Если предположить, что центры связывания субстрата на димере E_2 идентичны и не взаимодействуют, могут быть записаны следующие уравнения:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_E, \quad (8.288)$$

$$\frac{[E_2][S]}{[E_2S]} = K_{E_2}, \quad (8.289)$$

$$\frac{[E_2S][S]}{[E_2S_2]} = K_{E_2}. \quad (8.290)$$

Выражение для степени насыщения, которое может быть выведено тем же путем, что и для предыдущей системы, имеет вид

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{K_E} + 2Le_m \frac{s}{K_{E_2}} \left(1 + \frac{s}{K_{E_2}}\right)}{\left(1 + \frac{s}{K_E}\right) + 2Le_m \left(1 + \frac{s}{K_{E_2}}\right)^2}, \quad (8.291)$$

где e_m — концентрация мономера фермента. Если ввести обозна-

чения $\alpha = s/K_E$ и $c = K_E/K_{E_g}$, уравнение (8.291) можно записать в той же форме, что и (8.266):

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha + 2Le_m c \alpha (1 + \alpha)}{(1 + \alpha) + 2Le_m (1 + \alpha)^2}. \quad (8.292)$$

Эти уравнения показывают, что кооперативность системы зависит от концентрации фермента. В случае исключительного связывания, если субстрат связывает только мономерная форма ($K_{E_g} = \infty$), уравнение упрощается до уравнения гиперболы, если же субстрат связывает только димерная форма ($K_E = \infty$), связывание становится все более кооперативным по мере увеличения концентрации мономера при разбавлении. В более сложных системах исключительное связывание субстрата диссоциированной формой не обязательно приводит к потере кооперативности при разбавлении. Если, например, в случае равновесия димер—тетрамер



предположить, что два центра связывания на димере E_2 и четыре на тетрамере E_4 являются независимыми и не взаимодействуют, то, обозначив концентрацию свободного фермента через e , получим следующее уравнение связывания:

$$\bar{Y}_s = \frac{s/K_f (1 + s/K_f) + 2Les/K_g (1 + s/K_g)^2}{(1 + s/K_f)^2 + Le (1 + s/K_g)^4}, \quad (8.294)$$

где K_f и K_g — константы диссоциации комплексов S с димером E_2 и тетрамером E_4 соответственно. В этом случае исключительное связывание субстрата любой из форм фермента приводит к кооперативности, которая будет зависеть от концентрации фермента.

Концентрация свободного фермента может быть выражена через суммарную концентрацию фермента e_t :

$$e = \frac{-(1 + s/K_f)^2 + \sqrt{(1 + s/K_f)^4 + 4e_t L (1 + s/K_g)^2}}{2L (1 + s/K_g)^4}. \quad (8.295)$$

Это уравнение показывает, что величина e , входящая в уравнение (8.294), зависит от суммарной концентрации фермента. Возрастание e_t будет приводить к увеличению кооперативности, если большим сродством к субстрату обладает диссоциированная форма, и к ее уменьшению в противном случае. Такого типа зависимость степени кооперативности от концентрации фермента характерна для ассоциирующих систем рассматриваемого вида, но не для тех моделей, в которых кооперативность является результатом внутримолекулярных взаимодействий. Однако наличие в препаратах фермента примеси обратимо связанного акти-

ватора или ингибитора также может привести к зависимости кооперативности от концентрации фермента (см. с. 84—92). Поэтому прежде чем делать выводы о применимости модели ассоциации—диссоциации к данному ферменту, необходимо исключить указанную возможность.

Имеются надежные данные о том, что кооперативное связывание кислорода гемоглобином миогли обусловлено димеризацией белка [556] и что связывание нуклеотидов NADPH-зависимой глутаматдегидрогеназой (КФ 1.4.1.3) регулируется полимеризацией фермента [1425]. Вопрос о функционировании 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) кратко уже был рассмотрен выше (с. 86—87): аллостерические ингибиторы вызывают диссоциацию, а активаторы — ассоциацию фермента (рис. 4.5). Необходимо, однако, помнить о том, что подобные данные еще не могут служить доказательством наличия такого же кооперативного механизма в клетке; если наблюдается зависимость кооперативного эффекта от концентрации белка, необходимо провести исследования при его концентрациях, сравнимых с теми, которые характерны для клетки. Например, наблюдаемая зависимость кооперативности связывания кислорода гемоглобином млекопитающих от концентрации белка [1704] не может полностью объяснить кооперативные эффекты в эритроцитах, где диссоциация гемоглобина, по-видимому, не играет существенной роли. Кроме того, необходимо установить, протекает ли полимеризация белка достаточно быстро, чтобы на ее основе можно было объяснить наблюдаемые кооперативные эффекты, или же она является вторичным процессом. Например, может иметь место случай, когда связи между субъединицами в одном из состояний модели Моно и др. относительно слабы и происходит медленная диссоциация белка в R- или T-конформации; это приведет к дополнительным осложнениям при анализе функционирования системы.

Модель последовательных конформационных изменений (модель Кошланда, Немети и Филмера)

В простейшей форме эта модель, подобно рассмотренным выше, является моделью двух состояний. Однако в отличие от модели Моно и др. «последовательная модель» допускает существование «смешанных» молекул белка, субъединицы которых находятся в различных конформационных состояниях. Модель предложена Кошландом, Немети и Филмером [2570] и является более общей, чем модели, рассмотренные Эдером [21], Полингом [3627] и Уайменом [5176]. Предполагается, что связывание субстрата одной субъединицей олигомерного белка при-

водит к изменению ее конформации; это не обязательно сказывается на конформации соседних субъединиц, однако вследствие изменения «стабильности» контактов между субъединицами сродство их к субстрату изменяется.

Рассмотрим изолированную субъединицу, которая изменяет свою конформацию при связывании субстрата:



Константа диссоциации K_s комплекса субстрата с ферментом в В-состоянии равна

$$K_s = \frac{b \cdot s}{x}, \quad (8.297)$$

где x — концентрация комплекса BS, b — концентрация свободного фермента в состоянии В. Введем константу равновесия L для перехода между состояниями А и В

$$L = \frac{b}{a}. \quad (8.298)$$

Если мы имеем олигомерный белок, в котором на состояние какой-либо субъединицы влияет состояние соседних субъединиц, для описания этих эффектов необходимо определить три дополнительные константы. Так, с субъединицей в А-конформации могут соседствовать субъединицы как в А-, так и в В-конформации. Константы, которые описывают это влияние, равны

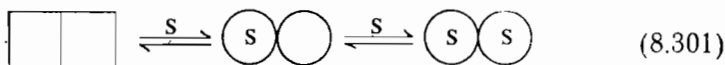
$$K_{AB} = \frac{[AB][A]}{[AA][B]}, \quad (8.299)$$

$$K_{BB} = \frac{[BB][A][A]}{[AA][B][B]}. \quad (8.300)$$

Эти две константы равновесия отражают относительную стабильность контакта между примыкающими субъединицами. Для определения значений этих констант необходимо ввести третий параметр, K_{AA} . Условно принимая константу стабильности АА-контакта (K_{AA}) равной единице, определяют K_{AB} и K_{BB} относительно этой величины. Например, если $K_{AB} > 1$, взаимодействие между А и В более предпочтительно, чем между А и А, и, следовательно, более вероятен переход с образованием АВ-контакта.

Связывание субстрата любой субъединицей олигомерного фермента будет, таким образом, зависеть от кажущейся константы диссоциации, константы равновесия перехода $A \rightleftharpoons B$ и

от изменения во взаимодействии между субъединицами. Рассмотрим димерный фермент



Кажущиеся константы диссоциации для стадий связывания субстрата выразим через микроскопическую константу диссоциации K_s ; эти константы равны $1/2 K_s$ и $2K_s$ для связывания первой и второй молекул субстрата соответственно. Изменение взаимодействий между субъединицами выражается отношением K_{AB}/K_{AA} для связывания первой молекулы субстрата и K_{BB}/K_{AB} — для второй молекулы. Таким образом, кажущаяся константа диссоциации первой молекулы субстрата равна

$$\bar{K}_1 = \frac{[AA]s}{[ABS]} = \frac{K_s K_{AA}}{2LK_{AB}} = \frac{K_s}{2LK_{AB}}, \quad (8.302 \text{ а})$$

а второй —

$$\bar{K}_2 = \frac{[ABS]s}{[BBS_2]} = \frac{2K_s K_{AB}}{LK_{BB}}. \quad (8.302 \text{ б})$$

Вторая молекула субстрата будет, следовательно, связываться более эффективно, если $2K_{AB} < K_{BB}/2K_{AB}$, и менее эффективно, если $2K_{AB} > K_{BB}/2K_{AB}$.

В олигомерных системах, содержащих более двух субъединиц, необходимо учитывать общую геометрию молекулы, так как она будет определять число субъединиц, соседствующих с любой данной субъединицей. Кошланд и др. [2570] рассмотрели квадратную и тетраэдрическую структуры (рис. 8.33), которые уже обсуждались в рамках модели Полинга (с. 578—581). Авторы провели также анализ линейной модели, представленной на рис. 8.33, в которой внешние субъединицы контактируют только с одной, а внутренние — с двумя другими субъединицами.

Уравнения для степени насыщения в случае этих моделей можно получить таким же путем, какой был использован для моделей Эдера и Полинга. Так, в случае тетраэдрической системы, обозначив концентрации форм A_4 , A_3BS , $A_2B_2S_2$, AB_3S_3 и B_4S_4 через e , ω , x , y и z , получим для кажущейся константы диссоциации комплекса фермента с первой молекулой субстрата выражение

$$\bar{K}_1 = \frac{e_1 s}{\omega} = \frac{K_s}{4LK_{AB}^3}, \quad (8.303)$$

где константа взаимодействия K_{AB} имеет показатель степени, равный 3, так как в тетрамере A_3BS имеется три АВ-контакта. В таком тетрамере есть также три АА-контакта и уравнение

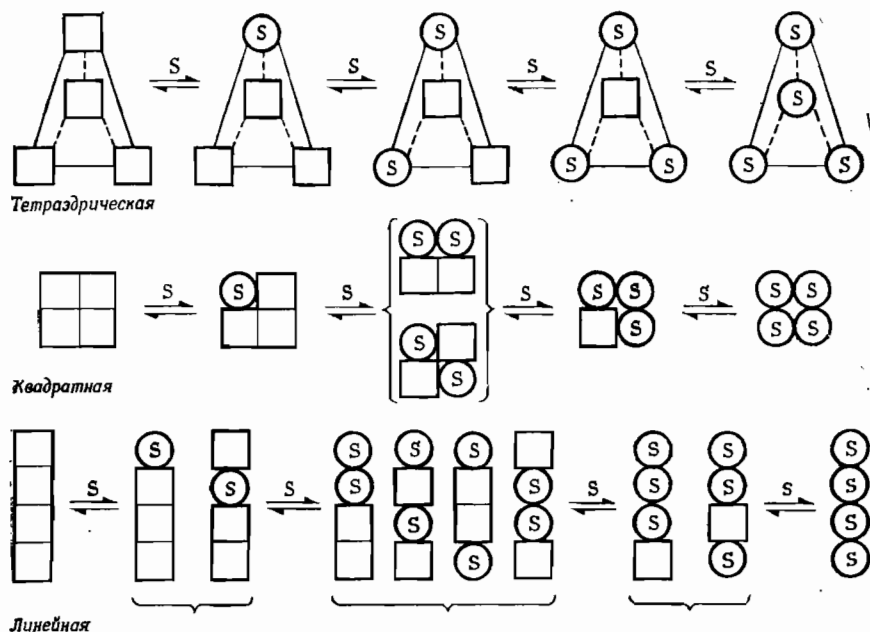


Рис. 8.33. Три типа взаимодействий между субъединицами тетрамерного фермента, рассматриваемых в модели последовательных конформационных изменений (модель Кошланда, Немети и Филмера [2570]).

должно было бы содержать член K_{AA}^3 , но так как константа K_{AA} условно принята за единицу, этот член не фигурирует в (8.303). Связывание второй молекулы субстрата приведет к появлению одного контакта между двумя субъединицами в А-конформации, четырьмя АВ-контактами и одним ВВ-контактом. Таким образом,

$$\bar{K}_2 = \frac{ws}{x} = \frac{2K_s}{3LK_{AB}K_{BB}}. \quad (8.304)$$

Соответствующие выражения для связывания третьей и четвертой молекул субстрата имеют вид

$$\bar{K}_3 = \frac{xs}{y} = \frac{3K_s K_{AB}}{2LK_{BB}^2}, \quad (8.305)$$

$$\bar{K}_4 = \frac{ys}{z} = \frac{4K_s K_{AB}^3}{LK_{BB}^3}. \quad (8.306)$$

В табл. 8.6 приведены данные о связи между показателем степени членов K_{AB} и K_{BB} в уравнениях (8.303) — (8.306) и изменением числа АВ- и ВВ-контактов, которое происходит на четырех стадиях связывания субстрата в случае тетраэдрического

Таблица 8.6

Соотношение между изменением числа АВ- и ВВ-контактов и показателем степени при K_{AB} и K_{BB} в уравнениях (8.303) — (8.306) для тетраэдрической модели, представленной на рис. 8.33

Комплекс	Контакты AA AB BB	Диссоции- рующая мо- лекула S	Изменение числа кон- тактов AA BB	Кон- станты	Показатель степени при K_{AB} K_{BB}	Уравнение
ES_4	0 0 6	Первая Вторая Третья Четвертая	+3 -3	$\bar{K}_4$	+3 -3	8.306
ES_3	0 3 3		+1 -2	$\bar{K}_3$	+1 -2	8.305
ES_2	1 4 1		-1 -1	$\bar{K}_2$	-1 -1	8.304
ES	3 3 0		-3	$\bar{K}_1$	-3	8.303
E	6 0 0					

расположения субъединиц в молекуле фермента, представленном в верхней части рис. 8.33. Поскольку уравнения дают константы диссоциации стадий, мы начнем с комплекса ES_4 и рассмотрим четыре последовательные стадии диссоциации молекул, протекающих справа налево (величина K_{AA} опущена, поскольку, как сказано выше, она условно принята равной единице).

После преобразования уравнений (8.303) — (8.306) и подстановки в уравнение (8.224) получим

$$\begin{aligned}
 \bar{\tau}_s &= \frac{LK^3_{AB} \frac{s}{K_s} + 3L^2K^4_{AB}K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2} + 3L^3K^3_{AB}K^3_{BB} \frac{s^3}{K_s^3} + L^4K^6_{BB} \frac{s^4}{K_s^4}}{1 + 4LK^3_{AB} \frac{s}{K_s} + 6L^2K^4_{AB}K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2} + 4L^3K^3_{AB}K^3_{BB} \frac{s^3}{K_s^3} + L^4K^6_{BB} \frac{s^4}{K_s^4}} = \\
 &= \frac{LK_s^3K^3_{AB}s + 3L^2K_s^2K^4_{AB}K_{BB}s^2 + 3L^3K_sK^3_{AB}K^3_{BB}s^3 + L^4K^6_{BB}s^4}{K_s^4 + 4LK_s^3K^3_{AB}s + 6L^2K_s^2K^4_{AB}K_{BB}s^2 + 4L^3K_sK^3_{AB}K^3_{BB}s^3 + L^4K^6_{BB}s^4} \quad (8.307)
 \end{aligned}$$

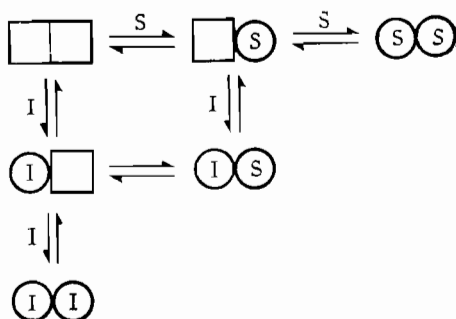


рис. 8.34. Схема связывания конкурентного ингибитора ферментом в соответствии с моделью последовательных конформационных изменений.

Это выражение весьма близко к уравнениям Эдера и Полинга и становится идентичным уравнению Полинга (8.239) при $1/K_s = LK_s K_{AB}^3/K_s$ и $1/\alpha = K_{BB}/K_{AB}^2$.

Аналогичным путем для квадратной модели (рис. 8.34) можно получить уравнение

$$\begin{aligned} \bar{Y}_s &= \frac{LK_{AB}^2 \frac{s}{K_s} + L^2 (K_{AB}^4 + 2K_{AB}^2 K_{BB}) \frac{s^2}{K_s^2} +}{1 + 4LK_{AB}^2 \frac{s}{K_s} + 2L^2 (K_{AB}^4 + 2K_{AB}^2 K_{BB}) \frac{s^2}{K_s^2} +} \rightarrow \\ &\rightarrow \frac{+ 3L^3 K_{AB}^2 K_{BB} \frac{s^3}{K_s^3} + L^4 K_{AB}^4 \frac{s^4}{K_s^4}}{+ 4L^3 K_{AB}^2 K_{BB} \frac{s^3}{K_s^3} + L^4 K_{AB}^4 \frac{s^4}{K_s^4}} = \\ &= \frac{LK_s^3 K_{AB}^2 s + L^2 K_s^2 (K_{AB}^4 + 2K_{AB}^2 K_{BB}) s^2 +}{K_s^4 + 4LK_s^3 K_{AB}^2 s + 2L^2 K_s^2 (K_{AB}^4 + 2K_{AB}^2 K_{BB}) s^2 +} \rightarrow \\ &\rightarrow \frac{+ 3L^3 K_s K_{AB}^2 K_{BB} s^3 + L^4 K_{AB}^4 s^4}{+ 4L^3 K_s K_{AB}^2 K_{BB} s^3 + L^4 K_{AB}^4 s^4}, \quad (8.308) \end{aligned}$$

которое тем же образом, что и уравнение (8.307), может быть сведено к уравнению Полинга для квадратной модели [уравнение (8.241)].

В случае линейной модели выражение для степени насыщения имеет вид

$$\begin{aligned} \bar{Y}_s &= \frac{L (K_{AB} + K_{AB}^2) \frac{s}{K_s} + L^2 (2K_{AB}^3 + K_{AB}^2 + K_{AB}^2 K_{BB})}{2 + 4L (K_{AB} + K_{AB}^2) \frac{s}{K_s} + 2L^2 (2K_{AB}^3 + K_{AB}^2 + K_{AB}^2 K_{BB}) +} \rightarrow \\ &\rightarrow \frac{+ 2K_{AB} K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2} + 3L^3 (K_{AB}^2 K_{BB} + K_{AB} K_{BB}^2) \frac{s^3}{K_s^3} + 2L^4 K_{BB}^2 \frac{s^4}{K_s^4}}{+ 2K_{AB} K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2} + 4L^3 (K_{AB}^2 K_{BB} + K_{AB} K_{BB}^2) \frac{s^3}{K_s^3} + 2L^4 K_{BB}^2 \frac{s^4}{K_s^4}} = \\ &= \frac{LK_s^3 (K_{AB} + K_{AB}^2) s + L^2 K_s^2 (2K_{AB}^3 + K_{AB}^2 + K_{AB}^2 K_{BB}) +}{2K_s^4 + 4LK_s^3 (K_{AB} + K_{AB}^2) s + 2L^2 K_s^2 (2K_{AB}^3 + K_{AB}^2 +} \rightarrow \\ &\rightarrow \frac{+ 2K_{AB} K_{BB}) s^2 + 3L^3 K_s (K_{AB}^2 K_{BB} + K_{AB} K_{BB}^2) s^3 + 2L^4 K_{BB}^2 s^4}{+ K_{AB}^2 K_{BB} + 2K_{AB} K_{BB}) s^2 + 4L^3 K_s (K_{AB}^2 K_{BB} + K_{AB} K_{BB}^2) s^3 + 2L^4 K_{BB}^2 s^4}. \quad (8.309) \end{aligned}$$

Приведенные выше уравнения отличаются от используемых Кошландом и его соавторами, которые выражали степень насыщения через константы ассоциации, а не через константы диссоциации, обычно применяемые в ферментативной кинетике. Уравнения Кошланда, Немети и Филмера [2570] можно полу-

чить, если константу K_s заменить на константу ассоциации $K_b = 1/K_s$. Например, выражение для степени насыщения в случае простого димера (8.291), записанное с использованием константы диссоциации, имеет вид

$$\bar{Y}_s = \frac{LK_{AB} \frac{s}{K_s} + L^2 K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2}}{1 + 2LK_{AB} \frac{s}{K_s} + L^2 K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2}} = \frac{LK_s K_{AB} s + L^2 K_{BB} s^2}{K_s^2 + 2LK_s K_{AB} s + L^2 K_{BB} s^2}, \quad (8.310)$$

если же используется константа ассоциации K_b , это выражение переходит в

$$\bar{Y}_s = \frac{LK_b K_{AB} s + L^2 K_b^2 K_{BB} s^2}{1 + 2LK_b K_{AB} s + L^2 K_b^2 K_{BB} s^2}. \quad (8.311)$$

Кошланд и др. [2570] отмечают, что термины «квадратный», «прямоугольный» и «линейный» вводятся не для уточнения трехмерного расположения субъединиц в молекуле белка, а просто для характеристики взаимодействий между субъединицами, которые возможны в каждом данном случае.

Последовательная модель была позднее обобщена Киртли и Кошландом [2472] на случай гетеротропных взаимодействий. Очевидно, что реальная система может быть значительно более сложной, чем это предполагает согласованная модель, поскольку имеется множество возможных путей связывания аллостерических активаторов и ингибиторов и влияния их на фермент. Можно построить большое число моделей, отвечающих этому случаю, включая такие, в которых эффектор или связывается с любым из двух конформационных состояний фермента в рамках простой последовательной модели, или индуцирует переход субъединицы, с которой он связывается, в совершенно новое конформационное состояние. Кроме того, эффектор может конкурировать с субстратом, связываться вместе с субстратом по неупорядоченному механизму или же по упорядоченному механизму только после связывания субстрата. Можно получить уравнения, характеризующие каждый из этих типов гетеротропных взаимодействий для различных структурных моделей. Однако наличие большого числа уравнений затрудняет их сравнение и возможность выбора механизма. Киртли и Кошланд рекомендовали рассматривать системы, в которых эффектор при связывании с субъединицей индуцирует переход последней в совершенно новое конформационное состояние (отличное от А и В) лишь в том случае, когда модель, включающая только два состояния, не способна объяснить имеющиеся данные.

Рассмотрим их подход на примере простого случая, когда эффектор действует как конкурентный ингибитор по отношению к субстрату и индуцирует переход фермента в такое же конфор-

мационное состояние, как и субстрат. Соответствующая схема связывания для димерного фермента представлена на рис. 8.34. Используя константы, определяемые уравнениями (8.297) — (8.300), и константу диссоциации комплекса фермента с ингибитором, равную

$$K_i = \frac{e_f i}{i}, \quad (8.312)$$

где t и e_f — концентрации комплекса ВІ и свободного фермента в В-конформации, можно получить тем же путем, что и ранее, выражение для степени насыщения:

$$\bar{Y}_s = \frac{LK_{AB} \frac{s}{K_s} + L^2 K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2} + L^2 K_{BB} \frac{si}{K_s K_i}}{1 + 2LK_{AB} \frac{s}{K_s} + L^2 K_{BB} \frac{s^2}{K_s^2} + 2LK_{AB} \frac{i}{K_i} + 2L^2 K_{BB} \frac{si}{K_s K_i} + L^2 K_{BB} \frac{i^2}{K_i^2}}. \quad (8.313)$$

Кажущиеся константы диссоциации для процессов связывания первой и второй молекул субстрата равны в этом случае

$$\bar{K}_1 = \frac{1 + 2LK_{AB} \frac{i}{K_i} + L^2 K_{BB} \frac{i^2}{K_i^2}}{2 \frac{L}{K_s} \left(K_{AB} + LK_{BB} \frac{i}{K_i} \right)}, \quad (8.314)$$

$$\bar{K}_2 = \frac{2 \left(K_{AB} + LK_{BB} \frac{i}{K_i} \right)}{\frac{LK_{BB}}{K_s}}. \quad (8.315)$$

Когда эффе́ктор отсутствует ($i=0$), (8.314) и (8.315) сводятся к выражениям для кажущихся констант диссоциации в случае простой димерной модели [(8.302а) и (8.302б)]. Можно видеть, что І действует как простой ингибитор, увеличивая $\bar{K}_2$ по мере роста концентрации. Влияние его на связывание первой молекулы субстрата более сложное. Анализ модели на рис. 8.34 показывает, что если димер содержит только одну молекулу І, то субстрат будет связываться с соседней субъединицей более эффективно, чем со свободным ферментом при условии, что наличие АВ-контакта способствует связыванию субстрата. Однако, когда обе субъединицы связаны с І, последний будет выступать в роли конкурентного ингибитора, поскольку субстрат должен его вытеснить для того, чтобы связаться с ферментом. Это видно из уравнения (8.314), согласно которому уменьшение концентрации І (при подходящих значениях других констант) будет приводить к уменьшению $\bar{K}_1$, а увеличение — к росту $\bar{K}_1$.

При очень высоких значениях i , таких, что существенными становятся только члены, содержащие i , (8.313) упрощается до

$$\begin{aligned}\bar{Y}_s &= \frac{L^2 K_{\text{ВВ}} \frac{si}{K_s K_i}}{2LK_{\text{АВ}} \frac{i}{K_i} + 2L^2 K_{\text{ВВ}} \frac{si}{K_s K_i} + L^2 K_{\text{ВВ}} \frac{i^2}{K_i^2}} = \\ &= \frac{1}{2 + \left(\frac{2K_{\text{АВ}}}{LK_{\text{ВВ}}} + \frac{i}{K_i} \right) \frac{K_s}{s}}\end{aligned}\quad (8.316)$$

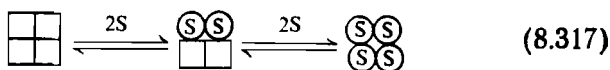
и, таким образом, зависимость степени насыщения от концентрации субстрата становится гиперболической.

Другие модели и обобщения

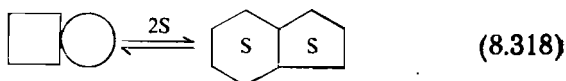
Прежде чем обсуждать другие модели кооперативности, необходимо отметить, что некоторые трактовки согласованной и последовательной моделей накладывают на них ограничения, которые, возможно, и не подразумевались в исходных формулировках. Моно, Уаймен и Шанжэ [3217] отдавали себе отчет в том, что в случае согласованного механизма нет необходимости ограничивать систему только двумя формами фермента. Системы, предусматривающие равновесие между тремя и более формами, рассмотрены Минтоном и Имаи [3178]. Для объяснения кооперативного связывания кислорода гемоглобином они предложили согласованную модель, включающую три состояния. Как уже отмечалось, согласованная модель с двумя состояниями дает конкретные предсказания относительно двухсубстратных систем, для которых связывание обоих субстратов или их аналогов может быть исследовано в равновесных условиях. Если субстраты связываются только ферментом, находящимся в R-конформации, и связывание является неупорядоченным процессом, то насыщение фермента любым из субстратов будет устранять кооперативность связывания другого. Если связывание субстратов протекает упорядоченно, то только насыщение фермента первым субстратом будет устранять кооперативность при связывании второго.

Хотя идея согласованного перехода без промежуточных состояний является основной в модели Моно, Уаймена и Шанжэ, Иоханнес и Гесс [2237] отметили, что в олигомерах, состоящих из четырех и более субъединиц, последние могут действовать отдельными согласованными группами, при этом симметрия молекулы по-прежнему сохраняется. В случае тетрамера, например, механизм, включающий две согласованные пары димеров,

может быть схематически представлен следующим образом:

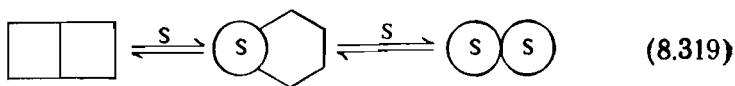


Такой механизм предложен для объяснения кооперативных свойств пируваткиназы (КФ 2.7.1.40) из дрожжей. Представление о симметрии особенно подчеркивается в первоначальных формулировках согласованной модели [3217], и действительно оно приводит к существенному упрощению, поскольку из него следует, что все центры связывания данного лиганда в любом состоянии одинаковы. Линдквист и Бренден [2829] первые отметили, что можно представить себе согласованную модель, в которой субъединицы в каждом из двух состояний располагаются несимметрично:



Бернхард и др. [2914, 4208] обсудили возможность расположения идентичных субъединиц таким образом, что они имеют более чем один тип локального окружения.

Простейший случай последовательной модели предусматривает только два возможных конформационных состояния любой из субъединиц. Однако заранее нет оснований предполагать, что конформационное изменение, вызванное в одной субъединице, не может перестроить конформацию примыкающих субъединиц за счет изменения взаимодействия между ними. Так, в случае димера это можно представить следующим образом:



Как уже отмечалось при обсуждении гетеротропных эффектов в случае последовательной модели, введение таких промежуточных конформаций приводит к значительному усложнению уравнений связывания. Конвей и Кошланд [865] предложили для объяснения поведения глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.12) из скелетных мышц кролика механизм, предусматривающий «промежуточные» конформационные состояния свободных субъединиц.

По мнению многих исследователей основное различие между согласованным и последовательным механизмами касается стадии, на которой происходит конформационное изменение. Так, приводятся доводы в пользу того, что при согласованном механизме связывание субстрата смещает предсуществующее равно-

весе между двумя конформационными состояниями фермента, тогда как при последовательном механизме конформационные изменения следуют за связыванием субстрата, поскольку они вызываются им. Эти особенности, однако, не являются существенными для каждой из этих моделей и можно представить согласованную модель, в которой переход из Т- в R-состояние может происходить вследствие связывания субстрата с Т-состоянием. Такая модель согласуется с детальными исследованиями кинетики предстационарной стадии реакции, катализируемой глицеральдегидфосфатдегидрогеназой из дрожжей, проведенными Киршнером и др. [2469—2470]. Возможен также последовательный механизм, в котором связывание субстрата смещает предсуществующее равновесие между конформационными состояниями.

По мнению ряда авторов [1211, 2468, 4922, 5178] последовательная и согласованная модели являются на самом деле частными случаями более общей модели, представленной на рис. 8.35. Действительно, такой общий механизм заложен в общей последовательной модели Кошланда (см., например, [1729]), и те модели, которые обсуждались нами выше, представляют собой частные случаи общей. Таким образом, согласованная модель может рассматриваться как частный случай общей последовательной модели, в которой концентрации гибридных промежуточных комплексов кинетически незначительны.

Явление отрицательной кооперативности, при котором связывание одного лиганда приводит к уменьшению эффективности связывания последующих молекул того же лиганда, также можно объяснить на основе последовательной модели, поскольку нет оснований заранее предполагать, что изменения, вызываемые связыванием одной молекулы субстрата, должны именно способствовать связыванию других молекул, а не затруднять его. Крайним случаем отрицательной кооперативности является случай так называемой «полуцентральной активности», при котором заполнение половины имеющихся центров на ферменте препятствует связыванию субстрата на других центрах. В литературе приводится много таких примеров (см., например, обзор [4208]). Хотя в ряде случаев это явление может иметь тривиальное объяснение (неполное удаление связанного с ферментом субстрата или наличие в препарате фермента определенной доли неактивных молекул), данные о постоянном функционировании в ферменте примерно только 50% доступных активных центров указывают на реальное существование феномена «полуцентральной активности». Следует также учитывать (особенно в том случае, когда используются относительно объемистые аналоги субстрата) возможность стерических затруднений для связывания, если активные центры соседних субъединиц находятся достаточно близко друг от друга.

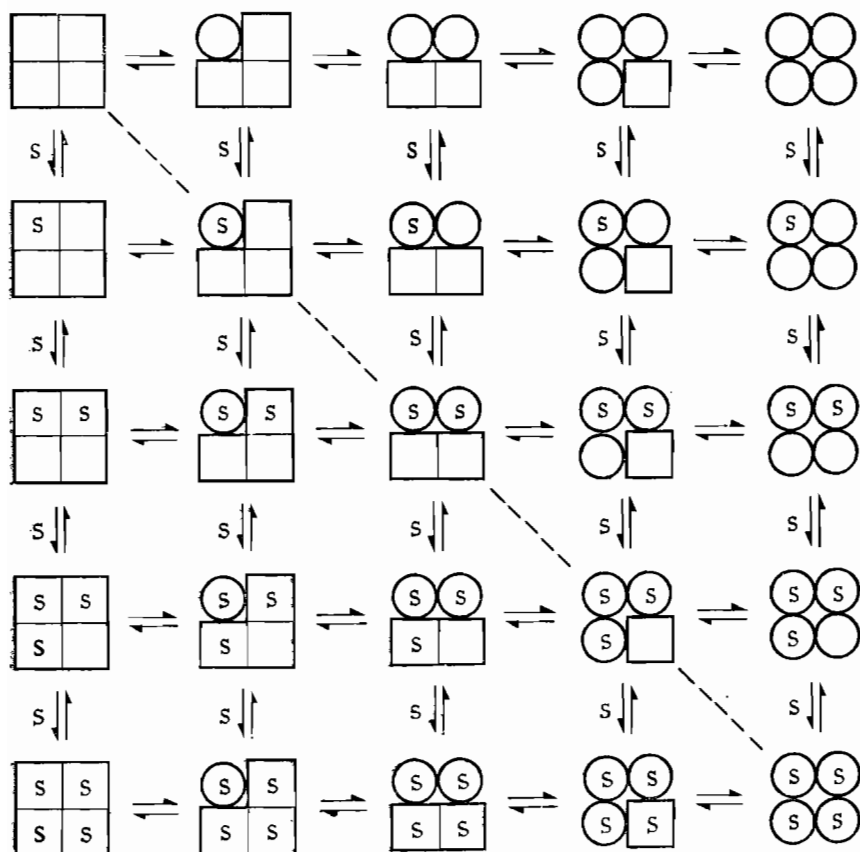


Рис. 8.35. Общая модель кооперативности. В крайних справа и слева колонках представлены формы фермента, рассматриваемые в согласованной модели, а вдоль пунктирной линии — формы фермента, рассматриваемые в простой последовательной модели.

Наряду с ферментами, проявляющими при связывании лиганда положительную или отрицательную кооперативность, известны и такие ферменты, для которых характерна смешанная кооперативность; в этом случае кривая зависимости $\bar{Y}_s$ от s имеет несколько точек перегиба. Такие кривые были получены для нескольких ферментов при построении зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. На рис. 8.36 представлены зависимости скорости реакции, катализируемой СТР-синтетазой (КФ 6.3.4.2), от концентрации субстрата, глутамина, при различных концентрациях аллостерического активатора, GTP [2778]. Тейпель и Кошланд [4698] рассмотрели механиз-

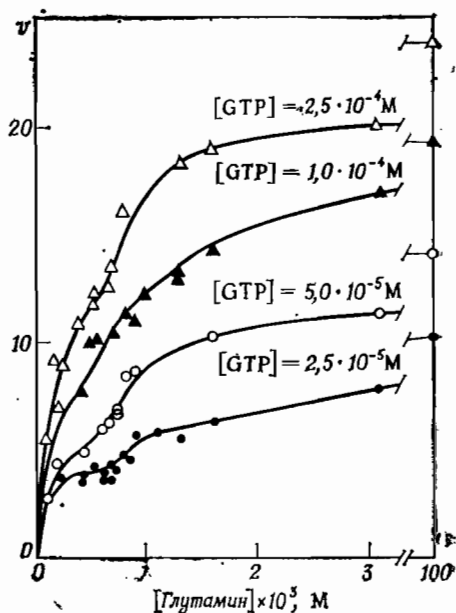


Рис. 8.36. Зависимость активности СТР-синтетазы от концентрации глутамина при нескольких концентрациях GTP [2778].

мы, при которых кривые связывания могут иметь промежуточное плато. Авторы пришли к заключению, что подобные зависимости могут наблюдаться только в случае последовательного механизма, если фермент имеет более двух центров связывания одного и того же лиганда и микроскопические константы диссоциации для этих центров сначала увеличиваются, а затем уменьшаются по мере их заполнения. К сожалению, в большинстве работ, в которых получены зависимости такого типа, приводятся данные об общей скорости реакции, а не о связывании субстрата. Поэтому они могут относиться к стационарным условиям (см. с. 625—642), т. е. осложнены тем фактом, что величина v/V не равна $\bar{Y}_s$.

Изображение различных конформационных состояний в виде квадратов и кружков не обязательно подразумевает, что конформационные изменения, приводящие к аллостерическим эффектам, велики. Все, что требуется, — это изменения, достаточные для соответствующего влияния на связывающие центры некоторых или всех контактирующих субъединиц, и такие изменения не обязательно связаны с существенными структурными перестройками молекулы белка. У некоторых ферментов, например аспартат—карбамоилтрансферазы (КФ 2.1.3.2), конформационное изменение, вызываемое связыванием аллостерического ингибитора, оказалось столь большим, что его можно обнаружить методом дисперсии оптического вращения [1150] и по устойчивости к птолизу [3063]. Однако изменение конформа-

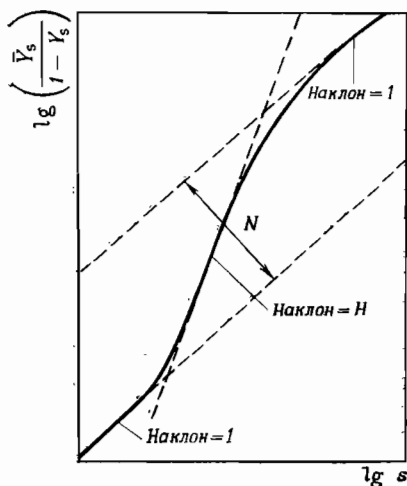


Рис. 8.37. График Хилла для кооперативного фермента; наклон кривой стремится к единице при очень высоких и очень низких концентрациях субстрата.

ции гликогенфосфорилазы не удалось обнаружить ни методом дисперсии оптического вращения, ни методом кругового дихроизма [1901, 2241].

Как отмечалось ранее, модель Хилла предсказывает, что зависимость $\lg \frac{\bar{Y}_s}{1 - \bar{Y}_s}$ от $\lg s$ должна быть линейной. Эта модель в то же время предполагает, что связывание не является процессом, состоящим из нескольких стадий, и не позволяет, следовательно, адекватно описать аллостерические процессы, в которых можно ожидать образование интермедиатов с частично заполненными центрами связывания лиганда. При постадийном связывании субстрата будет наблюдаться отклонение от уравнения Хилла, поскольку кооперативность не должна обнаруживаться ни при очень низких концентрациях лиганда, когда связывание протекает от состояния, при котором все центры любой молекулы фермента свободны, ни при очень высокой степени насыщения, когда остается незаполненным только один центр. Таким образом, можно ожидать, что наклон графика Хилла будет приближаться к единице при очень низкой и очень высокой степенях насыщения (рис. 8.37). Уаймен [5177], Сарофф и Минтон [4076] подробно рассмотрели такой случай и показали, что расстояние N между начальной и конечной асимптотами (см. рис. 8.37) связано с изменением свободной энергии для реакции связывания субстрата. Для фермента, имеющего n связывающих центров, эта величина определяется разностью изменений свободной энергии при связывании первой (ΔG_1) и последней (ΔG_n) молекул лиганда следующим соотношением:

$$\frac{-\Delta G_1 - \Delta G_n}{2,303RT} = \sqrt{2}N. \quad (8.320)$$

СПОСОБЫ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ДАННЫХ ПО КООПЕРАТИВНОСТИ

Несмотря на теоретические ограничения, график Хилла вполне пригоден для анализа данных по отрицательной и положительной кооперативности при степени насыщения от 10 до 90%, поэтому он широко используется для определения коэффициента кооперативности. Из уравнения Хилла (8.212) видно, что величина H (коэффициент Хилла) будет больше 1 в случае положительной кооперативности, меньше 1 в случае отрицательной кооперативности и равна 1, когда кооперативное взаимодействие отсутствует. Кроме того, H не может быть больше числа связывающих центров молекулы фермента, поскольку эта величина представляет собой показатель степени, в которую надо возвести концентрацию субстрата для того, чтобы кривую связывания описать уравнением равнобочной гиперболы.

На рис. 8.29 приведены кривые для систем с положительной и отрицательной кооперативностью в других координатах, обычно используемых при представлении данных о скоростях ферментативной реакции или об эффективности связывания. Коэффициент H из любого такого графика можно определить методом подгонки. Так, например, может быть использован метод последовательных приближений для анализа зависимости $1/\bar{Y}_s$ от $1/s^H$, состоящий в последовательном увеличении H до тех пор, пока не будет получена прямая, которая наилучшим образом ложится на экспериментальные точки.

Приводились также доводы в пользу того, что наиболее подходящим методом анализа данных по кооперативному связыванию является во многих случаях построение графика зависимости $\bar{Y}_s$ от s . Кошланд и др. [2570] предложили использовать в качестве меры кооперативности показатель кооперативности R_s , который определяется следующим соотношением:

$$R_s = \frac{s \text{ при степени насыщения } 90\%}{s \text{ при степени насыщения } 10\%}. \quad (8.321)$$

Для равнобочной гиперболы $R_s = 81$; в случае положительной и отрицательной кооперативности эта величина будет соответственно меньше или больше 81. Связь между R_s и коэффициентом Хилла можно найти, решив уравнение (8.212) для $\bar{Y}_s = 0,9$ и $0,1$:

$$s^H = 9K_s' \quad \text{при} \quad \bar{Y}_s = 0,9; \quad (8.322)$$

$$s^H = 1/9K_s' \quad \text{при} \quad \bar{Y}_s = 0,1. \quad (8.323)$$

Таким образом, при любом значении K_s подстановка в (8.321) дает

$$R_s = \sqrt[H]{81} \quad (8.324)$$

Таблица 8.7

Значения показателя кооперативности (R_s),
 рассчитанные для различных значений коэффициента Хилла (H)
 с помощью уравнения (8.324)

Коэффициент Хилла (H)	Показатель кооперативности (R_s)
0,5	6 561
0,75	350
1	81
2	9
3	4,3
4	3

Одним из преимуществ использования R_s как меры кооперативности является то, что эта величина прямо связана со свойствами ферментов в клетке, так как она характеризует влияние изменений концентрации субстрата или эффектора на активность фермента. В табл. 8.7 приведены значения R_s , соответствующие ряду значений H .

ВЫБОР МОДЕЛИ КООПЕРАТИВНОСТИ

Чтобы показать, что действие определенного фермента описывается именно данной, а не какой-либо другой моделью кооперативности, необходимо приложить немало усилий и проявить определенную изобретательность. Так как согласованная модель кооперативности позволяет сделать ряд предсказаний, которые можно проверить экспериментально, она более тщательно разработана и апробирована, чем последовательная модель. Действительно, как отмечалось выше, не предусматривающая каких-либо ограничений последовательная модель является настолько общей (из нее можно даже получить как частный случай согласованный механизм), что трудно предвидеть какой-либо механизм кооперативного связывания, который она не включает. Основные усилия были направлены поэтому на рассмотрение вероятных структур фермента, позволяющих объяснить наблюдаемые результаты. К сожалению, много сил тратится на споры о достоинствах и недостатках тех или иных моделей, а не на построение простейшей модели, которая объясняла бы наблюдаемые результаты, полученные для данного фермента, и которую можно было бы использовать как основу для предсказания регуляторного действия фермента в клетке и для планирования дальнейших экспериментов.

Обзор методов, которые можно использовать при выборе моделей, сделан в работах [5073, 2568, 5145]; мы рассмотрим только те методы, которые применяются наиболее часто.

Анализ кривых насыщения

Форма кривой насыщения — зависимости величины $\bar{Y}_s$ от концентрации s — может дать много полезной информации при выборе модели. В простейшем случае наличие отрицательной кооперативности ($R_s > 81$, $H < 1$) для какого-либо лиганда исключает согласованную модель, так как связывание лиганда протомером, находящимся в одной из форм, смещает равновесие между протомерами в сторону данной формы. Это видно из математических выражений, описывающих согласованный механизм. Рассмотрим лиганд s , который связывается более прочно с R -формой в рамках согласованной модели (8.244), т. е. когда $c = \frac{K_R}{K_T} < 1$.

При этом условии можно получить выражения для отношения концентраций R - и T -форм при различной степени насыщения фермента. В отсутствие S [см. уравнение (8.245)]

$$L = \frac{T}{R} = \frac{x_0}{y_0}, \quad (8.325)$$

и из уравнений (8.258) — (8.261) следует, что

$$\frac{x_1}{y_1} = \frac{L}{c}, \quad (8.326)$$

$$\frac{x_2}{y_2} = \frac{L}{c^2}, \quad (8.327)$$

$$\frac{x_3}{y_3} = \frac{L}{c^3}, \quad (8.328)$$

$$\frac{x_4}{y_4} = \frac{L}{c^4}, \quad (8.329)$$

и, так как $c < 1$, то

$$\frac{x_4}{y_4} > \frac{x_3}{y_3} > \frac{x_2}{y_2} > \frac{x_1}{y_1} > \frac{x_0}{y_0}. \quad (8.330)$$

Из уравнения (8.330) видно, что по мере увеличения насыщения будет наблюдаться постепенное смещение системы к состоянию, характеризующемуся более высоким сродством к лиганду, что приводит к появлению положительной кооперативности.

Как уже отмечалось ранее, отрицательная кооперативность при связывании лигандов может быть объяснена в рамках любой последовательной модели, включая модели Полинга [3627], Уаймена [5176] и Эдера [21], а также с помощью модели Кошланда и др. [2570], поскольку в эти модели не заложено никаких допущений о влиянии связывания лигандов на сродство еще свободных центров. Таким образом, наличие отрицательной ко-

оперативности позволяет исключить согласованный механизм, но не позволяет провести различие между другими возможными моделями.

Отрицательная кооперативность наблюдается для ряда ферментов, в том числе для глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.12) из скелетных мышц кролика [865] и СТР-синтазы (КФ 6.3.4.2) [2778], причем для последнего фермента наблюдается смешанная кооперативность при связывании глутамина (рис. 8.36).

Более искусственным подходом при выборе моделей является сравнение теоретических кривых, построенных согласно уравнениям для различных моделей, с экспериментальными кривыми связывания. Для фермента, связывающего четыре молекулы субстрата, уравнение Эдера можно записать в следующей форме:

$$\bar{Y}_s = \frac{\frac{s}{\beta_1} + \frac{2s^2}{\beta_2} + \frac{3s^3}{\beta_3} + \frac{4s^4}{\beta_4}}{4 \left(1 + \frac{s}{\beta_1} + \frac{s^2}{\beta_2} + \frac{s^3}{\beta_3} + \frac{s^4}{\beta_4} \right)}, \quad (8.331)$$

где β_i — константы, представляющие собой комбинации кажущихся констант диссоциации. Уравнения, соответствующие другим моделям, после необходимых преобразований и комбинирования входящих в них констант, также можно записать в форме, аналогичной (8.331). Это уравнение можно использовать для построения серии кривых насыщения при различных значениях β , с тем, чтобы найти среди них кривую, совпадающую с экспериментальной кривой связывания. Ясно, что такая обработка данных является очень трудоемкой, если она проводится без использования ЭВМ. Эффективность такого подхода при выборе модели обусловлена тем, что сама модель накладывает определенные ограничения на пределы, в которых значения отдельных констант β могут изменяться независимо, и, таким образом, ограничивает число теоретических кривых. Например, в согласованной модели с исключительным связыванием, а также квадратной и прямоугольной моделях Полинга [уравнения (8.239) и (8.241)] имеются только две независимые константы (K_R и L). Таким образом, в этих случаях только две константы β в уравнении (8.331) могут быть действительно независимы.

Такой способ подгонки кривых весьма полезен для решения вопроса о том, объясняет ли данная модель кооперативное действие фермента [888]. Однако этот метод выбора моделей ограничен тем обстоятельством, что несколько моделей могут накладывать одинаковые ограничения на константы β . Кроме того, есть два практических момента, которые нужно учитывать: во-первых, экспериментальные точки всегда определяются с ка-

кой-то ошибкой, и поэтому удовлетворительно согласовываться с опытными данными могут сразу несколько теоретических кривых, отвечающих разным моделям, во-вторых, подгонка теоретических кривых является довольно сложным процессом и часто кажется, что можно пренебречь плохим соответствием в одной части кривой, если наблюдается хорошее соответствие в других, поэтому необходима статистическая оценка точности подгонки всей кривой (см., например, [889]).

При другом, довольно близком подходе [2924, 4610, 5147] уравнение Эдера представляют в следующей форме:

$$\bar{Y}_s = \frac{K'_1 s + 2K'_1 K'_2 s^2 + 3K'_1 K'_2 K'_3 s^3 + 4K'_1 K'_2 K'_3 K'_4 s^4}{4(1 + K'_1 s + K'_1 K'_2 s^2 + K'_1 K'_2 K'_3 s^3 + K'_1 K'_2 K'_3 K'_4 s^4)}, \quad (8.332)$$

где $K'_1 - K'_4$ — *кажущиеся константы ассоциации*. Ограничения, налагаемые различными моделями, однозначно определяют соотношения между константами; при сопоставлении расчетных кривых и экспериментальных данных можно найти эти константы и сравнить их с теми значениями, которые предсказываются различными моделями.

Выбор, основанный на анализе значений коэффициента Хилла

Модель Хилла [1949] предполагает существование только двух форм фермента — свободного и полностью насыщенного [см. уравнение (8.209)]. Такая модель сводится к согласованной модели с исключительным связыванием, когда константа равновесия L для перехода между двумя формами фермента очень велика и почти весь свободный фермент находится в Т-форме. В этом случае концентрация субстрата должна быть очень велика по сравнению с константой диссоциации его из комплекса с R-формой ($s/K_R \gg 1$) почти во всей области насыщения. Следовательно, поскольку $s/K_R = \alpha$, уравнение (8.267) можно записать следующим образом:

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha^n}{L + \alpha^n} = \frac{\left(\frac{s}{K_R}\right)^n}{L + \left(\frac{s}{K_R}\right)^n} \quad (8.333)$$

и преобразовать его к такому же виду, какой имеет уравнение Хилла (8.212):

$$\bar{Y}_s = \frac{s^n}{LK_R^n + s^n}. \quad (8.334)$$

Таким образом, когда L очень велико, коэффициент Хилла H стремится к величине, равной числу кооперативных центров свя-

зывания n . Доля фермента в Т-состоянии будет увеличиваться при добавлении ингибитора, который связывается только с этой формой фермента, и это выразится в увеличении кажущейся константы L [см. уравнение (8.281)]. Можно, следовательно, ожидать, что при увеличении концентрации ингибитора до насыщающей значение коэффициента Хилла будет приближаться к числу кооперативных центров связывания. Если, однако, связывание субстрата не является исключительным, насыщение фермента субстратом будет описываться простым уравнением гиперболы, если L равно либо нулю [уравнение (8.268)], либо бесконечности [уравнение (8.269)]. В области промежуточных значений L коэффициент Хилла будет увеличиваться и проходить через максимум (рис. 8.38).

Последовательные модели не позволяют сделать никаких общих заключений относительно характера изменения кажущегося коэффициента Хилла при варьировании концентрации аллостерического ингибитора; предполагается, однако, что вряд ли будет иметь место максимальная кооперативность, при которой H становится равным числу кооперативных центров связывания [5073]. Этот подход можно, следовательно, использовать при изучении ферментов, действия которых описывается согласованной моделью с исключительным связыванием, если независимым путем определить число связывающих центров. С помощью этого метода были получены данные, свидетельствующие о том, что фосфорилаза (КФ 2.4.1.1) [604—605] и СМР-деаминаза (КФ 3.5.4.12) [4100] функционируют по согласованному механизму.

Согласованный механизм предсказывает также, что коэффициент Хилла будет стремиться к единице по мере приближения L к нулю как при исключительном, так и при неисклнчительном связывании (8.268). В случае 6-фосфофруктокиназы из дрожжей (КФ 2.7.1.11) и NAD^+ -зависимой изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41) отсутствие снижения H при наличии аллостериче-

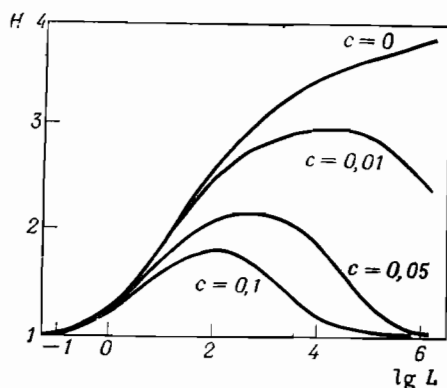
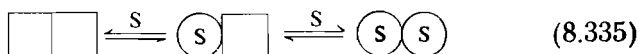


Рис. 8.38. Зависимость коэффициента Хилла (H) от аллостерической константы (L) при фиксированных значениях c ($=K_R/K_T$) для фермента, имеющего четыре центра связывания субстрата и функционирующего в соответствии с согласованной моделью [4018].

ского активатора свидетельствует, по мнению авторов работ [177—178], о том, что эти ферменты функционируют не по согласованному механизму. При неисключительном связывании активатора может, однако, наблюдаться ситуация, при которой изменения L относительно малы и H не уменьшается до единицы [4018]. Такая модель использована для описания кинетических свойств изоцитратдегидрогеназы из дрожжей [2119].

Конформационные изменения

Рассмотрим простейшую последовательную модель, в которой связывание субстрата с одной субъединицей олигомерного фермента изменяет конформацию только этой субъединицы и влияет только на взаимодействие между соседними субъединицами.



В этом случае можно ожидать, что количество фермента в конформации, возникающей в результате связывания лиганда (○), будет изменяться параллельно степени насыщения фермента. Обозначим фермент в этой конформации через R; тогда зависимость доли фермента в R-конформации от степени насыщения будет линейной (рис. 8.39). Такая зависимость может получиться и в случае простой последовательной модели для ферментов, состоящих более чем из двух субъединиц, поскольку доля фермента в конформации R определяется следующим выражением:

$$\frac{R}{R+T} = \bar{Y}_s. \quad (8.336)$$

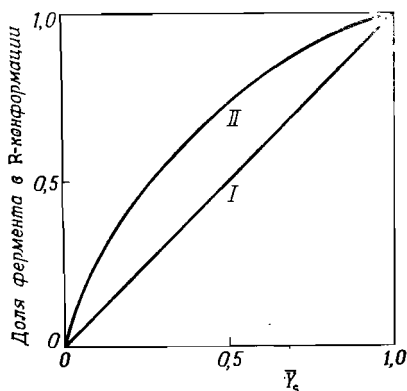
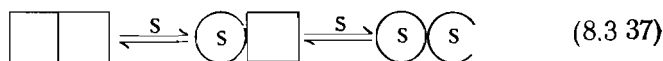


Рис. 8.39. Зависимость доли фермента в R-конформации от степени насыщения для простой последовательной модели (I) [уравнение (8.336)] и для согласованной модели (II) [уравнение (8.338)].

Для простой согласованной модели, описываемой схемой



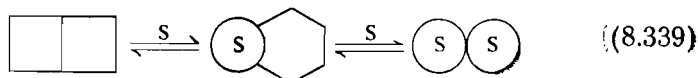
доля фермента в R-конформации (○) не связана со степенью насыщения такой простой зависимостью. Для фермента из n субъединиц эта доля дается выражением

$$\frac{R}{R+T} = \frac{\left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n}{\left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n + L \left(1 + \frac{s}{K_T}\right)^n}. \quad (8.338)$$

Из этого уравнения следует, что зависимость доли фермента в состоянии R от степени насыщения нелинейна (рис. 8.39). Характер кривой будет зависеть от значений констант, входящих в уравнение. В работе [5096] получены расчетные кривые при различных значениях n , L и степени неисключительного связывания.

Было предпринято несколько попыток использовать этот подход для выбора модели, рассматривая связь между конформационными изменениями молекулы фермента и степенью насыщения. Например, для аспартат-карбамоилтрансферазы (КФ 2.1.3.2) [3063] и аспартаткиназы—гомосериндегидрогеназы (КФ 2.7.2.4—1.1.1.3) [2208] получены нелинейные зависимости доли фермента в конформации, возникающей в результате связывания лиганда, от степени насыщения. Эти данные интерпретируются авторами в рамках согласованной аллостерической модели.

К сожалению, линейная зависимость доли фермента в конформации R от степени насыщения предсказывается только простой последовательной моделью. В случае общей последовательной модели, которая допускает взаимное влияние соседних субъединиц на конформацию, эта зависимость будет сложной [2568]. Например, для простого димерного фермента



она будет зависеть от свойств промежуточной формы (⊞). Если конформация этой формы очень близка к конформации субъединицы, связавшей субстрат (○), то зависимость доли фермента в этой конформации от степени насыщения будет аналогична таковой для согласованной модели (8.337). В другом крайнем случае, когда сходны конформации промежуточной

формы и свободного фермента ($\square$), отклонение от линейности будет незначительно.

По-видимому, при использовании такого подхода выбор модели возможен только в том случае, если зависимость доли фермента в конформации, вызываемой субстратом, от степени насыщения линейна. Такую зависимость наблюдали для гемоглобина [3510] при использовании спиновой метки для регистрации конформационных изменений, и на этом основании поведение гемоглобина интерпретировали в рамках простой последовательной модели. Однако теоретические расчеты, которые провели Вилл и Дамашун, свидетельствуют о том, что в ряде случаев согласованная модель приводит к зависимостям, очень мало отклоняющимся от линейной, и, следовательно, не всегда можно различить согласованную и простую последовательную модели.

Одновременное действие активаторов и ингибиторов

Рассмотрим простую согласованную модель с исключительным связыванием, представленную на рис. 8.32. При фиксированной ненасыщающей концентрации субстрата степень насыщения им фермента будет зависеть от L : увеличиваться при уменьшении этой величины и уменьшаться при ее увеличении. Изменение L может происходить при добавлении в реакционную смесь активатора или ингибитора. При фиксированной концентрации субстрата можно подобрать такое отношение концентраций ингибитора и активатора, при котором степень насыщения фермента субстратом будет такой же, как и в их отсутствие. Для этого в систему следует ввести заданное количество ингибитора и определить количество активатора, которое необходимо добавить для получения исходной степени насыщения. Согласно уравнению (8.283), связывающему кажущуюся константу L с концентрациями ингибитора и активатора, это будет наблюдаться, когда

$$\frac{i}{K_{\text{TI}}} = \frac{a}{K_{\text{RA}}}. \quad (8.340)$$

Следовательно, если концентрации активатора и ингибитора изменяются так, что отношение их остается постоянным, то активность фермента изменяться не будет. Этот подход предложил Уайтхед [5073], который отметил, что приведенное соотношение справедливо для любого механизма с двумя состояниями независимо от того, является ли переход между ними согласованным или последовательным, однако при условии, что активатор и ингибитор связываются с формами фермента, находящимися в различных состояниях.

Несколько другой подход использован в работе [605]. Для фермента, который находится в двух конформационных состояниях и связывает активатор и субстрат только в конформации R, а ингибитор — только в конформации T и имеет n центров связывания для каждого, согласованная модель приводит к следующему выражению для доли фермента в R-конформации [см. (8.338)]:

$$\frac{R}{R+T} = \frac{\left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n \left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^n}{L \left(1 + \frac{i}{K_{TI}}\right)^n + \left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n \left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^n}. \quad (8.341)$$

Степень насыщения фермента субстратом равна

$$\bar{Y}_s = \left[\frac{\left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n \left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^n}{L \left(1 + \frac{i}{K_{TI}}\right)^n + \left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n \left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^n} \right] \left[\frac{\frac{s}{K_R}}{1 + \frac{s}{K_R}} \right]. \quad (8.342)$$

При очень высоких концентрациях активатора это выражение упрощается до

$$\bar{Y}_s^{a, \max} = \left(\frac{\frac{s}{K_R}}{1 + \frac{s}{K_R}} \right), \quad (8.343)$$

где $\bar{Y}_s^{a, \max}$ — значение $\bar{Y}_s$ при концентрации активатора, достаточной для перевода всего фермента в R-состояние. После подстановки (8.343) в (8.342) и преобразования получаем

$$\bar{Y}_s^{a, \max} - \bar{Y}_s = \frac{\bar{Y}_s L \left(1 + \frac{i}{K_{TI}}\right)^n}{\left(1 + \frac{s}{K_R}\right)^n \left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)^n}. \quad (8.344)$$

Это выражение можно записать в следующем виде:

$$\sqrt[n]{\frac{\bar{Y}_s^{a, \max} - \bar{Y}_s}{\bar{Y}_s}} = \frac{\sqrt[n]{L} \left(1 + \frac{i}{K_{TI}}\right)}{\left(1 + \frac{s}{K_R}\right) \left(1 + \frac{a}{K_{RA}}\right)}. \quad (8.345)$$

Таким образом, зависимость величины $\sqrt[n]{\frac{\bar{Y}_s^{a, \max} - \bar{Y}_s}{\bar{Y}_s}}$ от i при фиксированных концентрациях субстрата и активатора должна

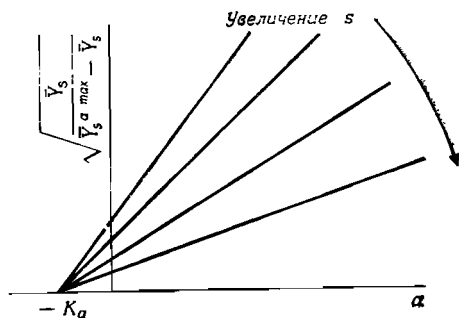


Рис. 8.40. Определение величины K_a для аллостерического активатора методом Бюка и Бюка [605] в случае димерного фермента [уравнение (8.345)].

быть линейной. Несколько таких графиков, полученных при различных фиксированных концентрациях субстрата и активатора, образуют семейство прямых, пересекающих ось i в точке, соответствующей $-K_i$. Аналогично графики зависимости $\sqrt{\frac{\bar{V}_s}{\bar{V}_s^{a, \max} - \bar{V}_s}}$ от s или a , полученные при фиксированных концентрациях других лигандов, тоже представляют собой прямые. Семейство таких прямых, полученных при варьировании концентрации s и различных фиксированных концентрациях a или i , будет пересекать ось s в точке, соответствующей $-K_R$, тогда как аналогичные прямые, полученные при варьировании a , пересекают ось абсцисс в точке $-K_a$. Пример такого графика для случая, когда изменяется концентрация активатора, представлен на рис. 8.40.

В работе [605] показано, что линейные зависимости такого типа получаются для димерного фермента фосфорилазы ($n=2$) при изменяющейся концентрации активатора (АМР) и нескольких фиксированных концентрациях субстрата (неорганического фосфата). Из этих результатов следует, что кинетика действия фермента описывается в рамках согласованной модели с двумя состояниями и исключительным связыванием.

