

ENZYMIC CATALYSIS

John Westley

Professor of Biochemistry
The University of Chicago

HARPER & ROW, PUBLISHERS, NEW YORK,
EVANSTON, AND LONDON

1969

Дж. Уэстли

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ

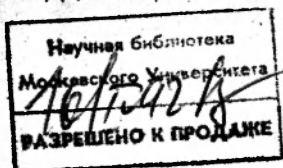
Перевод с английского и предисловие
д-ра хим. наук В. А. ЯКОВЛЕВА

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

МОСКВА

1972

УДК 577.15/17



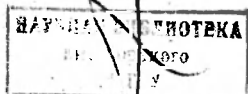
ЗФГ
У-991



В книге рассмотрены современные представления о строении ферментов, механизме и кинетике их действия, а также о механизмах регуляции метаболизма на уровне ферментов. Автор не перегружает изложение большим числом частных примеров, сосредоточив внимание на общих принципах ферментативного катализа, знание которых поможет специалисту разобраться в изучаемой им конкретной ферментной системе. В приложении даны задачи, позволяющие читателю проверить, насколько хорошо он усвоил материал.

Рассчитана на молодых исследователей, аспирантов, студентов старших курсов — биохимиков, биофизиков, химиков-органиков.

Редакция биологической литературы



7059-8-72

Инд. 2-10-2
120-72

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Кинетика ферментативных реакций как метод изучения механизма действия индивидуальных ферментов и систем ферментов все больше привлекает внимание исследователей. Использовать принципы химической кинетики применительно к реакциям, катализируемым ферментами, начали уже довольно давно — много десятилетий назад. Однако по мере того, как становилось ясно, что механизм ферментативных реакций значительно сложнее механизма самых сложных небιологических реакций, ценность измеряемых экспериментально кинетических констант подвергалась все большему сомнению. Это в свою очередь служило мощным стимулом для совершенствования теории и методов самой ферментативной кинетики. В результате эта наука сейчас достигла несомненных успехов, позволяющих достаточно плодотворно применять ее при изучении механизмов ферментативного катализа. Именно по этим причинам ни одна книга по ферментам не обходится сейчас без глав по кинетике, хотя эти вопросы излагаются обычно достаточно кратко.

Вместе с тем ясно, что для хорошей подготовки в области ферментативной кинетики необходимо знакомство с последовательным и достаточно подробным изложением предмета. Именно такое изложение читатель найдет в книге Уэстли. Автор предназначает ее для аспирантов, изучающих энзимологию и знакомых с основами физической и органической химии. Однако книга, несомненно, может быть полезной также студентам химических и биологических факультетов, специализирующимся по ферментам, и молодым научным работникам, применяющим методы кинетики в исследованиях ферментов.

Основное достоинство книги Уэстли — последовательное изложение теории и методов ферментативной кинетики, начиная от простых односубстратных реакций и кончая сложными полиферментными системами. Автор, имеющий немалый опыт собственных кинетических

исследований, строго критически обсуждает возможные способы интерпретации экспериментальных данных с точки зрения механизмов действия ферментов. В книге рассматриваются в основном наиболее доступные методы стационарной кинетики, широко используемые в энзимологии. Указывая на ограничения этих методов, не позволяющие использовать их для анализа механизма многих сложных реакций, имеющих практическое значение, автор затрагивает также теоретические и методические основы более новых методов (изотопного равновесия, предстационарной кинетики, релаксационных методов и некоторых других), облегчающих исследования механизмов таких реакций.

Многие авторы излагают основы ферментативной кинетики слишком формализованно, абстрагируясь от основных химических проблем энзимологии — роли химического строения фермента и субстрата в катализе, значения отдельных функциональных групп, электронных и стерических механизмов катализа и т. п. Дж. Уэстли стремится по возможности связывать формальные (кинетические) механизмы ферментативных реакций с химией катализа, и в этом, несомненно, большое достоинство его книги. Примеры исследований конкретных ферментов, хотя выбор их нередко носит в известной мере субъективный характер, достаточно убедительно иллюстрируют эту связь.

В последние годы все чаще обнаруживаются ферментативные реакции, не подчиняющиеся так называемой кинетике Михаэлиса (простой гиперболической зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата). Кинетика таких реакций представляет большой интерес, поскольку она может быть связана с механизмом саморегуляции на уровне индивидуального фермента. В книге Уэстли эти актуальные вопросы рассмотрены, по нашему мнению, несколько поверхностно и не вполне отражают современное состояние теории, развивающейся особенно интенсивно в последние 2—3 года. По этим причинам мы сочли целесообразным снабдить гл. XV, посвященную регуляции активности ферментов, небольшими подстрочными примечаниями и ссылками на работы, вышедшие в последнее время. В список лите-

ратуры к гл. XV также внесены добавления (отмечены звездочкой). Это поможет читателю лучше разобраться в современном состоянии кинетической теории регуляции ферментативной активности (в том числе аллостерической регуляции).

Автор заключает свою книгу небольшим сборником задач возрастающей сложности, решение которых должно способствовать усвоению материала, а главное — развитию навыков к кинетическому анализу механизмов ферментативных реакций.

В заключение хотелось бы выразить надежду, что книга Уэстли послужит полезным учебным пособием для аспирантов и студентов, специализирующихся в области энзимологии, а также хорошим руководством для химиков, биологов и медиков, изучающих ферменты и ферментативные реакции.

В. А. Яковлев

ИЗ ПРЕДИСЛОВИЯ АВТОРА

Эта книга предназначена в качестве учебного пособия в первую очередь для тех аспирантов, специализирующихся в области биохимии и родственных дисциплин, которые интересуются механизмом действия ферментов и знакомы с основами органической химии и биохимии, а также с элементами физической химии. В настоящее время имеются труды, в которых механизмы реакций описаны с позиций физической органической химии и которые можно использовать для анализа действия ферментов, а также ряд блестящих работ по кинетике ферментативных реакций. Тем не менее исследователь, не занимающийся специально механизмом действия ферментов, нуждается в кратком современном руководстве, в котором представления о ферментативном катализе были бы изложены с феноменологической точки зрения. В настоящей книге сделана попытка изложить этот материал, соблюдая по мере возможности равновесие между различными экспериментальными подходами и строго отделяя то, что доказано экспериментально, от гипотез.

Автор надеется (хотя и не уверен), что ему простят выбор примеров. Книга такого объема, написанная с указанной целью, не может и не должна быть всеобъемлющей. В ней приведено лишь минимальное количество примеров, необходимых для иллюстрации рассматриваемых принципов. Они избраны прагматически, в качестве материала, который автор находит полезным для развития у студентов понимания современной энзимологии. Естественно, что преобладающее большинство блестящих исследований здесь даже не упоминается.

В конце каждой главы приведены ссылки на некоторые хорошие книги и обзоры, в которых предмет рассматривается в более широком аспекте и с других точек зрения. Там же даны ссылки на экспериментальные работы, из которых заимствованы приведенные в книге данные.

Дж. Уэстли

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

Одна из самых несчастливых особенностей энзимологии состоит в том, что каждый автор стремится ввести свою собственную систему условных обозначений. Такие проблемы обычно решаются на основе международных соглашений, и, возможно, в будущем это удастся сделать. Но пока еще реформа на этом уровне полностью не осуществлена. В частности, до сих пор продолжают применять символы S и P для обозначения субстрата и продукта, хотя эти символы годились бы для обозначения серусодержащих и фосфорсодержащих ферментов.

При выборе символов для этой книги автор стремился прежде всего исключить возможность недоразумений. Для обозначения субстратов и продуктов применяются такие прописные буквы, которые не являются символами химических элементов, часто встречающихся в живой природе. В тех случаях, когда важно различить субстрат и продукт реакции, для первого приняты начальные буквы алфавита, а для второго — последние. Константы равновесия обозначаются через K , константы скорости — через k с положительными и отрицательными нижними индексами, характеризующими номер и направление реакции. В математических формулах концентрации обозначаются просто курсивным символом компонента реакции без общепринятых квадратных скобок, поскольку это обычно не вызывает недоразумений. Для обозначения молекулярных комплексов применяются скобки. Так, в математической формуле (EA) обозначает концентрацию комплекса A с E , тогда как EA обозначает произведение концентраций веществ E и A . Некоторые из принятых в книге способов обозначения, например способ обозначения констант скорости, находятся в соответствии с рекомендациями Международного биохимического союза, касающимися номенклатуры ферментов. Однако для наименования ферментов используются общепринятые тривиальные названия вместо официальных систематических.

При описании механизмов реакций приняты динамические уравнения процессов, аналогичные тем, которые ввел Болдуин, так как они позволяют без лишних объяснений показать ход превращения субстрата в реакции. В то же время эти формулы подчеркивают циклический характер участия фермента в катализе. В уравнениях такого типа обратимые реакции обозначаются двусторонними стрелками, так как содержание книги таково, что никаких недоразумений возникнуть не может (двусторонние стрелки часто используют еще для обозначения резонанса). Реакции нумеруются в последовательности слева направо. Наконец, в книге используются общепринятые термодинамические и химические символы. Значение каждого символа объясняется в тексте, когда он встречается впервые, а также в списке обозначений.

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

- A, B, C, \dots — субстрат;
 A, B, C, \dots — концентрация субстрата;
 A_0 — начальная концентрация субстрата;
 (AQ) — комплекс модификатора с субстратом;
 ΔC — очень малое отклонение от равновесной концентрации;
 D — диэлектрическая проницаемость;
 e — основание натуральных логарифмов;
 e — заряд электрона;
 E — свободный фермент;
 E — концентрация свободного фермента;
 E — аррениусова энергия активации;
 E_0 — начальная концентрация фермента, т. е. общая концентрация всех форм фермента;
 (EA) — фермент-субстратный комплекс;
 (EA) — концентрация фермент-субстратного комплекса;
 $(EA)_0$ — гипотетическая стационарная начальная концентрация комплекса (EA) ;
 ΔE^0 — стандартное изменение внутренней энергии;
 (EQ) — комплекс модификатора с ферментом;
 (EQ) — концентрация комплекса модификатора с ферментом;
 (EAQ) — тройной комплекс модификатора, фермента и субстрата;
 (EAQ) — концентрация этого тройного комплекса;
 (E_p, E_q, E_r) — ферменты в сопряженных системах;
 ER — замещенная форма фермента;
 (ERB) — комплекс субстрата с замещенной формой фермента;
э. е. — энтропийная единица, кал \cdot моль $^{-1}$ /К;
 ΔG^0 — стандартное изменение свободной энергии;
 ΔG^* — свободная энергия активации;
 h — постоянная Планка;

- H — концентрация гидроний-иона;
 ΔH^0 — стандартное изменение энтальпии;
 ΔH^* — энтальпия активации;
 I — ингибированная реакция;
 k — константа скорости реакции (числовые индексы обозначают номера реакций, знаки плюс и минус — их направление);
 k' — кажущаяся константа скорости реакции;
 K — постоянная Больцмана;
 K_a, K_1, \dots — константа равновесия (ассоциации) для реакции a , реакции 1 и т. д.;
 K_m — константа Михаэлиса (верхний буквенный индекс обозначает субстрат);
 K_m^{app} — кажущаяся константа Михаэлиса (величина, обратная длине отрезка, отсекаемого на оси абсцисс при использовании метода двойных обратных величин);
 K_Q — константа равновесия (ассоциации) для модификатора (числовой нижний индекс обозначает стадию реакции);
 K_S — константа равновесия (диссоциации) для фермент-субстратного комплекса;
 μ — ионная сила;
 N — нормальная неингибированная реакция;
 P, Q, R — фермент-субстратные комплексы ферментов E_p, E_q, E_r в сопряженной системе;
 pK — отрицательный логарифм константы диссоциации;
 pK_m — отрицательный логарифм константы Михаэлиса;
 $p\Delta V^0$ — произведение давления на стандартное изменение объема;
 Q — модификатор;
 Q — концентрация модификатора;
 r — расстояние между центрами зарядов в бимолекулярной ионной реакции;
 R — газовая постоянная;
 R — скорость изотопного обмена;
 R_{max} — максимальная скорость изотопного обмена;
 ρ — константа Гаммета для реакции;

- ΔS^0 — стандартное изменение энтропии;
 ΔS^* — энтропия активации (индексы e_s и ne_s обозначают электростатический и неэлектростатический вклад соответственно);
 σ — константа Гаммета для заместителя;
 t — время;
 T — абсолютная температура;
 τ — время релаксации;
 v_0 — начальная скорость реакции;
 V^{app} — кажущаяся максимальная скорость реакции (величина, обратная длине отрезка, отсекаемого на оси ординат при использовании метода двойных обратных величин);
 V — максимальная скорость реакции;
 X, Y, \dots — продукт реакции;
 X, Y, \dots — концентрация продукта реакции;
 Z_A, Z_B, \dots — заряд иона.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты несут в себе как свойства катализаторов, так и свойства белков. Как катализаторы, ферменты снижают свободную энергию активации катализируемых ими реакций. Так же как и для некоторых других катализаторов, для них характерен «эффект насыщения», заключающийся в том, что при достаточно высокой концентрации реагирующих веществ скорость реакции становится независимой от дальнейшего повышения их концентрации. Но ферменты отличаются от большинства других катализаторов тем, что зависимость их активности от рН и температуры имеет характер, типичный для белков. Графики зависимости активности ферментов от рН имеют перегибы при значениях рК', характерных для ионизирующихся функциональных групп белков. Температура, при которой фермент теряет свою активность, совпадает с температурой, вызывающей разрушение третичной структуры белка.

Ферменты обладают еще двумя свойствами, несомненно связанными с их белковой природой,— необычайно высокой активностью и очень строгой субстратной специфичностью; этими свойствами не обладает ни один из всех других известных нам катализаторов. Основные усилия исследователей направлены сейчас именно к тому, чтобы полностью изучить и в конечном итоге полностью понять эти две особенности ферментативного катализа. Хотя энзимологи часто обращали внимание на эти особенности, столь же часто они отмечали, что до сих пор не удалось найти полного химического объяснения этих двух особенностей ни для одного фермента. Тем не менее надо сказать, что к настоящему времени в изучении механизма действия ферментов достигнуты существенные успехи. По-видимому, мы располагаем сейчас достаточно точными аналитическими методами, чтобы в ближайшем будущем полностью выяснить механизм действия хотя бы некоторых ферментов.

Достижению этой цели способствуют исследования, проводимые в трех различных направлениях. Прежде всего это, естественно, исследования по химии белка, без которых нельзя до конца понять механизмы каталитического действия этих веществ. Мы нуждаемся в ис-

черпывающей информации относительно реакционной способности функциональных белковых групп, об их взаимодействии друг с другом и с другими молекулами. Другой необходимой предпосылкой полного понимания сущности ферментативного катализа является изучение каталитических механизмов как таковых, т. е. изучение физической органической химии катализа. В принципе сочетание этих двух путей исследования должно привести к пониманию механизма ферментативного катализа. Действительно, коль скоро мы будем знать все реакции, в которые способны вступать белки, и все возможные каталитические механизмы, мы будем располагать твердой базой для построения теории. Но есть еще третий подход, несколько отличающийся от этих двух, плодотворность которого для достижения поставленной цели совершенно несомненна. Этот подход базируется на той точке зрения, что самый прямой путь к пониманию механизмов ферментативного катализа — это исследование самих реакций, катализируемых ферментами. Такая феноменологическая точка зрения предусматривает два рода исследований: 1) изучение кинетики ферментативных реакций и 2) выделение отдельных ферментов и в особенности промежуточных продуктов катализируемых ими реакций, и изучение этих веществ. В большинстве исследований механизмов ферментативного катализа используются элементы всех трех подходов, хотя обычно отдается предпочтение одному из них.

В этой книге рассматриваются в известной мере все упомянутые выше направления исследований, но одни из них рассмотрены более детально, другие — менее детально. Предполагается, что читатель обладает некоторыми знаниями основ белковой химии и потому для напоминания излагаются лишь те ее аспекты, без которых невозможно понять основную материал. Вопросы физической органической химии катализа рассматриваются в первых главах при объяснении общих теорий ферментативного катализа. Однако наибольшее внимание уделено феноменологическому подходу, поскольку он служит источником той суммы фактов, которую должна объяснить искомая нами теория ферментативного катализа.

ОСНОВЫ ЭНЗИМОЛОГИИ

Ферменты являются катализаторами белковой природы, и, следовательно, для выяснения детальных механизмов их действия необходимо знать как химию белков, так и особенности катализируемых ими реакций.

ХИМИЯ ФЕРМЕНТОВ

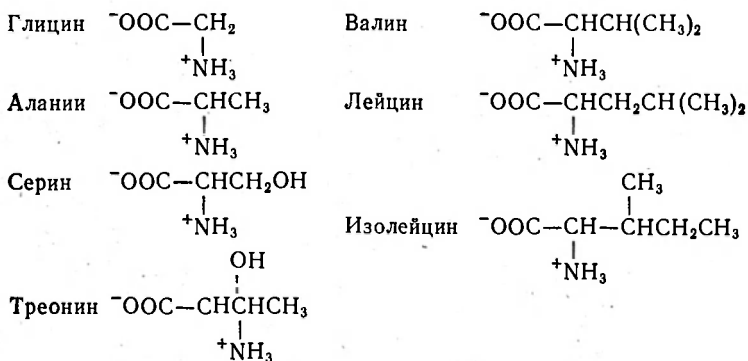
Молекулы ферментов, как и все белковые молекулы, построены из остатков α -аминокислот, соединенных пептидными связями. Линейную последовательность остатков в полипептидной цепи называют *первичной структурой* белка. Под *вторичной структурой* понимают характер спирализации или свертывания полипептидной цепи; эта структура стабилизируется водородными связями между карбонильной и амидной группами пептидных связей. В результате дальнейшего скручивания молекулы, уже имеющей определенную вторичную структуру, возникает *третичная структура*, которая стабилизируется за счет различных взаимодействий между боковыми группами аминокислот. Наконец, под *четвертичной структурой* понимают крупные белковые агрегаты, состоящие из нескольких полипептидных цепей различного типа. Помимо полипептидной цепи, на которую приходится основная масса молекулы, белок может содержать также и другие ковалентно связанные с полипептидной цепью химические группировки, называемые *простетическими группами*.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

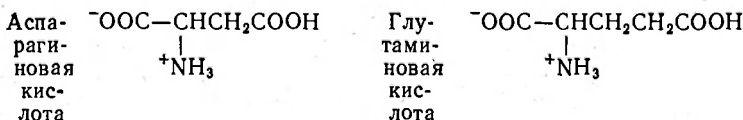
Остовом первичной структуры является полипептидная цепь, одинаковая у всех белков. Единственная особенность, наблюдающаяся у остова некоторых белков, связана с наличием в их структуре остатков пролина и оксипролина, которые относятся к вторичным, а не к первичным аминам. За этим исключением, специфические особенности каждого белка определяются расположением и числом различных аминокислотных остатков в его молекуле. Виды взаимодействий, в которые может вступать данный фермент, будь то реакции с субстратом и простетической группой или внутримолекулярные взаимодействия, стабилизирующие третичную структуру самого фермента, полностью определяются химическими свойствами и последовательностью этих боковых групп.

Ниже приведен список аминокислот, обычно встречающихся в белках (в этом списке указаны ионные формы, преобладающие в растворах свободных аминокислот в чистой воде).

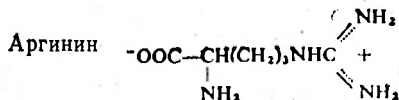
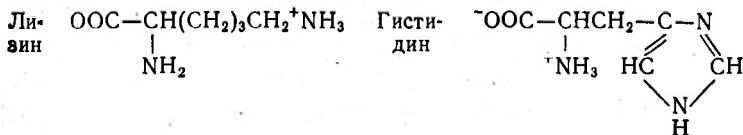
Нейтральные алифатические аминокислоты



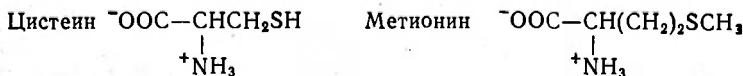
Кислые аминокислоты



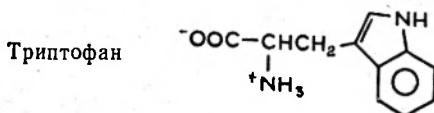
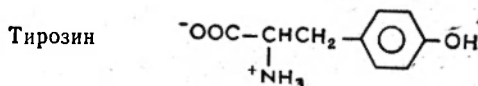
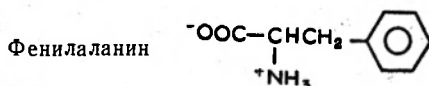
Основные аминокислоты



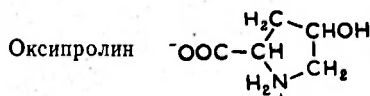
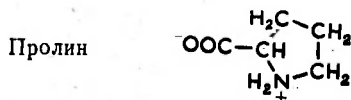
Серусодержащие аминокислоты



Ароматические аминокислоты



Насыщенные гетероциклические аминокислоты



Нейтральные алифатические аминокислотные остатки, не имеющие функциональных групп, не реакционно-способны в обычном смысле слова, но способны к ван-дерваальсовым взаимодействиям с находящимися поблизости другими молекулами или остатками других аминокислот. Помимо того, возможны взаимодействия неполярных групп, возникающие при сближении их в результате выталкивания из водного раствора (так называемые гидрофобные взаимодействия). Остаток глицина обладает некоторыми особыми свойствами, связанными с тем, что у него отсутствует боковая цепь. В частности, в звене, содержащем этот остаток, возможны резкие изгибы полипептидной цепи.

Алифатические остатки, содержащие гидроксильные группы, обладают несколько более специфической реакционной способностью. Алифатический гидроксил может играть роль донора при образовании водородной связи.

Помимо того (гл. VI), некоторые гидроксильные группы остатков серина в некоторых ферментах активно действуют в качестве нуклеофильных агентов.

Кислые аминокислотные остатки при физиологических значениях pH несут единичный отрицательный заряд. Поэтому они могут участвовать в ионных взаимодействиях. Эти остатки определяют отрицательный вклад в общий заряд белковой молекулы. Они могут также участвовать в образовании водородных связей. Неионизированная карбоксильная группа служит хорошим донором водорода, а карбоксилат-ион — хорошим акцептором. Амиды, образуемые этими карбоксилатными группами (остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот), могут участвовать в образовании водородных связей точно так же, как и амидные группы полипептидной цепи. Карбоксилатные группы могут также принимать участие в образовании клешневидных комплексов с ионами металлов, которые нередко прочно связаны с белками.

Основные аминокислотные остатки в их протонированной форме являются катионами. Поэтому они также участвуют в ионных взаимодействиях. Эти остатки определяют положительный вклад в общий заряд белковой молекулы. Гуанидиний-ион аргинина несет особую функцию, образуя стабильную ионную пару с карбоксилат-ионом в неполярных областях белковой структуры. ϵ -Аминогруппа остатка лизина может обратимо реагировать с карбонильными соединениями с выделением воды и образованием основания Шиффа. Кроме того, протонированные атомы азота могут служить донорами, а депротонированные формы остатков лизина — акцепторами в образовании водородной связи, хотя при физиологических значениях pH лишь азот имидазола гистидинового остатка имеет значение как акцептор. Слабоосновное кольцо имидазола характеризуется также и другими свойствами, которые дают основание считать его важнейшим компонентом ферментативных реакций. В своей непротонированной форме имидазольное кольцо гистидина содержит два атома азота с совершенно различными свойствами — один из них является нуклеофильным, а другой — электрофильным. Протонирование приводит к потере нуклеофильной активности. Поскольку

протонирование может происходить при физиологических значениях pH и поскольку в нейтральных растворах даже свободный имидазол обнаруживает некоторые явные каталитические свойства, во многих исследованиях в качестве моделей ферментов изучаются производные имидазола. Соединения имидазолового ряда являются также мощными лигандами при образовании координационных комплексов ионов переходных металлов. Возможно также, что имидазольное кольцо служит акцептором при образовании комплексов с переносом заряда, в которых участвует индольное кольцо триптофана или доноры электронов, отсутствующие в первичной структуре белка.

Серусодержащие аминокислотные остатки имеют важное значение в связи с особыми химическими свойствами серы. Высокая поляризуемость атома серы делает серусодержащие группировки особенно эффективными в реакциях нуклеофильного замещения (в качестве как замещаемых, так и замещающих группировок). Тиоловая группа цистеина является отличным нуклеофильным агентом. Даже тиоэфирная группа метионина обладает нуклеофильными свойствами, о чем свидетельствует ее способность к образованию сульфониевых производных типа S-аденозилметионина. Цистеин легко окисляется в цистин, и эта реакция в белках служит единственным способом образования истинно ковалентной связи между разными полипептидными цепями или между остатками одной цепи. Такие дисульфидные связи при некоторых условиях могут вступать в обменные реакции, в результате которых происходит обмен радикалов, соединенных с атомами серы:



Подобно карбоксилат-ионам и имидазольным группам серусодержащие группы могут образовывать координационные комплексы с ионами металлов. По-видимому, серусодержащие остатки аминокислот мало участвуют в образовании водородных связей между боковыми цепями.

Ароматические остатки составляют весьма неоднородную группу соединений, в которую входят аминокис-

лоты, содержащие бензольное кольцо¹. Все эти остатки способны к вандерваальсовым взаимодействиям и обладают сильно выраженными гидрофобными свойствами. Фенольная группировка остатка тирозина способна, помимо того, участвовать в качестве донора в образовании водородной связи. Индольное кольцо триптофана обладает рядом интересных и совершенно особых свойств. Это единственный остаток в белковой молекуле, способный очень легко вступать в реакцию образования комплекса с переносом заряда в качестве донора. Соединения индола являются очень хорошими донорами электронов при образовании комплексов с переносом заряда с соединениями пиридиния и другими электрофильными соединениями. Остатки триптофана определяют практически всю ультрафиолетовую флуоресценцию белков. Это верно даже в отношении белков, содержащих много тирозина и мало триптофана, хотя остатки тирозина (и в меньшей степени фенилаланина) дают вклад в ультрафиолетовое поглощение белков. Как поглощение, так и флуоресценция остатков триптофана в ультрафиолетовой области весьма чувствительны к изменениям их ближайшего окружения в молекуле белка. Пиррольный азот триптофана может служить донором в некоторых реакциях образования водородной связи.

Важное значение насыщенных гетероциклических остатков пролина и оксипролина обусловлено их стереохимическими свойствами. Полипептидные цепи, содержащие эти циклические вторичные α -аминокислоты, образуют более жесткие структуры, чем цепи, содержащие только первичные α -аминокислоты. Ограниченное участие оксипролина в построении белков (он встречается лишь в белках соединительных тканей, притом в единственной изомерной форме, содержащей гидроксил и карбоксил в *транс*-конфигурации), свидетельствует об особой структурной роли гидроксильной группы этого аминокислотного остатка.

¹ Хотя имидазольное кольцо гистидина также имеет ароматическую структуру, целесообразнее отнести его к классу основных аминокислот, рассмотренному выше.

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Конформация полипептида в растворе частично определяется прямым взаимодействием пептидных групп друг с другом. То обстоятельство, что синтетические полипептиды имеют высокорегулярную, «кристаллическую» структуру, тогда как многие другие полимеры аморфны, т. е. обладают структурой беспорядочного клубка, в принципе свидетельствует о наличии некой «естественной» конформации для полипептидов. Результаты тщательной оценки длины связей и валентных углов, основанной на размерах, установленных для планарных пептидных связей в кристаллах небольших пептидов, существенно ограничили число возможных моделей конформации полипептидов. Дальнейшие ограничения в выборе возможной конформации были связаны с тем, что, согласно исходным предположениям, каждая карбонильная и каждая амидная группа пептида участвует в образовании водородной связи и что конформация полипептида должна соответствовать минимальной энергии вращения вокруг одинарной связи. Этим требованиям для пептидов, в которых имеются внутримолекулярные связи, отвечала правая спираль, содержащая 3,6 аминокислотных остатка на один виток (так называемая α -спираль) [1]. Существование спиральных структур предсказанных размеров в синтетических полипептидах было подтверждено с помощью самых различных физических методов, в том числе и методом рентгеноструктурного анализа. Такая α -спираль, в которой каждая пептидная группа соединена водородной связью с третьей от нее пептидной группой, считается наиболее вероятной моделью отдельных участков остатка молекулы глобулярных белков, к которым относятся и ферменты. Нужно подчеркнуть, однако, что конформация глобулярного белка в целом отличается от простой регулярной α -спиральной структуры из-за наличия в белке дисульфидных связей и остатков пролина, которые нарушают спиральное строение и изменяют ориентацию цепи, а также из-за взаимодействия боковых цепей, ответственного за третичную структуру. Действительно, рентгеноструктурный анализ с высоким разре-

шением не обнаруживает в структуре ферментов большой доли α -спиральных участков [2—8]. Встречающиеся в молекулах спиральные участки перемежаются как с менее регулярными участками, так и с регулярными структурами другого типа, так называемыми складчатыми структурами (ранее считалось, что они встречаются лишь в нерастворимых фибриллярных белках).

