



Alan Fersht

MRC LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY, CAMBRIDGE

**ENZYME STRUCTURE
AND MECHANISM**

W. H. FREEMAN AND COMPANY

Reading and San Francisco

Э. Фёршт

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Перевод с английского
канд. хим. наук Ю. Б. Гребенщикова

под редакцией
д-ра хим. наук Б. И. Курганова

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва 1980

Книга посвящена одной из наиболее актуальных проблем современной биохимии. В сжатой форме и вместе с тем ясно и четко изложены современные данные о структуре и механизме действия большого числа ферментов, рассмотрены общие принципы ферментативного катализа. Подробно описаны методы определения скорости ферментативных реакций. Последний раздел книги посвящен строению и функции отдельных ферментов — дегидрогеназ, протеиназ, нуклеаз и других.

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

Редакция литературы по биологии

2007000000

© 1977, by W. H. Freeman and Company Limited

Ф $\frac{21005-128}{041(01)-80}$ 128-80

© Перевод на русский язык, «Мир», 1980

Э. Фёршт

**СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ
ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ**

Научный редактор Н. Н. Шафрановская
Мл. научный редактор Р. Ф. Куликова
Художник О. В. Комаев
Художественный редактор Б. Н. Юдкин
Технический редактор Г. Б. Алюдина
Корректор Е. Г. Литвак

ИБ № 1889

Сдано в набор 23.11.79. Подписано к печати 08.09.80. Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 2. Гарнитура латинская. Печать высокая. Объем 13,50 бум. л. Усл. печ л. 27,00. Уч.-изд. л. 26,14. Изд. № 4/0298. Тираж 7000 экз. Зак. 515. Цена 2 р. 40 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Ленинградская типография № 2 головное предприятие ордена Трудового Красного Знамени Ленинградского объединения «Техническая книга» им. Евгения Соколовой Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 198052, г. Ленинград, Л-52, Измайловский проспект, 29.

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Накопление экспериментальных данных и развитие теоретических представлений в энзимологии происходят чрезвычайно быстро. Поэтому выход в свет книги известного английского энзимолога Э. Фёршта, отражающей новейшие достижения в области изучения структуры и механизма действия ферментов, является весьма своевременным.

К достоинствам книги следует отнести строгое физико-химическое изложение основ ферментативного катализа и широкое привлечение данных по структуре ферментов. Интерпретация высокой каталитической эффективности ферментов и субстратной специфичности проводится на основе теории переходного состояния. Понимание того факта, что для ферментативного катализа важна стабилизация переходного состояния за счет дополнительных нековалентных взаимодействий между реагентами, является основой для синтеза высокоэффективных ингибиторов ферментов — аналогов переходного состояния, которые представляют интерес с точки зрения создания лекарственных препаратов. Дополнительное повышение субстратной специфичности (особенно важное в процессах репликации ДНК и биосинтеза белка) обеспечивается механизмами «кинетического корректирования». Ряд интересных исследований в этой области проведен самим автором книги.

На примере гликолитических ферментов Э. Фёршт показывает, что эволюция ферментов происходила в сторону увеличения отношения k_{cat}/K_M (для эволюционно совершенного фермента оно составляет $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) и достижения такого значения K_M , которое численно превышает физиологическую концентрацию субстрата. Исключение составляют аллостерические ферменты, занимающие ключевые позиции в метаболических путях и выполняющие важные функции в регуляции скорости процессов метаболизма. Таким образом, анализ каталитической эффективности ферментов следует проводить дифференцированно, с учетом функций, выполняемых ими в живой клетке.

Важное место в книге занимает обсуждение различных методов, используемых для установления механизма ферментативных реакций (в частности, для доказательств образования ацилфермента в реакциях, катализируемых протеазами).

Несомненно, книгу Э. Фёршта будет полезно прочесть не только тем, кто лишь приступает к изучению основ энзимологии, но и тем, кто уже достиг в ней определенных успехов.

Мы сочли целесообразным привести здесь ссылки на книги и статьи обзорного характера, которые появились после выхода в свет американского издания.

Б. И. Курганов

ЛИТЕРАТУРА

- К гл. 1. *Бландел Т., Джонсон Л.* Кристаллография белка. Пер. с англ. — М.: Мир, 1979.
- К гл. 2. *Березин И. В., Мартинек К.* Основы физической химии ферментативного катализа. — М.: Высшая школа, 1977.
- Чернавский Д. С.* Принципы биологического катализа в кн.: Итоги науки и техники, серия Математическая биология и медицина, т. I. Проблемы оптимального строения и функционирования биологических систем. — М.: ВИНТИ, с. 9—57, 1978.
- Transition states of biochemical processes (R. D. Gandour, R. L. Schowen, eds.). Plenum Press, New York, 1978.
- Isotope effects on enzyme catalyzed reactions. (W. W. Cleland, M. H. O'Leary, D. B. Northrop, eds). University Park Press, Baltimore, 1977.
- Klinman J. P.* Kinetic isotope effects in enzymology. In: Advances in enzymology, v. 46, p. 413 (A. Meister, ed.), Wiley-Interscience, New York, 1978.
- К гл. 3. *Ainsworth S.*, Steady-state enzyme kinetics, The MacMillan Press Ltd, London and Basingstoke, 1977.
- Roberts D. V.*, Enzyme kinetics, Cambridge University Press, Cambridge, 1977.
- К гл. 4. Методы исследования быстрых реакций. Пер. с англ./Под ред. Г. Хеммиса. — М.: Мир, 1977.
- Варфоломеев С. Д., Березин И. В.* Кинетические закономерности ферментативных реакций в нестационарных режимах. Издание химического факультета МГУ, 1975.
- Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, v. 24. Chemical relaxation in molecular biology (I. Pecht, R. Rigler, eds), Springer — Verlag, Berlin (1977).
- К гл. 6. *Мееров Г. И.* Радиометрические методы определения активности ферментов. — М.: Атомиздат, 1977.
- Березин И. В., Клёсов А. А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Издательство Московского Университета, 1976.

- К гл. 7. *Methods in enzymology*, v. 46. Affinity labeling (W. B. Jakoby, M. Wilchek, eds), Academic Press, New York (1977).
- К гл. 8. *Курганов Б. И.* Аллостерические ферменты. — М.: Наука, 1978.
Шаронов Ю. А., Шаронова Н. А. Структура и функция гемоглобина. — Мол. биол., 1975, № 9, с. 145—172.
Lazdunski M. «Half-of-the sites» reactivity and the role of subunit interactions in enzyme catalysis. In: *Progress in bioorganic chemistry*, v. 3, p. 81—140 (1974).
Némethy G. Molecular interactions and allosteric effects. In: *Subunits in biological systems, part C* (S. N. Timasheff, G. D. Fasman, eds), Marcel Dekker Inc., New York and Basel, p. 1—90 (1975).
Levitzki A., Koshland D. E., Jr. The role of negative cooperativity and half-of-the sites reactivity in enzyme regulation. In: *Current topics in cellular regulation*, v. 10, p. 1—40 (1976).
Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, v. 28. Levitzki A. Quantitative aspects of allosteric mechanisms. Springer-Verlag, Berlin (1978).
- К гл. 10. *Somero G. N., Yancey P. H.* Evolutionary adaptation of K_m and k_{cat} values. In: *Symposia Biologica Hungarica*, v. 21. New trends in the description of the general mechanism and regulation of enzymes (S. Damjanovich, P. Elödi, B. Somogui, eds), Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 249—272, 1978.
- К гл. 12. *Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases* (H. Sund, ed.), Walter de Gruyter and Co, Berlin, New York, 1977.
You K.-S., Arnold L. J., Jr., Allison W. S., Kaplan N. O. Enzyme stereospecificities for nicotinamide nucleotides, *Trends in Biochem. Sci.* 3, 265—268 (1978).
Developments in Biochemistry, v. 1. Mechanisms of oxidizing enzymes (T. P. Singer, P. N. Ondarza, eds), Elsevier, North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1978.
Walsh Ch., *Enzymic reaction mechanisms*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1979.
Transition states of biochemical processes (R. D. Gandour, R. L. Schowen, eds), Plenum Press, New York, 1978.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Успехи, достигнутые в области рентгеноструктурного анализа, кинетики переходных процессов и химического катализа за последние 20 лет, в корне изменили наши представления о ферментативном катализе и механизме действия ферментов. Данная монография представляет собой краткий обзор последних достижений в этой сфере и адресована студентам и аспирантам, уже прослушавшим соответствующие курсы по химии и биохимии. В книге в теоретическом и методологическом аспектах рассматриваются два вопроса: природа взаимодействия между ферментом и его субстратами, обуславливающего ферментативный катализ и специфичность действия фермента, и взаимосвязь между структурой фермента и механизмом ферментативного процесса. Обсуждаются экспериментальные подходы, позволяющие проводить прямые исследования ферментов на молекулярном уровне. Большое внимание уделяется, например, исследованию ферментативных реакций в предстационарных условиях, когда ферменты используются в концентрациях, сопоставимых с концентрациями субстратов, и можно непосредственно наблюдать за промежуточными фермент-содержащими соединениями. Кратко освещены проблемы взаимодействия ферментов с несколькими субстратами в стационарных условиях, а также некоторые вопросы химии коферментов и кофакторов.

При подготовке монографии я стремился, во-первых, рассматривать общие принципы и понятия энзимологии на конкретных примерах (однако, чтобы не перегружать теоретические разделы, посвященные кинетике, основная часть иллюстративного материала изложена в отдельной главе) и, во-вторых, ограничиваться только такими примерами, для которых имеются неоспоримые, проверенные доказательства, не приводя данных, допускающих различные толкования. Поэтому обсуждаются механизмы действия только тех ферментов, третичная структура которых точно установлена методом рентгеноструктурного анализа. Аналогичным образом, теоретические аспекты действия аллостерических белков рассматриваются главным образом на

примере гемоглобина, ибо это единственный белок, для которого получены надежные данные о природе взаимодействий, приводящих к положительной кооперативности в связывании кислорода.

В библиографию включены новейшие публикации — обзоры и статьи, содержащие большое число ссылок, а также оригинальные работы, представляющие интерес с исторической точки зрения. Примеры для иллюстраций были взяты мной в основном из картотеки Лаборатории молекулярной биологии Медицинского научно-исследовательского совета, поскольку они как правило весьма убедительны. В связи с этим мне хотелось бы выразить свою признательность А. Лентон за иллюстративный материал, подготовленный ею специально для меня, а также для других сотрудников, чем я беззастенчиво воспользовался.

Я особенно благодарен У. Дженксу, Г. Диксону, Р. Гутфройнду, К. Типтону и Р. Малвею за критические замечания, относящиеся к рукописи в целом, а также М. Перутцу и Д. Блоу за их комментарии к отдельным главам. Кроме того, я хочу поблагодарить Королевское общество, Американское химическое общество, издательства Корнельского университета, «Академик пресс», Дж. Уайли, а также Элана Р. Лисса за разрешение воспользоваться иллюстрациями.

Э. Фёршт

ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА ФЕРМЕНТОВ

В 1930 г. вышла книга Холдейна о ферментах [1], прочесть которую стоит и сегодня. Более всего в этой книге меня поразило несоответствие между обширностью для того времени знаний о свойствах и действии ферментов и их ограниченностью в отношении химической природы ферментов: вопрос о том, являются ли ферменты белками, все еще широко дискутировался. Такая односторонность была обусловлена отсутствием методов, позволяющих проводить прямое исследование ферментов. Вся информация носила косвенный характер — ее источником служили опыты по действию ферментов на соответствующие субстраты. Тем не менее уже спустя немногим более 30 лет после получения Бухнером в 1897 г. бесклеточного экстракта ферментов были заложены основы современной ферментативной стационарной кинетики.

Для дальнейшего развития энзимологии необходимо было получить очищенные ферменты в количествах, сравнимых с количеством субстратов, и непосредственно исследовать их. Первые шаги в этом направлении сделал в 1926 г. Самнер, которому удалось получить кристаллы уреазы, выделенной из экстрактов канавалии мечевидной. Вскоре (1930—1936 гг.) Нортроп и Кунитц закристаллизовали пепсин, трипсин и химотрипсин. Полученные факты позволили, наконец, доказать, что ферменты являются белками, и дали возможность разработать методы современной химии белка, определить аминокислотную последовательность (Сэнджер), установить трехмерную структуру молекул белков в растворе (Перутц и Кендрью), применить методы исследования кинетики быстрых реакций (работы, начатые Роутоном в 1923 г.).

Основная часть данной монографии посвящена прямым исследованиям ферментов, выполненным уже после того, как вышла в свет книга Холдейна [1]. В этой главе мы остановимся на наиболее значительном достижении в изучении ферментов — установлении их трехмерной структуры. Кроме того, здесь же вкратце будет рассмотрена структура лизоцима и сериновых протеиназ, поскольку работы, связанные с экспериментальным и

теоретическим исследованием этих ферментов, обсуждаются в последующих главах. В гл. 12 рассматриваются структура и механизм действия отдельных ферментов.

А. Первичная структура белков

Остовом белковой молекулы является неразветвленная полипептидная цепь из L- α -аминокислот, которые связаны друг с

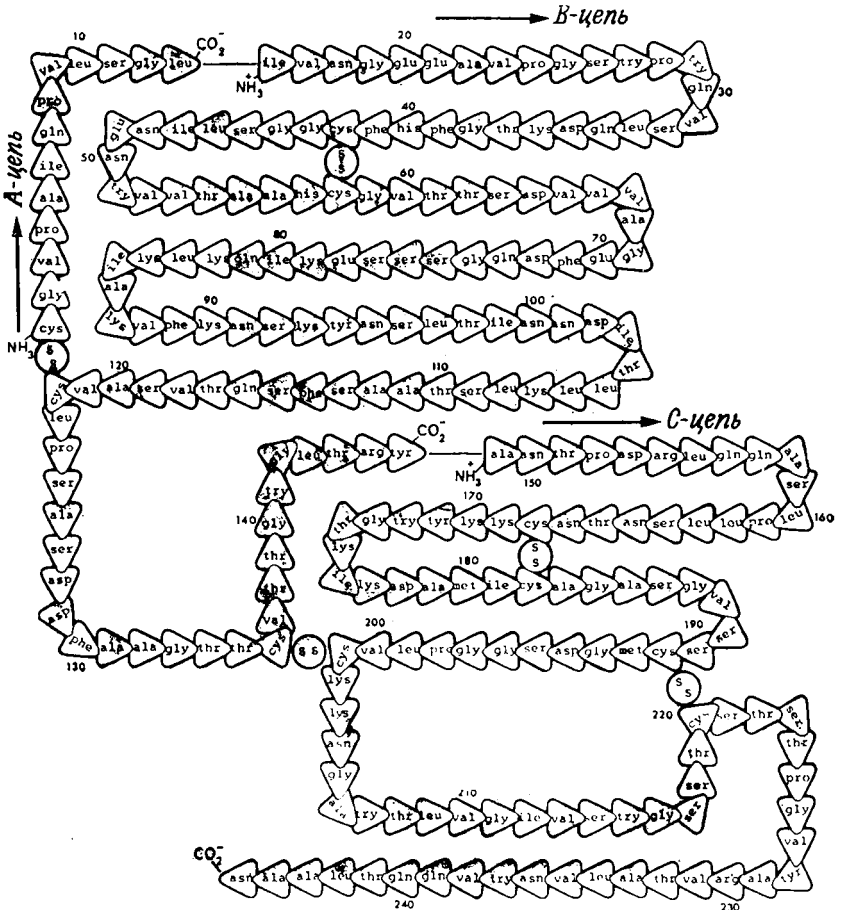
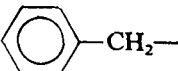
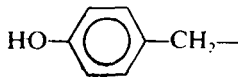
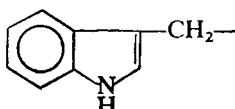


Рис. 1.1. Первичная структура α -химотрипсина. Фермент состоит из трех цепей, связанных друг с другом дисульфидными мостиками. Эти цепи образовались из одной полипептидной цепи химотрипсиногена в результате выщепления аминокислотных остатков Ser-13, Arg-14, Thr-147 и Asn-148. (С любезного разрешения Blow D. M.)

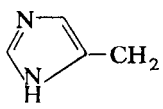
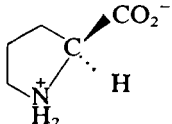
Таблица 1

Основные аминокислоты ($RCH(NH_3^+)CO_2^-$)

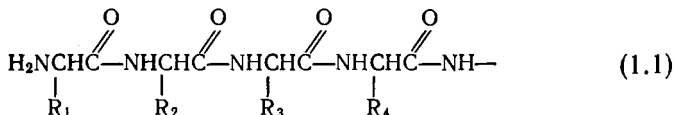
Аминокислота (трех и однобуквенные обозначения, мол. вес)	Боковая цепь, R	pK_a а)
Глицин (Gly, G, 75)	H—	2,35; 9,78
Аланин (Ala, A, 89)	CH ₃ —	2,35; 9,87
Валин (Val, V, 117)	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH— \\ \\ CH_3 \end{array}$	2,29; 9,74
Лейцин (Leu, L, 131)	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CHCH_2— \\ \\ CH_3 \end{array}$	2,33; 9,74
Изолейцин (Ile, I, 131)	$\begin{array}{c} CH_3CH_2 \\ \\ CH— \\ \\ CH_3 \end{array}$	2,32; 9,76
Фенилаланин (Phe, F, 165)		2,16; 9,18
Тирозин (Tyr, Y, 181)		2,20; 9,11; 10,13
Триптофан (Trp, W, 204)		2,43; 9,44
Серин (Ser, S, 105)	HOCH ₂ —	2,19; 9,21
Треонин (Thr, T, 119)	$\begin{array}{c} HO \\ \\ CH— \\ \\ CH_3 \end{array}$	2,09; 9,11
Цистеин (Cys, C, 121)	HSCH ₂ —	1,92; 8,35; 10,46
Метионин (Met, M, 149)	CH ₃ SCH ₂ CH ₂ —	2,13; 9,28
Аспарагин (Asp, N, 132)	H ₂ NC(=O)CH ₂	2,1; 8,84
Глутамин (Gln, Q, 146)	H ₂ NC(=O)CH ₂ CH ₂ —	2,17; 9,13
Аспарагиновая кислота (Asp, D, 133)	~O ₂ CCH ₂ —	1,99; 3,90; 9,90

а) Значения pK_a взяты из справочника Data for biochemical research, Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M., Oxford University Press (1969).

Продолжение

Аминокислота (трех- и однобуквенные обозначения, мол. вес)	Боковая цепь, R	pK _a ^{a)}
Глутаминовая кислота (Glu, E, 147)	$^{-}O_2CCH_2CH_2-$	2,10; 4,07; 9,47
Лизин (Lys, K, 146)	$H_3N^+(CH_2)_4-$	2,16; 9,18; 10,79
Аргинин (Arg, R, 174)	$H_2N^+ \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} C = NH(CH_2)_3-$	1,82; 8,99; 12,48
Гистидин (His, H, 155)		1,80; 6,04; 9,33
Пролин (Pro, P, 115)		1,95; 10,64

другом амидными связями; последние образуются α -карбок- сильной группой одного остатка и α -аминогруппой соседнего. Обычно белки состоят только из 20 перечисленных в табл. 1.1 аминокислот. Первичная структура белковой молекулы — это последовательность, в которой аминокислоты соединяются друг с другом, образуя биополимер. По договоренности эта последовательность записывается, начиная с N-конца цепи:



Почти все внутриклеточные белки — это линейные полипеп- тидные молекулы, многие же внеклеточные белки содержат ковалентные поперечные ($-S-S-$)-мостики, образованные ти- оловыми группами двух остатков цистеина. Эти мостики нахо- дятся либо в пределах одной цепи (и тогда в главной полипеп- тидной цепи возникают петли), либо связывают разные цепи (рис. 1.1). В последнем случае из одноцепочечного предше- ственника в результате протеолитического расщепления форми- руются многоцепочечные структуры. Примером такого рода мож- ет служить образование инсулина из проинсулина и хими- трипсина из химотрипсиногена. При восстановлении тиолами

дисульфидные мостики разрываются. Интересно, что отдельные полипептидные цепи часто можно восстановить и денатурировать, а затем вновь обратимо окислить и ренатурировать, в то время как восстановление и денатурация белков, образовавшихся из предшественников путем химической модификации последних, обычно носит необратимый характер.

Способность отдельных полипептидных цепей к самопроизвольной укладке позволяет сделать важный вывод: трехмерная структура белка определяется генетически детерминируемой аминокислотной последовательностью.

Б. Трехмерная структура ферментов

1. Рентгеноструктурный анализ

Значение рентгеноструктурного анализа в энзимологии, пожалуй, невозможно переоценить. Этот метод не только стал экспериментальной основой, позволившей получить все известные к настоящему времени данные о структуре белков, но и оказался наиболее ценным методом исследования механизмов ферментативного катализа. В этом разделе мы вкратце рассмотрим, какую информацию позволяют получить рентгеноструктурные исследования белков.

Рентгеновские лучи рассеиваются на электронах атомов аналогично тому, как рассеиваются световые волны, падающие на дифракционную решетку. Для монохроматического пучка рентгеновских лучей регулярная решетка кристалла играет роль трехмерной дифракционной решетки, дающей рефлексы в тех местах, где происходит усиление рассеянных лучей в результате интерференции. Структуру кристалла, или, точнее говоря, распределение электронной плотности, можно определить по рентгенограмме с помощью преобразования Фурье. Для этого необходимо знать интенсивность и направление дифрагированных лучей (что легко определить на фотопленке либо по распределению рефлексов, либо с помощью дифрактометра), а также их фазы. Определение фазы каждого рефлекса (главное условие при использовании преобразования Фурье) — наиболее трудная задача. Способ ее решения, разработанный для случая простых кристаллов, непригоден при установлении структуры белков. Проблема фаз была преградой на пути развития кристаллографии белков до тех пор, пока в 1954 г. Перутц и др. [2] не разработали метод *изоморфного замещения*, основанный на включении в определенные участки молекул белка тяжелых атомов без нарушения кристаллической структуры белка и его упаковки. Атомы металлов рассеивают рентгеновские лучи сильнее

атомов белка и изменяют интенсивность дифрагированных лучей. Из изменения интенсивности, которая может как увеличиваться, так и уменьшаться в результате рассеяния на тяжелых атомах, удается определить фазу дифрагированных на белке лучей. Для точного определения фаз необходимо иметь несколько различных изоморфных производных.

После определения фаз и амплитуд всех дифрагированных лучей рассчитывают электронную плотность белковой молекулы. Затем в соответствии с рассчитанной электронной плотностью из проволочных моделей аминокислотных остатков строят приближенную модель молекулы белка, которую впоследствии уточняют с помощью ЭВМ.

Точность и разрешение

Получаемая точность определяется качеством экспериментальных данных и *разрешением*. Смысл термина «разрешение» лучше всего иллюстрируется данными табл. 1.2. Карта электронной плотности, полученная при низком разрешении (порядка

Таблица 1.2

Разрешение и получаемая информация

Разрешение, Å (1 Å = 0,1 нм)	Выявляемая структура
5,5	Общая конфигурация молекулы. Спирали в виде интенсивно рассеивающих лучи палочек
3,5	Полипептидный остов (обычно не совсем четко)
3,0	Боковые цепи (не совсем четко)
2,5	Четкое разрешение боковых цепей. Разрешена плоскость пептидной группы. Расположение атомов определено с точностью $\pm 0,4$ Å
1,5	Расположение атомов определено с точностью $\pm 0,1$ Å — предельная точность, достижимая в настоящее время в кристаллографии
0,77	Длины связей в небольших кристаллах измерены с точностью 0,005 Å

4—6 Å), в большинстве случаев дает представление лишь об общей конфигурации молекулы. При разрешении 3,5 Å часто удается определить положение полипептидного остова, хотя и не совсем точно. Разрешение 3,0 Å при благоприятных условиях позволяет различить боковые цепи аминокислот и с той или иной степенью точности сопоставить их последовательность с электронной плотностью. При разрешении 2,5 Å часто путем подгонки

можно найти местоположение атомов с точностью $\pm 0,4 \text{ \AA}$. Чтобы определить местоположение атомов с точностью $0,2 \text{ \AA}$, нужно иметь совершенные кристаллы и разрешение $1,9 \text{ \AA}$. Что это означает на практике, видно из рис. 1.2. Для получения высокого разрешения необходимо использовать при расчетах рефлексы, полученные при больших углах рассеяния, а из рисунка видно, что эти рефлексы очень слабы. Следует отметить к тому же, что большинство кристаллов дает худшую дифракционную картину, чем представленная на рис. 1.2. Кроме того, число рефлексов, которые необходимо иметь, возрастает при переходе, например, от разрешения 3 \AA к разрешению $1,5 \text{ \AA}$ в $2^3 = 8$ раз, а объем затрачиваемых при этом усилий возрастает еще больше вследствие ухудшения качества данных.

При разрешении, большем чем $2,5 \text{ \AA}$, метод изоморфного замещения при исследовании кристаллов белка становится неэффективным, поскольку включение тяжелых атомов в молекулу приводит к некоторым изменениям в ее структуре; кроме того, становится очень трудно определять небольшие изменения интенсивностей и без того крайне слабых рефлексов. В настоящее время разработаны машинные методы уточнения структуры, в которых используются значения интенсивностей, полученные при более высоком разрешении, и модельная структура, определенная при разрешении $2\text{--}2,5 \text{ \AA}$.

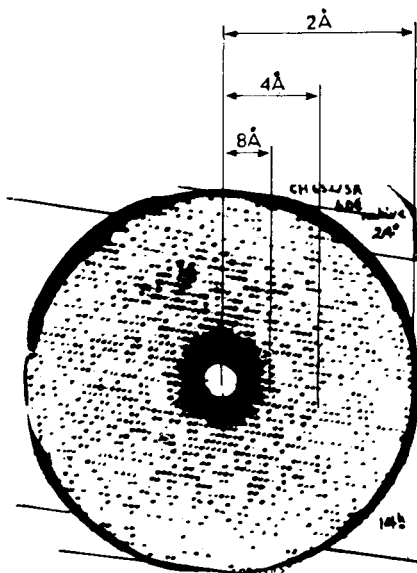


Рис. 1.2. Рентгенограмма кристалла α -химотрипсина, иллюстрирующая увеличение количества данных, необходимых для получения более высокого разрешения.

2. Структурные элементы белков

Еще до того как была определена структура белковых кристаллов методом рентгеноструктурного анализа, Полинг и Кори теоретически установили структуру единиц, которые, как было впоследствии показано, являются основными строительными

блоками белков [3]. Сначала они установили структуру кристаллов небольших пептидов, что позволило определить размеры и геометрию пептидной связи, а затем после построения точных моделей подобрали структуры, которые соответствовали рентгенограммам фибриллярных белков. Дифракционные рентгенограммы фибрилл представляют собой не набор точек, как для трехмерных кристаллов, а ряд линий, соответствующих расстояниям между регулярно повторяющимися элементами структуры. Позднее этот метод построения моделей был использован Уотсоном и Криком при установлении структуры ДНК.

а. Пептидная связь [3]

Исследование кристаллов небольших пептидов показало, что пептидная связь плоская и имеет *транс*-конфигурацию (рис. 1.3). Такое строение характерно для всех пептидных связей в белках

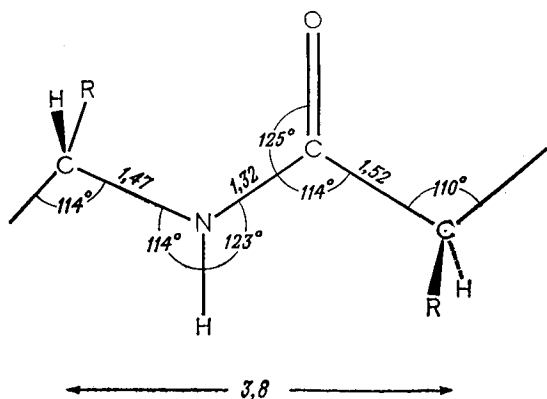
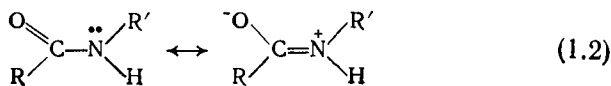


Рис. 1.3. Пептидная связь. Все расстояния даны в ангстремах [3].

(за очень редким исключением). Планарность пептидной связи обусловлена значительным смещением неподеленной электронной пары азота к кислороду карбонильной группы. Связь C—N соответственно укорочена и имеет характер двойной связи, который нарушается при повороте вокруг этой связи; при этом затрачивается энергия, равная энергии делокализации — 75—88 кДж·моль⁻¹ (18—21 ккал·моль⁻¹) [3, 4]



б. Вторичная структура: α -спираль и β -структура [3]

Полипептидные цепи фибриллярных белков организованы в так называемую вторичную структуру, стабилизируемую водородными связями. В этих упорядоченных областях атом кислорода каждой пептидной группы образует водородную связь с NH-группой соответствующей пептидной связи. При этом формируются структуры двух основных типов: α -спираль (как показал рентгеноструктурный анализ фибрилл α -кератина) или β -структура (в случае β -кератина). Полипептидная цепь глобулярного белка также самопроизвольно укладывается с образованием локальных упорядоченных областей.

На рис. 1.4 изображена α -спираль. Она представляет собой устойчивую структуру, в которой каждая амидная группа образует водородную связь с третьей от нее в любом направлении амидной группой. Группы C=O располагаются параллельно оси спирали и почти точно напротив NH-групп, с которыми они соединяются водородными связями. Боковые цепи аминокислот направлены под углом к оси спирали. На каждый виток приходится 3,6 аминокислотных остатка, шаг спирали — около 5,4 Å.

Вытянутая полипептидная цепь (рис. 1.5) может образовать комплементарные водородные связи с параллельной ей цепью, которая в свою очередь способна соединиться с другой вытянутой цепью, в результате чего образуется складчатая структура. Существуют две устойчивые струк-

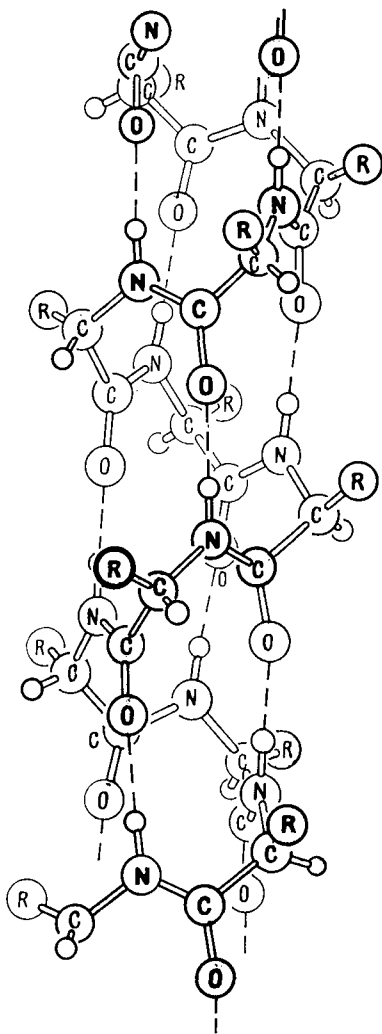


Рис. 1.4. Правая α -спираль — структура, характерная для молекул белков. (Из книги Pauling L., The nature of the chemical bond. © 1939, 1940, 3rd edition © 1960 by Cornell University. С разрешения Cornell University Press.)

туры такого типа: параллельная плоская β -структура, в которой все вытянутые цепи имеют одинаковое направление, и антипараллельная плоская β -структура с чередуемися направлением цепей (рис. 1.6). Плоские связи при тетраэдрических атомах углерода образуют плоскую структуру.

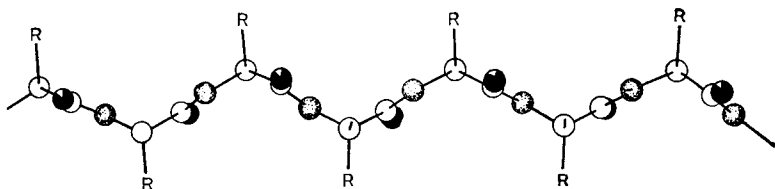


Рис. 1.5. Вытянутая полипептидная цепь. Водородные связи перпендикулярны плоскости рисунка, так что в результате наложения параллельных цепей друг на друга образуется β -структура.

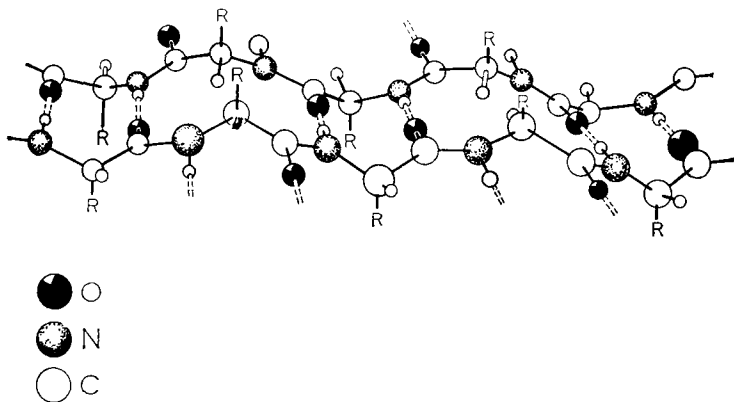


Рис. 1.6. Две полипептидные цепи, образующие β -структуру. Аналогичным образом можно присоединить следующие цепи.

Данные, полученные из статистического анализа и опытов с синтетическими полимерами, показывают, что одни аминокислоты предпочитают находиться в составе спирали, тогда как другие дестабилизируют эту структуру [5]. Например, пролин не может быть встроен в спираль без значительного нарушения ее структуры.

в. Изгибы в основной цепи [6—9]

Другой часто встречающийся тип структуры образуется в тех местах, где основная цепь резко изменяет направление, образуя « β -изгиб» из четырех последовательно расположенных остатков. В этих случаях C=O-группа i -го остатка соединяется с по-

мощью водородной связи с NH-группой ($i + 3$)-го, а не ($i + 4$)-го остатка α -спирали. Изменение направления цепи на 180° , при котором может образоваться связь между двумя антипараллельными цепями складчатой структуры, осуществляется

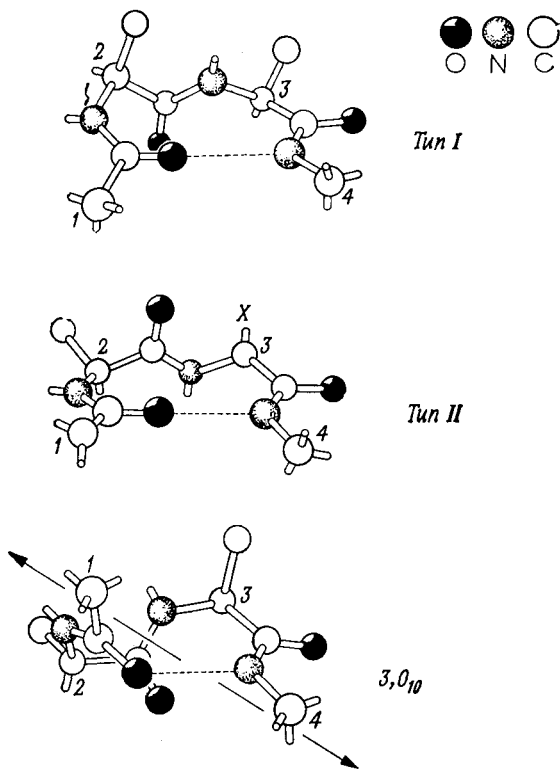


Рис. 1.7. Три типа изгибов, обнаруженные в белках. В структуре II остаток X всегда является глицином. [Birktoft J. J., Blow D. M., J. molec. Biol., 68, 187 (1972).]

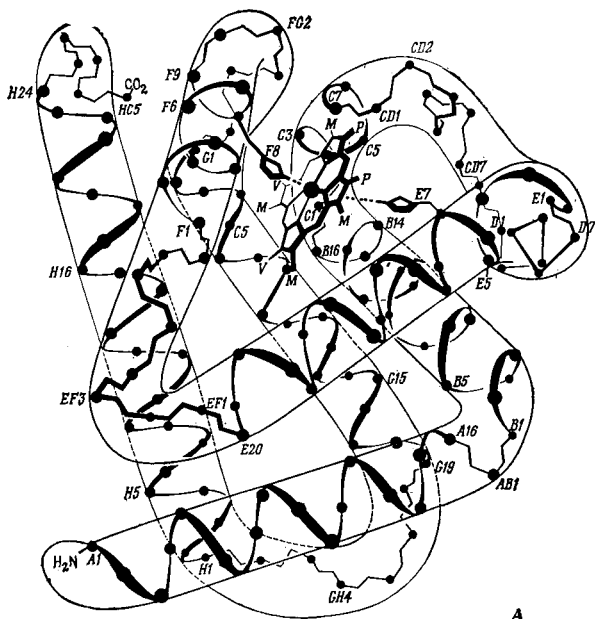
двумя путями (типы I и II, рис. 1.7). Тип II отличается тем, что в аминокислотной последовательности место третьего остатка должен занимать глицин. Искажение структуры типа I приводит к возникновению изгиба типа III, который может повторяться бесконечное число раз, образуя спираль, обозначаемую $3,0_{10}$ (более компактную и менее стабильную, чем α -спираль; на виток этой спирали приходится $3,0$ аминокислотных остатка, образующих стабилизируемые водородными связями петли из 10 атомов).

3. Построение белковых молекул из отдельных блоков

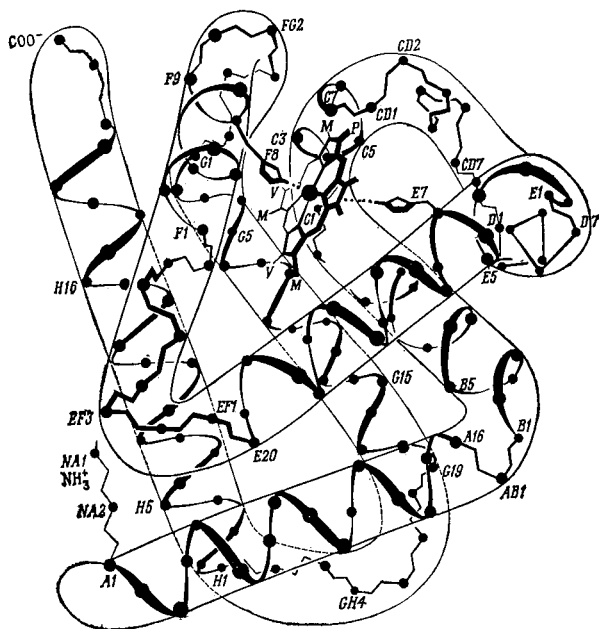
Расшифровка структуры первых двух белков вызвала сенсацию. Оказалось, что единственная полипептидная цепь миоглобина образует ряд α -спирализованных палочек, чередующихся с участками, отличными от β -структуры. Затем было установлено, что субъединицы гемоглобина идентичны четырем цепям миоглобина (рис. 1.8). Однако по мере расшифровки структуры разнообразных белков картина становилась все более сложной. Лизоцим и карбоксипептидаза — первые ферменты, структура которых была установлена, построены из α -спиралей и β -структур. Вскоре выяснилось, что молекула α -химотрипсина уложена почти целиком в виде β -структуры, за исключением двух α -спирализованных участков. Стало очевидно, что установить общие правила укладки полипептидных цепей очень трудно. Первые шаги в этом направлении сделаны лишь в настоящее время, когда определена структура около ста белков. Выявлены отдельные регулярно повторяющиеся структурные особенности. Развиваются методы классификации структур.

Предполагается, что большинство белков можно рассматривать в первом приближении как структуру типа сэндвича, каждый слой которой состоит либо из α -спиралей, либо из β -структур. Недавно Левитт и Чотиа [10] предложили простой и наглядный способ изображения таких структур (рис. 1.9). Упаковка спиральных и складчатых участков происходит за счет стэкинг-взаимодействия боковых цепей аминокислот. Внутренняя область белка имеет плотную упаковку: боковые цепи одного участка встраиваются между боковыми цепями другого, образуя гидрофобное ядро, плотность которого близка к плотности жидкого углеводорода или воска [11]. В этой области мало водородных связей: так, в карбоксипептидазе А их число равно только 17; они соединяют друг с другом 8 спиралей и одну складчатую структуру, т. е. на каждый спиральный участок приходится менее двух водородных связей. Расположенные во внутренней области белка доноры и акцепторы, способные образовывать водородные связи, всегда спарены. Участки, соединяющие друг с другом спирали и слои, обычно доступны для растворителя и непротяженны. Таким образом, глобулярные белки имеют гидрофобное ядро, на поверхности которого расположены заряженные группы.

Согласно данным Крика [12], две α -спирали (имеющие одинаковое направление) способны плотно упаковываться, если угол между ними составляет 20° ; при этом боковые группы одной спирали встраиваются между боковыми группами другой. Данный расчет был проделан для случая, когда на один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка. Для более



A



B

Рис. 1.8. Структура миоглобина (А) и β -субъединицы гемоглобина (Б). Укладка этих двух цепей практически одинакова. Основные различия сосредоточены у N- и C-концов цепей и у контактирующих поверхностей субъединицы гемоглобина. [С изменениями из книги Dickerson R. E., *The Proteins* (ed. H. Neurath), Academic Press (1964).]

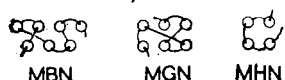
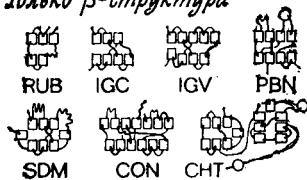
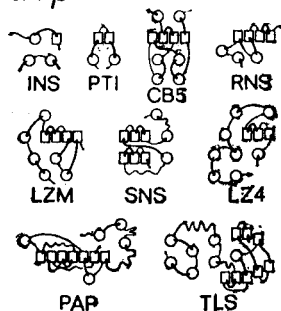
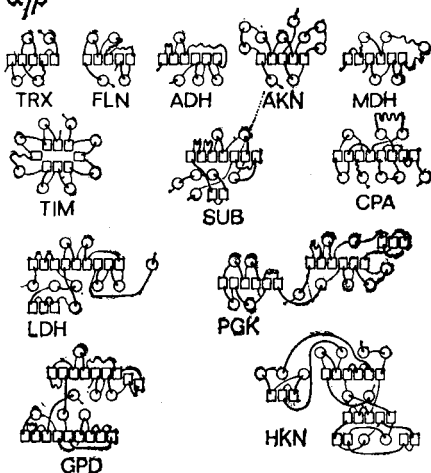
Только α -спиралиТолько β -структура $\alpha + \beta$  α/β 

Рис. 1.9. Классификация белковой структуры по Левитту и Чотиа [10]. На молекулу смотрят в таком направлении, чтобы как можно большее число ее структурных элементов было расположено торцом к читателю. Каждая цепь β -структуры изображена в виде квадратики. Ближний торец каждой α -спирали изображен в виде кружка. Расположение α -спиралей и β -структур на диаграмме отражает их пространственное расположение. Кружки и квадратики соединены жирными или светлыми стрелками (от N-конца к С-концу), чтобы показать, какими торцами соединены данные элементы — ближними (к читателю) или дальними. Примерные размеры: диаметр α -спирали — 5 Å; параметры β -структуры — 5×4 Å, расстояние между спиральми — 10 Å; расстояние между цепями β -структуры, связанными водородными связями, — 5 Å; расстояние между цепями, не связанными водородными связями, — 10 Å. Сокращения: MBN — миоглобин; MGN — миоген; MHN — миогемозритрин; RUB — рубредоксин; IGC — постоянная (константная) область иммуноглобулина; IGV — переменная область иммуноглобулина; PBN — преальбумин; SDM — супероксиддисмутаза; CON — конканавалин; CHT — химотрипсин; INS — инсулин, PTI — панкреатический ингибитор трипсина; CB5 — цитохром b_5 ; RNS — рибонуклеаза; LZM — лизоцим; SNS — стафилококковая нуклеаза; LZ4 — лизоцим фага T4; PAP — папаин; TLS — термоллизин; TRX — тиоредоксин; FLN — флаводоксин; ADH — алкогольдегидрогеназа, участок связывания кофермента; AKN — аденилаткиназа; TIM — триозофосфатизомераза; SUB — субтилизин; CPA — карбоксипептидаза; LDH — лактатдегидрогеназа; PGK — фосфоглицераткиназа; GPD — глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; HKN — гексокиназа; MDH — малатдегидрогеназа.

туго скрученной спирали (3,55 остатка на виток) этот угол уменьшается до 10° . Как отмечал Чотиа [13], β -структуры всегда изогнуты; такая изогнутая β -структура энергетически более выгодна, чем планарная (рис. 1.10).

Белки — это не рыхлые, случайным образом сформированные структуры. Их аминокислотные остатки упакованы так же плотно, как и аминокислоты в кристаллах [14—16]. Плотность упаковки (часть пространства, занимаемого атомами) для белков составляет примерно 0,75, а для кристаллов эта величина равна 0,7—0,78. Максимальная плотность упаковки сферических частиц равна 0,74, а цилиндрических частиц неограниченной длины — 0,91.

4. Третичная и четвертичная структура

Трехмерную структуру белка, состоящего из единственной полипептидной цепи или из ковалентно связанных цепей, называют его *третичной структурой*. Многие белки состоят из субъединиц, не связанных друг с другом ковалентно. Пространственная организация такого комплекса известна под названием *четвертичной структуры*. Трехмерная структура каждой субъединицы по-прежнему называется ее третичной структурой. Изменение четвертичной структуры означает, что субъединицы сместились друг относительно друга.

Субъединицы могут быть образованы как идентичными полипептидными цепями, так и различающимися. Как правило, области контакта субъединиц упакованы так же плотно, как и внутренняя часть белков, а расположенные на поверхности группы и ионы образуют ионные и водородные связи [17]. Изменение третичной структуры гемоглобина сопровождается смещением плотно упакованных субъединиц друг относительно друга.

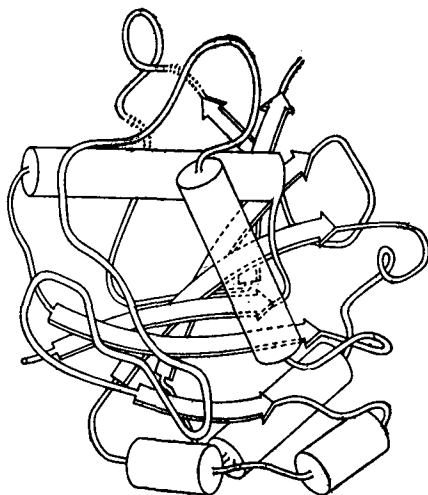


Рис. 1.10. Структура части молекулы глицеральдегид-3-фосфат — дегидрогеназы из *B. stearothermophilus*; цилиндры — α -спирали, изогнутые стрелки — β -слои. (С любезного разрешения Biesecker G. и Wonacott A.)

5. Одинакова ли структура фермента в растворе и в кристалле?

Этот вопрос является как нельзя более уместным, поскольку все данные о структурных особенностях ферментов и механизме их действия были получены при исследовании кристаллических белков. Когда-то ответить на поставленный выше вопрос было довольно трудно, но имеющиеся в настоящее время данные, как правило, дают положительный ответ. Сомнения остаются лишь относительно активного центра карбоксипептидазы (гл. 12), да и то только по поводу подвижной боковой цепи остатка тирозина.

Идентичность структуры ферментов в растворе и в кристаллах подтверждается следующими данными. 1. Несмотря на то что некоторые ферменты были получены в кристаллическом виде из разных растворителей и в различных формах, их структура оставалась практически одинаковой (например, субтилизин [18, 19] и лизоцим [20]). 2. Ферменты, принадлежащие к одному классу, имеют сходную структуру (например, сериновые протеазы, см. ниже). 3. При образовании димера α -химотрипсина контакт между мономерами осуществляется одними и теми же участками как в растворе, так и в составе кристалла [21, 22]. 4. Иногда ферменты сохраняют свою активность в кристаллическом состоянии (например, рибонуклеаза [23, 24] и карбоксипептидаза А [25]). Сопоставление активности фермента в растворе и в кристаллическом состоянии является непростой задачей, поскольку диффузия субстратов внутрь кристаллов затруднена. Имеется, правда, один путь остроумного решения этой проблемы, состоящий в кристаллизации связанного с ферментом промежуточного соединения (индолилакрилоилхимотрипсина; см. ниже разд. Г. 2) при таком значении рН, когда это промежуточное соединение устойчиво [26]. При изменении рН, приводящем к увеличению реакционной способности промежуточного соединения, оно гидролизует, причем реакция характеризуется той же самой константой скорости первого порядка, что и в растворе.

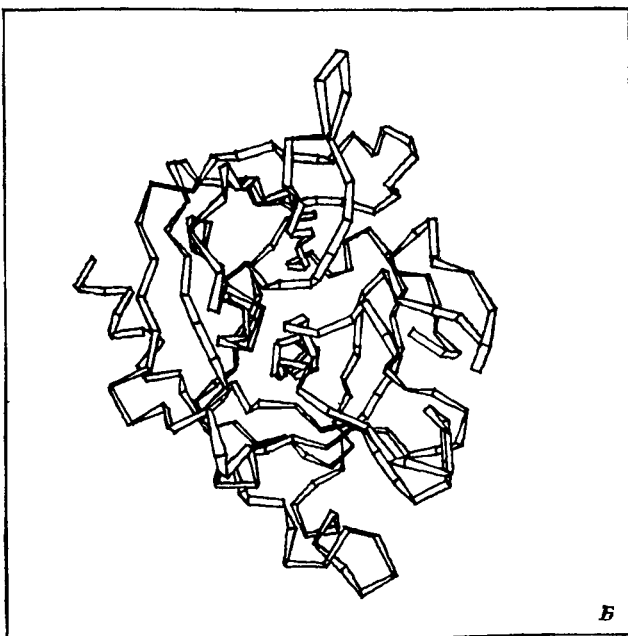
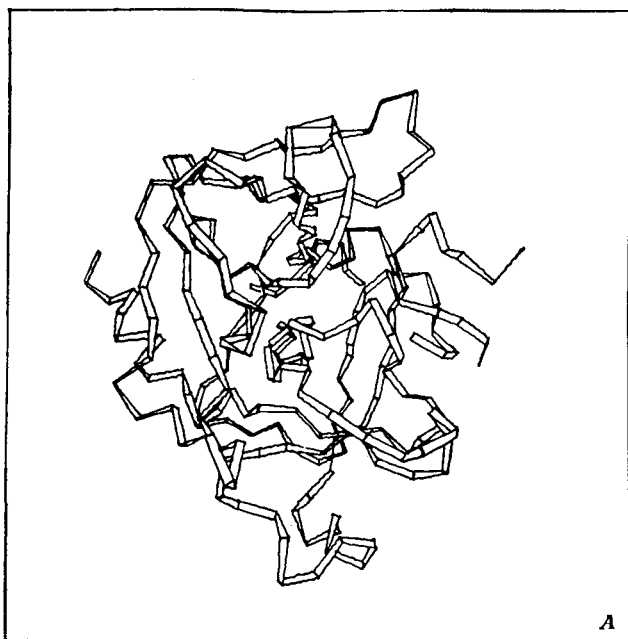
Однако если в растворе в равновесии фермент находится в нескольких разных конформациях, то при кристаллизации будет отбираться только одна из этих конформаций. Так, в условиях, при которых проводится кристаллизация, значительная часть α -химотрипсина находится в неактивной конформации [27], кристаллизуется же только активная форма фермента.

В. Классы ферментов

1. Сериновые протеазы [28—34]

Волнение, вызванное выявлением того факта, что белки, связывающие кислород, — гемоглобин и миоглобин — имеют одинаковую третичную структуру и выполняют одинаковые функции, вновь овладело учеными, когда было установлено, что аналогичная ситуация имеет место в случае сериновых протеаз млекопитающих. Эти ферменты названы так потому, что они имеют уникальный по своей активности сериновый остаток, который необратимо реагирует с фосфорорганическими соединениями, например с диизопропилфторфосфатом. Основные панкреатические ферменты — трипсин, химотрипсин и эластаза — кинетически весьма близки и гидролизуют пептиды и синтетические сложные эфиры. Их активность имеет оптимум при $pH \approx 7,8$ и определяется состоянием ионизации групп с $pK_a = 6,8$. Во всех трех случаях в процессе реакции образуется «ацилфермент», в котором карбоксильный фрагмент субстрата образует сложноэфирную связь с гидроксильной группой активного серина.

Основное различие между трипсином, химотрипсином и эластазой состоит в их специфичности. Трипсин специфически гидролизует пептиды, состоящие из лизина и аргинина, и эфиры этих аминокислот; химотрипсин расщепляет полипептидную цепь по фенилаланину, тирозину и триптофану, имеющим большие гидрофобные боковые цепи; специфичность эластазы проявляется в ее действии на такие небольшие гидрофобные молекулы, как аланин. Установление структуры кристаллических ферментов показало, что полипептидные остовы всех трех ферментов при наложении их друг на друга практически совмещаются, за исключением участков, где добавлено или пропущено несколько аминокислот (рис. 1.11). Различие же в специфичности этих ферментов обусловлено небольшими изменениями в строении «кармана», связывающего боковую цепь аминокислоты. В молекуле химотрипсина имеется четко выраженный карман, связывающий большие гидрофобные боковые цепи [35]. В молекуле трипсина на дне аналогичного кармана вместо Ser-189 находится аспарат [36]. Отрицательно заряженная карбоксильная группа Asp-189 образует ионную связь с положительно заряженной аммонийной или гуанидиниевой группами на конце цепи лизина или аргинина. Два глицина, расположенные у входа в карман химотрипсина, в случае эластазы замещены валином (Val-216) и треонином (Thr-226) [37]. Это предотвращает проникновение в карман больших боковых цепей и обеспечивает связывание небольшой по размерам боковой цепи аланина (рис. 1.12).



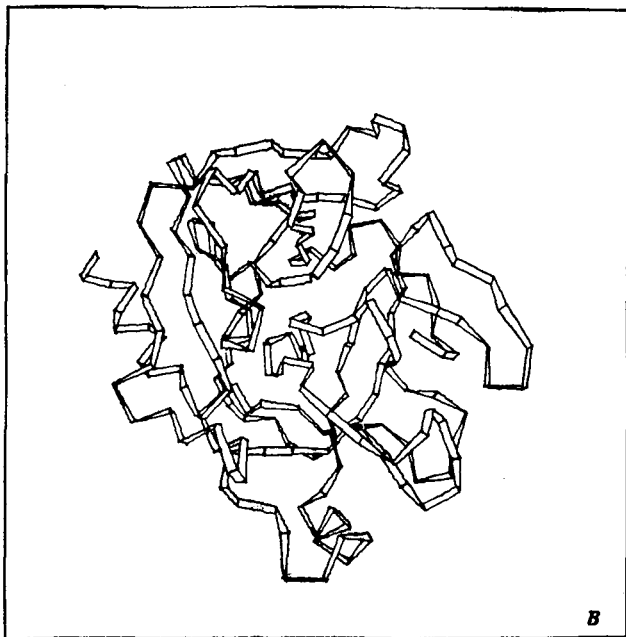


Рис. 1.11. Ленточные диаграммы полипептидных цепей химотрипсина (А), эластазы (Б) и трипсина (В). α -Углеродные атомы располагаются на сгибах ленты. Небольшие различия имеются в структуре лишь внешних петель. (С любезного разрешения Smith J.)

Поразительное сходство третичной структуры рассмотренных выше ферментов нельзя было предвидеть, исходя из сравнения их аминокислотных последовательностей. Между первичными структурами этих ферментов имеется довольно высокая гомология, однако аминокислотный состав эластазы и химотрипсина совпадает с аминокислотным составом трипсина только на 50%. Теперь, располагая кристаллографическими данными, мы вправе сказать, что такая степень гомологичности чрезвычайно высока. Пользуясь этим критерием, можно предположить, что сериновые протеазы плазмы, входящие в состав каскадной системы свертывания крови, также обладают весьма близкой третичной структурой (табл. 1.3). Согласно результатам детального исследования гомологичных участков, внутри белковой глобулы в неизменности сохраняется 60% аминокислотных остатков, тогда как на поверхности — только 10%. Основные различия касаются участков молекулы, расположенных на поверхности структуры или образующих внешние петли.

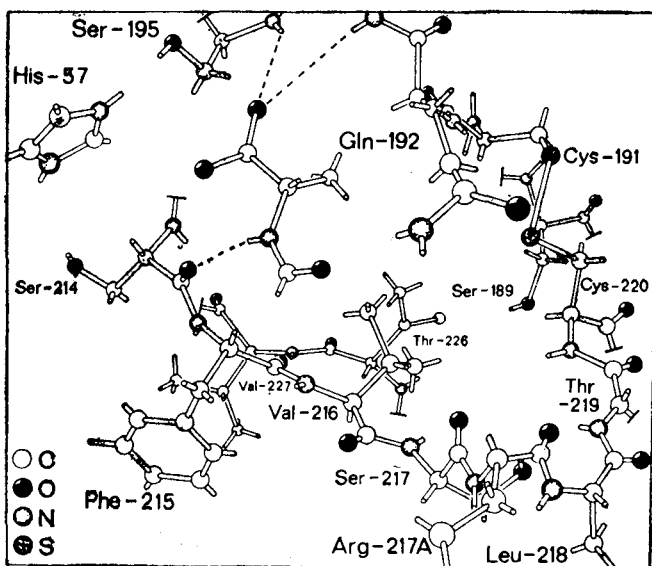
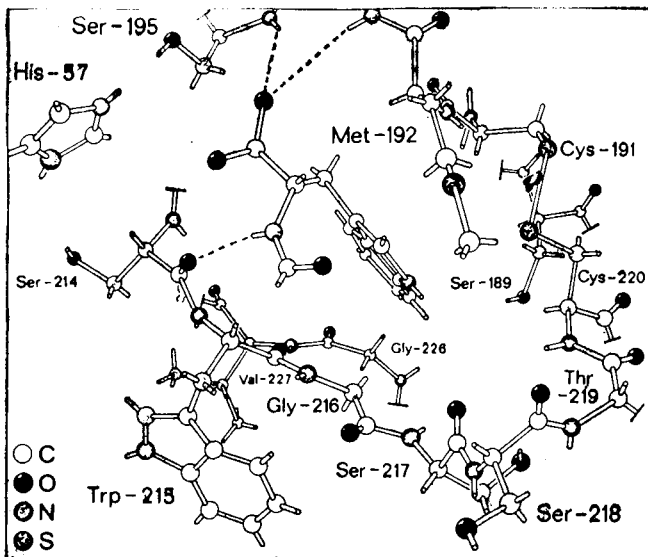


Рис. 1.12. Строение «карманов» у химотрипсина (*вверху*; показано связывание N-формил-L-триптофана) и эластазы (*внизу*; показано связывание N-формил-L-аланина). Строение «кармана» у трипсина практически такое же, как и у химотрипсина, за исключением того, что остаток 189 в трипсине — это аспартат, предназначенный для связывания положительно заряженных боковых цепей аминокислот. Показаны водородные связи между субстратом и полипептидным остовом фермента.

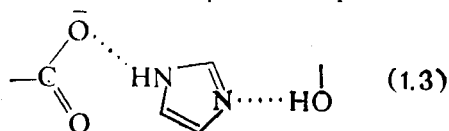
Таблица 1.3

Гомологичность сериновых протеаз
млекопитающих ^{а)}

Фермент	Гомологичность, %
Поджелудочная железа	
Трипсин	100
Химотрипсин А	53
Химотрипсин В	49
Эластаза	48
Плазма	
Тромбин	38
Фактор Ха	50

^{а)} Аминокислотный состав ферментов сравнивается с таковым для бычьего трипсина. Все ферменты выделены из клеток быка, за исключением эластазы, выделенной из клеток свиньи. [Hartley B. S., Sym. Soc. Gen. Microbiol., 24, 152 (1974)].

Совершенно неожиданные особенности были обнаружены в кристаллической структуре химотрипсина. Исследования этого фермента в растворе показывали, что имидазольное кольцо His-57 повышает реакционную способность Ser-195. Однако никаких указаний на то, что этот гистидин связан водородной связью с карбоксильной группой Asp-102, в результате чего образуется каталитическая триада, известная под названием «система с переносом заряда» [38], не было. Теперь такая система обнаружена во всех сериновых протеазах.



По-видимому, сериновые протеазы млекопитающих являются классическим результатом *дивергентной* эволюции. Все они, вероятно, происходят от некоего общего предка — сериновой протеазы, образовавшейся в далеком прошлом.

2. Сериновые протеазы микроорганизмов: конвергентная эволюция

Определение кристаллической структуры бактериальной сериновой протеазы — субтилизина из *Bacillus amyloliquifaciens* — показало, что данный фермент резко отли-

чается от сериновых протеаз млекопитающих [39]. Это не было неожиданностью, поскольку субтилизин имеет иную аминокислотную последовательность. Однако при более детальном исследовании обнаружилось, что по способности связывать субстрат и по своим каталитическим свойствам эти ферменты функционально идентичны. В субтилизине имеется система с переносом заряда, такая же, как у аналогичных ферментов млекопитающих, система водородных связей для связывания карбонильного кислорода и ацетамидной NH-группы субстрата и тот же набор подцентров для связывания ацильного фрагмента субстрата (рис. 1.12, см. также ниже). По-видимому, в данном случае мы имеем пример *конвергентной эволюции*. Различные организмы, начиная с разных третичных структур, выработали некий общий механизм катализа.

Как было показано позже, некоторые сериновые протеазы неживотного происхождения на 20—50% гомологичны аналогичным ферментам млекопитающих (табл. 1.4), что свидетельствует о значительном сходстве их третичных структур. Когда

Таблица 1.4

Различия между сериновыми протеазами ^{а)}

Фермент	Источник	Гомологичность, %
Трипсин	Бык	100
	Акула	69
	<i>S. griseus</i>	43
Эластаза	Свинья	48
	<i>M. sorangium</i>	26
	<i>S. griseus</i>	~ 20
Субтилизин	<i>B. subtilis</i>	0
	<i>B. amyloliquifaciens</i>	0

^{а)} Данные взяты из табл. 1.3 и работы Delbaere L., T. J., Hutcheon W. L. B., James M. N. G., Thiessen W. E., Nature, Lond., 257, 758 (1975).

была установлена кристаллическая структура эластазоподобной протеазы из *S. griseus*, оказалось, что, хотя ее полипептидная цепь существенно короче (186 аминокислотных остатков вместо 245 в α -химотрипсине), $2/3$ цепи имеет ту же конформацию, что и у ферментов млекопитающих [40]. Возможно, бактериальные и панкреатические ферменты происходят от общего предшественника, хотя следует отметить, что эволюционные взаимосвязи между этими типами организмов совершенно неясны.

3. Карбоксипептидазы [41, 42]

Карбоксипептидаза А гидролизует белки с С-конца полипептидной цепи. Она специфична в отношении гидрофобных боковых цепей фенилаланина, тирозина и триптофана. Карбоксипептидаза В специфична в отношении положительно заряженных боковых цепей лизина и аргинина. Между этими ферментами существует такая же связь, как между химотрипсином и трипсином. Их аминокислотные последовательности идентичны на 49%. Что касается различий в третичной структуре, то они имеются лишь в участках молекул, расположенных на поверхности. Основное отличие состоит в том, что остаток Ile-255, находящийся в кармане карбоксипептидазы А, в карбоксипептидазе В заменен на Asp-255, необходимый для связывания положительно заряженных боковых цепей основных субстратов.

4. Дегидрогеназы и домены [43]

Вполне разумно предположить, что NAD^+ -зависимые дегидрогеназы — класс ферментов, связанных с одним и тем же кофактором и обладающих одной и той же функцией — составляя группу структурно родственных ферментов. По-видимому, так оно и есть, однако структурное родство проявляется не столь четко, как в случае сериновых протеаз. При наложении молекул лактатдегидрогеназы акулы и растворимой малатдегидрогеназы свиньи (первых двух ферментов класса NAD^+ -зависимых дегидрогеназ, которые удалось получить в кристаллическом виде) наблюдается почти полное их совмещение; исключение составляют первые 20 остатков лактатдегидрогеназы. Вполне естественно было предположить, что эти ферменты произошли от общей дегидрогеназы-предшественника. Установление структуры алкогольдегидрогеназы из печени лошади и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы омара, которая оказалась существенно иной, усложнило картину, хотя и обнаружилось, что каждый из четырех ферментов состоит из двух доменов и один из них одинаков у всех четырех белков. Это участок, на котором происходит связывание NAD^+ (рис. 1.13).

Обнаруженные структурные особенности привели к созданию следующей гипотезы: дегидрогеназы появились в ходе эволюции в результате слияния гена, который кодировал участок фермента, связывающий динуклеотид, с рядом генов, каждый из которых кодировал отдельный «каталитический домен». Такой механизм дает весьма простой способ получения семейства ферментов с разной специфичностью.

Складка в молекуле фермента, где происходит связывание нуклеотида, имеет сложную структуру, изменяющуюся при

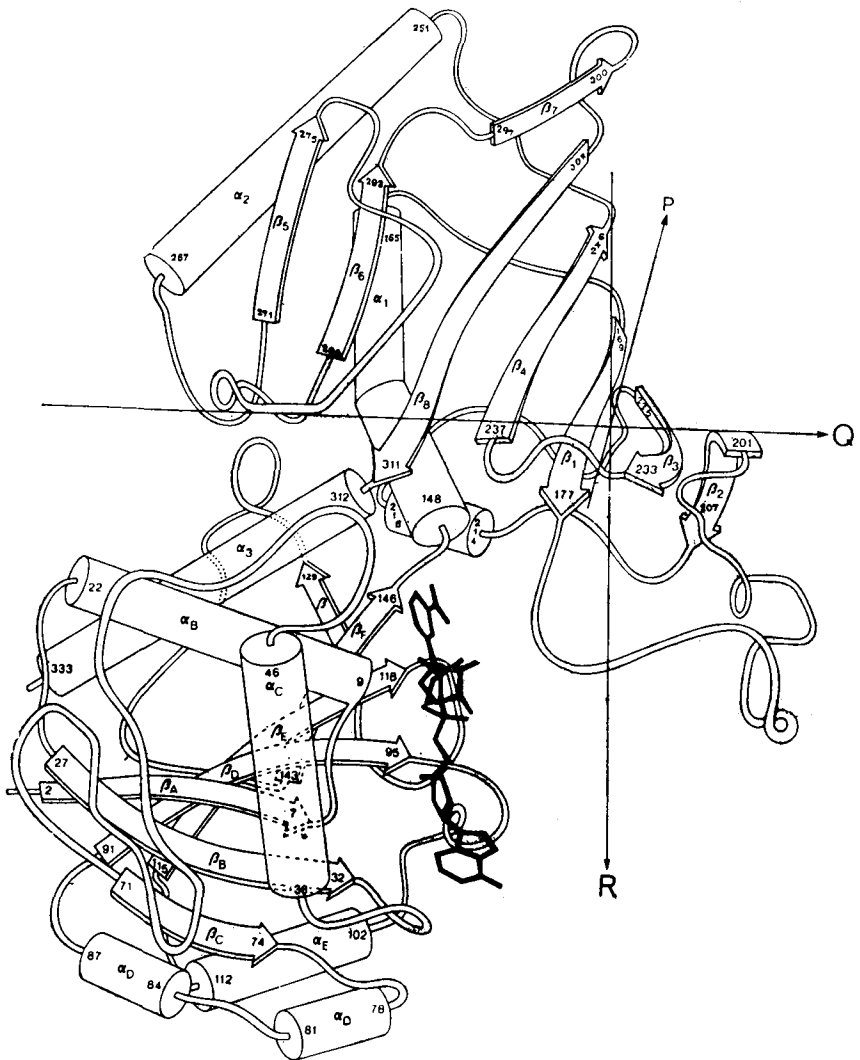


Рис. 1.13. Домены в молекуле глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназы из *B. stearothermophilus*. [Biesecker G., Harris J. I., Walker J. E., Wonacott A., *Nature, Lond.*, **266**, 328, (1977).]

переходе от одной дегидрогеназы к другой. В первом приближении можно считать, что она образована шестью параллельными участками β -структуры и четырьмя параллельными спиральными участками, направление которых противоположно направлению β -структуры. Подобная структура встречается у многих связывающих нуклеотиды белков, например у фосфоглицераткиназы. Однако она обнаружена и у таких белков, как флаводоксин, которые не относятся к нуклеотид-связывающим. Является ли это сходство указанием на наличие общего эволюционного белка-предшественника или оно связано только с ограниченностью числа способов укладки полипептидной цепи — не известно.

Г. Структура фермент-субстратных комплексов

Удивительная особенность ферментативного катализа состоит в том, что фермент специфическим образом связывает субстрат и все реакции протекают внутри фермент-субстратного комплекса. Таким образом, чтобы понять, как работает фермент, необходимо знать структуру не только нативного фермента, но и комплексов фермента с субстратами, а также промежуточных соединений и продуктов. Только в этом случае мы сможем понять, как происходит связывание субстрата, какие каталитические группы участвуют в этом процессе и какие структурные изменения происходят в субстрате и ферменте при образовании фермент-субстратного комплекса. Основная трудность на этом пути связана с тем, что реакции в фермент-субстратных комплексах и образование продуктов протекают за доли секунды, тогда как для снятия рентгенограммы требуется, как правило, несколько часов. В связи с этим обычно определяют структуру комплексов ферментов с продуктами реакции, ингибиторами или аналогами субстратов.

1. Методы исследования фермент-субстратных комплексов

а. Разностный Фурье-метод

Обычно белковые кристаллы содержат около 50% растворителя, иногда эта величина уменьшается до 30%, но никогда не бывает меньше. Нередко в кристаллах имеются заполненные растворителем каналы, которые идут от поверхности образца к активному центру; по ним субстраты могут диффундировать внутрь кристаллов и связываться с ферментом. Часто проводят сокристаллизацию фермента с субстратами. Разностный Фурье-

метод позволяет установить структуру комплекса в том случае, когда связывание лиганда не сопровождается сильными изменениями в структуре или упаковке молекул фермента в кристалле. Этот метод состоит в выявлении различий между рентгенограммами исходных кристаллов белка и этих же кристаллов, пропитанных раствором лиганда. Электронную плотность молекулы связанного лиганда и любые незначительные изменения в структуре фермента можно определить, не устанавливая полную структуру комплекса.

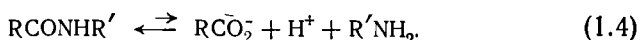
6. Получение стабильных комплексов

Отправным пунктом в первых опытах по определению структуры фермент-субстратного комплекса, в котором субстрат связан продуктивно, была структура стабильных комплексов между ферментом и ингибитором. Классическим примером такого рода является установление структуры лизоцима (см. конец данной главы). Указанный подход можно реализовать несколькими способами. Например, можно связать определенную часть молекулы субстрата с ферментом и установить структуру остальной части путем построения модели. Другой способ состоит в использовании не способного к ферментативному превращению аналога субстрата, в котором модифицирована реакционноспособная связь. Показательным примером применения подобного подхода может служить связывание рибонуклеазой фосфоната вместо фосфата (гл. 12, разд. В).

Иногда удается прямо исследовать реакционноспособный фермент-субстратный комплекс в условиях, при которых ферментативная реакция не протекает. Эти приемы основаны на использовании медленно реагирующих субстратов при рН, когда фермент почти полностью инактивирован в результате перехода остатка каталитического центра в другое ионное состояние (см. индолилакрилоилхмотрипсин), или при очень низких температурах (ацильное производное эластазы; см. ниже), либо на использовании химически модифицированного фермента. Примером химической модификации является восстановление карбоксильной группы важного в каталитическом отношении остатка Asp-52 лизоцима до спиртовой группы (см. ниже и гл. 12, разд. Д).

Иногда удается прямо исследовать реакционноспособный фермент-субстратный комплекс при быстром протекании реакции. Эта возможность реализуется в тех случаях, когда между субстратом и продуктом устанавливается равновесие, смещенное в сторону образования субстрата. Добавление к равновесной смеси фермента не может изменить положение равновесия в растворе, в результате чего удается получить стабильный фер-

мент-субстратный комплекс. Однако нет никакой уверенности в том, что положение равновесия, имеющее место в растворе, остается прежним для связанных с ферментом реагентов (гл. 3). Примером такого равновесия служит гидролиз дипептида, предпочтительный синтез которого *можно* стимулировать введением избытка амина [44, 45]:



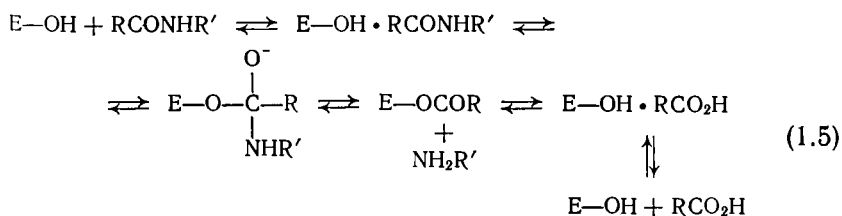
Этот подход был использован также в опытах с применением ЯМР-спектроскопии [46].

Другим примером является связывание диоксиацетонфосфата триозофосфатизомеразой (гл. 12, разд. Ж.1). Этот фермент катализирует изомеризацию одного реагента в другой; устанавливающееся равновесие сдвинуто в сторону образования одной из форм. Напомним, что для обратной реакции комплекс фермент—продукт является фермент-субстратным комплексом.

Примеры применения всех этих подходов обсуждаются в гл. 12. Ниже несколько более подробно рассмотрены сериновые протеазы и лизоцим. Эти ферменты сыграли важную роль в развитии обсуждаемых здесь идей и методов и часто упоминаются в данной книге.

2. Пример 1: сериновые протеазы

Пептиды и синтетические сложные эфиры гидролизуются сериновыми протеазами с образованием в качестве промежуточного продукта ацилфермента [47]:



Сначала в результате атаки субстрата гидроксилом Ser-195 образуется нековалентно связанное промежуточное соединение, превращающееся в *тетраэдрическое промежуточное соединение*. Затем это соединение распадается с образованием *ацилфермента* за высвобождением амина или спирта. Далее происходит гидролиз ацилфермента и образование комплекса фермент—продукт. Кристаллографические исследования позволили установить структуру большинства из этих комплексов.

Структура остальных может быть получена путем построения моделей. Двигаясь в обратном направлении, от «фермент-продуктного» комплекса к фермент-субстратному, Стейц и др. [48] установили структуру комплекса химотрипсина с продуктом —

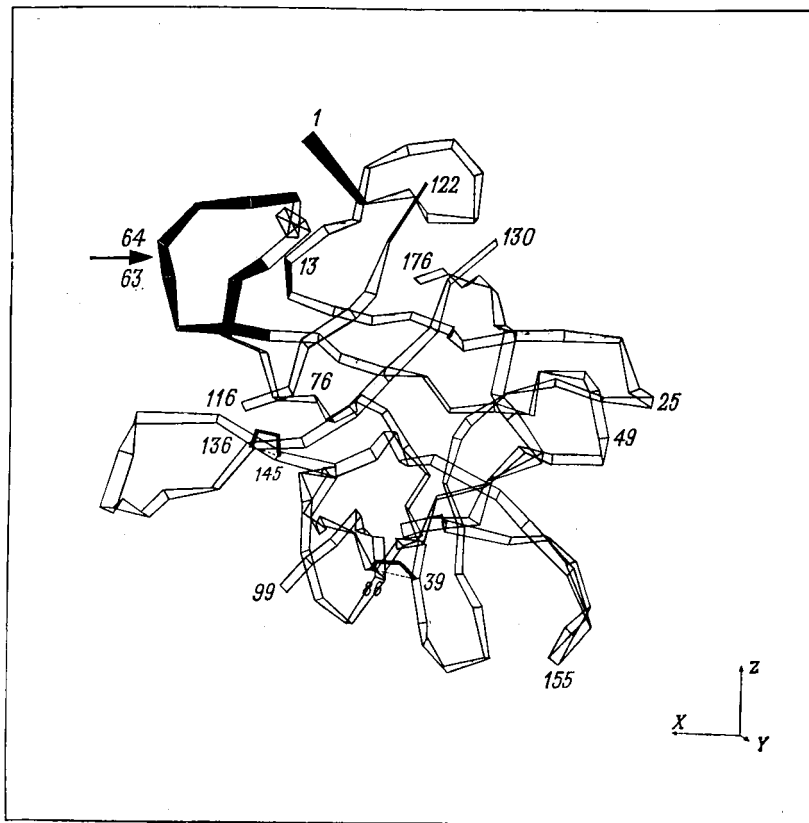


Рис. 1.14. Ленточная диаграмма полипептидной цепи соевого ингибитора трипсина. Зачерненные участки — области контакта с ферментом. [Blow D. M., Janin J., Chotia C., *Nature, Lond.*, 249, 54 (1974).]

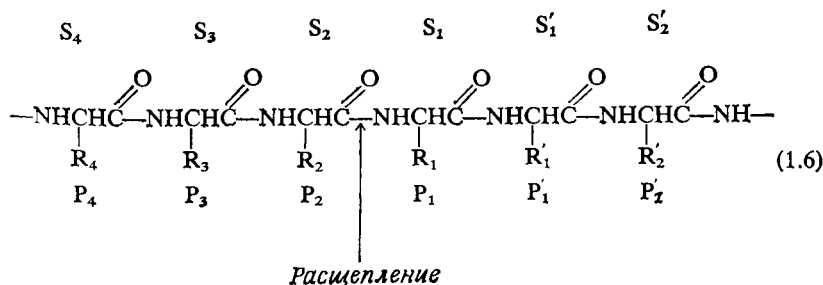
N-формил-L-триптофаном. Авторы использовали диффузию продукта внутрь кристаллического фермента с последующим применением разностного Фурье-метода. Структуру неспецифичного ацилфермента, индолилакрилоилхимотрипсина, определяли при pH 4, когда деацилирование комплекса происходит очень медленно [49]. Субстрат, активированное производное кислоты — индолилакрилоилимидазол, диффундировал в кри-

сталл, где ацилировал Ser-195. Структуру карбобензоксипептидазы определяли при температуре -55°C [50, 51].

Природа предоставила нам редкую возможность установить структуру фермент-субстратных комплексов трипсина и химотрипсина с полипептидами, создав множество ингибиторов-полипептидов, которые очень прочно связываются с трипсином и химотрипсином, поскольку зафиксированы в той конформации, которую субстрат принимает при связывании [52]. Эти полипептиды не гидролизуются при физиологических условиях, так как подвижность аминогруппы, которая высвобождается при расщеплении пептида, ограничена и она не может диффундировать из активного центра фермента. При устранении ограничений в панкреатическом ингибиторе трипсина путем восстановления дисульфидного мостика в полипептидной цепи пептидная связь между Lys-15 и Ala-16 легко расщепляется трипсином [53]. Структура трипсина, его комплекса с основным панкреатическим ингибитором трипсина и свободного ингибитора была установлена при разрешении 1,4, 1,9 и 1,7 Å соответственно [54]. Полученные данные относятся к числу наиболее точных — положение атомов известно с точностью 0,1—0,2 Å. Эти и другие исследования дали следующую информацию относительно связывания субстратов [55—65].

а. Центр связывания

«Центр связывания» полипептидного субстрата состоит из ряда подцентров, расположенных по поверхности фермента. Эти подцентры обозначаются так, как показано на схеме (1.6). Аминокислотные остатки полипептидного субстрата обозначаются буквой P, а подцентры — буквой S. Если не считать первичного подцентра S_1 , связывающего боковые цепи ароматических субстратов химотрипсина или основных аминокислотных субстратов трипсина, в сериновых протеазах нет никаких явно выраженных складок или желобков, которые предназначались бы для связывания субстрата.



6. Первичный подцентр связывания (S_1)

Карман, связывающий ароматические боковые цепи специфических субстратов химотрипсина, представляет собой четко выраженную впадину глубиной 10—12 Å, имеющую в поперечном сечении размеры 3,5—4 Å на 5,5—6,5 Å [48]. Эти параметры точно соответствуют размерам ароматического кольца, ширина которого составляет 6 Å, а толщина — 3,5 Å. Диаметр метиленовой группы равен 4 Å (гл. 9), так что боковые цепи лизина или

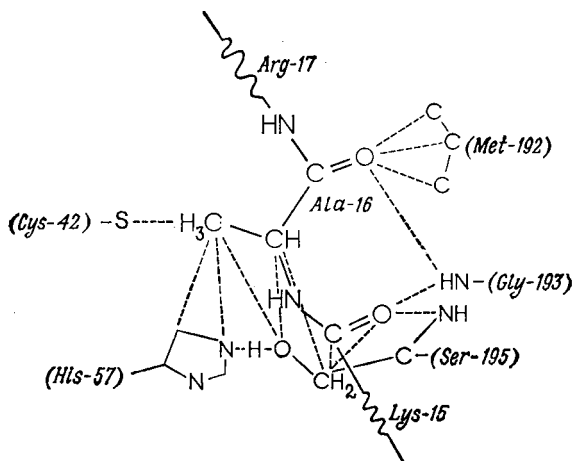


Рис. 1.15. Схематическое изображение участка связывания уходящей группы в химотрипсине, полученное с помощью подгонки модели ингибитора панкреатического трипсина к структуре фермента [65].

аргинина прочно связываются аналогичной по форме впадиной в молекуле трипсина. Как указывалось в разд. В.1, в трипсине на дне такого кармана имеется карбоксильная группа, предназначенная для связывания положительного заряда на конце боковой цепи субстрата, а в эластазе вход в карман частично блокирован.

Карман, связывающий субстрат в химотрипсине, можно назвать «гидрофобным карманом», поскольку он образован неполярными боковыми цепями аминокислот. Эти цепи создают подходящую среду, необходимую для связывания неполярных или гидрофобных боковых цепей субстратов. Физическая природа и прочность гидрофобных сил обсуждаются в гл. 9.

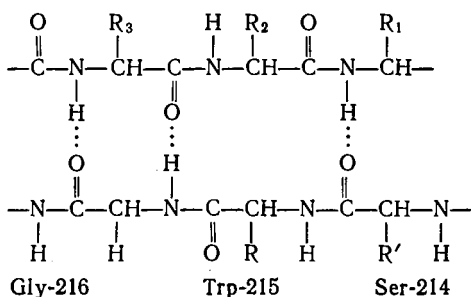
Участок гидрофобного связывания в субтилилизине представляет собой не столь четко выраженную впадину, как у панкреатических ферментов; он больше похож на неглубокую выемку.

Образование же водородных связей характерно в равной степени для всех ферментов (рис. 1.12).

Участок связывания реакционноспособного кислорода карбонильной группы локализован на полипептидном остове между NH-группами Ser-195 и Gly-195. Образующиеся здесь водородные связи имеют большое значение, поскольку кислород в процессе реакции приобретает отрицательный заряд. Водородная связь имеется также между NH-группой N-ациламинового фрагмента субстрата и C=O-группой Ser-214.

в. Подцентры S₁, S₂, S₃

Водородная связь между NH-группой N-ациламинового фрагмента субстрата и карбонильной группой Ser-214 является началом непротяженной области, имеющей антипараллельную β-структуру, которая образована аминокислотными остатками Ser-214, Trp-215 и Gly-216 фермента и остатками P₁, P₂ и P₃ субстрата



г. Подцентр S'₁— участок связывания уходящей группы

Строение подцентра связывания уходящей группы соответствует конформации L-аминокислот [65]. Взаимодействие с ферментом носит в основном гидрофобный характер, что обуславливает отсутствие экзонуклеазной активности фермента; для проявления последней требуется связывание ионизированной карбоксильной группы в неполярной области (рис. 1.15). («Уходящая группа» — жаргонное выражение, относящееся к замещаемой группе в молекуле, в данном случае в ацильной группе.)

3. Пример 2: лизоцим

Лизоцим катализирует гидролиз полисахарида, являющегося основным компонентом клеточной стенки некоторых бактерий. Этот полимер состоит из чередующихся единиц N-ацетилглюко-

замина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM), связанных $\beta(1 \rightarrow 4)$ -связями (рис. 1.16). Установление структуры лизоцима — это одно из выдающихся достижений рентгеноструктурного анализа [66—68]. Если определение структуры кристаллов сериновых протеаз явилось кульминационной точкой многолетних исследований, проходящих через всю историю энзимологии, то выяснение структуры малоизвестного фермента

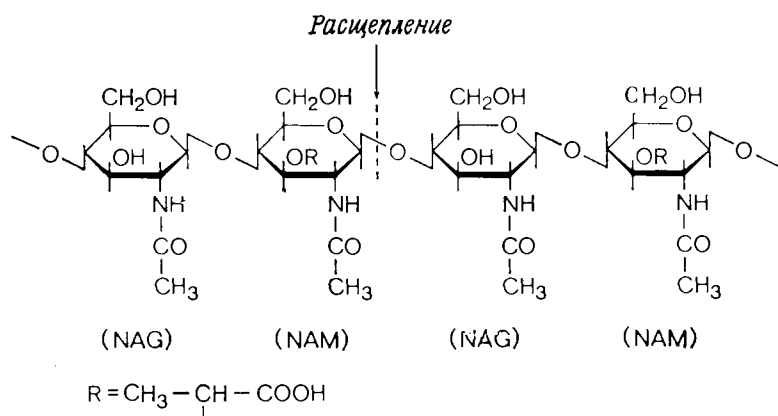


Рис. 1.16. Полисахаридный субстрат лизоцима, обнаруженный в клеточных стенках бактерий.

лизоцима послужило стимулом к исследованию белков в растворе. Кроме того, определение кристаллической структуры исходного фермента и его комплексов с ингибиторами пролили свет на неизвестный ранее механизм действия этого фермента.

В отличие от химотрипсина лизоцим имеет четко выраженную глубокую впадину для связывания субстрата, простирающуюся вдоль одного края молекулы, которая имеет форму эллипсоида. Эта впадина частично образована неполярными боковыми цепями аминокислот, обеспечивающими связывание неполярных областей субстрата, и, кроме того, имеет участки связывания ациламиновых и гидроксильных групп с помощью водородных связей. В этой впадине располагается шесть участков связывания субстрата, обозначаемых через А, В, С, D, Е и F. Остатки NAM могут связываться только на участках В, D и F, тогда как остатки NAG синтетических субстратов — на всех участках. Расщепляемая связь располагается между участками D и E. Ввиду отсутствия природных ингибиторов определить структуру продуктивного фермент-субстратного комплекса таким же способом, каким это было сделано в случае химотрипсина и трипсина, пока не представляется возможным. Ис-

пользуемый в настоящее время метод основан на построении моделей. С его помощью установлена структура фермента и комплекса фермента с ингибитором (NAG)₃ [67]. Это соединение является плохим субстратом для данного фермента — структурные исследования показали, что он связывается непродуктивно на участках А, В, С, минуя участки D и Е, где происходит расщепление связи. Структура продуктивного комплекса была установлена посредством построения проволочной модели комплекса (NAG)₃ с ферментом, а также удлинения полисахаридной цепи путем дальнейшего наращивания структурных единиц NAG; при этом использовались интуитивные представления о возможных местах связывания этой цепи с ферментом. В настоящее время такая работа выполняется с использованием ЭВМ, позволяющих оптимизировать соответствие между ферментом и субстратом. Установлено, что расщепляемая связь располагается между карбоксильными группами Glu-35 и Asp-52, которые находятся в неионизированном и ионизированном состояниях соответственно. Роль этих групп в расщеплении связей обсуждается в гл. 12.

В заключение отметим, что связывающие участки лизоцима и сериновых протеаз почти комплементарны субстратам: неполярные участки субстрата контактируют с неполярными боковыми цепями аминокислот; участки субстрата, способные образовывать водородные связи, связываются с NH-группами полипептидного остова белка или (как в случае лизоцима) с полярными боковыми цепями аминокислот. Благодаря этому подвергающаяся каталитическому превращению часть субстрата удерживается вблизи кислых, основных или нуклеофильных групп фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haldane J. B. S.*, Enzymes, Longmans, Green and Co. (1930), MIT Press (1965).
2. *Green D. W., Ingram V., Perutz M. F.*, Proc. R. Soc., **A225**, 287 (1954).
3. *Pauling L.*, Nature of the chemical bond, Cornell University Press (1960).
4. *Fersht A. R.*, J. Am. chem. Soc., **93**, 3504 (1971).
5. *Chou P. Y., Fasman G. D.*, Biochemistry, **13**, 211, 222 (1974).
6. *Venkatachalam C. M.*, Biopolymers, **6**, 1425 (1968).
7. *Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **68**, 2293 (1971).
8. *Kuntz I. D.*, J. Am. chem. Soc., **94**, 4009 (1972).
9. *Crawford J. L., Lipscomb W. N., Schellman C. G.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **70**, 538 (1973).
10. *Levitt M., Chothia C.*, Nature, Lond., **261**, 552 (1976).
11. *Kuntz I. D.*, J. Am. chem. Soc., **94**, 8568 (1972).
12. *Crick F. H. C.*, Acta cristallogr., **6**, 689 (1953).
13. *Chothia C.*, J. molec. Biol., **75**, 295 (1973).
14. *Klapper M. H.*, Biochim. biophys. Acta, **229**, 557 (1971).
15. *Richards F. M.*, J. molec. Biol., **82**, 1 (1974).

16. Chothia C., Nature, Lond., **254**, 304 (1975).
17. Chothia C., Janin J., Nature, Lond., **256**, 705 (1975).
18. Robertus J. D., Alden R. A., Kraut J., Biochem. biophys. Res. Commun., **42**, 334 (1971).
19. Drenth J., Hol W. G. T., Jansonius J. N., Koekoek R., Cold Spring Harb., Symp. quant. Biol., **36**, 107 (1971).
20. Moulf J., Yonath A., Traub W., Smilansky A., Podjarny A., Rabinovich D., Saya A., J. molec. Biol., **100**, 179 (1976).
21. Hexter C. S., Westheimer F. H., J. biol. Chem., **246**, 3928 (1971).
22. Fersht A. R., Sperling J., J. molek. Biol., **74**, 137 (1973).
23. Doscher M. S., Richards F. M., J. biol. Chem., **238**, 2399 (1963).
24. Bello J., Nowoswiat E. F., Biochim. biophys. Acta, **105**, 325 (1965).
25. Spilburg C. A., Bethune J. L., Vallee B. L., Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **71**, 3922 (1974).
26. Rossi G. L., Bernhard S. A., J. molec. Biol., **49**, 85 (1970).
27. Fersht A. R., Requena Y., J. molec. Biol., **60**, 279 (1971).
28. Hess G. P., The Enzymes, **3**, 213 (1971).
29. Keil B., The Enzymes, **3**, 249 (1971).
30. Magnusson S., The Enzymes, **3**, 277 (1971).
31. Hartley B. S., Magnusson S., The Enzymes, **3**, 323 (1971).
32. Blow D. M., The Enzymes, **3**, 185 (1971).
33. Kraut J., The Enzymes, **3**, 547 (1971).
34. Hartley B. S., Symposia Soc. gen. Microbiol., **24**, 151 (1974).
35. Matthews B. W., Sigler P. B., Henderson R., Blow D. M., Nature, Lond., **214**, 652 (1967).
36. Stroud R. M., Kay L. M., Dickerson R. E., J. molec. Biol., **83**, 185 (1974).
37. Shotton D. M., Watson H. C., Nature, Lond., **225**, 811 (1970).
38. Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S., Nature, Lond., **221**, 337 (1969).
39. Wright C. S., Alden R. A., Kraut J., Nature, Lond., **221**, 235 (1969).
40. Delbaere L. T. J., Hutcheon W. L. B., James M. N. G., Thiessen W. E., Nature, Lond., **257**, 758 (1975).
41. Quiocho F. A., Lipscomb W. N., Adv. Protein Chem., **25**, 1 (1971).
42. Schmid M. F., Herriott J. R., J. molec. Biol., **103**, 175 (1976).
43. Rossman M. G., Liljas A., Brandén C.-I., Banaszak L. J., The Enzymes, **11**, 61 (1975).
44. Fersht A. R., Requena Y., J. Am. chem. Soc., **93**, 3499 (1971).
45. Fersht A. R., Renard M., Biochemistry, **13**, 1416 (1974).
46. Robillard G., Shaw E., Shulman R. G., Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **71**, 2623 (1974).
47. Fastrez J., Fersht A. R., Biochemistry, **12**, 2025 (1973).
48. Steitz T. A., Henderson R., Blow D. M., J. molec. Biol., **46**, 337 (1969).
49. Henderson R., J. molec. Biol., **54**, 341 (1970).
50. Fink A. L., Ahmed A. I., Nature, Lond., **263**, 294 (1976).
51. Alber T., Petsko G. A., Tsernoglou D., Nature, Lond., **263**, 297 (1976).
52. Laskowski M., Jr., Sealock R. W., The Enzymes, **3**, 375 (1971).
53. Wilson K. A., Laskowski M., Sr., J. biol. Chem., **246**, 3555 (1971).
54. Rigbi M., Proceedings of the International Conference on Proteinase Inhibitors (ed. H. Fritz and H. Tschesche), Walter de Gruyter, Berlin, p. 117 (1971).
55. Bode W., Schwager P., Huber R., Proceedings of the Tenth FEBS Meeting, **40**, 3 (1975).
56. Sweet R. M., Wright H. T., Janin J., Chothia C. M., Blow D. M., Biochemistry, **13**, 4212 (1974).
57. Robertus J. D., Kraut J., Alden R. A., Birktoft J. J., Biochemistry, **11**, 4293 (1972).
58. Kraut J., Robertus J. D., Birktoft J. J., Alden R. A., Willcox P. E., Powers J. C., Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **36**, 117 (1971).

59. *Shotton D. M., White N. J., Watson H. C.*, Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **36**, 91 (1971).
60. *Segal D. M., Cohen G. H., Davies D. R., Powers J. C., Wilcox P. E.*, Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **36**, 85 (1971).
61. *Atlas D., Levit S., Schechter I., Berger A.*, FEBS Lett., **11**, 281 (1970).
62. *Gertler A., Hofmann T.*, Can. J. Biochem., **48**, 384 (1970).
63. *Thompson R. C.*, Biochemistry, **13**, 5495 (1974).
64. *Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dutler H.*, Eur. J. Biochem., **39**, 381 (1973).
65. *Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J.*, Biochemistry, **12**, 2035 (1973).
66. *Blake C. C. F., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R.*, Nature, Lond., **206**, 757 (1965).
67. *Phillips D. C.*, Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., **57**, 484 (1967)
68. *Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R.*, Proc. R. Soc., **B167**, 378 (1967).

ХИМИЧЕСКИЙ КАТАЛИЗ

Из структурных и кинетических исследований ферментов известно, что эти молекулы имеют определенные участки, связывающие субстраты, что иногда они образуют промежуточные соединения с ковалентными связями и содержат кислые, основные и нуклеофильные группы. В этой главе мы рассмотрим причины, по которым указанные особенности ферментов необходимы для катализа, и механизм их использования. Роль энергии фермент-субстратного связывания будет рассмотрена в гл. 10.

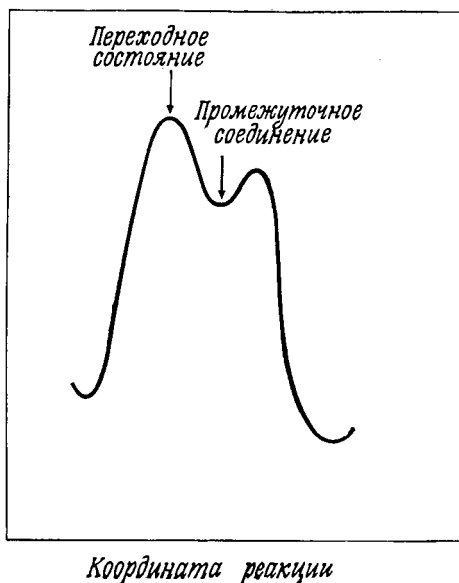
В основе многих концепций катализа лежит *теория переходного состояния*. Поскольку даже поверхностное знакомство с этой теорией значительно упрощает понимание одних представлений и совершенно необходимо для понимания ряда других, мы рассмотрим ее основные положения и область применения. Затем мы обсудим основные принципы химического катализа и факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов, далее ознакомимся с наиболее развитыми областями кинетики и основами гомогенного катализа и прежде всего обсудим, какие факторы определяют реакционную способность молекул (что такое хорошая нуклеофильность и что такое хорошая уходящая группа для данной реакции); остановимся также на зависимости реакционной способности молекул от их структуры. И наконец, для удобства попутно изложим некоторые сведения из области кинетики и стереохимии.

А. Теория переходного состояния [1—4]

Существует несколько теорий химической кинетики. Простейшая из них — теория столкновений, которая используется в гл. 4 для расчета констант скорости столкновения молекул в растворе. Более сложной является теория переходного состояния, особенно полезная при анализе зависимости реакционной способности молекул от их структуры. При этом процессы стол-

кновения реагентов не рассматриваются: теория имеет дело только с самими реагентами (*основное состояние*) и с наиболее нестабильными соединениями, образующимися в ходе реакции (*переходное состояние*). Переходному состоянию соответствует максимум на кривой изменения энергии реагентов вдоль координаты реакции (рис. 2.1); в этом состоянии химические связи

Рис. 2.1. Переходному состоянию соответствует максимум, а промежуточному состоянию — минимум на кривой зависимости энергии от координаты реакции.



непрерывно образуются и разрываются. Напротив, промежуточным соединениям со стабильными химическими связями соответствуют минимумы на рассматриваемой кривой. Простой способ расчета скорости реакции основан на допущении, что между переходным и основным состояниями существует термодинамическое равновесие; в этом случае концентрацию переходного состояния можно рассчитать из разности энергии этих состояний. Общую скорость реакции получают затем умножением концентрации переходного комплекса на константу скорости его распада. Расчет гораздо проще, чем кажется на первый взгляд, поскольку разность энергий между основным и переходным состояниями используется только качественно, и можно показать, что все переходные состояния при данной температуре распадаются с одинаковой частотой.

Рассмотрим мономолекулярную реакцию. Предположим, что разность энергий Гиббса для переходного (X^\ddagger) и основного (X)

состояний равна ΔG^\ddagger . Воспользуемся хорошо известным соотношением равновесной термодинамики¹

$$[X^\ddagger] = [X] \exp(-\Delta G^\ddagger/RT). \quad (2.1)$$

Частота распада переходного комплекса совпадает с частотой колебаний ν разрываемой связи. Эта частота получена из равенства энергий возбужденного осциллятора, рассчитанных на основе квантовой теории ($E = h\nu$) и классической физики ($E = kT$)

$$\nu = kT/h, \quad (2.2)$$

где k — константа Больцмана, h — постоянная Планка. При 25°C $\nu = 6,212 \cdot 10^{12}$ с⁻¹.

Следовательно, скорость распада молекул X определяется уравнением

$$-d[X]/dt = \nu[X^\ddagger] = \quad (2.3)$$

$$= [X](kT/h) \exp(-\Delta G^\ddagger/RT), \quad (2.4)$$

а константа скорости первого порядка для распада молекул X равна

$$k_1 = (kT/h) \exp(-\Delta G^\ddagger/RT). \quad (2.5)$$

При необходимости энергия активации Гиббса ΔG^\ddagger может быть подразделена на энтальпийную и энтропийную составляющие в соответствии с существующим в равновесной термодинамике соотношением

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger, \quad (2.6)$$

где ΔH^\ddagger — энтальпия активации, а ΔS^\ddagger — энтропия активации. Таким образом,

$$k_1 = (kT/h) \exp(\Delta S^\ddagger/R) \exp(-\Delta H^\ddagger/RT). \quad (2.7)$$

(При более строгом подходе в это выражение входит множитель, известный под названием трансмиссионного коэффициента, однако обычно он близок к 1, и им можно пренебречь.)

¹ Для простых кинетических экспериментов и опытов по связыванию наиболее полезны два термодинамических уравнения: а) соотношение между изменением энергии Гиббса и константой равновесия реакции

$$\Delta G = -RT \ln K;$$

б) соотношение между изменением энергии Гиббса и изменениями энтальпии и энтропии

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S.$$

1. Значение теории переходного состояния и ее применение

Ценность теории переходного состояния заключается в том, что она связывает скорость реакции с разностью энергий Гиббса для переходного и основного состояний. Это особенно важно при рассмотрении относительной реакционной способности субстратов или при сравнении скорости данной реакции в различных условиях. Иногда удается рассчитать отношение скоростей или в более общем случае качественно определить характер изменения реакционной способности. Например, щелочной гидролиз такого эфира, как фенилацетат, включает атаку нейтрального реагента в основном состоянии отрицательно заряженным гидроксильным ионом. Это означает, что переходный комплекс должен нести некоторый отрицательный заряд, перенесенный на эфир. Можно ожидать, что *n*-нитрофенилацетат является более реакционно-способным соединением, чем фенилацетат, поскольку нитрогруппа оттягивает на себя электрон и стабилизирует отрицательно заряженное переходное состояние. Рассмотрим спонтанное разложение трет-бутилбромида на ион трет-бутилкарбония и бромид-ион. Переходное состояние этой реакции должно иметь биполярный характер, поэтому полярный растворитель (например, вода) будет стабилизировать его, а неполярный (например, диэтиловый эфир) — дестабилизировать. В гл. 10 и 11 мы рассмотрим применение теории переходного состояния для количественного анализа ферментативных реакций — выявления зависимости реакционной способности и специфичности от структуры при дискретном изменении структуры субстрата.

2. Постулат Хэммонда [5]

Для применения теории переходного состояния, а также при анализе данных по зависимости реакционной способности реагентов от структуры весьма полезен постулат Хэммонда. Постулат утверждает, что если в ходе реакции образуется нестабильное промежуточное соединение, то переходный комплекс будет близок к нему по структуре. Связано это с тем, что нестабильному промежуточному соединению отвечает неглубокий минимум на диаграмме изменения энергии системы вдоль координаты реакции, расположенный вблизи максимума кривой. Постулат Хэммонда позволяет предсказать структуру переходного состояния и способ его стабилизации. Например, промежуточным соединением в реакции, катализируемой лизоцимом, является карбоксий-ион (рис. 2.2). Поскольку это нестабильное высокоэнергетическое соединение, есть основания считать, что переходное состояние имеет структуру карбоксий-иона.

К бимолекулярным реакциям постулат Хэммонда неприменим. В этих реакциях участвуют две молекулы, при столкновении которых образуется один переходный комплекс, и изменение энергии Гиббса обусловлено в основном уменьшением энтропии (разд. Б.4). Постулат Хэммонда справедлив главным образом по отношению к разностям энергий, и его применение наиболее эффективно в случае мономолекулярных реакций. Иногда он

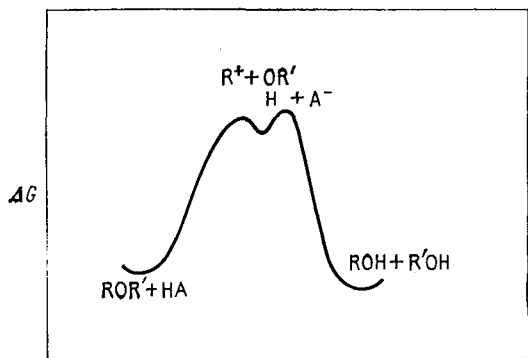


Рис. 2.2. Переходное состояние для реакции расщепления ацеталя по своей структуре близко к промежуточному соединению — карбоний-иону, которому соответствует небольшой минимум вблизи максимума на кривой зависимости энергии от координаты реакции.

выполняется и в такой ситуации, когда разность энергий реагентов и продуктов достаточно велика. Если продукты очень нестабильны, то переходное состояние по своей структуре близко к ним. Если же нестабильны исходные реагенты, переходное состояние имеет структуру, аналогичную структуре этих реагентов (правда, в этом последнем случае постулат выполняется менее строго).

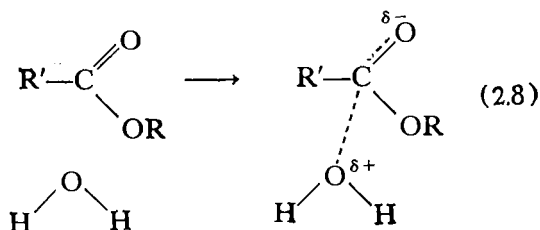
Б. Принципы катализа

1. В каких случаях и почему необходим катализ

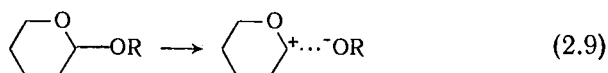
Чтобы показать, насколько велика роль катализа, рассмотрим некатализируемые реакции, которые в принципе ускоряются химотрипсином и лизоцимом.

Атака эфира водой в отсутствие катализа приводит к образованию переходного состояния, в котором атакующая молекула

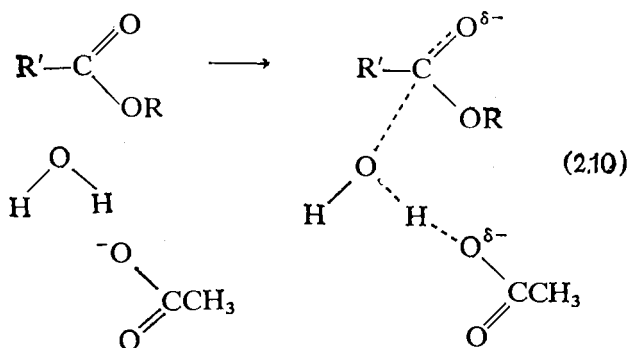
воды приобретает положительный заряд, а кислород карбонильной группы — отрицательный.



Некатализируемый гидролиз ацетала сопровождается образованием переходного состояния, близкого по своей структуре к карбоний-иону и алкоксид-иону.

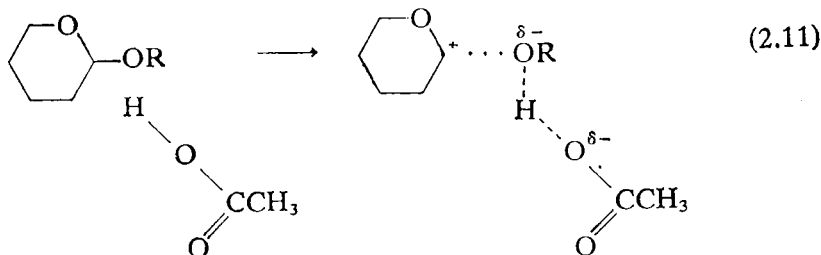


В обеих реакциях переходное состояние крайне невыгодно, поскольку возникают нестабильные положительный и отрицательный заряды. Стабилизация этих зарядов ускоряет реакцию, понижая энергию переходного состояния. Положительный заряд на атакующей молекуле воды можно стабилизировать переносом в процессе реакции одного из протонов на основание. Такой механизм ускорения реакции носит название *общий основной катализ*. На приведенной ниже схеме роль общего основного катализатора играет ацетат-ион.



Отрицательный заряд на молекуле спирта, образующегося из ацетала, можно стабилизировать путем переноса протона от кислоты. Такой механизм называется *общим кислотным катализом*.

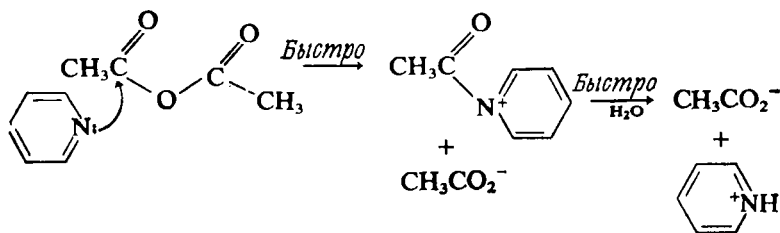
На приведенной ниже схеме роль общего кислотного катализатора играет уксусная кислота.



Рассмотренный кислотно-основный катализ называется общим, с тем чтобы отличать его от *специфического* кислотного или основного катализа, в котором катализатором является протон или гидроксил-ион.

Положительный и отрицательный заряды можно стабилизировать и с помощью *электростатического катализа*. Так, положительно заряженный карбоний-ион не удается стабилизировать путем общего основного катализа, поскольку он не ионизируется, однако его можно стабилизировать электрическим полем отрицательно заряженного карбоксилат-иона. Отрицательный заряд на оксианионе также может быть стабилизирован с помощью таких положительно заряженных ионов металлов, как Zn^{2+} или Mg^{2+} . Стабилизация отрицательного заряда, т. е. электрона, называется *электрофильным катализом*.

Рассмотренные выше типы катализа основаны на стабилизации переходного состояния реакции без изменения ее механизма. Но каталитический процесс может изменить путь протекания реакций. Типичный пример такого рода — *нуклеофильный катализ* переноса ацила или реакции гидролиза. Гидролиз уксусного ангидрида существенно ускоряется в присутствии пиридина благодаря быстрому образованию высокореакционноспособного ацетилпиридиний-иона.



Для эффективного нуклеофильного катализа необходимо, чтобы замещающее нуклеофильное соединение имело более сильно выраженный нуклеофильный характер, чем замещаемое, а промежуточное соединение было более реакционноспособным, чем исходное.

Нуклеофильный катализ — это типичный случай *ковалентного катализа*: субстрат временно модифицируется путем образования ковалентной связи с катализатором, в результате чего образуется реакционноспособное промежуточное соединение. Известно также множество примеров электрофильного катализа путем ковалентной модификации. Как мы увидим ниже, в реакциях, протекающих с участием пиридоксальфосфата и тиаминпирофосфата, и в реакциях образования шиффовых оснований электроны стабилизируются путем их делокализации.

2. Общий кислотно-основный катализ

а. Обнаружение и количественный анализ

Эффективность общего катализа реакции гидролиза эфира оценивается по возрастанию константы скорости реакции гидролиза при увеличении концентрации кислоты или основания. Обычно это делается при постоянном значении рН, что обеспечивает постоянство отношения кислых и основных форм катализатора. Важно, чтобы ионная сила реакционной смеси сохранялась постоянной, поскольку многие реакции чувствительны к изменению концентрации солей. Чтобы выяснить, какой формой катализатора — кислой или основной — осуществляется катализ, необходимо провести измерения, меняя состав буфера. Скорость гидролиза эфира обычно пропорциональна концентрации основного компонента буфера, т. е. имеет место общий основной катализ. Наклон прямой, представляющей собой зависимость константы скорости от концентрации основания, дает константу скорости второго порядка для общего основного катализа (рис. 2.3).

б. Эффективность кислотно-основного катализа: уравнение Брэнстеда [6]

Установлено, что эффективность общего основного катализа в реакциях гидролиза эфира пропорциональна основности катализатора [7]. Зависимость константы скорости этой реакции от концентрации основания определяется уравнением

$$\lg k_2 = A + \beta pK_a \quad (2.13)$$

Выражение (2.13) представляет собой одно из уравнений Брэнстеда. β — Коэффициент Брэнстеда, который является мерой чувствительности реакции к pK_a сопряженной основанию кислоты, A — константа, характерная для данной реакции.

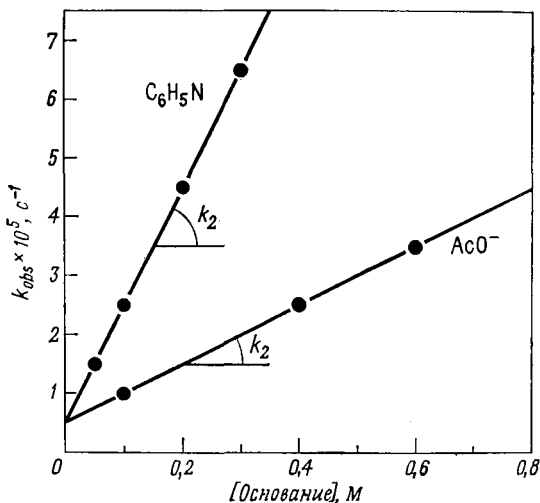


Рис. 2.3. Определение констант скорости гидролиза этилдихлорацетата, катализируемого по механизму общего основного катализа [Jencks W. P., Sargiolo J., Amer. chem. Soc., 83, 1743 (1961).] На графике изображена зависимость констант скорости первого порядка от концентрации основания. Наклон прямых дает константы скорости реакций второго порядка для случая общего основного катализа (k_2). Точка пересечения прямых с осью ординат, в которой концентрация буфера равна нулю, дает константу скорости «спонтанного» гидролиза при данном pH. Зависимость константы скорости «спонтанного» гидролиза от pH дает константы скорости для катализа ионами H^+ и OH^- . Видно, что пиридин более эффективный катализатор, чем ацетат-ион, который является более слабым основанием.

Уравнения Брэнстеда справедливы и в случае общего кислотного катализа, например для гидролиза некоторых ацеталей [8—10]. В этом случае соответствующее соотношение имеет вид

$$\lg k_2 = A - \alpha pK_a, \quad (2.14)$$

т. е. вместо β используется α . Для кислотно-основного катализа значения α и β лежат в интервале между 0 и 1 (за исключением некоторых карбоновых кислот) [11], поскольку при полном переносе протона $\alpha = 1$, а когда переноса не происходит совсем, $\alpha = 0$. Обычно же для гидролиза эфира эти значения лежат в интервале от 0,3 до 0,5, а для гидролиза ацеталей — вблизи 0,6.

В табл. 2.1 и 2.2 приведены данные по увеличению скорости реакций в присутствии общих основных и кислотных катализаторов. Все величины рассчитаны из уравнения Брэнстеда при значениях pK_a 15,74 и $-1,74$ для ионизации H_2O и H_3O^+ (т. е. из

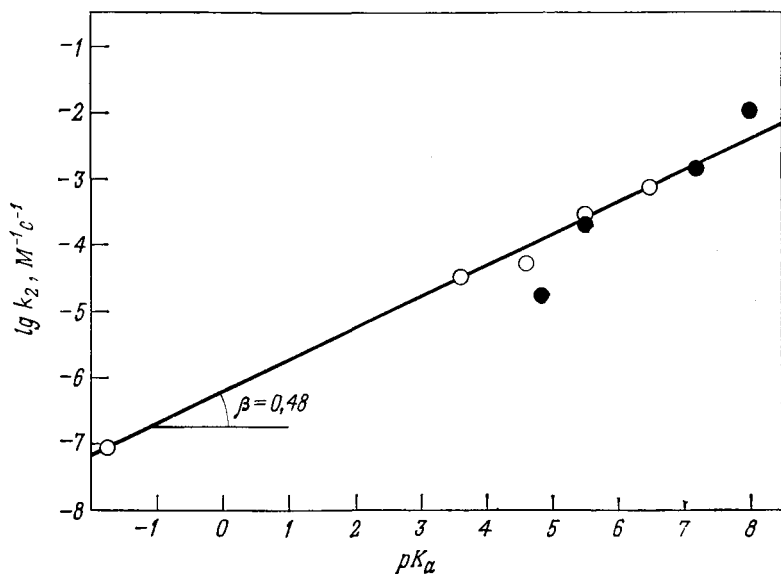


Рис. 2.4. График зависимости Брэнстеда для гидролиза этилдихлорацетата по механизму общего основного катализа. Логарифмы констант скорости второго порядка, полученные из графика рис. 2.3, отложены в зависимости от pK_a кислоты, сопряженной каталитическому основанию. Наклон прямой равен β . Обратите внимание, что точки, отвечающие азотистым основаниям (●), ложатся на ту же прямую, что и точки, отвечающие основаниям типа оксианионы (○), показывая, что катализ зависит в первую очередь от силы основания, а не его химической природы.

соотношения $[H^+][OH^-] = 10^{-14}$ и в предположении, что концентрация воды равна 55 М). Эффективность катализа сильно зависит от α , β и значения pK_a катализатора. Определяющим фактором является состояние ионизации катализатора в условиях протекания реакции. Кислота с $pK_a = 5$ является гораздо более эффективным общим кислотным катализатором, нежели кислота с $pK_a = 7$. Однако при рН 7 в активной форме находится только 1% молекул кислоты с $pK_a = 5$, остальные 99% молекул ионизированы. Кислота с $pK_a = 7$ при рН 7 ионизирована только на 50%, остальные 50% составляет активная форма. Из табл. 2.2 видно, что при $\alpha \leq 0,85$ кислота с $pK_a = 7$ при рН 7 является более эффективным катализатором, чем кислота с

Таблица 2.1

Влияние β на общий основной катализ

β	Скорость реакции в 1М растворе основания	
	Скорость реакции в воде	
	$pK_a=5$	$pK_a=7$
0	1	1
0,3	2,9	8,6
0,5	44	427
0,7	951	$2,4 \cdot 10^4$
0,85	$9,7 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^5$
1	10^5	10^7

Таблица 2.2

Влияние α и степени ионизации на общий основной катализ

α	Скорость реакций в 1М растворе кислоты			Скорость реакции в 1М растворе при pH ⁷ а)		
	Скорость реакции в воде			Скорость реакции в воде		
	$pK_a=5$	$pK_a=7$	$pK_a=9$	$pK_a=5$	$pK_a=7$	$pK_a=9$
0	1	1	1	1	1	1
0,3	31	8,6	2,9	1,3	4,8	2,9
0,5	$4,3 \cdot 10^3$	427	44	42	214	43,2
0,7	$6 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^4$	951	$6 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$	940
0,85	$2,5 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^3$
1	10^9	10^7	10^5	10^7	$5 \cdot 10^6$	$9,9 \cdot 10^4$

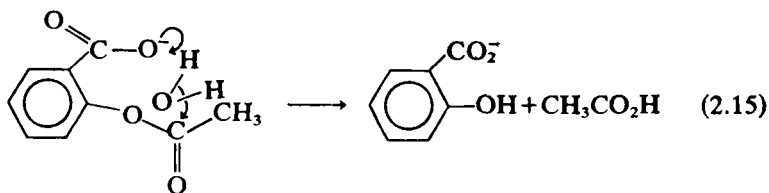
а) Скорости реакций в 1М растворе кислоты и основания сравнивались со скоростью некатализируемой водой реакции. Следует отметить, что протон становится эффективным катализатором при более высоких значениях α . При $\alpha=0,3; 0,5; 0,7; 0,85$ и $1,0$ скорость реакции возрастает при pH 7 в $1,0003; 2,3 \cdot 10^3; 1,3 \cdot 10^6$ и $5,5 \cdot 10^6$ раз соответственно, отнеся на второй план при больших значениях α катализ посредством других кислот.

$pK_a = 5$. Аналогичным образом основание с $pK_a = 7$ при pH 7 — более эффективный катализатор, чем основание с $pK_a = 9$ (при $\beta \leq 0,85$), поскольку по своей природе более реакционно-способное основание при значениях pH ниже его pK_a находится главным образом в протонированной форме. При pH 7 наиболее эффективными кислотно-основными катализаторами являются те соединения, pK_a которых близко к 7. Этим объясняется широкая распространенность в ферментативном катализе гистидина, имидазольное кольцо которого имеет pK_a 6—7.

3. Внутримолекулярный катализ: «эффективная концентрация» групп на молекуле фермента

Как мы видели, кислотно-основной катализ является эффективным средством ускорения химических реакций. Можно ли из этих данных определить, какова роль данного механизма в ферментативном катализе? Непосредственное перенесение результатов предыдущего раздела на ферменты встречает принципиальные затруднения. Дело в том, что каталитические реакции в растворе — это реакции второго порядка (скорость реакции возрастает с увеличением концентрации катализатора), тогда как реакции, протекающие в пределах фермент-субстратного комплекса, представляют собой реакции первого порядка, причем кислоты и основания являются составной частью молекулы фермента. Возникает вопрос: какую концентрацию кислоты или основания следует использовать в расчетах? Экспериментальный подход к этой проблеме состоит в синтезе соединений с каталитической группой, являющейся частью молекулы субстрата, и в последующем сравнении скоростей реакций с участием этих соединений со скоростями соответствующих внутримолекулярных реакций.

Типичным примером *внутримолекулярно катализируемой* реакции является гидролиз аспирина [12]. Гидролиз эфирной связи ускоряется с помощью внутримолекулярного общего основного катализа. Сравнение со скоростью некатализируемого гидролиза аналогичных соединений показывает, что в результате катализа скорость реакции возрастает примерно в 100 раз [13]. Если принять, что pK_a основания равно 7, а не 3,7, как у аспирина, то экстраполяция дает более высокое значение ускорения — в 5000 раз.

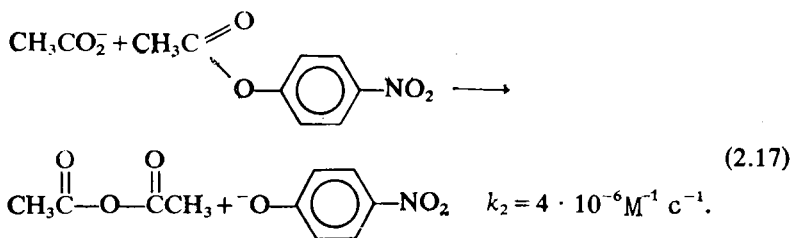
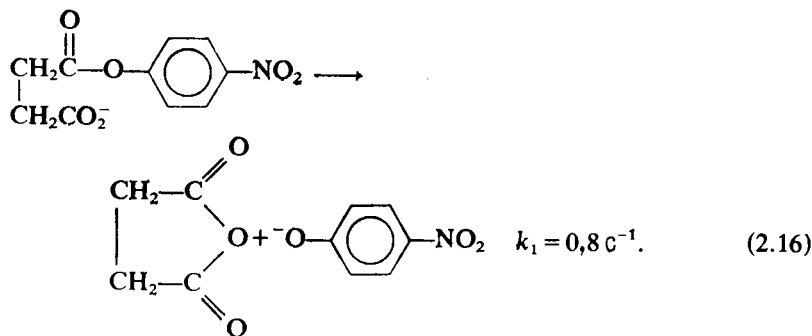


Внутримолекулярный общий основной катализ гидролиза также можно охарактеризовать количественно. Сравнение константы скорости такого гидролиза с константой скорости

внутримолекулярной реакции показывает, что для получения такого же значения константы скорости первого порядка, как и в случае внутримолекулярной реакции, необходимо взять 13 М раствор основания [12]. Следовательно, «эффективная концентрация» карбоксилат-иона в аспирине составляет 13 М. Это типичная величина для внутримолекулярного кислотно-основного катализа.

Эффективные концентрации нуклеофилов для внутримолекулярных реакций часто значительно превышают это значение. В приведенных ниже примерах рассматриваются «ненапряженные» системы; химик может синтезировать «напряженные» соединения. Снятие напряжения в ходе реакции существенно увеличивает ее скорость. В случае рассматриваемых здесь производных янтарной кислоты и аспирина атакующий нуклеофил может уйти в сторону от эфирной связи и снять напряжение. Наблюдаемые увеличения скорости полностью обусловлены высокой эффективной концентрацией соседней группы.

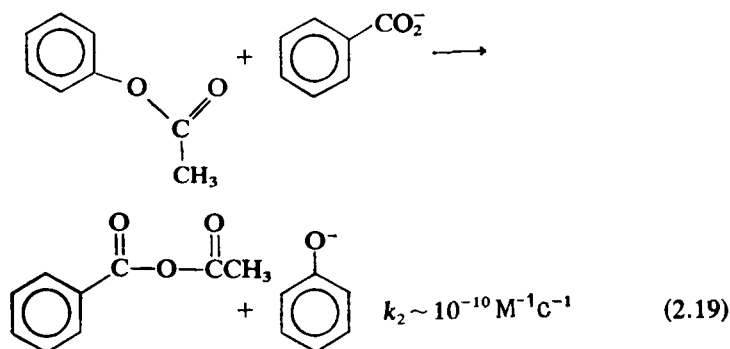
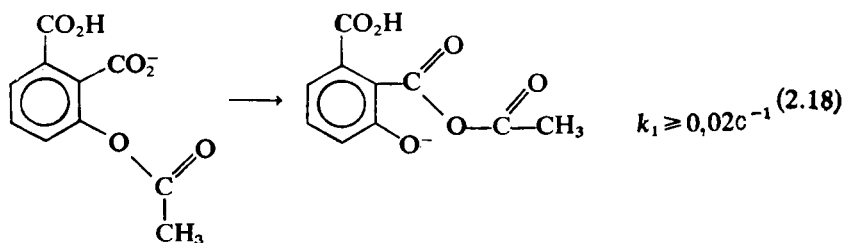
*а) Скорости переноса ацильной группы
в производных янтарной кислоты [14]*



*Эффективная
концентрация*

$$-\text{CO}_2^- = k_1/k_2 = 2 \cdot 10^5 \text{ M}$$

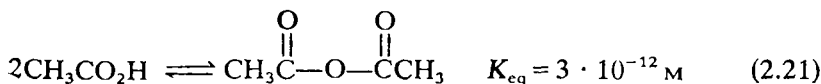
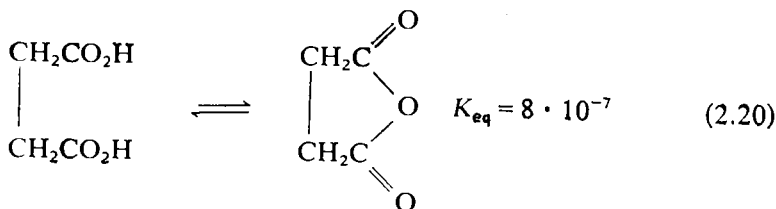
б) Скорости переноса ацильной группы в производных аспирина [15]



Эффективная
концентрация

$$-CO_2^- = k_1/k_2 > 2 \cdot 10^7 M.$$

в) Константы равновесия для реакций переноса ацильной группы в производных янтарной кислоты [16, 17]



Эффективная концентрация $-CO_2H = 3 \cdot 10^5 M.$

Эти примеры показывают, что огромное увеличение скоростей реакций обусловлено внутримолекулярным нуклеофильным катализом.