Определение параметров для согласованной модели

Уравнение насыщения в случае фермента, кинетика действия которого описывается в рамках согласованной модели с исключительным связыванием (8.266), можно преобразовать к линейной форме, проведя перегруппировку и логарифмирование [1250]:

$$\lg \left(\frac{\bar{V}_s(1+\alpha) - \alpha}{\alpha - \bar{V}_s(1+\alpha)} \right) = \lg L + (n-1) \lg \left(\frac{1+\alpha}{1+\alpha} \right). \quad (8.346)$$

Зависимость величины, стоящей в левой части уравнения (8.346),

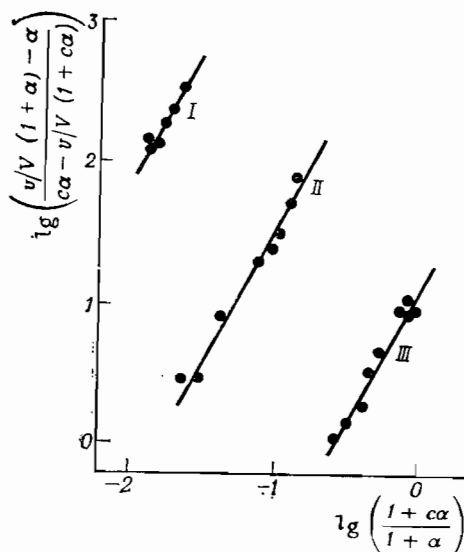


Рис. 8.41. Графики, построенные на основании данных по определению начальной скорости, для реакции, катализируемой пируваткиназой в присутствии аллостерического ингибитора АТР (I), аллостерического активатора фруктозо-1,6-бисфосфата (III) и в отсутствие эффекторов (II) [2237]. Графики построены по уравнению (8.346), за исключением того, что вместо величины $\bar{Y}_s$ использованы величины v/V , поскольку в опыте измерялись начальные скорости, а не степень связывания субстрата.

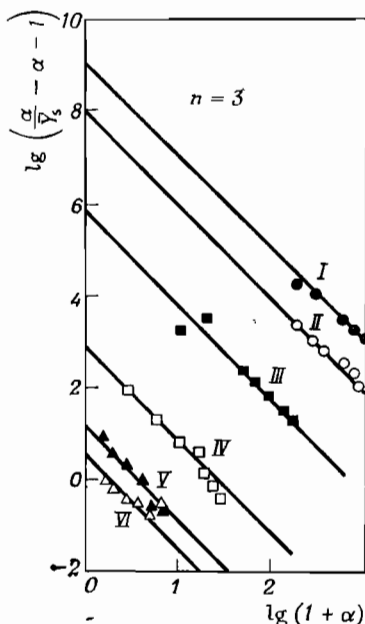
от $\lg\left(\frac{1+c\alpha}{1+\alpha}\right)$ должна быть линейной; наклон соответствующей прямой равен $(n-1)$, и она отсекает от оси ординат отрезок длиной $\lg L$ (рис. 8.41). Для построения такого графика необходимо знать величины $c (=K_R/K_T)$ и $\alpha (=s/K_R)$, однако описаны методы последовательного приближения, которые позволяют определить все четыре параметра по нескольким графикам, полученным при различных концентрациях аллостерического активатора или ингибитора, в результате чего изменяется кажущаяся константа L [928, 2237]. Было показано, что уравнение (8.346) выполняется для пируваткиназы (2.7.1.40) [2237] и 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) из *E. coli* [1250].

Более простым является случай согласованной модели с исключительным связыванием ($c=0$), когда применимо уравнение (8.267). Это уравнение можно преобразовать к виду [2047]

$$\lg\left(\frac{\alpha}{\bar{Y}_s} - \alpha - 1\right) = \lg L - (n-1) \lg(1+\alpha), \quad (8.347)$$

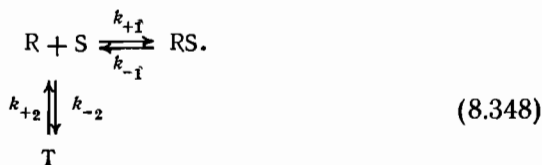
и зависимость величины, находящейся в левой части уравнения, от $\lg(1+\alpha)$ будет графически представляться прямой с наклоном $(n-1)$, которая, как и в более сложном случае, отсекает от оси ординат отрезок, равный $\lg L$ (рис. 8.42). Показано, что уравнение (8.347) справедливо для аспартат—карбамоилтрансферазы (КФ 2.1.3.2) из семян пшеницы [5239].

Рис. 8.42. Графики, построенные на основании данных по определению связывания субстрата аспартат—карбамоилтрансферазой из семян пшеницы в присутствии различного количества аллостерического ингибитора (UMP). Графики построены по уравнению (8.347). I — [UMP] = 1000 мкМ; II — [UMP] = 500 мкМ; III — [UMP] = 100 мкМ; IV — [UMP] = 10 мкМ; V — [UMP] = 2 мкМ; VI — [UMP] = 1 мкМ.



Исследование нестационарной кинетики

Эффективным подходом при выборе аллостерической модели является определение числа стадий в процессе связывания субстрата с помощью метода возмущений и релаксационного метода. Если имеет место согласованный механизм, описываемый уравнением (8.244), должны регистрироваться только три времени релаксации, соответствующие переходу $R \rightleftharpoons T$, связыванию субстрата на идентичных центрах R-формы фермента и связыванию субстрата на идентичных центрах T-формы. Если субстрат связывается только с R-конформацией фермента, ситуация еще более упрощается и должно наблюдаться только два времени релаксации. Так как изомеризация $R \rightleftharpoons T$ является мономолекулярной стадией, можно было бы полагать, что время релаксации этого процесса не будет зависеть от концентрации фермента и субстрата, однако в действительности этот переход зависит от связывания субстрата



Время релаксации стадии связывания субстрата определяется по уравнению (см. 281—290)

$$\frac{1}{\tau} = k_{-1} + k_{+1}(e_{eq} + s_{eq}), \quad (8.349)$$

где e_{eq} и s_{eq} — равновесные концентрации фермента и субстрата. Время релаксации перехода $R \rightleftharpoons T$, τ_2 , определяется по уравнению

$$\frac{1}{\tau_2} = k_{+2} + \frac{k_{-2}}{1 + \frac{s_{eq}}{[k_{-1}/k_{+1} + e_{eq}]}}. \quad (8.350)$$

Таким образом, величина $1/\tau_2$ будет уменьшаться с ростом s_{eq} и достигать предельного значения при высоких концентрациях субстрата. В то же время величина, обратная времени релаксации стадии связывания субстрата, будет увеличиваться линейно с ростом концентрации субстрата.

Как отмечалось ранее, для согласованного механизма неважно, предшествует ли конформационное изменение связыванию субстрата или следует за ним. В том случае, когда конформационное изменение происходит после связывания субстрата,

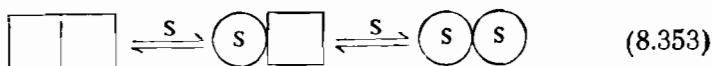


время релаксации для стадии связывания определяется уравнением (8.349), а для стадии конформационного перехода — уравнением (8.352):

$$\frac{1}{\tau_2} = k_{-2} + \frac{k_{+2}}{1 + \frac{k_{-1}/k_{+2}}{e_{eq} + s_{eq}}}. \quad (8.352)$$

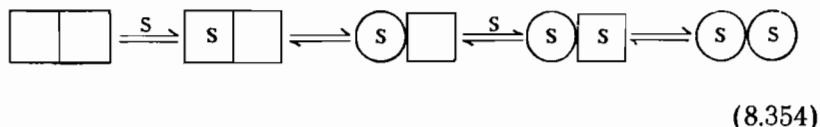
В этом случае величина $1/\tau_2$ будет увеличиваться с ростом s_{eq} и стремиться к предельному значению при высоких концентрациях субстрата.

Обычная схема изображения простой последовательной модели предполагает, что число стадий процесса связывания (и, следовательно, число наблюдаемых времен релаксации) равно числу центров связывания. Например, для димера



имеется два времени релаксации. Однако такая схема подразумевает, что конформационное изменение и связывание субстрата происходят одновременно, в одну стадию, хотя правильнее было бы считать, что эти два процесса протекают на разных стадиях

и, следовательно, схему (8.353) можно представить следующим образом:



Согласно этой схеме, для фермента с n центрами связывания должно наблюдаться $2n$ времен релаксации. На схеме (8.354) конформационное изменение происходит после связывания субстрата субъединицей фермента. Однако при последовательном механизме, согласно которому связывание субстрата смещает предсуществующее равновесие, устанавливающееся перед каждой стадией связывания, мы получим то же число времен релаксации.

Все сказанное выше показывает, что исследование кинетики релаксации для определения числа стадий реакции связывания дает простой способ выбора одной из двух указанных аллостерических моделей. Однако, как отмечалось в гл. 4, определение всех времен релаксации исследуемой системы не всегда оказывается простой задачей. Так, если зарегистрированы только три времени релаксации, это еще не означает, что система функционирует по согласованному механизму. С другой стороны, обнаружение $2n$ времен релаксации может служить четким доказательством функционирования системы по последовательному механизму.

К сожалению, бимолекулярные реакции между ферментом и лигандами протекают обычно со столь высокой скоростью [1754], что их не удается зарегистрировать такими методами, как метод температурного скачка. В таких случаях можно обнаружить только те стадии, которые связаны с более медленными конформационными изменениями; для согласованной модели регистрируется одно время релаксации, а для последовательной — n времен. При связывании эффекторов с аспартат—карбамоил-трансферазой (КФ 2.1.3.2) было обнаружено только одно время релаксации [1794, 5168]. Характер концентрационной зависимости этого времени релаксации свидетельствует о том, что оно связано с конформационным изменением, которое происходит после связывания субстрата. Этот результат проще всего объясняется в рамках согласованного механизма. При связывании же с этим ферментом субстрата (карбамоилфосфата) были обнаружены как бимолекулярная стадия, так и относительно медленная стадия изомеризации [1756]. Эти данные также наиболее просто объясняются в рамках согласованного механизма. Однако такое объяснение не согласуется с данными о наличии отрицательной кооперативности при связывании с ферментом

некоторых эффекторов [612, 5120]. Обзор кинетических и аллостерических свойств этого фермента дается в работах [1757] и [2185].

Киршнер [2469—2470] исследовал глицеральдегидфосфатдегидрогеназу из дрожжей (КФ 1.2.1.12) и обнаружил относительно простую картину. При температуре 40 °С кривые связывания ферментом NAD^+ являются S-образными, тогда как при более низких температурах они становятся гиперболическими. Обусловлено ли такое поведение действием регуляторного механизма или обратной тепловой денатурацией фермента, который может ренатурировать при связывании NAD^+ в результате кооперативного процесса, — не ясно. Исследования с помощью метода температурного скачка выявили три времени релаксации, которые четко различаются. Наибольшее из них (τ_3) отражает стадию изомеризации, поскольку оно зависит от изменения концентрации реагента. Два других времени релаксации относятся к бимолекулярным стадиям. Эти данные лучше всего объясняются в рамках согласованной модели с неисключительным связыванием. В отличие от связывания NAD^+ кривая связывания ферментом NADH является гиперболической, и методом температурного скачка зарегистрировано только одно время релаксации [2468]. На основании этих данных предполагается, что восстановленный кофермент имеет одинаковое сродство к ферменту в R- и T-конформации.

В отличие от глицеральдегидфосфатдегидрогеназы из дрожжей фермент из скелетных мышц кролика проявляет отрицательную кооперативность при взаимодействии с NAD^+ [865]. Результаты изучения связывания NAD^+ методом температурного скачка наиболее просто объясняются в рамках последовательной модели.

СКОРОСТИ РЕАКЦИЙ В КООПЕРАТИВНЫХ СИСТЕМАХ

Модели кооперативности, которые обсуждались выше, были предложены для объяснения кооперативного связывания лигандов. Можно ожидать, что при функционировании ферментов, проявляющих кооперативность при связывании субстрата, будут наблюдаться отклонения от обычной гиперболической зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Если скорость установления равновесия на стадиях связывания субстрата достаточно велика и равновесие сохраняется в условиях определения суммарной скорости ферментативной реакции, то изменения начальной скорости, представленной в виде относительной величины ($\phi = v/V$), будут идентичны изменениям степени инасыщения $\bar{Y}$, определяемым по связыванию субстрата. В стационарном состоянии степень насыщения фермента при любой

данной концентрации субстрата будет отличаться от степени насыщения, определенной в равновесных условиях. Поэтому величины ϕ и $\bar{Y}_s$ нельзя считать эквивалентными, если не показано, что равновесие на стадиях связывания субстрата сохраняется в ходе ферментативной реакции. Интерпретация сложных графиков зависимости скорости от концентрации субстрата становится еще более трудной задачей также и оттого, что имеются некоторые чисто кинетические эффекты, приводящие к подобным графикам в отсутствие кооперативности.

Кинетические эффекты в кооперативных системах

Как отмечалось ранее, в своем первоначальном виде согласованная модель кооперативности ничего не говорит о влиянии на величину максимальной скорости реакции. Однако Моно, Уаймен и Шанжэ [3217] обобщили свою модель кооперативности на случай систем, в которых аллостерические эффекторы влияют и на максимальную скорость ферментативной реакции, и на кажущееся сродство фермента к субстрату. В простейшей модели оба состояния, R и T, имеют одинаковое сродство к субстрату ($c=1$), но различаются по своей каталитической активности. Если константу скорости отщепления субстрата, связанного в активном центре R-формы фермента, обозначить через k , а субстрата, связанного в активном центре T-формы, — через k' , то максимальная скорость реакции для фермента, имеющего n центров связывания, будет равна

$$V_{\max} = (nk\bar{R} + nk'T)e, \quad (8.355)$$

где $\bar{R}$ и $\bar{T}$ — доля фермента в R- и T-конформациях соответственно. Считая, что распад фермент-субстратного комплекса не изменяет равновесия между ферментом и субстратом, из уравнений (8.270) и (8.338) для скорости реакции при любой данной концентрации субстрата получаем выражение

$$v = \frac{ne [k\alpha (1 + \alpha)^{n-1} + k'L\alpha (1 + \alpha)^{n-1}]}{(1 + \alpha)^n + L(1 + \alpha)^n}, \quad (8.356)$$

где $\alpha = s/K_R$. Если обозначить k'/k через β , то уравнение можно записать в более простом виде:

$$v = \frac{nek\alpha (1 + \beta L)}{(1 + \alpha)(1 + L)}. \quad (8.357)$$

В предположении, что фермент в R-состоянии обладает более высокой каталитической активностью ($\beta < 1$), истинная макси-

мальная скорость реакции равна

$$V = nek, \quad (8.358)$$

и, следовательно, уравнение (8.357) можно записать в виде

$$\varphi = \frac{\alpha(1 + \beta L)}{(1 + \alpha)(1 + L)}. \quad (8.359)$$

Таким образом, зависимость относительной скорости от концентрации субстрата является гиперболической. Присутствие эффекторов, связывающихся преимущественно с одной из двух форм фермента, будет влиять на скорость реакции при любой данной концентрации субстрата, изменяя кажущуюся константу L [см. уравнения (8.278) и (8.280)]. Если связывание эффектора протекает в рамках согласованного механизма при условии $c \neq 1$, кривые насыщения фермента эффектором будут S-образными в отличие от гиперболических кривых связывания субстрата. Когда оба состояния, R и T, обладают каталитической активностью при $\beta < 1$, эффектор, связывающийся преимущественно с R-формой, будет вести себя как несущественный активатор; когда же фермент активен только в R-состоянии, активатор окажется существенным, если исходное значение L очень велико. Эффектор, связывающийся только с T-формой, окажется неконкурентным ингибитором, если активностью обладает только R-форма, и частично конкурентным, если активны обе формы. Эта модель названа V-системой, поскольку максимальная скорость реакции изменяется в присутствии эффекторов, в отличие от модели, в которой в присутствии эффекторов изменяется только кажущееся сродство фермента. Последнюю модель часто называют K-системой.

Пируваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1.) во многих отношениях ведет себя как простая V-система, в которой ацетил-СоА является существенным аллостерическим активатором. Зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (MgATP^{2-}) являются гиперболическими, и скорость реакции увеличивается с ростом концентрации ацетил-СоА, как показано на графике двойных обратных величин на рис. 8.43, А. Зависимость скорости реакции от концентрации ацетил-СоА при фиксированных концентрациях субстрата является S-образной (рис. 8.43, Б). Эти данные можно объяснить на основе модели, рассмотренной выше, однако другие характеристики активности пируваткарбоксилазы с трудом поддаются интерпретации в рамках согласованной модели. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (пирувата) свидетельствует в пользу отрицательной кооперативности [4685, 4997], а зависимость активности от концентрации свободного Mg^{2+} (существенный активатор) является S-образной [4997]. Фруктозо-бисфосфатаза (КФ 3.1.3.11)

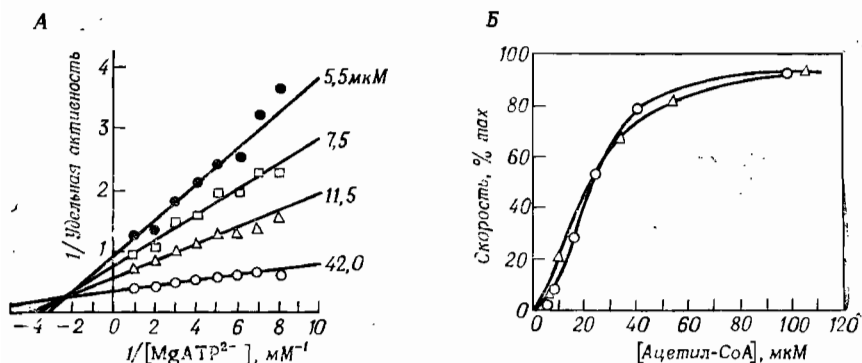


Рис. 8.43. Кинетика реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой из печени свиньи [4997]. А. Графики двойных обратных величин при разных концентрациях ацетил-СоА. Б. Зависимость начальной скорости прямой реакции (карбоксилирование пирувата) (○) и обратной реакции (декарбоксилирование оксалоацетата) (△) от концентрации ацетил-СоА.

также ведет себя как V-система, в которой АМР является частичным неконкурентным ингибитором; зависимость активности от концентрации АМР является S-образной [4651]. Эти результаты указывают на функционирование V-системы, в которой активны как R-, так и Т-состояния, а ингибитор связывается только с ферментом в Т-состоянии. Существенными активаторами фермента являются ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} ; как и в случае пируваткарбоксилазы, взаимодействие фермента со свободными ионами Mg^{2+} является кооперативным процессом. Тип кооперативного взаимодействия, по-видимому, зависит от источника фермента и ионов металла. Так, фруктозо-бисфосфатаза из печени кролика при связывании Mn^{2+} проявляет отрицательную кооперативность [2805], а зависимость активности фермента из печени быка от концентрации свободного Mg^{2+} является S-образной [3429]. В случае фермента из печени кролика наблюдаемая отрицательная кооперативность не позволяет объяснить его функционирование только в рамках согласованного механизма. Результаты же, полученные с ферментом из печени быка, объясняются в рамках такой модели (K-система с неисключительным связыванием Mg^{2+} ; ион металла выполняет двойную функцию — является аллостерическим активатором и существенным кофактором фермента) [3429].

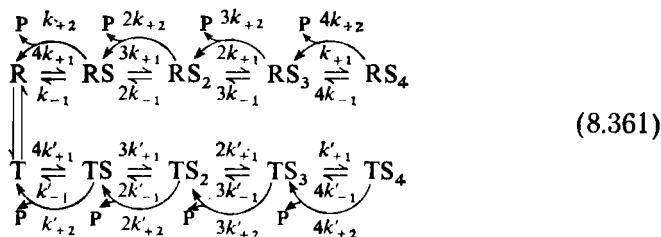
Существуют и смешанные V, K-системы, в которых эффекты влияют как на максимальную скорость реакции, так и на кажущуюся K_s . Подобным образом могут функционировать системы, которые только что обсуждались, если сродство к субстрату R- и Т-состояний не одинаково ($c \neq 1$); для таких систем

уравнение для скорости реакции, полученное из (8.266), имеет следующий вид:

$$v = \frac{ne [k\alpha(1+\alpha)^{n-1} + k'cL\alpha(1+\alpha)^{n-1}]}{(1+\alpha)^n + L(1+\alpha)^n}. \quad (8.360)$$

В этом случае зависимость относительной скорости (и степени насыщения) от концентрации субстрата будет S-образной, а активаторы и ингибиторы будут влиять как на величину V , так и на концентрацию субстрата, полунасыщающую фермент. Описан целый ряд ферментов, которые ведут себя как смешанные V, K -системы [736].

Рассмотренные выше модели предполагают, что распад фермент-субстратных комплексов с образованием продуктов не сопровождается изменением равновесия между свободным субстратом и указанными комплексами. Это положение не выполняется для стационарных условий. Уравнение скорости реакции в стационарных условиях для простого согласованного механизма, представленного схемой (8.361), получил Дальциль [961].



Константы k и k' представляют собой микроскопические константы скорости различных стадий реакций, в которых участвуют R- и T-состояния фермента соответственно. «Микроскопические константы Михаэлиса» для этих двух состояний можно определить следующим образом:

$$K_M^R = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}, \quad K_M^T = \frac{k'_{-1} + k'_{+2}}{k'_{+1}}. \quad (8.362)$$

Стационарная скорость реакции для такой схемы определяется выражением

$$v = \frac{4e [k_{+2}\alpha_m(1+\alpha_m)^3 + k'_{+2}c_mL\alpha_m(1+\alpha_m)^3]}{(1+\alpha_m)^4 + L(1+c_m\alpha_m)^4}, \quad (8.363)$$

где $\alpha_m = s/K_M^R$, $c_m = K_M^R/K_M^T$. Для фермента с n центрами связывания уравнение принимает вид

$$v = \frac{ne [k_{+2}\alpha_m(1+\alpha_m)^{n-1} + k'_{+2}c_mL\alpha_m(1+\alpha_m)^{n-1}]}{(1+\alpha_m)^n + L(1+c_m\alpha_m)^{n-1}}. \quad (8.364)$$

Это уравнение идентично тому, которое получают для подобной

системы в равновесных условиях [уравнение (8.360)], за исключением того, что α_m и c_m выражены через константы Михаэлиса, а не через константы диссоциации. Константа L в обоих случаях представляет собой константу равновесия перехода $R \rightleftharpoons T$. Эта система будет, следовательно, вести себя так же, как смешанная V, K -система, описанная выше, и, если $c_m = 1$, уравнение (8.364) упрощается до

$$v = \frac{nek_{+2}\alpha_m(1 + \beta L)}{(1 + \alpha_m)(1 + L)}, \quad (8.365)$$

где $\beta = k'_{+2}/k_{+2}$. Это уравнение имеет такой же вид, как и уравнение (8.357) для простой V -системы.

Модель, описываемая уравнением (8.361), предполагает, что переход между R - и T -формами происходит только в свободном ферменте и что такие переходы между комплексами этих форм с субстратом ($RS \rightleftharpoons TS$, $RS_2 \rightleftharpoons TS_2$ и т. д.) либо вообще не происходят, либо протекают так медленно, что оказываются несущественными (по сравнению с другими стадиями). Для такого предположения имеются как теоретические, так и экспериментальные обоснования [1214]; как обсуждалось ранее, конформационные изменения протекают обычно медленнее, чем реакции связывания субстрата, которые лимитируются диффузией. Если не вводить такое предположение (или если оно несправедливо), уравнение для скорости реакции в стационарных условиях чрезвычайно усложняется.

Особые случаи стационарной кинетики

Функционирование некоторых ферментов, не относящихся к классу «многоцентровых», описывается кинетическими схемами, характеризующимися сложными кривыми зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в стационарных условиях. Такие системы нередко рассматриваются как модели для объяснения кооперативных эффектов. Однако ферменты, имеющие только один центр связывания субстрата, не могут связывать этот субстрат кооперативным образом, и в то же время действие их может характеризоваться сложными кривыми зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Истинную кооперативность (при связывании субстрата) можно легко отличить от этих псевдокооперативных эффектов, если с помощью прямых измерений построить кривую насыщения фермента субстратом.

В гл. 4 было показано, что при анализе механизма функционирования двухсубстратного фермента в стационарных условиях при неупорядоченном связывании субстратов (рис. 4.20)

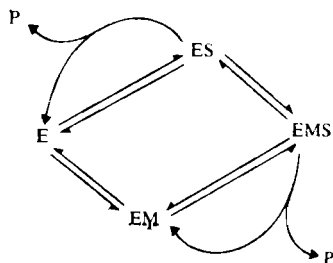


Рис. 8.44. Неупорядоченное взаимодействие фермента с субстратом (S) и модификатором (M).

получается сложное уравнение, содержащее члены, в которые входят концентрации обоих субстратов во второй степени [уравнение (4.82)]. Аналогично уравнения скорости реакции в стационарном состоянии в случае неконкурентного ингибирования [(8.17) и (8.24)] и неупорядоченной активации (8.150) являются уравнениями второй степени. Боттс и Моралес [501] рассмотрели общий случай, когда фермент взаимодействует с модификатором и субстратом, которые присоединяются неупорядоченно; модификатор может быть как активатором, так и ингибитором фермента. Эта схема представлена на рис. 8.44; для стационарных условий уравнение скорости имеет вид:

$$v = \frac{[(A + Bm)s^2 + (C + Dm + Em^2)s]e}{(F + Gm)s^2 + (H + Im + Jm^2)s + (K + Lm + Mm^2)}, \quad (8.366)$$

где A, ..., M — положительные константы, m и s — концентрация модификатора и субстрата соответственно. Если концентрации фермента и модификатора постоянны, уравнение (8.366) можно записать в упрощенном виде [ср. с уравнением (4.113)]:

$$v = \frac{a_1 s^2 + b_1 s}{f_1 s^2 + g_1 s + h_1}. \quad (8.367)$$

При постоянной концентрации фермента и субстрата уравнение принимает вид

$$v = \frac{a_2 m^2 + b_2 m + c_2}{f_2 m^2 + g_2 m + h_2}. \quad (8.368)$$

Таким образом, для любой реакции типа представленной на рис. 8.44 можно написать общее уравнение для скорости реакции в виде

$$v = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 x + \alpha_2 x^2}{\beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2}, \quad (8.369)$$

где x — концентрация лиганда (субстрата или модификатора). Уравнения (8.368) и (8.369) показывают, что скорость реакции имеет некоторое конечное значение, когда концентрация лиганда равна нулю; этого можно ожидать, если лиганд является либо

ингибитором, либо несущественным активатором. Из уравнения (8.367) видно, что скорость реакции равна нулю, когда концентрация субстрата равна нулю, а также в том случае, когда равна нулю концентрация модификатора, являющегося существенным активатором (например, когда комплекс ES на рис. 8.44 не может распадаться с образованием продукта). Таким образом, уравнение (8.367) представляет собой частный случай уравнения (8.369) при условии, что лиганд X является существенным для протекания ферментативной реакции и величина α_0 равна нулю.

При очень низкой концентрации X членом, содержащим x^2 , можно пренебречь и уравнение (8.369) упрощается до уравнения равнобочной гиперболы:

$$v = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 x}{\beta_0 + \beta_1 x}. \quad (8.370)$$

Если X является существенным для протекания реакции, это уравнение приобретает вид уравнения Михаэлиса — Ментен. Таким образом, системы, описываемые уравнением (8.369), будут приводить к гиперболической зависимости скорости реакции от концентрации реагента, если его концентрации довольно низки. Однако при более высоких концентрациях, когда член x^2 становится существенным, будут наблюдаться отклонения от простой гиперболической зависимости. Когда X является ингибитором, α_2 в уравнении (8.369) будет равно нулю и оно упрощается до

$$v = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 x}{\beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2}. \quad (8.371)$$

В этом уравнении концентрация X в знаменателе имеет более высокий показатель степени, чем в числителе, и скорость реакции, следовательно, будет равна некоторой конечной величине, когда $x=0$, и нулю при $x \rightarrow \infty$. Уравнение (8.369) упрощается и в случае ингибирования высокими концентрациями субстрата, когда X является одновременно субстратом и ингибитором (см. с. 184—197). В этом случае как α_0 , так и α_2 равны нулю, и (8.369) сводится к такому же выражению [уравнение (4.208)], какое получено для ингибирования высокими концентрациями субстрата:

$$v = \frac{\alpha_1 x}{\beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2} = \frac{\alpha_1/\beta_1}{\frac{\beta_0}{\beta_1} \cdot \frac{1}{x} + \frac{\beta_2}{\beta_1} x + 1}. \quad (8.372)$$

Графики зависимости v от x , отвечающие уравнению (8.369), могут иметь разный вид в зависимости от значений отдельных констант; Боттс [500] показал, что кривые могут иметь только один максимум (или минимум) и не более двух точек перегиба,

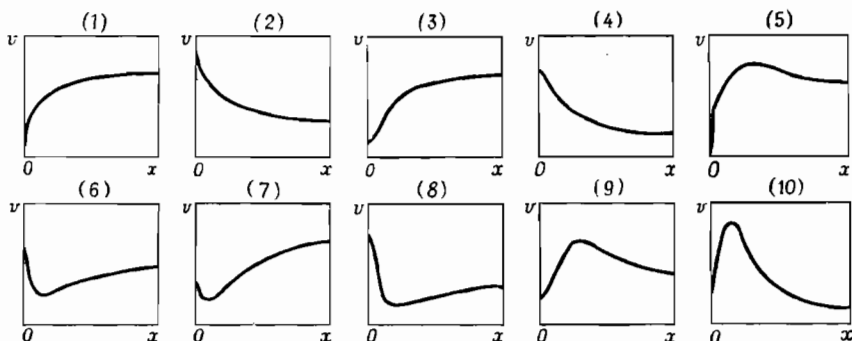


Рис. 8.45. Десять типов кривых $v-x$, которые могут наблюдаться для систем, описывающихся уравнением (8.369) [500].

На рис. 8.45 представлены десять возможных типов кривых, соответствующих этому уравнению. Число типов кривых уменьшается, если одна из констант в числителе уравнения (8.369) равна нулю. При $\alpha_2=0$ получаются только кривые типа (2), (4) и (10), а при $\alpha_1=0$ — только кривые типа (6), (7) и (8). В «особом» случае, когда $\alpha_0=0$, имеются четыре возможных типа кривых, подобных кривым (1), (3), (5), (9), за исключением того, что они проходят через начало координат ($v=0$ при $x=0$). Кри-

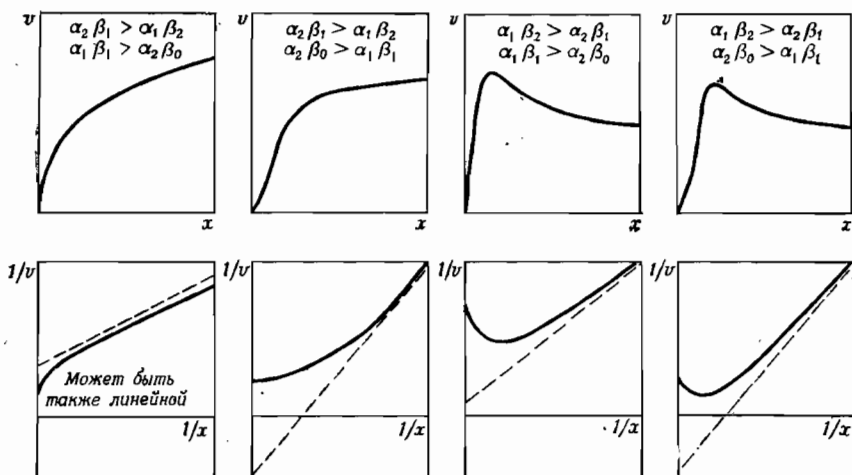


Рис. 8.46. Четыре типа кривых $v-x$, которые могут наблюдаться для систем, описывающихся уравнением (8.369), при $\alpha_0=0$ [500]. Под каждой из кривых $v-x$ приведен соответствующий график в двойных обратных координатах; указаны условия, при которых получаются кривые. Пунктирные прямые — линейные асимптоты.

вые, представленные на рис. 8.46, а также соответствующие графики в двойных обратных координатах детально рассмотрены Фердинандом [1321]. Он проанализировал условия, при которых уравнению (8.369) соответствует та или иная из приведенных кривых. Положение максимума на кривой можно определить, взяв первую производную выражения (8.369) при $\alpha_0 = 0$:

$$\frac{dv}{dx} = \frac{(\alpha_2\beta_1 - \alpha_1\beta_2)x^2 + 2\alpha_2\beta_0x + \alpha_1\beta_0}{(\beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2)^2}. \quad (8.373)$$

В точке максимума (или минимума) $dv/dx = 0$. Это условие выполняется в двух случаях: при $x \rightarrow \infty$ — и тогда кривая вырождается в прямую — и когда числитель выражения, стоящего в правой части (8.370), равен нулю, т. е.

$$x = -\frac{\alpha_2\beta_0 \pm \sqrt{\alpha_2^2\beta_0^2 - \alpha_1\beta_0(\alpha_2\beta_1 - \alpha_1\beta_2)}}{(\alpha_2\beta_1 - \alpha_1\beta_2)}. \quad (8.374)$$

Из этого уравнения видно, что $x > 0$ только при $\alpha_2\beta_1 < \alpha_1\beta_2$, и, таким образом, только при этом условии кривые зависимости v от x будут проходить через максимум.

Условия, необходимые для наличия точек перегиба на кривой, можно получить, взяв вторую производную выражения (8.369) при $\alpha_0 = 0$:

$$\frac{d^2v}{d^2x} = \frac{2[\beta_2(\alpha_2\beta_1 - \alpha_1\beta_2)x^3 - 3\alpha_2\beta_0\beta_2x^2 - 3\alpha_1\beta_0\beta_2x + \beta_0(\beta_0\alpha_2 - \alpha_1\beta_1)]}{(\beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2)^3}. \quad (8.375)$$

В точке перегиба $d^2v/dx^2 = 0$, что имеет место или когда x стремится к бесконечности, или когда числитель выражения, стоящего в правой части, равен нулю. Последнее условие выполняется, если

$$\frac{\beta_0(\alpha_1\beta_1 - \alpha_2\beta_0)}{\beta_2(\alpha_2\beta_1 - \alpha_1\beta_2)} + \frac{3\alpha_1\beta_0x}{(\alpha_2\beta_1 - \alpha_1\beta_2)} + \frac{3\alpha_2\beta_0x^2}{(\alpha_2\beta_1 - \alpha_1\beta_2)} + x^3 = 0. \quad (8.376)$$

Из этого уравнения следует, что x может быть > 0 или при

$$\alpha_2\beta_0 > \alpha_1\beta_1 \quad \text{и} \quad \alpha_2\beta_1 > \alpha_1\beta_2, \quad (8.377)$$

или при

$$\alpha_2\beta_1 < \alpha_1\beta_2. \quad (8.378)$$

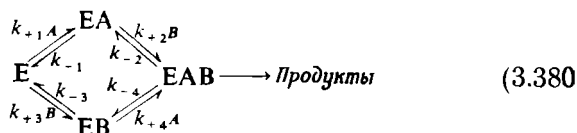
Выполнение неравенства (8.378) является также необходимым условием наличия максимума; следовательно, соответствующая кривая будет иметь как точку перегиба, так и максимум. Если к тому же $\alpha_2\beta_0 > \alpha_1\beta_1$, кривая будет иметь две точки перегиба и максимум. При условии $\alpha_2\beta_0 < \alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_1 > \alpha_1\beta_2$ не будет наблюдаться ни точек перегиба, ни максимума, и скорость реакции будет плавно увеличиваться до максимальной скорости.

Приведенные на рис. 8.46 кривые показывают, что при определенных условиях механизмы, представленные схематически на рис. 8.44 (при условии, что как M , так и S существенны для активности), могут характеризоваться кинетическими кривыми, сходными с теми, которые наблюдаются в случае положительной или отрицательной кооперативности. В этих условиях график Хилла будет линейным в достаточно широком интервале концентраций субстрата, а коэффициент Хилла будет либо больше, либо меньше единицы. Первое неравенство в (8.377) может выполняться, когда $\alpha_1 = \beta_1 = 0$; в этом случае уравнение (8.369) при $\alpha_0 = 0$ упрощается до вида

$$v = \frac{\alpha_2 x^2}{\beta_0 + \beta_2 x^2}, \quad (8.379)$$

идентичного уравнению Хилла (8.212).

Фердинанд провел анализ общего кинетического уравнения (8.380) для неупорядоченного механизма в стационарных условиях:



Он отметил, что S-образные зависимости скорости реакции от концентрации субстрата будут наблюдаться в том случае, если скорости прямых реакций двух альтернативных путей образования тройного комплекса (через EA и через EB) существенно различаются. При этих условиях один из путей образования комплекса EAB будет предпочтительным. Например, если $k_{+1}k_{+2} > k_{+3}k_{+4}$, то образование комплекса EAB через комплекс EA будет происходить быстрее, чем через EB. Если эти ограничения применить к общему кинетическому уравнению рассматриваемого механизма, то будут удовлетворены условия, приве-

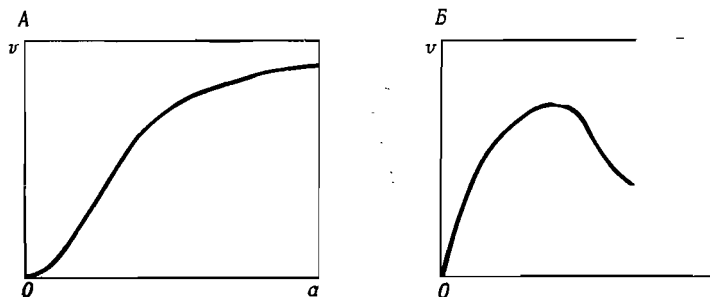


Рис. 8.47. Зависимость начальной скорости от концентрации субстратов A и B для реакции, описываемой уравнением (8.380), при условии $k_{+1}k_{+2} > k_{+3}k_{+4}$.

дящие к S-образной зависимости v от концентрации А. Рассмотрим качественно случай, когда ненасыщающая концентрация В является фиксированной и увеличивается a . При низких концентрациях субстрат А будет стремиться взаимодействовать с имеющимся в растворе комплексом ЕВ с образованием ЕАВ, несмотря на то что это более медленный путь реакции. Однако по мере роста концентрации А начинает преобладать более быстрый путь реакции (через ЕА), наклон кривой v — a будет возрастать, пока не начнет приближаться к $V_{\max}$ по мере насыщения фермента субстратом А. В результате будет наблюдаться S-образная зависимость (см. рис. 8.47, А).

Зависимость скорости реакции от концентрации В при изменении b и постоянной ненасыщающей концентрации А не будет S-образной. При низких концентрациях В реакция пойдет в основном по кинетически более выгодному пути, а по мере возрастания концентрации этого субстрата вклад более медленного пути реакции (через ЕВ) будет постепенно возрастать. Скорость реакции, увеличиваясь вначале до максимального значения, по мере насыщения фермента субстратом будет затем уменьшаться до некоего постоянного уровня. Кривая зависимости v от b для рассматриваемого случая представлена на рис. 8.47, Б. Зависимости такого типа наблюдали для реакции, катализируемой фосфо-2-кето-3-дезоксигептонат—альдолазой (КФ 4.1.2.15) из *Rhodocrobium vanniellii*; для субстратов — фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата — получены кривые зависимости скорости реакции от концентрации А и В типа, предсказанного выше [2232].

Для ферментов, функционирующих по неупорядоченному механизму в стационарных условиях, кривая зависимости скорости реакции от концентрации одного из субстратов при насыщающих концентрациях другого представляет собой простую равнобочную гиперболу. Это можно показать, преобразовав уравнение (4.82) к следующему виду:

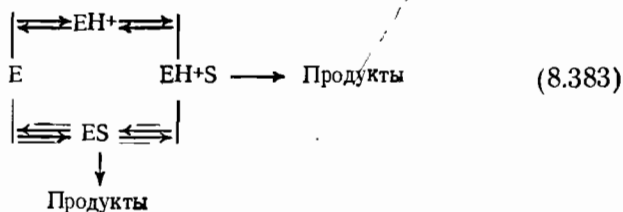
$$v = \frac{\frac{c_1}{ab} + \frac{c_2}{b} + \frac{c_3}{a}}{\frac{c_7}{a^2b^2} + \frac{c_8}{ab^2} + \frac{c_9}{a^2b} + \frac{c_{10}}{ab} + \frac{c_{11}}{b^2} + \frac{c_{12}}{a^2} + \frac{c_{13}}{b} + \frac{c_{14}}{a}}. \quad (8.381)$$

При очень высоких концентрациях, например, В это уравнение сводится к виду уравнения Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{\frac{c_3}{a}}{\frac{c_{12}}{a^2} + \frac{c_{14}}{a}} = \frac{\frac{c_3}{c_{14}}}{1 + \frac{c_{12}}{c_{14}} \frac{1}{a}}. \quad (8.382)$$

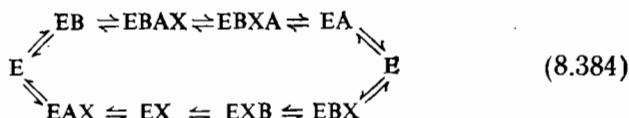
В общем случае, при наличии в системе модификатора, наблю-

дается интересная ситуация, если модификатором является ион водорода. В этом случае имеет место схема



и выполняется уравнение вида (8.367), описывающее зависимость скорости реакции от концентрации H^+ при ненасыщающих концентрациях S (или наоборот). Обычно предполагается, что связывание ионов водорода с ферментом протекает очень быстро и, следовательно, стадии протонирования являются равновесными. Если же это не так, то в случае фермента, функционирующего по схеме (8.383), может наблюдаться в некоторых условиях «негиперболическая» кинетика; отметим, что кривая зависимости скорости от концентрации субстрата будет представлять собой равнобочную гиперболу только при достаточно высоких или низких значениях pH , т. е. в условиях, когда функционирует только одна из двух возможных форм фермента.

Механизм, представленный на рис. 8.44, в стационарных условиях описывается уравнением, члены которого содержат концентрацию субстрата в квадрате, поскольку каждый из реагентов может связываться с двумя формами фермента: S может связываться с E и EM , а M — с E и ES . К подобным сложным уравнениям для скорости реакции в стационарных условиях могут приводить и другие механизмы. Ряд таких механизмов рассмотрен в работах [1672, 4603, 5149]. Это разветвленные схемы, в которых образование продукта может происходить более чем по одному пути; например, в случае трансферазной реакции



имеются два совершенно разных пути реакции. В стационарных условиях зависимость начальной скорости от концентрации каждого из субстратов описывается уравнением (8.369). Поскольку оба субстрата существенны для активности, α_0 в этом случае будет равно нулю. При насыщающих концентрациях одного из субстратов схема (8.384) превращается в схему с одним упорядоченным путем для другого субстрата и, следо-

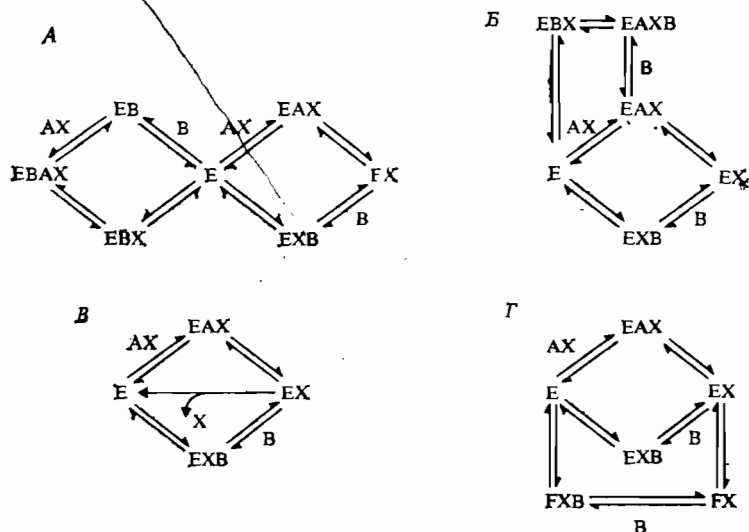


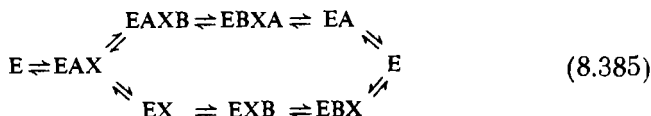
Рис. 8.48. Реакции двухстадийного переноса, которым соответствуют сложные кинетические уравнения, поскольку реакция $AX+B \rightleftharpoons A+BX$ может протекать по альтернативным путям [5059]. E и F — разные конформационные состояния фермента.

вательно, в этих условиях зависимость скорости от концентрации субстрата будет гиперболической.

Уэстли и Тейлор [5059] рассмотрели ряд кинетических схем для реакции двухстадийного переноса, которые характеризуются выпуклыми кривыми зависимости скорости от концентрации субстрата в двойных обратных координатах. Эти модели представлены на рис. 8.48 и предусматривают альтернативные пути, по которым реакция может протекать полностью или частично. На рис. 8.48, А представлен предполагаемый механизм функционирования глутатионтрансферазы (КФ 2.5.1.18) из печени крысы [3577]. Этот механизм предусматривает конкуренцию между двумя альтернативными путями для реакций обоих продуктов и приводит к уравнению вида (4.82). Представленная на рис. 8.48, Б схема включает альтернативные пути реакций для субстрата В, но не для субстрата АХ и, следовательно, приводит к уравнению второй степени относительно b и первой степени относительно ax . Реакция, катализируемая транслугтаминазой [791], описывается схемой типа 8.48, В, в которой второй субстрат (В) и вода конкурируют за модифицированную форму фермента. Из этой схемы следует, что если за ходом реакции следить по появлению продукта ВХ, то будет наблюдаться простая гиперболическая зависимость v от ax и v от b . Однако если регистрировать накопление продукта А, зависи-

мость v от b будет более сложной, так как образование продукта происходит в отсутствие В. Эта ситуация напоминает случай, когда искажение кинетических результатов связано с тем, что не введена поправка на «холостую» скорость (с. 653—654), что приводит к появлению выпуклых кривых зависимости скорости от концентрации субстрата в двойных обратных координатах. Предполагается, что кажущаяся отрицательная кооперативность по пирувату, наблюдаемая для пируваткарбоксилазы (см. с. 623), может быть связана с тем, что реакция протекает по механизму, представленному на рис. 8.48, В [1285]. Для функционирования тиосульфат-сульфидтрансферазы (КФ 2.8.1.1) из печени человека [2220] предложена кинетическая схема, предусматривающая изомеризацию фермента, связанного с фрагментом субстрата (рис. 8.48, Г). Эта схема приводит к уравнению первой степени относительно ax и второй степени относительно b .

Возможны также другие схемы, характеризующиеся уравнениями, в которых показатели степени при концентрации разных субстратов различаются. Например, в схеме



имеется только один путь связывания АХ, но два альтернативных пути связывания В; в этом случае уравнения, описывающие изменение начальной скорости при варьировании концентрации субстратов, имеют в стационарных условиях следующий вид:

$$v = \frac{\alpha_1 ax}{\beta_0 + \beta_1 ax} \quad (8.386)$$

и

$$v = \frac{\alpha_1' b + \alpha_2' b^2}{\beta_0' + \beta_1' b + \beta_2' b^2}. \quad (8.387)$$

Такой механизм будет приводить к гиперболической зависимости начальной скорости от концентрации АХ, однако при варьировании концентрации В можно ожидать отклонений от этой простой зависимости. В этом случае при насыщающих концентрациях АХ по-прежнему остаются два возможных пути связывания В и, следовательно, уравнение (8.387) остается применимым при этих условиях.

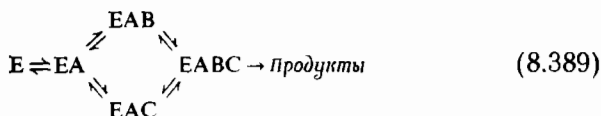
Уравнения второй степени — не самые сложные уравнения, которые могут быть получены при анализе разветвленных кинетических схем в стационарных условиях. Например, при функционировании трехсубстратного фермента по неупорядоченному

механизму имеются четыре формы фермента, с которыми каждый из субстратов может связываться на пути к образованию четырехкомпонентного комплекса (например, субстрат А может связываться с Е, ЕВ, ЕС и ЕВС на пути к ЕАВС). Таким образом, уравнение стационарной скорости реакции будет уравнением четвертой степени по концентрации каждого из субстратов. Общее уравнение, описывающее зависимость начальной скорости от концентрации одного из субстратов при фиксированных ненасыщающих концентрациях других, имеет следующий вид:

$$v = \frac{\alpha_1 x + \alpha_2 x^2 + \alpha_3 x^3 + \alpha_4 x^4}{\beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \beta_3 x^3 + \beta_4 x^4}. \quad (8.388)$$

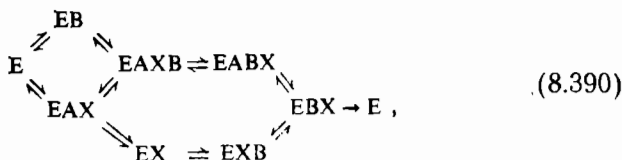
Если один из реагентов является несущественным модификатором, в числителе уравнения для этого реагента появляется член α_0 .

В этих сложных случаях могут получиться также уравнения, в которых показатели степени при концентрации разных субстратов различаются. Например, механизму



отвечают уравнения второй степени по b и c и первой степени по a . При этом механизме в условиях насыщающей концентрации А степень уравнений скорости реакции по концентрации любого из субстратов не изменится. Однако в условиях насыщающих концентраций либо В, либо С система станет практически упорядоченной и будет характеризоваться только уравнениями первой степени.

В механизме переноса, представленном схемой



имеются две формы фермента, с которыми может связываться АХ и, следовательно, в стационарном состоянии (по концентрации АХ) такой механизм будет характеризоваться уравнением второй степени по концентрации АХ:

$$v = \frac{\alpha_1 ax + \alpha_2 ax^2}{\beta_0 + \beta_1 ax + \beta_2 ax^2}. \quad (8.391)$$

Субстрат В может взаимодействовать с тремя формами фермен-

та (Е, ЕАХ и ЕХ), и, следовательно, скорость в стационарных условиях будет выражаться уравнением третьей степени по концентрации В:

$$v = \frac{\alpha_1'b + \alpha_2'b^2 + \alpha_3'b^3}{\beta_0' + \beta_1'b + \beta_2'b^2 + \beta_3'b^3}. \quad (8.392)$$

Рассмотрим предельные случаи этой кинетической схемы. При насыщающих концентрациях В получим упорядоченный механизм (ЕВ — промежуточный комплекс) и уравнение (8.391) упростится до уравнения первой степени (8.386). При насыщающих концентрациях АХ путь через комплекс ЕВ станет несущественным, В может связываться с двумя формами фермента (с ЕАХ или ЕХ). Следовательно, уравнение (8.392) при этих условиях упростится до уравнения второй степени (8.385).

Для ферментативной реакции общее уравнение n -й степени имеет следующий вид:

$$v = \frac{\alpha_0 + \alpha_1x + \alpha_2x^2 + \alpha_3x^3 + \dots + \alpha_nx^n}{\beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2 + \beta_3x^3 + \dots + \beta_nx^n}. \quad (8.393)$$

Таким уравнениям могут отвечать значительно более сложные кривые, чем уравнениям второй степени; они детально проанализированы в работах [284, 774]. Если выполняется уравнение третьей степени (8.392), могут наблюдаться все типы кривых изменения скорости от концентрации субстрата, описываемые уравнением второй степени, и, кроме того, возможно появление

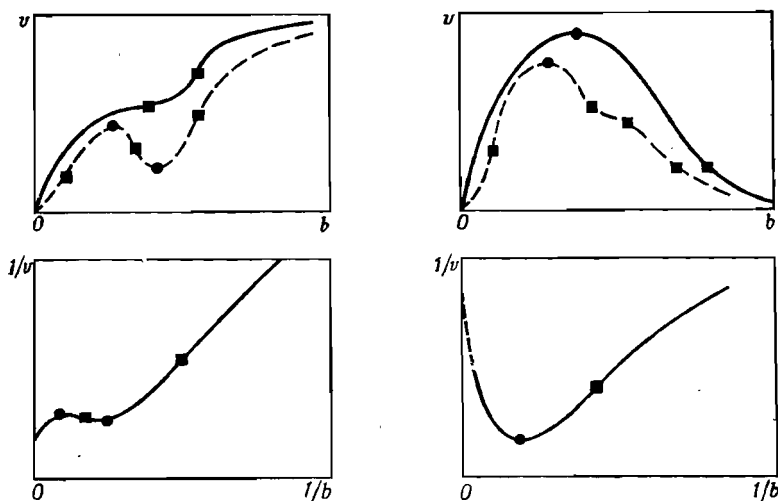


Рис. 8.49. Возможные типы кривых для механизмов, описываемых уравнением третьей степени (8.392) [285]. ● — точки максимумов и минимумов, ■ — точки перегиба.

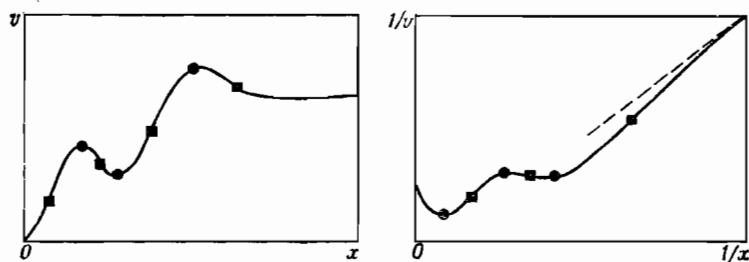


Рис. 8.50. Пример кривых более сложной формы, которые могут наблюдаться для механизмов, описывающихся уравнением четвертой степени (8.388) [285].
 ● — точки максимумов и минимумов, ■ — точки перегиба.

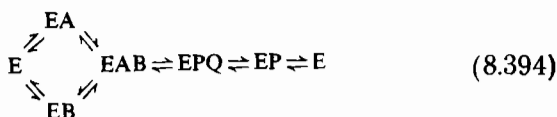
кривых, представленных на рис. 8.49. Кривые, описывающиеся уравнением третьей степени, могут иметь максимум шесть точек перегиба, а также не более одного максимума и одного минимума. Уравнение четвертой степени (8.388) описывает все возможные кривые, отвечающие уравнениям третьей степени, и, кроме того, кривые более сложной формы, имеющие два максимума и один минимум. Одна из таких сложных кривых показана на рис. 8.50.

Как и в случае уравнений второй степени, показатель степени при концентрации реагента в знаменателе может быть более высоким, чем в числителе, если один из реагентов является ингибитором. Однако и при каких обстоятельствах показатель степени при концентрации реагента в знаменателе не может быть меньше соответствующего показателя степени в числителе. Если один из реагентов является несущественным модификатором, константа a_0 в уравнении (8.393) будет иметь некоторое конечное значение и зависимость v от x не будет проходить через начало координат. Так как возможное число точек перегиба, максимумов и минимумов на кривой увеличивается с ростом степени уравнения, можно исключить из рассмотрения уравнения низких степеней и, следовательно, установить минимальную степень уравнения, определяя число точек перегиба и экстремумов на кривой зависимости v от x (см. [286]). Бардслей [284] подробно рассмотрел возможность оценки минимальной степени уравнения с помощью различных графиков. Поскольку уравнениям высоких степеней могут отвечать гиперболические кривые зависимости v от x , а также все кривые, возможные в случае уравнения второй степени, то аналитические методы позволяют оценить только минимальную степень уравнения, которое описывает наблюдаемую кривую.

Такие рассуждения не представляли бы практического интереса, если бы не было известно, что функционирование некото-

рых ферментов действительно описывается такими сложными уравнениями. Например, уравнение скорости реакции, катализируемой пероксидазой, является уравнением по крайней мере четвертой степени по концентрации перекиси водорода и третьей степени по концентрации субстрата — донора водорода. Эти результаты можно объяснить в рамках механизма с неупорядоченным связыванием субстратов и альтернативными путями образования продукта [4255].

Для ферментативных реакций, которые могут быть исследованы в обоих направлениях, степени уравнения скоростей для прямой и обратной реакций иногда различаются. Например, для фермента, функционирующего по механизму

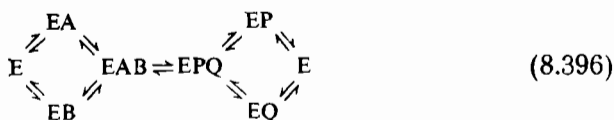


в стационарных условиях, зависимость скорости прямой реакции от концентрации субстратов А или В будет описываться уравнением второй степени, а зависимость скорости обратной реакции от концентрации Р или Q — уравнением первой степени. В этом случае ингибирование прямой реакции продуктами Р и Q описывается простым уравнением, в котором показатель степени при концентрации ингибитора равен единице. Ингибирование обратной реакции продуктами А и В описывается более сложным уравнением второй степени — (8.371). При насыщающих концентрациях Q по-прежнему будет наблюдаться ингибирование обратной реакции продуктами А или В, поскольку они связываются с формами фермента, отличными от тех, с которыми связывается Q. Ингибирование будет описываться уравнением второй степени, поскольку оба ингибитора могут присоединяться к двум разным формам фермента. При насыщающих концентрациях Р ни А, ни В не должны ингибировать обратную реакцию; хотя оба этих продукта (обратной реакции) конкурируют за ту же форму фермента (Е), что и Р, они, однако, по-прежнему могут связываться с ферментом с образованием комплексов ЕА и ЕВ соответственно. Поскольку имеются альтернативные пути образования продуктов обратной реакции, рассматриваемое связывание не приводит к простому ингибированию; следовательно, при насыщающих концентрациях Р продукты обратной реакции будут действовать как модификаторы, а не ингибиторы фермента. Уравнение скорости реакции в этом случае является уравнением первой степени и имеет вид

$$v = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 a}{\beta_0 + \beta_1 a}, \quad (8.395)$$

так как в рассматриваемых условиях имеется один центр связывания для каждого из этих реагентов.

Рассмотрим более симметричную кинетическую схему:



При стационарных условиях кинетические уравнения скорости прямой и обратной реакции будут представлять собой уравнения второй степени по концентрации всех субстратов; аналогичными уравнениями будет описываться и ингибирование продуктами прямой и обратной реакций. Например, ингибирование прямой реакции продуктами Р и Q при ненасыщающих концентрациях одного из субстратов будет описываться уравнением второй степени, а при насыщающих — уравнением первой степени (8.395).

С помощью аналогичных рассуждений можно установить и то, какого типа уравнения описывают влияние продуктов на скорость реакции других разветвленных кинетических схем. Например, механизм, представленный схемой (8.390), показывает, что продукт ВХ может связываться только с одной формой фермента. Следовательно, ингибирование этим продуктом прямой реакции описывается уравнением первой степени по концентраций ВХ при ненасыщающих концентрациях как АХ, так и В. При ненасыщающих концентрациях субстратов не должно наблюдаться ингибирование продуктом, так как все эти реагенты конкурируют за свободный фермент. С другой стороны, продукт А (как субстрат обратной реакции) может связываться с двумя формами фермента (ЕВХ и ЕХ) и, следовательно, можно ожидать, что ингибирование этим продуктом будет описываться уравнением второй степени. Степень уравнения не изменится при насыщении фермента субстратом АХ, однако насыщение фермента субстратом В будет препятствовать связыванию А с ЕХ, но не с ЕВХ и, таким образом, ингибирование прямой реакции А при этих условиях будет описываться простым уравнением первой степени:

$$v = \frac{\alpha_0}{\beta_0 + \beta_1 a}. \quad (8.397)$$

Рассуждая таким же образом, можно показать, что ингибирование обратной реакции продуктом АХ при ненасыщающих концентрациях ВХ описывается уравнением второй степени, так как АХ взаимодействует с двумя формами фермента (Е и ЕВ). При насыщающих концентрациях ВХ продукт АХ связывается только с формой ЕВ и его влияние как модификатора описывается

уравнением первой степени. Ингибирование обратной реакции продуктом В, который может взаимодействовать с тремя формами фермента, будет описываться уравнением третьей степени при ненасыщающих концентрациях субстратов и уравнением второй степени при насыщающих концентрациях А. Насыщение фермента субстратом обратной реакции ВХ будет препятствовать связыванию В со свободным ферментом и В будет действовать как модификатор, влияние которого описывается уравнением второй степени

$$v = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 b + \alpha_2 b^2}{\beta_0 + \beta_1 b + \beta_2 b^2} \quad (8.398)$$

в соответствии с его влиянием на вклад альтернативных путей в суммарную скорость реакции.

Такой подход к использованию данных по ингибированию продуктом несколько отличается от подхода, рассмотренного ранее для механизмов, приводящих к гиперболическим зависимостям. Однако ясно, что в случае механизмов, которым отвечают нелинейные зависимости скорости реакции от концентрации (в обратных координатах), попытка определить тип ингибирования продуктом была бы нецелесообразной. Рассмотренный выше подход при благоприятных условиях позволяет сделать выбор возможного механизма реакции; Уонг [5146] привел в виде таблицы данные об ожидаемом влиянии продуктов на степень соответствующих уравнений для ряда разветвленных кинетических схем.

При исследовании кинетического механизма действия алкогольдегидрогеназы из печени были изучены зависимости начальной скорости прямой и обратной реакций от концентрации реагентов и влияние на них насыщения фермента отдельными субстратами. На основании этих данных и результатов изучения влияния продуктов на скорость реакции Хейнс [1767], а также Уонг и др. [5148] пришли к заключению, что действие этого

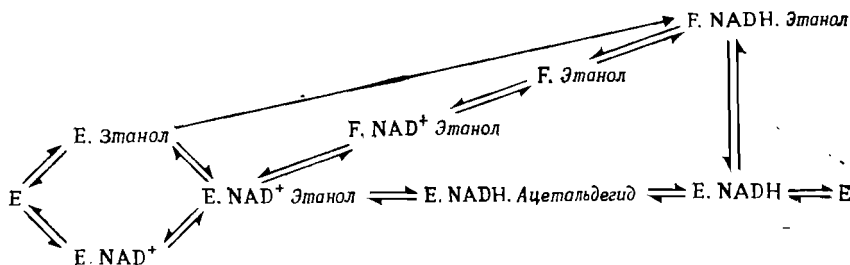


Рис. 8.51. Механизм реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой из печени, предложенный Хейнсом и др. [1767, 5148]. Е и F — разные конформационные состояния фермента.

фермента описывается механизмом, представленным схемой (8.394), в которой А и Р — это NAD^+ и NADH , а В и Q — этанол и ацетальдегид соответственно. Эти исследования показали также, что при очень высоких концентрациях этанола кинетическая схема становится еще более сложной из-за образования этанолом комплекса с двойным комплексом Е. NADH , как показано на рис. 8.51. Предполагается, что в этом непродуктивном комплексе конформация фермента (F) отличается от конформации фермента в комплексах основного пути реакции. Этот комплекс (F. NADH .Этанол) может образоваться также при взаимодействии NADH с двойным комплексом Е.Этанол. Диссоциация NADH из непродуктивного комплекса и последующее связывание NAD^+ приводят к образованию комплекса F. NAD^+ .Этанол, который может изомеризоваться в продуктивный тройной комплекс Е. NAD^+ .Этанол. Функционирование этого более медленного пути приводит к частичному ингибированию активности фермента при очень высоких концентрациях этанола. Аргументы, которые привели к построению такой сложной кинетической схемы, подробно обсуждаются в работах [1761, 5148]. Интересной особенностью подтвержденной экспериментально модели, представленной на рис. 8.51, является то, что степень уравнивания, описывающего ингибирование реакции с помощью NADH , изменяется необычным образом при варьировании концентрации этанола. При низких концентрациях этанола следует ожидать, что ингибирование реакции NADH будет описываться уравнением второй степени, поскольку NADH взаимодействует с Е и комплексом Е.Этанол. По мере увеличения концентрации этанола конкуренция между этанолом и NADH за Е должна привести к тому, что ингибирование будет описываться уравнением первой степени. Однако при очень высоких концентрациях этанола будет функционировать дополнительный путь связывания субстрата, что приведет к образованию комплекса F.Этанол. При этих условиях NADH будет связываться как с этим комплексом, так и с комплексом Е.Этанол, и ингибирование будет описываться уравнением второй степени. Таким образом, при увеличении концентрации этанола степень уравнивания, описывающего ингибирование реакции с помощью NADH , уменьшается от второй до первой и затем вновь увеличивается.