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА

Данные о гидродинамических свойствах белков в растворе и оценка размеров элементарной ячейки, полученная с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллических белков, свидетельствуют о компактности и жесткости белковой молекулы. Эти свойства белка нельзя объяснить одной лишь вторичной спиральной структурой, даже если принять во внимание наличие дисульфидных связей и остатков пролина. Легкость, с которой эта компактность может быть нарушена, свидетельствует вместе с тем о том, что структура стабилизирована не ковалентными связями. Стабилизация плотно свернутой третичной структуры глобулярных белков достигается за счет взаимодействия боковых цепей аминокислотных остатков, обладающих указанными выше химическими свойствами. Силы взаимодействия каждая в отдельности не велики: ионное взаимодействие, водородные связи, гидрофобное взаимодействие и вандерваальсовы силы. Но поскольку число этих слабых связей очень велико и все они действуют одновременно по всей свернутой структуре белка, она обладает достаточной устойчивостью при обычной температуре. Оценить относительное значение связей различного типа в поддержании третичной структуры очень трудно и на этот счет еще нет единого мнения.

Такая скрученная, свернутая модель молекулы фермента, какой она представляется на основе приведенных данных, выглядит в какой-то степени хаотичной, неопределенной, за исключением того, что все молекулы, имеющие одинаковую первичную структуру, скручены и свернуты одинаковым образом. Эта общая конформация, которую имеют все молекулы любого конкретного белка, хотя она и является одной из многих возможных

для данного полипептида, тем не менее определяется его первичной структурой. Стабилизация каждой данной третичной структуры осуществляется в результате специфических взаимодействий между специфическими для данного белка аминокислотными остатками, образующими специфическую для данного белка последовательность; например, определенные карбоксилатные группировки соединены водородной связью с определенными остатками тирозина, другие карбоксилатные группы взаимодействуют электростатически с гуанидиновыми группировками определенных остатков аргинина, а какие-то неполярные группировки аминокислотных остатков находятся в тесном контакте вследствие вытесняющего влияния растворителя. Вообще говоря, при изменении аминокислотного состава или последовательности аминокислот в первичной структуре характер названных взаимодействий должен изменяться, а это должно привести к образованию других конформаций белка. Свертывание в определенную конформацию, присущую данной белковой молекуле, вероятно, происходит постепенно, короткими участками, в процессе синтеза белка, поскольку соединенные аминокислотные остатки каждой вновь образованной молекулы белка отделяются от матрицы (информационной рибонуклеиновой кислоты) в строго определенной последовательности.

Благодаря существованию вторичной и третичной структур свойства молекулы фермента существенно отличаются от алгебраической суммы свойств аминокислотных остатков, входящих в ее состав. Некоторые различия, касающиеся гидродинамических и других физических свойств, могут быть качественно предсказаны на основе информации о размерах и форме молекул. Но помимо того, заслуживает внимания и ряд более тонких различий, так как они должны играть важную роль в механизме каталитического действия ферментов.

Каждая молекула фермента в растворе несет некоторый суммарный заряд, от которого в известной степени зависит характер ее взаимодействий с другими макромолекулами; это взаимодействие не может быть точно предсказано на основании первичной структуры. Еще

большее значение для взаимодействия с небольшими молекулами субстратов имеют заряды обоих знаков, локализованные на различных участках поверхности фермента. На этой поверхности могут существовать, помимо того, обширные области скопления неполярных, гидрофобных боковых цепей, а также донорных или акцепторных участков, способных к образованию водородных связей или комплексов с переносом заряда. Химические эффекты, обусловленные этими локализованными факторами, точно так же нельзя вывести ни из первичной структуры, ни из гидродинамических свойств молекул ферментов. Это объясняется двумя особенностями глобулярной структуры белка: а) существованием «поверхности» и «ядра» (внутренней области) молекулы и б) сближением в свернутой структуре группировок, которые в первичной последовательности разобщены.

Кристаллы белков, как и их растворы, содержат воду. Однако даже в кристаллах эта вода находится на поверхности макромолекулярной структуры. Значительная внутренняя область белковой молекулы практически не контактирует с водным раствором и недоступна даже для содержащихся в нем малых молекул. Существование такого недоступного ядра повышает стабильность белковой структуры. Ядро может иметь такую физико-химическую природу, при которой водородные связи, гидрофобные взаимодействия и вообще все типы взаимодействий, стабилизирующих вторичную и третичную структуры, оказываются гораздо более сильными, чем в водном растворе.

Одно из следствий этого факта заключается в том, что многие боковые группы аминокислот могут быть «замаскированы», «спрятаны» в ядре молекулы и благодаря этому недоступны действию обычных химических реагентов, применяемых для их титрования или качественного определения. Маскировка некоторых боковых цепей должна также повлиять и на такие физические свойства белка, как поглощение в ультрафиолетовой области и флуоресценция. Только у полностью развернутой белковой молекулы (при крайних значениях рН, при высокой температуре, в присутствии де-

тергентов или при высокой концентрации мочевины или гуанидина) свойства, обусловленные боковыми цепями, близки к тем, которых можно ожидать на основании аминокислотного состава белка.

То обстоятельство, что при возникновении третичной структуры происходит сближение функциональных групп, пространственно разделенных в первичной последовательности, должно иметь очень большое значение в механизме ферментативного катализа. В частности, область активного центра фермента (участок сорбции субстрата и его химических превращений) образуется функциональными группами, которые в первичной структуре расположены далеко друг от друга, но тесно сближаются при свертывании полипептидной цепи.

Конкретные примеры будут рассмотрены в соответствующих главах книги, но уже сейчас из общих соображений можно заключить, что, например, в той области структуры, где действуют полифункциональные и, следовательно, относительно сильные водородные связи, на поверхности фермента будет создаваться высокая локальная концентрация некоторых группировок. Аналогичным образом в молекуле фермента могут возникнуть области, обладающие относительно высоким сродством к неполярным группировкам, и т. п. Более того, пространственное расположение функциональных групп боковых цепей аминокислот может определять субстратную специфичность фермента, которая предполагает, что различные функциональные группы субстрата реагируют со строго фиксированными в пространстве участками структуры фермента. Наконец, третичная структура определяет возможность кооперативного эффекта другого типа, который состоит в том, что в результате взаимодействия субстрата с одной из группировок фермента облегчается его взаимодействие с другой соответствующим образом расположенной группировкой.

Рентгенограммы кристаллических ферментов, полученные к настоящему времени, ясно демонстрируют все эти возможности, и они заслуживают самого пристального внимания исследователей, пытающихся объяснить каталитические свойства ферментов.

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА

Ассоциация полипептидных цепей в более крупные агрегаты носит название четвертичной структуры. Силы, участвующие в образовании этой структуры, имеют, очевидно, ту же природу, что и силы, вызывающие образование третичной структуры, но они реализуются не во внутримолекулярном, а в межмолекулярном взаимодействии. Подобная ассоциация белковых субъединиц, распространена, по-видимому, очень широко. В ряде случаев она имеет определенное значение для ферментативной активности (например, обеспечивает способность гемоглобина связывать кислород), но точные механизмы этих эффектов до сих пор не ясны. В общих словах, причина образования подобных ассоциатов состоит в том, что в результате экранирования поверхностных гидрофобных участков молекулы стабильность мицеллы увеличивается. Так, две молекулы белка, не имеющие достаточного количества гидрофильных остатков для образования гидрофильного поверхностного слоя вокруг гидрофобного ядра, в водном растворе, где они образуют димер с закрытыми гидрофобными областями, становятся более стабильными.

КОФЕРМЕНТЫ И ПРОСТЕТИЧЕСКИЕ ГРУППЫ

Помимо аминокислот, составляющих основу белковой структуры, многие ферменты для проявления своей активности нуждаются в присутствии небольших количеств других химических компонентов. Эти компоненты — ионы металлов или органические молекулы (иногда также содержащие ионы металлов) — получили наименование *кофакторов*¹. По своей химической природе кофакторы весьма разнообразны и соответственно выполняют самые разнообразные функции в ферментативном

¹ Обычно при классификации принято проводить различие между ионами металлов и органическими кофакторами, но с функциональной точки зрения трудно понять, почему, например, циклическое окисление — восстановление иона меди в аскорбатоксидазе должно относиться к одному классу явлений, а циклическое окисление — восстановление флавина в сукцинатдегидрогеназе — к другому.

катализе. Большинство незаменимых факторов питания, таких, как микроэлементы и водорастворимые витамины, функционирует в организме в форме кофакторов.

Различают два типа кофакторов — *коферменты* и *простетические группы*. Обычно кофактор относят к тому или к другому типу в зависимости от того, насколько легко разрывается его связь с ферментом. Но, по мнению Диксона и Уэбба [9], классификация по этому признаку не слишком удобна. Хотя некоторые простетические группы соединены с ферментом ковалентными связями, встречаются и такие, которые связаны с белком более слабыми связями; и наоборот, при обратимом связывании некоторых коферментов некоторыми ферментами положение равновесия сильно сдвинуто в сторону ассоциации. На самом деле имеется широкий спектр значений «констант связывания», и только при крайних значениях они могут служить строгой основой классификации.

По этим причинам Диксон и Уэбб предложили функциональный способ разграничения простетических групп и коферментов. К простетическим группам они относят кофакторы, связанные в течение всего каталитического цикла с одним и тем же ферментом, а к коферментам — кофакторы, которые в процессе каталитической реакции последовательно связываются с двумя разными ферментами. Иными словами, простетическая группа представляет собой элемент структуры фермента, тогда как кофермент это не что иное, как субстрат с особыми циклическими функциями. Такой функциональный способ разграничения не находится в противоречии с ранее высказанными соображениями, но он проще и яснее с прикладной точки зрения. Этого способа мы и будем придерживаться в дальнейшем.

Совершенно очевидно, что кофактор придает молекуле фермента какое-то особое химическое свойство, которое не может быть обеспечено одними лишь аминокислотными остатками. В ряде случаев вполне ясно, что это за свойство, в других случаях неясно. Ион металла, например, может просто обеспечивать создание катионного центра для образования связи с субстратом анионной структуры или же (или помимо того) участвовать

в циклическом окислительно-восстановительном процессе, т. е. служить переносчиком электронов (такую роль, например, играет медь в аскорбатоксидазе или железосодержащий порфирин в цитохромах). Из органических кофакторов никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и флавины функционируют как окислительно-восстановительные переносчики. Многие другие кофакторы (например, биотин, пуриновые риботиды, кофермент А и пр.) служат переносчиками групп. Липоат несет обе эти функции, так же как и фолиевая кислота (последняя, правда, в несколько ином смысле слова). Пиридоксальфосфат, хотя он и не прямо выполняет функции переносчика групп или окислительно-восстановительные функции, играет важную роль в каталитических процессах, непосредственно участвуя во многих реакциях на стадии расщепления связей. Тиаминпирофосфат, действуя в качестве кофактора, также непосредственно участвует в атаке субстрата, хотя одновременно служит и переносчиком групп.

Эти хорошо установленные функции кофакторов (коферментов и простетических групп) служат очень поучительным примером для дальнейших исследований. Нет сомнений в том, что каталитическая роль отдельных функциональных групп аминокислотных остатков может быть выяснена с той же степенью точности.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Scheraga H. A., Protein Structure, Academic Press, New York, 1961.
- Tanford C., Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, New York, 1961.
- Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. (eds.), The Enzymes, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959. Chapter 10 by K. V. Linderström-Lang and J. A. Schellman.
- Hirs C. H. W., Methods Enzymol., 11, 1967.
- Steiner R. F., The Chemical Foundations of Molecular Biology, Van Nostrand, New York, 1965.
- Neurath H. (ed.), The Proteins, 2nd ed., Academic, New York, 1963. Especially the chapters by H. A. Scheraga in Vol. 1 and J. H. Schellman, C. Schellman in Vol. II.
- Bernhard S. A., The Structure and Function of Enzymes, Benjamin, New York, 1968. (Бернхард С., Структура и функция ферментов, изд-во «Мир», М., 1971.)

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Pauling L., Corey R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **37**, 241 (1951).
2. Blake C. C., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., Nature, **206**, 757 (1965).
3. Kartha G., Bello J., Harker D., Nature, **213**, 862 (1967).
4. Avey H. P., Boles M. O., Carlisle C. H., Evans S. A., Morris S. J., Palmer R. A., Woolhouse B. A., Shall S., Nature, **213**, 557 (1967).
5. Wyckoff H. W., Hardman K. D., Allewell N. M., Inagami T., Tsernoglou D., Johnson L. N., Richards F. M., J. Biol. Chem., **242**, 3749 (1967).
6. Reeke G. R., Hartsuck J. A., Ludwig M. L., Qui-ocho F. A., Steitz T. A., Lipscomb W. N., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **58**, 2220 (1967).
7. Fridborg K., Lilja K. K., Lundin J., Strandberg B., Strandberg R., Tilander B., Wiren G., J. Mol. Biol., **25**, 505 (1967).
8. Mathews B. W., Sigler P. B., Henderson R., Blow D. M., Nature, **214**, 652 (1967).
9. Dixon M., Webb E. C., Enzymes, 2nd ed., Academic, New York, 1964, p. 450. (Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, изд-во «Мир», М., 1966.)

СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

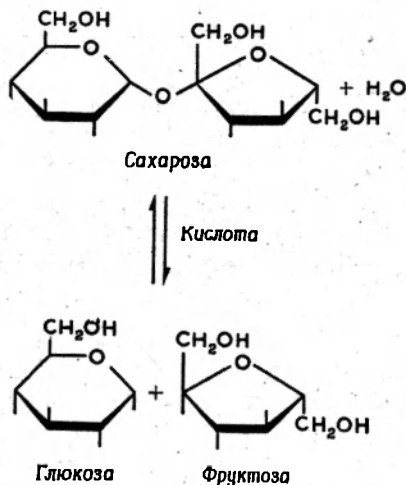
При прямом изучении ферментативного катализа наши возможности обычно ограничены наблюдением суммарной скорости катализируемой реакции. Единственное, что обычно поддается измерению, это концентрация субстрата или продукта реакции через разные промежутки времени после начала реакции. Такие измерения, посредством которых определяется скорость реакции (в идеальном случае текущая скорость), можно выполнить при самых разнообразных экспериментальных условиях и в результате получить информацию о катализируемой реакции. Эта описательная информация составляет «сырье» ферментативной кинетики. Любой постулируемый механизм катализа должен находиться в соответствии с полученными кинетическими данными. В принципе данные ферментативной кинетики полезны тем, что они позволяют исключить из рассмотрения не согласующиеся с ними гипотезы о механизме реакции. На этом основании иногда говорят, что кинетические данные по существу не позволяют ничего доказать; они могут лишь что-то опровергнуть. Следует заметить, что это относится вообще ко всем данным, когда мы пытаемся связать их с механизмом реакции. Любое экспериментальное наблюдение либо соответствует, либо не соответствует постулированному механизму. В первом случае оно ничего «не доказывает»; во втором случае оно решительно опровергает постулированный механизм. Недавние попытки [1, 2] исчерпывающего рассмотрения возможностей кинетики дают надежду, что для многих реакций на основании их кинетического исследования удастся методом исключения окончательно установить их механизм. Как мы увидим далее, по крайней мере в некоторых случаях, это действительно удается сделать.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
КАТАЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Исследование кинетики реакций началось не очень давно. Химическая кинетика насчитывает немногим бо-

лее столетия, ферментативная кинетика — около полу-столетия. Начало плодотворных исследований в области химической кинетики часто относят к 1850 году, когда появилось сообщение Вильгельми [3] о кинетическом изучении гидролиза сахарозы, катализируемого кислотой. Возникновение ферментативной кинетики можно датировать 1902 годом, когда Браун [4] сообщил об исследовании кинетики гидролиза сахарозы, катализируемого ферментом. Краткое рассмотрение гидролиза сахарозы при этих двух условиях освежит в нашей памяти принципы кинетики и в то же время выявит особенности ферментативного катализа.

Гидролиз сахарозы, катализируемый кислотой, протекает по схеме



Вильгельми установил, что скорость уменьшения концентрации сахарозы в присутствии кислоты прямо пропорциональна концентрации сахарозы в каждый данный момент времени. Выражаясь современным языком, мы должны сказать, что эта реакция гидролиза имеет первый порядок по сахарозе. Математически это выражается уравнением

$$-\frac{dA}{dt} = k'A, \quad (1)$$

где A — концентрация сахарозы в момент времени t ; в интегральной форме это уравнение имеет вид

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k't}, \text{ или } \ln \left(\frac{A_0}{A} \right) = k't,$$

где A_0 — концентрация сахарозы при $t = 0$, а k' — коэффициент пропорциональности, называемый кажущейся константой скорости реакции. Эти уравнения, выражающие экспоненциальный характер уменьшения концентрации сахарозы во времени (иными словами, линейный характер изменения логарифма концентрации), довольно хорошо описывают экспериментальные данные Вильгельми.

Необходимо, однако, отметить, следующие два обстоятельства: участие воды в стехиометрическом уравнении реакции и установленное каталитическое действие кислоты. Хотя в стехиометрическом уравнении гидроний-ион отсутствует и скорость реакции, по наблюдениям Вильгельми, зависит лишь от концентрации сахарозы (т. е. суммарно реакция имеет первый порядок), оба упомянутых фактора обязательно должны играть определенную роль. Действительно, Вильгельми установил, что величина константы скорости меняется с изменением кислотности раствора. Используя другие растворители, можно также показать, что константа скорости зависит от концентрации воды. Коротко говоря, на самом деле это реакция третьего порядка и первый порядок она имеет лишь по каждому компоненту в отдельности: сахарозе, гидроний-иону и воде. То обстоятельство, что при обычных экспериментальных условиях она кажется реакцией первого порядка, объясняется двумя причинами. Во-первых, гидроний-ион, являющийся истинным катализатором, в реакции не расходуется и, следовательно, его концентрация остается постоянной. Во-вторых, концентрация воды значительно превосходит концентрацию сахарозы и потому ее убыль в ходе реакции относительно невелика.

Таким образом, правильное дифференциальное уравнение должно было бы описывать реакцию третьего порядка, т. е. иметь вид

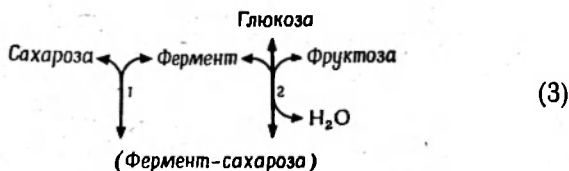
$$-\frac{dA}{dt} = kABC, \quad (2)$$

где B и C — концентрации воды и гидроний-ионов; но так как два последних члена практически постоянны, они входят в кажущуюся константу скорости k' уравнения (1). Константа k в уравнении (2) является истинной константой скорости реакции, и ее величина не зависит от концентраций участвующих в реакции веществ.

Полезно отметить здесь еще одно кинетическое понятие — молекулярность. Мы видели, что суммарное стехиометрическое уравнение реакции, хотя и существенно для понимания процесса, не обязательно отражает участие всех реагирующих веществ. Мы установили далее, что сравнительно поверхностное изучение кинетики процесса также не позволяет нарисовать отчетливую картину механизма реакции. Нас не удивило бы, если бы оказалось, что даже полный анализ суммарной кинетики не дает возможности сформулировать детальный механизм реакции. Так, например, третий порядок реакции гидролиза сахарозы, катализируемой кислотой, может означать обязательное участие всех трех реагирующих веществ в образовании активированного комплекса, который распадается с выделением глюкозы и фруктозы и с регенерацией гидроний-иона. Это была бы тримолекулярная реакция. Однако в равной мере это может означать наличие двух последовательных бимолекулярных реакций, приводящих к тому же результату. Следовательно, молекулярность реакции — это теоретическое понятие, позволяющее детально описать механизм процесса (так как оно характеризует число молекул, участвующих в переходном состоянии), тогда как порядок реакции представляет собой эмпирический и весьма приближенный способ описания процесса.

Укажем еще одно важное обстоятельство: если молекулярность всегда выражается целыми числами, порядок реакции может иметь *любые* значения от нуля и выше. Имеется также много реакций, скорость которых не выражается какой-либо простой зависимостью от концентрации. Таким реакциям, среди которых встречаются и ферментативные, нельзя приписать определенного порядка, но при некоторых особых экспериментальных условиях их можно приближенно охарактеризовать «псевдопорядком».

Ферментативный гидролиз сахарозы существенно отличается от реакции, катализируемой кислотой. В своей классической работе 1902 года Браун [4] показал, что абсолютное количество сахарозы, гидролизуемое в единицу времени, не зависит от начальной концентрации сахарозы. Другими словами, оказалось, что реакция гидролиза имеет нулевой порядок по сахарозе. Интерпретация этого наблюдения, предложенная Брауном, послужила основой практически всех возникших в дальнейшем представлений о механизме действия фермента. Браун предположил, что фермент соединяется с сахарозой в комплекс, который затем расщепляется с образованием продуктов реакции и освобождением фермента. Полученные Брауном экспериментальные данные соответствуют тому, что должно происходить в такой системе, содержащей небольшое количество фермента и избыток сахарозы. Формальный механизм реакции может быть выражен схемой



В подобной системе фермент должен все время циклически участвовать в реакциях. При достаточно высокой концентрации сахарозы скорость реакции 1 будет достаточной для того, чтобы практически весь фермент находился в форме комплекса фермент — сахароза. Это значит, что если реакция 1 протекает достаточно быстро, общая скорость процесса будет определяться скоростью реакции 2 и эта скорость не будет расти при дальнейшем повышении концентрации сахарозы. На основе этих рассуждений Браун предсказал и затем показал экспериментально, что при достаточно низкой концентрации сахарозы поведение системы будет иным. Особенно важно то, что имеется такая область концентраций сахарозы, в которой почти весь фермент на протяжении всей реакции будет находиться в свободном состоянии. В этих условиях суммарная скорость процес-

са определяется в основном реакцией 1 и становится пропорциональной концентрации сахарозы. Иными словами, при достаточно низкой концентрации сахарозы реакция ее ферментативного гидролиза приближается к псевдопервому порядку по сахарозе.

Мы обязаны отдать должное Брауну за его четкую формулировку существования фермент-субстратного комплекса и кинетических следствий из этого предположения. Как отмечал сам Браун, основная идея в неявной форме уже содержалась в предшествующих работах других исследователей; но именно в его работах она впервые была наиболее отчетливо сформулирована и ярко осветила главный принцип ферментативного катализа.

Годом позже после появления статьи Брауна Виктор Анри [5] опубликовал работу, в которой были приведены уравнения, описывающие ход ферментативной реакции во времени; в этих уравнениях были учтены уменьшение концентрации субстрата и увеличение концентрации продукта реакции как факторы, влияющие на скорость реакции. Уравнение, учитывающее изменение концентрации только одного субстрата, имело вид

$$\frac{X}{t} = V + \frac{K_m}{t} \ln \frac{A_0 - X}{A_0}, \quad (4)$$

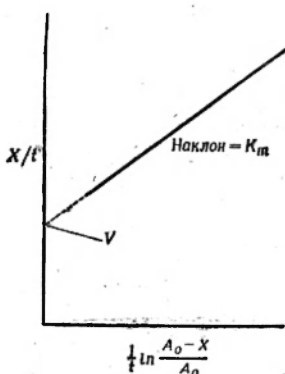
где A_0 — концентрация субстрата при $t = 0$; X — убыль концентрации субстрата вследствие образования продукта реакции; V — теоретическая предельная скорость при бесконечной концентрации субстрата; K_m — константа, характеризующая фермент и реакцию систему.

Согласно этому уравнению, зависимость X/t от $(1/t) \ln [(A_0 - X)/A_0]$ должна выражаться графически прямой с наклоном, равным K_m , отсекающей на оси ординат отрезок, равный V (фиг. 1). Выражая экспериментальные данные для любой реакции в такой форме, можно установить, насколько применимо к ней уравнение Анри.

Следует заметить, однако, что при использовании этого критерия кинетика ферментативной реакции, сопровождающейся ингибированием фермента продуктом

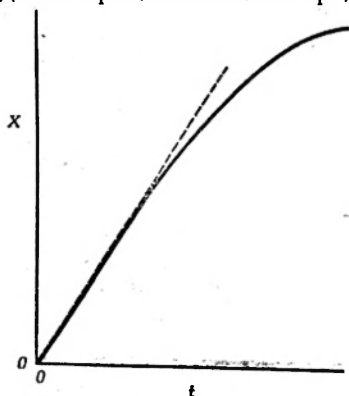
реакции, не будет отличаться от «нормальной», неингибированной (это также показал Анри). Графически зависимость будет выглядеть точно так же, однако определяемые константы будут иметь другой смысл.

В связи с возможностью ингибирующего действия продуктов реакции, а также частичной денатурации фермента при длительном проведении процесса обычно пред-



Фиг. 1. Графическое представление интегрального уравнения Анри (уравнение 4).

X — концентрация продукта реакции; A_0 — начальная концентрация субстрата; t — время; K_m и V — кинетические константы процесса.



Фиг. 2. Ход ферментативной реакции во времени.

Сплошная линия — накопление продукта в ходе реакции. Наклон пунктирной линии — начальная скорость реакции v_0 .

почитают изучать кинетику, измеряя начальную скорость реакции (v_0). Ее можно определить, измеряя, как меняется концентрация субстрата или продукта в начальном периоде реакции (фиг. 2). Полученная величина точно выражает скорость реакции для данных концентраций фермента и субстрата при концентрации продукта, равной нулю.

Измеряя таким образом начальную скорость реакции при различных начальных концентрациях субстрата (A_0), можно получить истинную зависимость v_0 от A . Для анализа такой зависимости удобнее пользоваться уравнением Анри в дифференциальной форме

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{dX}{dt} = v_0 = \frac{VA_0}{K_m + A_0} \quad (5)$$

Если это уравнение записать в форме

$$(V - v_0)(K_m + A_0) = VK_m,$$

то видно, что зависимость v_0 от A имеет вид равнобочной гиперболы, для которой V и $-K_m$ являются асимптотами (фиг. 3).

В связи с этим соотношением следует отметить два момента. Во-первых, оно полностью согласуется с представлениями Брауна: кинетика процесса соответствует псевдопервому порядку реакции при низких концентрациях субстрата и псевдонулевому порядку при высоких его концентрациях. Во-вторых, почти все исследованные ферментативные реакции подчиняются кинетическим закономерностям такого типа¹.

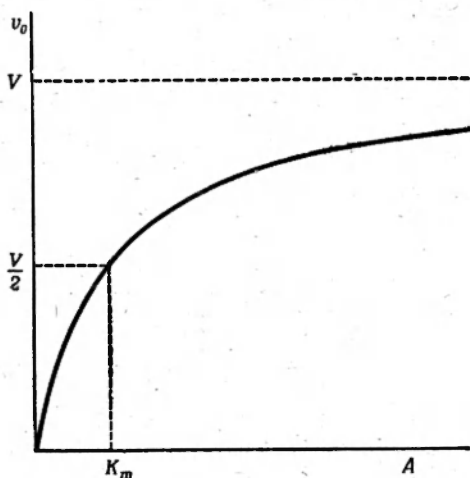
ВЫВОД УРАВНЕНИЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ НА ОСНОВЕ ПРОСТЫХ МОДЕЛЕЙ

Каждому формальному механизму реакции соответствует определенное кинетическое поведение системы. Вывод кинетических уравнений, количественно описывающих это поведение, позволяет сопоставить постулированный механизм исследуемой реакции с экспериментальными данными.

Вывод уравнений химической кинетики состоит обычно из трех этапов.

А. Выписываются уравнения, выражающие взаимозависимость изменений концентраций всех реагирующих веществ, промежуточных и конечных продуктов реакции и устанавливающие все формы, в которых указанные вещества присутствуют в постулируемом механизме. Иными словами, механизм реакции выражается с помощью математических символов.

¹ Гиперболический характер рассматриваемой зависимости имеет значение также и для практики. В частности, поскольку для определения содержания фермента в препарате обычно используют субстрат в высокой концентрации, на результаты не влияют небольшие ошибки при отмеривании раствора субстрата, а также случайное присутствие ингибиторов данного фермента. Действительно, начальная скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента при любой концентрации субстрата, за исключением крайнего случая, когда молярные концентрации субстрата и фермента по порядку величины близки.



Фиг. 3. Графическое представление дифференциального уравнения Анри (уравнение 5).

v_0 — начальная скорость; A — концентрация субстрата. При $A \leq 9K_m$ начальная скорость $v_0 \leq 0,9V$.

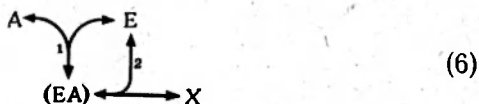
Б. Одно (или несколько) из этих уравнений содержит суммарную скорость реакции. Это дифференциальное уравнение преобразуется в уравнение, выражающее суммарную скорость через концентрации тех веществ, которые могут быть экспериментально измерены.

В. Полученное уравнение интегрируют и получают выражение для зависимости концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции от времени.

Такой способ вывода уравнения предпочтителен потому, что первичные экспериментальные данные, получаемые для реальной системы, с которой сравнивается постулируемая модель, выражаются через указанные здесь параметры. Следует напомнить, однако, что при исследовании кинетики ферментов ингибирование продуктами реакции и нестабильность ферментов вынуждают пользоваться непосредственно дифференциальным уравнением и определять начальные скорости реакции при различных концентрациях субстрата. По этой причине третий этап вывода уравнения — интегрирование — производится не всегда.

Степень сложности, с которой приходится сталкиваться при выводе кинетических уравнений, отражает в известной мере степень сложности того механизма, к которому относятся эти уравнения. Для простой мономолекулярной реакции, как было показано, необходимо выписать лишь одно дифференциальное уравнение — $(dA/dt) = kA$, что не требует сложных выкладок. Это уравнение может быть использовано для экспериментальной проверки непосредственно. Для этого даже не обязательно (хотя это и удобно) интегрировать его, чтобы перевести в экспоненциальную или логарифмическую форму. Напротив, даже простейшей из всех возможных моделей ферментативной реакции соответствует столь сложная кинетика, что строгое общее решение кинетического уравнения оказывается невозможным. Иными словами, вывод пригодного для проверки уравнения даже в случае простейшего из мыслимых механизмов требует дальнейших упрощающих предположений. Выбор наилучшего для этих целей приближения — источник главных трудностей в кинетическом анализе механизмов ферментативных реакций.