4. Энтропия: теоретические основы внутримолекулярного катализа и эффективная концентрация [18, 19]

Высокая эффективная концентрация внутримолекулярных групп — один из наиболее важных факторов, обуславливающих эффективность ферментативного катализа. Теоретически это можно понять с позиций теории переходного состояния и из анализа энтропийного члена в уравнении (2.7) для константы скорости. Эффективные концентрации можно определить путем подстановки изменения энтропии в член $\exp(\Delta S^\ddagger/R)$ уравнения (2.7).

а. Физический смысл энтропии

Смысл понятия «энтропия» (быть может, не совсем точно, но вполне удовлетворительно для данного контекста) можно сформулировать так: энтропия — это мера неупорядоченности системы. Чем неупорядоченнее система, тем больше вероятность ее существования и тем выше энтропия. Аналогичным образом энтропия связана с пространственной свободой атомов и молекул.

Преимущество внутримолекулярной реакции по сравнению с аналогичным межмолекулярным процессом с точки зрения катализа обусловлено энтропийным фактором. В межмолекулярной реакции участвуют две или большее число молекул, а в результате образуется одна. Это ведет к возрастанию «порядка» и, следовательно, к уменьшению энтропии. Из уменьшения энтропии можно рассчитать «эффективную концентрацию».

б. Значения энтропии

Энтропия молекулы — это сумма энтропий поступательного, вращательного и внутримолекулярного движений. Энтропию поступательного и вращательного движения можно точно рассчитать для молекулы вещества, находящегося в газообразном состоянии, из ее массы и геометрии. Энтропию колебательного движения рассчитывают из частот колебаний, а энтропию внутримолекулярного вращения — из энергетических вращательных барьеров.

Энтропия поступательного движения небольших молекул в 1 М растворе составляет примерно $120 \text{ Дж}(\text{град}\cdot\text{моль})^{-1}$.

[30 кал·(град·моль)⁻¹], т. е. является довольно большой величиной. Для 25°C (298 К) она равна примерно 40 кДж·моль⁻¹ (9 ккал·моль⁻¹). Энтропия поступательного движения пропорциональна объему, занимаемому молекулой; чем меньше объем, тем меньше возможностей для движения молекулы и тем меньше энтропия. Аналогичным образом энтропия уменьшается с увеличением концентрации вещества, поскольку средний объем, занимаемый молекулой, обратно пропорционален концентрации. Отметим, что зависимость энтропии от массы слабая (табл. 2.3). 10-кратное увеличение молекулярного веса (от 20 до 200) приводит лишь к небольшому изменению энтропии поступательного движения.

Для больших органических молекул энтропия поступательного движения также весьма велика — до 120 Дж·(град·моль)⁻¹ [30 кал·(град·моль)⁻¹]. Она слабо растет с увеличением массы, но не зависит от концентрации.

Таблица 2.3

Энтропия поступательного, вращательного и колебательного движений при 298 К [18]

Движение	Энтропия	
	Дж·(град·моль) ⁻¹	кал·(град·моль) ⁻¹
3 поступательных степени свободы для мол. веса 20—200 (Стандартное состояние—1М)	120—150	29—36
3 вращательных степени свободы		
Вода	44	10,5
<i>n</i> -Пропан	90	21,5
эндо-Дициклопентадиен	114	27,2
Внутримолекулярное вращение	13—21	3—5
Колебания, см ⁻¹		
1000	0,4	0,1
800	0,8	0,2
400	4,2	1,0
200	9,2	2,2
100	14,2	3,4

Для большинства ковалентных связей неупругие колебания вносят в энтропию очень небольшой вклад. Низкочастотные колебания, при которых движение атомов менее ограничено, могут дать вклад, составляющий несколько энтропийных единиц. Энтропия внутримолекулярного вращения равна 13—21 Дж·(град·моль)⁻¹ [3—5 кал·(град·моль)⁻¹] (табл. 2.3).

в. Уменьшение энтропии при образовании из двух молекул одной

Образование из двух молекул одной приводит к потере одного набора энтропии вращательного и поступательного движения. Эти энтропийные составляющие для продукта слияния двух молекул лишь ненамного превышают соответствующие

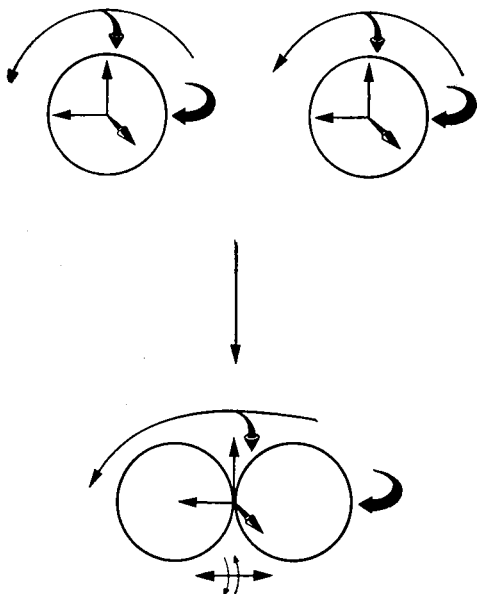


Рис. 2.5. Каждая из изображенных в верхней части рисунка молекул имеет три поступательных степени свободы и три вращательных. Молекула, образующаяся при слиянии двух таких молекул, имеет только три поступательных степени свободы и три вращательных. Соответствующее уменьшение энтропии частично компенсируется за счет увеличения энтропии внутримолекулярного колебательного и вращательного движения продукта.

значения для одной из исходных молекул, поскольку слабо зависят от размера молекулы (табл. 2.3). Уменьшение энтропии составляет примерно $190 \text{ Дж} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1}$ [$45 \text{ кал} \cdot (\text{град} \times \text{моль})^{-1}$], т. е. $55\text{--}59 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($13\text{--}14 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) при 25° . Это уменьшение может частично компенсироваться за счет возрастания энтропии внутримолекулярного движения, обусловленного появлением новых типов вращений и колебаний.

Приведенное выше значение уменьшения энтропии относится к стандартному состоянию 1 М растворов. Если раствор более разбавлен, энтропия уменьшится еще больше, поскольку энтропия поступательного движения зависит от концентрации.

г. Энтропийное преимущество мономолекулярных реакций над бимолекулярными

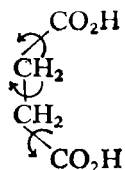
Сравним реакцию двух молекул, А и В, в результате которой образуется третья молекула, с аналогичной внутримолекулярной реакцией:



В соответствии с вышеизложенным образование переходного состояния AB^\ddagger сопровождается уменьшением поступательного и вращательного движения. Внутримолекулярная циклизация [уравнение (2.23)] приводит лишь к небольшому уменьшению энтропии внутримолекулярного вращения. Однако уменьшение энтропии при образовании AB^\ddagger частично компенсируется за счет некоторого увеличения энтропии внутримолекулярного вращения.

В зависимости от относительного увеличения и уменьшения энтропии внутримолекулярного вращения при внутримолекулярной реакции увеличение энтропии может достигать $190 \text{ Дж} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1}$ [$(45 \text{ кал} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1})$], или $55\text{—}59 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($13\text{—}14 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) при 25° . Это увеличение эквивалентно повышению эффективной концентрации соседней группы. Подстановка величины $190 \text{ Дж} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1}$ [$(45 \text{ кал} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1})$] в энтропийный член уравнения (2.7) дает для максимальной эффективной концентрации соседней группы значение $6 \cdot 10^9 \text{ М}$.

Уменьшение внутримолекулярного вращения весьма существенно снижает эффективную концентрацию. В случае сукцината теряется три вращательные степени свободы. Согласно оценкам Пейджа и Дженкса, потеря вращательных степеней свободы метиленовой группы приводит к уменьшению энтропии примерно на $13 \text{ кДж} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1}$ [$(3 \text{ ккал} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1})$], а потеря вращательных степеней свободы при ограничении вращения вокруг связи между метиленовой и карбоксильной группами — на $25 \text{ кДж} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1}$ [$(6 \text{ ккал} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1})$]. Это эквивалентно множителю $2 \cdot 10^3$. Если же свободное вращение групп в молекулах производных янтарной кислоты заморозить, то эффективная концентрация карбоксильной группы будет равна $\sim 5 \cdot 10^8 \text{ М}$. Поправка на энергию экранирования атомов водорода метиленовых групп при образовании пятичленного кольца дает увеличение концентрации еще в 10 раз.



Эти расчеты до конца справедливы только для газовой фазы. Однако до работы Пейджа и Дженкса вообще не предполагали, что реакции в растворе сопровождаются аналогичными изменениями энтропии, считая, что эффективная концентрация соседней группы достигает 55 М, т. е. концентрации молекул воды в воде. Это то значение, которое характерно для внутримолекулярного общего основного катализа.

д. Зависимость эффективной концентрации от «жесткости» переходного состояния

Более низкая эффективная концентрация, полученная для внутримолекулярного основного катализа, связана с тем, что переходное состояние для этих реакций менее «жестко». В нуклеофильных реакциях нуклеофил и электрофил довольно точно фиксированы, что и приводит к значительному уменьшению энтропии. При общем основном или кислотном катализе атомы в переходном состоянии обладают довольно большой свободой перемещения. Положение катализатора фиксировано не столь жестко, как в случае нуклеофильного катализа. Следовательно, общий основной катализ сопровождается меньшим снижением энтропии, т. е. внутримолекулярные реакции менее выгодны, чем аналогичные им нуклеофильные.

При расчете эффективных концентраций Кошланд вначале предполагал, что концентрация внутримолекулярных групп примерно равна концентрации молекул воды в водном растворе, поскольку в растворе молекула полностью окружена водой [20]. Это дает верхний предел эффективной концентрации, равный 55 М, что эквивалентно изменению энтропии на $34 \text{ Дж} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1}$ [$8 \text{ кал} \cdot (\text{град} \cdot \text{моль})^{-1}$]. Данная величина определяет вероятность нахождения в растворе друг возле друга двух молекул. Однако, как только две молекулы жестко связываются друг с другом, энтропия существенно уменьшается. «Разрыхленное» переходное состояние, вероятно, можно рассматривать как систему из двух молекул, находящихся рядом друг с другом, но сохранивших большую энтропийную свободу.

В заключение можно сказать, что энтропия является одним из важнейших факторов ферментативного катализа. Реакции, катализируемые в растворе, протекают медленно, поскольку

сближение катализатора и субстрата приводит к значительному уменьшению энтропии. Ферментативные реакции протекают в пределах фермент-субстратного комплекса; каталитические группы являются частью той же молекулы, что и субстрат, так что в переходном состоянии уменьшения энтропии поступательного или вращательного движения не происходит. В результате этого «эффективные концентрации» каталитических групп становятся очень высокими по сравнению с таковыми для бимолекулярных реакций в растворе. Этот выигрыш в энтропии «оплачивается» энергией связывания субстрата ферментом. Уменьшение энтропии поступательного и вращательного движения субстрата происходит при образовании фермент-субстратного комплекса, а не на химических стадиях реакции. (Уменьшение энтропии при образовании фермент-субстратного комплекса увеличивает константу диссоциации последнего.)

5. «Орбитальное управление» [21]

Были предприняты попытки объяснить увеличение скорости реакции при внутримолекулярном катализе повышением эффективной концентрации каталитических групп до 55 М и необходимой очень точной ориентации электронных орбиталей реагирующих атомов («орбитальное управление»). Несомненная заслуга Шторма и Кошланда состоит в том, что они обратили внимание на роль точной ориентации в фермент-субстратном комплексе, однако эти авторы переоценили важность данного фактора, поскольку, как теперь известно, при использовании значения 55 М сильно недооценивается вклад в эффективную концентрацию энтропии поступательного движения. В настоящее время считается, что, хотя перекрывание орбиталей в переходном состоянии и должно быть, оно может иметь точность $\sim 10^\circ$ [22, 23]. Напряжение, обусловленное деформацией даже полностью образовавшейся углерод-углеродной связи на 10° , составляет всего 11 кДж·моль⁻¹ (2,7 ккал·моль⁻¹). Для деформации на 5° необходимо только 2,8 кДж·моль⁻¹ (0,68 ккал·моль⁻¹) [19].

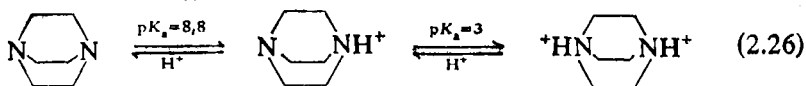
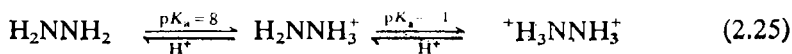
6. Электростатический катализ

Химические исследования с использованием модельных соединений не выявили сколько-нибудь заметного ускорения реакций за счет электростатических сил. В результате некоторые химики пришли к отрицанию самой идеи такого механизма, однако это было связано с недопониманием тех особенностей электростатических взаимодействий, которые имеют место в белковых молекулах. Энергия электростатического взаимодействия

двух точечных зарядов e_1 и e_2 , находящихся друг от друга на расстоянии r в среде с диэлектрической постоянной D , равна

$$E = e_1 e_2 / Dr. \quad (2.24)$$

Для протона и электрона, находящихся в вакууме на расстоянии 3,3 Å, энергия взаимодействия составляет -418 кДж·моль $^{-1}$ (-100 ккал·моль $^{-1}$). В воде, для которой диэлектрическая постоянная равна 79, эта величина уменьшается до $-5,4$ кДж·моль $^{-1}$ ($-1,3$ ккал·моль $^{-1}$). Как мы видим, чтобы энергия взаимодействия между двумя заряженными частицами не уменьшалась, они не должны находиться в водной среде. Рассмотрим протонирование двух оснований аминов в воде:



Энергия дестабилизации дикатиона с двумя расположенными рядом положительными зарядами, образующимися при протонировании гидразина, составляет ~ 920 кДж·моль $^{-1}$ (220 ккал·моль $^{-1}$), что соответствует энергии взаимодействия двух положительных зарядов, находящихся в вакууме на расстоянии 1,5 Å. Однако в действительности два значения pK_a различаются только на 9 единиц, что соответствует разности энергий 50,2 кДж·моль $^{-1}$ (12 ккал·моль $^{-1}$). Атомы азота в триэтилендиаmine разделены расстоянием 2,6 Å [уравнение (2.26)]. Можно было бы ожидать, что в вакууме энергия взаимодействия двух положительных зарядов в этом дикатионе составит ~ 546 кДж·моль $^{-1}$ (130 ккал·моль $^{-1}$), однако второе значение pK_a соответствует изменению энергии только на 33,4 кДж (8 ккал). По-видимому, в обоих случаях эффективная диэлектрическая проницаемость среды между этими двумя атомами азота равна примерно 17. Это обусловлено тем, что положительно заряженные ионы поляризуют растворитель и индуцируют образование диполей. Электростатическое поле этих диполей и любых противоионов частично нейтрализуют положительное поле катионов, в связи с чем окружающие ионы, даже не находясь между катионами, понижают энергию их взаимодействия. То обстоятельство, что исследования модельных соединений проводились в воде, привело к сильной недооценке роли электростатического катализа в случае белков.

В органических растворителях электростатическое взаимодействие гораздо сильнее, нежели в воде, из-за более низкой диэлектрической проницаемости. Это обстоятельство было использовано химиками-синтетиками для повышения скоростей

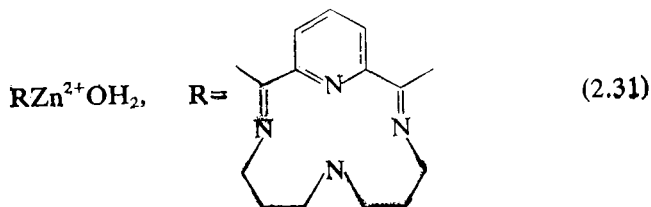
б. Источник гидроксил-ионов при нейтральном значении рН

Другой очень важный результат, полученный недавно при кинетических исследованиях в области неорганической химии, состоит в том, что связанные с металлом гидроксильные ионы являются мощными нуклеофилами [29—31]. Связанная с кобальтом молекула воды [см. уравнение (2.30)] имеет $pK_a = 6,6$; это на 9 единиц ниже pK_a свободной воды

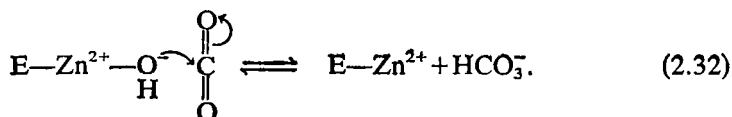


Однако связанная с кобальтом гидроксильная группа только в 40 раз менее эффективна, чем свободный гидроксил-ион, в отношении ускорения гидратации двуокиси углерода [29]. Подобное отсутствие связи между высокой реакционной способностью и pK_a является довольно общей закономерностью, проявляющейся независимо от того, ион какого именно металла связан [31]. Таким образом, источником нуклеофильных гидроксильных групп при нейтральном значении рН служат связанные с металлом молекулы воды. Подобно тому как основание с $pK_a = 7$ является наиболее эффективным общим основным катализатором (разд. Б, 2, б), связанная с металлом молекула воды с $pK_a = 7$ является наиболее эффективным соединением при нуклеофильной атаке, поскольку обладает высокой реакционной способностью и с большой вероятностью находится в ионизированном состоянии.

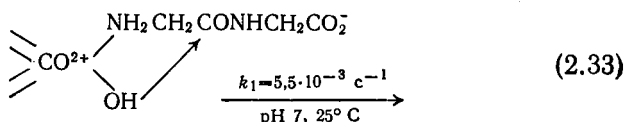
Изложенные соображения применимы и к механизму действия карбоангидразы. Этот фермент, катализирующий гидратацию CO_2 , содержит в активном центре ион цинка, связанный координационной связью с имидазольными кольцами трех гистидиновых остатков. Согласно классическим представлениям о механизме этой реакции, четвертый лиганд — это молекула воды с $pK_a = 7$ [32]. Полагают, что реакционноспособной единицей является связанный с цинком гидроксил; это согласуется с результатами химических исследований, согласно которым связанные с цинком гидроксильные группы обладают высокой реакционной способностью. Молекула воды в составе комплекса, представленного на схеме (2.31), имеет $pK_a = 8,7$ и катализирует гидратацию двуокиси углерода и ацетальдегида [33].



Возможно, механизм действия карбоангидразы включает следующую реакцию:



Наличие связанной с металлом гидроксильной группы в сочетании с внутримолекулярной реакцией привело к одному из самых больших увеличений скорости реакции, характерному для ненапряженных систем. Комплекс глицилглицина с (Этилендиамин)₂Co³⁺ и *цис*-гидроксидом [уравнение (2.33)] гидролизует при рН = 7 почти в 10¹⁰ раз быстрее, чем свободный глицилглицин [34].

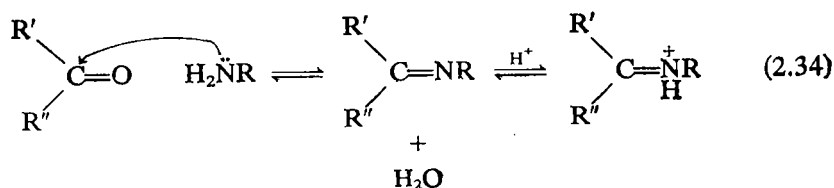


Известны более сложные примеры катализа ионами металлов. Кобальт в реакциях с участием витамина В₁₂ образует ковалентные связи с углеродными атомами субстратов [35, 36]. Металлы могут также выступать в качестве проводников электронов в окислительно-восстановительных реакциях. Например, в цитохроме *c* геминное железо обратимо окисляется и восстанавливается.

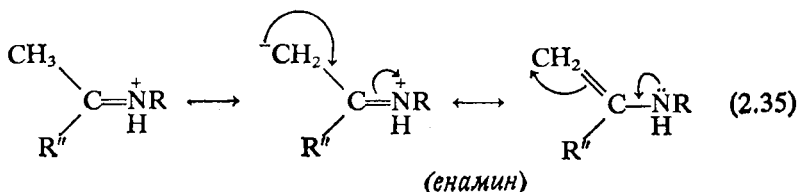
В. Ковалентный катализ

1. Электрофильный катализ с образованием шиффова основания [37]

Примером того, как кратковременная химическая модификация может активировать субстрат, является образование шиффова основания при конденсации амина с карбонильным соединением.



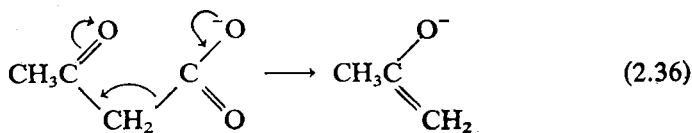
При нейтральных рН шиффово основание может протонироваться. Оно действует как электронный сток, стабилизируя образование отрицательного заряда на одном из α -углеродных атомов:



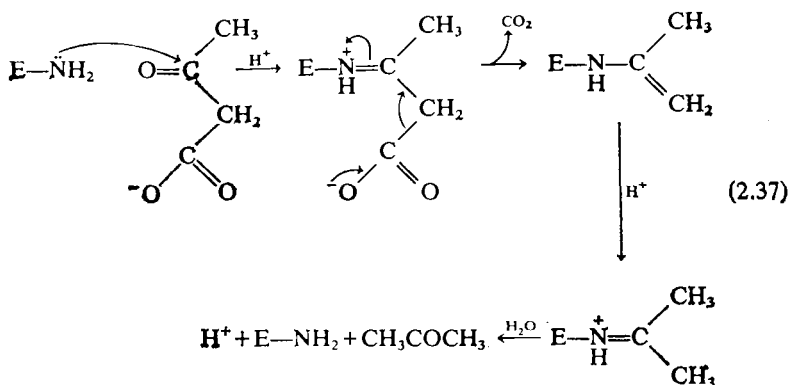
После таутомеризации, в результате которой образуется енамин, атом углерода метиленовой группы активизируется как нуклеофил. Еще одним следствием образования шиффова основания является облегчение атаки нуклеофилом карбонильного углерода вследствие сильного оттягивания электронов протонированным атомом азота.

а. Ацетоацетатдекарбоксилаза [38, 39]

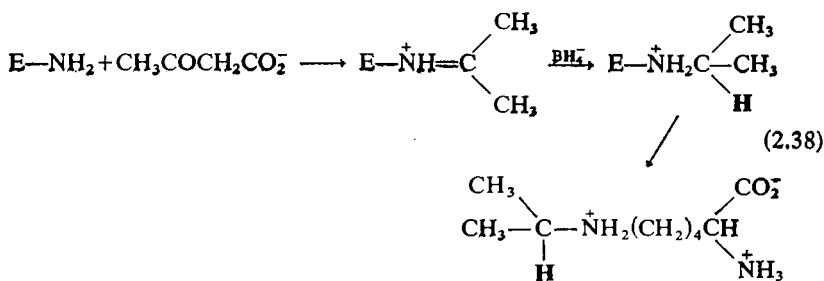
Этот фермент катализирует декарбоксилирование ацетоацетата до ацетона и двуокиси углерода. В ходе неферментативной реакции происходит отщепление сильно основного енолят-иона при нейтральном рН [уравнение (2.36)],



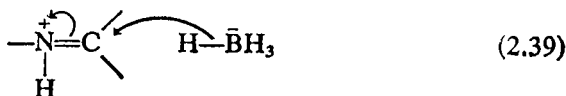
а в ферментативной реакции эта стадия отсутствует, но зато образуется шиффово основание с остатком лизина. Затем протонированный имин легко отщепляется. Этот процесс можно промоделировать в растворе, используя в качестве катализатора анилин.



В пользу образования такого промежуточного соединения свидетельствует тот факт, что при добавлении к комплексу с субстратом боргидрида натрия происходит необратимое ингибирование фермента. Известно, что боргидрид восстанавливает шиффово основание, а в гидролизате ингибированного белка обнаружен изопропиллизин.



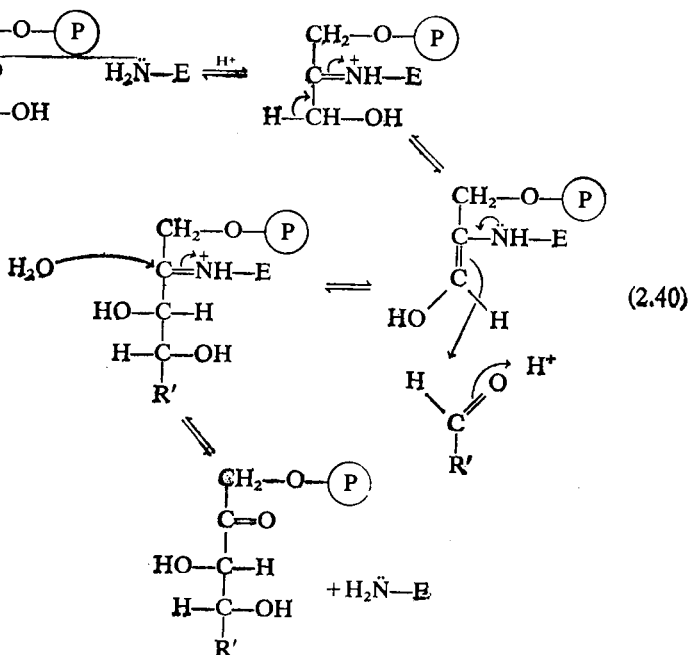
Активация углеродного атома шиффова основания происходит в результате переноса гидрид-иона от боргидрида.



6. Альдолаза [40, 41]

Альдольная конденсация и обратная реакция расщепления, катализируемые альдолазой, протекают с образованием шиффова основания. Механизм реакции расщепления аналогичен механизму действия ацетоацетатдекарбоксилазы — в обоих случаях

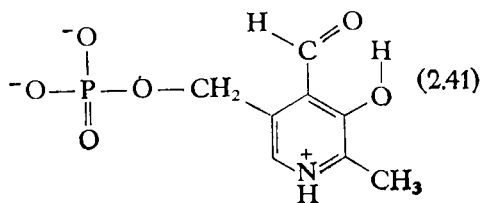
отщепляется протонированный имин. В ходе реакции конденсации выявляется другая функция шиффова основания — активация углеродного атома через образование енамина.



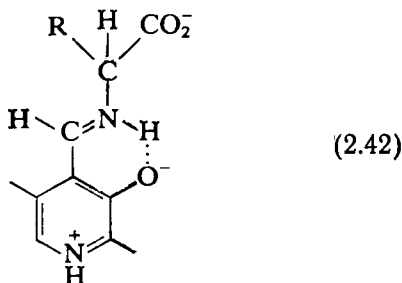
Промежуточное соединение можно обнаружить так, как указано выше.

2. Пиридоксальфосфат: электрофильный катализ [37, 42]

Рассмотренные выше реакции лежат в основе ряда важных метаболических превращений, протекающих с участием кофермента пиридоксальфосфата [схема (2.41)].



Пиридоксальфосфат конденсируется с аминокислотами, образуя шиффово основание [схема (2.42)].

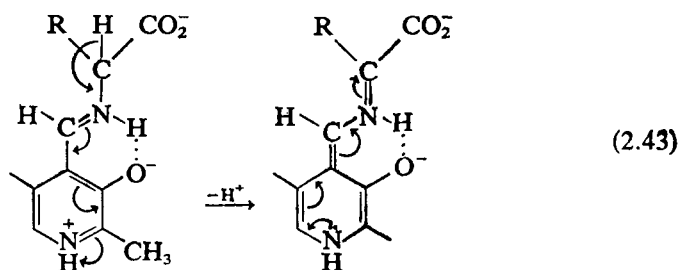


В шиффовом основании пиридиновое кольцо оттягивает на себя электроны, эффективно стабилизируя отрицательный заряд.

Любая из групп, окружающих хиральный атом углерода аминокислоты, может отщепиться, образуя анион, стабилизируемый шиффовым основанием и пиридиновым кольцом.

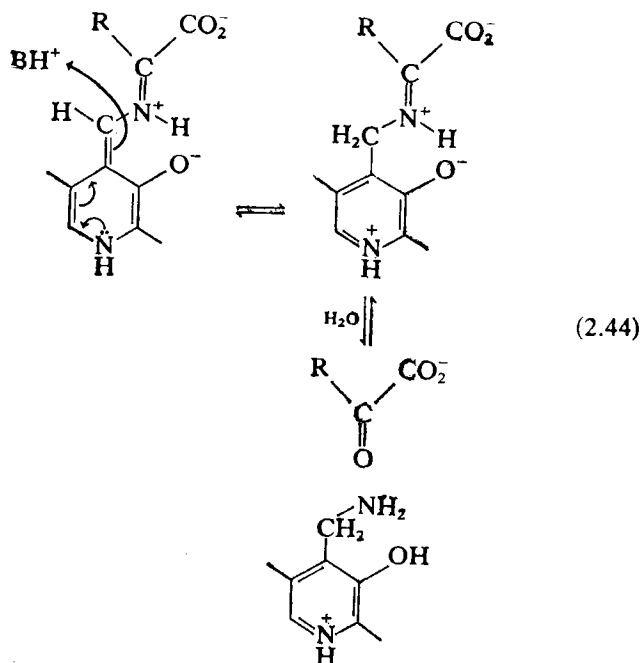
а. Отщепление α -водородного атома

Отщепление α -водородного атома приводит к образованию ключевого промежуточного соединения, которое в дальнейшем может претерпевать различные превращения.

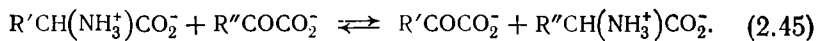


1. *Рацемизация.* Последующее присоединение к аминокислоте протона может привести к рацемизации, если это присоединение происходит нестереоспецифично.

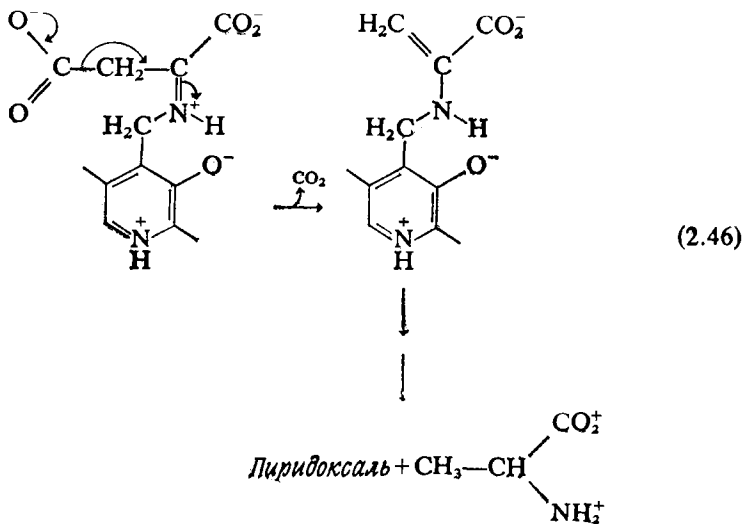
2. *Трансаминирование.* Присоединение протона к карбонильному атому углерода пиридоксаля приводит к образованию соединения, представляющего собой шиффово основание α -кето-кислоты и пиридоксамина. Гидролиз шиффова основания дает α -кето-кислоту и пиридоксамин, который может реагировать с другой α -кето-кислотой в обратной последовательности.



Суммарная реакция имеет вид

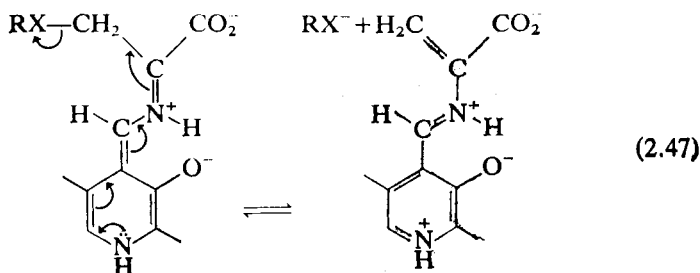


3. β -Декарбоксилирование. Если аминокислота — это ас-



партат, то второе соединение на схеме (2.44) представляет собой аналог шиффа основания в реакции, катализируемой ацетоацетатдекарбоксилазой, и может легко декарбоксилироваться. (См. уравнение (2.46)).

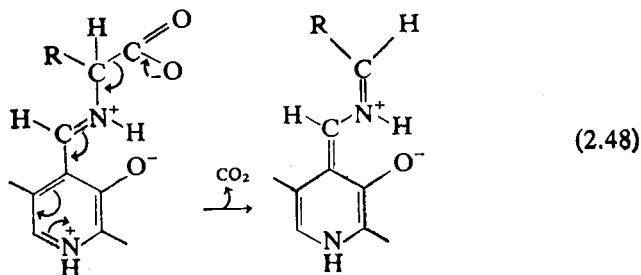
4. *Взаимопревращения боковых цепей.* Если RX — легко уходящая группа (тиоловая, гидроксильная или индольная), ее отщепление может происходить по следующей схеме:



Таким образом протекают взаимодействия или расщепление серина, треонина, цистеина, триптофана, цистатионина, а также серинфосфата и треонинфосфата.

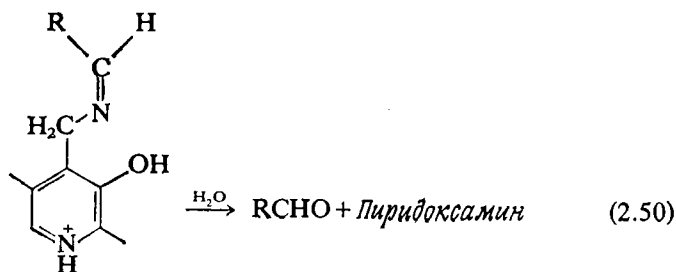
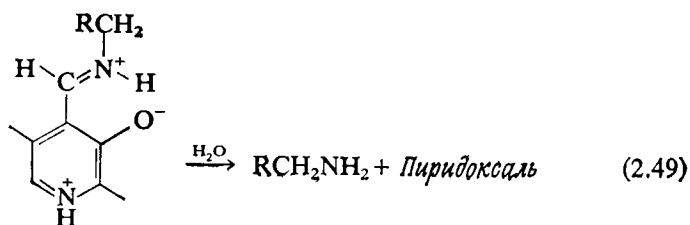
б. α -Декарбоксилирование

Декарбоксилирование облегчается при наличии оттягивающей электроны группы:



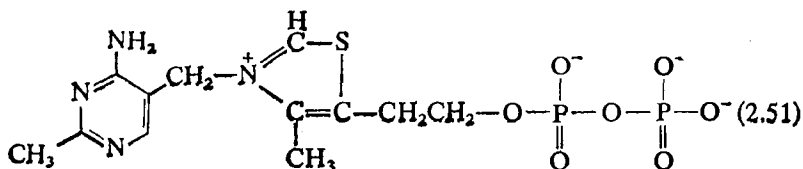
Декарбоксилированный продукт присоединяет протон либо к углеродному атому карбонильной группы аминокислоты с последующим гидролизом и образованием амина и пиридоксаля, либо к углеродному атому карбонильной группы пиридоксаля

с последующим гидролизом и образованием альдегида и пиридоксамина:

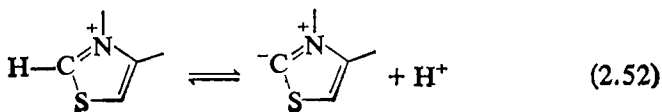


3. Тиаминпирофосфат: электрофильный катализ

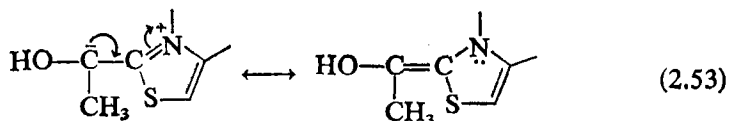
Тиаминпирофосфат [схема (2.51)] — еще один кофермент, который образует с субстратом ковалентную связь и стабилизирует отрицательный заряд.



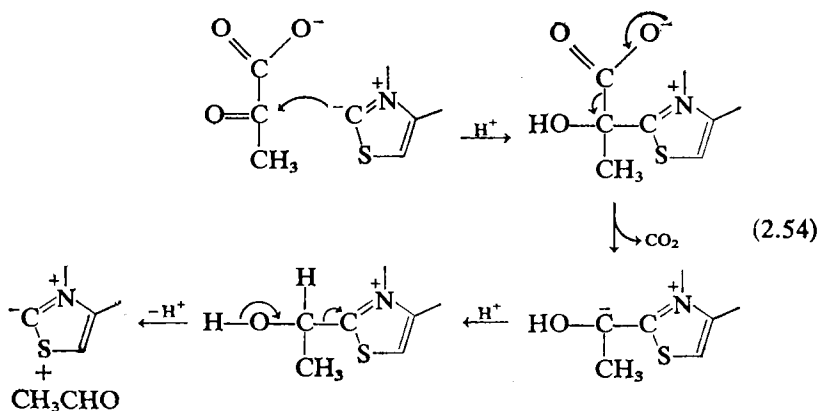
Положительный заряд на атоме азота облегчает ионизацию атома С-2 с помощью электростатической стабилизации. Этот ионизированный атом углерода является мощным нуклеофилом.



Атом азота может быть стабилизирован и делокализацией отрицательного заряда на продукте взаимодействия тиаминa с многими соединениями, например в оксиэтилтиаминфосфате [уравнение (2.53)] — форме кофермента, довольно распространенной *in vivo*.



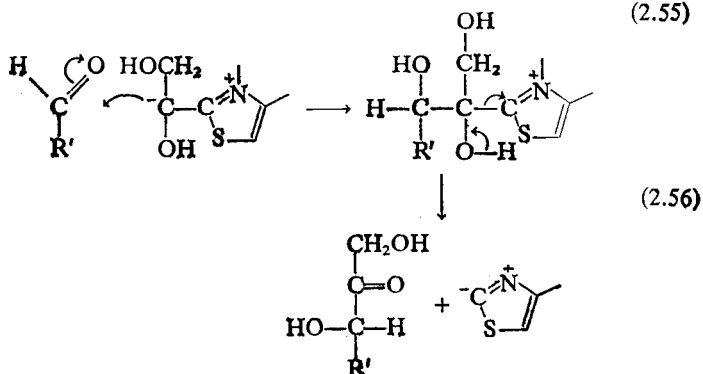
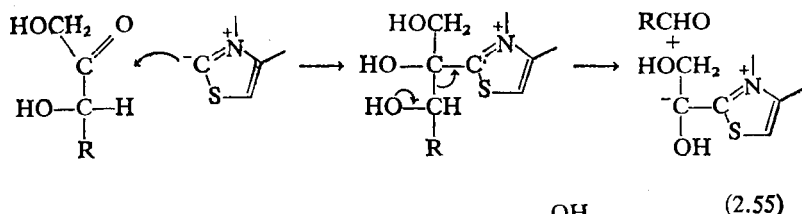
Сочетание этих реакций приводит к декарбоксилированию пирувата по следующей схеме:



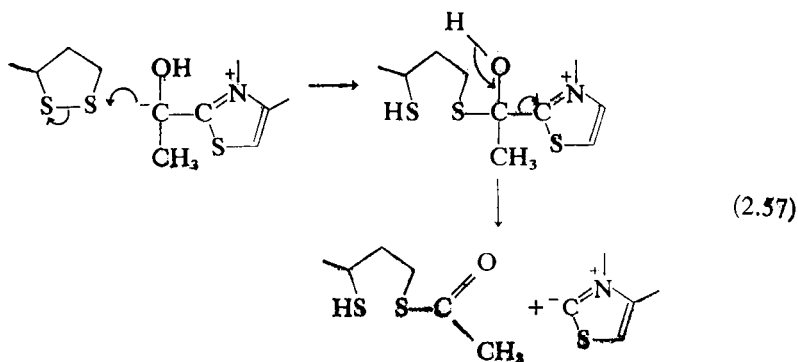
Аналогичным образом расщепляются и другие углерод-углеродные связи, образуемые карбонильной группой.

Оксиэтилтиаминпирофосфаты — мощные нуклеофилы и могут присоединяться к карбонильным соединениям с образованием углерод-углеродных связей. Характерным примером реакций, в ходе которых образуются и разрываются углерод-углеродные связи, являются реакции, катализируемые транскетолазой. Этот фермент содержит прочно связанный тиаминпирофосфат и обратимо переносит диоксиэтильную группу от D-ксилоулозо-5-фосфата на D-рибозо-5-фосфат с образованием

D-седогептулозо-7-фосфата и D-глицеральдегид-3-фосфата [уравнения (2.55) и (2.56)]:



Оксиэтилтиаминпирофосфат является нуклеофилом и по отношению к тиольной группе восстановленной липоевой кислоты. Образующийся полутиоацеталь разлагается с образованием тиоэфира.



4. Нуклеофильный катализ

К нуклеофильным группам ферментов, которые чаще всего участвуют в катализе, относятся гидроксильная группа серина (сериновые протеазы, холинэстеразы, эстеразы, липазы, кислая и щелочная фосфатазы) и тиоловая группа цистеина (глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа, тиоловые протеазы: папаин, фицин и бромелаин и т. д.). Имидазол гистидина обычно является кислотно-основным катализатором, который увеличивает нуклеофильность гидроксильных и тиоловых групп, но при переносе фосфата в реакциях фосфорилирования он иногда выступает в роли нуклеофила.

Таблица 2.4

Нуклеофильные группы ферментов

Нуклеофил	Фермент	Промежуточное соединение
—OH (серин)	Сериновые протеазы Кислотные и щелочные фосфатазы, фосфоглюкомутаза	Ацилфермент Фосфорилфермент
OH ⁻ (связанная с атомом цинка) —SH (цистеин)	Карбоангидраза Тиоловые протеазы, глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа	— Ацилфермент
—CO ₂ ⁻ (аспарат)	Пепсин АТРаза (K ⁺ /Na ⁺ , Ca ²⁺)	Ацилфермент Фосфорилфермент
—NH ₂ (лизин)	Ацетоацетатдекарбоксилаза, альдолаза, пиридоксалиевые ферменты	Шиффово основание
Имидазол (гистидин)	Фосфоглицеромутаза, сукцинил-СоА—синтетаза, нуклеозиддифосфокиназа, гистонфосфокиназа	Фосфорилфермент
—OH (тирозин)	Глутаматсинтетаза	Аденилфермент

Гидролиз пептидов этими протеазами — пример классического нуклеофильного катализа. Относительно инертный пептид превращается в значительно более реакционноспособный эфир или тиоэфир (ацилфермент), который затем быстро гидролизуется. Использование гидроксила серина вместо осуществления прямой атаки субстрата молекулой воды дает ряд преимуществ. Спирты часто являются лучшими нуклеофилами, чем вода, как в случае общего основного катализа, так и при прямой нуклеофильной атаке; реакция с остатком серина является внутримолекулярной и, следовательно, энтропийно более выгодной; реагирующие гидроксильные группы серина фиксированы более жестко, чем в случае связанной молекулы воды.

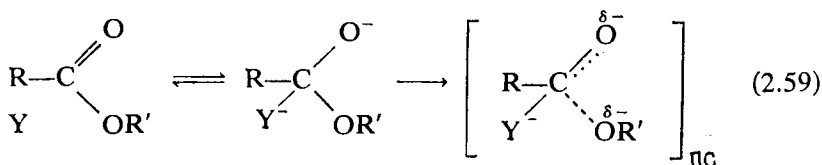
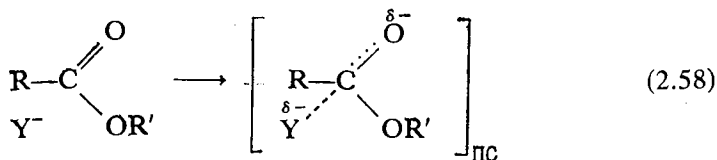
Г. Зависимость реакционной способности реагентов от их структуры

Один из наиболее плодотворных подходов при исследовании механизмов органических реакций состоит в сопоставлении изменения реакционной способности реагентов с изменением их структуры. Эти исследования дали ценную информацию об электронной структуре переходных состояний и факторах, определяющих реакционную способность, и позволили установить, чем является конкретная группа — хорошим нуклеофилом или хорошей уходящей группой. При исследовании зависимости реакционной способности от структуры выявляют влияние изменений в структуре субстрата на его взаимодействие с ферментом, а не на изменения электронной структуры переходного состояния. Из подобных исследований обычно трудно получить информацию о требованиях, предъявляемых в ферментативной реакции к электронной структуре субстрата, поскольку в субстрат могут быть внесены лишь минимальные изменения, а индуктивные эффекты, обусловленные введением заместителей, часто замаскированы эффектами, обусловленными связыванием. Однако полученные данные оказались неоценимыми для выяснения механизмов ферментативных реакций.

1. Нуклеофильная атака карбонильной группы

Исследования зависимости реакционной способности от структуры позволили получить представление о распределении заряда в переходном состоянии с помощью анализа влияния оттягивающих и отдающих электроны заместителей на скорость реакции. Например, было установлено, что скорость нуклеофильной атаки эфиров возрастает а) при оттягивании электронов ацильным фрагментом эфира ($\text{CHCl}_2\text{CO}_2\text{Et}$ значительно более реакционноспособен, чем $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$); б) при оттягивании электронов уходящей группой (*n*-нитрофенилацетат более реакционноспособен, чем фенилацетат); в) при увеличении основности нуклеофила, т. е. при передаче электронов на нуклеофил (гидроксил-ион более реакционноспособен, чем ацетат-ион). Используя положение теории переходного состояния, заключающееся в том, что скорость реакции зависит от разности энергий переходного и основного состояний, мы можем сделать вывод, что в данной реакции отрицательный заряд субстрата увеличивается, поскольку скорость реакции возрастает при оттягивании электронов, а заряд нуклеофила уменьшается, поскольку скорость реакции увеличивается при отдаче электронов (т. е. при отталкивании электрона). При этом реакция может протекать

в соответствии либо со схемой (2.58), где лимитирующей стадией является образование тетраэдрического промежуточного соединения, либо со схемой (2.59), где лимитирующей стадией является разрыв связи.



а. Линейные зависимости свободной энергии, уравнения Брёнстеда и Гаммета

Количественно оценить чувствительность реакции к изменению электронной плотности атакующего нуклеофила можно путем измерения констант скорости второго порядка для реакций, где определенный эфир атакуется рядом нуклеофилов. Аналогично тому, как это делалось для общего основного катализа, строят график зависимости логарифма константы скорости от pK_a нуклеофила. Обычно в тех случаях, когда используются лишь нуклеофилы сходной химической природы и когда диапазон значений pK_a невелик, получается линейная зависимость. Наклон прямой обозначается буквой β , как и в случае общего основного катализа.

Эти линейные зависимости между логарифмом константы скорости и pK_a известны под названием *линейных зависимостей свободной энергии*, поскольку логарифм константы скорости пропорционален энергии активации Гиббса для данной реакции, а логарифм константы равновесия — изменению энергии Гиббса реакции (раньше энергия Гиббса называлась свободной энергией). Наличие корреляции между нуклеофильностью нуклеофила и его основностью указывает на то, что энергия активации Гиббса для образования связи с углеродом карбонильной группы пропорциональна энергии Гиббса для переноса протона к нуклеофилу.

Аналогичная корреляция (соотношение Брёнстеда) существует между константой скорости и pK_a уходящей группы в том

случае, когда определенный нуклеофил взаимодействует с рядом эфиров, имеющих разные уходящие группы. Другой способ графического представления данных, который используется для ароматических соединений, основан на применении уравнения Гаммета и констант Гаммета для заместителей. Эти константы, характеризующие способность заместителей в бензольном кольце отдавать или принимать электроны, связаны с pK_a замещенных бензойных кислот следующей эмпирической зависимостью:

$$(pK_a)_X = (pK_a)_0 - \sigma_X, \quad (2.60)$$

где X — заместитель в бензойной кислоте в *мета*- или *пара*-положении, $(pK_a)_X$ — это pK_a замещенной кислоты,

Таблица 2.5

Константы, характеризующие различные заместители ^{а)}

Заместитель	Алифатическое соединение ^{б)}		Ароматическое соединение ^{в)}
	σ_I	σ_m	σ_p
—NH ₂	0,10	—0,16	—0,66 (—0,17) ^{г)}
—NH ₃ ⁺	0,60	0,63	
—NHAc	0,28	0,21	0,00
—OH	0,25	0,121	—0,37 (—0,11) ^{г)}
—OAc	0,39	0,39	0,31
—N(Me) ₃ ⁺	0,73	0,88	0,82
—CO ₂ [—]	—0,17	—0,10	0,00
—CO ₂ H	0,34	0,37	0,45
—COCH ₃	0,29	0,38	0,50 (0,87) ^{д)}
—F	0,52	0,337	0,062
—Cl	0,47	0,373	0,227
—Br	0,45	0,391	0,232
—I	0,39	0,352	0,18
—NO ₂	0,63	0,710	0,778 (1,24) ^{д)}
—CN	0,58	0,56	0,66 (0,90) ^{д)}
—CH ₃	—0,05	—0,069	—0,17
—OCH ₃	0,25	0,115	—0,268 (—0,11) ^{г)}

^{а)} Из Charton M., J. org. Chem., 29, 1222 (1964); Ritchie C. O., Sager W. F., Progress in Physical Organic Chemistry, 2, 323 (1964).

^{б)} Рассчитано из уравнения $(\sigma_I)_X = [(pK_a)CH_3CO_2H - (pK_a)_X - CH_2CO_2H] / 3,95$.

^{в)} Рассчитано из уравнения $\sigma = (pK_a)PhCO_2H - (pK_a)_X - PhCO_2H$.

^{г)} Для соединений, отличных от бензойной кислоты и карбонильных соединений.

^{д)} Для фенолов, анилинов и тиофенолов.

$(pK_a)_0$ — pK_a незамещенной кислоты, σ_x — константа, характеризующая заместитель X (разная для заместителей в *пара*- и *мета*-положениях). Обнаружено, что уравнение Гаммета выполняется и для реакций с участием производных бензойной кислоты (при определении скорости гидролиза эфиров бензойной кислоты, а также при изучении равновесий других реакций, в которых участвует соединение с бензольным кольцом, например при ионизации фенолов), но, оценивая чувствительность реакции к изменению σ , используют коэффициент пропорциональности ρ , постоянный для данной реакции. Например, при ионизации фенолов

$$(pK_a)_X = (pK_a)_0 - \rho\sigma_X \quad (2.61)$$

где $\rho = 2,1$. Для щелочного гидролиза фенилацетатов

$$\lg k_X = \lg k_0 + \rho\sigma_X \quad (2.62)$$

где $\rho = 0,8$.

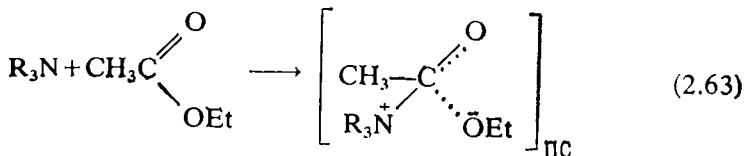
Соотношения Брэнстеда и Гаммета эквивалентны. Например, согласно уравнению Гаммета, для щелочного гидролиза фенилацетатов логарифм константы скорости, как и pK_a исходных фенолов, пропорционален σ . Следовательно, логарифмы констант скорости гидролиза пропорциональны pK_a , что непосредственно следует из графика Брэнстеда для зависимости логарифма константы скорости от pK_a .

Соотношения Брэнстеда и Гаммета выполняются также в случае атаки определенным нуклеофилом эфира с конкретной уходящей группой, в которой варьируется ацильный фрагмент.

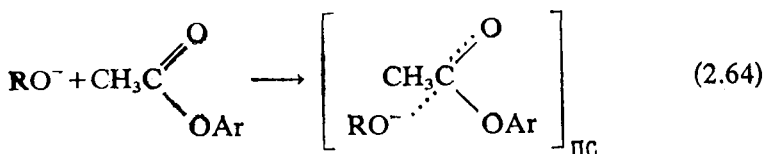
б. Смысл коэффициента β в уравнении Брэнстеда

Важным параметром, который можно определить из графиков Брэнстеда, является коэффициент β . Знак и величина этого коэффициента указывает на знак и величину заряда переходного состояния. Рассмотрим, например, атаку эфиров нуклеофилами. Для констант равновесия при переносе ацильных групп между оксианионами, а также третичными аминами β равно 1,6—1,7. Эта величина больше 1,0, поскольку ацетильная группа сильнее оттягивает электроны, чем протон (для которого $\beta = 1,0$ по определению), и более чувствительна к изменению pK_a спирта или амина. Установлено, что для атаки третичными аминами эфиров, образованных сильно основными спиртами, значение β при замене нуклеофила составляет +1,5, а при замене спирта —1,5 [43]. Это показывает, что переходное состояние реакции по своей структуре очень близко к продуктам, т. е.

характеризуется тем, что ацил почти полностью перенесен от спирта на амин [схема (2.63)],



В другом крайнем случае, для реакции основных нуклеофилов с эфирами, содержащими активированные уходящие группы, коэффициент β равен $+ (0,1-0,2)$ при замене нуклеофила и $- (0,1-0,2)$ при изменении pK_a уходящей группы. Это означает, что в переходном состоянии почти не происходит образования новых и разрыва старых связей и что оно близко по своей структуре к исходным соединениям:



Коэффициент β является мерой величины заряда, образующегося в переходном состоянии, а не мерой степени образования связи. Однако в реакциях (2.63) и (2.64), а также в других ситуациях, характеризующихся отсутствием кислотно-основного катализа, образование связи и заряда взаимосвязано, поэтому β служит также мерой степени образования связи. При наличии же кислотно-основного катализа, когда происходит частичная нейтрализация зарядов, образующихся в переходном состоянии, между β и степенью образования связи никакой зависимости нет [44].

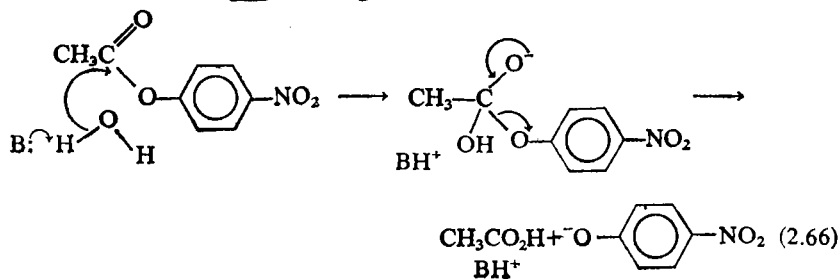
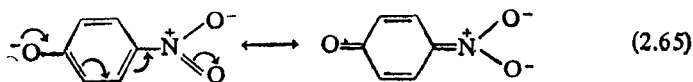
2. Факторы, определяющие нуклеофильность и легкость отщепления уходящей группы

Эффективность общего кислотно-основного катализа кислород- и азот-содержащими основаниями зависит только от их pK_a и не зависит от химической природы этих соединений (за исключением случая повышенной активности оксимов при общем кислотном катализе), а на нуклеофильную реакционную способность заметно влияет природа реагентов. Эти реакции можно разделить на два больших класса в зависимости от того, *слабые* или *сильные* электрофильные центры при этом атакуются [45].

а. Реакции нуклеофилов с карбонильной, фосфорильной, сульфгидрильной и другими сильными электрофильными группами

Атака нуклеофилом амидного, эфирного или карбонильного углерода сопровождается образованием «реально существующего» промежуточного соединения, и валентность углеродного атома не превышает при этом обычного значения, т. е. 4. Аналогичным образом атакуется эфир фосфорной кислоты, при этом образуется промежуточное соединение с пятивалентным атомом фосфора. Переходное состояние для этой реакции включает образование обычной ковалентной связи. Такая ситуация характерна для сильных электрофильных центров. Основным фактором, определяющим нуклеофильность в этих реакциях, является основность нуклеофила — чем она выше, тем сильнее нуклеофильность. Однако реакционные способности разных классов нуклеофилов различаются: амины и тиолят-анионы, как правило, более сильные нуклеофилы, чем окси-анионы [46, 47]. Кроме того, ряд нуклеофилов, у которых два электроотрицательных атома расположены рядом (например, $\text{NH}_2\text{CONHNH}_2$, HOO^- и MeOO^-), обладают большей реакционной способностью, чем можно было бы ожидать, исходя из значений их pK_a . Это явление известно под названием α -эффекта. Относительные реакционные способности разных классов нуклеофилов часто коррелируют с константами равновесия реакций присоединения этих веществ к альдегидам и кетонам [48].

Легкость отщепления группы зависит как от ее pK_a , так и от состояния протонирования. По существу «хорошая уходящая группа» — это группа, устойчивая в растворе. Например, *n*-нитрофенолят-ион является хорошей уходящей группой, поскольку представляет собой слабое основание (pK_a *n*-нитрофенола равен 7,0). В основе его стабильности лежит делокализация отрицательного заряда на ароматическом кольце и нитрогруппе [схема



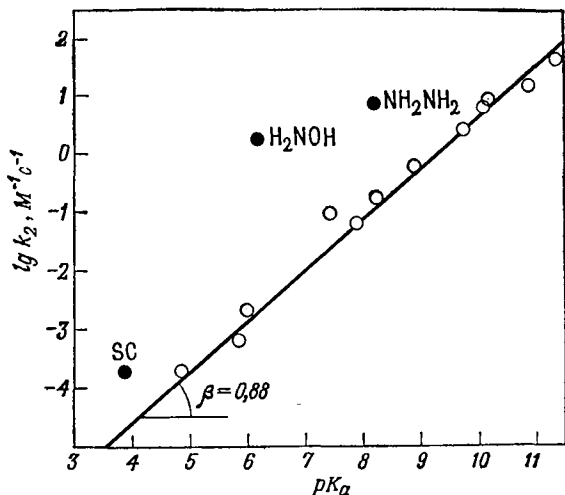


Рис. 2.6. График зависимости Брэнстеда для нуклеофильной атаки *p*-нитрофенилацетата первичными и вторичными аминами. [Jencks W. P., Gilchrist M., J. Amer. chem. Soc., 90, 2622, 1968.] Обратите внимание, что такие нуклеофилы, как семикарбазид (SC), гидроксилламин и гидразин более реакционноспособны (« α -эффект»), чем можно было бы ожидать, исходя из значений их pK_a .

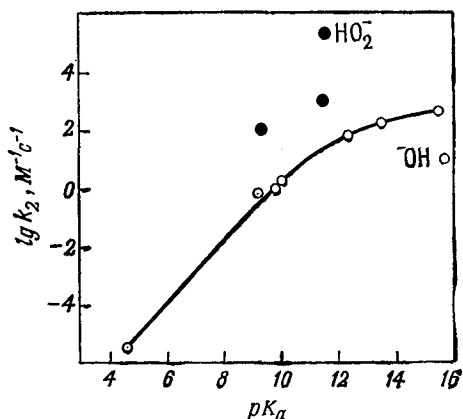
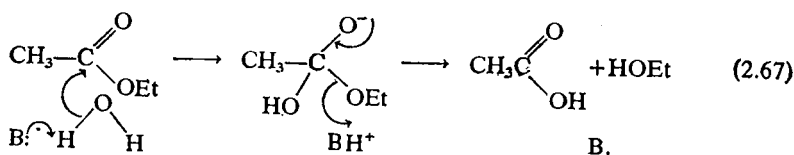


Рис. 2.7. График зависимости Брэнстеда для атаки *p*-нитрофенилацетата оксианионами-нуклеофилами. Как и в предыдущем случае (рис. 2.6), нуклеофилы (●) также обладают необычно высокой реакционной способностью (« α -эффект»). Обратите внимание на нарушение линейности на графике с увеличением pK_a для нуклеофилов с более высокой реакционной способностью. Вообще говоря, для этих реакций соотношения Брэнстеда выполняются только в узком диапазоне pK_a . Часто отклонение от линейности незаметно, поскольку число используемых оснований весьма невелико.

(2.65)]. Этот ион легко высвобождается непосредственно из тетраэдрического промежуточного соединения [схема (2.66)].

Для данного класса уходящих групп уменьшение основности приводит к облегчению отщепления уходящей группы. Ацетат (pK_a уксусной кислоты равен 4,76) — более хорошая уходящая группа, чем *n*-нитрофенол и фосфат (pK_a около 7), которые в свою очередь являются более хорошими уходящими группами, чем OH^- ($pK_a = 15,8$).

Отщепление алколюлят-ионов затруднено, поскольку это сильные основания (pK_a низших спиртов равен примерно 16). Отщепление спиртов ускоряется при общем кислотном катализе [схема (2.67)].

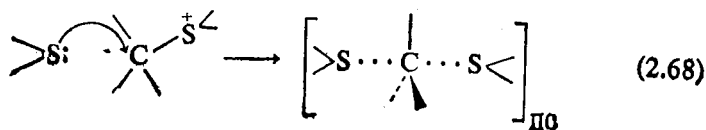


Нитрофениловые эфиры часто используются в качестве уходящих групп в синтетических субстратах по двум причинам: а) нитрофенолят-ион имеет характерный максимум поглощения при 400 нм и, следовательно, легко идентифицируется спектрофотометрически; б) этот ион является очень хорошей уходящей группой, в результате чего образуется реакционноспособный субстрат. Оба эти фактора обусловлены делокализацией зарядов [схема (2.65)].

Чтобы амин отщепился от молекулы, он должен присоединить протон, поскольку амид-ионы (RNH^-) слишком нестабильны, чтобы непосредственно высвободиться в раствор. (Исключение составляют сильно активированные производные, например, 2,4-динитроанилин.)

б. Атака нуклеофилом у насыщенного атома углерода

Атака нуклеофилом у насыщенного атома углерода (например, бимолекулярная реакция, в ходе которой тиол атакует углерод метильной группы в S-аденозилметионине) сопровождается образованием переходного состояния, в котором к обычно четырехвалентному углероду присоединено пять групп (2.68).



Такое число связей не является нормальным для углерода и свойственно лишь переходному состоянию. Это типичный пример «слабого» центра. Тяжелые, способные поляризоваться атомы, например атомы серы и иода (т. е. «слабые» лиганды), более реакционноспособны, чем слабо поляризуемые атомы — кислород или азот (т. е. «сильные» лиганды). Способность к поляризации является главным фактором, определяющим нуклеофильность по отношению к алкильным группам и другим слабым центрам. В пределах любого данного класса соединений увеличение основности увеличивает нуклеофильность, однако при переходе от класса к классу более важным фактором становится способность к поляризации (табл. 2.6).

Таблица 2.6

Относительная реакционная способность
различных нуклеофилов^{a)}

Нуклеофил	pK_a	Реакционная способность по отношению к реакционной способности CH_3Br
H_2O	-1,74	1,00
NO_3^-	-1,3	11
F^-	3,17	100
$CH_3CO_2^-$	4,76	525
Cl^-	-7,0	$1,1 \cdot 10^3$
C_6H_5N	5,17	$4,0 \cdot 10^3$
HPO_4^{2-}	7,21	$6,3 \cdot 10^3$
Br^-	-9,0	$7,8 \cdot 10^3$
OH^-	15,74	$1,6 \cdot 10^4$
$C_6H_5NH_2$	4,62	$3,1 \cdot 10^4$
I^-	-10,0	$1,1 \cdot 10^5$
CN^-	9,40	$1,3 \cdot 10^5$
SH^-	7,00	$1,3 \cdot 10^5$

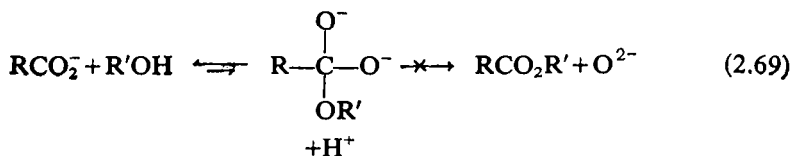
^{a)} Swain C. G., Scott C. B., J. Am. chem. Soc., **75**, 141 (1953).

Как и в случае реакций с карбонильной группой, слабоосновные уходящие группы замещаются легче, чем группы с высокой основностью.

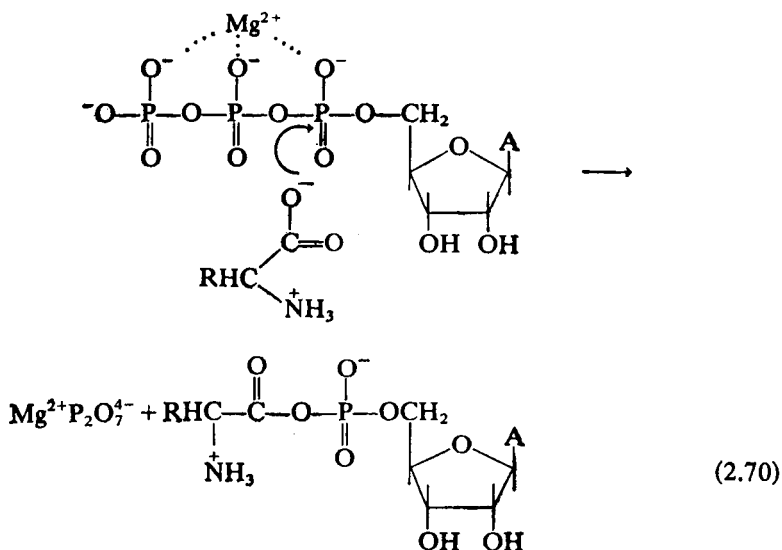
в. Активация уходящей группы

Как ясно из предыдущего раздела, замещение сильноосновных групп в карбонильных соединениях и групп, связанных с насыщенным атомом углерода, затруднено. Крайним примером

такого рода является этерификация спирта карбоксилат-ионом. Для ее осуществления потребовалось бы образование тетраэдрического промежуточного соединения с двумя отрицательно заряженными атомами кислорода и последующим высвобождением O^{2-} .

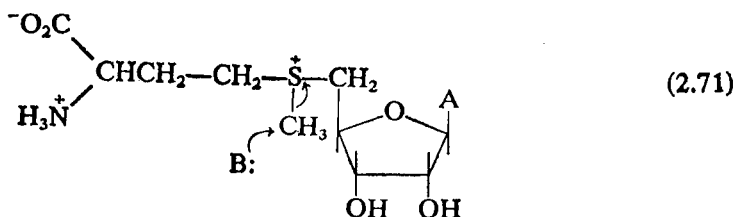


При катализируемой аминоксил-тРНК-синтетазой этерификации тРНК аминокислотами аминокислота активируется путем образования связанного с ферментом смешанного ангидрида с АМР [схема (2.70)] точно таким же образом, как это делает химик-органик, когда он активирует карбоновую кислоту с помощью образования ацилхлорида или смешанного ангидрида.



[Заметьте, что в схеме (2.70) субстратом является комплекс АТР с магнием, причем ион Mg^{2+} является электрофильным катализатором]. Карбонильная группа аминокислоты активируется согласно схеме (2.70), связываясь с хорошей уходящей группой — фосфатным остатком АМР, имеющим pK_a около 6 или 7. Он легко атакуется одной из гидроксильных групп рибозного кольца концевго аденозина тРНК.

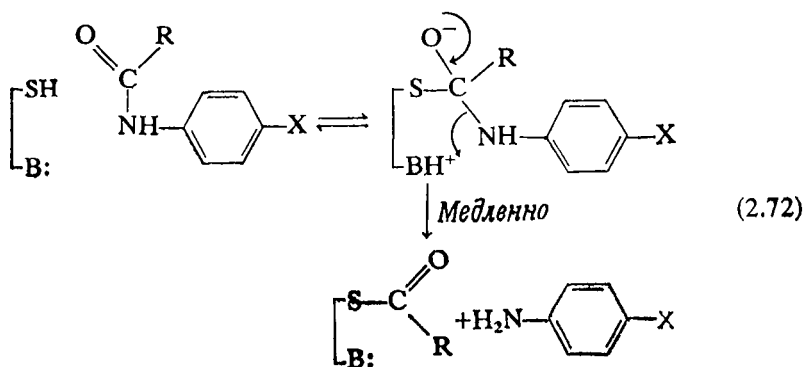
Еще одним примером активации уходящей группы является использование S-аденозилметионина, а не метионина в реакциях метилирования. От метионина должен отщепляться относительно основной тиолят-анион, а из активированного производного — вытесниться неосновная нейтральная сера.



3. Применение линейных зависимостей свободной энергии к ферментативным реакциям

Хотя коэффициенты β получены уже для многих ферментативных реакций, остается ряд нерешенных вопросов принципиального характера. Прежде всего неясно, какой параметр — k_{cat} или k_{cat}/K_M — лучше определять при исследовании влияния заместителей на реакционную способность. Параметр k_{cat}/K_M неудобен тем, что в него прямо входит энергия связывания, поэтому влияние заместителя на электронную конфигурацию может маскироваться влиянием его на связывание. Параметр же k_{cat} зависит от таких факторов, как накопление промежуточных соединений, непродуктивное связывание, напряжение и индуцированное соответствие (см. гл. 3 и 10). Известен по крайней мере один случай, когда влияние заместителей на непродуктивное связывание было ошибочно приписано индуктивному влиянию на скорость реакции [49]. Во многих отношениях k_{cat}/K_M — более надежный параметр, поскольку все перечисленные выше нежелательные факторы, которые влияют на k_{cat} , в этом случае отсутствуют (гл. 10). Тем не менее для ряда ферментов была успешно исследована зависимость реакционной способности от структуры. Проведенные ранее опыты по ацилированию химотрипсина неспецифическими субстратами [50] и деацилированию неспецифических ацилферментов [51] показали, что данные реакции очень чувствительны к оттягиванию электронов; это означает, что субстрат атакуется основной группой. Исследования гидролиза замещенных анилинов папаином (гл. 12, разд. Б.2) выявили, что ρ — большая отрицательная величина, т. е. значения k_{cat} и k_{cat}/K_M возрастают при увеличении способности заместителя в анилиновом

кольце отдавать электроны [52]. Наличие подобной корреляции указывает на то, что лимитирующей стадией является распад тетраэдрического промежуточного соединения, в котором протонируется анилиновое кольцо [схема (2.72)]. Эти случаи нетрудно интерпретировать, поскольку ρ достаточно велико. Дать объяснение в случае, когда ρ мало, труднее, так как это может быть обусловлено целым рядом факторов. Например, переходное состояние, характеризующееся незначительной перестройкой системы связей, будет практически нечувствительно к оттягиванию электронов, как и переходное состояние, в котором существенная перестройка системы связей компенсируется сильным смещением протона, принимающего участие в кислотно-основном катализе [44].



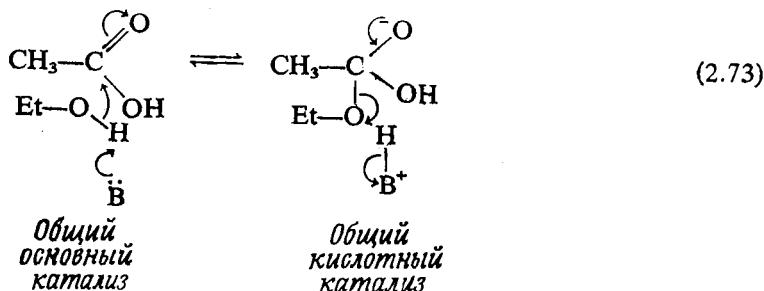
Реакции, в которых участвует дрожжевая алкогольдегидрогеназа, анализировались с помощью более совершенных методов [53]. Чтобы оценить по отдельности влияние заместителей на электронную структуру и вклад, вносимый энергией гидрофобного взаимодействия (гл. 9, разд. А), использовали метод множественной линейной регрессии. Аналогичный анализ был проведен и в случае реакций, катализируемых ацетилхолинэстеразой [54]. Упомянутая в обоих примерах энергия связывания, за счет которой увеличивается k_{cat} , будет подробно рассмотрена в гл. 10.

Иногда считают, что данные о зависимости реакционной способности от структуры более полезны при выяснении принципов катализа на простых модельных системах, чем при изучении самих ферментов. Однако совершенно очевидно, что исследования в области энзимологии также дали весьма ценную информацию и позволили сформулировать ряд интересных положений.

Д. Принцип детального равновесия

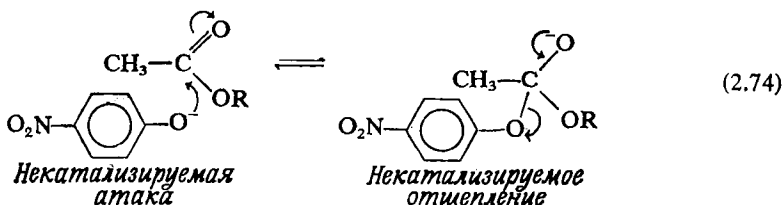
Принцип детального равновесия используется в термодинамике для того, чтобы установить ограничения, налагаемые на вероятность переходов между различными квантовыми или другими состояниями. Этот принцип применим также и к химическим ферментативным реакциям, если рассматривать каждое промежуточное соединение или конформацию как «состояние». Принцип детального равновесия требует, чтобы переходы между двумя любыми состояниями в равновесии происходили с равной частотой в прямом и обратном направлениях [55]. Это означает, что процесс $A \rightarrow B$ точно уравновешен процессом $B \rightarrow A$ и, таким образом, равновесие не может поддерживаться за счет циклического процесса, при котором в одном направлении идет реакция $A \rightarrow B$, а в противоположном $B \rightarrow C \rightarrow A$. В другой формулировке, более удобной для кинетических исследований, этот принцип гласит, что в равновесии прямая реакция протекает по пути, в точности противоположному пути протекания обратной реакции. Другими словами, переходные состояния для прямой и обратной реакций идентичны. Это справедливо также для (нецепных) реакций в стационарном состоянии [56].

Принцип детального равновесия особенно полезен при выяснении природы переходного состояния прямой реакции исходя из данных о переходном состоянии для обратной реакции. Например, поскольку атака уксусной кислоты этанолом при низких рН осуществляется по механизму общего основного катализа, обратная реакция должна протекать с отщеплением этоксида от тетраэдрического промежуточного соединения с помощью общего кислотного катализа [уравнение (2.73)].



Аналогичным образом, так как *n*-нитрофенол ионизируется при $\text{pH} > 7$, атака *n*-нитрофенолом карбонильного соединения не может ускоряться с помощью общего основного катализа: *n*-нитрофенолят-ион, несущий отрицательный заряд, является более сильным нуклеофилом и присутствует в более высокой

концентрации, чем *n*-нитрофенол. Следовательно, этот ион непосредственно атакует карбонильное соединение и, согласно принципу детального равновесия, отщепление *n*-нитрофенолят-иона от тетраэдрического промежуточного соединения является некатализируемым процессом [уравнение (2.74)].



Аналогичные соображения используются и для того, чтобы показать, что атака эфиров тиолами осуществляется без помощи общего основного катализа, т. е. имеет место прямая атака тиолят-иона даже при рН меньшем, чем рК_а тиола на 10 единиц, когда доля молекул, находящихся в ионизированном состоянии, равна всего 10⁻¹⁰ [44].

Прежде чем делать вывод о том, каков механизм реакции, необходимо удостовериться, что он удовлетворяет принципу детального равновесия. Время от времени появляются сообщения, в которых этот принцип при обсуждении механизма нарушается, поскольку на предлагаемых схемах обратная реакция идет по иному пути, чем прямая при тех же условиях проведения эксперимента.

Е. Принцип кинетической эквивалентности

При анализе рН-зависимости скорости химических реакций возникает неопределенность, от которой нельзя избавиться и которая известна как *принцип кинетической эквивалентности*. Когда из уравнения скорости реакции следует, например, что скорость реакции пропорциональна концентрации кислоты НА, это означает, что весь заряд ионов, на которые диссоциирует кислота, присущ и переходному состоянию, т. е. *либо* это недиссоциированная кислота, *либо* два иона, Н⁺ и А⁻. Аналогичным образом, если скорость реакции пропорциональна концентрации А⁻, то переходное состояние содержит *либо* А⁻, *либо* НА и ОН⁻. Формально этот принцип можно проиллюстрировать следующим образом.

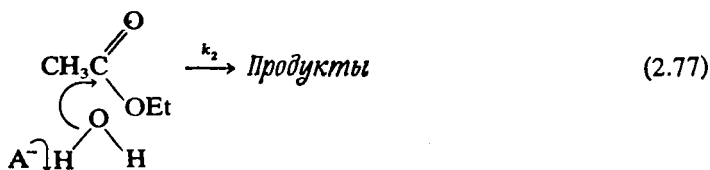
Преобразовав уравнение для ионизации кислоты, получаем

$$[\text{НА}] = [\text{А}^-] [\text{Н}^+] / K_a. \quad (2.75)$$

Концентрация кислоты связана с концентрацией сопряженного ей основания и протона. В связи с этим ответить на вопрос, что представляет собой переходное состояние реакции, зависящей от концентрации HA , — недиссоциированную кислоту или комбинацию протона с сопряженным основанием, — невозможно. Аналогичным образом, поскольку концентрация основной формы связана с концентрацией гидроксил-иона и кислоты с помощью уравнения

$$[\text{A}^-] = [\text{HA}] [\text{OH}^-] K_a / K_w \quad (2.76)$$

(где K_w — ионное произведение воды), отличить реакцию, идущую с образованием A^- , от реакции с образованием HA и OH^- , исходя из данных о концентрационной зависимости скорости реакции, невозможно. В этом состоит принцип кинетической эквивалентности. Например, двум приведенным ниже механизмам обобщенного основного катализа соответствуют одинаковые уравнения скорости реакции:



Для реакции (2.77)

$$v = k_2 [\text{A}^-] [\text{Эфир}]. \quad (2.79)$$

Для реакции (2.78)

$$v = k'_2 [\text{HA}] [\text{OH}^-] [\text{Эфир}] = \quad (2.80)$$

$$= k'_2 [\text{A}^-] [\text{Эфир}] K_w / K_a = \quad (2.81)$$

$$= k''_2 [\text{A}^-] [\text{Эфир}]. \quad (2.82)$$

Уравнения (2.79) и (2.82) эквивалентны, и эти два механизма невозможно различить, анализируя концентрационную или рН-зависимости скорости реакции. Данные механизмы нельзя различить и по знаку коэффициента Брэнстеда β при варьировании pK_a катализатора. Интуитивно это ясно, поскольку обе реакции сопровождаются делокализацией отрицательного заряда в переходном состоянии, но данный вывод можно обосновать и математически. Механизму (2.77) соответствует положитель-

ное значение коэффициента β , поскольку, чем сильнее основание, тем эффективнее будет катализ. Механизму (2.78) также соответствует положительное значение β , так как, хотя общему кислотному компоненту соответствует отрицательное значение β , наличие члена $1/K_a$ в уравнении (2.81) означает, что к $\lg v$ следует прибавить слагаемое $1 \cdot pK_a$, с избытком компенсирующее тот небольшой по значению отрицательный коэффициент β , который соответствует химической стадии.

Кинетически эквивалентные механизмы можно различить в том единственном случае, когда один из них включает «невозможную» стадию, например когда константа скорости реакции второго порядка превышает то предельное значение, которое характерно для реакции, лимитируемой диффузией, либо когда в результате расчета получается отрицательная энергия активации [скажем, в случае гидролиза аспирина; схема (2.78)] [12].

Ж. Кинетические изотопные эффекты [57]

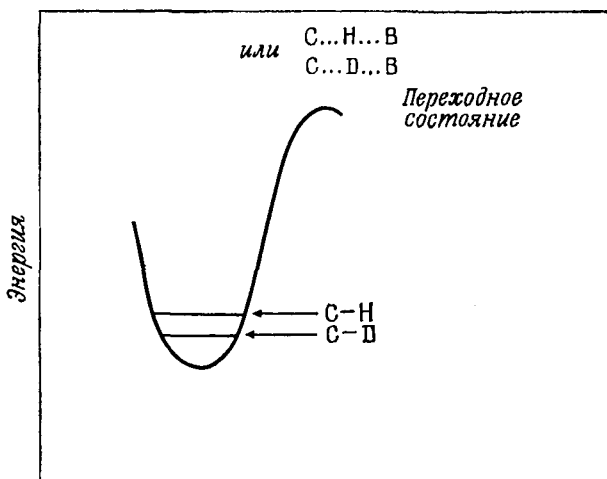
Иногда информацию о глубине протекания и природе стадий образования и разрыва связей в переходном состоянии удается получить, изучая влияние изотопного замещения на скорости реакций. Эти эффекты можно разделить на два класса в зависимости от положения замещенных атомов.

1. Первичные изотопные эффекты

Первичный изотопный эффект наблюдается при расщеплении связи у замещенного атома. Например, часто связь C—O расщепляется в несколько раз медленнее связи C—H. Менее заметное уменьшение скорости (на несколько процентов) обнаруживается иногда при замещении ^{14}N на ^{15}N или ^{16}O на ^{18}O . Степень изменения скорости позволяет судить о степени разрыва связи в переходном состоянии.

Для анализа изотопных эффектов проще всего сопоставить ферментативную реакцию с простой модельной системой, химические свойства которой изучены другими методами. В этом разделе нас интересуют в первую очередь эмпирические результаты модельных экспериментов, однако рассмотрение теоретических основ этих эффектов (даже в упрощенном виде) весьма полезно для понимания их природы. На рис. 2.8 представлена характерная зависимость энергии связи между атомами углерода и водорода от расстояния между этими атомами. Точно такая же зависимость имеет место и для атомов углерода и дейтерия, поскольку форма кривой определяется орбитальными электронами. Согласно квантовой теории, самый низкий энергетический

уровень, т. е. нулевой уровень энергии, располагается выше дна ямы на величину $1/2h\nu$, где ν — частота колебаний. Ее можно найти из инфракрасных спектров соединения. Нулевым энергетическим уровням для связей С—Н и С—D отвечает энергия 17,4 и 12,5 кДж·моль⁻¹ (4,15 и 3 ккал·моль⁻¹) соответственно. Если в переходном состоянии атом водорода или дейтерия находится



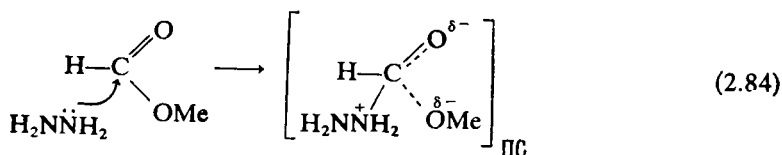
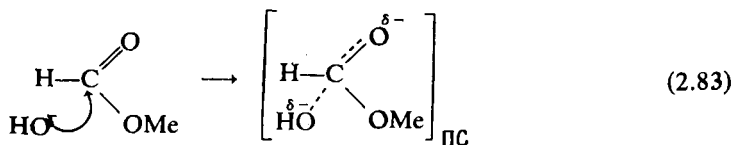
Расстояние между атомами С и Н
или С и D

Рис. 2.8. Изменение энергии при переносе водорода или дейтерия от атома углерода. Энергия переходного состояния в обоих случаях имеет одно и то же значение (этот вопрос обсуждается в тексте), однако в исходных веществах водород имеет более высокую энергию вследствие более высокой нулевой энергии. Следовательно, энергия активации при переносе водорода ниже, чем при переносе дейтерия.

на вершине энергетического профиля, а не в яме, то в переходном состоянии данной реакции отсутствует нулевой уровень энергии. Следовательно, разорвать связь С—Н при 25° в 7 раз легче, чем связь С—D [это соответствует разности энергий нулевых уровней (17,4—12,5) кДж·моль⁻¹ (4,15—3,0) ккал·моль⁻¹]. На самом деле кинетический изотопный эффект может быть больше за счет квантовомеханического туннельного перехода или меньше, поскольку в переходном состоянии имеют место компенсирующие деформационные колебания. Как правило, если полученные значения лежат в интервале от 2 до 15, это означает, что в переходном состоянии происходит разрыв связи С—Н. В гл. 12 (разд. А.1) будет показано, что для переноса гидрид-

иона между субстратом и NAD^+ в реакциях, катализируемых алкогольдегидрогеназой, отношение k_H/k_D равно 3—5.

Кинетические изотопные эффекты с применением кислорода и азота использовались для выяснения природы лимитирующей стадии в реакциях, катализируемых химотрипсином и папаином. Для катализируемого щелочью или общим основанием гидролиза метилформиата $[\text{HC}(=\text{O})^{16,18}\text{OCH}_3]$ в модельной системе отношение $k_{16\text{O}}/k_{18\text{O}} = 1,01$. В случае гидразинолиза, где лимитирующей стадией является распад тетраэдрического промежуточного соединения, величина изотопного эффекта равна 1,062.

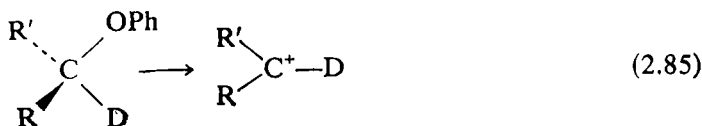


Эти величины можно сравнить с величиной 1,052 для случая отсутствия нулевого энергетического уровня в переходном состоянии [58]. Кинетические изотопные эффекты, обнаруженные при гидролизе эфирных субстратов, катализируемом химотрипсином, близки к эффектам, характерным для гидролиза метилформиата, катализируемого общим основанием [59]. Это означает, что лимитирующей стадией является, по-видимому, образование тетраэдрического промежуточного соединения. Катализируемый папаином гидролиз бензоил-L-аргинамида характеризуется кинетическим изотопным эффектом ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) около 1,024, что близко к верхнему пределу (1,01—1,025) для расщепления связи C—N [60], найденному в модельных опытах. Этот факт означает, что в переходном состоянии связь C—N в значительной мере расщеплена и скорее всего объясняется тем, что лимитирующей стадией является распад тетраэдрического промежуточного соединения (гл. 12, разд. Б.2).

Кинетический изотопный эффект для атомов азота (1,006—1,01), наблюдаемый при катализируемом химотрипсином гидролизе амида ацилтриптофана, авторы работы [61] рассматривали как доказательство того, что в лимитирующую стадию вносит вклад как образование, так и разрушение тетраэдрического промежуточного соединения.

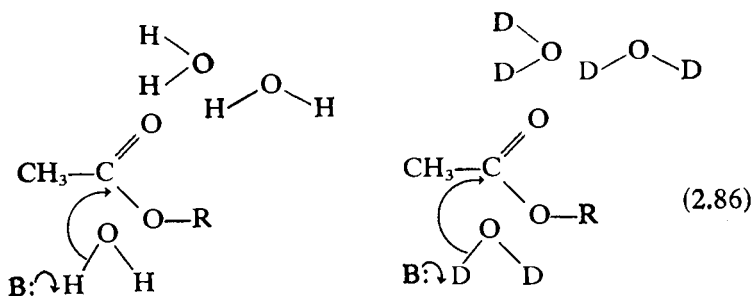
2. Вторичные изотопные эффекты

Вторичные изотопные эффекты наблюдаются при расщеплении связи между атомами, *соседними* с замещенным на другой изотоп атомом. Эти эффекты обусловлены изменением гибридизации атома, а не расщеплением связи. По-видимому, наиболее известным примером вторичного изотопного эффекта в ферментативных реакциях является замещение водорода на дейтерий или тритий при С-1-атоме субстратов лизоцима (гл. 12, разд. Д). В ходе этой реакции образуется карбоний-ион, а гибридизация атома С-1 меняется от sp^3 к sp^2 . Для модельных реакций $k_H/k_D = 1,14$, что близко к величине 1,11 для ферментативной реакции [62, 63]



3. Изотопные эффекты, обусловленные растворителем

Изотопные эффекты, обусловленные растворителем, проявляются при сравнении скоростей реакций в H_2O и D_2O . Обычно эти эффекты связаны с переносом протона между электроотрицательными атомами, *сопровождающим* образование и разрыв связи между более тяжелыми атомами в таких реакциях, как



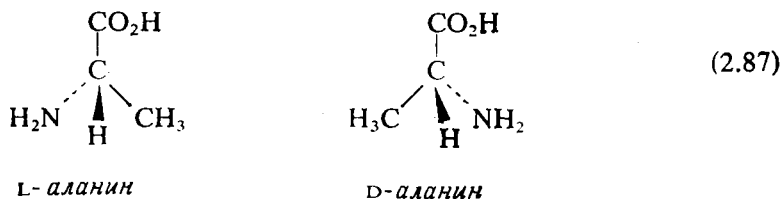
Изотопные эффекты, обусловленные растворителем, по своему происхождению отличаются от изотопных эффектов, сопровождающих расщепление связи С—Н, и их природа до конца не ясна. Перенос протона происходит гораздо быстрее, чем образование и разрыв связи, и в ходе реакции протон, вероятно, находится на дне потенциальной ямы. Исчезновение нулевого энер-

гетического уровня (как это имеет место при переносе протона от атома углерода, в котором сам разрыв связи С—Н протекает медленно) в этом случае не происходит. Определенный вклад в экспериментально наблюдаемый изотопный эффект, обусловленный растворителем, могут вносить сольватация реагентов и вторичные изотопные эффекты, вызванные заменой в реагентах водорода на дейтерий.

Рассматриваемые изотопные эффекты являются весьма ценным инструментом исследования простых химических реакций, хотя величины этих эффектов могут сильно варьировать. Например, установлено, что для реакций типа (2.86), катализируемых по механизму общего основного катализа, отношение k_H/k_D равно ~ 2 , тогда как для нуклеофильной атаки эфира оно близко к 1. Изотопные эффекты в ферментативных реакциях труднее интерпретировать, поскольку в молекуле белка слишком много протонов, которые способны обмениваться на атомы дейтерия [64]. Кроме того, при замене растворителя может слегка измениться структура белка.

3. Стереохимия [65]

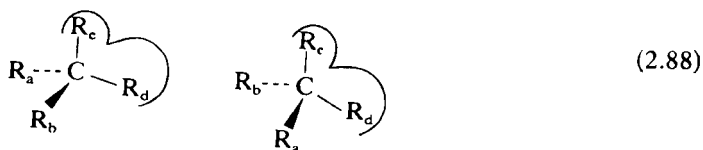
Представление о том, что ферменты обладают специфичностью только к одному из двух оптически активных изомеров субстрата, не менее старо, чем сама стереохимия. Пастер, гениальный химик и биохимик, сообщил в 1858 г., что он обнаружил дрожжи, сбразивающие правовращающую винную кислоту и не способные сбразивать левовращающую. Ранние исследования протеаз показали, что гидролизуются производные только L-, но не D-аминокислот.



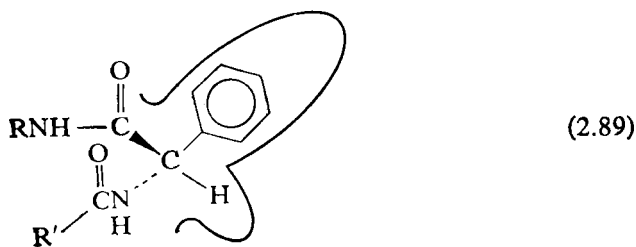
Соединение является оптически активным, если оно не может быть совмещено со своим зеркальным отображением, т. е. со своим энантиомером. Такое соединение поворачивает плоскость поляризации плоскополяризованного света. Чтобы проверить, совмещается ли данное соединение со своим зеркальным отображением, надо просто установить, обладает ли оно плоскостью или центром симметрии. Наличие подобной симметрии оз-

начает, что данное соединение оптически неактивно, и наоборот. Как и в случае многих органических молекул, представляющих биологический интерес, оптическая активность аминокислот обусловлена присутствием асимметричного атома углерода с четырьмя различными заместителями. Сейчас такой тип углеродного атома носит название *хиральный* центр. Углеродный атом с двумя одинаковыми заместителями ($CR_2R'R''$) называется *прохиральным*. Хотя соединение такого типа и не обладает оптической активностью (поскольку атом углерода связан с двумя одинаковыми группами и, следовательно, имеет плоскость симметрии), оно может стать таковым при замещении одной из R-групп другой группой (отличной от R' и R'').

Лет 40—50 назад отмечалось, что для распознавания ферментом хирального атома углерода по крайней мере три группы из числа окружающих этот атом групп должны связаться с ферментом (теория трехточечного присоединения) [66]. Если фермент связывается только с двумя группами, то две другие можно поменять местами, не повлияв на связывание [схема 2.88)].



Причина стереоспецифичности протеаз (ферментов, на которых были выполнены ранние стереохимические эксперименты) сразу же становится понятной при анализе их кристаллической структуры (гл. 1 и 12). Производные D-аминокислот отличаются от производных L-аминокислот тем, что H-атом и боковая цепь, присоединенные к хиральному атому углерода, поменялись в них местами. Связывание D-производных невозможно из-за стерических затруднений при контактировании фермента и боковой цепи аминокислоты, место которой в L-производных обычно занимает H-атом.



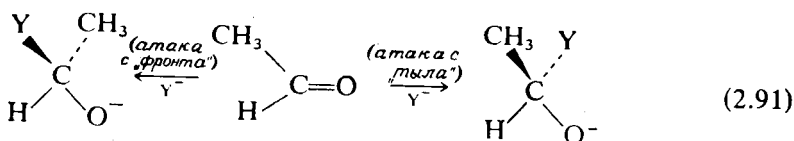
1. Асимметричный фермент может превратить симметричный субстрат в асимметричный

Хотя в случае простых химических реакций в молекуле $\text{CH}_2\text{RR}'$ оба атома водорода эквивалентны, при связывании с асимметричным активным центром фермента эта эквивалентность может быть утрачена [67]. Например, присоединение к ферменту молекулы $\text{CH}_2\text{RR}'$ группами R и R'



приводит к тому, что водородные атомы оказываются в разном окружении. Атом H_a может оказаться рядом с каталитически активным основанием, тогда как атом H_b — попасть в неактивное окружение.

Еще одним примером такого рода служат реакции между карбонильными соединениями и соединениями с двойными углерод-углеродными связями. Если реагент атакует плоский тригональный атом углерода только с одной стороны, то образуется оптически активное соединение. Например, если на схеме (2.91) нуклеофил атакует ацетальдегид «с фронта», то образуется продукт, изображенный слева, тогда как при атаке с «тыла» образуется энантиомер, изображенный справа.



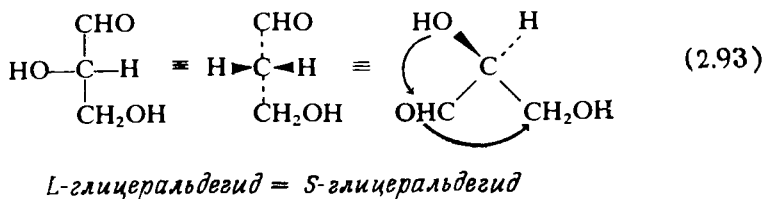
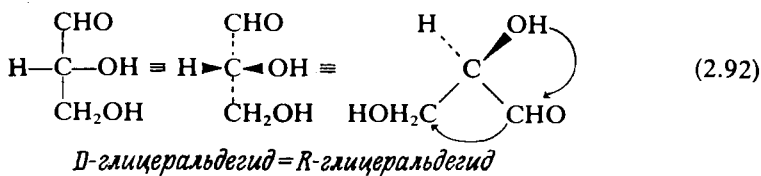
(Заметим, что атака тригонального атома углерода всегда происходит перпендикулярно плоскости двойной связи.) В случае простой химической реакции в растворе вероятность атаки тригонального углеродного атома со всех сторон одинакова (2.91), и в результате образуется рацемическая смесь, содержащая по 50% каждого энантиомера. В ходе ферментативной же реакции атака возможна только с одной стороны, поскольку субстрат жестко удерживается в асимметричном активном центре и для атакующей группы доступна только одна сторона субстрата.

2. Обозначения [65]

Символы D и L, которые обычно используются для обозначения конфигурации, имеют тот недостаток, что не являются абсолютными, а относятся к эталонному соединению. Более по-

лезная система обозначений, описывающая *абсолютную* асимметрию молекул, использует символы *R* и *S*. Согласно этой системе, определяется приоритет групп, связанных с хиральным углеродным атомом, основанный на ряде правил, в основу которых положены значения атомного номера и массового числа присоединенных атомов. Сначала рассматриваются атомы, непосредственно связанные с хиральным атомом углерода; чем больше атомный номер, тем выше приоритет атома. При наличии изотопов «старшим» считается изотоп с ббльшим массовым числом. Если группы связаны с хиральным атомом углерода через одинаковые атомы, то рассматриваются атомные номера и массовые числа следующих атомов. Лучше всего этот принцип иллюстрирует последовательность наиболее часто встречающихся групп: $-\text{SH} > -\text{OR} > -\text{OH} > \text{NHCOR} > > -\text{NH}_2 > -\text{CO}_2\text{R} > -\text{CO}_2\text{H} > -\text{CHO} > -\text{CH}_2\text{OH} > > -\text{C}_6\text{H}_5 > \text{CH}_3 > -\text{T} > -\text{D} > -\text{H}$. (Заметим, что приоритет группы $-\text{CHO}$ выше, чем группы $-\text{CH}_2\text{OH}$, поскольку считается, что в группе $\text{C}=\text{O}$ углерод связан с двумя атомами кислорода.)

Хиральный атом углерода обозначается буквой *R* или *S*. На этот атом смотрят в направлении, противоположном тому, которое ведет к заместителю, обладающему низшим приоритетом. Если приоритет оставшихся трех заместителей уменьшается в направлении, совпадающем с направлением движения часовой стрелки, то говорят, что молекула имеет абсолютную конфигурацию *R* (от *rectus* — правая). Если приоритет уменьшается в обратном направлении, то считается, что имеет место абсолютная конфигурация *S* (от *sinister* — левая). Например,

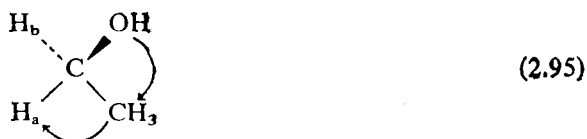


[Отметим, что формулы глицеральдегида, расположенные слева, написаны в соответствии с правилами Фишера; связи в

направлении «восток — запад» выступают вперед из плоскости рисунка, а связи, идущие в направлении «север — юг», уходят за плоскость, как это изображено на формулах в центре схем (2.92) и (2.93).]

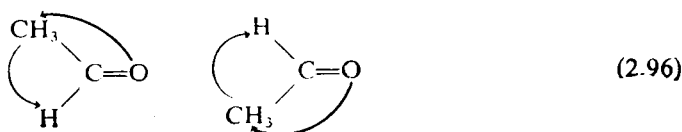


Кроме того, существует правило *прохиральности*. Например, если двум протонам в этаноле присвоить индексы а и б и *принять*, что приоритет атома H_a выше, чем атома H_b [схема (2.95)],



то H_a будет считаться *про-R*-атомом, поскольку приоритет при движении по часовой стрелке уменьшается. Напротив, атом H_b называют атомом *про-S*. Обратите внимание, что если повторить это рассмотрение, считая, что теперь приоритет атома H_b выше, то все равно H_a остается *про-R*-атомом, а H_b — *про-S*. Следовательно, прохиральность является абсолютной и не зависит от того, какому из атомов — H_a или H_b — принадлежит приоритет.

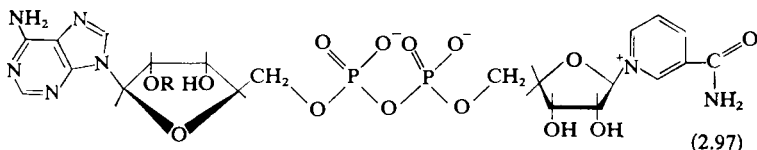
Две стороны соединения, содержащего тригональный углеродный атом, на основании ряда сложных правил обозначаются символами *re* (от *rectus*) и *si* (от *sinister*). Простой пример такого рода приведен на схеме (2.96); одно и то же соединение обращено к читателю двумя противоположными сторонами.



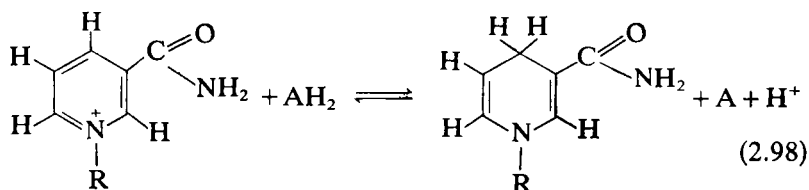
3. Примеры стереоспецифичности ферментов

а. Никотинамидадениндинуклеотид-зависимое окисление и восстановление

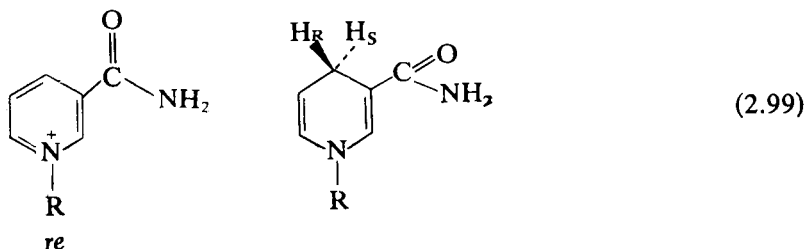
В окислительно-восстановительных реакциях NAD^+ и NADP^+



($\text{R} = \text{H}$ и PO_3^- соответственно) выступают в роли коферментов, обратимо присоединяя водород в положение 4 никотинамидного кольца.



Положение 4 в дигидроникотинамидном кольце является прохиральным. Стороны никотинамидного кольца и протоны при атоме С-4 можно пометить в соответствии с RS -системой, приняв, что та часть кольца, которая содержит группу $-\text{CONH}_2$, имеет больший приоритет, чем остальная



В ходе важных с исторической точки зрения экспериментов было выявлено, что между субстратом и NAD^+ происходит прямой стереоспецифический перенос водорода [68, 69]. Дрожжевая алкогольдегидрогеназа переносит 1 моль дейтерия от $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH}$ на NAD^+ . При инкубации полученного таким путем

NADD с ферментом и немеченым ацетальдегидом *весь* дейтерий оказывается перенесенным от NADD на образовавшийся спирт. Дейтерий или водород стереоспецифически присоединяется лишь к одной стороне молекулы NAD^+ и впоследствии от этой же стороны отщепляется. Неспецифическое присоединение к обеим сторонам NAD^+ привело бы к обратному переносу на ацетальдегид лишь 50% дейтерия (или значительно меньшего количества, поскольку кинетический изотопный эффект замедляет перенос). Одни дегидрогеназы переносят водород на ту же сторону NAD^+ , что и алкогольдегидрогеназа (дегидрогеназы класса А), другие — на противоположную сторону (класс В); эти дегидрогеназы перечислены в гл. 12. Впоследствии было установлено, что ферменты класса А осуществляют перенос протона к *re*-стороне NAD^+ (или NADP^+) и используют *про-R*-водород NADH.

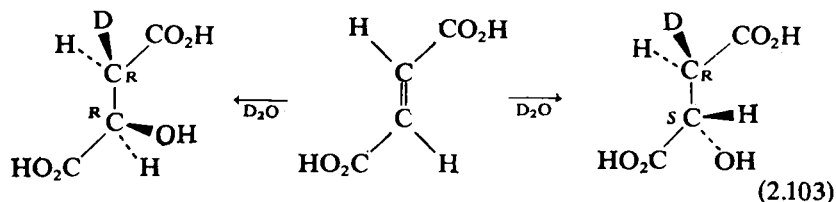


Перенос на альдегид также стереоспецифичен. Образующийся спирт [схема (2.102)] является *S*-энантиомером и обладает оптической активностью с удельным оптическим вращением $-0,28 \pm 0,03^\circ$ [70].



6. Гидратация фумарата, катализируемая фумаразой

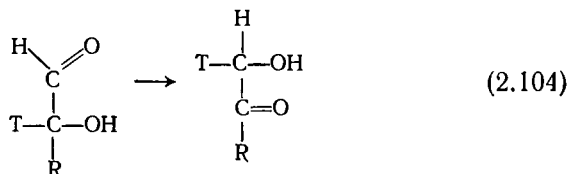
Фумараза катализирует присоединение составных частей воды по двойной связи фумарата [схема (2.103)].



Стереохимический анализ образующейся яблочной кислоты показал, что присоединяющаяся D_2O находится в *транс*-, а не в *цис*-положении (т. е. D^+ присоединяется вверху, со стороны *re*, а DO^- — внизу, со стороны *si*).

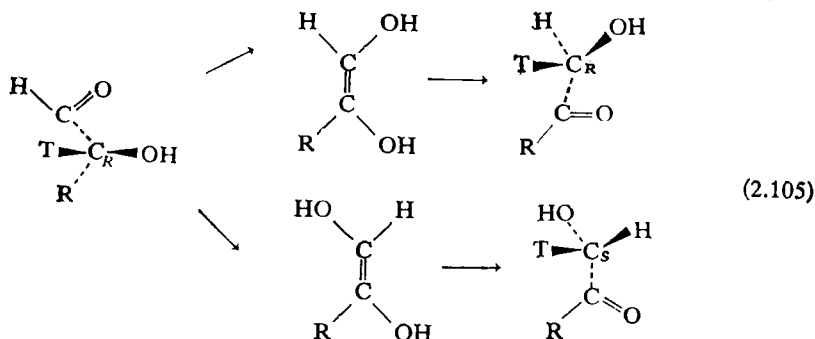
в. *Цис*-ендиольное промежуточное соединение в реакциях ферментативной изомеризации альдоз в кетозы

При катализе реакций изомеризации альдоз в кетозы образуется эндиольное промежуточное соединение, в котором переносимый протон [Т на схеме (2.104)] остается на *той* же стороне



промежуточного соединения. Анализ стереохимии продуктов показывает, что промежуточное соединение представляет собой *цис*-, а не *транс*-форму [71].

Альдозы, которые относительно атома С-2 являются *R*-формами [схема (2.105)], всегда образуют кетозы, которые являются *R*-формами относительно атома С-1. Это предполагает, что эндиол имеет *цис*- [схема (2.105), *вверху*], а не *транс*-конфигурацию.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pelzer H., Wigner E., Z. phys. Chem., B15, 445 (1932).
2. Eyring H., Chem. Rev., 17, 65 (1935).
3. Evans M. G., Polanyi M., Trans. Faraday Soc., 31, 875 (1935).
4. Frost A. A., Pearson R. G., Kinetics and mechanism, John Wiley & Sons Inc., (1961).
5. Hammond G. S., J. Am. Chem. Soc., 77, 334 (1955).
6. Brønsted J. N., Pedersen K., Z. phys. Chem., A108, 185 (1923).
7. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Am. chem. Soc., 83, 1743 (1961).
8. Fife T. H., Accs. chem. Res., 5, 264 (1972).
9. Craze G. A., Kirby A. J., J. chem. Soc. Perk. II, 61 (1974).
10. Atkinson R. F., Bruice T. C., J. Am. chem. Soc., 96, 819 (1974).

11. *Bordwell F. G., Boyle W. J., Jr.*, J. Am. chem. Soc., **94**, 3907 (1972).
12. *Fersht A. R., Kirby A. J.*, J. Am. chem. Soc., **89**, 4853, 4857 (1967); **90**, 5818, 5826 (1968).
13. *Pierre T. St., Jencks W. P.*, J. Am. chem. Soc., **90**, 3817 (1968).
14. Получено экстраполяцией на основании данных, представленных в работах Gaejens E. Morawetz H., J. Am. chem. Soc., **82**, 5328 (1960) and Gold V., Oakenfull D. G., Riley T., J. chem. Soc., **1968B**, 515 (1968).
15. *Fersht A. R., Kirby A. J.*, J. Am. chem. Soc., **90**, 5833 (1968).
16. *Higuchi T., Ebersson L., Macrae J. D.*, J. Am. chem. Soc., **89**, 3001 (1967).
17. *Jencks W. P., Barley F., Barnett R., Gilchrist M.*, J. Am. chem. Soc., **88**, 4464 (1966).
18. *Page M. I., Jencks W. P.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **68**, 1678 (1971).
19. *Page M. I.*, Chem. Soc. Revs., **2**, 295 (1973).
20. *Koshland D. E., Jr.*, J. theorët. Biol., **2**, 75 (1962).
21. *Storm D. R., Koshland D. E., Jr.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **66**, 445 (1970); J. Am. chem. Soc., **94**, 5805 (1972).
22. *Bruice T. C., Brown A., Harris D. C.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **68**, 658 (1971).
23. *Jencks W. P., Page M. I.*, Biochem. biophys. Res. Comm., **57**, 887 (1974).
24. *Perutz M. F.*, Proc. Ry. Soc., **B167**, 448 (1967).
25. *Warshel A., Levitt M.*, J. molec. Biol., **103**, 227 (1976).
26. *Mildvan A. S.*, The Enzymes, **2**, 246 (1970).
27. *Buckingham D. A., Davis C. E., Foster D. M., Sargeson A. M.*, J. Am. chem. Soc., **92**, 5571 (1970).
28. *Buckingham D. A., MacB. Harrowfield J., Sargeson A. M.*, J. Am. chem. Soc., **96**, 1726 (1974).
29. *Chaffee E., Dasgupta T. P., Harris G. M.*, J. Am. chem. Soc., **95**, 4169 (1973).
30. *Palmer D. A., Harris G. M.*, Inorg. Chem., **13**, 965 (1974).
31. *Buckingham D. A., Engelhardt L. M.*, J. Am. chem. Soc., **97**, 5915 (1975).
32. *Coleman J. E.*, Prog. bioorg. Chem., **1**, 159 (1971) (см. также ссылки в этой работе).
33. *Woolley P.*, Nature, Lond., **258**, 677 (1975).
34. *Buckingham D. A., Keene F. R., Sargeson A. M.*, J. Am. chem. Soc., **96**, 4981 (1974).
35. *Finlay T. H., Valinsky J., Sato K., Abeles R. H.*, J. biol. Chem., **247**, 4197 (1974).
36. *Golding B. T., Radom L.*, J. Am. chem. Soc., **98**, 6331 (1976).
37. *Snell E. E., di Mari S. J.*, The Enzymes, **2**, 335 (1976).
38. *Hamilton G. A., Westheimer F. H.*, J. Am. chem. Soc., **81**, 6332 (1959).
39. *Warren S. G., Zerner B., Westheimer F. H.*, Biochemistry, **5**, 817 (1966).
40. *Rose I. A., O'Connell E. L., Mehler A. H.*, J. biol. Chem., **240**, 1758 (1965).
41. *Rose I. A., O'Connell E. L.*, J. biol. Chem., **244**, 126 (1969).
42. *Davis L., Metzler D. E.*, The Enzymes, **7**, 33 (1972).
43. *Fersht A. R., Jencks W. P.*, J. Am. chem. Soc., **92**, 5442 (1970).
44. *Fersht A. R.*, J. Am. chem. Soc., **93**, 3504 (1971).
45. *Pearson R. G.*, J. chem. Educ., **45**, 103, 643 (1968).
46. *Jencks W. P., Carriuolo J.*, J. Am. chem. Soc., **82**, 1778 (1960).
47. *Jencks W. P., Gilchrist M.*, J. Am. chem. Soc., **90**, 2622 (1968).
48. *Sander E. G., Jencks W. P.*, J. Am. chem. Soc., **90**, 6154 (1968).
49. *Fastrez J., Fersht A. R.*, Biochemistry, **12**, 1067 (1973).
50. *Bender M. L., Nakamura K.*, J. Am. chem. Soc., **84**, 2577 (1962).
51. *Caplow M., Jencks W. P.*, Fedn Proc., **21**, 248 (1962).
52. *Lowe G., Yuthavong Y.*, Biochem. J., **124**, 107 (1971).
53. *Klinman J.*, Biochemistry, **15**, 2018 (1976).
54. *Järv J., Kesvatera T., Äaviksaar A.*, Eur. J. Biochem., **67**, 315 (1976).
55. *Thomsen J. S.*, Phys. Rev., **91**, 1263 (1953).

56. *Krupka R. M., Kaplan H., Laidler K. J.*, Trans. Farad. Soc., **62**, 2754 (1966).
57. *Richards J. H.*, The Enzymes, **2**, 321 (1970).
58. *Sawyer C. B., Kirsch J. F.*, J. Am. chem. Soc., **95**, 7375 (1973).
59. *Sawyer C. B., Kirsch J. F.*, J. Am. chem. Soc., **97**, 1963 (1975).
60. *O'Leary M. H., Urberg M., Young A. P.*, Biochemistry, **13**, 2077 (1974).
61. *O'Leary M. H., Kluetz M. D.*, J. Am. chem. Soc., **94**, 3584 (1972).
62. *Dahlquist F. W., Rand-Meir T., Raftery M. A.*, Proc. natn Acad., U. S. A., **61**, 1194 (1968).
63. *Smith L. E. H., Mohr L. H., Raftery M. A.*, J. Am. chem. Soc., **95**, 7497 (1973).
64. *Kresge A. J.*, J. Am. chem. Soc., **95**, 3065 (1972).
65. *Popjak G.*, The Enzymes, **2**, 115 (1970).
66. *Bergman M., Fruton J. S.*, J. biol. Chem., **117**, 193 (1937).
67. *Ogston A.*, Nature, Lond., **162**, 963 (1948).
68. *Westheimer F. H., Fisher H., Conn E. E., Vennesland B.*, J. Am. chem. Soc., **73**, 2043 (1951).
69. *Fisher H. F., Conn E. E., Vennesland B., Westheimer F. H.*, J. biol. Chem., **202**, 687 (1953).
70. *Levy H. R., Loewus F. A., Vennesland B.*, J. Am. chem. Soc., **79**, 2949 (1957).
71. *Rose I. A., O'Connell E. L.*, Biochim. biophys. Acta, **42**, 159 (1960).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Jencks W. P.*, Catalysis in chemistry and enzymology, McGraw-Hill Inc. (1969).
(Имеется перевод: Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. — М.: Мир, 1972.) (Подробно рассмотрено большинство вопросов, обсуждаемых в данной главе.)
- Page M. I.*, The energetics of neighbouring group participation, Chem. Soc. Revs., **2**, 295 (1973). (Рассмотрены вопросы, касающиеся энтропии, напряжения и т. д. в случае внутримолекулярных реакций.)
- Bruice T. C., Benkovic S. J.*, Bioorganic mechanisms, Benjamin W. A. (1966).
(Исчерпывающее описание химических механизмов многих важных в биологическом отношении реакций.)

ОСНОВНЫЕ УРАВНЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ

А. Стационарная кинетика

Концепция стационарного состояния широко используется в динамических системах. Система находится в стационарном состоянии, если некоторые существенные для ее характеристики величины не меняются со временем или если скорость образования какого-либо существенного компонента системы равна скорости его распада. Например, в стационарном состоянии скорость увеличения численности населения данной страны равна скорости его убыли. Аналогичным образом концентрация метаболита в клетке стационарна, если скорость его образования равна скорости распада. В ферментативной кинетике эта концепция применяется к концентрациям ферментсодержащих промежуточных соединений. При смешивании фермента с большим избытком субстрата наблюдается период, известный под названием *предстационарного*, во время которого концентрации этих промежуточных соединений выходят на стационарный уровень. Вслед за этим скорость реакции меняется со временем сравнительно медленно, и можно считать, что концентрации промежуточных соединений являются стационарными. По традиции скорость ферментативных реакций измеряют именно на этом стационарном участке. Стационарное состояние является известной аппроксимацией, поскольку субстрат постепенно расходуется в ходе эксперимента. Однако, если скорость измеряется за достаточно короткий отрезок времени и концентрация субстрата остается практически постоянной, это приближение является достаточно хорошим.

Хотя концепция предстационарности, несомненно, весьма полезна для анализа химических механизмов ферментативного катализа (гл. 4 и 7), для анализа метаболизма более важны данные стационарной кинетики, поскольку они характеризуют каталитическую активность фермента в условиях существующего в клетке стационарного состояния.

1. Экспериментальная основа: уравнение Михаэлиса—Ментен [1]

При выводе приведенных ниже кинетических уравнений предполагается, что концентрация фермента пренебрежимо мала по сравнению с концентрацией субстрата. За исключением тех случаев, когда речь идет о быстрых реакциях, описанных в следующей главе, это допущение выполняется почти всегда,

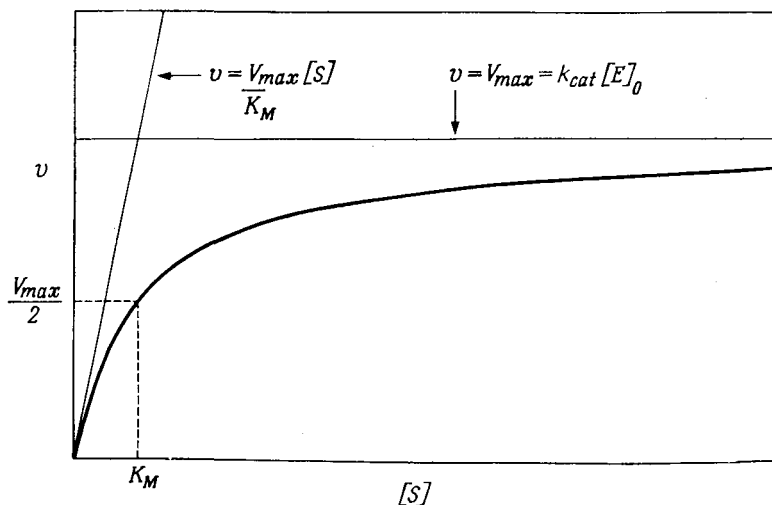


Рис. 3.1. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для механизма Михаэлиса—Ментен.

поскольку каталитическая эффективность ферментов достаточно высока.

Как правило, начальная скорость v образования продукта или превращения субстрата с участием фермента прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]_0$. Однако по мере повышения концентрации субстрата $[S]$ линейность начинает нарушаться, рост v замедляется и наконец при достаточно высоких, или *насыщающих*, концентрациях S скорость достигает предельного значения V_{\max} . Аналитически этот процесс описывается уравнением Михаэлиса—Ментен, основным уравнением ферментативной кинетики:

$$v = \frac{[E]_0 [S] k_{\text{cat}}}{K_M + [S]}, \quad (3.1)$$

где

$$k_{\text{cat}} [E]_0 = V_{\max}. \quad (3.2)$$

Концентрация субстрата, при которой $v = \frac{1}{2} V_{\max}$, обозначается K_M и называется *константой Михаэлиса*. Обратите внимание, что при низких значениях $[S]$, когда $[S] \ll K_M$,

$$v = (k_{\text{cat}}/K_M)[E]_0[S]. \quad (3.3)$$

2. Интерпретация кинетических параметров для односубстратных реакций: механизм Михаэлиса — Ментен

В 1913 г. Михаэлис и Ментен, развив идеи других исследователей, предложили следующую схему:



Каталитическая реакция состоит из двух стадий. Сначала фермент и субстрат соединяются и образуют фермент-субстратный комплекс ES. Предполагается, что эта стадия протекает быстро и обратимо и не сопровождается какими-либо химическими изменениями; фермент и субстрат удерживаются вместе за счет сил физической природы. На второй стадии протекают химические процессы, характеризующиеся константой скорости первого порядка k_{cat} (число оборотов).

Уравнение скорости выводится следующим образом. Из уравнения (3.4) получаем

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_S \quad (3.5)$$

и

$$v = k_{\text{cat}}[ES]. \quad (3.6)$$

Далее, поскольку суммарная концентрация фермента $[E]_0$ и концентрация свободного фермента $[E]$ связаны соотношением

$$[E] = [E]_0 - [ES], \quad (3.7)$$

имеем

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_S + [S]}, \quad (3.8)$$

и

$$v = \frac{[E]_0[S]k_{\text{cat}}}{K_S + [S]}. \quad (3.9)$$

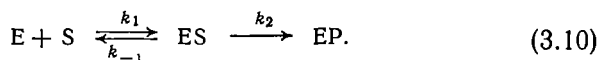
Это уравнение идентично уравнению (3.1), где K_M равна константе диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Концепция фермент-субстратного комплекса является краеугольным камнем ферментативной кинетики и лежит в основе наших представлений о механизмах ферментативного катализа. В честь ученого, который ввел это понятие, комплекс субстрата с ферментом, образованный без участия ковалентных связей, часто называют *комплексом Михаэлиса*.

3. Последующие модификации механизма Михаэлиса — Ментен

Не следует отождествлять уравнение и механизм, предложенные Михаэлисом и Ментен. Уравнение выполняется для многих механизмов, механизм же не всегда согласуется с полученными данными.

Механизм Михаэлиса — Ментен предполагает, что фермент-субстратный комплекс находится в термодинамическом равновесии со свободными ферментом и субстратом. Это справедливо только в том случае, если в уравнении (3.10) $k_2 \ll k_{-1}$:



Случай, когда k_2 сравнима с k_{-1} , впервые был рассмотрен Бриггсом и Холдейном в 1925 г.

а. Кинетика Бриггса — Холдейна [2]: $K_M > K_S$

Вывести уравнение скорости для схемы (3.10) немного труднее, чем для механизма Михаэлиса — Ментен. При расчете концентрации ES используется принцип стационарности, т. е. считается, что если измеряемая скорость реакции приблизительно постоянна в рассматриваемом промежутке времени, то [ES] также постоянна:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_{-1}[ES] \quad (3.11)$$

Из уравнений (3.7) и (3.11) получаем

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}, \quad (3.12)$$

и, поскольку $v = k_2[ES]$,

$$v = \frac{[E]_0 [S] k_2}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}. \quad (3.13)$$

Это уравнение идентично уравнению Михаэлиса — Ментен (3.1); здесь

$$(k_2 + k_{-1})/k_1 = K_M. \quad (3.14)$$

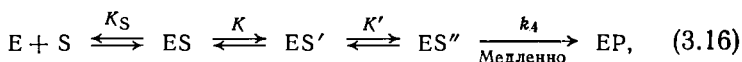
Поскольку константа диссоциации комплекса ES равна $K_S = k_{-1}/k_1$, то

$$K_M = K_S + k_2/k_1. \quad (3.15)$$

Естественно, что при $k_{-1} \gg k_2$ уравнение (3.14) сводится к виду $K_M = K_S$, т. е. константа Михаэлиса представляет собой в этом случае константу диссоциации фермент-субстратного комплекса.

б. Промежуточное соединение, образующееся вслед за образованием ES: $K_M < K_S$

Схему Михаэлиса — Ментен можно использовать для анализа самых разных процессов, отличительной особенностью которых является образование в ходе реакции дополнительных ковалентно или нековалентно связанных промежуточных соединений. Установлено, что во всех этих случаях применимо уравнение Михаэлиса — Ментен, хотя теперь K_M и k_{cat} представляют собой комбинации различных констант скорости и констант равновесия. При этом всегда $K_M \leq K_S$. Допустим, например, что реакция протекает с образованием ряда промежуточных соединений [схема (3.16)] и конечная каталитическая стадия является медленной:



где $[ES'] = K[ES]$, а $[ES''] = K'[ES]$.

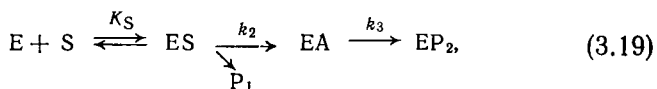
Следовательно,

$$K_M = K_S/(1 + K + KK') \quad (3.17)$$

и

$$k_{cat} = k_4KK'/(1 + K + KK'). \quad (3.18)$$

Катализируемый химотрипсином гидролиз эфиров и амидов протекает согласно следующему механизму:



где EA — «ацилфермент».

Считая, что концентрация комплекса EA стационарна, мы можем записать

$$v = [E]_0[S] \left\{ \frac{k_2k_3/(k_2 + k_3)}{K_Sk_3/(k_2 + k_3) + [S]} \right\}, \quad (3.20)$$

г. е. получаем уравнение Михаэлиса — Ментен, где

$$K_M = K_S k_3 / (k_2 + k_3) \quad (3.21)$$

и

$$k_{cat} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3), \quad (3.22)$$

или

$$1/k_{cat} = 1/k_2 + 1/k_3. \quad (3.23)$$

В более сложных случаях неравенство $K_M < K_S$ может не выполняться.

4. Все три механизма встречаются на практике

В случае механизма Бриггса — Холдейна, для которого $k_2 \gg k_{-1}$, отношение k_{cat}/K_M равно k_1 — константе скорости связывания фермента и субстрата. В гл. 4 будет показано, что константы скорости связывания должны быть порядка $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Это позволяет сделать вывод, что для механизма Бриггса — Холдейна отношение k_{cat}/K_M равно $\sim 10^7$ — $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Каталаза, ацетилхолинэстераза, карбоангидраза, кротоназа, фумараза и триозофосфатизомераза — все эти ферменты по указанному критерию подчиняются кинетике Бриггса — Холдейна, о чем свидетельствуют данные табл. 4.4. Еще одним ферментом такого типа является пероксидаза, выделенная из хрена, — один из первых ферментов, к которому были применены методы исследования быстрых реакций [3]. Сначала пероксидаза образует с перекисью водорода комплекс Михаэлиса, который затем взаимодействует с донором водорода (реакция второго порядка). При достаточно высоких концентрациях донора скорость второй реакции значительно превышает скорость диссоциации комплекса Михаэлиса.