Ясно, что наличие разветвлений в кинетической схеме реакции может приводить к очень сложным кривым зависимости скорости реакции от концентрации субстрата или модификатора. В некоторых случаях, если не проведено прямых исследований по связыванию, такие эффекты могут быть ошибочно приняты за проявление кооперативности. Кроме того, вполне возможно, что для ферментов, которые осуществляют кооперативное связывание субстрата, могут наблюдаться более сложные кривые зависимости скорости от концентрации субстрата из-за дополни-

тельных эффектов, приводящих к увеличению степени уравнивания скорости реакции. В большинстве случаев кинетические аномалии наблюдаются или при очень высоких, или при очень низких концентрациях субстрата. Это не является неожиданным, поскольку в двухсубстратных системах второстепенные альтернативные пути реакции вполне могут остаться незамеченными при концентрациях субстрата, близких к K_m . Для выяснения полной кинетической схемы ферментативной реакции необходимо проводить исследования в очень широком интервале концентраций субстрата. Анализ результатов таких исследований часто оказывается весьма сложным, поскольку при низких концентрациях могут возникнуть затруднения при точном определении начальных скоростей реакции, а при высоких концентрациях может проявляться неспецифическое влияние на ферментативную активность ионной силы или диэлектрических свойств раствора.

Кинетические эффекты изомеризации

Как показано различными исследователями, кинетические механизмы для ферментов, которые находятся в двух или более формах, могут приводить к сложным уравнениям скорости в стационарных условиях. Например, односубстратный механизм



согласно которому фермент может находиться в двух различных конформационных состояниях (E и F), приводит к уравнению стационарной скорости вида (8.367). В стационарных условиях скорость реакции для такого механизма описывается уравнением второй степени, однако как связывание субстрата ферментом, так и скорость реакции в равновесных условиях описываются простым уравнением первой степени (Михаэлиса — Ментен). Такая модель впервые была рассмотрена Блюмом [468] для объяснения кинетических аномалий, наблюдающихся при взаимодействии миокина с АТФ. Вебер [5013] представил эту модель в виде схемы (8.399). Если нет прямого взаимопревращения фермент-субстратных комплексов ($\text{ES} \rightleftharpoons \text{FS}$), схема (8.399) приводит к простому уравнению скорости — уравнению первой степени.

Имеется ряд моделей, которые предусматривают медленную изомеризацию фермент-субстратных комплексов. Простейшая из

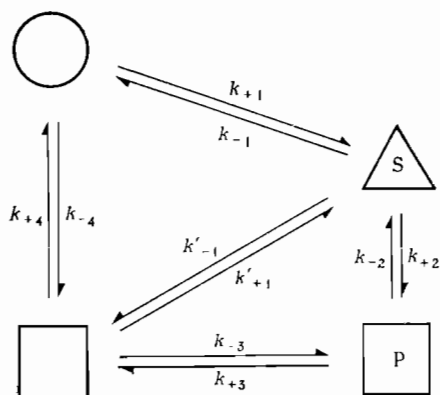
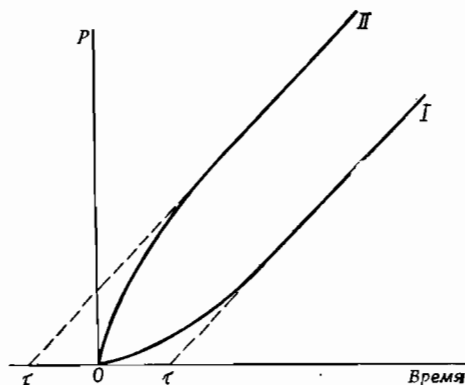


Рис. 8.52. Мнемоническая модель, предложенная Рикардом и др. [3909].

жет возвращаться только в одну из исходных конформаций свободного фермента. Такая схема приводит к уравнению стационарной скорости вида (8.367). Рассматривая полное уравнение скорости, а также проводя моделирование с помощью ЭВМ, можно показать, что для этого механизма форма графиков двойных обратных величин будет зависеть от констант скорости связывания субстрата с двумя исходными конформациями фермента (k_{+1} и k'_{+1}) и от константы скорости (k_{+4}) превращения одной формы свободного фермента (которая образуется после отщепления продукта) в другую, находящуюся с ней в равновесии. Если связывание субстрата формой фермента, которая образуется при диссоциации продукта, протекает быстрее, чем связывание с другой формой свободного фермента ($k'_{+1} > k_{+1}$), то анализ полного уравнения скорости реакции (при использовании подходов, описанных на с. 629—632) показывает, что эта модель приводит к S-образным зависимостям скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и вогнутым кривым в двойных обратных координатах. В том случае, когда форма фермента, образующаяся при диссоциации продукта, связывает субстрат медленнее ($k'_{+1} < k_{+1}$), кинетика действия фермента напоминает поведение систем с отрицательной кооперативностью и графики двойных обратных величин будут представлять собой выпуклые кривые. Если скорость превращения одной конформации свободного фермента в другую (характеризующаяся константой k_{+4}) велика, то рассмотренные эффекты, очевидно, будут незначительными. Эта модель была обобщена на случай двухсубстратных ферментативных реакций. Получены данные, показывающие, что кинетика действия гексокиназы (КФ 2.7.1.1) из семян пшеницы может быть описана этой моделью [3141].

В случае ферментов, активность которых изменяется в результате относительно медленных переходов между различными

Рис. 8.53. Кинетические кривые образования продукта ферментативной реакции с лаг-периодом (кривая I) или «начальным всплеском» (кривая II). τ — значение, полученное экстраполяцией линейных участков кривых.



их формами, на начальных стадиях образования продукта может иметь место ускорение или замедление, как показано на рис. 8.53. В гл. 4 мы говорили о том, что на предстационарных стадиях реакций может наблюдаться либо лаг-период, либо начальный всплеск. Обычно эти стадии столь кратковременны, что их можно исследовать только с помощью методов регистрации быстрых реакций. Однако, если конформационные переходы, изменяющие активность фермента, происходят достаточно медленно, эти эффекты наблюдаются на протяжении значительно более длительного периода времени.

При указанном выше условии простой механизм, представленный схемой (8.399), может приводить к появлению на кинетической кривой образования продукта как начального всплеска, так и лаг-периода. Фриден [1422] рассмотрел такой кинетический механизм (см. рис. 8.54) при следующих допущениях: а) стадии связывания субстрата являются быстрыми и при протекании реакции равновесие на этих стадиях сохраняется; б) концентрация субстрата остается постоянной на протяжении времени регистрации; в) реакция является обратимой и г) ингибирование продуктами реакции отсутствует. При этих допущениях

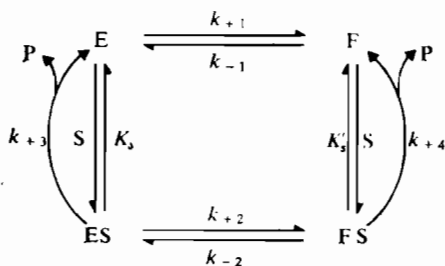


Рис. 8.54. Простая система, рассмотренная Фриденом [1422], в которой может наблюдаться гистерезис.

ниях скорость образования продукта равна

$$\frac{dp}{dt} = v_{\infty} + (v_{\infty} - v_0) e^{-\bar{k}t}, \quad (8.401)$$

где v_0 — начальная скорость, v_{∞} — конечная стационарная скорость. В этом уравнении кажущаяся константа скорости $\bar{k}$ определяется через константы, фигурирующие в схеме рис. 8.54, следующим образом:

$$\bar{k} = \frac{k_{+2}s + k_{+1}K_s}{K_s + s} + \frac{k_{-2}s + k_{-1}K'_s}{K'_s + s}. \quad (8.402)$$

После интегрирования уравнения (8.401) получаем выражение для концентрации продукта (p) в любой данный момент времени

$$p = v_{\infty}t - (v_{\infty} - v_0)(1 - e^{-\bar{k}t})/\bar{k}. \quad (8.403)$$

При $v_{\infty} > v_0$ на кинетической кривой образования продукта наблюдается лаг-период (рис. 8.53, кривая I), а при $v_{\infty} < v_0$ — начальный всплеск (кривая II). Обозначим через τ длину отрезка, отсекаемого при экстраполяции линейного участка кинетической кривой до пересечения с осью времени (см. рис. 8.53). Эта величина будет связана с кажущейся константой скорости следующим соотношением:

$$\tau = \left(\frac{v_{\infty} - v_0}{v_{\infty}} \right) \frac{1}{\bar{k}}. \quad (8.404)$$

Фриден [1422] предложил называть ферменты, при функционировании которых наблюдаются такие медленные изменения скорости реакции, *гистерезисными ферментами* и высказал предположение, что эти эффекты могут иметь важное значение для регуляции метаболических путей, в которых несколько ферментов конкурируют за один и тот же промежуточный продукт. Гистерезисные эффекты типа предсказываемого уравнением (8.403) наблюдаются при функционировании фосфорилазы из мышц лягушки [1422].

К гистерезисным эффектам могут приводить также многие более сложные реакционные механизмы, включающие стадии медленной трансформации [48, 1424, 4361]. В ряде случаев такие эффекты обусловлены медленной ассоциацией или диссоциацией фермента. Например, в случае α -N-ацетилгалактозаминадазы (КФ 3.2.1.49) на кинетической кривой образования продукта наблюдается лаг-период, если реакция начинается в результате добавления субстрата к раствору фермента; предполагается, что лаг-период связан с вызываемой присоединением субстрата медленной ассоциацией менее активных субъединиц в более активную олигомерную форму фермента [4977]. Ряд при-

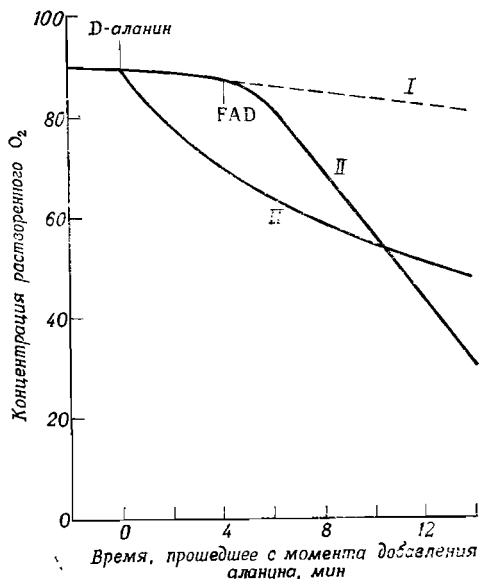


Рис. 8.55. Кинетические кривые реакции, катализируемой оксидазой D-аминокислот (КФ 1.4.3.3), после разбавления исходного раствора холофермента [1117]. Изменение концентрации O_2 регистрировали с помощью кислородного электрода в 4 мл пирогосфатного буфера (рН 8,5) при температуре 25 °С. 0,025 мл (12,5 мкг) раствора фермента, $5,7 \times 10^{-2}$ мкмоль FAD или 20 мкмоль D-аланина были добавлены, как указано в тексте.

меров таких аллостерических систем приведен в виде таблицы в работе Курганова и др. [2661]¹. Если лаг-периоды или всплески на кинетических кривых обусловлены медленной ассоциацией или диссоциацией фермента, то продолжительность периода, предшествующего установлению стационарной скорости, будет зависеть от концентрации фермента и, кроме того, от способа определения активности фермента [2662]. Если, например, фермент обладает большей активностью в ассоциированной форме и эта форма преобладает в исходном растворе фермента, то при запуске реакции путем добавления фермента к раствору субстрата можно ожидать появления всплесков на кинетической кривой. Разбавление фермента в реакционной смеси вызывает его диссоциацию и поэтому скорость ферментативной реакции будет уменьшаться, пока не будет достигнуто новое положение равновесия в реакции диссоциации олигомерного фермента. С другой стороны, если реакция запускается добавлением субстрата к уже разбавленному раствору фермента и субстрат способствует ассоциации, то на кинетической кривой будет наблюдаться лаг-период, поскольку концентрация олигомерной формы фермента будет увеличиваться до нового равновесного значения.

Такой эффект был четко показан для оксидазы D-аминокислот (КФ 1.4.3.3) в работе М. Диксона и Клеппе [1117]. Этот

¹ См. также Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. — М.: Наука, 1978. гл. IV. — *Прим. перев.*

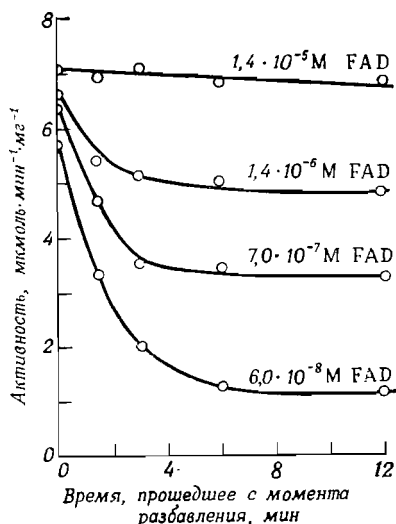


Рис. 8.56. Кинетические кривые инактивации холофермента после разбавления в присутствии различных концентраций FAD [1117].

фермент является флавопротеидом и может быть обозначен как EF, где F — это FAD, E — апофермент. Окисление D-аланина кислородом катализирует только EF, а E и F по отдельности не обладают активностью. Диссоциация EF на E и F при разбавлении является обратимой, сопровождается падением активности и завершается в течение нескольких минут. При добавлении достаточного количества F и E происходит образование EF и восстановление активности, однако этот процесс также требует некоторого времени. На рис. 8.55 представлены три кривые уменьшения концентрации O_2 в ходе ферментативной реакции. Изменение концентрации O_2 регистрировалось с помощью кислородного электрода. Кривая I получена при следующих условиях: 0,025 мл исходного раствора EF добавляли к 4 мл буферного раствора и перед добавлением субстрата (аланина) инкубировали в течение 12 мин для того, чтобы процесс диссоциации фермента достиг равновесия. Кривая III получена в тех же условиях, что и кривая I, за исключением того, что EF и аланин добавляли одновременно в момент времени, указанный на рисунке стрелкой. Видно, что реакция вначале протекает быстро, однако затем скорость ее уменьшается по мере диссоциации EF. Кривая II получена в тех же условиях, что и кривая I, но в момент времени, указанный другой стрелкой, в реакционную смесь добавляли избыток F; наблюдается весьма быстрое (но не мгновенное) ускорение реакции по мере образования EF, которое продолжается до тех пор, пока скорость реакции не становится равной по величине начальной скорости на кривой III. На рис. 8.56 представлены кривые изменения активности

оксидазы D-аминокислот во времени после разбавления фермента в присутствии различных концентраций F. Кривые характеризуют равновесное превращение $EF \rightleftharpoons E + F$.

В рассмотренной ранее согласованной модели кооперативности [3217], как и в реакционной схеме (8.399), предполагается, что фермент может находиться в различных конформационных состояниях. В отличие от механизма (8.399) согласованная модель рассматривает ферменты, состоящие из нескольких субъединиц. Для ферментов, функционирующих в соответствии с этой моделью, могут наблюдаться гистерезисные эффекты, если аллостерический переход является относительно медленным. Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12) из дрожжей функционирует по приведенной на рис. 8.57 согласованной модели, в которой переход между R- и T-состояниями фермента является относительно медленным процессом ($\tau \approx 0,5$ с); данные в пользу такой модели получены методом температурного скачка и обсуждались на с. 619—620. Расчет отдельных констант скорости из данных по изучению кинетики релаксации показал, что в отсутствие NAD^+ фермент находится почти полностью в состоянии T ($L \approx 60$) [2470]. При насыщающих концентрациях NAD^+ кажущаяся константа равновесия перехода между состояниями R и T (L') зависит от относительного сродства NAD^+ к этим двум состояниям (которое характеризуется константами диссоциации K_R и K_T), от числа связывающих центров (в данном случае четыре центра) и от величины аллостерической константы L следующим образом:

$$L' = \left(\frac{K_R}{K_T} \right)^4 L. \quad (8.405)$$

Величина L' рассчитана с использованием значений этих констант, полученных при изучении кинетики релаксации [2470], и составляет $1,5 \cdot 10^{-4}$, т. е. полностью насыщенный фермент находится преимущественно в R-состоянии.

Поскольку NAD^+ может связываться с ферментом как в R-, так и в T-состоянии и переход между этими формами

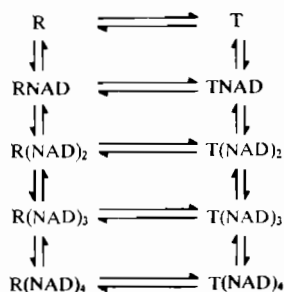


Рис. 8.57. Модель, предложенная Киршнером и др. [2469—2470] для объяснения кооперативных свойств глицеральдегидфосфатдегидрогеназы из дрожжей.

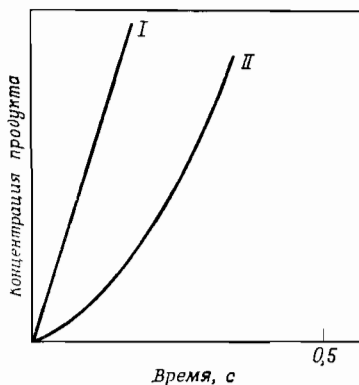


Рис. 8.58. Результаты, полученные методом остановленной струи, для глицеральдегидфосфатдегидрогеназы из дрожжей (по [2469]). Кривая I получена при быстром смешивании с раствором глицеральдегид-3-фосфата смеси фермента и NAD^+ . Кривая II — при быстром смешивании раствора фермента и смеси глицеральдегид-3-фосфата и NAD^+ .

является относительно медленным, преобладание Т-состояния в отсутствие NAD^+ означает, что добавленный NAD^+ будет связываться преимущественно с этим состоянием, а затем будет происходить переход в R-состояние. Киришер [2469], используя этот вывод, попытался выяснить, различаются ли два указанных состояния фермента по каталитической активности. Результаты эксперимента, полученные методом остановленной струи, представлены на рис. 8.58. Когда смесь фермента и избытка NAD^+ быстро смешивали с раствором глицеральдегид-3-фосфата, ферментативная реакция протекала без заметного лаг-периода (кривая I). В этих условиях при смешивании с глицеральдегид-3-фосфатом фермент находился практически полностью в форме $\text{R}(\text{NAD}^+)_4$. Однако, когда фермент быстро смешивали со смесью NAD^+ и глицеральдегид-3-фосфата (кривая II), кинетическая кривая накопления продукта имела четко выраженный лаг-период. Этот лаг-период обусловлен медленным конформационным переходом из Т- в R-состояние, происходящим после связывания NAD^+ . Показано, что продолжительность лаг-периода хорошо согласуется с величиной, рассчитанной по скорости перехода $\text{T} \rightarrow \text{R}$, которая была получена в результате релаксационных опытов. Эти исследования показывают также, что фермент в Т-состоянии имеет более низкое сродство к NAD^+ и не обладает каталитической активностью.

Наличие на кинетических кривых ферментативных реакций лаг-периодов или всплесков, длительность которых существенно превосходит величины, обычно связываемые с переходным периодом, по-видимому, типично для аллостерических ферментов. В работе Курганова и др. [2661] представлен детальный математический анализ влияния медленных конформационных изменений на форму кинетических кривых накопления продуктов для ферментов, описывающихся согласованной моделью кооперативности.

Наличие медленных конформационных переходов, которые влияют на активность фермента, может приводить к ситуации, при которой в результате взаимодействия лиганда с ферментом свойства последнего оказываются измененными в течение конечного промежутка времени после диссоциации этого лиганда (или образовавшегося из него продукта). Например, в случае механизма (8.400) связывание субстрата с ферментом приводит к образованию конформационной формы фермента, отличной от исходной; эта форма может сохраняться в течение некоторого периода времени после ухода продукта. Таким образом, фермент обладает «памятью» в том смысле, что в течение короткого промежутка времени на его свойства могут влиять предшествующие события. Вследствие низкой скорости конформационных изменений фермента может наблюдаться замедление изменения скорости катализируемой реакции, а следовательно, концентраций соответствующих метаболитов. Рассмотрим, например, простую реакцию связывания, которая индуцирует конформационное изменение



Если величины k_{+1} и k_{-1} относительно невелики, то система будет медленно реагировать на изменение концентрации A . Если скорость существенного конформационного перехода, происходящего при взаимодействии фермента с субстратом, мала, то очевидно, что активность фермента практически не будет изменяться при кратковременном изменении концентрации его субстратов, хотя при продолжительном изменении концентрации фермент, конечно, будет изменять свою конформацию. Такие эффекты могут играть важную роль при функционировании ферментов в клетке, однако оценить их значение на основании имеющихся в настоящее время данных довольно трудно.

АРТЕФАКТЫ

Наличие кинетических эффектов типа кооперативных, которые связаны с различными артефактами или с недооценкой сложности системы, свойственно многим системам. В приведенный ниже общий перечень типичных случаев включены также некоторые примеры из числа рассмотренных ранее.

Ферментативные реакции с участием двух молекул одного субстрата

Этот случай был рассмотрен в гл. 4. Отмечалось, что ферментативные реакции с участием двух молекул одного субстрата (A), протекающие по различным механизмам, приводят к сле-

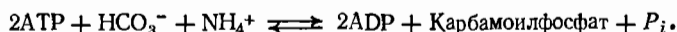
дующему уравнению для начальной скорости реакции:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^A}{a} + \frac{K_{M'}^A}{a} + \frac{K_s^A K_{M'}^A}{a^2}} \quad (8.407)$$

т. е. зависимость скорости реакции от концентрации субстрата может быть S-образной. Только в том случае, когда стадии связывания двух молекул субстрата разделены необратимой стадией, реакция между двумя молекулами одного субстрата бывает лишена каких-либо кинетических аномалий; примером может служить механизм двухстадийного переноса в условиях применимости уравнения (4.180). Если фермент функционирует по механизму с неупорядоченным присоединением субстратов в стационарных условиях, то уравнение скорости является чрезвычайно сложным; можно, однако, показать, введя коэффициенты в уравнение (4.82) и преобразовав его, что это уравнение третьей степени следующего вида:

$$v = \frac{\alpha_2 a^2 + \alpha_3 a^3}{\beta_0 + \beta_1 a + \beta_2 a^2 + \beta_3 a^3} \quad (8.408)$$

Поэтому, прежде чем делать вывод о том, что аномалии кинетических кривых обусловлены кооперативными свойствами фермента, важно проверить стехиометрию ферментативной реакции. Например, для реакции, катализируемой карбамоилфосфат-синтетазой (КФ 6.3.4.16)¹ из почек, сначала предполагали, что S-образность зависимости начальной скорости от концентрации субстрата (АТР) обусловлена кооперативными свойствами фермента. Однако, как потом оказалось, эта реакция протекает с участием двух молекул АТР по уравнению со следующей стехиометрией:



Показано, что кинетический механизм, описывающий эту ферментативную реакцию, является упорядоченным, стадия связывания бикарбоната находится между двумя стадиями связывания АТР. Таким образом, при очень высоких концентрациях бикарбоната между двумя стадиями связывания АТР появляется практически необратимая стадия и зависимость скорости реакции от концентрации АТР становится гиперболической [1235].

¹ В Номенклатуре ферментов (Пер. с англ. — М.: ВИНТИ, 1979) этот фермент имеет кодовый номер 2.7.2.5. — *Прим. ред.*

Отсутствие поправок на «холостые скорости»

Предположим, что в отсутствие фермента регистрируется некоторая скорость (или кажущаяся скорость) реакции и она не вычитается из скорости, полученной в присутствии фермента. В таком случае результаты кинетических измерений могут быть ошибочно объяснены наличием отрицательной кооперативности. Если эта «холостая скорость» постоянна в используемом интервале концентраций субстрата, зависимость скорости от концентрации субстрата не будет проходить через начало координат. Тогда в двойных обратных координатах будут получаться выгнутые кривые, стремящиеся к величине $1/\text{холостая скорость}$, а не к бесконечности при увеличении обратной концентрации субстрата. Нелинейность зависимости в двойных обратных координатах становится очевидной, если ввести в уравнение скорости реакции холостую скорость w в отсутствие фермента. Уравнение начальной скорости будет иметь вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s}} + w. \quad (8.409)$$

После преобразований получаем

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{s} \left(\frac{1}{V} + \frac{1}{w} \right) + \frac{1}{w} \left(2 + \frac{s}{K_M} \right) + \frac{1}{V}. \quad (8.410)$$

Характерные кривые в двойных обратных координатах для этого случая приведены на рис. 8.59, А.

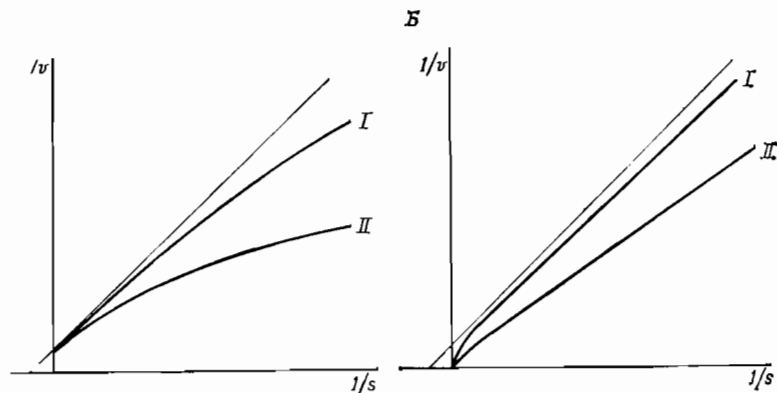


рис. 8.59. Влияние скорости неферментативной реакции на вид графика в двойных обратных координатах. А. Влияние постоянной «холостой скорости», величина которой составляет 2% от V (кривая I) и 10% от V (кривая II). Б. Влияние скорости неферментативной реакции, величина которой пропорциональна s . Кривые рассчитаны по уравнению (8.411) при $K_M = V = 1$ и $k' = 0,1$ (кривая I) или $0,5$ (кривая II).

В работе [1056] рассмотрена более сложная ситуация, когда скорость реакции в отсутствие фермента пропорциональна концентрации субстрата. Уравнение начальной скорости реакции в этом случае имеет вид

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M}{s}} + k's. \quad (8.411)$$

При $s \rightarrow \infty$ скорость реакции стремится к бесконечности и, таким образом, в двойных обратных координатах будут наблюдаться выпуклые кривые, проходящие через начало координат ($1/v=0$, когда $1/s=0$). Это можно показать, преобразовав уравнение (8.411) к виду

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V + k'K_M} \right) \frac{1}{s} + \frac{\left(\frac{V}{V + k'K_M} \right) \frac{1}{s}}{k' + (V + k'K_M) \frac{1}{s}}. \quad (8.412)$$

Характерные кривые в двойных обратных координатах для этого случая приведены на рис. 8.59, Б.

Примеси в растворе фермента

Выпуклые кривые в двойных обратных координатах могут наблюдаться и в том случае, когда фермент содержит примесь субстрата. Это приводит к систематическому занижению суммарной концентрации субстрата, находящегося в реакционной смеси. Обозначим концентрацию субстрата, добавленного в реакционную смесь, через s , а концентрацию субстрата, присутствующего в растворе фермента, — через s_e . Тогда суммарная концентрация субстрата s_t равна

$$s_t = s + s_e \quad (8.413)$$

и уравнение Михаэлиса—Ментен имеет следующий вид:

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_M}{s_t}}. \quad (8.414)$$

Так как раствор фермента содержит эндогенный субстрат, концентрация которого связана с концентрацией фермента соотношением

$$s_e = \omega e, \quad (8.415)$$

где ω — константа, уравнение (8.414) можно записать как

$$v = \frac{ke}{1 + \frac{K_M}{s + \omega e}} \quad (8.416)$$

и преобразовать к виду

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{ke} \left[1 + \frac{K_M}{s \left(1 + \frac{\omega e}{s} \right)} \right]. \quad (8.417)$$

При высоких значениях s это уравнение будет уравнением прямой, пересекающей ось $1/v$ в точке $1/V$. Однако при низких концентрациях субстрата график в двойных обратных координатах будет представлять собой выпуклую кривую, асимптотически приближающуюся с ростом $1/s$ к величине

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_M}{\omega e} \right). \quad (8.418)$$

Этой ситуации также соответствуют нелинейные зависимости начальной скорости реакции от концентрации фермента, если только концентрация добавленного субстрата не является очень высокой. Из уравнения (8.416) следует, что при насыщающих концентрациях субстрата зависимость скорости реакции от концентрации фермента будет представляться прямой с наклоном, равным k . При более низких значениях s , но при $s \gg \omega e$ линейная зависимость описывается уравнением $v = kes / (K_M + s)$. Однако, когда величиной ωe нельзя пренебречь, будет наблюдаться кривая, начальный наклон которой при очень низких концентрациях фермента равен $ks(K_M + s)$. При очень высоких значениях e эта кривая асимптотически приближается к прямой с наклоном, равным k . Такая кривая и график двойных обратных величин, соответствующий уравнению (8.417), приведены на рис. 8.60.

Еще один случай, который может приводить к ошибкам при оценке действительной концентрации субстрата, возможен при наличии в растворе фермента примеси, необратимо взаимодей-

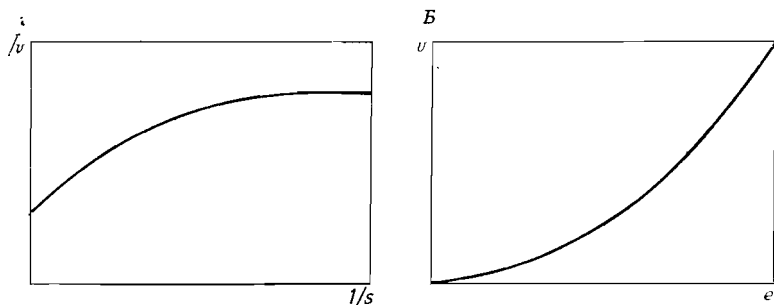


рис. 8.60. Влияние примеси субстрата в растворе фермента на вид графика в двойных обратных координатах (А) и зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента (Б).

ствующей с субстратом [5057]. В этом случае регистрируемая скорость реакции будет равна нулю до тех пор, пока мы не добавим достаточное количество субстрата, превышающее количество имеющегося необратимого ингибитора. Таким образом, получается кривая Михаэлиса, которая не проходит через начало координат, а приводит к нулевому значению скорости при конечном значении концентрации субстрата.

Прочное связывание субстрата

Нелинейные зависимости в двойных обратных координатах могут наблюдаться в случае некоторых субстратов или активаторов, обладающих высоким сродством к ферменту (см. с. 181—184); прочно связывающиеся ингибиторы также приводят к нелинейным зависимостям $1/v$ от концентрации ингибитора (см. с. 518—528). Отклонения от линейности наблюдаются при построении зависимости скорости от суммарной концентрации, а не от концентрации свободного вещества, поскольку в рассматриваемых условиях предположение о том, что количество субстрата в фермент-субстратном комплексе незначительно, является несправедливым. Такая ситуация возникает при исследованиях в области относительно высоких концентраций фермента, когда полная концентрация субстрата (s_t) может быть выражена через концентрацию свободного субстрата (s_f) и концентрацию фермент-субстратного комплекса (x)

$$s_t = s_f + x, \quad (8.419)$$

а полная концентрация фермента (e_t) — через e_f — концентрацию свободного фермента, и x ,

$$e_t = e_f + x. \quad (8.420)$$

Эти уравнения можно использовать для записи условия стационарности по концентрациям x , e_t и s_t в случае простого одно-субстратного механизма (4.5) и (4.6):

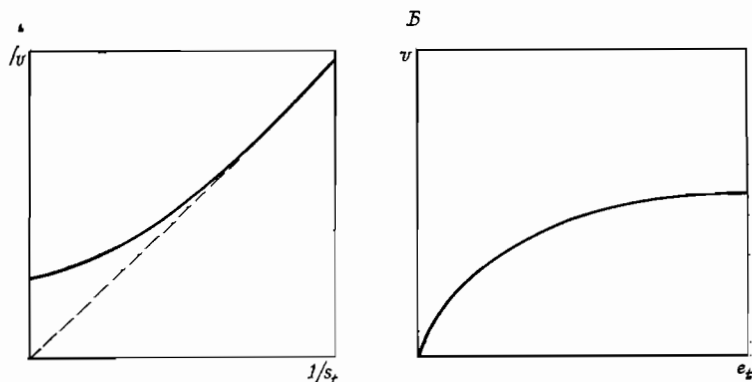
$$(s_t - x)(e_t - x) - K_M x = 0. \quad (8.421)$$

Решая это уравнение относительно x , получаем

$$x = \frac{1}{2} \left[(s_t + e_t + K_M) \pm \sqrt{(s_t + e_t + K_M)^2 - 4s_t e_t} \right], \quad (8.422)$$

и начальная скорость реакции будет равна kx .

Это уравнение приводит к нелинейным зависимостям в двойных обратных координатах, таким, например, как кривая, представленная на рис. 8.61, А. Эта кривая асимптотически приближается к прямой с наклоном $(K_M + e_t)/V$, которая при экстрапо-



8.61. Кинетические кривые при очень высоких концентрациях фермента.

яции проходит через начало координат. Из уравнения (8.422) следует также нелинейность зависимости начальной скорости реакции от концентрации фермента (рис. 8.61, Б).

Присутствие двух ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию

Этот вопрос рассмотрен в гл. 4 (см. с. 118—121). Кинетическое уравнение для смеси двух ферментов, имеющих разные K_m [уравнение (4.75)], представляет собой сумму уравнений двух равнобочных гипербол и приводит, таким образом, к выпуклым кривым на графиках двойных обратных величин (рис. 4.17). Уравнение (4.75) можно записать в такой же форме, что и уравнение (8.367), но в данном случае соотношение между отдельными константами показывает, что график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата должен иметь только один максимум и не иметь точки перегиба. Такая зависимость может быть ошибочно объяснена наличием отрицательной кооперативности, поэтому вначале необходимо проверить, не содержит ли исследуемый препарат двух ферментов. Иногда разграничение этих двух случаев облегчается, так как при некоторых специальных условиях более высокая степень полиномов в случае отрицательной кооперативности приводит к графикам двойных обратных величин, которые имеют четко выраженную точку излома между двумя линейными участками [963], в то время как для смеси двух ферментов эти графики имеют вид плавных кривых.

Установить, с чем именно связана кривизна графика, бывает довольно трудно, поскольку иногда она бывает обусловлена модификацией свойств части молекул данного фермента в ходе

очистки или экстракции, в результате чего образуется смесь форм фермента с разными свойствами. Такой случай уже обсуждался как одна из причин наличия реакционной способности только у половины связывающих центров. Присутствие двух форм фермента, действие каждой из которых описывается простой кинетикой Михаэлиса — Ментен, не может приводить к кривым насыщения, имеющим несколько точек перегиба. Однако при наличии смеси ферментов, один из которых проявляет положительную кооперативность, а действие другого описывается гиперболической кинетикой, могут наблюдаться кривые насыщения с промежуточным плато, как показано на рис. 8.36. Таким образом, кривые с промежуточным плато могут быть результатом такого изменения свойств фермента, обладающего положительной кооперативностью, при котором часть его молекул утрачивает свойство кооперативности.

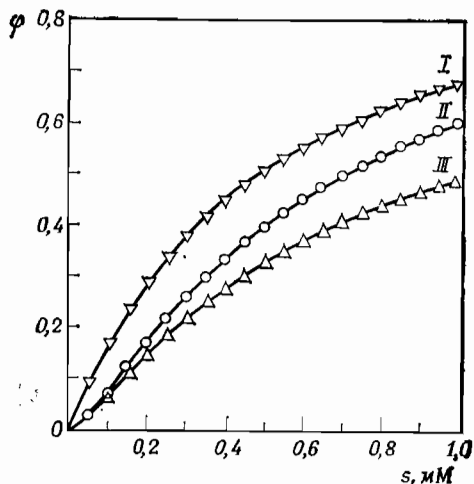
В некоторых случаях отрицательная кооперативность связана, вероятно, с асимметричным расположением идентичных субъединиц в олигомерном белке, при этом активные центры оказываются не в идентичном окружении и, строго говоря, это не артефакт [2914, 4208]. Такой случай можно приписать наличию в молекуле белка разных субъединиц.

Нестабильность фермента

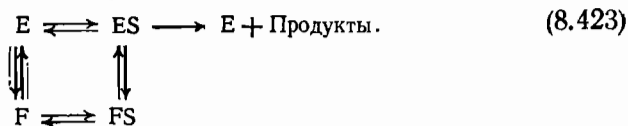
Иногда фермент, относительно нестабильный в реакционной смеси, становится более стабильным в присутствии высоких концентраций субстрата. Если не учитывать это обстоятельство и не предпринимать специальных мер, позволяющих определить истинную начальную скорость, то при низких концентрациях субстрата можно получить заниженные значения скорости, а график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата будет S-образным. Хардинг [1782] высказал предположение, что S-образную кинетику в случае треониндегидратазы (КФ 4.2.1.16) из *E. coli* можно объяснить именно нестабильностью фермента. При изучении кинетики действия этого фермента наблюдали S-образную зависимость, если скорость реакции определяли на основании измерения количества продукта, образовавшегося за данный промежуток времени. Однако при определении истинной начальной скорости реакции получали гиперболическую зависимость.

Труднее отличить от истинной кооперативности случай, когда инактивация фермента является равновесным процессом, который может быть обращен (или частично обращен) субстратом. Так, кинетические данные, характеризующие механизмы, включающие изомеризацию фермента рассмотренного ранее типа, можно было бы объяснить обратимой (полностью или частично)

Рис. 8.62. Зависимость относительной скорости реакции ($\varphi = v/V$) от полной концентрации субстрата для фермента, функционирующего по механизму (8.153—8.154), при равных концентрациях активатора и субстрата [3765]. Предполагается, что в случае I сродство субстрата к активатору достаточно велико и весь субстрат находится в составе комплекса AS; в случае II константа диссоциации комплекса AS [уравнение (8.155)] принята равной 10^{-4} M; в случае III константа диссоциации комплекса AS тоже принята равной 10^{-4} M, но, кроме того, свободный активатор является конкурентным ингибитором и K_i равно K_m для комплекса AS и составляет 0,5 mM.



денатурацией фермента. Например, представленная схемой (8.423) простая модель, рассматривающая две формы фермента (E и F), будет приводить к уравнению второй степени для скорости реакции в стационарных условиях.



Образование комплекса субстрат—активатор

Кинетика действия ферментов, истинным субстратом которых является комплекс активатор—субстрат, уже обсуждалась выше (см. с. 545—556). Было отмечено, что если рассматриваются зависимости начальной скорости реакции от полной концентрации субстрата или от полной концентрации активатора, а не от концентрации комплекса активатор—субстрат, то наблюдаются S-образные кривые. Так, механизмы, представленные схемами (8.153) и (8.154), приводят к кинетическому уравнению (8.160), из которого следует, что зависимость v от at или st не является гиперболической.

Однако такая зависимость будет наблюдаться, если концентрация одного из реагентов постоянна и настолько превышает константу диссоциации комплекса активатор—субстрат, что практически весь реагент, концентрация которого варьируется, находится в составе комплекса. Таким образом, при концентрации A, достаточно высокой для того, чтобы добавленный суб-

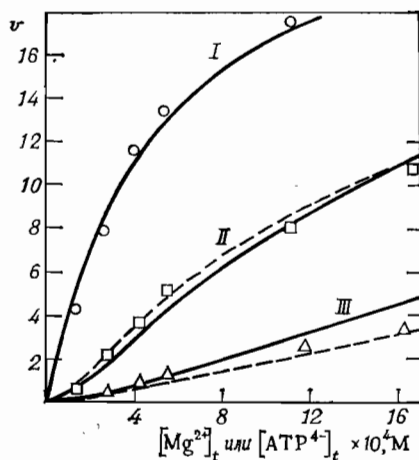


Рис. 8.63. Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой, от полной концентрации ATP^{4-} и Mg^{2+} [433]. Сплошные кривые — скорости в равновесных условиях, рассчитанные в предположении неупорядоченного связывания истинного субстрата (MgATP^{2-}) и активатора Mg^{2+} [уравнение (8.176)]. Пунктирные кривые — скорости для этой же системы в предположении, что свободный ATP^{4-} действует как неконкурентный ингибитор. Кривая I (левая ось ординат): $[\text{Mg}^{2+}]_t = [\text{ATP}^{4-}]_t + 1 \text{ мМ}$; кривая II (правая ось ординат): $[\text{Mg}^{2+}]_t = [\text{ATP}^{4-}]_t$; кривая III (правая ось ординат): $[\text{ATP}^{4-}]_t = [\text{Mg}^{2+}]_t + 0,4 \text{ мМ}$.

страт находился в составе комплекса AS, кинетические схемы (8.153) и (8.154) приводят к следующему простому уравнению:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_M^{\text{AS}}}{s_t}}. \quad (8.424)$$

Еще одна трудность при анализе систем, описывающихся кинетическим уравнением (8.160), может возникнуть в том случае, когда свободный субстрат (или активатор) способен связываться с ферментом как обратимый ингибитор. В результате может наблюдаться более сильное отклонение от простой гиперболы графика зависимости скорости от концентрации субстрата [3765]. Кривые такого типа представлены на рис. 8.62.

Еще более сложным является случай, рассмотренный на с. 554, когда фермент должен связывать как активатор, так и комплекс активатор—субстрат. Для таких систем наблюдаются S-образные зависимости начальной скорости от концентрации свободного активатора [уравнение (8.175)]; при использовании же рассчитанных концентраций комплекса активатор—субстрат, свободного активатора и свободного субстрата получается простая кинетика Михаэлиса. Как и в более простом случае, обсуждавшемся выше, осложнения могут возникать, если свободный субстрат действует как обратимый ингибитор фермента. Такой случай наблюдается при функционировании пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1), истинным субстратом которой является MgATP^{2-} , а свободный Mg^{2+} действует как активатор (рис. 8.63).

Глава 9

Кофакторы ферментов

Как уже отмечалось в гл. 1, для осуществления ферментативной реакции во многих случаях необходимо, помимо субстрата и фермента, еще одно вещество. Такого типа вещества — их называют кофакторами — функционируют на промежуточных стадиях ферментативной реакции (или цикла реакций, катализируемых системой ферментов), но не расходуются в ходе процесса и по завершении катализа оказываются в неизменном состоянии. Кофакторы, следовательно, можно рассматривать как важные компоненты механизма катализа.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Большинство кофакторов ферментов действуют по одному из следующих механизмов.

а. Выполняют функцию переносчиков между ферментами. Переносчик сначала взаимодействует с одним ферментом, при этом часть молекулы субстрата переходит на переносчик, далее «нагруженный» переносчик мигрирует к другому ферменту, передает переносимую часть субстрату этого фермента, а затем происходит диссоциация комплекса фермент — переносчик. Этот механизм, по-видимому, наиболее типичен для кофакторов. Следует отметить, что переносчик, функционируя как кофактор двухферментной системы, одновременно является вторым субстратом каждого из ферментов в отдельности.

б. Играют роль простетической группы (которая часто выступает как «внутриферментный» переносчик). Молекулы многих ферментов, помимо белковой части, содержат особую химическую группу (например, гем, флавин, атом металла и т. д.), являющуюся неотъемлемой частью фермента. Если молекула фермента содержит несколько идентичных субъединиц, то обычно отношение числа простетических групп к числу субъединиц равно 1 : 1; если же субъединицы различаются, то часто только один тип субъединиц имеет простетическую группу. Обычно простетическую группу можно рассматривать как часть каталитиче-

ского центра фермента. В некоторых случаях простетическая группа не очень прочно связана с ферментом и может быть удалена, при этом остается неактивный апофермент. Если апофермент оказывается неповрежденным, то активность фермента может быть восстановлена при присоединении простетической группы. В большинстве случаев простетическая группа присоединяет часть молекулы субстрата (донора) и затем переносит ее на второй субстрат (акцептор), который связан с той же молекулой фермента; таким образом, она играет роль межмолекулярного переносчика. Простетическую группу следует, однако, отличать от переносчика типа (а), поскольку она выполняет свою функцию, оставаясь связанной с одним и тем же ферментом, в то время как переносчик типа (а) действует как челнок между двумя различными ферментами.

в. Связываясь с молекулой фермента, изменяют ее конформацию. Иногда в отсутствие кофактора фермент находится в каталитически неактивном состоянии. Присоединение же кофактора к определенному участку фермента вне активного центра может так изменить форму молекулы, что активный центр переходит в каталитически активную конфигурацию. Соединение, вызывающее такие конформационные изменения, следует считать кофактором, хотя оно может не принимать участия в собственно каталитическом процессе.

г. Вызывают агрегацию субъединиц. Во многих случаях молекула фермента состоит из нескольких субъединиц, которые сами по себе неактивны, но активируются при объединении в олигомерную молекулу фермента. Отмечено, что агрегацию субъединиц, приводящую к образованию активного фермента, вызывают некоторые фосфорсодержащие соединения (особенно нуклеотиды) и некоторые ионы. Соответствующие примеры приведены в табл. 10.2.

Широко используемое выражение «конформационное изменение» подразумевает изменение как формы молекулы фермента, так и степени агрегации субъединиц. Кофактор, вызывающий изменение конформации фермента, может быть назван аллостерическим активатором. Кинетика действия таких активаторов [см. (в) и (г)], а также ионов металлов-активаторов рассматривается в гл. 8. Кофакторы, функционирующие по механизмам (а—г), встречаются наиболее часто. Однако к кофакторам относят также ряд других соединений, выполняющих одну из следующих функций.

д. Стабилизируют фермент. Некоторые ферменты по своей природе весьма нестабильны и столь быстро инактивируются, что иногда даже с трудом удается зафиксировать их активность. Такие ферменты нередко стабилизируются в присутствии определенных соединений. Следует подчеркнуть, что эти соединения не увеличивают активность, а стабилизируют ее, однако

они выступают как кофакторы. Механизмы их действия могут существенно различаться.

е. Играют роль матрицы. Для функционирования полимераз нуклеиновых кислот, которые синтезируют длинные полимерные цепи с определенной нуклеотидной последовательностью, необходима специальная молекула-матрица, в которой закодирована эта последовательность, — цепь нуклеиновой кислоты. Новая цепь строится шаг за шагом на этой ранее синтезированной цепи, которая, следовательно, является матрицей. Без нее фермент не может работать. Фермент движется вдоль матрицы, и тот ее участок, который контактирует с ферментом в каждый данный момент, может рассматриваться как часть активного центра, обеспечивающая специфичность к определенному нуклеотиду, который должен присоединяться в данном месте последовательности. Действие матриц детально рассматривается в гл. 11.

ж. Выступают в роли инициаторов. Функция полимеризующих ферментов заключается в удлинении цепей; однако обычно даже при наличии матрицы они не могут начать синтез новой цепи. Для этого в качестве инициатора требуется готовая короткая цепь, к концу которой полимеразы последовательно присоединяют новые единицы. Таким образом, можно сказать, что различие между инициатором и матрицей заключается в том, что новые единицы присоединяются к концу инициатора ковалентной связью, в то время как с матрицей осуществляется нековалентное взаимодействие. Следовательно, поскольку матрица в конце синтеза остается интактной, ее можно считать кофактором; инициатор же, образующий часть новой молекулы, правильнее считать субстратом.

з. Являются промежуточными соединениями. В некоторых случаях фермент может использовать в реакции молекулу кофактора, образуя из нее продукт, но при этом одновременно за счет субстрата образовать новую молекулу кофактора; например, в ходе рассматриваемой ниже фосфомутазной реакции субстрат превращается в кофактор, а ранее имевшийся кофактор переходит в продукт. Поскольку в конце реакции количество рассматриваемого вещества не изменяется, его вполне можно считать кофактором; однако, принимая во внимание, что *исходная молекула* переходит в продукт, столь же справедливо считать его субстратом.

В ряде случаев кофактор может выполнять одновременно две и более функции.

КОФАКТОРЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ КАК ПЕРЕНОСЧИКИ

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПЕРЕНОСЧИКИ

Очень важную группу кофакторов составляют вещества, восстанавливаемые одним и окисляемые другим соединением, иначе говоря, кофакторы, действующие как переносчики восстановительных эквивалентов от одной молекулы к другой:



где С — переносчик, E_1 и E_2 — ферменты. Восстановительными эквивалентами здесь являются атомы водорода, но в других системах в этой роли могут выступать электроны. Даже когда механизм переноса неизвестен, часто используют термины «переносчик» водорода или электронов. Чтобы не говорить о механизме катализа (см. с. 407—415), прибегают к термину «окислительно-восстановительные переносчики».

NAD и NADP

Эти два кофермента (никотинамидадениндинуклеотид и NAD-фосфат) очень сходны. О их существовании было известно задолго до того, как удалось установить их химическое строение и механизм действия.

Существование термостабильного кофермента, принимающего участие в процессе брожения («козимаза», которая теперь идентифицирована как NAD), было обнаружено Гарденом и Янгом [1780, 1781] еще в 1904 г., однако выделить этот кофермент тогда не удалось. В высокоочищенном виде данный кофермент был получен в 1936 г. Эйлером и др. [4924] и независимо от них Варбургом и Христианом [4986]. NADP был открыт Варбургом и Христианом [4984] в 1931 г. как кофермент глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (КФ 1.1.1.49). Доказательства того, что активной группой как в NAD, так и в NADP является никотинамид и что эта группа функционирует, подвергаясь попеременно восстановлению и окислению, были получены благодаря работам Варбурга и Христиана [4986, 4990]. NADP отличается от NAD только тем, что он содержит дополнительную фосфатную группу, которая легко отщепляется (например, под действием фосфатазы); положение этой фосфатной группы было установлено лишь в 1950 г. Корнбергом и Прайсером [2546].

Строение. Структурные формулы окисленных форм NAD и NADP приведены на рис. 9.1. Здесь представлена катионная форма с одним положительным зарядом у никотинамидной

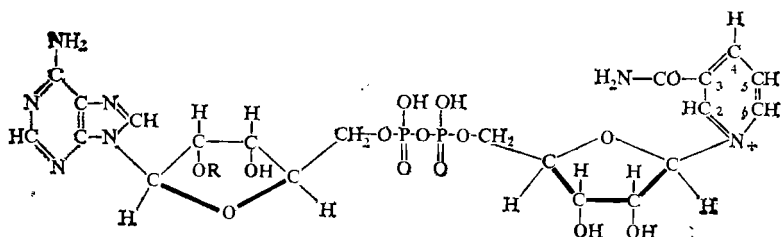


Рис. 9.1. Структура NAD и NADP (окисленные формы). R=—H (в NAD⁺) и —PO(OH)₂ (в NADP⁺).

группы. При pH 7,5 кислотные группы обоих фосфатных остатков NAD ионизированы, поэтому его суммарный заряд равен -1 и NAD можно рассматривать как биполярный ион, несущий еще и отрицательный заряд. В NADP ионизированы те же группы и, кроме того, еще две кислотные группы дополнительного фосфатного остатка, поэтому суммарный заряд иона оказывается равным -3 .

Остатки D-рибозы соединены с атомами азота аденина и никотинамида при помощи β -гликозидных связей. β -Рибозидные связи в аденозине и некоторых других природных нуклеозидах впервые обнаружили Тодд и др. [1005]; ими же было высказано предположение о том, что наличие таких связей в нуклеозидах является, возможно, общим правилом. При гидролизе обоих коферментов под действием нуклеотид-пирофосфатазы (КФ 3.6.1.9) образуется обычная адениловая кислота; следовательно, связь между аденином и сахаром в обоих коферментах имеет β -конфигурацию. Сведения о характере никотинамид-рибозидной связи получены при изучении неактивного изомера NAD, который был обнаружен в ранее выделенных препаратах кофермента [2333]; позднее было установлено, что этот изомер является артефактом, образующимся из природного NAD при 100° в процессе выделения [2184]. Было показано, что в данном изомере связь с никотинамидом имеет α -конфигурацию (поэтому он оказывается неактивным в опытах с дегидрогеназами), в то время как в природном активном изомере рассматриваемая связь имеет β -конфигурацию. Полный синтез NAD был осуществлен Хьюзом, Кеннером и Тоддом [2082]. Методы синтеза нуклеотидных коферментов рассмотрены в обзоре Бэддиля и Хьюза [224]. Поскольку NADPH можно превратить в NADH путем удаления одной фосфатной группы щелочной фосфатазой [3350], структуры коферментов (учитывая, конечно, добавочный фосфат у NADPH) идентичны.

Восстановление. Коферменты легко восстанавливаются химическими восстановителями, например гидросульфитом (отно-

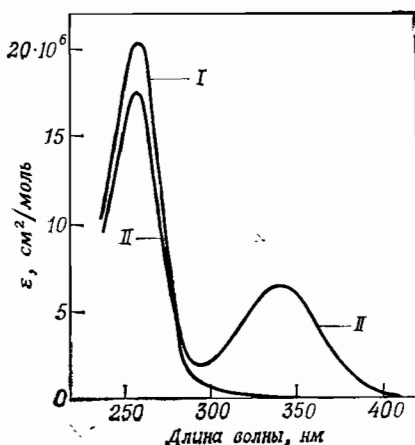


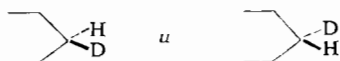
Рис. 9.2. Спектры поглощения окисленной (I) и восстановленной (II) форм NAD и NADP.

сительно медленно), а также ферментативным путем (значительно быстрее) — с участием тех дегидрогеназ, по отношению к которым они специфичны; в обоих случаях образуется одна и та же восстановленная форма. На восстановление каждой молекулы расходуется два эквивалента водорода. Варбург и Христиан установили, что восстановлению подвергается никотинамидное кольцо. При восстановлении коферментов изменяется спектр их поглощения в ультрафиолетовой области: окисленная форма имеет полосу поглощения только при 260 нм, что обусловлено наличием пуринового и пиридинового колец, а восстановленная форма — еще и полосу поглощения при 340 нм (рис. 9.2). Эта вторая полоса связана с наличием хиноидной структуры восстановленного никотинамидного кольца. Такая же полоса характерна и для простых производных никотинамида (например, нодметилата никотинамида) в восстановленном состоянии. Нуклеотиды, не содержащие никотинамида, в этой области не поглощают.

Дальнейшее доказательство того, что в дегидрогеназной реакции восстанавливается именно никотинамидное кольцо, Варбург и Христиан получили следующим образом. При восстановлении коферментов водородом в присутствии платинового катализатора поглощается не два, а шесть эквивалентов водорода и пиридиновое кольцо восстанавливается до пиперидинового, причем в результате образуется продукт, не способный принимать участие в ферментативной реакции и не поглощающий при 340 нм. Если кофермент вначале восстанавливается дегидрогеназой (с поглощением двух эквивалентов водорода), а затем водородом в присутствии Pt, то в последней реакции поглощается не шесть, а четыре эквивалента водорода. Это свидетельствует о том, что два эквивалента водорода, присоединившихся

при действии фермента, включаются в те же положения, что и два атома из шести атомов водорода, присоединяющихся при восстановлении окисленной формы водородом в присутствии Pt. Если бы они присоединились к любой другой части молекулы, то во второй стадии восстановления потребовалось бы еще шесть эквивалентов водорода. Естественно допустить, что при ферментативной реакции гидрируется одна двойная связь; это должно приводить к образованию структуры с распределением связей, похожим на распределение связей в *o*-хиноне, и обуславливать появление полосы поглощения при 340 нм. Одно время полагали (по аналогии с химическими свойствами других пиридиновых соединений), что восстанавливается двойная связь, находящаяся около атома азота, в результате присоединения атома водорода к атому углерода 2 или 6. Однако в 1954 г. опыты с применением дейтериевой метки показали, что это предположение неправильно. В гл. 7 мы ссылались на работу Венесланда и др., в которой показано, что при ферментативном восстановлении NAD^+ дейтерированными субстратами атом дейтерия включается всегда в одно определенное положение никотинамидного кольца. Химическими методами удалось определить положение этого атома дейтерия и таким образом установить строение восстановленной формы кофермента.

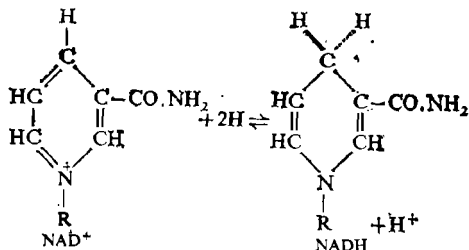
В результате весьма остроумных экспериментов Пулмен и др. [3763] показали, что дейтерий, переносимый на кофермент при восстановлении дегидрогеназой, не включается в положение 2 или 6 пиридинового кольца. Его истинное положение было установлено Левусом, Венесландом и Харрисом [2853]. Чисто химическим путем они синтезировали три никотинамида, каждый из которых содержал атом дейтерия, связанный с атомом углерода в положении соответственно 2, 4 или 6. Каждый из трех меченых никотинамидов был включен в молекулу NAD^+ путем ферментативного замещения с использованием NAD(P)^+ -нуклеозидазы (КФ 3.2.2.6); таким способом были получены препараты окисленного кофермента, меченного в трех различных положениях. Эти препараты были затем подвергнуты восстановлению гидросульфитом в H_2O . Поскольку атом углерода, по которому происходит восстановление, несет по одному атому водорода и дейтерия и является, следовательно, изотопно асимметричным, то образуется смесь двух стереоизомеров



(принимая во внимание, что восстановление гидросульфитом не является в заметной степени стереохимически специфичным), в одном из которых дейтерий находится перед плоскостью кольца, а в другом — позади нее. Стороны кольца не являются эк-

вивалентными, поскольку в 3-м положении находится амидная группа.

После окисления каждого из этих трех препаратов NADH пировиноградной кислотой в присутствии лактатдегидрогеназы выделили образовавшийся лактат и определили в нем содержание дейтерия. Оказалось, что из положений 2 и 6 дейтерий совсем не переносится, а из положения 4 он переносится в количестве, близком к теоретическому. Это убедительно доказывает, что в дегидрогеназных реакциях положения 2 и 6 не затрагиваются и что восстановление происходит исключительно в положениях 1 и 4. Восстановление может быть представлено, как показано ниже, где 2 Н обозначают два восстановительных эквивалента (часто это два атома водорода молекулы субстрата дегидрогеназы).



Адекватность этой структуры была подтверждена также в результате спектроскопических исследований в инфракрасной области и методом ЯМР путем сравнительного изучения 2-, 4- и 6-дейтерированных никотинамидов [584, 2101].

Дальнейшее подтверждение переноса водорода в положение 4 было получено с помощью рентгеноструктурного анализа при установлении трехмерной структуры комплекса дегидрогеназы и субстрата [37]. Было найдено, что реагенты располагаются в активном центре фермента таким образом, что атом водорода субстрата, который переносится на NAD, направлен к 4-му углеродному атому пиридинового кольца и находится в непосредственной близости от него.

Восстановление кольца по связи 1,4 характерно не только для ферментативных реакций. Выше было отмечено, что такого же типа восстановление осуществляется гидросульфитом. Этот тип восстановления не является, однако, характерным для пиридиновых соединений — он связан с наличием СО-группы в боковой цепи.

При переходе кофермента из окисленной формы в восстановленную происходит присоединение одного атома водорода и потеря одного положительного заряда. В связи с этим окисленную форму сокращенно обозначают NAD^+ , а восстановленную —

NADH; в действительности, однако, в нейтральной среде обе формы заряжены отрицательно и переход следует записать как $\text{NAD}^- \rightarrow \text{NADH}^{2-}$ или $\text{NADP}^{2-} \rightarrow \text{NADPH}^{3-}$, поскольку фосфатные группы несут отрицательные заряды. Обычно, однако, зарядом фосфатных групп пренебрегают и учитывают только заряд никотинамидной части. Если, говоря о коферменте, не уточняют, о какой форме его идет речь — окисленной или восстановленной, то используют обозначение NAD.

Теми названиями, которые были предложены еще в то время, когда структура соответствующих форм не была полностью установлена — дифосфопиридиннуклеотид (DPN) для NAD, трифосфопиридиннуклеотид (TPN) для NADP и дигидро-DPN или дигидро-TPN для восстановленных форм — в настоящее время не пользуются. Обозначение же NAD официально признано и используется в номенклатуре [1265, 1266].

Механизм биологических окислительно-восстановительных реакций уже обсуждался в гл. 7, однако на ряде моментов, связанных с восстановлением рассматриваемых коферментов дегидрогеназами, следует остановиться дополнительно. При восстановлении NAD^+ на него переносится один атом водорода и один электрон; поскольку в итоге происходит присоединение гидридного иона, то реакцию иногда называют переносом гидридного иона. Из этого, конечно, не следует, что эти компоненты переносятся в составе одной частицы; сформулировать механизм на основании уравнения полной реакции не представляется возможным. Рассматривая реакцию «со стороны субстрата», можно отметить, что во многих дегидрогеназных реакциях от субстрата отщепляются два атома водорода; например, —CHОН-группа субстрата обычно превращается в —СО-группу. Следовательно, нельзя говорить о простом переносе гидридного иона от субстрата к NAD^+ .

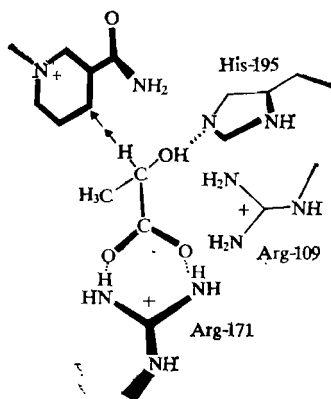


Рис. 9.3. Предполагаемая схема связывания субстрата в активном тройном комплексе [37].

Определенные сведения о механизме процесса были получены в результате рентгеноструктурных исследований комплекса субстрат — дегидрогеназа — NAD для лактатдегидрогеназы из тканей акулы (хотя данные не вполне однозначны) [37]. Установлено, что карбоксильная группа лактата взаимодействует с остатком аргинина; в результате лактат удерживается в активном центре в таком положении, что H от СН переносится к С-4 никотинамидного кольца (которое расположено достаточно близко), в то же время H от OH переносится в виде протона на расположенную рядом гистидиновую группу фермента; последняя функционирует как «ловушка протона». «Кофермент теряет свой заряд, который передается через субстрат на His-195». Этот процесс схематически показан на рис. 9.3. Во многом он еще остается неясным; в частности, можно полагать, что существенное значение имеют и некоторые другие группы, в первую очередь амидная группа NAD, способная образовывать водородную связь с гистидином.

Было высказано предположение (однако доказательства его являются еще фрагментарными), что у ряда разных дегидрогеназ NAD-связывающие участки сходны; они образованы параллельными цепями складчатой структуры, соединенными спиральными участками или петлями [529, 614]. На рис. 9.4 изображены NAD-связывающие участки двух дегидрогеназ (по такой же схеме, как и ниже на рис. 10.12); указано также расположение NAD. Схема коферментсвязывающего участка алкогольдегидрогеназы из печени приведена в работе [529]. Цепи β -слоя (см. рис. 10.8) изображены в виде широких плоских стрелок; они соединены друг с другом участками основной цепи, изображенными в виде более узких лент, местами спиральных. NAD изображен в виде цепочки фрагментов (N — никотинамид, R — рибоза, P — фосфат, A — аденин); субстрат обозначен буквой S.