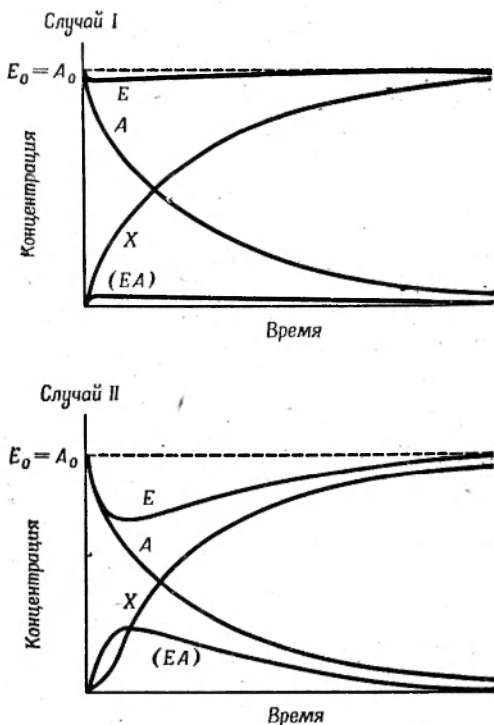
Для иллюстрации этих трудностей рассмотрим следующий простой механизм:



где E — фермент, A и X — субстрат и продукт, а (EA) — фермент-субстратный комплекс. Двусторонние стрелки выражают обратимость процесса; реакции пронумерованы в прямой последовательности. Очевидно, что эта модель представляет собой простое обобщение предположения Брауна о механизме ферментативного гидролиза сахарозы и, следовательно, является вполне реалистичной простой моделью¹.

¹ Установлено, что для некоторых ферментативных реакций, в которых участвуют два субстрата, вполне можно пользоваться моделью односубстратной реакции. Выведенные для этой модели уравнения можно применять и в более сложных случаях, если, скажем, поддерживать концентрацию одного из субстратов постоянной. Кинетика двухсубстратных реакций рассматривается в гл. IX.

Рассмотрим, как меняются во времени концентрации веществ, участвующих в реакции (6). Введем временно два упрощения: 1) суммарная реакция необратима и



Фиг. 4. Гипотетический ход ферментативной реакции во времени. Обозначения те же, что в уравнении (6). Начальные молярные концентрации фермента и субстрата приняты равными. Объяснение см. в тексте.

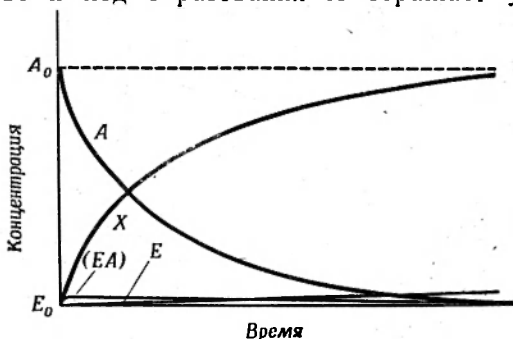
2) в реакцию вводятся эквимольные количества E и A . Мыслимы два случая:

I. Скорость реакции 1 значительно меньше, чем скорость реакции 2.

II. Обе скорости соизмеримы.

Результаты рассмотрения кинетики для случаев I и II представлены на фиг. 4. Концентрация субстрата изменяется в обоих случаях одинаково, и кривые E и (EA)

в обоих случаях являются зеркальным отражением одна другой. Различие состоит в том, что (EA) достигает разных максимумов и, кроме того, в случае II появляется заметный лаг-период в росте концентрации продукта. В обоих случаях сразу после смешения E и A образуется некоторое количество комплекса (EA) , но в случае I этот комплекс не может накапливаться в значительном количестве и ход образования X отражает убыль A .



Фиг. 5. Ход ферментативной реакции во времени при условии, что концентрация субстрата значительно превышает концентрацию фермента.

Обозначения те же, что и на фиг. 4.

В случае же II накапливается некоторое количество (EA) в системе, зависящее от соотношения констант скорости реакций 1 и 2; при этом в течение некоторого промежутка времени, называемого переходной стадией, скорость образования продукта X замедлена.

Оставим теперь предположение, что E и A смешиваются в эквимольных количествах, и рассмотрим, что происходит в реальных условиях эксперимента, когда начальная концентрация субстрата (A_0) намного больше, чем концентрация фермента (E_0). Графически кинетические данные для этого случая представлены на фиг. 5. В избранном масштабе величина E_0 очень мала, а концентрация комплекса (EA) во всяком случае не может быть больше E_0 . Переходная стадия по кривой X не обнаруживается. Короче говоря, если не применять специальную точную экспериментальную технику для выявления переходной стадии, кинетическая картина в

обоих случаях будет такой же, как в случае I, рассмотренном выше (фиг. 4). Изменения концентраций E и (EA) просто не будет заметно при масштабе, избранном для наблюдения изменений концентрации субстрата и продукта.

Наконец, оставим последнее упрощающее предположение о необратимости суммарной реакции. Тогда A будет приближаться к какой-то величине, отличной от нуля, а X — к какой-то величине, отличной от A_0 . Но все остальные изложенные выше рассуждения сохраняют свою силу. Более того, проблему обратимости суммарной реакции можно обойти экспериментально, пользуясь измерением начальных скоростей. Тогда основное внимание будет сконцентрировано на самой ранней стадии реакции, когда продукт еще не успел накопиться и реакция 2 может считаться практически необратимой. Начальную скорость реакции следует измерять при различных концентрациях субстрата и полученные результаты сопоставлять с дифференциальной, а не с интегральной формой кинетического уравнения для данной модели. Эти соображения позволяют проверить соответствие предполагаемой модели экспериментальным данным, не вводя никаких упрощений, а непосредственно исходя из поведения системы в случае I. Необходимо только работать с молярными концентрациями субстрата, значительно превосходящими концентрацию фермента, и использовать для кинетического анализа начальные скорости реакции. Теперь остается вывести уравнение, выражающее зависимость начальной скорости (v_0) от A для данной модели. Вообще говоря, согласно закону действия масс

$$v = \frac{dX}{dt} = - \frac{dA}{dt} = k_{+2}(EA) - k_{-2}XE, \quad (7)$$

где k_{+2} и k_{-2} — константы скорости реакции 2 в прямом и обратном направлении, а прописные буквы — концентрации соответствующих реагентов. Поскольку нас интересует начальная скорость, т. е. условия, когда $X = 0$, последний член уравнения (7) можно приравнять к нулю, и тогда

$$v_0 = k_{+2}(EA). \quad (8)$$

Очевидно, что это уравнение должно при всех условиях выражать начальную скорость суммарной реакции для рассматриваемой модели. Нужно заметить, что уравнение (8) выражает предельную максимальную скорость реакции при достаточно высокой концентрации субстрата, когда (EA) приближается к E_0 . В этих условиях

$$v_0 - k_{+2}E_0 = V, \quad (9)$$

где V — предельная, или максимальная скорость реакции.

Однако выведенное уравнение недостаточно для кинетического анализа процесса. Прямое определение (EA) практически невозможно. Отсюда возникает необходимость выразить (EA) как функцию A . Дифференциальное уравнение, выражающее изменение (EA) во времени, может быть записано аналогично уравнению (7):

$$\frac{d(EA)}{dt} = k_{+1}AE - k_{-1}(EA) - k_{+2}(EA). \quad (10)$$

Из этого уравнения можно исключить E , воспользовавшись уравнением постоянства суммы всех форм фермента

$$E_0 = E + (EA),$$

где E — концентрация свободного фермента.

Для того чтобы иметь в уравнении лишь величины, которые могут быть измерены экспериментально, заменим E на $E_0 - (EA)$, полагая E_0 известной величиной. Для A это не имеет значения, поскольку для начальных условий, когда $A_0 \gg E_0$ и лишь минимальная доля A расходуется на образование (EA) , величину A можно с хорошим приближением считать равной A_0 . Тогда уравнение принимает вид

$$\frac{d(EA)}{dt} = k_{+1}A_0[E_0 - (EA)] - k_{-1}(EA) - k_{+2}(EA). \quad (11)$$

Вывод был бы завершен, если бы удалось решить уравнение (11) и получить выражение для (EA) , в которые входили бы только A_0 , E_0 и константы скоростей. К сожалению, строго это сделать невозможно, и чтобы достигнуть цели, приходится ввести некоторые упрощения.

Были сделаны три различных упрощающих предположения:

1. Анри [5] и позже Михаэлис и Ментен [6] предположили, что k_{+2} значительно меньше k_{-1} . т. е. что реакция 1 уравнения (6) достигает равновесия.

2. Ван-Слайк и Каллен [7] предположили, что k_{+2} значительно больше k_{-1} . т. е. что реакция 1 необратима.

3. Бриггс и Холдейн [8] предположили, что скорость изменения (EA) пренебрежимо мала по сравнению со скоростью изменения A или X , которые измеряются в данной системе, т. е. что (EA) находится в «стационарном состоянии», или, иными словами.

$$\frac{d(EA)}{dt} \approx 0.$$

Мы не будем рассматривать здесь решения уравнений на основе упрощений Анри — Михаэлиса — Ментен и Ван-Слайка — Каллена. В настоящее время накопилось много данных, свидетельствующих о том, что эти упрощения не соответствуют экспериментальным данным. Относительные значения индивидуальных констант скоростей в ферментативных реакциях различаются не столь сильно. Как следует из фиг. 5 и из высказанных выше соображений, предположение о стационарности процесса служит более надежной базой развития ферментативной кинетики¹.

В предположении стационарности уравнение (11) принимает следующий вид:

$$\frac{d(EA)}{dt} = k_{+1}A_0[E_0 - (EA)] - k_{-1}(EA) - k_{+2}(EA) = 0.$$

Это уравнение может быть решено. Преобразовав его к виду

$$(EA)(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}A_0) = k_{+1}E_0A_0, \quad (12)$$

получаем

$$(EA) = \frac{k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}A_0} E_0A_0. \quad (13)$$

¹ Уолтер и Моралес [9], Уолтер [10] и Уонг [11] недавно проверяли эту гипотезу с помощью прецизионной техники и установили ее правильность для обычных экспериментальных условий. Мы еще вернемся к этому вопросу в конце главы.

Если ввести обозначение

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}},$$

то уравнение (13) примет вид

$$(EA) = \frac{E_0 A_0}{K_m + A_0}. \quad (14)$$

Таким образом, мы выразили (EA) через A_0 , E_0 и константы скорости. Из уравнения (8) следует тогда, что

$$v_0 = \frac{k_{+2} A_0 E_0}{K_m + A_0}; \quad (15)$$

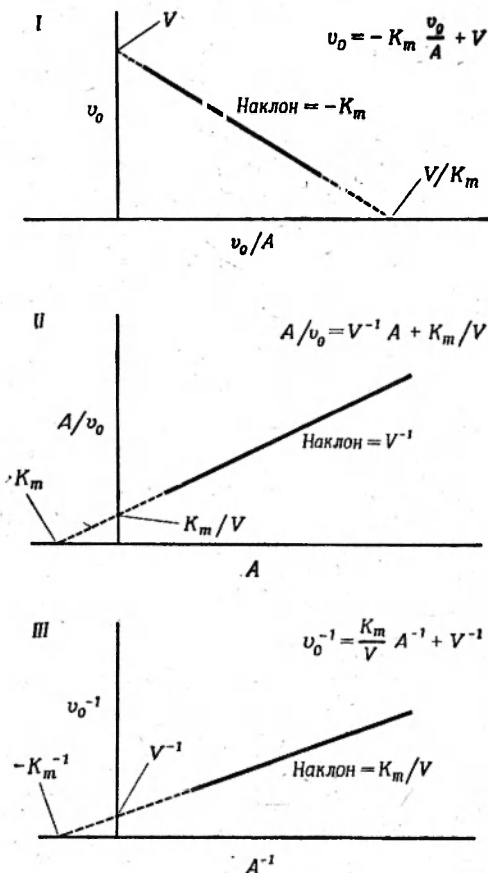
если, наконец, учесть уравнение (9), то окончательно получаем

$$v_0 = \frac{V A_0}{K_m + A_0}. \quad (16)$$

Заметим, что если $A_0 = K_m$, то $v_0 = V/2$. На этом основании K_m можно определить экспериментально как такую концентрацию субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной. Интересно также, что K_m не зависит от концентрации фермента.

Как можно проверить применимость уравнения (16), выведенного на основе концепции стационарности, к анализу конкретных ферментативных реакций? Это было сделано много раз как до, так и после вывода самого уравнения. Оно идентично уравнению (5) Анри, приведенному в предыдущем разделе этой главы.

Нужно заметить, что уравнение (16), являясь уравнением равнобочной гиперболы, с помощью алгебраических преобразований может быть линеаризовано. Использование линейных графиков удобно для оценки максимальных скоростей реакций и значений константы Михаэлиса (K_m), а также для изучения разброса экспериментальных точек относительно прямой, который может свидетельствовать либо об экспериментальных ошибках, либо о каких-то неучтенных особенностях механизма реакции. На фиг. 6 представлены три формы линейного преобразования уравнения (16) и соответствующие линейные графики с указанием значений наклона прямых и отсекаемых на осях координат от-



Фиг. 6. Три формы линейного преобразования уравнения (16).

резков. Вопрос о том, какая из этих форм наиболее удобна практически, до сих пор дискутируется [12—21], так как каждая из них имеет свои преимущества и недостатки; частично выбор той или иной формы зависит от конкретной цели эксперимента. Вероятно, большинство энзимологов используют все три способа, чтобы получить все доступные возможности анализа.

Графическое представление и оценку кинетических коэффициентов с доверительными границами лучше всего осуществлять с помощью статистических методов, но прямое использование метода наименьших квадратов для одной из форм преобразованного уравнения в этом случае не годится, так как при обращении происходит искажение ошибок [22, 23]. Обрабатывать данные таким образом *можно* лишь при условии подходящего взвешивания ошибок, а лучше всего пользоваться методами итеративного приближения с помощью равнобочной гиперболы. Клеланд [24] рассмотрел необходимые для этого условия и разработал программы для вычислительных машин, предусматривающие все наиболее часто встречающиеся случаи.

Следует особо подчеркнуть, что совпадение уравнений (5) и (16) *не указывает* на то, что механизм действия ферментов соответствует тому механизму, для которого выведено уравнение (16). С этой точки зрения поучительно заметить, что уравнение точно того же вида может быть получено для механизмов, подчиняющихся ограничениям, которые постулировали Анри и Михаэлис и Ментен или Ван-Слайк и Каллен. Отличие будет состоять лишь в том, что смысл констант будет иным; при этом очевидно, что константы, выведенные для стационарного механизма (например, $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$), могут найти наиболее широкое применение. Совпадение уравнений (5) и (16) *действительно* указывает лишь на одно — что принятый нами механизм, *быть может*, верно описывает ферментативный катализ. Для того чтобы подтвердить большую достоверность данного механизма по сравнению с другими, необходимо найти какие-то иные методы анализа.

Много обсуждались разнообразные механизмы действия ферментов, принципиально отличные от описанных выше, в том числе механизм типа цепной реакции и механизм «действия на расстоянии»; но в настоящее время полагают, что они не применимы к ферментативному катализу. В основе современных идей в этой области лежат три главных факта: 1) прямое доказательство существования фермент-субстратных промежуточных комплексов, 2) плодотворность представления о фермент-

субстратных комплексах для понимания действия ингибиторов и 3) поразительно строгая субстратная специфичность ферментов.

ОБОСНОВАННОСТЬ ГИПОТЕЗЫ СТАЦИОНАРНОСТИ

Предпринимались многочисленные попытки решить уравнение скорости ферментативной реакции с большей степенью приближения, чем это позволяет гипотеза стационарности. Как будет показано в гл. XI, ход ферментативной реакции в целом обычно хорошо описывается функцией, состоящей из двух частей: в течение большей части времени кинетика реакции определяется соотношением стационарности, а кинетика предстационарной стадии процесса определяется другой функцией, описывающей образование фермент-субстратного комплекса [25].

Хирон и др. [26] рассмотрел эту проблему более подробно. Хоммс [27], Уолтер и Моралес [9] и Уолтер [10] для проверки этих подходов к проблеме применили вычислительную технику, пытаясь ответить на вопрос, является ли гипотеза стационарности адекватным приближением для большинства практических целей. Результаты этих исследований с несомненностью показали, что гипотеза стационарности теоретически несовершенна и, пользуясь ею, неискушенный исследователь может быть введен в заблуждение. Действительно, по данным Уолтера [10], ошибки для очень малых отношений констант скорости прямой и обратной бимолекулярных реакций (особенно в некоторых двухсубстратных ферментативных процессах) оказываются очень большими. При тщательном рассмотрении, однако, эти данные не столь уж разочаровывают. Ведь Уолтер намеренно брал отношение концентраций субстрата и фермента очень низким (сравнительно с обычными условиями эксперимента), чтобы сделать более очевидными теоретические выводы; с увеличением этого отношения погрешность, к которой приводит предположение о стационарности, значительно уменьшается. Практически это делает вполне оправданным использование гипотезы стационарности при соблюдении обычных условий эксперимента. Тем не менее

всем, занимающимся кинетическими исследованиями, нужно помнить: если нет уверенности в том, что бимолекулярная константа скорости обратной реакции не превосходит константу скорости прямой реакции, отношение A_0/E_0 должно быть большим (предпочтительно 10^4 или более).

Уонг [11] недавно также рассмотрел вопросы, связанные с математическим описанием кинетики ферментативных реакций, обратив особое внимание на гипотезу стационарности. Он отмечает, что существенным условием применимости гипотезы стационарности является быстрое образование фермент-субстратного комплекса — условие, которое, несомненно, выполняется при достаточно большом избытке субстрата по отношению к ферменту. Практический вывод, к которому он приходит (распространяя его и на двухсубстратные реакции), состоит в том, что принцип стационарности может быть использован в условиях, обеспечивающих линейную зависимость v_0 от E_0 .

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Frost A. A., Pearson R. C., Kinetics and Mechanism, Wiley, New York, 1961.
Laidler K. J., The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Oxford, London, 1958.
Dixon M., Webb E. C., Enzymes, 2nd ed., Academic, New York, 1964. (Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, изд-во «Мир», М., 1966.)
Reiner J. M., Behavior of Enzyme Systems, Burgess, Minneapolis, 1959.
Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. (eds.), The Enzymes, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959.
Walter C., Steady-State Applications in Enzyme Kinetics, The Ronald Press, New York, 1965.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Wong J. T., Hanes C. S., Canad. J. Biochem. Physiol., 40, 763 (1962).
2. Cleland W. W., Biochim. et Biophys. Acta, 67, 104 (1963).
3. Wilhelmly L., Ann. Physik. Chemie (Poggendorf), 81, 413, 499 (1850).
4. Brown A. J., J. Chem. Soc., 81, 373 (1902).
5. Henri V., Lois Générales de l'action des diastases, Hermann, Paris, 1903.

6. Michaelis L., Menten M. L., *Biochem. Z.*, **49**, 333 (1913).
7. Van Slyke D. D., Cuilen G. E., *J. Biol. Chem.*, **19**, 141 (1914).
8. Briggs G. E., Haldane J. B. S., *Biochem. J.*, **19**, 338 (1925).
9. Walter C., Morales M., *J. Biol. Chem.*, **239**, 1277 (1964).
10. Walter C., *J. Theoret. Biol.*, **11**, 181 (1966).
11. Wong J. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1788 (1965).
12. Eadie G. S., *J. Biol. Chem.*, **146**, 85 (1942).
13. Hofstee B. H. J., *Science*, **116**, 329 (1952).
14. Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958, p. 65.
15. Hofstee B. N. J., *Nature*, **184**, 1296 (1959).
16. Dixon M., Webb E. C., *Nature*, **184**, 1298 (1959).
17. Hofstee B. H. J., *Science*, **131**, 39 (1960).
18. Wiegand J. H., *Science*, **131**, 1068 (1960).
19. Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, 2nd ed., Academic, New York, 1964, p. 70. (Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, изд-во «Мир», 1966.)
20. Coleman M. H., *Nature*, **205**, 798 (1965).
21. Dowd J. E., Riggs D. S., *J. Biol. Chem.*, **240**, 863 (1965).
22. Wilkinson G. N., *Biochem. J.*, **80**, 324 (1961).
23. Johansen G., Lumry R., *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **32**, 185 (1961).
24. Cleland W. W., *Advan. Enzymol.*, **29**, 1 (1967).
25. Roughton F. J., *Discussions Faraday Soc.*, **17**, 116 (1954).
26. Hearon J., Bernhard S., Friess S., Botts D., Morales M., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959.
27. Hommes F. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 28 (1962).

ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Для современных энзимологов существование фермент-субстратных комплексов — почти аксиома. В настоящее время накопилось огромное множество кинетических и других данных, подтверждающих образование таких комплексов в ходе ферментативных реакций, причем многие из них очень трудно объяснить каким-либо иным образом. Наиболее убедительны с этой точки зрения многочисленные прямые наблюдения образования соединений фермента с субстратом. Первое из них — наблюдение осаждения папаина его субстратом фибрином [1] — относится к 1880 году; последние известные нам работы такого рода — исследования кристаллического фермент-субстратного комплекса оксидазы D-аминокислот с помощью оптических методов и метода ЭПР [2—5]. Классическими примерами служат гемопротеиды — пероксидаза и каталаза [6, 7], для которых образование промежуточных комплексов было доказано с помощью прямых спектроскопических методов более 30 лет назад [8, 9]. Позднее прямые доказательства образования подобных комплексов были получены с помощью самых разнообразных методов при исследовании гидролитических ферментов [10—14], альдолаз [15, 16], ряда дегидрогеназ [17—21] и тиотрансферазы роданезы [22, 23].

Во многих твердо установленных случаях, однако, оказалось, что промежуточное соединение фермента представляет собой не истинный комплекс типа аддукта, как подразумевалось при выводе кинетических уравнений, а соединение ковалентного типа, образующееся при взаимодействии фермента с химически измененным, а не с исходным субстратом. Многие исследователи не обращают достаточного внимания на такую возможность, сообщая о данных, указывающих на образование фермент-субстратных соединений. Но по крайней мере в некоторых случаях имеются четкие доказательства образования истинных простых комплексов между

ферментом и неизменным субстратом, и в настоящее время представление о фермент-субстратных комплексах прочно утвердилось в качестве полезного способа описания ферментативных реакций.

Важную роль в образовании комплекса играет диффузионное сближение фермента и субстрата, определяющее частоту соударений реагирующих частиц. Доля продуктивных соударений, ведущих к взаимодействию, зависит от ориентации сталкивающихся молекул и других факторов, которые будут рассмотрены ниже. Весьма вероятно, что при взаимодействии образуются несколько изомерных фермент-субстратных комплексов.

Имеется ряд данных, позволяющих предполагать, что более глубокий анализ проблемы выявит весьма сложное строение этих кинетически постулируемых комплексов и покажет, что каждому из них соответствует набор (или сомножество) электронных состояний и, возможно, даже несколько химически различимых форм. Эти уточнения, однако, нисколько не обесценивают представление о комплексах как таковом и основанные на нем кинетические выводы.

Ниже будут рассмотрены типы связей, которые могут участвовать в образовании фермент-субстратных комплексов, и приведены некоторые прямые доказательства существования простых аддитивных фермент-субстратных комплексов.

СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ С ДРУГИМИ МОЛЕКУЛАМИ

При образовании фермент-субстратных комплексов связывание реагирующих молекул должно осуществляться за счет слабых сил. Более того, поскольку продукты ферментативной реакции, как правило, по своей структуре подобны субстратам и, кроме того, должны удаляться с поверхности фермента в ходе реакции, образование комплекса должно быть легко обратимым процессом. Основываясь на этих соображениях, а также на известных свойствах белков, можно попытаться, исходя из химической природы субстрата, оценить возможные механизмы его взаимодействия с ферментом. Так, образование комплексов с субстратами белковой природы

должно происходить за счет тех же множественных сил, которые ответственны за стабилизацию третичной и четвертичной структуры белков. И лишь для субстратов значительно меньшего молекулярного веса могут оказаться успешными попытки оценить индивидуальные силы связывания в «чистом виде». Связывание белками различных небольших молекул, например неорганических ионов и некоторых ароматических структур, изучалось совершенно независимо от развития проблем ферментативного катализа. Но при этом были получены результаты, имеющие важнейшее значение для понимания механизма образования фермент-субстратных комплексов.

Небольшие ионы реагируют с белками независимо от суммарного заряда белковой молекулы. Например, в условиях, когда рН белкового раствора имеет значения, при которых суммарный заряд белка отрицателен (т. е. в щелочной зоне от изоэлектрической точки), белок все же сохраняет способность связывать небольшие анионы. Белки способны связывать (и обычно связывают) катионы и анионы при всех значениях рН, совместимых с сохранением ферментативной активности. Более того, это связывание носит главным образом ионный характер. Объяснение заключается в относительных размерах белков и ионов: маленький ион может «видеть» одновременно лишь малую часть значительно большей по размеру белковой структуры. Таким образом, ионные взаимодействия (как и другие виды взаимодействия небольших молекул с белками) строго локализованы на небольших участках поверхности белковой молекулы. Приведенные соображения отнюдь не тривиальны, так как, во-первых, многие субстраты представляют собой небольшие ионы и, во-вторых, ионным взаимодействиям свойственны одновременно и прочность, и обратимость, столь необходимые для образования фермент-субстратного комплекса.

Связывание любых небольших молекул белками характеризуется высокой степенью специфичности и даже стереоспецифичности. Что касается ионов, то частично эта специфичность объясняется просто ионообменными свойствами белковой молекулы, которая легче связы-

вают ионы с большим зарядом или (при равном заряде) с меньшим диаметром в гидратированном состоянии. Но даже при связывании ионов мы встречаемся со специфичностью, в основе которой лежит другой фактор — сближение определенных функциональных групп боковых цепей белковой структуры. Примером такого рода служит образование в белке хелатирующих областей, обладающих селективностью связывания ионов, в основе которой лежит различие в геометрии координационных связей. Принцип образования хелатирующей области легко расширить, введя понятие о такой же по сложности строения области, характеризующейся относительно высокой степенью специфичности на основе полиденатного связывания. Например; область поверхности белка, содержащая катионную ϵ -аммониевую группировку лизина по соседству со скоплением неполярных боковых цепей, могла бы селективно связывать анионы жирных кислот. Можно себе также представить такие области, которые бы избирательно связывали один из энантиоморфных изомеров. Это могло бы иметь место, если бы связывание субстрата происходило в трех точках или было двухточечным, но при этом существовало бы какое-то стерическое препятствие (гл. V).

До сих пор мы рассматривали в основном ион-ионные взаимодействия, так как их механизм хорошо выяснен и так как почти во всех постулируемых механизмах ферментативного катализа предполагается их участие. Однако это не исключает участия и других сил. Действительно, все силы, участвующие в формировании третичной и четвертичной структуры белка, могут играть важную роль в образовании комплексов белков с небольшими молекулами по отдельности или совместно. Мы уже упоминали о возможности гидрофобного связывания и прямого взаимодействия с участием лондоновских дисперсионных сил, которые совместно могут приводить к «растворению» всей или части структуры неполярной молекулы субстрата в неполярной области поверхности фермента. Возможно также, что важную роль играют водородные связи, особенно полифункциональные или образующиеся одновременно со связями других типов.

Помимо сил, обуславливающих взаимодействия белок — белок, при образовании некоторых комплексов важную роль играют, вероятно, и другие силы. Скорее всего существенное значение имеют ион-дипольные взаимодействия, в том числе взаимодействия индуцированных диполей, поскольку субстраты часто содержат легко поляризуемые группировки. В ряде случаев возможны взаимодействия с переносом заряда, так как некоторые субстраты, в том числе коферменты, являются хорошими акцепторами при образовании комплексов с переносом заряда.

При оценке всех этих взаимодействий необходимо принимать во внимание ограничения, накладываемые стерическими факторами, к которым относятся допустимые углы между связями и взаимное отталкивание ван-дерваальсовых оболочек, возникающее при тесном сближении атомных электронных облаков. Наконец, необходимо учитывать влияние растворителя на энергетические изменения, сопровождающие связывание. В водных растворах ионы и диполи оказывают поляризующее влияние на молекулы воды. Некоторые из таких молекул воды довольно прочно связываются с ионами или диполями, в результате чего наблюдается уменьшение относительного удельного объема воды (так называемая электрострикция). При взаимодействии ионов противоположных зарядов с образованием нейтральной молекулы освобождается значительное количество молекул воды, которые раньше были определенным образом ориентированы. Термодинамически это проявляется в увеличении энтропии. Напротив, когда соединяются ионы одинакового знака с образованием нового иона, несущего больший заряд, эффект электрострикции оказывается столь большим, что в итоге наблюдается уменьшение энтропии. Качественно такой же (однако количественно меньший) эффект наблюдается в случае взаимодействия диполей. Было вычислено, что при взаимодействии двух однозарядных ионов молярное изменение энтропии в разбавленном водном растворе, обусловленное электрострикцией, составляет около 10 э. е. При обычной температуре это увеличивает свободную энергию реакции примерно на 3 ккал. Поскольку изменение

энергии пропорционально произведению зарядов, очевидно, что в случае взаимодействия активного центра фермента, содержащего несколько катионных групп, скажем, с дианионом, эффектом электрострикции пренебрегать нельзя.