Образование вслед за фермент-субстратным комплексом промежуточных соединений [как в схеме (3.19)] — чрезвычайно широко распространенное явление. Однако в случае физиологических субстратов эти промежуточные соединения часто не накапливаются и медленной стадией в последовательности реакций (3.19) является стадия с константой скорости k_2 . (Обусловлено это причинами принципиального характера, обсуждающимися в гл. 10, где приведены соответствующие примеры.) При этих условиях K_M равна K_S (константе диссоциации) и первоначально предложенный механизм Михаэлиса — Ментен оказывается всегда выполнимым. Для многих экспериментальных систем наблюдается обратная картина. Исследователи часто используют в опытах синтетические высокореакционные субстраты; в этих условиях часто происходит накопление содержащих ковалентные связи промежуточных соединений.

Б. Физический смысл параметров уравнения Михаэлиса — Ментен

1. Смысл константы k_{cat}

Когда имеется только один фермент-субстратный комплекс и все стадии связывания достаточно быстрые, параметр k_{cat} в уравнении Михаэлиса — Ментен представляет собой просто константу скорости первого порядка для химического превращения комплекса ES в комплексе EP. В более сложных ситуациях k_{cat} является функцией всех констант скорости первого порядка и не может быть отнесена ни к какому конкретному процессу, за исключением крайних случаев. Например, для механизма Бриггса — Холдейна, когда комплекс EP диссоциирует достаточно быстро, $k_{cat} = k_2$ [уравнение (3.10)]. Однако если диссоциация комплекса EP протекает медленно, то константа скорости этого процесса вносит вклад в параметр k_{cat} и в предельном случае, когда скорость диссоциации EP значительно меньше скоростей химических стадий, параметр k_{cat} будет равен константе скорости диссоциации. Из рассмотрения схемы (3.19) видно, что в этом случае k_{cat} является функцией констант k_2 и k_3 . Однако если одна из этих констант много меньше другой, k_{cat} становится равной меньшей константе. Например, если $k_3 \ll k_2$, то, согласно (3.22), $k_{cat} = k_3$. Из этого следует, что k_{cat} не может превышать ни одной из констант скорости первого порядка для реакционного пути в прямом направлении и представляет собой, таким образом, *нижний* предел для констант скорости химических реакций.

Часто параметр k_{cat} называют *числом оборотов* фермента, поскольку он определяет максимальное число молекул субстрата, превращающихся в продукт одним активным центром в единицу времени.

2. Смысл K_M : истинные и кажущиеся константы равновесия

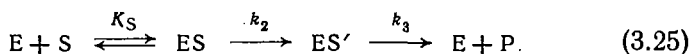
Несмотря на то что K_M равна K_S — истинной константе диссоциации фермент-субстратного комплекса — только для простого механизма Михаэлиса — Ментен или в аналогичных случаях, при решении определенных задач K_M можно рассматривать как *кажущуюся константу диссоциации*. Например, концентрацию свободного фермента можно рассчитать из соотношения

$$\frac{[E][S]}{\sum [ES]} = K_M, \quad (3.24)$$

где $\sum [ES]$ — сумма концентраций *всех* фермент-содержащих форм¹.

Концепция *кажущихся* величин очень плодотворна и используется во многих случаях, например при определении pK_a . Довольно часто значения pK_a не отражают микроскопическую ионизацию данной группы, а представляют собой комбинацию соответствующей константы с константами равновесия между разными конформационными состояниями данной молекулы. Эту *кажущуюся* константу можно определить титрованием как простую константу pK_a . При анализе влияния температуры, pH и других факторов на кажущуюся K_M не следует слишком полагаться на подобный упрощенный подход; необходимо помнить, что константы скорости, функцией которых является кажущаяся константа K_M , также зависят от указанных факторов. То же самое относится к значениям k_{cat} . В литературе имеются примеры, когда наличие изломов на температурной зависимости k_{cat} объяснялось тем, что фермент претерпевает конформационные изменения, тогда как в действительности имела место разная температурная зависимость индивидуальных констант скорости, входящих в параметр k_{cat} , т. е. констант k_2 и k_3 в уравнении (3.22).

То, что K_M является мерой количества фермента, связанного в той или иной форме с субстратом, иллюстрируется следующей схемой (сравните с механизмом действия химотрипсина):

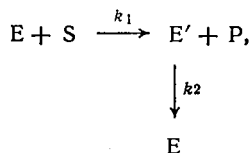


Применяя условие стационарности к комплексу ES' , получаем

$$[ES'] = [ES] k_2/k_3. \quad (3.26)$$

Когда $k_2 \gg k_3$, $[ES']$ намного превышает $[ES]$, так что ES' вносит в K_M больший вклад, чем ES , и является преобладающей

¹ Любопытно, что кинетика Михаэлиса — Ментен может наблюдаться и в отсутствие насыщения фермента субстратом. Рассмотрим, например, следующую схему:



Здесь взаимодействие активной формы фермента с субстратом представляет собой реакцию второго порядка; в результате образуются продукты и неактивная форма E' , которая медленно переходит в активную. Этот случай служит примером кинетики с кажущимся насыщением; при этом $k_{cat} = k_2$, а $K_M = k_2/k_1$. Если рассматривать E' как «связанную» форму фермента, то можно применять уравнение (3.24).

ферментсодержащей формой. Даже не решая написанных уравнений, мы интуитивно чувствуем, что K_M должна быть меньше K_S приблизительно в k_3/k_2 раз, т. е.

$$K_M \simeq K_S (k_3/k_2). \quad (3.27)$$

3. Смысл параметра k_{cat}/K_M

Как было показано ранее [уравнение (3.3)], скорость реакции при низких концентрациях субстрата определяется уравнением $v = (k_{cat}/K_M) [E]_0 [S]$, т. е. отношение k_{cat}/K_M представляет собой *кажущуюся* константу скорости второго порядка. Этот параметр не является истинной микроскопической константой, за исключением крайнего случая, когда реакция лимитируется столкновением фермента с субстратом.

Ценность параметра k_{cat}/K_M состоит в том, что он связывает скорость реакции с концентрацией свободного фермента, а не с его общей концентрацией. В этом нетрудно убедиться из рассмотрения приведенного выше уравнения (3.3), поскольку при низкой концентрации субстрата фермент находится преимущественно в свободном состоянии ($[E] \approx [E]_0$), и, следовательно, скорость реакции есть

$$v = [E] [S] k_{cat}/K_M.$$

Ниже будет показано [уравнение (3.41)], что этот вывод справедлив для любой концентрации субстрата. Мы покажем также [уравнение (3.44)], что параметр k_{cat}/K_M определяет специфичность действия фермента при наличии конкурирующих субстратов.

Отношение k_{cat}/K_M не может превышать ни одну из констант скорости второго порядка [4] для последовательности реакций, идущих в прямом направлении, и представляет собой, таким образом, *нижний* предел для константы скорости при связывании фермента с субстратом.

В. Графическое представление данных

Для графического анализа данных и обнаружения отклонений от идеальности весьма полезно преобразовать уравнение Михаэлиса — Ментен в линейную форму. Чаще всего для этого используют метод Лайнуивера—Бэрка. Взяв величины, обратные правой и левой частям уравнения (3.1), и подставив выражение (3.2), мы получим уравнение Лайнуивера — Бэрка [5]:

$$1/v = 1/V_{max} + K_M/V_{max} [S]. \quad (3.28)$$

График, построенный в координатах $\{1/[S]; 1/v\}$ (рис. 3.2), представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен K_M/V_{max} , отрезок, отсекаемый на оси ординат (при $1/[S] = 0$), есть $1/V_{max}$, а на оси абсцисс — $-1/K_M$.

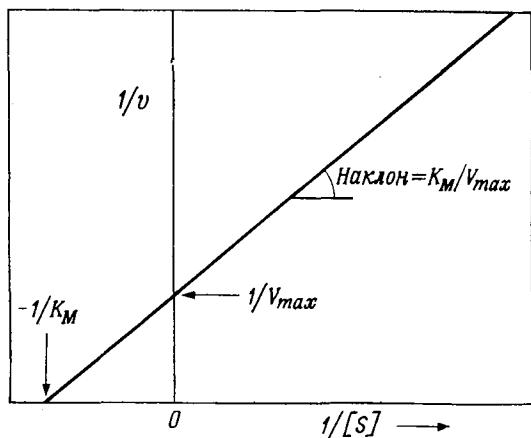


Рис. 3.2. График Лайнуивера — Бэрка.

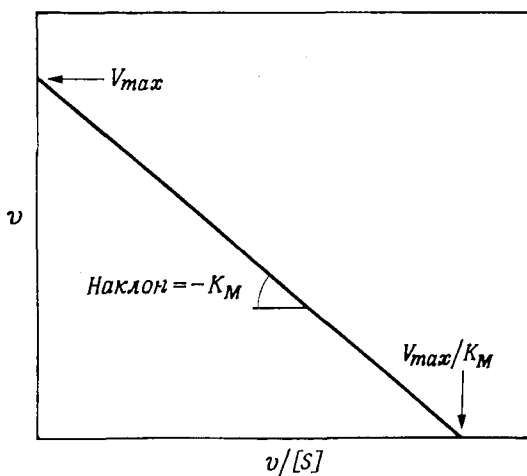


Рис. 3.3. График Эди — Хофсти.

Другой часто использующийся график — это график Эди — Хофсти [уравнение (3.29)] [6, 7]. Преобразование уравнений (3.1) и (3.2) приводит к выражению

$$v = V_{max} - K_M v/[S].$$

(3.29)

График, построенный в координатах $\{v/[S]; v\}$ (рис. 3.3), представляет собой прямую, отсекающую на оси ординат (при $v/[S]=0$) отрезок, равный V_{\max} . Тангенс угла наклона этой прямой равен $-K_M$, а отрезок, отсекаемый ею на оси абсцисс, V_{\max}/K_M .

График Лайнуивера — Бэрка имеет тот недостаток, что при высоких концентрациях субстрата экспериментальные точки попадают на небольшой отрезок, в результате чего точкам, соответствующим низким концентрациям, придается слишком большой вес. Достоинство же этого графика состоит в том, что он позволяет просто оценить значение v при данной концентрации субстрата $[S]$.

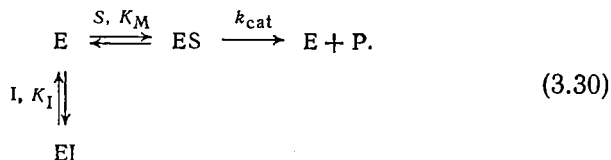
График Эди — Хофсти лишен указанного выше недостатка, однако определить с его помощью значение скорости труднее. Считается, что этот график дает более точные результаты, поэтому для определения параметров K_M и V_{\max} исследователи предпочитают пользоваться именно им [8, 9].

Г. Ингибирование

Помимо необратимой инактивации ферментов при нагревании или действии химических реагентов, может происходить обратимое ингибирование в ходе нековалентного связывания ингибиторов. Различают четыре основных типа ингибирования.

1. Конкурентное ингибирование

Если ингибитор I связывается с активным центром фермента и препятствует связыванию субстрата S и наоборот, т. е. I и S конкурируют за связывание с активным центром, то говорят, что I является *конкурентным* ингибитором. Для простого механизма Михаэлиса — Ментен [уравнение (3.4), $K_M = K_S$] следует рассматривать еще одну стадию:



Используя при выводе уравнения скорости соотношение

$$[E]_0 = [ES] + [EI] + [E], \quad (3.31)$$

получаем

$$v = \frac{[E]_0 [S] k_{cat}}{[S] + K_M (1 + [I]/K_I)}. \quad (3.32)$$

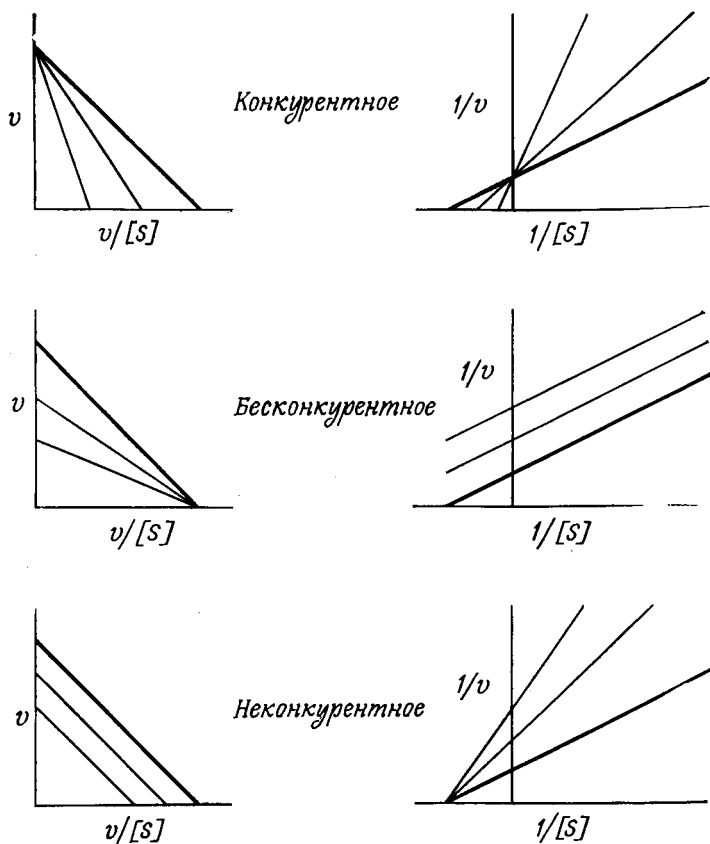


Рис. 3.4. Графики Эди—Хофсти (слева) и Лайнуивера—Бэрка (справа) для различных типов ингибирования. Жирные прямые соответствуют реакциям в отсутствие ингибитора, тонкие — реакциям в присутствии ингибитора.

Можно видеть, что K_M увеличивается в $(1 + [I]/K_I)$ раз. Это уравнение применимо ко всем механизмам, для которых справедливо уравнение Михаэлиса—Ментен. Конкурентное ингибирование влияет только на параметр K_M и не сказывается на V_{max} , поскольку при бесконечно больших концентрациях субстрат вытесняет ингибитор из активного центра фермента.

2. Неконкурентное, бесконкурентное и смешанное ингибирование

Когда I и S присоединяются к ферменту одновременно, а не конкурируют за один и тот же центр связывания, наблюдается

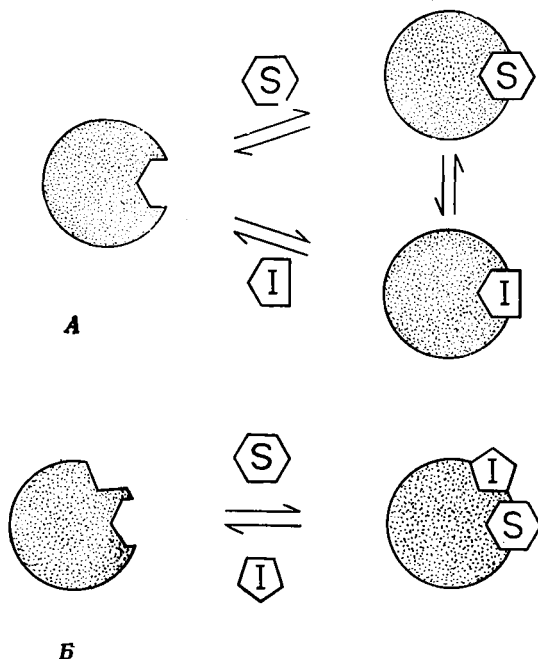
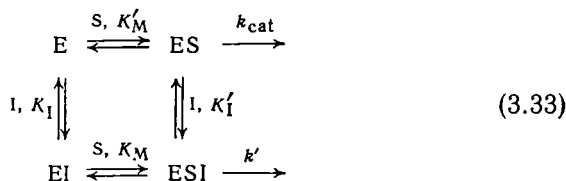


Рис. 3.5. А. Конкурентное ингибирование; ингибитор и субстрат конкурируют за один и тот же центр связывания. Например, индол, фенол и бензол связываются в гидрофобном кармане химотрипсина и ингибируют гидролиз производных триптофана, тирозина и фенилаланина. Б. Неконкурентное ингибирование; ингибитор и субстрат одновременно связываются с ферментом. Примером такой реакции может служить ингибирование фруктозо-1,6-дифосфатазы АМР. Этот тип ингибирования имеет много общего с действием мульти-субстратных ферментов. Примером бесконкурентного ингибирования односубстратного фермента, который встречается довольно редко, является ингибирование щелочной фосфатазы L-фенилаланином [Ghosh N. K., Fishman W. H., J. Biol. Chem., 241, 2516 (1966)]. Этот фермент состоит из двух идентичных субъединиц, и фенилаланин предположительно связывается с одним центром, а субстрат — с другим.

иная картина:



Для частного случая механизма Михаэлиса — Ментен, когда константы диссоциации для высвобождения субстрата из комп-

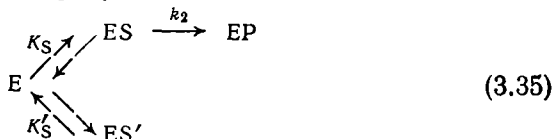
лексов EIS и ES одинаковы (т. е. $K_M = K'_M$), но комплекс ESI неореакционноспособен (т. е. $k' = 0$),

$$v = \frac{k_{\text{cat}}/(1 + [I]/K_I)}{[S] + K_M}. \quad (3.34)$$

Это случай *неконкурентного* ингибирования: в присутствии ингибитора константа K_M не изменяется, а k_{cat} уменьшается в $(1 + [I]/K_I)$ раз. В более общем случае константы диссоциации для высвобождения S из комплексов EIS и ES различаются. Это приводит к тому, что в присутствии ингибитора меняются оба параметра (K_M и k_{cat}), и такое ингибирование называют *смешанным*. Ингибирование, при котором I связывается ES и не связывается E, получило название *бесконкурентного*.

Д. Непродуктивное связывание

Известны случаи, когда наряду с продуктивным связыванием происходит связывание субстрата с активным центром фермента таким образом, что образуется неактивный комплекс. Подобные случаи носят название непродуктивного связывания.



Влияние непродуктивного связывания на механизм Михаэлиса — Ментен проявляется в уменьшении обоих параметров, k_{cat} и K_M . Параметр k_{cat} уменьшается из-за того, что при насыщении продуктивно связывается только часть субстрата. K_M становится меньше K_S , поскольку наличие дополнительных вариантов связывания должно приводить к более прочному связыванию.

Решая уравнение (3.35) обычным способом, получаем

$$v = \frac{[E]_0 [S] k_2}{K_S + [S](1 + K_S/K'_S)}. \quad (3.36)$$

Из сопоставления уравнений (3.36) и уравнения Михаэлиса — Ментен получаем

$$k_{\text{cat}} = k_2/(1 + K_S/K'_S) \quad (3.37)$$

и

$$K_M = K_S/(1 + K_S/K'_S). \quad (3.38)$$

Следует отметить, что

$$\boxed{k_{\text{cat}}/K_M = k_2/K_S} \quad (3.39)$$

Другими словами, на отношение k_{cat}/K_M не влияет наличие дополнительного способа связывания, поскольку k_{cat} и K_M изменятся симбатно. Так, например, если непродуктивно связывающий центр связывает субстрат в 1000 раз прочнее, чем продуктивно связывающий, то K_M будет в 1000 раз меньше K_S , однако, поскольку из тысячи молекул продуктивно связывается только одна, k_{cat} будет в 1000 раз меньше, чем k_2 (строго говоря, в 1001 раз).

$$E. \quad k_{\text{cat}}/K_M = k_2/K_S$$

Уравнение (3.39) для непродуктивного связывания носит довольно общий характер. Оно применимо не только к случаям непродуктивного связывания, но и к реакциям, в ходе которых образуются промежуточные соединения. Например, если для катализируемого химотрипсином гидролиза эфиров [схема (3.19)], при котором происходит накопление ацилфермента, взять отношение выражений (3.21) и (3.22), мы получим равенство $k_{\text{cat}}/K_M = k_2/K_S$. Очевидно, это соотношение не выполняется для механизма Бриггса — Холдейна, когда фермент-субстратный комплекс не находится в термодинамическом равновесии со свободным ферментом и субстратами. Следует иметь в виду, что если имеется несколько фермент-содержащих промежуточных соединений, находящихся по отношению друг к другу в состоянии быстро устанавливающегося равновесия, как в схеме (3.16), K_M может оказаться сложной функцией многих компонент. В этом случае в параметр k_{cat}/K_M вносят вклад все фермент-содержащие соединения.

Ж. Конкурирующие субстраты

1. Другая форма записи уравнения Михаэлиса — Ментен

Предположим, что за активный центр фермента конкурируют два субстрата:



Скорости реакций можно получить с помощью обычных методов стационарной кинетики или из уравнения Михаэлиса — Ментен. Однако если нас интересует отношение скоростей, то можно

воспользоваться следующим простым приемом. Подставив (3.24) в уравнение Михаэлиса — Ментен (3.1), получаем

$$v = (k_{\text{cat}}/K_M)[E][S], \quad (3.41)$$

где $[E]$ — концентрация свободного фермента. Ценность этого уравнения состоит в том, что в него вместо $[E]_0$ входит $[E]$. Оно позволяет прямо получить ряд важных соотношений.

2. Специфичность ферментов по отношению к конкурирующим субстратам

Если за фермент конкурируют два субстрата, А и В, то, поскольку

$$d[A]/dt = v_A = (k_{\text{cat}}/K_M)_A [E][A] \quad (3.42)$$

и

$$d[B]/dt = v_B = (k_{\text{cat}}/K_M)_B [E][B], \quad (3.43)$$

$$v_A/v_B = (k_{\text{cat}}/K_M)_A [A]/(k_{\text{cat}}/K_M)_B [B]. \quad (3.44)$$

Отсюда следует важный вывод: специфичность, т. е. выбор ферментом только одного из двух конкурирующих субстратов, определяется отношением k_{cat}/K_M , а не параметром K_M как таковым. Поскольку k_{cat}/K_M не зависит от непродуктивного связывания или накопления промежуточных соединений, эти факторы не влияют на специфичность (гл. 11).

3. Обратимость: уравнение Холдейна [10]

1. Равновесие в растворе



$$K_{\text{eq}} = [P]/[S] = k_f/k_r. \quad (3.46)$$

Фермент не может изменить константу равновесия для взаимопревращений свободных субстрата и фермента в растворе. Это означает, что величины k_{cat}/K_M для прямой и обратной реакций связаны определенным соотношением. В частности, в равновесии, когда скорости образования Р и S равны, (3.44) дает

$$(k_{\text{cat}}/K_M)_S [E][S] = (k_{\text{cat}}/K_M)_P [E][P], \quad (3.47)$$

так что

$$\left(\frac{k_{\text{cat}}/K_M}{k_{\text{cat}}/K_M} \right)_S / \left(\frac{k_{\text{cat}}/K_M}{k_{\text{cat}}/K_M} \right)_P = K_{\text{eq}} \quad (3.48)$$

Выведенное соотношение известно как уравнение Холдейна, которое этот ученый получил в 1930 г.

2. Равновесие на поверхности молекулы фермента

Уравнение Холдейна не связывает константу равновесия для реакции взаимопревращения ES и EP с константой равновесия процесса $S \rightleftharpoons P$ в растворе. Константы равновесия для процессов, протекающих с участием связанных с ферментом реагентов, часто весьма существенно отличаются от констант равновесия реакций между теми же реагентами в растворе. Обусловлено это несколькими причинами:

1. «Напряжение». Геометрия активного центра может быть такова, что, например, P связывается более прочно, чем S. Для P положение равновесия на поверхности фермента будет более благоприятным, чем в растворе.

2. «Непродуктивное связывание». Если существуют иные, отличные от каталитически продуктивного способы связывания субстрата S ферментом, то положение равновесия будет благоприятствовать образованию ES.

3. «Энтропия». В том случае, когда «P» представлен молекулами двух видов, т. е.



константа равновесия для раствора содержит член, отражающий выигрыш в энтропии при образовании двух молекул из одной. Однако если с поверхностью фермента связываются как P, так и P', т. е.



то соответствующая константа равновесия этого энтропийного члена содержать не будет.

Пример сильного различия между константами равновесия для раствора и при связывании субстрата с поверхностью фермента приведен в гл. 7, разд. Д. Константа равновесия для реакции гидролиза, когда АТР находится в равновесии с АДР и ортофосфатом на поверхности молекулы миозина (S_1), равна лишь 9, в то время как для раствора константа равновесия составляет 10^5 — 10^6 .

И. Невыполнимость уравнения Михаэлиса — Ментен

Помимо таких тривиальных причин, как невозможность провести измерение начальной скорости реакции, применимость

уравнения Михаэлиса — Ментен ограничена еще двумя основными факторами.

Первый из них — ингибирование избытком субстрата. При связывании с ферментом второй молекулы субстрата образуется каталитически неактивный комплекс ES_2 . Если для простого механизма Михаэлиса — Ментен вторую константу диссоциации обозначить через K'_S , мы получим

$$v = \frac{[E]_0 [S] k_{cat}}{K_S + [S] + [S]^2 / K'_S} \quad (3.51)$$

При низких концентрациях S уравнение скорости, как обычно, имеет вид $v = [E]_0 [S] k_{cat} / K_S$. Однако по мере увеличения $[S]$ v достигает максимального значения и затем начинает падать.

Второй фактор — активация избытком субстрата: образующийся комплекс ES_2 более активен, чем ES .

К. Мультисубстратные системы

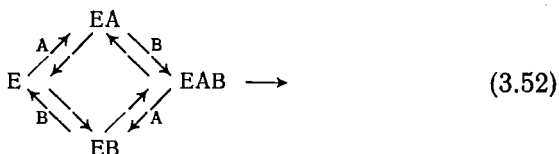
До сих пор мы рассматривали ферменты, которые взаимодействуют только с одним субстратом. Однако большинство ферментов связывают два субстрата. Так, например, дегидрогеназы связывают NAD^+ и субстрат, который должен быть окислен. Многие положения, справедливые для односубстратных систем, применимы и к мультисубстратным системам. Однако найти общее решение уравнений для таких случаев довольно сложно, и эта задача выходит за рамки данной монографии. Недавно вышли четыре книги, почти целиком посвященные детальному анализу стационарной кинетики мультисубстратных систем; к этим книгам мы и отсылаем заинтересованного читателя [11—14]. Весьма полезно ознакомиться также с превосходными краткими обзорами Клееланда [15] и Диила [16].

Для нас же наибольший интерес представляет тот факт, что большинство реакций подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен при такой постановке опыта, когда концентрация одного субстрата поддерживается постоянной, а концентрация другого меняется. Более того, на практике обычно встречается весьма ограниченный набор механизмов. Ниже мы только перечислим некоторые из них (самые распространенные) и приведем основные термины.

Реакции, в которых все субстраты связываются ферментом до того, как образуется первый продукт, называются *последовательными*. Если один или несколько продуктов высвобождаются до присоединения всех субстратов, такой механизм назы-

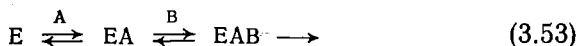
вается механизмом типа *пинг-понг*. Последовательные механизмы называют *упорядоченными*, если связывание субстратов и высвобождение продуктов происходят в строго определенном порядке. Если же этот порядок отсутствует, то механизм называют *неупорядоченным*. Термин *быстро устанавливающееся равновесие* используют в тех случаях, когда химические стадии являются более медленными, чем стадии связывания реагентов. Ниже приведено несколько примеров рассмотренных механизмов.

1. Неупорядоченный последовательный механизм



Комплекс EAB называют *тройным*, или *центральный*.

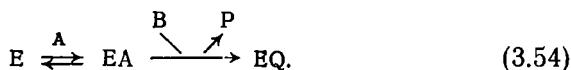
2. Упорядоченный механизм



Упорядоченные механизмы часто имеют место в реакциях, катализируемых NAD^+ -зависимыми дегидрогеназами, причем первым связывается кофермент. Это можно объяснить тем, что связывание динуклеотида вызывает конформационное изменение, увеличивающее средство фермента к другому субстрату (гл. 12).

3. Механизм Теорелла — Чанса

Примером упорядоченного механизма является механизм Теорелла — Чанса, когда в ходе реакции не происходит накопления тройного комплекса (как это установлено в случае алкогольдегидрогеназы из печени лошади):

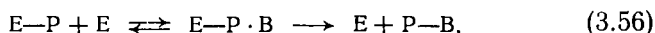
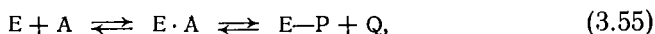


(Для реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой печени, P — это ацетальдегид, Q — NADH.)

4. Механизм типа пинг-понг (механизм с замещением фермента, или механизм двухтактного замещения)

Реакции, в которой фермент взаимодействует с одним субстратом с образованием химически модифицированного фер-

мента и высвобождением одного продукта, а затем вновь реагирует со вторым субстратом:



соответствует характерное семейство прямых на графике Лайнуивера — Бэрка (рис. 3.6).

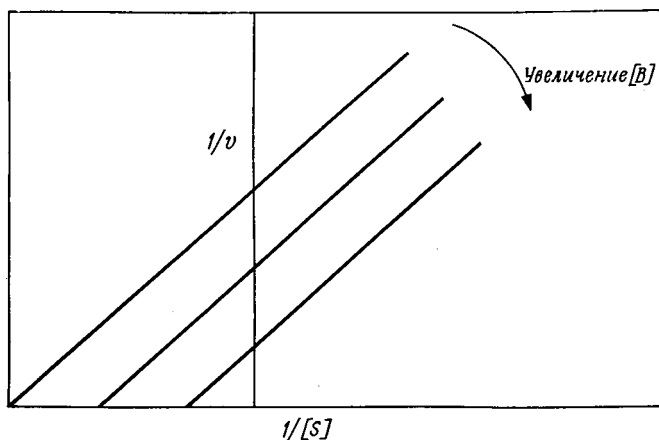
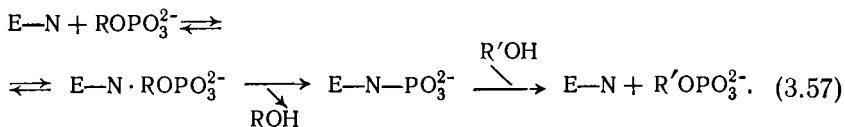


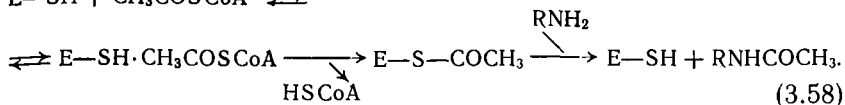
Рис. 3.6. Параллельные прямые на графике двойных обратных координат, характерные для механизма типа пинг-понг. При увеличении концентрации второго субстрата в указанной последовательности V_{\max} возрастает, как и K_M для первого субстрата. Параметр V_{\max}/K_M — величина, обратная тангенсу наклона прямых, — остается постоянной.

Примером реакции, протекающей по механизму типа пинг-понг, является реакция, катализируемая переносящим фосфат ферментом (например, фосфоглицеромутазой), который фосфорилируется одним субстратом с образованием фосфорилфермента ($E-P$), а затем переносит фосфорильную группу на второй субстрат:



В реакции (3.57) в случае фосфоглицеромутазы N представляет собой имидазол боковой цепи остатка гистидина (гл. 12, разд. Ж,3). Другой пример — перенос ацильной группы от ацетилкофермента А на сульфанилимид или другие амины, катали-

зируемый ацетил-СоА: ариламин—ацетилтрансферазой



В ходе этой реакции почти наверняка образуется ацилтиофермент, в котором ацилируется сульфгидрильная группа остатка цистеина [17].

Во многих отношениях кинетика реакций, протекающих по механизму типа пинг-понг, является наиболее информативной (в отношении механизма реакции), поскольку в этом случае мы получаем данные об образовании промежуточного соединения с ковалентными связями. Тот факт, что реакция подчиняется кинетике, характерной для механизма типа пинг-понг, часто используется как доказательство образования подобного промежуточного соединения, но, поскольку характерные семейства параллельных прямых на графике двойных обратных координат (рис. 3.6) могут дать и другие кинетические механизмы, к этому утверждению всегда следует относиться с осторожностью.

Данные стационарной кинетики могут использоваться для дифференциации рассмотренных выше механизмов. При соответствующих условиях они позволяют определить порядок присоединения субстратов и высвобождения продуктов. В связи с этим используемый в стационарной кинетике термин «механизм» часто обозначает просто последовательность присоединения субстратов и высвобождения продуктов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michaelis L., Menten M. L., *Biochem. Z.*, **49**, 333 (1913).
2. Briggs G. E., Haldane J. B. S., *Biochem. J.*, **19**, 338 (1925).
3. Chance B., *J. biol. Chem.*, **151**, 553 (1943).
4. Peller L., Alberty R. A., *J. Am. chem. Soc.*, **81**, 5907 (1959).
5. Lineweaver H., Burk D., *J. Am. chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
6. Eadie G. S., *J. biol. Chem.*, **146**, 85 (1942).
7. Hofstee B. H. J., *Nature, Lond.*, **184**, 1296 (1959).
8. Dowd J. E., Riggs D. S., *J. biol. Chem.*, **249**, 863 (1965).
9. Atkins G. L., Nimmo I. A., *Biochem. J.*, **149**, 775 (1975).
10. Haldane J. B. S., *Enzymes*, Longmans (1930).
11. Fromm H. J., *Initial rate enzyme kinetics*, Springer (1975).
12. Wong J. T.-F., *Kinetics of enzyme mechanisms*, Academic Press (1975).
13. Segel I. H., *Enzyme kinetics*, Wiley (1975).
14. Cornish-Bowden A., *Principles of enzyme kinetics*, Butterworths (1976).
[Имеется перевод: Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики.— М.: Мир, 1979.]
15. Cleland W. W., *The Enzymes*, **2**, 1 (1970).
16. Datzel K., *The Enzymes*, **10**, 2 (1975).
17. Jencks W. P., Gresser M., Valenzuela M. S., Huneus F. C., *J. biol. Chem.*, **247**, 3756 (1972).

ИЗМЕРЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ И ПОРЯДОК ИХ ВЕЛИЧИН

Часть 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ: КИНЕТИКА ПЕРЕХОДНЫХ ПРОЦЕССОВ

Кинетические исследования ферментативных реакций, протекающих в стационарных условиях, обычно позволяют определить только два параметра: константу Михаэлиса K_m , которая может быть равна константе диссоциации фермент-субстратного комплекса, и k_{cat} , в одних случаях представляющую собой микроскопическую константу скорости, а в других — комбинацию констант скорости для нескольких стадий. В распоряжении исследователя имеется ряд приемов, которые при случае можно использовать для выявления промежуточных соединений и даже для измерения индивидуальных констант скорости, однако это удастся сделать далеко не всегда и зависит от механизма реакции. (Несколько примеров такого рода будут рассмотрены в гл. 7.) Чтобы найти константы скорости отдельных стадий и обнаружить «короткоживущие» промежуточные соединения, необходимо измерить скорость приближения системы к стационарному состоянию. Индивидуальные константы скорости могут быть измерены за промежуток времени, в течение которого устанавливается это состояние.

Поскольку значения k_{cat} лежат в интервале $1-10^7$ с⁻¹, измерения следует проводить за время от 1 до 10^{-7} с. Для этого требуется либо аппаратура для быстрого смешивания и последующего наблюдения за ферментом и субстратом, либо особые, совершенно новые методы. Кроме того, поскольку наблюдаемые события происходят на самом ферменте, этот фермент должен присутствовать в количествах, сравнимых с количеством субстрата. Создание приборов для исследования быстрых реакций и разработка методов выделения больших количеств белка в чистом виде произвели настоящую революцию в ферментативной кинетике.

Ниже мы рассмотрим два метода исследования быстрых реакций. Первый из них — метод *быстрого смешивания реагентов*, который позволяет смешать два раствора за доли миллисекунд.

ды, в то время как число оборотов большинства ферментов составляет $\sim 1000 \text{ с}^{-1}$. Второй — метод *релаксационной кинетики*. Проблема мертвого времени, связанного со смешиванием реагентов, здесь отсутствует благодаря использованию предварительно смешанных растворов.

А. Методы быстрого смешивания реагентов и быстрого «замораживания» реакции

1. Метод непрерывной струи

В 1923 г. Хартридж и Роутон при исследовании присоединения лигандов к дезоксигемоглобину применили метод непрерывной струи [1]. Принцип этого метода иллюстрирует рис. 4.1. Два шприца соединены через смеситель с реакционной трубкой.

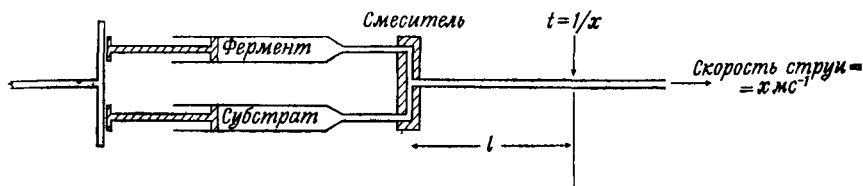


Рис. 4.1. Схема устройства, используемого в методе непрерывной струи.

Один шприц заполняется раствором фермента, другой — раствором субстрата; оба раствора продавливаются с постоянной скоростью и тщательно перемешиваются в смесителе, а затем поступают в трубку и «стареются». При постоянной скорости струи «возраст» раствора прямо пропорционален пути, пройденному им в трубке, и скорости струи. Например, если скорость струи равна $10 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, то на расстоянии 1 см от смесителя «возраст» раствора будет равен 1 мс, на расстоянии 10 см — 10 мс и т. д. Скорость протекания струи следует поддерживать выше критической, чтобы гарантировать турбулентность потока. Ниже этого критического значения, равного для трубки диаметром 1 мм приблизительно $2 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, поток может стать ламинарным и жидкость в центре трубки будет течь быстрее, чем у стенки. Тем самым устанавливается верхний временной предел для трубки данной длины.

2. Метод остановленной струи

Этот метод был разработан в 1934 г. Роутоном [2] и значительно усовершенствован шестью годами позже Чансом [3]. Лежащий в его основе принцип иллюстрирует рис. 4.2 [4].

В отличие от описанного выше метода непрерывной струи здесь поршни обоих шприцев объемом по 50—200 мкл каждый быстро приводятся в движение и затем механически останавливаются. Предположим, что мы наблюдаем за точкой, находящейся от смесителя на расстоянии 1 см. Если скорость струи равна $10 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, то за время существования *непрерывного потока* «возраст» раствора в этой точке будет равен 1 мс. После остановки струи происходит старение раствора и детектор регистрирует

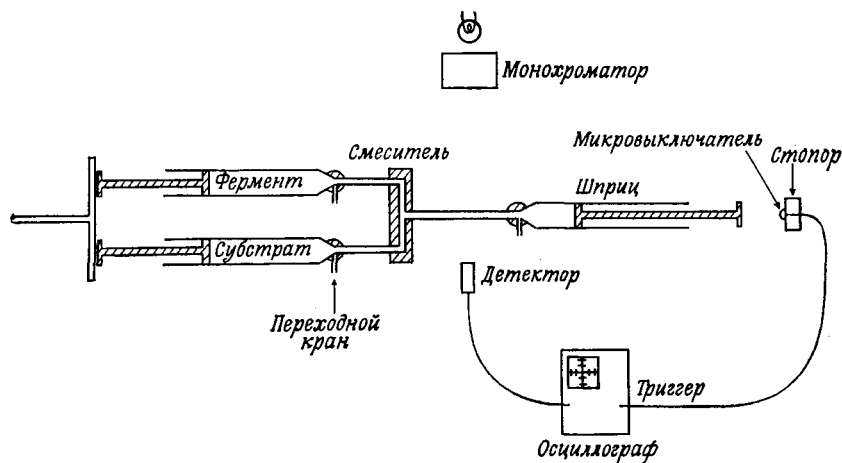


Рис. 4.2. Схема устройства, используемого в методе остановленной струи.

события, совершающиеся за прошедшие 1 мс. Возраст раствора в момент начала регистрации называется мертвым временем прибора.

Метод остановленной струи является рутинным лабораторным методом, тогда как метод непрерывной струи используется только в особых случаях. Для проведения всего цикла измерений с помощью метода остановленной струи достаточно 100—400 мкл раствора, при этом мертвое время составляет около 0,5 мс, а время регистрации может достигать нескольких минут (при наличии соответствующей аппаратуры). Применение метода непрерывной струи требует очень больших объемов, а регистрация должна проводиться только в течение ~ 100 мс, поскольку работать с более длинными трубками очень сложно. Дополнительные трудности связаны с тем, что сканирование должно проводиться по всей длине трубки.

Помимо проблем чисто технического плана, это ставит ряд принципиальных вопросов, в частности увеличение систематической ошибки в связи с неоднородностью размеров трубки и несовершенством ее термостатирования. Зато метод непрерыв-

ной струи имеет меньшее мертвое время — всего 100—200 мкс, поскольку отсутствуют трудности, связанные с механической остановкой струи; остановка происходит за доли миллисекунды и может привести к возникновению ударных волн, если осуществляется слишком резко. Второе преимущество данного метода состоит в том, что можно использовать инерционные детекторы, так как в каждой данной точке трубки возраст раствора постоянен. Этот фактор играл особенно большую роль в экспериментах Хартриджа и Роутона, которые использовали в качестве детектора ручной спектроскоп!

3. Метод быстрого «замораживания» струи

Чтобы не пользоваться для регистрации фотоумножителями или другими детекторами, растворы можно «заморозить» (на-

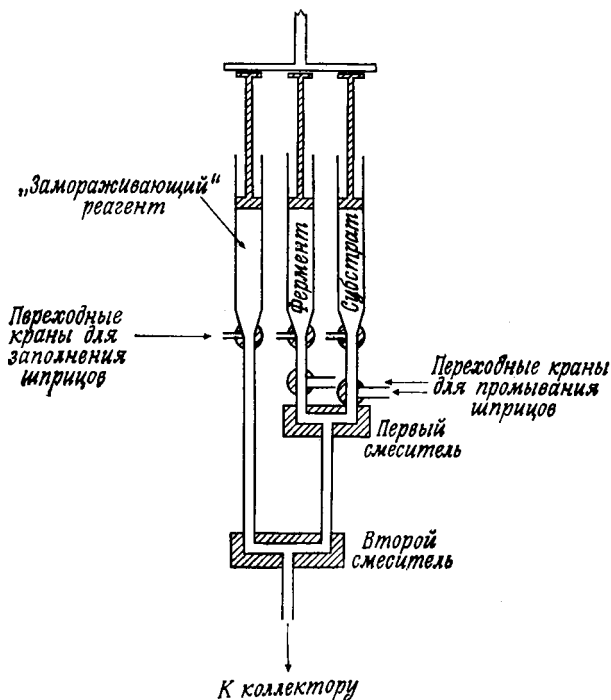


Рис. 4.3. Схема устройства, используемого в методе «замороженной» струи.

пример, добавив трихлоруксусную кислоту) и анализировать продукты реакции хроматографическими или какими-либо иными методами.

а. «Замороженная» струя

В простейшем варианте этот метод состоит в том, что конец реакционной трубки, используемой в методе непрерывной струи, погружают в сосуд с кислотой. Несколько более усовершенствованный вариант изображен на рис. 4.3. В этой установке имеется

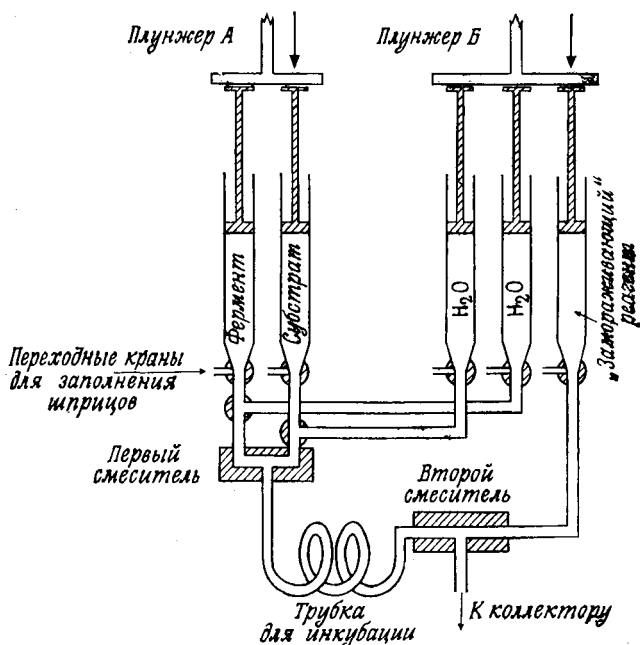


Рис. 4.4. Схема устройства, используемого в импульсном методе «замороженной» струи.

шприц с кислотой, которая смешивается с растворами реагентов во втором смесителе. Мертвое время устройства может составлять всего 4—5 мс. Однако максимальное время измерения при использовании малых объемов реагентов составляет около 100—150 мс; для его увеличения необходимы очень длинные реакционные трубки.

б. Импульсный метод замороженной струи

Временной интервал, в течение которого можно проводить регистрацию методом замороженной струи, может быть расширен с помощью приема, используемого в методе остановленной струи [5]. Как видно из рис. 4.4, сначала фермент и субстрат

смешивают и переводят в инкубационную трубку плунжером, приводимым в движение сжатым воздухом, а затем по прошествии некоторого времени (150 мс или больше) инкубируемую смесь вместе с порцией дистиллированной воды переводят вторым плунжером во второй смеситель, где и «замораживают».

Б. Релаксационные методы

1. Метод температурного скачка

Время перемешивания растворов налагает ограничения на мертвое время струевых методов. Единственный способ увеличить временное разрешение состоит в том, чтобы исключить

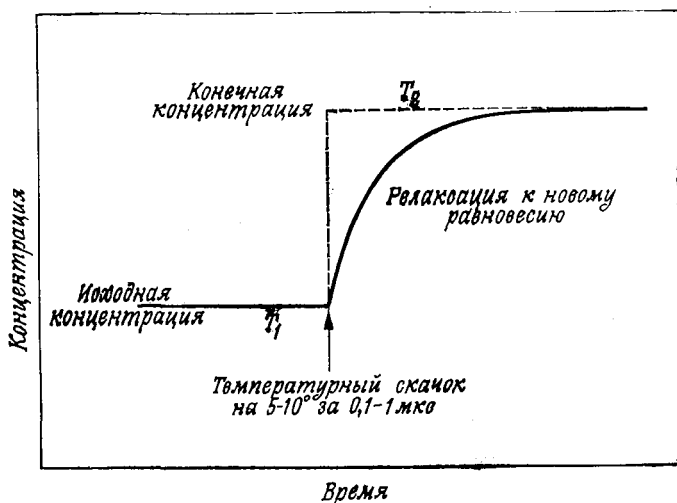


Рис. 4.5. Диаграмма, иллюстрирующая принцип метода температурного скачка.

смешивание и, имея равновесную смесь уже инкубированных реагентов, измерить каким-либо способом константы скорости.

Наиболее общий подход к этой проблеме состоит в использовании релаксационного метода. Систему выводят из состояния равновесия, а затем измеряют скорость установления нового равновесия (релаксация). Например, в методе температурного скачка [6] (рис. 4.5) раствор инкубируют в кювете спектрофотометра или флуориметра, а затем менее чем за 1 мкс повышают его температуру на $5-10^\circ$ с помощью разряда конденсатора (в самых последних установках за $10-100$ нс с помощью инфракрасного лазера). Если при этом изменяется энтальпия системы,

то смещается и положение равновесия. Переход системы к новому равновесию характеризуется в общем случае набором времен релаксации τ .

Ясно, что к системам, в которых протекают необратимые химические процессы, этот метод не применим. Наиболее ценен он для исследования простого связывания лигандов (например, связывания NAD^+ с дегидрогеназой, связывания ингибиторов) или для исследования конформационных изменений в белке. Предпринимались попытки объединить метод температурного скачка с методом остановленной струи.

2. Ядерный магнитный резонанс [7—10]

Иногда с помощью ЯМР можно измерить константы скорости *диссоциации* комплексов между ферментом и ингибитором. В сочетании с константами связывания для данной реакции это позволяет получить константы скорости ассоциации.

В. Анализ предстационарной кинетики и кинетики релаксационных процессов

В простых случаях дифференциальные уравнения для меняющихся со временем переходных процессов решаются относительно просто. Однако важно понимать, *почему* данному случаю соответствует именно данная форма решения. В настоящем разделе мы сосредоточим наше внимание на интуитивном подходе к решению этой проблемы. Понимание сути вещей поможет нам избежать ошибок в алгебраических выкладках, а кроме того, мы сможем находить решение для некоторых сложных кинетических схем просто по виду этих схем.

1. Простые экспоненциальные функции

а. Необратимые реакции

Предположим, что соединение А превращается в В с константой скорости первого порядка k_f и эта реакция идет до конца:



В таком случае

$$\frac{d[\text{A}]}{dt} = -k_f[\text{A}] \quad (4.2)$$

Интегрирование уравнения (4.2) дает

$$[A]_t = [A]_0 \exp(-k_f t), \quad (4.3)$$

где $[A]_0$ — начальная концентрация А. Поскольку

$$[A]_t + [B]_t = [A]_0, \quad (4.4)$$

то

$$[B]_t = [A]_0 \{1 - \exp(-k_f t)\}. \quad (4.5)$$

Как $[A]$, так и $[B]$ являются простыми экспоненциальными функциями.

Заметим, что время полупревращения $t_{1/2}$ для реакции, в которой $[A] = [B] = [A]_0/2$, задается уравнением

$$\exp(-k_f t) = \frac{1}{2}, \quad (4.6)$$

т. е.

$$t_{1/2} = \frac{0,6931}{k_f} = 0,6931\tau. \quad (4.7)$$

б. Метод начальных скоростей

Рассматривая более сложные примеры, мы воспользуемся *методом начальных скоростей*, чтобы проиллюстрировать физический смысл некоторых выражений. Этот метод часто применяется при изучении процессов, слишком медленных, чтобы использовать полное время реакции, а также в том случае, когда в системе протекают побочные реакции.

Начальная скорость v_0 реакции (4.1) равна

$$v_0 = k_f [A]_0. \quad (4.8)$$

Константа k_f определяется путем деления v_0 на ожидаемое изменение¹ концентрации реагента, следовательно,

$$k_f = v_0 / \Delta [A]_0. \quad (4.9)$$

в. Обратимые реакции

В этом случае А превращается в В не полностью, а концентрация А достигает равновесного значения.



¹ При полном завершении реакции. — *Прим. ред.*

Для данной реакции

$$K_{\text{eq}} = [B]/[A] = k_f/k_r \quad (4.11)$$

и

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_f[A] + k_r[B]. \quad (4.12)$$

Подставляя выражение для [B] из уравнения (4.4), получаем

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_f[A] + k_r([A]_0 - [A]) \quad (4.13)$$

Это уравнение можно проинтегрировать, разделив переменные и умножив каждую его часть на экспоненциальный множитель.

$$\frac{d[A]}{dt} + [A](k_f + k_r) = k_r[A]_0, \quad (4.14)$$

$$\frac{d[A]}{dt} \exp(k_f + k_r)t + [A](k_f + k_r) \exp(k_f + k_r)t = k_r[A]_0 \exp(k_f + k_r)t. \quad (4.15)$$

Отсюда

$$\frac{d}{dt} \{ [A] \exp(k_f + k_r)t \} = k_r[A]_0 \exp(k_f + k_r)t.$$

После интегрирования получаем

$$[A] \exp(k_f + k_r)t = \frac{k_r}{k_f + k_r} [A] \exp(k_f + k_r)t + \text{const}. \quad (4.16)$$

Используя начальные условия, состоящие в том, что при $t = 0$ $[A] = [A]_0$, а при $t = \infty$ равновесная концентрация A, $[A]_{\text{eq}}$, есть

$$[A]_{\text{eq}} = [A]_0 k_r / (k_f + k_r), \quad (4.17)$$

из уравнений (4.4) и (4.11) получаем решение

$$[A]_t = \frac{[A]_0}{k_f + k_r} [k_f \exp\{-(k_f + k_r)t\} + k_r] \quad (4.18)$$

Выражение (4.18) для изменения во времени концентрации реагента A можно разделить на различные множители. Первый из них — экспоненциальный член, который содержит константу скорости, или — в терминах релаксационной кинетики — величину, обратную времени релаксации $1/\tau$, равную

$$1/\tau = k_f + k_r, \quad (4.19)$$

а второй — амплитудный фактор

$$k_f / (k_f + k_r). \quad (4.20)$$

Для обратной реакции, т. е. для реакции, в которой исходным веществом является В, а не А, можно записать

$$[B]_t = \frac{[B]_0}{k_f + k_r} [k_r \exp \{-(k_f + k_r)t\} + k_f]. \quad (4.21)$$

Время релаксации для этого выражения такое же, как и для уравнения (4.18), но амплитудный множитель иной.

Первый важный момент, который необходимо отметить, состоит в том, что константа скорости для процесса приближения к равновесию больше каждой из индивидуальных констант скорости, k_f и k_r , и равна их сумме. Это легко понять, если проанализировать выражение для начальных скоростей. Начальная скорость в случае обратимой реакции (4.10) такая же, как и в случае необратимой (4.1), однако глубина последней реакции не столь велика, как первой. Например, до заметного накопления продукта В в системе будет присутствовать только реагент А, следовательно, уравнение

$$v_0 = k_f [A]_0$$

останется в силе.

Однако суммарное изменение $[A]$ определяется теперь уравнением

$$\Delta [A]_0 = [A]_0 - [A]_{\text{eq}}. \quad (4.22)$$

Подстановка выражения (4.17) дает

$$\Delta [A]_0 = [A]_0 k_f / (k_f + k_r), \quad (4.23)$$

откуда

$$1/\tau = v_0 / \Delta [A]_0 = k_f + k_r. \quad (4.24)$$

Второй момент состоит в том, что константы k_f и k_r нельзя определить, не зная амплитудный множитель.

Симметричность выражения для времени релаксации относительно констант скорости прямой и обратной реакций встречается во многих случаях, и, как правило, константы скорости мономолекулярных реакций нельзя рассчитать, не определив предварительно равновесные концентрации А и В. Позже мы увидим, что если реакция вследствие присутствия второго реагента является не мономолекулярной, а псевдомономолекулярной, то время релаксации будет зависеть от концентрации, что позволит устранить указанную выше трудность.

2. Связывание субстрата с ферментом



Если $[S] \gg [E]$, то имеет место реакция первого порядка, поскольку $[S]$ меняется лишь незначительно. Если константу скорости второго порядка для связывания фермента с субстра-

том обозначить через k_{on} , а константу скорости для диссоциации образующегося комплекса — через k_{off} , то уравнение (4.25) можно записать в более компактной форме:



Исходя из уравнения (4.19), получаем время релаксации для этой реакции:

$$1/\tau = k_{off} + k_{on}[S]. \quad (4.27)$$

Следует отметить два момента: а) когда константы скорости являются *псевдо*-мономолекулярными, время релаксации зависит от концентрации, так что k_{on} и k_{off} можно определить, не

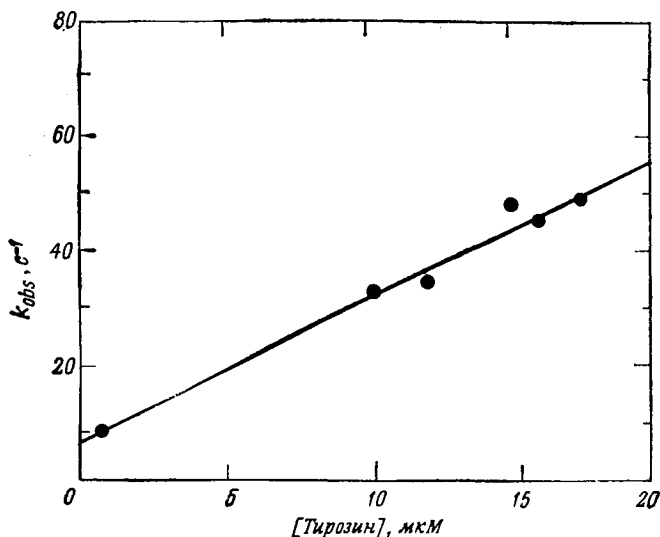


Рис. 4.6. Связывание тирозина тирозил-т-РНК—синтетазой из *B. stearotherophilus* [Fersht A. R., Mulvey R. S., Koch G. L. E., *Biochemistry*, 14, 13 (1975)].

зная амплитудного множителя; б) существует нижний предел для $1/\tau$: эта величина не может быть меньше k_{off} . Это налагает определенные ограничения на значения констант, которые можно измерить. С помощью чувствительного спектрофотометра, применяемого для регистрации в методе остановленной струи, можно измерить только константы скорости, не превышающие 1000 с^{-1} , а константы скорости диссоциации многих фермент-субстратных комплексов имеют более высокие значения.

Рассмотрим пример, приведенный на рис. 4.6. Константа скорости диссоциации комплекса тирозина с тирозил-тРНК — синтетазой невелика, а потому константы скорости ассоциации и диссоциации удается измерить методом остановленной струи. (Отметим, что иногда двухстадийный процесс можно ошибочно принять за рассмотренную выше одностадийную реакцию; см. разд. 6.)

В тех случаях, когда субстрат в фермент-субстратном комплексе не претерпевает химического превращения (например, в отсутствие косубстрата в мультисубстратной реакции) или когда речь идет о связывании ингибитора, метод температурного скачка является наиболее ценным методом определения констант скорости связывания лиганда.

3. Последовательные реакции

а. Необратимые реакции

Простейший случай последовательных реакций изображен на следующей схеме:



Используя уравнения материального баланса и способы интегрирования, примененные выше, нетрудно получить уравнения для изменения концентраций А, В и С во времени:

$$\begin{cases} [A] = [A]_0 \exp(-k_1 t), \\ [B] = \frac{[A]_0 k_1}{k_2 - k_1} \{ \exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t) \}, \\ [C] = [A]_0 \left[1 + \frac{1}{k_1 - k_2} \{ k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_2 t) \} \right]. \end{cases} \quad (4.29)$$

В — промежуточное соединение, которое образуется и затем исчезает. Если $k_1 \gg k_2$, то оно образуется с константой скорости k_1 , а затем медленно распадается с константой скорости k_2 . Если же $k_2 \gg k_1$, то В достигает стационарного уровня с константой скорости k_2 и медленно распадается с константой скорости k_1 . Парадокс состоит в том, что промежуточное соединение кажется образующимся с константой скорости его распада и распадающимся с константой скорости его образования. Это легко понять, проанализировав выражение для начальной скорости. При $k_1 \ll k_2$ концентрация соединения В достигает стационарного значения:

$$\frac{d[B]}{dt} = 0 = k_1 [A] - k_2 [B]. \quad (4.30)$$

Стационарная концентрация В дается уравнением

$$[B]_{SS} \approx \frac{k_1}{k_2} [A]_0 \quad (\text{т. е. } \ll [A]_0) \quad (4.31)$$

и

$$v_0 = k_1 [A]_0 \quad (4.32)$$

Отсюда

$$1/\tau = v_0/[B]_{SS} = k_2 \quad (4.33)$$

В последнем случае, когда $k_2 > k_1$, концентрация В очень низка, а в первом, при $k_1 > k_2$, В накапливается. Эти два случая можно дифференцировать, варьируя [В].

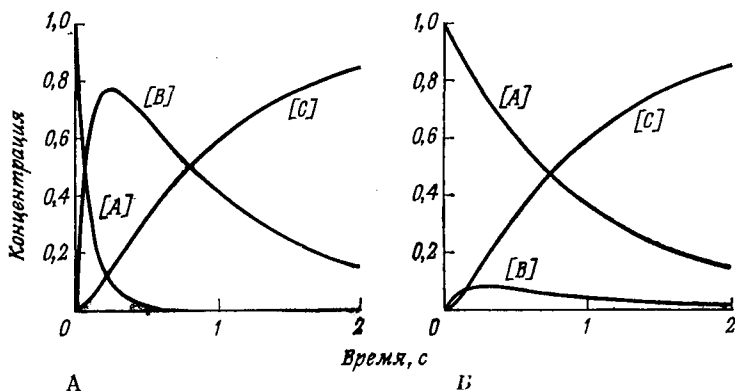
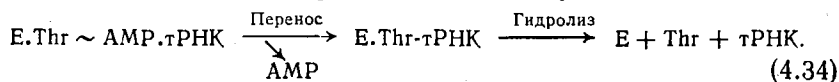


Рис. 4.7. Временные зависимости концентраций реагентов А, В и С для реакции $A \rightarrow B \rightarrow C$ [уравнение (4.28)]. А. $k_1 = 10 \text{ с}^{-1}$, $k_2 = 1 \text{ с}^{-1}$. Б. $k_1 = 1 \text{ с}^{-1}$, $k_2 = 10 \text{ с}^{-1}$. Заметим, что а) ход кривых для [С] в обоих случаях одинаков; б) кривые для [В] имеют одинаковую форму и различаются только амплитудой; в) концентрация вещества А в первом случае уменьшается в 10 раз быстрее, чем во втором. Таким образом, если не измерять концентрацию А, то различить эти два случая только на основании определения констант скорости нельзя.

Подобная ситуация иногда возникает в экспериментах по ренатурации белка, когда за кинетикой процесса следят по изменению его флуоресценции. При таких условиях выявить двухфазную кинетику нельзя, если только не известен квантовый выход образования промежуточного соединения, позволяющий определить его абсолютную концентрацию.

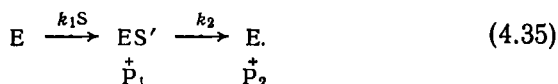
Пример применения рассмотренных выше уравнений приведен в гл. 7, разд. Г. Аминоацил-тРНК—синтетазы, специфически этерифицирующая молекулу тРНК, которая присоединяет валин, «исправляет» ошибку, в результате которой образуется аминоксиладенилат с треонином, по следующей схеме:



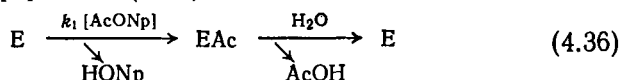
Как будет показано, скорость исчезновения $E.Thg \sim AMP.TPHK$ можно прямо измерить по скорости образования AMP , концентрация промежуточного соединения $E.Thg.TPHK$ определяется непосредственно, а вторая стадия (гидролиз) исследуется независимо, путем выделения неправильно этерифицированной $TPHK$ и добавления ее к ферменту.

б. Квазиобратимые реакции: стационарное состояние

Более общим случаем ферментативной реакции является процесс, протекающий согласно следующей схеме:



Например, химотрипсин реагирует с n -нитрофенилацетатом ($AcONp$) в соответствии с вышеприведенной схемой (когда для первой стадии $[AcONp] \ll K_s$) с образованием промежуточного соединения ацилфермента (EAc):



(для этой стадии $k_1 = k_{cat}/K_M$).

Поскольку ацилфермент постоянно образуется и распадается, его концентрация является стационарной (при условии, что $[AcONp] \gg [E]$). Стационарная концентрация ацилфермента задается уравнением

$$\frac{d}{dt} [EAc] = 0 = k_1 [AcONp] [E] - k_2 [EAc]_{SS}. \quad (4.37)$$

Далее, поскольку

$$[E] + [EAc] = [E]_0, \quad (4.38)$$

$$0 = k_1 [AcONp] ([E]_0 - [EAc]) - k_2 [EAc] \quad (4.39)$$

и

$$[EAc]_{SS} = \frac{k_1 [AcONp] [E]_0}{k_2 + k_1 [AcONp]}. \quad (4.40)$$

Воспользовавшись уравнением начальной скорости

$$v_0 = k_1 [E]_0 [AcONp], \quad (4.41)$$

получаем

$$1/\tau = v_0/[EAc]_{SS} = \quad (4.42)$$

$$= k_2 + k_1 [AcONp]. \quad (4.43)$$

Точно так же, как в случае обратимых реакций, промежуточное соединение образуется с константой скорости, которая

больше константы скорости превращения предшествующего промежуточного соединения.

Аналитическое выражение для накопления во времени HONp имеет вид

$$[\text{HONp}] = [\text{E}]_0 \left(\frac{k'_1}{k'_1 + k_2} \right) \left(\frac{k'_1}{k'_1 + k_2} \{1 - \exp[-(k'_1 + k_2)t]\} + k_2 t \right), \quad (4.44)$$

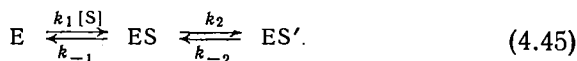
где $k'_1 = k_1 [\text{AcONp}]$. Если стадия ацилирования протекает в условиях насыщения, то $k'_1 = k_{\text{cat}} [\text{S}] / (K_M + [\text{S}])$.

В уравнении (4.44) имеется экспоненциальный член, становящийся пренебрежимо малым при $t \geq 5\tau$, и линейный, дающий в конце концов основной вклад в $[\text{HONp}]$.

в. Последовательные обратимые реакции

Нахождение общего решения для этого случая мы отложим до разд. 6. Здесь же рассмотрим ситуацию, когда одна из стадий протекает гораздо быстрее другой. При таких условиях времена релаксации для двух стадий существенно различаются и не налагаются друг на друга.

1. Быстрой является первая стадия (предравновесие)



Этот случай легко проанализировать, имея в виду два обстоятельства: а) должны существовать два времени релаксации — по числу стадий; б) поскольку скорости этих стадий существенно различаются, каждую из них можно рассматривать отдельно.

Первое время релаксации относится к стадии связывания. Оно задается уравнением, аналогичным уравнению (4.27):

$$\boxed{1/\tau_1 = k_{-1} + k_1 [\text{S}]} \quad (4.46)$$

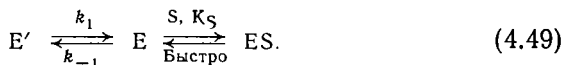
Второе время релаксации относится к медленной стадии. Она представляет собой обратимую реакцию, и по аналогии с уравнением (4.19) величина, обратная времени релаксации, представляет собой сумму констант скорости прямой и обратной реакций. Однако эффективная константа скорости прямой реакции равна k_2 , умноженной на долю фермента, находящегося в форме ES , т. е.

$$\boxed{1/\tau_2 = k_{-2} + \frac{k_2 [\text{S}]}{[\text{S}] + K_S}} \quad (4.47)$$

где

$$K_S = k_{-1}/k_1. \quad (4.48)$$

2. Быстрой является вторая стадия. Приведенная выше реакция может служить примером индуцируемого субстратом конформационного изменения фермента (где ES' — просто другое конформационное состояние) или примером накопления промежуточного соединения в ходе реакции. Следующая реакция дает пример смещения равновесия между двумя конформационными состояниями фермента, вызванного связыванием субстрата только одной из этих форм:



Такой механизм имеет место при связывании лигандов с химотрипсином; этот фермент находится в двух конформационных состояниях, но ароматические субстраты связывает только одна из форм. Можно показать (разд. 6), что

$$\boxed{1/\tau_2 = k_1 + k_{-1} \left(\frac{K_S}{[S] + K_S} \right)}. \quad (4.50)$$

Рассматриваемую ситуацию можно отличить от случая, когда быстрой является первая стадия, поскольку $1/\tau_2$ уменьшается с увеличением $[S]$. Это легко понять, проведя аналогию с необратимыми и обратимыми реакциями [уравнения (4.1) и (4.10)]. Ясно, что, когда концентрация S очень высока, реакция по существу необратима, поскольку форма E' полностью переводится в форму ES и, следовательно, $1/\tau_2$ стремится к k_1 . Аналогичным образом, когда $[S] \rightarrow 0$, концентрация ES становится очень малой и $1/\tau_2 \rightarrow k_1 + k_{-1}$. Следовательно, время релаксации зависит от концентрации.

4. Параллельные реакции

О параллельных реакциях говорят в тех случаях, когда соединение одновременно участвует в двух или более реакциях. Такая ситуация часто встречается в ферментативных реакциях, протекающих с образованием активированного промежуточного соединения, способного реагировать с несколькими конкурирующими акцепторами:



Кинетические уравнения для этого случая легко решаются путем интегрирования, однако весьма полезно получить их решения, исходя из интуитивных соображений. Очевидно, что уменьшение концентрации вещества А определяется константой скорости, являющейся суммой констант k_B и k_C , а скорость образования соединений В и С пропорциональна отношению соответствующей константы к сумме констант k_B и k_C . Поскольку скорости образования В и С зависят от концентрации А, оба эти соединения должны образовываться с константой скорости, равной константе скорости их исчезновения. Следовательно,

$$[A] = [A]_0 \exp [-(k_B + k_C) t], \quad (4.52)$$

$$[B] = \frac{[A]_0 k_B}{k_B + k_C} \{1 - \exp [-(k_B + k_C) t]\}, \quad (4.53)$$

$$[C] = \frac{[A]_0 k_C}{k_B + k_C} \{1 - \exp [-(k_B + k_C) t]\}. \quad (4.54)$$

Как и для обратимых реакций [уравнение (4.10)], время релаксации представляет собой сумму времен релаксаций для двух реакций.

Примеры параллельных реакций приведены в гл. 7 (атака различными нуклеофилами ацилхимотрипсина, кинетика которой исследована в стационарных и предстационарных условиях).

5. Вывод уравнений для метода температурного скачка

Рассмотрим в качестве иллюстрации связывание фермента с субстратом, протекающее в одну стадию:



Предположим, что вследствие изменения температуры происходит смещение равновесия, так что

$$[E] = [E]_{eq} + e, \quad (4.56)$$

$$[S] = [S]_{eq} + s, \quad (4.57)$$

$$[ES] = [ES]_{eq} + es, \quad (4.58)$$

где $[E]_{eq}$, $[S]_{eq}$ и $[ES]_{eq}$ — равновесные концентрации соответствующих соединений при новой температуре.

$$d[ES]/dt = k_1 ([E]_{eq} + e) ([S]_{eq} + s) - k_{-1} ([ES]_{eq} + es) = \quad (4.59)$$

$$= k_1 [E]_{eq} [S]_{eq} - k_{-1} [ES]_{eq} + k_1 ([E]_{eq} s + [S]_{eq} e + e \cdot s) - k_{-1} es. \quad (4.60)$$

Уравнение (4.60) можно упростить. Первые два члена в правой части взаимно уничтожаются, поскольку в равновесии они рав-

ны. Кроме того, так как реагенты сохраняются, $e = s = -es$. А поскольку концентрация $[ES]_{\text{eq}}$ постоянна, $d[ES]/dt = des/dt$. Следовательно,

$$-des/dt = k_1([E]es + [S]es + e \cdot s) + k_{-1}es. \quad (4.61)$$

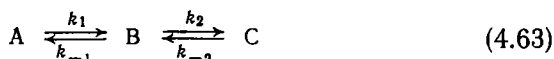
Далее, если смещение равновесия невелико, членом второго порядка малости, $e \cdot s$, можно пренебречь. В таком случае уравнение (4.61) удастся проинтегрировать и найти время релаксации:

$$1/\tau = k_1([E] + [S]) + k_{-1}. \quad (4.62)$$

Если равновесие смещается незначительно, то возвращение к равновесию всегда является процессом первого порядка, даже если концентрации реагентов близки.

6. Общее решение для двух последовательных обратимых реакций

Рассмотрим две последовательные реакции:



В этом случае необходимо решить *систему* линейных дифференциальных уравнений, что даст два времени релаксации:

$$1/\tau_1 = 1/2(p + q), \quad (4.64)$$

$$1/\tau_2 = 1/2(p - q), \quad (4.65)$$

где

$$p = k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}, \quad (4.66)$$

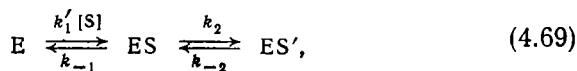
$$q = [p^2 - 4(k_1k_2 + k_{-1}k_{-2} + k_1k_{-2})]^{1/2}.$$

Эти основные уравнения могут быть использованы во многих случаях. Весьма полезно выразить константы скорости в виде сумм и произведений времен релаксации:

$$1/\tau_1 + 1/\tau_2 = k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}, \quad (4.67)$$

$$1/\tau_1\tau_2 = k_1k_2 + k_{-1}k_{-2} + k_1k_{-2}. \quad (4.68)$$

Эти уравнения легко решаются, если имеется концентрационная зависимость времени релаксации. Например, если реакционная последовательность представляет собой ряд превращений псевдопервого порядка:



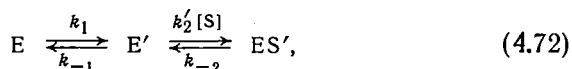
то k_1 в уравнениях (4.67) и (4.68) можно заменить на $k'_1[S]$. Кроме того, по аналогии с уравнением (4.62) для метода температурного скачка, константу k_1 при исследовании релаксации можно заменить на $k'_1([S] + [E])$.

Если одно из времен релаксации много больше другого, уравнения (4.67) и (4.68) упрощаются. Например, если первая стадия протекает гораздо быстрее, чем вторая, то в уравнении (4.67) членами $1/\tau_2$ и $(k_2 + k_{-2})$ можно пренебречь. В этом случае τ_2 определяется подстановкой (4.67) в (4.68). Для метода температурного скачка получаем

$$1/\tau_1 = k'_1([E] + [S]) + k_{-1}, \quad (4.70)$$

$$1/\tau_2 = k_{-2} + \frac{k_2([E] + [S])}{k_{-1}/k'_1 + ([E] + [S])}. \quad (4.71)$$

Аналогичные выкладки можно провести и для последовательности



где первая стадия является медленной. В этом случае мы получаем:

$$1/\tau_1 = k_{-2} + k'_2([E] + [S]), \quad (4.73)$$

$$1/\tau_2 = k_1 + \frac{k_{-1}\{(k_{-2}/k'_2) + [E']\}}{k_{-2}/k'_2 + ([E'] + [S])}. \quad (4.74)$$

Отметим два важных с практической точки зрения момента. Кинетические механизмы (4.69) и (4.72) можно различить, используя концентрационную зависимость $1/\tau_2$. Для механизма (4.69) $1/\tau_2$ при увеличении $[S]$ возрастает, а для механизма (4.72) — уменьшается. Однако в некоторых случаях провести такую дифференциацию не удастся. Например, если для механизма (4.72) $[E'] \gg [E]$, то быстро образуется какое-то количество ES' с временем релаксации τ_1 , затем по мере превращения E в E' скорость образования ES' замедлится и процесс будет характеризоваться временем релаксации τ_2 . Концентрационная зависимость τ_2 будет слабой, поскольку при $[E'] \gg [E]$ $k_1 \gg k_{-1}$ (рис. 4.8). В этой ситуации механизм (4.72) можно ошибочно принять за механизм (4.69), если в последнем количестве образующегося ES' мало. Кроме того, при $k_{-2} \gg k_2$ концентрационная зависимость $1/\tau_2$ для механизма (4.69) слабая. В обоих случаях амплитуды изменений слишком малы, чтобы можно было точно измерить константы скорости.

Более общий случай, с трудом поддающийся анализу,— это двухстадийное связывание субстрата ферментом [схема (4.69)] при условии, что константа диссоциации для первой стадии,

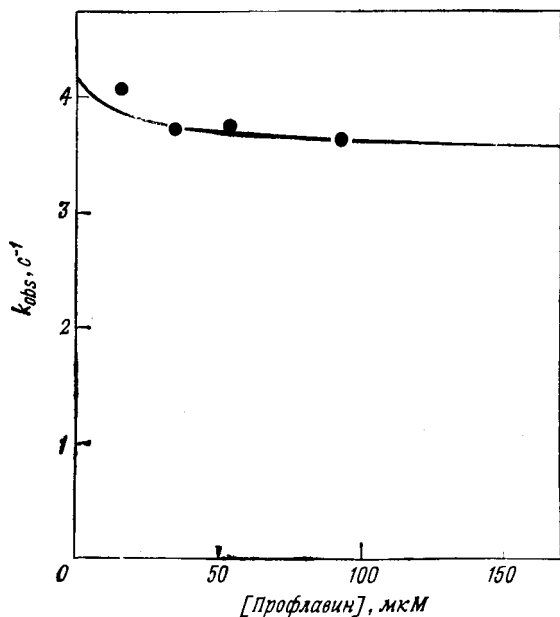
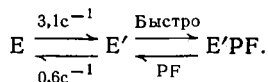


Рис. 4.8. График, показывающий невозможность дифференциации механизмов (4.69) и (4.72) с помощью уравнений (4.71) и (4.74). Приведена зависимость константы скорости для связывания профлавина α -химотрипсином при рН 6,84 и 25 °С от концентрации профлавина. Реакция протекает согласно следующему уравнению:



[Ferscht A. R., Requena Y., J. mol. Biol., 60, 279 (1971).] Константа скорости уменьшается с увеличением концентрации профлавина в соответствии с уравнением (4.19), однако это уменьшение невелико — максимум на 19%.

k_{-1}/k'_1 , велика. Если измерения проводятся только в той области, где $k_{-1}/k'_1 > ([E] + [S])$, то уравнение (4.71) сводится к виду ¹

$$1/\tau_2 = k_{-2} + k'_1 (k_2/k_{-1}) ([E] + [S]). \quad (4.75)$$

¹ Уравнение (4.71) было выведено в предположении, что $k_{-1} \gg k_2$. Если k_2 сравнима с k_{-1} , уравнение (4.75) преобразуется к виду

$$1/\tau_2 = k_{-2} + \frac{k'_1 k_2}{k_{-1} + k_2} ([E] + [S]).$$

Данное выражение имеет такой же вид, как и для случая простого одностадийного связывания субстрата ферментом [уравнение (4.62)], что может привести к ошибочным выводам. В этом случае расчет константы скорости связывания дает $k'_1 (k_2/k_{-1})$, т. е. величину, меньшую истинной константы скорости k'_1 . Занижение значений некоторых констант скорости

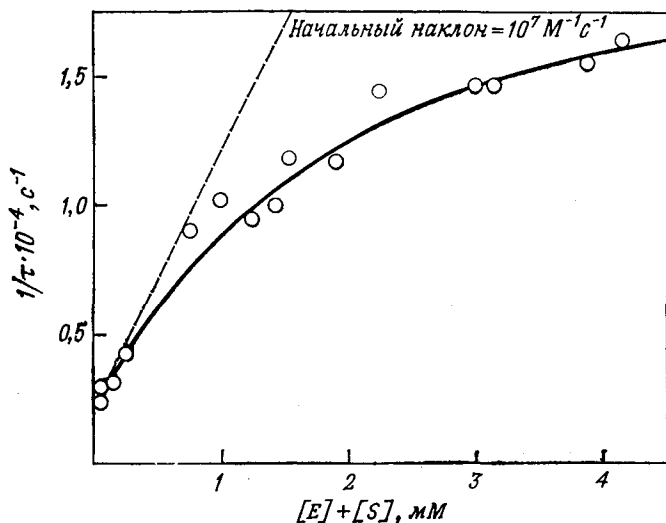


Рис. 4.9. Связывание лизоцима с (N-ацетилглюкозамино)₂. Температуру раствора, представляющего собой смесь фермента (0,03—0,2 мМ) и лиганда (0,02—4,1 мМ), резко поднимали от 29 до 38° С (рН 6). Низкой концентрации субстрата соответствует линейная часть кривой; получающаяся отсюда кажущаяся константа скорости второго порядка для связывания равна $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Однако измерения при более высоких концентрациях показывают, что кривая выходит на плато; это означает, что процесс протекает в две стадии.

(табл. 4.3), несомненно, обусловлено этим обстоятельством. Измерения всегда следует проводить вплоть до высоких концентраций субстратов, когда скорость реакции выходит на предельный уровень, предсказываемый уравнением (4.71) (рис. 4.9; см. также рис. 7.10).

7. Экспериментальное исследование кинетики переходных процессов

Ниже (гл. 7) мы рассмотрим ряд примеров успешного применения исследования кинетики переходных процессов для выяснения механизма ферментативных реакций, а пока кратко обсудим стратегию и тактику, применяемую при постановке

таких опытов. Во многих случаях, приступая к этим исследованиям, экспериментатор имел перед собой четкую задачу, которую он хотел решить. В других случаях исследование проводилось просто с целью накопления информации. Как бы то ни было, всегда необходимы воображение и умение продумать и поставить эксперимент. При этом весьма полезен следующий систематический подход.

Анализ времени релаксации можно разделить на две основные части:

1. Следует отнести время релаксации к определенному физическому событию.

2. Это физическое событие необходимо «встроить» в общий кинетический механизм изучаемого процесса.

Рассмотрим два примера. Первый пример — исследование связывания лиганда ферментом в ходе некатализируемой реакции. При этом могут произойти два физических события: связывание и индуцируемое лигандом конформационное изменение фермента. Чтобы установить число промежуточных стадий и определить соответствующие им константы скорости, прежде всего необходимо определить число времен релаксации и найти их концентрационную зависимость. В идеальном случае число времен релаксации будет равно числу стадий данной реакции. Если найдено даже одно время релаксации и его концентрационная зависимость нелинейна, это может означать, что процесс протекает в две стадии [например, уравнения (4.71) и (4.74)]. Далее стоит воспользоваться *несколькими* физическими методами (например, исследовать флуоресценцию и поглощение лиганда и белка), поскольку некоторые стадии могут быть выявлены только с помощью *одного* из этих методов. В ходе рассматриваемой реакции могут протекать и другие физические процессы, например отдача или присоединение протона или изменение степени агрегации белка. В первом случае весьма полезен еще один метод — измерение рН, для чего можно использовать просто цветные индикаторы. Агрегация осложняет кинетические исследования, однако ее можно обнаружить и количественно охарактеризовать, что также даст дополнительную информацию. Для исследования простых реакций релаксационные методы часто оказываются эффективнее струевых, поскольку позволяют изучать более быстрые процессы. Однако иногда метод остановленной струи более ценен, например, при исследовании процессов, слишком медленных, чтобы применять метод температурного скачка. Кроме того, некоторые эксперименты (такие, как исследование влияния сильных изменений рН) можно осуществить только в том случае, если использовать методы, включающие быстрое смешивание реагентов (хотя небольшого изменения рН можно добиться, применив метод темпера-

Очевидно, что если стадия, характеризующаяся константой k'_1 , протекает очень быстро, а стадия с константой k_2 — крайне медленно, то высвобождение P_1 легко зарегистрировать и связать его количество с концентрацией фермента. Однако на практике k_2 редко бывает пренебрежимо малой величиной, поскольку за начальным всплеском концентрации P_1 следует постепенное накопление этого продукта по мере превращения промежуточного соединения. Математически эта ситуация была

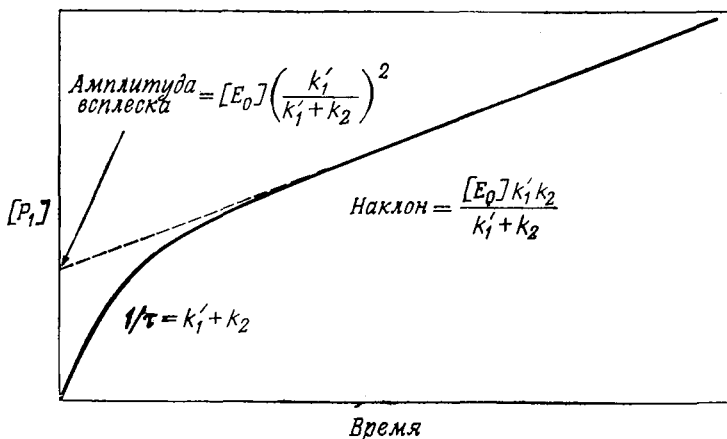


Рис. 4.10. Принцип титрования активных центров.

описана ранее [уравнения (4.35) — (4.44)]. Было показано, что всюду, за исключением начального периода, суммарное количество высвобождаемых продуктов зависит от времени линейно. Из уравнения (4.44) видно, что линейная экстраполяция к нулевому моменту временно дает амплитуду всплеска π , которая определяется выражением

$$\pi = [E]_0 \left\{ \frac{k'_1}{k'_1 + k_2} \right\}^2. \quad (4.77)$$

Отметим, что амплитуда связана с константами скорости квадратичной зависимостью. Если отношение k'_1/k_2 достаточно велико, то квадратичный член близок к единице и амплитуда всплеска концентрации продукта равна концентрации фермента. В противном случае концентрация будет занижена, если только не будут измерены и подставлены в уравнение (4.77) обе константы скорости.

2. Зависимость амплитуды всплеска от концентрации субстрата

Константа k'_1 , входящая в уравнение (4.76), представляет собой кажущуюся константу скорости первого порядка для реакции образования промежуточного соединения при данных ус-

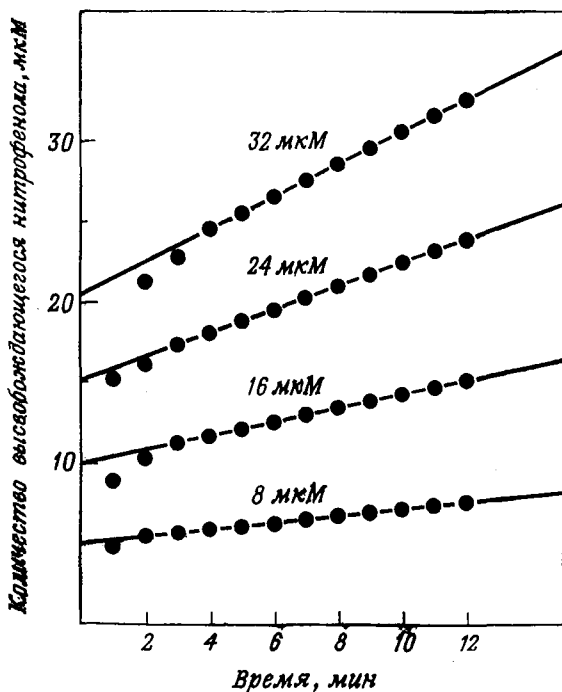


Рис. 4.11. «Начальное» титрование активных центров [Hartley V. S., Kilby V. A., Biochem. J., 56, 288 (1954)]. Химотрипсин в указанных на рисунке концентрациях смешивали с *p*-нитрофенилэтилкарбонатом ($\text{EtOCO}_2\text{—C}_6\text{H}_4\text{—NO}_2$). Ацилфермент E—O—COOEt образовывался быстро, а гидролизировался медленно. Отметим, что во время всплеска высвобождается около 0,63 моль *p*-нитрофенола на 1 моль фермента. Либо чистота (активность) фермента составляла только 63%, либо константа скорости образования ацилфермента не настолько превышает константу скорости деацилирования, чтобы ацилфермент мог накапливаться.

ловиях. Обычно в таких случаях применимо уравнение Михаэлиса — Ментен, т. е.

$$k'_1 = k_{\text{cat}} [S] / ([S] + K_M), \quad (4.78)$$

где k_{cat} и K_M относятся к первой стадии. При достаточно малых концентрациях S всплеск отсутствует, а при более высоких и при

условии, что k_{cat} много больше k_2 , вновь появляется. Подставляя (4.78) в (4.77), получаем

$$\frac{1}{\sqrt{\pi}} = \frac{1}{\sqrt{[E]_0}} \left[1 + \frac{k_2}{k_{\text{cat}}} + \frac{K_M k_2}{[S] k_{\text{cat}}} \right]. \quad (4.79)$$

Если $k_{\text{cat}} \gg k_2$, то уравнение (4.79) можно использовать для экстраполяции амплитуды всплеска к малым концентрациям S , исходя из значений, полученных при различных концентрациях субстрата. Очевидно, что когда k_2 не является пренебрежимо малой величиной, следует соблюдать осторожность, чтобы не получить заниженное значение концентрации фермента.

3. Определение концентрации активных центров, исходя из анализа скорости ферментативной реакции

Титрование активных центров применимо не всегда, поскольку для этого необходимо, чтобы в ходе реакции накапливалось

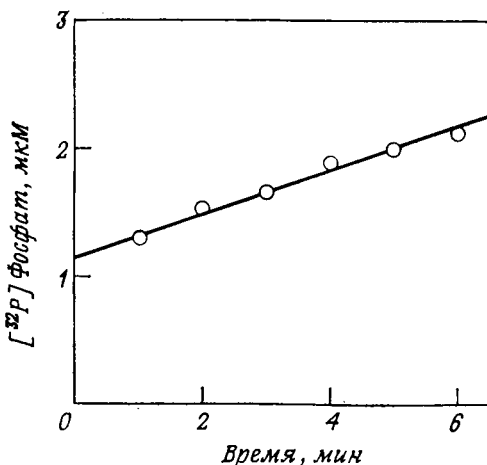
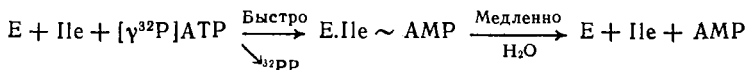


Рис. 4.12. Титрование активных центров изолейцил-тРНК-синтазы с использованием только 10 мкг (100 пмоль) фермента (0,1 мл 1 мкМ раствора фермента). Последовательность реакций такова:



[Fersht A. R., Kaethner M. M., Biochemistry, 15, 818 (1976).]

промежуточное соединение. Чаще концентрацию активных центров определяют с помощью анализа скорости реакции. Недостаток этого метода состоит в том, что он не позволяет найти

абсолютную концентрацию фермента, если не проведена калибровка по данным титрования активных центров. Кроме того, скорость реакции зависит от условий. Если в данной лаборатории эти условия могут поддерживаться более или менее постоянными, то от лаборатории к лаборатории они чаще всего варьируют. Для спектрофотометрического титрования активных центров необходимо несколько миллиграммов фермента; при использовании радиоактивной метки это количество можно уменьшить в 1000 раз [11]. Метод титрования активных центров с его относительной нечувствительностью к условиям, в которых проводится реакция, и возможностью определять абсолютные концентрации фермента наиболее ценен для получения воспроизводимых данных и для сравнения констант скорости, полученных с помощью стационарной и предстационарной кинетики. (Для стационарной кинетики константа скорости обычно включает экспоненциальный член, не зависящий от концентрации фермента, тогда как для стационарной кинетики константа скорости прямо пропорциональна концентрации.)

Часть 2. ПОРЯДОК ВЕЛИЧИН КОНСТАНТ СКОРОСТИ ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

А. Верхний предел констант скорости [12]

1. Ассоциация и диссоциация

Для анализа констант скорости химических реакций лучше всего использовать *теорию столкновений*. Константа скорости бимолекулярной реакции представляет собой произведение трех сомножителей: частоты соударений Z , стерического фактора p , равного доле молекул, имеющих необходимую ориентацию, и экспоненциального члена, в который входит энергия активации и который равен доле молекул, обладающих достаточной энергией:

$$k_2 = Zp \exp(-E_A/RT). \quad (4.80)$$

Когда энергия активации равна нулю, а стерический фактор — единице, константа скорости бимолекулярной реакции имеет максимальное значение. В таком случае говорят, что скорость процесса *лимитируется диффузией* и равна частоте межмолекулярных столкновений. Предположив, что реагирующие молекулы представляют собой незаряженные сферические частицы радиусами r_a и r_b , мы можем рассчитать частоту столкновений по следующей формуле:

$$Z = (2RT/3000\eta) (r_a + r_b)^2/r_a r_b, \quad (4.81)$$

где η — вязкость среды. Для двух молекул одинакового радиуса частота соударений в воде при 25°C равна $7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Следует отметить, что две большие молекулы сталкиваются точно с такой же частотой, как и две малые. Это обусловлено тем, что увеличение площади мишени точно компенсируется уменьшением скорости диффузии крупных молекул. Однако частота столкновения небольшой молекулы с большой выше частоты для двух предыдущих случаев, поскольку имеют место оба упомянутых фактора — увеличение площади (за счет большой молекулы) и увеличение подвижности (за счет малой). Более сложные расчеты, учитывающие с одной стороны электростатическое взаимодействие между молекулами, которое увеличивает частоту соударений, а с другой — влияние геометрии небольшой молекулы на частоту ее столкновения с молекулой большого размера, дают диапазон частот 10^9 — $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Аналогичным образом устанавливается верхний предел для констант скорости диссоциации бимолекулярных комплексов — 10^9 — 10^{12} с^{-1} . Экспериментально показано, что многие константы скорости второго порядка для реакций, протекающих без участия протонов или гидроксил-ионов, имеют величину порядка $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

2. Химические процессы

Верхний предел для констант скорости любых моно- или внутримолекулярных реакций равен частоте молекулярных колебаний — 10^{12} — 10^{13} с^{-1} .

3. Перенос протона

Перенос протона между такими электроотрицательными атомами, как O, N или S, совершается чрезвычайно быстро. Бимолекулярные реакции обычно лимитируются диффузией, и константы скорости имеют порядок 10^{10} — $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (табл. 4.1). Например, константа скорости переноса протона от H_3O^+ на имидазол, который является более сильным основанием, чем H_2O (и потому такой перенос благоприятен), равна $1,5 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Константу скорости обратной реакции — переноса протона от имидазолий-иона на молекулу воды — можно вычислить из разности pK_a этих соединений с помощью следующих уравнений:

$$\frac{[\text{B}][\text{H}^+]}{[\text{BH}^+]} = K_a, \quad \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{HA}]} = K'_a; \quad (4.82)$$

$$\frac{[\text{B}][\text{HA}]}{[\text{BH}^+][\text{A}^-]} = K_a/K'_a; \quad (4.83)$$

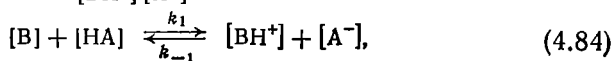


Таблица 4.1

Константы скорости переноса протона, $M^{-1} c^{-1}$; 25 °C ^{a)}

H^+ и	k	OH^- и	k
OH^-	$1,4 \cdot 10^{11}$		
Анионы неорганических кислот	$10^{10} - 10^{11}$	Неорганические кислоты	$\sim 10^{10}$
Карбоксилаты	$\sim 5 \cdot 10^{10}$	Карбоксильные кислоты	$\sim 10^{10}$
Феноляты	$\sim 5 \cdot 10^{10}$	Фенолы	$\sim 10^{10}$
Еноляты	$\sim 5 \cdot 10^{10}$	Енолы	$\sim 10^{10}$
Амины	10^{10}	Ионы аммония	$\sim 3 \cdot 10^{10}$
Карбанионы	$< 1 - 10^{10}$	Карбоновые кислоты	$< 1 - 10^9$
		Фосфорные кислоты	$10^8 - 10^{10}$

^{a)} Eigen M., Nobel Symposium, 5. 245 (1967).

откуда

$$k_{-1}/k_1 = K_a/K'_a \quad (4.85)$$

Рассчитанная таким образом константа скорости переноса протона от имидазолий-иона ($pK_a = 6,95$) на молекулу воды ($[H_2O] = 55 M$, $pK_a = -1,74$) равна $1,7 \cdot 10^3 c^{-1}$.

Перенос протона от карбоновых кислот на карбоновые основания обычно происходит гораздо медленнее. Обусловлено это тем, что более низкая электроотрицательность углеродного атома требует стабилизации отрицательного заряда на карбоновом основании путем делокализации электрона. Последующая перестройка структуры и влияние растворителя могут замедлить результирующую скорость переноса.

Одно время считалось, что скорость установления равновесия между кислотами и основными каталитическими группами фермента и растворителем устанавливает верхний предел числа оборотов для катализируемых кислотами и основаниями реакций, равный $10^9 c^{-1}$. Объяснялось это тем, что константа скорости переноса протона от имидазолий-иона на молекулу воды и от воды на имидазол составляет $\sim 2 \cdot 10^3 c^{-1}$. Однако перенос протонов между имидазолом или имидазолий-ионом и молекулами буфера в растворе совершается с константами скорости, во много раз превышающими указанную величину. Например, в случае АТР, pK_a которого равен pK_a имидазола, константа скорости составляет $\sim 10^9 M^{-1} c^{-1}$ (при концентрации АТР в клетке около 2 мМ). Имеется и ряд других метаболитов, присутствующих в клетке в миллимолярных концентрациях, которые содержат соответствующие кислые и основные группы, в результате чего

равновесие между каталитическими группами фермента и растворителем может устанавливаться со скоростью 10^7 — 10^8 с⁻¹ или выше. Числа оборотов ферментов обычно существенно ниже этого значения — они лежат в диапазоне 10 — 10^3 с⁻¹, хотя число оборотов карбоангидразы и каталазы равно 10^6 и $4 \cdot 10^7$ с⁻¹ соответственно. Свойства карбоангидразы рассмотрены в гл. 12, разд. Е.

Таблица 4.2

Константы скорости переноса протона на имидазол
и от имидазолий-иона ($pK_a = 6,95$)^{a)} [12]

Донор (DH ⁺)	pK_a	k (DH ⁺ → Im), M ⁻¹ с ⁻¹	k (ImH ⁺ → D), M ⁻¹ с ⁻¹
H ₃ O ⁺	-1,74	$1,5 \cdot 10^{10}$	31
H ₂ O	15,74	45	$2,3 \cdot 10^{10}$
CH ₃ CO ₂ H	4,76	$1,2 \cdot 10^9$	$7,7 \cdot 10^8$
НАТР ³⁻	6,7	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$
<i>n</i> -Нитрофенол	7,14	$4,5 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^8$
HP ₂ O ₇ ³⁻	8,45	$1,1 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^9$
Фенол	9,95	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^{10}$
CO ₃ ²⁻	10,33	$1,9 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^{10}$
Глюкоза	12,3	$1,6 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{10}$

a) T = 25 °C ионная сила = 0. Скорость в случае H₂O рассчитана при [H₂O] = 55 M.

Б. Константы скорости ферментативных реакций и лимитирующие процессы

1. Ассоциация ферментов и субстратов

Согласно расчетам, лимитируемые диффузией частоты столкновений фермента и субстрата должны быть порядка 10^9 M⁻¹ с⁻¹. Приведенные же в табл. 4.3 наблюдаемые частоты в основном лежат в интервале 10^6 — 10^8 M⁻¹ с⁻¹. Наиболее высокие значения приближаются к величинам, лимитируемым диффузией, но самые низкие лежат существенно ниже этого предела. В одних случаях это может быть обусловлено необходимостью десольватации, в других (что более вероятно) — тем, что процесс на самом деле является двухстадийным, а считается одностадийным. Например, при низких концентрациях лизоцим связывает NAG₂ с константой скорости $\sim 5 \cdot 10^6$ M⁻¹ с⁻¹. Однако измерения при более высоких концентрациях показывают, что связывание

Таблица 4.3

Константы скорости ассоциации и диссоциации фермент-субстратных комплексов

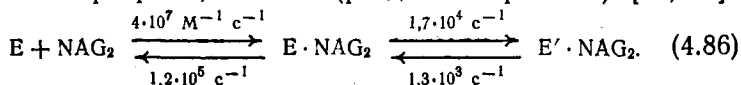
Фермент	Субстрат	k_1 , $M^{-1} c^{-1}$	k_{-1} , c^{-1}	Источник данных ^{в)}
<i>Небольшие лиганды</i>				
Каталаза	H ₂ O ₂	5 · 10 ⁶		1
Каталаза-H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	1,5 · 10 ⁷		1
Химотрипсин	Профлавин	1,2 · 10 ⁸	8,3 · 10 ³	2
	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир ацетил-L-триптофана	6 · 10 ⁷	6 · 10 ⁴	3
	Фурилакритоил-L-триптофана мид	6,2 · 10 ⁶		4
	Трифторацетил-D-триптофан	1,5 · 10 ⁷		5
Креатинкиназа	ADP	2,2 · 10 ⁷	1,8 · 10 ⁴	6
	MgADP	5,3 · 10 ⁶	5,1 · 10 ³	
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	NAD	1,9 · 10 ⁷	1 · 10 ³	7
		1,4 · 10 ⁶	2,1 · 10 ²	
Лактатдегидрогеназа (из мышц кролика)	NADH	~ 10 ⁹	~ 10 ⁴	8
Лактатдегидрогеназа (из сердца свиньи)	NADH	5,5 · 10 ⁷	39	9
	Оксамат	8,1 · 10 ⁶	17	9
Алкогольдегидрогеназа печени	NADH	2,5 · 10 ⁷	9	10
Лизоцим	(NAG) ₂	4 · 10 ⁷	1 · 10 ⁵	11, 12
Малатдегидрогеназа	NADH	5 · 10 ⁸	50	13
Пируваткарбоксилаза-Mn ²⁺	Пируват	4,5 · 10 ⁶	2,1 · 10 ⁴	14
Рибонуклеаза	Уридин-3' фосфат	7,8 · 10 ⁷	1,1 · 10 ⁴	15
	Уридин-2', 3'-циклофосфат	1 · 10 ⁷	2 · 10 ⁴	16
Тирозил-тРНК-синтетаза	Тирозин	2,4 · 10 ⁶	24	17
<i>Белок-нуклеиновые кислоты</i>				
Фенилаланил-тРНК-синтетаза	тРНК ^{Phe}	1,6 · 10 ⁸	27	18
Серил-тРНК-синтетаза	тРНК ^{Ser}	2,1 · 10 ⁸	11	19
Тирозил-тРНК-синтетаза	тРНК ^{Tyr}	2,2 · 10 ⁸	1,5	20
		1,4 · 10 ⁸	58	

Продолжение

Фермент	Субстрат	$k_1, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	k_{-1}, c^{-1}	Источник данных а)
Белок — белок				
Трипсин	Основной панкреатический ингибитор трипсина	$1,1 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^{-8}$	21
Ангидротрипсин		$7,7 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^{-8}$	21
Трипсин	Панкреатический секреторный ингибитор трипсина	$6,8 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	21
Ангидротрипсин		$4 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	21
Инсулин	Инсулин	$1,2 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^4$	22
β -Лактоглобулин	β -Лактоглобулин	$4,7 \cdot 10^4$	2,1	22
α -Химотрипсин	α -Химотрипсин	$3,7 \cdot 10^3$	0,68	22

- а) 1—Chance B. In: Currents in biochemical research (ed. Green D. E.), John Wiley, p. 308 (1956).
 2—Quast U., Engel J., Neumann H., Krause G., Steffen E., Biochemistry, 13, 2512 (1974).
 3—Renard M., Fersht A. R., Biochemistry, 12, 4713 (1973).
 4—Hess G. P., McConn J., Ku E., McConkey G., Phil. Trans. R. Soc., B257, 89 (1970).
 5—Smallcombe S. H., Ault B., Richards J. H., J. Am. chem. Soc., 94, 4585 (1972).
 6—Hammes G. G., Hurst J. K., Biochemistry, 8, 1083 (1969).
 7—Kirschner K., Eigen M., Bittman R., Volgt B., Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., 56, 1661 (1966).
 8—Czerlinski G. H., Schreck G., J. biol. Chem., 239, 913 (1964).
 9—D'A Heck H., J. biol. Chem., 244, 4375 (1969).
 10—Shore J. D., Gutfreund H., Biochemistry, 9, 4655 (1970).
 11—Holler E., Rupley J. A., Hess G. P., Biochem. biophys. Res. Commun., 37, 423 (1969).
 12—Baldo J. H., Halford S. E., Patt S. L., Sykes B. D., Biochemistry, 14, 1893 (1975).
 13—Czerlinski G., Schreck G., Biochemistry, 3, 89 (1963).
 14—Mildvan A. S., Scrutton M. C., Biochemistry, 6, 2978 (1967).
 15—Hammes C. G., Walz F. G., Jr., J. Am. chem. Soc., 91, 7179 (1969).
 16—del Rosario E. J., Hammes C. G., J. Am. chem. Soc., 92, 1750 (1970).
 17—Fersht A. R., Mulvey R. S., Koch G. L. E., Biochemistry, 14, 13 (1975).
 18—Krauss G., Römer R., Riesner D., Maass G., FEBS Letts., 30, 6 (1973).
 19—Pingoud A., Riesner D., Boehme D., Maass G., FEBS Letts., 30, 1 (1973).
 20—Pingoud A., Boehme D., Riesner D., Kownatski R., Maass G., Eur. J. Biochem., 59, 617 (1975).
 21—Vincent J.-P., Peron-Renner M., Pudles J., Lazdunski M., Biochemistry, 13, 4205 (1974).
 22—Koren R., Hammes C. G., Biochemistry, 15, 1165 (1976).

текает в две стадии с константой скорости ассоциации $4 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ при pH 4,4 и 31°C (разд. В.6 и рис. 4.9) [10, 13]:



2. Параметр k_{cat}/K_M может определяться частотой столкновений между ферментом и субстратом

Из табл. 4.4 видно, что для некоторых ферментов, обладающих высокой каталитической активностью, параметр k_{cat}/K_M может достигать $3 \cdot 10^8 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$. В подобных случаях этот параметр,

Таблица 4.4

Ферменты, для которых k_{cat}/K_M близко к лимитируемой диффузией скорости ассоциации

Фермент	Субстрат	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_M, \text{М}$	$k_{\text{cat}}/K_M, \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$	Источ- ник дан- ных ^а
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин	$1,4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^8$	1
Карбоангидраза	CO_2	$1 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$8,3 \cdot 10^7$	2
	HCO_3^-	$4 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^7$	3
Каталаза	H_2O_2	$4 \cdot 10^7$	1,1	$4 \cdot 10^7$	4
Кротоназа	Кротонил-СоА	$5,7 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^8$	5
Фумараза	Фумарат	$8,0 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^8$	6
	Малат	$9,0 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^7$	6
Триозофосфатизомераза	Глицеральдегид-3-фосфат	$4,3 \cdot 10^3$	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{10}$	7

^а 1—Posenberry T. I., Adv. Enzymol., 43, 103 (1975).

2—Kernohan J. C., Biochim. biophys. Acta, 81, 346 (1964).

3—Kernohan J. C., Biochim. biophys. Acta, 96, 304 (1965).

4—Ogura Y., Archs Biochem. Biophys., 57, 288 (1955).

5—Waterson R. M., Hill P. L., Fedn Proc., 30, 1114 (1971).

6—Teipel J. W., Hass G. M., Hill R. L., J. biol. Chem., 243, 5684 (1968).

7—Putman S. J., Coulson A. F. W., Farley I. R. T., Riddleston B., Knowles J. R., Biochem. J., 129, 301 (1972).

^б Наблюдаемое значение равно $9,1 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Приведенное в таблице значение рассчитано исходя из того, что реакционноспособными были только 3,8% субстрата, поскольку остальные 96,2% гидратированы в условиях эксперимента.

представляющий собой кажущуюся константу скорости второго порядка для реакций между свободным ферментом и свободным субстратом, близок к лимитируемой диффузией частоте столкновений фермента и субстрата. Для таких ферментов справедлива соотношения Бриггса — Холдейна (гл. 3, разд. Б).

3. Диссоциация комплексов фермент—субстрат и фермент—продукт

Константы скорости диссоциации этих комплексов значительно ниже константы, лимитируемой диффузией, поскольку для осуществления реакции необходимо преодолеть силы связывания. В некоторых случаях диссоциация фермент-субстратных комплексов протекает медленнее, чем соответствующие последовательные химические стадии, и это приводит к механизму Бриггса — Холдейна.

4. Параметр k_{cat} может определяться диссоциацией комплекса фермент—продукт

При насыщающих концентрациях субстратов для реакций с участием некоторых дегидрогеназ лимитирующей стадией является диссоциация комплекса фермент—продукт. Примером такого рода может служить диссоциация при высоких рН комплекса NADH с глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой [14], при низкой концентрации соли — комплекса NADH с алкоголь-дегидрогеназой из печени лошади [15, 16] и комплекса NADPH с глутаматдегидрогеназой [17].

5. Конформационные изменения

Известно множество примеров реакций, которые сопровождаются индуцируемыми субстратом конформационными изменениями фермента, характеризующимися константами скорости $10-10^4 \text{ с}^{-1}$, а также случаев, где отсутствие внутренней согласованности в значениях констант скорости свидетельствует о наличии лимитирующей стадии изомеризации белков [17]. Изомеризация действительно часто является относительно медленным процессом (например, в случае отщепления NADH от некоторых дегидрогеназ, сопровождающегося конформационным изменением белковой молекулы). Однако прямые указания на то, что процесс конформационного изменения является сам по себе лимитирующим, отсутствуют.

Следует отметить, что с изменением концентрации субстрата может произойти смена лимитирующей стадии, поскольку при насыщающих концентрациях субстрата скорость пропорциональна k_{cat} , а при низких — k_{cat}/K_m . В тех случаях, когда говорят, что данная стадия является лимитирующей и не указывают условий реакции, обычно имеют в виду, что концентрация субстрата насыщающая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hartridge H., Roughton F. J. W., Proc. R. Soc., A104, 376 (1923).
2. Roughton F. J. W., Proc. R. Soc., B115, 475 (1934).
3. Chance B., J. Franklin Inst., 220, 455, 613, 637 (1904).
4. Gibson Q., J. Physiol., 117, 49P (1952).
5. Fersht A. R., Jakes R., Biochemistry, 14, 3350 (1975).
6. Czerlinski G., Eigen M., Z. Elektrochem., 63, 652 (1959).
7. Mildvan A. S., Scrutton M. C., Biochemistry, 6, 2987 (1967).
8. Sykes B. D., J. Am. chem. Soc., 91, 949 (1969).
9. Smallcombe S. H., Ault B., Richards J. H., J. Am. chem. Soc., 94, 4585 (1972).

10. Baldo J. H., Halford S. E., Patt S. L., Sykes B. D., *Biochemistry*, **14**, 1893 (1975).
11. Fersht A. R., Ashford J. S., Bruton C. J., Jakes R., Koch G. L. E., Hartley B. S., *Biochemistry*, **14**, 1 (1975).
12. Eigen M., Hammes G. G., *Adv. Enzymol.*, **25**, 1 (1963).
13. Holler E., Rupley J. A., Hess G. P., *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **37**, 423 (1969).
14. Trentham D. R., *Biochem. J.*, **122**, 71 (1971).
15. Theorell H., Chance B., *Acta chem. scand.*, **5**, 1127 (1951).
16. Shore J. D., Gutfreund H., *Biochemistry*, **9**, 4655 (1970).
17. di Franco A., *Eur. J. Biochem.*, **45**, 407 (1974).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Eigen M., Hammes G. G.*, Elementary steps in enzyme reactions, *Adv. Enzymol.*, **25**, 1 (1963).
- Hammes G. G., Schimmel P. R.*, Rapid reactions and transient states, *The Enzymes*, **2**, 67 (1970).
- Gutfreund H.*, *Enzymes: physical principles*, Wiley-Interscience (1970).
- Claesson S. (ed.)*, Nobel symposium 5 (Fast reactions and primary processes in chemical kinetics), Wiley-Interscience (1967).
- Chance B., Eisenhardt R. H., Gibson Q. H., Karl K. Lonberg-Holm (eds.)*, Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry, Academic Press (1964).
- Careri G., Fasella P., Gratton E.*, Statistical time events in proteins: a physical assessment, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **141** (1975).
- Kustin K. (ed.)*, *Methods in Enzymology XVI*, Academic Press (1969).

рН-ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Активность многих ферментов изменяется с изменением рН точно таким же образом, как и степень ионизации простых кислот и оснований. Это неудивительно, поскольку, как говорится в гл. 1, активные центры ферментов обычно содержат кислотные или основные группы, принимающие участие в катализе. Можно ожидать, что если каталитической активностью обладает только одна протонированная форма кислоты или основания, то катализ будет зависеть от концентрации активной формы. В этой главе мы рассмотрим, как влияет ионизация фермента и фермент-субстратного комплекса на параметры k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M .

А. Ионизация простых кислот и оснований: основные уравнения

Обычно, рассматривая ионизацию основания В, пользуются константами, относящимися к превращениям сопряженной ему кислоты ВН⁺, чтобы для кислот и оснований применять один и тот же набор уравнений. Константа ионизации есть

$$K_a = [B][H^+]/[BH^+]. \quad (5.1)$$

Или для кислоты НА и сопряженного ей основания А⁻

$$K_a = [A^-][H^+]/[HA]. \quad (5.2)$$

pK_a определяется следующим образом:

$$pK_a = -\lg K_a. \quad (5.3)$$

Из уравнений (5.1) и (5.3) [или (5.2)] можно получить уравнение Гендерсона — Хассельбальха:

$$pH = pK_a + \lg ([B]/[BH^+]). \quad (5.4)$$

Легко видеть, что pK_a кислоты или основания — это pH , при котором кислота или основание ионизированы наполовину, т. е. концентрации B и BH^+ равны.

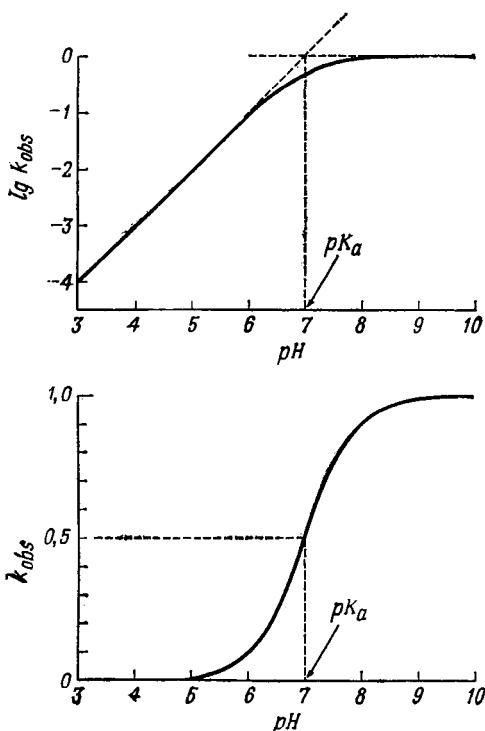


Рис. 5.1. Графики зависимости k_{obs} и $lg k_{obs}$ от pH для фермента, активного только в депротонированной форме кислоты с $pK_a = 7$.

Зависимость концентраций HA и A^- от концентрации протонов можно определить, преобразовав уравнение (5.2).

$$[HA] = [A]_0 [H^+] / (K_a + [H^+]), \quad (5.5)$$

$$[A^-] = [A]_0 K_a / (K_a + [H^+]), \quad (5.6)$$

где

$$[A]_0 = [HA] + [A^-].$$

Предположим, что имеется такая величина L (коэффициент поглощения, константа скорости и т. д.), что какая-либо характеристика (поглощение, скорость реакции и т. д.) является произведением этой величины на концентрацию. Если значение L для молекулы HA есть L_{HA} , а для молекулы A^- — L_{A^-} , то

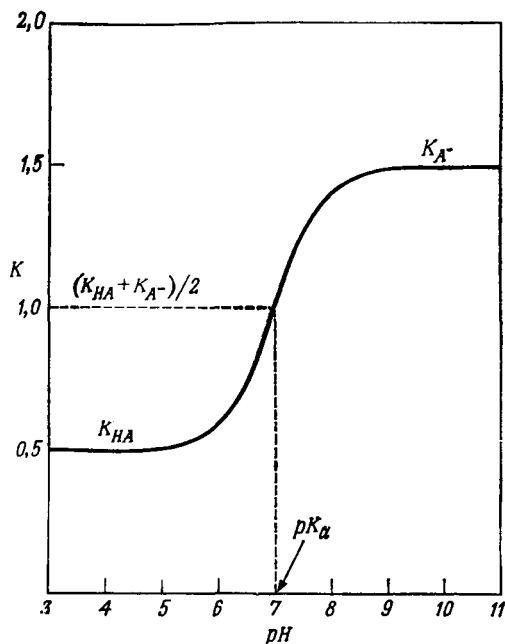


Рис. 5.2. рН-Зависимость произвольной константы K , которая равна K_{HA} для протонированной формы и K_{A^-} — для депротонированной формы кислоты с $pK_a = 7$.

Таблица 5.1

Значения pK_a ионизирующихся групп^{a)}

Группа	pK_a модельных соединений (небольшие пептиды)	Обычный диапазон значений pK_a в белках
α -CO ₂ H (аминокислота)	3,6	2—5,5
CO ₂ H (Asp)	4,0	
CO ₂ H (Glu)	4,5	
Имидазол (His)	6,4	
α -NH ₂ (аминокислота)	7,8	
ϵ -NH ₂ (Lys)	10,4	5—8
Гуанидин (Arg)	~ 12	
ОН (Tyr)	9,7	9—12
SH (Cys)	9,1	
Фосфаты	1,3; 6,5	

^{a)} Данные взяты главным образом из работ Tanford C., Adv. Prof. Chem., 17, 69 (1962); Tanford C., Roxby R., Biochemistry, 11, 2192 (1972).

Б. Влияние ионизации ионогенных групп ферментов на кинетику

Несмотря на то что ферменты содержат множество ионизирующихся групп, графики зависимости скорости реакции от рН имеют форму, соответствующую однократной или двукратной ионизации. Связано это с тем, что единственной важной ионизирующейся группой является группа активного центра, непосредственно участвующая в катализе, либо группа, расположенная вне активного центра, но ответственная за сохранение активной конформации фермента.

Рассмотрим несколько простых примеров, начав с механизма Михаэлиса — Ментен. Сделаем ряд упрощающих допущений, как правило, выполняющихся в действительности.

1. Группы ведут себя как идеально титрующиеся кислоты и основания (в действительности обычно имеет место достаточно хорошее приближение).

2. Активна только одна ионная форма фермента (обычно это условие выполняется).

3. Все промежуточные соединения с точки зрения переноса протона находятся в равновесии, т. е. перенос протонов осуществляется быстрее химических реакций (обычно это условие выполняется; см. гл. 4).

4. Природа лимитирующей стадии не изменяется с рН (это допущение может не выполняться, что приводит к весьма интересным последствиям).

1. Простая теория: механизм Михаэлиса — Ментен



Здесь K_E — константа ионизации свободного фермента, K_{ES} — константа ионизации фермент-субстратного комплекса, а K'_S и K_S — константы диссоциации HES и ES соответственно.

Эти четыре константы равновесия не могут изменяться независимо друг от друга, поскольку все превращения взаимосвязаны. Если известны три из четырех констант, то четвертая опре-

деляется из соотношения

$$K_E K'_S = K_{ES} K_S. \quad (5.15)$$

Уравнение (5.15) можно получить приравниванием произведений констант ионизации и констант диссоциации или просто из рассмотрения схемы (5.14), поскольку процесс $HES \rightarrow ES \rightarrow E$ должен сопровождаться таким же изменением энергии, как и процесс $HES \rightarrow HE \rightarrow E$.

Из уравнения (5.15) следует, что

- а) если $K_E = K_{ES}$, то $K_S = K'_S$ и связывание не зависит от pH;
 б) если $K_E \neq K_{ES}$, т. е. pK_a при связывании изменяется, то

$$K_S = K'_S (K_E / K_{ES}) \quad (5.16)$$

и связывание по необходимости должно зависеть от pH.

2. pH-зависимость параметров k_{cat} , k_{cat}/K_M , K_M и $1/K_M$ [1, 2]

Если выразить концентрацию ES через $[E]_0$ и проделать необходимые алгебраические преобразования, можно получить выражение для зависимости v от pH:

$$v_H = \frac{k_{cat} [E]_0 [S]}{K_S + [S] (1 + [H^+] / K_{ES}) + K_S [H^+] / K_E}. \quad (5.17)$$

Зависимость k_{cat} от pH получается из уравнения (5.17) при условии, что $[S] \gg K_S$, т. е.

$$(V_{max})_H = [E]_0 (k_{cat})_H = \frac{k_{cat} [E]_0 K_{ES}}{K_{ES} + [H^+]}. \quad (5.18)$$

Сравнение знаменателей уравнений (5.18) и (5.8) показывает, что зависимость V_{max} или k_{cat} от pH определяется константой ионизации фермент-субстратного комплекса K_{ES} .

Кажущееся значение K_M при каждом конкретном значении pH можно найти преобразованием уравнения (5.17) к виду уравнения Михаэлиса — Ментен (3.1).

$$(K_M)_H = \frac{K_S K_{ES} + [H^+] K_S K_{ES} / K_E}{K_{ES} + [H^+]}. \quad (5.19)$$

K_M также зависит от состояния ионизации фермент-субстратного комплекса.

рН-зависимость параметра k_{cat}/K_M получается из рН-зависимости v при низких значениях $[S]$ [или из отношения уравнений (5.18) и (5.19)]. Уравнение (5.17) можно упростить, положив $[S]$ равным нулю и преобразовав его к виду

$$(k_{\text{cat}}/K_M)_H = \frac{(k_{\text{cat}}/K_S)K_E}{K_E + [H^+]}. \quad (5.20)$$

k_{cat}/K_M (и v при $[S] \ll K_M$) определяется ионизацией свободного фермента.

3. Простое правило для идентификации компонента ферментативной реакции, определяющего характер рН-зависимости кинетических параметров

Приведенные выше результаты являются следствием общего правила, состоящего в том, что «зависимость константы равновесия K или константы скорости k от рН для процесса $X \rightarrow Y$ определяется константами ионизации X ».

Применим это правило к схеме (5.14), имея в виду, что субстрат также может содержать способные к ионизации группы. а. рН-зависимость k_{cat} .

Рассматривается процесс



рН-зависимость параметра k_{cat} определяется ионизацией фермент-субстратного комплекса.

б. рН-зависимость K_M .

Рассматривается процесс



рН-зависимость K_M определяется ионизацией фермент-субстратного комплекса.

в. рН-Зависимость $1/K_M^1$

Рассматривается процесс



рН-Зависимость $1/K_M$ определяется ионизацией свободного

¹⁾ Может вызвать удивление тот факт, что использование $1/K_M$ вместо K_M дает иное значение pK_a . Математическая сторона этого вопроса ясна из анализа уравнений (5.11)—(5.13). рН-Зависимость K_M позволяет получить pK_a для E , S и ES , однако для разных графиков эти константы определяются различными способами. Другой подход к анализу зависимости $\lg K_M$ от рН предложен Диксоном [1].

фермента и свободного субстрата.

г. *pH-Зависимость* k_{cat}/K_M .



pH-Зависимость k_{cat}/K_M определяется ионизацией свободного фермента и свободного субстрата.

В. Модификации простой теории и отклонения от нее

Для объяснения *pH-зависимости* параметров каталитического процесса в случае более сложных механизмов, чем механизм Михаэлиса—Ментен в его первоначальном виде, необходимо модифицировать рассмотренную выше в общих чертах простую теорию.

1. Модификации, обусловленные наличием дополнительных промежуточных соединений

а. Промежуточные соединения, образующиеся в ходе реакции [3]



Присутствие дополнительных промежуточных соединений не сказывается на *pH-зависимости* k_{cat}/K_M или $1/K_M$, поскольку эти параметры зависят только от свойств свободного фермента и свободного субстрата. *pH-зависимость* k_{cat} или $1/K_M$ и в этом случае позволяет получить pK_a для свободного фермента и свободного субстрата. Однако теперь *pH-зависимость* k_{cat} и K_M отражает изменение свойств как промежуточного соединения, так и фермент-субстратного комплекса. Если EA в уравнении (5.25) представляет собой основное фермент-содержащее соединение, то *pH-зависимость* k_{cat} и K_M даст его pK_a . Если же накапливаются и ES , и EA , то мы получим значение pK_a , являющееся средневзвешенным значением между pK_a для ES и EA [4].

б. Наличие непродуктивного связывания [5]

В том случае, когда наряду с продуктивным происходит непродуктивное связывание субстрата, *pH-зависимость* k_{cat} и K_M может дать кажущееся значение pK_a для важной в каталитическом отношении группы активного центра, которое далеко от его действительного значения в продуктивном комплексе. Такая

ситуация имеет место в том случае, если соотношение между продуктивным и непродуктивным связыванием сказывается на ионизации этой группы. Предположим, что активность ферментов зависит от состояния группы, которая при высоком значении pH находится в форме основания. Если, скажем, при низком pH продуктивное связывание субстрата осуществляется легче, чем при высоком, то происходящее при снижении pH (через pK_a каталитической группы) уменьшение скорости по мере протонирования этой группы будет частично компенсироваться увеличением непродуктивного связывания. В результате кажущееся значение pK_a , определяющее pH-зависимость k_{cat} , станет меньше, чем pK_a для продуктивного комплекса. pH-Зависимость K_M изменяется аналогичным образом.

Проанализируем этот случай с привлечением математического аппарата.