В активном центре алкогольдегидрогеназы адениновый конец NAD находится в гидрофобном кармане, образованном остатками, относящимися к цепям βA , βB и βD и к петле между цепями βD и αE ; фосфат локализован в небольшом углублении между петлями на концах цепей βA и βE ; другой конец молекулы NAD направлен в щель в сторону атома цинка активного центра.

Интересно отметить, что сходство трех рассмотренных ферментов ограничивается структурами коферментсвязывающих участков, другие области молекул совершенно различны. Различия видны также в характере взаиморасположения четырех субъединиц у двух ферментов (рис. 9.4, Б) и в пространственной ориентации молекул в различных субъединицах.

Свойства и распространенность. NAD⁺ восстанавливается многими субстратами в присутствии соответствующих дегидро-

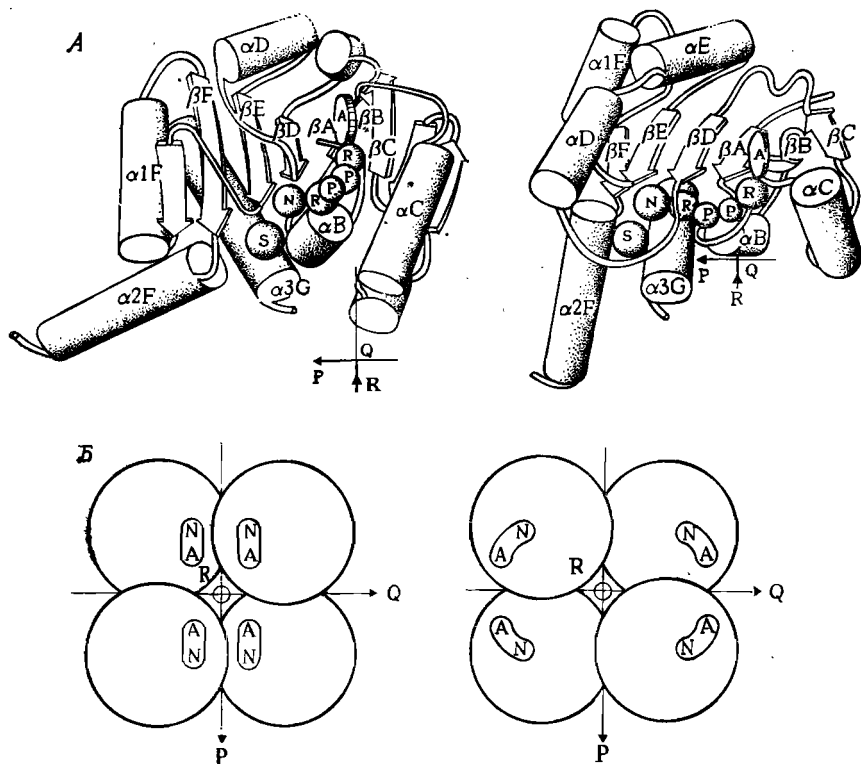


Рис. 9.4. А. Сравнение конформаций коферментсвязывающих областей глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназы (слева) и лактатдегидрогеназы (справа) [614]. На схеме для лактатдегидрогеназы спиральные и складчатые структуры обозначены в соответствии с принятой номенклатурой. Б. Сравнение типов связывания субъединиц в глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназе и лактатдегидрогеназе; N и A — никотинамидный и адениновый концы молекулы NAD.

геназ. $NADP^+$ восстанавливается меньшим числом ферментов. Ферменты, которые восстанавливают NAD^+ , обычно не восстанавливают $NADP$, и наоборот, однако это наблюдается не всегда. К 1978 г. сложилась следующая ситуация: было известно 154 фермента, которые функционировали только в присутствии NAD, 98 ферментов, которые функционировали только в присутствии $NADP$, и 40 ферментов — в присутствии любого из коферментов (однако не обязательно одинаково эффективно).

В отсутствие ферментов восстановленные формы коферментов не окисляются в заметной степени кислородом, красителями (например, метиленовым синим) или цитохромами, однако окисляются неферментативно рядом соединений, например феназинами, порфиридинами и порфирексидами [4117]. При участии

соответствующих ферментов они могут быть окислены самыми разными соединениями: многие дегидрогеназы, которые восстанавливают NAD^+ и NADP^+ , окисляют (в результате обратной реакции) восстановленные формы коферментов окисленными формами субстратов; кроме того, тридцать или более ферментов подкласса КФ 1.6 катализируют окисление коферментов различными более или менее специфическими акцепторами, в том числе некоторыми дисульфидными соединениями, хинонами, цитохромами b_5 , c_2 , Р-450 и (при некоторых условиях) c ; коферменты окисляются также H_2O_2 в присутствии специфических пероксидаз и красителями в присутствии некоторых флавопротеидов. Окисление NADPH за счет NAD^+ катализируется NAD(P)^+ -трансгидрогеназой.

Многие из рассмотренных реакций являются, однако, второстепенными. Главная функция рассматриваемых коферментов — это участие в дыхательном процессе. В митохондриях окисление происходит главным образом за счет убикинона и дыхательной цепи (см. рис. 9.21). Другая важная функция NAD — участие в анаэробном брожении, в котором восстановление и окисление происходят при действии различных дегидрогеназ.

Стабильность окисленных и восстановленных форм при сдвиге рН изменяется в противоположных направлениях. Восстановленная форма крайне неустойчива в кислых растворах, но относительно стабильна в щелочных, тогда как окисленная форма весьма стабильна в кислых растворах, а в щелочных мало устойчива [2880]. В нейтральном растворе восстановленная форма менее стабильна, чем окисленная.

Оба кофермента широко распространены в живой природе. Глок и Мак-Лин [1590] исследовали ряд тканей животных, используя специальные энзимологические методы, которые (в отличие от метода восстановления гидросульфитом) позволяют определить истинные количества не расщепленных на фрагменты молекул кофермента; их данные, полученные в опытах на крысах, приведены в табл. 9.1.

В большинстве клеток (исключение составляют клетки листьев растений) NAD присутствует в значительно больших количествах, чем NADP ; в то же время отношение количеств восстановленной и окисленной форм значительно выше для NADP , чем для NAD . В листьях растений NAD и NADP присутствуют почти в равных количествах; концентрация их составляет около 10 мкг на 1 г сырого веса [109].

Биосинтез и распад. NAD и NADP синтезируются и распадаются в результате серии последовательных реакций, катализируемых внутриклеточными ферментами, как показано в табл. 9.2.

Гидролитический распад NADP может осуществляться любой из четырех доступных связей (за исключением связей,

Таблица 9.1

Содержание NAD и NADP в различных тканях крысы

Ткань	NAD		NADP	
	общее содержание, мкг на 1 г ткани	содержание восстановленной формы, %	общее содержание, мкг на 1 г ткани	содержание восстановленной формы, %
Печень	570	36	210	97
Сердце	480	38	36	95
Падпочечники	470	33	130	87
Почка	440	48	57	95
Диафрагма	430	32	13	100
Молочная железа	310	27	50	100
Мозг	220	40	8	100
Железка	200	30	12	100
Печень	190	40	12	100
Легкое	160	33	27	67
Тимус	150	23	12	100
Семенники	150	47	6	100
Семенные пузырьки	140	8	12	100
Предстательная железа	100	18	11	100
Планта	100	11	3	100
Кровь	90	40	8	40

образующих AMP). Последовательность гидролитических реакций может изменяться в зависимости от обстоятельств; в таблице приведены две вероятные последовательности.

Аналоги. Было получено несколько производных NAD и NADP. Эти производные исследовали на активность в ряде ферментных систем. Особенно много работали в этой области Каплан и его сотрудники.

Рассматривая модификации молекулы, не затрагивающие никотинамидную группу, следует отметить, что иодметилат никотинамида и никотинамидмононуклеотид совершенно неактивны в качестве коферментов дегидрогеназ; это относится также и к NAD, у которого аденин замещен никотинамидом. Замена аминогруппы аденина на гидроксильную группу (при этом образуется никотинамидгипоксантидиннуклеотид) уменьшает активность. С различными дегидрогеназами активность этого аналога колеблется примерно от нуля до 50% активности нормального кофермента [3759]. Данный аналог активен также в системе NAD(P)-трансгидрогеназы. Модификация остатка сахара тоже влияет на биологическую активность; NAD, содержащий в аденилатной части дезоксирибозу, обладает лишь незначительной активностью как кофермент дегидрогеназ [2485]. Таким образом, для сохранения коферментной активности аденилатная часть молекулы не менее важна, чем никотинамидмононуклеотидная.

Синтез и распад NAD и NADP

Синтез

1. Рибозкиназа (КФ 2.7.1.15)
 $D\text{-рибоза} + \text{ATP} = D\text{-рибозо-5-фосфат} + \text{ADP}$
2. Рибозофосфат — пирозофоскиназа (КФ 2.7.6.1)
 $D\text{-рибозо-5-фосфат} + \text{ATP} = 5\text{-фосфо-}\alpha\text{-D-рибозо-1-дифосфат} + \text{AMP}$
3. Никотинат — фосфорибозилтрансфераза (КФ 3.6.1.9)
 $\text{Никотинат} + 5\text{-фосфо-}\alpha\text{-D-рибозо-1-дифосфат} = \text{Никотинатрибонуклеотид} + \text{Пирозофосфат}$
4. Никотинатмононуклеотид — аденилилтрансфераза (КФ 2.7.1.18)
 $\text{Никотинатрибонуклеотид} + \text{ATP} = \text{Дезамино-NAD}^+ + \text{Пирозофосфат}$
5. NAD^+ -синтетаза (КФ 6.3.5.1)
 $\text{Дезамино-NAD}^+ + \text{ATP} + \text{L-глутамин} + \text{H}_2\text{O} = \text{NAD}^+ + \text{AMP} + \text{Пирозофосфат} + \text{L-глутамат}$
6. NAD^+ -киназа (КФ 2.7.1.23)
 $\text{NAD}^+ + \text{ATP} = \text{NADP}^+ + \text{ADP}$

В некоторых тканях животных вместо реакций 3—5 могут протекать следующие реакции:

7. Никотинамид — фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.12)
 $\text{Никотинамид} + 5\text{-фосфо-}\alpha\text{-D-рибозо-1-дифосфат} = \text{NMN} + \text{Пирозофосфат}$
8. NMN^+ — аденилилтрансфераза (КФ 2.7.7.1)
 $\text{NMN}^+ + \text{ATP} = \text{NAD}^+ + \text{Пирозофосфат}$

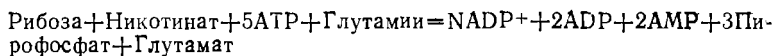
Распад

9. Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1)
 $\text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{NAD}^+ + \text{Фосфат}$
10. Нуклеотид-пирозофосфатаза (КФ 3.6.1.9)
 $\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{NMN}^+ + \text{AMP}$
11. 5'-N-нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5)
 $\text{NMN}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{Никотинамиднуклеозид} + \text{Фосфат}$
12. Нуклеозидаза (КФ 3.2.2.1)
 $\text{Никотинамиднуклеозид} + \text{H}_2\text{O} = \text{Никотинамид} + D\text{-рибоза}$

Вместо реакций 10—12 могут протекать следующие реакции:

13. NAD^+ -нуклеозидаза (КФ 3.2.2.5)
 $\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{Никотинамид} + \text{ADP-рибоза}$
14. Нуклеотид-пирозофосфатаза (КФ 3.6.1.9)
 $\text{ADP-рибоза} + \text{H}_2\text{O} = \text{AMP} + D\text{-рибозо-5-фосфат}$
15. Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1)
 $D\text{-рибозо-5-фосфат} + \text{H}_2\text{O} = D\text{-рибоза} + \text{Фосфат}$

Сумма реакций (1)—(6):



Сумма реакций (9) — (12) или (9) + [(13) — (15)]:



В случае NADP существенно положение третьей фосфатной группы. В кислом растворе эта фосфатная группа спонтанно перемещается из положения 2' в положение 3'. Образующийся аналог не действует на те дегидрогеназы, которые специфичны в отношении NADP, но активен (в той же степени, что и NADP) в отношении большинства дегидрогеназ, которые могут использовать оба кофермента [4273].

Обращаясь к модификациям никотинамидной группы, следует отметить, что, если эта группа соединена с рибозой β -связью, а также в случае полного восстановления никотинамидного кольца, динуклеотид оказывается неактивным. С помощью NAD(P)⁺-нуклеозидазы (КФ 3.2.2.6) можно заменить никотинамид другими основаниями и получить таким путем ряд неактивных аналогов. При участии того же фермента были получены аналоги, содержащие никотинамид с модифицированной боковой цепью [107, 108]. Результаты определения активности этих аналогов в опытах с пятью различными дегидрогеназами приведены в табл. 9.3.

Таблица 9.3

Скорости восстановления некоторых аналогов NAD⁺

Боковая цепь в положении 3	Алкоголь- дегидро- геназа из печени лошади	Алкоголь- дегидро- геназа из дрожжей	Лактат- дегидро- геназа из мышц кролика	Лактатде- гидроге- наза из сердца быка	Глицераль- дегидрофос- фатдегид- рогеназа из мышц кролика	Гидро- сульфит
-CO-NH ₂	100	100	100	100	100	+
-H	0	0	0	0	0	-
-CH ₃	0	0	0	0	0	-
-NH ₂	0	0	0	0	0	-
-NH-CO-CH ₃	0	0	0	0	0	-
-CS-NH ₂	348	16	3	41	16	+
-CO-NH-OH	44	3	20	10	19	+
-CO-NH-NH ₂	68	8	33	9	38	+
-CO-H	30	2	20	30	0	+
-CO-CH ₃	90	10	60	15	55	+
-CHON-CH ₃	0	0	0	0	0	-
-CO-CH(CH ₃) ₂	792	52	125	37	0	+
-CO-C ₆ H ₅	31	0	0	0	0	+
-CH=NOH	50	6	7	1	1	+
-CH=CH-CO-NH ₂	0	0	0	0	0	+

¹⁾ Скорость восстановления NAD⁺ принята за 100%. NAD⁺ (особенно легко в щелочном растворе) образует ряд аддуктов с такими веществами, как альдегиды, кетоны, тио-м. сульфит и цианид; присоединение происходит по положению 4; в спектре поглощения этих соединений (как и у NADH) имеется полоса в области 340 мμ. Соединения можно окислять феррицианидом до 4-замещенных аналогов NAD⁺; как окисленные, так и восстановленные формы соединений не активны в ферментативных реакциях [640, 4880].

Из этой таблицы видно, что для проявления коферментной активности и даже для восстановления гидросульфитом необходимо, чтобы к кольцу была присоединена группа CO или какая-либо другая ненасыщенная группировка. Замещение $-\text{CO}-\text{NH}_2$ на $-\text{CS}-\text{NH}_2$ приводит к резкому увеличению активности с одним из ферментов и к значительному уменьшению активности с другими ферментами. Замещение или модификация $-\text{NH}_2$ -группы обычно не полностью лишает соединение коферментной активности, а приводит лишь к ее снижению, хотя замена на группу $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ведет к значительному увеличению активности с одним из ферментов и полному исчезновению активности с другим. Поскольку специфичность различных дегидрогеназ сильно варьирует, аналоги успешно используются для разграничения дегидрогеназ различных видов животных, а также изоферментов у одного и того же вида.

Для образования коферментами аддуктов участия дегидрогеназы не требуется. Например, пируват как в присутствии, так и в отсутствие лактатдегидрогеназы из сердца при pH 10 образует ковалентное соединение по C-4 никотинамидного кольца NAD^+ . Если же соединение образуется в составе комплекса с ферментом, оно может быть затем экстрагировано; показана его идентичность соединению, образующемуся в отсутствие фермента. Однако в последнем случае пируват присоединяется практически неизбирательно по обеим сторонам кольца [образуется 60% «формы А» и 40% «формы В» (см. с. 418 и 667), как и в случае присоединения цианида]; в то же время, если присоединение происходит на ферменте, то вследствие стереоспецифичности [157] образуется только форма А. Комплекс NAD^+ — пируват, безусловно, является тупиковым и действует как конкурентный ингибитор.

Другие виды действия. В ряде случаев NAD и NADP выступают в роли кофакторов в системах, в которых не происходит окисления. В качестве примеров можно привести реакции, катализируемые лиазами 4.1.1.35, 4.2.1.45, 4.2.1.46, 4.2.1.47, изомеразами 5.1.3.2, 5.1.3.12, 5.5.1.4 и трансферазой 2.1.2.10 (в последнем случае, однако, происходит восстановление).

Некоторые нуклеотиды способствуют сборке неактивных субъединиц фермента в олигомер, обладающий полной активностью, другими словами, они действуют как кофакторы типа (г) (см. с. 662). Примеры такого рода приведены в табл. 10.2; весьма вероятно, что в ряде случаев такое действие (наряду с функцией окислительно-восстановительного переносчика) может быть присуще NAD . И в самом деле, было показано, что в присутствии NAD четыре неактивные субъединицы фермента КФ 1.1.1.49 из эритроцитов объединяются, образуя активный фермент; для этого же фермента из *Neurospora* было показано, что NADP препятствует диссоциации тетрамера на субъединицы.

Флавины и флавопротеиды

Первым из флавопротеидных ферментов был открыт флавопротеид Варбурга и Христиана (КФ 1.6.99.1) [4985], выделенный из дрожжей в 1932 г. Было установлено, что он состоит из желтой флавиновой группы (она теперь называется «рибофлавинфосфатом» или «флавинмоноклеотидом») и коллоида, который, как было показано позднее Теореллом, представляет собой белок. Строение рибофлавина было установлено путем синтеза Куном и др. [2623] и Кэррером и др. [2338] в 1935 г.

Позже Варбург и Христиан рассматривали открытый ими флавопротеид как артефакт [4987]. Однако в настоящее время число известных флавопротеидных ферментов достигает примерно 80. Некоторые из них содержат в качестве простетической группы рибофлавин-5'-фосфат (флавинмоноклеотид, FMN), но у большинства ферментов эту функцию выполняет флавинадениндинуклеотид (FAD). Структурные формулы указанных групп представлены на рис. 9.5. Строение флавинадениндинуклеотида в настоящее время подтверждено в результате полного синтеза [785]; это был первый динуклеотид, который удалось синтезировать.

Приведенные структурные формулы соответствуют окисленным формам, которые представляют собой желтые флуоресцирующие вещества; спектры поглощения этих веществ показаны

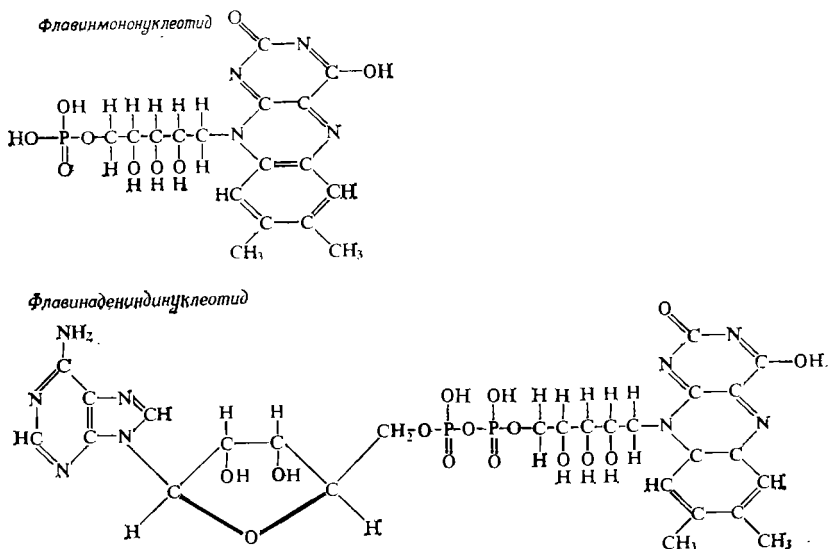


Рис. 9.5. Структура флавиновых простетических групп.

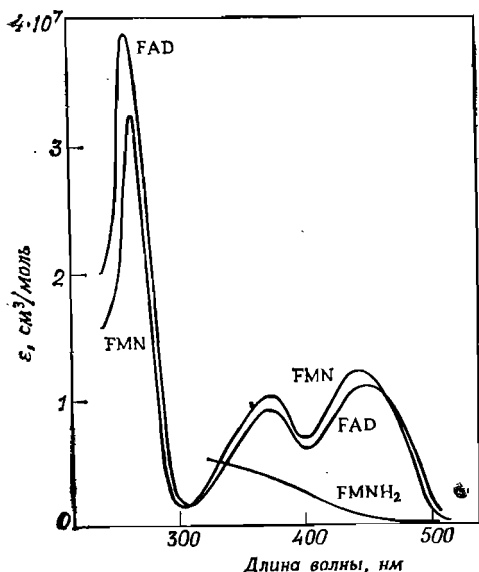


Рис. 9.6. Спектры поглощения окисленной формы флавимононуклеотида (FMN) и флавинаденинднуклеотида (FAD).

на рис. 9.6. Флавиннуклеотиды очень легко восстанавливаются до лейкоформ химическими восстановителями и после восстановления теряют свой желтый цвет и способность к флуоресценции (исчезает полоса поглощения при 450 нм). При восстановлении два водородных атома присоединяются к хиноидной структуре в изоаллоксазиновом ядре, как показано на рис. 9.7. Поскольку, однако, легко происходит таутомерное превращение



приведенные структуры можно изобразить по-разному.

Флавины связываются с рядом разных специфических белков (апоферментов) с образованием флавопротеидных ферментов; при этом обычно с каждой субъединицей фермента связывается одна молекула флавина. Как правило, молекулы флавина связываются с апоферментом прочно и специфически, хотя

Окисленная форма Восстановленная форма

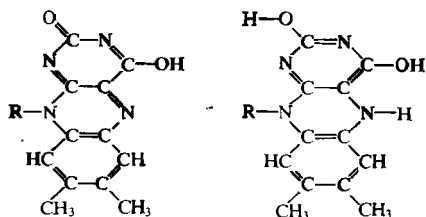


Рис. 9.7. Два состояния флавиновых групп.

иногда (например, в случае оксидазы D-аминокислот) может происходить частичная диссоциация флавина из комплекса с белком.

Катализ окислительно-восстановительных реакций флавопротеидами обусловлен последовательным окислением и восстановлением их флавиновых групп. Однако FAD отличается от NAD (который также претерпевает последовательное окисление и восстановление) тем, что завершает свой окислительно-восстановительный цикл, будучи связан с одним и тем же ферментным белком, в то время как NAD восстанавливается на одном ферменте, а окисляется на другом. NAD является, следовательно, межферментным окислительно-восстановительным переносчиком типа (а), а FAD — внутриферментным окислительно-восстановительным переносчиком типа (б).

Свойства флавина сильно изменяются в результате связывания с ферментом. В большинстве случаев спектр поглощения связанного с белком флавина слабо отличается от того, который приведен на рис. 9.6, однако незначительные изменения все же могут иметь место. Спектры же флуоресценции связанного с белком и свободного флавина могут существенно различаться. В то время как свободные флавины сильно флуоресцируют в окисленном состоянии и не флуоресцируют в восстановленном, многие флавопротеиды совсем не флуоресцируют в окисленном состоянии, а очень немногие флуоресцируют весьма слабо (интенсивность их флуоресценции составляет 1—2% по сравнению с интенсивностью флуоресценции свободного FMN). Известен только один флавопротеид — дигидролипоамид-дегидрогеназа (NAD⁺) (КФ 1.6.4.3), флуоресценция которого в окисленном состоянии приближается к таковой для свободных флавинов. С другой стороны, известно небольшое число флавопротеидов, которые в отличие от свободных флавинов флуоресцируют только в восстановленном состоянии (интенсивность их флуоресценции достигает 10% таковой для FMN) [1533]. Способность к флуоресценции не коррелирует ни с каким другим свойством флавопротеидов.

Белковая часть флавопротеидного фермента определяет как механизм, так и специфичность катализируемой реакции. Она выполняет ряд важных функций, в частности формирует субстратсвязывающий участок, который ответствен за активацию субстрата и высокую субстратную специфичность фермента. Во многих случаях с апоферментом связаны атомы металла (например, Fe, Mo, Cu), которые могут участвовать в каталитическом процессе, обеспечивая ферменту возможность реагировать с такими соединениями, которые не взаимодействуют со свободными флавинами (такова, например, роль атомов молибдена в восстановлении нитрата). Белок оказывает также стабилизирующее действие на некоторые полувосстановленные фор-

мы флавина, в том числе семихиноны, которые играют важную роль в некоторых катализируемых реакциях. Такие формы легко наблюдать у флавопротеидов и значительно труднее у свободных флавинов.

Наконец, белковая часть определяет специфичность флавиновой группы в отношении акцепторов и, следовательно, определяет функциональный класс, к которому принадлежит данный флавопротеид. В свободном состоянии восстановленные флавины проявляют очень небольшую специфичность и легко окисляются многими акцепторами. При взаимодействии флавина с белком избирательно ингибируются реакции с определенными акцепторами; более того, каждый белок, вероятно, формирует определенный вид специфичности флавинов в отношении акцепторов [1113]; это отражено в табл. 9.4, в которой в полуколичественном виде (числом знаков плюс) охарактеризована активность двадцати флавопротеидов по отношению к различным акцепторам. Некоторые из феноменов весьма примечательны и трудно объяснимы на основе существующих представлений. Например, восстановленные флавины очень быстро окисляются O_2 , если они не связаны с белком, однако восемь из приведенных белков обладают способностью предотвращать эту реакцию. Другие белки не влияют на реакцию с O_2 , но ингибируют реакции с некоторыми другими акцепторами.

Эти различия весьма важны, поскольку они определяют классификацию и функцию флавопротеидов, т. е. определяют, чем является данный фермент — оксидазой (реагирующей с O_2), цитохромредуктазой, дегидрогеназой и т. д.

Каталитическое воздействие всех флавопротеидов обусловлено восстановлением и окислением их флавиновых групп, однако не всегда в процессе участвуют только полностью восстановленные и полностью окисленные формы. При исследовании процесса методом остановленной струи с регистрацией спектров поглощения и сигналов ЭПР установлено, что существенную роль часто играют полувосстановленные формы различного типа. Однако, как и в других исследованиях, основанных на интерпретации спектров, остаются неясности в отношении природы идентифицируемых соединений, и некоторые спектры, ранее приписываемые семихинонам, в настоящее время приписывают другим соединениям, например комплексам с переносом заряда и аддуктам.

Говоря о функционировании флавинов, следует различать три основных типа окислительно-восстановительных механизмов. Первый тип связан с переходом между полностью окисленной и полностью восстановленной формами флавина ($F \rightleftharpoons FH_2$). Примером является глюкозооксидазная реакция [3022]; в этом случае субстрат восстанавливает форму F сразу до формы FH_2 без образования в качестве интермедиата свободного радикала

Таблица 1. Активность некоторых ферментов (по В¹)

Ф. код. номер	Флавопротеид	Кислород	H ₂ O ₂	Ферри-цианид	Бензохв-нон	Цит. с	DCIP	Метиленовый синий	PMS	Нитра-
1.3.4	Глюкозооксидаза	++++		±	0	0	+	+	+	
1.99.10	Глюкозодегидрогеназа	0			++		++++	+		
1.3.1	Гликолатоксидаза	++		0		0	+	+		0
13.12.4	Лактат 2-монооксигеназа (Б)	++		0		0	+	0		
1.2.3	Лактатдегидрогеназа (цитохром) (Д)	±		++++		++++	++++	++++		
1.2.4	D-Лактатдегидрогеназа (цитохром) (Д)	0		0		++	0	0	+++	
1.99.6	Дегидрогеназа D-2-гидроксикислот	+		++		+	++	++	+++	
4.3.2	Оксидаза L-аминокислот (ЗЯ)	+++		±	0	0	±	+	+++	
4.3.3	Оксидаза D-аминокислот (П)	+++		0	0	0	+	+	0	
4.3.1	D-Аспартатоксидаза (П)	++		+++	0	0	+	0	0	
2.3.2	Ксантиноксидаза	++	+	±	++	0	++++	++++	+++	+-
3.3.1	Дигидро-оротат — оксидаза	+++		+			+	+	+	
5.99.4	Никотиндегидрогеназа	0	0	0	+	0	+	++++		
1.6.5.1)	Хиноиредуктаза (Б)	0	0	++	++++	0	++++	0		
11.1.1	NADH-пероксидаза	±	+++	+++	+	0	0	0		
6.99.5	NADH-дегидрогеназа (хинон)	0		+++	0	0	++	0		
6.2.4	NADPH-цитохром — редуктаза (МП)	0		+++	+++	+++	+++			
6.2.2	Цитохром b ₅ -редуктаза (МП)	0		+++	±	0	+	+		
3.99.1	Сукцинатдегидрогеназа	0		++	0	0	0	0	+++	
6.4.3	Дигидролипоамиддегидрогеназа (NAD ⁺)	±		++	0	0	++	++	0	

¹) Сокращения: Б — бактерии; П — почки; МП — митохондрии печени; ЗЯ — змеиный яд; Д — дрожжи; DCIP — дихлорфенолиндофенол; PMS — левазметасульфат.

Таблица 9.7

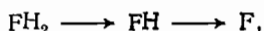
Некоторые свойства флавопротеидов¹⁾ [1113]

Ф. кодový номер	Фермент	Мол. масса	Флавин	Число флавиновых групп на молекулу	Флуоресценция	Металл	Число атомов металла на флавин	Каталитический механизм
1.1.3.4	Глюкозооксидаза	186 000	FAD	2	0	0	—	$F \rightleftharpoons FN_2$
1.1.99.10	Глюкозодегидрогеназа (<i>Aspergillus</i>)	100 000		1				
1.1.3.1	Гликоллактоксидаза	140 000	FMN	2	0	0	—	
1.13.12.4	Лактат-2-монооксигеназа (Б)	260 000	FMN	2		0	—	
1.1.2.3	Лактатдегидрогеназа (цитохром) (Д)	160 000	FMN	2		Гем.	1	$\begin{cases} F \rightarrow FH_2 \\ F \leftarrow FH \leftarrow FH_2 \end{cases}$
1.1.2.4	D-Лактатдегидрогеназа (цитохром) (Д)		FAD	1		Zn	3	
1.1.99.6	Дегидрогеназа D-2-гидроксикислот	100 000	FAD		0	M?		
4.4.3.4	Аминоксидаза (содержащая флавин)	100 000	FAD	1	+	0	—	
4.4.3.2	Оксидаза L-аминокислот (ЗЯ)	140 000	FAD	2		0	—	$F \rightleftharpoons FH_2$
4.4.3.3	Оксидаза D-аминокислот (П)	50 000	FAD	1	+	0	—	$F \rightleftharpoons FH_2$
4.4.3.1	D-Аспаратоксидаза (П)							
2.2.3.2	Ксаантиноксидаза	280 000	FAD	2	0	$\begin{Bmatrix} Mo \\ Fe \end{Bmatrix}$	$\begin{matrix} 1 \\ 4 \end{matrix}$	
3.3.3.1	Дигидро-оротат — оксидаза	62 000	$\begin{Bmatrix} FAD \\ FMN \end{Bmatrix}$	$\begin{matrix} 1 \\ 1 \end{matrix}$	+	Fe	1	
5.5.99.4	Никотиндегидрогеназа		FMN			M		
1.6.5.1)	Хинонредуктаза		FMN			0	—	
1.1.1.1	NADH-пероксидаза		FAD		0	0		
6.6.99.5	NADH-дегидрогеназа (хинон)		FMN					
6.6.2.4	NADPH-цитохром — редуктаза (МП)	81 000	FAD	2		0	—	$FH \rightleftharpoons FH_2$
1.6.2.2	Цитохром <i>b</i> ₅ -редуктаза (МП)	40 000	FAD	1	0	0	—	$\begin{cases} F \rightarrow FH_2 \\ F \leftarrow FH \leftarrow FH_2 \end{cases}$
1.3.99.1	Сукцинатдегидрогеназа	100 000	FAD	1		Fe	8	
1.6.4.3	Дигидролипоамид-дегидрогеназа (NAD ⁺)	100 000	FAD	2	+++	0	—	

¹⁾ Сокращения, как в табл. 9.4.

семихинона, а акцептор окисляет форму FH_2 сразу до формы F . Семихинон не участвует в катализе, однако он с большим выходом образуется в том случае, когда восстановителем является не глюкоза, а гидросульфит; его обнаруживают спектрофотометрически и с помощью ЭПР. Многие флавопротеиды образуют при действии гидросульфита семихиноны независимо от того, участвует ли семихинонная форма в катализе; подобная картина наблюдается и при действии NADH . Примечательно, однако, что семихинонная форма глюкозооксидазы каталитически совершенно неактивна и не может быть восстановлена субстратом [3019]. Аналогичным образом ведут себя также оксидазы D- и L-аминокислот.

Вариантом механизма рассматриваемого типа является механизм, по которому функционирует цитохром b_5 -редуктаза; восстановление F до FH_2 субстратом происходит, вероятно, в одну стадию, однако окисление FH_2 акцептором осуществляется в две стадии:



где FH — полувосстановленная форма.

В механизме второго типа, примером которого может служить механизм функционирования дигидролипоамид-дегидрогеназы (NAD^+ -зависимой), происходит переход между окисленной и полувосстановленной формами ($\text{F} \rightleftharpoons \text{FH}$), а форма FH_2 не участвует в каталитическом цикле.

В механизме третьего типа, примером которого является функционирование цитохром c -редуктазы, форма F в катализе не участвует, а переход происходит между полувосстановленной и полностью восстановленной формами ($\text{FH} \rightleftharpoons \text{FH}_2$). Форма FH_2 окисляется до формы FH кислородом, феррицианидом, цитохромом c , менадином и DCIP (дихлорфенолиндифенолом), однако форма FH не окисляется далее этими акцепторами. Следовательно, специфичность по отношению к акцепторам полностью восстановленной и полувосстановленной форм флавопротеидов различна [2317].

Сокращение FH , которым мы пользовались выше, не означает, что полувосстановленная форма, образующаяся при взаимодействии с субстратом (но не с гидросульфитом), является свободным радикалом семихинона; если соответствующий сигнал ЭПР отсутствует, нет оснований считать, что полувосстановленная форма является семихиноном, и ее природа требует выяснения. Массей и др. [3022] полагают, что «в отличие от металлофлавопротеидов, которые в результате восстановления субстратом с большим выходом образуют свободные радикалы, флавопротеиды, не содержащие металлов, удивительно «постоянны» в том отношении, что при восстановлении субстратом не образуют свободных радикалов».

Представляется весьма вероятным, что поскольку тип механизма должен частично определяться относительной специфичностью форм FH и FH_2 по отношению к акцептору, то может существовать корреляция между типом механизма и характером специфичности фермента к акцептору; к сожалению, однако, данные, которыми мы располагаем, не позволяют проверить правильность этого предположения.

Имеются данные о том, что в ряде случаев в процессе катализа наряду с флавинами и металлами окислению и восстановлению подвергаются некоторые группы апофермента. В частности, в дигидролипоамид-дегидрогеназе (NAD^+ -зависимой) и глутатионредуктазе [NAD(P)H -зависимой] (КФ 1.6.4.2) одновременно с флавином восстанавливается и окисляется S—S -группа белка; был предложен механизм [3022], при котором происходит образование комплексов полувосстановленного флавина и тиоловых групп. Возможно, не случайным является то обстоятельство, что действие обоих рассматриваемых ферментов связано с окислением тиоловых соединений.

Липоевая кислота

История изучения. Липоевая кислота — этот важный и имеющий широкое распространение переносчик водорода — была открыта в 1941 г. как фактор роста простейшего *Tetrahymena* [1079, 1080, 2440, 2441] и получила тогда название «фактор II». Стокстед и др. [4515] получили концентрат липоевой кислоты и назвали его вначале протогеном, а позднее протогеном А. Примерно в то же время Гирард и др. [1706] обнаружили фактор, наличие которого при отсутствии уксусной кислоты обеспечивало рост тех бактерий, которым эта кислота была необходима, и назвали его фактором, заменяющим ацетат, а О'Кейн и Гунзалус [3522] открыли фактор окисления пирувата у *Streptococcus faecalis*. В дальнейшем было доказано, что оба этих фактора идентичны протогену [4363].

В 1951 г. это вещество было получено в кристаллическом виде Ридом, Де-Бюском, Гунзалусом и Хорнбергером [3854], которые предложили называть его α -липоевой кислотой на том основании, что оно растворялось в органических растворителях; приставка α - в этом названии не имела химического смысла и была введена только для того, чтобы провести различие между данной формой вещества и другой его формой, образующейся в процессе получения. Учитывая некоторые химические свойства вещества (см. ниже), его называли также тиоктовой кислотой. В настоящее время обычно употребляется название «липоевая кислота», причем часто его относят только к окисленной форме.

Строение. Строение окисленной и восстановленной форм ли-

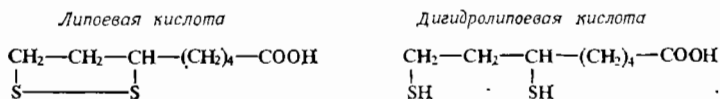


Рис. 9.8. Структура двух форм липоевой кислоты.

поевой кислоты [3852] представлено на рис. 9.8. При переходе окисленной формы липоевой кислоты в восстановленную дисульфидная группа восстанавливается до двух тиоловых групп. В молекуле липоевой кислоты содержится один асимметрический атом углерода, и, следовательно, эта кислота может существовать в виде двух оптических изомеров. Природный изомер окисленной формы поворачивает плоскость поляризации вправо, но при восстановлении его образуется левовращающая восстановленная форма. В системе оксидазы пировиноградной кислоты активны только природные изомеры.

В клетках большая часть липоевой кислоты присутствует, по-видимому, в связанной с белком форме, присоединяясь с помощью пептидной связи к боковой цепи лизина; она может быть отщеплена с помощью фермента из дрожжей или бактерий [3852].

Свойства. Липоевая кислота в окисленной форме представляет собой желтоватое вещество; спектр поглощения его изображен на рис. 9.9. Полоса поглощения при 335 нм обусловлена наличием у окисленной формы пятичленного кольца [659]. При действии сильных восстановителей, например цинка в соляной кислоте (но не боргидрида), это кольцо вследствие восстановления дисульфидной связи разывается. Липоевая кислота вос-

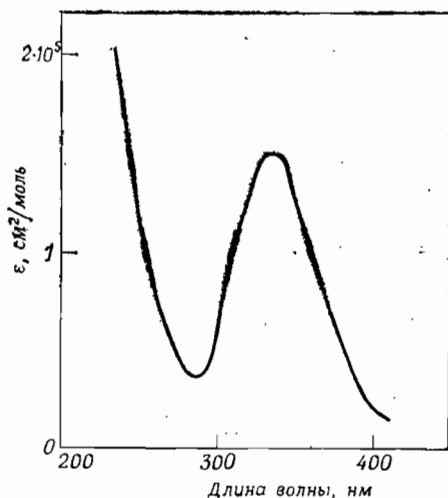


Рис. 9.9. Спектр поглощения липоевой кислоты.

становливается пировиноградной и α -оксоглутаровой кислотами в присутствии соответствующих дегидрогеназ (КФ 1.2.4.1 и 1.2.4.2) и тиаминдифосфата; в этих случаях восстановление осуществляется путем переноса ацильной группы от субстрата вначале на тиамин, а затем к липоевой кислоте с образованием ацетилгидролипоата и сукцинилгидролипоата соответственно. Гунзалус и др. [1711] доказали, что ацетильная группа ацилирует тиоловую группу в положении 6.

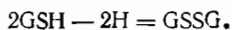
Восстановленный липоат после отщепления любой ацильной группы окисляется при помощи NAD^+ в присутствии дигидролипоамид-дегидрогеназы (NAD^+ -зависимой) (КФ 1.6.4.3). Кроме того, его можно окислить, используя такие мягкие химические окислители, как иод.

Глутатион

Глутатион — широко распространенный в природе серусодержащий пептид — открыт в 1921 г. Гопкинсом [2024]. В восстановленной форме глутатион был впервые выделен в аморфном состоянии; предполагалось, что он представляет собой дипептид цистеина и глутаминовой кислоты. Позже Гопкинс предложил изящный метод выделения кристаллического глутатиона из тканевых экстрактов [2025]; почти одновременно с ним глутатион в кристаллическом виде получили Кендалл и др. [2407]. В обеих этих работах было показано, что глутатион представляет собой трипептид цистеина, глутаминовой кислоты и глицина; однако Гопкинсу не удалось установить последовательность аминокислот в этом пептиде, а предположение Кендалла о последовательности аминокислот оказалось неправильным. Окончательно строение глутатиона было установлено после того, как его удалось синтезировать; выяснилось, что он представляет собой γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин [1786].

Функциональной группой молекулы глутатиона является тиоловая группа, поэтому для восстановленного глутатиона принято удобное сокращение GSH.

Свойства. Восстановленный глутатион окисляется до дисульфида мягкими окислителями, например иодом или феррицианидом. Это окисление аналогично окислению цистеина и может быть представлено уравнением



Глутатион в соответствующих условиях в присутствии следовых количеств металлов-катализаторов окисляется также молекулярным кислородом; кроме того, он окисляется цитохромом *c* и может быть окислен также и ферментативным путем — дегид-

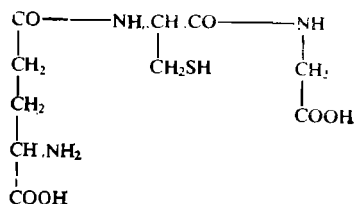
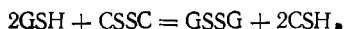


Рис. 9.10. Структура восстановленного глутатиона.

роаскорбиновой кислотой в присутствии глутатиондегидрогеназы (КФ 1.8.5.1). Для восстановления окисленной формы глутатиона необходимо действие сильных восстановителей, однако ферментативным путем глутатион может быть восстановлен за счет NADH и NADPH (особенно за счет последнего) в присутствии глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2). Благодаря своей способности подвергаться ферментативному окислению и восстановлению глутатион может служить биологическим переносчиком водорода; кстати, среди известных нам теперь переносчиков водорода первым был открыт именно глутатион.

В тиол-дисульфидных системах в отсутствие ферментов довольно легко устанавливается окислительно-восстановительное равновесие; глутатион и цистеин (CSH) находятся, таким образом, в равновесии согласно следующему уравнению:



Одна из подобных реакций катализируется ферментом глутатион-гомоцистин — трансгидрогеназой (КФ 1.8.4.1).

Несмотря на то что глутатион открыт очень давно и ему посвящена очень большая литература, роль его еще не вполне ясна. Он может, несомненно, выполнять функцию биологического переносчика водорода, что и было в свое время установлено Гопкинсом. Он может обеспечивать окисление коферментов при участии аскорбиновой кислоты и либо аскорбатоксидазы в растениях, либо цитохромоксидазы в организме животных. Однако до настоящего времени нет данных о физиологическом значении этих путей окисления. Глутатион может, кроме того, выполнять роль специфического кофермента в глиоксалазной системе и в системах малеилацетоацетат- и малеилпируват-изомеразы (КФ 5.2.1.2 и 5.2.1.4), а также в системе формальдегид-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.1). Участие глутатиона в глиоксалазной системе изучалось очень интенсивно, однако значение этой системы в обмене веществ все еще остается невыясненным. Многие ферменты представляют собой тиоловые соединения, активные только в SH-форме; предполагают, что очень важная функция глутатиона состоит в том, чтобы поддерживать эти ферменты в восстановленной форме.

Аскорбиновая кислота

Л-аскорбиновая кислота (витамин С) была вначале получена рядом исследователей в виде частично очищенных концентратов, а затем, в 1928 г., выделена в кристаллическом виде Сент-Дьёрди [4611]. Ее строение было установлено Хеурсом и др. [190] и подтверждено синтезом.

Необходимо отметить, что, хотя это вещество существует как в окисленной, так и в восстановленной форме, название «аскорбиновая кислота» относится только к восстановленной форме; окисленная же форма известна под названием «дегидроаскорбиновая кислота».

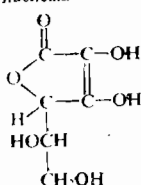
Свойства. Аскорбиновая кислота — сильный восстановитель, быстро восстанавливающий многие красители и даже нейтральный раствор нитрата серебра (до металлического серебра). Она, естественно, окисляется также обычными окислителями (например, иодом) и кислородом в присутствии следовых количеств металлов-катализаторов. В растениях эту реакцию осуществляет специфическая аскорбатоксидаза (КФ 1.10.3.3), в состав которой входит медь. В животных тканях этого фермента нет, и там аскорбиновая кислота может окисляться при помощи цитохромной системы.

Обе формы аскорбиновой кислоты представляют собой лактоны. Восстановленная форма обладает свойствами кислоты вследствие ионизации эндиоловой структуры, тогда как окисленная форма нейтральна. Лактоновое кольцо в аскорбиновой кислоте стабильно, а в дегидроаскорбиновой кислоте легко гидролизуется, причем образуется кислота с открытой цепью



Лактоновая форма дегидроаскорбиновой кислоты легко восстанавливается в аскорбиновую кислоту под действием H_2S или глутатиона в присутствии глутатиондегидрогеназы (КФ 1.8.5.1). Дегидроаскорбиновая кислота с открытой цепью не восстанавливается сероводородом до аскорбиновой кислоты; в растворе эта форма подвергается дальнейшим необратимым изменениям, поэтому окисление аскорбиновой кислоты становится необрати-

Л-аскорбиновая
кислота



Л-дегидроаскорбиновая
кислота

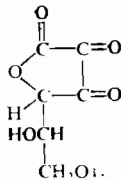


Рис. 9.11. Структура аскорбиновой кислоты и продукта ее окисления.

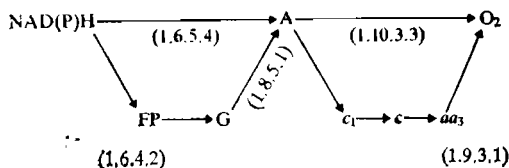


Рис. 9.12. Транспорт водорода с участием аскорбата. Обозначения на схеме: А — аскорбат; FMN — флавопротеидный фермент; G — глутатион; c_1 , c и aa_3 — цитохромы c_1 , c и a_3 соответственно. Приведены кодовые номера соответствующих ферментов.

мым в том случае, если не происходит быстрого восстановления окисленного продукта. Одно из окисленных производных аскорбиновой кислоты, которое не является дегидроаскорбиновой кислотой, но весьма быстро в нее превращается, способно окислять NADH и NADPH (особенно первый) в присутствии монодегидроаскорбатредуктазы (КФ 1.6.5.4). Это окисленное производное образуется (по крайней мере в качестве промежуточного продукта) при действии аскорбатоксидазы [2417, 3376]. Отсюда, естественно, напрашивается вывод о том, что аскорбиновая кислота может служить биологическим переносчиком водорода; однако значение ее в этом отношении все еще не вполне ясно. Схемы реакций, в которых аскорбиновая кислота служит переносчиком водорода, представлены на рис. 9.12; стрелками указано направление переноса атомов водорода. Кроме того, аскорбиновая кислота является существенным компонентом гидроксилазных систем (подгруппы КФ 1.14.11 и 1.14.17) (см. с. 710).

Аскорбиновая кислота необходима в качестве витамина только для приматов и морских свинок; однако ее широкое распространение в тканях других организмов свидетельствует о том, что она, вероятно, играет важную роль в обмене у всех животных.

Являясь хорошим восстановителем, аскорбиновая кислота, подобно глутатиону, может стабилизировать активность SH-ферментов. Это было подтверждено в ряде опытов *in vitro*.

Хиноны

Хиноны широко распространены в живой природе. В последнее время показано, что некоторые из них играют важную роль как промежуточные переносчики водорода в дыхательной системе. Это относится в первую очередь к метилированным хинонам с полиизопrenoидными боковыми цепями. Такого рода соединения подразделяются на две категории: убихиноны и витамины группы К. Структура их приведена на рис. 9.13.

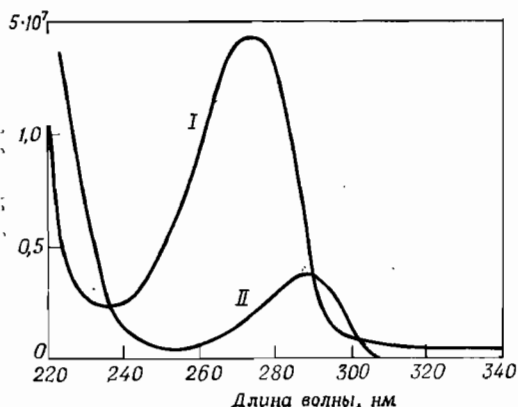


рис. 9.14. Спектры поглощения окисленной (I) и восстановленной (II) форм убихинона [5143]. Спектры получены для UQ_{10} в этаноле.

стицы теряют способность окислять сукцинат молекулярным кислородом при участии цитохрома *c*. Способность к окислению может быть полностью восстановлена при добавлении убихинона, но не других хинонов (неэффективен в этом отношении и витамин К) [2763]. Было сделано заключение, что убихинон является связующим звеном между сукцинатом и цитохромом *c*. З пользу этого говорят и спектроскопические данные. Спектры поглощения окисленной и восстановленной форм приведены на рис. 9.14. Из этих спектров видно, что за процессом окисления и восстановления можно следить, определяя поглощение при 275 нм.

Крогер и Клингенберг [2609] спектроскопически определили стационарную концентрацию восстановленного убихинона в митохондриальных частицах, используя в качестве субстратов сукцинат или NADH; было изучено влияние концентрации субстрата, а также действие специфических ингибиторов ферментов дыхательной цепи. Результаты исследования показали, что в опытах с обоими субстратами убихинон выступает как «обязательный интермедиат дыхательной цепи, а не является ее «слепым ответвлением»; группа убихинов ведет себя как функционально гомогенный пул.

Известно, что ферментная система, восстанавливающая убихинон, содержит негемовое железо; оно, вероятно, принимает участие в реакции.

В хлоропластах растений имеется группа близкородственных хинонов, известная под названием «пластохиноны». Они отличаются от убихинона тем, что с кольцом вместо $-\text{CH}_3$ связан $-\text{H}$, а вместо $-\text{OCH}_3$ -групп $-\text{CH}_3$ -группы. Функция пластохи-

нонов точно еще не установлена. Известно, однако, что они образуют одно из звеньев фотосинтетической цепи у зеленых растений (см. обзор [102]).

Витамин К. Имеются известные сомнения относительно того, содержится ли в митохондриях витамин К. Предположение о том, что он функционирует как переносчик в дыхательной цепи, еще не получило убедительных доказательств [5143]. В то же время известно, что витамин К и менадион (в особенности этот последний) могут подвергаться восстановлению и окислению в суспензии митохондрий. Обнаружена очень активная менадионредуктаза (КФ 1.6.5.2), осуществляющая восстановление менадиона (но не витаминов K_1 и K_2 или убихинона) за счет NADH или NADPH [2983]. Действие этого фермента подавляется незначительными концентрациями дикумарина, не оказывающими влияния ни на поглощение O_2 , ни на фосфорилирование в митохондриях. Если, следовательно, менадионредуктаза участвует в дыхательной цепи, то очевидно, что должен существовать и другой путь, который функционирует при добавлении дикумарина.

Цитохромы

Название «цитохром» предложено в 1925 г. Кейлином [2378] для группы внутриклеточных гемопротеидов, которые в восстановленной форме обладают четко выраженным характерным поглощением в видимой области. В настоящее время к цитохромам относят все внутриклеточные гемопротеиды, за исключением гемоглобина, миоглобина, пероксидазы и каталазы. В эту группу входят вещества, несущие различные биологические функции. Роль некоторых цитохромов неясна, но, по-видимому, все они функционируют путем последовательного окисления и восстановления. Из тех цитохромов, роль которых установлена, одни являются ферментами, а другие — просто переносчиками в процессах окисления и восстановления.

Спектр поглощения типичной системы цитохромов (компоненты a , b и c) с четырьмя полосами в видимой области наблюдал Мак-Мунн [2913] еще в 1886 г. при изучении ряда животных тканей; однако значение этих наблюдений было оценено только в 1925 г., когда Кейлин подтвердил их, а также, продолжив исследования, выделил компонент c и установил, что цитохромная система (цитохром + цитохромоксидаза) играет очень важную роль в процессах клеточного дыхания. Начиная с 1925 г. Кейлин провел ряд ставших классическими исследований [2378, 2379, 2380, 2382, 2384, 2385, 2386], в которых он изучил природу и механизм действия этой системы.

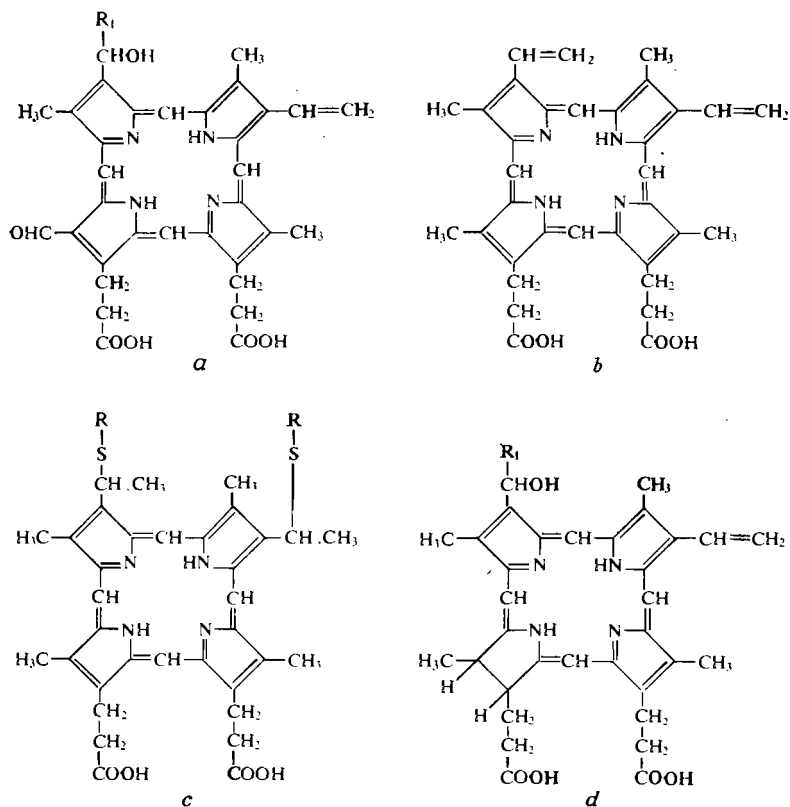


Рис. 9.15. Порфирины цитохромов *a*, *b*, *c* и *d*. Установлено, что R_1 — группа гема цитохромоксидазы — $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

Помимо открытых вначале трех цитохромов, Кейлин и другие исследователи обнаружили и ряд других, так что к настоящему времени известно уже свыше двенадцати широко распространенных цитохромов; у многих организмов обнаружены также цитохромы с несколько отличающейся структурой; они, однако, еще недостаточно полно охарактеризованы.

Основываясь на различиях в природе гемовой простетической группы, выделяют четыре группы цитохромов. Соответствующие четыре типа гемов, обозначаемые буквами *a*, *b*, *c* и *d*, различаются боковыми цепями порфириновых структур (см. рис. 9.15). Ниже приведены характерные черты четырех групп цитохромов [1266].

Цитохромы *a* — гемовая группа содержит формильную боковую цепь.

Цитохромы *b* — простетической группой является протогем, нековалентно связанный с белком.

Цитохромы *c* — боковые цепи гемовой группы ковалентно связаны с белком. (На рис. 9.15, *B* R-группы являются двумя цистеиновыми остатками одной полипептидной цепи; их связывание происходит в результате взаимодействия —SH-групп с винильными боковыми цепями протопорфирина.)

Цитохромы *d* — гемовая группа содержит дигидропорфирин (хлорин).

Если в цитохроме со специфическим белком связаны две разные гемовые группы, то в названии указывают оба типа гемов, например «цитохром *cd*». Если при обозначении цитохромов используются курсивные буквы без знака штрих, это означает, что атом железа координационно связан не только с четырьмя атомами азота порфирина, но также с определенными группами белка (пятая и шестая координационные связи). Например, в цитохроме *c* одна из координационных связей образуется с остатком гистидина, а другая — с остатком метионина. В обозначении цитохромов, у которых характер связей гемовой группы отличается от указанного, используется знак штрих (например, цитохром *c'*).

При обозначении цитохромов с хорошо установленной структурой используют числовой индекс, стоящий при букве, который указывает на принадлежность данного цитохрома к определенной подгруппе (например, цитохром *c₃*). При обозначении других цитохромов указывают длину волны (в нм) α -полосы в спектре восстановленной формы (например, цитохром *c*-554). Значение длины волны указывают для комнатной температуры, а не для температуры жидкого азота, и для абсолютно-го, а не разностного спектра поглощения. К сожалению, из-за технических трудностей в ряде работ измерения длин волн в спектре поглощения цитохромов были проведены не при комнатной температуре. Поскольку трудно предсказать, как изменяется длина волны полосы поглощения при изменении температуры, то сопоставление значений длин волн, приводимых в разных работах, оказывается невозможным. Более того, многие значения длин волн относятся к положениям пиков в разностных спектрах (т. е. кривым, полученным в результате вычитания из спектра восстановленной формы соответствующего спектра окисленной формы). Положение этих пиков может значительно отличаться от положения полос поглощения абсолютно-го спектра восстановленной формы. Поскольку различия в длинах волн полос поглощения двух цитохромов, принадлежащих к одной и той же группе, часто не выходят за пределы экспериментальных ошибок и оказываются даже меньшими, чем различия в длинах волн для одного цитохрома (по данным разных

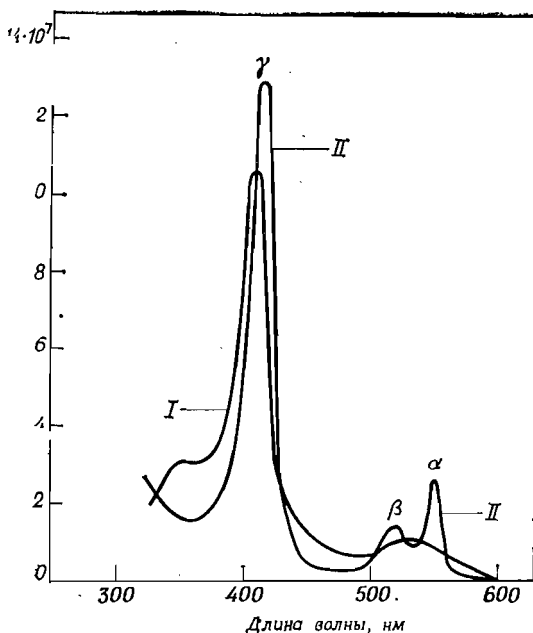


Рис. 9.16. Спектры поглощения окисленной (I) и восстановленной (II) форм цитохрома *c* [2976].

авторов), то неудивительно, что ряд цитохромов еще не отнесен ни к какой определенной подгруппе.

В типичном спектре поглощения индивидуального цитохрома (в восстановленном состоянии) имеются три основные полосы поглощения в видимой области; в порядке уменьшения длин волн они обозначаются как α -, β - и γ -полосы. Самой интенсивной, несомненно, является γ -полоса; α -полоса, обычно имеющая вид острого пика, интенсивней, чем β -полоса. Следует отметить, что у цитохромов *a* β -полоса поглощения выражена весьма слабо, а иногда и совсем отсутствует. В результате окисления восстановленной формы α - и β -полосы исчезают, поглощение в этой области становится диффузным; γ -полоса остается, но несколько смещается в сторону ультрафиолетовой области спектра, как видно на рис. 9.16.

Наблюдение за появлением и исчезновением α -полос в спектре позволяет следить за процессами окисления и восстановления разных цитохромов даже тогда, когда они находятся в живых тканях и суспензиях клеток.

Многие аэробные клетки имеют типичный спектр поглощения, обусловленный наличием в них цитохромов *a*, *b* и *c* митохондриальной дыхательной системы; он показан на рис. 9.17

Некоторые цитохромы и их характеристики

Цитохром	Характеристика
aa_3	Идентичен цитохром <i>c</i> -оксидазе (КФ 1.9.3.1); терминальная оксидаза дыхательной цепи, локализована во внутренней мембране митохондрий эукариотических клеток. Содержит две гемовые группы (типа <i>a</i>), возможно, связанные различным образом. Содержит также два атома меди на два гема. Этот цитохром восстанавливается восстановленной формой цитохрома <i>c</i> и окисляется O_2 . Его восстановленная форма связывает CO , причем последняя ингибирует цитохром, конкурируя с O_2 ; на свету соединение с CO диссоциирует. Этот цитохром ингибируется также цианидом. Длины волн полос поглощения: спектр восстановленной формы $\alpha=605$, $\gamma=405$ нм; комплекс с CO $\alpha=590$, $\gamma=430$ нм.
a_1	Обнаружен у ряда бактерий (например, <i>Acetobacter pasteurianum</i>). Восстановленная форма окисляется O_2 . Соединяется с цианидом. Длина волны полосы поглощения в спектре восстановленной формы: $\alpha=590$ нм.
b	Компонент митохондриальной дыхательной цепи; функционирует между субстратами и цитохромом c_1 . Имеются данные о наличии трех форм цитохрома <i>b</i> [995]. Длина волны полосы поглощения восстановленной формы: $\alpha=563$ нм. Мол. масса 13 700 (при кристаллизации из тканей личинки мясной мухи).
b_1	Обнаружен у ряда бактерий (например, <i>E. coli</i>). Длина волны полосы поглощения восстановленной формы: $\alpha=559$ нм.
b_2	Идентичен дрожжевой лактатдегидрогеназе (цитохромной) (КФ 1.1.2.3). Содержит один FMN на один гем. Представляет собой тетрамер с мол. массой 235 000.
b_3	Находится в микросомах растительных клеток. Длина волны полосы поглощения восстановленной формы: $\alpha=559$ нм. Мол. масса 40 000.
b_5	Находится в микросомах клеток животных тканей. Белок с небольшой молекулярной массой; содержит один гем на молекулу. Переносчик в окислительно-восстановительных процессах; восстанавливается NADH в присутствии цитохром b_5 -редуктазы (КФ 1.6.2.2). При обычном выделении с помощью липазы получают хорошо растворимый препарат. Мол. масса 11 000—12 000, его полипептидная цепь содержит 82—93 остатка. Получен в кристаллическом виде. Для фермента, выделенного из печени телянка, установлена трехмерная структура [3027]. Аминокислотные последовательности определены для препаратов фермента из шести видов млекопитающих. При выделении с помощью детергентов получают «вторую» форму фермента с мол. массой 16 700, имеющую дополнительный гидрофобный сегмент, содержащий 40—44 остатка. Этот сегмент удаляется при ферментативном гидролизе, а фермент переходит при этом в «первую» форму. «Вторая» форма фермента при удалении детергентов агрегирует. «Вторая» форма (но не «первая») спонтанно связывается с микросомами. Длина волны полосы поглощения восстановленной формы: $\alpha=556$ нм.