Чисто ковалентного связывания неизмененного субстрата при образовании фермент-субстратного комплекса, по-видимому, не происходит. Однако известны случаи, когда фермент все же образует ковалентно связанные промежуточные соединения с переносимыми в ходе реакции группировками, принадлежащими субстрату. В некоторых случаях переносимой группировкой является один атом, в других — вся молекула субстрата, за исключением одного атома. Важно, что этот ковалентный тип промежуточного соединения, образующегося путем разрыва связи в молекуле субстрата и образования новой связи между ферментом и фрагментом субстрата, качественно отличен от простого фермент-субстратного аддитивного комплекса. Важные кинетические следствия этого различия мы рассмотрим в гл. VIII. π

Таким образом, в образовании истинных фермент-субстратных комплексов могут участвовать силы молекулярного взаимодействия практически всех типов, характерных для белков, за исключением, быть может, ковалентного связывания. Следует также отметить, что при связывании некоторых кофакторов резко увеличивается способность фермента к связыванию субстрата; например, при координировании или хелатировании иона металла может создаваться мощный катионный центр.

ПРЯМЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ОБРАЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Хотя в нашем распоряжении имеются самые разнообразные убедительные кинетические доказательства реальности фермент-субстратных комплексов, подтверждающие их прямые данные были получены лишь в сравнительно небольшом числе случаев. Однако именно такие прямые данные имеют решающее значение, так как они окончательно доказывают образование промежуточных аддитивных комплексов в ходе ферментативных ре-

акций, на существовании которых базируются все современные теоретические концепции энзимологии.

Наиболее впечатляющие прямые данные такого рода были получены при изучении взаимодействия некоторых ферментов с их коферментами¹. Например, Велик [24] нашел, что образование комплекса лактатдегидрогеназы с окисленным или восстановленным НАД вызывает существенные изменения в спектре флуоресценции и поляризации флуоресценции компонентов реакции. Данные относительно изменений поляризации флуоресценции особенно убедительны, так как они связаны с молекулярными размерами флуоресцирующей структуры. Изменения поляризации при ассоциации молекулы пиридиннуклеотида с молекулой белка просто поразительны. Эти изменения несомненно связаны с образованием простого аддитивного комплекса, а не промежуточного соединения, являющегося производным фермента, так как анализ кинетических данных [25] показывает, что подобное соединение не участвует в механизме реакции. Тройной комплекс, включающий фермент, кофермент и лактат, образуется до того, как отделится какой-либо продукт реакции (см. гл. VII—IX).

Другие физические доказательства существования комплекса лактатдегидрогеназа — кофермент были получены с помощью спектроскопических [26] и седиментационных [27] методов. Помимо того, установленный прямой перенос водорода от лактата к коферменту [28] возможен лишь при обязательном образовании тройного комплекса фермента с обоими субстратами.

Для алкогольдегидрогеназы дрожжей тоже были получены убедительные доказательства физической реальности фермент-коферментного аддитивного комплекса с помощью кинетических [29], флуоресцентных [24] и седиментационных методов [30], а также на основании изучения прямого переноса водорода [31]. Аналогичным образом были получены данные по этому вопросу для

¹ Очевидно, что кофермент по существу является субстратом ферментов, в паре с которыми он функционирует, формально отличаясь от других субстратов лишь тем, что он является субстратом более чем одного фермента, т. е. способен к циклической регенерации.

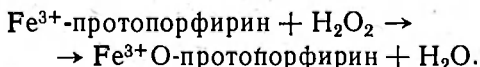
алкогольдегидрогеназы печени [32—34]. Подробно была исследована глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Она обычно выделяется в виде комплекса с НАД, который может быть легко удален. Для этого фермента также были получены доказательства образования аддитивного фермент-субстратного комплекса с помощью флуоресцентных и спектральных методов [30, 35], седиментационной техники [36], кинетических исследований [37] и изучения прямого переноса водорода [34]. Для этих случаев не найдено ни одного альтернативного представления, которое бы столь же хорошо соответствовало всей совокупности экспериментальных данных.

Чтобы на основании всего сказанного не создалось впечатления, будто коферменты представляют собой особый род субстратов, отличающийся от остальных какими-то иными свойствами помимо того, что они крайне удобны для изучения фермент-субстратных комплексов, следует отметить, что имеются также и другие убедительные примеры образования этих промежуточных продуктов. Например, сопоставление данных рентгеноструктурного анализа с разрешением 2—3 Å для карбокси-пептидазы А и ее комплекса с глицил-L-тирозином [38] показывает не только истинное расположение связанного пептида в «гидрофобном кармане» фермента, но и такие тонкие детали, как сдвиг остатка тирозина на 14 Å по направлению к субстрату при образовании комплекса. Впечатляющим примером подобного исследования является рентгеноструктурный анализ лизоцима [39], коррелирующий с результатами изучения механизма его действия [40]. Здесь, как и в случае карбокси-пептидазы, структура свободного фермента и его комплекса исследована очень детально.

Приведем еще один пример. Один из кристаллических промежуточных продуктов пурпурного цвета, выделенный Яги и др. [2—5] в анаэробных условиях из реакционной смеси оксидазы D-аминокислот, представляет собой, по-видимому, истинный фермент-субстратный аддитивный комплекс. Все данные убедительно свидетельствуют о том, что это так. Воздействие на него бензоатом в анаэробных условиях приводит к диссоциации комплекса с выделением субстрата и образованием комп-

лекса бензоата с окисленным ферментом. С помощью методов дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма было показано, что субстрат связывается с изоаллоксазиновым ядром простетической группы, а спектральные изменения свидетельствуют о том, что в основе связывания лежит образование комплекса с переносом заряда. В дальнейшем, по завершении переноса электрона, образуется второй кристаллический комплекс, содержащий парамагнитный семихинон, и его удастся выделить, но это не дает оснований сомневаться в том, что первая форма является классическим аддитивным фермент-субстратным комплексом.

В заключение упомянем об элегантном спектрофотометрическом исследовании геминных ферментов, выполненном Чансом. Хотя эта работа имеет огромное значение в развитии идей ферментативного катализа, обсуждать ее здесь подробно нет необходимости, так как она широко известна. Наблюдая за изменениями спектра поглощения железосодержащей порфириновой простетической группы, Чанс показал, что, например, в случае пероксидазы образуется не менее четырех различных комплексов фермента с субстратом — перекисью водорода. Однако мнения исследователей относительно химической природы этих комплексов расходятся. Например, Чанс [41] считает первый комплекс простым аддитивным комплексом, тогда как Джордж [42] полагает, что уже на первой стадии реакции трехвалентное железо в порфирине претерпевает дальнейшее окисление:



Хотя тем самым представление о промежуточных соединениях пероксидазы с H_2O_2 как о простых аддитивных комплексах ставится под сомнение, эта работа, тем не менее, крайне ценна тем, что в ней достигнут очень высокий уровень разрешения, позволяющий предполагать, что образование нескольких (вероятно, многих) различных форм комплекса является правилом.

Число работ в этой области растет очень быстро и среди них много таких, в которых изменения физических свойств, сопровождающие взаимодействие ферментов

с субстратами, наблюдаются непосредственно — с помощью спектральных методов [43], метода электронного парамагнитного резонанса и других методов, позволяющих регистрировать конформационные изменения в белке. При изучении этой литературы, однако, очень важно помнить о принципиальном различии между фермент-субстратным аддитивным комплексом и промежуточным соединением, содержащим замещенную форму фермента. Установить такое различие удается обычно на основании кинетических данных (гл. VIII), но, если такие данные в работе не приводятся, говорить о том, что в ней показано образование «комплекса Михаэлиса», как его иногда называют, можно лишь предположительно, пока не будет установлена истинная природа механизма.

Необходимо, однако, подчеркнуть, что даже механизмы, предусматривающие образование замещенных форм фермента, должны, как правило, включать один или два промежуточных бинарных комплекса простой аддитивной природы. Примерами, иллюстрирующими, как доказывается образование аддитивных комплексов в подобных случаях, могут служить исследования глутамат — оксалоацетат-аминотрансферазы [44] и роданезы [45].

Итак, в настоящее время образование фермент-субстратных аддитивных комплексов можно считать доказанным фактом. Их существование установлено столь твердо (его подтверждают и прямые наблюдения, и кинетические данные, и химические соображения), что убеждение энзимологов в их реальности непоколебимо.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Chance B., *Advan. Enzymol.*, 12, 153 (1951).
Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 7, Academic, New York, 1963.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

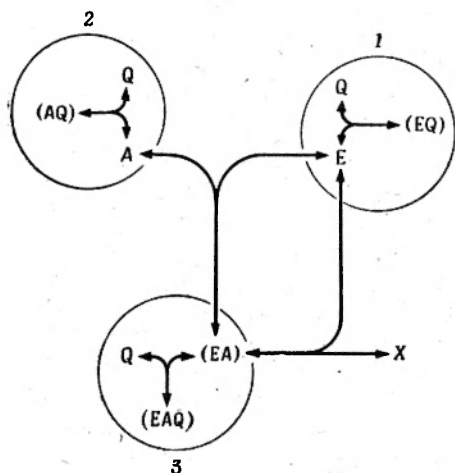
1. Wurtz A., *Compt. rend.*, 91, 787 (1880).
2. Yagi K., Ozawa T., *Biochim. Biophys. Acta*, 81, 29 (1964).
3. Yagi K., Ozawa T., *Nature*, 203, 864 (1964).

4. Yagi K., Okamura K., *J. Biochem. (Japan)*, **58**, 417 (1965).
5. Yagi K., Sugiura N., *J. Biochem. (Japan)*, **60**, 738 (1966).
6. Chance B., *J. Biol. Chem.*, **151**, 553 (1943).
7. Chance B., *Acta Chem. Scand.*, **1**, 236 (1947).
8. Stern K. G., *J. Biol. Chem.*, **114**, 473 (1936).
9. Keilin D., Mann T., *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B., **122**, 119 (1936).
10. Balls A. K., Wood H. N., *J. Biol. Chem.*, **219**, 245 (1956).
11. Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2540 (1962).
12. Bernhard S. A., Lau S. J., Noller H., *Biochemistry*, **4**, 1108, 1118 (1965).
13. Engstrom L., *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 49 (1961), **54**, 179 (1961).
14. Schwartz J. H., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1996 (1961).
15. Horecker B. L., Pontrenoli S., Ricci C., Cheng T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1949 (1961).
16. Horecker B. L., Rowley P. T., Grazi E., Cheng T., Tchola O., *Biochem. Z.*, **338**, 36 (1963).
17. Theorell H., Bonnicksen R., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1105 (1951).
18. Theorell H., Chance B., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1127 (1951).
19. Chance B., Neilands J. B., *J. Biol. Chem.*, **199**, 383 (1952).
20. Racker E., Krimsky I., *J. Biol. Chem.*, **198**, 731 (1952).
21. Velick S. F., *J. Biol. Chem.*, **203**, 563 (1953).
22. Green J. R., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **236**, 3047 (1961).
23. Westley J., Nakamoto T., *J. Biol. Chem.*, **237**, 547 (1962).
24. Velick S. F., *J. Biol. Chem.*, **233**, 1455 (1958).
25. Schwert G. W., Miller B. R., Peanasky P. J., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3245 (1967).
26. Chance B., Neilands J. B., *J. Biol. Chem.*, **199**, 383 (1952).
27. Takenaka Y., Schwert G. W., *J. Biol. Chem.*, **223**, 157 (1956).
28. Loewus F. A., Ofner P., Fisher H. F., Westheimer F. H., Venneslands B., *J. Biol. Chem.*, **202**, 699 (1953).
29. Wrattan C. C., Cleland W. W., *Biochemistry*, **2**, 935 (1963).
30. Velick S. F., Hayes J. E., Harting J., *J. Biol. Chem.*, **203**, 527 (1953).
31. Fisher H. F., Conn E. E., Vennesland B., Westheimer F. H., *J. Biol. Chem.*, **202**, 687 (1953).
32. Theorell H., Bonnicksen R., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 329 (1951).
33. Theorell H., McKinley McKee A. S., *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1797ff (1961).
34. Levy H. R., Vennesland B., *J. Biol. Chem.*, **228**, 85 (1957).
35. Smith T. E., *Biochemistry*, **5**, 2919 (1966).
36. Velick S. F., *J. Biol. Chem.*, **203**, 563 (1953).
37. Velick S. F., Furfine C., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 7, 1963.

38. Reeke G. N., Hartsuck J. A., Ludwig M. L., Guiocho F. A., Steitz T. A., Lipscomb W. N., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 58, 2220 (1967).
39. Blake C. C. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 167, 378 (1967).
40. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 167, 385 (1967).
41. Chance B., Arch. Biochem. Biophys., 41, 416 (1952).
42. George P., Biochem. J., 55, 220 (1953).
43. Ishimura Y., Nozaki M., Hayaishi O., J. Biol. Chem., 242, 2574 (1967).
44. Henson C. P., Cleland W. W., Biochemistry, 3, 338 (1964).
45. Volini M., Westley J., J. Biol. Chem., 241, 5168 (1966).

ИНГИБИРОВАНИЕ, АКТИВАЦИЯ, ИНАКТИВАЦИЯ, ВЛИЯНИЕ pH

Влиянию «посторонних» веществ на ферментативные реакции было посвящено значительное число энзимологических исследований, что вполне естественно, если учесть практическое значение этой проблемы для экономики и фармакологии. Вероятно, менее известно, что изучение ингибирования ферментов может сыграть важную



Фиг. 7. Возможные направления действия модификатора.

Q — модификатор, способный взаимодействовать с тем или иным компонентом каталитического цикла. Объяснение см. в тексте.

роль в анализе фундаментальных механизмов ферментативного катализа, особенно в тех случаях, когда эффект ингибирования или активации вызывает не «постороннее» вещество, а протон, субстрат или продукт изучаемой реакции, либо метаболит, участвующий в других реакциях той же клетки. В этой главе в качестве введения к анализу подобных эффектов мы рассмотрим, что произойдет, если в простую схему односубстратной реакции ввести постороннее вещество, способное

взаимодействовать с одним или несколькими компонентами системы. Это послужит базой, на которой можно будет строить изучение кинетики двухсубстратных реакций в следующих главах.

Поскольку начальная скорость односубстратной реакции определяется тремя компонентами, для ингибирующего или активирующего вещества в такой системе возможны только три точки атаки (фиг. 7). Для удобства обсуждения рассмотрим их сначала по отдельности, а затем совместно.

ВЕЩЕСТВА, РЕАГИРУЮЩИЕ СО СВОБОДНЫМ ФЕРМЕНТОМ

На фиг. 7 кружок 1 обозначает схематически один из типов взаимодействия вещества Q с ферментативной системой. Здесь Q обратимо реагирует с ферментом, образуя соединение, которое не связывается с субстратом А. Следовательно, Q является ингибитором. Заметим, что мы сделали три предположения о свойствах Q: а) что реакция с ферментом обратима, б) что Q реагирует только со свободным ферментом, в) что комплекс (EQ) полностью неактивен. Позднее мы постараемся установить характер действия Q в том случае, если какие-либо из этих условий не соблюдаются. А пока введем Q в кинетические уравнения рассматриваемой реакции, полагая, что все условия соблюдены.

Сделать это очень легко. Чтобы выразить влияние Q, нужно ввести добавочный член в уравнение (11). Для данного случая $E_0 = E + (EA) + (EQ)$. Так как (EQ) — «тупиковый комплекс», его концентрация может быть выражена через константу равновесия¹ $K_Q = (EQ)/QE$; следовательно, $(EQ) = K_Q QE$. Исходя из этого, при выводе уравнения для начальной скорости реакции член E в уравнении (10) нужно заменить не членом $[E_0 - (EA)]$, а членом $[E_0 - (EA)] / (K_Q + 1)$. Таким обра-

¹ Различные авторы по-разному определяют эту «ингибиторную константу». Например, у Диксона и Уэбба константа K_i представляет собой обратную величину K_i Лейдлера; в первом случае K_i константа диссоциации, во втором — константа ассоциации (как K_Q в данном тексте).

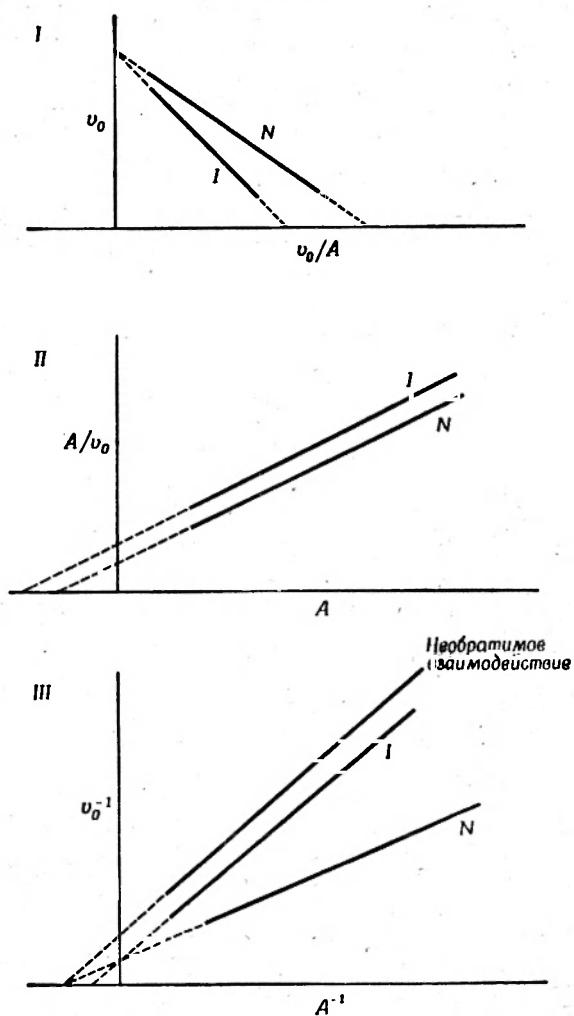
зом, если в реакции участвует ингибитор, то в кинетическом уравнении в знаменателе появляется член $(QK_Q + 1)$. Дальнейший вывод уравнения для начальной скорости реакции в присутствии ингибитора производится точно так же, как и раньше (уравнения 12—16), и потому этот новый член появляется и в знаменателе окончательного уравнения

$$v_0 = \frac{VA_0}{K_m(QK_Q + 1) + A_0} \quad (17)$$

Из этого уравнения ясно видны особенности ингибирования: уравнение имеет тот же самый вид (линейность графиков сохраняется), максимальная скорость реакции не изменяется, но кажущаяся константа Михаэлиса возрастает по сравнению с K_m для неингибированной реакции в $(QK_Q + 1)$ раз. На этом основании значение K_Q можно определить экспериментально, поскольку определение в отсутствие Q дает K_m , а в присутствии Q получается $K_m(QK_Q + 1)$ ¹. Если $Q = 0$ или K_Q очень мала, что указывает на низкое сродство Q к ферменту, то ингибирования не наблюдается и кажущаяся K_m имеет нормальное значение. Далее, если A_0 настолько велико, что определяет значение знаменателя в уравнении (17), т. е. если концентрация субстрата достаточна для достижения максимальной скорости реакции, то член QK_Q опять-таки не влияет на величину знаменателя и максимальная скорость реакции не изменяется. Таким образом, ингибирование носит «конкурентный» характер: оно выражено в наибольшей степени при высокой концентрации ингибитора или низкой концентрации субстрата и исчезает при очень низкой концентрации ингибитора или очень высокой концентрации субстрата. Это весьма наглядно видно на графиках, изображающих кинетику нормальной и конкурентно ингибированной ферментативных реакций (фиг. 8).

«Конкурентный» характер ингибирования *может* быть результатом какого-то истинного процесса конкуренции. Простейшим механизмом такого типа в буквальном

¹ Графический метод рассматривается ниже в связи с неконкурентным ингибированием.



Фиг. 8. Три способа графического представления конкурентного ингибирования.

N и I — нормальная и ингибированная системы. Случай необратимого взаимодействия показан только на фиг. 8, III.

смысле слова является конкуренция между А и Q за одни и те же связывающие области структуры фермента. Действительно, любая ситуация, при которой связывание А и Q взаимно исключается, должна дать именно такой кинетический результат. Как мы увидим дальше, такой результат может наблюдаться и при других явлениях, что требует осторожности при интерпретации данных по ингибированию.

Прежде чем переходить к следующим проблемам, рассмотрим, что произойдет, если реакция Q с E будет практически необратимой (т. е. если скорость диссоциации (EQ) будет меньше скорости ферментативной реакции). Очевидно, что это приведет просто к уменьшению общей концентрации фермента, причем это уменьшение будет зависеть от имеющегося количества Q. Никакие количества А не могут изменить этот эффект, поскольку концентрация E_0 уже снижена. Отсюда следует, что V , равная $k_{+2}E_0$, будет снижена пропорционально уменьшению концентрации E_0 , тогда как K_m останется неизменной, поскольку она не зависит от концентрации фермента (фиг. 8, III).

Этот случай обычно отличают от ингибирования и называют его «инактивацией». На практике, однако, этому различию не всегда придают значение, и это весьма прискорбно, так как внешне кинетическое поведение в этом случае ничем не отличается от случая чистого «неконкурентного» ингибирования, которое имеет совершенно иные причины¹. Особенно важно, что в случае необратимого ингибирования ничего нельзя сказать относительно места связывания ингибитора в молекуле фермента; это место может совпадать и может не совпадать с местом связывания субстрата. Все эти сообра-

¹ Однако существует два экспериментальных метода, с помощью которых можно различить эти два вида ингибирования. Кинетический метод основан на том, что для неконкурентного ингибирования, как мы увидим, и наклон прямых, и величины отсекаемых на осях координат отрезков при использовании метода двойных обратных величин изменяются линейно с изменением концентрации ингибитора, тогда как при необратимом ингибировании эта зависимость нелинейна. Второй метод — прямая проверка обратимости ингибирования, основанная на исследовании восстановления активности фермента после удаления Q из раствора (методом гель-фильтрации).

жения и с теми же результатами применимы также к случаю необратимого связывания, изображенному на фиг. 7 в кружке 3.

ВЕЩЕСТВА, РЕАГИРУЮЩИЕ С СУБСТРАТОМ

Обратимся теперь к случаю, схематически изображенному на фиг. 7 в кружке 2. Пусть вещество Q соединяется только со свободным субстратом. Для этих условий наше кинетическое уравнение требуется видоизменить с учетом того, что концентрация A теперь *не равна* A_0 , а меньше ее на величину (AQ) . Эту величину можно выразить через константу равновесия таким же способом, как мы выражали (EQ) в предыдущем разделе, т. е. $(AQ) = QAK_Q$. Тогда

$$A = A_0 - (AQ) = A_0 - QAK_Q = \frac{A_0}{QK_Q + 1},$$

В этом уравнении мы встречаемся с знаменателем того же вида, как и в уравнении для E (см. выше). Аналогичным же образом этот член попадает в конечное уравнение

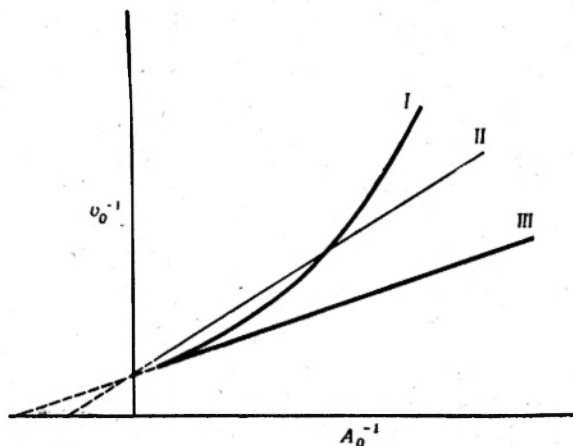
$$v_0 = \frac{VA_0}{K_m(QK_Q + 1) + A_0}, \quad (17a)$$

идентичное уравнению (17).

Как мы видим, обратимое взаимодействие с субстратом приводит к тому же самому результату (фиг. 9), что и классическое конкурентное ингибирование; это вполне естественно, поскольку можно считать, что Q конкурирует с ферментом за субстрат. Значение этого вывода для практики зависит от того, как исследуется кинетика ферментативной реакции. Если начальная концентрация субстрата A_0 принимается просто равной концентрации, введенной в реакционную смесь, а скорость реакции оценивается по скорости образования продукта X, отличить кинетически Q от истинного конкурентного ингибитора невозможно. Обнаружить отсутствие взаимодействия Q с самим ферментом можно только в том случае, если A_0 действительно *измеряется* в реакционной смеси с помощью метода, позволяющего отличать свободный A от

(AQ), и если v_0 измеряется по скорости исчезновения А (желательно, чтобы одновременно измерялась скорость образования X).

Нужно снова отметить, что такое разграничение конкурентных эффектов производится далеко не всегда. Нередко встречаются работы, в которых приводятся кинетические кривые, аналогичные кривым для нормальной



Фиг. 9. Взаимодействие модификатора с субстратом.

I — необратимое, *II* — обратимое, *III* — нормальная реакция. Форма графического представления, как на фиг. 8, *III*.

или обратимо ингибированной реакции, представленным на фиг. 8 или 9, и делается предварительный вывод, что ингибитор реагирует с участком связывания субстрата на ферменте. Но, учитывая приведенные выше данные, для такого заключения необходимо как минимум убедиться в том, что ингибитор практически никак не реагирует с субстратом — даже путем образования ионной пары или с помощью какого-либо иного легко обратимого механизма. Кроме того, используя несколько концентраций Q, необходимо также установить, что K_Q действительно сохраняет постоянное значение, поскольку другие факторы (например, эффекты, связанные с ионной силой), качественно имитирующие

конкурентное ингибирование, можно отличить от него по непостоянству кажущегося значения K_Q .

Теперь остается установить, что произойдет, если Q соединяется с A необратимо. В этом случае A_0 просто уменьшится на величину, равную истинной концентрации Q . Уравнение и график зависимости v_0 от $(A_0 - Q)$ будут обычными, но график зависимости v_0 от A_0 , если A_0 — просто концентрация субстрата, введенная в реакционную смесь, изменится. Равнобочная гипербола, выражающая зависимость v_0 от A_0 , будет смещена по оси A_0 , а график зависимости v_0^{-1} от A_0^{-1} станет нелинейным (фиг. 9). Этот случай по крайней мере нельзя спутать со случаем нормального процесса ингибирования. С другой стороны, на основании такого вида кривых нельзя утверждать, что мы наверняка имеем дело с необратимым связыванием субстрата, поскольку нелинейные зависимости этого типа могут появиться по ряду других причин (например, когда в реакционной системе имеется смесь ферментов или ферменты, обладающие несколькими видами активности, или же при действии некоторых нормальных двухсубстратных механизмов)¹.

ВЕЩЕСТВА, РЕАГИРУЮЩИЕ ТОЛЬКО С ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫМ КОМПЛЕКСОМ

Случай 3 на фиг. 7 — это реакция такого типа, который в чистом виде, по всей вероятности, не встречается. Здесь предполагается, что вещество Q обратимо реагирует с фермент-субстратным комплексом, но не реагирует ни со свободным ферментом, ни со свободным субстратом. В принципе такие случаи возможны, но, вероятно, они крайне редки. Тем не менее рассмотрение кинетики такого процесса весьма поучительно, поскольку аналогичные зависимости получаются по крайней мере для трех других механизмов, которые, несомненно, реали-

¹ В принципе при необратимом связывании субстрата кривая на графике двойных обратных величин стремится к бесконечно большому наклону (нулевой скорости) при обычно используемых концентрациях A и этим отличается от кривых, соответствующих другим рассмотренным здесь случаям. Но возможность установить это отличие зависит от точности метода исследования кинетики.

зуются достаточно часто. Кинетическое уравнение для этого случая, как и для случая I, будет отличаться от обычного (уравнение 11) только членом, выражающим общее число форм фермента. В данном случае необходимо ввести в уравнение концентрацию (EAQ) . Она в свою очередь зависит от константы равновесия K_Q для реакции ассоциации и от концентраций (EA) и Q . Таким образом, когда в реакцию добавляется вещество Q , в уравнении, как и раньше, появляется член, содержащий концентрацию этого вещества: $(EAQ) = (EA)QK_Q$; тогда основное уравнение (11) приобретает вид

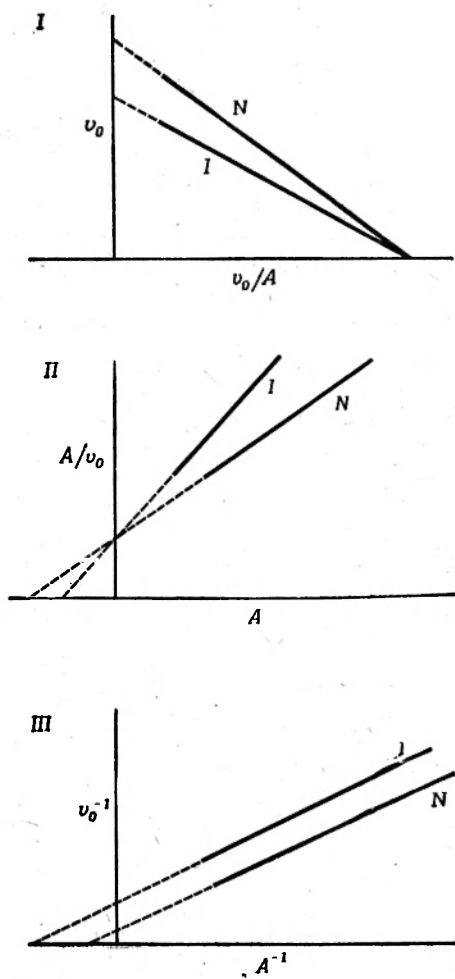
$$\frac{d(EA)}{dt} = k_{+1}A_0[E_0 - (EA) - (EA)QK_Q] - k_{-1}(EA) - k_{+2}(EA) = 0.$$

Производя необходимые преобразования и исключив (EA) , мы получаем снова член в знаменателе в форме $(QK_Q + 1)$. В данном случае, однако, окончательное уравнение скорости будет иметь несколько иную форму:

$$v_0 = \frac{VA_0}{K_m + A_0(QK_Q + 1)} = \frac{A_0V/(QK_Q + 1)}{K_m/(QK_Q + 1) + A_0}. \quad (18)$$

Таким образом, в уравнении, соответствующем случаю, когда Q соединяется с фермент-субстратным комплексом, константы K_m и V умножаются на один и тот же множитель $(QK_Q + 1)^{-1}$. Это уравнение тоже описывает равнобочную гиперболу, а графики его линеаризованных форм имеют вид прямых линий. Как показано на фиг. 10, I и II, эти прямые при любых концентрациях Q будут отсекают на оси абсцисс (при использовании графика типа фиг. 6, I), и на оси ординат (при использовании графика типа фиг. 6, II), те же отрезки, что и прямая, соответствующая неингибированной реакции. При использовании метода двойных обратных величин (т. е. графика типа фиг. 6, III), прямые для ингибированной и неингибированной реакции идут параллельно (фиг. 10, III).