Здесь HES и ES — продуктивные комплексы, K' и K — константы равновесия для процессов взаимопревращения между ними и непродуктивными комплексами HES' и ES'. Решая уравнение скорости, получаем

$$k_{cat} = \frac{k_2}{K(1 + [\text{H}^+]/K'_a) + 1 + [\text{H}^+]/K'_a} \quad (5.27)$$

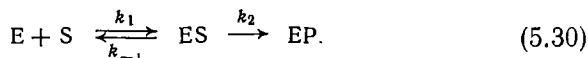
$$K_M = \frac{K_S(1 + [\text{H}^+]/K_a)}{K(1 + [\text{H}^+]/K'_a) + 1 + [\text{H}^+]/K'_a} \quad (5.28)$$

Преобразовав уравнения (5.27) и (5.28) к виду (5.8), из знаменателя выражения получаем, что наблюдаемое значение pK_a равно

$$pK_{obs} = pK'_a - \lg \frac{(1 + K)}{(1 + K')}. \quad (5.29)$$

По причинам, обсуждавшимся ранее, pH-зависимость k_{cat}/K_M и $1/K_M$ при наличии непродуктивного связывания не изменяется.

2. Отклонение от простых правил: механизм Бриггса — Холдейна и изменение природы лимитирующей стадии при изменении рН; кинетические pK_a [4, 6—8]



Рассмотрим предельный случай, когда константа скорости стадии химических превращений субстрата больше константы

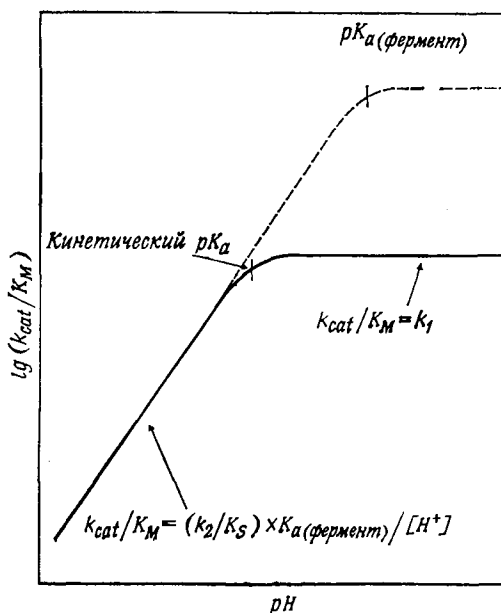


Рис. 5.3. Схема, объясняющая различие между истинным и «кинетическим» pK_a в механизме Бриггса — Холдейна, характеризующемся изменением природы лимитирующей стадии с изменением рН. При низком рН k_{cat}/K_M уменьшается как $[k_2/(k_{-1}/k_1)]K_a/(K_a + [H^+])$. [Это выражение можно упростить, приняв во внимание, что $K_S = k_{-1}/k_1$ и при низком рН $[H^+] \gg K_a$ (см. рисунок).] При высоком рН k_{cat}/K_M выходит на предел и становится равной k_1 — константе скорости второго порядка для связывания фермента с субстратом.

диссоциации фермент-субстратного комплекса (механизм Бриггса — Холдейна). В этой ситуации параметр k_{cat}/K_M равен k_1 — константе скорости связывания субстрата ферментом. Предположим снова, что каталитическая активность фермента зависит от состояния ионизации группы, находящейся в форме основания. При высоких рН $k_2 > k_{-1}$, а по мере его понижения

k_2 уменьшается вследствие протонирования основания, пока не станет меньше k_{-1} . Это приводит к тому, что кажущееся значение pK_a , определяемое из рН-зависимости k_{cat}/K_M , получается меньше pK_a участвующего в катализе основания (рис. 5.3) [7]. Можно показать, что кажущаяся константа ионизации определяется соотношением

$$K_{app} = K_a (k_2 + k_{-1}) / k_{-1}, \quad (5.31)$$

где K_a — константа ионизации данной группы фермента.

K_{app} называется *кинетическим* pK_a , поскольку он определяется не ионизацией как таковой, а зависит от отношения констант скорости процессов, не связанных с переносом протона. Кинетические pK_a получаются всякий раз, когда природа лимитирующей стадии изменяется с изменением рН.

3. Экспериментальное определение кинетических и равновесных pK_a [7, 8]

pK_a , которые представляют собой комбинацию констант равновесия и pK_a конкретных титрующихся групп [как в случае непродуктивного связывания; уравнение (5.29)], определяются в ходе титрования как реально существующие pK_a . Если в фермент-субстратный комплекс [схема (5.26)] включить кислоту или основание, то каталитическая группа будет титроваться в соответствии с pK_a , определяемым уравнением (5.29). Аналогичным образом, если измерять с помощью того или иного спектрального метода долю основания, находящегося в ионизированной форме, то обнаружится, что оно ионизируется с pK_a , определяемым уравнением (5.29). Иначе обстоит дело с кинетическими pK_a .

Для механизма Бриггса — Холдейна, характеризующегося тем, что природа лимитирующей стадии изменяется с изменением рН, прямое титрование каталитических групп будет давать истинную константу, отличающуюся от соответствующих величин, получаемых из рН-зависимости k_{cat}/K_M [см. уравнение (5.31)].

4. Микроскопические и макроскопические pK_a

Когда кислота представлена различными формами, например HES и HES' [схема (5.26)], pK_a каждой из этих форм называется *микроскопическим* pK_a системы, определяемый титрованием, например $pK_{обз}$ в уравнении (5.29), называется по-

разному: *макроскопический, кажущийся* или *групповой* pK_a . В отличие от кинетического этот pK_a во всех случаях является истинным.

Г. Влияние поверхностного заряда на pK_a групп в ферментах

На поверхности молекулы фермента находится множество полярных групп. Так, например, на поверхности химотрипсина локализованы 4 остатка аргинина и 14 остатков лизина, которые имеют положительные заряды, и 7 остатков аспартата и 5 — глутамата, заряженных отрицательно. Это приводит к созданию вокруг молекулы фермента ионного окружения, т. е. электростатического поля, которое может стабилизировать или дестабилизировать находящиеся внутри белковой глобулы (или частично погруженные в нее) ионные группы. Проведенные Линдерстрём-Лангом расчеты показали, что изменение pK_a погруженных групп является сложной функцией размера и формы молекулы белка, а также ионной силы раствора [9]. Значение этих эффектов четко показано в ряде работ, в которых расположенные на поверхности карбоксилат- или аммоний-ионы подвергались химической модификации.

При высоком рН активный центр химотрипсина несет отрицательный заряд, а при низком — нулевой. Можно ожидать, что основная форма активного центра при высоком рН будет стабилизироваться положительным поверхностным зарядом и дестабилизироваться — отрицательным. Как видно из табл. 5.2, это предположение подтверждается экспериментально. Превращение 14 положительно заряженных остатков лизина в отрицательно заряженные карбоксилат-ионы при взаимодействии химотрипсина с янтарным ангидридом приводит к тому, что pK_a группы, степень ионизации которой определяет рН-зависимость k_{cat} для гидролиза метилового эфира ацетилтриптофана, увеличивается от 7,0 до 8,0. И наоборот, превращение 13 отрицательно заряженных карбоксильных групп в положительно заряженные амины понижает pK_a до 6,1. Аналогичным образом ацилирование поверхностных аминогрупп трипсина уксусным ангидридом приводит к увеличению pK_a свободного фермента на 0,2 единицы.

Эти эффекты можно промоделировать с помощью изменения рН. При $pH < 5$ карбоксильные группы протонируются, а при $pH > 9$ аммонийные группы лизина в результате депротонирования начинают утрачивать свой положительный заряд. При экстремальных значениях рН это вызывает изменение кривых титрования фермента. Наиболее сильно такие эффекты проявля-

Таблица 5.2

Влияние поверхностного заряда фермента на pK_a

- Фермент	Модификация	pK_a	k_{cat} , c^{-1}
Химотрипсин ^{а)}	—	7,0 ^{б)}	47
Сукцинилхимотрипсин ^{а)}	Lys ($-NH_3^+$) → → $-NHOCCH_2CH_2CO_2^-$	8,0 ^{б)}	74
Этилендиаминхимотрипсин	Asp, Glu ($-CO_2^-$) → → $-CONH(CH_2)_2NH_3^+$	6,1 ^{б)}	50
Трипсин ^{в)}	—	7,0 ^{г)}	0,7
Ацетилтрипсин ^{в)}	Lys (NH_3^+) → $-NHCOCH_3$	7,2 ^{г)}	1,2

а) δ -Химотрипсин, 25 °С, ионная сила 0,1. Valenzuela P., Bender M. L., Biochim. biophys. Acta, 256, 538 (1971).

б) pK_a , определяющий k_{cat} для реакции гидролиза метилового эфира ацетил-L-триптофана.

в) Spomer W. E., Wootton J. F., Biochim. biophys. Acta, 235, 164 (1971).

г) pK_a , определяющий k_{cat}/K_M для реакции гидролиза амида бензоил-L-аргинина.

ются при низкой ионной силе — 0,2 М или меньше; при повышении концентрации солей эффекты уменьшаются, а в 1 М растворе исчезают совсем. К счастью, многие кривые титрования получены при рН между 5 и 9, когда титруется небольшая часть поверхностных групп; хорошие результаты получены при ионной силе 0,1 М [8,10].

На константы скорости стадий, в ходе которых совершаются химические превращения, влияет не только изменение pK_a участвующих в катализе кислот или оснований, но и изменение поверхностного заряда, если оно достаточно велико. Это изменение аналогично изменению ионной силы в неферментативных ионных реакциях, а два указанных эффекта аналогичны вторичному и первичному ионным эффектам в физической органической химии.

Д. Графическое представление данных

Предположим, что один из таких кинетических параметров, как k_{cat} , определяется долей фермента, находящегося в форме кислоты. В этом случае скорость реакции будет зависеть от константы ионизации K_a и рН следующим образом:

$$(k_{cat})_H = k_{cat} \frac{[H^+]}{(K_a + [H^+])}, \quad (5.32)$$

где $(k_{\text{cat}})_H$ — наблюдаемая величина при данной концентрации H^+ [уравнение (5.8)]. Уравнение (5.32) по форме идентично уравнению Михаэлиса — Ментен, и, следовательно, K_a можно

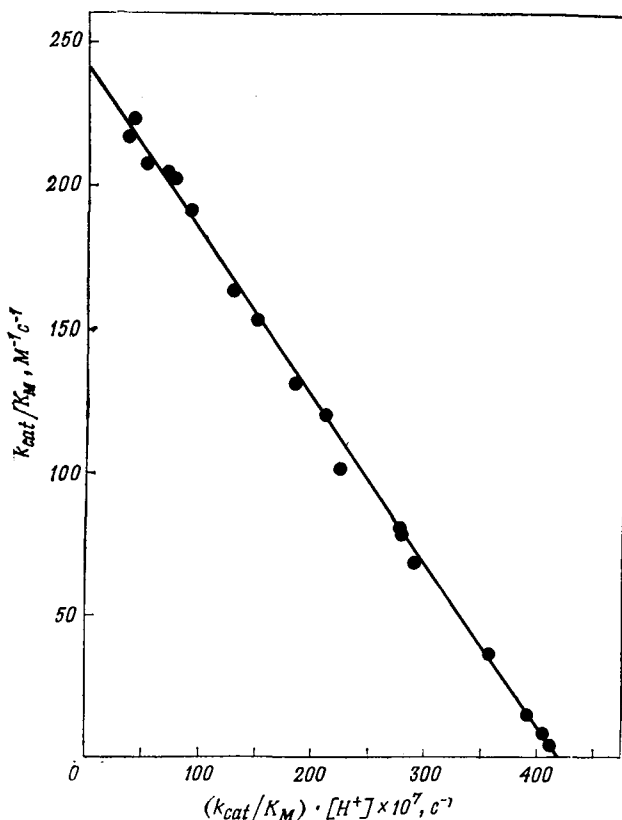


Рис. 5.4. Пример применения уравнения (5.34) для определения pK_a активного центра фермента. Здесь вместо k_{cat}/K_M используется k_{cat} (гидролиз ацетил-L-тирозин-*н*-ацетиланилида α -химотрипсином при 25 °C [8]).

найти, построив графики, аналогичные графикам Лайнуивера — Бэрка и Эди [уравнения (3.28) и (3.29)]. Например,

$$(k_{\text{cat}})_H = k_{\text{cat}} - K_a (k_{\text{cat}})_H / [H^+], \quad (5.33)$$

и, следовательно, k_{cat} и K_a определяются из графиков, построенных в координатах $\{(k_{\text{cat}})_H / [H^+]; (k_{\text{cat}})_H\}$. Аналогично, если скорость зависит от содержания основной формы фермента, то

МОЖНО ПОКАЗАТЬ, ЧТО

$$(k_{\text{cat}})_{\text{H}} = k_{\text{cat}} - (k_{\text{cat}})_{\text{H}} [\text{H}^+]/K_{\text{a}} \quad (5.34)$$

В этом случае строят график в координатах $\{(k_{\text{cat}})_{\text{H}}[\text{H}^+]; (k_{\text{cat}})_{\text{H}}\}$.

В более сложных случаях, когда кинетический параметр не уменьшается до нуля при высоком или низком рН (как это часто имеет место на графиках зависимости констант ассоциации или диссоциации от рН), для графического анализа используется разность между наблюдаемым значением параметра при данном рН и одним из предельных значений при экстремальных рН.

Е. Примеры и экспериментальные данные

Ферментом, кинетические свойства которого при разных рН изучены лучше, чем свойства остальных ферментов, является химотрипсин; хорошо известны его структурные особенности и механизм каталитического действия. Чрезвычайно широкая специфичность химотрипсина и, следовательно, возможность использования различных субстратов позволяет исследовать простой механизм Михаэлиса — Ментен, механизм с накоплением промежуточных соединений, обнаруживать непродуктивное связывание и анализировать механизм Бриггса — Холдена с изменением природы лимитирующей стадии при варьировании рН.

рН-зависимость $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ для гидролиза субстратов имеет вид колоколообразной кривой с максимумом при рН 7,8 и pK_{a} , равными 6,8 и 8,8, для α -химотрипсина и максимумом при рН 7,9 и pK_{a} , равными 6,8 и 9,1, для δ -химотрипсина. Значение $pK_{\text{a}} = 6,8$ соответствует ионизации каталитически важного основания в активном центре, а $pK_{\text{a}} = 9,1$ — ионизации α -аминогруппы Ile-16, которая в протонированном состоянии стабилизирует каталитически активную конформацию фермента. Эта важная в конформационном отношении ионизация не влияет на рН-зависимость k_{cat} , для которой обычно характерна сигмоидная кривая с $pK_{\text{a}} 6-7$, но приводит к увеличению K_{M} при высоком рН.

1. pK_{a} активного центра химотрипсина

а. Свободный фермент

Теория предсказывает, что если при изменении рН не происходит изменения природы лимитирующей стадии, то рН-зависимость $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ для всех неионизирующихся субстратов дает зна-

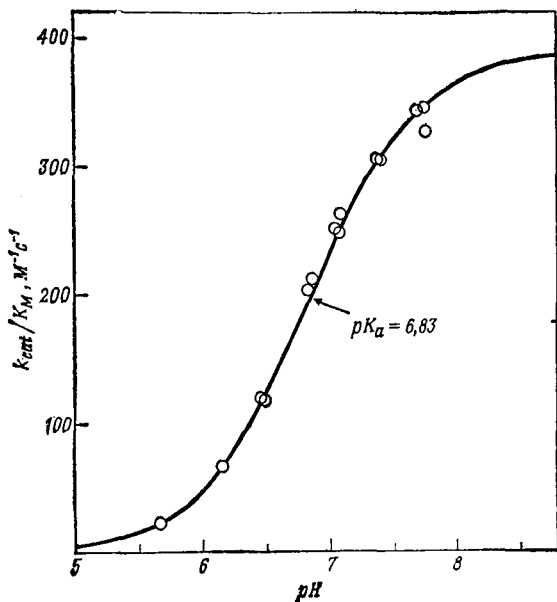


Рис. 5.5. Определение pK_a активного центра δ -химотрипсина из pH-зависимости k_{cat}/K_M для реакции гидролиза N-ацетил-L-тирозин-*p*-ацетил-анилида [7].

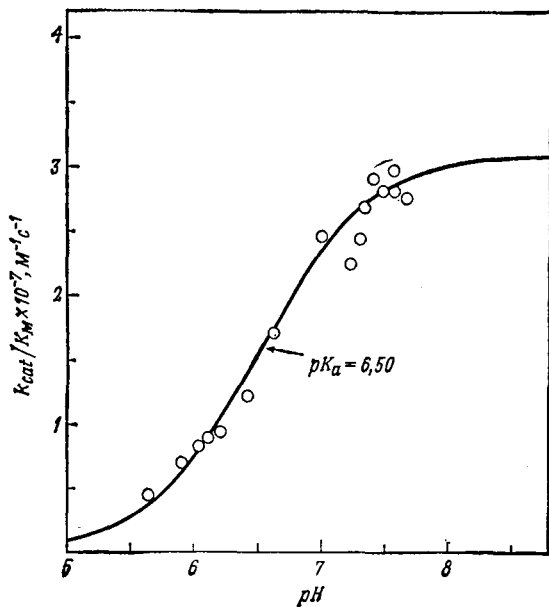


Рис. 5.6. Аномально низкое значение pK_a , которое получается из pH-зависимости параметра k_{cat}/K_M для катализируемого δ -химотрипсином гидролиза *p*-нитрофенилового эфира N-ацетил-L-триптофана [7].

чение pK_a , равное pK_a свободного фермента. За исключением единственного случая, это предсказание теории подтверждается. При 25°C и концентрации соли 0,1 M pK_a активного центра химотрипсина равно $6,80 \pm 0,03$. Наиболее точные экспериментальные данные очень хорошо совпадают с теоретическими кривыми ионизации в диапазоне рН 5—8 после внесения поправки на долю фермента, находящегося в неактивной конформации. Это соотношение справедливо для гидролиза амидов, где не происходит накопления промежуточных соединений и выполняется механизм Михаэлиса — Ментен, а также для гидролиза эфиров, где накапливается ацилфермент (табл. 5.3 и рис. 5.5 и 5.6).

Таблица 5.3

 pK_a активного центра химотрипсина

Субстрат	pK_a		Источник данных ^{а)}
	k_{cat}/K_M	k_{cat}	
Аланинамид ацетил-L-фенилаланина ^{б)}	6,80	6,6	1
Семикарбазид формил-L-фениланина ^{б)}	6,84	6,32	1
<i>n</i> -Ацетиланилид ацетил-L-тирозина ^{б)}	6,77	—	1
<i>n</i> -Нитрофенилацетат ^{б)}	6,85	—	2
Этиловый эфир ацетил-L-фенилаланина ^{б)}	6,8	6,85	3
<i>n</i> -Ацетиланилид ацетил-L-тирозина	6,83	—	4
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир ацетил-L-триптофана ^{в)}	6,50	6,9	4

а) 1—Fersht A. R., Renard M., Biochemistry, 13, 1416 (1974).

2—Bender H. L., Clement G. E., Kezdy F. J., Heck H. d'A., J. Am. Chem. Cos., 86, 3680 (1964).

3—Hammond B. R., Gutfreund H., Biochem. J., 61, 187 (1955).

4—Renard M., Fersht A. R., Biochemistry, 12, 4713 (1973).

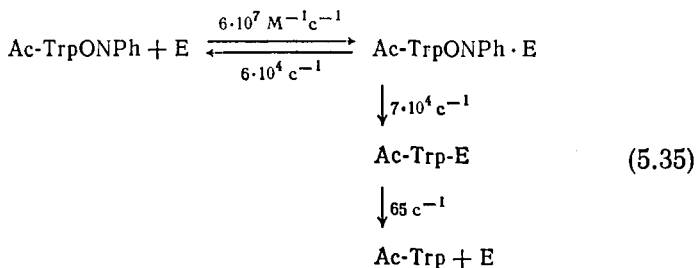
б) α-Химотрипсин, 25 °С, ионная сила 0,1.

в) δ-Химотрипсин, 25 °С, ионная сила 0,95.

б. *n*-Нитрофениловый эфир ацетил-L-триптофана: механизм Бриггса — Холдейна с изменением природы лимитирующей стадии при варьировании рН

Исключение, о котором упоминалось выше,— это рН-зависимость k_{cat}/K_M для гидролиза *n*-нитрофенилового эфира ацетил-L-триптофана. В этом случае кажущийся pK_a свободного фермента равен 6,50. Причина такого низкого значения pK_a была рассмотрена в разд. В.2. При высоком рН стадия связывания субстрата с ферментом является отчасти лимитирующей.

Предельное значение k_{cat}/K_M при высоком рН равно $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, что близко к величине, характерной для лимитируемых диффузией частот столкновений фермента и субстрата. Однако при низких рН химические стадии замедляются и по мере протонирования фермента и уменьшения его активности становятся лимитирующими. Константа скорости для стадии связывания, которую можно рассчитать из уравнения (5.31), равна $6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Эти данные находятся в соответствии со схемой (5.35) и значением $pK_a = 6,8$ для активного центра [7].



(E — химотрипсин).

Это редкий случай, когда анализ стационарной кинетики позволяет получить константы скорости для ряда конкретных стадий реакции.

в. Фермент-субстратный комплекс

pK_a фермент-субстратного комплекса не является величиной постоянной, как в случае свободного фермента, поскольку связывание субстратов изменяет pK_a активного центра. Значение pK_a , полученное из рН-зависимости k_{cat} для гидролиза амидов, колеблется в пределах 6—7. Соответственно значение K_M возрастает при низком рН в согласии с уравнением (5.16).

Точное определение pK_a фермент-субстратного комплекса из рН-зависимости K_M затруднено по двум причинам. Во-первых, изменение K_M относительно невелико и требуется высокая точность при получении данных. Во-вторых, необходимо определить две области плато: при низком и при высоком значениях рН. Это означает, что измерение нужно проводить в более широком диапазоне рН, чем при определении k_{cat} или k_{cat}/K_M , а при этом возникает опасность появления нежелательных эффектов, обусловленных ионизацией других групп.

г. Ионизация при высоких значениях рН [11]

Высокое значение pK_a обусловлено не зависящим от субстрата изменением конформации фермента, которое можно выявить физическими методами, например сняв спектры кругового

дихроизма или определив квантовый выход флуоресценции. Кинетические измерения дают такое же значение pK_a , как и эти методы.

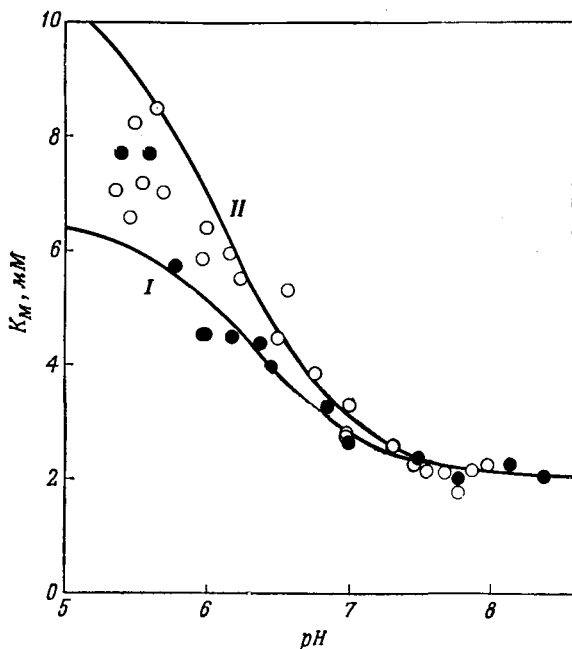


Рис. 5.7. Увеличение K_M при низких рН для катализируемого химотрипсином гидролиза N-формил-L-фенилаланинсемикарбазида (I) и формилгидразида (II), связанное с тем, что pK_a фермент-субстратного комплекса ниже pK_a свободного фермента [8].

Ж. Прямое титрование групп в ферментах

Существует несколько методов прямого титрования определенных ионизирующихся боковых цепей в белках. Одна из основных проблем заключается в идентификации данной группы.

1. Влияние D_2O на pH/pD и pK_a

Во многих спектроскопических методах в качестве растворителя вместо H_2O используют D_2O , что позволяет разделить нужный сигнал и сигналы, обусловленные растворителем. Экспериментально установлено, что pD , измеренный стеклянным электродом, на 0,4 единицы ниже pH :

$$pH = pD + 0,4. \quad (5.36)$$

pH в смеси H_2O и D_2O , измеренный стеклянным электродом, определяется соотношением [12]

$$\text{pH} = \text{pD} + 0,3139\alpha + 0,0854\alpha^2, \quad (5.37)$$

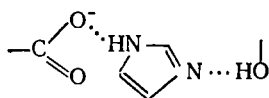
где α — относительное содержание дейтерия, т. е. $[\text{D}]/([\text{D}] + [\text{H}])$. Однако в растворе D_2O и в смеси $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ значение $\text{p}K_a$ выше, чем в водном растворе. Иногда увеличение $\text{p}K_a$ компенсирует уменьшение показаний прибора со стеклянным электродом, и значение $\text{p}K_a$, измеренное в D_2O , становится равным истинному $\text{p}K_a$ соединения в водном растворе. Влияние растворителя на константу ионизации непостоянно; недооценка этого факта может привести к ошибке в несколько десятых единиц pH.

2. Методы

а. Ядерный магнитный резонанс: гистидиновые остатки [13]

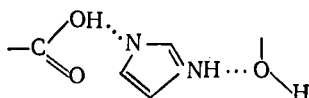
Метод ЯМР особенно ценен для определения $\text{p}K_a$ гистидиновых остатков в белках. Сигналы от протонов при углеродных атомах C-2 и C-4 сдвинуты в слабopольную область по отношению к сигналам от остальных атомов данной белковой молекулы и могут быть разрешены в растворах D_2O . При протонировании происходит изменение величины химического сдвига и, следовательно, гистидиновые группы можно легко оттитровать. Когда в белке присутствует более чем один гистидиновый остаток, возникают трудности, связанные с идентификацией отдельных $\text{p}K_a$. Решить эту задачу для рибонуклеазы помогли химическая модификация, избирательное дейтерирование и выяснение кристаллической структуры данного фермента; в настоящее время идентифицированы $\text{p}K_a$ всех четырех гистидиновых остатков рибонуклеазы [14, 15].

Сигнал ЯМР протонов, участвующих в образовании водородных связей, может быть сдвинут в слабopольную область настолько сильно, что его удастся зарегистрировать в растворе H_2O . Обнаружено, что в химотрипсиногене, химотрипсине и других сериновых протеазах между Asp-102 и His-57 находится протон, и установлено, что он титруется с $\text{p}K_a = 7,5$ [16] (хотя этот $\text{p}K_a$ относится к диссоциации протона, связанного с другим атомом азота имидазольного кольца):



Одна из сериновых протеаз, α -литическая протеаза, которая, как полагают, имеет в активном центре аналогичную «систему с

переносом заряда», содержит только один гистидин. Измерение величины химического сдвига для ^{13}C , который включен в С-2-положение, дает $pK_a = 6,7$. Однако в отличие от модельных соединений константа взаимодействия между этим атомом углерода и связанным с ним протоном не изменяется при изменении рН. По-видимому, группа, титрующаяся с $pK_a = 6,7$, принадлежит Asp-102, а не гистидину, как всегда предполагалось [17]. Этот вывод подтверждается данными титрования карбоксильной группы с помощью ИК-спектроскопии (см. ниже) [18].



ЯМР-спектроскопия на ядрах ^{13}C позволяет определить pK_a остатков лизина и аспартата. Ионизация остатков тирозина исследовалась с помощью ПМР.

б. ИК-спектроскопия [18, 20, 21]

Карбоксильные группы поглощают электромагнитные волны с частотой $\sim 1710 \text{ см}^{-1}$, а карбоксилаты — с частотой 1570 см^{-1} . Разностные ИК-спектры, снятые в D_2O , позволили определить pK_a необычных карбоксильных групп α -лактоглобулина (7,5), лизоцима (2,0; 6,5) и трипсина (Asp-102; 7).

в. Разностная УФ-спектроскопия [22, 23]

Разностная УФ-спектроскопия часто используется при исследовании ионизации фенольного гидроксила тирозиновых остатков, а также при изучении свойств сульфгидрильных групп цистеина и имидазольных групп гистидина.

г. Флуоресцентный анализ [22, 24]

Этот метод весьма полезен в тех случаях, когда при ионизации группы изменяется спектр флуоресценции соседнего с ней триптофана — главного флуоресцирующего остатка в белках, или происходит конформационное изменение в белковой молекуле, изменяющее спектр флуоресценции белка в целом. В отсутствие триптофана (который обладает относительно сильной флуоресценцией) можно следить за флуоресценцией тирозина.

д. Разностное титрование [25]

Прямое титрование белка кислотой или основанием обычно дает не поддающуюся интерпретации кривую ионизации из-за перекрывания, обусловленного титрованием большого числа

групп. Однако, сравнивая кривые титрования фермента до и после блокирования определенной группы, удается выделить одну или две ионизирующиеся группы. Например, Asp-52 лизоцима можно специфически этерифицировать триэтоксифторборатом. Сравнение кривых титрования модифицированного и нативного белка не только дает pK_a Asp-52, но и позволяет выявить влияние ионизации этой группы на свойства другой важной кислоты, входящей в состав активного центра,— Glu-35.

е. Разностное титрование с переводом фермента в денатурированное состояние [26]

Определить с помощью титрования состояние ионизации находящегося в глубине белковой глобулы остатка (например, Asp-102 в химотрипсине и химотрипсиногене) практически невозможно. Из-за высоких фоновых концентраций гидроксил-ионов и протонов точное титрование удастся осуществить только в диапазоне рН от 3 до 11. В связи с этим с помощью суммарной кривой титрования нельзя выявить ионизацию групп белка с аномальными pK_a . Например, в химотрипсине имеются три карбоксильные группы с аномально низкими pK_a — они находятся в ионизированной форме при $pH < 3$. Однако когда белок денатурирован, эти группы титруются нормально, а число титрующихся карбоксильных групп в денатурированном белке можно легко определить. Ионизация Asp-102 химотрипсина и химотрипсиногена при варьировании рН была установлена путем измерения числа поглощенных протонов при денатурации и сопоставления полученного результата с числом ионизированных карбоксильных групп в этих денатурированных белках. Для повышения точности большинство расположенных на поверхности карбоксильных групп было превращено в амиды, чтобы уменьшать число ионизирующихся групп.

ж. Химическая модификация

Значения pK_a аминокислотных остатков активного центра свободного фермента и комплекса фермента с ингибитором находят по результатам измерения скорости необратимого ингибирования ферментов точно так же, как и в случае обычной ферментативной кинетики. pK_a других остатков определяют из рН-зависимости скорости реакций этих соединений с различными реагентами. Например, поскольку амины, находясь в форме основания, реагируют с уксусным ангидридом [27] или динитрофторбензолом [28—30], степень их ионизации определяется из относительных скоростей реакций при разных рН. Этот подход был использован для определения pK_a аминокислотных групп в белках.

Аминогруппы модифицировали реагентами, меченными радиоактивными изотопами, затем белок гидролизovali, разделяли пептиды и измеряли их удельную радиоактивность. Таким способом можно найти pK_a нескольких групп одновременно, что и было сделано для эластазы и химотрипсина.

В видоизмененном варианте этого метода измеряется скорость обмена трития (из T_2O) с протоном, связанным с С-2-атомом имидазольного кольца гистидина [18, 31, 32]. Константа скорости обмена зависит от состояния ионизации имидазола и является более высокой для непротонированной формы. Описанный метод дополняет метод ЯМР, который также позволяет измерять pK_a гистидина. Эти эксперименты весьма трудоемки, однако с их помощью можно однозначно идентифицировать pK_a .

3. Влияние температуры, полярности растворителя и ионной силы на pK_a групп, находящихся в составе фермента и в растворе

Полярные растворители стабилизируют ионы — электростатические диполи растворителя взаимодействуют непосредственно с ионами, а увеличение диэлектрической проницаемости среды уменьшает тенденцию этих ионов к реассоциации. Ионизация нейтральной кислоты HA [уравнение (5.38)] при добавлении к водному раствору слабо полярного растворителя подавляется (табл. 5.4).

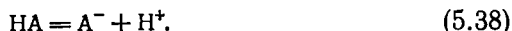


Таблица 5.4

Влияние органических растворителей на pK_a при 25 °С^{а)}

Диоксан, %	pK_a				
	уксусная кислота	трис ^{б)}	бензоиларгинин	глицин	
				-CO ₂ H	-NH ₃ ⁺
0	4,76	8,0	3,34	2,35	9,78
20	5,29	8,0		2,63	9,29
45	6,31	8,0		3,11	8,49
50		8,0	4,59		
70	8,34	8,0	4,60	3,96	7,42

^{а)} Harned H. S., Owen B. B., The physical chemistry of electrolytic solution, Reinhold, New York, 755-6 (1958); Inagami T., Sturtevant J. M., Biochim. Biophys. Acta, 38, 64 (1960).

^{б)} (HOCH₂)₃CNH₂.

С другой стороны, ионизация кислоты, несущей положительный заряд (BH^+), нечувствительна к полярности растворителя, поскольку в равновесии не происходит изменения заряда.

$$BH^+ = B + H^+. \quad (5.39)$$

Исследование влияния полярности растворителя на pK_a группы, связанной с ферментом, не позволяет с определенностью ответить на вопрос, какая кислота ионизируется — нейтральная или несущая положительный заряд. Частично погруженная вглубь белковой глобулы кислотная группа экранирована от растворителя, и более существенным может оказаться электростатическое взаимодействие с другим группами белка. Например, pK_a ацилфермента, образованного бензоиларгинином и трипсином, почти не изменяется в смеси диоксан/вода в диапазоне концентрации диоксана от 0 до 50% и лишь слегка возрастает, когда концентрация достигает 88% [33]. Казалось бы, это должно соответствовать кислоте, несущей положительный заряд (например, ионизирующемуся имидазолу), поскольку в этих условиях pK_a уксусной кислоты увеличивается приблизительно на 6 единиц, однако результаты исследований методами ЯМР- и ИК-спектроскопии указывают на то, что ионизируется карбоксильная группа Asp-102 [17, 18].

Аналогичным образом, хотя увеличение ионной силы приводит к снижению pK_a карбоксильных групп в растворе, pK_a Asp-52 и Glu-35 в лизоциме при увеличении ионной силы возрастает вследствие оказываемого ею влияния на поверхностный заряд белка [25].

Энтальпия ионизации имидазольных групп в растворе составляет ~ 30 кДж·моль⁻¹ (7 ккал·моль⁻¹), тогда как для карбоксильных групп эта величина пренебрежимо мала. Следует иметь в виду, что на энтальпию ионизации оказывает большое влияние изменение энтальпии образующих сольватную оболочку молекул воды, поэтому данные, полученные для раствора, нельзя прямо переносить на случай частично погруженных в белковую глобулу групп.

И. Аномальные значения pK_a в ферментах

Известно много примеров, когда амины, находящиеся в форме основания, и карбоксильные группы в белках имеют аномально высокий или низкий pK_a (табл. 5.5). Причины этого явления крайне просты и объясняются особенностями микроокружения. Если карбоксильная группа, например, аспартата в системе с переносом заряда α -литической протеазы или химо-трипсина находится в среде с относительно низкой полярностью,

Таблица 5.5

Некоторые аномальные значения pK_a белковых групп

Фермент	Остаток	pK_a
Лизоцим	Glu-35	6,5 [25]
Комплекс лизоцима с гликолхитином	Glu-35	~ 8,2 [25]
α -Литическая протеаза	Asp	6,7 [17]
Ацетоацетатдекарбоксилаза	Lys (ϵ -NH ₂)	5,9 [6]
Химотрипсин	He-16 (α -NH ₂)	10,0 [11]
α -Лактоглобулин	CO ₂ H	7,5 [20]

то ее pK_a будет повышен, поскольку в этих условиях анионная форма дестабилизируется. С другой стороны, если карбоксилат-ион образует ионную связь с аммоний-ионом, то он будет стабилизироваться положительным зарядом и станет более кислым. И наоборот, если аминогруппа имеет неполярное окружение (например, аминогруппа лизина в ацетоацетатдекарбоксилазе), то ее протонирование подавляется и pK_a понижается. Аммоний-ион, образующий в химотрипсине ионную связь с остатком He-16, стабилизируется отрицательным зарядом карбоксилат-иона; его депротонирование подавляется, и pK_a возрастает.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dixon M., *Biochem. J.*, **55**, 161 (1953).
2. Alberty R. A., Massey V., *Biochim. biophys. Acta*, **13**, 347 (1954).
3. Bender M. L., Clement G. E., Kézdy F. J., d'A Heck H., *J. Am. chem. Soc.*, **86**, 3680 (1964).
4. Fersht A. R., Requena Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 7079 (1971).
5. Fastrez J., Fersht A. R., *Biochemistry*, **12**, 1067 (1973).
6. Schmidt D. E., Jr., Westheimer F. H., *Biochemistry*, **10**, 1249 (1971).
7. Renard M., Fersht A. R., *Biochemistry*, **12**, 4713 (1973).
8. Fersht A. R., Renard M., *Biochemistry*, **13**, 1416 (1974).
9. Edsall J. T., Wyman J., *Biophysical chemistry*, Academic Press, New York, p. 510 (1958).
10. Kézdy F. J., Clement G. E., Bender M. L., *J. Am. chem. Soc.*, **86**, 3690 (1964).
11. Fersht A. R., *J. molec. Biol.*, **64**, 497 (1972) (см. также ссылки, приведенные в этой работе).
12. Pentz L., Thornton E. R., *J. Am. chem. Soc.*, **89**, 6931 (1967).
13. Markley J. L., *Accts chem. Res.*, **8**, 70 (1975).
14. Markley J. L., *Biochemistry*, **14**, 3546 (1975).
15. Дудкин С. М., Карпейский М. Я., Сахаровский В. Г., Яковлев Г. И., *ДАН СССР*, **221**, 740 (1975).
16. Robillard G., Shulman R. G., *J. molec. Biol.*, **86**, 519 (1974).
17. Hunkapiller M. W., Smallcombe S. H., Whitaker D. R., Richards J. H., *Biochemistry*, **12**, 4732 (1973).
18. Koeppe R. E. II, Stroud R. M., *Biochemistry*, **15**, 3450 (1976).
19. Karplus S., Snyder G. H., Sykes B. D., *Biochemistry*, **12**, 1323 (1973).

20. *Susi H., Zell T., Timasheff S. N.*, Archs. Biochem. Biophys., **85**, 437 (1959).
21. *Timasheff S. N., Rupley J. A.*, Archs. Biochem. Biophys., **150**, 318 (1972).
22. *Timasheff S. N.*, The Enzymes, **2**, 371 (1970).
23. *Gorbunoff M. J.*, Biochemistry, **10**, 250 (1971).
24. *Cowgill R. W.*, Biochim. biophys. Acta, **94**, 81 (1965).
25. *Parsons S. M., Raftery M. A.*, Biochemistry, **11**, 1623, 1630, 1633 (1972).
26. *Fersht A. R., Sperling J.*, J. molec. Biol., **74**, 137 (1973).
27. *Kaplan H., Stephenson K. J., Hartley B. S.*, Biochem. J., **124**, 289 (1971).
28. *Murdock A. L., Grist K. L., Hirs C. H. W.*, Archs. Biochem. Biophys., **114**, 375 (1966).
29. *Hill R. J., Davis R. W.*, J. biol. Chem., **242**, 2005 (1967).
30. *Cruickshank W. H., Kaplan H.*, Biochem. biophys. Res. Commun., **46**, 2134 (1972).
31. *Matsuo H., Ohe M., Sakiyama F., Narita K.*, J. Biochem., Tokyo, **72**, 1057 (1972).
32. *Ohe M., Matsuo H., Sakiyama F., Narita K.*, J. Biochem., Tokyo, **75**, 1197 (1974).
33. *Inagami T., Sturtevant J. M.*, Biochim. Biophys. Acta, **38**, 64 (1960).

ПРАКТИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА

Одним из необходимых условий проведения любого кинетического исследования является наличие удобного метода измерения скорости образования продуктов или скорости расходования субстратов. Для проведения подобных измерений используются самые разные методы, начиная с таких классических методов, как манометрический, вискозиметрический и поляриметрический, и кончая самыми современными — ЯМР и ЭПР. Однако наиболее широко применяются спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, автоматическое титрование, а также методы с использованием субстратов, меченных радиоактивными изотопами. В этой главе мы не будем рассматривать всех имеющихся методов, а остановимся только на самых распространенных, да и то ограничимся лишь областью их применения и практической стороной вопроса.

А. Кинетические методы

1. Спектрофотометрия

Многие соединения поглощают свет в ультрафиолетовой или видимой областях спектра. Если интенсивность света, падающего на раствор вещества, равна I_0 , интенсивность света, прошедшего через этот раствор, — I , то поглощение A равно

$$A = \lg(I_0/I). \quad (6.1)$$

Согласно закону Ламберта — Бэра,

$$A = \epsilon cl, \quad (6.2)$$

где ϵ — коэффициент поглощения (или экстинкции) данного соединения, c — его концентрация (обычно молярная), а l — оптический путь, или толщина образца (в см).

Спектрофотометрический анализ особенно ценен для исследования природных хромофоров. Например, скорости реакций с

участием многих дегидрогеназ можно измерить по скорости появления NADH, регистрируя поглощение света с $\lambda = 340$ нм ($\epsilon = 6,23 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), поскольку NAD в этой области не поглощает. Иногда в таких исследованиях используют искусственные субстраты, например в реакциях с участием эстераз — *n*-нитрофениловые эфиры, так как *n*-нитрофенолят-ион имеет максимум поглощения при $\lambda = 400$ нм ($\epsilon = 1,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Чувствительность метода зависит от коэффициента экстинкции соединения; для соединения с $\epsilon = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ предельное его количество, которое еще можно определить, составляет 0,5 нмоль (имеется в виду обычный спектрофотометр, когда для измерений необходимо по крайней мере 0,5 мл раствора, а поглощение должно составлять $\sim 0,01$).

Возможные источники ошибок

Чаще всего к ошибкам приводит невыполнение закона Ламберта — Бэра. Такая ситуация возникает по ряду причин. 1. Концентрация хромофора настолько высока, что он агрегирует или образует мицеллы; это сопровождается изменением коэффициента поглощения. 2. При высоком фоновом поглощении поглощается так много света, что проходящий через монохроматор свет с другими длинами волн становится существенным («побочный свет»). 3. Ширина щели монохроматора слишком велика, и на образец попадает свет с длинами волн, лежащими вне полосы поглощения хромофора. 4. Раствор мутный и рассеивает свет.

2. Спектрофлуориметрия

Некоторые соединения способны поглощать свет, а затем испускать его (но уже с большей длиной волны). Это явление называется флуоресценцией. Эффективность процесса характеризуется квантовым выходом q , который равен отношению числа испускаемых квантов к числу поглощаемых (q всегда меньше единицы). К природным флуорофорам относится NADH, поглощающий свет с $\lambda = 340$ нм, а испускающий — с $\lambda = 460$ нм. Основной флуорофор в белках — триптофан — поглощает в области 275—295 нм, а испускает свет с $\lambda = 330$ —340 нм. Слабо флуоресцирует в этой же области и тирозин. В основе многих синтетических субстратов эстераз, фосфатаз, сульфатаз и гликозидаз лежит 4-метилумбеллиферон — сильно флуоресцирующее производное фенола.

Теоретически спектрофлуориметрия примерно в 100 раз чувствительнее спектрофотометрии. Флуоресценция измеряется под

прямым углом к пучку падающего света. Изменение интенсивности возбуждающего света, скажем, на 5% изменяет интенсивность флуоресценции на те же 5%. При спектрофотометрическом анализе измеряются небольшие изменения интенсивности прошедшего света, и здесь любые флуктуации в интенсивности падающего света усиливаются; изменение ее на 5% эквивалентно изменению поглощения на 0,02 единицы.

Хотя интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности возбуждающего света, невозможно до бесконечности уменьшать концентрацию флуоресцирующего соединения, компенсируя это уменьшение увеличением интенсивности возбуждающего света. Это связано с наличием рассеяния света — рэлеевского, при котором рассеянный свет имеет ту же длину волны, что и падающий, и рамановского, при котором длина волны рассеянного света иная; все это существенно уменьшает интенсивность падающего света. Кроме того, при высокой интенсивности возбуждения исследуемое соединение может подвергаться фотолузу.

Некоторые свойства флуоресценции

Флуоресценция наблюдается в том случае, когда фотон поглощается соединением (которое переходит в возбужденное состояние с временем жизни ~ 10 нс), а затем испускается им. Однако молекула, находящаяся в возбужденном состоянии, может потерять свою энергию, столкнувшись с другой молекулой (например, с иодид-ионом) или передав энергию другой группе той же молекулы. В таких случаях говорят, что произошло *тушение флуоресценции*. Исследование тушения флуоресценции триптофана в составе белка при связывании субстратов является весьма ценным способом оценки степени связывания. Интенсивность флуоресценции может не только уменьшаться, но и увеличиваться. Например, соединение, лишь слабо флуоресцирующее в водном растворе, зачастую интенсивно флуоресцирует при переносе в неполярную среду. Таким свойством обладают, например, красители толуидин- и нафталинсульфоновые кислоты — при связывании в гидрофобных карманах белков они начинают сильно флуоресцировать. Интересно, что, если эти красители связываются в молекуле белка рядом с триптофановым остатком, они могут возбуждаться светом, поглощенным триптофаном, т. е. светом с $\lambda = 275\text{—}295$ нм, в результате переноса энергии с триптофана на краситель. В воде триптофан и NADH флуоресцируют слабо, однако их флуоресценция усиливается, когда они находятся в неполярных областях молекулы белка.

При возбуждении небольших молекул плоскополяризован-

ным светом испускается неполяризованный свет, поскольку в растворе эти молекулы непрерывно вращаются, причем время вращательной релаксации значительно меньше времени жизни возбужденного состояния. Однако крупные молекулы вращаются медленно. Согласно эмпирическому правилу, время вращательной релаксации в наносекундах приблизительно равно молекулярному весу в тысячах дальтон (химотрипсин с мол. весом 25 000 имеет время вращательной релаксации около 20 нс). Свет, испускаемый группами, которые являются частью молекулы белка или связаны с ней, будет частично плоскополяризованным, если они вращаются с такой же скоростью, как и вся молекула. Данное свойство можно использовать для изучения подвижности различных групп.

Возможные источники ошибок

Обычно источником ошибок является тушение флуоресценции. Оно может быть обусловлено попаданием в раствор посторонних примесей (например, иодида калия), но чаще всего имеет место *концентрационное тушение*, наблюдающееся в том случае, когда флуорофор или лиганд сильно поглощают свет и уменьшают интенсивность возбуждающего или испускаемого света. Так, если поглощение раствора равно A , то средняя интенсивность возбуждающего света в кювете будет [согласно уравнению (6.1)] равна

$$\bar{I} = I_0 \cdot 10^{-A/2}. \quad (6.3)$$

Истинную интенсивность флуоресценции можно вычислить, исходя или из этого уравнения, или из более сложного, куда введены соответствующие поправки, а также с помощью стандартных кривых [1].

3. Автоматизированные спектрофотометрические и спектрофлуориметрические методы

Наиболее удобно проводить спектроскопический анализ в том случае, когда продукты и реагенты имеют разные спектры и могут непосредственно регистрироваться; в этом случае достигается и наивысшая точность. Методы, основанные на окрашивании реакционной смеси с помощью специальных реагентов (например, окрашивание аминокислот нингидрином), можно автоматизировать, используя насос, смешивающий реагенты в требуемых соотношениях и пропускающий раствор через ячейку спектрофотометра или флуориметра (рис. 6.1). При этом исследу-

дования становятся менее трудоемкими, а получающиеся данные — значительно более воспроизводимыми и точными.

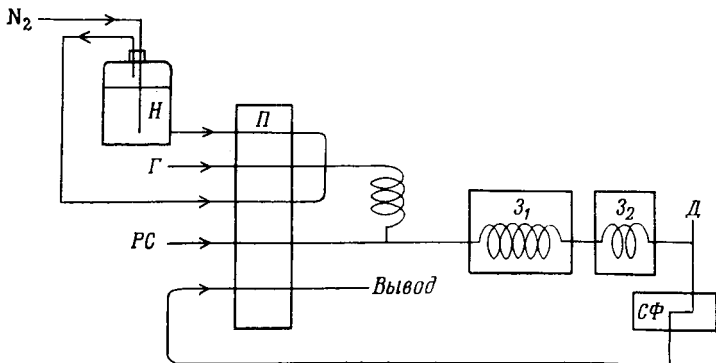
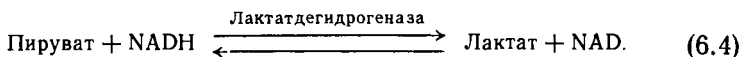


Рис. 6.1. Автоматическое устройство для анализа аминокислот, образующихся в ходе реакции и окрашиваемых нингидрином. Перистальтический насос (П) смешивает нингидрин (Н) с гидразином (Г) и азотом. (В проточной трубке образуются пузырьки азота и разделяют жидкость на несмешивающиеся друг с другом последовательные участки.) Гидразин и нингидрин интенсивно перемешиваются в первом змеевике, образуя активный аналитический раствор. Затем этот раствор смешивают и инкубируют с реакционной смесью (РС) в змеевике З₁ при 95 °С в течение 20 мин., в результате чего смесь окрашивается. После охлаждения до 25 °С в змеевике З₂ пузырьки азота удаляют через специальное устройство (Д), реакционную смесь пропускают через проточную ячейку спектрофотометра (СФ) и измеряют поглощение раствора. Объем каждой порции смешиваемого раствора зависит от диаметра трубки. Тот же перистальтический насос откачивает раствор из ячейки прибора. Диаметр выводящей трубки существенно меньше суммы диаметров трубок, через которые все компоненты смеси поступают в ячейку, поэтому часть раствора и пузырьки азота с силой выбрасываются через устройство Д. [Fersht A. R., Renard M., *Biochemistry* 13, 1416 (1974); Lenard J., Johnson S. L., Hyman R. W., Hess G. P., *Anal. Biochem.*, 11, 30 (1965), с изменениями.]

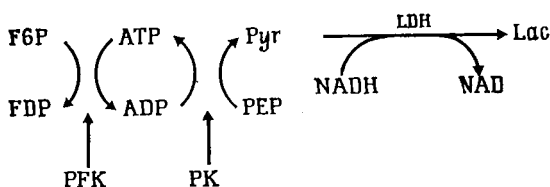
4. Использование сопряженных реакций

Реакции, в ходе которых не образуются окрашенные или флуоресцирующие соединения, могут быть сопряжены с другими ферментативными реакциями, позволяющими получать такие соединения. Многие из этих реакций идут с образованием или расходом NADH. Образование пирувата можно связать с превращением NADH в NAD с помощью лактатдегидрогеназы:



Образование же АТФ можно связать с реакцией (6.4) с помощью пируваткиназы, как будет показано ниже. Для определения фосфофруктокиназы можно воспользоваться следующей

совокупностью реакций:



(F6P — фруктозо-6-фосфат, FDP — фруктозо-1,6-дифосфат, Pyg — пируват, PEP — фосфоенолпируват, PFK — фосфофруктокиназа, PK — пируваткиназа, LDH — лактатдегидрогеназа).

Другой метод исследования фосфофруктокиназы основан на превращении фруктозодифосфата в диоксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат с участием альдолазы, изомеризации триозофосфатов с помощью триозофосфатизомеразы и последующем измерении количества образовавшегося NADH в ходе реакции окисления глицеральдегидфосфата глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой.

5. Автоматическое титрование кислоты или основания

Гидролитическую реакцию, в ходе которой происходит высвобождение кислоты, удобно исследовать с помощью титрования основанием. Лучше всего использовать для этого автоматическое титрование с применением рН-ста, когда рН раствора, регистрируемый стеклянным электродом, поддерживается постоянным благодаря добавлению основания с помощью шприца, управляемого электронным устройством. Объем, в котором протекает реакция, составляет всего 1 мл, а минимальное количество основания, которое можно зарегистрировать, равно ~ 50 нмоль (5—10 мкл раствора основания с концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-2}$ М). Обычно источником ошибок здесь является изменение рН раствора под действием растворенного CO_2 .

6. Применение радиоактивных изотопов

Наиболее чувствительные методы анализа основаны на использовании радиоактивных субстратов. Объем реакционной смеси составляет в этом случае всего 20—100 мкл.

Радиоактивность измеряется в кюри (Ки); $1 \text{ Ки} = 2,22 \cdot 10^{12}$ расп. мин⁻¹. На практике ее характеризуют числом импульсов в 1 мин. Для измерения радиоактивности используют сцинтилляционные счетчики, способные регистрировать излучение, испускаемое радиоактивными изотопами ^3H , ^{14}C , ^{35}S и ^{32}P .

Эти изотопы при распаде испускают β -частицы (электроны), которые вызывают свечение сцинтиллятора, регистрируемое фотомножителем (см. приложение). Эффективность счета при низкоэнергетическом излучении, испускаемом изотопом ^3H , составляет 15—40%, а для изотопов ^{14}C , ^{35}S и ^{32}P эта величина достигает 80%. Благодаря тому что энергетический спектр излучения ^3H существенно отличается от спектров излучения других изотопов, распад ^3H можно регистрировать в их присутствии, проводя измерение радиоактивности в разных областях энергетического спектра (опыты с двойной меткой) (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Некоторые часто использующиеся радиоактивные изотопы

Изотоп	Период полураспада	Удельная активность при 100%-ном обогащении, Ки·моль ⁻¹	Тип излучения	Максимальная энергия излучения, МэВ
^{14}C	5730 лет	62,4	β -частицы	0,156
^3H	12,35 лет	$2,9 \cdot 10^4$	β -частицы	0,0186
^{35}S	87,4 сут	$1,49 \cdot 10^6$	β -частицы	0,167
^{32}P	14,3 сут	$9,13 \cdot 10^6$	β -частицы	1,709
^{125}I	60 сут	$2,18 \cdot 10^6$	γ -лучи	
^{131}I	8,06 сут	$1,62 \cdot 10^7$	β -частицы и γ -лучи	0,247—0,806
^{76}Se	120 сут	$1,09 \cdot 10^6$	γ -лучи	

Излучение изотопа ^{32}P характеризуется настолько высокой энергией, что его можно регистрировать без сцинтиллятора, используя эффект Черенкова. При прохождении через воду или полиэтиленовую ампулу электроны движутся так быстро, что

Таблица 6.2

Некоторые меченные радиоактивными изотопами субстраты, имеющиеся в Радиохимическом центре (Amersham)

Субстрат	Удельная активность, Ки·моль ⁻¹	Чувствительность, пмоль ^{а)}
[^{14}C] Метионин (обогащение 90%)	280	0,1
[Me ^3H] Метионин	$8 \cdot 10^3$	0,01
[^{35}S] Метионин	$3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-4}$
[γ ^{32}P] АТФ	$1,5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^{-5}$

а) Определяется исходя из того, что минимальное число импульсов в минуту, которое можно зарегистрировать, равно 50.

спонтанно испускают фотоны, которые удается регистрировать с эффективностью порядка 40% с помощью счетчика с открытым окном. Этот эффект был использован для подсчета числа распадов изотопов ^{32}P и ^{14}C , одновременно присутствующих в образце, сначала с помощью излучения Черенкова, а затем повторным подсчетом в присутствии сцинтиллятора.

Чувствительность методов с использованием радиоактивных изотопов зависит от удельной активности препарата (табл. 6.2). Иногда удается обнаружить соединение, когда его количество не превышает 10^{-17} моль, что на 6—7 порядков меньше, чем минимальное количество, которое можно зарегистрировать спектрофотометрически.

Возможные источники ошибок

а. Тушение. Излучение трития настолько слабое, что практически целиком поглощается фильтровальной бумагой, хроматографической пластинкой, на которой адсорбирован образец, или осадком. Излучение изотопа ^{14}C регистрировать легче, но иногда максимум энергетического спектра смещается в сторону меньших энергий. Следует иметь в виду, что окрашенные соединения или древесный уголь могут поглощать свет, испускаемый сцинтиллятором.

б. Перенос ^3H . В ряде случаев тритий переносится с субстрата на растворитель или белок. В связи с этим, а также имея в виду сказанное выше, лучше использовать другой изотоп — ^{14}C , хотя более высокая удельная активность и относительно небольшая стоимость соединений, меченных тритием, часто компенсируют указанные недостатки.

в. Другие источники ошибок. Вода уменьшает эффективность счета, поэтому она должна присутствовать в образцах в строго фиксированном количестве. Иногда к артефактам приводит добавление основания. Необходимо также иметь в виду, что освещение сцинтилляторов вызывает их фосфоресценцию, которая может длиться несколько минут.

Разделение продуктов реакции

Совершенно очевидно, что для исследования той или иной реакции необходимо отделить продукты от исходных реагентов, а затем измерить радиоактивность. Весьма удобными методами разделения являются хроматография и высоковольтный электрофорез, поскольку бумагу можно разрезать на полоски и точно измерить их *относительную* радиоактивность. Еще удобнее использовать для избирательной адсорбции или выделения нужного соединения прокладку из фильтра. Например, меченую АТР

можно адсорбировать на древесном угле, который затем собирается на стеклянном фильтре, или на диске, содержащем древесный уголь. Для избирательной адсорбции анионов используются фильтры из диэтиламонийметилцеллюлозы, а катионов — фильтры из карбоксиметилцеллюлозы. Белки и любые прочно связанные с ними лиганды часто адсорбируют на фильтрах из нитроцеллюлозы. Ковалентно меченные белки или полинуклеотиды можно осадить кислотой и собрать на стеклянном фильтре (если образуется плотный осадок) или на нитроцеллюлозе (если осадок рыхлый). Эти фильтры не уменьшают эффективности регистрации излучения ^{14}C и ^{32}P .

Б. Графическое представление кинетических данных

1. Экспоненты

а. Простая экспонента

Для реакции первого порядка



концентрация вещества В в момент времени t , $[\text{B}]_t$, связана с конечной концентрацией $[\text{B}]_\infty$ соотношением

$$[\text{B}]_t = [\text{B}]_\infty [1 - \exp(-kt)], \quad (6.6)$$

или

$$\ln([\text{B}]_\infty - [\text{B}]_t) = \ln[\text{B}]_\infty - kt \quad (6.7)$$

[сравните с уравнением (4.5)]. Обычно k находят из графика, построенного в координатах $\{t; \ln([\text{B}]_\infty - [\text{B}]_t)\}$. Использование этой анаморфозы требует предварительного определения предельной концентрации $[\text{B}]_\infty$; следует отметить, что небольшие отклонения в оценке этой величины не будут приводить к существенным искажениям параметров, которые определяются из прямой, проведенной с помощью метода наименьших квадратов.

б. Метод Гуггенгейма

В тех случаях, когда не удастся найти предельное значение $[\text{B}]$, можно воспользоваться методом Гуггенгейма [2], используя зависимость

$$\ln([\text{B}]_{t+\Delta t} - [\text{B}]_t) = \text{const} - kt. \quad (6.8)$$

Константа k определяется из графика, построенного в координатах $\{t; \ln([\text{B}]_{t+\Delta t} - [\text{B}]_t)\}$, где Δt — постоянный отрезок времени, составляющий по крайней мере два-три периода полу-превращения.

в. Разность экспонент

Найти константы скорости для процесса, описываемого уравнением

$$[B] = X \{ \exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t) \} \quad (6.9)$$

[сравните с уравнением (4.29)], относительно просто, если одна из констант скорости в 5—10 раз больше другой. Используя

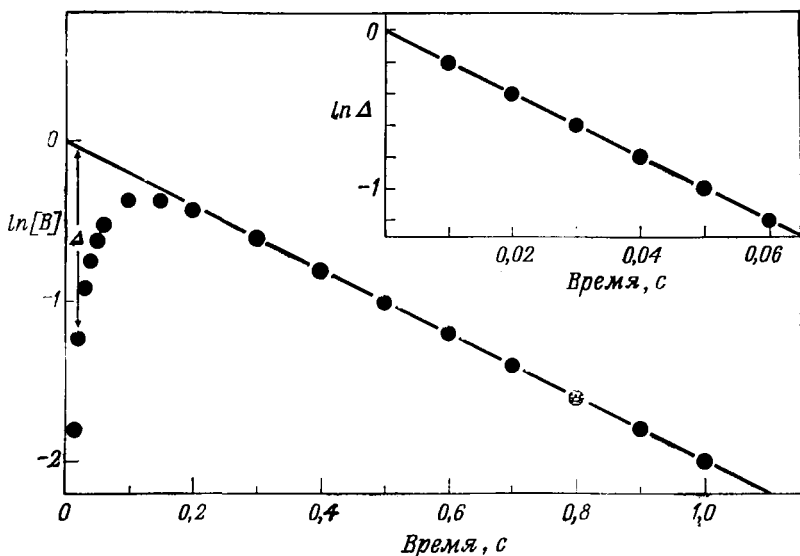


Рис. 6.2. Графический метод анализа кинетики реакции, подчиняющейся уравнению (6.9). График построен в координатах $\{t; \ln[B]\}$. Константа скорости медленного процесса определяется из наклона линейного участка кривой, когда быстрый процесс уже завершился. Константа скорости быстрого процесса определяется из графика зависимости $\ln \Delta$ (разность между значением концентрации B в данный момент времени и значением, полученным экстраполяцией линейного участка, как показано на рисунке) от времени, построенного по начальным точкам кривой. Для рассматриваемого примера константы скорости равны 20 и 2 с^{-1} .

точки кривой, соответствующие временам t , в 5—10 раз превышающим время полупревращения для первого процесса, строят по ним в полулогарифмическом масштабе прямую, которая относится только ко второму процессу, поскольку первый уже завершился. Затем подставляют полученные данные в уравнение (6.9) и находят константу скорости более быстрого процесса. Часто эта процедура выполняется графически, как показано на рис. 6.2. Если константы скорости разделить таким способом не

удается, проще попытаться изменить их соотношение, изменив условия проведения реакции, чем прибегать к методу наименьших квадратов.

2. Реакции второго порядка



Кинетику реакций второго порядка удобнее всего анализировать, если «превратить» их в реакции псевдопервого порядка, приняв, что концентрация одного из реагентов намного выше концентрации другого. При $[A] \gg [B]$ концентрация A за время реакции практически не изменяется и, следовательно,

$$d[C]/dt = -d[B]/dt = k_2 [A]_0 [B]. \quad (6.11)$$

Исчезновение B и накопление C представляет собой реакцию первого порядка с константой скорости псевдопервого порядка $k_2 [A]_0$. Построение графиков для серии таких реакций, имеющих разные значения $[A]_0$, позволяет определить k_2 .

Когда начальные концентрации веществ A и B близки, аналитическое решение кинетического уравнения имеет вид

$$(\ln [A]_0 [B]/[B]_0 [A])/([B]_0 - [A]_0) = k_2 t, \quad (6.12)$$

которое трудно представить в графической форме. Однако ситуация существенно упрощается, если $[A]_0 = [B]_0$. В этом случае аналитическое решение имеет вид

$$1/([A]_0 - [C]) - 1/[A]_0 = k_2 t. \quad (6.13)$$

Это простое уравнение достаточно точно выполняется, даже когда начальные концентрации не совсем равны друг другу. В этом случае вместо $[A]_0$ в уравнении (6.13) следует использовать среднее между значениями $[A]_0$ и $[B]_0$.

3. Кинетика Михаэлиса — Ментен

Несмотря на то что в последнее время для приведения экспериментальных данных к виду, соответствующему интегральной форме уравнения Михаэлиса — Ментен, очень широко применяется ЭВМ и это даже стало чем-то вроде моды, лучше всего для определения k_{cat} , k_{cat}/K_M и K_M использовать классический подход, заключающийся в измерении начальных скоростей (т.е. при глубине превращения до 5%) и построении такого графика, как график Эди — Хофсти [уравнение (3.29)] [3—5]. Измерения скорости целесообразно проводить при следующих концентрациях субстрата: $8K_M$, $4K_M$, $2K_M$, K_M , $0,5K_M$, $0,25K_M$, $0,125K_M$.

В. Определение констант диссоциации фермент-субстратных комплексов

1. Кинетика

Как указывалось в гл. 3, K_M для ферментативных реакций не всегда равна константе диссоциации фермент-субстратного комплекса; она может быть меньше или больше этой величины в зависимости от того, происходит накопление промежуточных соединений или выполняется механизм Бриггса — Холдейна. Чтобы на основании результатов стационарной кинетики определить константы диссоциации фермент-субстратных комплексов, необходимо либо вводить какие-то допущения о механизме реакции, либо постараться получить дополнительные данные. Более ценную информацию дает предстационарная кинетика, поскольку в этом случае стадии химического превращения субстрата и стадии связывания часто можно разграничить.

Константы диссоциации для конкурентных ингибиторов легко определить из опытов по ингибированию, используя уравнение (3.32). Это уравнение выполняется независимо от того, является ли K_M истинной константой диссоциации для субстрата. Сначала следует показать, что ингибирование является конкурентным; для этого определяют кажущуюся константу K_M для субстрата при различных концентрациях ингибитора, а затем из уравнения (3.32) рассчитывают K_i . Значительные изменения в K_M получены только при относительно высоких концентрациях ингибитора.

2. Равновесный диализ

Этот метод позволяет прямо измерить концентрацию свободного и связанного с ферментом лиганда. Раствор фермента (и лиганда) отделяют от раствора лиганда при помощи полупроницаемой мембраны, через которую могут проходить только небольшие молекулы. После установления равновесия, отобрав пробу из ячейки, содержащей белок, определяют сумму концентраций свободного и связанного лиганда; анализ пробы из другой ячейки дает концентрацию только свободного субстрата. Измерения можно проводить, используя лиганды, меченные радиоактивными изотопами, и ячейки объемом всего 20 мкл. Для анализа отбирают три образца по 5 мкл. Однако, поскольку для достижения равновесия даже при работе с самыми крупнопористыми мембранами требуется по крайней мере 1—2 ч, этот метод непригоден для исследования нестабильных лигандов и фермен-

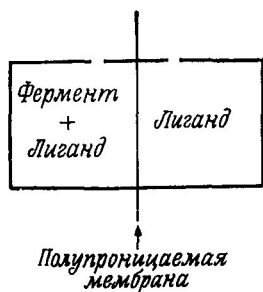


Рис. 6.3. Принцип равновесного диализа.

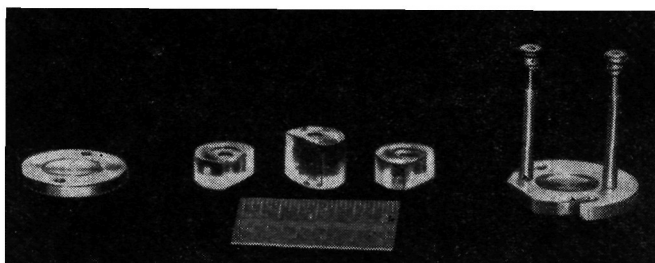


Рис. 6.4. Микроячейки для равновесного диализа [Englund P. T., Huberman J. A., Jovin T. M., Kornberg A., J. biol. Chem., 244, 3038 (1969).] Полу-проницаемую мембрану помещают между двумя ячейками из плексигласа и скрепляют их. Изображенное устройство имеет два типа ячеек; меньшие по размеру половинки ячеек могут крепиться к любому торцу центрального блока.

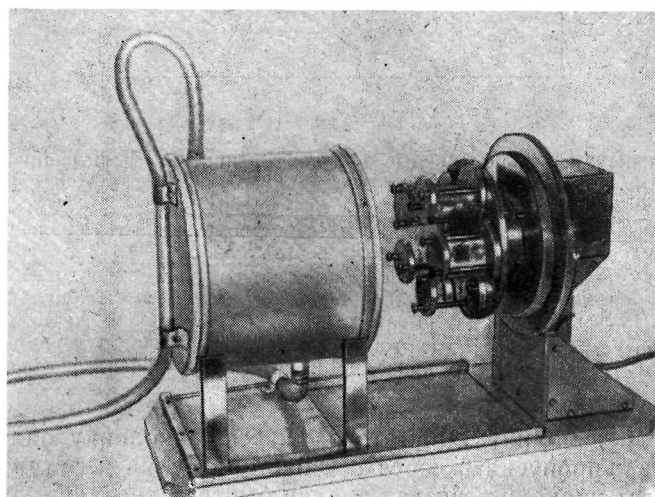


Рис. 6.5. Микроячейки, изображенные на рис. 6.4, смонтированные на вращающемся барабане для помещения их в термостат.

тов. Для проведения быстрых измерений используется метод *неравновесного диализа* [6], который основан на измерении скорости диффузии лиганда через мембрану из отсека, где он находится вместе с ферментом, в зависимости от концентрации. Связывание замедляет скорость диффузии.

3. Равновесная гель-фильтрация [7]

Некоторые гели (например, сефадекс и биогель) имеют поры такого размера, что в них вполне могут поместиться небольшие лиганды, тогда как для белковых молекул эти поры слишком

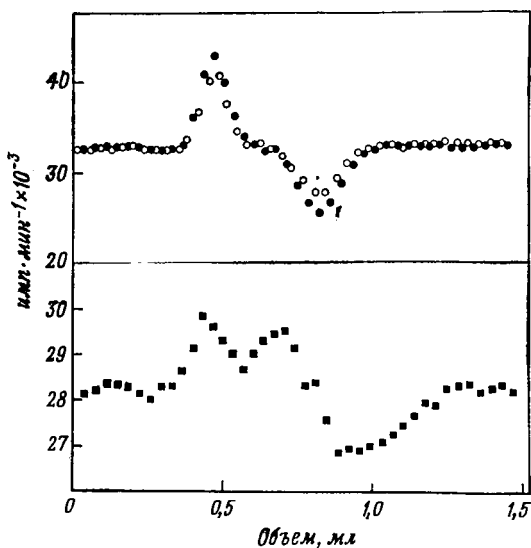


Рис. 6.6. Экспериментальные кривые, полученные при гель-фильтрации. А. Туберкулиновый шприц объемом 1 мл содержал 109 мкМ раствор $[^{14}\text{C}]$ валина (O) или 109 мкМ раствор $[^{14}\text{C}]$ валина и 4 мМ раствор АТР (●). К этим растворам было добавлено 100 мкл 25 мкМ раствора валил-тРНК—синтетазы. Стехиометрия связывания аминокислоты составляла 0,8 и 1,1 соответственно. Обратите внимание, что пик и впадина разделены плато, расположенным на уровне базовой линии; это означает, что опыт поставлен методически корректно. Б. При связывании ферментом $[\gamma^{32}\text{P}]$ АТР и валина часть меченой АТР гидролизуются, давая $[^{32}\text{P}]$ ортофосфат, который проходит через колонку быстрее, чем $[\gamma^{32}\text{P}]$ АТР; это приводит к артефакту — появлению двойного пика.

малы. Если заполнить хроматографическую колонку одним из таких гелей и пропускать через нее раствор белка и лиганда, то белок будет проходить через колонку быстрее лиганда, поскольку последний проникает внутрь частиц геля и задерживается в них, тогда как белок перемещается между этими частицами.

При проведении равновесной гель-фильтрации колонку уравнивают раствором лиганда и наносят образец фермента, уравнивающий буферным раствором. Проходя через колонку, белок связывает лиганд и перемещает его с такой же скоростью, с какой движется сам. В результате положение пика, соответствующего выходу лиганда из колонки, совпадает с положением пика, отвечающего белку, тогда как впадина на кривой находится в области, обычно занимаемой небольшими молекулами. Площадь под пиком равна площади впадины и соответствует количеству связанного лиганда.

Достоинство этого метода состоит в том, что фермент находится в контакте с данной молекулой лиганда очень недолго, и, следовательно, метод может использоваться в тех случаях, когда фермент медленно гидролизует лиганд. Еще одним преимуществом данной методики является то, что имеющиеся гели позволяют разделять молекулы по размерам; это, например, дает возможность исследовать связывание тРНК (мол. вес 25 000) аминоксил-тРНК—синтетазой (мол. вес 100 000) [8].

Рассмотренный метод позволяет работать с микроколичествами препаратов. При связывании небольших лигандов удобно использовать туберкулиновый шприц объемом 1 мл, заполненный сефадексом G-25. В шприц вводят образец объемом 100 мкл и каждую каплю (объемом 35—40 мкл) собирают в пробирку. Для измерения объема капель их втягивают в шприц. Однако при разделении белка и крупного лиганда приходится использовать колонки значительно большего размера (типичный пример — колонка размером $0,7 \times 18$ см, применяющаяся для разделения тРНК и тРНК—синтетазы).

Возможные источники ошибок

Для правильной постановки эксперимента необходимо, чтобы а) базовая линия оставалась постоянной; б) между пиком и впадиной находилось плато, расположенное на уровне базовой линии (это означает, что лиганд и белок существенно различаются по подвижности) и в) площадь пика была равна площади впадины. (Поскольку очень трудно приготовить точно такой же раствор фермента и лиганда, как раствор лиганда в уравнивающем буфере, целесообразно провести анализ аликвоты раствора фермента перед его нанесением на колонку с тем, чтобы внести необходимые поправки в площадь впадины.)

Причиной артефактов может быть задержка лиганда на колонке, обусловленная, например, связыванием лиганда с гелем (как в случае АТФ, АДФ и АМР, которые связываются с сефадексом). Из-за более высокой подвижности фосфата и пирофосфата, образующихся при гидролизе [$\gamma^{32}\text{P}$] АТФ, появляются дополнительные пики и впадины (рис. 6.6).

4. Ультрацентрифугирование

Связывание небольшого полимера с более крупным (например, тРНК с аминоксил-тРНК—синтетазой) нельзя исследовать методом равновесного диализа, а для равновесной гель-фильтрации требуются относительно большие объемы. В этом случае используют метод аналитического центрифугирования, позволяющий работать с объемами 100—200 мкл. Ячейку центрифуги

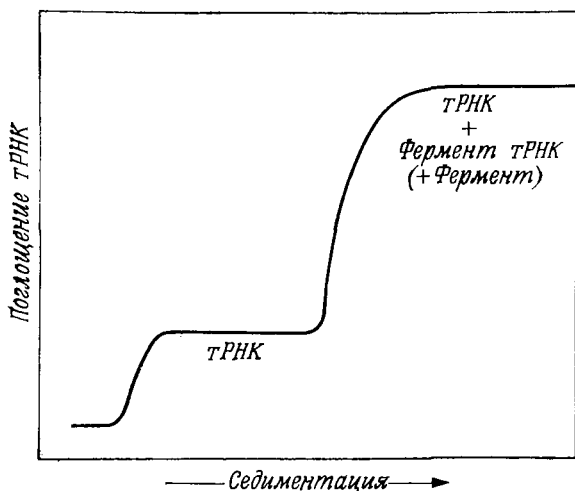


Рис. 6.7. Седиментация смеси тРНК и аминоксил-тРНК—синтетазы. Комплекс фермента с тРНК осаждается быстрее свободной тРНК. Свободный фермент и его комплекс с тРНК осаждаются вместе, поскольку находятся в состоянии быстро устанавливающегося равновесия.

заполняют раствором, содержащим смесь, скажем, тРНК и аминоксил-тРНК—синтетазы, и измеряют поглощение УФ-света связанной и свободной тРНК непосредственно в ходе седиментации. Комплекс фермента с тРНК, имеющий более высокий молекулярный вес, осаждается быстрее свободной тРНК, давая четкую границу поглощения, перемещающуюся по мере осаждения комплекса (рис. 6.7) [9]¹.

¹ Метод ультрацентрифугирования может быть использован и для изучения связывания фермента с высокомолекулярным субстратом (например, для изучения связывания фосфорилазы гликогеном: Чеботарева Н. А., Лисовская Н. П., Курганов Б. И., Молекул. биология, 13, 228—236, 1979). — Прим. ред.

5. Фильтрация [10]

Многие белки, связанные с каким-либо медленно отщепляющимся лигандом, адсорбируются на фильтрах из нитроцеллюлозы, тогда как свободный лиганд такими фильтрами не удерживается. В некоторых случаях это дает исследователю очень экономичный метод анализа связывания. С его помощью получено много ценных данных о присоединении нуклеиновых кислот к белкам. Отметим возможные источники ошибок при использовании фильтрации: часто связывание осуществляется менее чем на 100%; фильтры могут отличаться от партии к партии и насыщаться при довольно низких концентрациях белка.

6. Спектроскопические методы

За исключением ЯМР, с помощью которого удается измерить концентрации свободного и связанного лиганда, спектроскопические методы обычно не позволяют прямо определить число связанных молекул лиганда. При связывании лиганда в спектре происходят изменения, позволяющие найти лишь *долю* связанного белка, и, не имея дополнительной информации, нельзя установить *число* присоединившихся молекул лиганда. Типичным примером такого рода является изменение в спектре флуоресценции белка или в спектре флуоресценции или поглощения лиганда, вызываемое присоединением лиганда к ферменту. Обычно в таких опытах добавляют возрастающие количества лиганда к относительно разбавленному раствору белка и строят график зависимости изменения какого-либо параметра спектра от количества добавленного лиганда. Если связываемый лиганд не является хромофором, то исследуют конкурентное ингибирование процесса присоединения лигандов-хромофоров.

7. Титрование

Если константа диссоциации комплекса достаточно мала, можно определить число эквивалентов лиганда, которое вызывает максимальное изменение в спектре; это максимальное изменение имеет место в том случае, когда заняты все центры связывания. Например, к раствору белка, концентрация которого по крайней мере в 10 раз больше константы диссоциации, добавляются возрастающие количества субстрата. Для установления стехиометрии строят график, представленный на рис. 6.8.

Другой метод титрования предложен Джобом [11].

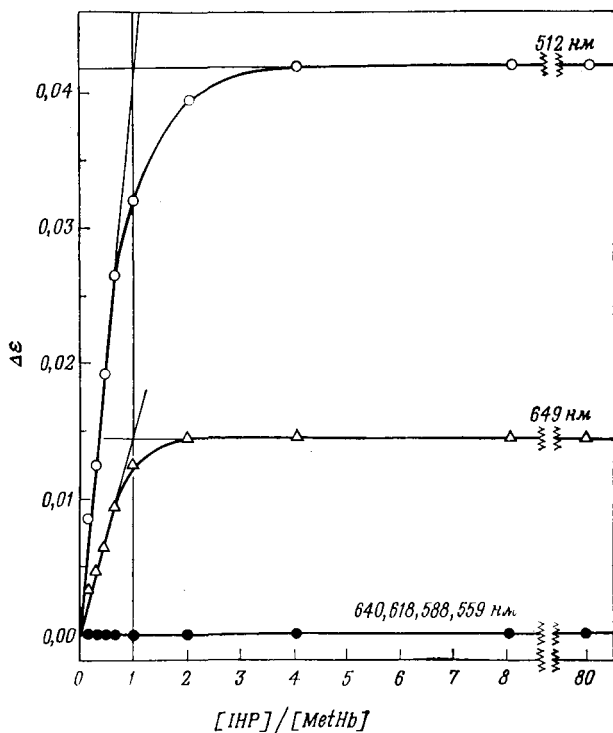


Рис. 6.8. Спектрофотометрическое титрование метгемоглобина (MetHb) инозитолгексафосфатом (IHP). При 512 и 649 нм поглощение комплекса увеличивается, а при 640, 618, 588 и 559 нм остается постоянным. Концентрация метгемоглобина в расчете на тетрамер (20 мкМ) примерно в 14 раз превышает константу диссоциации (1,4 мкМ) этого комплекса. Точка пересечения касательной к начальному участку кривой с плато дает стехиометрию связывания (в данном случае 1). Заметим, что этот простой метод нельзя использовать, если начальная концентрация белка не очень сильно превышает константу диссоциации, поскольку предполагается, что весь лиганд связывается белком сразу после добавления.

Г. Графическое представление данных по связыванию

1. Наличие одного центра связывания в молекуле фермента

Связывание лиганда с одним центром молекулы белка описывается следующими уравнениями:



$$K_S = [E][L]/[EL], \quad (6.15)$$

где $[E]$ и $[L]$ — концентрации свободного фермента и лиганда соответственно.

Вводя полную концентрацию фермента $[E]_0$, получаем

$$[EL] = [E]_0 [L] / ([L] + K_S). \quad (6.16)$$

Уравнение (6.16) аналогично уравнению Михаэлиса — Ментен и может использоваться аналогичным образом. Удобным способом графического представления данных является построение графика, аналогичного графику Эди:

$$[EL] = [E]_0 - K_S ([EL]/[L]). \quad (6.17)$$

Построение графика в координатах $\{[EL]/[L]; [EL]\}$ дает значение K_S .

Уравнение (6.17) нельзя использовать для непосредственного анализа спектроскопических данных, поскольку концентрация EL неизвестна. Однако, поскольку эта величина обычно прямо пропорциональна изменению определенного параметра спектра, можно написать, что

$$\Delta F = \Delta F_{\max} - K_S (\Delta F/[L]), \quad (6.18)$$

где ΔF — изменение этого параметра при добавлении лиганда к раствору белка до конечной концентрации $[L]$. График в координатах $\{\Delta F/[L]; \Delta F\}$ дает K_S и ΔF_{\max} — изменение параметра при переходе всего белка в связанное состояние¹.

2. Наличие нескольких центров связывания

а. Идентичные центры

Если молекула белка имеет n идентичных, не взаимодействующих друг с другом центров, то уравнение (6.17) можно преобразовать к виду

$$v = n - K_S (v/[L]), \quad (6.19)$$

где v — число молей лиганда, связанных с одним молем белка. Из графика, построенного в координатах $\{v/[L]; v\}$ (график Скэтчарда), можно найти стехиометрию (n) и константу K_S .

¹ Особый случай спектрофлуориметрического титрования при сопоставимых концентрациях фермента и лиганда, когда величины $[E]_0$ и ΔF_{\max} неизвестны, проанализирован в следующих работах: Курганов Б. И., Гуревич В. М., Сугрובה Н. П., Яковлев В. А., Молекул. биология, 6, 698—704, 1972; Курганов Б. И., Сугрובה Н. П., Яковлев В. А., FEBS Letters, 19, 308—310, 1972. — Прим. ред.

Неидентичные центры

Если в молекуле белка имеется два типа центров, один — сильно связывающий, а другой — слабо, то график Скэтчарда будет состоять из двух частей, относящихся к связыванию с разными центрами. Определить значения K_s из таких графиков можно только в том случае, если эти константы различаются по крайней мере в 10 раз.

Приложение: сцинтилляторы

1. *ВВОТ*. Хотя этот смешивающийся с водой сцинтиллятор уступает по емкости раствору Брэя [12], его проще приготовить и он не портится при стоянии на свету. В нем может присутствовать до 1% воды. Два литра сцинтиллятора содержат 9 г ВВОТ (2,5-бис-[5'-трет-бутилбензоксазолил-(2')] -тиофена), 1,51 г толуола и 0,51 г метоксиэтанола.

2. *РРО/РОРОР*. Фильтры из нитроцеллюлозы можно прямо погружать в этот не смешивающийся с водой сцинтиллятор. Состав сцинтиллятора: 2,5 л толуола, 12,5 г РРО (2,5-дифенил-оксазола) и 0,75 г РОРОР (1,4-бис-[2(5-фенил-оксазолил)] бензола).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ehrenberg M., Cronvall E., Rigler R., FEBS Letts., 18, 199 (1971).
2. Guggenheim E. A., Phil. Mag., 2, 538 (1926).
3. Nimmo I. A., Atkins G. L., Biochem. J., 141, 913 (1974).
4. Jennings R. R., Niemann C., J. Am. chem. Soc., 77, 5432 (1955).
5. Cornish-Bowden A., Biochem. J., 149, 305 (1975).
6. Colowick S. P., Womack F. C., J. biol. Chem., 244, 774 (1969).
7. Hummel J. P., Dreyer W. J., Biochim. biophys. Acta, 63, 530 (1962).
8. Waterson R. M., Clarke S. J., Kalousek F., Konigsberg W. H., J. biol. Chem., 248, 181 (1973).
9. Krauss G., Pingoud A., Boehme D., Riesner D., Peters F., Maass G., Eur. J. Biochem., 55, 517 (1975).
10. Yarus M., Berg P., Analys. Biochem., 35, 450 (1970).
11. Job P., Annls. Chim. (Ser. 10), 9, 113 (1928).
12. Bray G. A., Analyt. Biochem., 1, 279 (1960).

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Механизм ферментативной реакции можно считать полностью установленным, если охарактеризованы все промежуточные соединения, комплексы и конформационные состояния фермента и определены константы скорости их взаимопревращений. Таким образом, задача исследователя состоит в установлении числа и последовательности промежуточных соединений и процессов, выяснении их природы (т. е. в установлении, образуются ли промежуточные соединения с ковалентными связями или имеют место конформационные изменения), в измерении констант скорости и (исходя из анализа их рН-зависимости) в определении степени участия в катализе кислотых и основных групп. Исследователь должен установить химическую природу промежуточных соединений, выяснить, в ходе каких превращений они образуются и распадаются, и определить тип катализа. Все эти результаты вместе с данными рентгеноструктурного анализа и теоретическими расчетами позволят полностью описать механизм данной реакции.

Рассмотрим ряд методов обнаружения промежуточных соединений и описания путей реакции на примере процессов, катализируемых некоторыми хорошо изученными ферментами.

А. Возможности предстационарной и стационарной кинетики

Часто можно услышать, что кинетика не в состоянии доказать правильность предложенного механизма, но зато всегда может исключить альтернативные механизмы. Это утверждение, несомненно, справедливо для стационарной кинетики, когда измеряются только скорости появления продуктов или исчезновения реагентов, но оно не распространяется на предстационарную кинетику. Если промежуточные соединения можно регистрировать и, таким образом, определить скорость их образования и исчезновения, исследователь в состоянии доказать адекватность данного механизма. В этом заключается главная сила предстационарной кинетики; фермент берется в количествах, *сравнимых*

с количеством субстрата, и исследуются события, происходящие на самом ферменте. Конечно, и в этом случае некоторые промежуточные соединения могут остаться неидентифицированными — либо из-за того, что они не накапливаются, либо из-за того, что не дают вклад в изменение спектров или просто имеют слишком малые времена превращения, чтобы их можно было зарегистрировать. И тем не менее общий ход реакции можно проследить достаточно строго с помощью предстационарной кинетики. Основная слабость стационарной кинетики состоит в том, что получаемые данные всегда являются неоднозначными. Стационарная кинетика не дает прямой информации относительно числа промежуточных соединений и поэтому всегда оперирует минимальным числом этих соединений. Это не означает, что предстационарная кинетика должна вытеснить стационарную; скорее следует использовать сочетание этих двух подходов. Стационарная кинетика становится значительно более мощным инструментом, если с помощью предстационарной кинетики получена информация о промежуточных соединениях.

Предстационарная кинетика обладает рядом преимуществ с практической точки зрения. Она имеет дело с очень простыми по сути процессами; например, с ее помощью определяют стехиометрию процесса, в ходе которого происходит «всплеск» концентрации продукта, находят константы скорости переноса связанных с ферментом промежуточных соединений на второй субстрат или исследуют индуцируемые лигандами конформационные изменения в белках. Кроме того, характеристики процессов первого порядка (которые обычно изучают) не зависят от концентрации фермента в отличие от констант скорости, измеряемых в стационарной кинетике. Для исследования быстрых реакций требуются очень высокие концентрации ферментов, но их значения близки к концентрациям *in vivo*. Более того, аналогичные концентрации обычно используются при прямом определении физического состояния белка, что позволяет получать, например, данные об агрегации в условиях, при которых протекает реакция.

Данные предстационарной кинетики основаны на прямых измерениях, а прямые данные всегда предпочтительнее косвенных, особенно если учесть неопределенности, возникающие обычно при интерпретации данных стационарной кинетики (разд. Б.4).

1. Выявление промежуточных соединений: что считать доказательством?

Основная часть изложенного ниже материала посвящена вопросам определения путей превращения субстратов в ходе ферментативных реакций. Обычно прежде всего нужно обнару-

жить промежуточные соединения, поскольку это является доводом в пользу существования данного пути. Мы будем считать, что образование промежуточного соединения в ходе реакции доказано, если выполняются следующие условия:

- а. Промежуточное соединение выделено и охарактеризовано.
- б. Промежуточное соединение образуется достаточно быстро, чтобы находиться на пути превращения.
- в. Промежуточное соединение реагирует достаточно быстро, чтобы находиться на пути превращения.

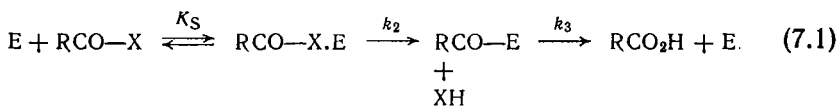
Чтобы выяснить, выполняются ли эти условия, необходимо на какой-то стадии исследований прибегнуть к предстационарной кинетике с тем, чтобы измерить константы скорости образования и исчезновения промежуточного соединения. Однако просто провести такие измерения недостаточно — нужно показать, что полученные константы согласуются с активностью фермента в стационарных условиях. Следовательно, весьма полезно и даже необходимо использовать сочетание этих двух подходов.

Следует помнить, что выделенное промежуточное соединение может представлять собой продукт превращения другого промежуточного соединения и на самом деле не образовываться в ходе реакции. Вот почему нужно, чтобы выполнялись условия б и в. И наоборот, может оказаться, что выделено само промежуточное соединение, но при выполнении экспериментальных процедур фермент переходит в другую, менее активную конформацию. В этом случае условия б и в не будут выполняться, несмотря на то что природа химического соединения не изменилась.

Б. Химотрипсин: выявление промежуточных соединений с помощью метода остановленной струи, данных стационарной кинетики и определения соотношения между продуктами

Механизм гидролиза амидов и эфиров, катализируемого этой типичной сериновой протеазой, включает образование на начальной стадии комплекса Михаэлиса с последующим ацилированием Ser-195 и образованием ацилфермента (гл. 1). Многие кинетические исследования ферментов были направлены на выявление ацилфермента. Полученные результаты хорошо демонстрируют возможности предстационарной и стационарной кинетики. Ацилфермент *накапливается* при гидролизе активированных или специфических эфирных субстратов ($k_2 > k_3$), так что выявить его относительно просто. В случае физиологических

пепетидов накопления ацилфермента не происходит ($k_2 < k_3$) и его выявление затруднено.



1. Выявление ацилфермента, образующегося при гидролизе эфиров, с помощью данных предстационарной кинетики

а. Исследование начального всплеска концентрации продукта реакции

В 1954 г. Хартли и Килби при исследовании реакции между химотрипсином, взятом в количестве, сравнимом с количеством субстрата, и избытком *n*-нитрофенилацетата или *n*-нитрофенилэтилкарбоната [1], обнаружили, что экстраполяция количества высвобождающегося *n*-нитрофенола к нулевому моменту времени дает не нулевое количество этого соединения, а указывает на наличие всплеска, амплитуда которого равна концентрации фермента (рис. 4.10). Они постулировали, что сначала эфир быстро ацилирует фермент в соотношении 1 : 1, а затем в ходе последующего превращения субстрата идет относительно медленный гидролиз ацилфермента — стадия, являющаяся лимитирующей. Впоследствии это предположение было подтверждено в ходе исследований с применением метода остановленной струи.

Позже аналогичные эксперименты были проведены и с многими другими ферментами. Однако наличие всплеска может быть обусловлено не накоплением промежуточных соединений, а причинами иной природы, что всегда следует иметь в виду. Ниже рассмотрено несколько примеров такого рода.

а. При связывании с первым молекул субстрата фермент переходит в менее активное конформационное состояние.

б. Лимитирующей стадией является высвобождение продукта.

в. Имеет место сильное ингибирование продуктом.

Исключить пп. а и б довольно сложно. Это удалось сделать в случае химотрипсина в ходе следующих исследований с применением метода остановленной струи.

б. Метод остановленной струи

1. *Хромофор в уходящей группе* [2—4]. Первые исследования, в которых использовался нитрофенилацетат, получили

дальнейшее развитие после того, как удалось синтезировать *n*-нитрофениловые эфиры специфических аминокислот, например

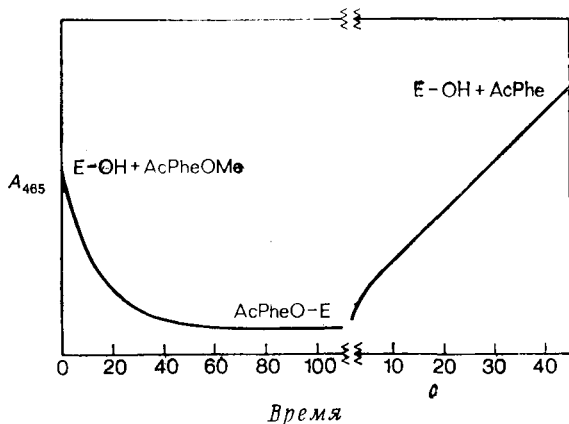
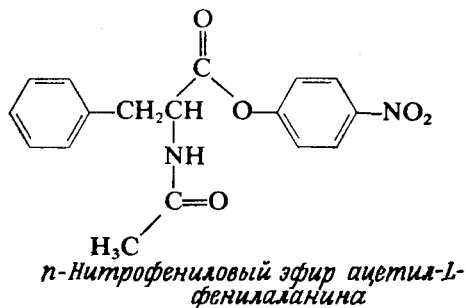


Рис. 7.1. Метод вытеснения профлавина. Растворы химотрипсина (10 мкМ), профлавина (50 мкМ) и AcPheOMe (2 мМ) смешивали при $\text{pH} = 6$ и 25°C в приставке к спектрофотометру, предназначенной для проведения исследований методом остановленной струи. Связывание субстрата протекало слишком быстро, чтобы его можно было зарегистрировать. Быстрое экспоненциальное уменьшение поглощения обусловлено вытеснением профлавина из фермента при образовании ацилфермента. Медленное увеличение поглощения отражает исчерпание субстрата и последующее уменьшение стационарной концентрации ацилфермента [4].

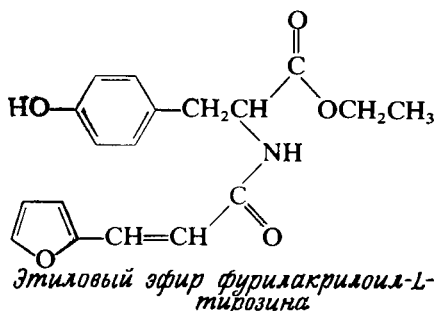
ацетил-L-фенилаланина, ацетил-L-тирозина и ацетил-L-триптофана. Скорость ацилирования фермента определяют по скорости появления нитрофенола или нитрофенолят-иона, полоса поглощения которого не совпадает с полосой поглощения исходного эфира.



При смешивании эфира с ферментом сначала наблюдается быстрый экспоненциальный рост поглощения, а затем поглощение увеличивается линейно и отражает постепенное накопление

нитрофенола. Константу скорости ацилирования и константу диссоциации фермент-субстратного комплекса можно рассчитать из концентрационной зависимости константы скорости экспоненциальной фазы [уравнение (4.44)]. Константа скорости для линейного участка дает скорость деацилирования. К сожалению, нитрофениловые эфиры часто настолько реакционноспособны, что скорость ацилирования слишком высока, чтобы можно было использовать метод остановленной струи.

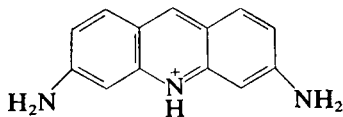
2. *Хромофор в ацильной группе* [4, 5]. Поглощение фурил-акрилоиловой группы зависит от полярности окружающей среды, а также от природы соединения, к которому эта группа присоединена. Связывание этилового эфира фурилакрилоил-L-тирозина с химотрипсином сопровождается небольшим изменением в спектре его поглощения; образование ацилфермента и последующий гидролиз также приводят к спектральным изменениям. Из соответствующих экспериментов можно определить константы скорости ацилирования и деацилирования и константу диссоциации комплекса Михаэлиса.



При смешивании этилового эфира фурилакрилоил-L-тирозина с ферментом на первом этапе происходит изменение поглощения раствора, обусловленное образованием комплекса Михаэлиса. Константа скорости этого процесса лежит вне временной шкалы метода остановленной струи, однако данные по изменению поглощения можно использовать для расчета константы диссоциации. По мере накопления ацилфермента наблюдается экспоненциальный рост поглощения. Дальнейшие изменения в спектре фурилакрилоиловой группы связано с постепенным гидролизом этого эфира до свободной кислоты.

3. *Хромофор в обратимо связывающемся ингибиторе* [6, 7]. Спектр поглощения красителя профлавина очень сильно зависит от полярности растворителя. Профлавин является конкурентным ингибитором химотрипсина, трипсина и тромбина; его связыва-

ние сопровождается значительным увеличением поглощения при 465 нм ($\Delta\epsilon \sim 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) (рис. 7.1).



Профлавин (3,6-диминоакридин)

При смешивании эфира (например, этилового эфира ацетил-L-фенилаланина) с химотрипсином и профлавином происходит следующее. Связывание субстрата с ферментом сопровождается быстрым вытеснением некоторого количества профлавина из активного центра, что приводит к уменьшению A_{465} . Когда образуется ацилфермент, равновесие между эфиром и профлавином при их связывании ферментом смещается, приводя к полному вытеснению профлавина. Поглощение остается постоянным до тех пор, пока не израсходуется весь эфир и не исчезнет ацилфермент. Зная количество вытесненного на первом этапе профлавина, можно рассчитать константу диссоциации фермент-субстратного комплекса, а из второй, экспоненциальной фазы получить константу скорости ацилирования.

Метод вытеснения профлавина значительно более удобен, чем использование соединений, содержащих фурилакрилоильную группу, поскольку нет необходимости синтезировать специальные субстраты; при работе со всеми субстратами можно использовать одно легкодоступное соединение. Вообще говоря, модифицированными субстратами лучше не пользоваться совсем, поскольку к трудностям, связанным с химическим синтезом, добавляются сомнения, правильно ли эти соединения идентифицированы.

4. *Деацилирование.* Отдельные неспецифические ацилферменты можно синтезировать и хранить их при низком pH [8—11]. При переходе к высоким pH ацилферменты деацилируются со скоростью, ожидаемой исходя из данных по стационарной кинетике. Этот подход был использован для изучения свойств специфических ацилферментов. При инкубации производных ацил-L-триптофана в среде с pH 3—4 происходит накопление ацилфермента. pH раствора можно очень резко изменить, смешав его с концентрированным буфером с высоким pH в кювете спектрофотометра, применяемого для регистрации в методе остановленной струи [12, 13]. Константу скорости деацилирования можно определить методом замещения профлавина или используя соединения, содержащие фурилакрилоильную группу. Ацилферменты получают и *in situ*, смешав эфирный субстрат,

содержащий нитрофенильную группу, с избытком фермента в устройстве, применяющемся в методе остановленной струи [14].

Эти эксперименты показывают, что промежуточным соединением в реакции гидролиза эфиров является ацилфермент, который можно выделить при низких рН. Константа скорости деацилирования ацилфермента имеет такое же значение, какое было получено из данных по стационарной кинетике. Из опытов по изучению реакции ацилирования следует, что промежуточное соединение образуется довольно быстро, в стехиометрическом соотношении 1 : 1. Естественно, что ни в одном из этих экспериментов не было показано, что ацилируется именно Ser-195. Окончательно этот вопрос был решен лишь при рентгеноструктурном анализе индолил-ацетил-химоотрипсина (гл. 1) [15]. Вывод об участии в ацилировании Ser-195 был подтвержден классическим путем, состоящим в необратимом ингибировании фермента эфирами фосфорной кислоты (например, диизопропилфторфосфатом) с последующим выделением фосфатсодержащего пептида после частичного гидролиза белка [16, 17].

2. Выявление ацилфермента при гидролизе эфиров с помощью данных стационарной кинетики

В предыдущем разделе было показано, что кинетические исследования с помощью метода оставленной струи дают возможность обнаружить *накапливающиеся* промежуточные соединения. Стационарная кинетика не позволяет прямо выявить эти соединения, она дает лишь косвенные данные. Окончательный ответ на вопрос зависит от результатов прямых измерений с привлечением данных предстационарной кинетики. Однако стационарная кинетика позволяет выявить *ненакапливающиеся* промежуточные соединения и, основываясь на данных тех экспериментов, когда накопление происходит, *доказать* их существование и выяснить природу.

Для выявления промежуточных соединений с помощью стационарной кинетики необходимо, чтобы имело место накопление а) промежуточного соединения, способного взаимодействовать с акцептором (или желательнее с несколькими различными акцепторами), концентрация которого (или которых) может изменяться; б) общего для нескольких субстратов промежуточного соединения E—R, образуемого субстратами, каждый из которых содержит фрагмент R; это промежуточное соединение должно обладать способностью взаимодействовать с различными акцепторами.

Гидролиз эфиров (и амидов), катализируемый химоотрипсином, удовлетворяет обоим требованиям. Так, например, при

гидролизе *n*-нитрофенилового эфира ацетил-*L*-триптофана образуется ацилфермент, реагирующий с различными аминами, например с гидроксиламином, аланинамидом, гидразином и т. д., а также с такими спиртами, как метанол, давая гидроксамовую кислоту, дипептид, гидразид и метиловый эфир ацетил-*L*-триптофана соответственно. Аналогичный ацилфермент образуется при гидролизе фенилового, метилового, этилового и других эфиров аминокислот (а также при гидролизе амидов). Кинетические последствия, к которым приводит наличие общего промежуточного соединения, могут быть использованы для выявления его присутствия.

Таблица 7.1

Значения k_{cat} для катализируемого α -химотрипсинном гидролиза различных субстратов при pH 7,0 и 25 °C

Производное	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	Лимитирующая стадия	Источник данных ^{а)}
<i>Производные N-ацетил-L-триптофана</i>				
Амид	0,026	7,3	Ацилирование	1
Этиловый эфир	27	0,1	Деацилирование	1
Метиловый эфир	28	0,1	»	1
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир	30	0,002	»	1
<i>Производные N-ацетил-L-фенилаланина</i>				
Амид	0,039	37	Ацилирование	1
Этиловый эфир	63	0,09	Деацилирование	1
Метиловый эфир	58	0,15	»	1
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир	77	0,02	»	1
<i>Производные N-бензоилглицина</i>				
Этиловый эфир	0,1	2,3	В основном ацилирование	2
Метиловый эфир	0,14	2,4	То же	2
Изопропиловый эфир	0,05	2,3	Ацилирование	2
Изобутиловый эфир	0,17	2,4	В основном ацилирование	2
Холиновый эфир	0,43	1,2	Деацилирование	2
4-пиридинметиловый эфир	0,51	0,092	»	2
<i>n</i> -Метоксифениловый эфир	0,61	0,1	»	3
Фениловый эфир	0,54	0,14	»	3
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир	0,54	0,03	»	3

^{а)} 1—Zerner B., Bond R. P. M., Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., 86, 3674 (1964).

2—Erard R. M., Wilson I. B., J. biol. Chem., 238, 1718 (1963).

3—Williams A., Biochemistry, 9, 3383 (1970). (Данные приведены к pH 7,0 исходя из данных для pH 6,91 в предположении, что $pK_a = 6,8$.)

а. Распад общего для нескольких субстратов промежуточного соединения и значения V_{\max} и k_{cat}

Если из нескольких субстратов образуется одно и то же промежуточное соединение и если его распад является лимитирующей стадией процесса, то гидролиз всех этих субстратов характеризуется одинаковой константой k_{cat} . Этот феномен, обнаруженный Гутфройндом и Хаммондом в 1959 г. [18], наблюдался затем при исследовании многих серий эфирных субстратов химотрипсина (табл. 7.1). Для слабо активированных эфиров величина k_{cat} уменьшается до значения, меньшего k_3 , поскольку стадия, характеризуемая константой k_2 , становится частично лимитирующей [уравнение (7.1)]. В случае амидов k_{cat} очень мала и стадия с константой k_2 является полностью лимитирующей.

Однако наличие одинаковой константы k_{cat} для ряда субстратов еще не доказывает того факта, что происходит накопление общего ковалентного промежуточного соединения, распад которого является лимитирующей стадией. Например, k_{cat} для гидролиза большого числа эфиров фосфорной кислоты, протекающего с участием щелочной фосфатазы, одинакова [19, 20]. Объяснялось это тем, что лимитирующей стадией для всех реакций является гидролиз фосфорилфермента. Однако теперь представляется более вероятным, что при щелочном pH дефосфорилирование происходит быстро [21], а лимитирующей стадией является высвобождение неорганического фосфата из комплекса фермент — продукт (E.P_i) [22, 23]. Наличие одинаковой константы k_{cat} для всех упомянутых реакций действительно обусловлено образованием одного и того же промежуточного соединения, однако оно не является ковалентным.

б. Распределение промежуточного соединения между конкурирующими акцепторами

Если образующееся промежуточное соединение может реагировать с различными акцепторами, то для его обнаружения можно использовать два подхода.

Первый подход состоит в определении соотношения, в котором образуются продукты. Например, гидролиз химотрипсином серии эфиров гиппуровой кислоты в растворе гидроксилamina ведет к образованию свободной гиппуровой кислоты и гиппурилгидроксамовой кислоты в постоянном соотношении (табл. 7.2). Неферментативный гидролиз в тех же условиях приводит к разному соотношению между продуктами [24, 25].

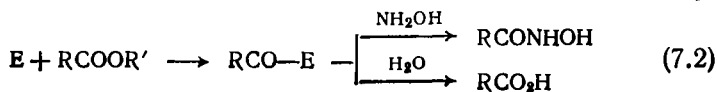


Таблица 7.2

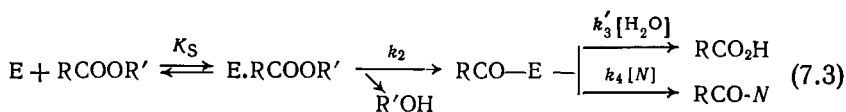
Соотношение между продуктами катализируемого α -химотрипсином гидролиза *N*-бензоилглициновых эфиров в 0,1 М растворе гидроксилamina [24, 25]

Эфир	Оксиминолиза/Гидролиза	
	в присутствии фермента рН 6,6–6,8	в отсутствие фермента рН 12
Метилловый	0,37	0,99
Изопропиловый	0,38	0,29
Гомохилиновый	0,37	1,73
4-пиридинметилловый	0,37	3,03

Это четко указывает на наличие общего промежуточного соединения.

Второй подход состоит в измерении скорости образования продуктов гидролиза определенного субстрата при разных концентрациях акцептора. Это дает информацию о лимитирующей стадии процесса и о природе промежуточного соединения. Предположим, что лимитирующей стадией является образование ацилфермента. В таком случае, поскольку акцептор реагирует с ацилферментом после лимитирующей стадии, он не может увеличить скорость гидролиза эфира. Суммарная скорость образования продуктов будет такой, как показано на рис. 7.2. Если лимитирующей стадией является гидролиз ацилфермента, то акцептор будет увеличивать скорость этой реакции и, следовательно, суммарную скорость образования продуктов (рис. 7.3).

Чтобы рассчитать кинетические параметры для распределения промежуточного соединения, можно воспользоваться схемой (7.3) (для простоты предполагается, что нуклеофил *N* не присоединяется к ферменту):



Применение обычного подхода, используемого для реакций, катализируемых химотрипсином [26], дает следующие выражения для k_{cat} и K_M :

$$K_M = K_S \left(\frac{k'_3 [H_2O] + k_4 [N]}{k_2 + k'_3 [H_2O] + k_4 [N]} \right). \quad (7.4)$$

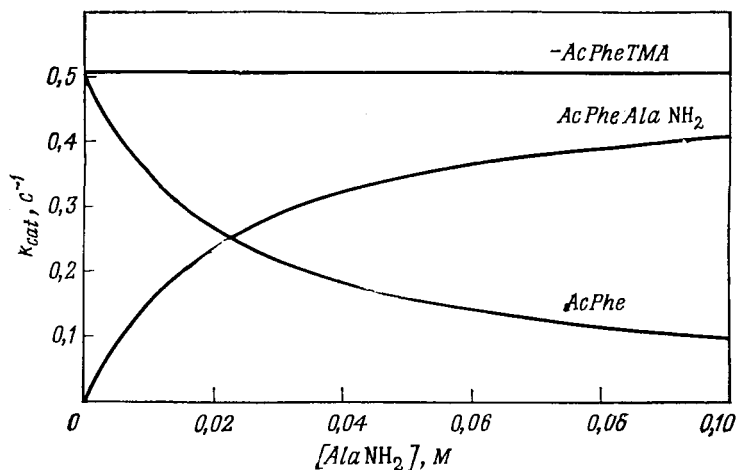


Рис. 7.2. Катализируемый хитотрипсином гидролиз и реакции трансацилирования *n*-триметиламмонийанилидацетилфенилаланина (AcPheTMA) в присутствии AlaNH₂ в различных концентрациях. Значения k_{cat} для исчезновения AcPheTMA и образования AcPhe и AcPheAlaNH₂ получены из уравнения (7.3) при $k_2 = 0,504 \text{ с}^{-1}$, $k'_3[\text{H}_2\text{O}] = 144 \text{ с}^{-1}$ и $k_4 = 6340 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ [14].

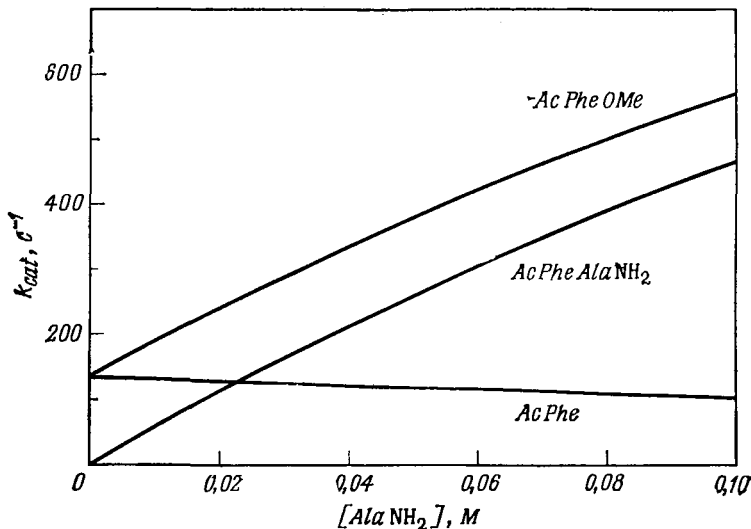


Рис. 7.3. Катализируемый хитотрипсином гидролиз и реакции трансацилирования метилового эфира ацетилфенилаланина (AcPheOMe) в присутствии AlaNH₂ в различных концентрациях. Значения k_{cat} для исчезновения AcPheOMe и образования AcPhe и AcPheAlaNH₂ получены из уравнения (7.3) при $k_2 = 2200 \text{ с}^{-1}$, $k'_3[\text{H}_2\text{O}] = 144 \text{ с}^{-1}$, $k_4 = 6340 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ [14].

Для реакции образования RCO_2H

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 k_3' [\text{H}_2\text{O}]}{k_2 + k_3' [\text{H}_2\text{O}] + k_4 [N]}, \quad (7.5)$$

а для образования RCO-N

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 k_4 [N]}{k_2 + k_3' [\text{H}_2\text{O}] + k_4 [N]}. \quad (7.6)$$

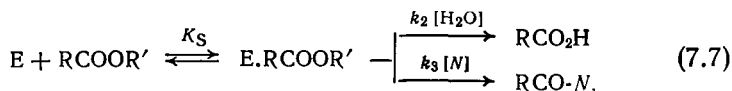
Значение k_{cat}/K_M для исчезновения $\text{RCO}_2\text{R}'$ получается делением суммы двух значений k_{cat} [уравнения (7.5) и (7.6)] на K_M и равно k_2/K_S . Напомним (гл. 3, разд. Е), что такое соотношение всегда справедливо для серии последовательных реакций, следующих за стадией равновесного связывания. Это дает еще один способ выявления промежуточного соединения. Если реакция с участием нуклеофилов включает прямую атаку комплекса

Таблица 7.3

Кинетические константы для катализируемого α -химотрипсином гидролиза эфиров N-ацил-L-аминокислот при 25 °С, pH 7,8 и ионной силе 0,1, полученные из опытов по определению соотношения между продуктами реакции [27]

Ацил	Аминокислота	Эфир	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	K_S , мМ
Ацетил	Gly	OCH_3	0,109	862	0,49	0,14	3380
Ацетил	Gly	OC_2H_5	0,051	445	0,094	0,11	823
Бензоил	Cly	OCH_3	0,31	4,24	0,42	1,17	5,78
Ацетил	But	OCH_3	1,41	66,7	8,81	1,68	417
Бензоил	But	OCH_3	0,32	1,41	0,41	1,52	1,79
Бензоил	Ala	OC_2H_5	0,069	5,97	0,069	0,6	5,97
Ацетил	NVal	OCH_3	5,08	14,3	35,6	5,93	100
Бензоил	NVal	OCH_3	2,45	0,85	4,16	5,93	1,45
Ацетил	Val	OCH_3	0,173	87,7	0,98	0,21	500
Ацетил	Val	OC_2H_5	0,152	110	0,55	0,21	398
Ацетил	Val	изо- OC_3H_7	0,096	177	0,178	0,21	327
Хлорацетил	Val	OCH_3	0,127	43	0,32	0,21	108,8
Бензоил	Val	OCH_3	0,064	4,17	0,09	0,22	5,84
Ацетил	NLeu	OCH_3	16,1	5,37	103	19,1	34,4
Ацетил	Phe	OCH_3	97,1	0,93	796	111	7,63
Ацетил	Phe	OC_2H_5	68,6	1,85	265	92,7	7,14
Ac-L-Ala	Phe	OCH_3	57,3	0,296	176	85	0,909
Бензоил	Phe	OCH_3	30,7	0,0349	45,8	91,6	0,0524
Ацетил	Tyr	OC_2H_5	192	0,663	5000	200	17,2
Бензоил	Tyr	OCH_3	90,9	0,018	364	121	0,0728
Бензоил	Tyr	OC_2H_5	85,9	0,022	249	131	0,0638
Ac-L-Leu	Tyr	OCH_3	65,7	0,0192	158	113	0,0461
Фурил	Tyr	OCH_3	50	0,417	66,7	200	0,56

Михаэлиса, как в реакции, представленной ниже, k_{cat}/K_M будет функцией концентрации N . Например, если



то для исчезновения эфира

$$k_{\text{cat}}/K_M = (k_2 [\text{H}_2\text{O}] + k_3 [N])/K_S. \quad (7.8)$$

[Ситуация, естественно, усложняется, если нуклеофилы связываются с ферментом и оба (и нуклеофил, и субстрат) конкурируют за один центр.]

Увеличение скорости деацилирования при добавлении нуклеофилов использовалось для получения константы скорости деацилирования (k_2) в случае тех субстратов, для которых стадия с константой k_3 обычно является лимитирующей. 1,4-бутандиол — достаточно хороший нуклеофил, чтобы его присутствие даже в умеренной концентрации приводило к увеличению скорости деацилирования до значения, большего чем k_2 [27]. Значения некоторых констант скорости, полученных этим методом, приведены в табл. 7.3.

Итак, очевидно, что исследование соотношения между продуктами является мощным методом обнаружения промежуточных соединений.

3. Выявление ацилфермента при гидролизе амидов и пептидов [14]

При гидролизе амидов ацилфермент не накапливается и обнаружить его довольно трудно. К счастью, для этого можно воспользоваться методикой прямого обнаружения промежуточного соединения, применявшейся в случае эфирных субстратов.

Образование ацилфермента при гидролизе производных ацетил-L-фенилаланина (AcPhe) было установлено исходя из следующих данных:

а. При гидролизе амидов в присутствии акцепторов-нуклеофилов получается такое же соотношение между продуктами, как и при гидролизе метилового эфира ацетил-L-фенилаланина (AcPheOMe) в аналогичных условиях (табл. 7.4). Более того, соотношение между продуктами оказалось таким же, какое ожидалось исходя из прямого спектрофотометрического исследования атаки нуклеофилами AcPhe-химоотрипсина, генерированного *in situ* методом остановленной струи (табл. 7.5).

б. В условиях, когда более 94% реагирующего амида образует AcPhe-нуклеофил, скорость исчезновения амида практиче-

Таблица 7.4

Соотношение между продуктами, образующимися в ходе катализируемого δ -химотрипсином гидролиза субстратов при pH = 9,3 и 25 °C [14]

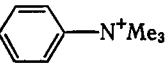
Субстрат	Акицептор =	Трансацилирование/Гидролиз, M^{-1}		
		AlaNH ₂	GlyNH ₂	H ₂ NNH ₂
AcPhe-OMe		43	13	2,2
AcPhe-NH-  -N ⁺ Me ₃		45	11	1,8
AcPhe-AlaNH ₂		43	9	—

Таблица 7.5

Константы скорости для атаки AcPhe- δ -химотрипсина нуклеофилами при pH 9,3 и 25 °C [14]

Нуклеофил	$k, M^{-1}c^{-1}$	
	прямые кинетические измерения	рассчитано из данных по соотношению между продуктами ^{a)}
AlaNH ₂	$4,8 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^3$
GlyNH ₂	$1,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
H ₂ NNH ₂	$3,3 \cdot 10^2$	$2,8 \cdot 10^2$
(H ₂ O)	142 c ⁻¹)	

^{a)} Из данных табл. 7.4.

ски не возрастает. Это согласуется с тем, что атака нуклеофила происходит после лимитирующей стадии, т. е. после образования промежуточного соединения, и что по крайней мере на 94% реакция идет через образование этого промежуточного соединения.

в. Последний довод в пользу образования в ходе реакции ацилфермента дает расчет константы скорости реакции гидролиза из константы скорости обратной реакции (синтез субстрата через образование ацилфермента) и уравнения Холдейна (гл. 3, разд. 3). Установлено, что амины реагируют с ацилферментом с образованием амидов и пептидов. Следовательно, согласно принципу детального равновесия, должна иметь место обратная реакция (гидролиз пептидов с образованием ацилфермента).

Вопрос состоит в том, достаточно ли высока скорость этой реакции, чтобы объяснить наблюдаемую скорость гидролиза. На этот вопрос можно ответить, измерив $(k_{cat}/K_M)_S$ для реакции синтеза пептида через стадию образования ацилфермента, определив K_{eq} для гидролиза этого пептида и затем рассчитав $(k_{cat}/K_M)_H$ для реакции гидролиза из уравнения Холдейна [$K_{eq} = (k_{cat}/K_M)_H / (k_{cat}/K_M)_S$]. Рассчитанное значение близко к полученному экспериментально.

4. Обоснованность выводов, полученных при исследовании распределения продуктов, и возможные источники ошибок

Ни постоянство величины V_{max} , ни постоянство соотношения между образующимися продуктами еще не доказывают присутствия промежуточного соединения. Например, оказалось, что в случае щелочной фосфатазы постоянство значения V_{max} является артефактом, а кроме того, нельзя сказать а priori, что атака комплекса Михаэлиса акцепторами также не даст постоянного соотношения между образующимися продуктами. Для того чтобы из указанных экспериментов можно было сделать четкий вывод о наличии промежуточного соединения, их необходимо связать с измерением скоростей. При измерении скоростей в рамках стационарной кинетики наиболее благоприятной является такая ситуация, когда промежуточное соединение накапливается. Если выполняются уравнения (7.4) — (7.6), можно сделать четкий вывод о существовании промежуточного соединения. Чрезвычайно полезно сочетание опытов по установлению распределения продуктов с исследованиями предстационарной кинетики (как это было сделано в случае химотрипсина и амидов).

Возможным источником ошибок является нежелательное изменение свойств ферментов. Химотрипсин часто рассматривают как раствор имидазола и серина. Однако белки крайне чувствительны к окружению; они могут неспецифически связывать органические молекулы и ионы, изменяя при этом свои кинетические свойства. Первое правило, которого следует придерживаться при постановке экспериментов, состоит в том, что реакции необходимо проводить при строго фиксированных, одинаковых концентрациях фермента. Многие белки склонны к агрегации, что может привести к изменению констант скорости. Второе правило гласит: соотношение между продуктами следует определять путем непосредственного анализа продуктов, а не из косвенных данных. Например, скорость атаки ацилфермента бензоил-Туг-химотрипсина глицинамидом ($GlyNH_2$) была в свое

время определена из данных по уменьшению k_{cat} для гидролиза бензоил-Тур- $GlyNH_2$ при добавлении $GlyNH_2$. ($GlyNH_2$ ингибирует эту реакцию, поскольку реагирует с ацилферментом с образованием бензоил-Тур- $GlyNH_2$.) Как оказалось, присоединение аминов к химотрипсину приводит к увеличению k_{cat} на 30% [14]. Это увеличение имеет тот же порядок величины, что и ожидаемое уменьшение, обусловленное обращением реакции. Вообще говоря, если изменения скорости ферментативных реакций невелики, эти данные нельзя считать надежными, поскольку изменения могут быть обусловлены причинами кинетической природы.

В ряде ситуаций простые правила распределения промежуточных соединений перестают выполняться. Если акцептор-нуклеофил реагирует с ацилферментом до того, как успевает произойти диффузия уходящей группы от фермент-содержащего промежуточного соединения, то распределение может зависеть от природы уходящей группы (т. е. обуславливаться стерическим затруднением атаки и т. д.). Кроме того, измерение констант скорости атаки нуклеофилами промежуточного соединения может привести к не совсем верным результатам вследствие упоминавшихся выше эффектов неспецифического связывания.

В. Другие примеры обнаружения промежуточных соединений с помощью исследования распределения продуктов и из кинетических данных

1. Щелочная фосфатаза

Почти нет сомнения в том, что при гидролизе этим ферментом эфиров фосфорной кислоты образуется фосфорилфермент. Фосфорилфермент стабилен при низком рН и его можно выделить [28, 29]. Исследование распределения продуктов с использованием трис-буфера в качестве акцептора фосфата показало, что соотношение между продуктами постоянно (табл. 7.6) [30, 31]. Результаты проведенных ранее кинетических исследований должны оцениваться в свете последних данных, согласно которым выделенный фермент может содержать прочно, хотя и нековалентно связанный фосфат [32], а лимитирующей стадией реакции при высоком рН является высвобождение этого прочно связанного фосфата [22, 23] (правда, единого мнения относительно кинетики или стехиометрии связывания нет) [33, 34]. Как отмечалось выше, постоянство V_{max} в реакциях гидролиза широкого круга эфиров фосфорной кислоты (табл. 7.7) [19, 20]

Таблица 7.6

Относительные значения V_{\max} для катализируемого щелочной фосфатазой гидролиза эфиров фосфорной кислоты [20]

Фосфат	V_{\max}	Фосфат	V_{\max}
5'AMP	1	dCTP	1,05
Пирофосфат	1	Рибозо-5-фосфат	0,7
3'AMP	0,9	β -Глицерофосфат	0,9
ApAp	0,6	Этаноламинфосфат	0,7
ATP	1,05	Глюкозо-1-фосфат	0,8
dATP	1,05	Глюкозо-6-фосфат	0,9
dGTP	1,05	Гистидинфосфат	0,8
UDP	1,0	<i>n</i> -Нитрофенилфосфат	1,0
5'UMP	0,85		

обусловлено, вероятно, тем, что лимитирующей стадией является медленная диссоциация комплекса фермент — продукт.

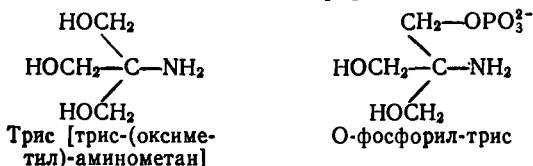


Таблица 7.7

Соотношение между продуктами для катализируемого щелочной фосфатазой гидролиза эфиров фосфорной кислоты и фосфоамидатов [30, 31]

Фосфат	Трансфосфорилирование/Гидролиз а)
Фенил	1,42
Крезил	1,41
Хлорфенил	1,38
<i>n</i> -трет-Бутилфенил	1,37
<i>n</i> -Нитрофенил	1,37
<i>o</i> -Метокси- <i>n</i> -метилфенил	1,40
α -Нафтил	1,40
β -Нафтил	1,40
<i>n</i> -Нитрофенил	1,2 б)
Фосфоамидаты	1,1 б), в)

а) Акцептор = 1 М трис; pH 8.

б) Акцептор = 2 М трис; pH 8,2.

в) Среднее для нескольких фосфоамидатов.