Цитохром	Характеристика
b_6	Находится в хлоропластах растений. Участвует в процессах фотосинтеза. Длина волны полосы поглощения восстановленной формы: $\alpha=563$ нм.
b_7	Находится в початке зантедешии эфиопской (<i>Zantedeschia aethiopica</i>). Восстановленная форма окисляется O_2 . Не ингибируется цианидом. Длина волны полосы поглощения восстановленной формы: $\alpha=560$ нм.
J-450	Сходен с цитохромами группы b; по-видимому, является группой цитохромов с различной специфичностью. Функционирует в гидроксилазных системах. Широко распространен; получен в кристаллическом виде из <i>Pseudomonas</i>. Мол. масса 45 000. Спектр поглощения: α-полоса выражена слабо; длина волны поглощения СО-комплекса восстановленной формы — $\gamma=450$ нм. Компонент дыхательной цепи митохондрий. Функционирует между цитохромом b и цитохром c-оксидазой (КФ 1.9.3.1). Небольшой белок (мол. масса 13 000) с одной гемовой группой в молекуле. Получен в кристаллическом виде из многих источников. Полная аминокислотная последовательность определена для белков более чем 40 видов; цитохромы позвоночных содержат 104 аминокислотных остатка (хотя у некоторых видов рыб число остатков равно 103); цитохромы насекомых и плесневых грибов содержат 107, а цитохромы растений — 111 аминокислотных остатков (по данным, полученным до настоящего времени). Трехмерная структура этого белка изображена на рис. 9.8. Окислительно-восстановительный переносчик на пути к O_2; восстановленная форма (в нейтральном растворе) окисляется O_2 только в присутствии цитохромоксидазы. Спектр поглощения восстановленной формы: α-полоса 550, β-полоса 520, γ-полоса 415 нм.
1	Компонент дыхательной цепи митохондрий; функционирует, вероятно, непосредственно перед цитохромом c . Мол. масса 210 000 (на один гем 37 000). Спектр поглощения восстановленной формы: $\alpha=553$ нм.
2	Обнаружен в ряде фотосинтезирующих бактерий; вероятно, является группой сходных между собой цитохромов, один из которых был назван цитохром c_4 , а другой цитохром c_5 . Небольшой растворимый белок (мол. масса 15 000). На молекулу белка приходится одна гемовая группа. Аминокислотная последовательность цитохрома c_2 содержит 112 остатков. Почти не взаимодействует с цитохром c -оксидазой млекопитающих. Цитохром c_2 <i>Rhodospirillum</i> (мол. масса 12 480; 112 остатков) функционирует как окислительно-восстановительный переносчик либо в процессах дыхания (в зависимости от условий). Пространственная структура определена с высоким разрешением [4057]. Вероятно, является первичным донором электронов для бактериохлорофилла.

Цитохром	Характеристика
c_3	Обнаружен в сульфатредуцирующих (и некоторых фотосинтезирующих) бактериях; это группа сходных цитохромов, один из которых содержит одну гемовую группу на молекулу белка, а другие — две группы. Расшифрована последовательность одного из белков; она содержит 107 остатков (или для белка другого штамма — 111 остатков). Мол. масса 13 000. Окислительно-восстановительный потенциал характеризуется большой отрицательной величиной.
c_b	Обнаружен в хлоропластах растений. Первоначально был назван цитохром <i>f</i> . Участвует в фотосинтезе. Мол. масса 110 000. На молекулу белка приходится две гемовые группы. Окислительно-восстановительный потенциал характеризуется большой положительной величиной. Длина волны полосы поглощения в спектре восстановленной формы: $\lambda = 555$ нм.
c'	Обнаружен в пурпурных фотосинтезирующих бактериях. Группа цитохромов типа <i>c</i> , у которых белок не является лигандом для 5 и 6 координационных связей атома Fe. Первоначальное название белка — RHP. По-видимому, единственными лигандами, которые легко связываются с цитохромом c' , являются NO и CO.
c -551	Выделен из <i>Pseudomonas</i> [97]. Белок имеет небольшую молекулярную массу. Аминокислотная последовательность (82 остатка) определена у цитохромов c -551 из трех штаммов.
d	Обнаружен у многих бактерий. Вероятно, является оксидазой в дыхательной цепи. Восстановленная форма окисляется O_2 и связывается с окисью углерода. Известен также как цитохром a_2 . Длины волн полос поглощения: окисленная форма, 645—650 нм; восстановленная форма 625—630 нм.

(при наблюдении в обычном спектроскопе). Вначале предполагали, что каждая из трех наблюдаемых α -полос соответствует индивидуальному цитохрому, однако впоследствии было показано, что каждая полоса является результатом наложения полос по крайней мере двух цитохромов, относящихся к одной группе; поскольку полосы располагаются очень близко друг к другу, они воспринимаются как одна полоса.

Например, в спектре поглощения препарата сердечной мышцы представлены α -полосы шести или семи различных цитохромов: a , a_3 , c , c_1 и, возможно, α -полосы трех цитохромов b .

Список цитохромов, который приводится в табл. 9.6, частично основан на соответствующих данных, приведенных в «Номенклатуре ферментов», изданной в 1972 г. [1266].

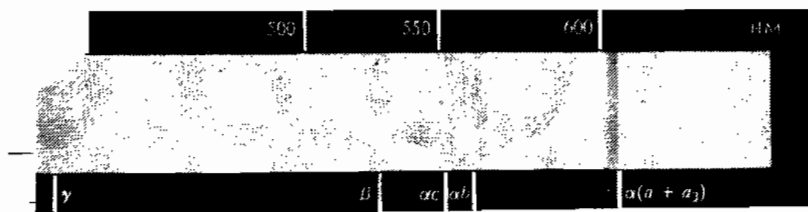


Рис. 9.17. Типичный спектр цитохромов аэробных клеток.

Главная трудность при изучении митохондриальной дыхательной системы и роли цитохромных компонентов состоит в том, что большинство цитохромов трудно получить в состоянии истинных растворов. За исключением цитохрома *c*, большая часть которого легко экстрагируется, остальные цитохромы выделяются с помощью таких жестких методов, как действие ультразвука, обработка детергентами или гидролиз ферментами. Субмитохондриальные частицы содержат значительные количества фосфолипидов, и по крайней мере некоторые реакции протекают в липидной фазе. Если при экстрагировании цитохромов процедура солюбилизации оказывается слишком жесткой, всегда остается подозрение, что в результате такой процедуры цитохромы оказались модифицированными. Если же действие детергентов оказывается слишком слабым, чтобы разрушить ассоциаты липид — белок, и вызывает только диспергирование ассоциатов в виде мелких частиц, то цитохромы могут оказаться связанными с гидрофобными структурами и будут «растворимыми» только в присутствии детергентов. Известно, что эти остатки гидрофобной структуры можно удалить с помощью ферментов и получить вполне определенный растворимый продукт. Можно возразить, что этот продукт является артефактом, однако такое возражение в равной мере относится к любому солюбилизованному фрагменту дыхательной системы. Очищенные компоненты этой системы не реагируют друг с другом при смешивании, если при этом одновременно не добавляются фосфолипиды.

Очищенный цитохром *c* изучен весьма детально. Он является стабильным растворимым белком. Подобно ряду других цитохромов, он имеет очень небольшую для белка молекулярную массу ($\sim 12\,000$) и мог бы называться полипептидом. Цитохром *c* получен в кристаллическом виде из многих источников. Более чем для 40 цитохромов *c* (из разных видов организмов) установлена полная аминокислотная последовательность [1017]. Несмотря на разнообразие биологических видов, из которых выделяли белок, его последовательность оказалась удивительно постоянной; отмечено лишь небольшое число положений, в

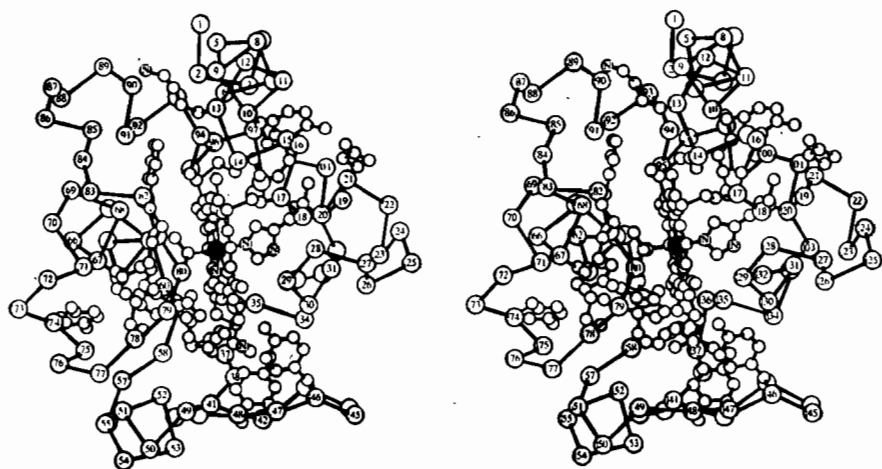


Рис. 9.18. Структура цитохрома *c* из сердца тунца [4642].

которых происходят мутации. Поэтому данный белок представляется идеальным объектом для построения эволюционного «генеалогического древа» [1017].

Методом рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная структура молекулы цитохрома *c* (из нескольких видов). Характер укладки полипептидной цепи у исследованных цитохромов меняется весьма незначительно; на рис. 9.18 представлено стереоизображение структуры цитохрома *c* из сердечной мышцы тунца (для этого цитохрома получены хорошие кристаллы [4642]). Для наглядности большинство боковых групп аминокислот не показано, однако некоторые наиболее важные на рисунке представлены. Цифрами в кружочках показаны положения α -углеродных атомов полипептидной цепи, а группа гема изображена в виде диска, расположенного примерно в центре молекулы. На рисунке представлена восстановленная форма; при окислении в разных частях молекулы происходят конформационные сдвиги групп, которые, однако, не настолько велики, чтобы вызвать существенные изменения в общей структуре молекулы. Эти вопросы подробно обсуждаются в работе [4642].

В обеих формах цитохрома группа гема располагается во впадине молекулы; она практически полностью окружена полипептидной цепью, за исключением одного края порфиринового кольца, локализованного у поверхности молекулы. Группа гема удерживается во впадине ковалентными связями, которые образуют боковые цепи порфиринового кольца с остатками Cys-14 и Cys-17, а также координационными связями атома железа с

His-18 и Met-80 и водородными связями Tyr-48, Thr-49, Asn-52, Trp-59 с цепочками пропионовой кислоты.

При окислении наиболее удивительным оказывается конфигурационное изменение, в результате которого остаток Phe-82 сдвигается вниз и влево в положение, при котором его фенильное кольцо оказывается расположенным над остатком, занимающим положение 70. Окисление сопровождается некоторыми другими изменениями структуры в этой области, в результате растворитель получает доступ в гемовый карман, достигая при этом левого верхнего края порфиринового кольца. Таким образом, когда при восстановлении карман закрывается, группа гема вместо окружения с относительно высокой диэлектрической постоянной оказывается в гидрофобном окружении с низкой диэлектрической постоянной. Гем как бы переходит из частично полярного в неполярное окружение [4642].

В течение многих лет восстановление и окисление цитохрома *c* трактовалось как простое присоединение электрона к атому железа и последующее его удаление (по аналогии с простым восстановлением и окислением ферри- и ферроионов). Все это, однако, весьма далеко от истины. В цитохроме атом железа, располагаясь в центре сложной координационной структуры, глубоко погруженной в молекулу, непосредственно недоступен. В работе [4642] приведены различного рода данные, свидетельствующие в пользу рассмотренного ниже механизма восстановления цитохрома *c* цитохром *c*-редуктазой и сукцинатом.

На рис. 9.19 прямоугольниками изображены кольца остатков Tyr-74, Trp-59 и Tyr-67 в ориентации, установленной рентгеноструктурным анализом (плоскость колец и плоскость рисунка взаимно перпендикулярны); на *A* представлена окисленная

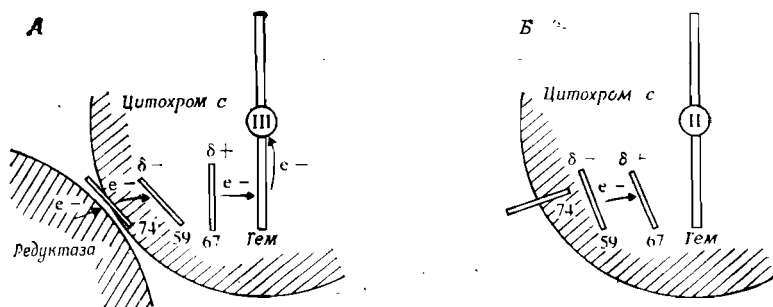


Рис. 9.19. Схема процесса восстановления цитохрома *c*, основанная на данных об ориентации ароматических колец и на экспериментах Майера [3308] по избирательной деструкции остатков метионина, тирозина и триптофана в молекуле белка [4642].

форма цитохрома, на *B* — восстановленная форма цитохрома. Согласно предложенному механизму, происходят следующие превращения:

1. Один электрон переходит от редуцтазы к Туг-74, а от него к Тгр-59 в результате перекрывания π -орбиталей. От тирозина на триптофан электрон мигрирует спонтанно, поскольку на более делокализованной кольцевой системе последнего он занимает энергетически более выгодную первую антисвязывающую орбиталь. Движение электрона от остатка 74 к остатку 59 направлено «сверху вниз».

2. Другой электрон переходит от Туг-67 к кольцу гема, создавая дефицит электронов у Туг-67. Переход электрона и в данном случае происходит от кольца с меньшей делокализацией электронов к кольцу с большей делокализацией, электронные уровни которого расположены ниже. На этот переход мог бы оказать влияние отрицательный заряд, обусловленный наличием избыточного электрона на соседнем Тгр-59, однако без перекрывания π -электронных облаков переход заряда от остатка 59 к остатку 67 оказывается невозможным.

3. При переходе от окисленной структуры цитохрома к восстановленной происходит конформационное изменение, в результате которого ароматические кольца Тгр-59 и Туг-67 оказываются параллельными, а их π -электронные облака перекрываются. Это конформационное изменение может быть обусловлено (полностью или частично) электростатическим притяжением Тгр-59, имеющего избыток электронов, и электрон-дефицитного Туг-67.

4. В результате перехода электрона от Тгр-59 к Туг-67 обе группы становятся нейтральными и молекула оказывается в конформации, характерной для восстановленной формы цитохрома.

Перенос электронов на первой и второй стадиях восстановления значительно облегчается, поскольку он происходит от менее делокализованной системы (тирозина) к более делокализованным системам. Переносу электрона на последней (четвертой) стадии способствует элиминирование ионной пары, локализованной внутри молекулы в среде с низкой диэлектрической постоянной; этот фактор — по крайней мере частично — понижает активационный барьер переноса заряда между ароматическими системами [4642].

Аргументы в пользу такого механизма получены при рассмотрении конформационных изменений, происходящих в процессе восстановления цитохрома *c*, а также на основании идентификации остатков, играющих существенную роль в этом процессе; эта информация была получена при изучении влияния химической модификации аминокислотных остатков в структурах цитохромов, выделенных из различных источников. Этот

механизм восстановления был подтвержден также рядом физических экспериментов.

Можно было бы ожидать, что окисление восстановленного цитохрома цитохром *c*-оксидазой осуществляется путем обращения рассмотренного процесса. Однако это не так. Химическая модификация остатков 74, 59, 67 или 80 препятствует восстановлению цитохрома редуктазной системой, но не влияет на процесс окисления восстановленного цитохрома оксидазой. С другой стороны, модификация остатка 13 не препятствует восстановлению с помощью редуктазы, но влияет на реакцию с оксидазой. Важная информация была получена в опытах с антителами, взаимодействующими с различными участками молекулы цитохрома. Антитела к участку молекулы в области остатка 58 не оказывают влияния ни на восстановление, ни на окисление. Другие антитела ингибируют восстановление, но не влияют на окисление, третьи же оказывают противоположное действие [2977]. Из этого следует, что процессы восстановления и окисления происходят «через» разные области поверхности молекулы цитохрома. Имеющиеся данные, в том числе результаты, полученные методом протонного магнитного резонанса, свидетельствуют о том, что «областью выхода электрона из ферроцитохрома *c* к цитохром *c*-оксидазе является край пиррольного кольца II» порфирина или же «связанный с боковой цепью этого кольца атом серы остатка Cys-17. Последний заметно выступает над поверхностью молекулы белка» [2977]. Можно, следовательно, заключить, что места входа и выхода восстановительных эквивалентов значительно удалены друг от друга на поверхности молекулы и путь транспорта электронов проходит буквально через *всю* молекулу. Возникает также вопрос, не может ли цитохром *c* одновременно связываться с редуктазой и оксидазой, образуя дыхательный комплекс.

Цитохром *c*, подобно другим цитохромам с небольшой молекулярной массой, является по существу переносчиком в окислительно-восстановительных процессах, транспортируя восстановительные эквиваленты от одной молекулы к другой, подобно тому, как это делает NAD. Поэтому его можно считать истинным кофактором дыхательной системы. Он не действует как фермент, активирующий специфический субстрат.

Цитохром *c*₂ *Rhodospirillum* был детально исследован Салеме и др. [4057] методом рентгеноструктурного анализа; в работе приведены стереоизображения структуры молекулы. Так же как в цитохроме *c* гем находится внутри молекулы, край его порфиринового кольца располагается вблизи поверхности, а атом железа координационно связан с остатками метионина и гистидина. Экспонированный край гема окружен одиннадцатью остатками лизина, так что в результате он оказывается в положительно заряженной области. Как и в цитохроме *c*, восстано-

ление происходит именно с этой стороны молекулы; восстановительный эквивалент переносится к атому железа по цепочке остатков, связанных друг с другом водородными связями. Согласно имеющимся данным, этими остатками являются Ser-89, Tyr-52, Tyr-70 и Met-91. В отличие от цитохрома *c* окисление происходит по тому же пути, но в обратной последовательности.

Цитохромоксидаза

Цитохром *aa₃* (цитохром *c*-оксидаза, КФ 1.9.3.1) осуществляет быстрое окисление восстановленного цитохрома *c* молекулярным O_2 ; в отсутствие этого фермента реакция протекает очень медленно. Цитохром *aa₃* является «терминальной» оксидазой главной дыхательной цепи митохондрий, он локализован во внутренней мембране митохондрий, с которой относительно прочно связан. Цитохром *aa₃* может быть солюбилизирован детергентами, при этом его получают в диспергированном состоянии; дальнейшую очистку осуществляют путем фракционирования в присутствии детергентов. В диспергированном состоянии оказываются также липиды из мембран и субъединицы различных белков; молекула оксидазы содержит два атома Cu и две группы гема типа *a*. Удаётся выделить, однако, только один тип гема. Гемовые группы несколько различаются по скорости реакций окисления и восстановления, взаимодействию с ингибиторами и по спектральным характеристикам, поэтому можно полагать, что они связаны с белком различным образом. Эти гемы получили названия: «гем *a*» и «гем *a₃*», отсюда и название «цитохром *aa₃*».

Цитохром *c*-оксидаза, находящаяся во внутренней мембране митохондрий сердечной мышцы быка, содержит шесть разных белковых субъединиц, которые получили номера от I до VI (не путать с комплексами I—IV митохондриальной дыхательной цепи, рассматриваемыми ниже). Гомогенные препараты шести белковых субъединиц были выделены методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [558]. Они обладают гидрофобными свойствами; определены их молекулярные массы и аминокислотный состав. Значения молекулярных масс, найденные разными авторами, различаются на несколько процентов; согласно последним данным [1294] они равны: I — 40 000, II — 22 500, III — 15 000, IV — 11 200, V — 9 800, VI — 7 300, так что самые мелкие субъединицы можно рассматривать как полипептиды.

В цитохромоксидазе из дрожжей и *Neurospora*, вероятно, имеется не шесть, а семь субъединиц, из которых три самые большие весьма гидрофобны и синтезируются на митохондриальных рибосомах; другие четыре субъединицы более гидро-

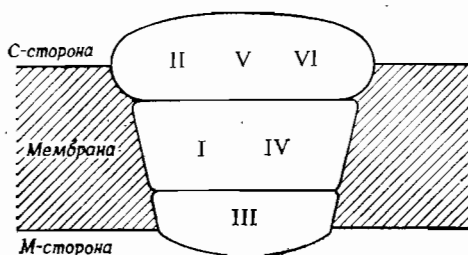


Рис. 9.20. Схема асимметричной упаковки субъединиц цитохром *c*-оксидазы во внутренней мембране митохондрий сердца быка [1294]. Размер и форма различных субъединиц (или групп субъединиц) выбраны произвольно.

фильны и синтезируются на цитоплазматических рибосомах [4112].

В работе Рэкера [1294] приведены данные об относительном расположении субъединиц оксидазы из сердечной мышцы быка, полученные путем обработки мембраносвязанной оксидазы диазобензолсульфонатом, меченным изотопами. Этот реагент взаимодействует с белками неспецифично, однако не может проникнуть в глубь мембраны. Полученные результаты показаны на рис. 9.20. Внутренняя мембрана на рисунке заштрихована; ее нижняя поверхность (М-сторона) находится в контакте с матриксом или внутренней областью митохондрии, а верхняя сторона (С-сторона) контактирует с пространством, расположенным между внутренней и внешней мембранами, т. е. с областью, из которой восстановленный цитохром *c* подходит к оксидазе. В предшествующих работах было показано, что область, в которой происходит связывание с лигандами, конкурирующими с кислородом, такими, как СО и азид, находится на М-стороне внутренней мембраны.

С помощью весьма остроумных приемов оказалось возможным избирательно обрабатывать препараты диазореагентом либо с С-стороны, либо с М-стороны. После этого субъединицы разделяли и определяли метки на каждой из них. Когда реагент действовал на С-сторону (на интактных митохондриях), то существенное количество метки обнаруживалось только в субъединицах II, V и VI, если же он действовал на М-сторону, то метилась субъединица III. Ни в одном случае не было обнаружено метки в субъединицах I или IV, что указывает на недоступность этих субъединиц для диазореагента. При использовании препаратов очищенной оксидазы метка была обнаружена в субъединицах II, III, V и VI, но не в I и IV; если фермент перед обработкой диазореагентом подвергался действию додецилсульфата натрия, то все шесть субъединиц оказывались мечеными.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что расположение оксидазы в мембране примерно соответствует схеме, пред-

ставленной на рис. 9.20; оксидаза образует асимметричный мостик между двумя сторонами мембраны. Ко времени написания книги положение гемовых групп и атомов меди в структуре оксидазы еще не было установлено, однако имеются данные, которые позволяют предполагать, что гем a_3 находится на М-стороне, а гем a , который, как следует из кинетических данных, первым взаимодействует с цитохромом c , находится на С-стороне, и что субъединицы V и VI участвуют в связывании цитохрома c . Данные, свидетельствующие о доступности оксидазной системы для аскорбата, подтверждают, что субъединица II находится на С-стороне.

В ходе окислительно-восстановительной реакции, катализируемой оксидазой, восстановительные эквиваленты, вероятно, переходят от С-стороны к М-стороне через расположенные в центре субъединицы; в этой же области, по-видимому, локализованы атомы меди, хотя прямых данных об их локализации пока не получено.

В интактной системе окислительно-восстановительная реакция сопряжена с окислительным фосфорилированием, сохраняя таким образом энергию для клетки. Согласно хемиосмотической теории (см. гл. 12), сопряжение осуществляется путем поляризации митохондриальной мембраны; это возможно только при асимметричном расположении компонентов дыхательной цепи. Поэтому весьма интересно, что подобные свойства присущи оксидазной системе.

В отношении механизма действия оксидазы отметим, что большинство рассмотренных ниже данных было получено в опытах с препаратами очищенной оксидазы, которая катализирует окислительно-восстановительный процесс, но не сопрягает его с фосфорилированием. Окисленная форма оксидазы, выделенной из тканей млекопитающих, весьма специфично восстанавливается восстановленной формой цитохрома c млекопитающих. При титровании с цитохромом c установлено, что для восстановления одной молекулы оксидазы требуется четыре восстановительных эквивалента; в этой реакции происходит восстановление обоих гемов и обоих атомов меди. Оксидазу из тканей млекопитающих можно восстановить также определенными химическими восстановителями, однако цитохром c из бактерий реагирует с ней весьма медленно. Полностью восстановленная форма оксидазы быстро окисляется до полностью окисленной формы. Это, однако, не означает, что в данном процессе участвуют только полностью восстановленная и окисленная формы. Полное восстановление оксидазы с помощью цитохрома c в отсутствие молекулярного кислорода протекает медленно (по сравнению с ее каталитической активностью в аэробных условиях). Фактически анаэробное восстановление происходит в две стадии: на первой стадии восстанавливается гем a , а на второй,

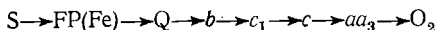


Рис. 9.21. Последовательность компонентов митохондриальной системы. Малыми латинскими буквами обозначены цитохромы. S — субстрат, например сукцинат, NADH и т. д. FP (Fe) — специфичный к определенному субстрату флавопротеидный фермент, с которым каким-то образом связано негемовое железо. Q — убинон.

значительно более поздней, восстанавливается гем a_3 . В опытах с очищенной оксидазой и восстановленным цитохромом c в обычной аэробной тест-системе цикл окисления и восстановления цитохрома c (в оптимальных условиях) длится всего 2 мс. При восстановлении же оксидазы восстановленным цитохромом c в анаэробных условиях 50% гема a восстанавливается приблизительно за 0,1 с, тогда как такое же количество гема a_3 восстанавливается за 7 с [2755]. Можно, следовательно, предположить, что в процессе нормального катализа в присутствии O_2 полностью восстановленная форма оксидазы играет второстепенную роль.

Одна из двух гемовых групп оксидазы (гем a_3) может связывать дыхательные ингибиторы CO или HCN , изменяя при этом свой спектр поглощения; гем a ингибиторы не связывает. Поскольку известно, что CO и O_2 конкурируют за связывание с оксидазой, можно сделать заключение, что с O_2 реагирует гем a_3 . Блокирование a_3 -группы ингибиторами препятствует окислению как a -, так и a_3 -группы, но не препятствует их восстановлению. Как уже упоминалось, восстановленный цитохром c реагирует предпочтительно с гемом a ; это позволяет предполагать, что гемы a и a_3 в дыхательной цепи функционируют не параллельно, а последовательно.

Соединение CO с a_3 -группой диссоциирует на свету, при этом восстанавливается каталитическая активность. Если построить график зависимости эффективности восстановления оксидазной активности от длины волны, то полученная кривая будет соответствовать спектру поглощения соединения a_3 -группы с CO . Это один из главных аргументов в пользу того, что данный цитохром идентичен цитохром c -оксидазе [2385, 2617, 4991].

Подробное рассмотрение дыхательной системы митохондрий, которая осуществляет окисление субстратов молекулярным кислородом, относится к разделу промежуточного метаболизма и выходит за рамки данной книги. Кратко можно сказать, что эта система содержит несколько окислительно-восстановительных переносчиков и ферментов, образующих цепь; каждый из компонентов восстанавливает следующий компонент по ходу цепи. Митохондриальная система млекопитающих представлена на рис. 9.21, где стрелками указано направление перехода восстановительных эквивалентов от одного компонента системы к другому.

На рисунке видно, что для каждого субстрата цепочка состоит из трех частей, связанных между собой низкомолекулярными окислительно-восстановительными переносчиками (убихинон или цитохром *c*). Адекватность этой схемы подтверждается тем, что при обработке холатом было получено несколько отдельных «комплексов», соответствующих отдельным частям цепи; «комплекс I» включает часть цепи $\text{NADH}-\text{Q}$, «комплекс II» — сукцинат— Q , «комплекс III» — Q —цитохром *c*, и, наконец, «комплекс IV» — это по существу неочищенная цитохромоксидаза. Эти комплексы, однако, надо рассматривать как «артефакты» соответствующих частей цепи; так, обработка холатом оказывает влияние, в частности, на поведение «комплексов» по отношению к некоторым ингибиторам и на эффективность взаимодействия их с добавленными убихиноном или цитохромом *c* [1266]. Тем не менее эти комплексы помогают установить порядок компонентов цепи; так, комплексы I и II содержат (различные) флавопротеиды, комплекс III содержит цитохромы *b* и *c*₁, а комплекс IV — цитохром *aa*₃. Свидетельством в пользу того, что приведенная на рисунке последовательность компонентов действительно имеет место, может служить также действие ингибиторов. HCN, который ингибирует цитохром *aa*₃, препятствует окислению молекулярным кислородом всех остальных компонентов цепи; антимицин А (при использовании в качестве субстрата сукцината) переводит цитохром *b* и все расположенные слева от него компоненты в восстановленное состояние, а цитохром *c*₁ и компоненты справа от него — в окисленное.

Рассматриваемая цепь, однако, не так проста, как это изображено на рисунке. Большинство компонентов ее было обнаружено спектрофотометрически, и вполне возможно, что имеются другие компоненты, которые пока не выявлены, поскольку у них нет интенсивных полос поглощения (например, негемовые железосодержащие белки различных типов). Кроме того, в процессе окисления не одна, а несколько стадий связаны с фосфорилированием ADP до ATP, что вносит дополнительные осложнения. Окислительное фосфорилирование, однако, слишком обширная тема, выходящая за рамки данной книги (см. гл. 12).

Цитохром P-450

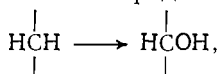
Рассмотренная выше система — не единственная дыхательная система в клетке, а митохондрия — не единственная органелла, участвующая в процессе дыхания. В микросомах имеются два других гемопротеида, цитохромы *b*₅ и P-450. Функция цитохрома *b*₅ в дыхательной системе пока не установлена, хотя известно, что его восстанавливает специфическая флавопротеидная редуктаза. Цитохром P-450 отвечает за потребление определен-

ной части кислорода микросомами клеток животных тканей; в большом количестве цитохром Р-450 содержится в митохондриях надпочечников.

Название «цитохром Р-450» не соответствует той номенклатуре, которая принята для цитохромов, однако вносить какие-либо изменения, по-видимому, уже поздно. Цитохром Р-450 представляет собой гемопротеид, который содержит гем *b*. Поэтому, рассматривая его как цитохром, следовало бы использовать название цитохром *b*. Спектр поглощения его восстановленной формы нетипичен для цитохромов (в частности, α -полоса не имеет вида острого пика). Цитохром Р-450 не поглощает при 450 нм, как можно было бы предполагать по его названию; полоса поглощения в этой области наблюдается для его соединения с СО, что и послужило основанием для названия. Способность к связыванию с СО не является характерной для цитохромов (хотя a_3 обладает таким свойством). Сродство цитохрома Р-450 к СО гораздо выше, чем у a_3 (по крайней мере, если судить по конкуренции с кислородом). Как и в случае соединения a_3 с СО, соединение Р-450 с СО диссоциирует на свету; можно, следовательно, получить «спектр действия», соответствующий спектру поглощения комплекса Р-450—СО.

Имеются основания полагать, что цитохром Р-450 является не индивидуальным гемопротеидом, а объединяет группу ферментов с одинаковыми простетическими группами, но с разной специфичностью. Можно провести аналогию с флавопротеидами — группой ферментов, содержащих флавиновую простетическую группу и имеющих одинаковые спектры поглощения, но разную специфичность, что связано с различием апоферментов. Цитохромы Р-450, выделенные из разных источников, имеют примерно одинаковые спектры поглощения, но значительно различаются по субстратной специфичности. Соответствующие данные приведены в работе [2755].

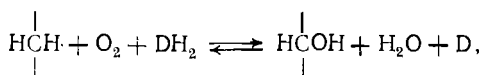
Основной функцией цитохрома Р-450 является катализ процесса гидроксирования стероидов, лекарственных веществ, ароматических соединений и жирных кислот; он действует как один из компонентов гидроксилазных систем с различной субстратной специфичностью. Некоторые из этих систем входят в подгруппы 1.14.14 и 1.14.15 Списка ферментов; имеются, вероятно, и другие системы такого типа. Во многих случаях реакцию гидроксирования можно представить в виде схемы



однако в других случаях углерод может находиться в ароматическом кольце.

Характерная особенность гидроксилазной системы заключается в том, что окисление осуществляется молекулярным O_2 ,

при этом один из атомов переходит в —ОН-группу, а другой включается в состав H_2O . Для восстановления второго атома кислорода требуется два восстановительных эквивалента, которые должны быть поставлены дополнительным донором. В процессе реакции происходит, следовательно, сопряженное окисление молекулой O_2 двух молекул — субстрата и донора; например,



где DH_2 — молекула донора. В роли доноров часто выступают NADPH или NADH ; в этом случае система содержит флавопротеид, катализирующий за счет NAD(P)H восстановление окислительно-восстановительного переносчика, функционирующего в системе. Следовательно, NAD(P) фактически не является компонентом каталитического механизма.

Природа окислительно-восстановительных переносчиков в разных системах различна. В гидроксилазах бактерий или митохондрий надпочечников в роли переносчика может выступать один из негемовых железосодержащих белков такого же типа, как ферредоксин в растениях; эти переносчики получили названия рубредоксин, адренодоксин и т. д. в зависимости от источника, из которого они были выделены. Переносчики разных гидроксилазных систем обычно не могут заменять друг друга; это положение справедливо и для флавопротеидных редуктаз.

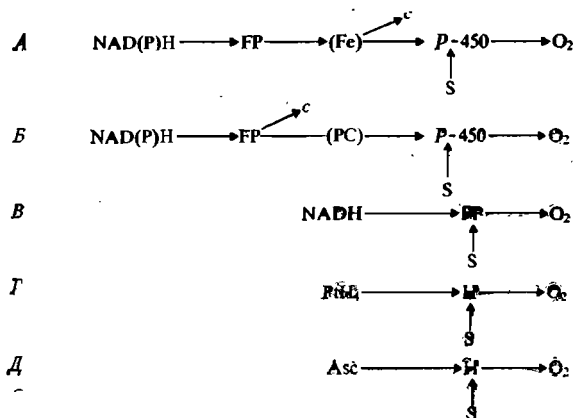


Рис. 9.22. Последовательность компонентов гидроксилазной системы. А. Митохондриальная и бактериальная системы Р-450. Б. Микросомальная система Р-450. В—Д — системы, в которых не участвует Р-450. FP — флавопротеидный фермент; Fe — содержащий негемовое железо белок ферредоксина; РС — фосфатидилхолин; S — гидроксилируемый субстрат; РН₄ — тетрагидроптеридиновый кофактор; Asc — аскорбат; Н — гидроксилаза неизвестной природы.

Гидроксилазная система рассматриваемого типа приведена на рис. 9.22, А.

В гидроксилазных системах микросом, насколько известно в настоящее время, нет негемовых железосодержащих белков. Цитохром Р-450 восстанавливается флавопротеидом, однако на этой стадии необходим фосфатидилхолин; механизм действия последнего не установлен. Этот тип гидроксилазной системы приведен на рис. 9.22, Б.

Митохондриальная гидроксилазная система (рис. А) имеет определенное сходство с митохондриальной дыхательной системой (рис. 9.21), если учесть, что цитохром Р-450 является цитохромом *b*-типа. В обоих случаях мы имеем последовательность от NAD(P)H к флавопротеиду, затем к негемовому железосодержащему белку и, наконец, к цитохрому *b*-типа. В обеих системах терминальные оксидазы (aa_3 и Р-450) соединяются с СО (последний конкурирует с O_2). Следует, однако, отметить, что в гидроксилазной системе цитохром *b* является терминальной оксидазой, в то время как в дыхательной системе перед терминальной оксидазой включены цитохромы *c*. Хотя гидроксильные системы способны восстанавливать цитохром *c*, этот процесс не связан с гидроксильрованием.

Исследования, проведенные с антителами, специфичными к цитохром *c*-редуктазе [301] и аденодоксину [302], показали, что флавопротеид микросомальной системы (рис. Б) идентичен NADPH-цитохромредуктазе (КФ 1.6.2.4), способной восстанавливать цитохром *c*, а флавопротеид митохондриальной системы (рис. А) идентичен аденодоксинредуктазе (КФ 1.6.7.1). Последняя не способна восстанавливать цитохром *c*, но восстанавливает негемовый железосодержащий белок аденодоксин (аденодоксин восстанавливает цитохром *c*). Восстановление цитохрома *c* митохондриальной системой ингибируется в отсутствие аденодоксина или в присутствии специфичных к нему антител (в такой же мере ингибируется и восстановление Р-450); в микросомальной системе в этих условиях ингибирование не наблюдается. Наоборот, антитела к цитохром *c*-редуктазе ингибируют восстановление цитохромов *c* и Р-450 в микросомальной системе, но не влияют на этот процесс в митохондриальной системе. Рассматриваемые флавопротеиды являются, следовательно, совершенно разными и не взаимозаменяемыми.

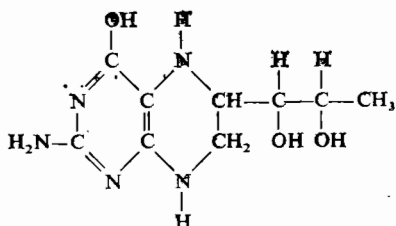
Механизм действия цитохромов Р-450 находится в стадии изучения; состояние вопросов было недавно рассмотрено в работе [2463]. Предполагается, что субстрат связывается с ферри-формой цитохрома Р-450, которая затем восстанавливается в ферро-форму одной из цепей, изображенных на рис. 9.22. Для этой стадии требуется, вероятно, только один восстановительный эквивалент. Затем молекула O_2 присоединяется к атому железа образовавшегося комплекса и реагирует с субстратом; в процес-

се, несомненно, участвует второй восстановительный эквивалент, но детали механизма еще не выяснены. Субстратная специфичность определяется, вероятно, только связывающим участком Р-450.

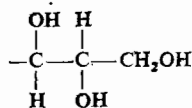
Большинство работ с рассматриваемыми системами проведено не с чистыми компонентами, так как очень трудно отделить Р-450 от микросомальных мембран. В нескольких случаях флавопротеид и ферредоксин удалось разделить, а в одном случае [камфора — 5-монооксигеназа (КФ 1.14.15.1) из индуцированной камфорой *Pseudomonas putida*, где эта оксигеназа растворима] цитохром Р-450 был получен в чистом виде и закристаллизован [1182]. Его иногда называют цитохромом Р-450_{cam}; он образован одной полипептидной цепью и содержит одну гемовую группу. Мол. масса этого цитохрома 46 000, его свойства рассмотрены в работе [2755].

Не все гидроксилазы относятся к типам (А) или (Б), содержащим Р-450 (подгруппы 1.14.15 или 1.14.14 в Списке ферментов). Многие гидроксилазы, катализирующие сходные процессы гидроксирования, не содержат Р-450. Эти гидроксилазы включены в подгруппу 1.14.13; почти все они бактериального происхождения, хорошо изучены, четыре фермента получены в гомогенном кристаллическом виде. Это индивидуальные флавопротеиды, содержащие один FAD на молекулу (мол. масса от 60 000 до 90 000), не содержат металлов или других белков. На рис. 9.22 эти гидроксилазы находятся в группе (Б). Флавопротеид связывает субстрат, и образовавшийся комплекс восстанавливается NADH. Восстановленный комплекс связывает O₂, а затем распадается с образованием окисленного флавопротеида, гидроксированного субстрата и воды; механизм процесса находится в стадии изучения. В одном случае было показано, что для восстановления флавопротеида NADH необходим субстрат.

Природа гидроксилаз подгруппы КФ 1.14.16 не установлена; имеются указания, что они содержат железо. Донором для этих ферментов (почти все они получены из тканей животных) является не NAD(P)H, а специфический кофактор, тетрагидро-*L*-эритробиоптерин

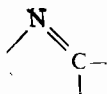


Тетрагидроэритробиоптерин



Тетрагидротреонеоптерин

(за исключением одной бактериальной системы, которая использует тетрагидро-*L*-треонеоптерин). Этот кофактор восстанавливает гидроксилазу, при этом сам окисляется до дегидро-формы, содержащей группу



Эти гидроксилазы на рис. 9.22 находятся в группе (Г). Если в систему с рассматриваемыми гидроксилазами ввести дигидроптеридинредуктазу (КФ 1.6.99.7), то в качестве донора может выступить NADPH, а кофактор будет действовать как окислительно-восстановительный переносчик. В отсутствие редуктазы в качестве донора может выступать аскорбат, поскольку он восстанавливает дигидроптеридин [2357].

Ферменты подгруппы 1.14.17, использующие в качестве донора аскорбат, по-видимому, не нуждаются в кофакторе (см. рис. 9.22, Д); один из ферментов получен в гомогенном виде, он содержит медь. Ферменты подгруппы 1.14.11 также нуждаются в аскорбате (вместе с ферро-ионами), при этом одновременно необходим 2-оксоглутарат, функция которого, однако, не вполне ясна. Некоторые полагают, что аскорбат является донором (как в случае рассмотренных выше гидроксилаз), а оксоглутарат — активатором; другие же считают, что аскорбат является активатором, а оксоглутарат — донором.

Наконец, несколько малоизученных гидроксилаз входят в подгруппу 1.14.99. Ферменты 1.14.99.5 и 1.14.99.16 являются железосодержащими белками, их иногда называют «цианид-чувствительным фактором». В отличие от цитохромов Р-450, которые ингибируются СО, но не цианидом, рассматриваемые ферменты ингибируются цианидом, но не СО.

ПЕРЕНОСЧИКИ ФОСФАТА

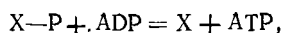
Наиболее многочисленный класс среди ферментов переноса образуют рассмотренные выше оксидоредуктазы; они переносят восстановительные эквиваленты от одной молекулы к другой при участии окислительно-восстановительного переносчика. Второй по величине класс образуют ферменты, переносящие фосфатные группы при участии переносчиков фосфата (132 фермента групп 2.7.1—2.7.4), а также ферменты, переносящие замещенные фосфатные группы (62 фермента групп 2.7.6—2.7.9), в том числе нуклеотидильные группы.

ADP и т. д.

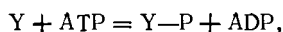
Наиболее универсальным переносчиком фосфата, безусловно, является ADP, который, принимая фосфатную группу, переходит в АТФ, а затем последний передает эту группу на соответствующую

щий акцептор. Из 132 ферментов, участвующих в переносе незамещенной фосфатной группы, не менее 114 специфичны к ADP; их называют «киназами». Ферменты, участвующие в переносе замещенных фосфатных групп, не столь однородны; некоторые из них используют в качестве акцептора CDP, GDP или UDP; ряд ферментов катализируют реакции равновесия дифосфат — монофосфат (а не дифосфат — трифосфат).

Киназную реакцию можно записать следующим образом:



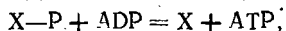
где P обозначает фосфатную группу, а X—P — субстрат-донор. Далее с помощью другой киназы может осуществляться другая реакция:



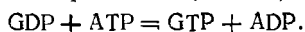
где Y — акцептор фосфата. Суммарным процессом является катализируемый двумя киназами (при участии ADP в качестве переносчика или кофактора) перенос фосфатной группы от X на Y. В данном процессе функция ADP аналогична функции NAD как окислительно-восстановительного переносчика (кофактора), функционирующего в системе, включающей две дегидрогеназы.

При превращении ADP в ATP образуется пирофосфатная связь; эта связь характеризуется более высокой энергией гидролиза, чем, например, обычная связь сахар — фосфат, поэтому ее принято называть «богатой энергией связью». Если связь Y—P (см. выше) также богата энергией, то вторая реакция будет легко обратимой, если же нет — ATP будет фосфорилировать Y практически полностью.

Энергия связи ATP является движущей силой многих биологических процессов, например синтеза белка (см. гл. 11), поэтому ATP следует рассматривать не только как переносчик фосфата, но и как источник энергии. Это можно проиллюстрировать на примере рибосомной системы, которая при синтезе белка использует GTP. Рассмотрим, однако, путь образования последнего. Допустим, что в результате окислительного процесса генерируется богатое энергией соединение X—P, далее должна произойти катализируемая киназой реакция

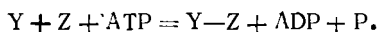


а затем вторая киназная реакция (2.7.4.6)



Таким образом, система, включающая две киназы, обеспечивает генерацию GTP.

После первой киназы может, однако, вступить в действие не вторая киназа, а синтетаза:

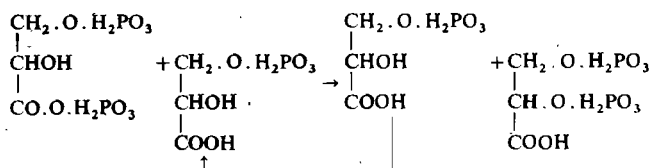


В этом случае энергия для синтеза новой молекулы $Y-Z$ из Y и Z поступает в конечном счете за счет распада $X-P$; ADP же выступает как переносчик энергии.

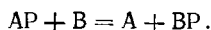
Наряду с двухферментными системами, в которых перенос фосфата осуществляется ADP, имеется группа ферментов (КФ 2.7.5), которые катализируют перенос фосфата от одного субстрата к другому без участия специального переносчика. В этом случае на ферменте происходит связывание обоих субстратов, между которыми происходит перенос фосфата, и богатые энергией связи в процесс не вовлекаются.

Коферменты фосфомутаз

О необычном механизме фосфомутазной реакции уже упоминалось на с. 664. Он отличается от других механизмов ферментативных реакций тем, что здесь в результате переноса одного фосфатного остатка кофермент превращается в продукт, а эквивалентное количество субстрата превращается в кофермент. Почти во всех случаях (КФ 2.7.5.1—2.7.5.3), когда фосфат переносится из положения a в положение b , коферментом служит a, b -бисфосфат. В одном случае (КФ 2.7.5.4), однако, a, b -бисфосфат превращается в b, c -бисфосфат; коферментом при этом служит b -монофосфат:



Эти фосфомутазные реакции представляют собой частные случаи трансферазной реакции общего типа



В рассмотренных выше реакциях первого типа AP идентично BP, в реакциях второго типа A идентично B. Механизм действия фермента КФ 5.4.2.1 отличается от рассматриваемого выше.

ПЕРЕНОСЧИКИ CO_2

Биотин — соединение, уже давно известное как витамин — играет роль кофактора ферментов, катализирующих карбоксилирование или перенос CO_2 [2897, 2899]. Он является протетической группой карбоксилирующих ферментов группы КФ 6.4.1, а также ферментов КФ 2.1.3.1, 4.1.1.41 и 6.3.4.5. Наряду с

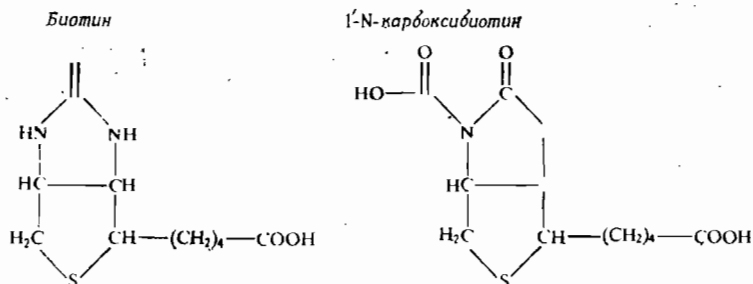


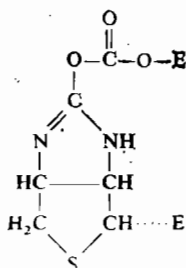
Рис. 9.23. Структура биотина и 1'-N-карбоксибиотина.

наступающие в организме при потреблении больших количеств яичного белка, являются следствием биотиновой недостаточности, вызванной белком авидином, который имеет высокое сродство к биотину и тормозит в печени различные реакции карбоксилирования.

Биотиновая простетическая группа связана с белковой частью фермента ковалентно; было показано, что в ряде случаев связывание осуществляется специальными синтетазами (например, КФ 6.3.4.9, 6.3.4.10 и 6.3.4.11) за счет энергии АТР.

Механизм действия биотина изучали Линен и др. [2899], используя метилкротонил-СоА — карбоксилазу (КФ 6.4.1.4). Они полагали, что присоединение CO_2 приводит к образованию 1'-N-карбоксипроизводного (см. рис. 9.23); после метилирования и ферментативного гидролиза комплекса фермент — биотин — CO_2 они выделили метилированное производное этого соединения.

Это представление было, однако, недавно поставлено под сомнение; исследования, которые провели Пратт и Брюс [3739] с использованием химических аналогов, показали, что N-карбоксипроизводные являются плохими карбоксилирующими агентами, в то время как соответствующие O-производные оказались очень эффективными. Эти авторы предполагают, что биологически активным является соединение



и что 1'-N-производное, полученное после деградации комплекса, образуется в результате спонтанной миграции HO_2C -группы от O к N перед метилированием. Они показали далее, что такая миграция легко происходит в модельных экспериментах. Не следует, однако, забывать о том, что поведение химических веществ в отсутствие ферментов не всегда служит хорошим ориентиром для суждения о превращениях, которые эти вещества претерпевают, будучи связаны с активным центром фермента.

ПЕРЕНОСЧИКИ АМИНОГРУПП (АМИНОКИСЛОТ)

Пиридоксальфосфат

Пиридоксальфосфат служит простетической группой большого числа ферментов, катализирующих несколько типов реакций с участием аминокислот, за исключением реакций образования или гидролиза пептидных связей. В большом классе реакций переаминирования пиридоксальфосфат выступает как переносчик аминогрупп; в ряде других случаев реакции не могут быть столь четко охарактеризованы.

Впервые кофактор в очищенном виде получили Гейл и Эппс [1490], а также Браунштейн и Крицман [536] в 1943 г. при выделении кофермента лизиндекарбоксилазы (КФ 4.1.1.18) и аспартат:пируват трансминазы соответственно. На следующий год Гунзалус и др. [1712] показали, что пиридоксальфосфат (но не пиридоксаль) активирует тирозиндекарбоксилазу (КФ 4.1.1.25); наконец, в 1952 г. Бэддилей и Матиас [225] установили структуру соединения в результате полного синтеза.

Присоединение пиридоксальфосфата (иногда сокращенно обозначаемого PLP) к апоферменту происходит весьма медленно; это позволяет предполагать, что процесс является относительно сложным. По крайней мере для некоторых случаев из-

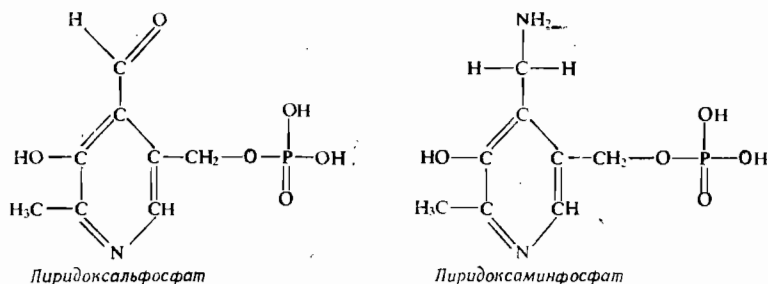


Рис. 9.24. Структура пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата.

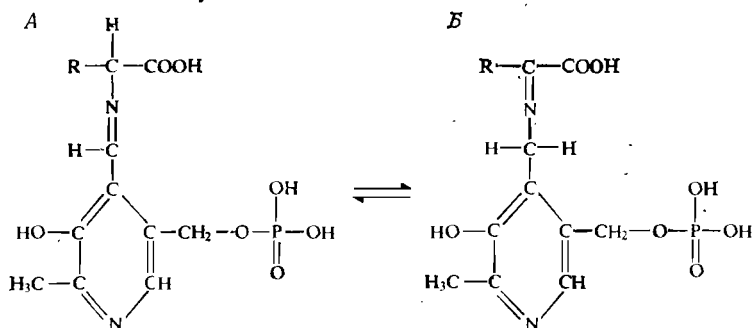


Рис. 9.25. Шиффово основание, образуемое пиридоксальфосфатом.

вестно, что процесс связан с агрегацией субъединиц фермента в тетрамер (сама по себе агрегация недостаточна для активации фермента). В ряде случаев было показано, что пиридоксальфосфат образует шиффово основание с боковым остатком лизина фермента, возможно, однако, что с группами фермента связано несколько групп кофермента (в частности, альдегидная, фосфатная, а также атом азота). Сродство кофермента к апоферменту значительно варьирует у разных ферментов.

Детали реакций, катализируемых PLP-протеидными ферментами, рассмотрены в обзорах [2168] и [4364], а также (с точки зрения стереохимии) в обзоре [1171]; этот материал является, однако, слишком сложным, чтобы обсуждать его здесь в полном объеме.

Характерной особенностью действия PLP является образование шиффова основания в результате взаимодействия альдегидной группы с аминогруппой субстратной аминокислоты (рис. 9.25, А). Шиффово основание может подвергаться таутомеризации, как показано на рис. 9.25, Б. Судьба образовавшегося соединения зависит от природы апофермента, с которым связан PLP, и от группы R. На основе приведенной общей схемы сразу же становится ясным действие рацемаз аминокислот (группа КФ 5.1.1), поскольку в форме Б утрачивается асимметрия α -углеродного атома. В случае действия аминотрансфераз (группа КФ 2.6.1) происходит гидролиз двойной связи в форме Б, в результате образуются пиридоксаминфосфат и оксокислота, а при обращении этой реакции аминокислота переносится на другую оксокислоту [2230]; таким образом, PLP действует как переносчик аминокислот. При функционировании декарбоксилаз (ферменты КФ 4.1.1.12—4.1.1.25, 4.1.1.53, 4.1.1.64) карбоксильная группа оказывается лабильной, легко выделяется CO_2 , а затем освобождается аминный продукт в результате гидролиза по двойной связи в структуре А. В ряде других случаев из комплекса удаляется вода или некоторые другие молекулы;

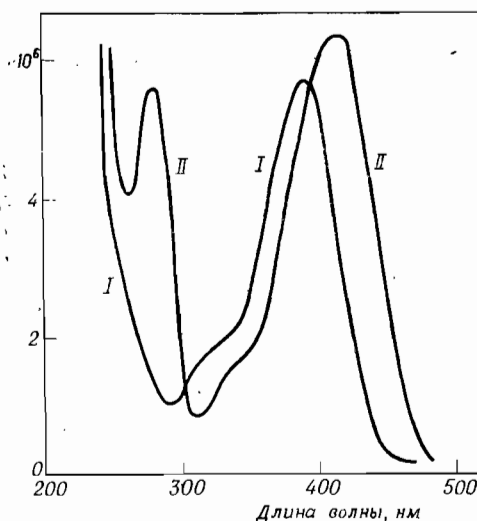


рис. 9.26. Спектры поглощения пиридоксальфосфата и его соединения с глицином [445]. *I* — пиридоксальфосфат, *II* — пиридоксальфосфат + 0,1 М глицин. Бикарбонатный буфер (рН 7,2).

∴ PLP остается связанным ненасыщенное соединение, которое затем освобождается в результате гидролиза. В качестве примеров можно привести ферменты групп КФ 2.1.2, 4.1.99, 4.2.1, 2.9.9 и 4.4.1, а также ферменты КФ 1.4.3.6, 2.3.1.37, 3.7.1.3 и 3.1.9. Таким образом, пиридоксальфосфат является коферментом большого числа различных ферментов.

Пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат в ближней ультрафиолетовой области имеют полосы поглощения при 395 и 330 нм соответственно. Спектр поглощения пиридоксальфосфата показан на рис. 9.26; данные по спектрам поглощения приведены в работах Браунштейна [532] и Дженкинса и Сайзера [2230].

Спектрофотометрические исследования показали [445], что свободный пиридоксальфосфат может неспецифически соединяться с аминокислотами в отсутствие ферментов (рис. 9.26). При изучении переноса NH_2 -группы от пиридоксаминфосфата было установлено [277], что образование шиффова основания является относительно быстрой стадией; лимитирует скорость процесса стадия таутомеризации, показанная на рис. 9.25. Было также найдено, что K_m пиридоксальфосфатных ферментов для их субстратов (аминокислот) в большинстве случаев равны константам диссоциации и по крайней мере в одном случае константа диссоциации и K_m изменяются аналогичным образом при изменении рН [2886]. Специфичность по отношению к определенным

аминокислотам и тип катализируемой реакции определяются белковой частью фермента; так, трансаминазы не катализируют декарбоксилирования аминокислот, а декарбоксилазы не катализируют реакций переаминирования, и ни одна из этих групп ферментов не обладает рацемазной активностью. Почти все эти ферменты высокоспецифичны по отношению к своим субстратам — определенным аминокислотам.

Рассматривая рис. 9.25, необходимо принимать во внимание связывание некоторых групп кофермента с апоферментом. Полагают, что PLP связан с активным центром через фосфат, азот пиридина и альдегидную группу. Известно, что последняя соединена с лизиновой группой фермента, образуя шиффово основание (в «неактивном» состоянии фермента). Полагают, что на первой стадии катализа лизиновая группа вытесняется из соединения с коферментом аминокислотой [4364], а образованию шиффова основания способствует ОН-группа, которая образует водородную связь с азотом аминокислоты. Аминокислота связывается с активным центром карбоксильной и R-группами.

Известен случай, когда пиридоксальфосфат действует по другому механизму; это имеет место при активации мышечной фосфорилазы (КФ 2.4.1.1), с которой пиридоксальфосфат прочно связан. Механизм реакции еще не выяснен, ясно только, что шиффово основание не образуется. Для активности важна фосфатная группа пиридоксальфосфата.

2-оксоглутарат

Рассматривая группу КФ 2.6.1, можно отметить, что почти все аминотрансферазы используют в качестве акцептора аминокислоты 2-оксоглутарат. Поскольку реакции переаминирования являются обратимыми, оксоглутарат, получив аминогруппу от субстрата одной трансферазы (превратившись при этом в глутамат), может затем передать ее субстрату (оксокислоте) другой трансферазы, действуя, таким образом, как переносчик аминокислоты. (Эта ситуация аналогична той, которая наблюдается при функционировании NAD с соответствующими дегидрогеназами.) Перенос аминокислоты является специфической функцией оксоглутарата; данные о том, что какая-либо другая оксокислота может функционировать как переносчик при переаминировании, отсутствуют.

ПЕРЕНОСЧИКИ ГЛИКОЗИЛЬНЫХ ГРУПП

UDP

Среди гексозилтрансфераз группы КФ 2.4.1 не менее 55 ферментов переносят гексозильные группы на UDP или от него. UDP, следовательно, может функционировать как переносчик

гексоз (на своей концевой фосфатной группе), распределяя их между различными субстратами-акцепторами, подобно тому, как это происходит при функционировании других рассмотренных выше переносчиков. В некоторых случаях вместо UDP переносчиками могут быть GDP или CDP; для ферментов группы пентозилтрансфераз (КФ 2.4.2) UDP, по-видимому, вообще не является переносчиком.

В других немногочисленных случаях (например, при функционировании эпимераз группы КФ 5.1.3 и нескольких синтетаз группы КФ 6.3.2) связь субстрат—UDP не вовлекается в реакцию переноса (эта реакция осуществляется не двумя, а одним ферментом); UDP при этом действует, по-видимому, просто как «рука», за которую фермент удерживает субстрат.

ПЕРЕНОСЧИКИ АЦИЛЬНЫХ ГРУПП

В настоящее время изучение промежуточного обмена жиров привлекло внимание к важности процесса переноса ацильных групп, особенно с участием переносчиков, содержащих тиоловые группы, с которыми ацильные группы образуют тиоловые эфиры. Эти богатые энергией соединения наряду с богатыми энергией фосфатными соединениями выполняют важную функцию переноса энергии в биологических системах.

Кофермент А

Этот важный кофермент был впервые открыт как кофермент ацетилирования в печени и у микроорганизмов Липманом в 1947 г. Строение его выяснено главным образом в результате работ школы Липмана, а синтез был осуществлен частично химическим и частично ферментативным путем [223]. Ферментативный путь биосинтеза кофермента А выяснен полностью. Строение кофермента показано на рис. 9.27. Он представляет собой 3'-фосфо-ADP-пантоил-β-аланилцистеамин и, следовательно, в известной мере сходен с адениндинуклеотидом, у которого второй нуклеозид заменен пантетеином (т. е. пантотенилцистеамином). Подобно NADP, он содержит третью фосфатную группу у рибозного остатка адениловой кислоты, но в данном случае фосфатная группа находится не в положении 2, а в положении 3.

Свойства. Кофермент А — бесцветное вещество, имеющее в ультрафиолетовой области полосу поглощения при 257 нм, связанную с наличием остатка аденина.

Ацильные группы могут присоединяться к тиоловой группе кофермента А либо в результате переноса от другой молекулы,

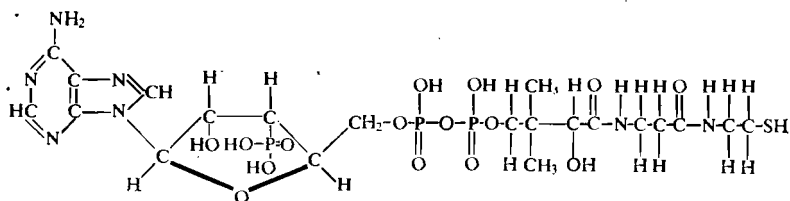


Рис. 9.27. Структура кофермента А.

либо в результате синтетазной реакции. Ферменты подгруппы КФ 6.2.1 катализируют образование тиоловых эфиров кофермента А из свободных кислот, используя энергию АТФ или (в двух случаях) ГТФ. Из 63 ацилтрансфераз группы КФ 2.3.1 56 переносят ацильную группу на кофермент А или от него, в том числе 32 фермента переносят ацетильную группу. Ацильная группа переносится от соединений, в которых она связана с атомами S (6 случаев), N (19 случаев), O (22 случая), C (7 случаев) или с фосфатом (2 случая).

В этих системах кофермент А переносит ацильную группу от одной молекулы к другой таким же образом, как переносчики в рассмотренных выше системах. Кофермент А, однако, участвует также в реакциях другого типа, когда переносимая на него ацильная группа удаляется из субстрата в результате реакции лиазного типа (в продукте образуется двойная связь). 16 лиаз группы КФ 4.1.3 (всего их 31) используют в качестве акцептора ацильной группы кофермент А. При протекании реакции в обратном направлении ацильная группа (обычно ацетильная) присоединяется по двойной связи субстрата. В результате синтетазной реакции такого типа образуется ряд важных метаболитов, в том числе цитрат, малат и гидроксиметилглутарил-СоА.

Ряд ферментов, функционирующих с коферментом А, может использовать также более простые аналоги кофермента, например N-ацетилцистеамин, другие, однако, строго специфичны к коферменту А.

Ацил-переносящие белки

Это название было дано другому, сравнительно недавно открытому переносчику ацильных групп, выделенному из бактериальных систем *E. coli* и *Clostridium butyricum*. Мол. масса этого переносчика составляет всего примерно 8500, так что его скорее можно считать полипептидом, чем белком; он термостабилен. В молекулу белка входит один остаток 4'-фосфопантетеина, являющийся (так же как в коферменте А) активной группой; его тиоловая группа выступает в роли акцептора [47].

Указанные выше бактериальные ферменты проявляют выраженное предпочтение к этому белку (по сравнению с коферментом А), однако в некоторых случаях ферменты взаимодействуют с обоими переносчиками. Из четырех ацилтрансфераз КФ 2.3.1.38—2.3.1.41 два фермента вначале взаимодействуют с ацил-СоА; ацильная группа при этом переносится на тиоловую группу фермента, а затем на переносящий белок; ацильная группа, следовательно, поочередно взаимодействует с тремя разными тиоловыми группами. Третий и четвертый ферменты переносят ацильные группы от ацил-переносящего белка на акцепторы. Акцептор для четвертого фермента должен находиться в комплексе со второй молекулой ацил-переносящего белка.

Ацил-переносящие белки участвуют также в реакциях, катализируемых ферментами КФ 1.1.1.100, 1.3.1.9—1.3.1.10 и 3.1.4.14.