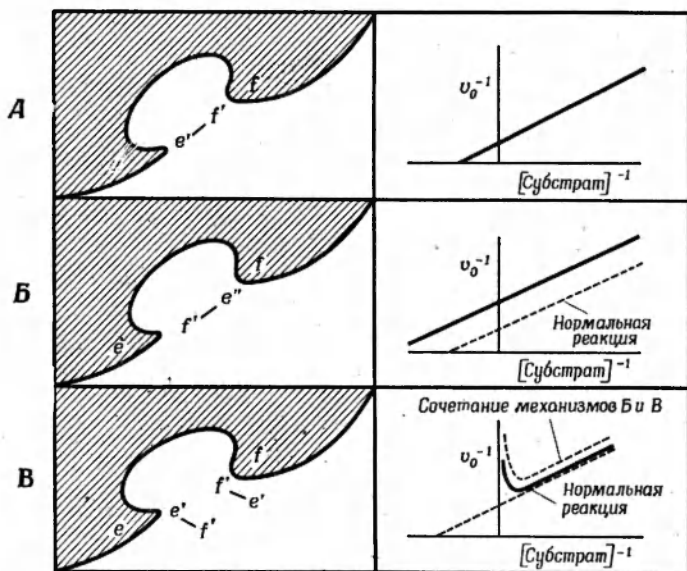
Такой тип кинетики называют «бесконкурентным» ингибированием. В принципе оно может возникнуть в ситуации, для которой было выведено уравнение (18).



Фиг. 10. Бесконкурентное ингибирование.
 Как и выше, N и I обозначают нормальную и ингибированную системы.

Однако есть еще по крайней мере три типа реакций, кинетический анализ которых приводит к тому же результату.

В гл. VIII будет показано, что кинетика двухсубстратных реакций, в которых в качестве промежуточных продуктов участвуют замещенные формы фермента, описывается такими же графиками, если Q реагирует с одним



Фиг. 11. Ошибочная ориентация и ингибирование субстратом.

А — нормальное взаимодействие; Б — ошибочная ориентация; В — классическое ингибирование субстратом. Заштрихованные участки представляют поверхность молекулы фермента. Объяснение см. в тексте.

из свободных субстратов, а не с фермент-субстратным комплексом. Заслуживает внимания также тот особый случай односубстратной реакции, когда $k_{+2} \gg k_{-1}$ и, следовательно, $K_m \approx k_{+2}/k_{+1}$ (это соответствует предположению Ван-Слайка — Каллена). В этом случае любое вещество Q, влияющее только на k_{+2} , должно оказывать пропорциональное влияние как на K_m , так и на максимальную скорость V, которая равна $k_{+2}E_0$.

Наконец, требует рассмотрения случай «непродуктивного связывания», или «ошибочной ориентации» субстрата. С этим явлением часто приходится встречаться при исследовании синтетических аналогов субстратов [1—4]. Предположим, что фермент содержит две группировки e и f , которые в норме соединяются с соответствующими группами e' и f' субстрата (фиг. 11, А). Но представим себе, что субстрат содержит такие группы e'' и f' , что e'' имеет электронное или структурное сходство с f' . Тогда некоторые из образующихся фермент-субстратных комплексов будут иметь «перевернутое» строение, т. е. содержать ошибочно ориентированный субстрат (фиг. 11, Б), и не будут способны к образованию продукта ферментативной реакции. В результате будет наблюдаться эффект ингибирования.

Кинетическое уравнение для этого случая выводится очень легко. Если $e'f'$ и $e''f'$ обладают свойствами субстрата, во всех других отношениях идентичными, то можно считать, что мы имеем здесь дело просто с конкурентным ингибированием, в котором, однако, роль Q играет сам субстрат. В соответствии с этим можно заменить Q в уравнении (17) на A_0 , считая K_Q константой равновесия для реакции образования ошибочно ориентированного комплекса. Это дает

$$v_0 = \frac{VA_0}{K_m(A_0K_Q + 1) + A_0} = \frac{VA_0}{K_m + A_0(K_QK_m + 1)} = \frac{A_0V/(K_QK_m + 1)}{K_m/(K_QK_m + 1) + A_0} \quad (19)$$

Полученное уравнение имеет формальное сходство с уравнением для бесконкурентного ингибирования в том отношении, что при графическом выражении кинетических данных методом двойных обратных величин субстратам $e'f'$ и $e''f'$ будут соответствовать параллельные прямые. Следует заметить, что $e''f'$ по сравнению с $e'f'$ будет давать не только меньшее значение V , но и меньшую величину K_m . Таким образом, из двух субстратов, имеющих одинаковое сродство к ферменту, один, обладающий способностью давать ошибочно ориентированный комплекс, характеризуется *меньшим* значением K_m ,

причем это уменьшение определяется тем, насколько произведение $K_Q K_m$ отличается от единицы. По этой причине нельзя признать обоснованными выводы о «натуральности» субстрата лишь на основании найденного для него наименьшего значения K_m .

Представления о том, что отдельные молекулы субстрата могут давать неактивные комплексы с ферментами, далеко не новы. Они используются в некоторых [5—7] (хотя, к сожалению, далеко не во всех) работах, посвященных проблеме ингибирования фермента субстратом. Полное рассмотрение ингибирования субстратом должно включать как механизмы ошибочной ориентации, так и более часто обсуждаемый в литературе механизм ингибирования вследствие связывания ферментом двух молекул субстрата (фиг. 11, В)¹. Исследование этого последнего механизма приводит к очевидным кинетическим следствиям. Скорость образования неактивного комплекса, содержащего две молекулы субстрата, пропорциональна квадрату концентрации субстрата. Член, характеризующий образование такого комплекса, входит в уравнение скорости реакции в форме

$$v_0 = \frac{VA}{K_m + A + K_Q A^2},$$

где K_Q — константа равновесия для образования неактивного тройного комплекса. Из этого уравнения видно, что ингибирование субстратом не имеет значения при низкой его концентрации, когда величина $K_Q A^2$ весьма мала. Однако при высокой концентрации субстрата этот член приобретает существенное значение, в результате чего, как показано на фиг. 11, В, будет наблюдаться заметное отклонение от нормальной кинетики. Заметим также, что механизмы ингибирования, выраженные графически порознь на фиг. 11, Б и 11, В, действуют, вероятнее всего, совместно, как показано пунктиром на

¹ Это только один частный случай из общего класса механизмов субстратного ингибирования, в основе которого лежит образование «тупикового комплекса» фермента с субстратом, т. е. комплекса, не образующего продукта реакции.

фиг. 11, В. Если не принять это во внимание, то, используя метод экстраполяции линейных участков кривых до пересечения с осями координат, можно получить неверные значения K_m и V . Вообще следует сказать, что экстраполяция линейных участков кривых, выражающих субстратное ингибирование, *не может* служить методом оценки K_m и V , если при этом не учитывать значений констант ингибирования.

Ингибирование продуктом реакции. Ход ферментативной реакции может замедлиться в присутствии продукта самой реакции по целому ряду причин [8]. Одна из них — обратимость суммарной реакции, в результате чего часть продукта расходуется с образованием исходного субстрата. Но это явление нельзя отнести к наиболее распространенным механизмам ингибирования продуктом реакции. Может также случиться, что продукт окажется реагентом, который либо случайно, либо выполняя какую-то регуляторную функцию, инактивирует одну или несколько форм фермента. Например, ферменты, катализирующие реакции, в ходе которых образуется H_2O_2 , часто инактивируются этим продуктом реакции. Это явление, однако, также не часто имеет существенное значение.

Наиболее распространенной причиной ингибирования продуктом, особенно для многоступенчатых механизмов, является уменьшение суммарной скорости реакции вследствие того, что продукт не отделяется от фермента, как при нормальном ходе реакции, а остается с ним связанным. Ясно, что если, скажем, последняя стадия каталитической реакции обратима, то последний продукт реакции, отделившийся от фермента, и первый субстрат должны конкурировать за свободный фермент независимо от положения равновесия суммарной реакции. Для реакций, в ходе которых образуется не один, а несколько продуктов, систематическое исследование начальных скоростей в присутствии одного из продуктов реакции позволяет получить важную информацию о формальном механизме процесса [9]. Этот способ будет более подробно рассмотрен в гл. VIII в связи с кинетическим анализом механизмов двухсубстратных реакций,

ВЕЩЕСТВА, РЕАГИРУЮЩИЕ БОЛЕЕ ЧЕМ С ОДНИМ КОМПОНЕНТОМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Нам осталось рассмотреть эффекты, возникающие при воздействии веществ, реагирующих более чем с одним компонентом ферментативной реакции.

Наиболее важное значение имеют эффекты одновременного воздействия на свободный фермент (кружок 1 на фиг. 7) и на фермент-субстратный комплекс (кружок 3). Так действуют вещества, относящиеся к классу «неконкурентных» ингибиторов¹. Чтобы получить кинетическое уравнение, описывающее этот эффект, нужно включить в него «конкурентный» и «бесконкурентный» члены, выведенные выше, так как эффект неконкурентного ингибирования складывается из эффектов, обусловленных этими двумя видами ингибирования.

Считая, как и раньше, (EA) и (EAQ) равновесными концентрациями и обозначив константы равновесия индексами, соответствующими номеру кружка на фиг. 7, мы получим, исходя из уравнений (17) и (18),

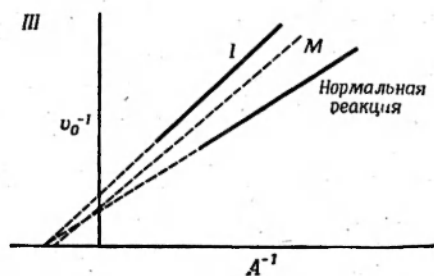
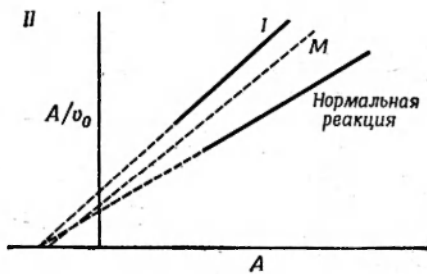
$$v_0 = \frac{VA_0}{K_m(QK_{Q1} + 1) + A_0(QK_{Q3} + 1)}. \quad (20)$$

В частном случае, когда $K_{Q1} = K_{Q3}$ (т. е. когда связывание А ферментом совершенно не влияет на связывание Q — чистое неконкурентное ингибирование), уравнение принимает вид

$$v_0 = \frac{A_0V/(QK_Q + 1)}{K_m + A_0}. \quad (21)$$

Уравнение (21) графически представляется равнобочной гиперболой и может быть линеаризовано. Из фиг. 12 видно, что K_m не изменяется в присутствии Q; меняется только кажущаяся величина V . Именно по этому кинетическому признаку обычно распознают простое неконкурентное ингибирование. Иногда его

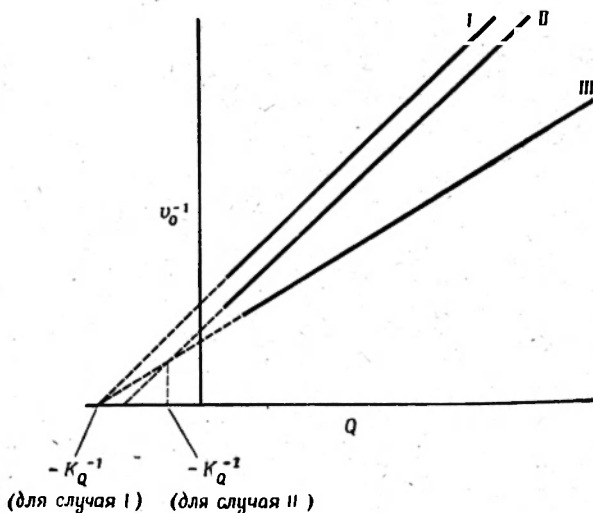
¹ Из этого не следует, что неконкурентное ингибирование возможно лишь в тех случаях, когда налицо взаимодействие с двумя формами фермента. Для многосубстратных механизмов неконкурентное ингибирование наблюдается и при взаимодействии с одной из форм фермента (гл. VII).



Фиг. 12. Неконкурентное и смешанное ингибирование.
 I — чисто неконкурентное ингибирование; M — смешанное ингибирование.

рассматривают как признак каких-то конформационных изменений фермента при взаимодействии с Q , в результате чего фермент теряет способность превращать A в продукты реакции¹.

Проверку соответствия кинетических уравнений и механизмов реакции и оценку констант ингибитора



Фиг. 13. Определение K_Q методом Диксона.

I — неконкурентное; *II* — конкурентное ингибирование; *III* — нормальная реакция.

(K_Q) как для конкурентного, так и для неконкурентного ингибирования иногда производят графическим методом Диксона [10], показанным на фиг. 13. Выражая V^{-1} или K_m/V как функцию Q , можно получить ту же информацию.

Очевидно, что особые условия, принятые при выводе уравнения (21) (равновесные концентрации, совпадение величин K_{Q1} и K_{Q2} , разделение функций связывающего

¹ Отметим еще раз, что внешне такая же кинетика будет наблюдаться либо при необратимом действии Q (инактивация фермента), либо при совместном действии на субстрат и на фермент-субстратный комплекс.

и каталитического центров), встречаются не часто. Это означает, что весьма редко приходится иметь дело с чисто неконкурентным ингибированием. В большинстве случаев экспериментально наблюдаемое ингибирование носит «смешанный» характер, при котором кажущиеся значения K_m и V меняются с концентрацией Q (фиг. 12)¹. Из всего сказанного следует, что анализ кинетического механизма оказывается подчас весьма трудным делом, требующим предварительного знания механизма действия фермента. При этом, как минимум, необходимо проверить кинетический механизм в возможно более широком ряду концентраций ингибитора и субстрата, предпочтительно как для прямой, так и для обратной реакции. Необходимо также проверить каким-либо прямым методом возможность взаимодействия ингибитора с свободным субстратом, причем этот метод должен позволять различать свободный и связанный ферментом субстрат². Тем не менее должным образом выполненный кинетический анализ крайне полезен и им, несомненно, следует пользоваться при исследовании многосубстратных ферментативных реакций.

Поскольку физические методы исследования конформационных изменений непрерывно совершенствуются, важно будет изучить прямыми методами влияние ингибиторов на сами ферменты. Даже сейчас в тех немногих случаях, когда есть возможность исследовать фермент в стехиометрической концентрации с субстратом, можно было бы использовать прямые тесты для оценки влияния ингибитора. Таким путем можно обойти и другие трудности ингибиторного анализа.

В табл. I суммированы кинетические характеристики ингибирования при взаимодействии ингибитора с различными компонентами ферментной системы.

¹ Некоторые специалисты в области кинетики предпочитают называть «неконкурентным» любое ингибирование, которое при использовании метода двойных обратных величин характеризуется изменением как наклона прямой (K_m/V), так и отсекаемого на ординате отрезка ($1/V$).

² Следовательно, нельзя, например, использовать титриметрический метод, который не позволяет различить свободный субстрат и находящийся с ним в равновесии субстрат, связанный с ферментом.

Таблица 1

Кинетическое поведение модификаторов ферментных реакций

Компонент, с которым взаимодействует модификатор (фиг. 7)	Обратимое действие	Необратимое действие ¹⁾
Е	Конкуреннтное (уравнение 17)	НК (фиг. 8)
А	Конкуреннтное (уравнение 17а)	Нелинейное (фиг. 9)
(ЕА)	Бесконкуреннтное (уравнение 18)	НК
(ЕА) + Е	Неконкуреннтное (уравнение 20)	НК
(ЕА) + А	Неконкуреннтное (уравнение 20)	НК

¹⁾ НК означает кинетическое поведение, которое выглядит графически как неконкуреннтное. Однако вторичные графики, выражающие зависимость наклона прямой и длины отсекаемых на осях отрезков от концентрации модификатора, в отличие от случая обратимого ингибирования являются нелинейными.

АКТИВАЦИЯ

До сих пор мы рассматривали только случаи, когда Q является ингибитором. Предположим, однако, что комплекс (ЕАQ) (фиг. 7), независимо от того, в результате какой реакции он образовался [(EQ) + А, (AQ) + Е или (ЕА) + Q], может распадаться с образованием Е + X + Q быстрее, чем (ЕА) распадается на Е + X¹. Этим самым мы снимаем условие, что Q-содержащие комплексы являются с точки зрения ферментативного катализа тупиковыми.

Кинетические уравнения для этого случая будут отличаться от уравнений для только что рассмотренного неконкуреннтного ингибирования только тем, что общая скорость реакции будет суммой скоростей v_0 и v'_0 , где v_0 — скорость распада (ЕА), выражаемая уравнением (20), а v'_0 — скорость распада (ЕАQ), выражаемая уравнением $v'_0 = k'_{+2}(ЕАQ)$. Последний член может быть найден при насыщающей концентрации Q (т. е. при такой концентрации, когда ее дальнейшее увеличение

¹ Дальнейшие выводы применимы также к случаю, когда распад (ЕАQ) с образованием продукта реакции происходит медленнее, чем распад (ЕА), но все же с достаточно высокой скоростью. Случай, когда оба комплекса распадаются одинаково быстро, тривиален — Q не влияет на ход реакции.

не изменяет скорости реакции). В этих условиях скорость реакции выражается уравнением

$$v_0^{\text{общ}} \text{ (при } Q_{\text{насыщ}}) = \frac{k'_{+2} K_{Q3} A_0 E_0}{K_m K_{Q1} + K_{Q3} A_0}. \quad (22)$$

Линейная форма уравнения (22) имеет вид

$$\frac{v_0}{A_0} = - \frac{v_0 K_{Q3}}{K_m K_{Q1}} + \frac{k'_{+2} K_{Q3} E_0}{K_m K_{Q1}}.$$

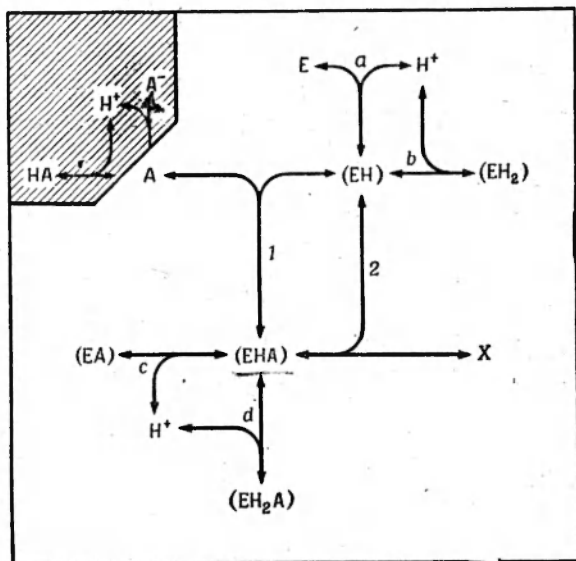
Таким образом, зависимость v_0/A от v_0 выражается прямой с наклоном $-K_{Q3}/K_m K_{Q1}$, отсекающей на оси v_0 отрезок, равный $k'_{+2} E_0$. Так как K_m можно определить экспериментально в отсутствие Q , из выведенных соотношений можно найти K_{Q3}/K_{Q1} . Для случая истинного неконкурентного ингибирования эта дробь должна быть, естественно, равна единице.

В заключение следует подчеркнуть, что эти уравнения выведены в предположении, согласно которому реакции распада комплексов (EA) и (EAQ) протекают сравнительно медленно, так что они заметным образом не влияют на равновесие между свободной и связанной формами фермента, участвующими в реакции. Полный анализ этого вида неконкурентного ингибирования методами стационарной кинетики дает столь сложные уравнения, что пользоваться ими практически невозможно. Моралес [11], однако, показал, что выведенные здесь уравнения (уравнения для чисто неконкурентного ингибирования) строго применимы только для равновесных условий. Точное соответствие опытных данных выведенным уравнениям можно даже рассматривать как признак того, что равновесные условия действительно достигнуты. Единственным случаем типичного неконкурентного ингибирования иного рода является блокирование одного из альтернативных путей реакции, ведущего к образованию (EAQ)¹.

¹ Согласно общему правилу, которое мы рассмотрим ниже, атипичная кинетика (например, нелинейность графиков двойных обратных величин) в отсутствие равновесия характерна для любого механизма, при котором субстрат реагирует достаточно быстро более чем с одной формой фермента (в данном случае с E и EQ) с образованием продукта реакции.

ВЛИЯНИЕ рН

Если гидроний-ион рассматривать как ингибитор или активатор фермента, то все приведенные выше рассуждения могут быть использованы для анализа влияния рН на скорость ферментативной реакции. В этом случае



Фиг. 14. Схема реакций с участием H^+ в качестве модификатора. Обозначения следует понимать в самом широком смысле: (EH) представляет все формы фермента, которые соединяются с А, (EHA) — все формы, которые при своих превращениях дают продукт X, и т. д. Иными словами, рассматривается ионизация лишь тех форм, которые имеют отношение к активности фермента. Реакции ионизации субстрата (заштрихованная область), хотя и имеют важное значение для кинетики ферментативной реакции, могут быть исследованы независимо и потому опущены при выводе уравнений в тексте.

допущение о равновесных условиях активации или ингибирования вполне допустимо, поскольку скорость ионных реакций, в которых участвует гидроний-ион, особенно высока. Поскольку, однако, необходимо рассмотреть как протонирование, так и депротонирование любых форм фермента, имеющих потенциальное значение для активности, примем за основу несколько модифицированную схему реакций, представленную на фиг. 14.

Полный вывод уравнений дается ниже. Для удобства мы опускаем реакции ионизации субстрата, поскольку они могут быть изучены независимо.

Равновесные реакции:

$$k_{+a}(EH) = k_{-a}HE, \quad \text{или} \quad E = \frac{(EH)}{H} K_a, \quad (23)$$

$$k_{+b}H(EH) = k_{-b}(EH_2), \quad \text{или} \quad (EH_2) = H(EH) K_b; \quad (24)$$

$$k_{+c}(EHA) = k_{-c}H(EA), \quad \text{или} \quad (EA) = \frac{(EHA)}{H} K_c; \quad (25)$$

$$k_{+d}H(EHA) = k_{-d}(EH_2A), \quad \text{или} \quad (EH_2A) = H(EHA) K_d. \quad (26)$$

Условие стационарности:

$$k_{+1}A(EH) + k_{-d}(EH_2A) + k_{-c}H(EA) = \\ = (EHA)(k_{-1} + k_{+2} + k_{+c} + k_{+d}H). \quad (27)$$

Объединяя уравнения (23—27), получаем

$$(EHA) = \frac{A(FH)}{K_m}, \quad \text{или} \quad (EH) = \frac{K_m(EHA)}{A}. \quad (28)$$

Уравнение постоянства суммы всех форм фермента

$$E_0 = E + (EH) + (EH_2) + (EA) + (EHA) + (EH_2A). \quad (29)$$

Объединяя его с уравнениями для равновесных реакций и уравнением (28), получаем

$$E_0 = (EHA) \left[\frac{K_m}{A} \left(1 + \frac{K_a}{H} + HK_b \right) + 1 + \frac{K_c}{H} + HK_d \right]. \quad (30)$$

Так как $v_0 = k_{+2}(EHA)$,

$$v_0 = \frac{k_{+2}E_0A}{K_m \left(1 + \frac{K_a}{H} + HK_b \right) + A \left(1 + \frac{K_c}{H} + HK_d \right)}. \quad (31)$$

Рассмотрим щелочную область рН, т.е. область, в которой существенное значение имеют только константы K_a и K_c . Примем далее, что $K_a \sim K_c$, т.е. что присоединение субстрата не изменяет величину pK группировок фермента, имеющих значение для каталитиче-

ского эффекта. Тогда уравнение (31) принимает вид

$$v_0 = \frac{k_{+2}E_0A}{(K_m + A)\left(1 + \frac{K_a}{H}\right)}, \quad \text{или} \quad v_0 = \frac{AV/\left(1 + \frac{K_a}{H}\right)}{K_m + A}. \quad (32)$$

Аналогичным образом для кислой области рН, когда важное значение имеют только константы K_b и K_d и предполагается, что $K_b = K_d$, получаем

$$v_0 = \frac{k_{+2}E_0A}{(K_m + A)(1 + HK_b)}, \quad \text{или} \quad v_0 = \frac{AV/(1 + HK_b)}{K_m + A}. \quad (33)$$

Заметим, что для этих частных случаев, когда связывание субстрата не изменяет величины K , концентрация A не влияет на форму кривой, описывающей зависимость v_0 от рН, тогда как в общем случае (уравнение 31) вид этой кривой должен зависеть от концентрации субстрата.

Очевидно, что для каждой из областей рН в отдельности приведенный выше кинетический анализ полностью аналогичен исследованию неконкурентного действия модификатора. Следует также заметить, что чисто неконкурентное влияние рН, как и чисто неконкурентное ингибирование вообще, наблюдается сравнительно редко, проявляясь лишь в условиях равновесного образования фермент-субстратного комплекса¹. Более того, в условиях, подобных тем, при которых в общем случае проявляется конкурентный эффект модификатора (диссоциация протона только свободного фермента или только свободного субстрата), рН-эффекты будут

¹ Лейдлер [12] провел детальный анализ таких реакций, приняв во внимание возможность образования EH_2A из $EH_2 + A$, с использованием стационарной кинетики вместо предположения о равновесиях в реакциях ионизации. Он показал, что действительно можно представить себе только два случая, при которых уравнение (32) справедливо для неконкурентного торможения: а) когда $k_{+2} \ll k_{-1}$, т. е. когда связывание субстрата носит равновесный характер, или б) когда и связывание субстрата в комплекс, и его диссоциация по одному из направлений происходят значительно быстрее, чем по другим (по мнению Лейдлера, этот случай нереален). Альберти и Блумфильд [13] проанализировали также систему, в которой реакции всех трех ионизированных форм фермента дают заметный вклад в общую скорость процесса.

конкурентными. В этом случае при изменениях рН будет изменяться K_m , но не V . Аналогичным образом при диссоциации только фермент-субстратного комплекса рН-эффекты будут сказываться как на K_m , так и на V пропорционально «степени бесконкурентности», так что при очень низкой концентрации субстрата скорость реакции не будет изменяться при изменении рН. Объясняется это, естественно, тем, что при концентрации субстрата, значительно меньшей, чем K_m , концентрация ЕА будет исчезающе мала и бесконкурентному ингибитору не с чем будет реагировать. Заметим, что в этом случае

$$v_0 = \frac{v_{\infty}}{K_m + 2} E_0 A = \frac{V}{K_m} A,$$

т. е. знаменатель не содержит константы бесконкурентного ингибитора (уравнение 18).

Некоторые удобные формы графического представления зависимости K_m , V и V/K_m от рН, необходимые для идентификации каталитически важных функциональных групп ферментов, будут рассмотрены в гл. XIV.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958.
 Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, 2nd ed., Academic, New York, 1964. (Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, изд-во «Мир», М., 1966.)
 Reiner J. M., *Behavior of Enzyme Systems*, Burgess, Minneapolis, 1959.
 Webb J. L., *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic, New York, 1963. (Уэбб Л., Ингибиторы ферментов и метаболизма, изд-во «Мир», М., 1966.)

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Huang H. T., Niemann C., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 59 (1952).
2. Rapp J. R., Neimann C., Hein G. E., *Biochemistry*, **5**, 4100 (1966).
3. Mintel R., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3381 (1966).
4. Jencks W. P., in: N. O. Kaplan, E. P. Kennedy (eds.), *Current Aspects of Biochemical Energetics*, Academic, New York, 1966, p. 273.

5. Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958, pp. 72—77.
6. Reiner J. M., *Behavior of Enzyme Systems*, Burgess, Minneapolis, 1959, pp. 189—200.
7. Webb J. L., *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic, New York, 1963, pp. 118—130. (Уэбб Л., *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, изд-во «Мир», М., 1966.)
8. Walter C., Frieden E., *Advan. Enzymol.*, 25, 167 (1963).
9. Cleland W. W., *Biochim. et Biophys. Acta*, 67, 173 (1963).
10. Dixon M., *Biochem. J.*, 55, 170 (1953).
11. Morales M. F., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 4169 (1955).
12. Laidler K. J., *Trans. Faraday Soc.*, 51, 528 (1955).
13. Alberty R. A., Bloomfield V., *J. Biol. Chem.*, 238, 2804 (1963).

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Попытки понять процессы, лежащие в основе образования фермент-субстратных комплексов и явления ингибирования, естественно, привели к представлению о фермент-субстратной специфичности. Два фермента, катализирующие реакции различного типа, скажем гидролиз и дегидрирование, всегда обнаруживают избирательность в отношении субстратов в зависимости от содержащихся в их структуре функциональных групп. Помимо того, за исключением тех случаев, когда присоединение субстрата происходит за счет лишь одной из функциональных групп и этого присоединения достаточно для осуществления каталитического акта, должна обнаруживаться также известная пространственная специфичность. Но даже в этих необычных условиях можно ожидать геометрической избирательности для таких механизмов, которые предполагают образование тройных комплексов фермента с двумя субстратами.

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА И РАЗРЫВ СВЯЗЕЙ

Эти соображения легко понять, если постараться представить себе в деталях, что происходит в процессе ферментативной реакции. Во-первых, субстрат должен присоединиться к ферменту. Вследствие больших различий в размерах молекула субстрата, вообще говоря, может находиться в контакте лишь с ограниченной частью молекулы фермента. Именно это соображение привело к представлению об активных центрах молекулы фермента. Разумеется, активный центр не обязательно представляет собой (а если это и случается, то крайне редко) какой-то отрезок аминокислотной последовательности в первичной структуре фермента. Это скорее некая локализованная область свернутой глобулярной структуры фермента. Присоединение субстрата к активному центру происходит за счет слабых сил (гл. III), определяющих взаимодействие между некоторыми осо-

быми группировками или, во всяком случае, особыми типами группировок фермента и субстрата. Если присоединение субстрата является многоточечным, т. е. осуществляется за счет сил взаимодействия не одной, а нескольких пар функциональных групп, то очевидно, что расположение активных группировок в молекуле субстрата должно достаточно точно соответствовать расположению соответственных групп в активном центре. Тот факт, что белковая структура в какой-то степени подвижна, в принципе не противоречит этому представлению, хотя и обуславливает известную ширину границ комплементарности. Потенциальные субстраты, в которых необходимые группировки расположены «неправильно», будут плохо присоединяться к ферменту; кинетически это можно заметить по влиянию на величину k_{-1}/k_{+1} , которое сказывается, правда не всегда, на величине K_m (она растет) и не сказывается на величине V .

В односубстратных реакциях вслед за образованием комплекса наступает стадия, характеризующаяся константой скорости k_{+2} . Например, это может быть разрыв какой-то связи в молекуле субстрата. Если в перераспределении электронов субстрата, необходимом для разрыва связи, участвует какая-то иная группировка активного центра, помимо группировки, осуществляющей связывание субстрата, то эта вторая группировка также должна быть строго ориентирована относительно связанного субстрата. В противном случае смещение электронов будет не эффективным, что приведет к понижению k_{+2} . Таким образом, этот эффект сказывается на величине V , а также на величине K_m (в той степени, настолько k_{+2} влияет на K_m).

В случае двухсубстратных реакций, которые требуют образования тройного комплекса, оба субстрата, естественно, должны быть так расположены в комплексах, чтобы реакция была возможна. Трудно представить себе, как мог бы происходить прямой перенос атома или группы от одного субстрата к другому, если бы субстраты не были связаны с тесно примыкающими или перекрывающимися центрами фермента. Следовательно, в этом случае, как и в рассмотренном выше, точное взаимное расположение группировок субстрата

и связывающих групп фермента должно иметь огромное значение.

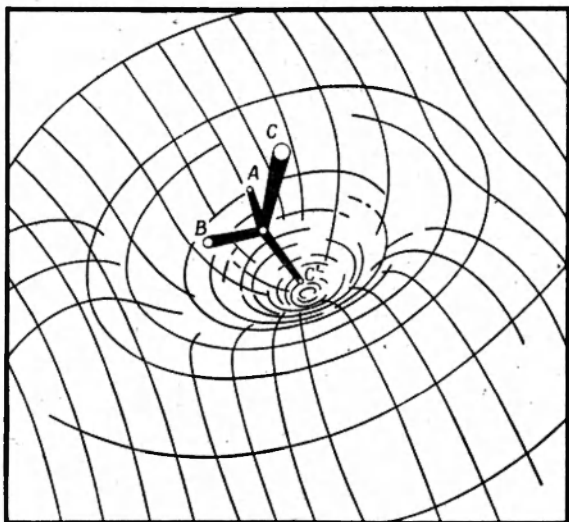
Из этих рассуждений следует, что, помимо специфичности по отношению к определенным группам субстрата, фермент должен обладать известной пространственной специфичностью. Следует предполагать далее, что стерическая специфичность может, вообще говоря, сказываться на многих или даже на всех кинетических константах.

В связи с этим необходимо заметить, что фермент-субстратный комплекс может претерпевать реакции мономолекулярной изомеризации, в результате которых образуется не один, а несколько промежуточных соединений. Пеллер и Альберти [1], проанализировав кинетические следствия этого явления, показали, что по форме кинетические уравнения в этом случае аналогичны уравнениям, выведенным для одного промежуточного соединения, но константы скорости, рассчитанные в предположении механизма с одним промежуточным соединением, являются нижним пределом истинных констант скоростей.

АСИММЕТРИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ СИММЕТРИЧНЫХ СУБСТРАТОВ

Понятие пространственной специфичности можно расширить, включив в него случаи, когда молекула субстрата, имеющая элементы симметрии, тем не менее ведет себя в ферментативной реакции как асимметричная. Например, *мезо*-углеродные атомы ведут себя в реакциях с ферментами так, как будто они имеют асимметричную структуру. Такая ситуация имеет место в случае цитрата, на примере которого Огстон [2] впервые указал, что в основе асимметрической реакции может лежать трехточечное связывание субстрата. На самом деле оказывается, что наличие двух специфических точек связывания совершенно достаточно для ориентации субстрата стереоспецифическим образом. На фиг. 15 схематически изображена молекула субстрата, обладающая плоскостью симметрии и присоединенная к ферменту двумя группами *A* и *B*; однако изображен-

ный на схеме фермент-субстратный комплекс явно асимметричен. Группировки субстрата C и C' , хотя химически и идентичны, несомненно будут иметь различную реакционную способность по отношению к другим связанным молекулам, группировкам фермента, а также свободным молекулам растворителя или растворенного



Фиг. 15. Схема, изображающая поверхность фермента с впадиной, в которой к ферменту присоединена тетраэдрическая молекула, содержащая группировки A , B , C и C' .

вещества. Важной особенностью этой системы является, несомненно, асимметрия молекулы фермента, выражающаяся в данном случае в отсутствии взаимозаменяемости центров связывания A и B , а также в неоднородности свойств в направлении, перпендикулярном поверхности молекулы.

С помощью схемы, изображенной на фиг. 15, легко, например, понять субстратную специфичность дрожжевой алкогольдегидрогеназы, о которой свидетельствуют величины K_m и максимальной скорости реакции, полученные Леви и др. [3] для окисления этилового, метилового и изопропиловых спиртов. Если группами C и C'

(фиг. 15) являются атомы водорода при мезо-атоме углерода, как в этаноле, то *A* и *B* — это гидроксил и метил. Замена метильной группы на водород, как в метаноле, приводит к уменьшению максимальной скорости в 25 раз и увеличению K_m в 65 раз. Замена водорода при мезо-углероде на метильную группу, как в изопропаноле, вызывает уменьшение максимальной скорости в 2,5 раза и увеличение K_m в 70 раз. На этом основании авторы предположили, что сочетание обеих этих замен, которое могло бы иметь место, если бы этанол размещался в активном центре в «перевернутом состоянии», сказывалось бы на активности очень сильно¹. Другие экспериментальные данные подтвердили это предположение: было показано, что этот фермент проявляет абсолютную стереоспецифичность в отношении ориентации этанола и может быть даже использован для получения оптически активного монодейтероэтанола [3].

ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Изложенные выше предположения были полностью подтверждены экспериментальными исследованиями субстратной специфичности многих ферментов. Целый ряд ферментов, как оказалось, проявляет лишь очень широкую групповую специфичность. Например, щелочная фосфатаза *E. coli* катализирует гидролиз разнообразных эфиров фосфорной кислоты, не проявляя видимой селективности в отношении этих субстратов [4]. Возможно, что в этом случае образование комплекса фермента с эфиром фосфорной кислоты происходит в основном за счет ионного взаимодействия, поскольку все эти эфиры являются анионами и в активном центре фермента существенную роль играет катион Zn^{2+} .

Однако большинство ферментов обнаруживают более высокую степень специфичности. Некоторые из них абсолютно специфичны в отношении одного-единствен-

¹ Скорость реакции при низкой концентрации спирта пропорциональна V/K_m . Принимая V/K_m за меру скорости реакции, получим различие между этиловым и метиловым спиртом в 1625 раз и между этиловым и изопропиловым спиртом в 175 раз. Из этого следует, что отношение скоростей реакции для двух ориентаций этанола составляет 10^5 .

ного субстрата (или одной пары субстратов). Высшей степенью специфичности является исключительно строгая стереоспецифичность. Например, в ферментативных реакциях, в ходе которых возникает асимметрический центр, образующийся продукт является всегда одним из возможных энантиомеров. Отсюда следует, что в обратной реакции, а также всегда, когда субстрат оптически активен, обычно лишь один из энантиомеров является эффективным субстратом. Например, дрожжи содержат два отдельных фермента — L-лактат- и D-лактатдегидрогеназу [5, 6]. В таких случаях оптические изомеры могут быть конкурентными ингибиторами [7].

Наиболее широко изучена стереоспецифичность реакций, в которых участвуют пиридиннуклеотидные коферменты. Веннесланд [8] и ее сотрудники с помощью изотопных методов доказали, что атом водорода в положении 4 пиридинового кольца при ферментативном восстановлении НАД занимает всегда лишь одно из двух возможных положений в пространстве¹. Углеродный атом, который принимает водород, не асимметричен ни в окисленной, ни в восстановленной форме кофермента, но фермент катализирует прямой перенос атома водорода от субстрата строго на определенную сторону плоскости пиридинового кольца в четвертом положении. Одни ферменты специфически переносят водород на одну сторону плоскости пиридинового кольца, другие — на другую сторону.

Другой точно установленный случай стереоспецифичности этого типа — ферментативное фосфорилирование глицерина [9]. Этот субстрат, разумеется, не является асимметрическим, но претерпевает асимметрические превращения под влиянием киназы. Фермент катализирует этерификацию одной из двух первичных спиртовых групп, в результате чего образуется только один из энантиоморфных α -глицерофосфатов, а именно L- α -глицерофосфат. Ключевой реакцией и здесь является образование асимметрического фермент-субстратного

¹ Это исследования из той же серии, что и широко известные эксперименты, в которых показан прямой перенос атомов водорода от субстрата к коферменту (гл. III).

комплекса. Единственной причиной асимметричности синтеза является, по нашему мнению, наличие *мезо*-углеродного атома в субстрате.

Здесь необходимо еще раз привлечь внимание к необходимости детального изучения строения ферментов и фермент-субстратных комплексов с помощью методов рентгеноструктурного анализа. Когда накопится больше данных о соотношении между структурой молекул в кристаллах и в растворе, они послужат крайне ценным источником информации о механизме действия ферментов. В литературе уже встречаются данные об активности некоторых ферментов в кристаллическом состоянии [10—12]. Примечательно, что все кристаллографические данные свидетельствуют о наличии в ферментах «расщелин» или «карманов» для связывания субстрата в полном соответствии с изложенными выше идеями относительно стереоспецифичности.

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Стереоспецифичность многих метаболических реакций может объясняться причинами, имеющими отношение к формальным механизмам катализа. Например, одинаковая стереохимическая специфичность четырех кето-альдегид-изомераз привела Розе [13] к предположению об общем *цис*-эндиольном механизме для этих четырех ферментов и об одновременном разрыве связей в каждой из этих реакций. Противоположные стереохимические свойства ферментов, в других отношениях близких к кето-альдегид-изомеразам — глутаматмутазы и метилмалонил-КоА-мутазы, — были сочтены, напротив, свидетельством того, что обмен атомов водорода и замещающих группировок в субстратах осуществляется по меньшей мере в два независимых этапа, а не одновременно [14].

Майстер [15] элегантно использовал метод исследования субстратной специфичности для выяснения пространственной организации активного центра глутаматсинтетазы. Особенность стереоспецифичности этого фермента состоит в том, что он реагирует и с L- и

с D-глутаматом, но лишь с D-изомером β -глутамата и L-изомером α -метилглутамата. Эти наблюдения позволили сделать определенный вывод о характере пространственного расположения группировок субстрата и комплементарного расположения соответствующих групп в активном центре. Прогнозы, основанные на этом выводе, были подтверждены в дальнейших исследованиях разнообразных замещенных субстратов.

Приведенные данные заставляют думать, что исследования субстратной специфичности можно гораздо шире использовать для изучения механизма действия ферментов. Несколько примеров использования различных вариантов субстратов приведены во второй части книги.

Обычно подчеркивают исключительно строгую специфичность ферментов. Хотя с этим нельзя не согласиться, особенно в том, что касается абсолютной стереоспецифичности активного центра, полезно все же подчеркнуть другое — огромное разнообразие типов и степеней специфичности. В этом отношении интересны данные, полученные Покером и Мини [16] при сравнении реакций гидратации пиридинальдегидов, катализируемых ферментом и ионами металлов. Авторы показали, что свободные двухвалентные ионы цинка или кобальта проявляют заметную избирательность в реакции гидратации 2-пиридинальдегида по сравнению с гидратацией 4-пиридинальдегида (разница в скоростях реакции в несколько сот раз), причем в основе этой избирательности, несомненно, лежат стереохимические факторы (возможно, она связана с размерами группы

—Zn—ОН как бифункционального катализатора).

В то же время цинксодержащий фермент карбоангидраза, являющийся высокоактивным катализатором в этой реакции, не обнаруживает специфичности в отношении тех же субстратов. Этот случай, когда фермент обладает *меньшей* избирательностью по сравнению с небиологическими катализаторами, ясно показывает, что относительно специфичности ферментов правомерно единственное обобщение — что она может быть самой

различной. Однако в связи с особым значением специфичности в теории ферментативного катализа (гл. VI) это обобщение заслуживает самого серьезного внимания.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Levy H. R., Talalay P., Vennesland B., in: P. B. D. de la Mare and W. Klyne (eds.), *Progress in Stereochemistry*, Vol. 3. Butterworths, London, 1962.
- Rose L. A., *Ann. Rev. Biochem.*, 35 (1966).
- Jencks W. P., in: N. O. Kaplan, E. P. Kennedy (eds.), *Current Aspects of Biochemical Energetics*, Academic, New York, 1966.
- Gutfreund H., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 1, 1959.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Peller L., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 5907 (1959).
2. Ogston A. G., *Nature*, 164, 180 (1949).
3. Levy H. R., Loewus F. A., Vennesland B., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2949 (1957).
4. Heppel L. A., Harkness D. R., Hilmoer R. J., *J. Biol. Chem.*, 237, 841 (1962).
5. Back S. J., Dixon M., Zerfas L. G., *Biochem. J.*, 40, 229 (1946).
6. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.*, 236, 920 (1961).
7. Huang H. T., Niemann C., *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1555 (1951).
8. Vennesland B., *J. Cellular Comp. Physiol.*, 47, 201 (1956).
9. Bublitz C., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.*, 211, 963 (1955).
10. Richards F. M., *Brookhaven Symp. Biol.*, 15, 208 (1962).
11. Murdock A. L., *Federation Proc.*, 26, 385 (1967).
12. Quijcho F. A., Bishop W. H., Richards F. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 57, 525 (1967).
13. Rose I. A., *Brookhaven Symp. Biol.*, 15, 293 (1962).
14. Sprecher M., Clark M. J., Sprinson D. B., *J. Biol. Chem.*, 241, 872 (1966).
15. Meister A., *Federation Proc.*, 27, 100 (1968).
16. Pocker Y., Meany J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 631 (1967).

ТЕОРИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Чтобы закончить наше обсуждение основ энзимологии, нам осталось рассмотреть некоторые идеи, касающиеся взаимосвязи между теорией действия ферментов и общими теориями катализа. Главное свойство ферментов состоит, разумеется, в том, что они снижают свободную энергию активации катализируемой ими реакции. Заранее, однако, нельзя сказать, с чем связан этот эффект — с энтропией или с энтальпией активации. Тем не менее накопленный к настоящему времени огромный экспериментальный материал позволяет уже обсудить роль различных факторов в ферментативном катализе. Таких главных факторов можно насчитать семь. Рассмотрим их кратко и затем покажем, как они проявляются в реакции, катализируемой α -химотрипсином, которая, пожалуй, изучена лучше других.

ЭФФЕКТЫ СБЛИЖЕНИЯ И ОРИЕНТАЦИИ

Представим себе, что фермент не несет никакой другой функции, помимо того, что, адсорбируясь на его поверхности, реагирующие субстраты попадают в непосредственную близость друг к другу. При этом концентрация субстратов на поверхности фермента оказывается высокой даже в том случае, когда общая их концентрация в растворе очень низка. Эта ситуация аналогична той, с которой мы встречаемся при рассмотрении внутримолекулярных реакций в отличие от межмолекулярных. Кошланд [1, 2] исследовал эту возможность, включая также вопрос о надлежащей ориентации субстратов относительно друг друга. Его расчеты являются, естественно, приближенными, однако полученные значения дают правильное представление о порядке величины. На основании этих расчетов Кошланд пришел к заключению, что простое сближение и взаимная ориентация субстратов не могут объяснить эффект ферментативного катализа. Рассчитанные им скорости отличались

от наблюдаемых на много порядков. Лишь приняв в расчет сближение и ориентацию субстратов не только по отношению друг к другу, но и по отношению к каталитическим группировкам фермента, Кошланд получил достаточно высокие значения ожидаемой скорости реакции.

Общее эмпирическое правило относительно вклада чистого эффекта сближения можно сформулировать следующим образом: скорость простого внутримолекулярного взаимодействия примерно равна скорости соответствующей бимолекулярной реакции, в которой один из реагирующих компонентов присутствует в концентрации $10 M$ [2—4]. Это число не имеет четкого физического смысла и лишь характеризует порядок величины, на которую различаются скорости реакции функциональных групп, принадлежащих разным молекулам, и тех же групп, находящихся в одной и той же молекуле. Надо признать, что это очень грубое приближение. Возможно, следует предпочесть более ранние представления о таком факторе, как своего рода «отбор» растворенных молекул из раствора¹.

ИЗМЕНЕНИЕ РЕАГИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

В тех случаях, когда фермент реагирует с субстратами последовательно (скажем, принимает какую-то группировку от одного субстрата и передает ее другому), возникает очень простая возможность снижения энергии активации путем изменения общего характера реакции. Например, если конечный акцептирующий субстрат обладает не очень высокой реакционной способностью в кинетическом смысле, более реакционная группировка фермента может атаковать донорный субстрат и в результате его расщепления образовать реакционную способную замещенную форму фермента. Именно так, по-видимому, действуют многие гидролазы;

¹ Этот процесс приводит к увеличению энтропии активации на величину порядка -8 э. е. для всех бимолекулярных реакций [5]. Представление о действии «отбора» в процессе бимолекулярной реакции равнозначно увеличению концентрации второго реагента не до 10 , а до $50 M$ [6].

в катализируемых ими реакциях атака осуществляется такими сильными нуклеофильными группировками, как $-\text{O}^-$ (например, в химотрипсине, см. ниже), или $-\text{S}^-$ (например, в папаине) [7]. Аналогичным образом, если два субстрата являются одинаково заряженными ионами¹, их самопроизвольному взаимодействию препятствует эффект электростатического отталкивания. В таких случаях взаимодействие фермента с донорным субстратом, приводящее либо к отщеплению от фермент-субстратного комплекса первого продукта анионного строения, либо к нейтрализации заряда субстрата катионной группировки фермента, должно существенно увеличивать скорость реакции. Роданеза, представляющая собой S-трансферазу, служит примером фермента, работающего по этому принципу. В этом случае самопроизвольной реакции субстратов SSO_3^{2-} и CN^- препятствует электростатическое отталкивание. Но после того как фермент реагирует с SSO_3^{2-} , присоединяя нейтральную серу и освобождаясь от иона SO_3^{2-} [8, 9], подход иона CN^- к подлежащему переносу атому серы уже не встречает электростатических затруднений. Здесь реакция видоизменяется таким образом, что полностью исключается анион-анионное взаимодействие. Следует заметить, что если этот электростатический фактор действительно имеет важное значение, то взаимодействие тиосульфата с цианидом должно катализироваться в какой-то степени анионообменными смолами. Опыт показал, что это действительно так, хотя каталитический эффект оказывается значительно более низким, чем при ферментативном катализе [10]. Обобщая, можно сказать, что этот фактор катализа реализуется в форме самых разнообразных способов изменения характера реакции.

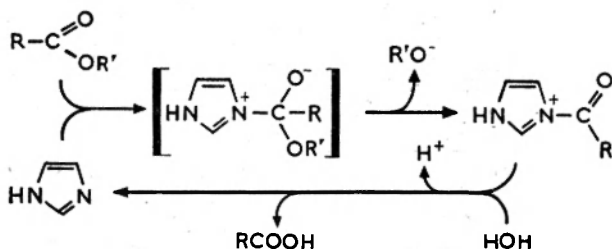
ЭЛЕКТРОННЫЕ ЭФФЕКТЫ

К факторам катализа, обсуждавшимся значительно чаще, относятся разнообразные эффекты, которые можно назвать электронными, поскольку при подходе

¹ Во многих случаях субстратами являются, например, фосфат-анионы.

молекулы субстрата к нуклеофильным или электрофильным (или к тем и другим) группам ферментов происходят те или иные смещения электронной плотности.

Поясним это, рассмотрев в качестве модели какой-либо простой катализатор, например имидазол. Катализируемый имидазолом гидролиз сложного эфира в действительности является реакцией переноса ацила, включающей стадию образования ацилимидазола. Очевидно, что в ходе каталитической реакции происходит нуклеофильная атака имидазола на карбонильный углерод эфира, приводящая к образованию неустойчивого ацилимидазола:

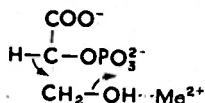


Эта система, конечно, очень привлекательна в качестве модели, особенно если вспомнить, что имидазольные группы принимают участие в каталитическом действии многих ферментов. Вместе с тем ни в одном из случаев образования ацилированного фермента не было найдено промежуточного соединения, содержащего ацил у имидазола.

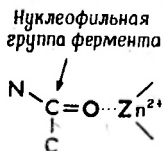
Ацилированные производные ферментов, найденные в реакциях, катализируемых пептидазами и эстеразами, вероятно, во всех случаях содержат ацил, связанный эфирной связью с гидроксилом серина или с сульфгидрильной группой. Это не удивительно, поскольку и анион гидроксила серина, и сульфгидрильный анион являются сильными нуклеофильными агентами. Но, поскольку наличие имидазольных групп в активных центрах этих ферментов доказано независимыми методами, механизм каталитического действия имидазола должен быть каким-то иным. Этот механизм, по-видимому, основан на

принципе кислотно-основного катализа, который мы рассмотрим в следующем разделе.

Принцип катализа с помощью электрофильных группировок легче всего рассмотреть на модели каталитического действия иона металла. Очевидно, что ион металла может принимать электроны. В соответствии с этим можно ожидать, что приближение субстрата к иону металла, будь это «свободный» ион (в действительности координированный с молекулами растворителя) или ион, координированный с функциональными группами фермента, приведет к смещению электронов в молекуле субстрата, которое качественно можно предсказать. Так, участие иона металла в реакциях енолазы можно понять, приняв, что электрофильная группировка, связанная с 2-фосфоглицератом, облегчает отрыв гидроксильной группы [11, 12]:



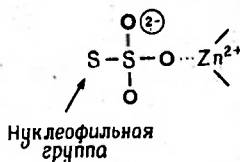
Роль иона цинка в действии карбоксипептидазы можно объяснить аналогичным образом [13]. В этом случае ион металла усиливает поляризацию карбонильной группы пептидной связи субстрата, облегчая атаку нуклеофильной группировки фермента:



Ион цинка в карбоангидразе, по-видимому, имеет аналогичную функцию [14]. Простые комплексы ионов металлов (и даже ионы гидрония) также являются электрофильными катализаторами некоторых из этих реакций.

Расщепление S—S-связи в SSO_3^{2-} , катализируемое роданезой, также основано, по крайней мере частично, на электрофильном механизме. Ряд данных показывает,

что в тиосульфате, который, как предполагается, связывается координационной связью через свой кислород с ионом цинка фермента, происходит вследствие этого смещение электронной плотности и разрыв связи, в результате чего концевой атом серы переносится к нуклеофильной группировке фермента [6, 15]:

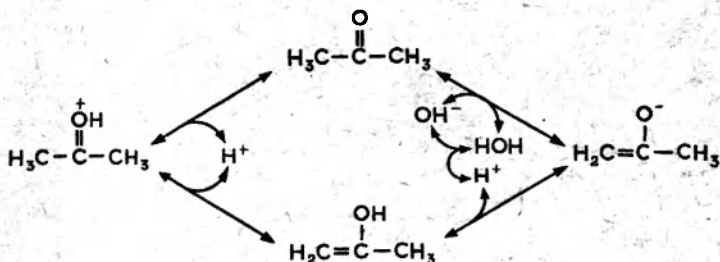


Метцгер и Уилсон [16] также получили убедительные данные, свидетельствующие о том, что в основе каталитического действия ряда гидролитических ферментов лежит электрофильный механизм.

ОБЩИЙ КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЙ КАТАЛИЗ

Взаимодействие кислот с основаниями, вообще говоря, отличается от всех других реакций лишь постольку, поскольку мы придерживаемся очень узкого определения понятий «кислота» и «основание». Если перейти от определений Брэнстеда [17] к определениям Льюиса [18], особенно в обобщенной форме [19, 20], то все нуклеофилы могут быть отнесены к основаниям, а все электрофилы (в том числе ионы металлов) к кислотам. Мы считаем, однако, что здесь будет полезнее воздержаться от далеко идущих обобщений и остаться в пределах теории Брэнстеда. С этой точки зрения общекилотный катализ можно определить как ускорение реакции вследствие частичного переноса протона от любой брэнстедовой кислоты к реагенту, находящемуся в переходном состоянии. Аналогично основоосновный катализ наблюдается в том случае, когда брэнстедово основание ускоряет реакцию, частично отбирая протон от переходного комплекса. Известно, что значительное число органических и неорганических реакций катализируется таким образом.

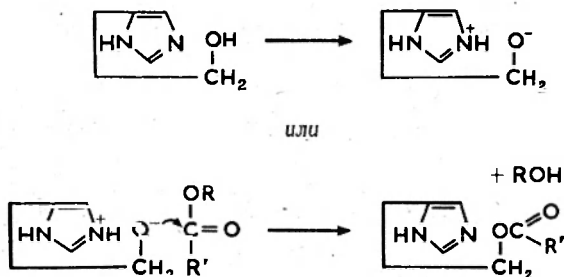
Примером могут служить реакции, в которых стадией, лимитирующей скорость процесса, является образование енольных форм; в катализе этих реакций участвуют оба механизма одновременно — и кислотный, и основной.



Принимая все это во внимание и учитывая, что ферменты содержат группировки, ионизирующиеся во всем физиологическом интервале pH, надо думать, что каталитическое действие ферментов во многом основано на механизмах кислотно-основного катализа. О возможном участии различных группировок ферментов в таких каталитических механизмах писалось и говорилось очень много. Однако продемонстрировать это участие с абсолютной убедительностью крайне трудно, и успех большинства гипотез о кислотно-основной природе механизма катализа объясняется в основном тем, что такие механизмы кажутся весьма вероятными, а не тем, что они строго доказаны экспериментом. Однако участие, в частности, имидазольной группировки в таком механизме почти не вызывает сомнений.

В этом нас убеждает в первую очередь два типа наблюдений. Во-первых, многие экспериментальные работы показали, что гистидин играет важную роль в активности многих ферментов. Во-вторых, ни в одном случае имидазол не реагирует как нуклеофильный агент; например, при образовании ацилферментов как промежуточных продуктов в реакции катализа замещенным оказывается не гистидин, а чаще всего серин. Эти наблюдения привели энзимологов к предположению о том, что имидазол играет роль общесосновного катализатора, оттягивающего протон от гидроксильной группы серина

с образованием сильно нуклеофильной группировки —O^- . Альтернативно можно представить себе имидзоль-ион в качестве общекислотного катализатора, который протонирует основание, освобождающееся при расщеплении субстрата:



Совершенно такие же представления могут быть использованы для объяснения механизма деацилирования фермента при взаимодействии с водой (см. последний раздел этой главы).