2. Кислая фосфатаза

Реакция, катализируемая кислой фосфатазой,— это простой пример реакции с накоплением промежуточного фосфорилфермента, распад которого является лимитирующей стадией. Широкий круг эфиров гидролизует кислая фосфатаза с одинаковым значением V_{\max} (табл. 7.8) [35], причем соотношение

Таблица 7.8

K_M и V_{\max} для катализируемого кислой фосфатазой предстательной железы гидролиза эфиров фосфорной кислоты при pH 5 и 37 °C [35]

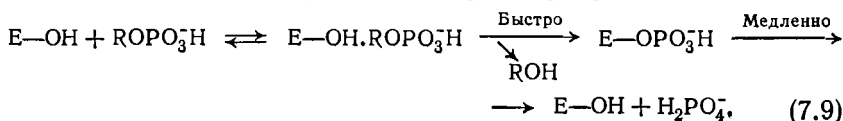
Эфиры фосфорной кислоты	K_M , мМ	V_{\max} (относительная)
β -Глицерофосфат	1,1	1
2' АМР	0,28	1
Ацетилфосфат	0,17	1
3' АМР	0,068	1
<i>n</i> -Нитрофенилфосфат	0,034	1

Таблица 7.9

Соотношение между продуктами катализируемого кислой фосфатазой предстательной железы гидролиза эфиров фосфорной кислоты [36]

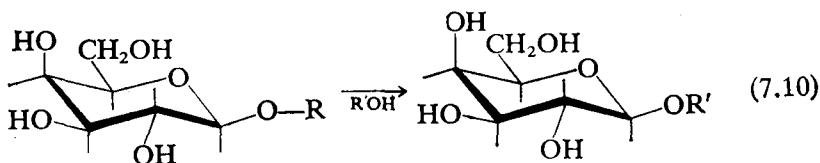
Эфир фосфорной кислоты	Трансфосфорилирование/Гидролиз	
	Акцептор — этанол	Акцептор — этаноламин
<i>n</i> -Нитрофенилфосфат	0,29	0,044
Фенилфосфат	0,26	0,044
3' УМР	0,28	—
3' АМР	0,30	0,046
β -Глицерофосфат	0,28	0,041

между продуктами остается постоянным (табл. 7.9); исследование методом остановленной струи с использованием *n*-нитрофенилфосфата показывает, что во время всплеска высвобождается один моль *n*-нитрофенолята на субъединицу фермента; фермент ковалентно модифицируется диизопропилфосфатом [36].

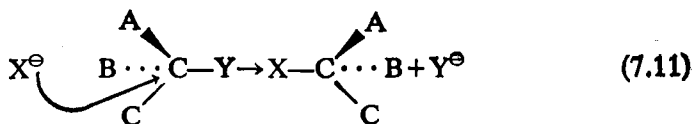


3. β -Галактозидаза: сохранение конфигурации предполагаемого промежуточного соединения

Алкоголиз β -D-галактозидов β -галактозидазой происходит с сохранением конфигурации у атома C-1 [37, 38].



Тем самым из этого процесса исключаются простые реакции бимолекулярного замещения (S_N2), которые часто встречаются в органической химии, поскольку известно, что они всегда идут с обращением конфигурации [39].



Сохранение конфигурации наблюдается всегда, когда имеют место два последовательных обращения у данного углеродного атома или если образуется промежуточный карбоний-ион, который может быть атакован нуклеофилом только с одной стороны. Следовательно, сохранение конфигурации связано с наличием многостадийной реакции, в ходе которой образуется промежуточное соединение. Согласно этому критерию, реакция с участием лизоцима также идет с образованием промежуточного соединения [40, 41].

Данные, полученные при исследовании соотношения между продуктами при гидролизе β -галактозидов, свидетельствуют в пользу образования в ходе этой реакции промежуточного соединения (табл. 7.10). Из таблицы видно, что соотношение между водой и метанолом остается постоянным [42, 43]. Лимитирующей стадией в случае слабоактивированных субстратов является образование промежуточного соединения, поскольку V_{\max} — величина переменная, а в случае сильноактивированных динитросоединений лимитирующей стадией становится гидролиз этого промежуточного соединения, так как скорость остается

Таблица 7.10

Соотношение между продуктами катализируемого β -галактозидазой гидролиза β -галактозидов и относительные значения V_{\max} при 25 °С и pH 7,0—7,5 [42—44]

β -Галактозид	Метанолиз/Гидролиз, М ⁻¹	V_{\max} (относит.)	Лимитирующая стадия
2,4-динитрофенил		1,3	Дегалактози- дирование
3,5-динитрофенил		1,1	То же
2,5-динитрофенил		1,1	»
2-нитрофенил	1,97	1,0	»
3-нитрофенил	1,96	0,9	»
3-хлорфенил	2,08	0,5	Галактозиди- рование
4-нитрофенил	1,99	0,2	То же
Фенил	1,94	0,1	»
4-метоксифенил	2,14	0,1	»
4-хлорфенил	2,13	0,02	»
4-бромфенил	2,02	0,02	»
Метил	2,2	0,06	»

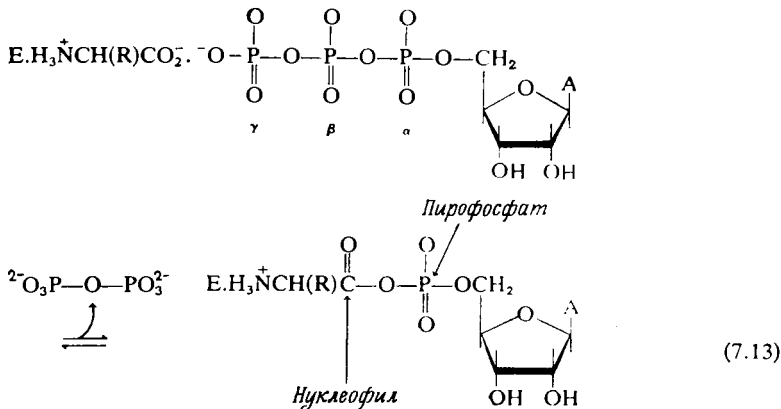
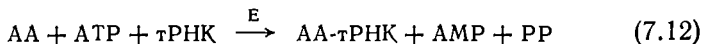
постоянной. С таким выводом согласуются данные о том, что скорость исчезновения 2,4-динитро- и 3,5-динитропроизводных возрастает при добавлении метанола, но не менее реакционно-способных субстратов (см. рис. 7.2 и 7.3). Возможный механизм этой реакции включает образование на начальном этапе карбоний-иона [44, 45].

Г. Аминоацил-тРНК—синтетазы: обнаружение промежуточных соединений методами «замороженной» струи, изотопного обмена и с помощью стационарной кинетики

1. Механизм реакции

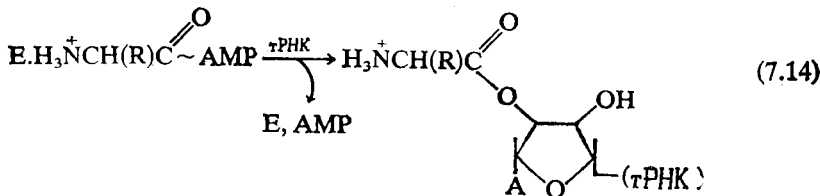
Эта группа ферментов катализирует образование аминоацил-тРНК из свободной аминокислоты (АА) и АТР. В отсутствие тРНК данные ферменты облегчают (за несколькими исключениями) атаку аминокислот нуклеофилами и АТР пирофосфатом [46—49]. Активация осуществляется путем образования прочного комплекса с аминоациладенилатом, смешанным ангидри-

дом аминокислоты и АМР. (Химическая сторона процесса активации обсуждается в гл. 2, разд. Г.2.в)



Активацию атаки пирофосфатом исследуют с помощью обмена $\text{PP} \rightleftharpoons \text{ATP}$, для чего инкубируют фермент, аминокислоту и АТР с пирофосфатом, меченным ^{32}P . При этом в результате непрерывного циклического формирования комплекса $\text{E.AA} \sim \text{AMP}$ образуется β, γ -меченый АТР. Механизм образования комплекса представлен на схеме (7.13). Атака меченого пирофосфата приводит к обращению реакции и образованию меченого АТР. Этот процесс многократно повторяется до тех пор, пока изотопная метка не распределится равномерно по всем реагентам.

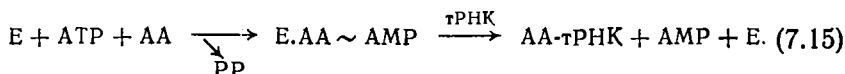
Ацилирование тРНК осуществляется в ходе атаки карбонильной группы карбоксилком рибозы конечного аденозина тРНК [схемы (7.13) и (7.14)].



Не вызывает сомнений, что фермент-содержащий аминоацил-аденилат образуется в отсутствие тРНК. Его можно выделить хроматографически, а свободный аминоациладенилат получить осаждением фермента кислотой [50, 51]. Более того, этот выде-

ленный комплекс будет переносить свою аминокислоту на тРНК.

Все приведенные выше данные позволяют предложить следующий механизм:



Тем не менее одно время казалось, что с предположением об образовании в ходе реакции аминоациладенилата согласуются не все данные. Был предложен другой механизм реакции — в присутствии тРНК аминоациладенилат не образуется, а реакция идет при одновременном взаимодействии тРНК, аминокислоты и АТФ [52]. Как мы увидим ниже, этот механизм некорректен, хотя в свое время казался вполне приемлемым. Кроме того, необходимо отметить, что наличие парциальной реакции в отсутствие одного из субстратов (например, образование аминоациладенилата из аминокислоты и АТФ в отсутствие тРНК) не означает, что аналогичная реакция имеет место в присутствии *всех* субстратов. Действительно, в ряде случаев показано, что такие парциальные реакции являются артефактом.

Адекватность механизма с образованием аминоациладенилата очень просто доказать с помощью трех типов экспериментов с использованием метода замороженной струи, руководствуясь тремя критериями: промежуточное соединение должно быть выделено, оно должно достаточно быстро образовываться и достаточно быстро реагировать, чтобы реакция шла по данному пути [53]. При исследовании реакции с участием изолейцил-тРК—синтетазы (IRS) получены следующие результаты: а. При смешивании предварительно образованного и выделенного комплекса IRS. $[^{14}\text{C}] \text{Ile} \sim \text{AMP}$ с тРНК константа скорости первого порядка для переноса $[^{14}\text{C}] \text{Ile}$ на тРНК, измеренная импульсным методом замороженной струи, оказалась такой же, как и k_{cat} для стационарного аминоацилирования тРНК в аналогичных реакционных условиях. Таким образом, константа скорости превращения промежуточного соединения достаточно высока, чтобы реакция шла с образованием данного соединения, и, более того, эта реакция является, по-видимому, лимитирующей стадией процесса. б. При смешивании IRS, изолейцина, тРНК и $[\gamma^{32}\text{P}] \text{ATP}$ (метка включена в концевой фосфат) наблюдается всплеск, регистрируемый импульсным методом замороженной струи, — высвобождение меченого пирофосфата, которое предшествует стационарному процессу аминоацилирования тРНК. Это означает, что *либо* аминоациладенилат образуется до стадии аминоацилирования тРНК, и это, следовательно, является доводом в пользу адекватности данного механизма, *либо*

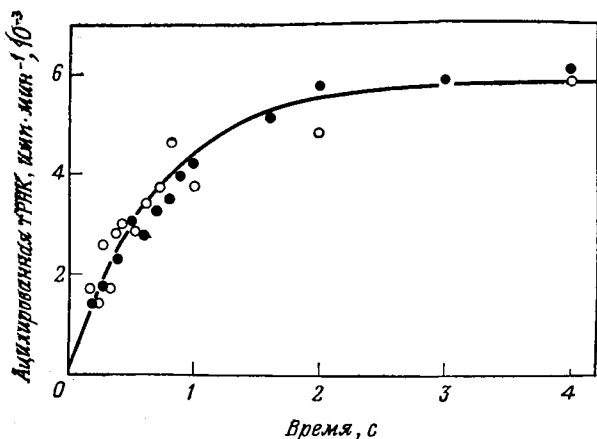


Рис. 7.4. Перенос $[^{14}\text{C}]\text{Ile}$ от IRS. $[^{14}\text{C}]\text{Ile} \sim \text{AMP}$ на тРНК 116 при смешивании указанного комплекса с избытком тРНК в устройстве, применяющемся в импульсном методе замороженной струи.

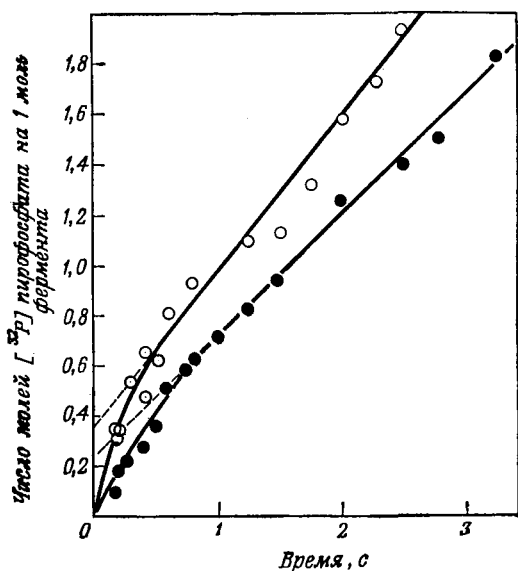
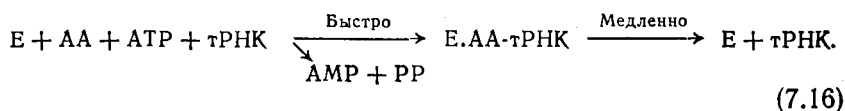


Рис. 7.5. Высвобождение $[^{32}\text{P}]$ пиррофосфата при смешивании $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$, изолейцина, тРНК и фермента в устройстве, применяющемся в импульсном методе замороженной струи. Значение амплитуды всплеска концентрации продукта, полученное экстраполяцией, составляет менее одного моля пиррофосфата на моль фермента, поскольку концентрация АТР не является насыщающей (гл. 4, разд. Г). Светлые кружки — концентрация АТР равна $2 \cdot K_m$, темные — $1 \cdot K_m$.

реакция идет по такому пути, в ходе которого быстро образуется аминоксил-тРНК, а далее следует медленная стадия диссоциации комплекса IRS.Ile-тРНК [схема (7.16)].



Этот путь, существование которого предполагали многие исследователи, исключается результатами третьего эксперимента

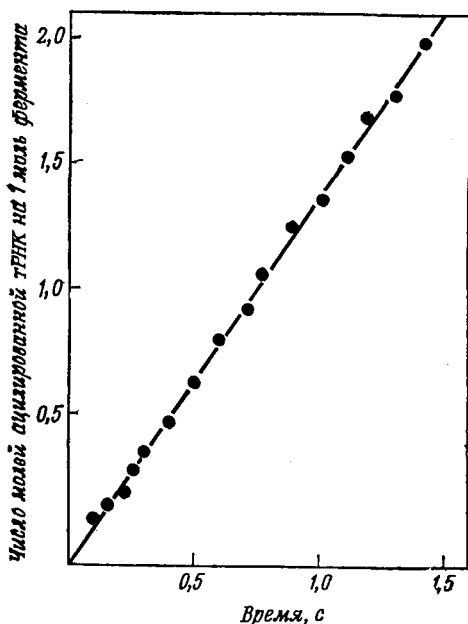


Рис. 7.6. Начальная скорость ацилирования тРНК^{11e} при смешивании насыщающих концентраций [¹⁴C]Ile, ATP и тРНК с ферментом.

(метод замороженной струи). Согласно схеме (7.16), ацилирование тРНК должно протекать в две стадии, поскольку образование одного моля связанной с ферментом аминоксил-тРНК происходит быстро, а дальнейшее превращение осуществляется медленно. *в.* Оказалось, что при смешивании IRS, [¹⁴C]Ile, тРНК и ATP начальная скорость ацилирования тРНК при экстраполяции идет в ноль, без каких-либо указаний на наличие начального всплеска. Всплеск, при котором высвобож-

дается пирогосфат, обусловлен образованием аминокциладенилата, которое предшествует переносу аминокислоты на тРНК (рис. 7.6).

2. Механизм корректирования биосинтеза белка

В гл. 11 говорится о том, что в процессе биосинтеза белка клетка выбирает нужную ей аминокислоту со значительно более высокой точностью, чем можно было бы ожидать, исходя из структурных различий между аминокислотами. Эта точность может обеспечиваться специфически катализируемым аминокцил-тРНК—синтетазой гидролизом аминокциладенилатного комплекса, образуемого «ошибочной» аминокислотой, или неправильно «нагруженной» тРНК [51]. Примером такого рода процесса может служить «отказ» валил-тРНК—синтетазы (VRS) присоединять треонин вместо валина [54]. Этот фермент катализирует реакцию обмена $PP \rightleftharpoons ATP$ в присутствии треонина и, кроме того, образует стабильный комплекс VRS.Thr ~ AMP. В присутствии тРНК и треонина VRS функционирует как АТФ-пирогосфатаза, гидролизует АТФ до АМР и пирогосфата и не катализируя образование Thr-тРНК^{Val}. В качестве промежуточного соединения в этой реакции образуется комплекс VRS.Thr ~ AMP, о чем свидетельствует наличие обмена $PP \rightleftharpoons ATP$.

Эксперименты с применением импульсного метода замороженной струи показывают, что механизм корректирования при ошибочном присоединении треонина основан на быстром гидролизе неправильно ацилированной тРНК. Такую тРНК можно выделить и показать, что она действительно гидролизуется с достаточно высокой скоростью. При смешивании комплекса VRS. [¹⁴C]Thr ~ AMP с тРНК^{Val} в аппарате, применяемом в методе замороженной струи, наблюдается кратковременное образование [¹⁴C]Thr-тРНК^{Val} (рис. 7.7). Это соединение можно выделить, быстро остановив реакцию с помощью фенола и осадив неправильно ацилированную тРНК из водной фазы; такая РНК гидролизуется VRS с константой скорости 40 с⁻¹ (рис. 7.8). Скорость переноса треонина от комплекса VRS.Thr ~ AMP можно измерить независимо по скорости высвобождения АМР (используя соединение VRS.Thr ~ [³²P]AMP; рис. 7.9). Сплошная кривая на рис. 7.8 построена исходя из результатов независимо измерения констант скорости образования и гидролиза [схема (7.17)].

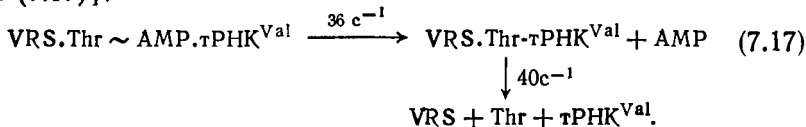


Рис. 7.7. Кратковременное образование $[^{14}\text{C}]\text{Thr}-\text{tPHK}^{\text{Val}}$ при смешивании $\text{VRS} \cdot [^{14}\text{C}]\text{Thr} \sim \text{AMP}$ с избытком tPHK в устройстве, применяемом в методе замороженной струи.

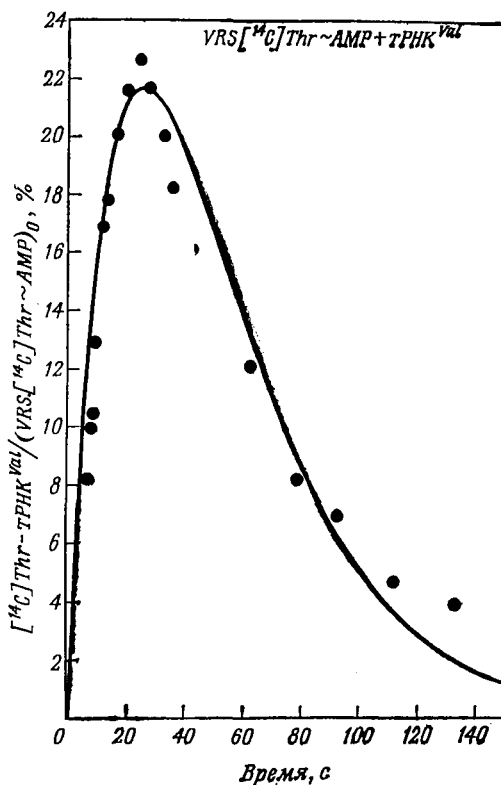
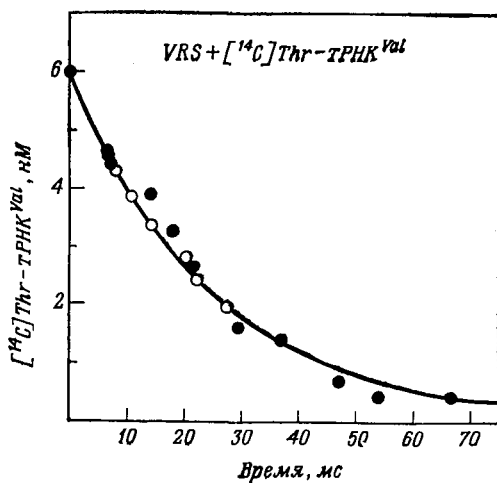


Рис. 7.8. Катализируемый валил- tPHK -синтетазой (VRS) гидролиз ошибочно ацилированной $[^{14}\text{C}]\text{Thr}-\text{tPHK}^{\text{Val}}$.



Отметим один достойный внимания момент. Константу скорости деацилирования неправильно ацилированной тРНК можно определить из данных предстационарной кинетики даже в

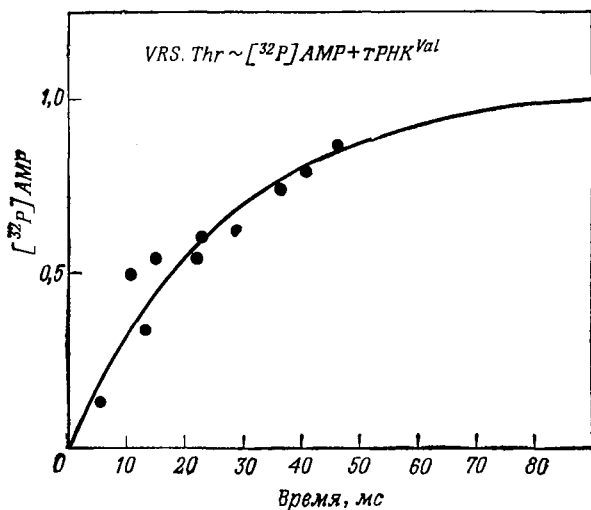


Рис. 7.9. Скорость распада $Thr \sim AMP$ при смешивании $VRS. Thr \sim [^{32}P]AMP$ с избытком $тРНК^{Val}$.

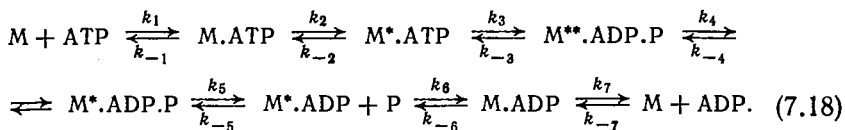
присутствии большого количества неацилированной тРНК. Методом стационарной кинетики это сделать нелегко из-за конкурентного ингибирования неацилированной тРНК.

Д. Миозиновая АТРаза: определение констант скорости ассоциации и диссоциации фермент-субстратного комплекса, исследование промежуточных конформационных состояний и равновесий методом остановленной струи с регистрацией флуоресценции, методом высвобождения протонов, измерением ферментативной активности при помощи вспомогательных ферментных систем, методом светорассеяния и методом замороженной струи

Сокращение мышцы является результатом скольжения двух типов перекрывающихся нитей (филаментов) — толстых, содержащих миозин, и тонких, содержащих актин. Между толстыми и тонкими нитями имеются поперечные мостики, составляющие

часть молекулы миозина. В ходе сокращения поперечные мостики многократно разрываются и вновь образуются. В мостиках расположены активные центры, катализирующие гидролиз АТФ. АТФазная активность покоящейся мышцы крайне низка, а при сокращении она возрастает в тысячу раз. Высвобождающаяся при гидролизе энергия используется для мышечного сокращения. Возникает вопрос: как связаны между собой химическая и механическая энергия? Согласно существующей гипотезе, взаимопревращения этих форм энергии осуществляется посредством конформационных изменений в белке, связанных с гидролизом АТФ.

Активные центры миозина, присоединяющиеся к актину, расположены в глобулярных участках молекулы миозина, которые получили название S_1 -субъединиц. Они могут быть отделены от остальной части молекулы путем протеолиза. Полученные таким образом фрагменты более удобны для проведения кинетических исследований, чем целая молекула миозина [55]. Механизм гидролиза АТФ с участием фрагмента S_1 в том виде, в каком его сейчас представляют, довольно сложен — это последовательность реакций, состоящая из семи стадий [схема (7.18)]. Несмотря на всю свою сложность, эта схема вполне логична [56—68].



Конформационные состояния обозначены звездочками; число этих звездочек отражает интенсивность флуоресценции триптофана. Считается, что константы равновесия и константы скорости, полученные при исследовании скелетных мышц кролика при 21°C и $\text{pH } 8,0$, имеют следующие значения: $k_1/k_{-1} = 4,5 \cdot 10^3 \text{ M}$; $k_2 = 400 \text{ c}^{-1}$; $k_{-2} \leq 0,0003 \text{ c}^{-1}$; $k_3/k_{-3} = 9$; $k_3 \geq 160 \text{ c}^{-1}$; $k_4 = 0,06 \text{ c}^{-1}$; $k_5/k_{-5} > 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $k_6 = 1,4 \text{ c}^{-1}$; $k_{-6} = 400 \text{ c}^{-1}$ и $k_7/k_{-7} = 2,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ [68]. Рассмотрим теперь, как была построена схема (7.18).

1. Лимитирующая стадия гидролиза АТФ

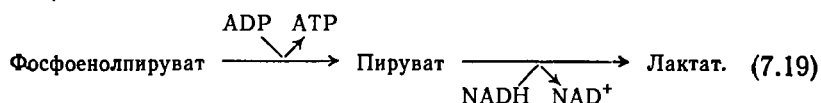
Число оборотов для гидролиза АТФ с участием миозина очень мало — всего $0,04 \text{ c}^{-1}$. Исследования методом замороженной струи с использованием $[\gamma^{32}\text{P}]$ АТФ показывают, что константа скорости расщепления АТФ при первом обороте фермента равна 160 c^{-1} [60]. Это означает, что в стационарном состоянии лимитирующей является стадия, следующая за стадией химиче-

ского расщепления. На этой стадии может происходить либо конформационное изменение, либо медленное высвобождение продуктов. Измерение скоростей диссоциации, которые оказались относительно высокими, показало, что имеет место конформационное изменение (разд. 2) [61]. Медленная стадия характеризуется константой k_4 . Поскольку изменение конформации сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции, эту константу измеряют методом остановленной струи с регистрацией флуоресценции; кроме того, ее можно определить по высвобождению протонов, так как на данной стадии на один моль гидролизованной АТФ высвобождается один протон [64]. Константу скорости высвобождения протонов легко определить методом остановленной струи с регистрацией оптической плотности, используя окрашенный индикатор рН, в данном случае фенол красный.

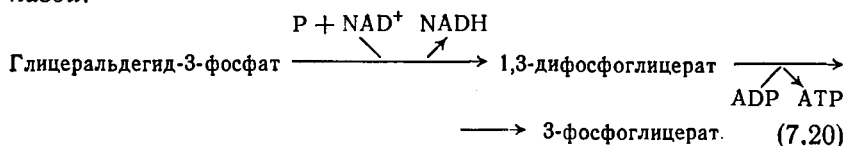
2. Скорости высвобождения ADP и P (фосфата)

Первые опыты по определению скоростей высвобождения ADP и P были весьма остроумными: скорость появления в *растворе свободных* ADP и P определяли с помощью сопряженных ферментных систем и метода остановленной струи с регистрацией оптической плотности [64].

а. Высвобождение ADP, сопряженное с исчезновением NADH в реакциях, катализируемых пируваткиназой и лактат-дегидрогеназой:



б. Высвобождение P, сопряженное с образованием NADH в реакции, катализируемой глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой:



(Глицеральдегид-3-фосфат превращается в 1,3-дифосфоглицерат, который для предотвращения ингибирования первой реакции удаляется с помощью фосфоглицераткиназы, превращающей его в 3-фосфоглицерат.)

При высвобождении P или ADP всплеска концентрации не наблюдается, так что либо оба продукта медленно отщепляются

с одинаковой скоростью, либо диссоциация происходит после завершения лимитирующей стадии. Если бы высвобождение, скажем, ADP было медленным и являлось лимитирующим, то высвобождение Р носило бы двухстадийный характер, и наоборот. В ходе специальных экспериментов была определена константа скорости диссоциации комплекса $S_1 \cdot \text{ADP}$; она оказалась равной $1,4 \text{ с}^{-1}$. ТιοИТР быстро связывается со свободным S_1 , что сопровождается спектральными изменениями. При смешивании избытка тιοИТР с комплексом $S_1 \cdot \text{ADP}$ образование $S_1 \cdot \text{тιοИТР}$ лимитируется диссоциацией $S_1 \cdot \text{ADP}$ и, следовательно, скорость диссоциации $S_1 \cdot \text{ADP}$ определяется просто.

3. Двухстадийные процессы связывания АТР и АDР, выявляемые методом остановленной струи [65] с регистрацией флуоресценции триптофана

При низких концентрациях АТР связывается с S_1 с кажущейся константой скорости второго порядка, равной

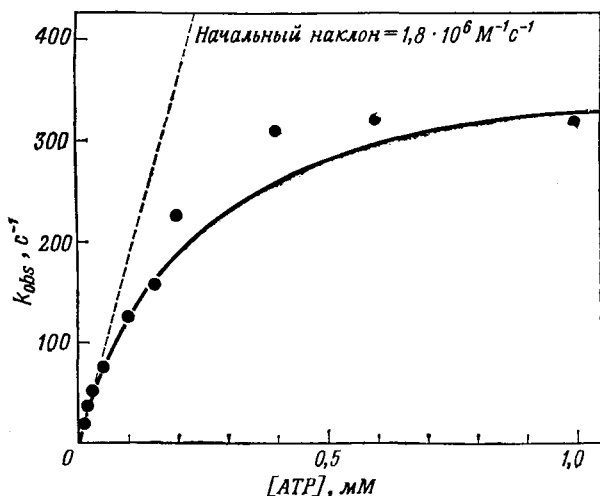


Рис. 7.10. Константы скорости процесса увеличения интенсивности флуоресценции фрагмента S_1 при смешивании с АТР, взятой в различных концентрациях; смешивание проводилось в устройстве, применяемом в методе остановленной струи [65].

$1,8 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Это на два порядка ниже константы скорости лимитируемой диффузией реакции и указывает на то, что, возможно, связывание происходит в две стадии. Измерения при

более высоких концентрациях подтверждают это предположение (рис. 7.10). Показано, что имеется начальная, быстрая стадия, находящаяся за пределами разрешения метода остановленной струи, сопровождающаяся изомеризацией со скоростью 400 с^{-1} . Константы k_2 и k_1/k_{-1} можно определить из концентрационной зависимости констант скорости так, как описано в гл. 4. Аналогичные данные были получены и при исследовании связывания ADP. При низких концентрациях константа скорости второго порядка для связывания ADP равна $1,5 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, а при высокой скорости выходит на плато и становится равной 400 с^{-1} , что свидетельствует о наличии стадии изомеризации, характеризующейся константой k_{-6} .

Константа k_{-2} слишком мала, чтобы ее можно было прямо измерить. В опытах по катализируемому фрагментом S_1 синтезу $[^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ и $[^{32}\text{P}]\text{ортофосфата}$ для нее были получены значения $3 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $2 \cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$ [66, 67].

4. Равновесие между $\text{M}^*.\text{АТФ}$ и $\text{M}^{**}.\text{АДР.Р}$

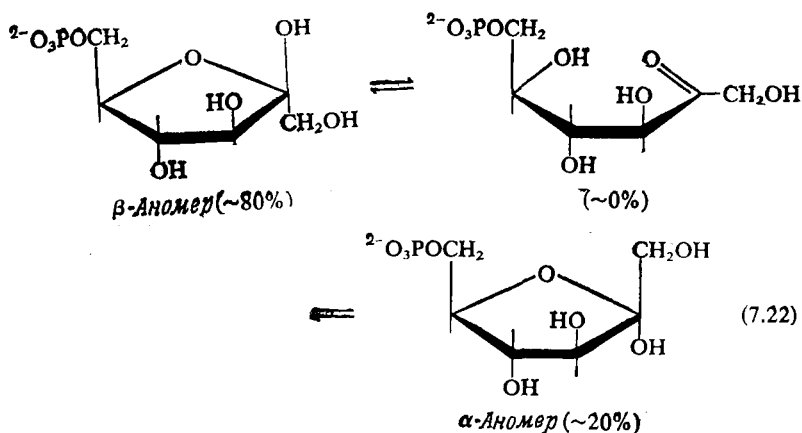
Эта стадия исследовалась с помощью смешивания избытка фермента с $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ и измерения концентраций $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ и $[^{32}\text{P}]\text{ортофосфата}$ методом остановленной струи [63]. Равновесие на поверхности фермента быстро устанавливается и медленно нарушается по мере того, как $\text{M}^{**}.\text{АДР}.[^{32}\text{P}]\text{Р}$ изомеризуется с образованием $\text{M}^*.\text{АДР}[^{32}\text{P}]\text{Р}$ со скоростью $0,06 \text{ с}^{-1}$.

5. Измерение светорассеяния

При полимеризации актина (мол. вес 42 000) образуются крупные агрегаты. Каждый мономер может связать один моль фрагмента S_1 (мол. вес 115 000), и образующийся в результате актомиозиновый комплекс (акто- S_1) имеет приблизительно в три раза большую массу. Этот процесс сопровождается увеличением мутности раствора, поскольку светорассеяние связано с массой полимера. Стимулируемое АТФ высвобождение S_1 из комплекса можно исследовать, наблюдая за *уменьшением* мутности раствора. Для этого применяют метод остановленной струи с регистрацией оптической плотности. Более чувствительным, однако, является метод регистрации флуоресценции, поскольку в этом случае измерения проводятся под прямым углом к падающему световому пучку (гл. 6) [69].

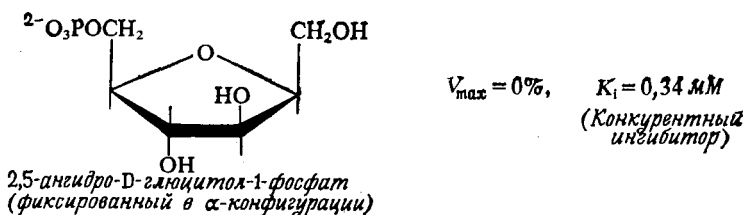
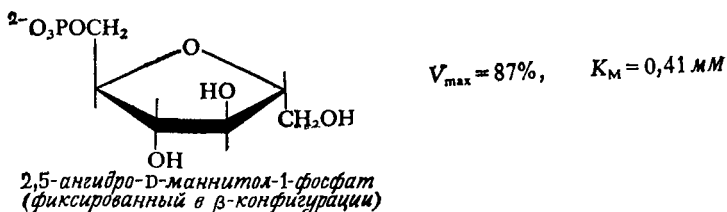
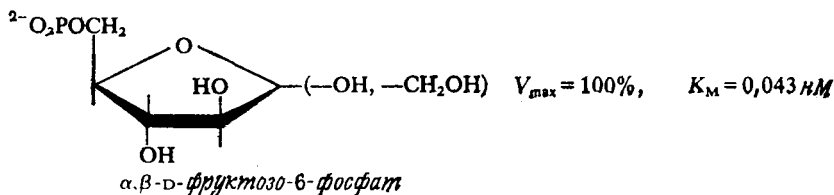
Е. Фосфофруктокиназа: определение аномерной специфичности методом остановленной струи, замороженной струи и с помощью использования субстратов с фиксированной конфигурацией

Фосфофруктокиназа катализирует фосфорилирование фруктозо-6-фосфата до фруктозо-1,6-дифосфата. В растворе субстрат существует в виде смеси двух аномеров — α (20%) и β (80%), переходящих один в другой через образование открытой кето-формы.



Применение методов исследования быстрых реакций, позволяющих измерить скорость взаимопревращений аномеров, показало, что фермент специфичен к β -аномеру. К такому же выводу привело и определение активности фермента по отношению к активности модельных субстратов, фиксированных в одной из этих конфигураций. При использовании достаточных количеств фермента, позволяющих фосфорилировать весь активный аномер прежде, чем между α - и β -формами установится новое равновесие, выявилось, что 80% данного субстрата реагирует быстро, а остальные 20% — с константой скорости аномеризации этого субстрата. Кинетика процесса исследовалась методом замороженной струи с применением $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ [70] и с помощью спектрофотометрического анализа реакции (7.19) [71]. Использовались также данные стационарной кинетики с применением

следующих субстратов [72]:

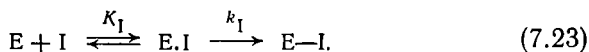


2,5-ангидро-D-маннитол-1-фосфат может находиться только в одной фиксированной конфигурации, аналогичной конфигурации β-аномера D-фруктозы. В этом соединении в положении 2 отсутствует OH-группа и оно не способно принять конфигурацию, аналогичную конфигурации α-аномера, поскольку кольцо не может раскрыться. С другой стороны, производное глюцитола всегда имеет конфигурацию, аналогичную конфигурации α-аномера. Из анализа значений V_{max} и K_M (или K_i) видно, что, хотя с ферментом связываются оба соединения, только β-аномер связывается продуктивно и фосфорилируется.

Ж. Аффинные метки [73]

Аффинная метка или, иначе говоря, необратимый ингибитор активного центра, представляет собой химически активное соединение, близкое по своей структуре к субстрату. Это соединение специфически связывается с активным центром фермента и

образует ковалентные связи с аминокислотными остатками белка [74—76]. Аффинные метки очень полезны для идентификации аминокислотных остатков, участвующих в катализе, и при определении pK_a из pH-зависимости скорости модификации.



Реакция аффинной метки с ферментом начинается с образования обратимо связанного комплекса фермент—ингибитор, далее следует стадия ковалентной модификации фермента и, следовательно, необратимо ингибирование. Эта схема аналогична механизму Михаэлиса—Ментен, а потому при возрастании концентрации ингибитора должно наблюдаться насыщение. Решение кинетического уравнения для этого случая приведено в гл. 4 [уравнение (4.71)]. Для простого случая неравновесного связывания, за которым следует медленная стадия химического превращения, справедливо уравнение

$$-d[E]/dt = \frac{k_I[E][I]}{K_I + [I]}. \quad (7.24)$$

Поскольку связывание «субстрата» с ферментом является специфичным, скорость химической реакции, протекающей в пределах фермент-«субстратного» комплекса, чаще всего достаточно высока благодаря энтропийному преимуществу ее над простой бимолекулярной реакцией в растворе. Следовательно, соединения, которые обычно обладают низкой реакционной способностью, могут стать очень реакционноспособными аффинными метками.

Таблица 7.11

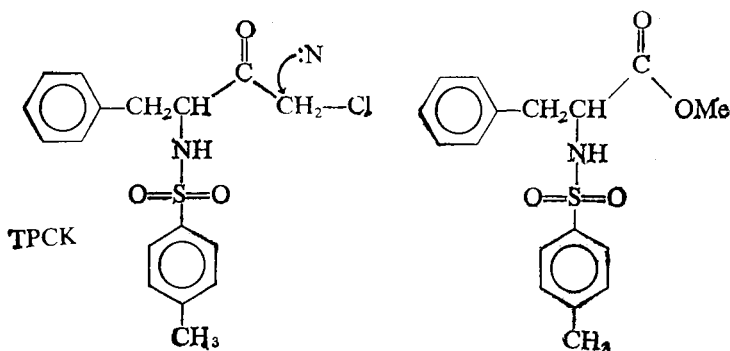
Высокая реакционная способность аффинных модификаторов ^{a)}

Реакция	Константа скорости второго порядка, $M^{-1}c^{-1}$
Cbz-L-фенилаланинхлорметилкетон + химотрипсин (алкилирование His-57)	69
Cbz-L-фенилаланинхлорметилкетон + ацетилгистидин	$4,5 \cdot 10^{-6}$

^{a)} Shaw E. N., Ruscica J., Archs Biochem. Biophys., 145, 484 (1971).

Принцип данного метода очень хорошо иллюстрируется одним из первых экспериментов по применению аффинных меток — исследованием реакции тозил-L-фенилаланинхлорметилкетона (ТРСК) с химотрипсином [74]. ТРСК сходен с такими

субстратами, как метиловый эфир тозил-L-фенилаланина, но содержит хлорметилкетонную группу, являющуюся алкилирующим агентом. Известно, что галоидметилкетоны реагируют с тиолами и имидазолами. Процесс необратимого ингибирования химотрипсина ТРСК имеет следующие особенности [73, 74]:



а. Скорость инактивации фермента подавляется обратимыми ингибиторами или субстратами фермента.

б. График зависимости относительной скорости ингибирования от рН при низких концентрациях ингибитора ($[I] \ll K_I$) имеет вид колоколообразной кривой с такими же значениями pK_a , какие были найдены из рН-зависимости k_{cat}/K_M в случае гидролиза субстратов.

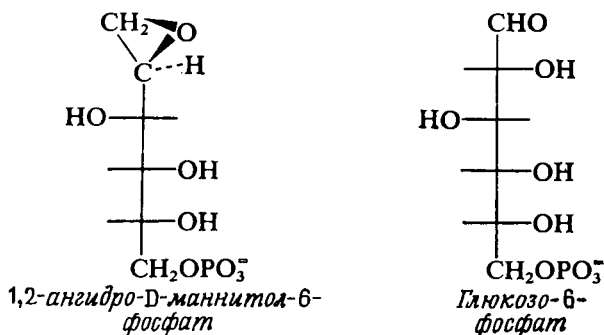
в. С помощью ингибитора, меченного радиоактивным углеродом, показано, что инактивированный фермент связывает один моль ингибитора на один моль активных центров.

г. Согласно более поздним данным, кривая зависимости скорости инактивации от концентрации ингибитора выходит на плато при достаточно высоких концентрациях последнего ($\langle K_M \rangle \approx 0,3 \text{ мМ}$) [77]. (Проведенные позже исследования показали, что модифицируемой аминокислотой в активном центре является His-57).

Все эти свойства в совокупности являются тестом на выявление аффинной метки, модифицирующей в активном центре группу, ионизация которой контролирует активность фермента. Наличие кинетики с насыщением (п. г) показывает, что метка образует комплекс с ферментом, хотя это можно и не обнаружить, если K_1 лежит в области концентраций, при которых ингибитор не растворяется. Конкурентное ингибирование субстратом (п. а) подтверждает, что связывание происходит в активном центре. Стехиометрическое соотношение 1 : 1 означает, что эта модификация является избирательной. Ценные данные позволяют получить анализ рН-зависимости различных параметров. Как отме-

чалось в гл. 5, рН-зависимость V_{\max}/K_M или k_{cat}/K_M дает pK_a тех групп в свободном ферменте, которые участвуют в катализе и связывании субстрата. Аналогичным образом из рН-зависимости параметра k_i/K_i (или относительной скорости реакции при $[I] \ll K_i$, поскольку в этих условиях скорость пропорциональна k_i/K_i), мы получаем pK_a тех групп в свободном ферменте, которые участвуют в связывании и в реакции с ингибитором. Следовательно, рН-зависимости k_{cat}/K_M и k_i/K_i должны дать идентичные наборы значений pK_a , если аффинной меткой модифицируются те же группы, что и участвующие в катализе. Аналогично тому как из рН-зависимости k_{cat} мы получаем pK_a фермент-субстратного комплекса, рН-зависимость k_i дает значения pK_a комплекса фермент — ингибитор (с оговорками, указанными в гл. 5).

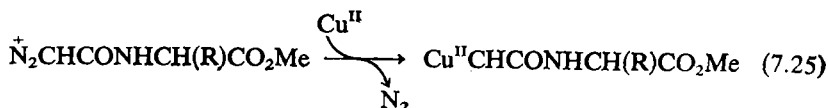
Ферменты всегда таят в себе много неожиданного для энзимолога. Так, например (см. гл. 12, разд. Е.2), аффинная метка 1,2-ангидро-D-маннитол-6-фосфат присоединяется к остатку глутаминовой кислоты в глюкозо-6-фосфатизомеразе [78].



Установлено, что в этом случае имеет место кинетика с насыщением, субстраты препятствуют модификации, стехиометрия инактивации равна 1 : 1, а рН-зависимость k_i дает значения pK_a для комплексов фермента с ингибитором, близкие к pK_a фермент-субстратного комплекса. Однако результаты кристаллографического анализа позволяют предположить, что модифицировалась не та группа, которую имели в виду, а другое участвующее в катализе основание (гл. 12, разд. Е.2) [79]. Если все обстоит именно так, то неожиданный результат интереснее ожидаемого, поскольку тем самым обнаружена важная, не известная ранее каталитическая группа.

Еще один показательный пример использования аффинных меток связан с исследованием пепсина [см. уравнения (12.29) и (12.30)]. Этот фермент содержит два участвующих в катализе

остатка аспарагиновой кислоты, из которых ионизирован только один. Ионизированная карбоксильная группа взаимодействует с эпоксидом, поскольку последний вступает в реакцию, конечно, с нуклеофильной группой. Неионизированная карбоксильная группа взаимодействует с диазоацетильным производным эфира аминокислоты (7.25).



Эта реакция катализируется ионами меди, что, вероятно, обусловлено образованием комплекса карбена с медью [80]. Известно, что карбен, у которого на внешней оболочке находится только шесть электронов, присоединяется к неионизированным карбоксильным группам по связи O—H.

Еще один интересный подход состоит в использовании *фоточувствительных аффинных меток* [81, 82] — соединений, устойчивых в темноте, но активизирующихся в результате фотолиза, и способных обратимо присоединяться к ферменту. Обычно в ка-

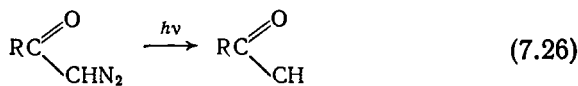
Таблица 7.12

Некоторые аффинные метки ^{a)}

Фермент	Аффинная метка	Субстрат
Триозофосфатизомераза	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{ICH}_2\text{CCH}_2\text{OPO}_3^{2-} \\ \text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OPO}_3^{2-} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HOCH}_2\text{CCH}_2\text{OPO}_3^{2-} \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{HCCH(OH)CH}_2\text{OPO}_3^{2-} \end{array}$
Лизоцим		
Изолейцил-тРНК-синтаза	$\text{BrCH}_2\text{CO-Ile-tРНК}^{\text{Ile}}$	$\text{Ile-tРНК}^{\text{Ile}}$

^{a)} Hartmann F. C., Biochem. biophys. Res. Commun., 33, 888 (1968); Waley S. G., Miller J. C., Rose I. A., O'Connell E. L., Nature, Lond., 227, 181 (1970); Thomas E. W., McElvy J. P., Sharon N., Nature, Lond., 222, 485 (1969); Santí O. V., Marchant W., Biochem. biophys. Res. Commun., 51, 370 (1973).

честве таких реагентов используются диазосоединения или ази-ды, при фотолизе которых образуются соответственно высокореакционноспособные карбены или нитрены:



Фоточувствительные аффинные метки оказались очень полезными при картировании аминокислотных остатков в активных центрах ферментов и в центрах связывания белков (например, антител). Для кинетических исследований более удобны обычные аффинные метки, поскольку они специфичны в отношении основных и нуклеофильных групп, которым в катализе принадлежит главная роль, и позволяют получить информацию о pK_a модифицируемых групп.

В настоящее время синтезированы сотни аффинных меток; в основе большинства из них лежат галоидметилкетоны или эпоксиды. Перечень меток ежегодно приводится в периодических сообщениях для специалистов «Аминокислоты, пептиды и белки», издаваемых Химическим обществом Великобритании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hartley B. S., Kilby B. A., *Biochem. J.*, **56**, 288 (1954).
- Gutfreund H., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 167 (1955).
- Gutfreund H., Sturtevant J. M., *Biochem. J.*, **63**, 656 (1956).
- Himoe A., Brandt K. G., DeSa R. J., Hess G. P., *J. biol. Chem.*, **244**, 3483 (1969).
- Barman T. E., Gutfreund H., *Biochem. J.*, **101**, 411 (1966).
- Bernhard S. A., Gutfreund H., *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **53**, 1238 (1965).
- McConn J., Ku E., Himoe A., Brandt K. G., Hess G. P., *J. biol. Chem.*, **246**, 2918 (1971).
- Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B., *J. Am. chem. Soc.*, **84**, 2540 (1962).
- Caplow M., Jencks W. P., *Biochemistry*, **1**, 883 (1962).
- Bernhard S. A., Lau S. J., Noller H., *Biochemistry*, **4**, 1108 (1965).
- De Jersey J., Keough D. T., Stoops J. K., Zerner B., *Eur. J. Biochem.*, **42**, 237 (1974).
- Miller C. G., Bender M. L., *J. Am. chem. Soc.*, **90**, 6850 (1968).
- Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J., *Biochemistry*, **12**, 2035 (1973).
- Fastrez J., Fersht A. R., *Biochemistry*, **12**, 2025 (1973).
- Henderson R., *J. molec. Biol.*, **54**, 341 (1970).
- Jansen E. F., Nutting M. D., Balls A. K., *J. biol. Chem.*, **179**, 201 (1949).
- Schaffer N. K., May S. C., Summeson W. H., *J. biol. Chem.*, **202**, 67 (1953).
- Gutfreund H., Hammond B. R., *Biochem. J.*, **73**, 526 (1959).
- Garen A., Levinthal C., *Biochem. biophys. Acta*, **38**, 470 (1960).
- Heppel L. A., Harkness D. R., Hilfmoer R. J., *J. biol. Chem.*, **237**, 841 (1962).
- Aldridge W. N., Barman T. E., Gutfreund H., *Biochem. J.*, **92**, 23C (1964).

22. Hull W. E., Sykes B. D., *Biochemistry*, **15**, 1535 (1976).
23. Hull W. E., Halford S. E., Gutfreund H., Sykes B. D., *Biochemistry*, **15**, 1547 (1976).
24. Epand R. M., Wilson I. B., *J. biol. Chem.*, **238**, 1718 (1963).
25. Epand R. M., Wilson I. B., *J. biol. Chem.*, **240**, 1104 (1965).
26. Bender M. L., Clement G. E., Gunter C. R., Kezdy F. J., *J. Am. chem. Soc.*, **86**, 3697 (1964).
27. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клёсов А. А., *FEBS Letts.*, **15**, 121 (1971).
28. Engström L., *Biochim. biophys. Acta*, **54**, 179 (1961); **56**, 606 (1962).
29. Schwartz J. H., Lipmann F., *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **47**, 1996 (1961).
30. Barrett H., Butler R., Wilson I. B., *Biochemistry*, **8**, 1042 (1969).
31. Snyder S. L., Wilson I. B., *Biochemistry*, **11**, 3220 (1972).
32. Bloch W., Schlesinger M. J., *J. biol. Chem.*, **248**, 5794 (1973).
33. Chlebowski J. F., Armitage I. M., Tusa P. P., Coleman J. E., *J. biol. Chem.*, **251**, 1207 (1976).
34. Chappellet-Tordo D., Iwatsubo M., Lazdunski M., *Biochemistry*, **13**, 3754 (1974).
35. Kilsheimer G. S., Axelrod B., *J. biol. Chem.*, **227**, 879 (1957).
36. Ostrowski W., Barnard E. A., *Biochemistry*, **12**, 3893 (1973).
37. Wallenfjels K., Kurz G., *Biochem. Z.*, **335**, 559 (1962).
38. Wallenfjels K., Malhotra O. P., *Adv. Carbohydr. Chem.*, **16**, 239 (1961).
39. Koshland D. E., Jr., In: McElroy W. D., Glass V. (eds.), *Mechanisms of enzyme action*, p. 608, Johns Hopkins Press, Baltimore (1954).
40. Rupley J. A., Gates V., *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **57**, 496 (1967).
41. Pollock J. J., Chipman D. M., Sharon N., *Archs Biochem. Biophys.*, **120**, 235 (1967).
42. Stokes T. M., Wilson I. B., *Biochemistry*, **11**, 1061 (1972).
43. Sinnott M. L., Viratelle O. E., *Biochem. J.*, **133**, 81 (1973).
44. Sinnott M. L., Souchard I. J. L., *Biochem. J.*, **133**, 89 (1973).
45. Sinnott M. L., Withers S. G., *Biochem. J.*, **143**, 751 (1974).
46. Hoagland M. B., *Biochim. biophys. Acta*, **16**, 288 (1955).
47. Berg P., P., *J. biol. Chem.*, **222**, 1025 (1956).
48. Hoagland M. B., Keller E. B., Zamecnik P. C., *J. biol. Chem.*, **218**, 345 (1956).
49. Söll D., Schimmel P. R., *The Enzymes*, **10**, 489 (1974).
50. Norris A., Berg P., *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **52**, 330 (1964).
51. Baldwin A. N., Berg P., *J. biol. Chem.*, **241**, 839 (1966).
52. Lofffield R. B., *Prog. Nucl. Acid. Res. (& Mol. Biol.)*, **12**, 87 (1972).
53. Fersht A. R., Kaethner M. M., *Biochemistry*, **15**, 818 (1976).
54. Fersht A. R., Kaethner M. M., *Biochemistry*, **15**, 3342 (1976).
55. Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H., *J. mol. Biol.*, **42**, 1 (1969).
56. Weber A., Hasselbach W., *Biochim. biophys. Acta*, **15**, 237 (1954).
57. Tomomura Y., Kitagawa S., *Biochim. biophys. Acta*, **26**, 15 (1957).
58. Lynn R. W., Taylor E. W., *Biochemistry*, **9**, 2975 (1970).
59. Taylor E. W., Lynn R. W., Moll G., *Biochemistry*, **9**, 2984 (1970).
60. Lynn R. W., Taylor E. W., *Biochemistry*, **10**, 4617 (1971).
61. Trentham D. R., Bardsley R. G., Eccleston J. F., Weeds A. G., *Biochem. J.*, **126**, 635 (1972).
62. Bagshaw C. R., Eccleston J. F., Trentham D. R., Yates D. W., Goody R. S., *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **37**, 127 (1972).
63. Bagshaw C. R., Trentham D. R., *Biochem. J.*, **133**, 323 (1973).
64. Bagshaw C. R., Trentham D. R., *Biochem. J.*, **141**, 331 (1974).
65. Bagshaw C. R., Eccleston J. F., Eckstein F., Goody R. S., Gutfreund H., Trentham D. R., *Biochem. J.*, **141**, 351 (1974).
66. Mannherz H. G., Schenck H., Goody R. S., *Eur. J. Biochem.*, **48**, 287 (1974).
67. Wolcott R. G., Boyer P., *J. Supramolecular Structure*, **3**, 154 (1975).

68. *Trentham D. R., Eccleston J. F., Bagshaw C. R.*, Q. Rev. Biophys., **9**, 2 (1976).
69. *Taylor R. W., Weeds A. G.*, Biochem. J., **159**, 301 (1976).
70. *Fishbein R., Benkovic P. A., Schray K. J., Siewers I. J., Steffens J. J., Benkovic S. J.*, J. biol. Chem., **249**, 6047 (1974).
71. *Würster B., Hess B.*, FEBS Letts., **38**, 257 (1974).
72. *Koerner T. A. W., Jr., Younathan E. S., Ashour A.-L. E., Voll R. J.*, J. biol. Chem., **249**, 5749 (1974).
73. *Shaw E.*, The Enzymes, **1**, 91 (1970).
74. *Schoellmann G., Shaw E.*, Biochem. biophys. Res. Commun., **7**, 36 (1962); Biochemistry, **2**, 252 (1963).
75. *Baker B. R., Lee W. W., Tong E., Ross L. O.*, J. Am. chem. Soc., **83**, 3713 (1961).
76. *Wofsy L., Metzger H., Singer S. J.*, Biochemistry, **1**, 1031 (1961).
77. *Glick D.*, Biochemistry, **7**, 3391 (1968).
78. *O'Connell E. L., Rose I. A.*, J. biol. Chem., **248**, 2225 (1973).
79. *Shaw P. J., Muirhead H.*, FEBS Letts., **65**, 50 (1976).
80. *Lundblada R. L., Stein W. H.*, J. biol. Chem., **244**, 154 (1969).
81. *Singh A., Thornton E. R., Westheimer F. H.*, J. biol. Chem., **237**, 3006 (1962).
82. *Knowles J. R.*, Acc. chem. Res., **5**, 155 (1972).

КООПЕРАТИВНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

А. Положительная кооперативность

Молекулы многих белков состоят из субъединиц и имеют несколько центров связывания лигандов. В ряде случаев кривые связывания лигандов не следуют уравнению Михаэлиса — Ментен (глава 6, разд. Г), а имеют *сигмоидный* характер. Кривая такого рода представлена на рис. 8.1; она отражает зависимость степени насыщения гемоглобина кислородом от давления кислорода. Здесь же для сравнения приведена гипербола, описываемая уравнением типа уравнения Михаэлиса — Ментен, которая отражает связывание кислорода миоглобином. Сигмоидные кривые характерны для случая кооперативного связывания лигандов белками, имеющими несколько центров связывания в белковом олигомере. Так, например, молекула гемоглобина состоит из четырех полипептидных цепей, каждая из которых сходна с единственной полипептидной цепью миоглобина. Кривую связывания кислорода гемоглобином можно описать уравнением, содержащим четыре константы последовательного связывания (уравнение Эдера [1]). Удивительная особенность процесса кооперативного связывания состоит в том, что сродство гемоглобина к четвертой присоединяемой молекуле кислорода в несколько сот (до тысячи) раз превышает сродство к первой молекуле. Это увеличение сродства нельзя объяснить, исходя из наличия четырех не взаимодействующих центров, обладающих просто разным сродством к кислороду. В этом случае центры с высоким сродством к кислороду заполнялись бы первыми и молекула с частично заполненными центрами связывания обладала бы меньшим сродством, чем дезоксигемоглобин. Увеличение сродства по мере насыщения гемоглобина кислородом является результатом взаимодействия связывающих центров, приводящим к тому, что связывание молекулы кислорода с одним центром вызывает увеличение сродства другого.

Аналогичными кооперативными свойствами обладает и ряд ферментов. Здесь также зависимость v от $[S]$ изображается сигмоидными кривыми. Обычно эти ферменты ответственны за

регуляцию и контроль метаболических процессов, и их активность регулируется по принципу обратной связи. Терминология, используемая при рассмотрении вопросов кооперативности, заимствована из области исследования процессов регуляции [2].

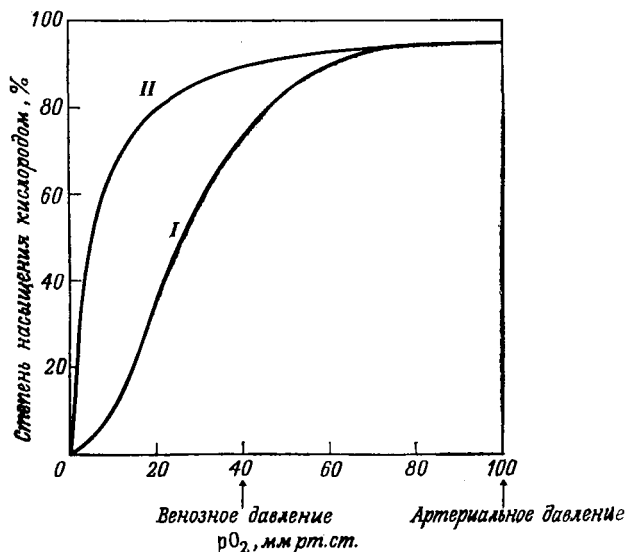


Рис. 8.1. Связывание кислорода гемоглобином (I) и миоглобином (II).

Ферменты с описанными выше свойствами называются *аллостерическими* (от греч. *allos* — другой, *stereos* — пространство),

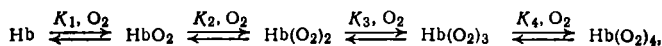
Таблица 8.1

Константы Эдера ($\text{мм}^{-1} \text{Hg}$) для присоединения O_2 к гемоглобину при 25°C , $\text{pH } 7,4$ и $0,1 \text{ M NaCl}$ ^{а), б)}

2,3-дифосфоглицерат, мМ	K_1	K_2	K_3	K_4
0	0,024	~ 0,074	~ 0,086	7,4
2,0	0,01	~ 0,023	~ 0,008	11,2

а) Туума I., Imai K., Shimizu K., Biochemistry, 12, 1491 (1973).

б) Уравнение Эдера описывает следующий процесс:



где

$$K_1 = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{Hb}] [\text{O}_2]}, \quad K_2 = \frac{[\text{Hb(O}_2)_2]}{[\text{HbO}_2] [\text{O}_2]} \quad \text{и т. д.}$$

поскольку аллостерический эффектор (ингибитор или активатор) обычно структурно отличен от субстрата и связывается с центром, расположенным в другом месте белковой молекулы, чем активный центр. Взаимодействия между идентичными молекулами субстрата называют *гомотропными*, а взаимодействия между аллостерическим эффектором и субстратом — *гетеротропными*.

Б. Механизмы аллостерических взаимодействий и кооперативности

Первые попытки объяснить механизм кооперативности были предприняты при исследовании свойств гемоглобина. Чтобы лучше понять смысл этих работ, рассмотрим структуру дезокси- и оксигемоглобина. Молекула гемоглобина состоит из двух пар цепей, α и β , расположенных в пространстве таким образом, что образуется симметричный тетраэдр. Гемы, являющиеся центрами связывания кислорода, располагаются достаточно далеко друг от друга и непосредственно не взаимодействуют. При оксигенации дезоксигемоглобина тетраэдрическая симметрия сохраняется, а в четвертичной и третичной структуре наблюдаются изменения (рис. 8.2) [3]. Из опытов по измерению констант связывания известно, что дезоксигемоглобин характеризуется низким сродством к кислороду, тогда как оксигемоглобин — высоким.

1. Механизм Моно — Уаймена — Шанжэ [4]

Моно, Уаймен и Шанжэ предложили изящное объяснение кооперативности, приняв, что небольшая часть дезоксигемоглобина находится в виде четвертичной окси-структуры, которая связывает кислород более прочно. При присоединении одного моля кислорода концентрация окси-структуры возрастает, поскольку кислород предпочтительно связывается именно с этой структурой. Связывание достаточно большого числа молекул кислорода приводит к тому, что окси-форма становится преобладающей формой гемоглобина в растворе, и последующее связывание кислорода облегчается. Чтобы упростить соответствующие математические выражения и сделать более ясным их физический смысл, авторы предположили, что четвертичная структура молекулы гемоглобина всегда сохраняет свою симметрию; данная молекула, присоединившая некоторое количество кислорода, находится либо в окси-, либо в дезокси-состоянии; смешанные состояния невозможны. По этой причине модель

Моно и др. часто называют «согласованной» моделью, построенной по принципу «все или ничего», или моделью «двух состояний».

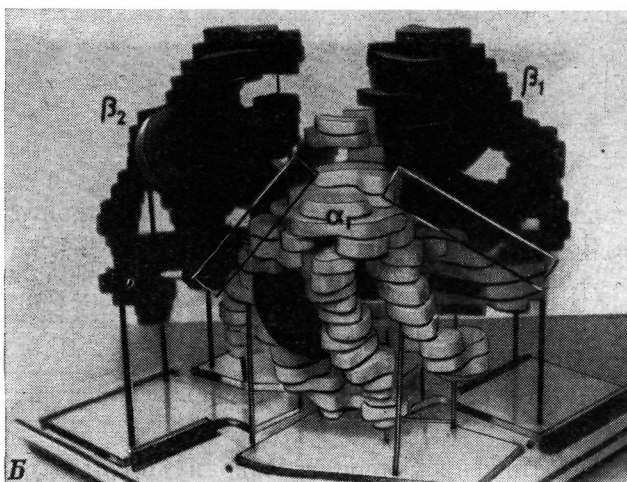
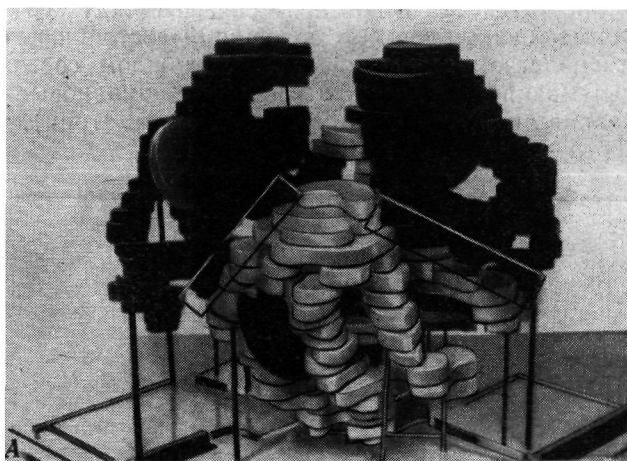


Рис. 8.2. Модели оксигемоглобина (А) и дезоксигемоглобина (Б), выполненные из бальзового дерева. Гемы изображены в виде дисков. Обратите внимание на увеличение расстояния между β -цепями при дезоксигенации.

Эта модель применима и к другим аллостерическим белкам при следующих предположениях.

а. Рассматриваемые белки являются олигомерами. *б.* Молекула белка находится в одном из двух конформационных состоя-

ний: T (tense, «напряженном»)-состоянии, которое преобладает, когда белок не связан с лигандами, или R (relaxed, «расслабленном»)-состоянии. Формы белка, соответствующие разным состояниям, находятся в равновесии. Указанные состояния различаются энергетически и по числу связей между субъединицами. *в.* Форма белка, соответствующая T-состоянию, обладает меньшим родством к лигандам. *г.* В каждом состоянии все центры связывания эквивалентны и имеют одинаковые константы связывания лигандов (предположение симметрии).

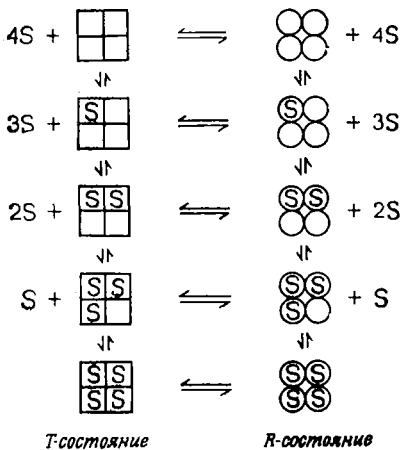


Рис. 8.3. Модель Моно, Уаймена и Шанжэ связывания лигандов тетрамерным белком.

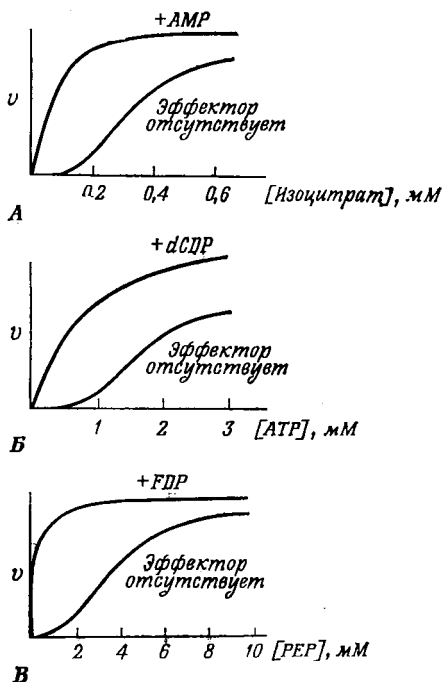
Сигмоидную кривую связывания можно построить, используя лишь три параметра: L — аллостерическую константу, равную отношению концентраций двух состояний свободного фермента $[T]/[R]$, K_T и K_R — константы диссоциации для каждого центра в T- и R-состояниях соответственно.

Регуляция активности фермента с помощью аллостерических взаимодействий

Первым достижением теории Моно и др. было построение теоретической кривой связывания на основе трех параметров — L , K_R и K_T , которая с большой точностью совпала с экспериментально полученной кривой связывания кислорода гемоглобином. Но еще более впечатляющим было предложенное этой теорией очень простое объяснение механизма регуляции. Моно, Уаймен и Шанжэ утверждали, что сигмоидный характер зависимости ν от $[S]$ в отсутствие аллостерических активаторов и ингибиторов свойствен всем аллостерическим ферментам. Они указывали, что

если эта сигмоидность обусловлена кооперативным связыванием и существованием $R \rightleftharpoons T$ равновесия, то регуляцию можно объяснить изменением под действием эффектора отношения $[R]/[T]$ путем предпочтительной стабилизации одной из этих форм. Активатор связывается с R-формой и увеличивает ее концентрацию; ингибитор предпочтительно связывается с T-формой и таким образом затрудняет переход в R-состояние.

Рис. 8.4. Исчезновение положительной кооперативности при присоединении аллостерических эффекторов к некоторым ферментам. Обратите внимание на очень сильное увеличение ферментативной активности при низких концентрациях субстрата (фосфоенолпирувата) при добавлении AMP к изоцитратдегидрогеназе (А), dCDP к дезокситимидинкиназе (Б) и FDP к пируваткиназе (В), показывающее, как можно «включить» фермент с помощью аллостерического эффектора. [Hathaway J. A., Atkinson D. E. J. *biol. Chem.*, 238, 2875 (1963); Okazaki R., Kornberg A. J. *biol. Chem.*, 239, 275 (1964); Haeckel R., Hess B., Lauterhorn W., Würster K.-H. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 349, 699 (1968).]



В предельном случае активатор смещает равновесие между R- и T-формами в такой степени, что преобладает R-состояние, кооперативность исчезает и выполняется кинетика Михаэлиса — Ментен, что и подтверждается экспериментально для ряда ферментов (рис. 8.4).

Согласно модели Моно и др., присоединение ингибитора к ферменту, который связывает субстраты по кооперативному механизму, должно происходить некооперативно, поскольку ингибитор присоединяется к преобладающему T-состоянию. Для активаторов, присоединяющихся к ансамблю связывающих центров в R-состоянии, должно наблюдаться кооперативное связывание.

Наиболее слабым местом теории Моно и др. является допущение о симметрии. Использование минимального числа промежуточных состояний приводит к тому, что модель становится лишь неким приближением к действительности. Но как раз в этом допущении и заложено достоинство модели: она дает простую схему, которая объясняет экспериментальные данные. Такие предсказания, как переход от сигмоидной зависимости к кинетике Михаэлиса — Ментен при достаточно высоких концентрациях активатора для ферментов, выполняющих регуляторные функции, могут быть сделаны независимо от того, вводится ли допущение о наличии промежуточных состояний. Необходимо отметить также, что, несмотря на свою простоту, эта теория объясняет характер кривых связывания кислорода целым рядом мутантных форм гемоглобина (см. ниже).

Теория Моно и др. является по своей сути структурной теорией. Гипотеза, что между субъединицами, находящимися в Т-состоянии, существует напряжение, послужила отправным пунктом многих структурных работ Перутца и других исследователей при объяснении природы и энергетики этих напряжений в гемоглобине.

2. Последовательная модель

Кошланда — Немети — Филмера [5]

Авторы этой модели не используют допущение о симметрии, а предполагают, что переход от Т-состояния к связанному с лигандом R-состоянию представляет собой последовательный процесс. Конформация субъединиц в олигомере при связывании лиганда изменяется поочередно, без резкого «переключения» всей молекулы из одного состояния в другое (рис. 8.5). В модели Моно и др. используется идея об изменении четвертичной структуры, в то время как в рассматриваемой модели за основу принимается предположение о последовательном изменении третичной структуры.

Модель Кошланда и др. основана на двух допущениях:

- а. В отсутствие лигандов белок существует в одной конформации.
- б. При связывании лиганд индуцирует в субъединице, к которой он присоединяется, конформационное изменение. Это изменение может передаваться на соседнюю, «вакантную» субъединицу.

Рассматриваемая модель олицетворяет высказанную ранее Кошландом идею об *индуцированном соответствии*, согласно которой связывание субстрата с ферментом вызывает в послед-

нем конформационные изменения, в результате чего каталитические группы фермента принимают необходимую ориентацию.

Используя эти допущения, можно описать связывание кислорода с помощью четырех констант связывания, что формально эквивалентно использованию уравнения Эдера, и, следовательно, модель Кошланда и др. можно рассматривать как интерпретацию этого уравнения на молекулярном уровне. В общем случае

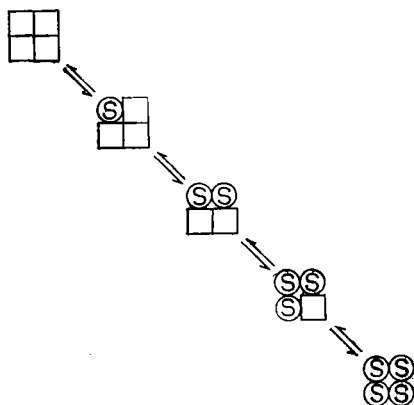


Рис. 8.5. Модель Кошланда, Немети и Филмера связывания лигандов тетрамерным белком.

число необходимых для описания констант равно числу центров связывания в отличие от модели Моно и др., в которой всегда используется три константы.

Модель Кошланда и др. является более общей и, вероятно, лучше описывает аллостерические свойства некоторых белков, чем модель Моно и др., хотя интерпретация экспериментальных данных в этом случае часто бывает несколько более сложной.

3. Обобщенная модель [6]

Эйген указывал, что модели Моно и др. и Кошланда и др. представляют собой предельные случаи более общей схемы (рис. 8.6). Эта схема сложнее представленной здесь «шахматной доски», поскольку по причинам симметрии в случае гемоглобина имеется 44 возможных состояния. На рис. 8.6 модель Кошланда и др. представляется перемещением слона вдоль диагонали, идущей из левого верхнего угла шахматной доски в правый нижний угол, а модель Моно и др. — перемещением ладьи вдоль вертикальных сторон доски и между этими сторонами. В работе

[7] была проанализирована обобщенная модель, включающая как крайние случаи модели Моно и Кошланда и рассматривающая диссоциацию олигомера на субъединицы и т. д. Однако получающиеся результаты слишком сложны, чтобы ими можно

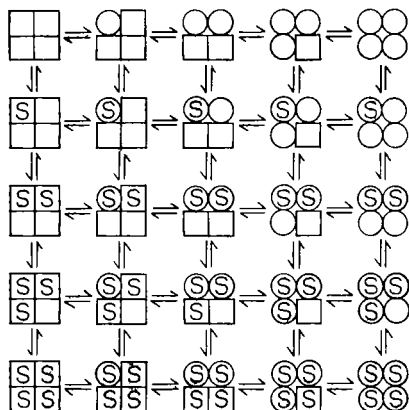


Рис. 8.6. Обобщенная схема Эйгена для связывания лигандов тетрамерным белком. Крайне слева и справа столбцы изображают упрощенную схему Моно и др., а диагональ, идущая из левого верхнего угла в правый нижний, — схему Кошланда и др.

было широко пользоваться, и значительно удобнее интерпретировать экспериментальные данные в рамках рассмотренных выше моделей.

В. Отрицательная кооперативность и реакционная способность половины активных центров [8, 9]

У некоторых ферментов при последовательном связывании молекул лигандов наблюдается *уменьшение* сродства. Как указывалось ранее, это явление можно объяснить изначальным различием в сродстве имеющихся центров связывания, приводящим к тому, что первым связывают лиганды те центры, у которых сродство выше. Однако установлено, что такое поведение свойственно и олигомерным ферментам, состоящим из идентичных субъединиц. Результаты рентгеноструктурных исследований двух ферментов — тирозил-тРНК-синтетазы [10] и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы [11] из *Bacillus stearothermophilus* — показали, что субъединицы этих ферментов располагаются симметрично, так что все центры в исходном состоянии эквивалентны. Однако тирозил-тРНК-синтетаза, являясь димером, прочно связывает только один моль тирозина, связывание же второго моля не удается обнаружить даже при миллимолярных концентрациях тирозина [12, 13]. Присоединение четырех молей NAD^+ к глицеральдегид-3-фосфат-дегидро-

геназе из мышц кролика характеризуется следующим увеличением констант диссоциации: 10^{-11} , 10^{-9} , $3 \cdot 10^{-7}$ и $3 \cdot 10^{-5}$ М [14, 15]. Аналогичные изменения сродства обнаружены при исследовании бактериального фермента. Подобный антагонизм в связывании молекул известен под названием *отрицательная кооперативность* (или *антикооперативность*).

Отрицательную кооперативность нельзя объяснить, исходя из модели Моно и др., согласно которой присоединение первой молекулы лиганда только стабилизирует состояние с высоким сродством и не способно увеличить концентрацию Т-формы. Теория Кошланда и др. объясняет отрицательную кооперативность тем, что присоединение лиганда к одному центру вызывает конформационное изменение, которое передается на вакантную субъединицу (допущение *v*). Таким образом, отрицательная кооперативность является отличительным признаком механизма Кошланда и др.

Ситуация, аналогичная отрицательной кооперативности, возникает тогда, когда из $2n$ центров молекулы фермента реагируют (быстро) только n центров (реакционная способность половины связывающих центров; *half-of-the sites reactivity*). Обнаружить это явление удается с помощью данных по предстационарной кинетике. Показательным примером такого фермента может служить тирозил-тРНК-синтетаза: образование одного моля связанного с ферментом тирозиладенилата происходит с константой скорости 18 с^{-1} , тогда как второй центр реагирует в 10^4 раз медленнее [12, 16].

Рассматриваемое явление не вписывается в рамки простой теории Моно и др., поскольку центры связывания неэквивалентны, и тем самым симметрия нарушена.

В этой связи необходимо отметить следующее. Возможность выявления случая реакционной способности половины связывающих центров зависит от того, известна ли концентрация центров связывания на ферменте, что в свою очередь зависит от точности определения концентрации белка и чистоты препарата. Негомогенный препарат, содержащий молекулы, обладающие разным сродством к лиганду, дает кривую связывания такого же вида, как и в случае отрицательной кооперативности, что может привести к ошибочному выводу о наличии взаимодействия между субъединицами. Еще одна ситуация, которую можно ошибочно интерпретировать как случай реакционной способности половины связывающих центров, имеет место в реакциях, катализируемых лактатдегидрогеназой, и обсуждается в гл. 12: из-за неблагоприятной константы равновесия между $\text{E.NAD}^+ \cdot \text{Лас}$ и E.NADH.Pyг не происходит полного накопления ферментсодержащего промежуточного соединения E.NADH.Pyг [схема (12.9)].

Таблица 8.2

Ферменты, у которых реакционной способностью обладает только половина активных центров

Фермент	Реакция	Число субъединиц	Источник данных ^{а)}
Ацетоацетатдекарбоксилаза	Инактивация активного центра лизина	12	1
Альдолаза	«Парциальная» реакция с фруктозо-6-фосфатом	2	2
Аминоацил-тРНК—синтетазы (некоторые)	Двухфазное образование аминокислоты	2	3
Цитидинтрифосфатсинтетаза	Необратимая инактивация (анализ стехиометрии)	4	4
Глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа	Реакция с нефизиологическими субстратами. В реакции с физиологическими субстратами участвуют все центры	4	5
Аспартат-карбамоил-трансфераза	Связывание СТР Связывание карбамилфосфата	6 (регулят.) 6 (каталит.)	5
Глутаминсинтетаза	Необратимое ингибирование	8	6

- ^{а)} 1—Schmidt D. E., Jr., Westheimer F. H., *Biochemistry*, 10, 1249 (1971) и литература, приведенная в этой статье.
 2—Tsolas O., Horecker B. L., *Archs Biochem. Biophys.*, 173, 577 (1976).
 3—Mulvey R. S., Fersht A. R., *Biochemistry*, 15, 243 (1976).
 4—Levitzki A., Stalcup W. B., Koshland D. E., Jr., *Biochemistry*, 10, 3371 (1971).
 5—Seydoux F., Malhotra O. P., Bernhard S. A., *Crit. Revs Biochem.*, 227 (1974).
 6—Tate S. S., Meister A., *Proc. natn. Acad. Sci., USA*, 68, 781 (1971).

Г. Количественный анализ кооперативности

1. Уравнение Хилла; коэффициент Хилла — мера кооперативности [17]

Рассмотрим случай полностью кооперативного связывания; молекула фермента имеет n связывающих центров и лиганд присоединяется одновременно ко всем центрам.



Константа диссоциации имеет следующий вид:

$$K = \frac{[E][S]^n}{[ES_n]} \quad (8.2)$$

Степень насыщения Y есть

$$Y = \frac{[ES_n]}{[E]_0}, \quad (8.3)$$

$$1 - Y = \frac{[E]}{[E]_0}. \quad (8.4)$$

Из уравнений (8.2) и (8.4) получаем

$$\lg [Y/(1 - Y)] = n \lg [S] - \lg K. \quad (8.5)$$

Аналогичное уравнение, называемое уравнением Хилла,

$$\lg [Y/(1 - Y)] = h \lg [S] - \lg K, \quad (8.6)$$

удовлетворительно описывает связывание лигандов аллостерическими белками в интервале от 10 до 90% насыщения. За

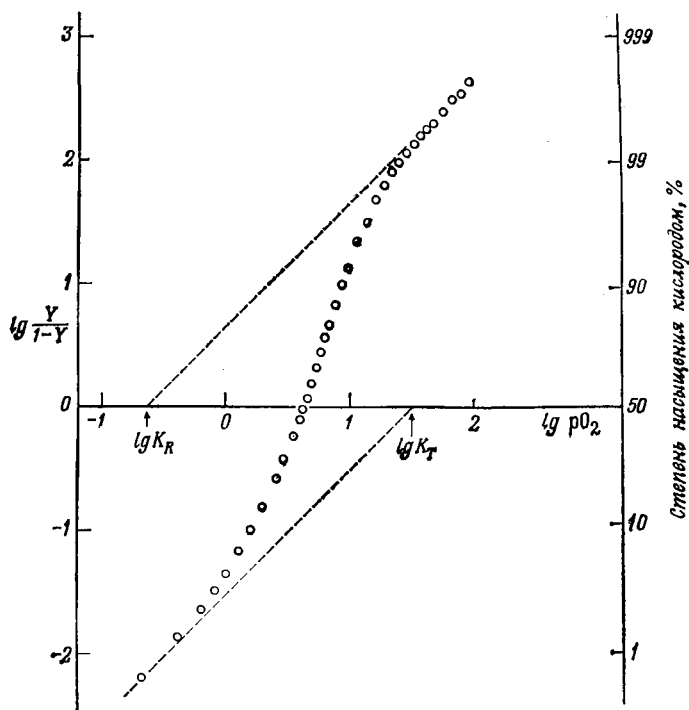


Рис. 8.7. График Хилла для связывания кислорода с нормальным гемоглобином (рН 7.4). [Kilmartin J. V., Imai K., Jones R. T., In: Erythrocyte structure and function, Alan R. Liss Inc. New York, p. 21 (1975).]

пределами этого интервала экспериментальная кривая отклоняется от прямой. Величина h , определяемая из наклона кривой,

описываемой уравнением (8.6), в области полунасыщения ($Y = 0,5$), известна под названием *коэффициент Хилла* и является мерой кооперативности. Чем выше h , тем сильнее кооперативность. В пределе h равен числу центров связывания. Если $h = 1$, то кооперативность отсутствует; при $h > 1$ имеет место положительная кооперативность, а при $h < 1$ — отрицательная.

Уравнение Хилла можно использовать при кинетических измерениях, если вместо Y подставить v :

$$\lg v/(V_{\max} - v) = h \lg [S] - \lg K. \quad (8.7)$$

2. Кривая связывания для модели Моно и др. [4]

Пусть константа диссоциации лиганда для комплекса с R-формой равна K_R , а для комплекса с T-формой — K_T . Обозначим отношение этих констант через c :

$$c = K_R/K_T. \quad (8.8)$$

R-состояние с x присоединенными молекулами лигандов обозначим через R_x , для T-состояния введем аналогичное обозначение T_x . В таком случае аллостерическая константа L определяется выражением

$$L = [T_0]/[R_0]. \quad (8.9)$$

Доля связанного с лигандом белка Y рассчитывается из уравнения материального баланса. Следует помнить о необходимости введения «статистических множителей» в константы связывания. Например, константа диссоциации¹ для первой присоединяющейся к гемоглобину молекулы O_2 равна $K_T/4$, поскольку число центров, с которыми этот лиганд может связаться, равно четырем, а отщепление осуществляется только от одного центра. Аналогичным образом константа диссоциации для второй присоединяющейся молекулы будет равна $2K_T/3$, поскольку имеется три центра, к которым она может присоединиться, но после ее присоединения образуются два центра, от которых молекула кислорода может отщепиться.

Величина Y для белка, имеющего n центров, определяется выражением

$$Y = \frac{([R_1] + 2[R_2] + \dots + n[R_n]) + ([T_1] + 2[T_2] + \dots + n[T_n])}{n([R_0] + [R_1] + \dots + [R_n] + [T_0] + [T_1] + \dots + [T_n])}. \quad (8.10)$$

Если перейти к параметрам L и c и ввести для удобства безразмерную концентрацию субстрата

$$\alpha = [S]/K_R, \quad (8.11)$$

¹ Речь идет о макроскопической константе диссоциации (следует помнить, что K_R и K_T — микроскопические константы диссоциации). — *Прим. ред.*

то уравнение (8.10) преобразуется к виду

$$Y = \frac{Lc\alpha(1+c\alpha)^{n+1} + \alpha(1+\alpha)^{n-1}}{L(1+c\alpha)^n + (1+\alpha)^n} \quad (8.12)$$

Согласно модели Моно и др., ход кривой насыщения для любого олигомерного белка, состоящего из n протомеров, определяется только тремя неизвестными параметрами и концентрацией лиганда $[L, K_R, K_T$ и $[S]$, из которых три последние величины связаны с c и α , а потому входят неявным образом в уравнение (8.12)].

Таблица 8.3

Аллостерические константы для некоторых белков

Белок	Лиганд	Число центров связывания n	Коэффициент Хилла h	L	c	Источник данных а)
Гемоглобин	O ₂	4	2,8	$3 \cdot 10^5$	0,01	1
Пируваткиназа (дрожжи)	Фосфоенол-пируват	4	2,8	$9 \cdot 10^8$ б)	0,01 б)	2
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (дрожжи)	NAD ⁺	4	2,3	60	0,04	3

а) 1—Edelstein S. J., Nature, Lond., 230, 224 (1971).

2—Haeckel R., Hess B., Lauterhorn W., Würster K.-H. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 349, 699 (1968); Bischofberger H., Hess B., Röschlau P., ibid., 352, 1139 (1971).

3—Kirschner K., Gallego E., Schuster I., Goodall D., J. molec. Biol., 58, 29 (1971).

б) По оценкам автора.

В табл. 8.3 приведен ряд значений L и c , полученных с помощью ЭВМ путем описания экспериментальных кривых связывания для некоторых белков уравнением (8.12). (Это, однако, не означает, что структурные изменения происходят в соответствии с моделью Моно и др.— модель Кошланда и др. предсказывает аналогичную кривую связывания; см. ниже.)

а. Зависимость коэффициента Хилла от параметров L и c [18]

Значение h можно рассчитать, проанализировав с помощью ЭВМ уравнение (8.12). Установлено, что при постоянном c зависимость h от L графически представляется колоколообразной кривой (рис. 8.8). $h = 1$, когда L много больше или много меньше c , и принимает максимальное значение, когда

$$L = c^{-n/2} \quad (8.13)$$

(где n — число центров связывания). Подобный характер зависимости h от L объясняется тем, что при малых L начальная концентрация R-формы достаточно высока, чтобы обеспечить

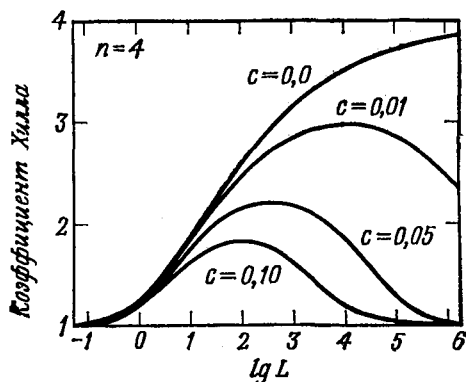


Рис. 8.8. Изменение коэффициента Хилла для тетрамерного белка с изменением параметра L . [Rubin M. M., Changeux J.-P., J. molec. Biol., 21, 265 (1966).]

высокую степень связывания, а при очень большом L концентрация R-формы слишком мала, чтобы вносить в связывание ощутимый вклад.

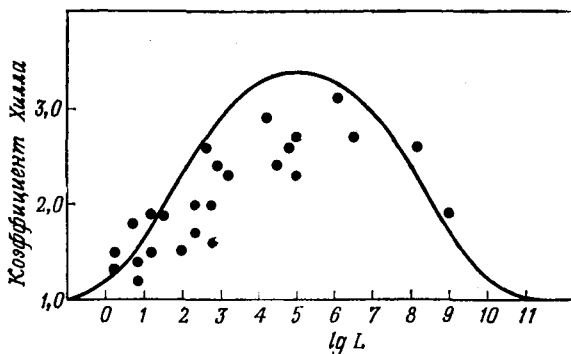


Рис. 8.9. Изменение коэффициента Хилла с изменением параметра L для связывания кислорода с различными мутантными формами гемоглобина. [Baldwin J. M., Prog. Biophys. Molec. Biol., 29, 3 (1975).]

Колоколообразная кривая представляет особый интерес для анализа эффектов структурных изменений в белке, которые сказываются на величине L . Именно на такую кривую ложатся коэффициенты Хилла для широкого круга модифицированных и мутантных форм гемоглобина (рис. 8.9) [19].

3. Кривая связывания для модели Кошланда и др.

В рамках модели Моно и др. выражение для Y имеет простой вид благодаря предположению, что имеется только две константы диссоциации. В модели Кошланда и др. каждому промежуточному состоянию соответствует своя константа диссоциации, поэтому простого общего выражения для Y не существует. Число параметров должно быть равно числу центров связывания.

4. Обнаружение кооперативности и сопоставление механизмов Моно и др. и Кошланда и др.

Наличие кооперативности выявляется по величине коэффициента h , а также по характерным отклонениям от линейности соответствующих анаморфоз кривых насыщения или прямых на

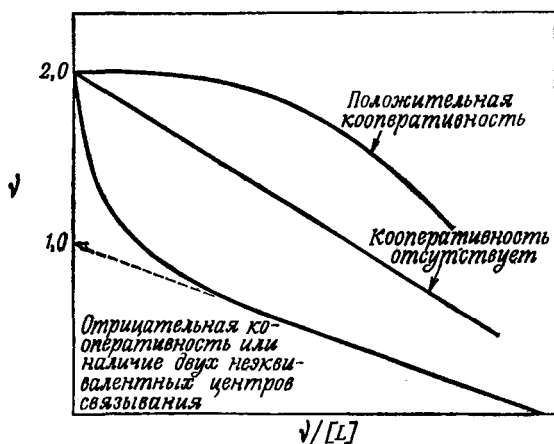


Рис. 8.10. График зависимости стехиометрии связывания v от $v/[L]$ для процесса присоединения лиганда L к димерному белку.

графике Скэтчарда (рис. 8.10). Обнаружение отрицательной кооперативности указывает на невыполнимость простого механизма Моно и др., в то время как положительная кооперативность согласуется с обеими моделями. Анализ формы кривой связывания также не дает однозначного ответа, поскольку обеим моделям соответствуют аналогичные кривые. В принципе различить эти две модели можно, измерив *скорость* связывания лигандов [6]. Например, модель Моно и др. дает меньшее число времен релаксации, поскольку включает меньшее число состоя-

ний. Этот подход был с успехом применен при исследовании глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназы дрожжей Киршнером и др. [20], которые показали, что связывание NAD^+ происходит в соответствии с моделью Моно и др. В то же время исследование связывания лигандов с гемоглобином указывает на существование промежуточных состояний.

Выбор модели часто зависит от характера эксперимента. Исследователи, изучающие, скажем, влияние структурных изменений в молекуле гемоглобина на сродство кислорода и коэффициент Хилла, предпочитают пользоваться моделью Моно и др., поскольку она является по своей природе *структурной*. Эта модель позволяет легко предсказать характер связывания лиганда и интерпретировать экспериментальные данные. Использование ее для нахождения коэффициента Хилла и анализа результатов исследования *равновесных* процессов дает очень хорошие результаты. Ученые, занимающиеся кинетическими исследованиями, предпочитают модель Кошланда и др., поскольку кинетические параметры более чувствительны к существованию промежуточных состояний. В теории Кошланда и др. больше параметров и больше возможностей для подгонки.

Д. Молекулярный механизм кооперативного связывания для гемоглобина [3]

1. Физиологическое значение кооперативного связывания кислорода

Положительная кооперативность не предназначена для увеличения сродства гемоглобина к кислороду; константа связывания кислорода свободными цепями гемоглобина значительно выше константы связывания первого моля кислорода дезоксигемоглобином и приблизительно равна константе связывания кислорода оксигемоглобином. Положительная кооперативность обеспечивает резкое изменение степени сродства в очень узком диапазоне давлений кислорода. Это позволяет гемоглобину насытиться кислородом в легких и затем высвободить примерно 60% его в тканях. Процесс насыщения может осуществляться в довольно узком диапазоне давлений, что обусловлено крутизной графика зависимости степени насыщения от давления кислорода в области 50%-ного насыщения. Кривая, описываемая простым уравнением Михаэлиса — Ментен, гораздо более пологая. (Коэффициент Хилла является мерой крутизны кривой насыщения в точке, отвечающей 50% насыщения; для сигмоидной кривой, отвечающей связыванию гемоглобина, $h \approx 3$, а для гиперболы $h = 1$.)

2. Стереохимический механизм оксигенации гемоглобина

Две пары α - и β -субъединиц гемоглобина образуют тетраэдр с осью симметрии второго порядка (рис. 8.2), проходящей через полость, расположенную в центре структуры. Органические фосфаты, например 2,3-дифосфоглицерат, являющиеся аллостерическими эффекторами, связываются в этой полости с дезокси-гемоглобином в стехиометрическом соотношении 1 : 1 (рис. 8.11)

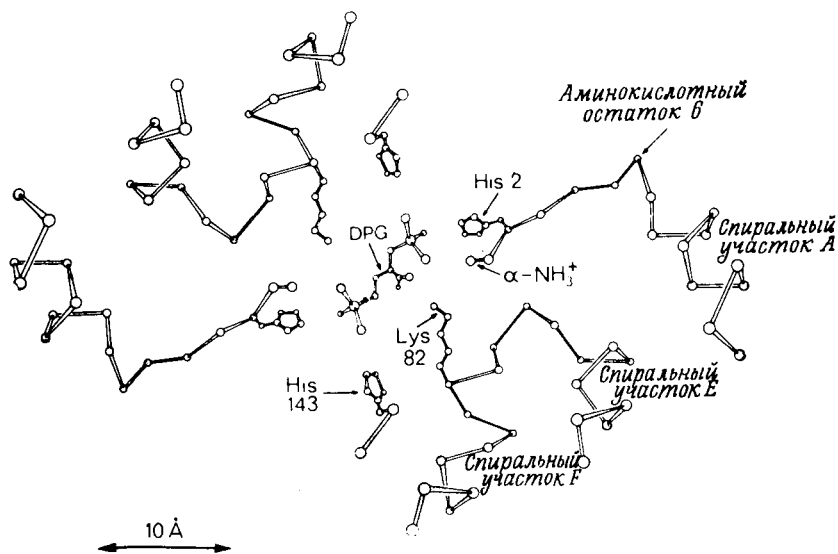


Рис. 8.11. Встраивание 2,3-дифосфоглицерата (DPG) между β -цепями в центральной полости гемоглобина человека. [Argnone A., Perutz M. F., Nature, Lond., 249, 34 (1974).]

[21—23]. Отрицательно заряженный органический фосфат располагается между двумя β -субъединицами, образуя четыре ионные связи с каждой цепью (с остатками Val-1, His-2, Lys-82 и His-143). Дезоксигемоглобин стабилизирован четырьмя парами солевых мостиков между контактирующими поверхностями двух α -цепей и двумя мостиками между α - и β -цепями.

При оксигенации субъединицы поворачиваются друг относительно друга и ось второго порядка приблизительно на 10° . Углы наклона гемов изменяются на несколько градусов, а спиральные участки сдвигаются друг относительно друга на 2—3 Å. Все эти изменения выявляются даже при низком разрешении. При высоком разрешении можно видеть, что помимо некоторых кон-

формационных изменений в субъединицах происходит разрыв солевых мостиков между всеми субъединицами. Кроме того, α -аминогруппы Val-1 каждой β -цепи в центральной полости расходятся на 4 Å, тогда как сама полость сужается, выталкивая присоединившийся органический фосфат. Происходит также уменьшение площади гидрофобной поверхности, вдоль которой

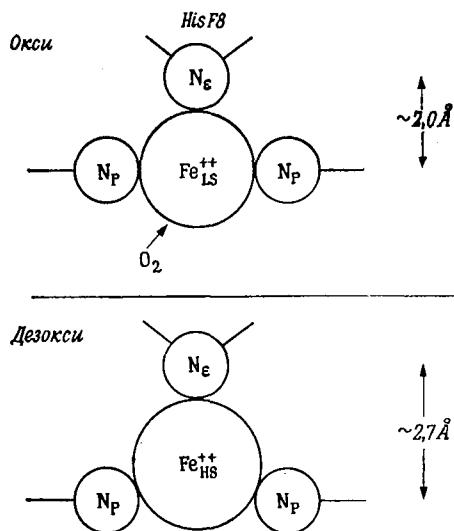


Рис. 8.12. Перемещение имидазольного кольца аминокислотного остатка HisF8 при присоединении кислорода к дезоксигемоглобину. Уменьшение радиуса иона Fe^{2+} позволяет ему поместиться между атомами пиррольного азота (N_p) в плоскости пиррольного кольца.

осуществляется контакт субъединиц [24]. Таким образом, предсказанные Моно, Уайменом и Шанжэ «напряжения», возникающие между субъединицами в Т-состоянии, обусловлены образованием солевых мостиков и наличием дополнительных гидрофобных взаимодействий.

Все это объясняет причину низкого сродства дезоксигемоглобина к кислороду по сравнению с миоглобином или искусственно полученными отдельными цепями гемоглобина [13]. При связывании кислорода в четвертичной структуре гемоглобина происходит нарушение взаимодействий, ответственных за пониженное сродство к кислороду. Солевые мостики разрываются, и гидрофобные поверхности обнажаются. Становится понятным и механизм действия аллостерических эффекторов: органические фосфаты прочно связываются с определенным центром в Т-состоянии и затрудняют его переход в R-состояние.

Разрыв солевых мостиков при оксигенации объясняет также эффект Бора [25]. Оксигенация при физиологическом pH сопровождается высвобождением $\sim 0,7$ протона на гем. Это обусловлено тем, что pK_a аминных оснований, принимающих участие

в образовании солевых мостиков, выше, чем обычно, из-за присутствия карбоксилат-ионов (гл. 4). Разрушение мостиков сопровождается уменьшением pK_a и высвобождением протонов.

Вызывает удивление, почему связывание с кислородом сопровождается столь сильными структурными изменениями в гемоглобине. Дело в том, что природа создала остроумный триггерный механизм. Ион Fe^{2+} в дезоксигемоглобине находится в высокоспиновом состоянии, и его радиус слишком велик, чтобы ион мог располагаться в плоскости порфиринового кольца гема (рис. 8.12). При связывании O_2 ион Fe^{2+} переходит в низкоспиновое состояние, и его радиус уменьшается на 13%. Теперь Fe^{2+} может занять энергетически выгодное положение в плоскости порфиринового кольца и перемещается приблизительно на 0,6 Å. Это вызывает перемещение гистидина, связанного с Fe^{2+} , что сопровождается конформационными изменениями молекулы гемоглобина [3, 26].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adair G. S.*, J. biol. Chem., **63**, 529 (1925).
2. *Monod J., Changeux J.-P., Jacob F.*, J. molec. Biol., **6**, 306 (1963).
3. *Perutz M. F.*, Nature, Lond., **228**, 726 (1970).
4. *Monod J., Wyman J., Changeux J.-P.*, J. molec. Biol., **12**, 88 (1965).
5. *Koshland D. E., Jr., Neméthy G., Filmer D.*, Biochemistry, **5**, 365 (1966).
6. *Eigen M.*, Nobel Symposium, **5**, 333 (1967).
7. *Herzfeld J., Stanley H. E.*, J. molec. Biol., **82**, 231 (1974).
8. *Levitzki A., Stallcup W. B., Koshland D. E., Jr.*, Biochemistry, **10**, 3371 (1971).
9. *MacQuarrie R. A., Bernhard S. A.*, Biochemistry, **10**, 2456 (1971).
10. *Irwin M. J., Nyborg J., Reid B. R., Blow D. M.*, J. molec. Biol., **105**, 577 (1976).
11. *Blesecker G., Harts J. I., Thlerry J. C., Walker J. E., Wonacott A. J.*, Nature, Lond., **266**, 328 (1977).
12. *Fersht A. R., Mulvey R. S., Koch G. L. E.*, Biochemistry, **14**, 13 (1975).
13. *Bosshard H. R., Koch G. L. E., Hartley B. S.*, Eur. J. Biochem., **53**, 493 (1975).
14. *Conway A., Koshland D. E., Jr.*, Biochemistry, **7**, 4011 (1968).
15. *Schlessinger J., Levitzki A.*, J. molec. Biol., **82**, 547 (1974).
16. *Fersht A. R.*, неопубл. данные.
17. *Hill R.*, Proc. R. Soc., **B100**, 419 (1925).
18. *Rubin M. M., Changeux J. P.*, J. molec. Biol., **21**, 265 (1966).
19. *Edelstein S.*, Nature, Lond., **230**, 224 (1971).
20. *Kirschner K., Gallego E., Schuster I., Schudall D.*, J. molec. Biol., **58**, 29 (1971).
21. *Perutz M. F.*, Nature, Lond., **228**, 734 (1970).
22. *Arnone A.*, Nature, Lond., **237**, 146 (1972).
23. *Arnone A., Perutz M. F.*, Nature, Lond., **249**, 34 (1974).
24. *Chothia C., Wodak S., Janin J.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **73**, 3793 (1976).
25. *Bohr C., Hasselbach K. A., Krogh A.*, Skand. Arch. Physiol., **16**, 402 (1904).
26. *Hoard J. L.*, In: Hemes and homoproteins (eds. Chance B., Estabrook R. W., Yonetani T.), Academic Press, p. 9 (1966).

СИЛЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ МЕЖДУ МОЛЕКУЛАМИ, И ЭНЕРГИЯ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Важной особенностью ферментативного катализа является то, что фермент *связывает* субстрат и реакция протекает в пределах фермент-субстратного комплекса. Чтобы глубже понять причины, обуславливающие прочность и специфичность этого связывания, мы рассмотрим взаимодействие между несвязанными атомами, применив эмпирический и феноменологический подход. В частности, мы уделим большое внимание значению энергии взаимодействия. Нековалентные взаимодействия важны не только потому, что они ответственны за связывание. Как мы увидим ниже (гл. 10), вместо того чтобы давать непосредственный вклад в энергию связывания, эти взаимодействия понижают энергию активации стадии химического превращения субстрата, а кроме того играют важную роль в поддержании структуры белка.

К очевидным нековалентным взаимодействиям между атомами относится электростатическое взаимодействие между заряженными группами. Но притягиваются друг к другу даже неполярные молекулы. На наличие такого взаимодействия как на одну из причин отклонения газов от идеальности указывал столетие назад Ван-дер-Ваальс. Некоторые из взаимодействий между нейтральными молекулами газа хорошо изучены, и сейчас известно несколько «соединений Ван-дер-Ваальса». Например, энергия связи между атомами в димерах благородных газов Ne_2 , Ar_2 и Xe_2 равна 0,2; 0,92 и 2,2 кДж·моль⁻¹ (0,05; 0,22 и 0,53 ккал·моль⁻¹) соответственно [1].

А. Нековалентные взаимодействия между атомами

1. Электростатические взаимодействия

Все действующие между атомами и молекулами силы по своей природе являются электростатическими, даже если речь идет о неполярных молекулах. Однако мы сохраним название

«электростатическое» лишь за теми взаимодействиями, которые имеют место между заряженными атомами и молекулами или между диполями. Из всех взаимодействий они изучены наиболее хорошо, и тем не менее их количественная оценка зачастую затруднена из-за невозможности точно определить диэлектрическую проницаемость среды. Этот вопрос обсуждался в гл. 2, где указывалось, что энергия взаимодействия между двумя положительно заряженными атомами азота [530 кДж (130 ккал)] при перенесении их из вакуума в воду уменьшается в 16 раз. Окружающая водная среда поляризуется заряженными атомами, что ведет к возникновению нейтрализующего поля. Проведенные недавно расчеты показали, что эффективная диэлектрическая проницаемость в активном центре лизоцима равна ~ 5 [2].

Существуют следующие типы электростатических взаимодействий:

- а. Взаимодействие между ионами; энергия взаимодействия обратно пропорциональна r .
- б. Взаимодействие между постоянными диполями; энергия взаимодействия обратно пропорциональна r^6 .
- в. Взаимодействие между ионом и индуцируемым им диполем; энергия обратно пропорциональна r^4 .
- г. Взаимодействие между постоянным диполем и индуцируемым им диполем; энергия взаимодействия обратно пропорциональна r^6 .

2. Неполлярные взаимодействия (вандерваальсовы, или дисперсионные силы)

На рис. 9.1 приведены типичные кривые потенциальной энергии для взаимодействия двух атомов. Характерной особенностью этих кривых является резкое увеличение энергии отталкивания при сближении атомов до расстояния, при котором начинается перекрывание их электронных облаков. Энергия взаимодействия изменяется обратно пропорционально двенадцатой степени расстояния. На эти взаимодействия накладывается энергия притяжения, обусловленная главным образом *дисперсионными силами* Лондона. Она изменяется обратно пропорционально шестой степени расстояния. Полная потенциальная энергия определяется выражением

$$U = A/r^{12} - B/r^6. \quad (9.1)$$

В табл. 9.1 приведены некоторые полумпирические значения параметров A и B , вычисленные из физико-химических данных; эти значения используются при расчете энергий взаимодействия.

Энергия взаимодействия между диполями обратно пропорциональна шестой степени расстояния. Дисперсионные силы притяжения обусловлены взаимным индуцированием в молекулах электростатических диполей. Хотя неполярная молекула не

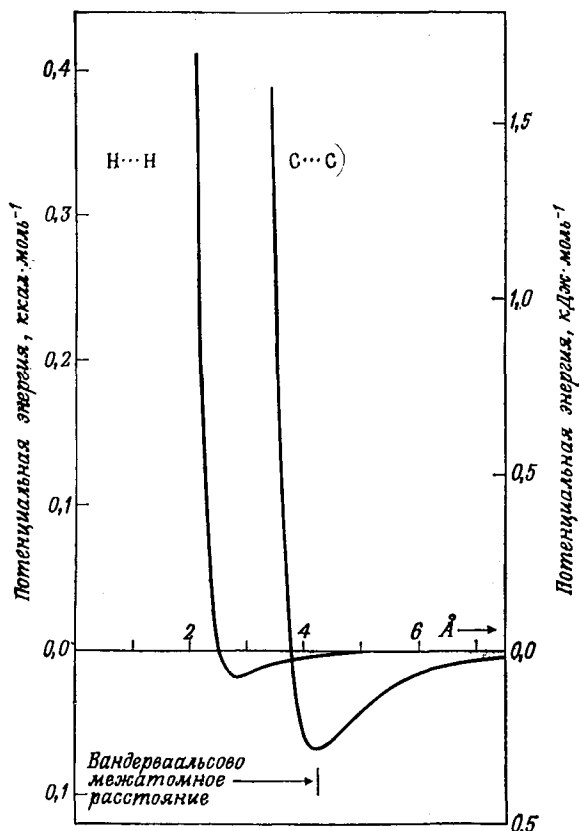


Рис. 9.1. Энергия взаимодействия между двумя атомами водорода и двумя (тетраэдрическими) атомами углерода в молекуле белка (по данным табл. 9.1).

имеет постоянного дипольного момента, она обладает *мгновенным* дипольным моментом из-за локальных флуктуаций электронной плотности. Поскольку энергия зависит от индуцируемого дипольного момента, важным фактором, определяющим силу взаимодействия между любыми двумя атомами, является их поляризуемость.

Межатомное расстояние, при котором энергия взаимодействия минимальна, является наиболее вероятным межатомным

Таблица 9.1

Значения констант A и B , входящих в уравнение (9.1) ^{a)}

Взаимодействие	A , ккал·моль ⁻¹ ·Å ⁻¹²	B , ккал·моль ⁻¹ ·Å ⁻⁶
H...H	4,609 · 10 ³	18,52
=O...O=	1,537 · 10 ⁵	178,62
N...N	2,963 · 10 ⁶	1,272 · 10 ³
C...C	2,284 · 10 ⁶	787,7
C...C ^{b)}	2,399 · 10 ⁶	2,083 · 10 ³

^{a)} Представленные полуэмпирические данные получены из известных физико-химических свойств углеводов, аминокислот и кристаллических амидов [2].

^{b)} Атом углерода карбонильной или карбоксильной группы.

расстоянием и называется вандерваальсовым (van der Waals' contact distance). Каждый атом имеет характерный вандерваальсов радиус. В силу аддитивности оптимальное расстояние

Таблица 9.2

Вандерваальсовы радиусы для некоторых атомов и групп

Атом или группа	Вандерваальсов радиус, Å		Минимальный радиус, Å ^{a)}
H	1,2 ^{b)}	1,4 ^{г)}	
O (гидроксил)	1,5 ^{b)}		1,3
O (карбонил)	1,5 ^{b)}	1,7 ^{г)}	1,3
O ⁻ (карбоксил)	1,5 ^{b)}	1,8 ^{г)}	
N (амид)	1,55 ^{b)}	2 ^{г)}	1,3
NH ₃ ⁺ (аммоний)	1,65 ^{b), в)}		
N ⁺ (имидазолий)	1,55 ^{b)}		
CH (тетраэдрический)	1,85 ^{b), в)}	2,1 ^{г)}	1,5
C (тригональный)	1,7 ^{b)}	1,8 ^{г)}	1,45
CH (в ароматических соединениях)	1,8 ^{b), в)}		
S	1,8 ^{b)}		1,5

^{a)} Минимальный радиус в белке; Levitt M., J. molec. Biol., 82, 393 (1974).

^{b)} Bondi A., J. phys. Chem., 68, 441 (1965); Brant D. A., Flory P. J., J. Am. chem. Soc., 87, 2791 (1965).

^{v)} Это значение получено с учетом размеров присоединенного атома водорода.

^{г)} Warshel A., Levitt M., J. molec. Biol., 103, 227 (1976); эти значения близки к значениям, отвечающим минимуму потенциальной энергии — в предыдущей колонке приведены несколько меньшие величины.

между двумя атомами равно сумме их вандерваальсовых радиусов. В табл. 9.2 приведены значения вандерваальсовых радиусов, полученные из данных рентгеноструктурного анализа. Кроме того, здесь же приведены минимальные значения радиусов, полученные из кривой потенциальной энергии и из данных по гибкости белков. В табл. 9.3 приведены энергии взаимодействия между некоторыми атомами, находящимися на оптимальном расстоянии друг от друга.

Таблица 9.3

Энергия дисперсионного (вандерваальсова) взаимодействия между различными атомами при оптимальном расстоянии между ними [2]

Взаимодействующие атомы	Энергия	
	кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹
H...H	0,0778	0,0186
=O...O=	0,217	0,0519
N...N	0,572	0,1366
C...C	0,284	0,0679
C...C ^{a)}	1,891	0,4519

^{a)} Атом углерода карбонильной или карбоксильной группы.

Хотя вандерваальсовы силы довольно слабые, они, суммируясь по всей молекуле, вносят значительный вклад в связывание. Так, например, согласно данным по теплотам сублимации, вклад в связывание каждой метильной группы в кристаллическом углеводороде составляет 8,4 кДж·моль⁻¹ (2 ккал·моль⁻¹), а для СН-групп кристаллического бензола эта величина равна 6,7 кДж·моль⁻¹ (1,6 ккал·моль⁻¹) [3]. По расчетам энергии вандерваальсова взаимодействия между подцентром D активного центра лизоцима и расположенным в нем глюкопиранозным кольцом составляет около -58,5 кДж·моль⁻¹ (-14 ккал·моль⁻¹) [2].

3. Водородная связь

В биологических системах роль водородной связи чрезвычайно велика. Эта связь образуется между двумя электроотрицательными атомами (одним из которых обычно является кислород), связанными с одним и тем же протоном. В интересующих нас системах водородные связи асимметричны — расстоя-

ние между протоном и атомом, к которому он формально присоединен, соответствует длине нормальной ковалентной связи, а расстояние до другого атома несколько меньше длины вандерваальсова контакта. Оптимальным для водородной связи является линейное расположение атомов, однако отклонение от линейности приводит лишь к небольшому проигрышу в энергии. При образовании водородной связи между $>NH$ -группой и карбонильным кислородом в кристаллическом амиде расстояние $O...N$ обычно составляет 2,85—3,00 Å, а расстояние $O...H$ — от 1,85 до 2,00 Å [4, 5]. Изменение потенциальной энергии с изменением расстояния между атомами N и O носит такой же характер, что и изменение энергии для атомов H—N и C—C (рис. 9.1); минимальное расстояние, на которое сближаются эти атомы, составляет 2,4—2,5 Å. При образовании водородной связи $H_2O \dots H-OH$ расстояние между атомами кислорода со-

Таблица 9.4

**Энергии дисперсионного и электростатического взаимодействия
в некоторых кристаллах**

Кристалл	Расчитанные энергии				Наблюдаемая теплота сублимации	
	дисперсионное взаимодействие		электростатическое взаимодействие а)		кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹
	кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹	кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹		
Бензол	-42	-9,9	-5,4	-1,3	-44,8	-10,7
n-Гексан	-54	-12,9	0	0	-50,2	-12,0
n-Пентан	-42	-10,0	0	0	-43,9	-10,5
Перилен	-119	-28,4	-2,5	-0,6	-125,5	-30
Фенантрен	-85	-20,3	-4,2	-1,0	-91,8	-21,7
Адипамид (четыре водородные связи)	-86	-20,6	-77	-18,4		—
Формамид (две водо- родные связи)	-24	-5,7	-43	-10,3	-73,2	-17,5
Малонамид (четыре водородные связи)	-52	-12,3	-81	-19,4	-120,5	-28,8
Оксамид (четыре водо- родные связи)	-45	-10,8	-60	-14,4	-118,0	-28,2
Сукцинамид (четыре водородные связи)	-65	-15,5	-76	-18,2	-135,2	-32,3
Мочевина (три водо- родные связи)	-28	-6,7	-65	-15,6	-92,8	-22,2

а) Электростатическое взаимодействие обусловлено водородными связями. Энергии рассчитаны из эмпирических энергетических функций (см. табл. 9.3). Levitt M., Lifson S. личное сообщение.

ставляет 2,76 Å, а расстояние между атомами О и Н — 1,77 Å.

Согласно многочисленным оценкам, энергия водородных связей лежит в диапазоне 12—38 кДж·моль⁻¹ (3—9 ккал·моль⁻¹) [4, 6]. Так, для связи NH...О между двумя амидными группами эта энергия, рассчитанная по данным табл. 9.4, составляет 21 кДж·моль⁻¹ (5 ккал·моль⁻¹) [3]. Связи, характеризующиеся такой энергией, имеют особое значение, поскольку они достаточно стабильны, чтобы обеспечить связывание, и в то же время прочность их невелика, что обуславливает быструю диссоциацию. Если энергия активации, необходимая для разрыва связи, целиком определяется прочностью этой связи, то ее можно рассчитать, воспользовавшись теорией переходного состояния, согласно которой связи с энергией 12,5, 25,0 и 37,5 кДж·моль⁻¹ (3, 6 и 9 ккал·моль⁻¹) разрываются с константами скорости $4 \cdot 10^{10}$, $3 \cdot 10^8$ и $2 \cdot 10^6$ с⁻¹ соответственно.

NH-группы полипептидного остова фермента не только участвуют в связывании субстрата, но и играют роль сольватной оболочки для отрицательных зарядов, образующихся в переходном состоянии. В частности, в гл. 1 указывалось, что в сериновых протеазах имеется центр связывания карбонильного кислорода субстратов, состоящий из двух NH-групп полипептидного остова. В переходном состоянии кислород приобретает отрицательный заряд и стабилизируется дипольными моментами амидных групп.

4. Гидрофобная связь [7, 8]

Понятие «гидрофобные силы» используется при описании тенденции неполярных соединений, например углеводов, переходить из водной фазы в органический растворитель. Этот эффект обусловлен не столько прямым взаимодействием между растворителем и растворенными молекулами, сколько перестройкой системы водородных связей в воде в результате присутствия гидрофобного соединения. Чтобы сохранить число водородных связей, каждая из которых имеет энергию ~ 25 кДж·моль⁻¹ (6 ккал·моль⁻¹), молекулы воды располагаются вокруг неполярной молекулы. Поэтому гидрофобное соединение не вызывает больших изменений энтальпии растворителя, но приводит к уменьшению его энтропии из-за увеличения локальной упорядоченности. Вода стремится вновь увеличить свою энтропию, вследствие чего гидрофобная молекула вытесняется в гидрофобную область белка.

Удобный способ оценки гидрофобности соединения состоит в измерении распределения его между органической и водной фазами при встряхивании в смеси нерастворимого в воде органического растворителя (как правило, *n*-октанола) с водой.

Распределение растворенного вещества между двумя фазами зависит от исхода конкуренции между гидрофобными участками молекулы, стремящимися слиться с органической фазой, и полярными участками, которые стремятся перейти в водную фазу с образованием сольватной оболочки.

а. Гидрофобность малых групп: уравнение Ганча [9, 10]

Исследуя распределение замещенных соединений между н-октанолом и водой, Ганч с сотрудниками установил, что многие заместители вносят постоянный и аддитивный вклад в гидрофобность растворенного соединения. Если отношение растворимости исходного соединения в органической фазе к растворимости его в водной фазе обозначить через P_0 , а аналогичное отно-

Таблица 9.5

Значения π для некоторых групп^{а),б)}

Группа	π	Энергия Гиббса для переноса данной группы из н-октанолола в воду	
		кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹
CH ₃ —	0,5	2,85	0,68
CH ₃ CH ₂ —	1,0	5,71	1,36
CH ₃ (CH ₂) ₂ —	1,5	8,56	2,05
CH ₃ (CH ₂) ₃ —	2,0	11,41	2,73
CH ₃ (CH ₂) ₄ —	2,5	14,26	3,41
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ —	1,3	7,42	1,77
$\begin{array}{l} \text{CH}_3\text{CH}_2 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ —	1,8	2,45	10,27
PhCH ₂ —	2,63	15,00	3,59
—OH ^{в)}	-1,16	-6,62	-1,58
—NHCOCH ₃ ^{в)}	-1,21	-6,90	-1,65
—OCOCH ₃ ^{в)}	-0,27	-1,54	-0,37

а) Относительно атома водорода.

б) Hansch C., Coats E., J. Pharm. Sci., 59, 731 (1970).

в) Связаны с алифатическими соединениями.

шение для замещенного соединения — через P , то константа гидрофобности π будет равна

$$\pi = \lg(P/P_0). \quad (9.2)$$

В табл. 9.5 приведены значения π для некоторых групп. Отметим несколько важных моментов.

1. Значения π для групп, не являющихся сильными донорами или акцепторами электронов, фактически постоянны и не зависят от характера группы, к которой они присоединены. Более того, имеет место аддитивность: так, для метиленовой группы значение π равно 0,5 и присоединение каждой последующей группы увеличивает значение этой величины на 0,5. Изменение логарифма на 0,5 единицы соответствует изменению свободной энергии Гиббса на 2,84 кДж·моль⁻¹ (0,68 ккал·моль⁻¹). (В данном контексте замещение водорода на метильную группу равносильно добавлению метиленовой группы, поскольку этот процесс можно рассматривать как встраивание метиленовой группы между атомом водорода и остальной частью молекулы.)

2. Поведение групп, которые могут присоединяться к бензольному кольцу (например, нитро- и аминогрупп), зависит от других связанных с кольцом групп.

6. Гидрофобность изменяется с изменением площади поверхности [11—14]

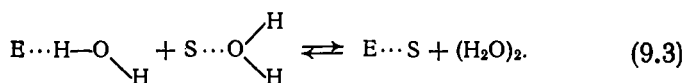
Существует эмпирическая зависимость между площадью поверхности гидрофобной боковой цепи аминокислоты и энергией Гиббса для переноса этой цепи из водной фазы в органический растворитель. 1 Å² поверхности соответствует гидрофобной энергии 80—100 Дж·моль⁻¹ (20—25 кал·моль⁻¹). (Площадь поверхности группы определяется исходя из суммы ван-дерваальсовых радиусов воды и внешних атомов этой группы.)

Корреляцию между площадью поверхности и гидрофобностью можно объяснить, исходя из простой модели, в которой рассматривается энергия образования в воде полости. Поверхностное натяжение воды равно 72 дин·см⁻², поэтому для образования полости с площадью поверхности 1 Å² необходимо затратить энергию 72·10⁻⁶ эрг, или 7,2·10⁻²² Дж (1,72·10⁻²² кал). Умножение этой величины на число Авогадро дает 435 Дж·Å⁻²·моль⁻¹ (104 кал·Å⁻²·моль⁻¹). Итак, образование в воде полости, которую могла бы занять гидрофобная группа, обходится в 435 Дж·Å⁻²·моль⁻¹. Эта величина может быть несколько больше из-за увеличения дисперсионной энергии взаимодействия воды с растворенным веществом при заполнении полости и изменяется с изменением площади поверхности.

Энергия образования полости в воде близка к общему изменению энергии при образовании гидрофобной связи и является движущей силой при распределении соединения между двумя фазами.

Б. Энергия связывания субстратов с ферментами

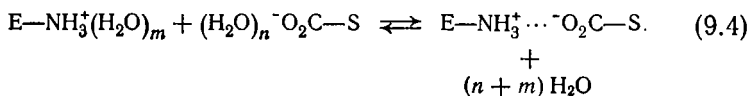
Исходя из простых физических оценок, приведенных в последнем разделе, оценить вклад энергии водородных, электростатических и гидрофобных связей и полную энергию связывания субстрата с ферментом очень трудно. Основная причина этих затруднений состоит в том, что процесс связывания представляет собой реакцию *обмена*: субстрат «обменивает» свою сольватную водную оболочку на связывающий центр фермента. Суммарная энергия связывания представляет собой *разность* между энергиями связывания этого субстрата с водой и с ферментом. Расчет суммарной энергии образования водородных связей затрудняется тем, что обычно в водном растворе субстрат, так же как и фермент, образует с молекулами воды водородные связи. Образование водородных связей в фермент-субстратном комплексе сопровождается вытеснением связанных водородными связями молекул воды. Следовательно, при этом суммарное число водородных связей не увеличивается.



Но при образовании внутримолекулярных связей в фермент-субстратном комплексе происходит увеличение энтропии. Энергия отдельной водородной связи складывается из двух составляющих: энергетической, способствующей связыванию, и энтропийной, препятствующей этому процессу, поскольку из двух молекул образуется одна (гл. 2, разд. Б.4, а также данная глава, разд. В). Однако если субстрат так или иначе фиксирован в фермент-субстратном комплексе, то в дальнейшем при образовании внутримолекулярных водородных связей никакой потери энтропии не происходит. Другими словами, потеря энтропии должна «оплачиваться» только один раз. Образование внутримолекулярных водородных связей является благоприятным из-за увеличения энтропии при высвобождении связанных молекул воды. Грубая оценка показывает, что на каждый моль высвобождающейся воды энтропия возрастает приблизительно на $40 \text{ Дж} \cdot \text{град}^{-1}$ ($10 \text{ кал} \cdot \text{град}^{-1}$).

Определение энергии ионных связей затруднено вследствие сольватации в растворе ионов, участвующих в образовании этих

связей. Энергии сольватации очень высоки; так, по оценкам энергия стабилизации иона $-\text{CO}_2^-$ составляет ~ 270 кДж·моль $^{-1}$ (65 ккал·моль $^{-1}$) [2]. Энергия ионной связи сильно зависит также от диэлектрической проницаемости среды. Помимо всего прочего, образование ионной связи в глубине структуры является энтропийно выгодным, поскольку при этом высвобождается сольватированная вода [уравнение (9.4)]:



Определение энергии гидрофобных связей, образующихся при присоединении лиганда к белку, затрудняется тем обстоятельством, что оценки, полученные из опытов по распределению вещества между органическими растворителями и водой, в этом случае являются не вполне применимыми. Перенос растворенного вещества из водной фазы в органический растворитель мысленно можно разделить на следующие стадии: а) образование полости в растворителе; б) перенос растворенного вещества в эту полость; в) ликвидация полости в водной фазе. Перенос гидрофобного субстрата в гидрофобную область фермента сопровождается заполнением *уже существующей* полости и, возможно, переносом воды из этой полости в водную фазу.

Вклад различных факторов в энергию связывания фермента с субстратом можно оценить из исследований самих ферментативных реакций, а не только модельных систем.