Карнитин

ОН
|
ОН

Карнитин $((\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COO}^-)$ проникает через мембрану митохондрий и действует как переносчик ацильных групп через эту мембрану. Кофермент А является значительно более крупной молекулой, чем карнитин: ни ацил-кофермент А, ни сам кофермент А не могут проникать в митохондрии. Поскольку ацильные группы переносятся от кофермента А на карнитин (и обратно) ферментом КФ 2.3.1.7, то при добавлении к митохондриям ацил-кофермента А и карнитина может осуществляться перенос ацильных групп в митохондрии. Вначале в наружной среде ацильная группа переносится на карнитин ацилтрансферазой, затем происходит перенос ее через мембрану в составе ацил-карнитина и, наконец, она переносится на кофермент А ацилтрансферазой внутри митохондрий, где подвергается метаболическим превращениям (в частности, окислению).

Бромацетил-кофермент А является сильным ингибитором ацилтрансфераз. При введении в среду он ингибирует окисление добавленного к митохондриям ацил-кофермента А, но не ацил-карнитина. Это обусловлено тем, что бромацетил-кофермент А препятствует переносу ацила с ацил-кофермента А на карнитин снаружи от митохондрий; в этих условиях в митохондрии могут попасть только ацильные группы ацил-карнитина, добавленного в среду. Бромацетил-кофермент А, как отмечалось выше, не способен проходить через мембрану митохондрий и, следовательно, ингибировать ацилтрансферазу внутри митохондрий, поэтому окисление ацильной группы ацил-карни-

тина (после переноса на кофермент А внутри митохондрий) протекает беспрепятственно. В то же время бромацетил-карнитин, способный проникать через мембрану, ингибирует ацилтрансферазу как снаружи, так и внутри митохондрий, поэтому он ингибирует окисление митохондриями как ацил-кофермента А, так и ацил-карнитина [4816, 4817]. Высказано предположение, что ацил-карнитин фактически не попадает во внутреннее пространство митохондрий, а осуществляет перенос ацильной группы на кофермент А на внутренней стороне мембраны митохондрий.

ПЕРЕНОСЧИКИ ОДНОУГЛЕРОДНЫХ ГРУПП

В процессах синтеза и распада ряда аминокислот и пуринов происходит перенос одноуглеродных фрагментов в форме оксиметильной, формильной, формиминной и метильной групп. Перенос осуществляется тетрагидроfolатом или его производными; метильная группа переносится также аденозилгомоцистеином и витамином В₁₂. Биотин, играющий роль простетической группы, которая функционирует как переносчик CO₂, уже рассматривался выше.

Тетрагидроfolат

Уже довольно давно было известно, что важную роль в реакциях переноса одноуглеродных групп играет какое-то производное фолиевой кислоты. Из работ Блекли [444] вытекает, что

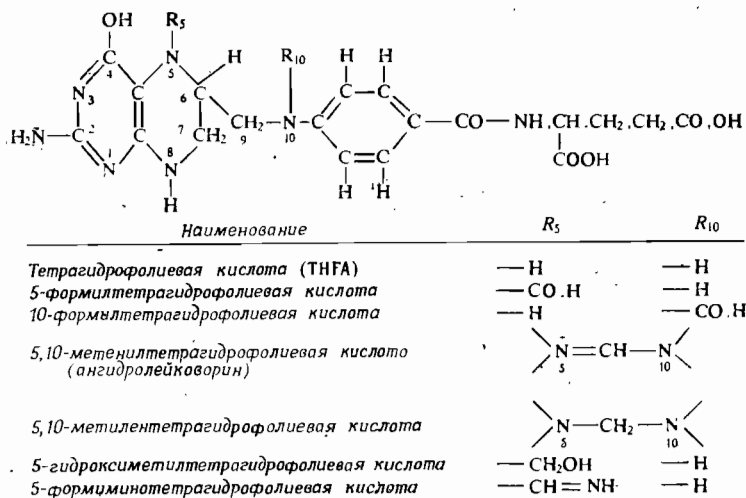
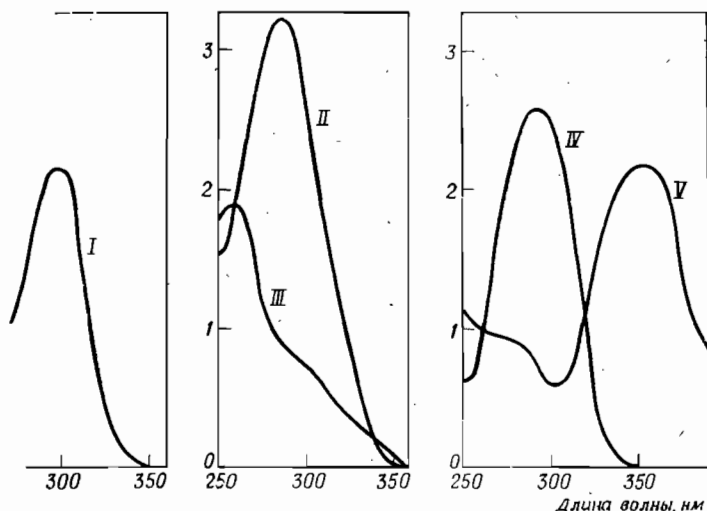


Рис. 9.28. Структура производных тетрагидроfolата.



9.29. Спектры поглощения тетрагидрофолата и некоторых его производных. I — THFA; II — 5-формил-THFA; III — 10-формил-THFA; IV — 5,10-метилтен-THFA; V — 5,10-метенил-THFA.

ивным переносчиком является не сама фолиевая кислота: птеридиновое ядро переносчика должно быть восстановлено до тетрагидроформы (рис. 9.28). Это восстановление происходит ферментативным путем в неочищенных ферментных препаратах, поэтому в опытах, где используются такие препараты, фолат оказывается активным. Однако, например, с очищенными препаратами ферментной системы из животных тканей, которая превращает глицин в серин, активностью, как выяснилось, обладают только ди- или тетрагидрофолат. С аналогичной ферментной системой из бактерий активным оказывается уже не сам тетрагидрофолат, а только его полиглутаматно производное.

Свойства. Тетрагидрофолат представляет собой бесцветное вещество; однако и сам он, и его производные имеют характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области (рис. 9.29). Тетрагидрофолат легко самоокисляется и в присутствии молекулярного кислорода быстро превращается в дигидрофолат. Он окисляется также ферментативным путем при участии NADP^+ . Фолат восстанавливается до ди- и тетрагидрофолата в присутствии фермента из печени (КФ 1.5.1.3) и NADPH ; бактериальный фермент специфически катализирует восстановление дигидрофолата до тетрагидрофолата [449, 5280].

THFA функционирует как переносчик метильных, оксиметильных, формильных и формиминных групп. В результате

ваться свободные одноуглеродные соединения; формальдегид реагирует с THFA неферментативным путем, но для взаимодействия формата с THFA необходимы АТР и соответствующая синтетаза. В результате ферментативного переноса оксиметильной группы на THFA образуется производное с метиленовым мостиком, однако не исключено, что в качестве промежуточного продукта образуется 5-гидроксиметил-THFA [446]; при ферментативном переносе формиминогруппы образуется только 5-формимино-THFA, тогда как при ферментативном переносе формильной группы может образоваться либо 5-формил-, либо 10-формил-THFA, либо производное с метениловым мостиком. Формилтрансфераза, представленная на рисунке (КФ 2.1.2.6), катализирует образование 5-формил-THFA; при действии двух других формилтрансфераз (КФ 2.1.2.2, 2.1.2.3) (они не указаны на рисунке), участвующих в синтезе пуринов, образуется производное с метениловым мостиком и 10-формил-THFA соответственно. NADH в присутствии дегидрогеназы может восстановить производное с метиленовым мостиком в метилпроизводное, являющееся скорее всего 5-метил-THFA, затем метильная группа при участии фермента переносится на кофермент В₁₂, который также функционирует как переносчик метильных групп [1700] (см. ниже).

Тетрагидрофолат отличается от других переносчиков в том отношении, что переносимая им группа, будучи в связанном состоянии, может претерпеть изменение; в таком случае группа, перенесенная на акцептор, оказывается неидентичной той, которая была вначале присоединена переносчиком. К переносчику, например, может присоединиться формильная группа, а на акцептор после превращения будет перенесена оксиметильная группа.

Главные ферменты, которые функционируют с THFA, — это четыре дегидрогеназы КФ 1.5.1.3—1.5.1.6, двенадцать трансфераз КФ 2.1.1.13—2.1.1.14 и 2.1.2.1—2.1.2.10, гидролазы КФ 3.5.1.10 и 3.5.4.9, дезаминазы КФ 4.3.1.4 и синтетазы КФ 6.3.2.12, 6.3.3.2 и 6.3.4.3.

Аденозилгомоцистеин

Кантони [675] показал, что для переноса метильной группы метионина на другие вещества (трансметилирования) необходим АТР и что в каждом случае в процессе участвуют два фермента. Первый фермент, метионинаденозилтрансфераза (КФ 2.5.1.6), образует S-аденозилметионин путем переноса аденозильной группы АТР на метионин, при этом освобождается одна молекула пирофосфата и одна молекула фосфата. Во вто-

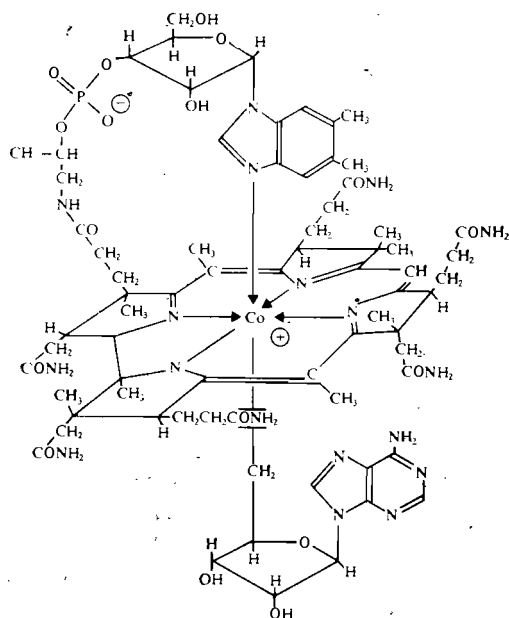
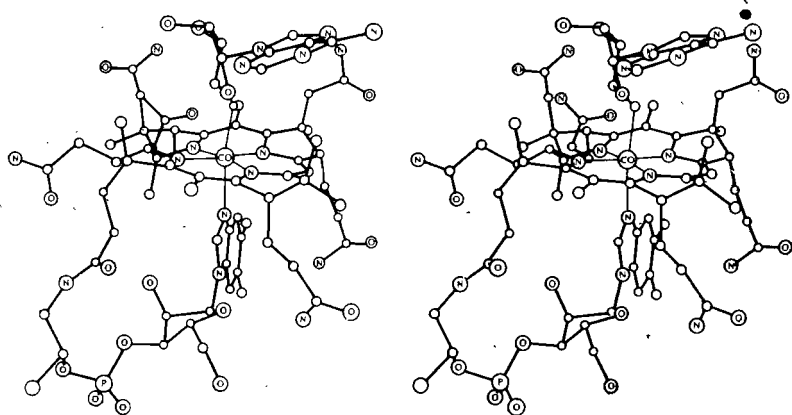


Рис. 9.31. Структура ко-фермента В₁₂ [288, 2757—2758].



рой стадии группа CH_3^+ переносится от образовавшегося сульфониевого соединения (при этом остается аденозилгомоцистеин) на другие соединения, например на никотинамид или гуанидин-ацетат. Этот перенос катализируется специфическими метил-трансферазами (КФ 2.1.1), из которых к настоящему времени охарактеризовано 54. Так как переносы, катализируемые метил-трансферазами, обратимы, то аденозилгомоцистеин выступает как переносчик метильных групп, катализируя таким образом большое число биологически важных процессов метилирования.

Кобамидные коферменты

Эти коферменты, относящиеся к группе витамина В₁₂, содержат атом кобальта в центральном кольце — сложной кольцевой структуре, напоминающей порфирин, но вместе с тем и существенно отличающейся от него. Вопросы химии и терминологии витамина В₁₂ и его производных подробно освещены в монографии Смита [4343].

На рис. 9.31 приведена структура главного из встречающихся в природе коферментов. Он содержит 5'-дезоксиаденозин, который присоединен по положению 5 рибозы связью углерод—кобальт. В клетках большая часть витамина В₁₂ присутствует, по-видимому, в форме кофермента В₁₂ или близкородственных ему коферментов, хотя обычно витамин выделяется в артефактной форме (кобальт оказывается связанным с цианидом или другими группировками). Кофермент может функционировать как переносчик метильных групп [1700]. В результате ферментативного переноса метильной группы от 5-метил-THFA образуется метилкобаламин, в котором метильная группа присоединена непосредственно к кобальту вместо группы дезоксиаденозина. Эта метильная группа может быть перенесена от метилкобаламина на гомоцистеин с образованием метионина ферментом КФ 2.1.1.13.

Кофермент выступает также в роли кофактора в реакциях изомеризации, в которых происходит внутримолекулярный перенос групп от одного углеродного атома к соседнему углеродному атому цепи. Механизм реакций, катализируемых ферментами КФ 5.4.99.1, 5.4.99.2, 5.4.99.4, как было установлено с помощью изотопов, основан на миграции карбоксильной группы (между соседними атомами углерода); ферменты КФ 5.4.3.2—5.4.3.6 катализируют миграцию аминогруппы от одного углеродного атома к другому, а ферменты КФ 4.2.1.28, 4.2.1.30—миграцию гидроксильной группы с образованием альдегид-гидрата, например $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$. Было показано, что в ходе некоторых неферментативных реакций изомеризации, катализируемых трехвалентным кобальтом, происходит образование свободных радикалов; миграция групп, связанных с углеродом, происходит в пределах молекулы к атому, имеющему свободную связь [1209].

Механизм действия коферментов в составе ферментов КФ 1.4.3.8 и 1.17.4.2 еще не установлен.

ПЕРЕНОСЧИКИ СУЛЬФАТА

Аденозин-3',5'-бисфосфат

Ферменты группы КФ 2.8.2 катализируют перенос сульфатных групп. Во всех этих реакциях участвует переносчик сульфа-

та — аденозин-3',5'-бисфосфат, который, присоединяя сульфатную группу, образует 3'-фосфоаденилилсульфат.

Фосфоаденилилсульфат может образоваться также из аденилилсульфата; последний образуется при действии трансферазы КФ 2.7.7.4, которая переносит АМР-группу от АТР на сульфат (при этом освобождается пирогосфат). В другом случае фермент КФ 2.7.7.5 переносит на сульфат АМР-группу от АДР (освобождается фосфат). Далее аденилилсульфат фосфорилируется АТР (с помощью киназы КФ 2.7.1.25) и образуется 3'-фосфоаденилилсульфат.

Последний, участвуя в реакциях, катализируемых 14 сульфотрансферазами группы КФ 2.8.2, является донором сульфата для различных органических соединений; органические сульфаты гидролизуются 11 гидролазами группы КФ 3.1.6. Гидролизу с освобождением сульфата подвергаются также аденилилсульфат и фосфоаденилилсульфат (ферменты КФ 3.6.2.1—3.6.2.2). Наконец, аденилилсульфат может быть восстановлен до аденилсульфита редуктазой КФ 1.8.99.2.

ПЕРЕНОСЧИКИ АЛЬДЕГИДНЫХ ГРУПП

Тиаминдифосфат

Способность этого вещества служить кофактором впервые установили Ломан и Шустер [2856] в 1937 г.; они выделили из дрожжей кристаллическое вещество, определили его химическую природу и показали, что оно является простетической группой пируватдекарбоксилазы, которая, как обнаружили позднее Грин, Херберт и Субраманиян [1644], представляет собой тиаминдифосфатпротеид. Строение тиаминдифосфата показано на рис. 9.32.

Помимо декарбоксилазной системы тиаминдифосфат участвует также в функционировании пируватоксидазной и 2-оксоглутаратоксидазной систем и системы, катализирующей образование ацетона. Уже давно известно, что в реакциях,

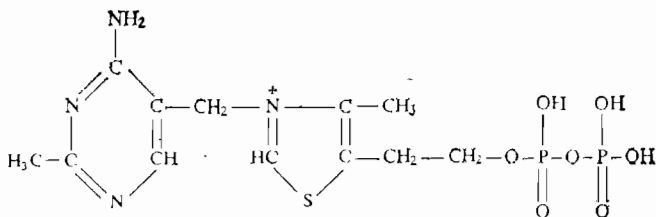
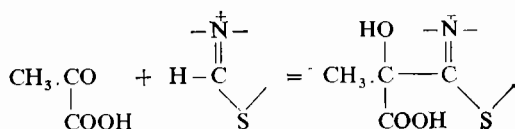
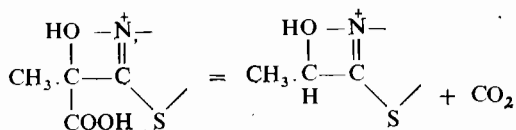


Рис. 9.32. Структура тиаминдифосфата.

связанных с превращениями пирувата, в результате декарбоксилирования образуется присоединенный к кофактору остаток «активного ацетальдегида». Строение промежуточного соединения было однозначно установлено в работах [2014, 2585]. Местом присоединения активного ацетальдегида оказался реакционноспособный атом С между атомами S и N в тиазоловом кольце. Вначале происходит присоединение пирувата, как это схематически изображено ниже (показана лишь та часть тиазолового кольца молекулы тиамина, к которой присоединяется пируват):



Образовавшееся соединение претерпевает быстрое декарбоксилирование:



В результате образуется α -гидроксиэтилтиаминдифосфат, который и является соединением, содержащим остаток «активного ацетальдегида».

Судьба этого соединения зависит от природы фермента. Декарбоксилаза катализирует его прямой распад с образованием ацетальдегида; в случае пируватдегидрогеназы (оксидазная система) вначале происходит окисление липоатом до ацетильного производного (помимо липоата в качестве акцепторов могут выступать также и некоторые другие соединения, например феррицианид или индофенол), а затем перенос ацетильной группы на восстановленный липоат.

Другие ферменты, действующие на 2-оксокислоты, например 2-оксоглутаратдегидрогеназа, вероятно, имеют аналогичный механизм действия; тиаминдифосфат выступает в этом случае как переносчик более сложных групп. Было показано, что транскетолаза (КФ 2.2.1.1), переносящая гликольальдегидную группу от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат, образует промежуточное соединение, представляющее собой, как полагают, α,β -дигидроксиэтилтиаминдифосфат [2016].

Глава 10

Структура ферментов

В энзимологии одним из наиболее интересных и трудно-разрешимых является вопрос о том, каким образом молекулярная структура ферментов обеспечивает их необыкновенно высокую каталитическую активность и специфичность. Издавна считали, что получить ответ на этот вопрос практически невозможно, поскольку определение полной химической и геометрической (трехмерной) структуры молекулы фермента представлялось чрезвычайно трудной задачей.

До последнего времени о структуре ферментов судили на основании косвенных данных. Результаты всесторонних исследований показали, что если не считать тех немногих ферментов, которые содержат особые простетические группы, то все ферменты состоят из таких же аминокислот, из которых построены обычные белки, так что их каталитическая активность обусловлена особенностями структуры, определяемой расположением различных аминокислот. Молекулярные массы ферментов чаще всего определяли физическими методами; есть указания на то, что молекулы ферментов по форме обычно близки к сферам или эллипсам. Согласно результатам кинетических исследований, в ферментах имеются определенные субстратсвязывающие участки; число их на молекулу невелико — чаще всего это один или два участка. Феномен специфичности свидетельствует о том, что субстратсвязывающий участок по своей структуре комплементарен субстрату и что связывание субстрата обусловлено наличием в этом участке групп, способных образовывать водородные связи и расположенных так, что они могут взаимодействовать с соответствующими группами субстрата. Результаты опытов, в которых исследовали действие некоторых специфических химических реагентов на ферменты, позволили составить представление о природе химических групп, участвующих в катализе, а результаты, полученные при использовании меченных изотопами субстратов, в ряде случаев позволили высказать предположение об отдельных этапах ферментативного процесса.

На основании этих отрывочных сведений удалось построить

схемы оставались весьма гипотетическими и неполными, а точный механизм действия ферментов и природа каталитической активности были до конца неясными.

Однако приблизительно с 1965 г., когда началось стремительное накопление данных о химической и физической структуре ферментов, ситуация в корне изменилась. Была определена не только полная аминокислотная последовательность, но и трехмерная структура, положение различных химических групп, форма активных центров ряда ферментов, а также установлено, каким образом субстрат соединяется с ферментом.

Успехи последних лет следует отнести в основном на счет двух главных достижений: одного в области химии, другого — физики.

Первое из достижений основывалось на применении к изучению ферментов методов определения аминокислотной последовательности полипептидов и белков, разработанных Сэнгером [4065]. В основе метода лежит гидролиз белков с помощью чистых пептидаз, а не сильных кислот. Пептидазы в отличие от сильных кислот обладают специфичностью и расщепляют определенные пептидные связи (гл. 6), поэтому молекулы ферментов гидролизуются не до аминокислот, а до пептидных фрагментов различной длины; эти фрагменты могут быть выделены и проанализированы. Поскольку при действии разных пептидаз образуются пептиды с перекрывающимися последовательностями аминокислот, можно расположить фрагменты в том порядке, в котором они находятся в исследуемом ферменте, хотя этот процесс является очень трудоемким. Естественно, чтобы начать анализ, надо иметь чистый фермент.

Первым белком, полную аминокислотную последовательность которого определил Сэнгер [4065], был инсулин, низкомолекулярный белок, не обладающий ферментативной активностью. В 1963 г. была установлена аминокислотная последовательность еще двух ферментов — рибонуклеазы [4362] и лизоцима [669] (оба этих фермента также имеют небольшую молекулярную массу — ниже, чем средняя молекулярная масса большинства ферментов), а в следующем году Хартли [1797] опубликовал данные о последовательности аминокислот у более типичного фермента, α -химотрипсина, молекула которого приблизительно в 5 раз больше молекулы инсулина. С тех пор число ферментов с известной аминокислотной последовательностью стало быстро увеличиваться (см. [1017] и [430]).

Второе важнейшее достижение было связано с применением рентгеноструктурных методов высокого разрешения для выяснения деталей трехмерной структуры кристаллических ферментов. Эти методы, впервые использованные Перутцем и Кендрию примерно в 1961 г. для анализа двух белков, не являющихся ферментами, миоглобина и гемоглобина, затем были успешно

применены для изучения десятков ферментов; они способствовали выяснению их природы и механизма действия. Первым ферментом, структура которого была полностью установлена, явился лизоцим [438, 440]; как уже упоминалось, это относительно низкомолекулярный фермент. Объем работы, необходимый для определения структуры ферментов средних размеров, очень велик, и она была бы практически неосуществима без использования мощных ЭВМ. Тем не менее к 1970 г. удалось определить структуру нескольких ферментов (все они являются гидролазами), а именно: α -химотрипсина [415], эластазы [4264], карбоксипептидазы А [2841] и субтилизина [74] (см. также [3679]).

Следует подчеркнуть, что для определения полной структуры фермента необходимо провести оба типа исследований. Знание аминокислотной последовательности само по себе недостаточно для того, чтобы установить взаимное расположение разных частей цепи и их групп в пространстве. Действительно, внутримолекулярная геометрия фермента определяется характером укладки длинной полипептидной цепи, приводящим к формированию структуры, близкой по форме к глобуле, а характер укладки в свою очередь определяется последовательностью химических групп вдоль цепи; но при теперешнем уровне наших знаний едва ли возможно предсказать детали укладки цепи, зная только аминокислотную последовательность, и еще меньше шансов предсказать форму образующегося каталитического центра. С другой стороны, для того чтобы расшифровывать карты электронных плотностей, получаемые с помощью рентгеноструктурного анализа, необходимо знать аминокислотную последовательность. Таким образом, оба указанных метода дополняют друг друга.

Следует также отметить, что в настоящее время лишь немногие ферменты могут быть изучены этими методами, поскольку подавляющую часть ферментов пока не удалось получить в кристаллическом виде, а большинство из числа закристаллизованных ферментов образуют слишком мелкие кристаллы, которые непригодны для исследования методом рентгеноструктурного анализа. Весьма желательно иметь в кристаллическом виде и производные фермента, содержащие атомы тяжелых металлов, с тем чтобы можно было использовать метод изоморфного замещения, который значительно облегчает интерпретацию полученных данных. Нет сомнений, что техника выращивания крупных кристаллов ферментов будет со временем совершенствоваться, но в настоящее время структуру большинства ферментов нельзя исследовать этими методами, и мы вынуждены довольствоваться информацией, которую можно получить, пользуясь старыми методами, рассмотренными выше.

СТРУКТУРА ФЕРМЕНТОВ

Различают четыре уровня структурной организации молекулы белка, в том числе и фермента. Под *первичной структурой* белка понимают последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Пептидная цепь, однако, не может находиться в растянутом (линейном) состоянии — исследования показывают, что молекулы ферментов имеют приблизительно глобулярную форму, т. е. цепь должна быть свернута в спираль или определенным образом уложена. Под *вторичной структурой* понимают характер укладки белковой цепи, например в спираль (преимущественно α -спираль), в которой следующие друг за другом витки стабилизированы водородными связями, как в свое время предположили Полинг и Кори [3628]. Поскольку диаметр спирали значительно меньше, чем размер реальной молекулы фермента, в последней должны быть упакованы бок о бок несколько цепей (спирализованных или неспирализованных) так, чтобы сформировалась молекула, имеющая форму глобулы; образовавшаяся таким путем структура, в которой полипептидная цепь уложена определенным образом, называется *третичной структурой*. Этот термин относится, следовательно, к детальной трехмерной структуре белка, а также к форме каталитического субстратсвязывающего участка или активного центра, поскольку эта сложная структура образуется в результате определенного пространственного взаиморасположения участков полипептидной цепи, являющегося результатом ее укладки. Поэтому точная укладка цепи имеет важнейшее значение, и результаты рентгеноструктурных исследований показали, что она одинакова во всех молекулах закристиализованного фермента. Укладка определяется образованием (а) большого числа водородных или гидрофобных связей между группами, расположенными в различных участках цепи; расположение этих групп вдоль цепи таково, что максимальное число связей может образоваться только при одном варианте укладки и (б) нескольких ковалентных дисульфидных мостиков между определенными остатками цистеина в различных участках цепи. Из сказанного ясно, что третичная структура белковой молекулы определяется ее первичной структурой. В некоторых случаях на характер укладки могут влиять и другие факторы, например наличие атомов металла или порфириновых колец, связанных с определенными участками полипептидной цепи.

Молекулы многих ферментов с небольшой молекулярной массой образованы одной пептидной цепью, в то время как молекулы большинства ферментов, мол. масса которых превышает примерно 100 000, состоят из ассоциатов субъединиц с мол. массой от 40 000 до 50 000. Способ укладки субъединиц в

Таблица 10.1

Ферменты с известной первичной и/или третичной структурой

Кодовый номер	Фермент	Источник фермента	Число остатков в цепи	Число S—S-групп	Источник данных об аминокислотной последовательности	Источник данных о третичной структуре
.1.1.1	Алкогольдегидрогеназа (Е и S)	Печень лошади	374	0	1223, 2264—2265	529, 122-
.1.1.27	Лактатдегидрогеназа (форма M ₄)	Акула	331	0	4693	38, 3995, 506-
.1.1.37	Малатдегидрогеназа (s-форма)	Сердечная мышца свиньи	328	0		1951
.2.1.12	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	Мышца свиньи Омар Дрожжи	332 334	0	1792 980 2256	615
.4.1.3	Глутаматдегидрогеназа (NAD(P) ⁺)	Печень быка	506	0	4345	
.4.1.22	Лактозосинтаза, β-цепь	Бык	123	4	551	
.7.1.1	Гексокиназа	Дрожжи				1374
.7.2.3	Фосфоглицераткиназа	Мышцы лошади	355			436
.1.1.4	Фосфолипаза A ₂	Поджелудочная железа свиньи	123		1032	
.1.1.4	Нуклеаза	<i>Staph. aureus</i>	149	0	856, 4672	2564
.1.1.21.1	Дезоксирибонуклеаза I	Поджелудочная железа быка	257		2804	
.1.1.27.3	Рибонуклеаза T ₁	<i>A. oryzae</i>	104	2	4639	

Кодовый номер	Фермент	Источник фермента	Число остатков в цепи	Число S—S-групп	Источник данных об аминокислотной последовательности	Источник данных о третичной структуре
1.1.27.5	Рибонуклеаза (панкреатическая)	Поджелудочная железа быка	124	4	690, 4362	690, 1087, 2339 5172, 5173
		Поджелудочная железа свиньи			2176	
		Крыса	127		1017	
1.2.1.17	Лизоцим	Курица	129	4	669, 2250	438, 440, 1017 3279
		Фэг Т ₄	164		2142	
1.4.17.1	Карбоксипептидаза А	Бык	307	1	2841	1087, 3279
1.4.21.1	Химотрипсин	Бык	13(A) +131(B) +97(C)	5	1797	415
1.4.21.4	Трипсин	Бык	223	5	1797	500f
1.4.21.11	Эластаза	Свинья	240	4	1797	426-
1.4.21.14	Субтилзин	<i>B. subtilis</i>	275	0	74, 2984	74, 352-
1.4.22.2	Папаин	Сок дынного дерева (<i>Pa- paya</i>)	212	3	3183	1087, 115
1.2.1.1	Карбоант-дегидратаза С	Человек	~260			2816
1.2.1.20	Триптофансинтаза, α-цепь	<i>E. coli</i>	267		5223	
1.1.1.1	Тирозил-тРНК-синтетаза	<i>B. Stearothermophilus</i>				2146

молекуле фермента называют его *четвертичной структурой*. Этот термин в общем виде применим как к простой димеризации, так и к образованию ассоциатов из разных ферментов при формировании определенных мультиферментных систем.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

Ко времени написания данной книги была определена полная аминокислотная последовательность 40 разных ферментов, и число это быстро растет. Частично установлена последовательность аминокислот и у многих других ферментов. Более того, в ряде случаев удалось определить полную аминокислотную последовательность для одного и того же фермента, выделенного из разных источников, и сравнить полученные результаты. Эти данные представляют огромный биологический интерес. В табл. 10.1 перечислены многие ферменты из числа тех, для которых к настоящему времени установлена первичная структура. Конечно, аминокислотная последовательность определена также и для ряда белков, не являющихся ферментами (см. [1017]):

Число полипептидных цепей

Поскольку первичная структура фермента закодирована в его структурном гене в виде линейной последовательности нуклеотидов (см. гл. 11), можно ожидать, что молекула фермента представляет собой одиночную неразветвленную цепь из аминокислот. Однако, хотя эта идея в основном и правильна, она представляется слишком упрощенной по следующим причинам:

(а) Хотя молекулы большинства низкомолекулярных ферментов (мол. масса 10 000—50 000) действительно состоят из одной полипептидной цепи, ферменты с большой молекулярной массой обычно представляют собой ассоциаты из двух или более субъединиц, каждая из которых образована одной полипептидной цепью (см. ниже разд. «Четвертичная структура» и табл. 10.2). Независимо от того, состоят ли ферменты из субъединиц или представляют собой одноцепочечную молекулу, мол. масса полипептидной цепи составляет обычно примерно 40 000 (см. рис. 10.1). По-видимому, мол. масса $\sim 10\,000$ является нижним пределом для белков, обладающих ферментативной активностью (меньшую молекулярную массу имеют лишь несколько ферментов). В то же время полипептидные цепи только очень небольшого числа ферментов (например, некоторые аминоксил-тРНК — синтетазы) имеют мол. массу свыше 100 000

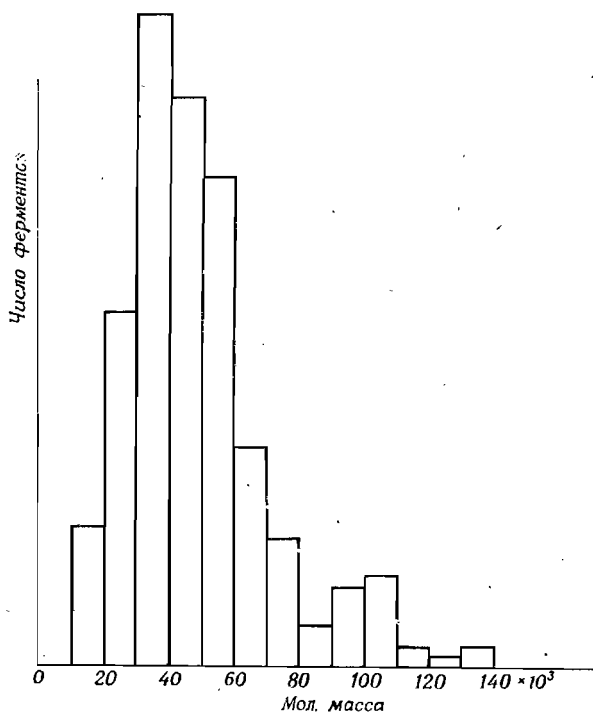


Рис. 10.1. Молекулярные массы субъединиц 294 ферментов.

(б) Хотя сами полипептидные цепи не разветвлены, разные участки одной и той же цепи или разные цепи могут быть связаны несколькими мостиками. Это либо дисульфидные мостики, образовавшиеся при окислении SH-групп двух остатков цистеина в цепи, либо простетические группы, такие, как порфириновое кольцо гема, соединенное с двумя участками цепи, либо же атом металла, являющийся частью активного центра фермента и соединенный координационными связями более чем с одним аминокислотным остатком. Кроме того, в ферментной молекуле имеется много водородных связей (обычно 100 или больше на молекулу) между разными группами цепи; и хотя каждая одиночная водородная связь значительно слабее всех рассмотренных выше связей, в совокупности они обеспечивают достаточно прочное связывание различных участков цепи.

(в) Известно несколько низкомолекулярных ферментов, не являющихся агрегатами из субъединиц в обычном смысле, молекулы которых образованы тем не менее двумя и даже тремя

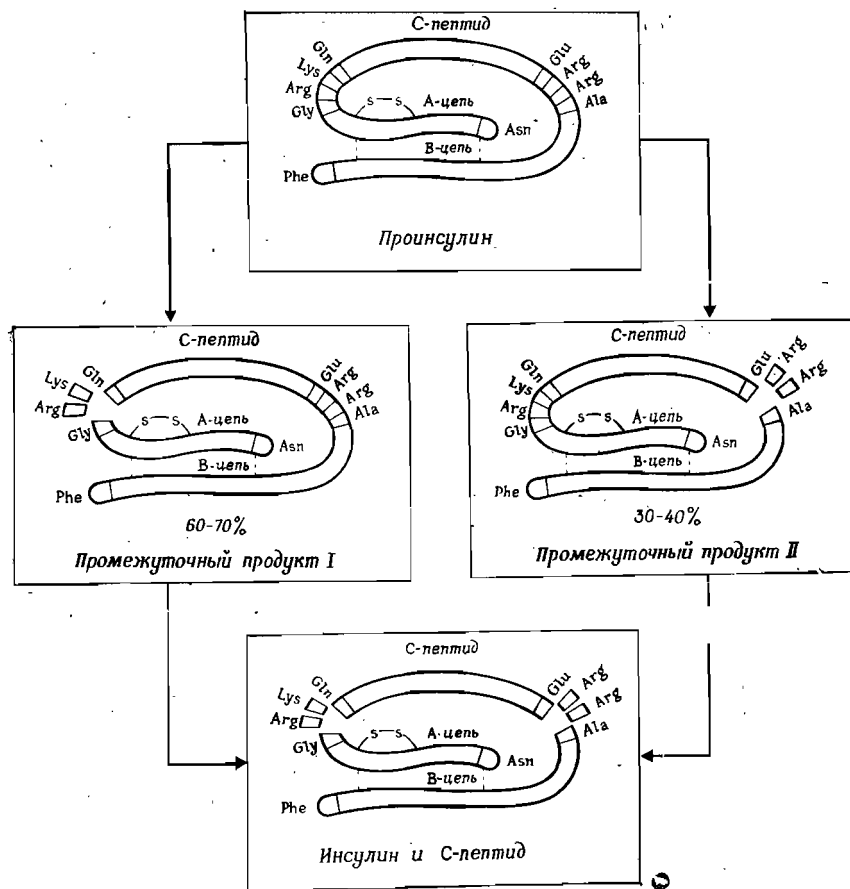


Рис. 10.2. Упрощенная схема превращения *in vivo* проинсулина крупного рогатого скота в инсулин и С-пептид через известные промежуточные формы проинсулина [2404].

полипептидными цепями. Примером такого фермента может служить химотрипсин. Заметим, однако, что по крайней мере для двух случаев наличие более чем одной цепи есть результат расщепления одиночной полипептидной цепи предшественника в процессе активации. Этот процесс наиболее ясно иллюстрируется образованием гормона инсулина [2404, 3408] (рис. 10.2). Его предшественник — проинсулин — вначале формируется как одиночная пептидная цепь. Два ее концевых участка соединяются вместе двумя дисульфидными мостиками, в результате чего образуется кольцевая структура. Затем трипсиноподобная пептидаза расщепляет эту цепь в двух местах, высвобождая в

каждой точке по две аминокислоты, а средний участок цепи отщепляется. В результате образуются три цепи: А- и В-цепи молекулы инсулина и цепь С (на долю этой цепи приходится более четверти исходной молекулы), которая отделяется. Главная функция пептида С в составе исходной молекулы — обеспечить образование мостиков между соответствующими остатками цистеина.

Химотрипсин, молекула которого также состоит из трех цепей, образуется аналогичным образом из одноцепочечного предшественника (химотрипсиногена) при ферментативном расщеплении его в двух местах, при этом в каждом месте отщепляется по пептиду (рис. 10.3). В данном случае, однако, все три образовавшихся отрезка цепи соединены дисульфидными мостиками и остаются в составе молекулы фермента. Появление промежуточных форм в обоих случаях обусловлено тем, что последовательность расщепления соответствующих пептидных связей носит более или менее случайный характер [3159].

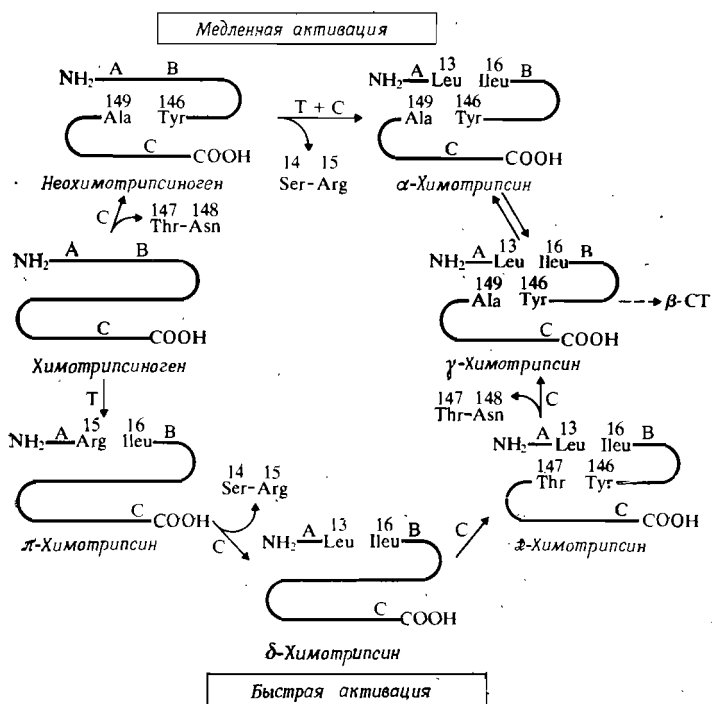


Рис. 10.3. Схема активации химотрипсиногена [3159]. Буквами С обозначено расщепление химотрипсином, Т — расщепление трипсином. Буквами А, В и С обозначены три цепи, образующиеся при расщеплении одиночной цепи химотрипсиногена А указанными протеиназами. Три образовавшиеся цепи удерживаются вместе дисульфидными мостиками.

Отщепление части исходной пептидной цепи при биосинтезе ферментов является достаточно общим феноменом. Известно, что ряд гидролитических ферментов образуется из неактивных предшественников при отщеплении части полипептидной цепи с аминного конца молекулы; в результате появился термин «активационный пептид», употребляющийся применительно к отделяющейся части цепи, который претерпевает дальнейшее расщепление с образованием ряда пептидов. При образовании трипсина от предшественника отщепляется пептид, состоящий из шести аминокислотных остатков, но в некоторых случаях активационный пептид значительно больше и составляет значительную часть молекулы предшественника. Например, пепсин свиньи образуется при отщеплении 42 остатков аминокислот из 363, входящих в состав цепи пепсиногена [2376], при образовании карбоксипептидазы А отщепляется 60 остатков и остается цепь из 300 аминокислот [3408], а в случае карбоксипептидазы В быка отщепляется около 200 остатков от цепи предшественника, состоящего из 505 аминокислот [903]. (В отличие от карбоксипептидазы В образование карбоксипептидазы А быка, но не других видов животных осложнено тем, что она прочно связана с предшественником другой пептидазы; предшественник удаляется при участии специального фермента до того, как прокариоксипептидаза А может быть активирована [3408]).

По-видимому, мы можем рассматривать отщепление части молекулы предшественника (исходно синтезированной молекулы) с аминного конца как общее явление при биосинтезе ферментов, поскольку аминокислоты, с которых начинается синтез (формилметионин в случае белков бактерий [798] и метионин в случае белков животных [2173]), обычно отщепляются за счет ферментативного гидролиза, иногда даже до того, как завершается формирование другого конца цепи!

Особенности первичной структуры

На рис. 10.4—10.6 приведены последовательности аминокислотных остатков полипептидной цепи трех ферментов. Хотя эти последовательности в конечном счете определяют общую форму молекул, такой метод изображения дает о ней очень приблизительное представление, ибо структуру молекулы нельзя удовлетворительно изобразить какой-либо двумерной диаграммой. Например, группы, соединенные дисульфидными связями и, следовательно, сближенные в пространстве, могут находиться далеко друг от друга вдоль полипептидной цепи; то же самое может относиться и к группам, о которых известно, что они входят в состав относительно небольшого субстратсвязываю-

cetyl-Ser-Thr-Ala-Gly-Lys-Val-Ile-Lys-Cys-Lys-Ala-Ala-Val-Leu-Trp-Glu-Glu-Lys-Lys-Pro-Phe-Ser-Ile-Glu-Glu-Val-Glu-Val-Ala-Pro-Pro-Lys-Ala-His-Glu-Val-Arg-Ile-Lys-Met-Val-Ala-Thr-Gly-Ile-Cys-Arg-Ser-Asp-Asp-His-Val-Val-Ser-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Pro-Leu-Pro-Val-Ile-Ala-Gly-His-Glu-Ala-Ala-Gly-Ile-Val-Glu-Ser-Ile-Gly-Glu-Gly-Val-Thr-Thr-Val-Arg-Pro-Gly-Asp-Lys-Val-Ile-Pro-Leu-Phe-Thr-Pro-Gln-Cys-Gly-Lys-Cys-Arg-Val-Cys-Lys-His-Pro-Glu-Gly-Asn-Phe-Cys-Lys-Ala-Ala-Ser-Leu-Ser-Met-Pro-Arg-Gly-Thr-Met-Gln-Asp-Gly-Thr-Ser-Arg-Phe-Thr-Cys-Arg-Gly-Lys-Pro-Ile-His-His-Phe-Leu-Gly-Thr-Ser-Thr-Phe-Ser-Gln-Tyr-Thr-Val-Val-Asp-Glu-Ile-Ser-Met-Ala-Lys-Ile-Asp-Ala-Ala-Ser-Pro-Leu-Glu-Lys-Val-Cys-Leu-Ile-Gly-Cys-Gly-Phe-Ser-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ala-Val-Lys-Val-Ala-Lys-Val-Thr-Gln-Gly-Ser-Thr-Cys-Ala-Val-Phe-Gly-Leu-Gly-Gly-Val-Gly-Leu-Ser-Val-Ile-Met-Gly-Cys-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala-Ala-Arg-Ile-Ile-Gly-Val-Asp-Ile-Asn-Lys-Asp-Lys-Phe-Ala-Lys-Ala-Lys-Glu-Val-Gly-Ala-Thr-Glu-Cys-Val-Asn-Pro-Gln-Asp-Tyr-Lys-Lys-Pro-Ile-Gln-Glu-Val-Leu-Thr-Glu-Met-Ser-Asn-Gly-Gly-Val-Asp-Phe-Ser-Phe-Glu-Val-Ile-Gly-Arg-Leu-Asp-Thr-Met-Val-Thr-Ala-Leu-Ser-Cys-Cys-Gln-Glu-Ala-Tyr-Gly-Val-Ser-Val-Ile-Val-Gly-Val-Pro-Pro-Asp-Ser-Gln-Asn-Leu-Ser-Met-Asn-Pro-Met-Leu-Leu-Leu-Ser-Gly-Arg-Thr-Trp-Lys-Gly-Ala-Ile-Phe-Gly-Gly-Phe-Lys-Ser-Lys-Asp-Ser-Val-Pro-Lys-Leu-Val-Ala-Asp-Phe-Met-Ala-Lys-Lys-Phe-Ala-Leu-Asp-Pro-Leu-Ile-Thr-His-Val-Leu-Pro-Phe-Glu-Lys-Ile-Asn-Glu-Gly-Phe-Asp-Leu-Leu-Arg-Ser-Gly-Glu-Ser-Ile-Arg-Thr-Ile-Leu-Thr-Phe

Рис. 10.4. Аминокислотная последовательность алкогольдегидрогеназы из печени лошади («этанол-активный» изофермент). S-форма отличается в положениях 17, 94, 101, 110, 115 и 366.

Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly-Val-Ser-Gln-Ile-Lys-Ala-Pro-Ala-Leu-His-Ser-Gln-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ser-Asn-Val-Lys-Val-Ala-Val-Ile-Asp-Ser-Gly-Ile-Asp-Ser-Ser-His-Pro-Asp-Leu-Lys-Val-Ala-Gly-Gly-Ala-Ser-Met-Val-Pro-Ser-Glu-Thr-Pro-Asn-Phe-Gln-Asp-Asp-Asn-Ser-His-Gly-Thr-His-Val-Ala-Gly-Thr-Val-Ala-Ala-Leu-Asn-Asn-Ser-Ile-Gly-Val-Leu-Gly-Val-Ala-Pro-Ser-Ser-Ala-Leu-Tyr-Ala-Val-Lys-Val-Leu-Gly-Asp-Ala-Gly-Ser-Gly-Gln-Tyr-Ser-Trp-Ile-Ile-Asn-Gly-Ile-Glu-Trp-Ala-Ile-Ala-Asn-Asn-Met-Asp-Val-Ile-Asn-Met-Ser-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Ala-Ala-Leu-Lys-Ala-Ala-Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ala-Ser-Gly-Val-Val-Val-Ala-Ala-Ala-Gly-Asn-Glu-Gly-Ser-Thr-Gly-Ser-Ser-Ser-Thr-Val-Gly-Tyr-Pro-Gly-Lys-Tyr-Pro-Ser-Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ala-Val-Asp-Ser-Ser-Asn-Gln-Arg-Ala-Ser-Phe-Ser-Ser-Val-Gly-Pro-Glu-Leu-Asp-Val-Met-Ala-Pro-Gly-Val-Ser-Ile-Gln-Ser-Thr-Leu-Pro-Gly-Asn-Lys-Tyr-Gly-Ala-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-Pro-His-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Leu-Ile-Leu-Ser-Lys-His-Pro-Asn-Trp-Thr-Asn-Thr-Gln-Val-Arg-Ser-Ser-Leu-Gln-Asn-Thr-Thr-Thr-Lys-Leu-Gly-Asp-Ser-Phe-Tyr-Tyr-Gly-Lys-Gly-Leu-Ile-Asn-Val-Gln-Ala-Ala-Ala-Gln

Рис. 10.5. Аминокислотная последовательность субтилизина BPN'.

Acetyl-Ser-Lys-Ile-Gly-Ile-Asp-Gly-Phe-Gly-Arg-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Ser-Cys-Gly-Ala-Gln-Val-Val-Ala-Val-Asn-Asp-Pro-Phe-Ile-Ala-Leu-Glu-Tyr-Met-Val-Tyr-Met-Phe-Lys-Tyr-Asp-Ser-Thr-His-Gly-Val-Phe-Lys-Gly-Glu-Val-Lys-Met-Glu-Asp-Gly-Ala-Leu-Val-Val-Asp-Gly-Lys-Lys-Ile-Thr-Val-Phe-Asn-Glu-Met-Lys-Pro-Glu-Asn-Ile-Pro-Trp-Ser-Lys-Ala-Gly-Ala-Glu-Tyr-Ile-Val-Glu-Ser-Thr-Gly-Val-Phe-Thr-Thr-Ile-Glu-Lys-Ala-Ser-Ala-His-Phe-Lys-Gly-Gly-Ala-Lys-Lys-Val-Val-Ile-Ser-Ala-Pro-Ser-Ala-Asp-Ala-Pro-Met-Phe-Val-Cys-Gly-Val-Asn-Leu-Glu-Lys-Tyr-Ser-Lys-Asp-Met-Thr-Val-Pro-Thr-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys-Thr-Thr-Asn-Cys-Leu-Ala-Pro-Val-Ala-Lys-Val-Leu-His-Glu-Asn-Phe-Glu-Ile-Val-Glu-Gly-Leu-Met-Thr-Thr-Val-His-Ala-Val-Thr-Ala-Thr-Gln-Lys-Thr-Val-Asp-Gly-Pro-Ser-Ala-Lys-Asp-Trp-Arg-Gly-Gly-Arg-Gly-Ala-Ala-Gln-Asn-Ile-Ile-Pro-Ser-Ser-Thr-Gly-Ala-Ala-Lys-Ala-Val-Gly-Lys-Val-Ile-Pro-Glu-Leu-Asp-Gly-Lys-Leu-Thr-Gly-Met-Ala-Phe-Arg-Val-Pro-Thr-Pro-Asp-Val-Ser-Val-Val-Asp-Leu-Thr-Val-Arg-Leu-Gly-Lys-Glu-Cys-Ser-Tyr-Asp-Asp-Ile-Lys-Ala-Ala-Met-Lys-Thr-Ala-Ser-Glu-Gly-Pro-Leu-Gln-Gly-Phe-Leu-Gly-Tyr-Thr-Glu-Asp-Asp-Val-Val-Ser-Ser-Asp-Phe-Ile-Gly-Asp-Asn-Arg-Ser-Ser-Ile-Phe-Asp-Ala-Lys-Ala-Gly-Ile-Gln-Leu-Ser-Lys-Thr-Phe-Val-Lys-Val-Val-Ser-Trp-Tyr-Asp-Asn-Glu-Phe-Gly-Tyr-Ser-Gln-Arg-Val-Ile-Asp-Leu-Leu-Lys-His-Met-Gln-Lys-Val-Asp-Ser-Ala

Рис. 10.6. Аминокислотная последовательность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы омара (КФ 1.2.1.12).

щего участка. При сравнении рис. 10.5 и 10.10 видно, как трудно представить особенности структуры фермента на одном рисунке.

Более того, связь между первичной структурой фермента и его каталитической активностью настолько косвенна, что при современном уровне наших знаний невозможно предсказать каталитические свойства исходя из последовательности аминокислот или предугадать, какая аминокислотная последовательность требуется для осуществления катализа данной химической реакции. Даже если бы можно было «сконструировать» трехмерный активный центр, который будет специфически присоединять молекулу субстрата и осуществлять определенную реакцию, необходимо (а) предсказать последовательность нескольких сотен аминокислот с функциональными группами, расположенными таким образом, чтобы цепь спонтанно свернулась и образовала структуру требуемой формы (задача, невозможная на сегодняшний день), и (б) включить в последовательность химические группы, реагирующие с молекулой субстрата таким путем, который соответствовал бы их взаимному расположению в активном центре. Аминокислотная последовательность содержит всю информацию, необходимую для формирования трехмерной структуры молекулы фермента. Знание аминокислотной последовательности в рибонуклеазе А позволило чисто химическим путем синтезировать белок с такой же последовательностью (для этого пришлось провести несколько тысяч химических реакций); было установлено, что молекула этого белка спонтанно укладывается таким образом, что образуется фермент, обладающий каталитической активностью, неотличимый от активности природного фермента [1724].

Часто задают вопрос: для чего нужна такая большая и сложная структура, какой является молекула фермента, когда собственно каталитическая часть (активный центр) относительно мала? Ответить на этот вопрос следует, по-видимому, так: эта структура необходима для того, чтобы сформировать активный центр и удерживать в пространстве образующие его составные части в правильной относительной ориентации.

Однако последовательность *всех* аминокислот в молекуле данного фермента (не участвующая в формировании активного центра) не обязательно должна быть абсолютно инвариантна. Замена одного аминокислотного остатка на другой в самом активном центре обычно действительно приводит к потере каталитической активности, но такая замена в других участках молекулы может не сказаться на характере укладки полипептидной цепи и, следовательно, на активности. Даже несколько замещений в разных участках цепи могут привести к возникновению такой модифицированной формы фермента, которая все же обладает каталитической активностью.

Такие замены имеют важные биологические последствия. Они происходят в естественных условиях в результате точечных мутаций в соответствующих генах — спонтанные замещения одного нуклеотида на другой в ДНК, которая определяет структуру данного фермента, становятся причиной замены одного остатка аминокислоты на другой в соответствующем месте полипептидной цепи (см. гл. 11). Сравнительное исследование аминокислотной последовательности определенных ферментов, выделенных из организмов различных видов, показало, что, хотя генетическая информация о полной последовательности аминокислот молекул ферментов передавалась потомству на протяжении длительных периодов времени с замечательной точностью, иногда такие мутации все же возникали. Таким образом, свойства данного фермента у разных видов могут слегка варьировать.

Изучение видовых различий аминокислотных последовательностей молекул ферментов в последнее время открыло целую новую область исследований. Обнаружилось, что последовательность аминокислот данного фермента очень редко бывает совершенно одинаковой у каких-либо двух видов организмов, хотя различия могут заключаться в замещении лишь одной аминокислоты в том или другом участке молекулы. Как и можно было ожидать, последовательности аминокислот для данного фермента у двух близкородственных видов различаются весьма незначительно, в то время как аминокислотные последовательности для ферментов неродственных видов могут существенно различаться. Например, последовательности аминокислот у глицеральдегидфосфатдегидрогеназ млекопитающих разных видов, можно сказать, «почти идентичны» [3648], в то время как у тех же ферментов из мышц свиньи и омара 28 процентов остатков аминокислот, находящихся в разных участках молекулы, различно [1792].

Однако все такие различия обычно приходится на участки, отдаленные от активного центра. Например, было обнаружено, что последовательность 17 аминокислот в области, содержащей активную тиоловую группу, идентичны у глицеральдегидфосфатдегидрогеназ десяти различных видов, которые были исследованы, в том числе у млекопитающих, птиц, рыб, дрожжей и насекомых. Все сказанное свидетельствует о значительно большей консервативности строения данного участка, чем остальной части молекулы. Это, вероятно, обусловлено эволюционным давлением — естественный отбор направлен против изменений, ведущих к потере активности фермента, в то время как изменения, мало влияющие на активность, не обязательно элиминируются. Этим можно также объяснить тенденцию к консервативной замене остатков, расположенных во внутренней части молекулы, т. е. к замене данного остатка на другой подобного

же типа, например одной гидрофобной группы на другую. В то же время участки молекулы, расположенные вне области активного центра, могут претерпевать весьма серьезные изменения, связанные, например, с изменением электрического заряда. Замена остатка аминокислоты, расположенного внутри молекулы, может повлиять на конфигурацию молекулы и, следовательно, на активность фермента, в то время как аналогичная замена на поверхности молекулы будет, по-видимому, оказывать меньшее влияние на конфигурацию и большее — на общие физические свойства фермента, такие, как его электрофоретическая подвижность [1792].

Если принять, что видовые различия в аминокислотной последовательности ферментов являются результатом точечных мутаций, возникающих с более или менее постоянной и малой скоростью в течение длительного времени, то можно построить «эволюционное древо» путем сравнения последовательности аминокислот определенного фермента, выделенного из многих организмов. Два близкородственных вида, происходящие от общего предка, скорее всего разошлись относительно недавно и число мутаций у них должно быть невелико, а аминокислотная последовательность соответствующих ферментов должна быть очень близкой. С другой стороны, у двух неродственных видов, разошедшихся очень давно, могло накопиться много мутаций и последовательность аминокислот соответствующих ферментов должна существенно различаться. По-видимому, можно оценить интервал времени между следующими друг за другом точками ветвления (на «эволюционном древе») у ряда видов путем простого подсчета числа различий в последовательности аминокислот. Таким образом было построено несколько биохимических филогенетических родословных для ферментов и других белков (в частности, цитохрома *c*) и обнаружено принципиальное сходство их с принятым «эволюционным древом» [1017].

Таким образом, чем ближе два вида друг к другу, тем более сходны аминокислотные последовательности их ферментов, хотя можно поставить вопрос и по-другому: не потому ли похожи два вида и по своему строению, и функционально, что они имеют сходные ферменты?

Мутация, которая появляется у общего предка до расхождения двух видов, будет наследоваться обоими видами, но после расхождения мутации у двух видов будут появляться независимо. Поэтому при детальном исследовании различий в аминокислотной последовательности можно проследить историю каждой замены и определить время ее появления. Однако до сих пор это, по-видимому, делалось без большого успеха главным образом потому, что в этой же точке могли возникать следующие мутации, либо аннулирующие первую мутацию, либо приводящие к появлению другой аминокислоты. Тем не менее опреде-

ленные успехи все же были достигнуты и было высказано предположение о наследуемости таких замен в ходе эволюции [1017].

Аминокислотная последовательность для одного и того же фермента может различаться не только у разных видов, но даже в пределах одного вида, хотя, естественно, эти различия менее значительны. Точечная мутация в данном гене может привести к незначительным различиям (например, различие в заряде, определяемое при электрофорезе в геле) в свойствах этого фермента у особей одного и того же вида или даже между молекулами одного и того же фермента у одной и той же особи. Некоторые случаи можно объяснить, если принять во внимание, что в норме в клетке имеются два гена для данного фермента: один отцовского, другой материнского происхождения, и каждый из них образует примерно одинаковое с другим количество фермента. Если оба гена кодируют «нормальную» последовательность аминокислотных остатков, то фермент будет только нормального типа. Если же в одном из генов произошла мутация, то клетка будет содержать приблизительно равные количества нормального и мутантного фермента. Если оба родителя несут одинаковую наследственную мутацию — все количество фермента будет мутантного типа. Положение, однако, может оказаться более сложным в случае дупликации гена, т. е. если один и тот же ген встречается дважды в разных местах одной хромосомы, например отцовской. Далее, возможно, что в одном из этих генов произойдет мутация, а в другом — нет; тогда отцовская хромосома сама сможет дать две формы фермента. Если же произойдет более чем одна мутация, то возможно, что по указанной причине будут присутствовать вместе четыре различных «изофермента»; следует, однако, помнить, что мутации возникают редко.

Приведенные выше соображения относятся к ферменту, молекула которого представлена единой полипептидной цепью. Если же фермент состоит из субъединиц, возникают дополнительные возможности для образования изоферментов. Пусть, например, а и b — нормальная и мутантная субъединицы и молекула содержит четыре субъединицы; тогда могут образоваться следующие изоферментные формы: a_4 , a_3b , a_2b_2 , ab_3 , b_4 . Изоферменты более подробно обсуждаются в гл. 12.

Существование небольших модификаций в аминокислотной последовательности ферментов создает дополнительные трудности при их наименовании. Сколько замещений аминокислот должно произойти в молекуле фермента, чтобы мы могли сказать, что образовался новый фермент? Если принять во внимание видовые различия, то число модификаций может оказаться слишком большим, чтобы можно было присвоить всем им разные названия, и для того, чтобы точно идентифицировать каж-

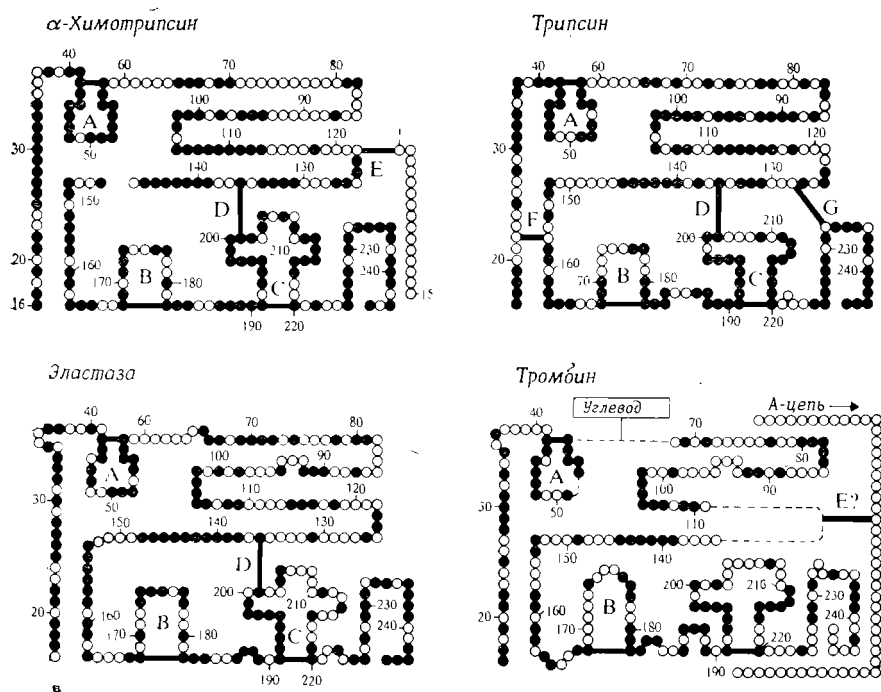


Рис. 10.7. Расположение дисульфидных мостиков в молекулах сериновых протеиназ млекопитающих [1798]. Светлыми кружками обозначены аминокислотные остатки, присутствующие только в одном из четырех белков.

дую форму, необходимо, кроме названия фермента, указывать источник и номер изофермента, если таковой имеется. Однако активный центр у разных форм, по-видимому, остается сравнительно неизменным, и в связи с тем, что число известных форм возрастает, возможно, имеет смысл называть ферменты исходя из аминокислотной последовательности их активных центров, а не всей молекулы.

В этой связи интересно отметить, что анализ аминокислотной последовательности выявил значительное сходство между разными ферментами с близкой функцией; это наводит на мысль о том, что данные ферменты могли образоваться при дифференциации от общего предка. Это особенно четко видно на примере сериновых протеиназ млекопитающих [1797]. Последовательность аминокислот в области активных центров химотрипсина, трипсина и эластазы почти идентична, различия в специфичности следует отнести на счет минорных изменений, а характер укладки полипептидной цепи и места дисульфидных связей весьма сходны. Из рис. 10.7 видна поразительная гомо-

логия между первичными структурами этих трех ферментов и тромбина; черными кружочками обозначены те аминокислоты, которые идентичны по крайней мере у двух из этих ферментов; видно, что степень соответствия значительно больше, чем это можно было бы объяснить простой случайностью. В то же время сходство между ферментами не следует переоценивать: только 42 остатка из 245 идентичны у всех четырех ферментов.

Дальнейшее изучение гомологии в аминокислотной последовательности разных ферментов представляет большой интерес, поскольку поможет понять, как в процессе эволюции возникли новые ферменты. Эти исследования, по-видимому, помогут также раскрыть связи между ферментами и некоторыми белками, не обладающими ферментативной активностью. Например, белок α -лактальбумин не проявляет каталитических свойств, характерных для лизоцима, хотя более чем одна третья часть остатков аминокислот полипептидной цепи этого белка идентична остаткам в этих же положениях в лизоциме [552]. Более того, α -лактальбумин хотя и не обладает каталитическими свойствами, может образовывать комплекс с ферментом, изменяя его специфичность. Лактозосинтаза (КФ 2.4.1.22) является комплексным белком, состоящим из двух белков, А и В; В — это α -лактальбумин, а А — галактозилтрансфераза [517].