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЯ

Свободная энергия, в частности свободная энергия активации, складывается из энтропийной и энтальпийной составляющих:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$$

Но тогда как энтальпийная составляющая, выражающаяся, например, через аррениусову энергию активации, строго связана с образованием и разрывом ковалентных связей и отражает силы Ван-дер-Ваальса, которые действуют между реагирующими участками, сближенными в активированном комплексе, энтропийная составляющая определяется рядом явлений, основанных на разных механизмах. К ним относятся: 1) электрострикция и некоторые другие эффекты, связанные с влиянием растворителя на скорость реакции, 2) изменения энтропии реагирующих молекул субстратов, в том числе такие,

которые обусловлены возникновением напряжения в молекуле субстрата вследствие связывания его с ферментом, 3) изменения конформации фермента вследствие связывания субстрата и «замораживание» субстрата, когда он связывается с ферментом в конформации, сходной с той, которую он принимает в активированном состоянии, необходимом для катализируемой реакции. В настоящее время не все из этих возможных составляющих энтропии активации удастся определить в эксперименте отдельно, но в принципе они различаются и заслуживают тщательного изучения, поскольку их вклад в каталитический эффект может привести к изменению константы скорости реакции на несколько порядков.

Практически электростатический и неэлектростатический вклад в энтропию активации можно разделить, комбинируя два экспериментальных подхода. Как будет показано в гл. XIII, для определения суммарной энтропии активации (ΔS^*) индивидуальной реакции нужно измерить скорости реакции при различных температурах. Тот же подход можно использовать и для определения ΔS^* отдельной стадии ферментативной реакции, если удастся показать, что при всех этих температурах измеряется скорость именно этой стадии реакции.

Чтобы найти электростатический вклад в энтропию (ΔS_{es}^*), нужно исследовать влияние ионной силы или диэлектрической проницаемости на кинетику реакции (гл. XIII). При условии применимости закона Дебая — Хюккеля зависимость $\log k$ от квадратного корня из ионной силы является линейной, причем наклон прямой равен $Z_A Z_B$ — произведению зарядов ионов, соединяющихся или разъединяющихся в ходе реакции. (Ясно, что в отсутствие электростатического взаимодействия один из двух сомножителей или оба они равны нулю и, следовательно, влияния ионной силы обнаружить не удастся.) Если условия опыта позволяют варьировать диэлектрическую проницаемость среды, то можно построить $\log k_0$ (k_0 — константа скорости, экстраполированная к нулевой ионной силе) как функцию величины, обратной диэлектрической проницаемости, и по наклону этой прямой также оценить $Z_A Z_B$. Найдя произведение

зарядов любым из этих двух методов и задавшись каким-то разумным значением расстояния между зарядами, можно приближенно вычислить ΔS_{es}^* ; для водных растворов при комнатной температуре и расстоянии между центрами зарядов 2 \AA член $\Delta S_{es}^* \approx 10Z_A Z_B$.

Смысл величины ΔS_{es}^* можно обычно объяснить, обратившись к эффекту электрострикции, т. е. связыванию или освобождению воды при разделении или нейтрализации зарядов в ионных реакциях. Полученные описанным выше методом величины являются приближенными, особенно если учесть необходимость введения специальных предположений для применения этого метода к исследованию белков (гл. XIII), однако их можно использовать для качественной оценки неэлектростатического вклада ΔS_{nes}^* в общую величину ΔS^* , который равен $\Delta S^* - \Delta S_{es}^*$.

Неэлектростатический вклад сам по себе зависит от многих составляющих, но лишь одну из них обычно можно оценить индивидуально. Это энтропия «отбора» (упомянутого выше в связи с эффектом сближения), равная -8 э. е. при образовании одного комплекса из двух разделенных частиц (не учитывая никаких других изменений в системе, влияющих на энтропию). Другие составляющие неэлектростатического вклада в энтропию активации рассматриваются ниже в связи с изменениями конформации.

Необходимо упомянуть еще об одном эффекте, связанном с влиянием растворителя, который до сих пор не привлек достаточного внимания исследователей. Речь идет о том, что при тщательном исследовании ферментов в их активных центрах были найдены неполярные области. Этот фактор может иметь решающее значение в ферментативном катализе, поскольку он может обеспечить осуществление неводных реакций в водном растворе. Хорекер [21] обсудил преимущества такого гидрофобного окружения субстрата в молекуле альдолазы, при действии которой должна выделиться молекула воды и образоваться шиффово основание. Однако пока еще такого рода явления количественно не исследованы.

ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ФЕРМЕНТА И СУБСТРАТА;
ЭФФЕКТЫ НАПРЯЖЕНИЯ

Во многих ферментативных реакциях имеются стадии, характеризующиеся такими величинами ΔS^* , которые значительно превышают величины, ожидаемые на основе представлений об электростатических взаимодействиях или простых эффектах «отбора». Так, например, ΔS^* деацилирования ацетил- α -химотрипсина составляет примерно -36 э. е. [22]. Можно представить себе несколько возможных причин этого явления, но экспериментальное исследование каждой из них в отдельности пока неосуществимо. Одна из возможностей состоит в том, что молекула фермента претерпевает какое-то конформационное изменение [23]. Такой эффект предусматривается в гипотезе «принудительного контакта» Кошланда [24], согласно которой конформационные изменения, возникающие в молекуле фермента при образовании комплекса с субстратом, обеспечивают необходимое расположение каталитических групп. Как отмечают Бендер и сотр. [22], «принудительный контакт» должен привести к существенному повышению энтропии активации, величину которого нельзя предсказать на основе структуры субстратов. Возможно, дальнейшие более точные измерения энтропии активации позволят оценить роль этого эффекта по сравнению с другими эффектами, обсуждаемыми ниже. В этой же связи следует упомянуть, что, согласно предположению Хаммеса [25], изменения третичной структуры фермента при комплексообразовании дают вклад в каталитический эффект за счет того, что освобождающаяся при этом энергия частично компенсирует энергию активации, необходимую для взаимодействия субстратов.

Вторая возможность заключается в том, что при присоединении субстрата к ферменту, независимо от того, имеет ли фермент жесткую или подвижную структуру, в молекуле субстрата возникает напряжение связей [26—29]. В пользу этого предположения наиболее убедительно свидетельствуют данные о том, что ферменты проявляют специфичность не только в связывании субстрата, но и в самой каталитической реакции.

Как убедительно показал Дженкс [29], эта возможность не обязательно связана с подвижностью одного лишь белка, но легко осуществима, если гибкостью обладает и субстрат, и фермент. В этих условиях при образовании комплекса возникает напряжение связей в обеих молекулах. Те субстраты, которые связываются менее прочно, оказываются менее напряженными и, следовательно, менее реакционноспособными в составе комплекса, чем более прочно связанные субстраты.

Существует еще третья возможность, которую очень трудно отличить экспериментально от только что изложенной. Специфичность может влиять на энтропию активации потому, что при связывании субстрата его конформация в составе комплекса с ферментом оказывается близкой к конформации в активированном комплексе. Эта возможность предусматривает не напряженные валентные углы и связи, а ограничение вращения¹.

В комплексах с «хорошими» субстратами, т. е. такими, которые не только хорошо связываются, но и легко реагируют, основное состояние фиксируется в конформации, которая очень близка к конформации в переходном состоянии. В случае «плохих» субстратов этого не происходит, вращение вокруг критической связи оказывается более свободным, и правильная конформация возникает лишь изредка и совершенно случайно [22]. Вообще говоря, такой механизм катализа должен осложняться образованием непродуктивных комплексов (в частности, комплексов с ошибочной ориентацией субстрата, обсуждавшихся выше), и потому исчерпывающий анализ механизма этих энтропийных эффектов в катализе весьма затруднителен.

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

В предыдущих разделах мы подчеркивали каталитическую функцию ферментов, заключающуюся в уменьшении той или другой составляющей свободной энергии

¹ Следует заметить, что эта точка зрения близка к идее об ориентации субстрата, упоминавшейся выше в связи с анализом эффекта сближения. Дженкс называет этот фактор «энтропийным напряжением».

активации катализируемых ими реакций. Но ферментативный катализ может быть рассмотрен и с другой точки зрения. Ее легко понять, представив себе существование в клетке высокореакционноспособного и необходимого организму метаболита. Тогда «тактическая задача» состоит не в том, чтобы обеспечить ему возможность реагировать, а в том, чтобы предохранить его от реакции в ненужном направлении. В этой ситуации фермент может играть роль эффективного агента, *повышая* свободную энергию активации других реакций, независимо от того, снижает он или не снижает энергию активации той реакции, которую он специфически катализирует. В данном случае он также является катализатором, хотя и отрицательным, и его функциональное значение в качестве фермента неоспоримо.

В связи с этими соображениями возникает два вопроса: при каких обстоятельствах они приложимы и известны ли конкретные примеры таких механизмов действия ферментов? Очевидно, что если фермент должен эффективно осуществлять эту, по сути дела, защитную функцию, он должен связывать данный метаболит очень прочно; это означает, что в растворе должно содержаться мало свободного метаболита. Именно так обстоит дело со многими неустойчивыми метаболитами, например аденилатами аминокислот при синтезе белка, которые существуют в связанной с ферментами форме. С логически крайним случаем такого рода мы имеем дело в реакциях двухсубстратного механизма с замещением фермента, в которых промежуточное соединение вызывает модификацию какой-либо группировки самого фермента. Это либо окисление — восстановление протестической группы, ковалентно связанной с ферментом, либо замещение одной из группировок фермента группировкой первого субстрата. Такое промежуточное соединение может быть химически весьма неустойчивым, как, например, шиффово основание, образующееся в качестве промежуточного продукта в альдозазной реакции. Тем не менее выбор молекул, с которыми это промежуточное соединение действительно может реагировать, ограничен вследствие различий химического окружения в свободном растворе и на поверхности белка,

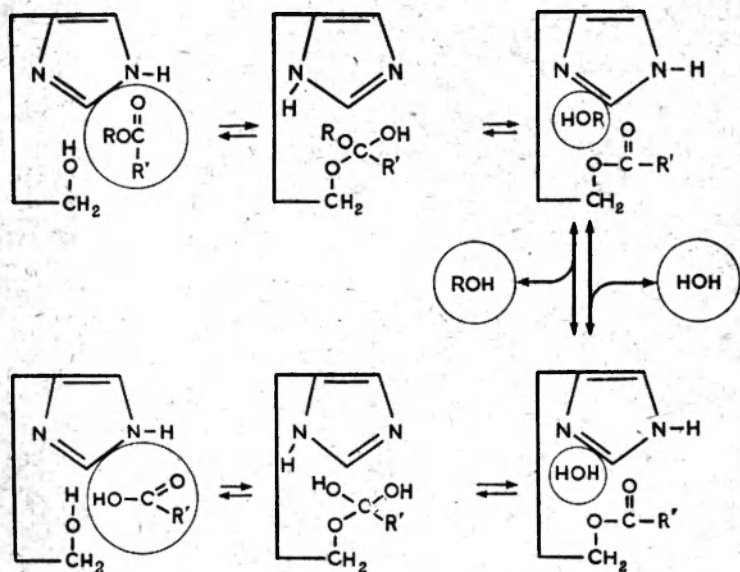
т. е. вследствие специфичности фермента для второго субстрата.

Ферменты могут обладать как положительными, так и отрицательными каталитическими функциями. Однако все общие методы определения ферментов основаны на их положительной функции. Было бы весьма интересно обнаружить ферменты с чисто отрицательным каталитическим эффектом. В организованных субструктурах особенно высока вероятность найти молекулы, выполняющие только функции связывания высокорекреационно-способных метаболитов и предохранения их от взаимодействия с водой или другими посторонними реагентами. Хотя, быть может, трудно разработать хорошие методы определения таких ферментов (которые являются все же «белковыми катализаторами», хотя и с отрицательными каталитическими функциями), у нас нет никаких оснований сомневаться а priori в их существовании.

α-ХИМОТРИПСИН

Бендер и Кежди [22] использовали представления, развитые в этой главе, для анализа каталитического действия химотрипсина. Для этой реакции не обнаружено ни влияния ионной силы или диэлектрической проницаемости, ни признаков электрофильного катализа, однако многие другие факторы катализа, несомненно, действуют. Проанализировав известные экспериментальные факты относительно каталитического действия α-химотрипсина, Бендер и Кежди пришли к выводу, что оно основано на согласованном механизме (фиг. 16), заключающемся в протонировании и депротонировании имидазола и одновременно в нуклеофильной атаке гидроксильной группы серина с образованием ацилированного фермента [30]. Подобная же последовательность процессов была постулирована для взаимодействия ацилфермента с водой как нуклеофильным реагентом, в результате чего происходит деацилирование фермента. Исходя из аналогии с литературными данными из области физической органической химии, эти исследователи попытались объяснить найденные порядки величин скорости деацилирования (лимитирующей стадии реакции)

для этой протеазы. Иными словами, они подошли к количественному расчету процесса ферментативного катализа, базируясь на разумных величинах вклада различных факторов.



Фиг. 16. Механизм гидролитического действия химотрипсина по Бендеру — Кежди.

Длинная линия, соединяющая имидазольное кольцо и алифатическую гидроксильную группу, обозначает белковую структуру, с помощью которой поддерживается необходимое расположение этих группировок в пространстве. Кружками обведены вещества, не связанные с белком.

Исходя из величины константы скорости катализируемого гидроксид-ионами гидролиза N-ацетилтриптофанамида ($3 \cdot 10^{-4} M^{-1} c^{-1}$), Бендер и его сотрудники определили константу скорости для реакции имидазольного общесосновного катализа ($4,8 \cdot 10^{-10} M^{-1} c^{-1}$) и затем, основываясь на допущении о концентрации $10 M$, обсуждавшемся выше, — константу скорости внутримолекулярной реакции имидазольного общесосновного катализа ($4,8 \times 10^{-9} c^{-1}$). Изменение природы лимитирующей реакции — переход от гидролиза к алкоголизу амида (атака

гидроксила серина) — может само по себе привести к повышению скорости реакции в 100 раз (константа скорости будет равна $4,8 \cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$). После того как авторы, исходя из представления о замораживании субстратной специфичности (стр. 109), учли неэлектростатический вклад в энтропию активации (электростатический вклад в данном случае отсутствует), рассчитанная константа скорости увеличилась еще в 10^3 раз. Это было сделано в предположении, что «фактор внутримолекулярности» реакции ($10 M$) не включает компонент, связанных с ограничением вращения. Рассчитанная таким образом константа возросла до величины $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Далее оставалось оценить вклад общекислотного катализа на стадии депротонирования имидазола. Химическая аналогия с реакцией переноса протона на сложные эфиры показывает, что увеличение скорости в 100 раз является вполне разумной оценкой. Таким образом, согласно расчету, константа скорости должна составлять сотые доли обратных секунд. Экспериментально найденная константа равна $4,4 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, что прекрасно совпадает с величиной, выведенной на основе ясных химических аналогий для каждой стадии реакции.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Bender M. L., Kézdy F. J., *Ann. Rev. Biochem.*, 34 (1965).
Jencks W. P., *Ann. Rev. Biochem.*, 32 (1963).
Jencks W. P., in: N. O. Kaplan, E. P. Kennedy (eds.), *Current Aspects of Biochemical Energetics*, Academic, New York, 1966.
Koshland D. E., Jr., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959 and *Advan. Enzymol.*, 22 (1960).
Westheimer F. H., *Advan. Enzymol.*, 24 (1962).
Lumry R., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959.
Waley S. G., *Mechanisms of Organic and Enzymic Reactions*, Oxford, London, 1962.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Koshland D. E., Jr., *Cellular Comp. Physiol.*, 47, Suppl. 1, 217 (1956).
2. Koshland D. E., Jr., *J. Theoret. Biol.*, 2, 75 (1962).
3. Bender M. L., Chow Y., Chloupek F., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 5380 (1958).

4. Bruice T. E., Brookhaven Symp. Biol., 15, 52 (1962).
5. Laidler K. J., The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Oxford, London, 1958, p. 204.
6. Leininger K., Westley J., J. Biol. Chem., 243, 1892 (1968).
7. Smith E. L., J. Biol. Chem., 233, 1392 (1958).
8. Green J. R., Westley J., J. Biol. Chem., 236, 3047 (1961).
9. Westley J., Nakamoto T., J. Biol. Chem., 237, 547 (1962).
10. Mintel R., Unpublished data.
11. Wold F., Ballou C. E., J. Biol. Chem., 227, 301 (1957).
12. Williams R. J. P., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds.), The Enzymes, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959, p. 391.
13. Vallee B. L., Federation Proc., 23, 8 (1964).
14. Gibbons B. H., Edsall J. T., J. Biol. Chem., 238, 3502 (1963).
15. Mintel R., Westley J., J. Biol. Chem., 241, 3381 (1966).
16. Metzger H. P., Wilson I. B., Biochemistry, 3, 926 (1964).
17. Brønsted J. N., Chem. Revs, 5, 231 (1928).
18. Lewis G. N., J. Franklin Inst., 226, 293 (1938).
19. Усанович М., ЖОХ, 9, 182 (1939).
20. Milliken R., J. Phys. Chem., 56, 801 (1952).
21. Lai C. Y., Hoffee P., Horecker B. L., Arch. Biochem. Biophys., 112, 567 (1965).
22. Bender M. L., Kézdy F. J., Gunter C. R., J. Am. Chem. Soc., 86, 3714 (1964).
23. Laidler K. J., The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Oxford, London, 1958, p. 205 ff.
24. Koshland D. E., Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 98 (1958).
25. Hammes G. G., Nature, 204, 342 (1964).
26. Reiner J., Behavior of Enzyme Systems, Burgess, Minneapolis, 1959, p. 297 ff.
27. Lumry R., in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds.), The Enzymes, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959, p. 157.
28. Jencks W. P., Ann. Rev. Biochem., 32, 639 (1963).
29. Jencks W. P., in: N. O. Kaplan, E. P. Kennedy (eds.), Current Aspects of Biochemical Energetics, Academic, New York, 1966, p. 273.
30. Bender M. L., F. J. Kézdy, J. Am. Chem. Soc., 86, 3704 (1964).

Типы механизмов ферментативного катализа

Выводы, к которым мы пришли в гл. II—IV, по большей части строго приложимы только к *односубстратным реакциям*. Для таких реакций формальные стороны механизма (т.е. последовательность реакций, изображаемая, скажем, так, как на стр. 43) вполне ясны и легко поддаются анализу. Но, к сожалению, почти во всех ферментативных реакциях участвуют по меньшей мере два субстрата¹. До недавнего времени это препятствовало однозначному кинетическому анализу механизма ферментативных реакций. Однако предложение Кошланда классифицировать трансферазные реакции на основе представления об однократном и двухкратном замещении (аналогично SN_1 - и SN_2 -механизмам органических реакций) дало возможность начать плодотворное обсуждение формальных

¹ Это не всегда сразу очевидно, если одним из субстратов является вода.

аспектов механизмов многих двухсубстратных реакций. Еще важнее, что это предложение помогло, наконец, развеять мистический туман, окутывавший многие представления о действии ферментов. Даже у тех из нас, кому искусство выделения ферментов представлялось чем-то сверхестественным, возникло желание исследовать ферменты как химические вещества и появилась уверенность в том, что такой подход создаст в конце концов основу для понимания каталитических свойств ферментов. Последующие успехи в исследованиях стационарной кинетики двухсубстратных реакций и продолжающееся развитие методов предстационарной кинетики позволяют сейчас сравнительно просто анализировать формальные механизмы многих ферментативных реакций.

МЕХАНИЗМЫ ОДНОТАКТНОГО И ДВУХТАКТНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ

До 50-х годов нашего столетия в большинстве работ, рассматривавших двухсубстратные реакции, предполагалось, что важнейшей особенностью любого ферментативного механизма является образование промежуточного тройного комплекса, состоящего из фермента и обоих субстратов. Выдающимся исключением, однако, была работа Дудорова, Баркера и Хассида [1], в которой были представлены доказательства того, что в ходе реакции, катализируемой фосфорилазой сахарозы, образуется в качестве промежуточного вещества глюкозилированный фермент¹.



В отсутствие фруктозы или другого акцептора глюкозильного остатка этот высокоспецифичный фермент катализирует быструю обменную реакцию между глюкозо-1-фосфатом и радиоактивным неорганическим фосфатом или арсенатом. Так как глюкозиларсенат самопроизвольно гидролизует, суммарная реакция в присутствии арсената представляет собой ферментативный гидролиз глюкозо-1-фосфата.

Расширив и обобщив методы, использованные для установления этого формального механизма, Кошланд [4] создал основу для различения механизмов, названных им однократным и двухкратным замещением. По существу это различие между механизмами, предусматривающими образование тройного комплекса фермента с исходными субстратами, и механизмами, основанными на образовании замещенной формы фермента

¹ Образование такой формы фермента было недавно подтверждено как методами кинетики [2], так и путем выделения самого вещества [3].

в качестве промежуточного соединения (таков, в частности, механизм действия фосфорилазы сахарозы). В механизме первого типа, или механизме однократного замещения, субстраты связываются на ферменте в необходимой близости друг от друга¹, что обеспечивает возможность реакции между ними (фиг. 18). Таким образом, происходит одна реакция — однократное замещение. Механизм двухтактного замещения, или образования замещенной формы фермента, предусматривает, напротив, сначала взаимодействие фермента с одним из субстратов с образованием замещенной формы фермента и одного из продуктов реакции. Далее замещенная форма фермента принимает участие во второй реакции замещения с другим субстратом, что приводит к регенерации фермента и образованию второго конечного продукта реакции.

Критерии экспериментального различения механизмов одно- и двухтактного замещения обсуждались очень широко. Как впервые установил Кошланд, для этого в принципе могут быть использованы метод изотопного обмена и изучение специфичности, принятые при изучении фосфорилазы сахарозы, а также изучение инверсии или сохранения оптической конфигурации субстрата, если его асимметрический центр утрачивается при ферментативной реакции.

Важно заметить, что в случае реакции фосфорилазы сахарозы как глюкозо-1-фосфат, так и сахароза имеют α -конфигурацию. В то же время глюкозил-фермент предположительно имеет β -конфигурацию. Такое предположение следует из общего правила, согласно которому обращение конфигурации имеет место при нечетном числе замещений, а сохранение — при четном, и соответствует результатам других исследований этого фермента.

¹ Фермент может также взаимодействовать сначала с одним из субстратов с образованием двойного комплекса, который затем атакуется вторым субстратом, в результате чего образуется тройной комплекс, у которого время жизни не превосходит времени жизни активированного комплекса, соответствующего теории переходного состояния, или, во всяком случае, не лимитирует общую скорость реакции. Такой механизм носит название механизма Теорелла — Чанса [5]; он также относится к реакциям однократного замещения.

Было установлено, что многие ферменты обнаруживают свойства, согласующиеся с механизмом двухкратного замещения, в том числе высокий каталитический эффект в соответствующей реакции обмена и сохранение оптической конфигурации в продукте реакции. В то же время многие реакции переноса не обнаруживают таких свойств: в продукте реакции происходит обращение конфигурации и не наблюдается обмена в отсутствие одного из субстратов. Так, например, реакция фосфорилазы мальтозы [6] являет собой полный контраст реакции фосфорилазы сахарозы. Для этого фермента в отсутствие акцептора сахара не наблюдается обмена фосфата ни с α -, ни с β -глюкозо-1-фосфатами, а при фосфороллизе мальтозы (α -глюкозилглюкозид) образуется β -глюкозо-1-фосфат, т. е. происходит полное обращение конфигурации. Эти наблюдения свидетельствуют в пользу механизма однократного замещения [6].

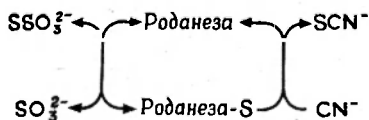


Вообще говоря, такие наблюдения можно рассматривать как хорошие дополнительные данные, помогающие установить, протекает ли данная реакция по механизму одно- или двухкратного замещения. Поскольку любая информация о форме каталитического механизма имеет неопределимое значение для выбора направления дальнейших исследований, полученные при таком подходе результаты существенно повысили интерес к механизмам ферментативного катализа и стимулировали работу в этом направлении.

Бойер [7] и Дженкс [8] высказали ряд заслуживающих внимания критических замечаний относительно слишком широкого использования метода изотопного обмена. Действительно, обмен какой-то части молекулы субстрата может служить доказательством двухкратного механизма лишь при определенных условиях. Применительно к обмену неорганического фосфата в глюкозо-1-фосфате в случае реакции фосфорилазы сахарозы

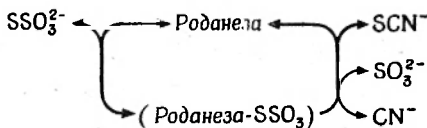
необходимо также убедиться в существовании участка связывания фруктозы и в том, что фосфат, скорее всего, не может его занять. В противном случае обмен был бы возможен и при механизме однократного замещения с фосфатом в качестве акцепторного субстрата; первым субстратом и продуктом реакции был бы тогда глюкозо-1-фосфат. В данном случае в пользу механизма двухтактного замещения убедительно свидетельствуют как необходимость фруктозы для реакции, так и сохранение оптической конфигурации; последнее в случае механизма однократного замещения было бы возможно лишь при так называемой фронтальной атаке, которая считается маловероятной. Но, вообще говоря, в тех случаях, когда наблюдается обмен, выводы, основанные на обсуждавшихся выше критериях, должны учитывать характер специфичности субстрата и малую вероятность фронтальной атаки.

Необходимость проявления должной осторожности при интерпретации данных, полученных методом изотопного обмена, иллюстрирует работа Сёрбо [9], который нашел, что сульфит (SO_3^{2-}) может служить акцепторным субстратом для атома серы, переносимого от тиосульфата ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) при каталитическом действии роданезы. Это наблюдение можно было трактовать как свидетельство в пользу механизма двухтактного замещения, формально аналогичного механизму действия фосфорилазы сахарозы:

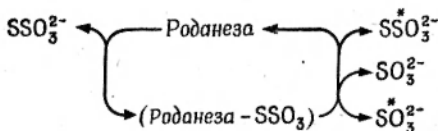


Однако Сёрбо сделал простое предположение, что сульфит является альтернативным акцепторным субстратом в реакции с ферментом, выполняя функцию цианида и формально не участвуя в механизме. С этой точки зрения полученные Сёрбо экспериментальные данные соответствуют механизму Теорелла — Чанса или какому-либо другому механизму однократного замещения в той же степени, как и механизму двухтактного заме-

щения. Без дополнительной информации никаких определенных выводов о формальном механизме реакции сделать было нельзя, несмотря на то, что специфичность роданезы в отношении цианида считалась в то время абсолютной, а сульфит и цианид являются хорошими нуклеофильными агентами для реакции с серой.



или



Из всего сказанного следует, что особенно в тех случаях, когда невозможно использовать конфигурационные критерии, обнаружение реакции обмена (даже с высокой специфичностью для акцепторного субстрата) еще не позволяет сделать окончательный вывод о формальном механизме процесса. Доказательство того, что в основе механизма действия роданезы действительно лежит двухкратное замещение, потребовало дальнейшей экспериментальной работы.

Более того, даже если данные о конфигурации имеются, может оказаться, что предположение о невозможности фронтальной атаки недостаточно убедительно. Рентгеноструктурное исследование комплекса лизоцим — субстрат, например, показывает, что в этой крайне напряженной структуре фронтальная атака возможна [10]. Во всяком случае, нет никаких оснований а priori утверждать, что фронтальная атака не может произойти в активном центре, локализованном в расщелине белковой молекулы, даже если для свободного раствора такой механизм кажется необычным.

Помимо указанной выше неопределенности в интерпретации положительных результатов исследования реакций обмена, объяснение отрицательных результатов также вызывает известные трудности. Действительно, если обмен не происходит, то из одного этого наблюдения нельзя сделать никакого вывода, поскольку наблюдению обмена могло помешать наступление равновесия в первой реакции двухтактного замещения¹. Однако в некоторых случаях такого рода исследование реакций обмена для прямого и обратного направления процесса может все же привести к определенному заключению о механизме. Например, Кошланд [11] нашел, что, во-первых, обмена между мечеными аденозином и адениловой кислотой в присутствии 3'-нуклеотидазы не происходит и, во-вторых, этот фермент не способен катализировать изотопный обмен между неорганическим фосфатом и водой. Предположение о том, что здесь действует механизм двухтактного замещения, прекрасно объясняет эти результаты:



Из результатов первого эксперимента было рассчитано, что $k_{-1} < k_{+2}$. Аналогичным образом из результатов второго эксперимента следовало, что $k_{-2} < 10^{-3}k_{+1}$. Таким образом, чтобы соответствовать этим данным, скорости гидролиза в присутствии фермента при данных условиях и предположению о механизме двухтактного замещения, суммарная константа равновесия должна быть очень большой:

$$K_{eq} = \frac{k_{+2}k_{+1}}{k_{-1}k_{-2}} > 10^3.$$

На самом деле, однако, суммарная константа равновесия имеет величину порядка единицы и, следовательно-

¹ Хотя в принципе обмен можно было бы наблюдать (за исключением случая, когда первая реакция полностью необратима), практически измерение радиоактивности оказывается при этом затруднительным.

но, предположение о механизме двухкратного замещения для этого процесса неверно. Таким образом, отрицательные результаты экспериментов по обмену могут иногда быть использованы для исключения механизмов двухкратного замещения.

По-видимому, самым убедительным способом доказательства механизма двухкратного замещения является выделение замещенной формы фермента из реакционной смеси в условиях, соответствующих протеканию ферментативной реакции, однако в отсутствие второго субстрата. Если удастся это осуществить и показать, что выделенный белок содержит группировку субстрата, подлежащую переносу, но не остаточную группировку донорного субстрата, доказательство может считаться достаточно строгим. Если, помимо того, можно показать, что выделенное промежуточное производное фермента достаточно быстро реагирует с соответствующим вторым субстратом, образуя второй продукт, и, возможно, с первым продуктом, образуя исходный субстрат, доказательство может считаться полным. Все это настолько ясно, что не требует дальнейших разъяснений. Этот метод, однако, применим, далеко не всегда, так как не всегда удается найти заместитель, который давал бы с ферментом продукт, достаточно стабильный для целей выделения. Тем не менее в литературе описано несколько примеров промежуточных производных ферментов, отвечающих всем этим критериям: ацил- α -химотрипсин [12], серусодержащая роданеза [13, 14] и КоА-трансфераза [15, 16].