1. Оценка увеличения энергии связывания из кинетических данных

Один из способов оценки вклада заместителя R в субстрате R—S в связывание состоит в сравнении констант диссоциации комплексов R—S и H—S с ферментом. Однако, как будет показано в следующей главе, энергия связывания больших по размеру субстратов при этом часто недооценивается, поскольку обычно энергия связывания идет на уменьшение энергии активации, а не на увеличение K_M . Гораздо лучше сравнивать значения параметров k_{cat}/K_M для двух субстратов. При этом учитывается как энергия активации, так и энергия связывания и устраняются недостатки, которые свойственны методу, основанному на сравнении только констант диссоциации. Из уравнений (10.2) и (10.10) следует, что

$$\ln(k_{\text{cat}}/K_M) = \ln(kT/h) - (\Delta G_0^\ddagger + \Delta G_b), \quad (9.5)$$

где kT/h — константа при данной температуре, ΔG_0^\ddagger — внутренняя энергия активации, обусловленная электронными эффектами, которые связаны с образованием и разрывом связи, ΔG_b — внутренняя энергия связывания субстрата с ферментом. В случае сходных субстратов различием в ΔG_0^\ddagger можно иногда пренебречь или внести соответствующую поправку, сравнив реакционные способности этих субстратов в неферментативных реакциях.

2. Оценка энергий связывания малых групп в случае аминоксил-тРНК—синтетазы

Функция аминоксил-тРНК—синтетаза состоит в выборе определенной аминокислоты среди других аминокислот и меньших по размеру конкурирующих соединений (гл. 11). В основе отбора нужной аминокислоты лежит, вероятно, то обстоятельство, что ее энергия связывания выше, чем энергия связывания всех других присутствующих соединений. Эти различия в энергии связывания специфического субстрата и меньшего по размеру конкурирующего соединения можно определить из сравнения k_{cat}/K_M для реакции обмена Пирофосфат \rightleftharpoons АТФ (гл. 7).

а. Алкильные группы

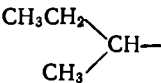
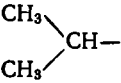
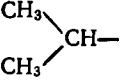
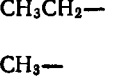

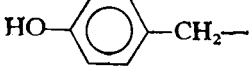
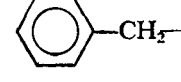
Из данных табл. 9.6, сравнив энергию связывания изолейцина и валина с изолейцил-тРНК—синтетазой и валина и α -аминомасляной кислоты с валил-тРНК—синтетазой, можно видеть, что дополнительная метиленовая группа в большем по размеру субстрате вносит в энергию связывания вклад порядка 12—16 кДж·моль⁻¹ (3—3,8 ккал·моль⁻¹). Это значительно больше величины 2,85 кДж·моль⁻¹ (0,68 ккал·моль⁻¹) для переноса метиленовой группы из воды в *n*-октанол. Сравнение соответствующих величин для валина и аланина показывает, что разность в энергиях связывания изопропильной и метильной групп составляет 22,6 кДж·моль⁻¹ (5,41 ккал·моль⁻¹), а разность энергий переноса этих групп из воды в *n*-октанол составляет 4,6 кДж·моль⁻¹ (1,1 ккал·моль⁻¹). Таким образом, энергия гидрофобного связывания с ферментом в пять раз превышает энергию переноса из одной фазы в другую.

б. Образование водородных связей

Тирозил-тРНК—синтетаза связывает тирозин по крайней мере в 28 000 раз прочнее, чем фенилаланин. Возможно, в этом белке имеются центры связывания, которые присоединяют или фенольный гидроксил тирозина, или молекулу воды в отсутствие

Таблица 9.6

Определение энергии связывания различных групп с использованием аминоксил-тРНК-синтетаз^{а)}

Аминокислота ($R-CH(NH_3^+)CO_2^-$) R—	Аминоацил- тРНК-синтетаза	k_{cat}^b	K_M , мМ	k_{cat}/K_M^b	$\Delta\Delta G^\ddagger$	
					кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹
	Изолейцил- тРНК-син- тетаза	1 1	0,005 0,005	1 1		
	Изолейцил- тРНК-син- тетаза	0,77 0,56	0,8 0,39	0,005 0,0072	13,1 12,2	3,14 2,92
	Валил-тРНК- синтетаза	1	0,14	1		
	Валил-тРНК- синтетаза	0,36	30	0,0017	15,8	3,78
	Валил-тРНК- синтетаза	0,03	39	$1,1 \cdot 10^{-4}$	22,6	5,41
	Тирозил- тРНК-син- тетаза	1	0,0018	1		
	Тирозил- тРНК-син- тетаза	1	50	$3,6 \cdot 10^{-6}$	25,3	6,06

^{а)} Bergmann F. H., Berg P., Dieckmann M., J. biol. Chem., 236, 1735 (1961); Lofffield R. B., Eigner E. A., Biochim. biophys. Acta, 130, 426 (1966); Owens S. L., Bell F. E., J. biol. Chem., 248, 5515 (1970); Fersht A. R., Mulvey R. S., Koch G. L., Biochemistry, 14, 13 (1975).

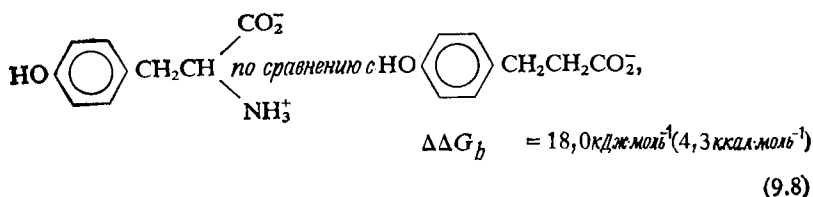
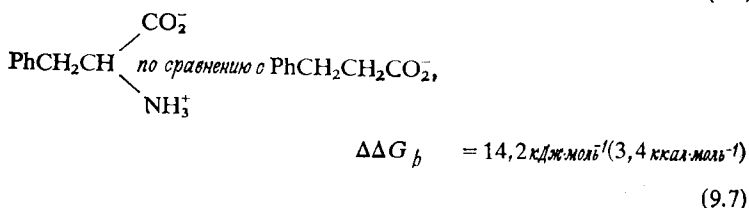
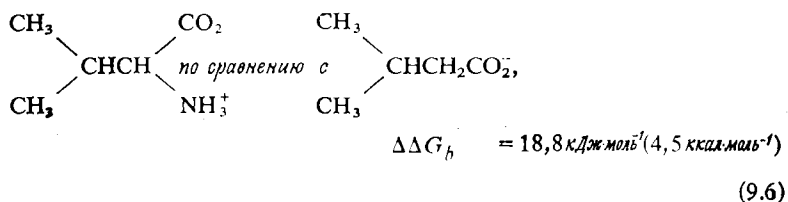
^{б)} Относительно k_{cat} и k_{cat}/K_M для реакции обмена Пирофосфат \rightleftharpoons АТФ с участием специфического субстрата.

субстрата. Связывание фенилаланина должно сопровождаться либо вытеснением связанной воды, при котором два центра образования водородных связей остаются свободными, либо деформацией связывающего кармана. Разность в энергии связывания, равная 25,5 кДж·моль⁻¹ (6,1 ккал·моль⁻¹), отражает как преимущества, которые дает образование водородных связей между ферментом и тирозином, так и невыгодность связывания фенилаланина.

в. Ионные связи

Сравнение констант связывания различных дезаминированных аминокислот и соответствующих аминокислот с аминоксил-тРНК—синтетазой позволяет получить нижний предел для значения энергии связывания иона аммония [15—17].

Из схем (9.6), (9.7), (9.8) видно, что вклад $-\text{NH}_3^+$ -группы в энергию связывания составляет около 17 кДж·моль⁻¹ (4 ккал·моль⁻¹). Возможно, это обусловлено образованием ионной связи с карбоксилат-ионом фермента.



3. Оценка полной энергии связывания на примере химотрипсина

Аминоацил-тРНК — синтетазы обладают исключительно высокой специфичностью. Энергии связывания, полученные для этих ферментов, имеют, вероятно, максимальные из всех принципиально возможных значений. Несколько более низкие значения получаются в случае химотрипсина — фермента, обладающего широкой специфичностью.

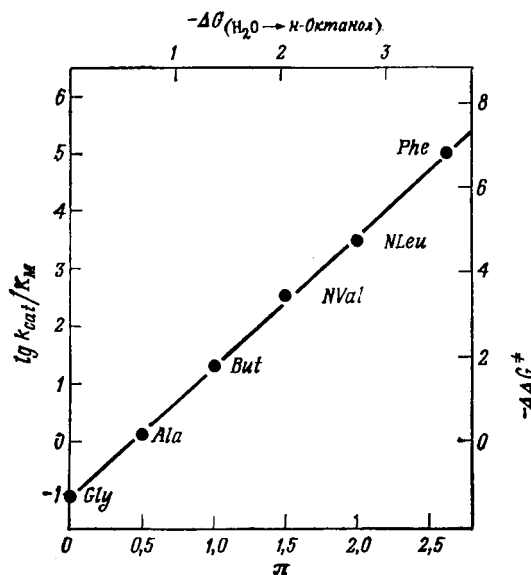


Рис. 9.2. Соотношение между гидрофобностью боковой цепи аминокислоты и параметром k_{cat}/K_M для катализируемого химотрипсином гидролиза метиловых эфиров N-ацетил-L-аминокислот [16]. Энергия выражена в ккал·моль⁻¹.

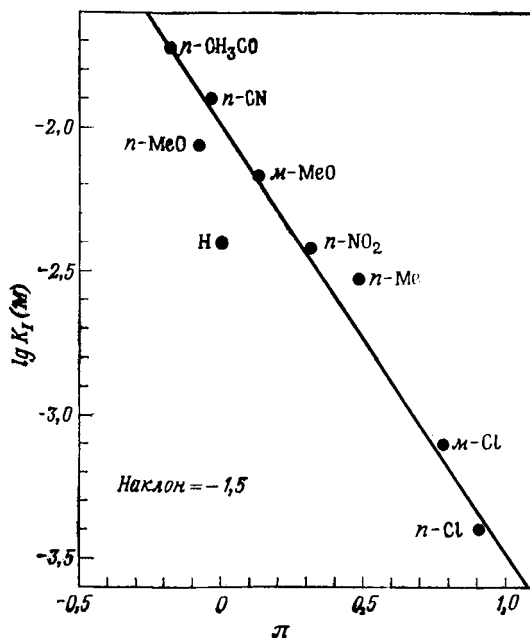


Рис. 9.3. Корреляция между константами диссоциации для замещенных форманидов и значениями π для распределения между n-октанола и водой.

а. Алкильные группы

Параметр k_{cat}/K_M для катализируемого химотрипсином гидролиза серии эфиров с общей формулой $R-\text{CH}(\text{NHAc})\text{CO}_2\text{Me}$ (где R — неразветвленная алкильная цепь) возрастает при увеличении гидрофобности этой цепи [18]. Уменьшение энергии активации в 2,2 раза превышает свободную энергию переноса алкильных групп из воды в n -октанол (рис. 9.2) [19]. По-видимому, связывающий карман в 2,2 раза более гидрофобен, чем n -октанол.

Константы ингибирования для ряда замещенных форманилидов возрастают при увеличении гидрофобности. График зависимости логарифмов констант ингибирования от π представляет собой прямую с наклоном $-1,5$ [20]. Это еще раз показывает, что активный центр химотрипсина более гидрофобен, чем n -октанол (рис. 9.3).

б. Ионная связь

Каталитически активная форма химотрипсина стабилизирована ионной связью между $\alpha\text{-NH}_3^+$ -группой Ile-16 и $-\text{CO}_2^-$ -группой Asp-194. Эта форма находится в равновесии с другой формой, в которой $\alpha\text{-NH}_3^+$ -группа является свободной и находится в водном окружении. Измерение констант равновесия между указанными формами при высоком значении рН, когда аминокислота депротонирована, и при низком рН, когда она находится в $-\text{NH}_3^+$ -форме, показало, что энергия стабилизации активной формы ионной связью составляет $12,1 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($2,9 \text{ ккал} \times \text{моль}^{-1}$) [21]. Эта ионная связь находится внутри белковой глобулы, ионные же связи на поверхности гемоглобина имеют более низкую энергию стабилизации [22].

4. Почему ферменты более гидрофобны, чем органические растворители

Одна из причин более высокой гидрофобности химотрипсина по сравнению с n -октанолом указывалась ранее. Связывающий карман в химотрипсине сохраняется и в отсутствие субстрата, в то время как полость образуется в органическом растворителе лишь при перенесении соединения из водной фазы. Более того, в кармане находится примерно 16 молекул воды. Следовательно, образование гидрофобной связи с химотрипсином эквивалентно образованию *двух* «нормальных» гидрофобных связей, поскольку имеются две энергетически невыгодные водно-гидрофобные поверхности раздела: одна для субстрата и одна для связанной с ферментом воды.

Прочному связыванию метиленовых групп изолейцил- и валил-тРНК—синтетазами способствует еще один фактор. В том случае, когда валин занимает центр связывания изолейцил-тРНК—синтетазы, в образующемся комплексе остается незаполненная полость, которая была бы занята добавочной метиленовой группой изолейцина в случае его присоединения к ферменту. Ранее указывалось, что энергия дисперсионного взаимодействия метиленовой группы в кристаллическом углеводороде составляет $8,4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($2 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$). Поскольку плотность упаковки белков такая же, как и плотность упаковки кристаллов [23], наличие полости добавляет к энергии гидрофобной связи метиленовой группы еще $8,4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$.

5. Заключение

Константа диссоциации фермент-субстратного комплекса отражает термодинамическую стабильность субстрата, связанного с ферментом, по отношению к стабильности субстрата в свободном состоянии в растворе. Она зависит от соотношения между прочностью водородных связей в фермент-субстратном комплексе и прочностью водородных связей, образуемых каждым из

Таблица 9.7

Энергии связывания для различных групп субстратов

Группа	Фермент	Вклад в общую энергию связывания	
		кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹
—CH ₂ —	Аминоацил-тРНК— синтетаза ^{а)}	15	3,5
НО— (две водородные связи)	»	25	6
—NH ₃ ⁺ . . . ⁻ O ₂ C—	»	17	4
—CH ₂ —	Химотрипсин	8	2
—CH ₂ —CH ₂ —	»	16	3,8
—(CH ₂) ₃ —	»	23	5,6
—(CH ₂) ₄ —	»	29	6,8
RhCH— ^{б)}	»	34	8,2

а) Приведена максимальная величина.

б) Относительно атома водорода.

компонентов с молекулами воды, от соотношения между стабильностью солевых мостиков в комплексе и прочностью солевой оболочки отдельных ионов, от соотношения между энергией дисперсионного взаимодействия фермента с субстратом и энергией взаимодействия компонентов комплекса с водой, а также от гидрофобного связывания. Эти различия в энергии (табл. 9.7), если их просуммировать по всей молекуле, могут оказаться весьма существенными. Интересно, что образование водородных, ионных и гидрофобных связей сопровождается увеличением энтропии из-за высвобождения связанных с белком молекул воды.

Абсолютная энергия взаимодействия между ферментом и субстратом зависит от дисперсионных сил и абсолютной энергии водородных и ионных связей. Наиболее прочными из этих связей являются водородные и ионные. Поскольку они, кроме того, стабилизируют образование заряда в переходном состоянии, их роль в катализе особенно велика.

В. Энтропия и связывание [24]

В водном растворе спаривание одиночных комплементарных оснований (например, А и У) практически не происходит из-за связывания этих оснований с молекулами воды. Однако триплет оснований прочно связывается с комплементарным антикодоном тРНК. Триплет UUC присоединяется к тРНК^{Phe} с константой связывания $2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [25,26]. Две молекулы тРНК с комплементарными антикодонами связываются еще более прочно: константа связывания между тРНК^{Phe} и тРНК₂^{Glu} равна $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ [27]. Обусловлено это фактором энтропийной природы. При связывании одиночных оснований А и У энергия системы уменьшается за счет комплементарного спаривания и увеличивается за счет разрыва водородных связей между основаниями и молекулами воды. Энтропия системы, с одной стороны, уменьшается, поскольку эти основания теряют часть поступательных и вращательных степеней свободы, а с другой стороны, увеличивается за счет высвобождения связанных молекул воды. При связывании комплементарной пары триплетов высвобождается в три раза больше молекул воды, прежде связанных водородными связями, однако энтропия системы все же уменьшается за счет потери одного набора поступательных и вращательных степеней свободы. Эта ситуация очень напоминает рассмотренный нами ранее случай с внутримолекулярной и аналогичной ей межмолекулярной реакциями (гл. 2, разд. Б.4. г). Из всего сказанного можно сделать вывод, что, хотя отдельные водородные связи в растворе слабы, если их число достаточно велико, связывание может быть очень прочным.

Аналогичным образом связывание димера X—Y ферментом может быть значительно более прочным, чем связывание мономеров X и Y, поскольку димер теряет только один набор поступательной и вращательной степеней свободы.

Это явление давно известно в неорганической химии под названием *хелатного эффекта*. Значение его можно проиллюстрировать на примере, взятом из этой области, когда несколько или все шесть молекул воды, связанные координационными связями с ионом Ni^{2+} , замещаются аммиаком и полиаминами. Из табл. 9.8 видно, что по мере увеличения числа аминогрупп происходит огромное увеличение констант связывания лигандов.

Таблица 9.8

Хелатный эффект при связывании Ni^{2+} с аминами^{а)}

Лиганд	Константы ассоциации, M^{-1}					
	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5	K_6
NH_3	468	132	41	12	4	0,8
$H_2N(CH_2)_2NH_2$	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^4$			
$H_2N(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH_2$	$6 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^8$				
$H_2N(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH_2$	$2 \cdot 10^{14}$					
$(H_2N(CH_2)_2NH(CH_2)_2)_2NH$	$3 \cdot 10^{17}$					

^{а)} The Chemical Society (London) Special Publications 17 and 25 (1964, 1971).

Г. Белок-белковое взаимодействие

Соприкасающиеся поверхности в олигомерных белках (например, в гемоглобине), а также в комплексах белок — белок (например, в комплексе трипсина с трипсиновым ингибитором), хорошо подогнаны и прилегают друг к другу достаточно плотно. Все водородные и ионные связи спарены. Другими словами, поверхности комплементарны друг другу. По-видимому, на этом основано взаимное распознавание белков.

Хотя мнения относительно вклада энергии водородных и ионных связей в суммарную энергию стабилизации белок-белковых комплексов расходятся и высказывалось предположение, что многие константы ассоциации всецело определяются гидрофобным связыванием, нет никакого сомнения, что водородным связям и электростатическим взаимодействиям принадлежит важная роль в специфичности белковых взаимодействий [28—30]. Даже оставив в стороне вопрос о величине положительного вклада водородных и ионных связей в энергию стабилизации

«правильных» комплексов, мы можем твердо сказать, что присутствие *неспаренных* водородных связей и ионов в «неправильных» комплексах значительно уменьшает энергию их диссоциации. Эксперименты с аминоксил-тРНК—синтетазами показали, что утрата образующей водородную связь гидроксильной группы в случае фенилаланина приводит к тому, что прочность его связывания с тирозил-тРНК—синтетазой становится по крайней мере на $25 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) ниже, чем для тирозина. Аналогичным образом разрыв солевого мостика между α -аммонийным ионом субстрата и ферментом уменьшает прочность связывания приблизительно на $17 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($4 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$). Эти результаты можно экстраполировать на случай взаимодействия соприкасающихся поверхностей белков. Например, замещение аргинина в соевом ингибиторе трипсина фенилаланином, который, попадая в специфический карман трипсина, образует ионную связь с погруженным в белковую глобулу аспаратом, уменьшает энергию связывания на $13 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($3,1 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) [31]. Далее установлено, что панкреатический ингибитор трипсина связывается с химотрипсином, однако в этом случае энергия связывания на $25 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) меньше, чем при связывании с трипсином [32, 33]. Это различие отражает главным образом тот факт, что положительно заряженная боковая цепь лизина погружается в гидрофобный карман химотрипсина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ewing G. E., *Acct. Chem. Res.*, **8**, 185 (1975).
2. Warshel A., Levitt M., *J. Molec. Biol.*, **103**, 227 (1976).
3. Levitt M., Lifson S., личное сообщение.
4. Hagler A. T., Lifson S., Huler E., In: *Peptides, polypeptides, and proteins* (eds. Blout E. R., Bovey F. A., Goodman M., Lotan N.), John Wiley & Sons, p. 35 (1974).
5. Hagler A. T., Huler E., Lifson S., *J. Am. chem. Soc.*, **96**, 5319 (1974).
6. Johansson A., Kollman P., Rothenberg S., McKelvey J., *J. Am. chem. Soc.*, **96**, 3794 (1974).
7. Kauzmann W., *Adv. Prot. Chem.*, **14**, 1 (1959).
8. Klapper M. H., *Progr. Bioorg. Chem.*, **2**, 55 (1973).
9. Fujita T., Iwasa J., Hansch C., *J. Am. chem. Soc.*, **86**, 5175 (1964).
10. Leo A., Hansch C., Elkins D., *Chem. Revs.*, **71**, 525 (1971).
11. Hermann R. B., *J. phys. Chem.*, **76**, 2754 (1972).
12. Harris M. J., Higuchi T., Rytting J. H., *J. phys. Chem.*, **77**, 2694 (1973).
13. Reynolds J. A., Gilbert D. B., Tanford C., *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **71**, 2925 (1974).
14. Chothia C., *Nature, Lond.*, **248**, 338 (1974).
15. Owens S. L., Bell F. E., *J. biol. Chem.*, **245**, 5515 (1970).
16. Santi D. V., Pena V. A., *J. med. Chem.*, **16**, 273 (1973).
17. Mulivor R., Rappaport H. P., *J. molec. Biol.*, **76**, 123 (1973).
18. Knowles J. R., *J. theoret. bioy.*, **9**, 213 (1965).
19. Доровская В. Н., Варфоломеев С. Д., Казанская Н. Ф., Клесов А. А., Мартинек К., *FEBS Letts.*, **23**, 122 (1972).

20. *Fastrez J., Fersht A. R.*, *Biochemistry*, **12**, 1067 (1973).
21. *Fersht A. R.*, *J. molec. Biol.*, **64**, 497 (1972).
22. *Perutz M. F.*, *Nature, Lond.*, **228**, 726 (1970).
23. *Page M. I.*, *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **72**, 456 (1976).
24. *Jencks W. P.*, *Adv. Enzymol.*, **43**, 219 (1975).
25. *Eisinger J., Feuer B., Yamane T.*, *Nature New Biology, Lond.*, **231**, 126 (1971).
26. *Pongs O., Bald R., Reinwald E.*, *Eur. J. Biochem.*, **32**, 117 (1973).
27. *Eisinger J., Gross N.*, *Biochemistry*, **14**, 4031 (1975).
28. *Jencks W. P.*, *Catalysis in chemistry and enzymology*, McGraw-Hill Book Co., pp. 351, 399 (1969).
29. *Chothia C., Janin J.*, *Nature, Lond.*, **256**, 705 (1975).
30. *Janin J., Chothia C.*, *J. molec. Biol.*, **100**, 197 (1976).
31. *Laskowski M., Jr.*, личное сообщение.
32. *Quast U., Engel J., Heumann H., Krause G., Steffen E.*, *Biochemistry*, **13**, 2512 (1974).
33. *Vincent J.-P., Peron-Renner M., Pudles J., Lazdunski M.*, *Biochemistry*, **13**, 4205 (1974).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Jencks W. P.*, *Catalysis in chemistry and enzymology*, McGraw-Hill Book Co. (1969), Chapters 6—9.
- Jencks W. P.*, Binding energy, specificity, and enzymic catalysis—the Circe effect, *Adv. Enzymol.*, **43**, 219—410 (1975).

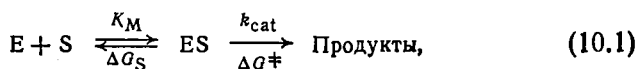
КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ МЕЖДУ ФЕРМЕНТОМ И СУБСТРАТОМ И ТЕОРИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

А. Использование энергии связывания фермента с субстратом в катализе

Как было показано в гл. 2, высокая каталитическая активность многих ферментов обуславливается в значительной мере факторами энтропийной природы, участием в катализе кислых и основных групп фермента и электростатическими эффектами. Важнейшей особенностью ферментов является также их специфичность в отношении субстратов и высокая энергия связывания. В 1930 г. Холдейн высказал предположение, что эта энергия используется для деформации субстрата до структуры продуктов [1], и теоретиками были рассмотрены различные способы использования энергии связывания для понижения энергии активации стадии химического превращения субстрата.

Особенно полезна при анализе возможных механизмов ферментативного катализа теория переходного состояния. Мы применим этот подход к простому механизму Михаэлиса — Ментен (для которого $K_M = K_S$; см. гл. 3), с тем чтобы увидеть, как энергия связывания автоматически уменьшает энергию активации перехода, определяемого кажущейся константой скорости второго порядка k_{cat}/K_M , и как часть этой энергии используется для уменьшения энергии активации стадии химического превращения субстрата с константой скорости k_{cat} [2].

1. Энергия связывания понижает энергию активации перехода с константой скорости k_{cat}/K_M



Напомним (гл. 3), что константа скорости для взаимодействия свободного фермента со свободным субстратом с образо-

ванием продуктов равна k_{cat}/K_M . В терминах теории переходного состояния (гл. 2) константа равновесия для реакции (10.2) пропорциональна энергии активации ΔG_{\ddagger} . Эта энергия состоит из двух составляющих: одна из них, ΔG^{\ddagger} , положительна и отвечает энергии активации химических стадий, в ходе которых

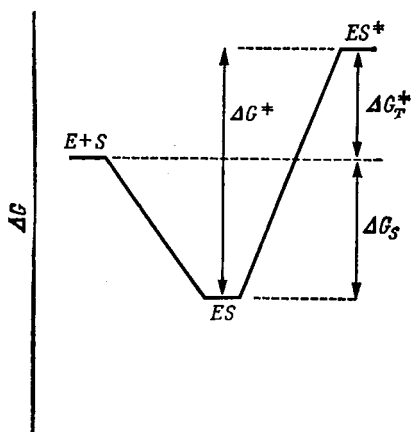
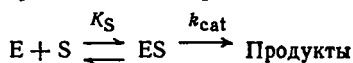


Рис. 10.1. Изменение энергии Гиббса для реакции



(ΔG_S — отрицательная величина, ΔG^{\ddagger} и $\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger}$ положительны).

происходит образование и разрыв связей, а другая, ΔG_S , отрицательна и отражает использование энергии связывания:

$$\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} = \Delta G^{\ddagger} + \Delta G_S. \quad (10.3)$$

Все сказанное выше иллюстрирует рис. 10.1, относящийся к случаю простого механизма Михаэлиса — Ментен.

Подставив выражение (10.3) в уравнение (2.5), получаем

$$RT \ln(k_{\text{cat}}/K_M) = RT \ln(kT/h) - \Delta G^{\ddagger} - \Delta G_S. \quad (10.4)$$

2. Взаимопревращаемость энергии связывания и энергии активации стадии химического превращения субстрата

Когда каждая связывающая группа субстрата соединяется с соответствующим центром связывания фермента, энергия связывания принимает максимальное значение. В этом случае говорят, что фермент и субстрат структурно комплементарны. По-

сколько структура субстрата изменяется в ходе реакции — сначала образуется переходное состояние, а затем продукты — структура *недеформированного* фермента может быть комплементарна только одной форме субстрата. Можно показать, что для фермента каталитически выгодно быть комплементарным переходному состоянию субстрата¹, а не исходному субстрату. В этом случае увеличение энергии связывания по мере приближения структуры субстрата к структуре переходного состояния уменьшает энергию активации стадии химического превращения. И наоборот, если фермент комплементарен исходному субстрату, уменьшение энергии связывания при образовании переходного состояния будет увеличивать энергию активации химической стадии.

В следующем разделе мы обсудим вопрос о комплементарности фермента переходному состоянию субстрата, используя подразделение энергий активации на две составляющие, одна из которых отвечает стадии химического превращения, а другая равна изменению энергии связывания в ходе реакции.

3. Комплементарность фермента переходному состоянию субстрата означает, что k_{cat}/K_M имеет максимальное значение

Идея комплементарности при фермент-субстратном взаимодействии принадлежит Фишеру, воплотившему ее в своей знаменитой модели «замка и ключа» [3]. В современной терминологии это означает комплементарность между ферментом и субстратом. В настоящее время отдают предпочтение концепции комплементарности фермента переходному состоянию, введенной Холдейном [1] и развитой Полингом [4].

а. Комплементарность фермента исходному субстрату

Допустим, что максимальная внутренняя свободная энергия связывания равна ΔG_b . В рассматриваемом случае она реализуется в исходном фермент-субстратном комплексе, обеспечивая прочное связывание; K_M — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса — будет мала. Образование переходного состояния, сопровождающееся изменением геометрии субстрата и ухудшением соответствия, приведет к уменьшению энергии связывания и, следовательно, к уменьшению k_{cat} . Если увели-

¹ Речь идет о дополнительных нековалентных взаимодействиях между реагентами в переходном состоянии реакции (см., например, И. В. Березин, К. Мартинек «Основы физической химии ферментативного катализа», М., Высшая школа, 1977, стр. 42—47, 72). — *Прим. ред.*

чение свободной энергии, вызванное ухудшением структурного соответствия между ферментом и субстратом, обозначить через ΔG_R , а свободную энергию активации для образования и разрыва химических связей на стадии, определяемой константой k_{cat} , через ΔG_0^\ddagger , то наблюдаемая свободная энергия активации

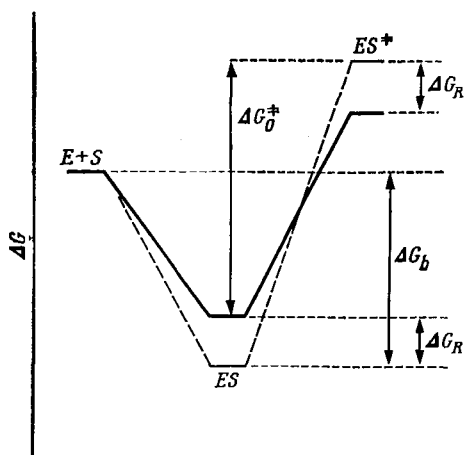


Рис. 10.2. Изменение энергии Гиббса для реакции, схематически изображенной в подписи к рис. 10.1. Пунктирная линия — фермент структурно комплементарен субстрату, сплошная — переходному состоянию. (ΔG_S — отрицательная величина, ΔG_0 и ΔG_R положительны.)

для стадии химического превращения субстрата с константой скорости k_{cat} будет равна

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger + \Delta G_R \quad (10.5)$$

и

$$\Delta G_S = \Delta G_b. \quad (10.6)$$

Энергия активации Гиббса для процесса (10.2) есть $\Delta G^\ddagger + \Delta G_S$, т. е.

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger + \Delta G_R + \Delta G_b. \quad (10.7)$$

б. Комплементарность фермента переходному состоянию субстрата

В этом случае полная энергия связывания ΔG_b реализуется в переходном состоянии. Исходному фермент-субстратному комплексу соответствует положительный член ΔG_R , который увеличивает K_m , а прирост энергии связывания по мере приближе-

ния к переходному состоянию увеличивает k_{cat} . Таким образом,

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger - \Delta G_R \quad (10.8)$$

и

$$\Delta G_S = \Delta G_b + \Delta G_R. \quad (10.9)$$

И опять энергия активации Гиббса для перехода, характеризующегося константой k_{cat}/K_M , определяется выражением

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G^\ddagger + \Delta G_S,$$

т. е.

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger + \Delta G_b, \quad (10.10)$$

и ΔG_R из выражения исключается.

Сравнение уравнений (10.7) и (10.10) показывает, что, когда фермент комплементарен переходному состоянию субстрата, а не самому субстрату, k_{cat}/K_M возрастает в $\exp(\Delta G_R/RT)$ раз.

Следует отметить, что k_{cat}/K_M не зависит от взаимодействий в исходном фермент-субстратном комплексе, поскольку член ΔG_R не входит в соответствующие уравнения.

4. Экспериментальные данные об использовании энергии связывания в катализе и комплементарности фермента переходному состоянию субстрата

а. Энергия связывания

Наиболее четкие данные об использовании энергии связывания в катализе получены при кинетических исследованиях сериновых протеаз. Напомним (гл. 1), что эти ферменты имеют ряд «подцентров» для связывания аминокислотных остатков полипептидных субстратов. Из табл. 10.1 видно, что, когда большие по размеру группы занимают в химоотрипсине центр связывания входящей группы, их энергия связывания используется для увеличения k_{cat}/K_M . К увеличению k_{cat}/K_M приводит и удлинение полипептидной цепи субстратов эластазы. Интересно отметить, что в приведенных примерах энергия связывания добавочных групп не понижает K_M , т. е. используется не для связывания субстрата, а для увеличения k_{cat} .

Аналогичная ситуация наблюдается и для пепсина. Из табл. 10.1 видно, что K_M для гидролиза широкого круга субстратов равна $\sim 0,1$ мМ. И опять добавочная энергия связывания групп больших по размеру субстратов используется для увеличения k_{cat} , а не для уменьшения K_M . Таким образом, чем больше по размерам субстрат, тем выше значение k_{cat}/K_M .

Очень интересные данные получены при исследовании катализируемого химоотрипсином гидролиза синтетических эфиров

Таблица 10.1

Взаимопревращение энергии активации и связывания

Фермент и субстрат	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{cat}}/K_M, \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$
а. Химотрипсин^{а)}			
AcTyr-NH ₂	0,17	32	5
AcTyr-GlyNH ₂	0,64	23	28
AcTyr-AlaNH ₂	7,5	17	440
AcProTyr-GlyNH ₂	4,4	32	140
AcPhe-NH ₂	0,06	31	2
AcPhe-GlyNH ₂	0,14	15	10
AcPhe-AlaNH ₂	2,8	25	114
AcProPhe-GlyNH ₂	0,76	15	51
б. Эластаза^{б)}			
AcAlaProAla-NH ₂	0,09	4,2	21
AcProAlaProAla-NH ₂	8,5	3,9	2200
AcGlyProAla-NH ₂	0,02	33	0,5
AcProGlyProAla-NH ₂	2,8	43	64
в. Пенсин^{в)} (расщепление связи Phe—Phe в AcPhePheOP4P)			
PheGly	0,5	0,3	$1,7 \cdot 10^3$
ZPheGly	25	0,11	$2,2 \cdot 10^6$
ZAlaGly	145	0,25	$5,8 \cdot 10^5$
ZAlaAla	282	0,04	$7 \cdot 10^6$
ZGlyAla	409	0,11	$3,7 \cdot 10^6$
ZGlyIle	13	0,07	$1,8 \cdot 10^5$
ZGlyLeu	134	0,03	$4,2 \cdot 10^6$
PheGlyGly	6	0,6	$1 \cdot 10^4$
ZPheGlyGly	127	0,13	$9,8 \cdot 10^5$
Mns ^{г)}	0,002	0,1	20
MnsGly ^{г)}	0,13	0,03	$3,7 \cdot 10^3$
MnsGlyGly ^{г)}	16	0,07	$2,3 \cdot 10^5$
MnsAlaAla ^{г)}	112	0,06	$2 \cdot 10^6$

^{а)} Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dutler H., FEBS letts., 8, 257 (1970); Eur. J. Biochem., 39, 381 (1973); 25 °C, pH 7,9.

^{б)} Thompson R. C., Blout E. R., Biochemistry, 12, 51 (1973); 37 °C, pH 9.

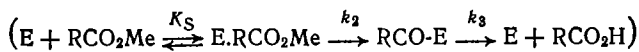
^{в)} Sachdev G. P., Fruton J. S., Biochemistry, 9, 4465 (1970). (OP4P=3-(4-пиридил)пропил-1-окса); 37 °C, pH 3,5.

^{г)} Sachdev G. P., Fruton J. S., Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., 72, 3424 (1975). (Mns=мансил); 25 °C, pH 2,4.

(табл. 10.2). Увеличение размера гидрофобной боковой цепи, связывающейся с гидрофобным центром фермента, приводит к возрастанию k_{cat}/K_M вплоть до $\sim 10^6$. Увеличение энергии связывания в случае больших по размеру субстратов расходуется на уменьшение константы диссоциации фермент-субстратного

Таблица 10.2

Кинетические параметры гидролиза химотрипсинном метиловых эфиров *N*-ацетиламино кислот^{а)}



Аминокислота	k_2, c^{-1}	k_3, c^{-1}	K_S, mM	$k_{cat}/K_M, M^{-1} c^{-1}$
Gly	0,49	0,14	3380	0,13
But	8,8	1,7	417	21
NVal	35,6	5,93	100	360
NLeu	103	19	34	$3 \cdot 10^3$
Phe	796	111	7,6	$1 \cdot 10^5$
Tyr ^{б)}	5000	200	17	$3 \cdot 10^5$

а) α -Химотрипсин, 25 °С, рН 7,8 (данные табл. 7.3).

б) Этиловый эфир.

комплекса и увеличение констант скорости ацилирования и деацилирования.

В разд. Б данной главы будет показано, каким образом расходование энергии связывания на увеличение k_{cat} , а не на уменьшение K_M приводит к повышению скорости реакции.

б. Комплементарность фермента переходному состоянию субстрата

Прямое указание на комплементарность фермента переходному состоянию субстрата было получено при рентгеноструктурном анализе сериновых протеаз и лизоцима (разд. В.4 данной главы и гл. 1), а также при исследовании связывания аналогов переходного состояния. Этот подход был предложен Полингом в 40-х годах, но оценен по достоинству лишь недавно [4].

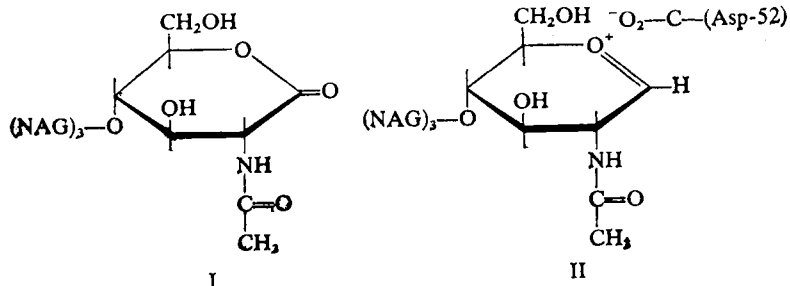
5. Аналоги переходного состояния субстрата: зонды для исследования комплементарности [5, 6]

Зная механизм органической реакции, можно получить представление о структуре переходного состояния ферментативной реакции, синтезировать соединения, близкие к переходному состоянию субстрата, и сравнить присоединение к ферменту этих соединений с присоединением исходного субстрата.

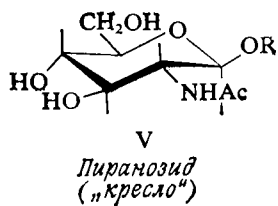
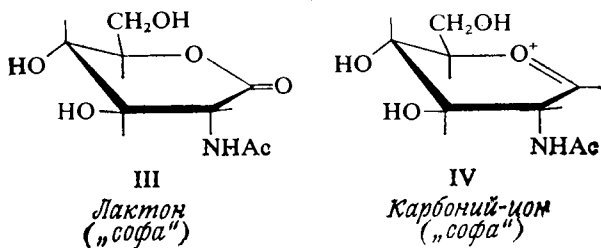
а. Лизоцим и глюкозидаза

Лизоцим катализирует гидролиз полисахаридного компонента клеточной стенки растений и синтетических полимеров,

структурные единицы которых, N-ацетилглюкозамин (NAG), соединены друг с другом β (1—4)-связями (см. гл. 1). Исходя из результатов исследования неферментативных реакций, можно ожидать, что в ходе гидролиза образуется карбоний-ион, в котором глюкопиранозное кольцо, имеющее форму кресла, изменяет свою конформацию, принимая форму софы (см. гл. 1). Аналог переходного состояния I, в котором лактоновое кольцо имитирует переходный комплекс, подобный карбоний-иону (II), прочно связывается с лизоцимом с $K_{diss} = 8,3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ [7].



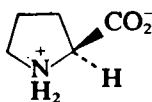
Сравним эту величину с константами диссоциации для NAG_4 и NAG-NAM-NAG-NAG (связывающимися с подцентрами ABCD), которые равны 10^{-5} и $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ соответственно [7, 8]. Стократное увеличение прочности связывания переходного состояния субстрата частично может быть обусловлено электростатическим взаимодействием отрицательно заряженного Asp-52 с положительным зарядом карбонильного атома углерода этого лактона.



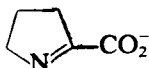
Еще более поразительный эффект наблюдается при связывании лактона (III) с β -N-ацетил-D-глюкозаминидазой. Константа диссоциации комплекса равна $5 \cdot 10^{-7}$ M, что в 4000 раз меньше K_M для пиранозидного субстрата ($2 \cdot 10^{-3}$ M) [9].

б. Пролинрацемаза

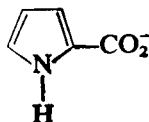
При рацемизации пролина (VI) хиральный атом углерода должен на некоторой стадии стать тригональным. В соответствии с этим соединения VII и VIII связываются в 160 раз прочнее пролина [10, 11].



VI



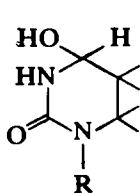
VII



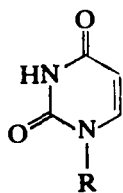
VIII

в. Цитидиндезаминаза

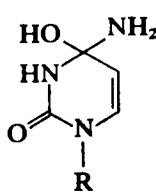
Константа диссоциации тетрагидроуридина (IX) примерно в 10 000 раз меньше констант связывания продуктов реакции — уридина (X) и аммиака. Вероятно, тетрагидроуридин напоминает промежуточное тетраэдрическое соединение XI [12].



IX



X



XI

г. Анализ результатов связывания аналогов переходного состояния субстрата

Аналоги переходного состояния субстрата, которые были синтезированы до настоящего времени, позволили проанализировать ту часть каталитического процесса, которая связана с различием в комплементарности фермента переходному состоянию субстрата и исходному субстрату. В приведенных выше четырех примерах аналоги переходного состояния связываются в 10^2 — 10^4 раз прочнее самих субстратов. Это свидетельствует об эволюции ферментов в сторону структурной комплементарности

переходному состоянию субстрата, а также показывает, что величина k_{cat} может возрасти в 10^2 — 10^4 раз за счет увеличения K_m . Принимая во внимание, что эти синтетические аналоги могли быть весьма далеки по структуре от переходного состояния, которое они моделировали, энергетический выигрыш от увеличения комплементарности между переходным состоянием субстрата и ферментом можно оценить по крайней мере в $20 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($5 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$). В гл. 12 будет показано, что в центре связывания карбонильного кислорода субстрата сериновой протеазы недостает одной водородной связи. Эта связь образуется во время реакции при образовании переходного состояния, и подобное увеличение комплементарности дает выигрыш в энергии 20 — $25 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ (5 — $6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$).

д. Возможные ошибки при интерпретации данных, полученных при использовании аналогов переходного состояния субстрата

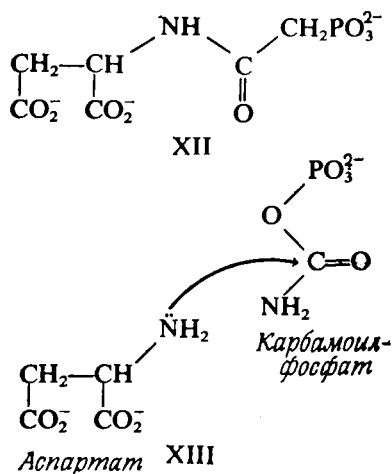
Изучение комплементарности фермента переходному состоянию субстрата с использованием аналогов переходного состояния субстрата может быть осложнено наличием «лишних» связей с группами, введенными в молекулу аналога. В гл. 9 было показано, что связывание небольшой группы дает существенный вклад в энергию связывания, когда в процесс вовлекается специфический для этой группы центр связывания. Например, вклад метиленовой группы в энергию связывания может составлять $12 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($3 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$), а вклад гидроксильной группы за счет образования водородной связи — $25 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$). Даже если специфические центры связывания не затрагиваются, большой энергетический вклад могут дать гидрофобные эффекты: замена в фенильном кольце ацетильной группы на атом Cl приводит к 50-кратному увеличению прочности связывания этого кольца в гидрофобном кармане химотрипсина [13].

Затруднения при интерпретации данных (обусловленные хелатным эффектом) возникают и в тех случаях, когда используются аналоги переходных состояний для мультисубстратных реакций. Как отмечалось в предыдущей главе, полидентатные лиганды (например, ЭДТА) в отличие от монодентатных прочно связывают ионы металлов. Это различие в свойствах обусловлено энтропийным фактором; связывание шести монодентатных лигандов приводит к потере шести наборов поступательных и вращательных степеней свободы. То же самое относится и к связыванию ферментом «мультисубстратных» или «мультипродуктивных» аналогов. Если А и В присоединяются к ферменту независимо и рядом друг с другом и процесс характеризуется энергией связывания Гиббса x и y килоджоулей соответственно,

а комплекс А — В связывается с ферментом аналогичным образом, то свободная энергия связывания будет равна

$$\Delta G_{\text{ass}} = x + y + S, \quad (10.11)$$

где S — отрицательная величина, поскольку связывание А — В сопровождается потерей только одного набора степеней свободы в отличие от связывания А и В, когда теряется два набора. Даже если не принимать во внимание эффекты подобного рода, связывание мультисубстратного аналога должно быть очень прочным за счет комплементарности фермента переходному состоянию субстрата. Например, соединение XII связывается аспарат-карбамоилтрансферазой очень прочно: $K_{\text{diss}} = 2,7 \cdot 10^{-8}$ М. Однако это значение равно просто произведению констант диссоциации комплексов фермента с сукцинатом и карбамоилфосфатом ($9 \cdot 10^{-4} \times 2,7 \cdot 10^{-5} \text{ М}^{-2}$), которые близки по структуре к составным частям соединения XII, имитирующего переходное состояние реакции [14].



Б. Эволюция фермента в сторону увеличения максимальной скорости реакции: сильное связывание переходного состояния субстрата — слабое связывание самого субстрата

В предыдущем разделе было показано, что ферменты эволюционировали в сторону более сильного связывания переходных состояний субстратов, а не самих субстратов. Ниже будет

показано, что *слабое* связывание субстратов является каталитически *выгодным*.

Хотя комплементарность фермента переходному состоянию субстрата максимизирует k_{cat}/K_M , это не означает, что максимальной является и суммарная скорость реакции. Дело в том, что максимальная скорость реакции при данной концентрации субстрата зависит от величин k_{cat} и K_M как таковых, а не от их

Таблица 10.3

Характер изменения параметров K_M и k_{cat} в результате эволюции фермента, протекающей при постоянстве значений k_{cat}/K_M и $[S]$ ^{а)}

$$(k_{\text{cat}}/K_M = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}, [S] = 10^{-3} \text{ M})$$

$K_M, \text{ M}$	$k_{\text{cat}}, \text{ c}^{-1}$	Скорость ^{б)} , c^{-1}
10^{-6}	1	1
10^{-5}	10	9
10^{-4}	10^2	90
10^{-3}	10^3	500
10^{-2}	10^4	909
10^{-1}	10^5	990
1	10^6	999

^{а)} Умозрительные процессы: а) фермент эволюционирует в сторону обеспечения комплементарности переходному состоянию субстрата и максимально высокого значения отношения k_{cat}/K_M ; б) при сохранении максимально высокого значения k_{cat}/K_M фермент эволюционирует в сторону увеличения K_M . Значения величин k_{cat}/K_M и $[S]$ выбраны произвольно.

^{б)} Число молей продукта, образующихся на моль фермента в 1 с.

отношения. В табл. 10.3 приведены значения скорости, рассчитанные для различных значений k_{cat} и K_M при постоянном отношении k_{cat}/K_M . Из этой таблицы видно, что максимальные скорости достигаются при $K_M > [S]$, т. е. при высоких значениях K_M . Таким образом, ферменты должны эволюционировать в сторону слабого связывания субстратов.

1. Принцип максимизации K_M при постоянном k_{cat}/K_M [2]

Этот принцип опровергает широко распространенное мнение, что необходимым условием протекания ферментативной реакции является наличие сильного связывания фермента с субстратом

или низкое значение K_M . Рассмотрим еще два довода в пользу важности для катализа высоких значений K_M . Физические причины этого фактора иллюстрируются графически.

а. Графическая иллюстрация важности для катализа высоких значений K_M

Предположим, что концентрация субстрата больше K_M для данной реакции (рис. 10.3, А). Фермент-субстратный комплекс

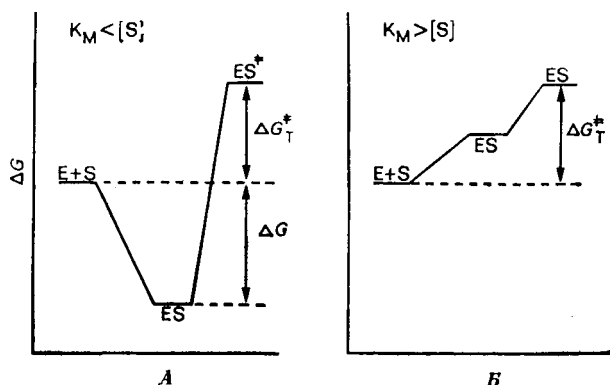


Рис. 10.3. Два случая эволюции фермента. Переходные состояния субстрата связываются с ферментом одинаково хорошо, но в случае А сам субстрат связывается прочно, тогда как в случае В в результате эволюции фермента — слабо (концентрация субстрата в обоих случаях одинакова). А. Энергия активации равна $\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} + \Delta G$; имеет место процесс $ES \rightarrow ES^{\ddagger}$. Б. Энергия активации равна $\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger}$; имеет место процесс $E + S \rightarrow ES^{\ddagger}$. (Изменения энергии Гиббса относятся к реальным концентрациям субстрата, а не к стандартным условиям, когда исходные концентрации равны 1 М.)

находится в более низком энергетическом состоянии, чем свободный фермент и субстрат, а энергия активации равна $\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} + \Delta G$. Если же $K_M > [S]$ (рис. 10.3, В), то энергия комплекса ES будет выше энергии E + S, а энергия активации меньше $\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger}$.

Если K_M низка, это означает, что фермент-субстратный комплекс находится в термодинамической яме и в ходе реакции необходимо преодолеть энергетический барьер. При высокой K_M комплекс поднят на «ступеньку термодинамической лестницы».

б. Алгебраическая иллюстрация

В гл. 3 было показано, что уравнение Михаэлиса — Ментен можно представить в удобной форме, позволяющей связать

скорость реакции с концентрацией свободного фермента [E]:

$$v = [E][S]k_{cat}/K_M \quad (10.12)$$

Исходя из уравнения (10.12), процесс эволюции ферментов, направленный на увеличение скорости катализируемых ими реакций, можно умозрительно разделить на два этапа:

1. Максимизация k_{cat}/K_M за счет повышения комплементарности фермента переходному состоянию субстрата.
2. Максимизация [E] за счет повышения K_M , направленная на то, чтобы в свободном состоянии находилось максимально возможное количество фермента.

Для эволюции ферментов характерно увеличение K_M с последующим увеличением k_{cat} . Скорость изменения этих параметров быстро уменьшается по мере увеличения K_M до значений, больших [S]. При $K_M = [S]$ половина фермента находится в свободном состоянии, поэтому, согласно уравнению (10.11), скорость равна половине максимальной. При $K_M = 5[S]$ в свободном состоянии находится 5/6 молекул фермента, поэтому скорость реакции составляет 83% максимальной. Любое дальнейшее увеличение K_M даст лишь незначительное увеличение скорости.

Насколько сильно возрастет K_M — зависит от структурного различия между субстратом и его переходным состоянием. В пределе любое увеличение K_M должно компенсироваться ослаблением связывания переходного состояния. Наиболее сложен этот процесс в случае крупных метаболитов, присутствующих в высокой концентрации.

в. Исключения из принципа максимизации K_M — контроль активности ферментов, участвующих в регуляции скорости метаболических процессов

Все приведенные выше доводы в пользу увеличения K_M молчаливо подразумевали, что при этом максимизируется скорость реакции. Хотя для большинства ферментов это действительно так, иногда на первый план выступают *регуляторные* функции фермента, а не обеспечение высокой скорости реакции. Все метаболические процессы регулируются. Регуляция обычно осуществляется с помощью контроля активности ряда ключевых ферментов. Активность этих ферментов, как правило, регулируется путем изменения K_M соответствующих субстратов через аллостерическое воздействие на них. Эти K_M для ключевых ферментов относятся к регуляции, и к ним не всегда применимы положения, рассмотренные в предыдущем разделе.

Иногда для первого фермента метаболического пути может оказаться выгодным низкое значение K_M . Это обеспечивает

контроль скорости поступления субстрата в метаболический путь, предотвращает его перегрузку и накопление рационнo-способных промежуточных соединений. Например, в случае гексокиназы, первого фермента гликолиза, K_M для глюкозы равно 0,1 мМ, тогда как концентрация этого соединения в эритроцитах человека составляет ~ 5 мМ. Десятикратное увеличение или уменьшение концентрации глюкозы почти не изменяет скорость гликолиза.

2. Экспериментально определяемые значения K_M

В гл. 9 было показано, что энергия связывания субстрата с ферментом потенциально является очень большой величиной, однако экспериментально определяемые значения K_M обычно сравнительно высоки. Разительным примером в этом отношении является связывание NAD^+ . Этот большой по размерам субстрат содержит два остатка рибозы, остатки аденина и никотинамида и пирофосфат. Если бы реализовалась вся потенциальная энергия связывания указанных групп, то константа диссоциации могла бы быть величиной порядка 10^{-20} М. И действительно, константа диссоциации для связывания первой молекулы NAD^+ тетрамерной глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой оказалась меньше 10^{-11} М, что свидетельствует о чрезвычайно высокой прочности связывания [15]. Однако обычно K_M и константы диссоциации комплексов NAD^+ с дегидрогеназами оказываются равными 0,1—1 мМ. Еще более впечатляющим является тот факт, что константа диссоциации комплекса АТФ и миозина равна 10^{-13} М [16], в то время как обычно K_M для АТФ равна 0,1—10 мМ.

Во многих случаях сопоставить K_M с физиологическими концентрациями субстратов не представляется возможным, поскольку эти концентрации неизвестны. Одним из ферментов, для которых такое сопоставление возможно, является карбоангидраза, так как концентрация в крови двуокиси углерода и бикарбоната измеряется довольно просто. В физиологических условиях этот фермент насыщается каждым из указанных субстратов приблизительно только на 6 % и K_M для двуокиси углерода слишком высока, чтобы ее можно было измерить [17].

а. Концентрации субстратов и значения K_M для гликолиза

Процесс гликолиза изучен достаточно хорошо. Исследованы свойства гликолитических ферментов, определены концентрации метаболитов для клеток трех различных типов (мозга, эритроцитов и мышц). Данные для нерегуляторных гликолитических

Таблица 10.4

Концентрации ряда метаболитов и значения K_M для некоторых гликолитических ферментов ^{а)}

Фермент	Источник	Субстрат	Концентрация субстрата, мкМ	K_M , мкМ	$K_M/ S $
Глюкозофосфат-изомераза	Мозг Мышца ^{б)}	G6P	130	210	1,6
		G6P	450	700	1,6
		F6P	110	120	1,1
Альдолаза	Мозг Мышца ^{в)}	FDP	200	12	0,06
		FDP	32	100	3,1
		G3P	3	1000	333
		DHAP	50	2000	40
Триозофосфатизомераза	Эритроциты ^{г)} Мышца ^{д)}	G3P	18	350	19
		G3P	3	460	153
		DHAP	50	870	17
Глицеральдегид-фосфатдегидрогеназа	Мозг Мышца ^{е)}	G3P	3	44	15
		G3P	3	70	23
		NAD	600	46	0,08
		P _i	2000		> 10 ^{ж)}
Фосфоглицераткиназа	Мозг Эритроциты ^{з)} Мышца ^{и)}	1,3DPG	< 1	9	> 9
		ADP	1500	70	0,05
		3PG	118	1100	9,3
		3PG	60	1200	200
Фосфоглицеромутаза	Мозг Мышца ^{к)}	3PG	40	240	6
		3PG	60	5000	83
		3PG	60	5000	83
Енолаза	Мозг Мышца ^{л)}	2PG	4,5	33	7
		2PG	7	70	10
Пируваткиназа ^{м)}	Эритроциты ^{н)}	PEP	23	200	9
		ADP	138	600	4,4
Лактатдегидрогеназа	Мозг Эритроциты ^{о)}	Pyg	116	140	1,2
		Pyg	51	59	1,2
		Lac	2900	8400	2,9
		NADH	0,01 ^{п)}	10 ^{р)}	100
		NAD	33	150	4,6
Глицерофосфатдегидрогеназа	Мышь Мышца ^{с)}	GlyP	170	37	0,22
		GlyP ^{т)}	220	190	0,9
		DHAP	50	190	3,8

Продолжение

а) Сокращения; G6P — глюкозо-6-фосфат; F6P — фруктозо-6-фосфат; FDP — фруктозо-1,6-дифосфат; G3P — глицеральдегид-3-фосфат; DHAP — диоксациетонфосфат; P₁ — ортофосфат; 1,3DPG — 1,3-дифосфоглицерат; 3PG — 3-фосфоглицерат; 2PG — 2-фосфоглицерат; PEP — фосфоенопируват; Pyr — пируват; Lac — лактат; (все D-сахара); GlpP — L-глицерофосфат. Данные о концентрации ферментов и метаболитов в мозге мыши взяты из работы Lowy O. H., Passonneau J. V. J. Biol. Chem., 239, 31 (1964); данные о концентрации метаболитов в эритроцитах человека взяты из работы Minakami S., Saito T., Suzuki C., Yoshikawa H. Biochem. biophys. Res. Commun., 17, 748 (1964); данные о концентрации ферментов в эритроцитах человека взяты из работы, указанной ниже; данные о концентрации метаболитов в диафрагме крысы взяты из работ Newsholme E. A., Randle P. J. Biochem. J., 80, 655 (1961); Hohnhorst H. J., Reim M., Bartels H. Biochem. biophys. Res. Commun., 7, 137 (1962); данные о концентрации ферментов из скелетной мышцы кролика взяты из работы, указанной ниже. Концентрация метаболитов рассчитана исходя из того, что содержание воды в клетках мозга равно 60%, а в эритроцитах — 70%. Никаких поправок на компарментализацию клеток мышц и мозга не делалось, однако суммарные концентрации метаболитов обычно близки к концентрациям в цитозоле [Greenbaum A. L., Gutma K. A., McLean P. Archs Biochem. Biophys., 143, 617 (1971)]. Значения всех величин для мозга мыши получены немедленно после декантации животного. Использование максимальных величин не приводило к существенным изменениям результатов.

б) Zalitis J., Oliver I. T. Biochem. J., 102, 753 (1967).

в) Rutter W. J. Fed. Proc., 23, 1248 (1964); Spoiter P. D., Adelman R. C., Weinhouse S. J. Biol. Chem., 240, 1327 (1965).

г) Schneider A. S., Valentine W. N., Hattori M., Heins H. L. New Engl. J. Med., 272, 229 (1965).

д) Burton P. M., Waley S. G. Biochem. biophys. Acta, 151, 714 (1968).

е) Oguchi M., Gerth E., Fitzgerald B., Park J. H. J. Biol. Chem., 248, 5571 (1973).

ж) Значение K_M порядка 6 мМ для P₁ относится к высоким концентрациям GAP при накоплении ацилфермента. При низких концентрациях GAP K_M неизмеримо высока [Harrigan P. J., Trentham D. R. Biochem. J., 143, 353 (1974)]. *Примечание:* в случае G3P и DHAP наиболее вероятными субстратами соответствующих реакций являются негидратированные формы указанных соединений. Хотя в таблице приведенные концентрации субстратов представляют собой суммарные концентрации гидратированных и негидратированных форм, в отношении $K_M/[S]$ числитель и знаменатель завышены в одно и то же число раз [Trentham D. R., McMurray C. H., Pogson C. I. Biochem. J., 114, 19 (1969); Roynolds S. J., Yates D. W., Pogson C. I. Biochem. J., 122, 285 (1971)].

а) Yoshida A., Watanabe S. J. Biol. Chem., 247, 440 (1972).

и) Rao D. R., Oesper P. Biochem. J., 81, 405 (1961).

к) Cowgill R. W., Pizer L. I. J. Biol. Chem., 223, 885 (1956); Grisolia S., Cleland W. W. Biochemistry, 7, 1115 (1968).

л) Wolf F., Barker R. Biochim. Biophys. Acta, 85, 475 (1964).

м) Вопрос о том, является ли этот фермент регуляторным, остается пока открытым; концентрация PEP в любом случае значительно ниже K_M . Приведенные данные относятся к случаю, когда [FDP] = 500 мкМ и выполняется механизм Михаэлиса — Ментен. В отсутствие FDP кинетическая кривая имеет S-образную форму и $K_{0,5} = 650$ мкМ.

н) Staal S. E. J., Koster J. F., Kamp H., van Milligan — Boersma L., Veeger C. Biochim. Biophys. Acta, 227, 86 (1971).

о) Nisselbaum J. S., Bodansky O. J. Biol. Chem., 238, 969 (1963).

п) Рассчитана из отношения [Лактат]/[Пируват] в предположении, что концентрация NAD и NADH равновесные. Константа равновесия равна $1,1 \cdot 10^{-4}$; Veech R. L., Eggleston L. V., Krebs H. A. Biochem. J., 115, 609 (1969).

р) Rapoport S. Essay in Biochemistry, 4, 69 (1969).

с) Fondy T. P., Levin L., Sollohub S. J., Ross C. R. J. Biol. Chem., 243, 3148 (1968).

т) Denton R. M., Yorke R. E., Randle P. J. Biochem. J., 100, 407, (1966).

ферментов приведены в табл. 10.4 и на рис. 10.4. Из представленной гистограммы видно, что K_M чаще всего превышает концентрацию субстрата в 1—10 и в 10—100 раз. Особого внимания среди указанных ферментов заслуживает триозофосфатизомераза. Этот хорошо изученный фермент, названный за свою

каталитическую эффективность «эволюционно совершенным», характеризуется очень высокими значениями K_M для обоих субстратов.

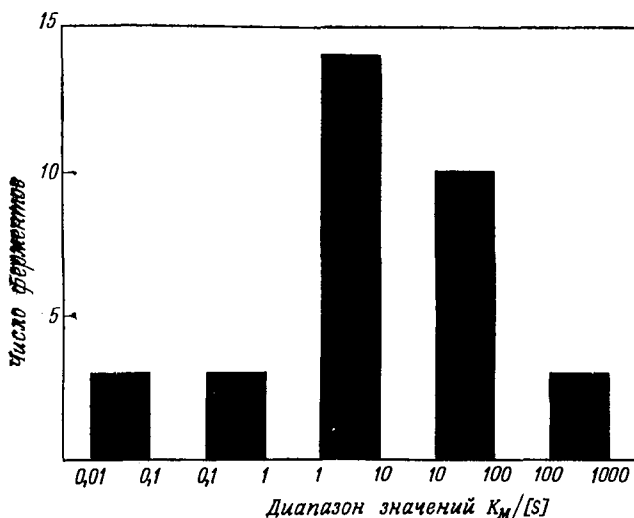


Рис. 10.4. Распределение гликолитических ферментов по значениям параметра $K_M/[S]$.

Что касается ситуации, когда K_M ниже концентрации субстратов, то вопрос о том, чем это обусловлено — эволюционными или метаболическими причинами, — остается пока открытым.

3. Эволюционно совершенный фермент

Чтобы найти критерий для определения эволюционного совершенства фермента, обеспечивающего максимально возможную скорость реакции, можно опять рассмотреть две умозрительные стадии, о которых шла речь в разд. Б.1.б данной главы, т. е. стадию максимизации k_{cat}/K_M и стадию увеличения K_M до значений, превышающих концентрацию S . Напомним (гл. 3), что максимальное значение k_{cat}/K_M представляет собой определяемую диффузией константу скорости столкновений фермента и субстрата и что эта величина равна 10^8 – 10^9 $M^{-1}c^{-1}$, т. е. эволюционно совершенный фермент должен иметь k_{cat}/K_M 10^8 – 10^9 $M^{-1}c^{-1}$ и $K_M > [S]$. Анализ значений k_{cat}/K_M и соотношения между K_M и концентрацией субстрата показывает, что эволюционно совершенными в отношении максимизации скорости реакции являются карбоангидраза и триозофосфатизомераза в со-

ответствии со сделанным ранее выводом Олбери и Ноулса относительно второго фермента [18].

Отметим еще один важный момент: для термодинамически невыгодной реакции величина k_{cat}/K_M не может достичь определяемого диффузией предельного значения. Это следует из уравнения Холдейна (гл. 3, разд. 3), согласно которому константа равновесия для реакции в растворе дается отношением величин k_{cat}/K_M для прямой и обратной реакций. Ясно, что k_{cat}/K_M для термодинамически невыгодной реакции не может достичь определяемого диффузией значения, поскольку в этом случае отношение k_{cat}/K_M для обратной реакции, являющейся термодинамически выгодной, должно было бы быть больше определяемого диффузией предела, чтобы не нарушалось уравнение Холдейна. Для невыгодной реакции верхний предел k_{cat}/K_M равен определяемому диффузией значению, умноженному на термодинамически невыгодную константу равновесия этой реакции.

В гл. 3, разд. А.3, указывалось, что, когда k_{cat}/K_M достигает определяемого диффузией значения, имеет место механизм Бриггса — Холдейна, а не Михаэлиса — Ментен. Таким образом, чем дальше продвинулся фермент на пути эволюции в отношении максимизации скорости, тем большее значение приобретает механизм Бриггса — Холдейна.

В. Молекулярные механизмы использования энергии связывания

Итак, мы обсудили в общих чертах, какие каталитические преимущества дает комплементарность фермента переходному состоянию субстрата и высокое значение K_M , и увидели, что эта ситуация реализуется на практике. Рассмотрим теперь, какие механизмы используются для достижения этой цели.

1. Деформация

Концепция деформации принадлежит Холдейну и Полингу [1, 4] и состоит в том, что активный центр фермента структурно комплементарен не самому субстрату, а переходному состоянию. При связывании с ферментом в субстрате возникают напряжения или деформации. Говоря словами Холдейна, «в модели Фишера замка и ключа ключ не совсем подходит к замку, а подвергается в замке некоторой деформации» (рис. 10.5). В настоящее время эта концепция применяется в модифицированном виде как концепция *стабилизации переходного состояния*: дело не в деформации субстрата, а в том, что переходное

состояние субстрата взаимодействует с ферментом лучше, чем сам субстрат, а поэтому полная энергия связывания не реализуется до тех пор, пока не сформируется переходное состояние.

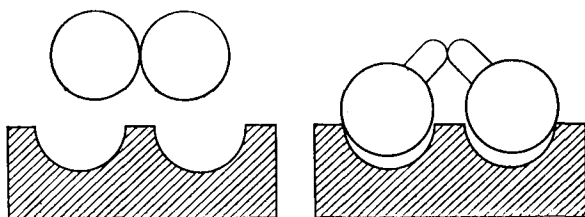


Рис. 10.5. Схематическое изображение процесса деформации по Холдейну. Центр связывания фермента растягивает молекулу субстрата так, что ее структура приближается к структуре продукта и сжимает молекулу продукта, так что ее структура приближается в свою очередь к структуре субстрата.

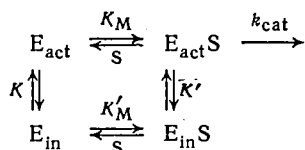
2. Индуцированное соответствие

Как было показано в гл. 8, теория индуцированного соответствия хорошо объясняет некоторые явления, наблюдаемые в случае аллостерических ферментов. Эта теория была предложена ранее для объяснения субстратной специфичности для простых (неаллостерических) ферментов. Предполагается, что в отсутствие субстрата фермент структурно не комплементарен переходному состоянию. Однако, поскольку молекула фермента довольно гибкая, а субстрат имеет жесткую структуру, при образовании фермент-субстратного комплекса каталитические группы на ферменте ориентируются оптимальным для катализа образом: это означает, что фермент становится комплементарным переходному состоянию только после связывания субстрата. В классическом варианте концепции деформации считается, что K_M возрастает за счет той составляющей энергии связывания, которая отвечает за деформацию субстрата, а в теории индуцированного соответствия — за счет той составляющей энергии связывания, которая отвечает за деформацию фермента.

а. Отрицательные стороны механизма индуцированного соответствия в случае неаллостерических ферментов

В теории напряжений величина k_{cat}/K_M максимальна, поскольку *недеформированный* фермент комплементарен *недеформированному* переходному состоянию. Индуцированное соответствие понижает k_{cat}/K_M , так как недеформированному переходному состоянию комплементарен *деформированный* фермент и k_{cat}/K_M уменьшается за счет того, что часть энергии расходуется на деформацию фермента.

Рассмотрим процесс связывания субстрата с ферментом по механизму индуцированного соответствия с других позиций. Разделим этот процесс на воображаемые стадии. Предположим, что между неактивной формой фермента (E_{in}), преобладающей в рассматриваемой системе ($[E_{in}] \approx [E]_0$), и активной формой (E_{act}) у которой каталитические группы ориентированы нужным образом, существует равновесие:



Рассматривая K_M в этой схеме как простые константы диссоциации и приняв $K = [E_{act}]/[E_{in}]$, можно показать, что

$$v = \frac{[E]_0 [S] k_{cat} K' / (1 + K')}{[S] + (K_M K' / K) (1 + K) / (1 + K')} \quad (10.13)$$

и

$$(k_{cat}/K_M)_{obs} = (k_{cat}/K_M) (K/(1 + K)). \quad (10.14)$$

Поскольку $K \ll 1$,

$$(k_{cat}/K_M)_{obs} = K (k_{cat}/K_M). \quad (10.15)$$

Наблюдаемое значение k_{cat}/K_M существенно меньше, чем для случая, когда весь фермент находится в активной конформации.

Если $K' \gg 1$, т. е. фактически весь фермент при связывании с субстратом находится в активной форме, уравнение (10.13) можно упростить. В этом случае

$$(k_{cat})_{obs} = k_{cat} \quad (10.16)$$

и

$$(K_M)_{obs} = K_M / K. \quad (10.17)$$

k_{cat} имеет такое же значение, как и в случае, когда весь фермент находится в активной конформации, а параметр K_M значительно выше.

Индукционное соответствие увеличивает K_M без увеличения k_{cat} , и, следовательно, отношение k_{cat}/K_M уменьшается, что приводит к уменьшению эффективности катализа.

Уравнение (10.15) показывает, что величина k_{cat}/K_M такова, как если бы в активной конформации постоянно находилась небольшая часть фермента. Это справедливо для всех субстратов, поскольку K от природы субстрата не зависит.

3. Непродуктивное связывание

Хотя при непродуктивном связывании константа K_M не увеличивается, целесообразно рассмотреть здесь этот механизм, поскольку он приводит к эффектам, качественно аналогичным

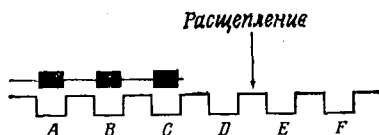


Рис. 10.6. Непродуктивное связывание субстратов лизоцимом. Небольшие субстраты способны присоединяться с любой стороны вдоль вытянутого активного центра лизоцима, не связываясь с подцентром, где происходит расщепление, из-за его более низкого средства.

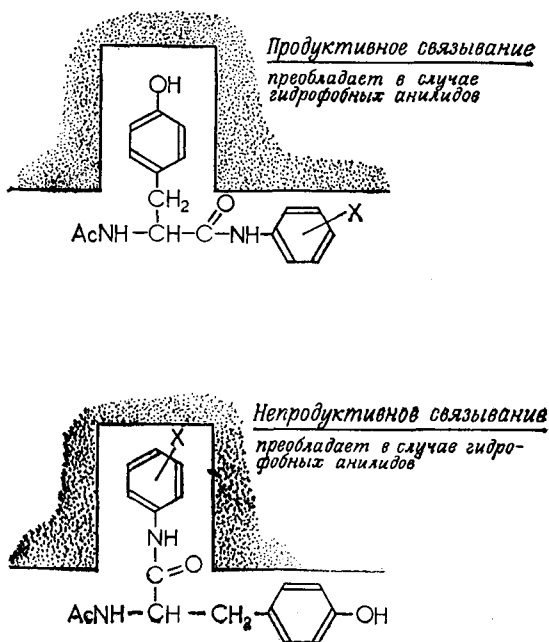


Рис. 10.7. Неправильное связывание амидов, содержащих аномальный гидрофобный остаток, с гидрофобным центром связывания химотрипсина.

эффектам, возникающим при напряжении или индуцированном соответствии. Вначале эта теория была привлечена для объяснения более высокой реакционной способности больших по размерам специфических субстратов по сравнению с меньшими неспецифическими субстратами. Предполагалось, что помимо

продуктивного связывания в активном центре возможны другие, непродуктивные способы связывания, когда небольшие субстраты связываются, но не подвергаются каталитическому превращению (рис. 10.6).

Примером такого рода может служить связывание полисахаридов с лизоцимом. Для осуществления реакции необходимо, чтобы из шести центров связывания — А, В, С, D, E, F — молекула субстрата заняла центры D и E. При связывании с центром D возникает некоторое напряжение, так что увеличение суммарной энергии связывания при этом не происходит. Тримеры и тетрамеры связываются непродуктивно с центрами А, В, С и А, В, С, D соответственно. Однако в случае гексамера выигрыш в энергии связывания при занятии центров E и F обеспечивает продуктивное связывание его с центрами А, В, С, D, E, F.

Наряду с этим «многовариантным» непродуктивным связыванием возможна ситуация, когда субстрат связывается с активным центром, но в неправильной ориентации (рис. 10.7). Эта идея была предложена для объяснения низкой скорости деацилирования ацилхимотрипсина [19].

4. Независимость специфичности фермента от напряжения, индуцированного соответствия и непродуктивного связывания

Специфичность фермента, заключающаяся в его способности распознавать один из конкурирующих субстратов, не зависит от того, какой из трех перечисленных выше механизмов имеет место. Подробно этот вопрос обсуждается в гл. 11, но по существу все дело здесь в том, что специфичность зависит от k_{cat}/K_M , а напряжение и непродуктивное связывание не влияют на эту величину [уравнения (10.10) и (3.36)]. Из уравнения (10.15) видно, что индуцированное соответствие просто изменяет параметр k_{cat}/K_M для активной конформации фермента в равной мере по отношению ко всем субстратам (т. е. в K раз).

5. Экспериментальное подтверждение существования напряжения и индуцированного соответствия и природа этих явлений

а. Стационарная кинетика

Хотя данные стационарной кинетики обычно интерпретируют в рамках одного из указанных выше механизмов, какой именно из них реализуется — решить трудно, и выбор всецело зависит от воли экспериментатора. Как правило, при этом сравнивают

величины k_{cat}/K_M для нескольких серий субстратов (как в табл. 10.1 и 10.2), чтобы убедиться, что специфичность проявляется в увеличении k_{cat} , а не в уменьшении K_M . В таком случае экспериментатор получает четкие указания на выполнимость какого-то одного из механизмов, но, как уже отмечалось, не может определить, какого именно. Дело в том, что все три механизма приводят к одному и тому же результату: энергия связывания превращается в энергию активации для химической стадии. Рассмотрим этот момент несколько более подробно.

Деформация: дополнительные группы в больших по размеру субстратах участвуют в деформации субстрата, а не в связывании. (В рамках теории стабилизации переходного состояния это

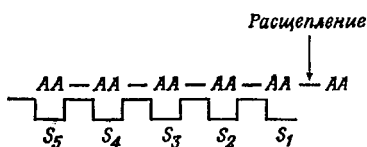


Рис. 10.8. Подцентры связывания эластазы.

положение формулируется так: «Дополнительная энергия связывания не реализуется до тех пор, пока не образуется переходное состояние».)

Индукцированное соответствие: дополнительные группы в больших по размеру специфичных субстратах участвуют в деформации фермента. Меньшие по размеру неспецифичные субстраты присоединяются преимущественно к неактивной форме фермента. Это приводит к уменьшению k_{cat} ввиду уменьшения продуктивного связывания, однако соответственно уменьшается и K_M , поскольку энергия связывания не используется для превращения неактивной конформации в активную.

Непродуктивное связывание: большие по размеру субстраты связываются только продуктивно, а меньшие, обладая способностью к слабому продуктивному связыванию, связываются еще и непродуктивно, уменьшая K_M . Соответственно уменьшается и k_{cat} .

Несмотря на то что на основании данных стационарной кинетики, сравнивая k_{cat} и K_M , различить механизмы деформации и индуцированного соответствия невозможно, иногда удается получить дополнительную информацию, позволяющую сделать выбор между этими двумя механизмами. Одним из характерных примеров такого рода является исследование эластазы [20]. Параметр k_{cat} для гидролиза AcProAlaProAla-NH₂ в сотни раз больше, чем для гидролиза AcAlaProAla-NH₂ (табл. 10.1). Объяснить это различие непродуктивным связыванием не удается,

поскольку наличие последовательности AlaProAla должно было обеспечить продуктивное связывание. Сравнение связывания субстратов и аналогов переходного состояния указывает на то, что остатки в подцентрах S_5 — S_4 дестабилизируют группу $-\text{CONH}_2$, энергия гидролиза которой составляет ~ 8 кДж·моль $^{-1}$ (2 ккал·моль $^{-1}$), относительно переходного состояния. Аналоги переходного состояния, в которых группа $-\text{CONH}_2$ замещена на $-\text{CHO}$, образуют тетраэдрический аддукт с Ser-195, моделируя подобное тетраэдрическому промежуточному соединению переходное состояние гидролитической реакции. Связывание этих аналогов усиливается при занятии подцентров S_5 и S_4 . Ответить а priori на вопрос, чем обусловлена взаимная дестабилизация между подцентрами S_4 — S_5 и амидной группой субстрата — передающимся через белок конформационным изменением или неблагоприятным взаимодействием, уменьшающимся при образовании переходного состояния, — невозможно.

б. Предстаационарная кинетика и эксперименты по связыванию

Известно довольно много примеров, когда добавление к ферментам субстратов и ингибиторов сопровождается изменением флуоресценции и кругового дихроизма, что свидетельствует об индуцируемых в ферментах конформационных изменениях [21]. Во многих случаях эти процессы исследованы методами изучения быстрых реакций. Однако полученные данные, как правило, нельзя объяснить в рамках какого-либо конкретного механизма.

в. Рентгеноструктурный анализ

Наиболее обширная информация получена при исследовании кристаллических ферментов методом рентгеноструктурного анализа.

1. *Лизоцим: механизм напряжения?* При гидролизе лизоцимом полисахаридов кольцо сахара, связанного с подцентром D, превращается в карбоний-ион, меняя свою конформацию с «кресла» на «софу» (гл. 1 и гл. 10, разд. А.4.б). Построение моделей для этой системы подтвердило, что субстрат, связывающийся с подцентром D, вынужден принять конформацию «софы» вследствие неблагоприятных взаимодействия с ферментом, т. е. в данном случае действует классический механизм деформации [22]. Позднее Левитт еще раз проанализировал связывание лизоцима с (NAG) $_6$, используя более точные координаты атомов этого фермента и проведя весьма сложные расчеты его взаимодействия с субстратом вместо построения проволочных

моделей [8, 23]. Координаты фермента и субстрата оптимизировались путем выражения длин всех связей, углов между связями, торсионных углов и расстояний между несвязанными ато-

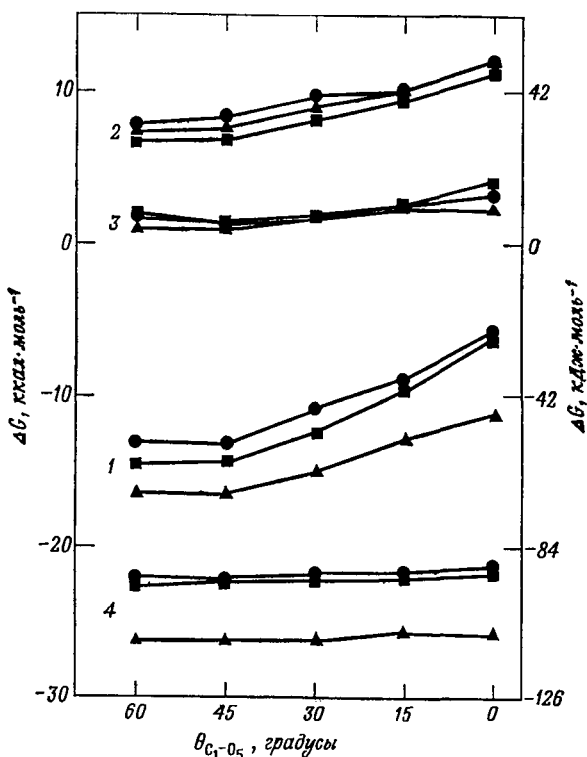
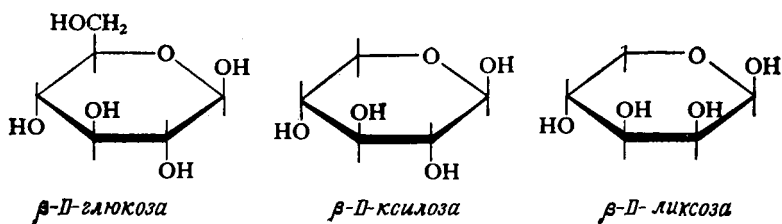


Рис. 10.9. Зависимость энергии связывания (ΔG) сахарного кольца с подцентром D лизоцима для субстратов $(NAG)_6$ с искусственно фиксированной структурой от величины торсионного угла $\theta_{C_1-O_5}$. 1 — суммарное изменение свободной энергии при связывании; 2 — вклад торсионных напряжений; 3 — вклад угловых напряжений; 4 — вклад нековалентных взаимодействий (см. текст). Для конформации «кресла» угол $\theta_{C_1-O_5} = -60^\circ$, а для полукресла — 0° [8].

мами в виде эмпирических энергетических функций и минимизации энергии с помощью ЭВМ. Результаты, полученные для D -подцентра и присоединяющегося к нему сахарного кольца, представлены на рис. 10.9. Используются три типа приближения. Первое (●) предполагает, что субстрат обладает гибкостью и подгоняется к жесткому ферменту. Согласно второму (▲), гибкостью обладают и фермент, и субстрат и оба они участвуют в достижении наилучшего соответствия. Третье приближение

(■) основано на допущении, что фермент обладает лишь незначительной гибкостью. Как видно из рисунка, наиболее благоприятной во всех случаях является ситуация, отраженная в левой части рисунка, когда субстрат имеет конформацию кресла. Это подтверждает представление о том, что субстрат, связываясь с подцентром D, имеет форму кресла и не изменяет свою конформацию на «софу» вплоть до образования карбоний-иона (или переходного состояния). Классический механизм деформации субстрата, по-видимому, вряд ли имеет место, хотя исследования с помощью аналогов переходного состояния указывают на возможность стабилизации переходного состояния.

2. *Гексокиназа: индуцированное соответствие.* Имеются веские данные в пользу того, что в гексокиназе дрожжей, которая фосфорилирует глюкозу с участием концевого фосфата молекулы АТР, достигается индуцированное соответствие между ферментом и субстратом. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, связывание как сахара, так и нуклеотида вызывает существенные изменения в третичной структуре фермента. Кроме того, присоединение нуклеотида к одной из форм фермента облегчается связыванием сахара [24, 25]. Эти результаты согласуются с результатами более ранних исследований АТРазной активности этого фермента в растворе в отсутствие глюкозы. Гексокиназа фосфорилирует глюкозу в положении 6 с $V_{\max} = 800$ мкмоль·мин⁻¹ на 1 мг белка и K_M для АТР 0,1 мМ. В отсутствие глюкозы АТР гидролизуется с $V_{\max} = 0,02$ мкмоль·мин⁻¹ на 1 мг белка и $K_M = 4,0$ мМ. Добавление ликсозы, которая не может фосфорилироваться вследствие утраты оксиметильной группы в положении 6, приводит к увеличению V_{\max} для реакции с участием АТРаза в 18 раз; при этом величина K_M для АТР уменьшается в 40 раз, т. е. до значения K_M , характерного для фосфорилирования глюкозы [26, 27]. Ксилоза вызывает изменения в кристаллической структуре фермента, аналогичные изменениям, индуцируемым глюкозой (рис. 10.10).



3. *Сериновые протеазы: стабилизация переходного состояния.* Химотрипсин и сериновые протеазы относятся к числу на-

иболее изученных ферментов благодаря использованию рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением для исследования этих ферментов и их комплексов с природными полипептидными ингибиторами, моделирующими субстраты (гл. 1) [28—31]. Каталитическую активность химотрипсина можно подавить

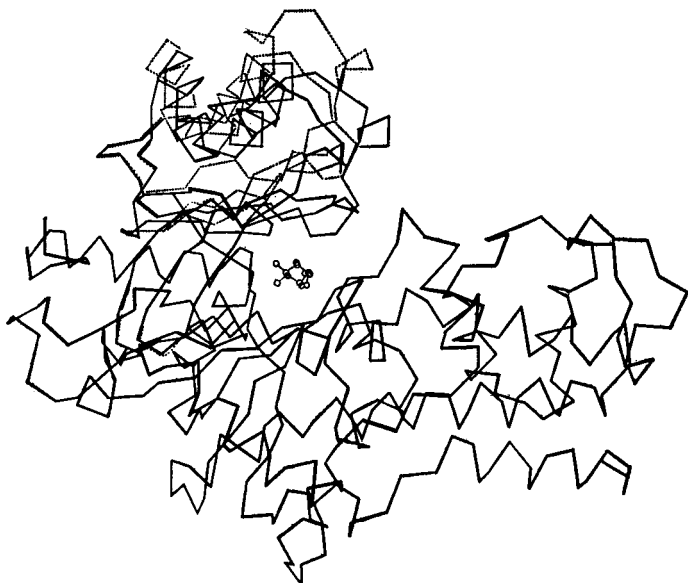


Рис. 10.10. Изменение конформации гексокиназы, индуцируемое присоединением глюкозы. Сплошная линия — α -углеродный полипептидный остов изофермента А, закристаллизованного в присутствии глюкозы. Пунктирная линия — полипептидный остов той части изофермента В, которая имеет другую структуру при кристаллизации в отсутствие глюкозы. (Bennett W. S., Steitz T. A., неопубликованные данные; Fedn. Proc. Abstr., 1977.)

с помощью химического превращения нуклеофильного Ser-195 в дегидроаланин путем удаления гидроксильной группы и атома водорода. В остальном структура ангидрофермента остается прежней, и его можно использовать для изучения связывания субстрата.

Четко показано, что гидролиз пептидов протекает по механизму деформации [32]. Кристаллографические данные указывают на наличие центра связывания для уходящей группы пептидного субстрата. Величина k_{cat}/K_M для гидролиза AcPhe-NH₂, AcPheGly-NH₂ и AcPheAla-NH₂ значительно возрастает по мере увеличения размера уходящей группы, пока она не займет весь центр связывания (табл. 10.1), однако это увеличение всецело обусловлено увеличением k_{cat} , величина же K_M

остаётся постоянной. Указания на присоединение AlaNH_2 или GlyNH_2 к ферменту в ходе обратной реакции (атака уходящей аминокислотной группой АсPhe-химотрипсина) отсутствуют, поскольку кинетики с насыщением не наблюдаются. Эти группы реагируют значительно быстрее аммиака (для NH_3 $k_{\text{cat}}/K_M = 8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, а для GlyNH_2 и AlaNH_2 эта величина равна $2000 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и $6000 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответственно) [32]. Энергия связывания остатков аланина и глицина используется для уменьшения энергии активации стадии химического превращения. Это не связано с эффектом индуцированного соответствия, поскольку структура кристаллического трипсина идентична структуре трипсина (и ангидротрипсина, если не принимать в расчет отсутствия в нем гидроксильной группы у Ser-195) в кристаллическом комплексе с панкреатическим ингибитором трипсина (разрешение 1,4—1,5 Å).

Связывание субстрата также, по-видимому, не сопровождается его деформацией. Рентгеноструктурные исследования комплекса трипсина и ингибитора осложняются деформацией ингибитора в отсутствие фермента [33], однако исследования методом ЯМР присоединения небольших субстратов к химотрипсину указывают на отсутствие деформации этих субстратов [34].

Использование энергии связывания уходящей группы, по-видимому, может рассматриваться как пример стабилизации переходного состояния. При связывании происходит лишь небольшая деформация фермента или субстрата (возможно, эта деформация и вообще отсутствует), однако уходящая группа не вполне соответствует своему центру связывания до тех пор, пока не образуется переходное состояние.

4. *Специфическая сольватация переходного состояния — роль полипептидного остова.* Рентгеноструктурный анализ позволил установить очень интересную особенность сериновых протеаз: NH-группы белка служат сольватной оболочкой для переходного состояния реакции. Это приводит к фундаментальному различию между простыми химическими реакциями в растворе и реакциями, катализируемыми ферментами. Единственный тип ориентации, который необходимо рассматривать для реакций в растворе, — это взаимная ориентация реагентов, поскольку растворитель создает сольватную оболочку вокруг любого образующегося заряда. Для ферментативной же реакции характерны определенные стереохимические отношения между реагирующими группами и группами, создающими сольватную оболочку и являющимися частью этой же молекулы фермента (рис. 10.11). Очень важную роль при деформации и, следовательно, в обеспечении специфичности играют водородные связи, поскольку их энергия сильно зависит от расстояния (гл. 9). Особая роль в этих процессах принадлежит полипептидному

остову,— жесткое расположение групп делает возможным ускорение катализа за счет напряжения в результате ослабления водородных связей с субстратом и образования более прочных связей с переходным состоянием. Высказывалось предположение, что в случае химотрипсина и трипсина карбонильный кислород подвергающейся химическому превращению амидной или эфирной группы субстрата, располагаясь между NH-группами Ser-195 и Gly-193 полипептидного остова, образует прочную водородную связь с Ser-195 (гл. 1, а также гл. 12, разд. Б.1).

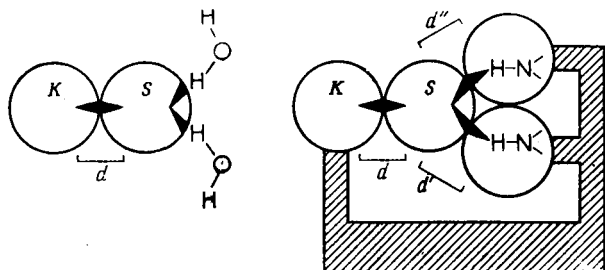


Рис. 10.11. Геометрические ограничения при ферментативном катализе, возникающие вследствие того, что катализатор (К) и сольватирующие группы (NH) являются составной частью фермента. Зачерненные конусы показывают допустимые углы орбитального перекрытия при образовании водородных связей; d — межатомное расстояние. *Слева*: взаимодействие между молекулой катализатора К и субстратом приводит к образованию отрицательного заряда, вокруг которого образуется сольватная оболочка из молекул воды. *Справа*: расстояние между катализатором и донорами водородных связей фиксировано в связи с тем, что они являются частью фермента [2].

Связь с Gly-193 слабая, однако по мере увеличения длины двойной связи между атомами углерода и кислорода в ходе реакции и превращения ее в одинарную связь между атомом кислорода и Gly-193 становится достаточно прочной [32]. Построение моделей для субтилизина приводит к аналогичному, хотя и отличающемуся в деталях механизму [35]. Изначально карбонильный кислород не располагается между двумя NH-группами в фермент-субстратном комплексе, а занимает это положение по мере образования тетраэдрического промежуточного соединения. Предполагается также, что водородная связь между N-аминогруппой субстрата и Ser-214 образуется только в тетраэдрическом промежуточном соединении.

Стоит отметить, что специфичность образования водородных связей между ферментом и субстратом определяется в значительной степени *длиной* связи, а не взаимным расположением участвующих в ее образовании атомов, поскольку, как говорилось в предыдущей главе, энергия водородной связи сильно

зависит от расстояния, но очень слабо изменяется при отклонении от линейного расположения атомов [2].

Механизм действия сериновых протеаз очень хорошо иллюстрирует смысл концепции стабилизации переходного состояния. Примеры реализации механизмов деформации и индуцированного соответствия обсуждаются в гл. 12 (последний механизм рассмотрен на примере функционирования карбоксипептидазы, папаина и глюкозо-6-фосфат—изомеразы, а напряжение — на примере папаина).

6. Природа напряжения. Напряжение или деформация?

Хотя в некоторых случаях напряжение представляет собой истинную деформацию субстрата, зачастую оно вообще не сопровождается искажением структуры последнего. Такая ситуация возникает либо в том случае, когда между субстратом и ферментом имеются неблагоприятные взаимодействия, устраняющиеся в переходном состоянии, либо когда при образовании переходного состояния возникает дополнительное взаимодействие, не реализующееся в фермент-субстратном комплексе. В обоих случаях существуют силы, изменяющие структуру субстрата, с тем чтобы приблизить ее к структуре переходного состояния. Поскольку нековалентные взаимодействия довольно слабые (за исключением вандерваальсовых сил отталкивания), а ферменты и субстраты — достаточно гибкие молекулы, трудно ожидать, что взаимодействие фермента с субстратом приведет к деформации последнего. Может иметь место лишь поворот групп субстрата относительно простых связей (как, например, при конформационных изменениях субстратов лизоцима), растяжение же этих связей или их деформация вряд ли возможны, поскольку это требует больших энергетических затрат. Энергии связывания вполне достаточно для деформации субстрата, однако для использования этой энергии необходимо, чтобы ее значение существенно изменялось на очень коротком расстоянии, т. е. чтобы образовалась сильная связь. На основании энергетических расчетов Левитт пришел к следующему выводу: «Небольшие изменения конформации субстрата, приводящие к существенным изменениям энергии напряжения, не могут быть вызваны связыванием с ферментом» [8, 36]. Кроме того, он предположил, что самые большие по величине силы, которые принимают участие в деформации субстрата, не превышают $12 \text{ кДж} \cdot (\text{моль} \cdot \text{Å})^{-1}$ [$3 \text{ ккал} \cdot (\text{моль} \cdot \text{Å})^{-1}$], что приводит к смещению атомов на 1 Å . Деформация может иметь место лишь в предельных случаях, и обычно напряжение определяется тонко

сбалансированным соотношением между выгодными и невыгодными взаимодействиями. Более вероятно, что деформируется не субстрат, а фермент, поскольку ферменты имеют менее жесткую структуру. Действительно, в данной главе приведено множество примеров деформации фермента при связывании субстрата. Возможно, некоторые из этих деформаций представляют собой неблагоприятное следствие гибкости белков и невозможности сформировать активный центр, в точности комплементарный данному субстрату. Легкая доступность активного центра может быть обеспечена низким значением энергии конформационного перехода, при котором определенная часть активного центра сближается с субстратом (как в случае пептидов и карбоксилпептидазы, а также NAD^+ и дегидрогеназ, гл. 12).

В физике и технике термин «деформация» (strain) имеет вполне определенный смысл. Подразумевается, что структура объекта физически искажена. Другой, близкий термин «напряжение» (stress) означает, что объект находится в напряженном состоянии, но не разрушен. Используя эти точные физические термины, можно сказать, что в фермент-субстратном комплексе фермент, как правило, деформирован, тогда как субстрат находится в состоянии напряжения.

Деформация и напряжение в ферментах могут вызываться различными причинами. Как мы видели в данной главе и увидим ниже (гл. 12), деформация и напряжение включают два процесса: дестабилизацию субстрата и стабилизацию переходного состояния. Дестабилизация субстрата может сопровождаться пространственной деформацией, когда между ферментом и субстратом возникают неблагоприятные взаимодействия (пролинрацемаза, лизоцим), десольватацией фермента (удаление двух молекул воды от карбоксильной группы Asp-52 в лизоциме), десольватацией субстрата (например, пептида, теряющего какое-то количество молекул связанной воды). Стабилизация переходного состояния сопровождается возникновением таких типов связывания, которые отсутствуют в случае субстрата (сериновые протеазы, цитидиндезаминазы), ослаблением пространственной деформации, повторной сольватацией фермента или субстрата (или образованием электростатических связей) в переходном состоянии.

7. Деформация — индуцированное соответствие — непродуктивное связывание

Деформация вносит положительный вклад в катализ при условии комплементарности фермента переходному состоянию субстрата, увеличивая k_{cat} и K_{M} , что приводит к увеличению

скорости реакции. Индуцированное соответствие уменьшает эффективность катализа, увеличивая K_M без соответствующего увеличения k_{cat} по сравнению с ферментом, находящимся в активной форме в отсутствие субстрата. Механизм непродуктивного связывания не затрагивает каталитического превращения специфических субстратов, однако он приводит к появлению дополнительных связывающих центров для конкурирующих между собой неспецифических субстратов. Эффективность катализа при этом может уменьшаться, если связывание неспецифических субстратов препятствует присоединению к ферменту специфических субстратов. Поскольку ни один из указанных механизмов не обеспечивает никакой дополнительной специфичности, для нерегуляторных ферментов наиболее важной из этих трех процессов должна быть деформация. Непродуктивное связывание вообще может оказаться артефактом, свойственным лишь системам *in vitro*, и не иметь никакого биологического значения [2].

Приложение: проблема накопления промежуточных соединений [2]

Как отмечалось в гл. 7, выявление промежуточных соединений ферментативных реакций потребовало больших усилий. Было установлено, что в физиологических условиях в ходе реакций с участием многих наиболее распространенных гидролитических ферментов и природных субстратов эти соединения не накапливаются (табл. 10.5), в связи с чем механизм действия пепсина и карбоксипептидазы до сих пор не удалось установить.

Накопление промежуточных соединений при исследовании механизма действия фермента часто наблюдают в тех случаях, когда используют синтетические субстраты, обладающие высокой реакционной способностью (например, эфиры при изучении химотрипсина), или когда работают при необычных рН (например, в кислой среде при исследовании щелочной фосфатазы). Все это обусловлено причинами принципиального характера. Естественное следствие принципа максимизации скорости путем увеличения как k_{cat} , так и K_M состоит в том, что накопление промежуточных соединений уменьшает скорость реакции. Любое накапливающееся промежуточное соединение уменьшает K_M реакции, приводя к насыщению при более низких концентрациях субстрата. Посмотрим на эту проблему с другой стороны. Если промежуточное соединение накапливается, то это означает, что константа скорости его исчезновения меньше константы скорости образования. Следовательно, скорость реакции ниже, чем

Таблица 10.5

Ферменты и промежуточные соединения

Фермент (класс)	Субстрат	Промежуточное соединение	Накоп- ление а)
Химотрипсин (Сериновые протеазы)	Пептиды	Ацилфермент	—
Пепсин (Кислые протеазы)	»	Ацилфермент (?), Аминофермент (?)	—
Карбоксипептидаза	»	?	—
Папаин (Тиоловые протеазы)	Амиды	Ацилфермент	—
Эстераза печени свиньи (Эстеразы печени)	Алифатические эфирь	»	—
Ацетилхолинэстераза (Холиновые эстеразы)	Ацетилхолин	»	+
Кислая фосфатаза	Фосфорные моноэфирь	Фосфорилфермент	+
Лизоцим (Гликозидазы)	Полисахаридь	Карбоний-ион (эфир)	— б)

а) Указано, происходит (+) или не происходит (—) накопление фермент-содержащих промежуточных соединений в случае физиологических субстратов при насыщающих концентрациях субстратов. Следует отметить, что если физиологическая концентрация субстрата ниже соответствующего значения K_M , то промежуточное соединение не накапливается даже при насыщающих концентрациях.

б) Промежуточное соединение накапливается в случае синтетической уходящей группы (*p*-нитрофенол) в реакции с участием глюкозидазы.

она могла бы быть, если бы образование промежуточного соединения было лимитирующей стадией.

Проблема накопления промежуточного соединения—наиболее сложная проблема ферментативного катализа, поскольку ферменты (например, те из них, которые участвуют в пищеварении) должны «справляться» с периодически появляющимися большими количествами субстратов. Если физиологическая концентрация субстрата ниже K_M для этой реакции, то промежуточное соединение *in vivo* не накапливается, поскольку фермент находится преимущественно в несвязанном состоянии. Однако в условиях эксперимента, когда можно использовать высокие концентрации субстрата, промежуточное соединение иногда удается накопить. Примером такого рода служит реакция с участием глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназы. Из табл. 10.4 видно, что концентрация альдегида *in vivo* ниже K_M . Однако в лабораторных условиях ацилфермент может накапливаться, если используются насыщающие концентрации субстрата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haldane J. B. S.*, Enzymes, Longmans, Green and Co., p. 182 (1930).
2. *Fersht A. R.*, Proc. R. Soc., **B187**, 397 (1974).
3. *Fischer E.*, Ber. dt. Chem. Ges., **27**, 2985 (1894).
4. *Pauling L.*, Chem. Engng. News, **24**, 1375 (1946), Am. Scient., **36**, 51 (1948).
5. *Wolfenden R.*, Accts. Chem. Res., **5**, 10 (1972).
6. *Leinhard G. E.*, Science, N. Y., **180**, 149 (1973).
7. *Secemski I. I.*, *Lienhard G. E.*, J. biol. Chem., **249**, 2932 (1974).
8. *Levitt M.* In: Peptides, polypeptides and proteins (ed. Blout E. R., Boyve F. A., Goodman M., Lotan N.), John Wiley and Sons Inc., p. 99 (1974).
9. *Leaback D. H.*, Biochem. biophys. Res. Comm., **32**, 1025 (1968).
10. *Cardinale G. J.*, *Abeles R. H.*, Biochemistry, **7**, 3970 (1968).
11. *Keenan M. V.*, *Alworth W. L.*, Biochem. biophys. Res. Comm., **57**, 500 (1974).
12. *Cohen R. M.*, *Wolfenden R.*, J. biol. Chem., **246**, 7561 (1971).
13. *Fastrez J.*, *Fersht A. R.*, Biochemistry, **12**, 1067 (1973).
14. *Collins K. D.*, *Stark G. R.*, J. biol. Chem., **246**, 6599 (1971).
15. *Schlessinger J.*, *Levitzki A.*, J. molec. Biol., **82**, 547 (1974).
16. *Mannherz H. G.*, *Schenck H.*, *Goody R. S.*, Eur. J. Biochem., **48**, 287 (1974).
17. *Kernohan J. C.*, *Forrest W. W.*, *Roughton F. J. W.*, Biochim. biophys. Acta, **67**, 31 (1963).
18. *Albery W. J.*, *Knowles J. R.*, Biochemistry, **15**, 5627, 5631 (1976).
19. *Henderson R. H.*, J. molec. Biol., **54**, 341 (1970).
20. *Thompson R. C.*, Biochemistry, **13**, 5495 (1974).
21. *Citri N.*, Adv. Enzymol., **37**, 397 (1973).
22. *Blake C. C. F.*, *Johnson L. N.*, *Mair G. A.*, *North A. C. T.*, *Phillips D. C.*, *Sarma V. R.*, Proc. R. Soc., **B167**, 378 (1967).
23. *Warshel A.*, *Levitt M.*, J. molec. Biol., **103**, 227 (1976).
24. *Anderson W. F.*, *Steitz T. A.*, J. molec. Biol., **92**, 279 (1975).
25. *Colowick S. P.*, The Enzymes, **9**, 1 (1973).
26. *DelaFuente G.*, *Lagunas R.*, *Sols A.*, Eur. J. Biochem., **16**, 226 (1970).
27. *DelaFuente G.*, *Sols A.*, Eur. J. Biochem., **16**, 234 (1970).
28. *Rühlmann A.*, *Kukla D.*, *Schwager P.*, *Bartels K.*, *Huber R.*, J. molec. Biol., **77**, 417 (1974).
29. *Huber R.*, *Kukla D.*, *Bode W.*, *Schwager P.*, *Bartels K.*, *Deisenhofer J.*, *Steigemann W.*, J. molec. Biol., **89**, 73 (1974).
30. *Sweet R. M.*, *Wright H. T.*, *Janin J.*, *Chothia C. H.*, *Blow D. M.*, Biochemistry, **13**, 4212 (1974).
31. *Bode W.*, *Schwager P.*, *Huber R.*, In: Federation of European Biochemical Societies Tenth Meeting (ed. Desnuelle P.), North Holland/American Elsevier, **40**, 3 (1975).
32. *Fersht A. R.*, *Blow D. M.*, *Fastrez J.*, Biochemistry, **12**, 2035 (1973).
33. *Deisenhofer J.*, *Steigemann W.*, Acta Cryst., **B31**, 238 (1975).
34. *Robillard G.*, *Shaw E.*, *Shulman R. G.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **71**, 2623 (1974).
35. *Robertus J. D.*, *Kraut J.*, *Alden R. A.*, *Birktoft J. J.*, Biochemistry, **11**, 4293 (1972).
36. *Levitt M.*, Thesis Ph. D., University of Cambridge, p. 270 (1972).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Jencks W. P., Adv. Enzymol., **43**, 219 (1975).

СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ОТНОСИТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ

Специфичность — чрезвычайно многозначный и зачастую неверно интерпретируемый термин. В энзимологии под ним обычно понимают способность фермента *узнавать* определенный субстрат из нескольких конкурирующих за активный центр этого фермента субстратов. Именно в этом смысле, например, говорят о специфичности конкретной аминоксил-тРНК—синтетазы по отношению к конкретной аминокислоте и конкретной тРНК. Таков смысл понятия «специфичность» в применении к биологическим системам. При этом рассматривается ситуация, в которой за фермент конкурируют два субстрата, и ставится задача определения относительной прочности связывания субстратов с данным ферментом. В этом смысле специфичность является функцией прочности связывания обоих субстратов и скорости катализа: если какой-либо субстрат, реагируя с ферментом, имеет константу k_{cat} в 1000 раз меньше, чем k_{cat} для интересующего нас субстрата, но связывается в тысячу раз прочнее, эти два фактора будут компенсировать друг друга. Вот почему важным кинетическим параметром при определении специфичности является отношение k_{cat}/K_M : оно отражает оба фактора — скорость реакции и прочность связывания.

Термин «специфичность» используется также (по существу неверно) при описании активности фермента по отношению к другому субстрату в *отсутствие* специфического субстрата. Такая ситуация часто имеет место в опытах *in vitro*. При этом субстрат называют «плохим», если для него характерно либо высокое значение K_M , либо низкое k_{cat} . В биологических же системах важны оба этих параметра.

Различие между двумя указанными значениями термина «специфичность» очень важно для понимания сущности механизмов деформации, индуцированного соответствия и непродуктивного связывания в катализе. Как будет показано в последней главе, эти факторы не влияют на биологическую специфичность, поскольку они изменяют параметры k_{cat} и K_M таким образом, что отношение k_{cat}/K_M остается постоянным.

А. Ограничения, налагаемые на специфичность

Центральную проблему специфичности можно сформулировать так: каким образом фермент отличает специфический субстрат от другого, меньшего или равного ему по размеру (изо-стерического) субстрата? Отличить больший по размеру субстрат от специфического субстрата нетрудно, поскольку полость фермента, в которой происходит связывание, может быть достаточно велика, чтобы связать небольшой специфический субстрат, но слишком мала, чтобы в нее поместилась более крупная молекула конкурирующего субстрата. Однако небольшой по размерам субстрат не встречает таких стерических препятствий. В этом случае энергия связывания, используемая в катализе, будет меньше. Такие примеры были рассмотрены в разделе, посвященном сериновым протеазам. Большие по размеру производные ароматических аминокислот не могут связываться небольшим связывающим карманом эластазы в отличие от меньших по размерам производных аминокислот, способных связываться и реагировать с химотрипсином. Однако, как обсуждалось в начале предыдущей главы, реакции с участием меньших по размеру субстратов характеризуются значительно меньшими значениями параметров k_{cat} и k_{cat}/K_M . Различить субстраты не составляет труда и в том случае, если между ними имеются существенные стереохимические различия. Как указывалось в конце гл. 2, при замене L-аминокислоты D-аминокислотой происходит такая перестановка двух групп у хирального атома углерода, что продуктивное связывание субстрата становится невозможным.

Гораздо труднее различить субстраты в реакциях, протекающих с участием аминоксил-тРНК—синтетаз — ферментов, которые должны с высокой точностью выбрать нужную аминокислоту. Два примера такого рода — конкуренция между валином и изолейцином за активный центр изолейцил-тРНК—синтетазы и между треонином и валином за активный центр валил-тРНК—синтетазы (рис. 11.1).

Валин, отличающийся от изолейцина отсутствием одной метиленовой группы, связывается с изолейцил-тРНК—синтетазой в сотни раз слабее. Треонин, несмотря на то что он изостеричен валину, связывается с валил-тРНК—синтетазой в 100—200 раз слабее, поскольку в гидрофобный карман, обычно занимаемый метиленовой группой валина, погружается теперь гидроксильная группа.

Эту ситуацию можно проанализировать, воспользовавшись теорией переходного состояния, как это сделано при рассмотрении комплементарности между ферментом и субстратом в предыдущей главе. Энергия активации данной реакции представ-

ляет собой сумму двух составляющих; одна из них — энергия активации для стадии химического превращения субстрата, а другая — энергия связывания фермента с субстратом. Если меньший по размеру или изостерический субстрат отличается от специфического субстрата отсутствием элемента R, который

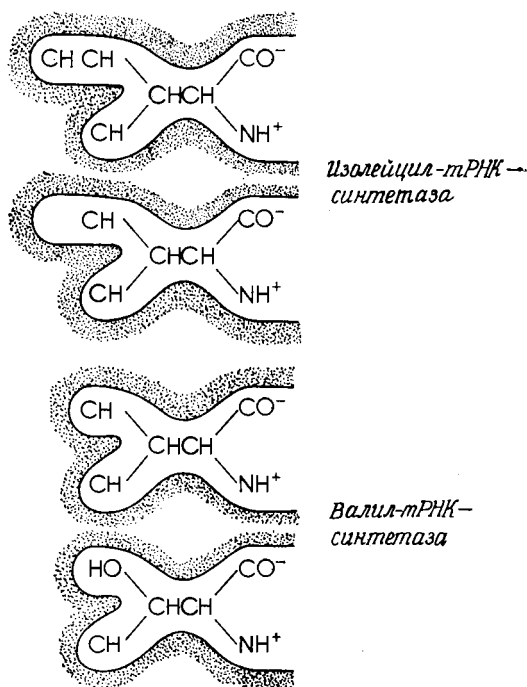


Рис. 11.1. Полость в активном центре изолейцил-тРНК — синтетазы способна связывать валин, поскольку она связывает больший по размеру изолейцин. Активный центр валил-тРНК — синтетазы не может «отторгнуть» треонин, так как он изостеричен валину.

имеет потенциальную энергию связывания $\Delta\Delta G_b$, максимально возможное различие в скорости реакции, обусловленное этим стереохимическим фактором, равно $\exp(-\Delta\Delta G_b/RT)$ и не может увеличиваться за счет деформации, индуцированного соответствия, ряда конформационных изменений, наличия дополнительных стадий химических превращений или двух (или большего числа) одновременно функционирующих центров. Впервые это было показано для частного случая — механизм Михаэлиса — Ментен, — а затем обобщено на все другие механизмы. Как мы увидим дальше, специфичность обусловлена связыванием именно переходного состояния.

1. Механизм Михаэлиса — Ментен

В гл. 3, разд. Ж.2 было показано, что специфичность в случае конкурирующих субстратов определяется величиной k_{cat}/K_M . Если скорость реакции с участием специфического субстрата А обозначить через v_A , а соответствующую скорость для конкурирующего субстрата В — через v_B , то можно записать

$$v_A/v_B = [A] (k_{\text{cat}}/K_M)_A / [B] (k_{\text{cat}}/K_M)_B \quad (11.1)$$

Воспользовавшись уравнениями (10.3), (10.4) и (10.10), это соотношение можно представить в виде

$$\ln (k_{\text{cat}}/K_M) = \ln (kT/h) - (\Delta G_0^\ddagger + \Delta G_b), \quad (11.2)$$

где ΔG_0^\ddagger — энергия активации для стадии химического превращения субстрата, а ΔG_b — энергия связывания переходного состояния субстрата ферментом.

Если дополнительная группа R субстрата А не претерпевает химического превращения в ходе данной реакции, то ΔG_0^\ddagger для А и В будет одинакова, если не принимать во внимание индукционные эффекты. В таком случае, положив разность энергий связывания равной $\Delta\Delta G_b$, из уравнения (11.2) получаем

$$(k_{\text{cat}}/K_M)_A / (k_{\text{cat}}/K_M)_B = \exp(-\Delta\Delta G_b/RT), \quad (11.3)$$

где $\Delta\Delta G_b$ — отрицательная величина.

Уравнение (11.3) дает *максимальный* эффект, к которому может привести связывание дополнительной группы. Если при переходе от А к В лимитирующей становится другая стадия, то энергия активации уменьшается на величину, меньшую $\Delta\Delta G_b$.

Кроме того, если в случае субстрата В наряду с тем способом связывания и химического превращения, которые реализуются в случае субстрата А, существуют иные, это будет приводить к увеличению суммарной скорости реакции.

Как мы увидим, высказанное ранее предположение о том, что специфичность обуславливают перечисленные ниже механизмы, не подтверждается.

а. Деформация

Как было показано в гл. 10, деформация не влияет на величину k_{cat}/K_M , так как вызывает одинаковые изменения k_{cat} и K_M .

б. Индуцированное соответствие

В той же гл. 10 указывалось, что в случае индуцированного соответствия отношение k_{cat}/K_M равно просто отношению k_{cat}/K_M для активной конформации, деленному на постоянный для всех субстратов коэффициент [уравнения (10.14) и (10.17)]. Индуцированное соответствие не изменяет значения k_{cat}/K_M по

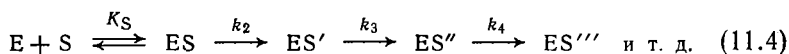
сравнению с соответствующей величиной для случая, когда весь фермент находится в активной конформации, и, следовательно, не влияет на специфичность.

в. Непродуктивное связывание

Согласно данным гл. 3, разд. Д, при непродуктивном связывании отношение k_{cat}/K_M не изменяется, а k_{cat} и K_M уменьшаются в одинаковой степени. Специфичность, таким образом, остается прежней.

г. Последовательность реакций

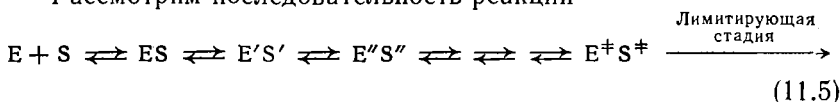
Специфичность фермента не повышается, если ферментативная реакция проходит через ряд последовательных стадий, каждая из которых характеризуется энергией $\Delta\Delta G_b$. Проще всего понять этот факт, обратившись к гл. 3, разд. Е, откуда станет ясно, что для реакции (11.4) отношение k_{cat}/K_M всегда равно k_2/K_S независимо от числа промежуточных стадий.



2. Общий случай

Для анализа вклада энергии связывания в свободную энергию активации для каталитической стадии в общем случае можно использовать следующий формальный термодинамический подход.

Рассмотрим последовательность реакций



где E , E' , E'' и т. д. различные состояния фермента, а S , S' , S'' — различные состояния субстрата. Скорость реакции можно рассчитать из теории переходного состояния, пренебрегая всеми промежуточными стадиями, а просто рассматривая энергетику процесса $E + S \rightarrow E^\ddagger S^\ddagger$. Свободная энергия активации Гиббса представляет собой сумму трех составляющих: изменения свободной энергии ΔG_E^\ddagger , представляющего собой разность энергий состояний E^\ddagger и E , ΔG_S^\ddagger — разности энергий состояний S^\ddagger и S и ΔG_b — энергии связывания E^\ddagger и S^\ddagger .

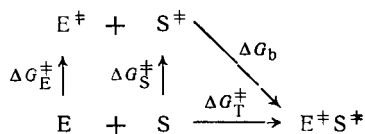


Схема I

Из термодинамического цикла, представленного на схеме I, видно, что энергия активации $\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger}$ равна

$$\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} = \Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} + \Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} + \Delta G_{\ddagger}^{\ddagger}. \quad (11.6)$$

Согласно теории переходного состояния, скорость реакции определяется выражением

$$v = (kT/h) [E] [S] \exp [-(\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} + \Delta G_{\ddagger}^{\ddagger} + \Delta G_{\ddagger}^{\ddagger})/RT]. \quad (11.7)$$

Относительные скорости реакций с участием субстратов А и В можно получить, подставив значения энергии Гиббса для А и В в уравнение (11.7) и взяв отношение скоростей:

$$v_A/v_B = ([A]/[B]) \exp [-(\Delta \Delta G_b + \Delta G_A^{\ddagger} - \Delta G_B^{\ddagger})/RT]. \quad (11.8)$$

Разность в энергиях связывания субстратов А и В, $\Delta \Delta G_b$, входит в уравнение только один раз. $\Delta \Delta G_b$ нельзя увеличить, суммируя соответствующие величины для каждой из стадий. Специфичность, обусловленная $\Delta \Delta G_b$, просто «распределяется» по этим стадиям.

Для подобных субстратов ΔG_A^{\ddagger} будет близка к ΔG_B^{\ddagger} , так что

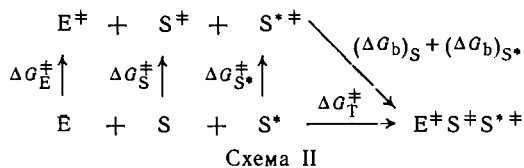
$$v_A/v_B = ([A]/[B]) \exp (-\Delta \Delta G_b/RT) \quad (11.9)$$

Этот подход можно использовать и для анализа связывания обычных косубстратов, например NAD^+ или АТФ. Происходящие при этом изменения энергии Гиббса сокращаются, как и в случае с $\Delta G_{\ddagger}^{\ddagger}$ при определении отношения скоростей из уравнения (11.7) или аналогичного ему уравнения.

3. Взаимодействующие активные центры

Может ли увеличиться специфичность при связывании с ферментом, имеющим несколько центров связывания, более чем одной молекулы субстрата? Такая возможность не исключается для систем *in vitro*, когда присутствует только один субстрат и анализируется абсолютная скорость, а не различие между субстратами. Однако в реальных биологических системах, где имеются специфические и конкурирующие субстраты, специфичность увеличиваться не может, поскольку в реакции участвуют смешанные комплексы, содержащие фермент и оба субстрата. Это можно показать с помощью формальных термодинамических выкладок. Рассмотрим случай, когда реакционной способностью обладает половина активных центров, и одна молекула субстрата, S^* , связывается с ферментом, но не претерпевает химических превращений с образованием продукта в отличие от

второй молекулы, S. Сравнение скоростей реакций с участием пары комплексов, например E.A.A* с E.B.A*, показывает, что дополнительная энергия при связывании большего по размеру субстрата, $\Delta\Delta G_b$ используется только «один раз».



Согласно теории переходного состояния, выражение для скорости имеет вид

$$v = (kT/h) [E] [S] [S^*] \exp \left[- \left(\Delta G_E^\ddagger + \Delta G_S^\ddagger + \Delta G_{S^*}^\ddagger + (\Delta G_b)_S + (\Delta G_b)_{S^*} \right) / RT \right] \quad (11.10)$$

Если субстрат А связывается прочнее, чем субстрат В из-за различия в структуре, обуславливающего разный вклад в энергию связывания $\Delta\Delta G_b$, и если v_{AB^*} — скорость реакции для случая, когда субстрат А связывается с центром, осуществляющим химические превращения, а В — с другим центром, то, подставляя выражение для энергии Гиббса в уравнение (11.7) и полагая $\Delta G_A^\ddagger = \Delta G_B^\ddagger$, получаем

$$v_{AA^*} / v_{BA^*} = ([A]/[B]) \exp(-\Delta\Delta G_b / RT) \quad (11.11)$$

и

$$v_{AB^*} / v_{BB^*} = ([A]/[B]) \exp(-\Delta\Delta G_b / RT), \quad (11.12)$$

так что

$$(v_{AA^*} + v_{AB^*}) / (v_{BA^*} + v_{BB^*}) = [A]/[B] \exp(-\Delta\Delta G_b / RT). \quad (11.13)$$

При образовании смешанных комплексов А и В с ферментом специфичность не может увеличиться в результате одновременного связывания двух молекул субстрата. Связывание А дает больший вклад в скорость каталитической стадии, чем присоединение В к некаталитическому центру, однако в смешанном комплексе EAB связывание А повышает активность в такой же степени, как и в двойном комплексе EA.

4. Стереохимическая природа специфичности

Специфичность в отношении конкурирующих субстратов зависит от относительной прочности связывания ферментом их переходных состояний. Комплементарность фермента переходному состоянию субстрата позволяет достичь максимально высокой специфичности, поскольку этим обеспечивается оптималь-

ное связывание переходного состояния. Кроме того, комплементарность является признаком оптимальности значения k_{cat}/K_m , что вполне естественно, поскольку специфичность фермента определяется этим параметром. Максимизация скорости сопровождается максимизацией специфичности.

Причина, по которой гексокиназа предпочитает фосфорилировать глюкозу, а не воду, заключается в том, что глюкоза в отличие от воды хорошо связывается в переходном состоянии. Каким бы ни был механизм этой реакции (деформация или индуцированное соответствие), исход конкуренции между глюкозой и водой будет одинаковым. Если допустить, что V_{max} для фосфорилирования глюкозы и воды одинакова, а энергия связывания глюкозы используется на уменьшение K_m , то глюкоза будет фосфорилироваться эффективнее благодаря тому, что активный центр предпочитательнее связывает именно глюкозу. Если бы вся энергия связывания глюкозы использовалась для понижения энергии активации стадии, определяющей V_{max} , это также привело бы к более эффективному ее фосфорилированию вследствие повышения реакционной способности этого соединения при связывании.

Существуют, однако, случаи, когда механизмы деформации или индуцированного соответствия оказывают ощутимое влияние на специфичность. Эти механизмы не имеют значения, когда между субстратами существует конкуренция. Если же никаких специфических субстратов нет, указанные механизмы могут уменьшить абсолютную активность фермента в отношении, скажем, воды. Так, например, механизм индуцированного соответствия способен предотвратить превращение гексокиназы в «агрессивную» АТРазу в *отсутствии* глюкозы (хотя такое отсутствие крайне маловероятно).

Б. Сверхспецифичность и механизмы корректирования

1. Синтез белков

Ограничения, налагаемые на специфичность различиями в энергии связывания, не обеспечивают должной точности работы некоторых биологических систем.

Например, клетка не смогла бы существовать, если бы точность процессов репликации и синтеза белка определялась только описанными выше факторами. Наличие добавочной метиленовой группы у изолейцина может привести к превышению скорости реакции этого соединения с изолейцил-тРНК—синтетазой над скоростью соответствующей реакции с участием валина в 100—200 раз. С учетом того, что концентрация валина *in vivo*

в пять раз выше, чем концентрация изолейцина, это могло бы дать ошибку в скорости, равную 1/20—1/40. Однако установлено, что суммарная ошибка в скорости для валина, ошибочно занявшего

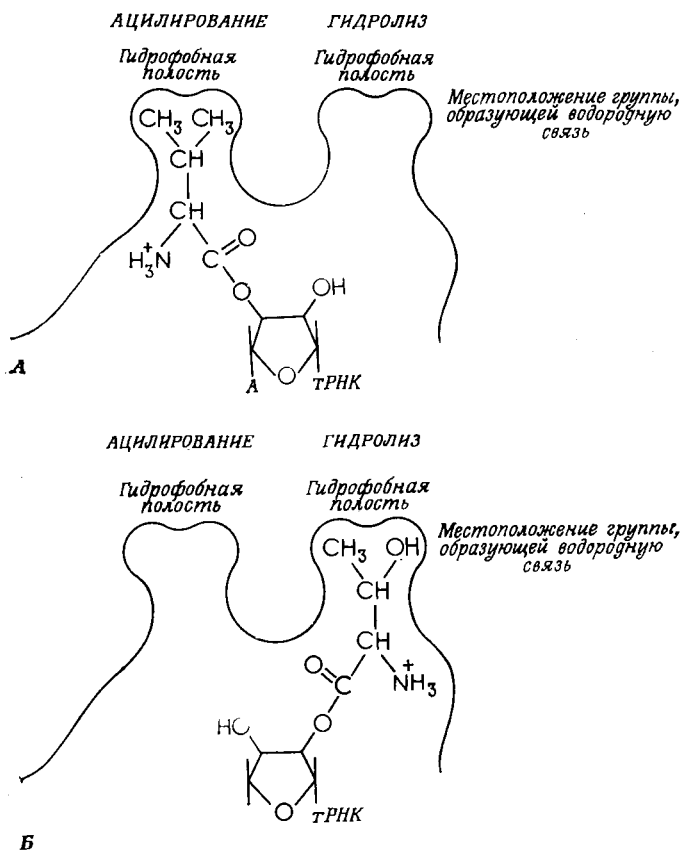
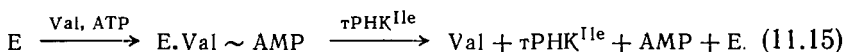
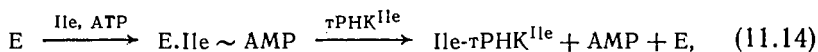


Рис. 11.2. Возможный механизм специфичности, направленный на предотвращение неправильного ацилирования тРНК^{Val} треонином. А. Гидрофобный центр ацилирования, избирательно связывающий треонин. Б. Гидролитический центр использует энергию связывания гидроксильной группы треонина для связывания или катализа. Как показано на рисунке, ацильная группировка перемещается из положения 2' в положение 3' [3].