Следует, однако, признать, что не все данные об аминокислотной последовательности легко объяснить с чисто эволюционной точки зрения. Например, было высказано предположение, что α -лактальбумин «произошел» от лизоцима в тот период эволюции, когда начиналось формирование системы лактации у млекопитающих, однако видовые различия в последовательности аминокислот свидетельствуют о том, что лактальбумин образовался задолго до того, как возникли первые млекопитающие ([1087], с. 78). Аминокислотная последовательность лизоцима бактериофага T_4 совершенно отлична от таковой для лизоцимов других видов, хотя он действует на те же субстраты [2143] и, вероятно, имеет весьма сходный активный центр; эти результаты говорят о том, что данный активный центр может сформироваться при укладке пептидной цепи с различной последовательностью. Значительные различия в аминокислотной последовательности у сериновых протеиназ бактерий и млекопитающих свидетельствуют о том, что эти две группы организмов произошли от разных предков, однако последовательность аминокислот у сериновой протеиназы *B. sorangium*, по-видимому, гомологична таковой для сериновых протеиназ млекопитающих ([1798], с. 86). Дайхофф и Экк ([1017], с. 12) подчеркивают, что цитохром с гремучей змеи претерпел множество изменений с тех пор, как отошел от родоначальной линии, и в то же время некоторые мутации у этого фермента

обнаруживают удивительное сходство с мутациями у соответствующих ферментов приматов. Следовательно, интерпретация данных по гомологичности аминокислотных последовательностей у различных ферментов требует осторожности.

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Под этим термином понимают характер укладки линейной полипептидной цепи с образованием более стабильной спиральной структуры, соседние витки которой удерживаются в надлежащем положении водородными связями, образующимися между остатками аминокислот. Были высказаны предположения о существовании нескольких типов спиралей, и все они действительно были обнаружены у разных ферментов; например, в молекуле карбонат-дегидратазы имеются спиральные участки разных типов [2816]. Но наиболее стабильной и наиболее широко распространенной является α -спираль, предложенная Полингом и Кори [3628] в 1951 г. в результате исследований на моделях; эта спираль содержит 3,6 остатка аминокислот на один виток и закручена вправо.

Позднее было показано, что α -спираль является основой структуры таких фибриллярных белков, как кератин, а когда была установлена трехмерная структура первых двух глобулярных белков, гемоглобина и миоглобина [2408, 3652], то выяснилось, что в структуре молекул этих белков имеются протяженные α -спиральные участки, соединенные неспирализованными участками; в связи с этим было сделано предположение, что α -спираль может играть доминирующую роль также и в формировании структуры ферментов. В настоящее время, однако, установлено, что наличие α -спирали в структуре ферментов не является общим правилом; α -химотрипсин, например, содержит короткий спиралеподобный участок, состоящий из трех витков, только на С-конце молекулы. В молекулах других ферментов, например субтилизина [74] и карбоксипептидазы А [2841], имеются несколько спиральных сегментов (не всегда α -типа), локализованных в различных участках полипептидной цепи. Однако даже у этих ферментов по крайней мере $2/3$ полипептидной цепи имеют неспиральную конфигурацию. Таким образом, гемоглобиновый тип структуры нетипичен для ферментов.

α -Спираль формируется благодаря образованию водородных связей между NH- и CO- группами, участвующими в образовании пептидных связей, а не между боковыми группами аминокислот, поэтому она сохраняет свою форму независимо от последовательности аминокислот в цепи, в отличие от третич-

ной структуры, определяющей общую форму молекулы фермента. Спираль является периодической структурой; в то же время большая часть белковой цепи фермента не спирализована, а уложена нерегулярным образом, что определяется последовательностью боковых групп аминокислот. Тем не менее формирование пространственной структуры происходит не случайным образом, она точно воспроизводится во всех молекулах данного фермента.

Полинг и Кори [3629] высказали предположение о существовании еще одного типа структуры — β -слоя, которая также формируется благодаря водородным связям между NH- и CO-группами пептидной цепи, но при этом водородные связи образуются между удаленными участками цепи, расположенными бок о бок в пространстве. Хотя логически эта структура может рассматриваться как третичная, так как она связана с укладкой главной цепи при формировании глобулярной молекулы, ее часто рассматривают как вторичную структуру, поскольку ее периодичность не связана с последовательностью аминокислот.

Из имеющихся в настоящее время данных вытекает, что β -слой (называемый также складчатым слоем) может играть роль ядра в молекулах некоторых ферментов, образуя «опорную» структуру. Поскольку эта структура сближает удаленные участки полипептидной цепи, можно полагать, что она играет существенную роль в определении общей формы молекулы, в то время как аминокислотная последовательность определяет характер укладки полипептидной цепи, так как β -структура фиксирует только расстояние между соседними участками цепи, но не их взаимное пространственное расположение.

Соседние участки цепи в β -слое могут иметь либо одинаковое, либо противоположное направление (параллельны или антипараллельны); на рис. 10.8 приведен пример полипептидной цепи, у которой пять участков направлены слева направо и три — справа налево. Если бы полипептидная цепь регулярно меняла свое направление, то в результате образовалась бы структура, в которой полипептидная цепь поочередно направлена влево и вправо, а номера остатков увеличиваются сверху вниз. Этого не наблюдается ни в случае карбоксипептидазы А (рис. 10.8), ни у других ферментов, исследованных к настоящему времени. Более того, в рассматриваемом случае не представляется возможным сформировать приведенную структуру путем последовательного свертывания цепи, начиная с одного конца, так как по крайней мере в пяти областях не останется места для размещения последующих фрагментов, если ранее уложенные фрагменты находятся в надлежащем положении; кроме того, укладке последнего фрагмента будет препятствовать дисульфидная связь, поэтому конформация цепи в про-

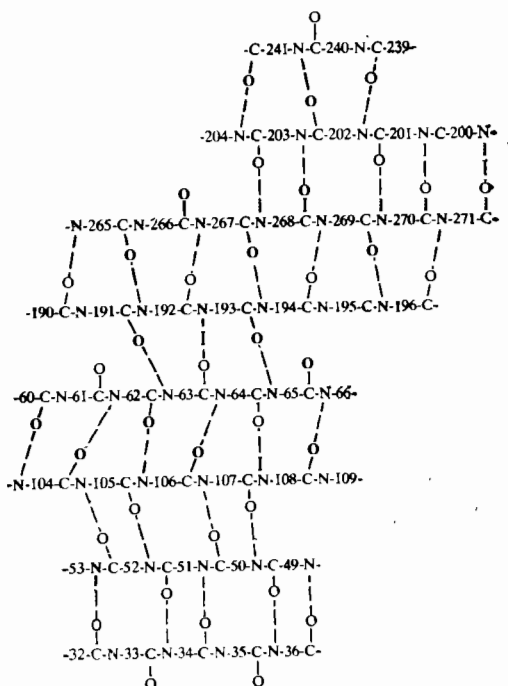


Рис. 10.8. Схематическое изображение структуры β -слоя карбоксипептидазы А (КФ 3.14.17.1) [2841]. Аминокислотные остатки пронумерованы с N-конца; пунктирными прямыми обозначены водородные связи.

цессе укладки должна отличаться в нескольких местах от ее конформации в конечном состоянии [2841].

Структура, изображенная на рис. 10.8, выглядит плоской, однако результаты рентгеноструктурного анализа показывают, что в действительности вся она равномерно закручена сверху вниз, так что каждый сегмент повернут примерно на 17° по отношению к предыдущему и суммарный угол поворота составляет в случае карбоксипептидазы А 120° . Однако у разных ферментов суммарный угол поворота β -структуры различен; у карбонат-дегидратазы, β -слой которой образован десятью сегментами, этот угол составляет около 220° [2816], в то время как у состоящего из пяти сегментов β -слоя субтилизина он равен $\sim 45^\circ$ [74]. Примеры закрученных β -структур можно видеть на стереоизображениях, представленных на рис. 10.17, 10.20 и 10.25 (этот рисунок помещен на вклейке); см. также [434].

Доля остатков, находящихся в составе β -структуры, варьирует от одного фермента к другому, но даже в молекуле карбоксипептидазы, у которой по имеющимся данным эта доля максимальна, в состав β -структуры входит только 17% аминокислотных остатков.

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА

Под третичной структурой понимают характер свертывания длинной полипептидной цепи, приводящего к образованию глобулы; эта структура играет фундаментальную роль в каталитической активности фермента. Она не только определяет форму молекул фермента в целом, но и формирует активный центр из химических групп, расположенных в разных частях цепи, и обеспечивает определенное взаиморасположение субстратсвязывающих групп, которое приводит к образованию структуры, комплементарной молекуле субстрата, определяя, следовательно, специфичность фермента. Когда при денатурации молекула фермента разворачивается, разрушается его активный центр и каталитическая активность исчезает.

Определение трехмерной структуры фермента является сложным и трудоемким делом, как это можно видеть, например, из описания процесса при исследовании карбоксипептидазы А (Липскомб и др. [2841]). Прежде всего необходимо получить кристаллы соответствующего размера и качества, причем не только самого фермента, но также и ряда его производных, содержащих атомы тяжелого металла, чтобы можно было применить метод изоморфного замещения. Затем в каждом случае должен быть проведен рентгеноструктурный анализ кристаллов при высоком (0,2 нм) разрешении (более низкое разрешение, например при 0,6 нм, дает представление только об общей форме молекулы и ничего не говорит о расположении боковых групп). Анализ может потребовать определения параметров около 20 000 рефлексов при исследовании фермента и на много тысяч рефлексов больше при исследовании производных. Затем, произведя сложные расчеты на ЭВМ, нужно построить карты электронных плотностей для разных сечений молекулы.

Исходя из известной аминокислотной последовательности данного фермента строят несколько предварительных атомных моделей; сопоставив их с данными карт электронных плотностей, получают представление о трехмерной структуре и строят приближенную модель молекулы фермента. Затем с помощью программы математического построения модели белков находят координаты нескольких сотен атомов. Далее с помощью дополнительных программ, включающих для карбоксипептидазы А расчет более 16 000 структурных факторов, уточняют результаты. Полученные данные позволяют построить модель структуры фермента, состоящей из «шариков и палочек» (атомов и связей); эти данные могут быть также введены в ЭВМ для построения стереодиаграмм, показывающих вид молекулы с разных направлений. В ряде исследований такие построения были выполнены также для фермент-субстратного или фермент-

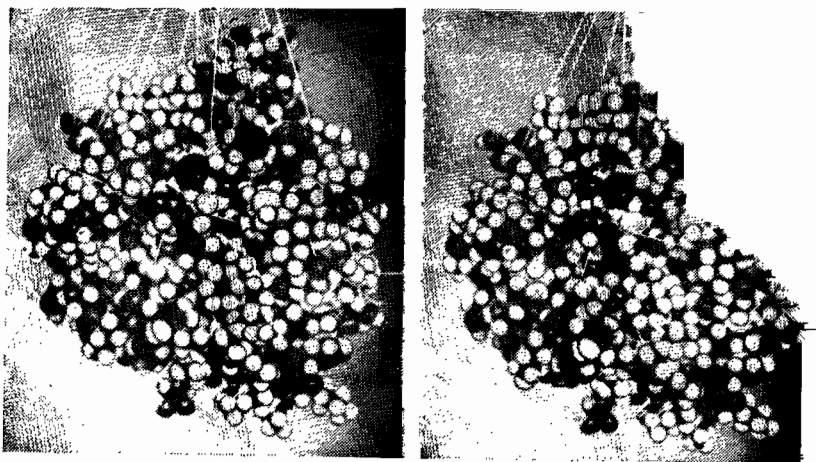


Рис. 10.9. α -Химотрипсин [415].

ингибиторного комплекса с тем, чтобы выяснить характер связывания субстрата и ингибитора в активном центре.

Поскольку для проведения указанных исследований требуется исключительно высокая точность, а вся процедура очень трудоемка, не удивительно, что на сегодняшний день в деталях выяснена структура только немногих ферментов.

Даже если структура установлена, представить ее в наглядной форме не просто и каждый из способов изображения обладает определенными недостатками. Большинство изображений дает лишь общую структуру, опуская многие детали, хотя на самом деле упаковка молекулы довольно плотная и все пространство заполнено множеством боковых групп, кроме особых щелей, или карманов, в области активного центра. Например, на модели, в которой атомы заполняют все пространство (см. модель химотрипсина, показанную в стереоизображении на рис. 10.9), внутренняя структура молекулы не видна, хотя такая модель дает представление об общей форме молекулы и на ней можно видеть впадину (карман), образующую активный центр, в которой находится молекула субстрата.

Модель, в которой атомы представлены шариками, а связки тонкими стержнями, позволяет увидеть внутреннюю структуру глобулы, но фотография такой модели слишком сложна для восприятия (см. например, рис. 10.10, на котором представлена модель субтилизина). Множество стержней и скрепок, необходимых для того, чтобы фиксировать модель, еще более запутывает картину. Обычно в такой модели по ходу пептидной цепи протягивают струну, которая служит ориентиром, но даже и в

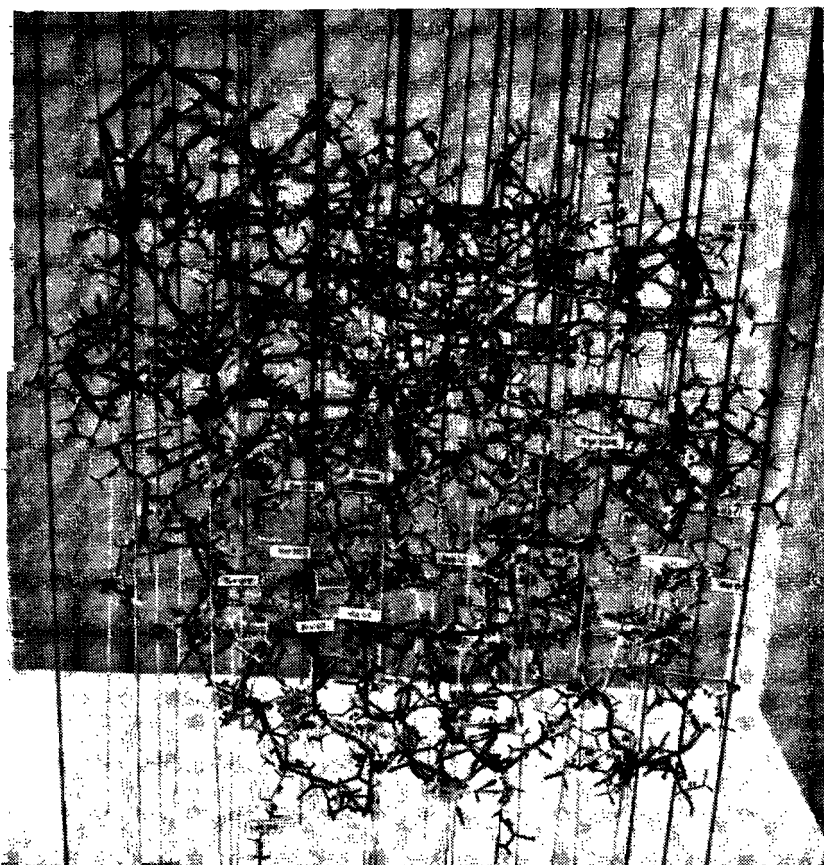


Рис. 10.10. Субтилизин [74]. Каркасная модель субтилизина BPN', вид на активный центр. Направление взгляда приблизительно перпендикулярно плоскости имидазольного кольца His-64 в активной конформации. Виден скелет полипептидной цепи.

том случае нелегко получить представление о характере укладки полипептидной цепи.

Поэтому обычно приводят детальное изображение только активного центра и упрощают диаграммы третичной структуры, опуская боковые группы и пептидные связи; при этом каждый аминокислотный остаток обозначают одной точкой, указывающей положение α -углеродного атома. Хотя такое изображение является весьма упрощенным, оно облегчает восприятие общей структуры молекулы, если использовать ряд приемов, например пронумеровать остатки аминокислот с N-конца полипептидной цепи.

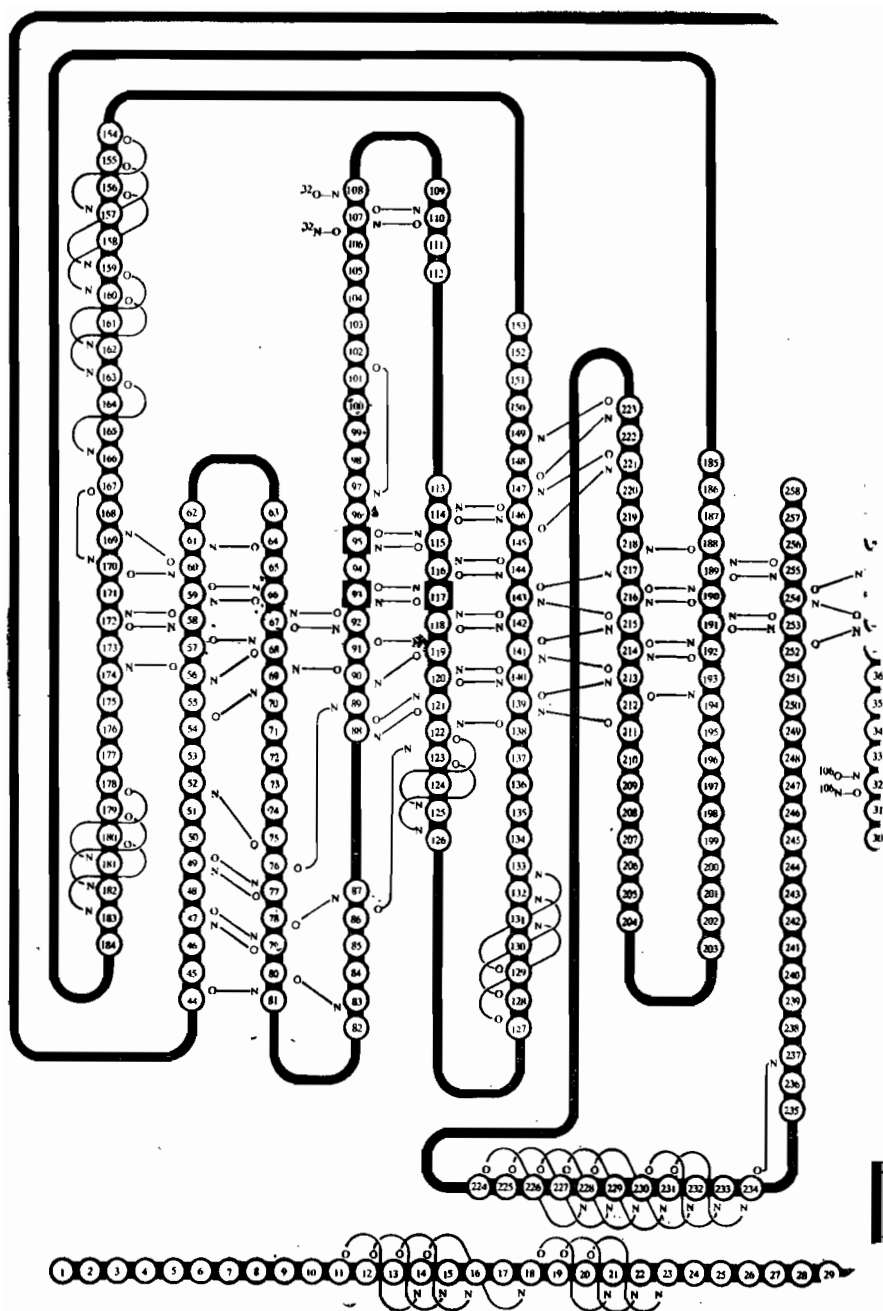


Рис. 10.11. Карбонат-дегидратаза [2816]. Изображены водородные связи в основной полипептидной цепи. α -Углеродные атомы, к которым присоединены цинки, заключены в квадраты. β -Структура (в центре) стабилизирована многочисленными водородными связями. Спиральные участки указаны искривленными линиями, изображающими водородные связи.

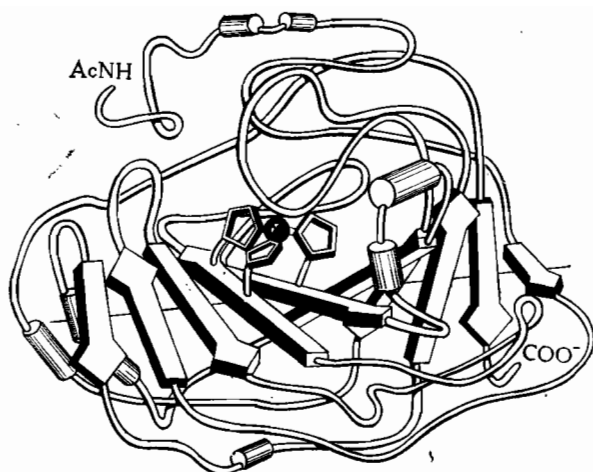


Рис. 10.12. Карбоант-дегидратаза [2816]. Схематическое изображение укладки молекулы с ионом цинка в активном центре. Системой стрелок изображен изогнутый β -слой; цилиндры — спиральные участки.

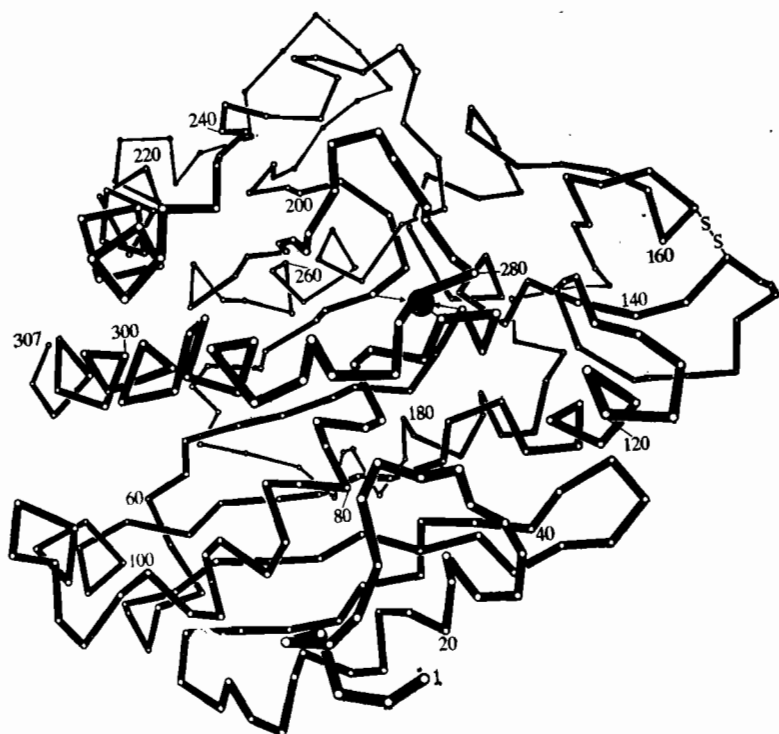


Рис. 10.13. Карбоксипептидаза А [2841]. Полипептидная цепь изображена в виде лент разной ширины. Заштрихованный шарик вблизи центра молекулы — атом цинка; дисульфидная связь — справа, С-конец — слева (307-й остаток), N-конец — внизу (первый аминокислотный остаток).

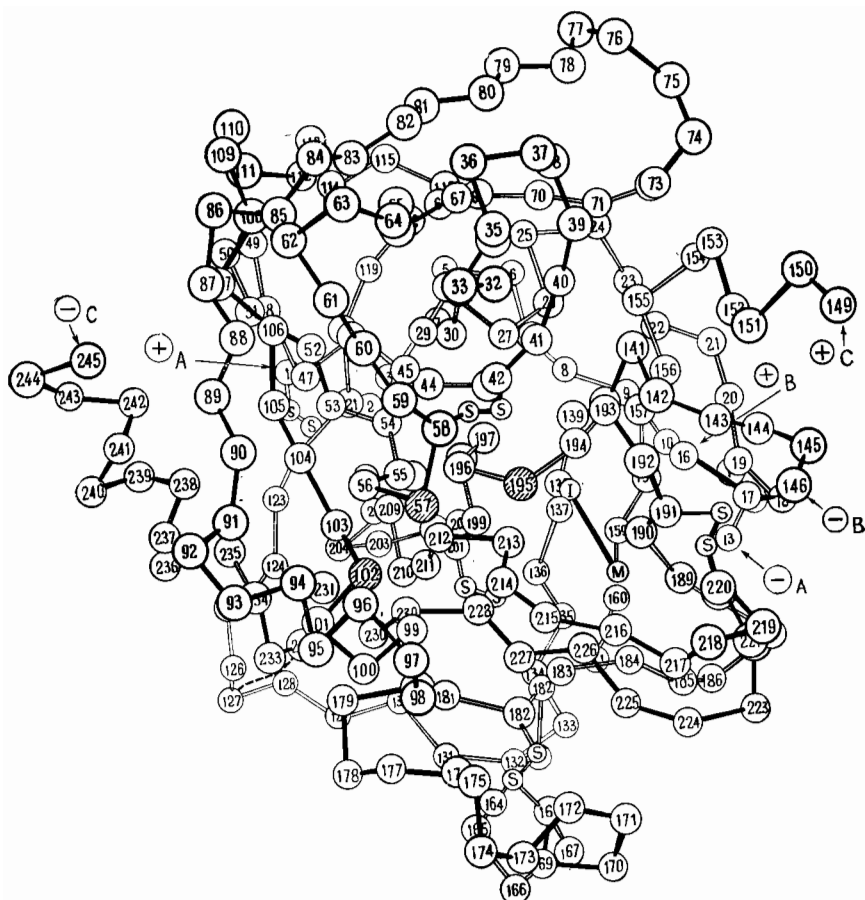


Рис. 10.14. α -Химотрипсин. Представлена укладка основной полипептидной цепи; нумерация аминокислотных остатков такая же, как у химотрипсиногена. — и + — аминный и карбоксильный концы A, B и C цепей. Обратите внимание на предполагаемую β -структуру, образованную участками цепи, в состав которых входят остатки 91—86, 103—108, 55—50, 39—46 и 35—29. Дисульфидные связи, имеющиеся в трипсине, но отсутствующие в химотрипсине, расположены между аминокислотными остатками 22—157 и 127—232. Дополнительный дипептид в трипсине, содержащий остаток Glu, который оказывает влияние на специфичность трипсина (отдается предпочтение боковым цепям основных аминокислот), заключен между остатками 185 и 186. Важные для катализа остатки His-57, Asp-102 и Ser-195 затушеваны. (R. E. Dickerson, I. Geis, The Structure and Action of Proteins, W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, California, USA, Copyright by Dickerson and Geis, 1969.)

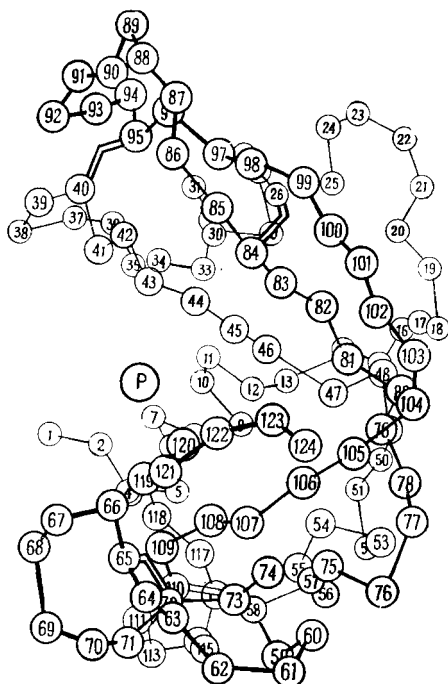


Рис. 10.15. Рибонуклеаза А. Фосфатная группа во впадине (P) указывает местоположение активного центра. Дисульфидные мостики представлены изогнутой двойной линией. Обратите внимание на участок справа вверху, при расщеплении которого образуется рибонуклеаза S (рис. 10.19) (R. E. Dickerson and I. Geis, *The Structure and Action of Proteins*, W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, California, USA, Copyright by Dickerson and Geis, 1969.)

Один из таких приемов состоит в изображении укладки полипептидной цепи так, как это сделано для карбонат-дегидратазы (рис. 10.11). Указывая, между какими аминокислотными остатками образуются H-связи, можно по крайней мере получить представление о том, какие участки цепи являются соседними. В то же время такое изображение создает картину, не отражающую в ряде случаев истинное положение вещей; например, остатки 43 и 44 в действительности расположены рядом, а остаток 32 находится поблизости от остатков 106 и 108. Трудно представить себе, что эта же самая структура изображена на рис. 10.12, на котором остатки аминокислот не показаны, а α -спираль и β -структура изображены в виде цилиндров и плоских стрелок соответственно. Этот рисунок дает некоторое представление о плане молекулы, хотя по нему трудно вообразить истинную укладку α -углеродной цепи, которая показана в стереоизображении на рис. 10.17.

Другой, достаточно удобный, способ состоит в изображении α -углеродной цепи на плоскости с помощью линий разной толщины: толстыми линиями изображают участки цепи, находящиеся на переднем плане, а тонкими — участки, находящиеся на заднем плане, как это сделано при изображении молекулы карбоксипептидазы на рис. 10.13. Можно также использовать

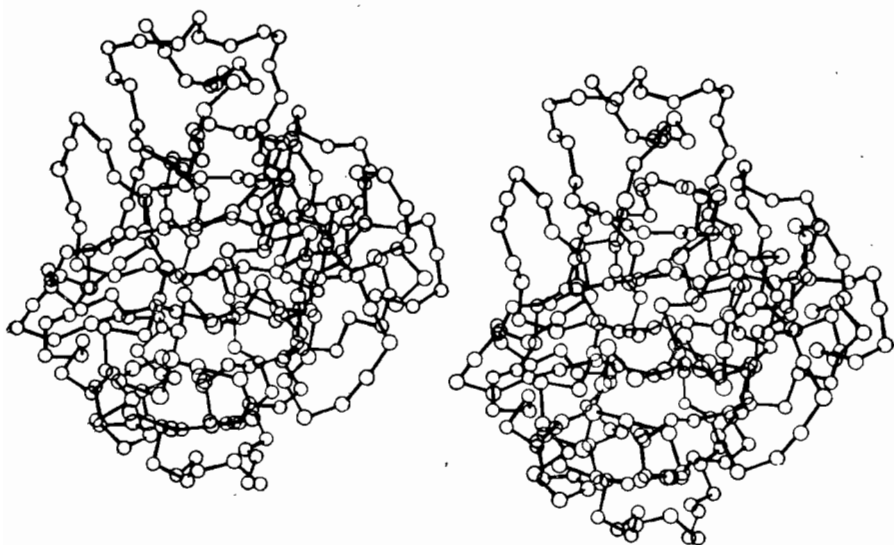


Рис. 10.17. Карбонат-дегидратаза [2816].

черный и серый цвета разной интенсивности (рис. 10.14 и 10.15) или какой-либо другой цвет (рис. 10.16; см. вклейку).

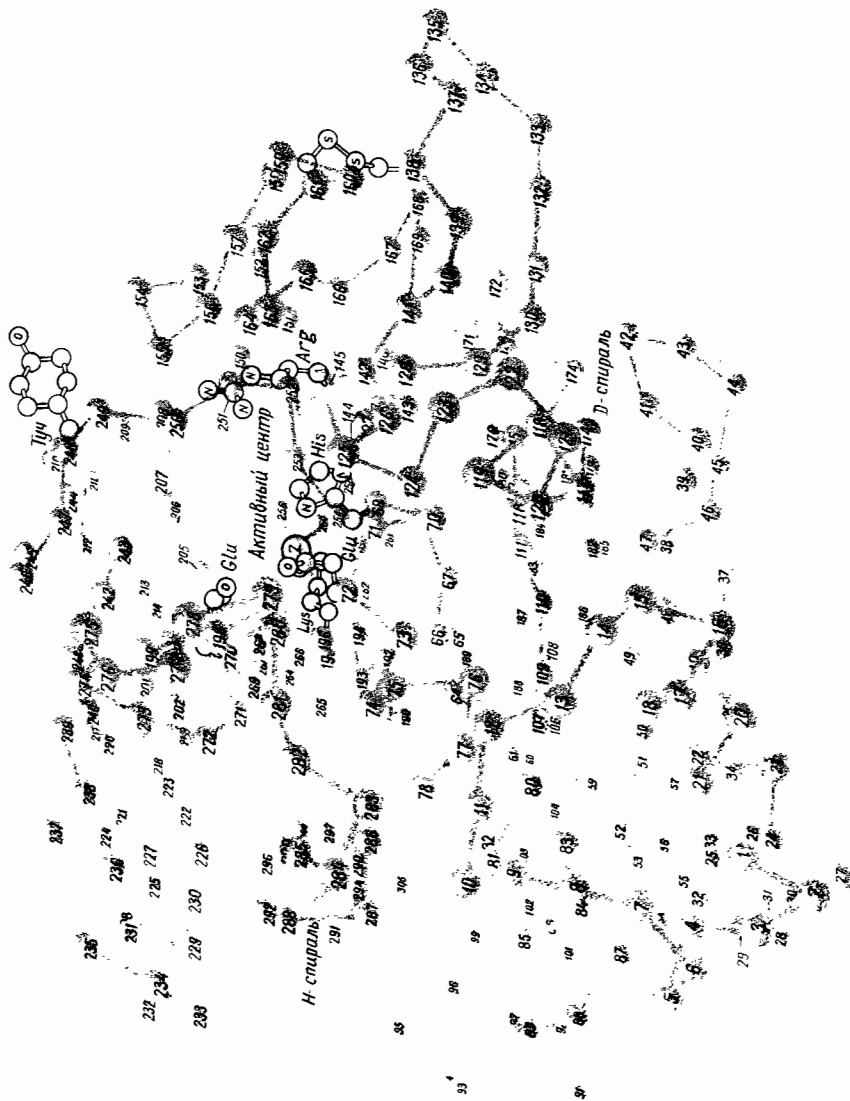
Наиболее четко трехмерную структуру фермента можно представить, изображая укладку α -углеродной цепи с помощью стереодиаграмм, как это показано на рис. 10.17; стереокартину можно рассматривать с помощью любого простого доступного стереоприбора или даже — при соответствующем навыке — без всякого приспособления, правильно фокусируя глаза. Два стереоизображения могут быть напечатаны в красном и зеленом цветах анаглифным методом, и рассматривать их нужно через специальные цветные очки. Ряд изображений структур ферментов, сделанных этим методом, приведен в работе [838]. Однако, чтобы получить правильное представление о структуре фермента, желательно пользоваться либо моделью, либо несколькими ее изображениями в разных ракурсах.

Особенности структуры

В этом разделе мы рассмотрим только те ферменты, которые не обладают субъединичной структурой; ферменты, молекулы которых состоят из двух или более субъединиц, будут рассмотрены в разделе «Четвертичная структура».

С помощью рентгеноструктурного анализа было установлено, что по форме исследованные к настоящему времени молеку-

Рис. 10.16. Карбоксипептидаза А, укладка основной цепи. Активный центр представляет собой чашеобразное углубление вверху справа, ниже Tyr-248. От поверхности молекулы вглубь идет выемка («карман»), как предполагают, комплементарная субстрату. Карман приводит к образованию, образованными аминокислотами 277—281 и 123—127. Указан атом цинка (Zn). Cys-138 и 161 соединены дисульфидным мостиком. Амнокислотные остатки, образующие активный центр (Tyr-248, Glu-270 и Arg-145), изображены в тех положениях, которые они занимают, когда фермент не связан с субстратом или ингибитором. Непосредственно от концов молекулы видны спиральные участки Н (слева) и D (справа). Обратите внимание, как «сплетается» растущая полипептидная цепь, образуемая аминокислотными остатками 124—174 и 241—251, формируя активный центр. Расположение активного центра и механизм катализа сходны с таковыми у химотрипсина. Оба фермента имеют тиреобонный «карман», в котором находится активный центр и который обуславливает субстратную специфичность: в него погружается ароматическая боковая цепь расширяемого полипептида. В обоих ферментах карбоксильный углерод расширяемой пептидной связи образует временную ковалентную связь (промежуточный продукт) с нуклеофилами: Ser-195 в химотрипсине и Glu-270 в карбоксипептидазе. И наконец, у обоих ферментов соседняя группа (His-57 или Tyr-248) передает протон азоту расширяемой связи и получает протон от воды (R. E. Dickerson, I. Geis, The Structure and Action of Proteins, W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, California, USA, Copyright by Dickerson and Geis, 1969.)



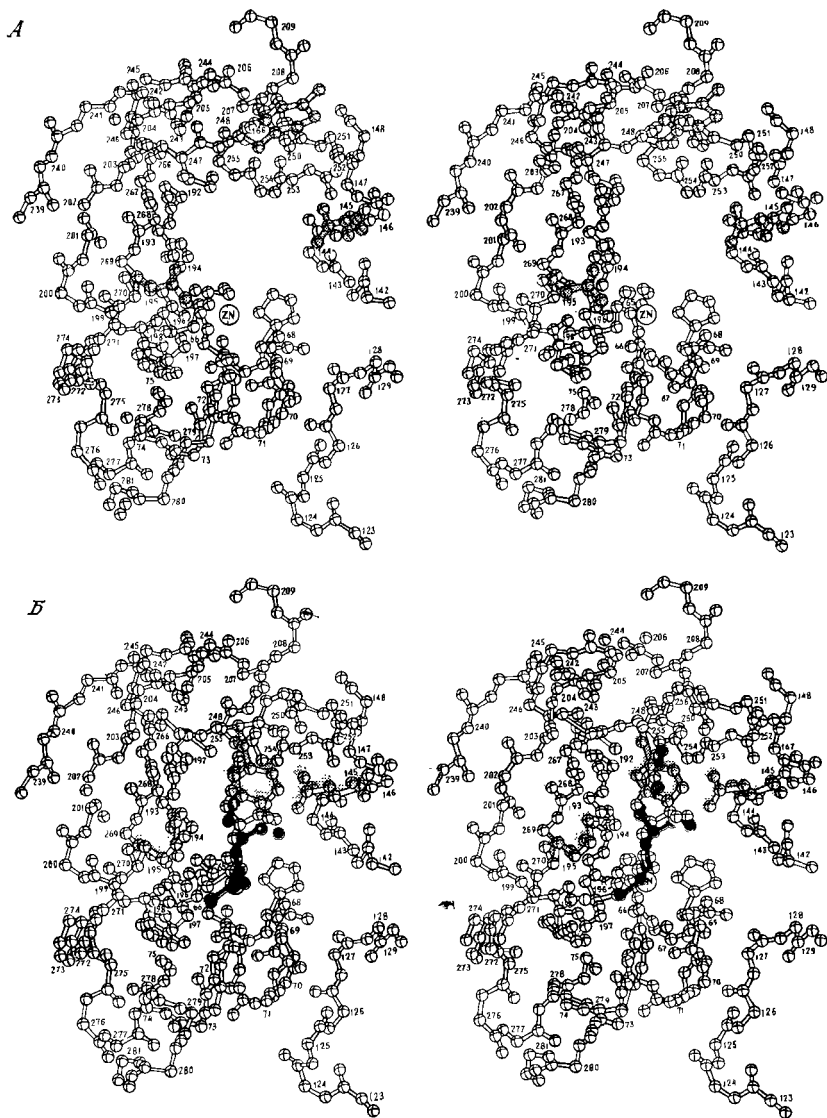


Рис. 10.25. Карбоксипептидаза А [2841]. Область активного центра в отсутст-
вие (*A*) и в присутствии (*B*) субстрата (Gly-Tyr, зеленый цвет).

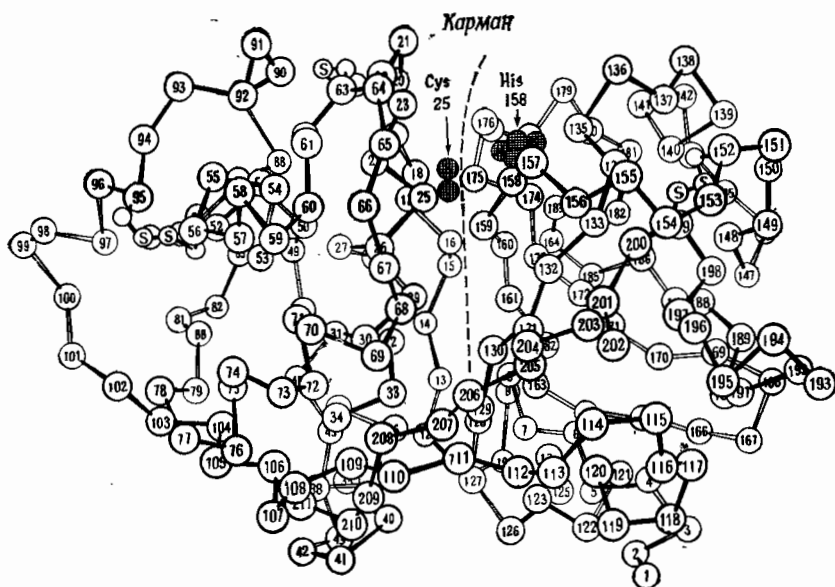


Рис. 10.18. Папаин. Вход в карман, в котором расположен активный центр, находится в верхней части молекулы, как изображено на рисунке; в нем помещаются His-158 (справа) и Cys-25 (слева). Обратите внимание на β -структуру, образованную аминокислотными остатками 163—172, и на общий вид изогнутого складчатого слоя, сформированного участками цепи с аминокислотными остатками 115—107, 203—210, 133—126, 159—164, 174—170 и 184—189. (R. E. Dickerson, I. Geis, *The Structure and Action of Proteins*, W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, California, USA, Copyright by Dickerson and Geis, 1969.)

лы таких ферментов близки к глобуле (см. рис. 10.9, 10.13, 10.14, 10.17). Как и следовало ожидать, полипептидная цепь уложена таким образом, что гидрофобные остатки погружены внутрь глобулы, а гидрофильные боковые группы расположены на поверхности. Таким образом, молекулы ферментов имеют гидрофобное ядро, структура которого стабилизируется благодаря не только водородным связям, но и гидрофобным взаимодействиям.

Общей характерной чертой структуры является наличие расщелины (щели, углубления, кармана), идущей от поверхности в глубь молекулы, по стенкам которой расположено много гидрофобных групп. Это хорошо видно из рис. 10.9, 10.15, 10.18 и 10.19 и менее наглядно из рис. 10.20, где молекула изображена под таким углом зрения, что участок цепи закрывает карман.

Активный центр фермента расположен в углублении, или кармане. Субстрат проникает в карман, в котором происходит реакция, и удерживается в нем надлежащим образом расположенными боковыми группами аминокислот, локализованных на

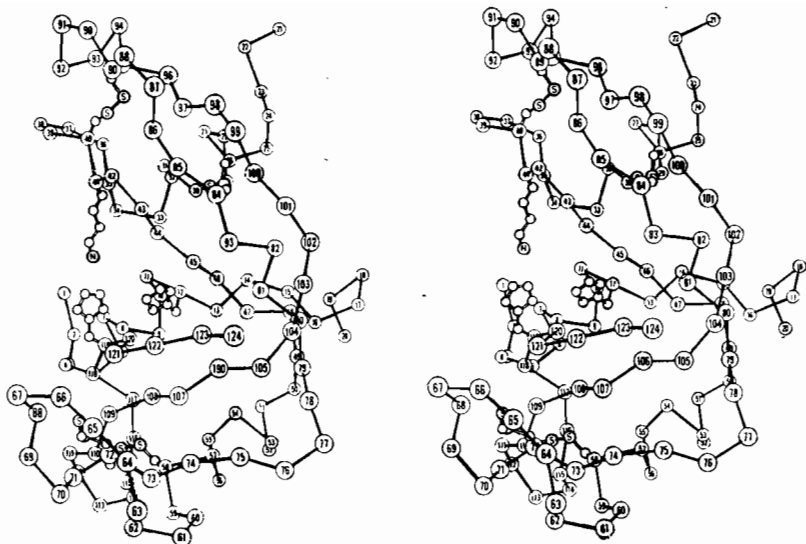


Рис. 10.19. Рибонуклеаза S. На рисунке справа видны два разошедшихся конца расщепленной цепи (остатки 20 и 21); в остальном образовавшийся фермент мало чем отличается от рибонуклеазы A. (R. E. Dickerson, I. Geis, The Structure and Action of Proteins, W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, California, USA, Copyright by Dickerson and Geis, 1969.)

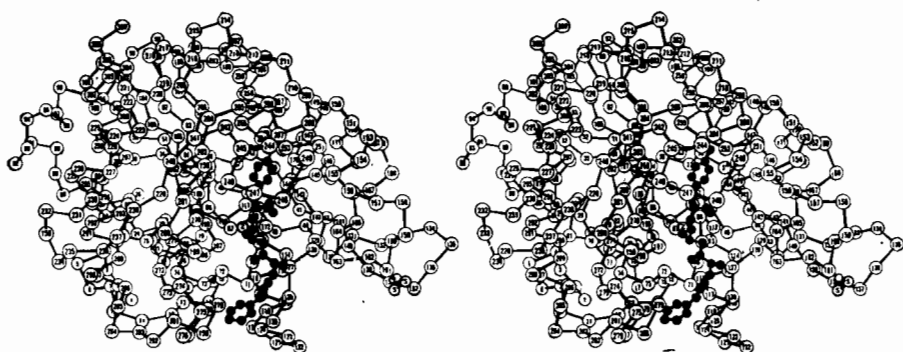


Рис. 10.20. Карбоксипептидаза A. Вид сверху на молекулу карбоксипептидазы A, представленную на рис. 10.16. Субстрат изображен черными кружками. Обратите внимание, как структура образует спираль, закручиваясь по часовой стрелке и как бы выступая вперед из плоскости рисунка. (R. E. Dickerson, I. Geis, The Structure and Action of Proteins, W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, California, USA, Copyright by Dickerson and Geis, 1969.)

стенках кармана. В ряде случаев установлены структуры комплексов ферментов с субстратами или с подобными субстрату ингибиторами. Соответствующее стереоизображение приведено на рис. 10.20. В области кармана можно выделить положение ряда остатков, о которых известно на основании химических исследований, что они важны для катализа. Например, на рис. 10.19 это боковые группы остатков His-12, His-119 и Lys-41, расположенные близко друг от друга в левой части рисунка, а на рис. 10.18 — Cys-25 и His-158, находящиеся у входа в карман. Карман проникает глубоко в молекулу фермента, и субстрат, заполняя карман, приходит в контакт с гидрофобным ядром; было высказано предположение, что существенную роль для ферментативного катализа играет гидрофобное окружение, в котором оказываются реагирующие вещества.

Иногда в активном центре удается идентифицировать группы, которые участвуют в самом каталитическом процессе, а не в связывании субстрата (например, когда в катализе участвуют атомы металла); обычно такие группы находятся глубоко в кармане, недалеко от центра молекулы. Примерами могут служить атомы Zn в карбоксипептидазе (рис. 10.13) и карбоиат-дегидратазе (рис. 10.12). В последнем случае Zn удерживается между тремя кольцами гистидина, как хорошо видно на рис. 10.21.

В настоящее время стало ясно, что активный центр имеет большие размеры, чем предполагали раньше. Он отнюдь не является небольшой областью на поверхности очень большой мо-

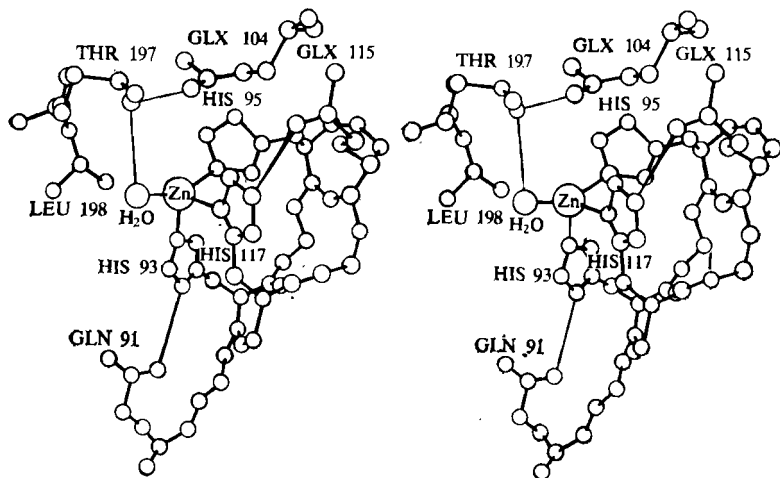


Рис. 10.21. Активный центр карбоиат-дегидратазы [2816]. Стереонизображение области активного центра.

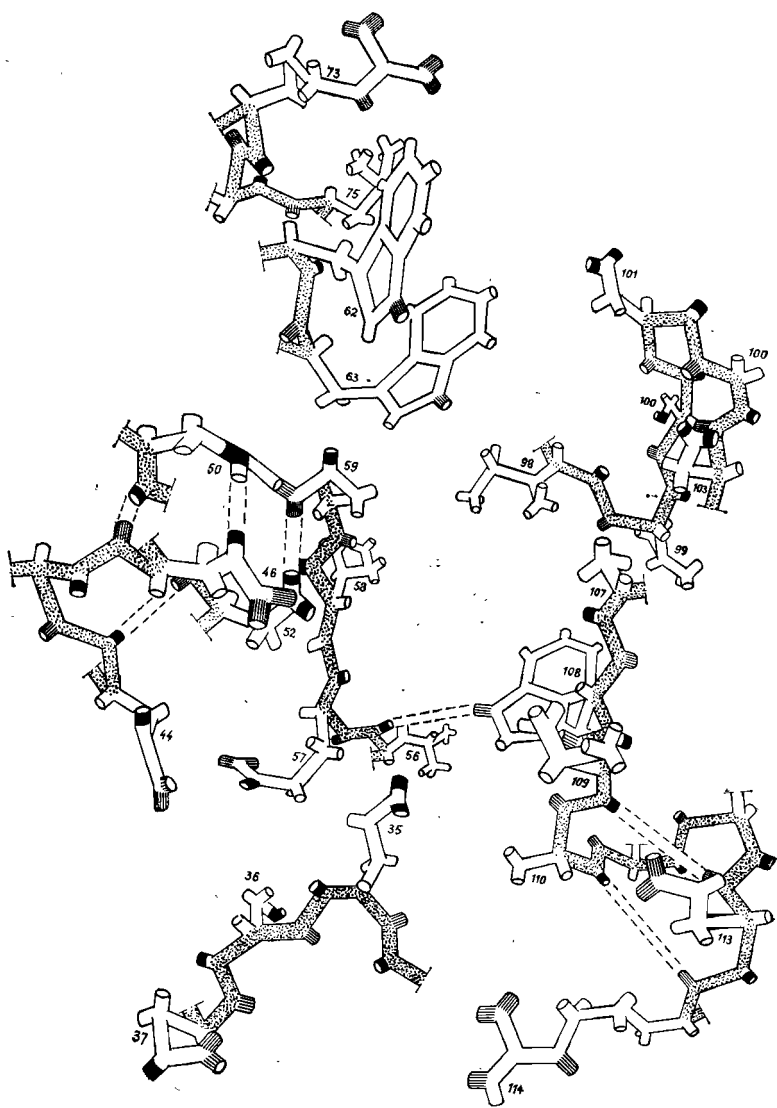


Рис. 10.22. Активный центр лизоцима [438]. Показано расположение атомов в области впадины, в которой связываются ингибиторы. Главная цепь отмечена точками, а атомам N(H) и O отвечают заштрихованные и зачерненные выступы соответственно.

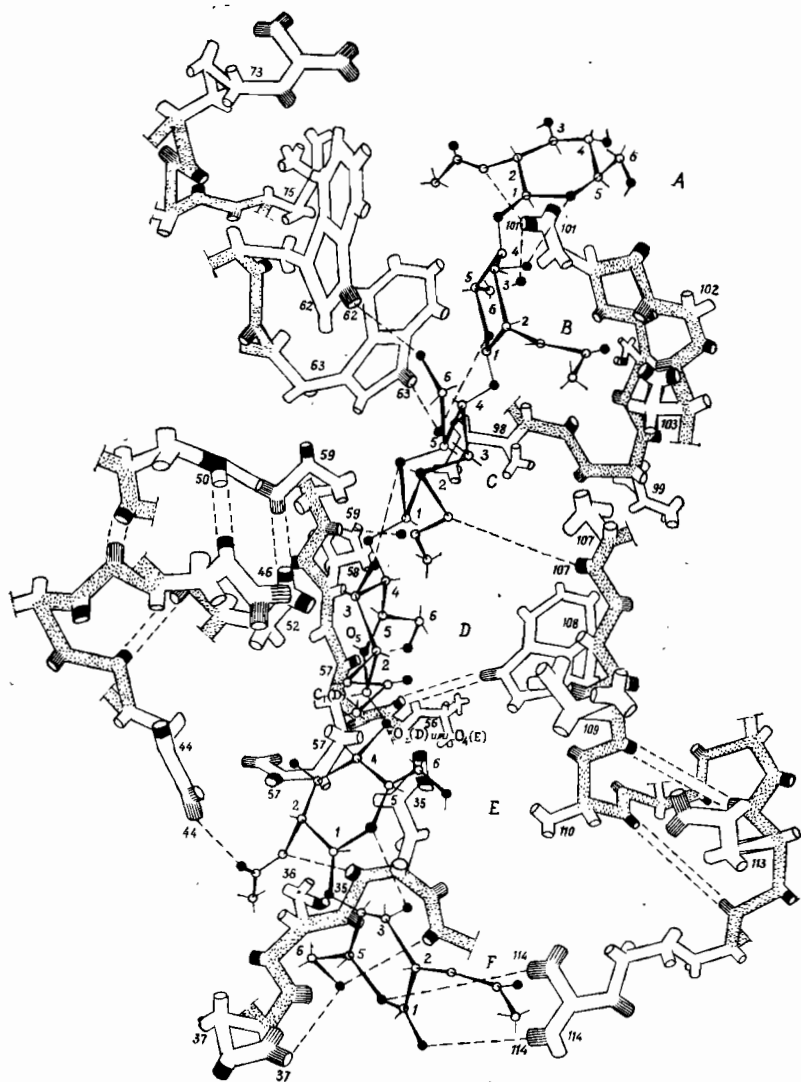


Рис. 10.23. Активный центр лизоцима в комплексе с аналогом субстрата [438]. На рисунке показана конформация молекулы гекса-N-ацетилхитогексаозы, связанной с ферментом. Остатки сахаров А, В и С такие же, как образующиеся при расщеплении три-NAG (и β -NAG для остатка С). При малом разрешении было установлено, что они занимают положения 4, 3 и 2 соответственно; положение остатков D, E и F определяют из модели. Предполагается, что фермент гидролизует связь между остатками D и E.

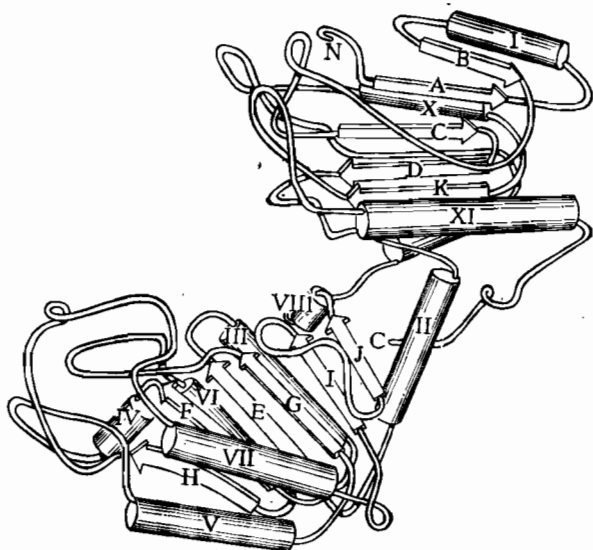


Рис. 10.24. Схематическое изображение молекулы фосфоглицераткиназы [436]. Цилиндры — α -спиральные участки, пронумерованные римскими цифрами с N-конца; стрелки — отдельные цепи β -структуры, обозначенные буквами также с N-конца.

лекулы, а может распространяться на значительную часть молекулы фермента и включать субстратсвязывающие группы, относящиеся к разным участкам главной цепи. На рис. 10.22 изображены участки цепи, которые образуют субстратсвязывающий участок лизоцима, а на рис. 10.23 представлен этот же участок с присоединенным ингибитором, структура которого сходна со структурой субстрата. Некоторые из 16 водородных связей, участвующих в связывании, изображены пунктиром. У ферментов, состоящих из одиночной полипептидной цепи, карман, в котором удерживается субстрат, занимает почти весь поперечник молекулы. Такие ферменты имеют, по-видимому, только один активный центр, поскольку для размещения двух центров просто нет места. В некоторых случаях у фермента имеется особая простетическая группа, например гем или флавин, которые составляют часть активного центра; на молекулу фермента приходится одна такая группа. Более сложные случаи, когда фермент состоит из нескольких субъединиц, обсуждаются в следующем разделе.

Особенно интересным ферментом является фосфоглицераткиназа (КФ 2.7.2.3) из мышц [436]. Она изображена на рис. 10.24 таким же образом, как и карбонат-дегидратаза на рис. 10.12. Молекула содержит не один, а два β -слоя, по одному на каждой стороне кармана. На первый взгляд создается впечатление, что молекула состоит из двух молекул или субъединиц, но при

более внимательном рассмотрении становится очевидным, что она образована одной полипептидной цепью, участки которой объединяют β -слои и α -спирали. Можно было бы полагать, что нижняя половина ее образована одним концом цепи (это относится и к соответствующей ДНК), а верхняя — другим; однако участки, из которых состоит верхняя половина, локализованы у обоих концов пептидной цепи, а участки, образующие нижнюю половину, расположены между ними. Это поднимает интересный вопрос о том, как же в таком случае происходит кодирование.

Результаты, полученные при рентгеноструктурном анализе кристаллов, естественно, дают информацию о структуре фермента в твердом состоянии, и возникает вопрос: сохраняет ли фермент ту же самую конфигурацию в растворе? Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что различия в структуре относительно невелики, за исключением, возможно, тех случаев, когда молекула состоит из субъединиц. Поскольку основная третичная структура молекулы формируется благодаря образованию множества связей между различными частями полипептидной цепи, то следует ожидать, что эта структура будет сохраняться и в растворе, за исключением тех случаев, когда в среде присутствуют денатурирующие агенты (например, мочевины в достаточно высокой концентрации, которая разрушает водородные связи). Однако у поверхности молекулы свободные концы или петли полипептидной цепи могут менять свое положение (ср. лизоцим, [3279]).

Структура активного центра имеет определенные особенности, поскольку он содержит ряд групп, которые притягивают специфический субстрат и в свою очередь притягиваются им. Так как белок не является абсолютно жесткой структурой, можно ожидать, что при взаимодействии с субстратом последний будет «притягивать» эти группы и упаковывать их более плотно вокруг себя. Это представление выдвинуто Кошландом в его теории индуцированного соответствия [2564], в пользу которой получено к настоящему времени много данных (гл. 6). Во многих теориях ферментативного катализа предполагается, что при взаимодействии с активным центром молекулы субстрата в последней индуцируется некоторое напряжение. Из этого в свою очередь следует, что в результате такого взаимодействия напряжение индуцируется и в активном центре. В результате соответствие между активным центром и субстратом становится более полным.

Однако степень изменения конфигурации при индуцированном соответствии не следует переоценивать. Рентгеноструктурные данные показали, что во всех исследованных случаях изменения затрагивают лишь немногие группы в активном центре, а остальная часть молекулы остается практически без измене-

ния. При сопоставлении рис. 10.22 и 10.23 видно, что структура свободного активного центра и центра, связавшего субстрат, практически одинакова.

На рис. 10.25 показана область активного центра карбоксипептидазы А в присутствии и в отсутствие субстрата; этот рисунок иллюстрирует концепцию индуцированного соответствия на примере конкретно наблюдаемых изменений структуры. Как можно видеть, изменения, возникшие при соединении с субстратом, касаются главным образом положения трех боковых групп, которые заштрихованы. Основной эффект состоит в том, что кольцо Туг-248 опускается и в данном ракурсе прикрывает субстрат. Боковая цепь Arg-145 перемещается в направлении к карбоксилу тирозина субстрата, а боковая цепь Glu-270 слегка поворачивается. Структура всей остальной части молекулы остается, по-видимому, без изменений. Весьма интересно было бы получить аналогичные данные для других ферментов.

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА

В предыдущих разделах были рассмотрены ферменты, не имеющие субъединичной структуры, однако молекулы многих ферментов состоят из двух или более субъединиц (см. табл. 10.2). Термин «четвертичная структура» относится к характеру укладки субъединиц; при этом рассматривается как простая димеризация, происходящая при увеличении концентрации фермента в растворе (или диссоциация при разбавлении), так и образование высокомолекулярной системы частиц, содержащей несколько разных ферментов, — системы, структура которой может быть различима с помощью электронного микроскопа.

Диссоциация фермента на субъединицы может происходить под действием различных факторов — от простого разбавления раствора фермента до действия денатурирующих агентов. Было показано, что изменение суммарного заряда олигомера, которое можно вызвать высокой концентрацией соли или изменением рН среды, а также химической модификацией белка также часто приводит к диссоциации; например, сукцинирование вызывает диссоциацию глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [2190], а малеилирование — диссоциацию альдолазы из мышц кролика и из листьев шпината [3826, 4274]. Диссоциацию может вызвать и химическая модификация сульфгидрильных групп; например, при реакции с *n*-хлормеркурибензоатом диссоциируют на субъединицы аспартат—карбамоилтрансфераза [1526] и гексокиназа дрожжей [2719]. Было показано, что при взаимодействии метаболитов с ферментом может протекать как диссоциация на субъединицы, так и ассоциация субъединиц, и некоторые из этих эффектов, по-видимому, участвуют в аллостерической регуляции активности этих ферментов (см. гл. 8).

Некоторые ферменты, состоящие из субъединиц, чувствительны к низкой температуре: при охлаждении они диссоциируют. Так, например, на холоду диссоциирует пируваткарбоксилаза из печени цыплят (на четыре субъединицы) [2144] и митохондриальная АТРаза из сердечной мышцы быка [3645], причем инактивация, связанная с охлаждением, не всегда обратима. В некоторых случаях такие ферменты могут быть стабилизированы глицерином, сахарозой или метанолом; механизм стабилизации остается неясным. Принимая во внимание, что самопроизвольная диссоциация на холоду предполагает выделение тепла, а это в свою очередь указывает на увеличение энтропии в процессе ассоциации, Гутфройнд считает, что в ходе реакции полимеризации происходит освобождение воды [1721].

Методы определения числа субъединиц в белке подробно рассмотрены в обзоре [1423]. В тех случаях, когда процесс ассоциации легко обратим, молекулярная масса субъединиц может быть определена путем экстраполяции величин, полученных одним из обычных методов (таких, как определение коэффициентов седиментации и диффузии, интенсивности светорассеяния или осмотического давления), к нулевой концентрации белка, однако найденная величина может не соответствовать истинному размеру субъединицы; например, белок оксигемоглобин, который является тетрамером, состоящим из двух α - и двух β -субъединиц, при разбавлении легко диссоциирует на димеры из одной α - и одной β -цепи, и только при более жестких условиях обработки диссоциирует на мономеры (см. [2471]).

В некоторых случаях четвертичная структура не является четко фиксированной; например было показано, что при агрегации субъединиц глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.3) образуется линейный стержень; степень агрегации зависит от концентрации фермента и состава растворителя [821, 2281, 3886]. Подобный тип полимеризации может наблюдаться и в случае глутаминазы (КФ 3.5.1.2) [937, 4598]. На рис. 10.26 приведена кривая зависимости константы седиментации химотрипсина от его концентрации; при повышении концентрации белка происходит его полимеризация. В связи с рассмотрением ассоциирующих белковых систем следует помнить, что концентрация белка, при которой обычно определяется ферментативная активность, во много раз меньше концентраций, необходимых для определения молекулярной массы или прямого определения связывания лиганда таким методом, как равновесный диализ (гл. 4). Следовательно, степень агрегации фермента в опытах по определению активности может отличаться от таковой при определении его молекулярной массы или идентификации субстрат-связывающих участков; это может приводить к противоречивым результатам, если активность фермента зависит от степени его агрегации (см. гл. 8).

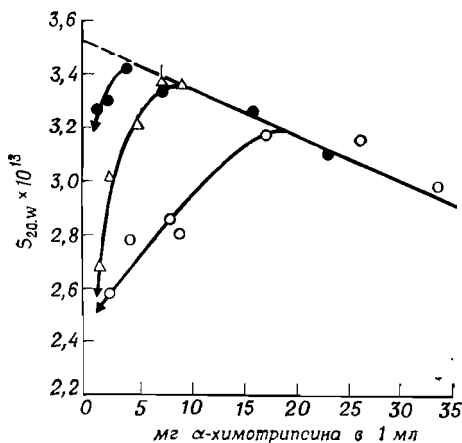


Рис. 10.26. Зависимость константы седиментации α -химотрипсина от его концентрации для трех значений pH. Определения проводили при 25°. ● — pH 3,86, ионная сила 0,2. △ — pH 4,99, ионная сила 0,2. ○ — pH 6,20, ионная сила 0,2.

Для определения молекулярной массы субъединиц используют ультрацентрифугирование в растворе с высокой концентрацией солей или денатурирующих агентов. Следует помнить, однако, что измерение констант седиментации в растворе с высокими концентрациями солей может дать неверные результаты, так как если белок содержит воду, недоступную для растворителя, то в солевом растворе он будет иметь большую плавучую плотность (и отсюда меньшую константу седиментации); именно такая ситуация наблюдалась в случае глицеральдегидфосфатдегидрогеназы из сердечной мышцы кролика [191]. Кроме того, необходимо показать, что в присутствии данной соли или денатурирующего агента происходит полная диссоциация белка. Например, исследования размера субъединиц аспартат—карбамоилтрансферазы, выполненные методом седиментации, дали неправильные результаты, поскольку диссоциация фермента, которую проводили с помощью солей ртути [1526], была неполной [5014].

Особенно простым методом определения молекулярной массы субъединиц, получившим широкое распространение, является электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [1173, 5015]. Показано, что если предварительно разрушить все имеющиеся в молекуле дисульфидные связи, то подвижность белка в среде, содержащей додецилсульфат натрия, будет пропорциональна молекулярной массе субъединиц.

Чтобы предотвратить диссоциацию фермента при обработке его додецилсульфатом натрия, для ковалентного поперечного сшивания субъединиц можно использовать бифункциональные агенты, способные реагировать с боковыми цепями аминокислот в белке (см. обзоры [4724, 5131]). В этих условиях можно определить молекулярную массу агрегированной формы фермента [993]. Преимущество этого метода состоит в том, что

поперечное сшивание может быть проведено при относительно низких концентрациях фермента, так что состояние агрегации будет аналогично таковому в опытах по определению активности фермента.

В арсенале методов, используемых для определения числа субъединиц в ферменте [2121, 5014], важное место занимают методы белковой химии, такие, как определение N-концевых аминокислот [5014] и анализ триптических гидролизатов методом отпечатков пальцев, хотя метод сопоставления числа пептидов, образующихся при гидролизе трипсином, с общим содержанием суммы аргинина и лизина в белке может привести к ошибочным результатам в тех случаях, когда «ядро» молекулы белка устойчиво к действию протеиназы.

Из табл. 10.2 можно видеть, что лишь небольшое число полимерных ферментов образовано нечетным числом субъединиц. Было высказано предположение, что симметрия, которая обусловлена присутствием в ферменте четного числа идентичных субъединиц, может создавать определенные селективные преимущества, и Шанжэ [736, 3217], формулируя одну из теорий аллостерии, учитывал наличие в молекуле фермента оси симметрии; наличие оси симметрии предусматривается также в теории межаллельной комплементации [920]. Однако рентгеноструктурные исследования кристаллов димера гормона инсулина показали, что идентичные субъединицы этого белка расположены несимметрично [116, 472, 4477].

Можно утверждать, что для белков, состоящих из идентичных субъединиц, взаимоузнавание участков взаимодействия двух субъединиц имеет важное селективное значение. Так, если имеется более чем один ген, кодирующий данную полипептидную цепь, то какая-либо мутация в одном гене, приводящая к неправильной укладке полипептидной цепи, повлечет за собой изменение узнаваемого участка субъединицы, он не будет узнан и, следовательно, не будет участвовать в образовании олигомера. Тогда для таких случаев, когда только олигомерная форма обладает значительной активностью, у диплоидных организмов такие мутации не проявятся. Более важное преимущество субъединичной структуры выявляется в процессе межаллельной комплементации (гл. 12). Этот термин характеризует ситуацию, в которой одна вредная мутация может компенсироваться другой мутацией, причем обе эти мутации присутствуют в паре аллельных генов. Высказано предположение, что такая комплементация с образованием олигомерного белка возможна тогда, когда объединяются пары субъединиц с разными мутациями [709, 920, 1337]. Полагают, что комплементация происходит вследствие того, что неправильное свертывание данной молекулы, вызываемое мутацией, компенсируется при взаимодействии ее с другой молекулой, адекватно

уложенной в области взаимодействия. Очевидно, что компенсация не может быть полной и комплементированный фермент будет отличаться от нативной формы такими свойствами, как термостабильность, энергия активации и величина K_m (см. [709]).

Ряд случаев комплементации был исследован *in vitro*. Финчем детально изучил две дефектные мутантные формы глутаматдегидрогеназы из *Neurospora* [808, 1338] и показал, что они могут быть разделены хроматографически и комплементация имеет место только у гибридных олигомерных форм, которые содержат оба типа мутантных субъединиц.

Субъединичная структура, по-видимому, является характерной чертой большинства ферментов. Так, Кэтчсайд [709] показал, что более половины генов, исследованных у *Neurospora crassa*, способны к межallelельным взаимодействиям (комплементации). Эти результаты свидетельствуют о том, что более половины генов в этом организме кодируют образование белков, которые состоят из субъединиц. Из табл. 10.2 видно, что субъединичная структура характерна для внутриклеточных ферментов. Внеклеточные ферменты, как правило, являются относительно простыми белками, их активность не регулируется каким-либо видом специального метаболического контроля.

Большинство теорий кооперативного действия ферментов предполагает, что регуляторные ферменты обладают четвертичной структурой (см. гл. 8), и было показано, что все детально исследованные регуляторные ферменты имеют субъединичную структуру; субъединицы могут быть либо идентичными (что, по-видимому, имеет место в случае глутаматдегидрогеназы [139]), либо разными (как у аспартат—карбамоилтрансферазы [5014]). Алкогольдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа образуются в результате ассоциации субъединиц разных типов, о чем упоминалось выше и будет идти речь в гл. 12.

Кроме тех случаев, когда ферменты обладают четвертичной структурой в клетке, возможно образование четвертичной структуры в процессе их выделения или хранения. Можно полагать, что ферменты, которые в клетке прикреплены к липидсодержащим мембранам, взаимодействуют с липидами этих мембран своими гидрофобными участками. Если при экстрагировании и очистке происходит удаление липидов, то эти «липкие» гидрофобные участки белковых молекул будут взаимодействовать друг с другом, что приведет к агрегации. Такого типа агрегацию наблюдали у фермента UDPглюкоза-липополисахарид—глюкозилтрансферазы I (КФ 2.4.1.58) из *Salmonella typhimurium* [3296].

Расположение лигандсвязывающих участков у полимерных белков различается; как правило, каждая субъединица имеет один связывающий участок для каждого субстрата, однако в

некоторых случаях, например у аспартат-карбамоилтрансферазы, с субстратами и с аллостерическими эффекторами [1526, 5014] взаимодействуют разные субъединицы, а у лактозосинтазы (система, которую мы обсуждали выше) один из двух типов субъединиц непосредственно участвует и в связывании субстрата, и в катализе. Показано, что на две субъединицы UDPглюкоза—4-эпимеразы из дрожжей и *E. coli* связывается одна молекула NAD [969, 5109], а NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа из сердечной мышцы свиньи, которая является октамером, связывает четыре молекулы NADP. Этот, а также другие примеры (см. обзор [2489]) могут быть объяснены тем, что в образовании активного центра участвует не одна субъединица. Проще всего предположить при этом, что каждая из двух субъединиц формирует какую-то часть активного центра. Например, если бы на рис. 10.18 внизу не было узкого мостика между двумя половинками молекулы, мы имели бы две субъединицы, каждая из которых несет одну сторону щели, и активностью обладал бы только комплекс из двух субъединиц. Однако на самом деле ситуация часто оказывается более сложной, и мы пока не располагаем данными, подтверждающими наше предположение, хотя, возможно, присоединение 2,3-бисфосфоглицерата между двумя β -цепями дезоксигемоглобина [483, 3294] является иллюстрацией именно такого случая. Другим объяснением может служить феномен «полуцентральной активности» в мультимерных ферментах. Это явление более подробно обсуждается в гл. 8.

Мультиферментные системы

Мультиферментные системы рассматриваются в рамках представлений о четвертичной структуре, однако следует иметь в виду, что наличие более чем одной каталитической активности у молекулы фермента не обязательно указывает на то, что эти активности связаны с разными субъединицами, хотя обычно это именно так. Иногда в результате слияния генов образуется одна полипептидная цепь с двумя активными центрами, катализирующими совершенно разные реакции, что и было продемонстрировано на примере двух ферментов гистидинового оперона у *Salmonella typhimurium* [5266], а также триптофансинтазы (КФ 4.2.1.20) некоторых грибов [1671]. Анализ аминокислотной последовательности показал, что слияние субъединиц имеет место также у некоторых аминоксил-тРНК — синтаз [2506].

Прочность связывания компонентов в мультиферментной системе может варьировать. В некоторых случаях, например в

комплексе синтетазы жирных кислот у дрожжей и у млекопитающих, а также у 2-оксoglутаратдегидрогеназы млекопитающих, связь между компонентами достаточно прочная. Другие мультиферментные системы, например комплекс триптофансинтазы некоторых видов микроорганизмов и цистеинсинтазы, легко диссоциируют (см. обзор [1568]). Комплексы, у которых прочность связывания относительно мала, могут диссоциировать в процессе выделения и при очистке, как это, по-видимому, происходит при выделении комплекса триптофансинтазы из *E. coli* [1568]. Возможно, некоторые ферменты, выделяющиеся как отдельные ферментные единицы, в клетке находятся в комплексе с другими ферментами. Так, было показано существование комплексов между карбонат-дегидратазой и ксантиноксидазой [1412], F-актином и альдолазой, триозофосфатизомеразой и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой [155, 156]. Ассоциация может происходить между ферментами, каталитические функции которых не связаны непосредственно, а связывание ферментов с клеточными мембранами и органеллами приводит к тому, что расположенными близко друг от друга оказываются самые разные ферменты. Кемпнер и Миллер [2406], исследуя *Euglena gracilis* с помощью центрифугирования, пришли к выводу, что в цитоплазме у этого организма нет свободных ферментов, все они связаны с различными субклеточными структурами.

Образование комплекса может оказывать существенное влияние на активность компонентов системы. В случае триптофансинтазы из *E. coli* комплекс достаточно легко диссоциирует на две α - и одну β_2 -субъединицы, причем последняя диссоциирует на две субъединицы только в условиях, при которых происходит денатурация. Было показано, что активность обеих субъединиц значительно возрастает при образовании комплекса [1568]. Аналогичным образом альдолаза активируется при связывании с F-актином, и на образование комплекса оказывают влияние метаболиты, такие, как АТФ и фруктозо-1,6-бисфосфат [156]. Был очищен комплекс фосфорилазы α из мышц и аланинаминотрансферазы; оказалось, что метаболиты, такие, как АМР, глюкозо-1-фосфат и гликоген, которые влияют на активность фосфорилазы, влияют также на активность трансаминазы в этом комплексе [247].

Иногда диссоциация мультиферментной системы приводит к полной потере активности одним или более компонентами системы. В некоторых случаях такую инактивацию вызывают жесткие условия, в которых проводят диссоциацию, и чтобы исключить такую возможность, необходимо показать, что активность восстанавливается при реассоциации комплекса. Было обнаружено, что активность редуктазы β -кетокислот, являющейся компонентом синтетазы жирных кислот дрожжей, ис-

чезает при диссоциации комплекса в результате замораживания и оттаивания, которые проводят в концентрированном солевом растворе, но восстанавливается при реассоциации комплекса при низких концентрациях соли [4578]. Изменение активности при образовании комплекса обычно приписывают изменению конформации. Однако это весьма неопределенный термин, который в настоящее время используют применительно к изменению не только формы молекул, но и распределения заряда.

Молекулярные массы и число субъединиц в ферментах

Ферменты расположены в порядке возрастания молекулярных масс; в тех случаях, когда ферменты имеют несколько субъединиц, они приведены все в одном столбце вслед за минимальным значением обозначения типа субъединиц; обозначение $\alpha_2\beta_2$ указывает, что фермент является тетрамером, состоящим из двух α - и двух β -цепей, причем аминокислотные последовательности α - и β -субъединиц не идентичны. Последовательность которой близка, но не идентична последовательности фермента, состоящих из четырех и более субъединиц, может протекать в несколько этапов диссоциации. Нередко первый этап диссоциации осуществляется спонтанно, обратимо и легко, а последующие этапы обычно требуют более жесткой обработки, например, с помощью концентрированной додецилсульфата натрия или гуанидина, что почти всегда приводит к полной денатурации и необратимым повреждениям структуры субъединиц.

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Субъединицы	Субъединицы, 10^3
1.8.3.1	Гидрогеназа	<i>Desulphovibrio</i>	1		
3.1.27.3	Гуанилрибонуклеаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	1		
3.1.4.8	Рибонуклеаза	<i>Bacillus subtilis</i>	1		
3.1.27.2	Рибонуклеаза	Поджелудочная железа быка	1		
3.1.27.5	Целлюлаза	<i>Polyporus</i>	1		
3.2.1.4	Ацилфосфатаза	Мозг быка	1		
3.6.1.7	Лизоцим	Куриное яйцо	1		
3.2.1.17	α -Амилаза	<i>B. stearothermophilus</i>	1		
3.2.1.1		<i>Bacillus subtilis</i>			
		<i>Aspergillus oryzae</i>			
		Поджелудочная железа свиньи			
		Солод			
3.1.1.8	Гидроксипролин-эпимераза	<i>Pseudomonas striata</i>	1		

1.7.1.6	Галактокиназа	<i>E. coli</i>	20				
		Эритроциты человека	55	2	27		
3.4.22.2	Папаин	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	4	23	α_4	
1.7.4.3	Аденилаткиназа	Сок <i>Papaya</i> (латекс)	20,7	1	20,7	α	
		Мышцы свиньи	21	1	21	α	
		Мышцы кролика	21				
		Печень крысы	68	3	23		
		Пекарские дрожжи	41				
1.7.1.20	Аденозинкиназа	Печень кролика	23				
1.4.21.1	α -Химотрипсин	Поджелудочная железа быка	23	1	23	α	
1.5.2.6	Пенициллиназа	<i>Bacterium licheniformis</i>	23				
		<i>Bacillus cereus</i>	32				
1.1.3.2	Кислая фосфатаза	Селезенка быка	23				
		<i>Neurospora</i>	85	2	42		
		Простата человека	96				
1.5.1.3	Тетрагидрофлат-дегидрогеназа	Печень цыпленка	23				
1.4.21.4	Трипсин	Культура клеток хомяка	25	1	25		
		Поджелудочная железа быка	23,8	1	23,8	α	
1.4.22.6	Химопайпин	<i>Papaya</i>	27				
1.1.1.11	Пектинэстераза	Томаты	27,5				
		<i>Fusarium</i>	35				
1.2.1.1	Карбонат-дегидратаза	Куринные эритроциты	28	1	28	α	1 атом Zn на молекулу
		Эритроциты человека	34	1	34	α	
1.1.21.1	Дезоксирибонуклеаза I	Поджелудочная железа быка	30	1	30		
		<i>E. coli</i>	110				
1.5.1.19	Никотинамидаза	<i>E. coli</i>	30				
1.4.23.4	Химозин	Желудок теленка	31				
1.15.1.1	Пероксид-дисмутаза	<i>Neurospora crassa</i>	31	2	16	α_2	2 атома Cu + 2 атома Zn на молекулу
		Млекопитающие	32	2	16		1 атом Cu + 1 атом Zn на молекулу
		<i>E. coli</i>	39,5	2	21		
		<i>Rhodospirillum rubrum</i>	180	4			Mn

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
1.1.1.4	Фосфолипаза A ₂ Бензоналгинин- β - нафтиламид — аминогидролаза	Яд змеи <i>Naja naja</i> Лизосомы из печени крыс	33 33				
1.1.1.5	Цитохромпероксидаза	Печень человека Дрожжи	223 34	6 1	38 34	α	1 гсм на молекулу
4.17.1	Карбоксипептидаза A	Поджелудочная железа быка	34,6	1	34,6	α	
6.99.1	NADPH-дегидрогеназа	Листья шпината	35	1	35	α	
1.1.1.49	20 α -Гидроксистероид-дегидрогеназа	Семена свиньи	35	1	35	α	
4.23.1	Пепсин A	Желудок свиньи	35	1	35	α	
2.2.5	NAD ⁺ -нуклеозидаза	Сперма быка	36				
2.1.60	D-3-Гидроксидеаноил- [ацилпереносящий белок] — дегидратаза	<i>E. coli</i>	36	2	18		
3.8.1.1	Тиосульфатсульфид-трансфераза	Печень быка	37	2	18,5	α_2	Спонтанно диссоциирует
3.1.4	Формиминотетрагидрофолат-циклодезаминаза	<i>Clostridium cylindrosporum</i>	38				
1.1.22.1	Дезоксирибонуклеаза II	Селезенка свиньи	38				
4.21.5	Тромбин	Сыворотка крови быка	39	1 +1	33 6		
2.1.61	Микодекстраназа	<i>Penicillium melinii</i>	40				
7.3.3	Аргининкиназа	Омар <i>Potamobius astacus</i>	40 43	1	40	α	

1.1.1.17	Манинитол-1-фос- фат — дегидроге- наза	<i>Aerobacter aerogenes</i>	40				
1.4.1.10	Лениансахараза	<i>Bacillus subtilis</i>	40				
1.1.1.7	Пероксидаза	Хрен	40	1	40	α	
		Японский хрен	55	1	55	α	
		Коровье молоко	82				
1.8.1.2	3-Меркаптопируват- сульфидтрансфе- раза	Печень крысы	40	4	10		
1.6.2.2	Цитохром b_5 -редук- таза	Печень теленка	40	1	40	α	1 FAD на молекулу
1.3.1.7	Маннозонизомераза	<i>Aerobacter aerogenes</i>	40				
1.3.3.1	Стероид- Δ -изомераза	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	40,8	3	13,4	α_2	
1.1.6.1	Арилсульфатаза	<i>Aerobacter aerogenes</i>	41				
		Печень быка	107	4			
1.1.3.9	Галактозооксидаза	<i>Dactyllum dendroides</i>	42				
		<i>Polyporus circinatus</i>	75				
1.1.1.1.2	Экзодезоксирибонук- леаза III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42,5				
1.4.1.2.2	Лактозосинтаза	Коровье молоко	43				
		Молочная железа мыши	44	1 +1	29 15	$\alpha\beta$	Единица с мол. массой 29 000 катализирует образование ацетил- глюкозамина, а не ла- ктозы Единица с мол. массой 15 000 — α -лактальбу- мин
1.14.99.7	Сквален-монооксиге- наза (2,3-эпоксиди- рующая)	Микросомы из печени крыс	44				
1.6.4.2	Глутатионредуктаза (NAD(P)H)	Печень крысы	44				
		<i>Staphylococcus aureus</i>	60	2	30		
		Горох	60				
		Дрожжи	118	2			

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
5.1.2	Тиамин-пиридинилаза	<i>Bacillus thiaminolyticus</i>	44				
2.1.14	D-Сериндегидратаза	<i>E. coli</i>	45,5	1	45,5	α	
2.7.2.3	Фосфоглицераткиназа	Дрожжи	46				
		Мышцы кролика	46				
		Эритроциты человека	49,6	1	49,6	α	
4.1.3.1	Рибулозофосфат — 3-эпимераза	Дрожжи	46				
2.7.2.2	Карбаматкиназа	<i>Streptococcus faecalis</i>	46				
2.7.7.7	ДНК — нуклеотидилтрансфераза	<i>Bacillus subtilis</i>	46				
		<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	80				
		Печень крысы	49				
		<i>E. coli</i>	115	1	110	α	
		Бактериофаг T4	100	1	100	α	
1.1.1.50	3 α -Гидроксистерондегидрогеназа	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	47				
2.7.1.7	Маниокиназа	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	47				
3.1.9	Глюкозофосфатизомераза	Молочная железа коровы	48				
		Эритроциты человека	125	2	63		
		Мышцы человека	134				
		Мышцы кролика	134	2	61		Изоферменты $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$
		Пивные дрожжи	145				
2.4.2.14	Амидофосфорибозилтрансфераза	<i>Aerobacter aerogenes</i>	48				
		Печень голубя	200	4	50		Активные формы с молекулярной массой 200 000, 100 000 и 50 000
2.2.1.3	Экзо-1,4- α -D-глюкозидаза	Печень цыпленка	210				
		<i>Coniophora cerebella</i>	48				

3.4.13	Фосфорибозилгли- цинамид — синте- таза	<i>Aerobacter aerogenes</i>	48			
2.7.1.2	Глюкокиназа	Печень крысы	50			
2.2.1.21	β -D-Глюкозидаза	Почки крысы	50			
		<i>Trichoderma viride</i>	76			
		Дрожжи	300			
1.3.17	Фосфатаза фосфори- лазы	Мышцы кролика	50			
1.1.17	Глутамил-гРНК — синтетаза	<i>E. coli</i>	50			
6.99.2	NAD(P)H-дегидро- геназа (хиинон)	Печень быка	52			
2.6.1.21	D-Аланин — амино- трансфераза	<i>Bacillus subtilis</i>	53			
2.7.5.3	Фосфоглицеромутаза	Мышцы кролика	54	2	27	
		Грудная мышца цыплен- ка	66			
		Дрожжи	112			
1.3.3	Альдоза — 1-эпиме- раза	Почки свиньи	54			
5.1.3	ω -Амидаза	<i>Penicillium notatum</i>	70			
3.1.7	Карнитин-ацетил- трансфераза	Печень крысы	55	2	27	
		Грудная мышца голубя	55			
2.7.1.21	Тимидинкиназа	Тимус теленка	55			
3.1.1	Триозофосфатизо- мераза	Мышцы кролика	56	2	28	
3.4.23.5	Катепсина D	Пекарские дрожжи	56			
2.4.99.2	Метилмалонил- CoA—мутаза	<i>Propionibacterium sher- manii</i>	56			
		Печень овцы	165	2	75	
2.6.1.9	Гистидинолфосфат- аминотрансфераза	<i>Salmonella typhimurium</i>	59	2		
2.7.6.1	Рибозофосфат — пи- рофосфокиназа	Эритроциты человека	60	2	34,5	

1 молекула кооамидного
кофермента на суб-
единицу

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
10.3.2	Лакказа	<i>Polyporus versicolor</i>	60				
1.1.42	Изоцитрадегидрогеназа (NADP ⁺)	<i>Rhus vernicifera</i>	120				4 атома Си на молекулу
		Сердечная мышца свиньи	60	2	32		
		Печень свиньи	75	2	37,5		
		<i>B. stearothermophilus</i>	92,5	2	46		
1.1.1.1	Алкогольдегидрогеназа	<i>Drosophila</i>	60	2	27		Изоферменты α_2 , $\alpha\beta$ и β
		Печень лошади	80	2	41		
		Дрожжи	150	4	37		
3.3.2	Изопентенилдифосфат — Δ -изомераза	Печень свиньи	60				
1.1.37	Малатдегидрогеназа	<i>Chlorella</i> (m и s)	61				Буквами m и s обозначены митохондриальная и супернатантная формы
		Сердце свиньи (m)	70	2		α_2	
		Сердце свиньи (s)	73	2	37	α_2	
		Печень крысы (m)	66	2	33	α_2	
		Шпинат	66				
		<i>Neurospora</i>	67				
		<i>Bacillus subtilis</i>	148	4			
		<i>E. coli</i>	60	2			
1.1.21	Альдозоредуктаза	<i>Rhodotorula</i>	61	1	38	$\alpha\beta$	Спонтанно диссоциирует
				+1	23		Субъединица с мол. массой 38 000 (α) обладает активностью
1.2.4	Дезоксирибозофосфат-альдолаза	<i>Lactobacillus plantarum</i>	61				
1.7.5.1	Фосфоглюкомутаза	Печень крысы	253				
		Мышцы кролика	62	2	31		
		<i>E. coli</i>	75				

1.1.1.8	Глицерол-3-фосфат— дегидрогеназа (NAD ⁺)	Печень крысы Курица Мышцы кролика	63 78 78	2 2	32 40		Спонтанно диссоциирует
1.6.1.1	Несорганическая пиро- фосфатаза	Дрожжи <i>E. coli</i>	63 120	6	20		
1.1.1.30	L-3-гидроксипути- ратдегидроге- наза	<i>Drosophila melanogaster</i>	63				
2.1.1.13	L-Сериндегидратаза	Печень крысы	64	2	34		
2.7.1.40	Пируваткиназа	<i>Neurospora crassa</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces carlsberg- ensis</i>	64 160 191	1 8 4	64 20 48	α	
2.2.1.2	Трансальдолаза	Мышцы кролика Молочная железа коро- вы <i>Candida utilis</i>	230 65 76 +64	4 2 2 1	57 38 32 65	$\alpha_2\alpha'_2$ α_2 β_2 α	Спонтанно диссоциирует Изоферменты α_2 , $\alpha\beta$, β
1.6.1.9	Нуклеотидпирофос- фатаза	Дрожжи	65	1	65		1 FAD на молекулу
1.4.1.3.2	4-Гидроксипбензоат— 3-монооксигеназа	<i>Pseudomonas fluores- cens</i>	65				
1.3.1.18	Галактозид-ацетил- трансфераза	<i>E. coli</i>	65,3	2	29,7	α_2	
9.3.2	Цитохромоксидаза	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67,5	2	33,7		
2.1.2.0	α -D-Глюкозидаза	Дрожжи	68				
6.4.5	Тиоредоксинредукта- за (NADPH)	<i>E. coli</i>	68				
1.3.9.1	мио-Инозитолоксиге- наза	Почки крысы	68				
2.9.9.8	Цистеинсинтаза	<i>Salmonella typhimurium</i>	68	2	34	α_2	Этот компонент действо- ет как ацетилсерин- сульфгидролаза. 1 фосфопиридоксаль на субъединицу

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
1.1.4.16	2' : 3'-цикло-Нуклеотид — фосфодиэстераза		68				
1.4.2.8	Гипоксантинфосфорибозилтрансфераза	Эритроциты человека	68	2	34		
1.4.2.1	Глициндегидрогеназа (цитохром)	<i>Nitrobacter agilis</i>	69				
1.1.1.18	Глутаминил-тРНК — синтетаза	<i>E. coli</i>	69,3	1	69	α	
1.2.1.1	Ацетил-СоА — синтетаза	Сердечная мышца быка	70				
1.2.1.4	Сукцинил-СоА — синтетаза (образующая GDP)	Сердечная мышца свиньи	70				
1.1.1.45	Тимидилатсинтаза	<i>Lactobacillus</i>	70	2	35		
1.1.1.29	Глицератдегидрогеназа	Асцитиные клетки <i>Pseudomonas acidovorans</i>	70 70	2	35		
1.7.4.6	Нуклеозид-дифосфат — киназа	Горох Пекарские дрожжи <i>Bacillus subtilis</i>	70 102 100	4 6	17 17		
1.1.2.14	Фосфо-2-кето-3-дезоксиглюконат — альдолаза	Почки свиньи <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	138 72 86	6 3 2	21 24		
1.1.1.2	Триптофанил-тРНК — синтетаза	<i>E. coli</i> Поджелудочная железа быка	74 110	2 2	37 54	α_2	
1.6.2.3	Цитохром с-редуктаза (NADPH)	Дрожжи	75				

3.1.12	Префенатдегидрогеназа	<i>Aerobacter aerogenes</i>	76	2	40	α_2	1 NAD на молекул
3.3.7	Аконитат — Δ -изомераза	<i>E. coli</i>	80	2	40	$\alpha\beta$	
		<i>Pseudomonas putida</i>	78	2	39		
1.1.1.4	Ацетилсеротонин — метилтрансфераза	Шишковидная железа быка	78	2	39	α_2	
1.13.11.1	Катехол — 1,2-диоксигеназа	<i>Brevibacter fuscum</i>	78				
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	83				
1.1.3.2	UDP-глюкоза — 4-эпи-мераза	<i>E. coli</i>	79	2	39	α_2	
	Люцифераза	<i>Candida pseudotropicalis</i>	250	4	60		
		<i>Photobacter fischeri</i>	79	2	40	$\alpha\beta$	
		Светляки	92	2	52	α_2	
		<i>Diplocardia longa</i>	300	2	71	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	Mg предотвращает диссоциацию
				+2	58		
				+2	14,5		
1.1.3.1	Щелочная фосфатаза	<i>E. coli</i>	80	2	40		
		<i>Bacterium licheniformis</i>	121	4	26		
		Печень быка	190				
		Коровье молоко	190				
2.7.3.2	Креатинкиназа	Мышцы кролика	80	2	40		
		Мышцы цыпленка	80	2	40		
1.7.7.12	Гексозо-1-фосфат — уридилтрансфераза	<i>E. coli</i>	80	4	20		
2.7.3.4	Тауроциаминкиназа	<i>Arenicola marina</i>	80	2	40		
2.7.3.5	Ломбрицикиназа	<i>Lumbricus terrestris</i>	80	2	38		
1.1.2.13	Фруктозобисфосфат-альдолаза	Дрожжи	80	2	40		
		Мышцы кролика	160	4	40		
		Печень кролика	154	4			
		Листья шпината	120	4	30	$\alpha_2\beta_2$	
2.1.1.11	Енолаза	Мышцы кролика	82	2	41	α_2	
		Мышцы обезьяны	82	2	41		
		Дрожжи	88	2	44		
		<i>E. coli</i>	90	2	44		
		Мышцы форели	91				
		Мышцы лосося	100	2	50		

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
1.4.1.7	Сахарозофосфорилаза	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	84				
1.2.1.23	β -D-Галактозидаза	Печень быка	85				
		Печень крысы	127				
		<i>E. coli</i>	135	4	34		
			или 320	4	75		
1.99.10	Глюкозодегидрогеназа (акцептор)	<i>Bacterium anthracinum</i>	86				
1.1.1.23	Гистидинолдегидрогеназа	<i>Salmonella typhimurium</i>	87	2	40		
1.1.1.1	Тирозил-tPHK — синтетаза	<i>Bacillus subtilis</i>	88				
		<i>E. coli</i>	95				
1.2.1.35	Гиалуроноглюкозаминидаза	Печень крысы	89				
1.3.2	Оксидаза L-аминокислот	Почки крысы	89				
		<i>Crotalus</i>	135	2	70		2 FAD на молекулу
1.2.4.1	Пируватдегидрогеназа (липоат)	<i>E. coli</i>	90	2	45		Изоферменты α_2 , $\alpha\beta$ и β_2
1.4.2.1	Пуриннуклеозидфосфорилаза	<i>B. cereus</i> (вегетативная форма)	90	4	24		
		(споры)	95	4	24		В отсутствие фосфата диссоциирует на димеры
1.6.1.1	Аспаратаминотрансфераза	Пекарские дрожжи	91				
		Сердечная мышца	100	2	50		
		свиньи					
1.14.13.1	Салицилат — 1-монооксигеназа	Почвенные бактерии	91	2			2 FAD на молекулу

4.3.6	Аминоксидаза (содержащая пиридоксаль)	Проростки гороха	96				
		Плазма крови свиньи	195				
		Плазма крови быка	255				
3.99.1	Суццинатдегидрогеназа	Сердечная мышца быка	97	1 +1	70 27	$\alpha\beta$	Субъединица с мол. массой 70 000 содержит 1 FAD. Обе субъединицы содержат Fe
	Глиоксилатредуктаза	Листья шпината	97,5	2	48,7		
	Рибулокиназа	<i>E. coli</i>	98	2	50	α_2	
	Серил-тРНК — синтетаза	<i>E. coli</i>	98	2	47	α_2	
	Гексокиназа	Дрожжи	120	2	60		
		Печень крысы	100				
		Дрожжи	104	2	51		
	Ацетондегидрогеназа	<i>Aerobacter aerogenes</i>	100	4	25		
	Формиминоглутамат-дезимилаза	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	2	53		
	Цитрат (si)-синтаза	Сердечная мышца свиньи	100	2	50	α_2	
		Сердечная мышца крысы	100	2			
		Печень крысы	100	2			
	β -D-Маниозидаза	Яйцевод курицы	100				
	Глюкозаминфосфат-изомераз (образующая глутамин)	<i>E. coli</i>	100				
		<i>Bacillus subtilis</i>	100				
		Печень крысы	340				
		Клетки HeLa	340				
13.11.19	Цистеамин-диоксигеназа	Почки лошади	100	2	50		
3.1.2	Метиласпартат — амин-ацетилаза	<i>Clostridium tetanomorphum</i>	100	2			
7.3.3	Уратоксидаза	Печень свиньи	100				
4.3.3	Оксидаза D-аминокислот	Почки свиньи	100	2	50		
1.1.43	Фосфоглюконатдегидрогеназа	Печень крысы	102	2	52		
		Печень овцы	129				
6.4.3	Липоамид-дегидрогеназа (NAD ⁺)	Печень быка	102				
		Листья шпината	102	2			
		Сердечная мышца свиньи	112	2	56		2 FAD на молекулу
		<i>E. coli</i>	112				

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
1.1.1.6	Лизил-тРНК — синтетаза	<i>E. coli</i>	104		60		
1.1.1.4	Лейцил-тРНК — синтетаза	Дрожжи	138	2	69	α	
1.3.11.12	Липоксигеназа	Бобы сои	108	2	54		
1.3.3	Орнитин — карбоамилтрансфераза	Печень быка	108	3	37		1 остаток субъединицу с мол. массой 37 000
		<i>Streptococcus faecalis</i>	223	6	39		1 остаток метионина на субъединицу с мол. массой 39 000
1.5.3.1	Аргиназа	Печень кролика	110		36,5		
1.1.1.9	Валил-тРНК — синтетаза	<i>E. coli</i>	110	1	110	α	1 цепь и 1 субстратсвязывающий участок на молекулу
1.4.24.3	Коллагеназа	Дрожжи	112				
1.1.1.5	Изолейцил-тРНК — синтетаза	<i>Clostridium histolyticum</i>	110				
1.6.1.2	Аланинаминотрансфераза	<i>E. coli</i>	114	1	114	α	
1.6.1.5	Тирозинаминотрансфераза	Печень крысы	114				
1.7.2.4	Аспартаткиназа	Сердечная мышца свиньи	115				
		Печень крысы	115	4	32	α_4	4 фосфопиридоксаль на молекулу
1.10.3.1	Катехолоксидаза	<i>Bacillus polymixa</i>	116	2	47	$\alpha_2\beta_2$	
[1.14.18.1]	Монофенол-монооксигеназа	<i>E. coli</i>	177	+2 4	17 46		
2.2.1.1	Транскетолаза	Грибы	120	4	30		
		<i>Neurospora</i>	120	4	30		
		Муха комнатная	120	4			
		Пекарские дрожжи	140	2	70	α_2	

3.3.1	Дигидро-оротат — оксидаза	<i>Zymobacter oroticum</i>	120	2			2 FAD, 2FMN и 4Fe на молекулу
2.6.1.30	Пиридоксаминпируват—трансаминаза	<i>Pseudomonas</i> Бактерии, разные виды	120 150	4	38		2 субстратсвязывающих участка на молекулу
1.3.16	4-Гидроксн-2-оксо-глутарат — альдолаза	Печень крысы	120				
2.7.7.7	ДНК — нуклеотидил-трансфераза	<i>E. coli</i>	120				
3.1.2.2	Пальмитонил-СоА — гидролаза	<i>E. coli</i>	122	4	30	α_4	
6.3.2.3	Глутатионсинтетаза	Пекарские дрожжи	123				
3.5.4.12	dCMP-дезаминаза	<i>E. coli</i> (индуцированы фактом T4g ⁺)	124	6	20		
3.1.3.11	Фруктозо-бисфосфатаза	Печень кролика	130	2	30	$\alpha_2\beta_2$	4 субстратсвязывающих участка на молекулу
1.1.1.49	Глюкозо-6-Фосфат—дегидрогеназа	Молочная железа крысы	130	+2 2	37 63		
		Надпочечники быка	239				
		Эритроциты человека	210	4	53		NAD образует тетрамер.
		Дрожжи	212	4	51		
		<i>Neurospora crassa</i>	206	4	57		NADP стабилизирует тетрамер. Субъединицы не идентичны
2.6.1.13	Орнитин-оксокислота — аминотрансфераза	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Митохондрии из печени крыс Почки свиньи	190 132 250	4	33		2 фосфопиридоксальных центра на молекулу 4 фосфопиридоксальных центра на молекулу

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
3.5.1.1	Аспарагиназа	<i>E. coli</i>	133 (также 255)	4 12	33 22)	α_4	Молекула с мол. массой 255 000 спонтанно диссоциирует; образуется форма, мол. масса которой 133 000; последняя в мочевины диссоциирует на субъединицы с мол. массой 22 000
3.5.3	Фосфорибозилформилглицинамид — синтетаза	Сыворотка крови морской свинки <i>Salmonella typhimurium</i>	138 135				
1.1.27	Лактатдегидрогеназа	Сердечная мышца свиньи	135	4	27		Изоферменты $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$ и β_4
3.5.1.38	Глутамин(аспарагин)аза	Сердечная мышца быка Семенники мышей Мышцы акулы Мышцы краба <i>Achromobacter</i>	136 140 140 140 138	4 4 4 4 4	36 37.7 35 35 35		
1.1.3	Гомосериндегидрогеназа	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	138	2	76		Диссоциирует при удалении соли. Форма с мол. массой 76 000 обладает полной активностью, но нечувствительна к ингибиторам, действующим по типу отрицательной обратной связи

17.1.37	Протеникиназа (зависит от cAMP)	Надпочечники быка Ретикулоциты кролика Сердечная мышца быка	140 140 280			42 + 55		Субъединицы с мол. массой 42 000 активны, их активность не зависит от cAMP. Субъединицы с мол. массой 55 000 присоединяют cAMP
10.3.5	3-Гидроксиантранилат-оксидаза	Тыква	140					
11.2.19	Рамнулозофосфатальдолаза	<i>E. coli</i>	140	4		35	α_4	
12.1.5	Сукцинил-СоА — синтетаза (образующая ADP)	<i>E. coli</i>	140	2 + 2		38,5 29,5	$\alpha_2\beta_2$	
13.11.2	Катехол—2,3-диоксигеназа	<i>Pseudomonas arvilla</i>	140					
13.11.8	Прото-катехат — 4,5-диоксигеназа	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	140					В организме разделены α - и β -формы катализируют разные, последовательно протекающие реакции. Каждая из форм активна, но при соединении активность их существенно возрастает. β -Форма содержит 1 фосфолипидоксаль на молекулу
12.1.20	Триптофансинтаза	<i>Neurospora</i>	140	2 + 2				
		<i>E. coli</i>	159	2 + 2		29,5 49,5	(α) (β)	
		<i>Pseudomonas putida</i>				43	(β)	
13.27	Антракилат-синтаза	<i>Serratia marcescens</i>	141	4			$\alpha_2\beta_2$	
		<i>Neurospora crassa</i>	240	6		40		
13.12	2-Изопропилмалат-синтаза	<i>Neurospora crassa</i>	143	3				
		<i>Salmonella typhimurium</i>	200	4		50		

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
2.7.1.11	6-Фосфофруктокиназа	<i>Clostridium pasteurinum</i> Мышцы кролика	144 190	4 2	35 78		
		Эритроциты кролика	500		53		
		Дрожжи	600	6	100		
2.1.1.2	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	Мышцы кролика	144	4	36	α_4	
		Мышцы свиньи	144	4	36		
		<i>E. coli</i>	144	4	36		
		<i>Bacillus stearothermophilus</i>	144	4	37		
2.1.3.2	Тартратдегидратаза	<i>Pseudomonas putida</i>	145	4			
4.99.1	Метиласпартатмутаза	<i>Clostridium tetanomorphum</i>	145		128 17	(α) (β)	Спонтанно диссоциирует: присутствует в виде неактивных α - и β -субъединиц. α -Субъединица присоединяет субстрат и в присутствии субстрата присоединяет кобаламиновый кофермент; β -субъединица — SH-белок
2.1.1.9	Имидазолглицеролфосфат-дегидратаза	<i>Salmonella typhimurium</i>	145				
3.2.3.1	Тиогликозидаза	Семена белой горчицы	151	2	62	α_2	Содержит углевод
1.1.3.4	Глюкозооксидаза	<i>Penicillium notatum</i>	152				
		<i>Aspergillus niger</i>	186				
3.2.1.49	α -N-ацетилгалактозаминидаза	Печень быка	155	4	42		2 FAD на молекулу
3.2.1.30	β -N-ацетилглюкозаминидаза	Почки крысы	160				Спонтанно диссоциирует

4.2.1.16	Треониндегидратаза	<i>E. coli</i> <i>Clostridium tetanomorphum</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	155 160 195	4 4	40 48,5	α_4	Каждая субъединица состоит из двух цепей и содержит 1 молекулу фосфопиридоксала. АТР или АДФ стабилизируют форму с мол. массой 160 000, при удалении образуется форма с мол. массой 90 000 (у <i>E. coli</i> 78 000)
4.1.3.20	Фосфоглицератфосфатаза	Сахарный тростник	160	.	.		
2.99.9	Цистатионин-γ-сукцинатаза	<i>Salmonella typhimurium</i>	160	4	40		
2.1.17	Еноил-СоА — гидратаза	Печень быка	164	6	28		
3.1.1.1	Карбоксилэстераза	Печень быка Печень свиньи	164 168	6 4	28 42	$\alpha_2\beta_2$	Спонтанно диссоциирует на активные формы: мол. массой 84 000; субъединицы с мол. массой 42 000, активностью не обладают
4.3.1.9	Ацетил-СоА — ацетилтрансфераза	Сердечная мышца свиньи	170	4	42,5		
4.1.3.1	Изоцитрат-лиаза	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Pseudomonas indigofera</i>	170 202	4 4	48		
4.1.1.1	Пируватдекарбоксилаза	Пивные дрожжи <i>E. coli</i> Пекарские дрожжи	175 180 209	4 2 2	90 108		
4.5.3.7	Гуанидинобутираза	<i>Pseudomonas putida</i> Печень ящерицы	180 252	.	.	$\alpha_2\beta_2$	
4.1.1.20	Фенилаланил-тРНК-синтетаза	<i>E. coli</i> Пекарские дрожжи	180 276	4 2 +2	45 75 63		

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
1.1.1.10	Метионил-тРНК — синтетаза	<i>E. coli</i>	180	4	45	α_4	Субъединицы обладают активностью
1.1.2.4	Глицин — формил-трансфераза	<i>Clostridium cylindrosporum</i>	180				
1.1.1.10	Гомоцистеин — метил-трансфераза	Печень лошади	180	4	50		
	Аспартат — аммиак-лиаза	<i>Enterobacter aerogenes</i>	180	4			
1.4.1.1	Фосфорилаза	Печень кролика	185	2	92		
		Печень кролика (активная форма)	185	2	92		
		(неактивная форма)					
		Мышцы кролика (активная форма)	370	4	92,5		
		(неактивная форма)	240	2			
		Картофель	207				
		<i>E. coli</i>	140				
4.1.1.64	Декарбоксилаза диалкиламино кислот (пируват)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	188	8	23	α_8	
		<i>Arthrobacter</i>	188	8	23		
6.3.4.16 (2.7.2.5)	Карбамоилфосфат-синтетаза (аммиак)	<i>E. coli</i>	190	1	140	$\alpha\beta$	
		Печень лягушки-быка	315	+1	48		
4.1.1.22	Гистидиндекарбоксилаза	<i>Lactobacillus</i>	190	5	29,7		В состав субъединицы с мол. массой 29 700 входит пиридоксаль. 4 фосфопиридоксаль не молекулу
				+5	9		
4.4.1.1	Цистатионин-γ-лиаза	Печень крысы	190				
4.2.1.2	Фумарат-гидратаза	Сердечная мышца свиньи	194	4	48,5		

2.4.14.1	Дипептидилпептидаза	Селезенка быка	197	8	24,5	$\alpha_6\beta_2$	
3.1.3	Гистидин — аммиак-лиаза	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	198				
1.1.1.31	Фосфосолпируват-карбоксилаза	<i>Salmonella typhimurium</i>	198	4	49,2	α_4	
		<i>Arachia hypogaeae</i>	350				
		<i>E. coli</i>	402	4	100		
1.6.1.5	Апираза	Клубни картофеля	200	4	50		
2.4.2.14	Амидофосфорибозил-трансфераза	Печень голубя	200	4	50		Формы с мол. массой 200 000, 100 000 и 50 000 активны
		Печень дылплат	210				
2.1.3	Альдегид-дегидрогеназа	Печень человека	200				
		Печень лошади	250	4	57		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250				
		Дрожжи	210	4	53		
1.1.1.20	Диаминопимеллинат-декарбоксилаза	<i>E. coli</i>	200				
2.7.7.8	Полирибонуклеотид — нуклеотидилтрансфераза	<i>E. coli</i>	200	2	95		
		<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	230				
2.1.7	Безальдегиддегидрогеназа (NADP ⁺)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	200				
4.3.2.1	Аргининосукцинат-лиаза	Печень быка	202	4	50		При низкой температуре диссоциирует с образованием неактивной формы с мол. массой 100 000. В присутствии субстрата эта форма переходит в активную форму с мол. массой 200 000
1.1.9.1	Триптофаназа	<i>Bacillus alvei</i>	208	4	50,5	α_4	В отсутствие фосфоридоксала диссоциирует на димеры
		<i>E. coli</i>	208	4	55		
2.1.2.26	β -D-Фруктофуранозидоза	<i>Neurospora crassa</i>	210	4	51,5	$\alpha_2\beta_2$	Димер активен

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
3.3.4.2	СТР-синтетаза	<i>E. coli</i>	210	4	50	α_4	Выделяется в виде димера, но в присутствии АТР превращается в тетрамер
3.2.1.31	β -D-глюкуронидаза	Почки крысы	210				
		Печень человека	218				
3.2.1.51	α -L-Фукозидаза	Лизосомы из печени крыс	280	4	75	$\alpha_2\beta_2$	
		Эпидидимис крысы	210	2	60		
3.2.1.2	β -Амилаза	Батат	215	+2	47		
3.4.2.17	АТР-фосфорибозил-трансфераза	<i>Salmonella typhimurium</i>	215	6	35	α_6	
3.7.1.30	Глицеролкиназа	<i>E. coli</i>	217	4	55		
		<i>Candida mycoderma</i>	251				
3.1.3.18	Ацетолактатсинтаза	<i>Aerobacter aerogenes</i>	220	4	58		Нативный фермент, по-видимому, является димером. Субъединица имеет 1 тиоловую группу, 1 дисульфидный мостик и 1 тиаминдифосфат
3.1.1.14	Глицил-тРНК — синтетаза	<i>E. coli</i>	227	2	80	$\alpha_2\beta_2$	
3.4.1.1	Аланиндегидрогеназа	<i>Bacillus subtilis</i>	230	+2	33		
3.1.1.47	Синтаза полуальдегида тартроновой кислоты	<i>Pseudomonas oxalaticus</i> (анофермент)	230	4	61		2 FAD на молекулу. При восстановлении FAD фермент инактивируется
			115	2	60)		
3.11.1.6	Каталаза	Печень быка	232	4	57,5		
		<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	232				

1.2.3	Лактатдегидрогеназа (цитохром b_2)	Дрожжи	235	4	57	α_4	Каждая субъединица содержит 1 FMN и 1 гем. Тетрамерная структура стабилизируется с помощью катионов
3.4.3	Формилтетрагидрофолат-синтетаза	<i>Clostridium cylindrosporum</i>	240	4	60	α_4	
13.11.9	2,5-Дигидроксипириндин — 5,6-диоксигеназа	<i>Pseudomonas putida</i>	242	6	39,5		
14.11.2	Пролин, 2-оксоглутарат — диоксигеназа	Куриный эмбрион	248	2	113		
2.1.24	Порфиобилиногенсинтаза	<i>Rhodospirillum spheroides</i>	250	12	20		
2.1.24	α -D-Маниозидаза	Печень мышей	250	6	42		
2.1.22	Цистатионин- β -синтаза	Яйцевод курицы	250	2	51		
4.11.1	Лейциламинопептидаза	Почки свиньи	255	+2	73		
1.1.7	Ацетилхолинэстераза	Хрусталик глаза быка	327	4	63,5		
1.1.4	Ацетоацетатдекарбоксилаза	<i>Electrophorus electricus</i>	259	12	21,5		
1.2.2.2	Пируватдегидрогеназа (цитохром)	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	260	8			
1.1.3.1	Оксидаза L-2-гидроксикислот	Хлоропласты шпината	325	12	28		
6.4.1.1	Пируваткарбоксилаза	<i>E. coli</i>	265	4			2 молекул. При низких температурах диссоциирует на 4 тетрамера; каждый тетрамер содержит 1 молекулу биотина и 1 атом Mn
3.1.4.32	Эндодезоксирибонуклеаза (АТР- и S-аденозил-L-метионинзависимая)	Листья шпината	270	4	70		
		<i>Pseudomonas citronellolis</i>	270	2	135		
		Печень цыпленка	660	16	45		
		<i>Hemophilus influenzae</i>	270				

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10 ³	Структура	Примечание
4.11.2	Аминопептидаза (микросомальная)	Почки свиньи	280				
4.6.1.3	Аденозинтрифосфатаза	Мозг свиньи Митохондрии из сердечной мышцы быка <i>Streptococcus faecalis</i>	280 284 385	12 6 12			На холоду спонтанно диссоциирует
4.4.3.2	Лизин — 2,3-аминомутаза	<i>Clostridium</i>	285	6	33 48		
4.1.1.41	Изоцитратдегидрогеназа (NAD ⁺)	Пекарские дрожжи Сердечная мышца быка	300 330	8 8	39 41		
4.3.1.30	Цистеинсинтаза	<i>Salmonella typhimurium</i>	309	1	160		Диссоциирует в присутствии ацетилсерина
4.2.99.8				+2	68		
4.1.3.2	Аспартат — карбоамилтрансфераза	<i>E. coli</i>	310	6 +7	33 17	(α) (β)	Форма α_3 обладает активностью. Субъединица β — регуляторная, присоединяется к СТР
4.1.1.15	Глутаматдекарбоксилаза	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>E. coli</i>	360 310	2 6	180 50	α_3 α_6	
4.5.4.6	АМР-деаминаза	Мышцы кролика	320				

4.1.3	Глутаматдегидрогеназа (NAD(P) ⁺)	Печень быка	320	6	57		Образует крупные агре-
6.3.1.2	Глутаминсинтетаза	Печень китайского хо- мячка <i>Neurospora crassa</i>	335 360	8 4	42 90	α_8	Истидии вызывает агре- гацию
		Мозг овцы Мозг быка	450 525	8	65		В отсутствие АТР диссо- циирует на тетрамер
2.7.2.4	Аспартаткиназа + го- мосериндегидроге- наза	Проростки гороха	450				
1.1.1.3		<i>E. coli</i>	592	12	48,5	α_{12}	
		<i>E. coli</i>	340	4	80	α_4	Обе активности принад- лежат одному белку
2.4.1.64	Пептидаза α, α -Трегалозофосфо- рилаза	Эритроциты овцы <i>Euglena gracilis</i>	340 344	6	56	α_6	
5.3.1.4	L-Арабиноизомер- аза	<i>E. coli</i>	362	6	60	α_6	
2.7.7.9	Глюкозо-1-фосфат — уридилтрансфе- раза	<i>Dictyostelium discoideum</i> Печень теляка	390 480	8	55 60	α_8	
2.7.7.6	РНК — нуклеотидил- трансфераза	Эритроциты человека <i>Pseudomonas putida</i>	440 400	1 +1 +1 +2	165 155 95 39	$\alpha_2\beta\beta'\sigma$	Каждая субъединица со- стоит из 1 пептидной цепи
		<i>E. coli</i>	400 также 880	2	440		К субъединице с мол. массой 400 000 присо- единяется 1 цепочка poly U
2.4.1.13	Сахарозсинтаза	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Phaseolus aureus</i>	782 400	2 4	391 94	α_4	

Кодовый номер	Название фермента	Источник фермента	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Число субъединиц	Молекулярная масса субъединицы, 10^3	Структура	Примечание
1.1.38	Фосфоенолпируват-карбоксикиназа (пирофосфат)	<i>Propionibacterium shermanii</i>	400	4	100	α_8	Активны все формы, т.е. формы с мол. массой 400 000, 200 000 и 100 000. Субстраты превращают и тетрамер, и мономер в димер
1.7.7.4	Сульфат — аденилат-трансфераза	<i>Penicillium chrysogenum</i>	440	8	56		
1.5.1.5	Уреаза	Канавалия мечевидная	483	6	83		
1.1.39	Рибулозодифосфат-карбоксилаза	<i>Hydrogenomonas</i> Листья шпината	515 550	8 +12	41 52 12		Субъединицы с мол. массой 52 000 выполняют каталитическую функцию, субъединицы с мол. массой 12 000 выполняют регуляторную или структурную функцию
		<i>Chromatium</i>	550		57 +12		Спонтанно диссоциирует при высоких pH
1.1.40	Малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая оксалоацетат) (NADP ⁺)	<i>E. coli</i>	550	8	67	α_8	
1.3.6	Цитрат (про-3S)-лиаза	<i>Aerobacter aerogenes</i>	575	8	74		
1.3.1	Метилмалонил-СoA — карбоксил-трансфераза	<i>Propionibacterium shermanii</i>	670	3 +6 +6	115 55 12		В отсутствие солей диссоциирует при pH 10. Каждая наименьшая субъединица содержит 1 молекулу биотина

1.1.1.12	Аспартат-4-декарбоксилаза	<i>Alcaligenes faecalis</i>	675	12	57	α_{12}	Каждая субъединица содержит 1 молекулу фосфопиридоксала
		<i>Achromobacter</i>	760		60		
		<i>Pseudomonas dacunhae</i>	800	16	50	α_{16}	Субъединица состоит из одной пептидной цепи и содержит 1 молекулу фосфопиридоксала. Молекула имеет 8 субстратсвязывающих центров и содержит 8 атомов негемового Fe. Субъединица с мол. массой 58 000 содержит флаavin и негемовое Fe. Она катализирует восстановление цитохрома с при участии NADPH. Субъединица с мол. массой 53 000 катализирует восстановление сульфита виологеном.
1.13.11.3	Протокатехат—3,4-диоксигеназа	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	700	8			
1.8.1.2	Сульфитредуктаза (NADPH)	<i>E. coli</i>	700	8 +4	58 53		
1.4.1.3	Пропионат-КоА—карбоксилаза (гидролизующая АТР)	Сердечная мышца свиньи	700	4			
1.1.1.19	Аргининдекарбоксилаза	<i>E. coli</i>	820	10	82	α_{10}	Субъединица состоит из одной пептидной цепи
1.3.1.12	Липоат-ацетилтрансфераза	<i>E. coli</i>	960	24	40	α_{24}	Субъединица состоит из одной пептидной цепи. Фермент образует комплекс с пируватдегидрогеназой и дигидролипонамиддегидрогеназой (NAD ⁺)

Оглавление

Глава 7. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ	397
Активный центр	401
Исследование механизма действия	404
Оксидоредуктазы	407
Механизм восстановления NAD(P)^+	415
Трансферазы	424
Идентификация связи, расщепляемой в ходе реакции	425
Одно- или двухстадийный перенос?	429
Гидролазы	439
Эстеразы и протеиназы, в функционировании которых участвуют активные остатки серина и цистеина	440
Другие протеиназы	447
Лизоцим	452
Рибонуклеаза и нуклеаза микрококков	456
Фосфатазы	458
Лиазы	460
Изомеразы	465
Лигазы (синтетазы)	469
Глава 8. ИНГИБИРОВАНИЕ И АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ	481
Ингибиторы	481
Типы обратимого ингибирования	482
Сводка, иллюстрирующая различные типы влияния ингибиторов	497
Определение ингибиторных констант	500
Определение ингибиторных констант для систем с частичным ингибированием	508
Ингибирование в ферментных системах с несколькими субстратами	509
Наличие ингибитора в препарате субстрата	510
Другие типы ингибирования	514
Нелинейная кинетика ингибирования	515
Неспецифические эффекты ингибирования	518
Ингибиторы с очень высоким сродством	518
Влияние pH на ингибирование	528
Необратимое ингибирование	530
Активаторы	545
Влияние на скорость реакции	545
Равновесные эффекты	561
Неспецифическое влияние ионов	564
Липофильные ионы	569

Аллостерические и кооперативные эффекты	570
Аллостерические эффекты	570
Кооперативные эффекты	571
Способы представления данных по кооперативности	605
Выбор модели кооперативности	606
Скорости реакций в кооперативных системах	620
Артефакты	651
Глава 9. КОФАКТОРЫ ФЕРМЕНТОВ	661
Механизм действия	661
Кофакторы, действующие как переносчики	664
Окислительно-восстановительные переносчики	664
Переносчики фосфата	713
Переносчики CO_2	715
Переносчики аминогрупп (аминокислот)	717
Переносчики гликозильных групп	720
Переносчики ацильных групп	721
Переносчики одиоуглеродных групп	724
Переносчики сульфата	729
Переносчики альдегидных групп	730
Глава 10. СТРУКТУРА ФЕРМЕНТОВ	732
Структура ферментов	735
Первичная структура	738
Вторичная структура	750
Третичная структура	753
Четвертичная структура	768

Оглавление первого тома

Предисловие редакторов перевода	5
Предисловие	7
Из предисловия ко второму изданию	9
Из предисловия к первому изданию	10
Благодарности	12
Глава 1. ВВЕДЕНИЕ	13
Специальные термины	18
Глава 2. МЕТОДИКА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ	22
Измерение скорости ферментативных реакций	22
Типы методов, используемых при изучении ферментативных реакций	25
Некоторые практические соображения	26
Общие правила работы с ферментами	27
Исследование фермента	29
Удельная и молекулярная активности	31
Сродство фермента к реагирующим веществам	34
Методы количественного изучения ферментативных реакций	36
А. Спектрофотометрические методы	36
Б. Флуоресцентные методы	40
В. Манометрические методы	40
Г. Электродные методы	41
Д. Поляриметрические методы	42
Е. Методы с отбором проб	43
Глава 3. ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ	45
Значение очистки ферментов	45
Методы очистки	47
А. Методы определения ферментативной активности	47
Б. Общие приемы	48
В. Источник фермента	51
Г. Экстракция	52
Методы фракционирования	54
А. Фракционное осаждение при изменении рН	56
Б. Фракционная денатурация нагреванием	56
В. Фракционное осаждение органическими растворителями	57

Г. Фракционирование солями	58
Д. Фракционная адсорбция	61
Е. Колоночная хроматография	63
Ж. Электрофорез	67
З. Кристаллизация	71
И. Чередование методов фракционирования	72
К. Другие методы	74
Л. Концентрирование	75
Критерий чистоты ферментов	76
Затруднения, встречающиеся при работе с чистыми ферментами	80

Глава 4. КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ 82

Значение исследования кинетики действия ферментов	82
Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций	83
А. Влияние концентрации фермента	83
1. Вогнутые кривые $v - [E]$	84
2. Выпуклые кривые $v - [E]$	87
Б. Влияние концентрации субстрата	92
Ферментативная кинетика одиосубстратных реакций	92
Теория Михаэлиса	95
Теория стационарного состояния	95
Кинетические уравнения для ферментов, действующих на два и большее число субстратов	123
Реакция с участием двух субстратов	127
Установление кинетического механизма	142
Реакции с участием трех и большего числа субстратов	171
Исследование связывания субстрата	174
Ингибирование высокими концентрациями субстрата	184
Субстрат, действующий одновременно как активатор фермента	197
В. Влияние pH	199
pH-функции Михаэлиса	202
Влияние pH на V	213
Влияние pH на K_m	221
Г. Влияние температуры	235
Теплота инактивации ферментов	236
Влияние температуры на собственно ферментативную реакцию	241
Влияние температуры на состояние ионизации фермента	259
Д. Влияние давления	259
Е. Предстационарная фаза ферментативных реакций	260
Методы исследования быстрых реакций	260
Анализ результатов исследований быстрых реакций	265
Релаксационные методы	281

Глава 5. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ 291

Схема нумерации ферментов	293
Правила классификации и номенклатура	299
а) Общие указания и правила	299
б) Указания и правила, касающиеся отдельных классов ферментов	304
Ферментативные реакции	309
1. Оксидоредуктазы	310
2. Трансферазы	313

3. Гидролазы	321
4. Лиазы	325
5. Изомеразы	328
6. Лигазы	329
Глава 6. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ	330
Изучение специфичности действия ферментов	332
Общие замечания о специфичности	335
Стереоспецифичность фермента	336
Гипотеза индуцированного соответствия	344
Примеры, иллюстрирующие специфичность ферментов	347
Дегидрогеназы	347
Глюкозооксидаза	348
Флавопротеиды	349
Метилтрансферазы	350
Транскетолаза и трансальдолаза	351
Гликозилтрансферазы	352
Фосфотрансферазы	355
Эстеразы	359
Фосфатазы	364
Нуклеазы	365
Гликозидазы	367
Пептидазы	370
Лиазы	377
Изомеразы	380
Ферменты, действующие на субстраты, содержащие углеводородные цепи	382
Общие выводы	385

УВАЖАЕМЫИ ЧИТАТЕЛЫ

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП

1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».

Диксон Малколм, Уэбб Эдвин

ФЕРМЕНТЫ

том 2

Научный редактор Н. Н. Шафрановская
Мл. редактор З. Е. Кожанова
Художник Б. А. Шляпугин
Художественный редактор А. В. Проценко
Технический редактор Л. П. Чуркина
Корректор С. А. Денисова

ИБ № 2881

Сдано в набор 18.02.82. Подписано к печати 28.05.82.
Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 2.
Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 13,00 бум. л.
Усл. печ. л. 26,00. Усл. кр.-отт. 26,25. Уч. изд. л. 26,25.
Изд. № 4/1804. Тираж 6700 экз. Зак. 14. Цена 3 р. 70 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»,
Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам
издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1.