в белке место изолейцина, составляет только 1/3000 [1]. Эта сверхспецифичность обусловлена наличием *корректирующего механизма* (editing mechanism). Изолейцил-тРНК—синтетаза не только выполняет свои обычные биосинтетические функции, но и обладает гидролитической способностью. Параметр k_{cat}/K_M для образования связанного с этим ферментом валил-

аденилата будет примерно в 150 раз меньше, чем при образовании изолейциладенилата. Однако в то время как присоединение тРНК^{Ile} к правильному комплексу ведет к образованию Ile-тРНК^{Ile}, при присоединении неправильного комплекса валиладенилата образуются валин и АМР, а не Val-тРНК^{Ile} [2]. В присутствии валина, АТР и тРНК^{Ile} изолейцил-тРНК-синтетаза функционирует как АТР-пирофосфатаза — непроизводительно, но по необходимости гидролизует АТР до АМР.



Для реакции отщепления треонина валил-тРНК-синтетазой удалось установить механизм специфичности (гл. 7. разд. Г) [3]. Этот фермент имеет отдельный гидролитический центр для

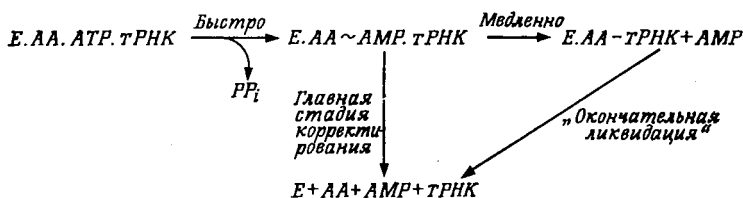


Рис. 11.3. Один из вариантов механизма «двойного сита», в котором стадия корректирования предшествует стадии переноса аминокислоты на тРНК.

гидролиза Thr-тРНК^{Val} и образует треониладенилатный комплекс с k_{cat}/K_M примерно в 600 раз меньшей, чем при образовании валиладенилата. Thr-тРНК^{Val} очень быстро гидролизуются с числом оборотов 40 с⁻¹. Val-тРНК^{Val} гидролизуются медленно, число оборотов составляет лишь 0,015 с⁻¹. Ясно, что гидролитический центр фермента для обеспечения специфического связывания треонина должен быть способен образовать водородную связь с гидроксильной группой последнего. Гидрофобный валин связывается с гидролитическим центром значительно слабее, гидролизуясь приблизительно в 3000 раз медленнее. В процессе эволюции природа создала специфический механизм использования структурного различия, реализующийся в двух случаях: один раз — для узнавания нужного субстрата на стадии биосинтеза, а другой — для узнавания неправильного субстрата на стадии расщепления (рис. 11.2).

Наиболее сложен процесс распознавания изолейцила и валина таким ферментом, как изолейцил-тРНК-синтетаза. Дело в том, что в *E.coli* содержание валина в пять раз превышает

содержание изолейцина [4]. В этом случае может иметь место механизм двойного контроля, при котором большая часть валиладенилата деградирует еще до переноса к тРНК^{Ile}. Далее изолейцил-тРНК—синтетаза использует свою гидролитическую

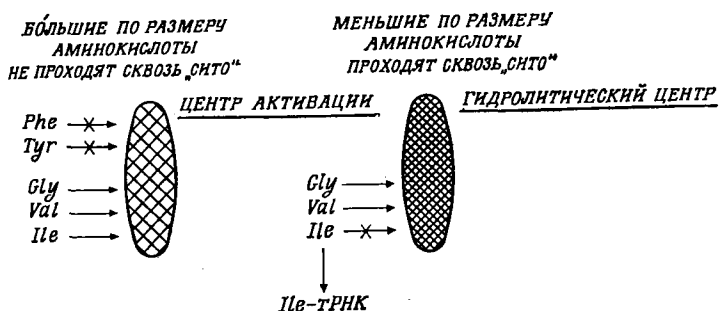


Рис. 11.4. Механизм «двойного сита», моделирующий процесс корректирования работы изолейцил-тРНК—синтетазы. Активный центр, где происходит образование аминокладенилата, «отторгает» аминокислоты, большие, чем изолейцин, и связывает меньшие по размеру аминокислоты. Аналогичным образом гидролитический центр, размеры которого достаточны для связывания валина, отторгает изолейцин и присоединяет валин и все меньшие по размеру аминокислоты.

активность, ликвидируя все молекулы Val-тРНК^{Ile}, которым удалось пройти через первый «пропускной пункт» [5]. Этот механизм аналогичен «двойному сити» (рис. 11.4).

2. Механизм корректирования при репликации ДНК [6]

Процесс репликации ДНК характеризуется чрезвычайно высокой точностью. Частота мутации для *E. coli* составляет 10^{-6} — 10^{-8} , и, следовательно, точность репликации ДНК либо равна указанным величинам, либо еще больше [7]. Это подтверждается результатами исследования *in vitro* ДНК-полимеразы из *E. coli* и фага Т4, согласно которым вероятность ошибки составляет менее 10^{-5} [7, 8]. Такая точность обеспечивается сложной системой корректирующих механизмов.

Основное различие между процессами синтеза белка и ДНК состоит в том, что в последнем случае исправить ошибку относительно легко. При синтезе белка растущий конец полипептидной цепи активируется и переносится к следующей в цепи аминокислоте. В этом случае удалить неправильный аминокислотный остаток и «реактивировать» полипептид невозможно. Ошибку необходимо исправить до полимеризации. При синтезе

же ДНК активируется мономерный нуклеотид, присоединяющийся к неактивированной растущей цепи. Это позволяет исправить ошибку уже после завершения полимеризации.

Молекула ДНК синтезируется в направлении $5' - 3'$ (нуклеотиды присоединяются к $3'$ -гидроксильной группе полинуклеотида), а все ДНК-полимеразы прокариот расщепляют цепь в направлении $3' - 5'$ (рис. 11.6). Имеются веские данные в пользу наличия механизма **вырезания** ошибочно присоединенных

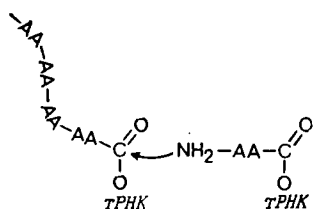


Рис. 11.5. В процессе синтеза молекулы белка происходит перемещение активированной полипептидной цепи к следующему аминокислотному остатку.

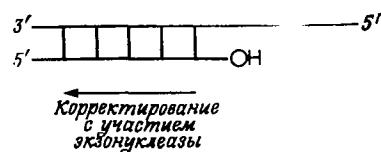
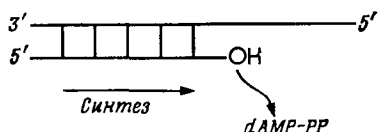


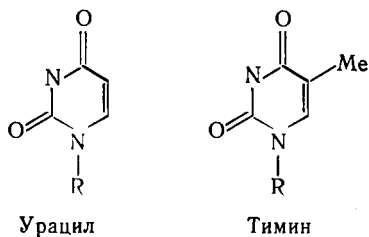
Рис. 11.6. В ходе синтеза молекулы ДНК происходит присоединение активированного дезоксирибонуклеотиднофосфата к $3'$ -гидроксильной группе растущей цепи. Корректирование происходит в обратном направлении.

оснований с участием этого фермента. Во-первых, показано, что экзонуклеаза наиболее эффективно гидролизует участки, содержащие ошибочные основания, а также одноцепочечную ДНК [9, 10]. Во-вторых, частота мутаций у фага Т4 коррелирует с экзонуклеазной активностью, проявляемой ДНК-полимеразой. Штаммы, обладающие очень высокой скоростью мутации, синтезируют ДНК-полимеразу с низкой экзонуклеазной активностью (табл. 11.1) [7]. Штаммы, устойчивые к мутациям, обладают высокой экзонуклеазной активностью. Из табл. 11.1 видно, что эти штаммы гидролизуют расточительно большое количество дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, чтобы включить единственное основание [11]. В-третьих, обратная транскриптаза из РНК-содержащего вируса миелобластомы птиц, которая синтезирует ДНК с использованием РНК в качестве матрицы, не обладает $3' - 5'$ -экзонуклеазной активностью и частота неправильного включения цитидина составляет 1/600

[8]. Следует отметить, что корректирование должно осуществляться полимеразой, а не репарирующим ферментом, включающимся на следующей стадии, поскольку при синтезе двухцепочечной ДНК нельзя было бы выяснить, какое именно из двух спаренных оснований было включено по ошибке.

Механизм корректирования при репликации ДНК должен несколько отличаться от механизма, используемого в случае аминоксил-тРНК—синтетаз: для выполнения своей функции в процессе биосинтеза ДНК-полимераза должна обладать способностью связывать все четыре дезоксирибонуклеотида, следовательно, она не может иметь специальный центр связывания для ошибочного основания (как, например, валил-тРНК—синтетаза, имеющая центр связывания для треонина).

Нарушения первичной структуры ДНК могут быть обусловлены не только ошибками в работе синтезирующего аппарата; они возникают под действием рентгеновского излучения и ультрафиолетового света, в результате химической модификации оснований. В этих случаях ошибка исправляется с помощью механизма вырезания дефектного участка, замещения его при участии полимеразы и сшивания концов цепи ДНК-лигазой [6]. Ошибочно включенное основание распознается благодаря тому, что оно химически отличается от четырех обычно присутствующих в ДНК оснований. Имеется система, способная выщеплять остатки дезоксиуридина, ошибочно включенные вместо тимидина [12]. Здесь можно провести аналогию с распознаванием изолейцина и валина при синтезе белка, поскольку урацил отличается от тимина тем, что последний содержит метильную группу.



Урацил удаляется из молекулы ДНК с помощью урацилгликозидазы, которая отщепляет это основание от сахарного кольца. Механизм действия данного фермента аналогичен механизму действия изолейцил-тРНК—синтетазы, гидролизующей Val-тРНК^{Ile}. В обоих случаях гидролитический центр слишком мал, чтобы вместить субстрат, содержащий дополнительную метильную группу, благодаря чему этот субстрат остается неповрежденным. Коррекция при синтезе ДНК осуществляется

Таблица 11.1

Корреляция между частотой мутации и экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы фага Т4 [11]

Штамм	Фенотип	$\frac{\text{Количество гидролизованного dTTP}}{\text{Количество включенного dTMP}}$
L56	Высокая частота мутаций	0,005
L98	То же	0,01
74D	Дикий тип	0,04
L42	Низкая частота мутаций	1,6
L141	То же	13

отдельным ферментом, так как ошибку можно исправить по завершении полимеризации. Поскольку в случае синтеза белков такая роскошь непозволительна, гидролитическая функция возлагается на синтетазу, так что исправление ошибки должно произойти до того, как неправильно ацилированная тРНК покинет этот фермент [13].

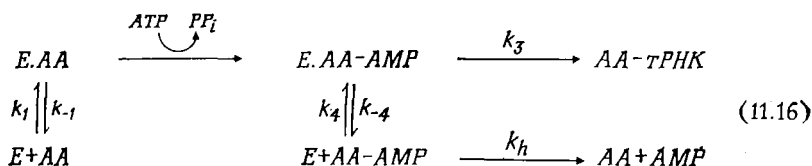
3. «Кинетическое корректирование»

Основное условие функционирования корректирующего механизма состоит в том, что в ходе реакции должно образовываться легко гидролизующееся промежуточное соединение или продукт.

Корректирование осуществляется введением в реакционный путь ответвления, обеспечивающего гидролиз нежелательных соединений. Как мы видели, в реакции аминоацилирования тРНК с участием аминоацил-тРНК-синтетазы в этом процессе участвует особый гидролитический центр фермента, где гидролизуется неправильно ацилированная тРНК, а возможно, и предшественник аминоациладенилата.

Хопфилд [14] предложил специфический химический механизм, который в принципе может использоваться для коррекции,— кинетическое корректирование. Отличительной чертой этого механизма является отсутствие у фермента гидролитического центра; нежелательные промежуточные соединения диффундируют в раствор, где подвергаются неферментативному гидролизу. Принципы действия кинетического корректирования можно проиллюстрировать, рассмотрев гипотетический процесс аминоацилирования тРНК [схема (11.16)] (хотя, как было показано выше, в этом случае на самом деле имеет место не кинетическое

корректирование, а механизм «двойного сита» с участием особого гидролитического центра):



При гидролизе АТФ образуется высокоэнергетическое промежуточное соединение — аминоациладенилат. Фермент-содержащее промежуточное соединение может либо реагировать с тРНК с образованием продуктов, либо диффундировать в раствор и гидролизироваться. Если имеет место кинетическое корректирование, ошибочное промежуточное соединение (например, комплекс валиладенилата с изолейцил-тРНК—синтетазой) диффундирует в раствор и гидролизуется быстрее, чем успевает прореагировать с образованием продуктов, т. е. $k_3 \ll k_{-4}$. Для «правильного» промежуточного соединения $k_3 > k_{-4}$ и имеет место образование продуктов. Следовательно, более прочное связывание специфического субстрата используется дважды: первый раз при связывании субстрата с образованием комплекса Михаэлиса и второй — при связывании промежуточного соединения. Таким образом, если избирательность для первой стадии обозначить через f , то при условии, что для второй стадии она может достичь того же значения, мы получаем в итоге избирательность f^2 . Однако чтобы избирательность на второй стадии достигла максимального значения, f , для *правильного* субстрата k_3 должно быть меньше k_{-4} , так что эффективность его образования будет низкой. Эти ограничения не распространяются на механизмы двойного сита (рис. 11.4), поскольку из-за наличия у фермента отдельного гидролитического центра структурное различие между двумя субстратами может использоваться на двух этапах. Так, например, при удалении валина с помощью изолейцил-тРНК—синтетазы преимущественное связывание изолейцина (а не валина) с центром аминокислотирования обуславливается тем, что изолейцин больше по размерам, чем валин. С другой стороны, благодаря меньшим размерам валин легче связывается с центром, где происходит деградация, связывание же изолейцина с этим центром стерически затруднено. В механизме кинетического корректирования различия между двумя субстратами также используются дважды. Пока четких данных о выполнимости этого механизма нет, однако в принципе он весьма интересен и правдоподобен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lofthield R. B., Vanderjagt M. A.*, *Biochem. J.*, **128**, 1353 (1972).
2. *Baldwin A. N., Berg P.*, *J. biol. Chem.*, **241**, 831 (1966).
3. *Fersht A. R., Kaethner M.*, *Biochemistry*, **15**, 3342 (1976).
4. *Raunio P., Rosenqvist H.*, *Acta chem. Scand.*, **24**, 2737 (1970).
5. *Fersht A. R.*, *Biochemistry*, **16**, 1025 (1977).
6. *Kornberg A.*, *DNA synthesis*, Freeman W. H. and Co., (1974). [Имеется перевод: Корнберг А. Синтез ДНК. — М.: Мир, 1977.]
7. *Hall Z. W., Lehman I. R.*, *J. molec. Biol.*, **36**, 321 (1968).
8. *Battula N., Loeb L. A.*, *J. biol. Chem.*, **249**, 408 (1974); **250**, 4405 (1975).
9. *Brutlag D., Kornberg A.*, *J. biol. Chem.*, **247**, 241 (1972).
10. *Koessel H., Roychoudhury R.*, *J. biol. Chem.*, **249**, 4094 (1974).
11. *Muzyczka N., Poland R. L., Bessman M. J.*, *J. biol. Chem.*, **247**, 7116 (1972).
12. *Lindahl T.*, *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **71**, 3649 (1974).
13. *Ninio J.*, *Biochimie*, **57**, 587 (1975).
14. *Hopfield J. J.*, *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **71**, 4135 (1974).

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

В этой главе мы рассмотрим механизм действия большинства ферментов, кристаллическая структура которых установлена с высоким разрешением.

Особое внимание уделено вопросу о том, как совместное использование данных кинетических и структурных исследований позволяет достаточно полно описать механизм реакций, а также тому, что дало изучение *ферментативного* катализа для развития представлений о механизме *химического* катализа. Кроме того, в этой главе рассмотрены некоторые экспериментальные подходы, используемые в энзимологии. К сожалению, мы не касаемся здесь многих весьма интересных по своим свойствам ферментов, поскольку их кристаллическая структура все еще не установлена. Охватить в такой небольшой по объему книге все ферменты невозможно — их число превышает 1500, — и мы включили в данную главу только те из них, для которых можно связать трехмерную структуру с механизмом действия фермента.

Детали механизма действия большинства этих ферментов более или менее известны. Установлено, например, наличие и положение каталитических групп и последовательность химических превращений в ходе реакции (хотя и не для всех случаев). Лучше всего изучены реакции, протекающие с образованием промежуточных соединений, которые можно выделить и охарактеризовать. Это не только дает представление о механизме химических превращений, но и позволяет сразу получить важную информацию о положении субстрата относительно каталитических групп фермента.

Основной задачей структурного исследования является определение структуры фермент-субстратного комплекса. Без этого невозможно уяснить себе детали ферментативного процесса (например, определить, деформируются ли в ходе реакции фермент и субстрат) и точно установить положение субстрата относительно каталитических групп. Сама по себе структура фермента дает только основу, позволяющую строить различные ги-

потезы. К сожалению, как уже отмечалось в гл. 1, установить структуру продуктивных комплексов между ферментом и субстратом, как правило, не удается, а потому приходится использовать соединения, являющиеся аналогами субстратов, и прибегать к построению моделей. Недостаток данного подхода состоит в том, что можно не заметить такие эффекты, как напряжения и деформации. Иногда (например, в случае рибонуклеазы) структура аналога очень близка к структуре природного субстрата. В редких случаях (для трипсина и триозофосфатизомеразы) положение равновесия между субстратом и продуктом таково, что оно позволяет установить структуру продуктивного комплекса.

Очень важно иметь в виду следующее. Интерпретируя свои экспериментальные данные, исследователи нередко переоценивают их надежность и делают необоснованные выводы. Так, например, при анализе рентгенографических данных один исследователь может придавать большое значение каким-то изменениям на карте электронной плотности, а другой рассматривать их как артефакт. Наихудшие интерпретаторы из всех — это те, кто интерпретируют интерпретацию других.

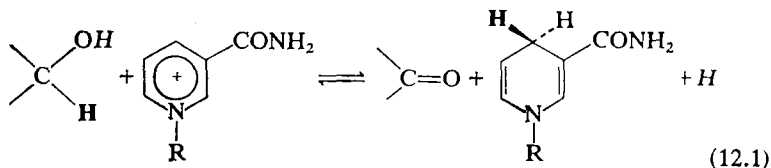
В подготовке данной главы существенную помощь мне оказали мои коллеги, позволившие привести свои неопубликованные данные. В связи с этим хотел бы выразить благодарность следующим ученым (их фамилии приведены в алфавитном порядке): Брэндену С.-И., Дутлеру Х. и Плэппу Б. (алкогольдегидрогеназа); Байсекеру Г. и Уонакотту А. (глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа); Петско Г. (эластаза); Андреевой Н. С., Антонову В. К. и Гофману Т. (пепсин); Ноулсу Р. и Филлипсу Д. (триозофосфатизомеразы); Уотсону Х. (фосфоглицеромутаза).

А. Дегидрогеназы

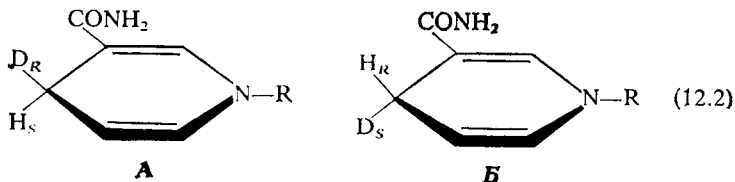
Дегидрогеназы, которые мы рассмотрим в данном разделе, катализируют окисление спиртов до карбонильных соединений. В роли коферментов для них выступают либо NAD^+ , либо $NADP^+$. Комплекс фермента и кофермента называется *голоферментом*, тогда как свободный фермент именуется апоферментом. Некоторые дегидрогеназы специфичны лишь к одному из этих коферментов, когда как другие используют оба. Реакции, катализируемые дегидрогеназами, легко обратимы, так что карбонильные соединения могут быть легко восстановлены с помощью $NADH$ или $NADPH$. Скорости как прямых, так и обратных реакций очень просто измерить по появлению или исчезновению восстановленного кофермента, который имеет характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области с максимумом

при $\lambda = 340$ нм. Кроме того, восстановленные коферменты при освещении их светом с длиной волны 340 нм флуоресцируют, что дает еще более чувствительный способ их регистрации.

Химическая сторона процесса восстановления NAD^+ была изучена в ходе весьма элегантных экспериментов [1]. Окисление спирта сопровождается отщеплением двух атомов водорода. Один из них переносится непосредственно в положение 4 никотинамидного кольца NAD^+ , другой высвобождается в виде протона [2, 3]. Обычно считают, что водород переносится в виде



гидрид-иона H^- (однако не исключено, что образуется промежуточное соединение, являющееся радикалом). Этот перенос стереоспецифичен. Использование дейтерированных субстратов позволило установить, что одни дегидрогеназы переносят водород на одну сторону никотинамидного кольца, а другие — на противоположную [схема (12.2)]. Исходя из этого ферменты подразделяются на два класса — А и В (табл. 12.1) (см. также гл. 2, разд. 3).

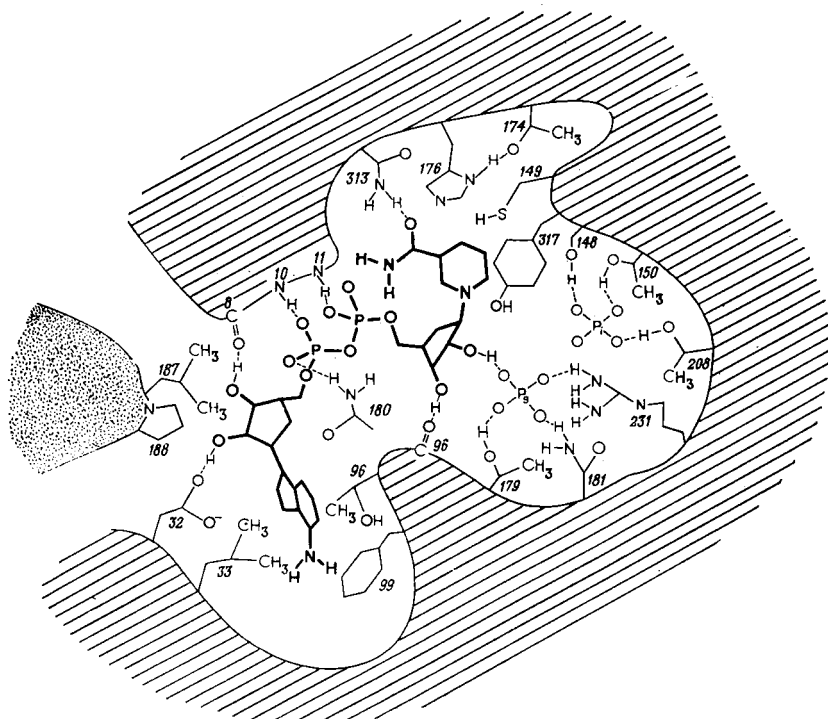


Структура некоторых дегидрогеназ установлена. Эти ферменты, их физические и кинетические свойства подробно рассмотрены в работах [4—8]. Приведенные данные позволяют сделать некоторые выводы. Как говорилось в конце гл. 1, в субъединицах фермента можно выделить два домена: каталитический домен, структура которого существенно различается для разных дегидрогеназ, и домен, связывающий нуклеотид и характеризующийся тем, что его полипептидная цепь уложена одинаковым для всех дегидрогеназ образом. Детали структуры этого домена варьируют от фермента к ферменту, однако во всех случаях кофермент присоединяется в развернутой конформации (рис. 12.1). Наиболее важное изменение касается способа расположения никотинамидного кольца: для ферментов разных классов (А и В) оно обращено к субстрату разными сторонами.

Таблица 12.1

Стереоспецифичность коферментов некоторых дегидрогеназ

Дегидрогеназы	Необходимый кофермент	Стереоспецифичность (класс)
Глутаматдегидрогеназа	NAD^+ или NADP^+	В
Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа	NADP^+	В
3-глицерофосфат—дегидрогеназа	NAD^+	В
Глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа	»	В
Малатдегидрогеназа (растворимая)	»	А
Алкогольдегидрогеназа	»	А
Лактатдегидрогеназа	»	А
Изоцитратдегидрогеназа	NADP^+	А

Рис. 12.1. Связывание NAD^+ глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой из *Bacillus stearothermophilus* [58].

1. Алкогольдегидрогеназы [5]

Алкогольдегидрогеназы — это цинксодержащие металлоферменты, окисляющие широкий круг алифатических и ароматических спиртов до соответствующих альдегидов и кетонов и использующие в качестве кофермента NAD^+ [см. схему (12.11)]. Наиболее детально изучены две алкогольдегидрогеназы: из дрожжей и из печени лошади. Кристаллическая структура апо- и голоферментов из печени лошади была установлена с разрешением 2,4 [9] и 4,5 Å соответственно. Молекула этого фермента представляет собой симметричный димер, состоящий из двух идентичных цепей с мол. весом 40 000. Каждая цепь содержит один центр связывания NAD^+ и два центра связывания Zn^{2+} . Непосредственное участие в катализе принимает только один из ионов цинка. Дрожжевая алкогольдегидрогеназа представляет собой тетрамер с мол. весом 145 000, каждая цепь которого связывает одну молекулу NAD^+ и один ион Zn^{2+} . Несмотря на отмеченные различия, предварительные данные по аминокислотной последовательности свидетельствуют о высокой гомологичности этих двух ферментов. Предполагается, что механизм ферментативной реакции для обоих ферментов в принципе одинаков, хотя лимитирующая стадия, рН-зависимость скорости реакции и графики Гаммета могут различаться.

а. Структура активного центра алкогольдегидрогеназы печени [5]

Ион Zn^{2+} находится на дне гидрофобного кармана, образованного в месте соединения каталитического и связывающего нуклеотид доменов. Лигандами атома цинка являются атомы серы аминокислотных остатков Cys-46 и Cys-174 и атом азота остатка His-67. Четвертым лигандом служит способная к ионизации молекула воды, связанная водородной связью с гидроксильной группой остатка Ser-48, который в свою очередь образует водородную связь с His-51. Из рН-зависимости связывания NAD^+ [10] и прямого определения количества высвобождающихся протонов при связывании NAD^+ [11] следует, что pK_a функциональной группы апофермента равен 9,6, тогда как в голоферменте эта величина составляет $\sim 7,6$. Кристаллографические исследования позволяют предположить, что ионизируется связанная с цинком молекула воды. Никотинамидное кольцо прочно связывается в непосредственной близости от иона цинка на дне гидрофобного кармана.

б. Структура фермент-субстратного комплекса

Структура реакционноспособных тройных комплексов фермент — NAD^+ — спирт и фермент — NADH — альдегид (или ке-

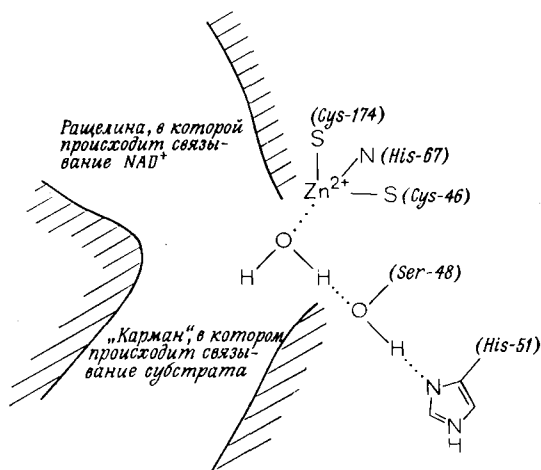


Рис. 12.2. Схематическое изображение активного центра алкогольдегидрогеназы из печени лошади. (С любезного разрешения С.-I. Brändén.)

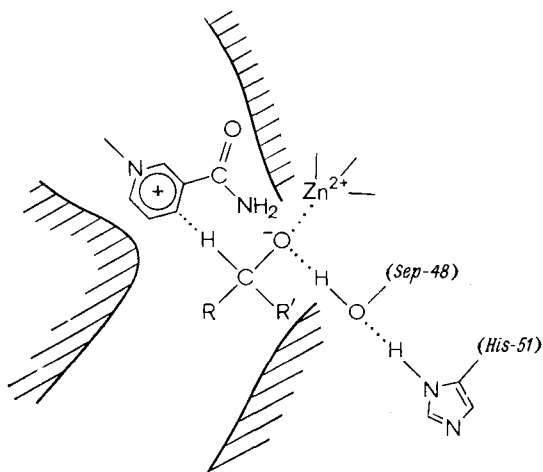
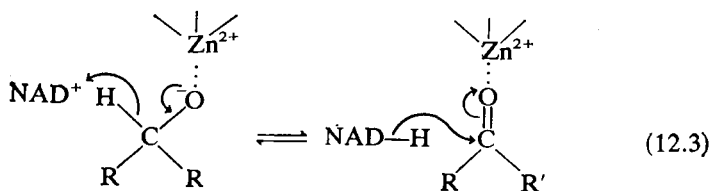


Рис. 12.3. Модель продуктивного тройного комплекса алкогольдегидрогеназы из печени лошади. Предполагается, что ионизированный спирт замещает связанную с цинком молекулу воды, изображенную на рис. 12.2. (С любезного разрешения С.-I. Brändén.)

тон) была определена не прямым способом, а с помощью построения моделей. Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что атом кислорода спирта или альдегида (кетона) непосредственно присоединен к иону цинка, а гидрофобная боковая цепь связывается с гидрофобной «полостью» кармана [5]. Эта гипотеза подтверждается проведенными недавно с помощью построения моделей исследованиями взаимозависимости структуры и реакционной способности для ряда замещенных производных циклогексанов [12], спектроскопическими данными [13] и данными по связыванию [14], показывающими, что карбонильная группа присоединяется непосредственно к положительно заряженному или кислотному центру (при введении заместителей, являющихся донорами электронов, в спектре альдегида происходят соответствующие изменения, а связывание замещенных бензальдегидов становится более прочным).

Координационное число для иона Zn^{2+} и состояние ионизации спирта в тройном комплексе точно не известны. Согласно одной гипотезе, спирт замещает присоединенную к цинку молекулу воды или гидроксил-ион и связывается в виде ионизированного алколят-иона [5]:



По мнению других авторов [15], недиссоциированный спирт присоединяется к иону Zn^{2+} без замещения молекулы воды; координационное число цинка возрастает до 5.

Модель тройного комплекса построена исходя из следующих межатомных расстояний: расстояние между ионом Zn^{2+} и С-1-атомом спирта равно 3,3 Å; расстояние от Zn^{2+} до центра никотинамидного кольца — 4,5 Å; расстояние между С-1-атомом спирта и С-4-атомом никотинамидного кольца составляет 3,5 Å [12].

в. Кинетический механизм

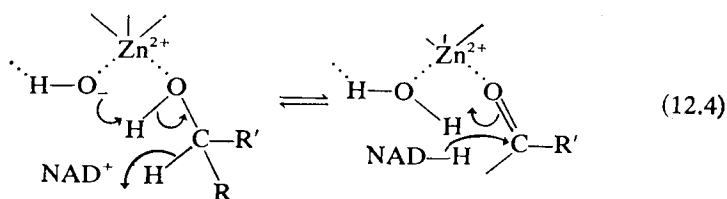
Исследования дегидрогеназы из печени лошади, проведенные с использованием методов стационарной кинетики и методом остановленной струи, рассматриваются теперь как классические экспериментальные работы. Они позволили установить, что окисление спиртов представляет собой упорядоченный процесс,

первой стадией которого является связывание кофермента, а лимитирующей стадией — диссоциация комплекса фермент — NADH [10, 16, 17]. И теория переходного состояния, и данные стационарной кинетики показывают, что образующийся комплекс фермент—NAD⁺ изомеризуется [17, 18]. Что касается обратной реакции, то при восстановлении ароматических альдегидов лимитирующей стадией является стадия диссоциации комплекса между ферментом и спиртом [17, 19], тогда как восстановление ацетальдегида лимитируется химической стадией (перенос гидрид-иона).

Комплексы между ферментом и продуктом для алкогольдегидрогеназы дрожжей диссоциируют довольно быстро, так что лимитирующими являются стадии химического превращения [20]. Это позволяет измерить кинетические изотопные эффекты для указанных стадий с помощью стационарной кинетики. Установлено, что окисление дейтерированных спиртов RCD₂OH и восстановление бензальдегидов дейтерированным NADH (т. е. NADD) протекают значительно медленнее соответствующих реакций с участием немеченых соединений ($k_H/k_D = 3-5$) [14, 20]. Это показывает, что перенос гидрид-иона (или дейтерид-иона) осуществляется в ходе лимитирующей стадии реакции. Измерение константы скорости переноса гидрид-иона в случае алкогольдегидрогеназы печени лошади с помощью предстационарной кинетики выявило наличие аналогичных изотопных эффектов [21, 22].

Основной момент, остающийся неясным для рассматриваемого механизма, касается координационного числа иона Zn^{2+} и состояния ионизации его лигандов. Соответствующие данные были получены при исследовании зависимости реакционной способности фермента от его структуры и pH-зависимости скорости реакции. Установлено, что k_{cat} для реакции окисления спиртов алкогольдегидрогеназой дрожжей и k_{cat} для реакции восстановления бензальдегидов алкогольдегидрогеназой печени слабо зависят от способности реагирующих атомов принимать или отдавать электроны [14, 15, 20, 23, 24]. Возможно, это обусловлено тем, что перенос гидрид-иона осуществляется по механизму общего кислотно-основного катализа (т. е. образующийся при переносе гидрид-иона заряд нейтрализуется синхронным переносом протона от кислородного атома субстрата или на этот атом). Однако никакой боковой цепи, которая находилась бы достаточно близко к субстрату, чтобы выполнять каталитическую функцию, не обнаружено. Было высказано предположение, что карбонильная группа субстрата присоединяется не к самому иону цинка, а к связанной с ним молекуле воды [25]. Хотя это согласуется с предположением о наличии общего кислотно-основного катализа, в котором связанная с цинком вода играет роль

общей кислоты, а связанный с цинком гидроксил-ион — общего основания, геометрия указанного комплекса, по-видимому, противоречит данным рентгеноструктурного анализа [26]. Согласно другой гипотезе, связанная с цинком молекула воды выполняет роль катализатора, а субстрат присоединяется координационной связью непосредственно к атому цинка. При этом предполагается, что связывание субстрата с цинком не приводит к вытеснению молекулы воды, а увеличивает координационное число цинка до пяти [уравнение (12.4)] [15].

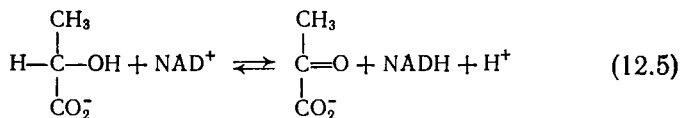


Для выяснения состояния ионизации каталитической группы была исследована рН-зависимость скорости ферментативной реакции. При окислении *n*-метилбензилового спирта, катализируемом алькогальдегидрогеназой дрожжей, k_{cat} возрастает при увеличении рН и определяется состоянием ионизации основной формы группы с $pK_a = 8,25$, тогда как при восстановлении ацетальдегида параметр k_{cat}/K_M возрастает при уменьшении рН и определяется состоянием ионизации кислой формы группы с $pK_a = 8,25$ [27]. Это не противоречит механизму (12.4), поскольку связанные с цинком молекулы воды в модельных соединениях ионизируются именно в этой области рН [28]. Значительно труднее интерпретировать рН-зависимость k_{cat} для реакций, катализируемых нативной алькогальдегидрогеназой из печени лошади. Скорость восстановления альдегидов мало изменяется в диапазоне рН от 6 до 10 [15], что можно рассматривать как довод в пользу выполнения механизма (12.3) [29]. Если имеет место механизм (12.4), то pK_a связанной с цинком молекулы воды в тройном комплексе с NADH и альдегидом должен быть относительно высоким, а pK_a связанного с цинком гидроксильного иона в тройном комплексе с NAD⁺ и альдегидом — относительно низким [15]. Аналогичным образом, если справедлив механизм (12.3), то связанный с цинком алкогальт-ион должен иметь необычно низкое значение pK_a .

Вопрос о том, обладают ли реакционной способностью все активные центры молекулы алькогальдегидрогеназы или половина их, остается открытым. Хотя этот фермент связывает два моля NAD⁺ с одинаковым сродством, считается, что в катализе участвует только один активный центр.

2. L-лактатдегидрогеназа [4, 6, 32]

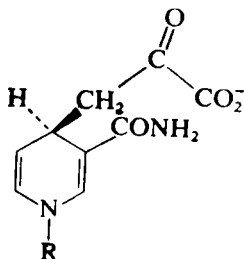
L-лактатдегидрогеназа катализирует обратимое окисление L-лактата до пирувата с использованием в качестве кофермента NAD⁺:



Этот фермент, выделенный из многих источников, представляет собой тетрамер с мол. весом 140 000. Он может существовать в двух формах: H₄, преобладающей в сердечной мышце, и M₄, преобладающей в скелетной мышце [33, 34]. Эти формы называются *изоферментами* — разными молекулярными формами одного и того же фермента. Аминокислотный состав форм M₄ и H₄ существенно различается; кинетические свойства изоферментов также неодинаковы. Несмотря на это, свойства центров ассоциации субъединиц весьма близки, поскольку вероятность образования таких гибридных форм, как M₃H, M₂H₂ и MH₃, определяется чисто статистическими факторами [35]. В ходе каталитической реакции субъединицы никак не взаимодействуют между собой, так что кинетические свойства, например, формы H₃M и смеси форм H₄ и M₄ в соотношении 3 : 1 идентичны. Кристаллическая структура апофермента, выделенного из акулы, была установлена с разрешением 2,0 Å, а его комплекса с аддуктом NAD—пируват — с разрешением 2,8 Å [36]. Молекула фермента симметрична, а субъединицы структурно эквивалентны.

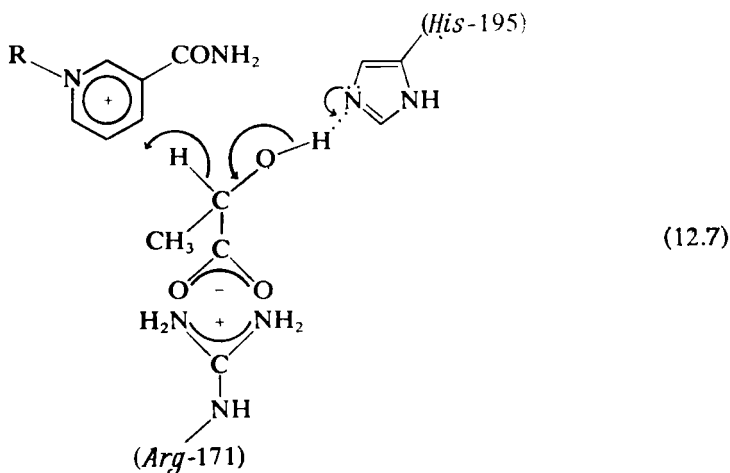
а. Структура фермент-субстратного комплекса

Структура тройных комплексов была определена из кристаллографических исследований [37] связывания аддукта NAD—пируват, который можно рассматривать как аналог связанных ковалентной связью пирувата и NADH [38]:



(12.6)

Скорее всего активные тройные комплексы имеют следующую конформацию:

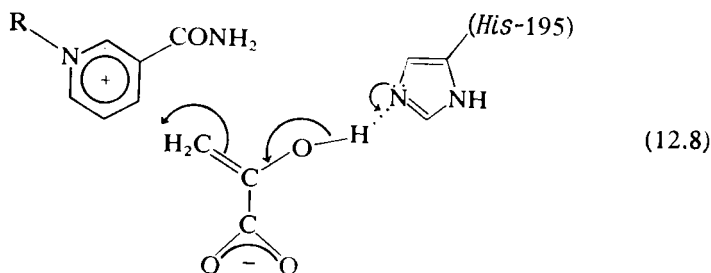


Карбоксильная группа субстрата образует ионную связь с боковой цепью Arg-171. Гидроксильная группа лактата связана водородной связью с непротонированным имидазольным кольцом His-195, в то время как карбонильная группа пирувата образует водородную связь с протонированным имидазолом. His-195 не только участвует в ориентации субстрата, но и действует как кислотно-основной катализатор, стабилизируя отрицательный заряд, который образуется на кислородном атоме пирувата в ходе реакции, и способствуя отщеплению протона от лактата при окислении.

Аддукт NAD—пируват образуется из NAD⁺ и *енольной* формы пирувата в присутствии фермента [39]¹ (в обычной реакции субстратом является *кето*-таутомер [40]). Предполагается,

¹ См. также Сугрובה Н. П., Курганов Б. И., Яковлев В. А., Молек. биология 8, 716—722 (1974); Burgner J. W., Ainslie G. R., Jr., Cleland W. W., Ray W. J., Jr., Biochemistry 17, 1646—1653 (1978); Burgner J. W., Ray W. J., Jr., Biochemistry 17, 1654—1661 (1978); Wilton D. C., Biochem. J. 177, 951—957 (1979). — *Прим. ред.*

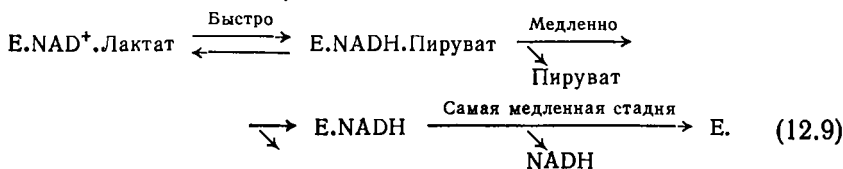
что как и при окислении лактата, в роли катализатора в этой реакции выступает His-195:



б. Кинетический механизм [6, 41]

Лактатдегидрогеназа связывает лактат или пируват только в присутствии кофермента [42]. Следовательно, имеет место упорядоченный механизм, причем первым связывается кофермент. Об этом же свидетельствуют кристаллографические данные: присоединение кофермента индуцирует конформационное изменение, при котором аминокислотные остатки в цепи от 98 до 114 перемещаются на относительно большое расстояние, приближаясь к активному центру в тройном комплексе [36, 37]. Применение методов исследования быстрых реакций показывает, что этот механизм несколько отличается от механизма действия алкогольдегидрогеназы из печени лошади, но лимитирующей стадией в обоих случаях является диссоциация комплекса E.NADH [41, 43]. В случае алкогольдегидрогеназы скорость высвобождения альдегида из тройного комплекса E.RCHO.NAD выше скорости переноса гидрид-иона, так что эти два тройных комплекса никогда не находятся в равновесии. Однако в реакциях, катализируемых лактатдегидрогеназой, перенос гидрид-иона происходит очень быстро, а пируват высвобождается медленно, и тройные комплексы находятся в равновесии. При нейтральных pH равновесие сдвинуто в сторону образования лактата и NAD⁺. При смешивании лактата с голоферментом при pH 7 в течение первой миллисекунды 20% связанного NAD⁺ восстанавливается до NADH в соответствии с положением быстро устанавливающегося равновесия между E.NAD⁺.Лактат и E.NADH.Пируват. По мере высвобождения пирувата равновесие смещается в сторону образования продуктов, так что восстанавливаются все четыре связанные молекулы NAD⁺. Затем происходит более медленное отщепление NADH,

являющееся лимитирующей стадией в стационарном состоянии:

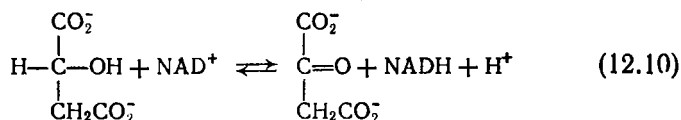


Такое поведение можно по ошибке объяснить тем, что реакционной способностью обладает половина активных центров в молекуле, однако все четыре центра, по-видимому, являются независимыми [6, 41, 43]. Связывание коферментов также происходит независимо с каждым центром.

Играющий большую роль в катализе остаток His-195 обладает необычной реакционной способностью в отношении диэтилпирокарбоната. Это дает возможность определить pK_a ($\approx 6,7$) как апо-, так и голофермента непосредственно из pH-зависимости скорости модификации [44]. Имеются данные о том, что лактат предпочтительно связывается с голоферментом, несущим неионизированный гистидин, тогда как пируват — с комплексом E.NADH, гистидин которого протонирован.

3. Малатдегидрогеназа [7]

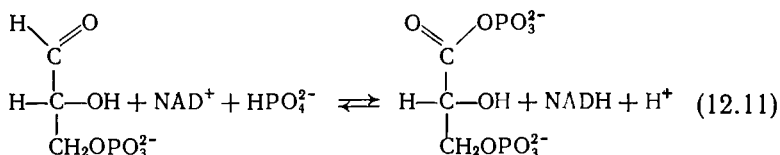
Малатдегидрогеназа катализирует обратимое окисление малата до оксалоацетата с использованием в качестве кофермента NAD^+ :



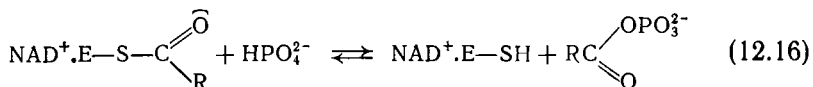
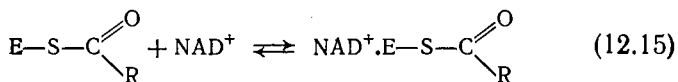
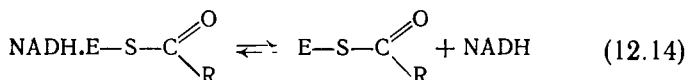
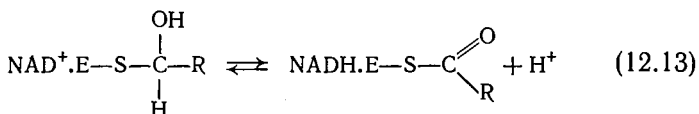
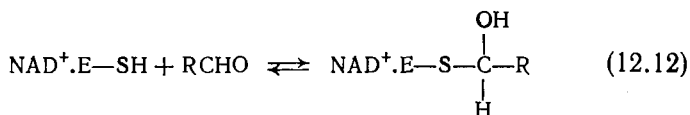
Кристаллическая структура растворимого (цитоплазматического) фермента установлена с разрешением 2,5 Å [45]. Карта электронной плотности еще не соотнесена с аминокислотной последовательностью, но, как указывалось в гл. 1, укладка полипептидной цепи фермента в принципе аналогична укладке цепи лактатдегидрогеназы, хотя малатдегидрогеназа является всего лишь димером с мол. весом 70 000. Вероятно, механизм действия обоих ферментов одинаков, поскольку малатдегидрогеназа также содержит важный для катализа остаток гистидина, который может модифицироваться диэтилпирокарбонатом [46]. Два моля NADH (или NAD^+) связываются с одинаковым сродством [47]. Кажущаяся отрицательная кооперативность при связывании кофермента, обнаруженная для одного из препаратов фермента, может быть обусловлена тем, что на самом деле в препарате присутствовали две формы [48, 49].

4. Глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа [50]

Глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа, тетрамерный фермент с мол. весом 150 000, состоит из четырех идентичных цепей; он катализирует обратимое окислительное фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-дифосфоглицерата с использованием в качестве кофермента NAD^+ :



Эта реакция протекает через несколько стадий. Адекватность механизма окислительного фосфорилирования [реакции (12.12)—(12.16)], предложенного в 1953 г. [51], подтверждается всесторонними исследованиями с привлечением данных предстационарной [52] и стационарной [53] кинетики:



В ферменте имеется реакционноспособный остаток цистеина, который легко ацилируется ацилфосфатами с образованием тиоэфира [обратное направление реакции (12.16)] [54]. Первая стадия в приведенной последовательности реакций состоит в образовании полутиоацетала между цистеином и субстратом. На этой стадии происходит превращение карбонильной группы, трудно поддающейся прямому окислению, в спиртовую группу, легко дегидрирующуюся обычным путем [реакция (12.13)].

Образовавшийся в ходе реакции (12.13) тиоэфир взаимодействует с ортофосфатом, давая ацилфосфат (12.16). Однако перенос ацильной группы происходит очень медленно до тех пор, пока NAD^+ не присоединится к ферменту [55, 56]. Поэтому обязательным этапом в последовательности приведенных выше реакций является замещение NADH на NAD^+ в ходе реакций (12.14) и (12.15). Интересно, что диссоциация комплекса ацилфермента с NADH (12.14) при насыщающих концентрациях реагента и высоком рН является лимитирующей стадией данной последовательности реакций [55]. Следствием замещения NADH на NAD^+ до высвобождения ацилфосфата является то, что свободный апофермент не принимает участие в реакции. Кроме того, поскольку ацилирование фермента дифосфатом активируется NAD^+ , голофермент инициирует восстановительное дефосфорилирование 1,3-дифосфоглицерата.

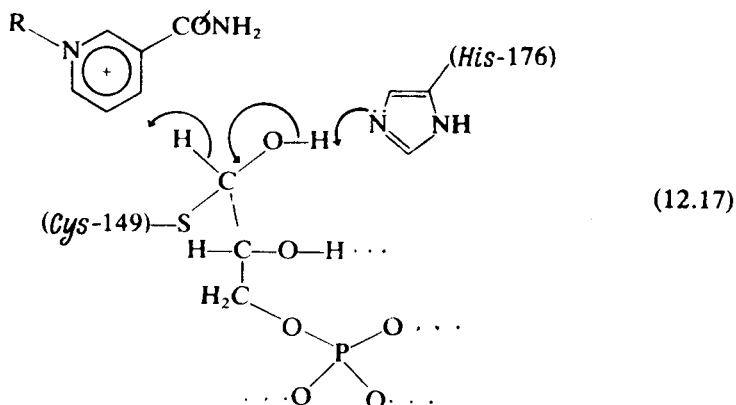
Комплексы Михаэлиса голофермента с альдегидом или дифосфоглицератом и ацилфермента с ортофосфатом в эту схему не включены, поскольку их константы диссоциации слишком высоки, чтобы могло происходить накопление комплексов.

а. Структура фермент-субстратных комплексов

Кристаллическая структура голоферментов, выделенных из омара [57] и *Bacillus steroothermophilus* [58], была установлена с разрешением 2,9 и 2,7 Å соответственно, а структура голофермента человека [59] и бактериального апофермента [58] — с низким разрешением. Структура фермент-субстратных комплексов определена с помощью построения моделей для фермента, выделенного из омара, и бактериального фермента [57, 58]. Далее мы всюду будем рассматривать только данные, касающиеся только бактериального фермента.

В активном центре бактериального фермента, полученного в кристаллической форме из раствора сульфата аммония, выявлены два центра связывания сульфат-ионов (рис. 12.1) [60]. Разумную с точки зрения химии и стереохимии схему реакции можно построить, предположив, что один из этих двух центров представляет собой центр связывания фосфатного остатка субстрата, а другой — центр связывания фосфатного остатка, принимающего участие в реакции деацилирования (12.16). Когда 3-фосфат образует водородные связи с гидроксильной группой Thr-179, положительно заряженной боковой цепью Arg-231 и 2'-гидроксильной группой рибозного кольца, присоединенного к никотинамиду NAD^+ , альдегидная группа субстрата может образовывать с остатком Cys-149 полутюацеталь (рис. 12.1). Затем гидроксильная группа субстрата в положении С-2 может образовать водородную связь с Ser-148, а гидроксильная группа

в положении С-1 — с атомом азота остатка His-176. В результате субстрат будет расположен таким образом, что атом водорода, присоединенный к атому С-1, окажется на расстоянии менее 3 Å от атома С-4 никотинамидного кольца. При таком способе связывания реакция дегидрирования может протекать так, как это было описано выше (окисление лактатдегидрогеназы), с His-176 в качестве общего основного катализатора (12.17).



Переходное состояние при атаке тиоэфира ортофосфатом может стабилизироваться за счет образования водородных связей между атакующим фосфатом и гидроксильными группами остатков Ser-148, Thr-150 и гидроксилом при С-2-атоме субстрата, а также между атомами азота амидных групп Cys-149 и Thr-150. Наличие специфического центра связывания фосфата объясняет тот факт, что тиоэфир фосфорилируется быстрее, нежели гидролизуется. Атом серы полуацетала находится достаточно близко к С-атому никотинамидного кольца NAD^+ , чтобы поляризоваться под действием его положительного заряда. Возможно, с этим связана активация реакции переноса ацила при связывании NAD^+ .

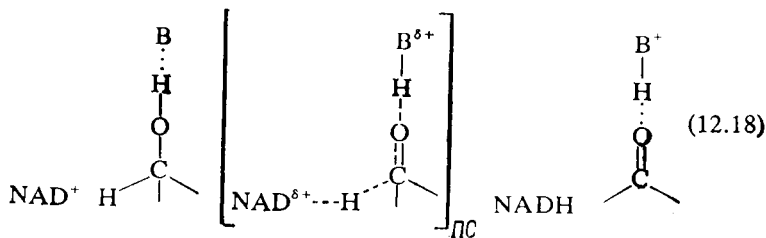
б. Характер симметрии фермента и кооперативность при связывании лигандов

Единого мнения о характере симметрии дегидрогеназы, кооперативности при связывании лигандов, а также о том, обладают ли реакционной способностью все активные центры или половина их, не существует [61—68]. Связывание NAD^+ с ферментом является четко выраженным кооперативным процессом; при связывании NAD^+ с ферментом из мышц кролика и бактериальным ферментом обнаруживается сильная отрицательная кооперативность [61, 65], хотя при некоторых температурах

присоединение NAD^+ к дегидрогеназе дрожжей характеризуется положительной кооперативностью [69]. С другой стороны, присоединение глицеральдегид-3-фосфата ко всем четырем субъединицам происходит независимо [68]. Наличие реакционной способности у половины активных центров установлено только в случае искусственных субстратов; например, 1,3-дифосфоглицерат ацилирует все четыре реакционноспособных остатка цистеина с одной и той же константой скорости [55, 63, 65, 68]. На основании данных ряда кинетических работ и результатов исследования связывания было высказано предположение, что эта дегидрогеназа существует в виде «димера димеров», состоящего из двух пар структурно различающихся субъединиц [67, 70]. Анализ карты электронной плотности кристаллического голофермента из омара, полученной при высоком разрешении, подтверждает эту точку зрения [57], однако более поздние исследования бактериального фермента четко показывают, что все четыре субъединицы структурно идентичны и данный фермент имеет симметрию 222 [58]. Бактериальный апофермент обладает такой же симметрией, хотя исследования проводились только при низком разрешении [58]. Сравнительный анализ свойств бактериальных апо- и голоферментов показывает, что связывание NAD^+ вызывает существенное смещение домена, на котором связывается кофермент, и это приводит к уменьшению объема молекулы. Структурные предпосылки отрицательной кооперативности пока не выявлены.

5. Общие замечания относительно дегидрогеназ

Структурные исследования позволили дать ясное и вполне разумное с химической точки зрения описание стереохимических и каталитических условий протекания реакции переноса гидриона. В трех из рассмотренных примеров присутствует кислотно-основный катализатор, который образует водородную связь с карбонильной или спиртовой группой субстрата, способствует его правильной ориентации и стабилизирует переходное состояние [схема (12.18)].



Аналогичная ситуация имеет место и в случае алкогольдегидрогеназы печени, где роль ВН^+ в стабилизации переходного состояния и ориентации субстрата играет либо присоединенная к цинку молекула воды, либо сам ион Zn^{2+} .

Следствием направленности образующейся водородной связи является то, что спирт присоединяется предпочтительно к основной форме катализатора (В), тогда как альдегид к кислой (ВН^+). Значение pK_a основания В в составе тройного комплекса $\text{E.NAD}^+.\text{RCH}_2\text{OH}$ уменьшается, а в составе комплекса E.NADH.RCHO — увеличивается. Это означает, что высвобождающийся при окислении протон не покидает тройного комплекса, а захватывается каталитической группой, и наоборот. Высвобождение протона в растворе происходит только при замене одних молекул субстрата другими [18, 41, 63, 71].

Столь же четкое объяснение получила и природа специфичности дегидрогеназ. Энантиомеры субстратов L-лактат- и D-глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназ не могут связываться продуктивно, гидрофобный карман алкогольдегидрогеназы не связывает заряженную боковую цепь лактата и т. д. Происходят ли в процессе катализа конформационные изменения или имеет место деформация — неизвестно.

Основная кинетическая особенность NAD^+ -зависимых дегидрогеназ состоит в том, что NADH обычно связывается более прочно, чем NAD^+ . Каковы структурные предпосылки такого различия — неясно; отметим только, что заряженное никотинамидное кольцо более гидрофильно, чем его восстановленная форма в NADH . Прочное связывание NADH приводит к тому, что диссоциация комплексов E.NADH является в значительной мере лимитирующей стадией при насыщающих концентрациях реагентов и физиологическом pH . Более того, хотя константа равновесия для реакции окисления в растворе такова, что равновесие сдвинуто в сторону образования NAD^+ и спирта, благодаря более прочному связыванию NADH константа равновесия для связанных с ферментом реагентов оказывается не столь неблагоприятной для образования NADH и альдегида: константа равновесия между двумя тройными комплексами в реакциях с участием лактатдегидрогеназы близка к единице.

Б. Протеазы

Протеазы удобно классифицировать в соответствии с характером их активности и природой функциональных групп. Сериновые протеазы являются эндопептидазами, имеющими реакционноспособный сериновый остаток, и обладают максимальной активностью при pH , близких к 7,0. Кислые протеазы представ-

ляют собой эндопептидазы с реакционноспособными карбоксильными группами и обладают максимальной активностью при низких рН (за исключением химозина, активность которого сохраняется вплоть до нейтральных рН). Тиоловые протеазы являются эндопептидазами, отличающимися от сериновых протеаз присутствием реакционноспособных цистеиновых остатков. Карбоксипептидазы представляют собой цинксодержащие экзопептидазы, специфичные по отношению к определенным С-концевым остаткам белков и функционирующие при нейтральном рН. За исключением лейцинаминопептидазы, мол. вес которой равен 250 000, все перечисленные протеазы представляют собой небольшие мономерные ферменты с мол. весом от 15 000 до 35 000, легко поддающиеся кинетическим и структурным исследованиям, в связи с чем относятся к наиболее хорошо изученным ферментам. Несмотря на то что эти ферменты катализируют одну и ту же реакцию, механизм каталитического действия протеаз разных классов различается. Некоторые механизмы изучены достаточно полно, для них построены химические модели, другие исследованы лишь в общих чертах.

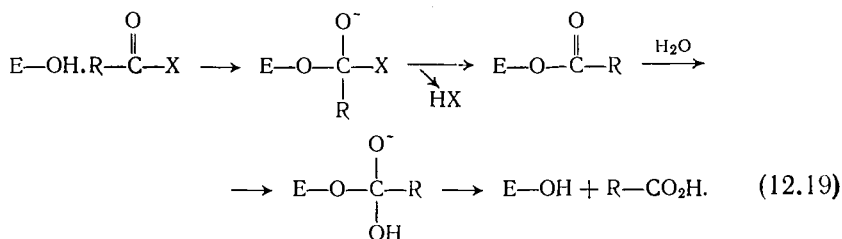
В данном разделе для описания подцентров связывания широко используются условные обозначения, введенные Бергером и Шехтером [уравнение (1.6)]. (Расщепляемая связь пептидного субстрата занимает участок между подцентрами S_1 и S'_1 , С-конец субстрата занимает подцентры $S'_1 - S'_n$, а N-конец — $S_1 - S_n$.)

1. Сериновые протеазы

Эти ферменты уже рассматривались нами в разных разделах. Основной материал распределился следующим образом: классификация ферментов, их специфичность — гл. 1, разд. В; структура активного центра, фермент-субстратный комплекс, ацилфермент и комплекс между ферментом и продуктом — гл. 1, разд. Г; кинетика реакций и установление их механизма — гл. 7, разд. Б; рН-зависимость каталитического процесса и состояние ионизации активного центра — гл. 5, разд. Е и Ж.2.а; использование энергии связывания для увеличения k_{cat} — гл. 10, разд. А.4; стабилизация переходного состояния, специфическая сольватация переходного состояния — гл. 10, разд. В.5.в. В этом разделе вкратце рассмотрены все перечисленные вопросы.

Катализируемый сериновыми протеазами гидролиз субстратов, эфиров или амидов, сопровождается образованием промежуточного ацилфермента в результате ацилирования субстратом гидроксильной группы Ser-195. В случае амидов образование ацилфермента при насыщающих концентрациях субстрата явля-

ется медленной стадией, а гидролиз эфиров часто сопровождается его накоплением. Атака Ser-195 карбоксильной группы субстрата, по всей вероятности, приводит к образованию высокоэнергетического тетраэдрического промежуточного соединения:

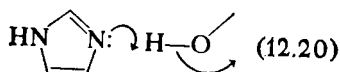


Механизм катализа и структура промежуточных соединений, образующихся в ходе реакций с участием сериновых протеаз, определены с помощью более прямых экспериментов, чем в случае любого другого фермента или класса ферментов. Выяснить структуру сериновых протеаз удалось главным образом благодаря установлению кристаллической структуры сокристаллизованных комплексов трипсина и некоторых природных пептидов-ингибиторов, имитирующих субстраты (гл. 1, разд. Г). Из этих исследований известно, что активный центр фермента комплементарен переходному состоянию субстрата, которое структурно очень близко к тетраэдрическому аддукту остатка Ser-195 и углеродного атома карбонильной группы субстрата. Более того, структура фермента при связывании субстрата не искажается. Исследование связывания небольших пептидов с помощью ЯМР-спектроскопии показывает, что при связывании эти пептиды также не деформируются. (Определение кристаллической структуры комплекса трипсина с панкреатическим ингибитором трипсина при высоком разрешении ясно показывает, что реакционноспособная пептидная связь деформируется таким образом, что ее конфигурация приближается к конфигурации пептидной связи в тетраэдрическом промежуточном соединении. Однако, поскольку эта связь уже деформирована до присоединения к ферменту, «сконструированный» ингибитор связывается очень прочно, т. е. является аналогом естественного переходного состояния.)

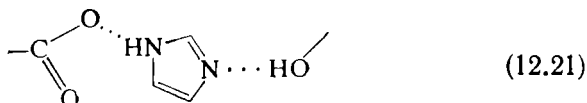
а. Система с переносом заряда

Долгое время полагали, что основной имидазол остатка His-57 увеличивает нуклеофильность гидроксильной группы Ser-195, действуя как общий основной катализатор: активность

понижается при низких рН в соответствии с изменением состояния ионизации основания с $pK_a \approx 7$, характерным для остатка гистидина; His-57 модифицируется аффинной меткой — тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон — с необратимой потерей ферментативной активности (гл. 7, разд. Ж) [72].

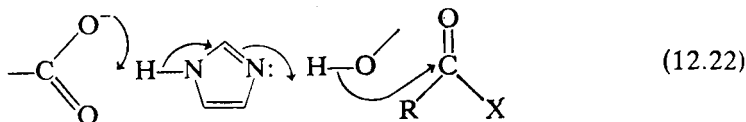


Для кристаллографов явилось полной неожиданностью выявление того факта, что карбоксильная группа Asp-102 также входит в состав активного центра с образованием каталитической триады, названной «системой с переносом заряда» [73].



Хотя карбоксильная группа полностью погружена вглубь белковой глобулы, она окружена полярными остатками и связанными с белком молекулами воды. Было высказано предположение, что погруженная карбоксильная группа ионизирована в активном протонированном состоянии фермента; позже это предположение подтвердилось (гл. 5, разд. Ж.2.е) [74]. Еще один сюрприз преподнесли исследователям данные, полученные с помощью ЯМР [75], а затем и с помощью ИК-спектроскопии [76], которые показали, что группа, ионизирующаяся с $pK_a \sim 7$, принадлежит погруженному внутрь белковой глобулы аспартату, а не His-57 (гл. 5, разд. Ж.2). Если эти данные правильны, то имидазол His-57 остается непротонированным в химотрипсине вплоть до рН 2, поскольку на графике зависимости активности от рН не обнаруживается данной стадии ионизации при низких рН [77].

Как все эти факторы влияют на катализ — неизвестно. Было высказано предположение, что между Asp-102 и His-57 в ходе реакции (12.22) происходит перенос протона [75].



Очень интересно было бы заменить каким-нибудь образом Asp-102 аспарагином и затем определить каталитическую активность такого фермента. По мнению автора, при этом значение

pK_a His-57 было бы равно 5, а константа k_{cat} уменьшилась в 10 раз (исходя из данных об уменьшении pK_a каталитического

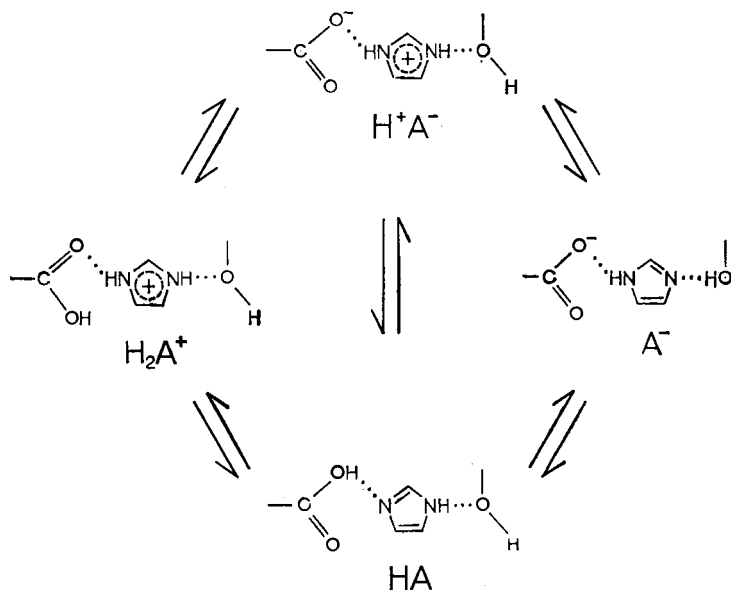


Рис. 12.4. Ионизированные состояния системы с переносом заряда. A^- — каталитически активное состояние. Состояние H_2A^+ в реакциях с участием химотрипсина не наблюдается даже при pH 2. Если состояние, реализующееся при низком pH, — H^+A^- , то погруженный в белок Asp-102 является как раз тем остатком, который увеличивает основность His-57 и ответствен за напряжение. Если состояние, реализующееся при низком pH, — HA , то появляется возможность переноса в процессе катализа протона между Ser-195 и His-57, сопровождаемое одновременным переносом протона между His-57 и Asp-102.

основания приблизительно на 2 единицы и имея в виду, что коэффициент Брёнстеда β в случае общего основного катализа равен $\sim 0,5$) [74].

б. Структура и реакционная способность субстрата

Структурные требования, которым должен удовлетворять субстрат, чтобы обладать реакционной способностью, определяются из данных по измерению k_{cat} и K_M для широкого круга эфирных субстратов и констант ассоциации для обратимых ингибиторов [78]. Эфиры обладают чрезвычайно высокой реакционной способностью, что налагает ограничение на выбор эфирных субстратов, которые должны гидролизироваться с доступной для измерения скоростью. Таким образом, эфиры наиболее по-

лезны для определения стерических требований, предъявляемых к ацильному фрагменту субстрата. Амиды и пептиды настолько нереакционноспособны, что использовать можно только производные специфических субстратов — фенилаланина, тирозина и триптофана. Теперь эти исследования удастся проводить в сочетании с рентгеноструктурным анализом.

Таблица 12.2

Структурные требования при деацилировании ацилхимотрипсинов (RCO_2E) (25°C)^{a)}

R—	k_{cat} для деацили- рования, с^{-1}	k_{OH^-} для гидро- лиза RCO_2CH_3 , $\text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$
CH_3-	0,01	0,19
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2-$	0,178	0,15
$\text{CH}_2(\text{NHCOCH}_3)-$	0,12	2,48
$\text{L-C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-$	111	1,94

^{a)} Dupaix A., Vechet J.-J., Roucoux C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 464 (1970); Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А., *FEBS Letts.*, 15, 121 (1971); см. табл. 7.3.

1. Стадия деацилирования. В табл. 12.2 приведены данные по деацилированию различных ацилферментов. Соответствующие данные для аминокислот приведены в табл. 7.3. Наибольшей реакционной способностью обладает производное ацетил-L-фенилаланина. Как указывалось в гл. 1, в химотрипсине имеется четко выраженный карман для связывания ароматической боковой цепи аминокислоты и центр образования водородной связи ($\text{C}=\text{O}$ -группа Ser-214) с NH -группой в CH_3CONH -фрагменте субстрата (рис. 12.5). При замещении в ацетилфенилаланине $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$ и CH_3CONH -групп водородом и образовании простой ацетильной группы скорость деацилирования уменьшается в 10^4 раз (правда, десятикратное уменьшение скорости обусловлено индукционным эффектом CH_3CONH -группы, как это видно из значений констант скорости катализируемого гидроксил-ионами гидролиза эфиров; последняя колонка табл. 12.2). Интересно, что в повышении реакционной способности участвуют как ароматическое кольцо, так и ациламиногруппа (табл. 12.2). Ацетилглицинхимотрипсин деацилируется только в 12 раз быстрее ацетилхимотрипсина, и, как видно из значений констант скорости гидролиза, катализируемого гидроксил-ионами, это увеличение обусловлено исключительно индукционным эффектом ациламиногруппы, а не влиянием связывания.

Аналогичным образом β -фенилпропионилхимотрипсин деацилируется только в 17,8 раз быстрее ацетилхимотрипсина. Причина, по которой за повышение реакционной способности ответственны как ароматическое кольцо, так и ациламиногруппа, была выявлена с помощью рентгеноструктурного анализа. Как отмечалось в гл. 1 и будет показано ниже, карбонильный кислород пептидного субстрата расположен между NH-группами пептидного остова, принадлежащими Ser-195 и Gly-193. Такой

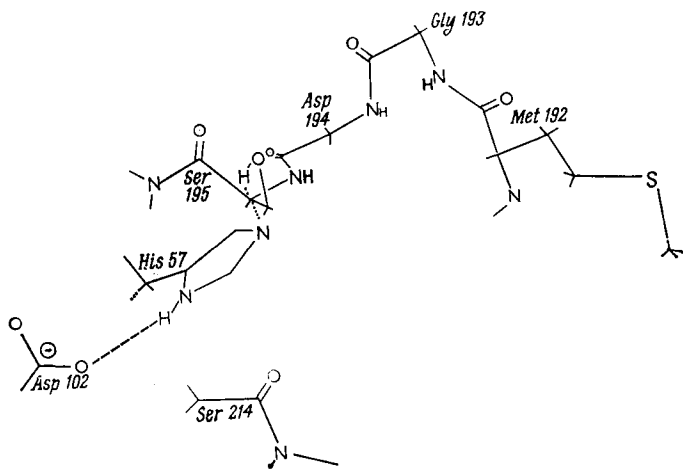


Рис. 12.5. Некоторые аминокислотные остатки химотрипсина, участвующие в связывании и катализе.

тип связывания был обнаружен недавно для специфического ацилфермента карбобензокси-L-аланинэластазы [79], однако, как оказалось, присоединение карбонильного кислорода неспецифического ацилфермента индолилакрилоилхимотрипсина не приводит в данном случае к продуктивному связыванию [80]. Вместо этого между карбонильным кислородом и каталитическим атомом азота His-57 молекула воды образует мостик из водородных связей (рис. 12.6). Для осуществления реакции карбонильный кислород должен повернуться в сторону центра образования водородной связи между Ser-195 и Gly-193, а связанная молекула воды должна атаковать карбонильный атом углерода. Таким образом, присутствие и ациламиногруппы, и ароматического кольца необходимо для правильной фиксации карбонильной группы. Если какая-либо из этих фиксирующих групп отсутствует, то карбонильный кислород оказывается вовлеченным в непродуктивный тип связывания.

2. Стадия ацилирования. Как указывалось в гл. 10, заполнение подцентров S_2 , S_3 , S_4 и S_6 часто увеличивает k_{cat} для гидролиза полипептидных субстратов без уменьшения K_M . Причина такого явления неизвестна. Энергия связывания с подцентром S_1 также используется для увеличения k_{cat} , а не для по-

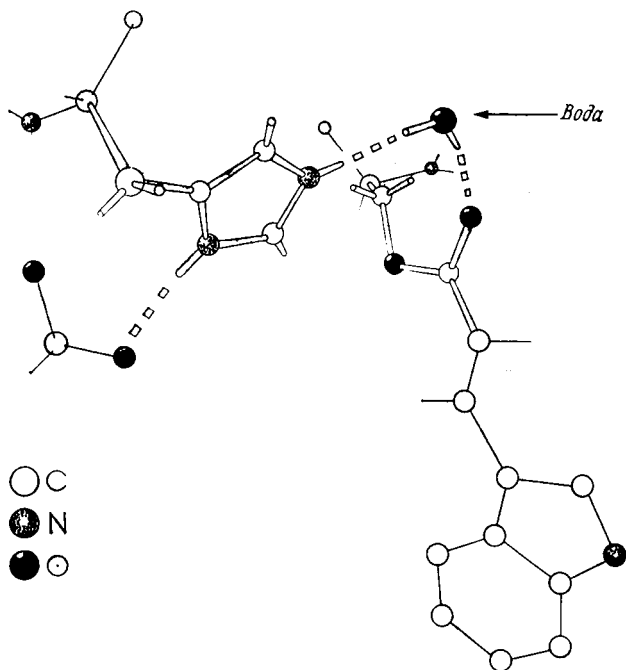


Рис. 12.6. Кристаллическая структура индолилакрилоилхимотрипсина. [Henderson R., J. molec. Biol., 54, 341 (1970).] Отметим, что карбонильный кислород этого неспецифического ацилфермента связан не с NH-группами Ser-195 и Gly-193, а непродуктивно присоединен к His-57 через водородную связь с молекулой воды. Установлено, что этот ацилфермент деацилируется в растворе с такой же скоростью, как и в кристалле (гл. 1). [Rossi G. L., Bernhard S. A., J. molec. Biol., 49, 85 (1970).]

вышения прочности связывания. Было высказано предположение, что это обусловлено наличием невыгодных взаимодействий между уходящей группой и ферментом, которые уменьшаются при образовании тетраэдрического промежуточного соединения (гл. 10, разд. В.5.в) [81]. Возможно, между NH-группами полипептидного остова и отрицательно заряженным кислородом тетраэдрического промежуточного соединения образуются более прочные водородные связи, чем между указанными группами и карбонильным кислородом субстрата.

в. Описание механизма реакции

Кинетические и структурные данные позволяют качественно описать механизм ацилирования химотрипсина хорошим полипептидным субстратом [81].

В специфическом кармане химотрипсина между атомом водорода N-ациламиногруппы субстрата и карбонильной группой Ser-214 образуется водородная связь. Все располагающиеся

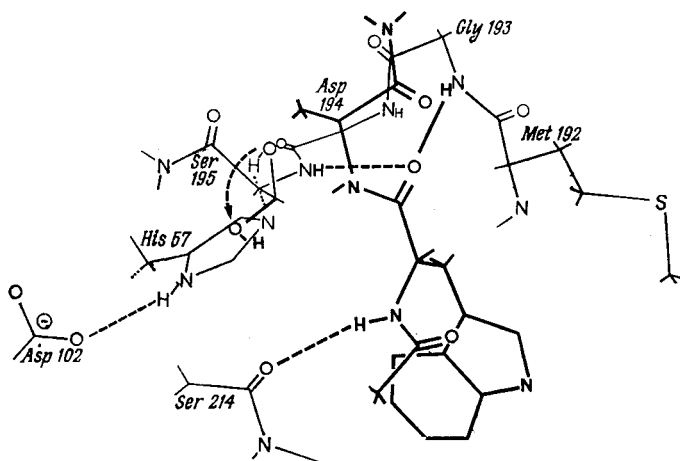


Рис. 12.7. N-ацетил-L-триптофаналанинамид, связанный с химотрипсином. Обратите внимание на образование водородных связей между карбонильной группой субстрата и NH-группами остатков Gly-193 и Ser-195. Гидроксильная группа Ser-195 поворачивается из верхнего положения, занимаемого ею в кристалле фермента, в сторону субстрата.

далее остатки в N-ациламино-фрагменте связываются с доступными подцентрами. Реакционноспособная карбонильная группа располагается со своим атомом кислорода между NH-группами Ser-195 и Gly-193 (рис. 12.7). Однако не исключено, что водородная связь между указанным атомом кислорода и Gly-193 довольно слабая. Уходящая группа помещается в подцентре S_1' , «втискиваясь» между ним и боковой цепью Ser-195. Было высказано предположение, что это заставляет реакционноспособную гидроксильную группу Ser-195 в химотрипсине повернуться и занять примерно такое же положение, какое она занимает в переходном состоянии. Однако в трипсине эта гидроксильная группа, по-видимому, частично повернута указанным выше образом и в отсутствие субстрата. Первой стадией химического превращения в этой реакции является атака карбонильного атома углерода субстрата гидроксильной группой

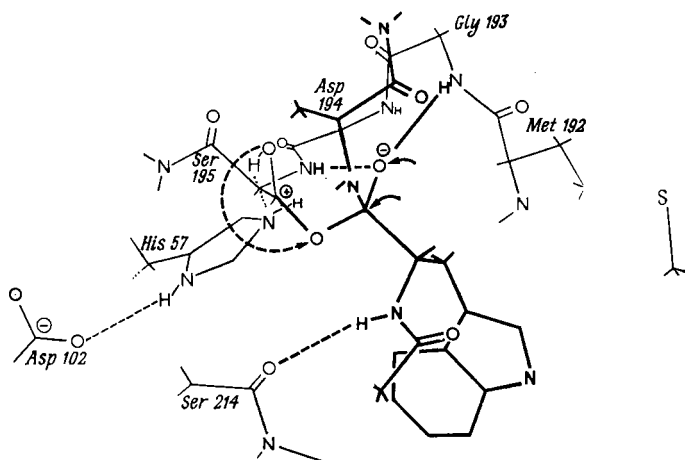


Рис. 12.8. Образование тетраэдрического промежуточного соединения. Гидроксильная группа Ser-195 продолжает поворачиваться и образует связь с субстратом. При этом атомы углерода и кислорода карбонильной группы субстрата также перемещаются, возможно образуя более прочные водородные связи с группами полипептидного остова фермента.

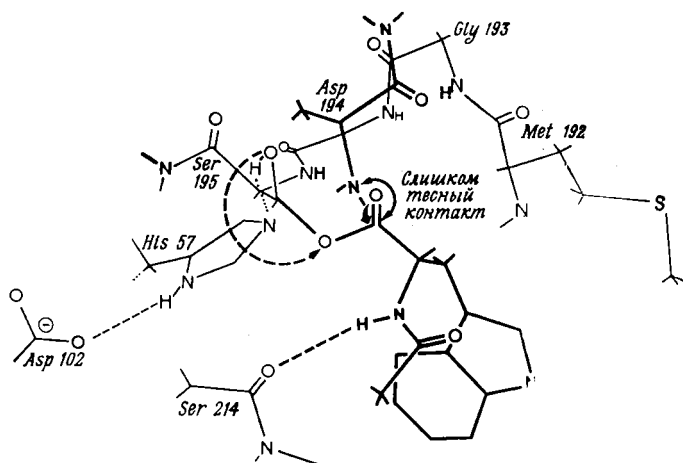


Рис. 12.9. Распад тетраэдрического промежуточного соединения, при котором происходит высвобождение аланинамида и образование ацилфермента. Аланинамид не может остаться связанным с центром связывания уходящей группы (S_1') из-за слишком тесного контакта с карбонильной группой ацилфермента.

Ser-195, завершающаяся образованием тетраэдрического промежуточного соединения (рис. 12.8). В ходе этой реакции протон гидроксильной группы перемещается на имидазол остатка His-57 и одновременно протон от другого атома азота этого кольца может переместиться на карбоксилат Asp-102. По мере образования связи между Ser-195 и углеродным атомом карбонильной группы связь C=O удлиняется, превращаясь в одинарную. Кислород, несущий отрицательный заряд, приближается к NH-группе Gly-193, образуя более короткую и более прочную водородную связь. Переходное состояние стабилизируется относительно комплекса Михаэлиса за счет уменьшения напряжения между уходящей группой и боковой цепью Ser-195 и образования более прочной водородной связи с Gly-193. Распад переходного состояния приводит к образованию ацилфермента и выбросу уходящей группы (рис. 12.9). Уходящая группа не может связываться с подцентром S_i' ацилфермента, так как это приводило бы к слишком сильному сближению аминокруппы и углеродного атома карбонильной группы. Таким образом, в обратной реакции, т. е. при атаке уходящей группой ацилфермента, энергия связывания с подцентром S_i' реализуется только в переходном состоянии. Деацилирование происходит при участии системы с переносом заряда, активирующей атаку молекулы воды. При этом образуется другое тетраэдрическое промежуточное соединение, которое разрушается с высвобождением Ser-195 и образованием комплекса между ферментом и продуктом.

Примечание. В настоящее время получены прямые данные в пользу существования тетраэдрического промежуточного соединения и согласованного переноса протона от Ser-195 на His-57 и от His-57 на Asp-102 при гидролизе анилидного субстрата, катализируемого сериновой протеазой; Hunkapiller M. W., Forgacs M. D., Richards J. H., *Biochemistry*, **15**, 5009 (1976).

Несмотря на все эти подробности, многие важные аспекты механизма ацилирования все еще неясны. Например, мы не знаем, каким образом энергия связывания N-ациламино-фрагмента субстрата иногда используются для увеличения k_{cat} , а не для уменьшения K_m (табл. 10.1). Нам не известно, какой вклад в катализ вносит погруженный в белковую глобулу Asp-102, который входит в систему с переносом заряда (какой бы была активность химоотрипсина, если бы аспарат был заменен аспарагином).

г. Зимогены

Некоторые сериновые протеазы присутствуют в поджелудочной железе в виде неактивных предшественников, которые могут быть переведены в активное состояние путем протеолиза. Так,

например, трипсиноген превращается в трипсин в результате отщепления N-концевого гексапептида за счет расщепления энтерокиназой связи между Lys-6 и Ile-7. Химотрипсиноген активируется с помощью трипсина, расщепляющего связь между

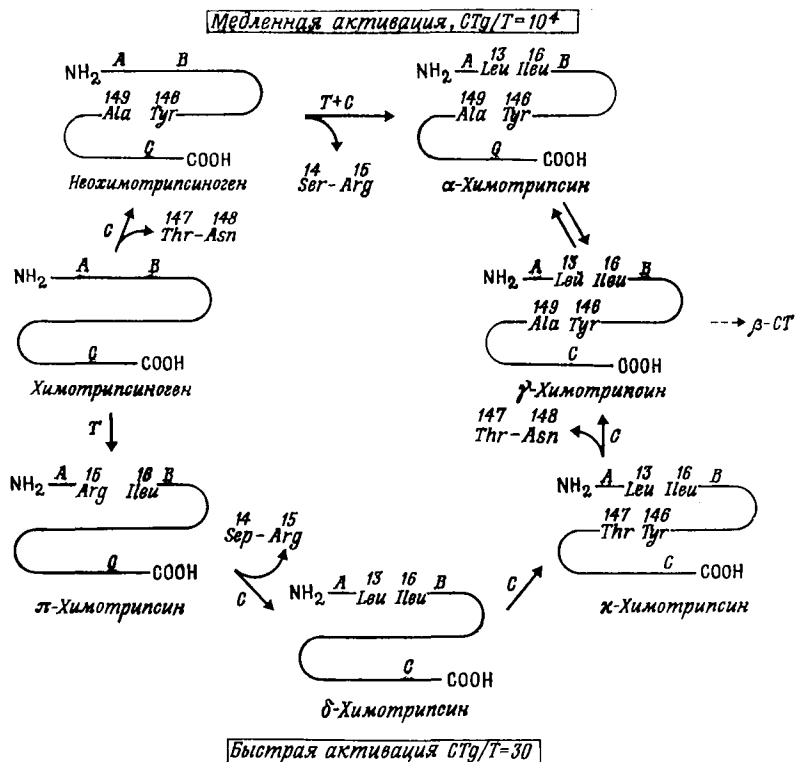


Рис. 12.10. Активация химотрипсиногена. [Miller D. D., Horbett T. A., Teller D. C., *Biochemistry*, 10, 4641 (1971).] Т — трипсин, С — химотрипсин, СТг — химотрипсиноген. При «быстрой» активации количество трипсина достаточно для того, чтобы активировать весь зимоген, прежде чем произойдет накопление химотрипсина в результате автолиза. При медленной активации небольшая часть трипсина медленно активирует зимоген и образовавшийся вначале химотрипсин расщепляет остающийся неактивированный зимоген с образованием неохимотрипсиногена.

Arg-15 и Ile-16. (В этом случае дальнейший протеолиз с помощью химотрипсина, высвобождающегося в процессе активации, приводит к образованию различных форм этого фермента.)

Механизм активации и причины отсутствия активности у химотрипсиногена были однозначно определены при сравнении кристаллической структуры фермента и зимогена [82—84]. Зи-

моген имеет систему с переносом заряда, которая может находиться в тех же самых ионизационных состояниях, что и в ферменте [74, 85]. Однако активность зимогена крайне низка: он лишен протеолитической активности, а его реакционная способность по отношению к синтетическим субстратам идентична реакционной способности имидазола, взятого в соответствующей концентрации [86, 87]. Обусловлено это тем, что в зимогене по существу не сформирован карман для связывания субстрата и участвующая в образовании водородной связи NH-группа остатка Gly-193 занимает невыгодное положение по отношению к субстрату [83]. Этот пример является весьма поучительным. Для ферментативного процесса важно не просто присутствие в молекуле фермента высокорекционноспособной каталитической группы, но и соответствующее расположение субстрата и обычных каталитических групп.

Конформационное изменение, приводящее к образованию связывающего кармана и повороту Gly-193, само является результатом перемещения остатка Ile-16, когда его α -аммонийная группа образует солевой мостик с погруженной вглубь белковой молекулы карбоксильной группой Asp-194. Процесс активации можно моделировать, изменяя рН. При высоком рН аммонийная группа депротонируется, ионная связь дестабилизируется и фермент принимает зимоген-подобную конформацию. Разность энергий этих двух конформаций мала и они находятся в состоянии тонко сбалансированного равновесия [88].

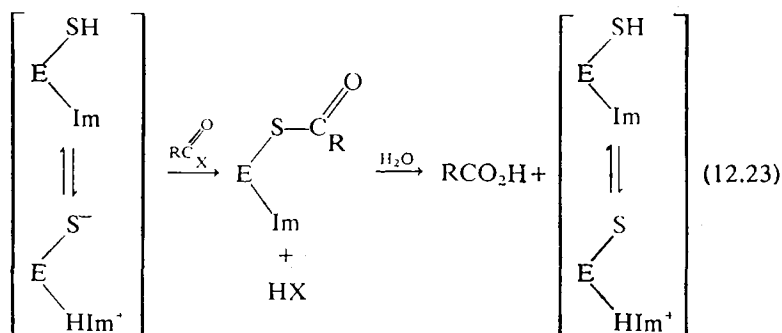
2. Тиоловые протеазы [89—94]

Тиоловые протеазы широко распространены в природе. Ферменты, выделенные из растений, — папаин (папайя — дынное дерево), фицин (фиговое дерево) и бромелаин (ананас) — входят в группу структурно гомологичных ферментов. Они не гомологичны бактериальной тиоловой протеазе клострипаину (из *Clostridium histolyticum*) и стрептококковой протеназе (из гемолитических стрептококков). Возможно, эти две группы ферментов соотносятся между собой так же, как сериновые протеазы животных и бактерий. Установлено, что у млекопитающих тиоловые протеазы катепсин В1 и В2 встроены в лизосомы.

а. Папаин [89—92]

Этот фермент образован единственной полипептидной цепью, состоящей из 212 аминокислотных остатков и имеющей мол. вес 23 406 [95]. Кинетические исследования показали, что активный центр может связать семь аминокислот — четыре с той стороны расщепляемой связи, где находится ацильная группа (подцентры $S_4 - S_1$), а три — со стороны аминогруппы ($S'_1 - S'_3$) [96].

В отличие от сериновых протеаз, у которых главным специфическим центром связывания служит подцентр S_1 , у папаина специфичностью к гидрофобным аминокислотам обладает подцентр S_2 , а за специфичность к изолейцину или триптофану ответствен подцентр S'_1 [97]. Гидролиз эфиров, а возможно, и пептидов сопровождается образованием ацилфермента (как и в случае сериновых протеаз, за исключением того, что ацилируется Cys-25) [98—101]. График, построенный в координатах $\{pH; k_{cat}/K_M\}$, представляет собой колоколообразную кривую с максимумом при $pH \sim 6$, что обусловлено ионизацией His-159 и Cys-25, pK_a которых равен 4,2 и 8,2 соответственно. Обозначим гистидин через Im, а цистеин — через RSH. При низком pH неактивна ионная форма $RSH.HIm^+$, тогда как при высоком — форма $RS^- .Im$. При нейтральном pH каталитически активная форма представляет собой один из таутомеров — $RSH.Im$ или $RS^- .HIm^+$: исследование pH-зависимости не позволяет различить два ионных состояния, несущих одинаковый суммарный заряд («принцип кинетической эквивалентности», гл. 2, разд. E). pH-зависимость k_{cat} для деацилирования определяется ионизацией основания с pK_a около 4. Возможно, этим основанием является группа, принадлежащая His-159, поскольку цистеин блокирован в ацилферменте. Механизм реакции можно представить с помощью следующей схемы:



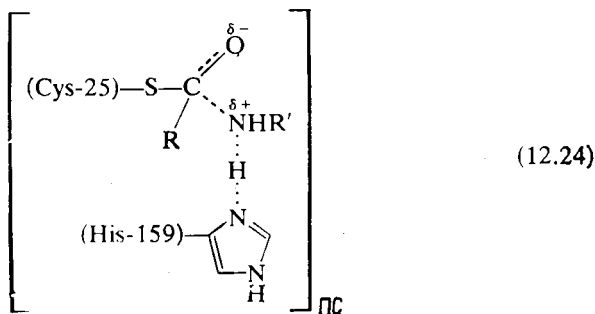
1. Структура активного центра папаина [89, 102—105]. Кристаллографические исследования показывают, что молекула папаина состоит из двух доменов, разделенных глубокой расщелиной, в которой и происходит связывание субстрата. Несмотря на то что Cys-25 и His-159 находятся в тесном контакте, они расположены на разных краях расщелины. Довольно глубокий карман подцентра S_2 , связывающий гидрофобные аминокислоты, образован гидрофобными боковыми цепями Туг-67, Рго-68 и Тгр-69 одного домена и гидрофобными боковыми цепями Phe-207, Ala-160, Val-133 и Val-157 — другого.

В свое время считали, что значение $pK_a = 4,2$, полученное из рН-зависимости активности фермента, относится к карбоксильной группе боковой цепи, поскольку обычно эти группы ионизируются именно в данной области рН. Однако ближайшая к Cys-25 карбоксильная группа (\sim Asp-158) находится от этого остатка на расстоянии $7,5 \text{ \AA}$ [92], т. е. слишком далеко, чтобы выступать в роли кислотно-основного катализатора, в отличие от благоприятно расположенного имидазольного кольца His-159. Низкое значение pK_a гистидина связано в основном с тем, что этот остаток частично погружен в гидрофобную область белка. Системы, эквивалентной системе с переносом заряда, у сериновых протеаз нет; имидазольное кольцо His-159 не взаимодействует с погруженной в белковую молекулу карбоксильной группой.

Природу стереоспецифичности папаина помогает понять построение моделей [105]. Проведенные исследования показали, что D-аминокислоты не могут поместиться в подцентрах из-за стерических затруднений, возникающих при их контактировании с ферментом. Папаин не является экзопептидазой, поскольку свободная карбоксильная группа субстрата должна находиться на расстоянии $3\text{--}4 \text{ \AA}$ от карбоксильной группы Asp-158 из-за электростатического отталкивания. Кроме того, указанные исследования позволили предположить наличие механизма деформации. В фермент-субстратном комплексе уходящая группа субстрата, по-видимому, подвергается «давлению» со стороны $\alpha\text{-CH}_2$ -группы His-159, однако при образовании тетраэдрического промежуточного соединения это давление ослабляется. В пользу указанного предположения говорит тот факт, что аналоги субстратов, у которых уходящая группа заменена небольшой по размерам группой, связываются значительно прочнее аналогов с более крупными остатками [92, 105]. Специфичность подцентра S_2 к большему по размеру гидрофобным остаткам проявляется в возрастании k_{cat} , а не в увеличении прочности связывания. Лоу и Ютавонг [105] предположили, что связывание подцентром S_2 такого остатка, как фенилаланин, приводит к некоторому увеличению размеров расщелины и к еще большей деформации активного центра [105]. Раздвижение стенок расщелины было впоследствии обнаружено при исследовании кристаллической структуры фермента, ингибированного хлорметилкето-производным N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланин-L-аланина [104]. Использование этого соединения указывает на наличие в ферменте центра связывания карбонильного кислорода расщепляемой пептидной связи. В этот центр, как и в случае сериновых протеаз, входит NH-группа полипептидного остова, принадлежащая Cys-25; другая водородная связь образуется с участием NH_2 -группы Gln-19.

Механизм действия папаина как кислотно-основного катализатора точно не известен. Деацилирование ацилфермента, несомненно, сопровождается катализируемой по механизму общего основного катализа атакой имидазольного кольца His-195 молекулой воды, но роль гистидина в реакции ацилирования до конца не ясна [106, 107]. Установлено, что в простых химических системах пара основание В — тиол RSH участвует в реакциях в виде RS^- и BH^+ . Случаи катализа атаки тиола по механизму общего основного катализа не обнаружены. Однако не известно, чтобы вынужденная близость общего основания влияла на реакционную способность тиола [106].

Лимитирующей стадией гидролиза амидов и анилидов, по-видимому, является катализируемый по механизму общего кислотного катализа распад тетраэдрического промежуточного соединения [108, 109]. В пользу этого свидетельствуют следующие данные: а) субстраты, содержащие более основные анилины ($\rho = -1,04$), характеризуются более высокими значениями k_{cat} и k_{cat}/K_M [108]; это означает, что атом азота в субстрате протонируется в переходном состоянии (чем сильнее основание, тем легче протонирование) и б) k_{cat}/K_M для гидролиза бензил-L-аргининамида в случае субстрата, содержащего в уходящей группе изотоп ^{14}N , на 2,4% выше, чем для субстрата, содержащего изотоп ^{15}N ; отношение $k_{^{14}N}/k_{^{15}N}$, равное 1,024, близко к значению, ожидаемому для случая практически полного расщепления связи C—N [109]. (Примечание: то, что лимитирующей стадией является распад промежуточного соединения, не означает, что это соединение накапливается; просто оно быстрее превращается в исходные соединения, чем в продукты.)



3. Карбоксипептидазы [110—112]

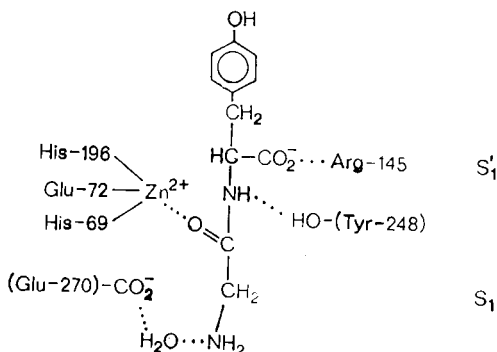
Панкреатическая карбоксипептидаза А представляет собой металлофермент с мол. весом 34 472, содержащий один атом цинка, который связан с единственной полипептидной цепью,

образованной 307 аминокислотными остатками [113]. Карбоксипептидаза А является экзопептидазой и отщепляет аминокислоты от С-конца полипептидных субстратов; она специфична к большим по размеру гидрофобным аминокислотам типа фенилаланина. Очень близкая ей карбоксипептидаза В (гл. 1, разд. В.3) специфически отщепляет остатки лизина и аргинина. В структурном отношении эти два фермента почти одинаковы, за исключением того, что в В-форме имеется остаток аспартата, который связывает положительно заряженную боковую цепь субстрата [114]. Приведенный ниже материал относится к карбоксипептидазе А, однако все сказанное справедливо для обеих форм фермента.

а. Структура активного центра карбоксипептидазы А

Кристаллическая структура фермента была установлена с разрешением 2,0 Å [115]. Активный центр представляет собой небольшую выемку на поверхности фермента, которая ведет к глубокому карману, образованному алифатическими и полярными боковыми цепями и участками полипептидной цепи и

Рис. 12.11. Непродуктивный комплекс дипептида и карбоксипептидазы А. (С любезного разрешения Lipscomb W. H.)



предназначенному для связывания С-концевой аминокислоты. Лигандами иона цинка, играющего важную роль в катализе, являются основные боковые цепи остатков Glu-72, His-196 и His-69. Приблизительно у 20% молекул фермента четвертым лигандом является атом кислорода фенольной группы Tyr-248 [116]. Боковая цепь этого остатка обладает высокой конформационной подвижностью, что послужило источником разногласий в вопросе о сходстве структуры этого фермента в растворе и в кристалле и привело к бурным дискуссиям [116, 117]. Боковая цепь, содержащая фенольную группу, может поворачиваться вокруг своей $C_{\alpha}-C_{\beta}$ -связи, и примерно 80% электронной плотности этой группы локализовано на той части молекулы, которая

направлена в раствор [116]. В карбоксипептидазе В этот остаток настолько подвижен, что его положение в кристаллической структуре определить не удается [114].

Модель связывания субстратов карбоксипептидазой А была построена исходя из данных о структуре комплекса фермента с глицил-L-тирозином, установленной разностным Фурье-методом с разрешением 2 Å (рис. 12.11) [110, 115]. Дипептиды гидроли-

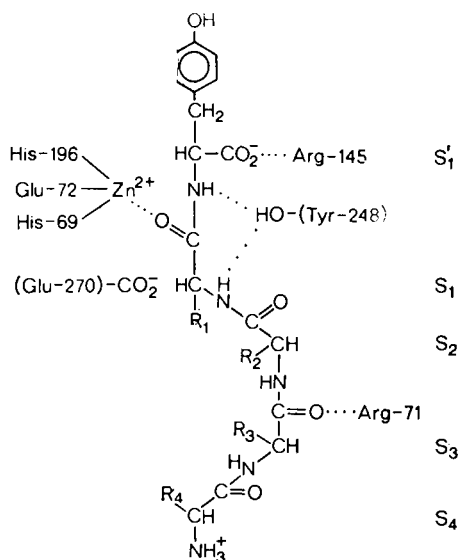


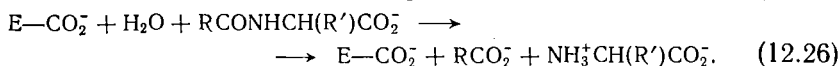
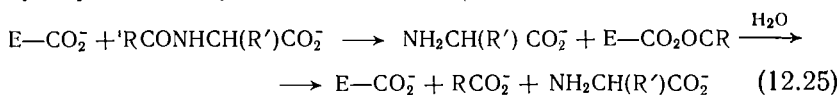
Рис. 12.12. Предполагаемое связывание полипептидного субстрата с карбоксипептидазой А с образованием продуктивного комплекса. (С любезного разрешения Lipscomb W. N.)

зуются очень медленно и связываются в основном непродуктивно. Предполагается, что низкая скорость гидролиза обусловлена тем, что свободная аминогруппа субстрата связывается с карбоксильной группой Glu-17 через молекулу воды. Это не позволяет карбоксильной группе играть роль общего основания или нуклеофила в реакции гидролиза (см. ниже). Для построения модели продуктивного связывания используются также следующие особенности рассматриваемого комплекса: боковая ароматическая цепь связывается в связывающем кармане; С-концевой карбоксилат-ион образует ионную связь с Arg-145; карбоксильный кислород расщепляемой связи становится четвертым лигандом иона цинка; фенольный кислород Tyr-148 находится на расстоянии примерно 3 Å от расщепляемой связи; боковая цепь повернута на $\sim 120^\circ$ относительно положения, занимаемого ею в свободном ферменте. Используя все эти данные, можно построить схему расположения полипептидной цепи, представленную на рис. 12.12.

6. Механизм реакции

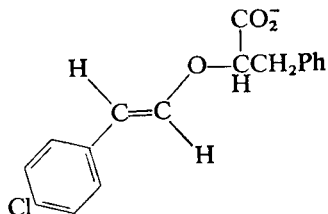
Механизм действия карбоксипептидазы изучен не столь хорошо, как для сериновых и тиоловых протеаз. Роль всех каталитических групп однозначно не установлена. Ион цинка, по всей вероятности, играет роль электрофильного катализатора, поляризуя карбонильную группу и стабилизируя образующийся на атоме кислорода отрицательный заряд (гл. 2, разд. Б.7) [118]. Характер рН-зависимости скорости реакции позволяет сделать вывод, что в каталитическом процессе участвует ионизированная карбоксильная группа Glu-270. График зависимости активности фермента от рН представляет собой колоколообразную кривую с максимумом при рН 7,5; положение максимума определяется ионизацией основной формы группы с $pK_a = 6$ и кислой формы группы с $pK_a = 9,1$ в свободном ферменте [119, 120]. Более низкий pK_a соответствует Glu-270, более высокий пока не отнесен ни к какой группе. По всей видимости, гидроксильная группа Tug-248 выступает в этой реакции в роли общей кислоты [110]. Хотя прямых данных в пользу высказанного предположения нет, данный остаток, несомненно, важен для проявления пептидазной активности. Модификация боковой цепи тирозина в результате ацетилирования или диазотирования подавляет пептидазную активность, но *усиливает* эстеразную активность фермента [121]. Интересно, что при замещении цинка атомом ртути, кадмия или свинца эстеразная активность не изменяется, а пептидазная подавляется [122].

Центральным моментом механизма действия карбоксипептидазы является вопрос о том, в какой роли выступает остаток Glu-270 — является ли он нуклеофильным катализатором, образующим смешанный ангидрид с субстратом [схема (12.25)], или представляет собой общее основание, которое активирует атаку субстрата молекулой воды [схема (12.26)] [110].



Дело в том, что прямых данных слишком мало, чтобы можно было сделать выбор между этими двумя возможностями. Применение методов исследования быстрых реакций (включая импульсное «замораживание» реакции), в которых использовались физиологические субстраты, никогда не позволяло обнаружить промежуточный ацилфермент. Совсем недавно были описаны два эксперимента, результаты которых противоречат друг другу. Данные опыта, в котором в качестве субстрата использовался эфирный субстрат — О-(*транс*-*n*-хлорциннамоил)-L-β-фенил-

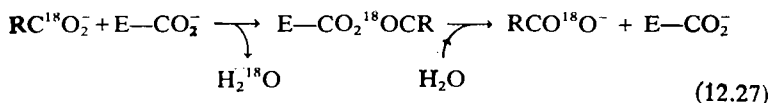
лактат — свидетельствовали о наличии двухстадийного механизма, включающего образование в качестве промежуточного соединения ацилфермента в ходе реакции между коричневой кислотой и карбоксильной группой фермента [123].



Поскольку при нормальной температуре промежуточные соединения обнаружить не удавалось, опыты проводились при температурах до -60°C . За ходом реакции следили по изменению в спектре поглощения остатка коричневой кислоты (аналогично тому, как это делалось в случае фурилакрилоиловой группы; гл. 7). Спектр этого соединения очень чувствителен к химическому окружению; он может измениться при образовании фермент-субстратного комплекса, ацилфермента и комплекса фермента с продуктом, и предсказать природу этих изменений не так-то просто. При смешивании субстрата с *избытком* фермента при повышенных температурах было установлено, что гидролиз субстрата представляет собой простой экспоненциальный процесс. Однако при низких температурах (порядка -40°C) реакция является двухстадийной. При увеличении температуры константа скорости для второй стадии возрастает быстрее, чем для первой. Таким образом, при низкой температуре вторая стадия является более медленной, чем первая, а при высокой — более быстрой. Было высказано предположение, что на первой стадии происходит образование ацилфермента, а на второй — его гидролиз. При нормальных температурах скорость деацилирования относительно высока, поэтому ацилфермент не накапливается; при низких же температурах скорость становится достаточно низкой для накопления этого соединения. Однако изменения в спектре поглощения циннамоильного остатка не удается так просто связать с какими-либо конкретными химическими или физическими событиями, как это было, например, в случае *n*-нитрофенола, увеличение поглощения которого указывало на расщепление нитрофенилового эфира. Не исключено, что изменения в спектре поглощения обусловлены индуцируемыми субстратом конформационными изменениями в ферменте. В связи с этим понадобились дополнительные доказательства в пользу образования ковалентного промежуточного соединения. При -58°C , когда ацилфермент стабилен, к ферменту был добавлен

прочно связывающийся конкурентный ингибитор L-бензилсукцинат. Этот ингибитор не вытеснял из фермента циннамоильный остаток, указывая на то, что последний связан ковалентно. Имеются данные, что это ковалентное промежуточное соединение является ангидридом кислоты: при частичной денатурации ацилфермента мочевиной происходит деацилирование с константой скорости, отвечающей гидролизу ангидрида кислоты.

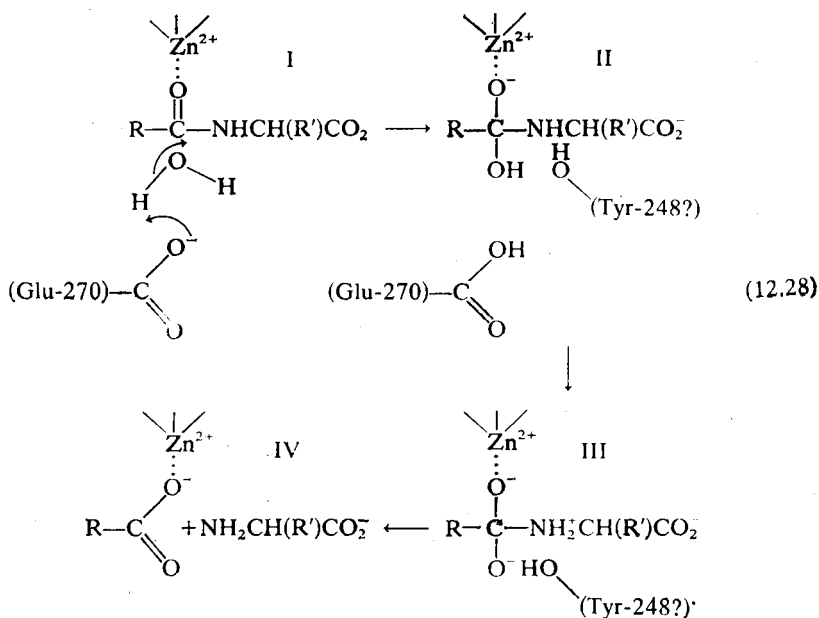
Результаты другого недавно проведенного эксперимента, в котором исследовался изотопный обмен [124], свидетельствовали против образования ацилфермента. Если гидролиз протекает по схеме (12.25) (с образованием ангидрида), то для синтеза пептида в ходе обратной реакции необходимо предварительное образование ангидрида из фермента и RCO_2^- . Следовательно, фермент должен обладать способностью катализировать обмен ^{18}O между субстратом и водой [схема (12.27)]. Однако без



добавления свободной аминокислоты $\text{NH}_3^+\text{CH}(\text{R}')\text{CO}_2^-$ обмена не происходит, он имеет место лишь в ее присутствии в результате синтеза пептида в ходе обратной реакции. Обмен не стимулируется аналогом указанной кислоты $\text{HOCH}(\text{R}')\text{CO}_2^-$. Все эти данные исключают возможность протекания реакции через образование ангидрида, если только не предположить, что добавляемая аминокислота (но не ее гидроксилсодержащий аналог) является активатором реакции обмена или высвобождающаяся в ходе реакции (12.27) H_2^{18}O не обменивается со средой, оставаясь связанной с ферментом. Все сказанное выше вместе с данными о том, что метанол не может заменить воду в реакции сольватации, привели к механизму, представленному на стр. 382 [124].

Этот механизм объясняет неспособность метанола заменить воду, поскольку промежуточное соединение III имеет два отрицательно заряженных атома кислорода. Гидроксильная группа Туг-248, вероятно, выступает в роли «мостика» при переносе протона от гидроксильной группы тетраэдрического промежуточного соединения II на атом азота.

Возможно, результаты описанных экспериментов и не противоречат друг другу. Имея в виду упоминавшиеся ранее данные о том, что химическая модификация фермента или вытеснение иона металла по-разному сказываются на активности эстеразы и пептидазы, можно предположить, что гидролиз эфира коричной кислоты протекает через образование ацилфермента, тогда



как гидролиз пептидов — по механизму общего основного катализа, в котором роль катализатора выполняет остаток Glu-270.

в. Зимоген

Прокاربоксипептидаза А активируется при отщеплении с помощью трипсина около 64 аминокислотных остатков с N-конца полипептидной цепи [125]. Этот зимоген обладает довольно высокой каталитической активностью. Проявляя способность гидролизовать небольшие эфиры и пептиды [126, 127], прокарбоксипептидаза отщепляет от лизоцима C-концевой лейцин только в семь раз медленнее, чем карбоксипептидаза. Зимоген гидролизует также бензоил-Gly-L-Phe с $k_{\text{cat}} = 3 \text{ с}^{-1}$ и $K_M = 2,7 \text{ мМ}$ (соответствующие величины для фермента равны 120 с^{-1} и $1,9 \text{ мМ}$) [126]. В отличие от химотрипсина в прокарбоксипептидазе, несомненно, имеется центр связывания и каталитический аппарат практически полностью сформирован.

4. Кислые протеазы [128—130]

Кислые протеазы названы так потому, что функционируют при низком pH. Наиболее известный представитель этой группы — пепсин, первый из ферментов, получивший наименование (Шванн, 1825 г.). К этой же группе относятся химозин (реннин),

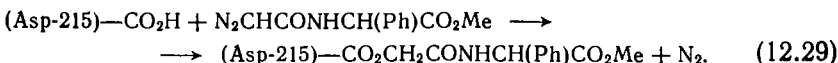
катепсин D, *Rhizopus*-пепсин (выделенный из *Rhizopus chinensis*) и пенициллопепсин (выделенный из *Penicillium janthinellum*). Гомологичны между собой пепсин, химозин и пенициллопепсин [131, 132]. Определена структура нескольких ферментов, но лишь при низком разрешении [133, 134]. Правда, недавно структура пепсина уточнена с разрешением 2,7 Å [135], а структура пенициллопепсина [136] — с разрешением 2,8 Å. О механизме действия пепсина и пенициллопепсина известно гораздо меньше, чем о механизме действия любой другой кислой протеазы; нет даже никакой простой химической модели, которая могла бы служить руководством при исследовании. Рассмотренные ниже данные относятся к обоим ферментам, близким по структуре и по своим кинетическим свойствам.

а. Пепсин

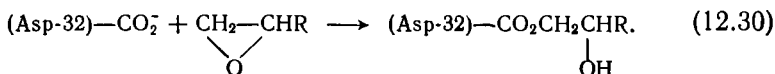
Пепсин, мол. вес которого равен 34 644, состоит из единственной полипептидной цепи, содержащей 327 аминокислотных остатков [137, 138]. Ser-68 фосфорилирован, однако удаление фосфата не приводит к существенным изменениям каталитических свойств фермента [139]. Как и у других кислых протеаз, активный центр пепсина занимает обширную область, в которую может поместиться по крайней мере четыре-пять, а возможно, и до семи остатков молекулы субстрата [140, 141]. Наиболее благоприятной для функционирования пепсина является такая ситуация, когда по обе стороны от расщепляемой связи находятся гидрофобные аминокислоты. Статистический анализ процесса расщепления связей в белках показывает, что подцентр S_1 специфичен к лейцину, фенилаланину, триптофану и глутамату (!), а подцентр S_1' — к триптофану, тирозину, изолейцину и фенилаланину [141]. Пепсин, как правило, не гидролизует эфиры; исключение составляют эфиры L- β -фенилмолочной кислоты и некоторые эфиры сернистой кислоты.

1. *Механизм действия пепсина.* Пепсин имеет два каталитически активных остатка — Asp-32 и Asp-215. Их ионизацию можно исследовать, воспользовавшись рН-зависимостью активности фермента, оптимум которой находится при рН 2—3 и определяется ионизацией кислой формы группы с $pK_a \sim 4,5$ и основной формы группы с $pK_a \sim 1,1$ [142, 143]. Значения pK_a идентифицированы с помощью опытов по связыванию необратимых ингибиторов, способных специфически взаимодействовать с ионизированными или неионизированными карбоксильными группами. Диазосоединения типа метилового эфира N-диазоацетил-L-фенилаланина, взаимодействующие с неионизированными карбоксильными группами, специфически реагируют с

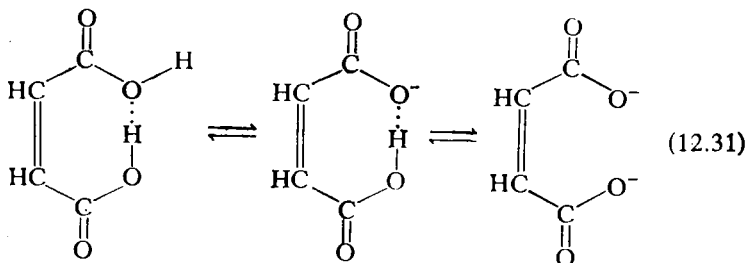
Asp-215 вплоть до pH ~ 5 [уравнение (12.29)] [144—146]:



Эпоксиды, специфически реагирующие с ионизируемыми карбоксильными группами, модифицируют Asp-32 [уравнение (12.30)]. pH-зависимость скорости модификации показывает, что pK_a этого остатка менее 3 [147].

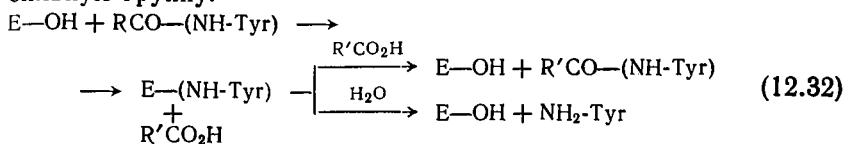


Исследование кристаллической структуры фермента при высоком разрешении показывает, что карбоксильные группы двух указанных остатков аспарагиновой кислоты связаны друг с другом водородной связью [145, 146]. Аналогичная картина имеет место при ионизации малеиновой кислоты, имеющей pK_a 1,9 и 6,2:

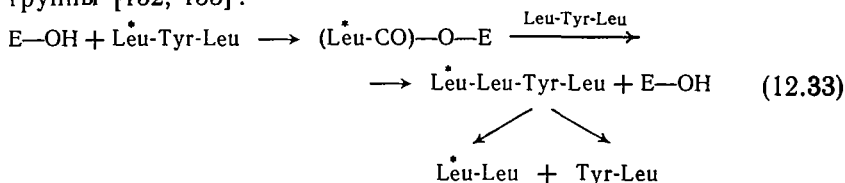


Любой предлагаемый механизм действия пепсина должен объяснять тот факт, что во время реакции образуется как *аминофермент*, так и *ацилфермент*. Впервые предположение об образовании аминофермента было высказано около 20 лет назад, когда выяснилось, что пепсин катализирует не только гидролиз, но и транспептидацию [148]. При гидролизе Cbz-Glu-Tyr образуются такие соединения, как Cbz-Glu-Tyr-Tyr и Tyr-Tyr. Проще всего объяснить этот факт, предположив, что происходит образование аминофермента E-NHR и что это приводит к переносу аминокетильной группы на свободную карбоксильную группу при синтезе нового пептида. Данная гипотеза подтверждается результатами недавно проведенных экспериментов по определению соотношения между продуктами, в которых один аминокетильный фермент мог образоваться из нескольких субстратов [схема (12.32)] [149—150]. (Далее мы всюду через NH-Tyr будем обозначать тирозин, связанный с другим остатком через NH-группу, а через Leu-CO — лейцин, связанный через карбок-

сильную группу.



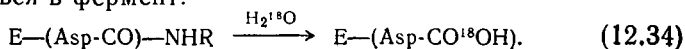
Предположение об образовании ацилфермента как промежуточного соединения было высказано в 1962 г., когда выяснилось, что пепсин катализирует обмен ^{18}O между H_2^{18}O и карбоксильными группами Cbz-L-Phe и Cbz-L-Tyr. Эта гипотеза, как правило, не рассматривалась всерьез до тех пор, пока не было показано, что при гидролизе Leu-Tyr-Leu образуется Leu-Leu, что может быть обусловлено следующим переносом ацильной группы [152, 153]:



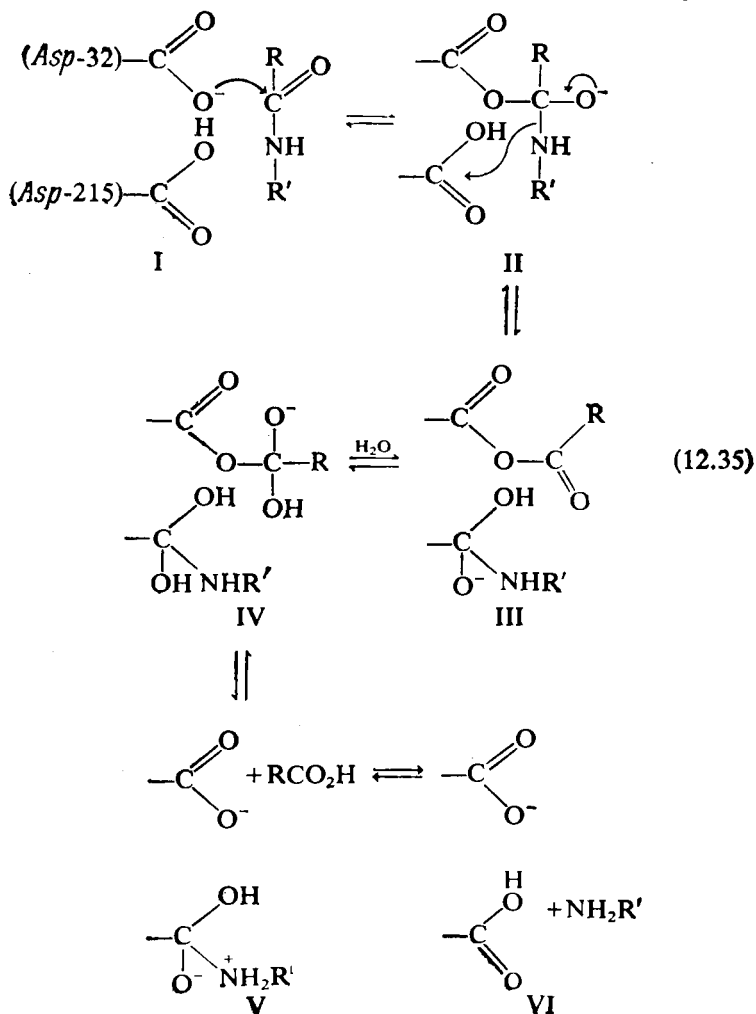
Этот эксперимент был повторен с использованием субстрата с двойной меткой ^{14}C Leu-Tyr- ^3H Leu, чтобы показать, что в ходе реакции происходит одновременный перенос амино- и ацильной групп. Было установлено, что образуется как ^3H Leu- ^3H Leu, так и ^{14}C Leu- ^{14}C Leu [154]. Продукт, меченный ^{14}C (его в три-четыре раза больше), образуется в результате переноса ацильной группы, а продукт, меченный ^3H , — из ^{14}C Leu-Tyr- ^3H Leu- ^3H Leu, который образуется из аминфермента согласно схеме (12.32).

Следует иметь в виду, что прямых данных в пользу существования промежуточных соединений с ковалентными связями нет. Возможно, аминогруппа в аминферменте связана не ковалентно, а просто «активирована». Перенос ацильной группы в ходе реакции (12.33) может происходить и путем прямой атаки Leu-Tyr-Leu связанного с ферментом Leu-Tyr-Leu. Кроме того, исследования ферментативной реакции в предстационарных условиях не выявили ни одного промежуточного соединения. Если они и образуются, то не накапливаются.

Прежде чем попытаться делать какие-то предположения о механизме реакции, обсудим следующий момент. Если бы образовался аминфермент, в котором аминогруппа связана в ферменте амидной связью с одной из карбоксильных групп, то при гидролизе в воде, обогащенной H_2^{18}O , изотоп ^{18}O должен был бы включаться в фермент:



Однако по данным, полученным в лаборатории В. К. Антонова, при гидролизе в воде, на 40% обогащенной H_2^{18}O , включения ^{18}O в фермент не происходит. По окончании катализируемого гидролиза AcPhe-TyrOEt фермент выделяли с помощью гель-фильтрации и две его каталитические карбоксильные группы по отдельности блокировали с помощью реакций (12.29) и (12.30). При гидролизе двух образующихся эфиров в конечных продуктах — $\text{HO-CH}_2\text{CONHCH(Ph)CO}_2\text{H}$ и $\text{HO-CH}_2\text{CH(OH)R-}^{18}\text{O}$ не обнаружено. Либо эта аминокислота связана с аминоферментом нековалентно, либо, возможно, справедлив следующий предложенный В. К. Антоновым механизм [155]:



Согласно этому механизму, транспептидация путем переноса аминогруппы осуществляется просто обращением стадии, ведущей от IV к V. Однако для переноса ацильной группы необходимо, чтобы соединение III могло распадаться с отщеплением $R'NH_2$ и образованием ацилфермента $[(Asp-32) - CO_2COR : (Asp-215) - CO_2H]$. Не исключено, что возможность распада соединения III с высвобождением либо $R'NH_2$, либо RCO_2H объясняет те необычные результаты, которые были получены в экспериментах по определению соотношения между продуктами, в ходе которых изучали превращения серии субстратов, протекающие с образованием общего аминофермента, E-Tp, в присутствии акцептора — AcPhe [156]. Соотношение между AcPheTp и Tp, образующимися при гидролизе серии пептидов XPheTp в присутствии AcPhe, изменяется в зависимости от природы X ($X = AcGly$ и т. д.). Обычно этот факт рассматривается как довод против образования общего промежуточного соединения (гл. 7, разд. Б.2.6). Однако относительные скорости отщепления $R'NH_2$ (например, Tp) и RCO_2H (например, XPhe) должны зависеть от природы фрагмента RCO_2H , и, следовательно, доля образующегося аминофермента будет изменяться. Таким образом, соотношение между продуктами реакции в случае механизма (12.35) не должно быть постоянным.

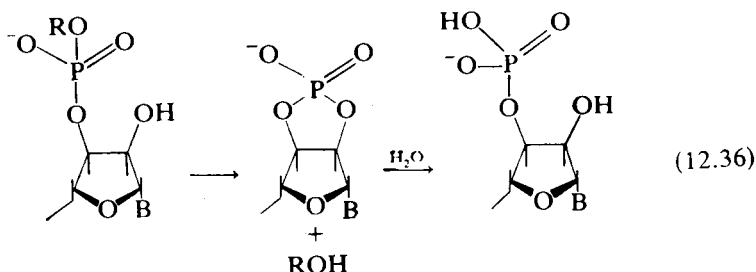
Рассмотренный механизм значительно сложнее, чем в случае других протеаз. Тем не менее все его стадии вполне приемлемы с точки зрения химии, хотя подобных аналогий в простых химических системах не обнаружено.

2. Зимоген. Пепсин образуется из пепсиногена при отщеплении от N-конца 44 аминокислотных остатков. При нейтральном pH зимоген устойчив, а при $pH < 5$ быстро и самопроизвольно активируется. Активация осуществляется либо в процессе, катализируемом пепсином, либо с помощью внутримолекулярного катализа. Имеется много данных, свидетельствующих о том, что пепсиноген самоактивируется в ходе мономолекулярного процесса, при котором активный центр расщепляет свою собственную полипептидную цепь с N-конца [157—163]. Пожалуй, наиболее изящным образом это было продемонстрировано при автоактивации пепсиногена, ковалентно присоединенного к сфарозе [159]. Молекулы зимогена иммобилизованы и не могут контактировать друг с другом. Тем не менее при pH 2 пепсиноген самопроизвольно активируется. Между двумя путями активации существует конкуренция: бимолекулярная активация преобладает при более высоких концентрациях зимогена и при pH выше 2,5, а внутримолекулярная — при низком pH. Результатом самопроизвольной активации чистого зимогена является то, что

большинство молекул пепсиногена становится активным уже через 10 с после смешивания с соляной кислотой в желудке.

В. Рибонуклеаза [164, 165]

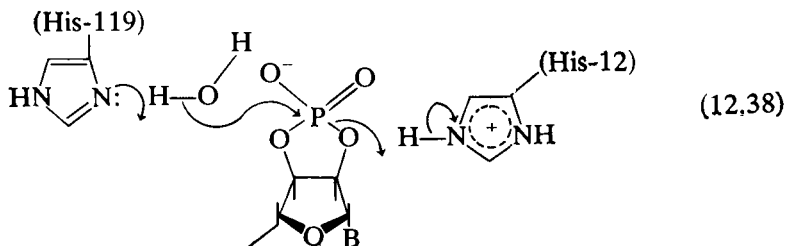
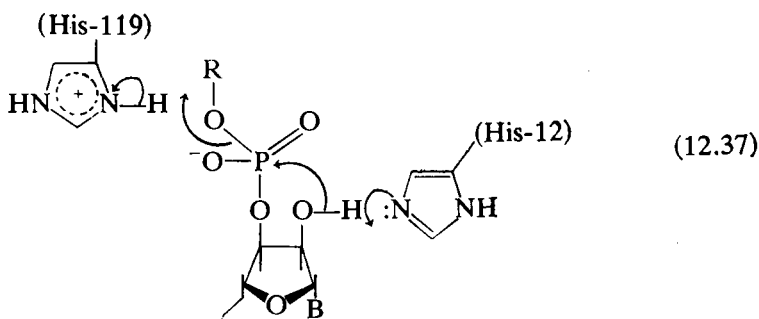
Панкреатическая рибонуклеаза гидролизует РНК в ходе двухстадийного процесса, при котором в качестве промежуточного соединения образуется циклический фосфат:



Циклизация обычно протекает значительно быстрее, чем последующий гидролиз, поэтому промежуточное соединение можно легко выделить. Молекула ДНК рибонуклеазой не гидролизуется, поскольку у нее отсутствует 2'-гидроксильная группа. Фермент высокоспецифичен по отношению к основанию, находящемуся на 3'-конце: это основание должно быть пиримидином — урацилом или цитозином.

Рибонуклеаза имеет мол. вес 13 680 и образована единственной полипептидной цепью, содержащей 124 аминокислотных остатка [166, 167]. Связь между Ala-20 и Ser-21 может расщепляться субтилизином. Интересно отметить, что при этом пептид остается связанным с остальной частью молекулы с помощью нековалентных связей. Модифицированный белок, названный рибонуклеазой S, и нативный белок, называемый сейчас рибонуклеазой A, обладают одинаковой каталитической активностью. Благодаря своим небольшим размерам, простоте выделения и стабильности рибонуклеаза очень удобна для физических и химических исследований. Она была первым ферментом, для которого удалось определить аминокислотную последовательность [166]. Кристаллическая структура обеих форм фермента была установлена с разрешением 2,0 Å [168, 169]. Поскольку каталитическая активность рибонуклеазы зависит от состояния ионизации двух остатков гистидина, фермент всесторонне исследовался с помощью ЯМР — очень ценного метода для анализа свойств имидазольного кольца гистидина (гл. 5, разд. Ж.2.а).

Химический механизм действия рибонуклеазы в том виде, в каком его себе сейчас представляют, был построен из общих соображений еще до установления кристаллической структуры фермента [170]. Известно, что график зависимости активности фермента от pH представляет собой колоколообразную кривую с максимумом при $\text{pH} \sim 7$. pH-зависимость k_{cat}/K_M показывает, что скорость гидролиза зависит от состояния ионизации в свободном ферменте основания с $\text{p}K_a = 5,22$ и кислоты с $\text{p}K_a = 6,78$, в то время как из pH-зависимости k_{cat} следует, что в фермент-субстратном комплексе эти значения $\text{p}K_a$ изменяются до 6,3 и 8,1. Было высказано предположение, что реакция катализируется по механизму общего кислотно-основного катализа с участием двух остатков гистидина, как выяснилось позднее, — His-12 и His-119:

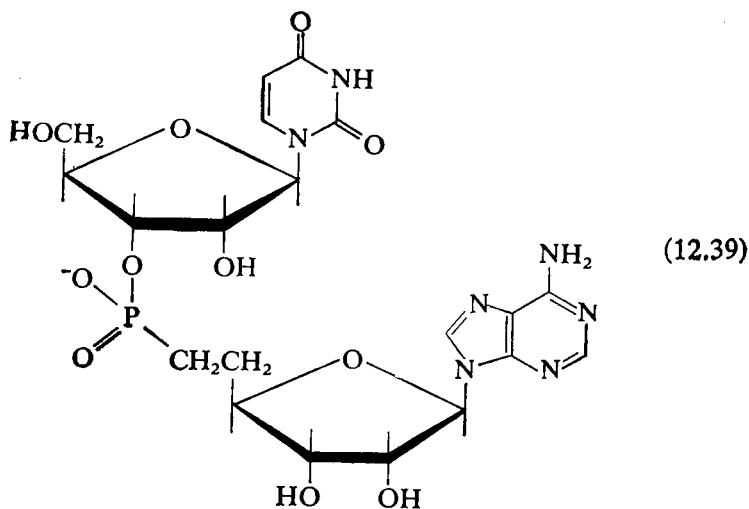


На стадии циклизации His-12 выступает в роли общего основного катализатора, а His-119 — в роли общей кислоты, которая протонирует уходящую группу. На стадии гидролиза His-12 и His-119 меняются ролями; His-119 активизирует атаку воды по механизму общего основного катализа, а His-12 является кислотным катализатором, протонирующим уходящую группу. Такая обратимость вполне логична. Реакция (12.38) по существу является реакцией, обратной (12.37), за исключением того, что ROH заменено на HOH . Исходя из принципа детального равно-

весия, можно ожидать, что группа, выступающая в прямой реакции в роли общей кислоты, в обратной реакции будет играть роль общего основания.

1. Структура фермента и фермент-субстратного комплекса [164, 171]

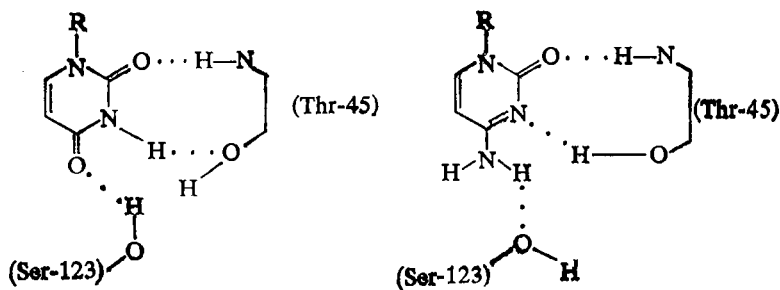
В рибонуклеазе имеется четко выраженная расщелина для связывания субстрата. В этой расщелине располагаются His-12, His-119 и боковые цепи остатков Lys-7, Lys-41 и Lys-66. Структура фермент-субстратного комплекса на стадии циклизации была построена исходя из данных кристаллографических исследований структуры комплекса фермента с аналогом субстрата УрсА (12.39), представляющим собой фосфонатный аналог УрА.



Это очень близкий аналог, отличающийся от субстрата только тем, что атом кислорода замещен в нем —CH₂-группой, так что структура его комплекса с рибонуклеазой близка к структуре продуктивного фермент-субстратного комплекса. Установлено, что His-119 располагается на расстоянии длины водородной связи от уходящей группы, а His-12 — на расстоянии длины водородной связи от 2'-ОН-группы рибозы пиримидина. Ни одна из боковых цепей лизина не вступает в прямой контакт с субстратом, однако они, по-видимому, имеют важное значение для

катализа, поскольку а) при их ацетилировании фермент теряет свою активность и б) остатки лизина находятся в положениях 7, 41 и 66 во всех 20 (или около того) рибонуклеазах этого класса, для которых установлена аминокислотная последовательность [172]. Возможно, положительные заряды этих боковых цепей стабилизируют промежуточное соединение, содержащее пятивалентный атом фосфора, которое образуется, когда гидроксильная группа атакует фосфат. Значения pK_a для His-12 и His-119, измеренные с помощью ЯМР при 40°C, оказались равными 5,8 и 6,2 соответственно [173]. При физиологическом pH значительная часть гистидиновых остатков находится в таком состоянии ионизации, при котором возможен общий кислотно-основной катализ [схема (12.37)].

Показательным примером специфичности по принципу замка и ключа может служить связывание пиримидина с активным центром [171]. Водородные связи с гидроксильными группами Ser-123 и Thr-45 и NH-группой, принадлежащей Thr-45, могут образовывать как урацил, так и цитозин [схема (12.40)]. Связывание производных аденозина, имеющих больший размер, приводит к смещению фосфата относительно гистидиновых остатков.

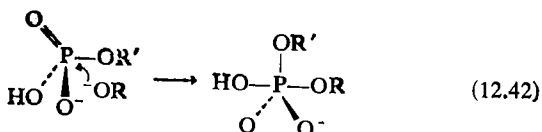
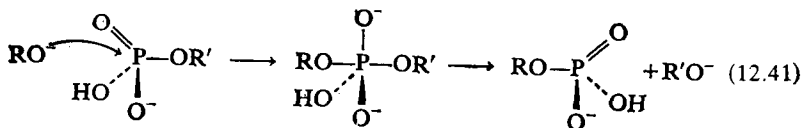


(12.40)

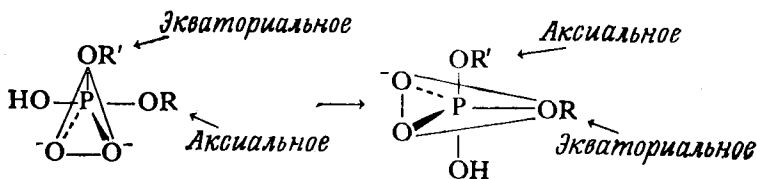
2. Стереохимия реакции замещения

Нуклеофильное замещение у атома фосфора в реакции этого типа протекает как реакция присоединения—отщепления, в которой образуется промежуточное соединение, содержащее пятивалентный атом фосфора. Упомянутая реакция может осуществляться двумя путями: по механизму (12.41), когда атакующий нуклеофил присоединяется со стороны, противоположной уходящей группе (in-line mechanism), или по механизму (12.42), когда нуклеофил подходит со стороны уходящей группы

(adjacent mechanism) [174, 175]. В последнем случае реакция имеет еще одну стадию.

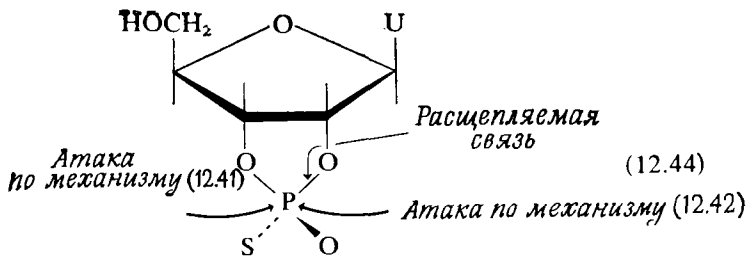


Для тригонального бипирамидального атома фосфора должен наблюдаться поворот заместителей, что обусловлено перемещением уходящей группы в аксиальное положение [схема (12.43)]. Эта перегруппировка является следствием детального равновесия: нуклеофил атакует по аксиальному положению и, следовательно, уходящая группа должна покинуть это положение (поскольку в ходе обратной реакции она должна атаковать по аксиальному положению).



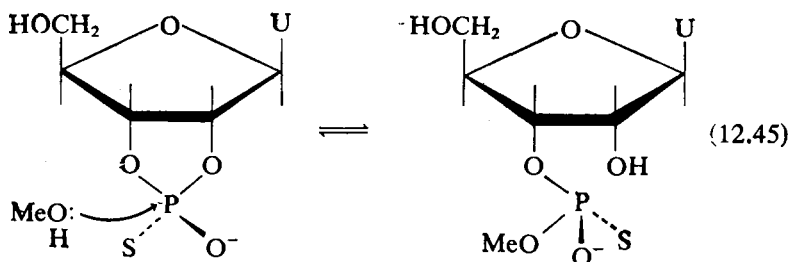
(12.43)

Исследование фермент-субстратного комплекса позволило высказать предположение о наличии механизма (12.41), которое получило подтверждение в ходе весьма элегантных химических экспериментов с использованием оптически активного субстрата уридин-2'-3'-циклофосфоата [176—178]:

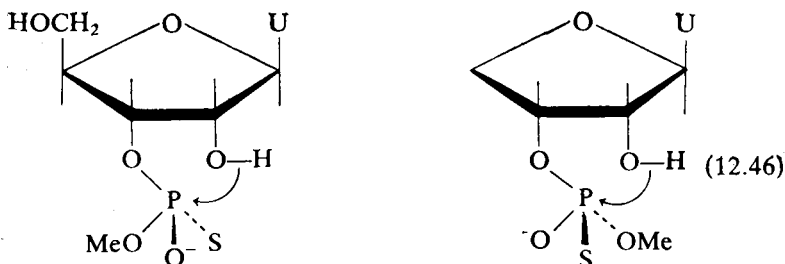


(12.44)

Это соединение было получено в кристаллическом виде, а его структура и абсолютная стереохимическая конфигурация установлена с помощью рентгеноструктурного анализа. При инкубации с рибонуклеазой в смеси метанол/вода образовывался метиловый эфир по механизму, обратному схеме (12.37). Это соединение было также закристаллизовано, а его абсолютная стереохимическая конфигурация установлена методом рентгеноструктурного анализа [см. схему (12.45)].



Метиловый эфир образуется по механизму (12.41). При инкубации его в водном растворе с рибонуклеазой образуется исходный циклофосфотиоат (12.44), что согласуется с принципом детального равновесия, поскольку прямая и обратная реакции должны протекать через одно и то же переходное состояние. Но это прямо показывает, что стадия циклизации сопровождается атакой по механизму (12.41): атака гидроксила рибозы по механизму (12.42) при циклизации метилового эфира в реакции (12.45) должна была бы дать энантиомер циклофосфотиоата.

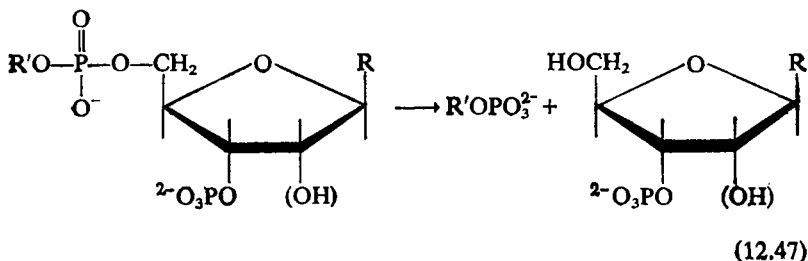


Атака по механизму (12.41)

Атака по механизму (12.42)

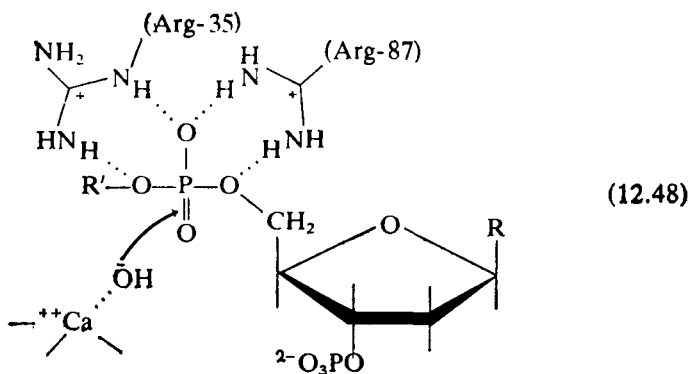
Г. Стафилококковая нуклеаза [179, 180]

Стафилококковая нуклеаза является фосфодиэстеразой, расщепляющей ДНК и РНК с образованием 3'-фосфомононуклеозидов.



Фермент имеет мол. вес 16 900 и образован единственной полипептидной цепью, содержащей 149 аминокислотных остатков. Структура стафилококковой нуклеазы и его комплекса с тимидин-3',5'-дифосфатом была установлена с разрешением 2,0 Å [181, 182], и, несмотря на это, механизм действия фермента не известен. Вспомнив об успехах, достигнутых при исследовании рибонуклеазы, и имея в виду все вышесказанное о стафилококковой нуклеазе, можно сделать вывод, что определение структуры фермента не означает, что мы автоматически устанавливаем механизм его действия. И тем не менее данные о кристаллической структуре послужили основой при выяснении механизма действия рассматриваемого фермента.

5'-фосфатная группа тимидин-3',5'-дифосфата в комплексе фермента с ингибитором занимает, по-видимому, центр связывания фосфата диэфирного субстрата. Эта группа связана водородными связями с положительно заряженными боковыми цепями Arg-35 и Arg-87, что облегчает атаку нуклеофилом. Однако вблизи расщепляемой связи не обнаружено никаких кислотных оснóвных боковых цепей, хотя на расстоянии ~5 Å от фосфатной группы находится ион кальция, связанный с карбоксилатными группами Asp-21, Asp-40 и Glu-43. Известно, что ионы кальция имеют важное значение для активности фермента. Возможно, в реакции принимают участие связанные с металлом нуклеофильные гидроксил-ионы [схема (12.48)] [183, 184].

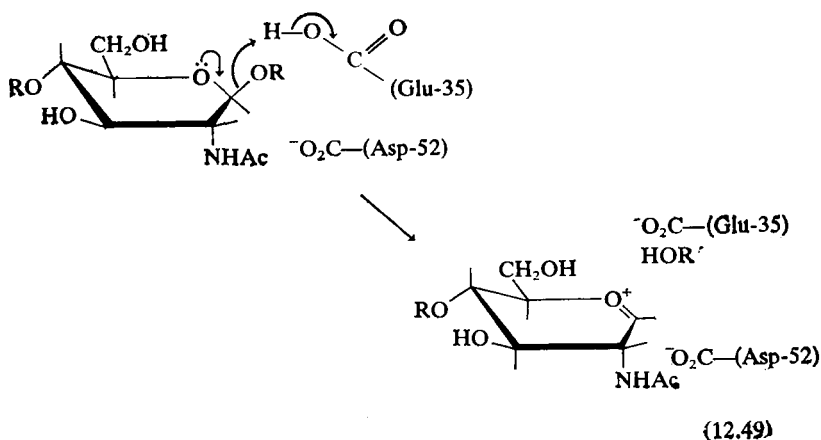


Это предположение подтверждается в какой-то мере тем фактом, что между ионом кальция и фосфатной группой имеется некоторая электронная плотность, как видно на карте кристаллической структуры; кроме того, рН-оптимум ферментативной активности весьма высок (график рН-зависимости k_{cat}/K_M представляет собой колоколообразную кривую, положение максимума которой определяется значениями pK_a 8,4 и 9,2) [185]. Все приведенные соображения носят сугубо предположительный характер. Необходимо, кроме того, обратить внимание на следующее обстоятельство: с комплексом между ферментом и ингибитором связано два иона кальция [186], но в кристаллической структуре виден только один.

Д. Лизоцим [187—189]

Лизоцим яичного белка — это небольшой фермент с мол. весом 14 500, состоящий из 129 аминокислотных остатков. О лизоциме говорилось в конце гл. 1; отмечалось, что пионерские работы по установлению кристаллической структуры этого фермента стимулировали исследования ферментов в растворе. Механизм действия лизоцима был построен исходя из данных о структуре активного центра с привлечением идей физической органической химии [190, 191]. Механизм основан на следующих положениях. Молекула лизоцима имеет шесть подцентров для связывания глюкопиранозных колец субстрата — А, В, С, D, Е и F; расщепляемая связь располагается между подцентрами D и E поблизости от карбоксильных групп Glu-35 и Asp-52; это позволяет предположить, что реакция протекает через образование промежуточного карбоний-иона (точнее карбоксоний-иона), который стабилизируется ионизированной карбоксильной группой

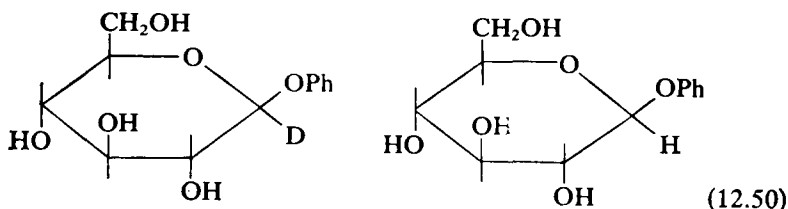
остатка Asp-52. Высвобождение спирта катализируется по механизму общего кислотного катализа неионизированной карбоксильной группой Glu-35. Кроме того, как обсуждалось в гл. 10 (разд. А.5.6 и В.5.в), при связывании с подцентром D кольцо сахара принимает свойственную карбоний-иону конформацию «софы»; для небольших полисахаридов деформации на участке D не происходит вследствие связывания их с центрами ABC. Рассмотрим, каким образом все эти положения (за исключением, пожалуй, роли деформации при связывании с подцентром D) были проверены экспериментально. (Конформация глюкопиранозного кольца, связанного с подцентром D, вначале была названа конформацией «полукресла», однако точнее называть ее «софой» [192].)



1. Карбоний-ион

Механизм с участием карбоний-иона реализуется путем прямой атаки субстрата водой или путем нуклеофильной атаки остатком Asp-52 углеродного атома C-1 с образованием промежуточного соединения, которое по своей природе является эфиром. Простая реакция замещения исключается, поскольку протекает с сохранением конфигурации (гл. 7, разд. В.3) [193—195]. Образование карбоний-иона, т. е. выполнение механизма S_N1 , подтверждается данными о вторичных изотопных эффектах в опытах с использованием субстратов, меченных в положении C-1 дейтерием или тритием [196, 197]. Так, например, k_H/k_D для соединений, представленных на схеме (12.50), составляет 1,11, в то время как для реакции с образованием карбоний-иона эта

величина равна 1,14, а для реакции бимолекулярного замещения (S_N2) в простых химических моделях — 1,03.



2. Электростатический и общий кислотный катализ

pH-зависимость k_{cat}/K_M показывает, что скорость реакции, катализируемой лизоцимом, определяется состоянием ионизации кислоты с $pK_a \sim 6$ и основания с $pK_a \sim 4$ в свободном ферменте [198]. Остаток Asp-52 можно специфически блокировать посредством этерификации его триэтоксийфторборатом (реакция, протекающая лишь при наличии ионизированной карбоксильной группы). Различие в кривых титрования для модифицированного и нативного белка показывает, что значение pK_a Asp-52 равно 4,5, тогда как для Glu-35 оно составляет 5,9 [199]. Таким образом, скорость реакции зависит от состояния ионизации этих двух остатков в соответствии с рассмотренным выше механизмом действия лизоцима.

Результаты, полученные при исследовании обратной реакции, указывают на наличие механизма общего кислотного катализа с участием Glu-35. Установлено, что скорость реакции спиртов с карбоний-ионом фактически не зависит от их pK_a . Этот факт позволяет предположить, что имеет место катализируемая по механизму общего основного катализа атака карбоний-иона спиртом, и, следовательно, согласно принципу детального равновесия, высвобождение алкоголят-иона из гликозида ускоряется по механизму общего кислотного катализа [200].

Описывая впервые механизм действия лизоцима, Вернон [191] подчеркивал, что наиболее важным фактором катализа является электростатическая стабилизация карбоксоний-иона остатком Asp-52. Проведенные недавно теоретические исследования, в которых впервые принималась во внимание диэлектрическая постоянная белка, свидетельствуют о том, что в результате электростатической стабилизации энергия активации для стадии химического превращения, характеризующейся константой k_{cat} , уменьшается на $37,6 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($9 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) [201]. Этот вывод получил экспериментальное подтверждение

Такое сильное уменьшение энергии активации показывает, что химическое превращение карбоксильной группы Asp-52 в $-CH_2OH$ -группу приводит к потере ферментативной активности [202].

3. Энергии связывания с подцентрами

Первоначально предполагалось, что нековалентные взаимодействия между ферментом и сахарным кольцом на подцентре D приводят к тому, что сахар переходит в конформацию «софы», свойственную карбоний-иону. Предпринимались попытки оценить энергию связывания с этим подцентром путем выделения соответствующей составляющей из суммарной энергии связывания, полученной из кинетических данных и экспериментов по связыванию [187, 189]. Некоторые результаты этих исследований представлены в табл. 12.3. Хотя приведенные значения не

Таблица 12.3

Энергия связывания различных остатков с подцентрами лизоцима яичного белка

Подцентр	Связываемый остаток ^{а)}	Энергия связывания	
		кДж·моль ⁻¹	ккал·моль ⁻¹
A	NAG	-8	-2
B	»	-12	-3
	NAM	-16	-4
C	NAG	-20	-5
D	NAM	+12	+3
	NAG	0	0
E	»	-16	-4
F	»	-8	-2

^{а)} NAG=N-ацетилглюкозамин, NAM=N-ацетилмуравья кислота.

отличаются высокой точностью, ясно, что взаимодействие NAM с подцентром D сопровождается их взаимным отталкиванием. Кроме того, поскольку установлено, что (NAG)₄ связывается примерно одинаково с подцентрами A, B, C и A, B, C, D, никакого выигрыша в энергии при связывании NAG с подцентром D нет [203]. Место связывания небольших субстратов было определено по их взаимодействию со специфическими соединениями-зондами, например с красителем бибрихским алым [204]

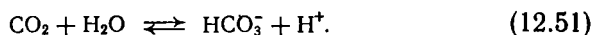
и ионом лантанида [203], которые связывались в расщелине; было показано, что указанные субстраты связываются в основном непродуктивно. На первый взгляд это служит веским доводом в пользу механизма деформации. Однако Левитт [205], пересмотрев эти данные (гл. 10, разд. В.4.в) и проделав соответствующие расчеты, пришел к выводу, что вероятность деформации сахарного кольца при связывании с подцентром D очень мала [201, 205]. Кроме того, было показано, что аналоги переходного состояния, имеющие химически модифицированное сахарное кольцо, структурно аналогичное карбоний-иону, связываются не более чем в 100 раз прочнее субстратов, у которых это кольцо не модифицировано (гл. 10, разд. А.5) [203, 206]. Далее, предполагается, что слабое связывание сахарного кольца с подцентром D обусловлено вытеснением этим кольцом двух молекул воды, связанных с карбоксильной группой Asp-52. Следовательно, связывание с подцентром является скорее «электростатическим», чем механическим. (В любом случае, как подчеркивалось в гл. 10, более прочное связывание переходного состояния не означает, что связанный субстрат деформирован.)

Данные, полученные в результате рентгеноструктурных исследований лизоцима и его комплексов с ингибиторами, не только выдержали испытание временем, но и получили четкое подтверждение при исследовании в растворах (но в этом случае основное внимание уделялось электростатической компоненте механизма напряжения, а не компоненте, обусловленной деформацией).

Наконец, следует отметить, что, как установлено, связывание небольших субстратов является двухстадийным процессом, сопровождающимся изомеризацией фермент-субстратного комплекса [207, 208]. В чем состоит это так называемое конформационное изменение и как соотносится с описанной выше схемой — неясно; можно предположить, что оно связано с небольшими структурными изменениями, наблюдающимися при связывании $(\text{NAG})_3$ в кристаллическом ферменте.

Е. Карбоангидраза [209, 210]

Карбоангидраза катализирует гидратацию двуокиси углерода и дегидратацию бикарбоната:



Кристаллическая структура изоферментов В и С человека была установлена с высоким разрешением [211, 212]. Обе формы являются металлоферментами, содержащими один моль цинка, прочно связанного с единственной полипептидной цепью с мол.

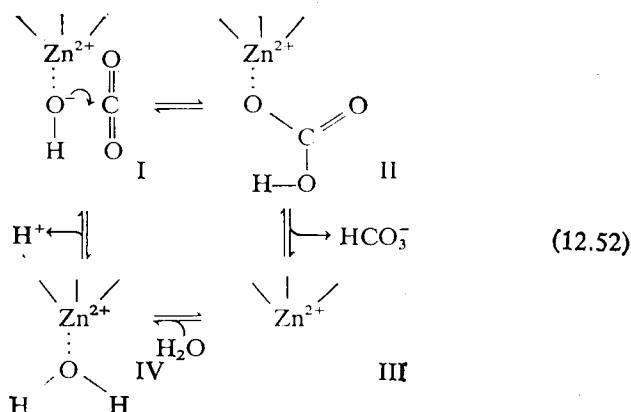
весом 29 000. Полипептидная цепь более активной С-формы состоит из 259 аминокислотных остатков — на один меньше, чем у В-формы [213, 214]. Аминокислотные последовательности этих двух изоферментов совпадают на 60%, а их третичные структуры очень сходны. Лигандами иона Zn^{2+} являются имидазольные кольца трех остатков гистидина, расположенных на дне полости активного центра на расстоянии около 12 Å от поверхности молекулы фермента. Четвертым лигандом служит, по-видимому, молекула воды или гидроксил-ион (в зависимости от рН) [211, 212].

Изофермент С является чрезвычайно эффективным катализатором. Для реакции гидратации k_{cat} равна 10^6 с⁻¹, а K_M для CO_2 — 8,3 мМ, в то время как для реакции дегидратации $k_{cat} = 6 \cdot 10^5$ с⁻¹, а K_M для HCO_3^- равна 32 мМ [215]. Каталитическая активность фермента определяется состоянием ионизации группы с $pK_a = 7$ в свободном ферменте [215]. Реакция гидратации зависит от доли этих групп, находящихся в основной форме, а реакция дегидратации — от доли этих же групп, находящихся в кислой форме. Число оборотов для указанных реакций значительно выше констант скорости переноса протонов между водой и группой с $pK_a = 7$ (приблизительно $2 \cdot 10^3$ с⁻¹; табл. 4.2). В нефизиологических реакциях эти ферменты катализируют также гидратацию альдегидов и гидролиз эфиров.

Предметом исследований в данной области являются в последнее время три вопроса: а) что представляет собой ионизирующаяся группа с $pK_a = 7$, от которой зависит активность фермента? б) какова природа субстрата, связываемого в реакции дегидратации (HCO_3^- , или H_2CO_3)? в) совместимы ли высокие числа оборотов со скоростями переноса протона?

В рамках классического механизма считается, что при высоком рН связанный с цинком нуклеофильный гидроксил-ион образуется за счет связывания с этим атомом молекулы воды с $pK_a = 7$ [210, 216]. Известно, что связанный с цинком гидроксил-ион является нуклеофилом и ионизируется в этой области (гл. 2, разд. Б.7.6). Было высказано множество других предположений на этот счет [217—219], но единственными группами в активном центре, которые могут иметь указанный pK_a , являются гистидины. Однако исследование процесса ионизации остатков гистидина с помощью ЯМР выявило несоответствие между активностью фермента и состоянием их ионизации [220]. К тому же результаты измерений ядерных квадрупольных взаимодействий в ферменте, где цинк замещен на кадмий, указывают на ионизацию связанной с металлом молекулы воды с таким же pK_a , какое было найдено из рН-зависимости активности фермента [221].

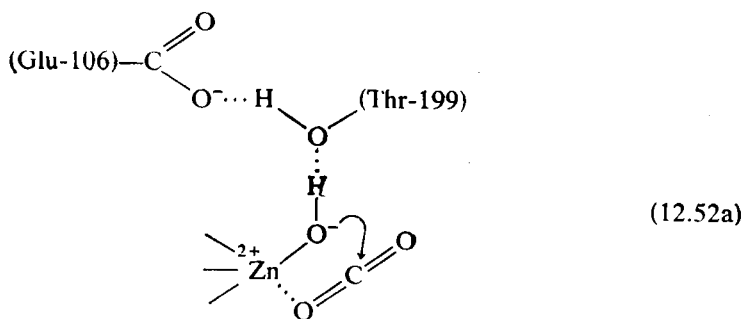
Вполне разумным с химической точки зрения является следующий механизм:



Любой механизм, в котором предполагается, что в роли субстрата в реакции выступает HCO_3^- , требует, чтобы на каком-то этапе от фермента отщепился протон и высвободился в среду. На схеме (12.52) этот процесс происходит на стадии $\text{IV} \rightarrow \text{I}$. В растворе, не обладающем необходимой буферной емкостью, скорость переноса протона слишком мала, чтобы регенерировать свободный фермент. Так, например, из данных табл. 4.2 видно, что константа скорости переноса протона от основания с $\text{pK}_a = 7$ на молекулу воды равна $2,5 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$, а на гидроксил-ион при концентрации 10^{-7} М и $\text{pH} 7$ — $2,3 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$; эти величины значительно ниже числа оборотов $5 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$ при этом же pH . Данное противоречие нельзя разрешить, предположив, что на стадии $\text{III} \rightarrow \text{IV}$ ион цинка связывается не с молекулой воды, а с OH^- -группой. Максимальное значение константы скорости второго порядка равно $\sim 10^{10} - 10^{11} \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (гл. 4, часть 2), что при концентрации гидроксил-иона 10^{-7} М дает для этой стадии при $\text{pH} 7$ предельное значение константы скорости $10^3 - 10^4 \text{ с}^{-1}$. Аналогичные расчеты показывают, что недиссоциированная кислота H_2CO_3 тоже не может служить субстратом в реакции дегидратации, поскольку ее концентрация при $\text{pH} 7$ низка по сравнению с концентрацией HCO_3^- [216, 222]. Если бы H_2CO_3 служила субстратом, то ни поглощения протона, ни высвобождения его в среду не происходило бы. Однако простой расчет показывает, что такие значения констант скорости переноса можно объяснить даже теми низкими концентрациями буферов, которые обычно используются (см. табл. 4.2) [216, 223].

Недавно это положение было проверено в ходе экспериментов с применением растворов, не обладающих буферной емкостью: скорость реакции дегидратации оказалась аномально низкой. Добавление 10 мМ буфера приводит к восстановлению максимальной скорости [224, 225].

Дополнение. В настоящее время установлена кристаллическая структура комплекса карбоангидразы В человека с конкурентным ингибитором — имидазолом [Kannan K. K., Petef M., Fridborg K., Cid-Dresdener H., Lövgren S., FEBS Letts., 73, 115 (1977)]. Этот находящийся в гидрофобном кармане имидазол через атом азота связан координационной связью непосредственно с ионом цинка. Наиболее интересно, по-видимому, то, что он является пятым лигандом цинка и не вытесняет связанную с ним молекулу воды или OH^- -группу. По аналогии с этим предполагается, что атом кислорода двуокиси углерода также непосредственно присоединяется к атому цинка и не вытесняет воду. Таким образом, цинк не только ориентирует молекулу CO_2 и поляризует ее, но и поставляет связанную с ним нуклеофильную молекулу воды:



Увеличение координационного числа цинка до пяти при связывании субстрата аналогично предполагаемому увеличению координационного числа для алкогольдегидрогеназы из печени лошади [схема (12.4)] [15]. Авторы этой работы указывали, что связанная молекула воды образует водородную связь с гидроксильной группой остатка Thr-199, который в свою очередь связан водородной связью с карбоксильной группой Glu-106. Это заставляет взглянуть на проблему идентификации группы, ионизирующейся с $pK_a = 7$, с другой стороны. Возможно, этой группой является карбоксильная группа Glu-106, pK_a которой существенно возрастает при изменении окружения, а не связанная с цинком молекула воды. Если это так, то нуклеофилом

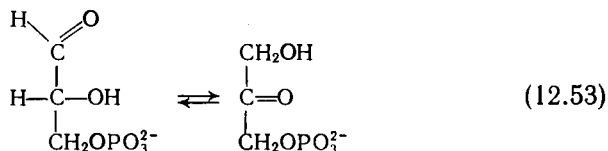
является не гидроксил-ион, как это изображено на схеме (12.52,а), а ненонизированная молекула воды, активируемая остатком Glu-106 по механизму общего основного катализа при участии гидроксила остатка Thr-199.

Ж. Гликолитические ферменты

Большинство гликолитических ферментов получено в кристаллическом виде, и их кристаллическая структура установлена. Современное состояние рентгеноструктурных исследований в этой области было освещено Блэйком [226]. К сожалению, аминокислотная последовательность установлена только для нескольких ферментов. Два из них — лактатдегидрогеназа и глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа — были рассмотрены ранее, в разд. А. Здесь мы остановимся лишь на отдельных интересных вопросах, связанных с некоторыми из этих ферментов.

1. Триозофосфатизомераза [227—229]

Триозофосфатизомераза весьма эффективно катализирует взаимопревращения D-глицеральдегид-3-фосфата и диоксиацетонфосфата:



Кристаллическая структура фермента из мышц цыпленка была установлена с разрешением 2,5 Å [230—231]. Фермент является симметричным димером с мол. весом 53 000, каждая из идентичных цепей которого содержит 247 аминокислотных остатков. Никаких указаний на наличие какой-либо кооперативности между субъединицами в процессе катализа не выявлено.

а. Структура фермент-субстратного комплекса

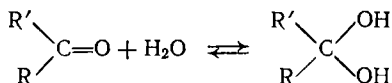
Указанный фермент предоставляет ученым редкую возможность прямо исследовать фермент-субстратный комплекс с помощью рентгеноструктурного анализа. Катализируемая реакция представляет собой простое равновесное взаимопревращение субстрата и продукта, причем константа равновесия реакции

(~ 20)¹ такова, что равновесие сильно сдвинуто в сторону образования диоксиацетонфосфата. Это позволило установить кристаллическую структуру комплекса фермента с ацетонфосфатом с разрешением 6 Å, воспользовавшись разностным Фурье-методом; субстрат проникал внутрь кристаллов фермента с помощью диффузии [230, 232]. Удалось не только локализовать некоторые конформационные изменения в ферменте, но и определить положение субстрата относительно двух кислотно-основных каталитических групп фермента и выяснить механизм реакции. Из исследований фермента в растворе известно (см. ниже), что реакция протекает через образование промежуточного соединения *цис*-ендиола [232, 234] с переносом протона при участии одного основания, возможно, карбоксильной группы остатка Glu-165 [235—237]. Согласно рентгеноструктурным данным, карбоксильная группа глутаминовой кислоты располагается на одинаковом расстоянии от С-3- и С-2-атомов субстрата, что обуславливает перенос протона между ними. Установлено также, что имидазольное кольцо His-95 находится на равном расстоянии от карбоксильного и гидроксильного кислорода, что также обеспечивает перенос протона от одного из этих атомов на другой.

2. Эксперименты с использованием в качестве меток дейтерия и трития и механизм действия ферментов, катализирующих кето-альдольную изомеризацию

Одним из наиболее важных методов исследования механизма действия ферментов, участвующих в переносе водорода между двумя углеродными атомами, состоит в использовании изотопов водорода. Эти эксперименты с каждым годом становятся все сложнее, и, чтобы лучше в них разобраться, стоит рассмотреть их в ретроспективном плане.

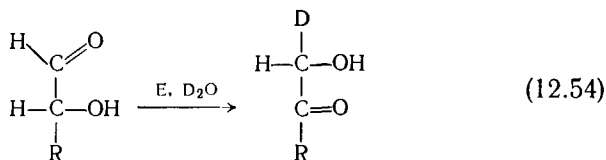
¹ В растворе такие субстраты, как альдегид и кетон, частично гидратированы:



При 25°С около 55% диоксиацетонфосфата и 3,3% глицеральдегид-3-фосфата находятся в негидратированных кетоформах, которые и являются субстратами в ферментативных реакциях. Константа равновесия для процесса взаимопревращения негидратированных кетоформ равна поэтому 330, причем преобладающей формой является негидратированная кетоформа диоксиацетонфосфата [Trentham D. R., McMurray C. H., Pogson C. I., *Biochem. J.* 114, 19 (1969); Reynolds S. J., Yates D. W., Pogson C. I., *Biochem. J.*, 122, 285 (1971)].

а. Обмен протонов со средой: ендиол в качестве промежуточного соединения [233, 238—240]

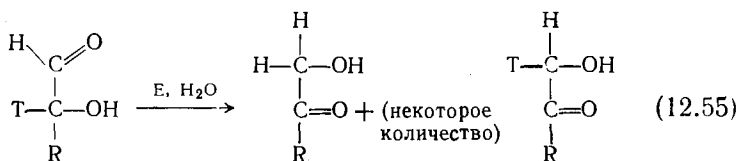
Первые эксперименты, проведенные в водных растворах, обогащенных дейтерием или тритием, показали, что в продукты реакций, катализируемых маннозо-6-фосфат-, глюкозо-6-фосфат-, рибозо-5-фосфат- и триозофосфатизомеразами, стереоспецифически включается до одного моля изотопа.



Всегда считалось, что результаты этих экспериментов исключают возможность прямого переноса гидрид-иона и указывают на образование протонов, которые могут обмениваться со средой. Было высказано предположение, что в качестве промежуточного соединения образуется ендиол $\text{RC}(\text{OH})=\text{C}(\text{OH})\text{H}$ [238].

б. Выявление внутримолекулярного переноса протона: *цис*-ендиол и участие в переносе только основания [234]

Следующим достижением было выявление того факта, что помимо обмена протона со средой, происходит внутримолекулярный перенос водорода (трития) между двумя углеродными атомами:



Проще всего объяснить это явление следующим образом. Тритий, связанный с С-2-атомом субстрата, переносится на катализирующее основание; некоторое количество трития, прежде чем перейти на С-1-углеродный атом, обменивается с протонами воды, а остальная часть атомов включается в положение С-1 до того, как успеет высвободиться в раствор. Из этого можно сделать два важных вывода:

1. Перенос осуществляется только основанием (если, скажем, основание «отбирало» бы протон от атома С-2, а отдельный остаток кислоты переносил свой протон на С-1, то никакого переноса не происходило бы).

2. Поскольку в переносе протона участвует только основание, протон должен вновь присоединиться к ендиолу с той же стороны, с которой был удален. Из рассмотрения стереохимии продуктов следует, что ендиол является *цис*-изомером (гл.2, разд. В). На этом основании Роуз предложил следующий механизм [228, 248]:

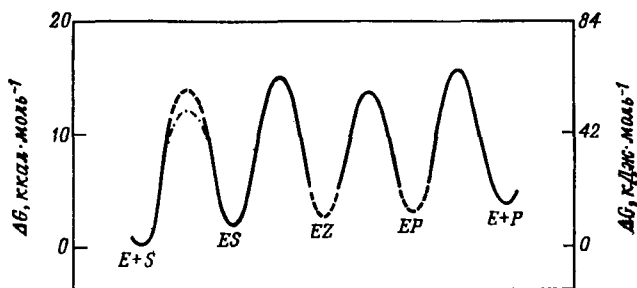
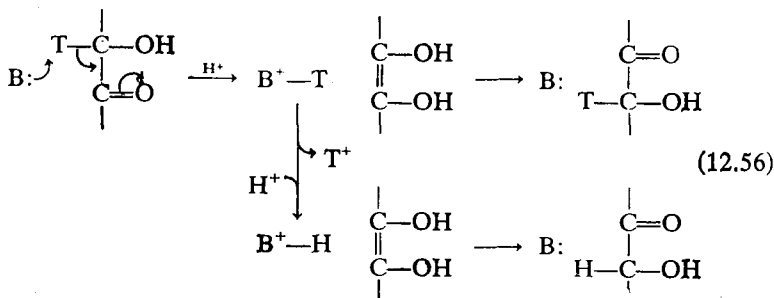


Рис. 12.13. Энергетический профиль реакций, катализируемых триозофосфатизомеразой [244]. S — диоксиацетонфосфат, Z — ендиол, P — глицеральдегид-3-фосфат. Штрих-пунктирная линия относится к случаю, когда частота соударений определяется диффузией. Энергетические барьеры для бимолекулярных реакций рассчитаны для концентрации реагентов 40 мкМ, что примерно соответствует концентрации диоксиацетонфосфата в клетке. Отметим, что высота всех энергетических барьеров такая же (или немного больше), как и в случае ассоциации фермента и субстрата. Дальнейшее увеличение скорости в результате эволюции фермента невозможно. Этот фермент полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к эволюционно совершенному ферменту (гл. 10, разд. Б.2): значение k_{cat}/K_M близко к лимитируемому диффузией пределу, а K_M много больше [S].

Основание В в механизме действия триозофосфатизомеразы представляет собой карбоксильную группу Glu-165. Роль His-95 до конца не выяснена: его ионизация не выявляется из рН-зависимости k_{cat} . (График зависимости k_{cat}/K_M от рН для

фермента из мышц цыпленка представляет собой колоколообразную кривую, характеризующуюся $pK_a = 6$ и 9 , тогда как рН-зависимость k_{cat} изображается сигмоидной кривой, в которой проявляется только более низкое значение pK_a [241]. рН-зависимость k_{cat}/K_m для фермента, выделенного из дрожжей, также описывается сигмоидной кривой, отражающей ионизацию группы с более низким значением pK_a [242]. рН-зависимость скорости химической модификации Glu-165 показывает, что pK_a этого остатка равен $3,9$ [242, 243]; см. гл. 5, разд. Б.2.в и гл. 7, разд. Ж.)

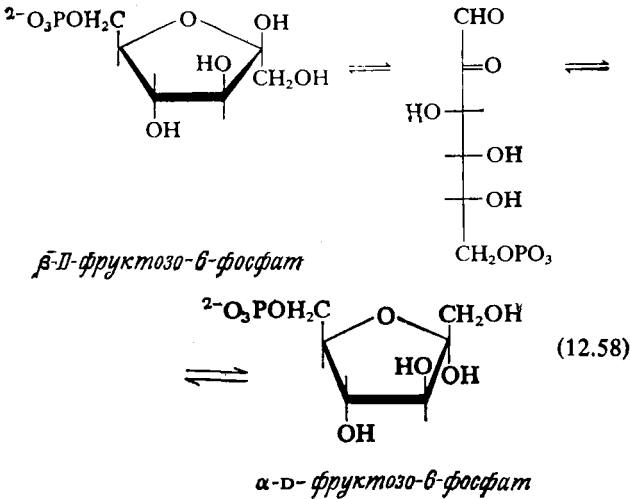
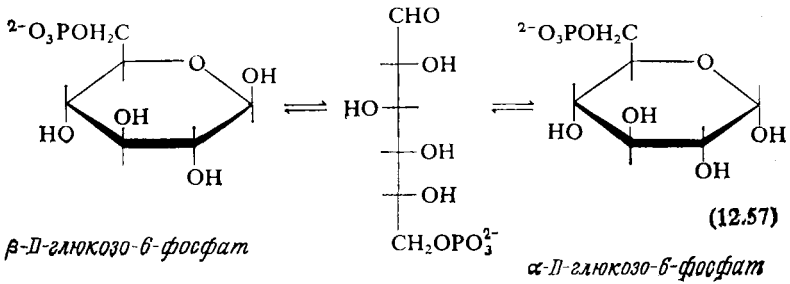
в. Построение энергетического профиля для реакции [244]

Самое последнее достижение в исследовании указанных выше реакций с применением радиоактивных изотопов состоит в исчерпывающем анализе обмена тритием между водой и продуктом и остающимся субстратом в стационарных условиях, обмена тритием между меченым тритием субстратом и раствором и продуктом, а также первичных кинетических изотопных эффектов для скорости реакции. Из этих данных удалось определить все константы скорости для механизма (12.56) и построить энергетический профиль для реакции, катализируемой триозофосфатизомеразой (рис. 12.13).

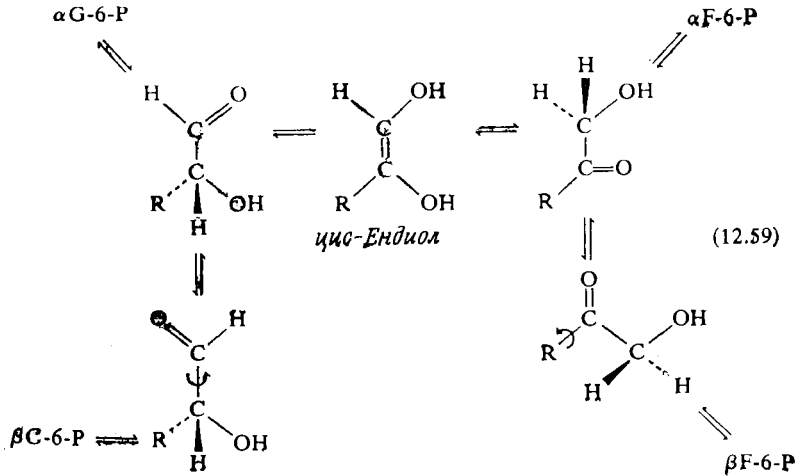
3. Глюкозо-6-фосфат—изомеразы [228, 229]

Другой гликолитический фермент, D-глюкозо-6-фосфат—изомеразы, катализирует взаимопревращение между глюкозо-6-фосфатом и фруктозо-6-фосфатом. Кристаллическая структура фермента, выделенного из мышцы свиньи, была установлена с разрешением $3,5 \text{ \AA}$. Фермент является симметричным димером с мол. весом $120\,000$ [245].

Последовательность реакций, катализируемых глюкозо-6-фосфат—изомеразой, более сложна, чем в случае триозофосфатизомеразы. В растворе сахара существует в виде циклических полуацеталей, представляющих собой равновесную смесь α - и β -аномеров (глюкозо-6-фосфат на 38% представлен α -формой и на 62% — β -формой; для фруктозо-6-фосфата эти величины составляют 20 и 80% соответственно) [228]. Субстрат, участвующий в реакции изомеризации, находится в раскрытой форме [246—248]. В растворе эта форма присутствует лишь в очень небольшом количестве, и, следовательно, первая стадия реакции представляет собой катализируемое ферментом раскрытие кольца. α -Аномер реагирует быстрее β -аномера, однако оба они участвуют и образуются в ходе реакции.



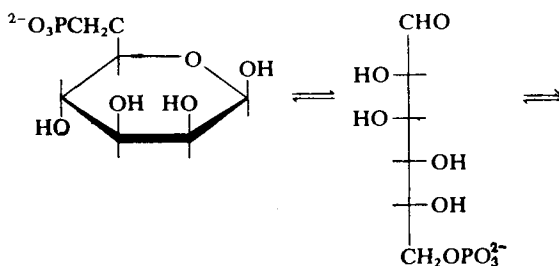
Реакция протекает следующим образом [228, 234]:



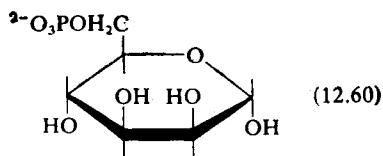
Фермент не превращает маннозо-6-фосфат в фруктозо-6-фосфат, а катализирует раскрытие кольца, в результате чего α -аномер переходит в β -аномер со скоростью, примерно равной скорости изомеризации глюкозо-6-фосфата [249].

Производные маннозы отличаются от производных глюкозы положением атома водорода и OH-групп, связанных с С-2-атомом. Вследствие этого, вероятно, атом водорода вытесняется из основания, которое катализирует образование *цис*-ендиола в ходе реакции (12.59).

Скорость реакции изомеризации зависит от присутствия основной группы с $pK_a = 6,8$ и кислой группы с $pK_a = 9,3$ в свободном ферменте [250]. Исходя из данных по теплотам изомеризации было высказано предположение, что эти значения pK_a относятся к имидазольной и аммонийной боковым цепям остатков гистидина и лизина соответственно [250]. Остаток глутаминовой кислоты модифицируется эпоксидом 1,2-ангидро-D-маннитол-6-фосфатом (гл. 7, разд. Ж) [251]. Все эти данные в совокупности с результатами кристаллографического анализа позволили сформулировать механизм действия фермента. Интересно, что при этом аминокислотная последовательность глюкозо-6-фосфат—изомеразы все еще не установлена, и, следовательно, боковые цепи аминокислот не могут быть четко идентифицированы.



β -D-Маннозо-6-фосфат



α -D-Маннозо-6-фосфат

Кристаллическая структура комплекса между ферментом и эффективным ингибитором арабинонат-5-фосфатом установлена

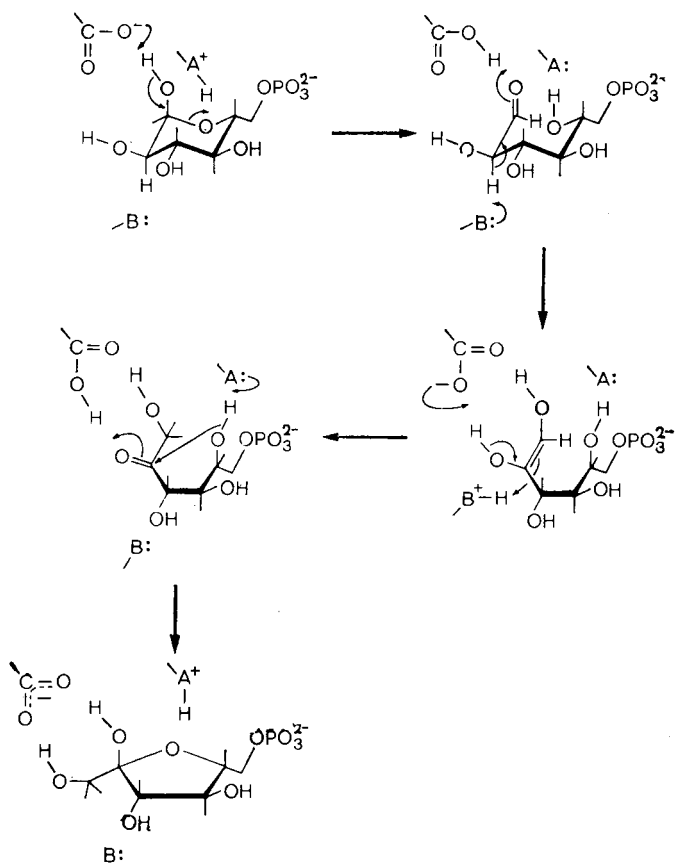
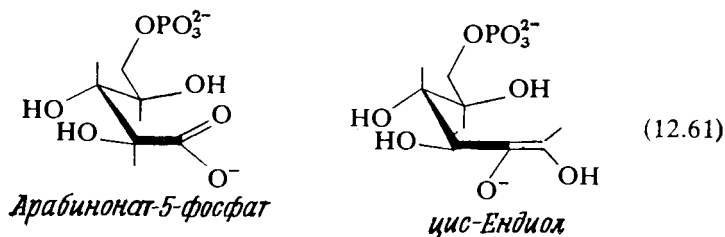


Рис. 12.14. Механизм действия глюкозо-6-фосфат—изомеразы, основанный на данных рентгеноструктурного анализа [252].

с разрешением 3,5 Å [252]. Это соединение сходно с промежуточным соединением *цис*-ендиолом [схема (12.61)] и связывается в 1000 раз прочнее субстрата [253].



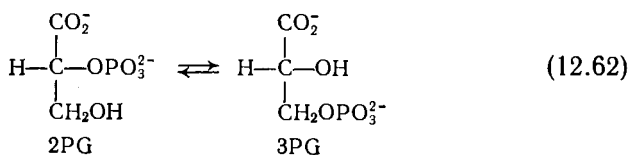
Центр связывания фермента расположен в расщелине между двумя субъединицами. Фосфат, кислород кольца и гидроксильные группы при С-1- и С-2-атомах присоединяются к одной субъединице, а перемещение другой субъединицы приводит к тому, что две большие боковые цепи связываются с гидроксильными группами, присоединенными к С-2- и С-3-атомам.

По-видимому, глутамат, который модифицируется эпоксидом, *не* является основанием, катализирующим перенос протона между двумя углеродными атомами в реакции изомеризации. Вместо этого он катализирует реакцию раскрытия кольца и перенос протона между кислородами карбонильной и гидроксильной групп на стадиях, включающих образование *цис*-эндиола (рис. 12.14) [252].

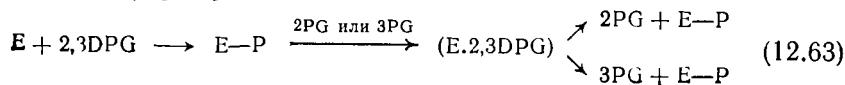
Весьма интересно узнать (когда выяснится аминокислотная последовательность фермента), правильным ли было представление кристаллографов относительно природы боковых цепей аминокислот.

4. Фосфоглицеромутаза [254]

D-фосфоглицеромутаза катализирует взаимопревращение 2- и 3-D-фосфоглицерата [схема (12.62)]. Фермент, выделенный из мышцы, является димером с мол. весом 54 000. Кристаллическая структура фосфоглицеромутазы дрожжей была установлена с разрешением 3,5 Å. Фермент является симметричным тетрамером с мол. весом 110 000 [255].

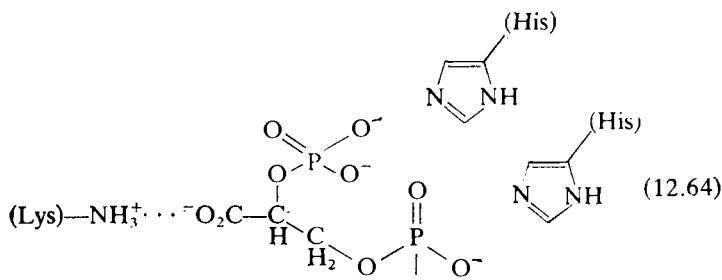


В качестве активатора или инициатора в реакции участвует 2,3-дифосфоглицерат (2,3DPG). Функция этого соединения состоит, по-видимому, в фосфорилировании боковой цепи гистидина с образованием каталитически активного фосфорилфермента. 2,3-дифосфоглицерат был выделен как в случае мышечной, так и дрожжевой фосфоглицеромутазы [256]. Кинетические данные находятся в соответствии с механизмом (12.63) (механизм типа пинг-понг) [257]:

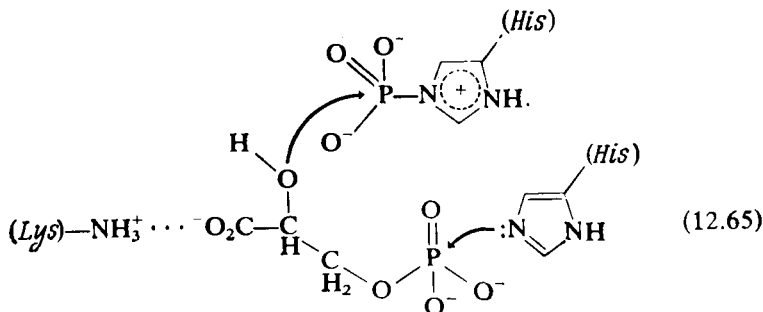


Так, например, образование 2-фосфоглицерата из 3-фосфоглицерата сопровождается переносом фосфата от фосфорилфермента на субстрат в положение 2, тогда как фосфат из положения 3 переносится на фермент с образованием фосфорилфермента. Возможно, во время каталитического цикла образуется прочный комплекс между ферментом и 2,3DPG.

Механизм этой реакции легко определяется из рентгеноструктурных данных. Данные по аминокислотной последовательности в области активного центра фермента прекрасно согласуются с данными по электронной плотности. Четко показано наличие центра связывания субстрата, в котором боковая цепь лизина связывает карбоксильную группу субстрата. Наиболее интересный момент состоит в том, что имеется два имидазольных кольца боковых цепей гистидина, которые расположены параллельно на расстоянии около 4 Å друг от друга и фиксируют 2 и 3 положения субстрата [258]. Эти кольца участвуют в переносе и акцептировании фосфатных групп от субстрата.



Фосфатная группа дифосфоглицерата может быть перенесена на один из этих остатков гистидина, после чего монофосфоглицерат отщепляется от фермента. Далее фосфорильная группа быстро переносится между двумя гистидинами, так что с фосфорилферментом связывается либо 2-фосфоглицерат, либо 3-фосфоглицерат. Например:



3. Заключение

Традиционный подход к анализу процессов ферментативного катализа, сформировавшийся на основании химических исследований задолго до определения кристаллической структуры ферментов, основывается на следующих факторах: общий кислотно-основный катализ; катализ ионами металлов; нуклеофильный катализ; электростатический катализ; эффекты подобия (сочетание внутримолекулярной реакции и правильной ориентации); напряжение (деформация субстрата); индуцированное соответствие (деформация фермента). Наличие всех этих факторов в настоящее время в той или иной степени установлено. Наиболее распространен общий кислотно-основный катализ [реакции, катализируемые дегидрогеназами, сериновыми протеазами (а также, по-видимому, тиоловыми протеазами и карбоксипептидазами), рибонуклеазами, лизоцимом]. Ускорение реакций ионами металлов в его классической форме стабилизации аниона имеет место при функционировании карбоксипептидазы и, возможно, алкогольдегидрогеназы. Этот тип катализа имеет место и в реакциях с участием нуклеофила, катализируемых карбоангидразой и, возможно, стафилококковой нуклеазой. Ион-катализатором в этом случае является связанный с металлом гидроксил-ион. Нуклеофильный катализ, несомненно, имеет место в реакциях гидролиза, катализируемых тиоловыми и сериновыми протеазами, а также в реакциях, где между карбонильной группой субстрата и боковой цепью остатка лизина образуются шиффовы основания. Перенос фосфорильной группы выявлен между субстратами и боковыми цепями гистидинов в фосфоглицеромутазе. Электростатический катализ имеет важное значение для стабилизации карбоний-иона, являющегося промежуточным соединением в реакциях с участием лизоцима. Эффекты подобия в ферментативных реакциях исследовать нелегко; наиболее полную информацию в этой области дает исследование простых модельных систем и расчеты (гл. 2). Никаких прямых данных в пользу деформации субстрата при присоединении к ферменту нет, однако, как обсуждалось в гл. 10, имеется множество примеров деформации в форме «стабилизации переходного состояния». Кроме того, есть данные о деформации фермента при связывании субстрата.

Ни для одной из ферментативных реакций мы пока не можем сказать, что ее скорость увеличилась в x раз за счет наличия общего основного катализа, в y раз за счет выигрыша в энтропии, в z раз за счет стабилизации переходного состояния и т. д. Описание ферментативных реакций на этом уровне, без сомнения, будет дано химиками-теоретиками и первые шаги в этом направлении уже сделаны. Основы для такого анализа уже

заложены химиками и кинетиками, которые позволили установить пути превращения субстратов, а также спектроскопистами и кристаллографами, установившими структуру ферментов и их комплексов. В настоящее время мы имеем вполне удовлетворительное с химической точки зрения описание механизмов многих ферментативных реакций. Некоторые из них установлены более точно, чем для химических модельных реакций в растворах, поскольку в ферментативных реакциях точно известно расположение каталитических групп.

Исследование взаимодействий субъединиц в олигомерных ферментах — это область кристаллографии. Мы знаем структуру дезоксигемоглобина и его полностью лигандированной формы, а также имеем четкое представление о причинах кооперативности при связывании лигандов. Однако нам не известна кинетика путей перехода между двумя состояниями и структура промежуточных соединений. Хорошо описаны такие явления, как реакционная способность половины активных центров и отрицательная кооперативность связывания лигандов. Однако их значение еще не осознано в полной мере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Popják G.*, *The Enzymes*, **2**, 115 (1970).
2. *Fisher H. F., Conn E. E., Vennesland B., Westheimer F. H.*, *J. biol. Chem.*, **202**, 687 (1953).
3. *Pullman M. E., San Pietro A., Colowick S. P.*, *J. biol. Chem.*, **206**, 129 (1954).
4. *Rossmann M. G., Liljas A., Brändén C.-I., Banaszak L. J.*, *The Enzymes*, **11**, 61 (1975).
5. *Brändén C.-I., Jorvall H., Eklund H., Furugren B.*, *The Enzymes*, **11**, 104 (1975).
6. *Holbrook J. J., Liljas A., Steindel S. J., Rossmann M. G.*, *The Enzymes*, **11**, 191 (1975).
7. *Banaszak L. J., Bradshaw R. A.*, *The Enzymes*, **11**, 369 (1975).
8. *Dalziel K.*, *The Enzymes*, **11**, 2 (1975).
9. *Eklund H., Nordstrom B., Zeppezauer E., Söderlund G., Ohlsson I., Boiwe T., Söderberg B.-O., Tapia O., Brändén C.-I., Åkeson A.*, *J. molec. Biol.*, **102**, 27 (1976).
10. *Dalziel K.*, *J. biol. Chem.*, **238**, 2850 (1963).
11. *Shore J. D., Gutfreund H., Brooks R. L., Santiago D., Santiago P.*, *Biochemistry*, **13**, 4185 (1974).
12. *Dutter H., Brändén C.-I.*, (в печати).
13. *Dunn M. F., Biellman J. F., Bruylant G.*, *Biochemistry*, **14**, 3176 (1975).
14. *Klinman J. P.*, *Biochemistry*, **15**, 2018 (1976).
15. *Dworschack R. T., Plapp B. V.*, *Biochemistry* (в печати).
16. *Theorell H., Chance B.*, *Acta chem. Scand.*, **5**, 1127 (1951).
17. *Wratten C. C., Cleland W. W.*, *Biochemistry*, **2**, 935 (1963); **4**, 2442 (1965).
18. *Shore J. D., Gutfreund H., Yates D.*, *J. biol. Chem.*, **250**, 5276 (1975).
19. *Bernhard S. A., Dunn M. F., Luisi P. L., Schack P.*, *Biochemistry*, **9**, 185 (1970).
20. *Klinman J. P.*, *J. biol. Chem.*, **247**, 7977 (1972).
21. *Shore J. D., Gutfreund H.*, *Biochemistry*, **9**, 4655 (1970).

22. Brooks R. L., Shore J. D., *Biochemistry*, **10**, 3855 (1971).
23. Jacobs J. W., McFarland J. T., Wainer I., Jeanmaier D., Ham C., Hamm K., Wnuk M., Lam M., *Biochemistry*, **13**, 60 (1974).
24. Blackwell L. F., Hardmann M. J., *Eur. J. Biochem.*, **55**, 611 (1975).
25. Sloan D. L., Young J. M., Mildvan A. S., *Biochemistry*, **14**, 1998 (1975).
26. Brändén C. I.: In: Alcohol and aldehyde metabolizing systems. Vol. 2 (ed. R. Thurman), Academic Press (1977).
27. Klinman J. P., *J. biol. Chem.*, **250**, 2569 (1975).
28. Woolley P., *Nature, Lond.*, **258**, 677 (1975).
29. McFarland J. T., Chu Y. H., *Biochemistry*, **14**, 7140 (1975).
30. Luisi P. L., Bignetti E., *J. molec. Biol.*, **88**, 653 (1974).
31. Hadorn M., John V. A., Meier F. K., Dutler H., *Eur. J. Biochem.*, **54**, 65 (1975).
32. Everse J., Kaplan N. O., *Adv. Enzymol.*, **37**, 61 (1973).
33. Markert C. L., Moller F., *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **45**, 753 (1959).
34. Fine I., Kaplan N. O., Kuflinec D., *Biochemistry*, **2**, 116 (1963).
35. Chilson O. P., Costello L. A., Kaplan N. O., *Biochemistry*, **4**, 271 (1965).
36. White J. L., Hackert M. L., Buehner M., Adams M. J., Ford G. C., Lentz D. L., Jr., Smiley I. E., Steindel S. J., Rossmann M. G., *J. molec. Biol.*, **102**, 759 (1976).
37. Adams M. J., Buehner M., Chandrasekhar K., Ford G. C., Hackert M. L., Liljas A., Rossmann M. G., Smiley I. E., Allison W. S., Everse J., Kaplan N. O., Taylor S. S., *Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A.*, **70**, 1968 (1973).
38. Everse J., Barnett R. E., Thorne C. J. R., Kaplan N. O., *Archs. biochem. Biophys.*, **143**, 444 (1971).
39. Coulson C. J., Rabin B. R., *FEBS Letts.*, **3**, 333 (1969).
40. Griffin J. H., Criddle R. S., *Biochemistry*, **9**, 1195 (1970).
41. Holbrook J. J., Gutfreund H., *FEBS Letts.*, **31**, 157 (1973).
42. Novoa W. B., Schwert G. W., *J. biol. Chem.*, **236**, 2150 (1961).
43. Whitaker J. R., Yates D. W., Bennett N. G., Holbrook J. J., Gutfreund H., *Biochem. J.*, **139**, 677 (1974).
44. Holbrook J. J., Ingram V. A., *Biochem. J.*, **131**, 729 (1973).
45. Webb L. E., Hill E., Banaszak L. J., *Biochemistry*, **12**, 5101 (1973).
46. Holbrook J. J., Lodola A., Illsley N. P., *Biochem. J.*, **139**, 797 (1974).
47. Holbrook J. J., Wolfe R. G., *Biochemistry*, **11**, 2499 (1972).
48. Cassman M., King R. C., *Biochemistry*, **11**, 4937 (1972).
49. Cassman M., Vetterlein D., *Biochemistry*, **13**, 684 (1974).
50. Harris J. I., Waters M., *The Enzymes*, **13**, 1 (1976).
51. Segal H. L., Boyer P. D., *J. biol. Chem.*, **204**, 265 (1953).
52. Harrigan P. J., Trentham D. R., *Biochem. J.*, **143**, 353 (1974).
53. Duggleby R. G., Dennis D. T., *J. biol. Chem.*, **249**, 167 (1974).
54. Krimsky I., Racker E., *Science, N. Y.*, **122**, 319 (1955).
55. Trentham D. R., *Biochem. J.*, **122**, 59, 71 (1971).
56. Byers L. D., Koshland D. E., *Biochemistry*, **14**, 3661 (1975).
57. Moras D., Olsen K. W., Sabesan M. N., Buehner M., Ford G. C., Rossmann M. G., *J. biol. Chem.*, **250**, 9137 (1975).
58. Biesecker G., Harris J. I., Thierry J. C., Walker J. E., Wonacott A. J., *Nature, Lond.*, **266**, 328 (1977).
59. Watson H. C., Duée E., Mercer W. D., *Nature New Biology, Lond.*, **240**, 130 (1972).
60. Buehner M., Ford G. C., Moras D., Olsen K. W., Rossmann M. G., *J. molec. Biol.*, **90**, 25 (1974).
61. Conway A., Koshland D. E., Jr., *Biochemistry*, **7**, 4011 (1968).
62. Peczon B. D., Spivey H. O., *Biochemistry*, **11**, 2209 (1972).
63. Harrigan P. J., Trentham D. R., *Biochem. J.*, **135**, 695 (1973).
64. Seydoux F., Bernhard S. A., Pfenninger O., Payne M., Malhotra O. P., *Biochemistry*, **12**, 4290 (1973).

65. *Schlessinger J., Levitzki A.*, J. molec. Biol., **82**, 547 (1974).
66. *Levitzki A.*, J. molec. Biol., **90**, 451 (1974).
67. *Seydoux F., Bernhard S. A.*, Bioorg. Chem., **1**, 161 (1974).
68. *Kelemen N., Kellershohn N., Seydoux F.*, Eur. J. Biochem., **57**, 69 (1975).
69. *Gennis L. S.*, Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., **73**, 3928 (1976).
70. *Bode J., Blumenstein M., Raftery M. A.*, Biochemistry, **14**, 1146 (1975).
71. *Dunn M.*, Biochemistry, **13**, 1146 (1974).
72. *Shoelman G., Shaw E.*, Biochemistry, **2**, 252 (1963).
73. *Blow D. M., Birkoft J. J., Hartley B. S.*, Nature, Lond., **221**, 337 (1970).
74. *Fersht A. R., Sperling J.*, J. molec. Biol., **74**, 137 (1973).
75. *Hunkapiller M. W., Smallcombe S. H., Whitaker D. R., Richards J. H.*, Biochemistry, **12**, 4732 (1973).
76. *Koepe R. E., II, Stroud R. M.*, Biochemistry, **15**, 3450 (1976).
77. *Fersht A. R., Renard M.*, Biochemistry, **13**, 1416 (1974).
78. *Hein G. E., Niemann C.*, J. Am. Chem. Soc., **84**, 4495 (1962).
79. *Petsko G.* Личное сообщение.
80. *Henderson R.*, J. molec. Biol., **54**, 341 (1970).
81. *Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J.*, Biochemistry, **12**, 2035 (1973).
82. *Freer S. T., Kraut J., Robertus J. D., Wright H. T., Xuong Ng. H.*, Biochemistry, **9**, 1997 (1970).
83. *Wright H. T.*, J. molec. Biol., **79**, 1, 13 (1973).
84. *Birkoft J. J., Kraut J., Freer S. T.*, Biochemistry, **15**, 4481 (1976).
85. *Robillard G., Shulman R. G.*, J. molec. Biol., **86**, 519 (1974).
86. *Fersht A. R.*, FEBS Letts., **29**, 283 (1973).
87. *Gertler A., Walsh K. A., Neurath H.*, Biochemistry, **13**, 1302 (1974).
88. *Fersht A. R.*, J. molec. Biol., **64**, 497 (1972).
89. *Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Wolthers B. G.*, The Enzymes, **3**, 485 (1971).
90. *Glaser A. N., Smith E. L.*, The Enzymes, **3**, 501 (1971).
91. *Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Wolthers B. G.*, Adv. Prot. Chem., **25**, 79 (1971).
92. *Lowe G.*, Tetrahedron, **32**, 291 (1976).
93. *Liu T.-Y., Elliott S. D.*, The Enzymes, **3**, 609 (1971).
94. *Mitchell W. M., Harrington W. F.*, The Enzymes, **3**, 699 (1971).
95. *Mitchell R. E. J., Chaiken I. M., Smith E. L.*, J. biol. Chem., **245**, 3485 (1970).
96. *Berger A., Schechter I.*, Phil. Trans. R. Soc., **B257**, 249 (1970).
97. *Alecio M. R., Dann M. L., Lowe G.*, Biochem. J., **141**, 495 (1974).
98. *Stockell A., Smith E. L.*, J. biol. Chem., **227**, 1 (1957).
99. *Lowe G., Williams A.*, Biochem. J., **96**, 189, 199 (1965).
100. *Hinkle P. M., Kirsch J. F.*, Biochemistry, **10**, 2717 (1971).
101. *Brubacher L. J., Bender M. L.*, J. Am. chem. Soc., **88**, 5871 (1966).
102. *Drenth J., Jansonius J. N., Wolthers B. G.*, J. molec. Biol., **24**, 449 (1967).
103. *Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Swen H. M., Wolthers B. G.*, Nature, Lond., **218**, 929 (1968).
104. *Drenth J., Kalk K. H., Swen H. M.*, Biochemistry, **15**, 3731 (1976).
105. *Lowe G., Yuthavong Y.*, Biochem. J., **124**, 107 (1971).
106. *Fersht A. R.*, J. Am. chem. Soc., **93**, 3504 (1971).
107. *Polgar L.*, FEBS Letts., **47**, 15 (1974).
108. *Lowe G., Yuthavong Y.*, Biochem. J., **124**, 117 (1971).
109. *O'Leary M. H., Urberg M., Young A. P.*, Biochemistry, **13**, 2077 (1974).
110. *Hartsuck J. A., Lipscomb W. N.*, The Enzymes, **3**, 1 (1971).
111. *Quiocho F. A., Lipscomb W. N.*, Adv. Prot. Chem., **25**, 1 (1971).
112. *Lipscomb W. N.*, Tetrahedron, **30**, 1725 (1974).
113. *Brandshaw R. A., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **63**, 1389 (1969).
114. *Schmid M. F., Herriott J. R.*, J. molec. Biol., **103**, 175 (1976).

115. *Reeke G. N., Hartsuck J. A., Ludwig M. L., Quioco F. A., Steitz T. A., Lipscomb W. N.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **58**, 2220 (1967).
116. *Lipscomb W. N.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **70**, 3797 (1973).
117. *Johansen J. T., Vallee B. L.*, Biochemistry, **14**, 649 (1975).
118. *Vallee B. L., Riordan J. F., Coleman J. E.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **49**, 109 (1963).
119. *Auld D. S., Vallee B. L.*, Biochemistry, **10**, 2892 (1971).
120. *Bunting J. W., Chu S. S.-T.*, Biochemistry, **15**, 3237 (1976).
121. *Riordan J. F., Sokolovsky M., Vallee B. L.*, Biochemistry, **6**, 358, 3609 (1967).
122. *Coleman J. E., Vallee B. L.*, J. biol. Chem., **236**, 2244 (1961).
123. *Makinen M. W., Yamamura K., Kaiser E. T.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **73**, 3882 (1976).
124. *Breslow R. E., Wernick D.*, J. Am. chem. Soc., **98**, 259 (1976).
125. *Freisheim J. H., Walsh K. A., Neurath H.*, Biochemistry, **6**, 3010, 3020 (1967).
126. *Uren J. R., Neurath H.*, Biochemistry, **13**, 3512 (1974).
127. *Bazzone T. J., Vallee B. L.*, Biochemistry, **15**, 818 (1976).
128. *Fru-ton J. S.*, The Enzymes, **3**, 119 (1971).
129. *Clement G. E.*, Prog. Bioorg. Chem., **2**, 177 (1973).
130. *Fru-ton J. S.*, Adv. Enzymol., **44**, 1 (1976).
131. *Sodek J., Hofmann T.*, Can. J. Biochem., **48**, 1014 (1970).
132. *Pedersen V. B., Foltmann B.*, FEBS Letts., **35**, 250 (1973).
133. *Андреева Н. С., Борисов В. В., Мелик-Адамян В. Р., Райз В. С., Трофимова Л. Н., Шуцкевер Н. Е.*, Мол. биол., **5**, 908 (1971).
134. *Subramanian E., Swan I. D. A., Davies D. R.*, Biochem. biophys. Res. Commun., **68**, 875 (1976).
135. *Андреева Н. С., Федоров А. А., Гущина А. А., Шуцкевер Н. Е., Рыскулов Р. П., Вольнова Т. В.*, ДАН СССР, **228**, 480 (1976).
136. *Hsu I. N., Delbaere L. T., James M. N. G., Hofmann T.*, Nature, Lond., **266**, 140 (1977).
137. *Sepulveda P., Marciszyn J., Jr., Liu D., Tang J.*, J. biol. Chem., **250**, 5082 (1975).
138. *Moravec L., Kostka V.*, FEBS Letts., **43**, 207 (1974).
139. *Clement G. E., Rooney J., Zakheim D., Eastman J.*, J. Am. chem. Soc., **92**, 186 (1970).
140. *Sam-path-Kumar P. S., Fru-ton J. S.*, Proc. natn. Acad. Sci., J. S. A., **71**, 1070 (1974).
141. *Зинченко А. А., Руми Л. Д., Антонов В. К.*, Биоорг. хим., **2**, 803 (1976).
142. *Denburg J. L., Nelson R., Silver M. S.*, J. Am. chem. Soc., **90**, 479 (1968).
143. *Cornish-Bowden A. J., Knowles J. R.*, Biochem. J., **113**, 353 (1969).
144. *Delpierre G. R., Fru-ton J. S.*, Proc. natn. Acad. Sci., J. S. A., **54**, 1161 (1965); **56**, 1817 (1966).
145. *Lundblad R. L., Stein W. H.*, J. biol. Chem., **244**, 154 (1969).
146. *Bayliss R. S., Knowles J. R., Wybrandt G. B.*, Biochem. J., **113**, 377 (1969).
147. *Hartsuck J. A., Tang J.*, J. biol. Chem., **247**, 2575 (1972).
148. *Neumann H., Levin Y., Berger A., Katchalski E.*, Biochem. J., **73**, 33 (1959).
149. *Антонов В. К., Руми Л. Д., Тиходеева А. Г.*, FEBS Letts., **46**, 29 (1974).
150. *Тиходеева А. Г., Руми Л. Д., Антонов В. К.*, Биоорг. хим., **1**, 993 (1975).
151. *Sharon N., Grisaro V., Neumann H.*, Archs. biochem. Biophys., **97**, 219 (1962).
152. *Takahashi M., Hofmann T.*, Biochem. J., **127**, 35P (1972); **147**, 549 (1975).
153. *Takahashi M., Wang T. T., Hofmann T.*, Biochem. biophys. Res. Commun., **57**, 39 (1974). Wang T. T., Hofmann T., Biochem. J., **153**, 691 (1976).
154. *Newmark A. K., Knowles J. R.*, J. Am. chem. Soc., **97**, 3557 (1975).

155. Антонов В. К., 3-й Всесоюзный симпозиум по структуре и функции активных центров ферментов, Пушкино, 1976.
156. Silver M. S., Stoddard M., Kelleher M. H., J. Am. chem. Soc., **98**, 6684 (1976).
157. Bustin M., Lin M. C., Stein W. H., Moore S., J. biol. Chem., **245**, 846 (1970).
158. Tang J., Biochem. biophys. Res. Commun., **41**, 697 (1970).
159. Bustin M., Conway-Jacobs A., J. biol. Chem., **246**, 615 (1971).
160. Al-Janabi J., Hartsuck J. A., Tang J., J. biol. Chem., **247**, 4628 (1972).
161. McPhie P., J. biol. Chem., **247**, 4277 (1972).
162. Sanny C. G., Hartsuck J. A., Tang J., J. biol. Chem., **250**, 2635 (1975).
163. Dykes C. W., Kay J., Biochem. J., **153**, 141 (1976).
164. Richards F. M., Wyckoff H. W., The Enzymes, **4**, 647 (1971).
165. Richards F. M., Wyckoff H. W., Atlas of molecular structures in biology, Clarendon Press, Oxford (1973).
166. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H., J. biol. Chem., **235**, 633 (1960).
167. Smyth D. G., Stein W. H., Moore S., J. biol. Chem., **238**, 227 (1963).
168. Kartha G., Bello J., Harker D., Nature, Lond., **213**, 862 (1967).
169. Wyckoff H. W., Tsernoglou D., Hanson A. W., Knox J. R., Lee B., Richards F. M., J. biol. Chem., **245**, 305 (1970).
170. Findlay D., Herries D. G., Mathias A. P., Rabin B. R., Ross C. A., Nature, Lond., **190**, 781 (1961).
171. Richards F. M., Wyckoff H. W., Carlson W. D., Allewell N. M., Lee B., Mitsui Y., Cold Spring Harb. symp. Quant. Biol., **36**, 35 (1971).
172. Walter B., Wold F., Biochemistry, **15**, 304 (1976).
173. Markley J. L., Biochemistry, **14**, 3546 (1975).
174. Westheimer F. H., Acc. Chem. Res., **1**, 70 (1968).
175. Benkovic S. J., Schray K. J., The Enzymes, **8**, 201 (1973).
176. Usher D. A., Richardson D. I., Eckstein F., Nature, Lond., **228**, 663 (1970).
177. Usher D. A., Erenrich E. S., Eckstein F., Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **69**, 115 (1972).
178. Eckstein F., Saenger W., Suck D., Biochem. biophys. Res. Commun., **46**, 964 (1972).
179. Cotton F. A., Hazen E. E., Jr., The Enzymes, **4**, 153 (1971).
180. Anfinsen C. B., Cuatrecasas P., Taniuchi H., The Enzymes, **4**, 177 (1971).
181. Arnone A., Bier C. J., Cotton F. A., Day V. W., Hazen E. E., Jr., Richardson D. C., Richardson J. S., Yonath A., J. biol. Chem., **246**, 2302 (1971).
182. Cotton F. A., Bier C. J., Day V. W., Hazen E. E., Jr., Larsen S. W., Cold Spring Harb. symp. Quant. Biol., **36**, 243 (1971).
183. Mildvan A. S., The Enzymes, **2**, 446 (1970).
184. Mildvan A. S., Ann. Rev. Biochem., **43**, 357 (1974).
185. Dunn B. M., Di Bello C., Anfinsen C. B., J. biol. Chem., **248**, 4769 (1973).
186. Cuatrecasas P., Fuchs S., Anfinsen C. B., J. biol. Chem., **242**, 3063 (1967).
187. Imoto T., Johnson L. N., North A. C. T., Phillips D. C., Rupley J. A., The Enzymes, **7**, 665 (1972).
188. Dunn B., Bruice T. C., Adv. Enzymol., **37**, 1 (1973).
189. Chipman D. M., Sharon N., Science, N. Y., **165**, 454 (1969).
190. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarna V. R., Proc. R. Soc., **B167**, 378 (1967).
191. Vernon C. A., Proc. R. Soc., **B167**, 389 (1967).
192. Ford L. O., Johnson L. N., Machin P. A., Phillips D. C., Tjian R., J. molec. Biol., **88**, 349 (1974).
193. Rupley J. A., Gates V., Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., **57**, 496 (1967).
194. Raftery M. A., Rand-Meir T., Biochemistry, **7**, 3281 (1968).
195. Zehavi U., Pollock J. J., Teichberg V. I., Sharon N., Nature, Lond., **219**, 1152 (1968).

196. *Dahlquist F. W., Rand-Meir T., Raftery M. A.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **61**, 119 (1968).
197. *Smith L. E. H., Mohr L. H., Raftery M. A.*, J. Am. chem. Soc., **95**, 7497 (1973).
198. *Pollock J. J., Chipman D. M., Sharon N.*, Archs. biochem. Biophys., **120**, 235 (1967).
199. *Parsons S. M., Raftery M. A.*, Biochemistry, **11**, 1623 (1972).
200. *Rupley J. A., Gates V., Bilbrey R.*, J. Am. chem. Soc., **90**, 5633 (1968).
201. *Warshel A., Levitt M.*, J. molec. Biol., **103**, 227 (1976).
202. *Eshdat Y., Dunn A., Sharon N.*, Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., **71**, 1658 (1974).
203. *Secemski I. I., Lienhard G. E.*, J. biol. Chem., **249**, 2932 (1974).
204. *Holler E., Rupley J. A., Hess G. P.*, Biochemistry, **14**, 1088, 2377 (1975).
205. *Levitt M. F.* In: Reptides, polypeptides, and proteins (eds. Blout E. R., Bovey F. A., Goodman M., Lotan N.), John Wiley & Sons, p. 99 (1974).
206. *Schindler M., Sharon N.*, J. biol. Chem., **251**, 4330 (1976).
207. *Holler E., Rupley J. A., Hess G. P.*, Biochem. biophys. Res. Commun., **37**, 423 (1969).
208. *Baldo J. H., Halford S. E., Patt S. L., Sykes B. D.*, Biochemistry, **14**, 1893 (1975).
209. *Lindskog S., Henderson L. E., Kannan K. K., Liljas A., Nyman P. O., Strandberg B.*, The Enzymes, **5**, 587 (1971).
210. *Coleman J. E.*, Progress Bioorg. Chem., **1**, 159 (1971).
211. *Liljas A., Kannan K. K., Bergsten P.-C., Waara I., Fridborg K., Strandberg B., Carlbom U., Järup L., Lövgren S., Petef M.*, Nature New Biology, Lond., **235**, 131 (1972).
212. *Kannan K. K., Notstrand B., Fridborg K., Lövgren S., Ohlsson A., Petef M.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **72**, 51 (1975).
213. *Andersson B., Nyman P. O., Strid L.*, Biochem. biophys. Res. Commun., **48**, 670 (1972).
214. *Henderson L. E., Henriksson D., Nyman P. O.*, J. biol. Chem., **251**, 5457 (1976).
215. *Steiner H., Jonsson B. H., Lindskog S.*, Eur. J. Biochem., **59**, 253 (1975).
216. *Lindskog S., Coleman J. E.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **70**, 2505 (1973).
217. *Koenig S. H., Brown R. D. III*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **69**, 2422 (1972).
218. *Appleton D. W., Sarkar B.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **71**, 1686 (1974).
219. *Pesando J. M.*, Biochemistry, **14**, 675, 681 (1975).
220. *Campbell I. D., Lindskog S., White A. I.*, J. molec. Biol., **90**, 469 (1974); **98**, 597 (1975).
221. *Bauer R., Limkilde P., Johansen J. T.*, Biochemistry, **15**, 334 (1976).
222. *Prince R. H., Wooley P.*, Bioorganic Chemistry, **2**, 337 (1973).
223. *Khalifah R. G.*, Proc. natn. Acad. Sci., U. S. A., **70**, 1986 (1973).
224. *Silvermann D. N., Tu C. K.*, J. Am. Chem. Soc., **97**, 2263 (1975).
225. *Tu C. K., Silverman D. N.*, J. Am. chem. Soc., **97**, 5935 (1975).
226. *Blake C. C. F.* In: Essays in Biochemistry (eds. Campbell P. N., Aldridge W. N.), Academic Press, Vol. II, p. 37 (1975).
227. *Rose I. A.*, The Enzymes, **2**, 281 (1970).
228. *Rose I. A.*, Adv. Enzymol., **43**, 491 (1975).
229. *Noltmann E. A.*, The Enzymes, **6**, 271 (1972).
230. *Banner D. W., Bloomer A. C., Petsko G. A., Phillips D. C., Pogson C. I.*, Cold Spring Harb. symp. Quant. Biol., **36**, 151 (1971).
231. *Banner D. W., Bloomer A. C., Petsko G. A., Phillips D. C., Pogson C. I., Wilson I. A., Corran P. H., Furth A. J., Milman J. D., Offord R. E., Priddle J. D., Waley S. G.*, Nature, Lond., **255**, 609 (1975).

232. *Phillips D. C.* Личное сообщение.
233. *Rieder S. V., Rose I. A.*, J. biol. Chem., **234**, 1007 (1958).
234. *Rose I. A., O'Connell E. L.*, J. biol. Chem., **236**, 3086 (1961).
235. *Hartmann F. C.*, Biochem. biophys. Res. Commun., **33**, 888 (1968); **39**, 384 (1970).
236. *Waley S. G., Miller J. C., Rose I. A., O'Connell E. L.*, Nature, Lond., **227**, 181 (1970).
237. *De La Mare S., Coulson A. F. W., Knowles J. R., Priddle J. D., Ofjord R. E.*, Biochem. J., **129**, 321 (1972).
238. *Topper Y. J.*, J. biol. Chem., **225**, 419 (1957).
239. *Bloom B., Topper Y. J.*, Nature, Lond., **181**, 1128 (1958).
240. *Rose I. A., O'Connell E. L.*, Biochim. biophys. Acta, **42**, 159 (1960).
241. *Plaut B., Knowles J. R.*, Biochem. J., **129**, 311 (1972).
242. *Hartman F. C., LaMuraglia G. M., Tomozawa Y., Wolfenden R.*, Biochemistry, **14**, 5274 (1975).
243. *Schray K. J., O'Connell E. L., Rose I. A.*, J. biol. Chem., **248**, 2214 (1973).
244. *Albery W. J., Knowles J. R.*, Biochemistry, **15**, 5588, 5627 (1976).
245. *Muirhead H., Shaw P. J.*, J. molec. Biol., **89**, 195 (1974).
246. *Salas M., Vinuela E., Sols A.*, J. biol. Chem., **240**, 561 (1965).
247. *Wurster B., Hess B.*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **351**, 1537 (1970).
248. *Schray K. J., Benkovic S. J., Benkovic P. A., Rose I. A.*, J. biol. Chem., **248**, 2219 (1973).
249. *Rose I. A., O'Connell E. L., Shray K. J.*, J. biol. Chem., **248**, 2232 (1973).
250. *Dyson J. E. D., Noltmann E. A.*, J. biol. Chem., **243**, 1401 (1968).
251. *O'Connell E. L., Rose I. A.*, J. biol. Chem., **248**, 2225 (1973).
252. *Shaw P. J., Muirhead H.*, FEBS Letts., **65**, 50 (1976).
253. *Chirgwin J. M., Noltmann E. A.*, J. biol. Chem., **250**, 7272 (1975).
254. *Ray W. J., Jr., Peck E. J., Jr.*, The Enzymes, **6**, 4 (1972).
255. *Campbell J. W., Watson H. C., Hodgson G. I.*, Nature, Lond., **250**, 301 (1974).
256. *Rose Z. B.*, Archs. biochem. Biophys., **140**, 508 (1970); **146**, 359 (1971).
257. *Grisolia S., Cleland W. W.*, Biochemistry, **7**, 1115 (1968).
258. *Watson H. C., Forthergill L. A., Winn S. I.* Личное сообщение.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абсолютная конфигурация** 102—103
Автоматическое титрование 196
ADP 205, 239, 240—242
Алкогольдегидрогеназа 24, 33, 92, 97, 104—105, 127, 160, 347, 348—352, 361
Аллостерические ферменты 253
— взаимодействия 254—260
Альдозокетозоизомераза (альдокетомутаза) *см.* **Ендиол**
Альдолаза 71—72, 262, 308
Аминоацил-тРНК—синтазаы 89, 236, 262, 283—285. *См. также*
Валил-тРНК—синтаза, **Изолейцил-тРНК**—синтаза, **Тирозил-тРНК**—синтаза
Аминокислоты 13—14
— оптическая активность 100
AMP 89, 143, 205, 232, 235, 236, 342
2,5-Ангидро-D-маннитол-1-фосфат 244
1,2-Ангидро-D-маннитол-6-фосфат 247
Антикооперативность *см.* **Отрицательная кооперативность**
Апофермент 345
Арабинонат-5-фосфат 409
Асимметрия молекул 102
Аспаргат-карбамоил—**трансфераза** 262, 303
Аспирин 57—59
АТФ 89, 158, 195, 205, 231, 232, 233, 235, 236, 239, 242, 319, 342
АТРаза 238
Аффинная метка 244—249
Ацетил-СоА: **акриламин**—**ацетил-трансфераза** 129
Ацетилхолинэстераза 114, 162
Ацетоацетатдекарбоксилаза 70—71, 189, 262
Ацилфермент 37, 113, 188, 213—227
S-аденозилметионин 90
- Белки, корректирование синтеза** 335—338
Белков кристаллы 26, 35
- Белок-белковое взаимодействие** 290—291
Бора эффект 270
Брёнстеда коэффициенты 54—56, 83—84, 94—95
— уравнение 53, 81, 83
Бриггса—**Холдейна** механизм 114, 123, 162, 311
— рН-зависимость 174—175, 179, 181
Бромелаин 373
Быстро устанавливающееся равновесие 127
Быстрые реакции, методы исследования 130
- Валил-тРНК**—**синтаза** 236—237, 283, 329, 337. *См. также* **Валин**
Валин 142, 335
«Ван-дер-Ваальса соединения» 272
Вандерваальсов радиус 275, 276
Вандерваальсовы силы 273, 276
Внутримолекулярное вращение 63
Внутримолекулярный катализ 60, 65
Водорода перенос 104—105, 405. *См. также* **Гидрид-ион**, **Протона перенос**
Водородная связь 19, 269, 276—278, 281, 283—284, 289, 290, 291
Вращательной релаксации время 194
Вторичная структура ферментов 19
Второго порядка реакции 201
- β-Галактозидаза** 230—231
Гаммета уравнение 82—83
Ганча уравнение 279
Гексокиназа 24, 307, 319, 335
Гель-фильтрация 204—205
Гемоглобин 22, 25, 252—258, 264, 265, 266, 268, 269—271, 287, 290
Гендерсона—**Хассельбаха** уравнение 165
Гидрид-ион 96, 346, 351, 356, 405

- Гидрофобная связь 278, 281, 282, 287—289
 Гиперспецифичность 335, 336
 Гликозидаза 299
 Гликолитические ферменты 307—309, 403
 Глицеральдегид 102
 Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 24, 33, 160, 163, 260, 262, 265, 268, 308, 347, 357—361
 Глицерофосфатдегидрогеназа 308, 347
 Глутаматдегидрогеназа 163, 347
 Глутаминсинтезаза 262
 Глюкозо-6-фосфат 247, 407, 408, 409
 Глюкозо-6-фосфат — изомераза 247, 308, 405, 407—411
 Голофермент 345
 Графическое представление кинетических данных 199—201
Гуггенхайма метод 199
- «Двойного сита» механизм 338, 342
 Двухтактного замещения механизм 127—129
 Дегидрогеназы 33—35, 307, 345—361
 — NAD-зависимые 33, 105, 346, 361
 Дейтерий 98, 104—105, 396, 405
 Детальное равновесие 92—93, 392, 393, 397
 Деформация 311, 316, 320, 321, 331, 335
 Диализ 202, 204
 Диксоацетонфосфат 404
 Дисперсионные силы 273—276
 Диффузия 156—157, 159, 162
 ДНК-полимераза 338, 339, 340
 D₂O 98, 183—184, 185
 Домены 33
- Енамины 70, 72
 Ендюл (*цис*-ендиол) 106, 404—406
 Енолаза 308
- Замещения реакция, механизм 391
 «Замка и ключа» модель 295, 311, 391
 «Замороженная» струя 133—135, 231, 233—240
- ИК**-спектроскопия 185
 Ингибирование 119
 — бесконкурентное 122
 — конкурентное 119
 — неконкурентное 122
 — необратимое 245
 — смешанное 120—122
- Ингибиторы активного центра, необратимые см. Аффинная метка
 Индолиллактилоилхлмотрипсин 26, 36, 38, 218, 367
 Индуцированное соответствие 258, 312—316, 319, 324—325
 Ионные связи 281, 285, 287, 290
 Ионогенные группы ферментов 169
 Изолейцил-тРНК—синтезаза 155, 233, 248, 329, 335—338
 Изостерический субстрат 329
 Изоферменты 353
 Изоцитратдегидрогеназа 257, 347
- Кальций 394—395
 Карбоангидраза 67, 68, 114, 159, 162, 310, 399—403
 Карбоксипептидаза 22, 24, 26, 33, 67, 326, 376—382
 Каталаза 114, 159, 160, 162
 Катализ 46
 — ковалентный 53, 69
 — общий кислотно-основной 53—57, 351, 389, 413
 — — кислотный 396
 — специфический кислотный и основный 52
 — электростатический 52, 65—67
 — электрофильный 52, 67
 — — ионами металлов 67, 89
 — — с образованием шиффова основания 69—72
 — — — участием пиридоксальфосфата 72—76
 — — — тиаминпирофосфата 76—78
 Катализатор кислотно-основной 354, 360, 375
 — общий основный 359, 363
 — электрофильный 379
 Катепсин D 383
 Кинетическая эквивалентность 93, 94, 374
 Кинетические изотопные эффекты 95, 351
 «Кинетическое корректирование» 341—342
 Клострипанн 373
 Комплементарность между ферментом и субстратом 293—325
 Конкурирующие субстраты 123—124
 Константа диссоциации кажущаяся 115
 — ионизации 165
 — Михаэлиса (K_M) 111, 115, 116
 — равновесия кажущаяся 115

- Константа связывания (K_s) 208—210
 — скорости ассоциации 160—161, 238. *См. также* Столкновений теория
 — диссоциации фермент-субстратного комплекса 140, 157, 160, 162, 216, 238
 — связывания 139, 150. *См. также* Константа скорости ассоциации
 Константы диссоциации кислот и оснований *см.* Константа ионизации
 Конфигурация промежуточного соединения, сохранение 230
 Кооперативность 252—271
 — отрицательная 260—261, 267, 356, 359, 360
 Корректирования механизмы 236—238, 335, 338—342
Кошланда модель (механизм) 258—260, 261, 267
 Кристаллы белков 26, 35
 Кротоназа 114, 162
 Ксилоза (β -D-ксилоза) 319
- Лайнуивера* — *Бэрка* график 117, 119, 178
 Лактатдегидрогеназа 24, 33, 160, 261, 308, 347, 353—356, 361
Ламберта — *Бэра* закон 191, 192
 Лизоцим 22, 24, 41—43, 49, 50, 67, 98, 150, 159, 185, 186, 189, 230, 248, 276, 299—300, 315, 317, 326, 395—399
- Магний (Mg^{2+}) 52, 89
 Максимизация K_m 304—306
 Малатдегидрогеназа 24, 33, 347, 356
 Маннозо-6-фосфат 409
 Маннозо-6-фосфат—изомераза 405
 Метаболитов концентрация 308
 Металлов ионы, катализ 52, 67—69
 Металлоферменты 67, 348, 376, 399
 Миоглобин 22, 23, 252
 Миозин 238, 239
 Миозиновая АТРаза 238
Михазлиса комплекс 112
 — константа (K_m) 111, 115—116
 — максимизация 304—306
Михазлиса — *Ментен* кинетика 116, 201
 — механизм 111—112, 114, 115, 119, 121, 122, 126, 169—171, 293—294, 330—331
 — уравнение 110, 123, 125—126, 245
 — насыщающая концентрация субстрата 110
- Модификация химическая аминогрупп белков 186—187
Моно — *Уаймена* — *Шанжэ* механизм 254. *См. также* *Моно* модель
Моно модель 257, 259, 261, 264—265, 267—268
 «Мультипродуктные» аналоги 302
 «Мультисубстратные» аналоги 302
- Напряжение 125, 312, 314—315, 317, 323—324
 Начальная скорость реакции 137
 Нековалентные взаимодействия 272
 Непрерывной струи метод 131
 Непродуктивное связывание 122—123, 125, 172, 314—315, 316, 324—325, 367
 Неупорядоченный механизм 127
 Никотинамидадениндинуклеотид *см.* NAD+
 Нуклеаза стафилококковая 24, 394—395
 Нуклеофильная атака 80—88
 Нуклеофильность 84, 88
 Нуклеофильные группы ферментов 79
 NAD+ 33, 104—105, 192, 195, 260, 268, 307, 324, 345—348, 351, 352, 353—358, 359—360, 361
 NADH 105, 163, 192, 193, 195, 196, 348, 351, 352, 353—358, 361
 NADP+ 104—105, 345
 NADPH 163, 345
 NAG (N-ацетилглюкозамин) 41, 398—399
 NAM (N-ацетилмурамовая кислота) 42
- Обратная транскриптаза 339
 Общая кислота 379. *См. также* Катализ общий кислотный
 Оксизтиламинпирофосфаты 77
 «Орбитальное управление» 65
 Остановленной струи метод 131—133, 214—216, 240, 241
- Папаин 24, 90, 97, 326, 373—376
 Пенициллопепсин 383
 Пепсин 297, 383—388
 Пепсиноген 324—325
 Пептидная связь 18
 Первичная структура ферментов 12—15
 Первого порядка реакции 199
 Переходное состояние 46
 — аналоги 299—303, 317

- Переходное состояние, стабилизация 311, 316, 319—323
 — — теория 46—50, 293, 329, 332, 333, 334, 351
 Переходные процессы, кинетика 130, 150—152
 Пероксидаза 114
 «Пинг-понг» механизм 127—129, 411
 Пиридоксальфосфат 72, 73
 Пируваткиназа 257, 265, 308
 Плотность упаковки для белков 25
 Поверхностный заряд 176—177
 Полупревращения время 137
 Последовательные механизмы 127
 Предстабионарная кинетика 136, 211
 Проксикарбоксипептидаза 382
 Пролонгатораза 301
 Промежуточные соединения 47, 85, 113, 123, 129, 212—238, 325—326
 Протеаза α -литическая 184
 — стрептококковая 373
 Протеазы 361—362
 — кислые 326, 382
 — сериновые 27—32, 37, 319, 362—363
 — тиловые 373
 Протона перенос 157—159, 401, 405—406. *См. также* Водорода перенос
 Профлавин 215, 217
 рН-зависимость активности фермента 375, 383, 400
 — аффинные метки, выявление 246
 — необратимого ингибирования 186, 246
 — k_{cat} 171, 172, 173, 182, 348, 351, 352, 374, 379, 389, 406, 407
 — K_M 171, 172, 173, 182
 — k_{cat}/K_M 171, 173, 175, 179, 181, 247, 389, 395, 397, 407
 рK_a 175, 176—184. *См. также* Константа ионизации
 — кажущийся 176
 — кинетический 175
 — макроскопический 176
 — микроскопический 175
 Радиоактивные изотопы, применение 196
 Рибозо-5-фосфат — изомераза 405
 Реакционная способность половины активных центров 260—261, 352, 356, 359—360
 Регуляторные функции фермента 306
 Релаксация время 136, 139
 Релаксационная кинетика 131
 Релаксационные методы 135
 Реннин 382
 Рентгеноструктурный анализ 15—17, 35—36
 Рибонуклеаза 24, 26, 388—392
 R-состояние 256
 Rhizopus-пепсин 383
 Светорассеяние 242. *См. также* Рассеяние
 Свободная энергия 81, 91
 Сигмоидные кривые связывания 252.
См. также Хилла коэффициент
 Система с переносом заряда 31, 184—185, 363—365, 371
Скэтчарда график 209
 Солевые мостики 270, 289, 291.
См. также Ионные связи
 Сопряженные реакции (системы) 195—196, 240
 Спектрофотометрические методы 194.
См. также Спектрофотометрия, ИК-спектроскопия, УФ-спектроскопия
 Спектрофотометрия 191—192
 Специфичность фермента 290, 315, 328—342
 α -Спираль 19, 21, 22, 24
 Стабионарная кинетика 109—115, 218—224
 Стабионарное состояние 109
 Стереохимия 99
 Стереоспецифичность 100, 104
 Столкновений теория 156
 β -Структура 19, 20, 22, 24, 25
 Субтилизин 24, 31—32, 40, 322
 Субъединицы белков 25, 252, 258, 260, 261, 353
 Сукцинат *см.* Янтарная кислота
 Сцинтилляторы 210
 Тиаминпирофосфат 76—78
 Тирозил-тРНК—синтетаза 141, 160, 260, 261, 283, 291
 Температурного скачка метод 135—136, 146—147, 151
Теорелла — Чанса механизм 127
 Тетраэдрическое промежуточное соединение 37
 Титрование активных центров 152—155
 Тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон (ТРСК) 245—246
 Транскетолаза 77
 Третичная структура ферментов 25
 Трехточечного присоединения теория 100
 Триозофосфатизомераза 24, 37, 114, 162, 308, 310, 403—407

- Трипсин 27, 29, 39—41, 185
Трипсина ингибитор 24, 38, 39, 291
Тритий 396, 404—407
Тройной комплекс 127, 335—354
Тромбин 31
Т-состояние 256
- Упорядоченный механизм 127, 355
УФ-спектроскопия 185
Уходящая группа 41, 85—90
- Фаг Т4, частота мутаций 339—341
Фермент-субстратные комплексы, структура 35—43
— — ассоциация 159—162
— — диссоциация 162
— — константа 140, 157, 160, 162, 202, 216, 238
— — энергия связывания 272, 281—289
Фицин 373
Фишера правила 102
Флуоресценция 185, 192—194
Фосфатаза кислая 229, 326
— щелочная 220, 226, 227—228
Фосфоглицераткиназа 24, 35, 308
Фосфоглицеромутаза 128, 308, 411—412
Фосфофруктокиназа 195—196
Фруктозо-6-фосфат 243, 407—409
Фумараза 105, 114, 162
Фурилакрилоновая группа 216, 217, 380
- Хелатный эффект 290, 302
Хилла коэффициент 262, 264, 265—266
— уравнение 262, 264
Химозин 382, 383
Химотрипсин 10, 24, 50, 113, 213—227
— аффинные метки 245—246
— гидролиз эфиров 220—224
— деформация субстрата 321, 323—325
— кинетический изотопный эффект 97
— конформация 32, 179, 181, 182
— кристаллизация 26
— непродуктивное связывание 90, 367
— поверхностный заряд 176, 177
— предстационарная кинетика 143
— система с переносом заряда 31, 184—185, 363—365, 371
— специфичность 27
- Химотрипсин, стабилизация переходного состояния 319—321
— структура 27—31
— титрование активного центра 154
— фермент-субстратный комплекс 39—41
— энергия связывания 285—288
— rK_a активного центра 179—183, 184, 186, 187, 189
 α -Химотрипсин 12, 22, 26, 32, 143, 149, 178, 179, 219, 221, 223
 δ -Химотрипсин 179, 180, 225
Химотрипсиноген 10, 372
Хиральный атом 100, 102
Холдейна уравнение 124—125, 225—226, 311
Хэммонда постулат 49—50
- Центральный комплекс 127
Цинк (Zn^{2+}) 52, 348, 350, 351—352, 361, 376, 377, 400, 401, 402
Цитидиндезаминаза 301
Цитидинтрифосфатсинтетаза 262
- Частота соударений 156, 157
Четвертичная структура ферментов 25
Число оборотов 111, 115
- Шиффово основание 69—76
- Эволюционно совершенный фермент 310
Эволюция 31, 32, 303
Эдера константы 253
— уравнение 259
Эди — Хофсти график 119, 201, 209
Эластаза 27, 29, 32, 36, 40, 187, 297, 316
Электростатические силы 65, 272
Электрофильные центры 84
Энергия активации 48, 293—297
Энтерокиназа 372
Энтропийный фактор 252
Энтропия 60—65, 125, 240, 278, 281, 289—290
— активации 48
Эпоксид (ы) 248, 249
Эстераза 326
 α -Эффект 85
Эффективная концентрация групп на молекуле фермента 57—64
- Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) 136, 184—185, 321, 388, 400
Янтарная кислота 58, 59

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	9
Глава 1. Трехмерная структура ферментов	11
А. Первичная структура белков	12
Б. Трехмерная структура ферментов	15
1. Рентгеноструктурный анализ	15
2. Структурные элементы белков	17
3. Построение белковых молекул из отдельных блоков	22
4. Третичная и четвертичная структура	25
5. Одинакова ли структура фермента в растворе и в кристалле?	26
В. Классы ферментов	27
1. Сериновые протеазы [28—34]	27
2. Сериновые протеазы микроорганизмов: конвергентная эволюция	31
3. Карбоксипептидазы [41, 42]	33
4. Дегидрогеназы и домены [43]	33
Г. Структура фермент-субстратных комплексов	35
1. Методы исследования фермент-субстратных комплексов	35
2. Пример 1: сериновые протеазы	37
3. Пример 2: лизоцим	41
Список литературы	43
Глава 2. Химический катализ	46
А. Теория переходного состояния [1—4]	46
1. Значение теории переходного состояния и ее применение	49
2. Постулат Хэммонда [5]	49
Б. Принципы катализа	50
1. В каких случаях и почему необходим катализ	50
2. Общий кислотно-основный катализ	53
3. Внутримолекулярный катализ: «эффективная концентрация» групп на молекуле фермента	57
4. Энтропия: теоретические основы внутримолекулярного катализа и эффективная концентрация [18, 19]	60
5. «Орбитальное управление» [21]	65
6. Электростатический катализ	65
7. Катализ ионами металлов [26]	67
В. Ковалентный катализ	69
1. Электрофильный катализ с образованием шиффова основания [37]	69
2. Пиридоксальфосфат: электрофильный катализ [37, 42]	72
3. Триаминпирофосфат: электрофильный катализ	76

	4. Нуклеофильный катализ	79
Г.	Зависимость реакционной способности реагентов от их структуры	80
	1. Нуклеофильная атака карбонильной группы	80
	2. Факторы, определяющие нуклеофильность и легкость отщепления уходящей группы	84
	3. Применение линейных зависимостей свободной энергии к ферментативным реакциям	90
Д.	Принцип детального равновесия	92
Е.	Принцип кинетической эквивалентности	93
Ж.	Кинетические изотопные эффекты [57]	95
	1. Первичные изотопные эффекты	95
	2. Вторичные изотопные эффекты	98
	3. Изотопные эффекты, обусловленные растворителем	98
3.	Стереохимия [65]	99
	1. Асимметричный фермент может превратить симметричный субстрат в асимметричный	101
	2. Обозначения [65]	101
	3. Примеры стереоспецифичности ферментов	104
	Список литературы	106
Глава 3.	Основные уравнения ферментативной кинетики	109
А.	Стационарная кинетика	109
	1. Экспериментальная основа: уравнение Михаэлиса — Ментен [1]	110
	2. Интерпретация кинетических параметров для односубстратных реакций: механизм Михаэлиса — Ментен	111
	3. Последующие модификации механизма Михаэлиса — Ментен	112
	4. Все три механизма встречаются на практике	114
В.	Физический смысл параметров уравнения Михаэлиса — Ментен	115
	1. Смысл константы k_{cat}	115
	2. Смысл K_M : истинные и кажущиеся константы равновесия	115
	3. Смысл параметра k_{cat}/K_M	117
В.	Графическое представление данных	117
Г.	Ингибирование	119
	1. Конкурентное ингибирование	119
	2. Неконкурентное, бесконкурентное и смешанное ингибирование	120
Д.	Непродуктивное связывание	122
Е.	$k_{cat}/K_M = k_2/K_s$	123
Ж.	Конкурирующие субстраты	123
	1. Другая форма записи уравнения Михаэлиса — Ментен	123
	2. Специфичность ферментов по отношению к конкурирующим субстратам	124
3.	Обратимость: уравнение Холдейна [10]	124
	1. Равновесие в растворе	124
	2. Равновесие на поверхности молекулы фермента	125
И.	Невыполнимость уравнения Михаэлиса — Ментен	125
К.	Мультисубстратные системы	126
	1. Неупорядоченный последовательный механизм	127
	2. Упорядоченный механизм	127
	3. Механизм Теорелла — Чанса	127
	4. Механизм типа пинг-понг (механизм с замещением фермента, или механизм двухтактного замещения)	127
	Список литературы	129

Глава 4.	Измерение констант скорости ферментативных реакций и порядок их величин	130
Часть 1.	Экспериментальные методы: кинетика переходных процессов	130
А.	Методы быстрого смешивания реагентов и быстрого «замораживания» реакции	131
1.	Метод непрерывной струи	131
2.	Метод остановленной струи	131
3.	Метод быстрого «замораживания» струи	133
Б.	Релаксационные методы	135
1.	Метод температурного скачка	135
2.	Ядерный магнитный резонанс [7—10]	136
В.	Анализ предстационарной кинетики и кинетики релаксационных процессов	136
1.	Простые экспоненциальные функции	136
2.	Связывание субстрата с ферментом	139
3.	Последовательные реакции	141
4.	Параллельные реакции	145
5.	Вывод уравнений для метода температурного скачка	146
6.	Общее решение для двух последовательных обратимых реакций	147
7.	Экспериментальное исследование кинетики переходных процессов	150
Г.	Абсолютные концентрации ферментов	152
1.	Титрование активных центров и начальный «всплеск» концентрации продукта	152
2.	Зависимость амплитуды всплеска от концентрации субстрата	154
3.	Определение концентрации активных центров исходя из анализа скорости ферментативной реакции	155
Часть 2.	Порядок величин констант скорости для ферментативных процессов	156
А.	Верхний предел констант скорости [12]	156
1.	Ассоциация и диссоциация	156
2.	Химические процессы	157
3.	Перенос протона	157
Б.	Константы скорости ферментативных реакций и лимитирующие процессы	159
1.	Ассоциация ферментов и субстратов	159
2.	Параметр k_{cat}/K_M может определяться частотой столкновений между ферментом и субстратом	161
3.	Диссоциация комплексов фермент — субстрат и фермент — продукт	162
4.	Параметр k_{cat} может определяться диссоциацией комплекса фермент — продукт	163
5.	Конформационные изменения	163
	Список литературы	163
Глава 5.	pH-зависимость скорости ферментативных реакций	165
А.	Ионизация простых кислот и оснований: основные уравнения	165
1.	Получение pK_a из кинетических уравнений	168
Б.	Влияние ионизации ионогенных групп ферментов на кинетику	169
1.	Простая теория: механизм Михаэлиса — Ментен	169
2.	pH-зависимость параметров k_{cat} , k_{cat}/K_M , K_M и $1/K_M$ [1, 2]	170
3.	Простое правило для идентификации компонента ферментативной реакции, определяющего характер pH-зависимости кинетических параметров	171

В.	Модификации простой теории и отклонения от нее	172
	1. Модификации, обусловленные наличием дополнительных промежуточных соединений	172
	2. Отклонение от простых правил: механизм Бриггса — Холдейна и изменение природы лимитирующей стадии при изменении рН; кинетические pK_a [4, 6—8]	174
	3. Экспериментальное определение кинетических и равновесных pK_a [7, 8]	175
	4. Микроскопические и макроскопические pK_a	175
Г.	Влияние поверхностного заряда на pK_a групп в ферментах	176
Д.	Графическое представление данных	177
Е.	Примеры и экспериментальные данные	179
	1. pK_a активного центра химотрипсина	179
Ж.	Прямое титрование групп в ферментах	183
	1. Влияние D_2O на рН/рD и pK_a	183
	2. Методы	184
З.	Влияние температуры, полярности растворителя и ионной силы на pK_a групп, находящихся в составе фермента и в растворе	187
И.	Аномальные значения pK_a в ферментах	188
	Список литературы	189
Глава 6.	Практическая кинетика	191
А.	Кинетические методы	191
	1. Спектрофотометрия	191
	2. Спектрофлуориметрия	192
	3. Автоматизированные спектрофотометрические и спектрофлуориметрические методы	194
	4. Использование сопряженных реакций	195
	5. Автоматическое титрование кислоты или основания	196
	6. Применение радиоактивных изотопов	196
Б.	Графическое представление кинетических данных	199
	1. Экспоненты	199
	2. Реакции второго порядка	201
	3. Кинетика Михаэлиса — Ментен	201
В.	Определение констант диссоциации фермент-субстратных комплексов	202
	1. Кинетика	202
	2. Равновесный диализ	202
	3. Равновесная гель-фильтрация [7]	204
	4. Ультрацентрифугирование	206
	5. Фильтрация [10]	207
	6. Спектроскопические методы	207
	7. Титрование	207
Г.	Графическое представление данных по связыванию	208
	1. Наличие одного центра связывания в молекуле фермента	208
	2. Наличие нескольких центров связывания	209
	Приложение: синтилляторы	210
	Список литературы	210
Глава 7.	Примеры использования кинетических методов для исследования механизмов действия ферментов	211
А.	Возможности стационарной и стационарной кинетики	211
	1. Выявление промежуточных соединений: что считать доказательством?	212
Б.	Химотрипсин: выявление промежуточных соединений с помощью метода остановленной струи, данных стационарной кинетики и определения соотношения между продуктами	213

	1. Выявление ацилфермента, образующегося при гидролизе эфиров, с помощью данных предстационарной кинетики	214
	2. Выявление ацилфермента при гидролизе эфиров с помощью данных стационарной кинетики	218
	3. Выявление ацилфермента при гидролизе амидов и пептидов [14]	224
	4. Обоснованность выводов, полученных при исследовании распределения продуктов, и возможные источники ошибок	226
В.	Другие примеры обнаружения промежуточных соединений с помощью исследования распределения продуктов и из кинетических данных	227
	1. Щелочная фосфатаза	227
	2. Кислая фосфатаза	229
	3. β -Галактозидаза: сохранение конфигурации предполагаемого промежуточного соединения	230
Г.	Аминоацил-тРНК-синтазы: обнаружение промежуточных соединений методами «замороженной» струи, изотопного обмена и с помощью стационарной кинетики	231
	1. Механизм реакции	231
	2. Механизм корректирования биосинтеза белка	236
Д.	Миозиновая АТРаза: определение констант скорости ассоциации и диссоциации фермент-субстратного комплекса, исследование промежуточных конформационных состояний и равновесий методом остановленной струи с регистрацией флуоресценции, методом высвобождения протонов, измерением ферментативной активности при помощи вспомогательных ферментных систем, методом светорассеяния и методом замороженной струи	238
	1. Лимитирующая стадия гидролиза АТФ	239
	2. Скорости высвобождения ADP и P (фосфата)	240
	3. Двухстадийные процессы связывания АТФ и ADP, выявляемые методом остановленной струи [65] с регистрацией флуоресценции триптофана	241
	4. Равновесие между $M^*.ATP$ и $M^{**}.ADP.P$	242
	5. Измерение светорассеяния	242
Е.	Фосфофруктокиназа: определение аномерной специфичности методом остановленной струи, замороженной струи и с помощью использования субстратов с фиксированной конфигурацией	243
Ж.	Аффинные метки [73]	244
	Список литературы	249
Глава 8.	Кооперативное связывание лигандов и аллостерические взаимодействия	252
А.	Положительная кооперативность	252
Б.	Механизмы аллостерических взаимодействий и кооперативность	254
	1. Механизм Моно — Уаймена — Шанжэ [4]	254
	2. Последовательная модель Кошланда — Немети — Филмера [5]	258
	3. Обобщенная модель [6]	259
В.	Отрицательная кооперативность и реакционная способность половины активных центров [8, 9]	260
Г.	Количественный анализ кооперативности	262
	1. Уравнение Хилла; коэффициент Хилла — мера кооперативности [17]	262
	2. Кривая связывания для модели Моно и др. [4]	264

	3. Кривая связывания для модели Кошланда и др.	267
	4. Обнаружение кооперативности и сопоставление механизмов Моно и др. и Кошланда и др.	267
Д.	Молекулярный механизм кооперативного связывания для гемоглобина [3]	268
	1. Физиологическое значение кооперативного связывания кислорода	268
	2. Стереохимический механизм оксигенации гемоглобина	269
	Список литературы	271
Глава 9.	Силы, действующие между молекулами, и энергия фермент-субстратного взаимодействия	272
А.	Нековалентные взаимодействия между атомами	272
	1. Электростатические взаимодействия	272
	2. Неполлярные взаимодействия (вандерваальсовы, или дисперсионные силы)	273
	3. Водородная связь	276
	4. Гидрофобная связь [7, 8]	278
Б.	Энергия связывания субстратов с ферментами	281
	1. Оценка увеличения энергии связывания из кинетических данных	282
	2. Оценка энергий связывания малых групп в случае аминоксил-тРНК-синтетазы	283
	3. Оценка полной энергии связывания на примере химотрипсина	285
	4. Почему ферменты более гидрофобны, чем органические растворители	287
	5. Заключение	288
В.	Энтропия и связывание [24]	289
Г.	Белок-белковое взаимодействие	290
	Список литературы	291
Глава 10.	Комплементарность между ферментом и субстратом и теории ферментативного катализа	293
А.	Использование энергии связывания фермента с субстратом в катализе	293
	1. Энергия связывания понижает энергию активации перехода с константой скорости k_{cat}/K_M	293
	2. Взаимопревращаемость энергии связывания и энергии активации стадии химического превращения субстрата	294
	3. Комплементарность фермента переходному состоянию субстрата означает, что k_{cat}/K_M имеет максимальное значение	295
	4. Экспериментальные данные об использовании энергии связывания в катализе и комплементарности фермента переходному состоянию субстрата	297
	5. Аналоги переходного состояния субстрата: зонды для исследования комплементарности [5, 6]	299
Б.	Эволюция фермента в сторону увеличения максимальной скорости реакции: сильное связывание переходного состояния субстрата — слабое связывание самого субстрата	303
	1. Принцип максимизации K_M при постоянном k_{cat}/K_M [2]	307
	2. Экспериментально определяемые значения K_M	310
	3. Эволюционно совершенный фермент	310
В.	Молекулярные механизмы использования энергии связывания	311
	1. Деформация	311
	2. Индуцированное соответствие	312
	3. Непродуктивное связывание	314

	4. Независимость специфичности фермента от напряжения, индуцированного соответствия и непродуктивного связывания	315
	5. Экспериментальное подтверждение существования напряжения и индуцированного соответствия и природа этих явлений	315
	6. Природа напряжения. Напряжение или деформация?	323
	7. Деформация — индуцированное соответствие — непродуктивное связывание	324
	Приложение: проблема накопления промежуточных соединений [2]	325
	Список литературы	327
Глава 11.	Специфичность и относительная реакционная способность	328
А.	Ограничения, налагаемые на специфичность	329
1.	Механизм Михаэлиса — Ментен	331
2.	Общий случай	332
3.	Взаимодействующие активные центры	333
4.	Сtereoхимическая природа специфичности	334
Б.	Сверхспецифичность и механизмы корректирования	335
1.	Синтез белков	335
2.	Механизмы корректирования при репликации ДНК [6]	338
3.	«Кинетическое корректирование»	341
	Список литературы	343
Глава 12.	Структура и механизм действия отдельных ферментов	344
А.	Дегидрогеназы	345
1.	Алкогольдегидрогеназы [5]	348
2.	L-лактатдегидрогеназа [4, 6, 32]	353
3.	Малатдегидрогеназа [7]	356
4.	Глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа [50]	357
5.	Общие замечания относительно дегидрогеназ	360
Б.	Протеазы	361
1.	Сериновые протеазы	362
2.	Тиоловые протеазы [89—94]	373
3.	Карбоксипептидазы [110—112]	376
4.	Кислые протеазы [128—130]	382
В.	Рибонуклеаза [164, 165]	388
1.	Структура фермента и фермент-субстратного комплекса [164, 171]	390
2.	Сtereoхимия реакции замещения	391
Г.	Стафилококковая нуклеаза [179, 180]	394
Д.	Лизоцим [187—189]	395
1.	Карбоний-ион	396
2.	Электростатический и общий кислотный катализ	397
3.	Энергии связывания с подцентрами	398
Е.	Карбоангидраза [209, 210]	399
Ж.	Гликолитические ферменты	403
1.	Триозофосфатизомераза [227—292]	403
2.	Эксперименты с использованием в качестве меток дейтерия и трития и механизм действия ферментов, катализирующих кето-альдольную изомеризацию	404
3.	Глюкозо-6-фосфат—изомераза [223, 229]	407
4.	Фосфоглицеромутаза [254]	411
З.	Заключение	413
	Список литературы	414