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

Koshland D. E., Jr., in: W. McElroy, B. Glass (eds.), *Mechanisms of Enzyme Action*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Doudoroff M., Barker H. A., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.*, 168, 725 (1947).
2. Silverstein R., Voet J., Reed D., Abeles R. H., *J. Biol. Chem.*, 242, 1338 (1967).
3. Voet J., Abeles R. H., *Federation Proc.*, 26, 389 (1967).

4. Koshland D. E., Jr., in: W. McElroy, B. Glass (eds.), *Mechanisms of Enzyme Action*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 608.
5. Theorell H., Chance B., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1127 (1951).
6. Fitting C., Doudoroff M., *J. Biol. Chem.*, **199**, 153 (1952).
7. Boyer P. D., *Ann. Rev. Biochem.*, **29**, 15 (1960).
8. Jencks W. P., *Ann. Rev. Biochem.*, **32**, 639 (1963).
9. Sorbo B. H., *Acta Chem. Scand.*, **11**, 628 (1957).
10. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B, **167**, 385 (1967).
11. Koshland D. E., Jr., *Discussions Faraday Soc.*, **20**, 142 (1955).
12. Kezdy F. J., Clement G. E., Bender M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3690 (1964).
13. Green J., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **236**, 3047 (1961).
14. Westley J., Nakamoto T., *J. Biol. Chem.*, **237**, 547 (1962).
15. Hersh L. B., Jencks W. P., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3468 (1967).
16. Hersh L. B., Jencks W. P., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3481 (1967).

ЗАМЕЩЕННЫЕ ФОРМЫ ФЕРМЕНТА И ТРОЙНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

В ранних работах при обсуждении критериев, позволяющих делать выводы о формальных механизмах ферментативных реакций, кинетический подход почти всегда игнорировался. Вместе с тем на основании кинетического анализа двухсубстратной реакции обычно можно с достоверностью установить, протекает ли она через образование третичного комплекса с интактными субстратами или через замещенную форму фермента¹. Основная заслуга в развитии теории стационарной кинетики, необходимом для этих целей, принадлежит Альберти [1, 2], Дальцилю [3, 4], Фридену [5], Клеланду [6] и Уонгу и Хейнсу [7]. Рассмотрев исчерпывающим образом кинетическую схему, достаточно сложную для того, чтобы охватить все возможные разновидности и комбинации двухсубстратных механизмов, Уонг и Хейнс создали твердую базу для экспериментального кинетического анализа подобных систем. Они доказали, в частности, общность и эффективность кинетического метода Дальциля, позволяющего отличать механизмы с замещением фермента от других механизмов ферментативного катализа. Клеланд много сделал для внедрения этого метода в практику экспериментальной работы.

Математические методы, позволяющие осуществлять всесторонний анализ вероятных механизмов реакций, были разработаны Кингом и Альтманом [8] и несколько модифицированы Волькенштейном и Гольдштейном [9]. Последние авторы предложили метод графов, основанный на использовании детерминантов для решения систем уравнений, описывающих механизм реакции.

¹ Для того чтобы облегчить читателю знакомство с литературой в этой области, заметим, что промежуточное соединение в механизме двухтактного замещения, содержащее фермент, соединенный с переносимой группировкой первого субстрата, имеет несколько разных названий — замещенная форма фермента, фермент-субстратное соединение (*не* «комплекс»), ковалентный фермент-субстратный промежуточный продукт.

Хотя метод Кинга и Альтмана — это, несомненно, наилучший метод вывода уравнений скорости реакции для новых механизмов¹, мы не будем рассматривать его подробно по двум причинам: а) подробную сводку уравнений скорости для всех широко распространенных механизмов можно найти в литературе [1—7] и в отличном обзоре Клеланда [10], где систематизированы различные способы обозначения, применяемые большинством авторов; б) нам кажется более важным раскрыть смысл этих уравнений, показав их связь с уравнениями односубстратных реакций, приведенными в первой части книги.

МЕХАНИЗМЫ С ЗАМЕЩЕНИЕМ ФЕРМЕНТА

Кинетический анализ двухсубстратных механизмов, предусматривающих образование замещенных производных фермента (фиг. 17), выявляет две характерные особенности этих механизмов: 1) соответствующие им кинетические графики прямолинейны²; 2) графики, построенные для одного субстрата при различных постоянных концентрациях другого, дают одну и ту же величину отношения K_m^{app}/V^{app} . Таким образом, механизм с замещением фермента формально аналогичен механизму бесконкурентного торможения; метод двойных обратных величин дает семейство параллельных прямых (фиг. 17).

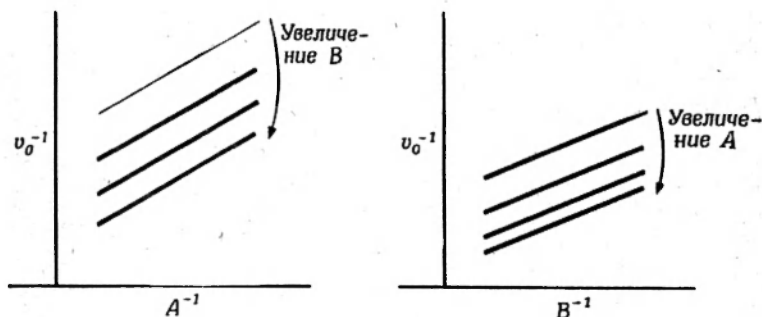
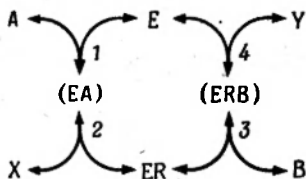
Ключом к пониманию этих свойств является тот факт, что первый продукт реакции отделяется от фермента раньше, чем к нему присоединится второй субстрат, т. е. что мы имеем дело с механизмом двухтактного замещения. Именно благодаря этому реакции первого и второго субстратов разобщены и в начале процесса, когда продукт реакции отсутствует, как те, так и другие практически необратимы. Эта начальная необратимость реакций очень важна, так как вследствие этого удаётся

¹ Подробности этого метода в удобной для применения форме можно найти в книге Малера и Кордеса (см. библиографию).

² За исключением случая ингибирования субстратом, когда, как и в односубстратных реакциях, с субстратом могут связываться две формы фермента.

измерить начальную скорость отщепления продуктов реакции от фермента (начальная концентрация продуктов в растворе равна нулю).

Таким образом, второй субстрат не оказывает прямого воздействия ни на одну реакцию первого субстрата, поскольку его просто нет на ферменте до отделения



Фиг. 17. Схематическое изображение механизма с замещением фермента (синонимы — механизм двухтактного замещения, механизм трансаминазного типа, механизм типа „пинг-понг“) и соответствующие кинетические прямые.

Любое из неустойчивых промежуточных соединений (заклучены в скобки) может быть кинетически незначимым.

первого продукта. Единственное, в чем второй субстрат влияет на кинетическое поведение первого, это эффект, связанный с регенерацией свободного фермента. Так, более высокая концентрация второго субстрата означает только большую долю свободного фермента в E_0 . Формально это аналогично бесконкурентному торможению в односубстратной системе, когда ингибитор лишь *препятствует* регенерации свободного фермента из промежуточного производного фермента.

Допустимость этой формальной аналогии следует из формы кинетических кривых для замещенной формы фермента. Вывод уравнения для начальной скорости (в форме обратных величин) методами стационарной кинетики (см. ниже) приводит к следующему выражению:

$$v_0^{-1} = E_0^{-1} \frac{k_{+2} + k_{+4}}{k_{+2}k_{+4}} \left(\frac{K_m^A}{A} + \frac{K_m^B}{B} + i \right). \quad (34)$$

При графическом представлении зависимости v_0^{-1} от A^{-1} наклон прямой не связан с членами, содержащими B . Аналогично прямые $v_0^{-1} = f(B^{-1})$ имеют один и тот же наклон при различных значениях A . Таким образом, прямые, выражающие зависимость v_0^{-1} от обратной концентрации одного из субстратов (*варьируемый* субстрат) при различных постоянных концентрациях другого субстрата (*фиксированный* субстрат) параллельны. Характерность таких графиков для механизмов с замещением фермента показана на большом числе примеров, а существующая в настоящее время строгая теория кинетического анализа в принципе позволяет исключать в таких случаях все другие мыслимые формы механизмов. Было также показано, что, даже если допустить образование «тупиковых» комплексов (т. е. непродуктивных комплексов В с Е и А с ЕR) в механизме с замещением ферментов, идентификация этой формы механизма не становится менее надежной [11]. Такое характерное двойное конкурентное ингибирование субстратами может даже значительно облегчить обнаружение замещенных форм фермента [12].

Из этих соображений следует, что описанную выше кинетику реакций, протекающих по механизму двухтактного замещения, можно понять как чисто интуитивно, так и на основании анализа характеристического уравнения скорости реакции. Мы надеемся, что нам удастся рассмотреть механизм одноктактного замещения на той же основе. Сначала, однако, убедимся в том, что уравнение (34) действительно отражает данный формальный механизм. Для этого одного случая (не потому, что мы всерьез сомневаемся в правильности уравнения, а для того, чтобы читатель лучше понял суть дела) мы

выведем уравнение скорости, используя точно такой же простой метод, каким было выведено ранее уравнение скорости односубстратной реакции.

Отправляясь от механизма двухтактного замещения, представленного на фиг. 17, мы можем выразить начальную скорость реакции в виде

$$v_0 = k_{+4}(ERB) = k_{+2}(EA). \quad (35)$$

При достаточно большом избытке субстрата по сравнению с ферментом все формы фермента будут находиться в стационарных концентрациях. В начале реакции концентрации обоих продуктов — X и Y — будут равны нулю. В соответствии с этим получаем следующие уравнения для начальной концентрации каждой из форм фермента:

$$\begin{aligned} \frac{d(EA)}{dt} &= k_{+1}AE - k_{-1}(EA) - k_{+2}(EA) = 0, \\ \therefore (EA) &= \frac{k_{+1}AE}{k_{-1} + k_{+2}}. \end{aligned} \quad (36)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(ER)}{dt} &= k_{+2}(EA) - k_{+3}B(ER) + k_{-3}(ERB) = 0, \\ \therefore (ER) &= \frac{k_{+2}(EA) + k_{-3}(ERB)}{k_{+3}B}, \end{aligned} \quad (37)$$

$$\frac{d(ERB)}{dt} = k_{+3}B(ER) - k_{-3}(ERB) - k_{+4}(ERB) = 0.$$

Произведя подстановку из уравнений (36) и (37), получим

$$\overline{(ERB)} = \frac{k_{+3}B(ER)}{k_{-3} + k_{+4}} = \frac{k_{+3}B \frac{[(k_{+2}k_{+1}AE)/(k_{-1} + k_{+2})] + k_{-3}(ERB)}{k_{+3}B}}{k_{-3} + k_{+4}},$$

откуда

$$(ERB) = \frac{k_{+2}k_{+1}AE}{k_{+4}(k_{-1} + k_{+2})}. \quad (38)$$

Тогда из уравнения (35) следует

$$v_0 = k_{+4} = \frac{k_{+2}k_{+1}AE}{k_{+4}(k_{-1} + k_{+2})}. \quad (39)$$

Уравнение (39) имеет весьма простой вид, но его неудобство состоит в том, что в него входит концентрация

свободного фермента, а не общая его концентрация. Воспользуемся уравнением постоянства суммы концентраций всех форм фермента

$$E_0 = E + (EA) + (ER) + (ERB), \quad (40)$$

в котором (EA) дается уравнением (36), (ER) — уравнением (37) и (ERB) — уравнением (38). Тогда

$$E = \frac{E_0}{1 + \frac{k_{+1}A}{k_{-1} + k_{+2}} + \frac{k_{+1}k_{+2}A}{k_{+3}B(k_{-1} + k_{+2})} + \frac{k_{+1}k_{+2}k_{-3}A}{k_{+3}k_{+4}B(k_{-1} + k_{+2})} + \frac{k_{+1}k_{+2}A}{k_{+4}(k_{-1} + k_{+2})}} \quad (41)$$

Умножив числитель и знаменатель правой части уравнения (41) на $k_{+3}k_{+4}B(k_{-1} + k_{+2})$ и подставив ее в уравнение (39), мы получим

$$v_0 = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}ABE_0}{k_{+3}k_{+4}B(k_{-1} + k_{+2}) + k_{+1}k_{+3}k_{+4}AB + k_{+1}k_{+2}A(k_{-3} + k_{+4}) + k_{+1}k_{+2}k_{+3}AB} \quad (42)$$

Уравнение вида (42) в обратных величинах будет иметь вид

$$v_0^{-1} = E_0^{-1} \left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}k_{+2}A} + \frac{k_{-3} + k_{+4}}{k_{+3}k_{+4}B} + \frac{k_{+2} + k_{+4}}{k_{+2}k_{+4}} \right), \quad (43)$$

или, если придать ему форму уравнения (34),

$$v_0^{-1} = E_0^{-1} \frac{k_{+2} + k_{+4}}{k_{+2}k_{+4}} + \left(\frac{K_m^A}{A} + \frac{K_m^B}{B} + 1 \right),$$

где

$$K_m^A = \frac{k_{+4}(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+1}(k_{+2} + k_{+4})}$$

и

$$K_m^B = \frac{k_{+2}(k_{-3} + k_{+4})}{k_{+3}(k_{+2} + k_{+4})}.$$

Эти выражения для K_m имеют более сложный вид, чем в случае рассмотренной выше односубстратной реакции, но они имеют аналогичное функциональное значение; например, K_m^A означает концентрацию субстрата А, при которой скорость реакции равна половине мак-

симальной скорости в присутствии насыщающей концентрации субстрата В. Следует заметить, что максимальная скорость для данной системы определяется выражением

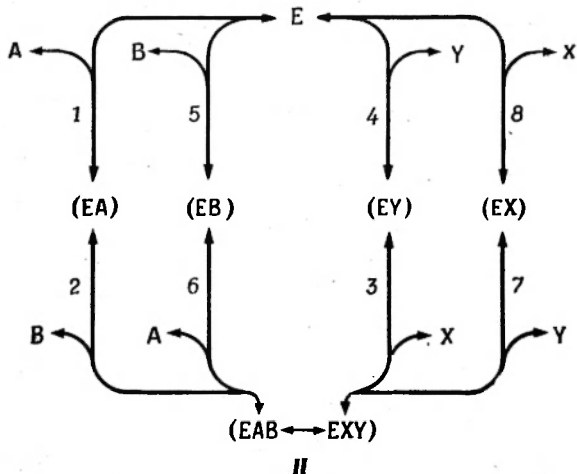
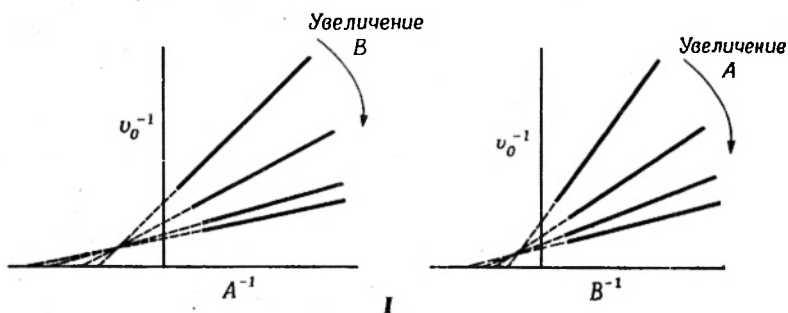
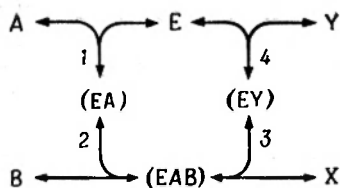
$$V = E_0 \frac{k_{+2}k_{+4}}{k_{+2} + k_{+4}}$$

Приведенный вывод, помимо того, что он подтверждает справедливость уравнения (34), показывает, что уравнение скорости двухсубстратной реакции можно получить совершенно таким же путем, как и уравнение для односубстратной реакции. Лишь выкладки станут значительно более громоздкими.

МЕХАНИЗМЫ С ОБРАЗОВАНИЕМ ТРОЙНОГО КОМПЛЕКСА

Как и в случае механизма с замещением фермента, все механизмы, характеризующиеся обязательным образованием тройного комплекса, можно проанализировать так же, как и механизмы с участием модификатора, разобранные в одной из предыдущих глав.

Рассмотрим случай, когда роль модификатора Q играет второй субстрат В. На фиг. 18, I показана схема упорядоченного механизма реакции (т. е. механизма с обязательной последовательностью присоединения субстратов), при котором образование продукта реакции и регенерация свободного фермента происходят при распаде тройного комплекса фермента с обоими субстратами. В терминах механизма односубстратной реакции это означает, что константа скорости распада (EA) с образованием продукта реакции и свободного фермента равна нулю и максимальная скорость определяется другими мономолекулярными стадиями. Здесь очевидна формальная аналогия со случаем неконкурентного ингибирования односубстратной реакции с той лишь разницей, что в данном случае реакция (EA) с В ускоряет, а не ингибирует образование продуктов. Помимо этого, рассматриваемый механизм отличается от механизма с замещением фермента тем, что реакции 1 и 2 в данном случае не разобщены в результате процесса освобождения продукта. Таким образом, как



Фиг. 18.

I. Схематическое изображение упорядоченного механизма с образованием тройного комплекса (синонимы — механизм однократного замещения, механизм дегидрогеназного типа, последовательный механизм) и соответствующие кинетические прямые. Некоторые неустойчивые промежуточные соединения (заключены в скобки) могут быть кинетически незначимыми. II. Общая (неупорядоченная) форма механизма с образованием тройного комплекса, предусматривающая возможность различной последовательности присоединения субстратов к ферменту при образовании комплекса, а также возможность изомеризации этого комплекса.

(EA), так и E изменяются под влиянием B . Уравнение стационарной скорости реакции для обсуждаемого механизма имеет вид

$$v_0^{-1} = E_0^{-1} \frac{k_{+3} + k_{+4}}{k_{+3}k_{+4}} \left[\frac{K_m^A}{A} + \frac{K_m^B}{B} + \frac{k_{-1}k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})}{k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4})AB} \right]. \quad (44)$$

Оно отличается от уравнения (34) главным образом тем, что в нем появляется член, содержащий концентрации обоих субстратов. Вследствие этого наклон прямых $v_0^{-1} = f(A^{-1})$, $v_0^{-1} = f(B^{-1})$ и отрезки, отсекаемые ими на осях координат, изменяются при изменении B и A соответственно. Характерный вид прямых для начальных скоростей показан на фиг. 18.

Если не считать этого последнего члена уравнения, оба уравнения очень сходны. Член

$$E_0 \frac{k_{+3}k_{+4}}{k_{+3} + k_{+4}}$$

в уравнении (44) выражает максимальную скорость реакции для упорядоченного механизма с образованием тройного комплекса. Так же как и для механизма с замещением фермента, величины K_m — это концентрации субстрата, соответствующие скорости реакции, равной половине максимальной, при условии насыщения фермента вторым субстратом:

$$K_m^A = \frac{k_{+3}k_{+4}}{k_{+1}(k_{+3} + k_{+4})} \quad \text{и} \quad K_m^B = \frac{k_{+4}(k_{-2} + k_{+3})}{k_{+2}(k_{+3} + k_{+4})}.$$

Интересно и полезно заметить, что прямые, вычерченные по методу двойных обратных величин для случая, когда A изменяется, а B поддерживается на нескольких различных постоянных уровнях, образуют семейство, пересекающееся в точке, соответствующей такому взаимодействию A и фермента, на которое B не влияет. Действительно, абсцисса этой точки равна $-1/K_S^A$, т. е. $-K_1$. Второй субстрат, вообще говоря,

влияет на K_m^A , но, разумеется, не на K_S^A ¹. Использовать этот факт для оценки константы равновесия (K_S) можно, естественно, лишь при условии, что известно, какой субстрат является первым, т. е. присоединяется к свободному ферменту (см. ниже).

Существуют также более сложные формы механизмов с образованием тройного комплекса, изображенные на фиг. 18, II. На этой схеме показана возможность образования тройного комплекса двумя различными путями: присоединение В после А и присоединение А после В. Учтено также возможное различие в очередности выделения продуктов реакции в раствор. И наконец, показано образование двух тройных комплексов — одного, состоящего из фермента и двух субстратов, и другого, состоящего из фермента и двух продуктов. Таким образом, эта схема выражает самую общую форму механизма с тройным комплексом, которая упрощается в описанную выше упорядоченную форму, когда суммарная скорость на пути 1—4 значительно превосходит скорость на пути 5—8, а скорость взаимопревращения третичных комплексов превосходит скорость реакции 3 или 4 или их суммарную скорость.

Вообще говоря, неупорядоченный механизм, изображенный на фиг. 18, II, не дает нормальной кинетической кривой в виде гиперболы; графики кинетических уравнений, подвергнутых обычным линейным преобразованиям, оказываются не прямолинейными. Для всех линейных (неразветвленных) механизмов любой из используемых обычно способов графического представления кинетических данных дает прямые линии, так как концентрации субстратов входят в уравнения только в первой степени. О таких механизмах говорят, что они имеют первый порядок по субстрату. Но механизмы с точками разветвления, предусматривающие возможность существования нескольких форм фермента, с которыми может реагировать определенный субстрат на пути к продукту реакции, имеют второй или еще

¹ Снова напомним, что K_m^A определяется через различные константы скорости, тогда как K_S^A представляет собой просто константу диссоциации комплекса фермента с А.

более высокий порядок по этому субстрату. Отсюда следует, что таким механизмам могут соответствовать криволинейные графики. Вместе с тем существуют условия, при которых криволинейность таких графиков *не будет* заметна. Одно из таких условий — быстрое установление равновесия между всеми формами, кроме двух тройных комплексов.

При построении графиков двойных обратных величин для такого неупорядоченного механизма с быстрым установлением равновесия получаются прямые, пересекающиеся слева от оси ординат. Это семейство прямых для начальных скоростей нельзя отличить от прямых, характеризующих механизм с упорядоченным образованием тройного комплекса, так как уравнение скорости реакции в обоих случаях имеет одну и ту же форму. Но эти два формальных механизма можно различить, исследуя ингибирование продуктом реакции (см. ниже).

Если, помимо быстрого наступления равновесия, присоединение каждого субстрата к ферменту *полностью* независимо от присоединения другого субстрата, точка пересечения графиков двойных обратных величин лежит на оси абсцисс. Пересечение прямых выше оси абсцисс свидетельствует о том, что присоединение фиксированного субстрата облегчает присоединение варьируемого субстрата; пересечение прямых ниже оси абсцисс говорит о том, что присоединение одного субстрата затрудняет присоединение другого. Таким образом, полная независимость присоединения упрощает общее уравнение скорости реакции для механизма с быстрым установлением равновесия:

$$\frac{V}{v_0} = \left(\frac{K_m^A}{A} + 1 \right) \left(\frac{K_m^B}{B} + 1 \right) \quad \text{или} \quad v_0 = \frac{AV / (BK_2 + 1)}{K_1^{-1} + A}.$$

Вторая форма уравнения идентична уравнению (21), приведенному в гл. IV, которое было получено для чисто неконкурентного механизма в односубстратной равновесной реакции при действии ингибитора или активатора. Здесь, как и при анализе семейства прямых, мы снова встречаемся с формальной аналогией между

неконкурентным поведением и механизмом, предполагающим образование тройного комплекса.

Известны и другие условия, при которых механизмы с неупорядоченным присоединением субстратов характеризуются прямолинейными кинетическими графиками. Келланд заметил, что при известных обстоятельствах члены кинетических уравнений, содержащие концентрации субстратов в высших степенях, полностью сокращаются. Во многих случаях эти члены, входящие как в числители, так и в знаменатели уравнений, столь малы, что обнаружить кривизну графиков практически невозможно. Эта ситуация частично напоминает рассмотренный Рейнером [13] случай кривизны графика, построенного по данным для односубстратной системы со смесью ферментов, действующих на один и тот же субстрат. Автор сделал вывод, что величины K_m для двух ферментов должны различаться вдвое, чтобы кривизна была заметной.

Термин «механизмы с тройным комплексом» не означает, что все механизмы, дающие пересекающиеся кинетические прямые, включают образование *кинетиически значимых* тройных комплексов. Рассмотрим упорядоченный механизм, схема которого изображена на фиг. 18, I. Предположим, что стадия 3 является очень быстрой, а стадия 4 очень медленной (механизм Теорелла — Чанса). В этих условиях максимальная скорость будет определяться стадией 4 и концентрация тройного комплекса будет очень низкой даже при максимальной скорости реакции. Короче говоря, образование тройного комплекса не будет иметь существенного значения для кинетики реакции в обычном смысле слова. Однако графики начальных скоростей будут при этом пересекаться, как и в случае механизма с тройным комплексом. Уравнение скорости реакции будет по форме таким же, как и уравнение (44), однако смысл кинетических коэффициентов будет иным:

$$v_0^{-1} = E_0^{-1} \frac{1}{k_{+4}} \left(\frac{K_{m1}^A}{A} + \frac{K_m^B}{B} + 1 + \frac{k_{-1}k_{+4}}{k_{+1}k_{+2}AB} \right).$$

Константы Михаэлиса сохраняют свой практический смысл, но в этом случае $K_m^A = k_{+4}/k_{+1}$, $K_m^B = k_{+4}/k_{+2}$ и

$V = k_{+4}E_0$. Некоторые способы, позволяющие различать эти варианты механизмов с тройным комплексом, разбираются в гл. IX и X.

Вполне возможно также (и даже весьма вероятно), что все механизмы такого рода включают образование множества различных тройных комплексов. Такие комплексы могут образовываться либо одновременно, как, например, комплексы с «ошибочной ориентацией» (см. часть первую), либо последовательно один за другим по мере превращения субстратов в продукты реакции. Для последнего случая Блумфильд и сотр. [2] показали, что форма уравнения скорости реакции не зависит от числа промежуточных соединений, а величины констант скоростей, вычисленные на основании предположения о минимальном числе стадий, дают нижнюю оценку их истинной величины. Этот вывод верен также для случая механизма с замещением фермента.

Тщательному рассмотрению был подвергнут вопрос о том, при каких условиях механизм с образованием тройного комплекса может давать параллельные графики двойных обратных величин аналогично механизму с замещением фермента [14, 15]. Это могло бы, например, наблюдаться в том случае, если бы необратимость образования комплекса фермента с первым субстратом в механизме с тройным комплексом объяснялась какими-либо иными причинами, а не освобождением фермента от продукта реакции при нулевой концентрации продукта в растворе, как в механизме с замещением фермента. Довольно трудно представить себе обстоятельства, в которых это было бы в принципе затруднительно, и может, конечно, случиться, что имеющиеся данные о начальных скоростях процесса недостаточны для суждения о формальном механизме. Вероятно, в большинстве подобных случаев удобно использовать такие способы построения графиков (v_0 как функция v_0/A или A/v_0 как функция A), при которых отношение кажущихся величин K_m и V можно найти по величине отрезков на осях координат, а не по наклону прямых. Слейтер [16] предложил использовать иной метод — вычерчивать зависимость K_m^{app} от V^{app} , что в случае механизма с замещением фермента дает прямую,

проходящую через начало координат (при этом кажущиеся кинетические коэффициенты строго пропорциональны). Для оценки этих кажущихся коэффициентов удобно использовать статистические методы [17]. Костер и Вигер [14] нашли, что в таких случаях полезно ввести в систему какой-либо конкурентный ингибитор (в постоянной концентрации) при заданной концентрации субстрата.

Выше несколько раз отмечалось, что кинетическая информация может быть обесценена, если неизвестно, какой субстрат присоединяется к ферменту первым. Чтобы выяснить это, можно использовать два способа: изучение ингибирования продуктом реакции и изучение кинетики реакции со смесью субстратов. Суть первого метода иллюстрирует схемы, приведенные на фиг. 17 и 18; они показывают, что как в случае механизма с замещением фермента, так и в случае упорядоченного механизма с образованием тройного комплекса только первый субстрат и последний продукт реакции конкурируют друг с другом. Далее, только в случае механизма с замещением фермента, когда субстраты реагируют с ферментом в районе одного активного центра, первый продукт должен конкурировать с каким-либо субстратом, в данном случае (фиг. 17) со вторым субстратом. По этим соображениям определение начальной скорости процесса в присутствии каждого из продуктов реакций должно быть весьма полезным¹. При планировании таких экспериментов и их интерпретации должны быть получены ответы на следующие три вопроса:

1. *Наблюдается ли* в этих условиях ингибирование? Иначе говоря, сохраняется ли уменьшение v_0 при поддержании насыщающей концентрации фиксированного субстрата (субстратов)?
2. *Если да*, то изменяется ли V ? Иными словами, уменьшается ли v_0 даже при насыщающей концентрации варьируемого субстрата? *Если V не изменяется*, ингибирование является конкурентным.

¹ Этот метод полезен также для подтверждения выводов, основанных на оценке начальных скоростей, и для различения отдельных видов механизма с тройным комплексом. Некоторые примеры такого анализа даются в следующих главах.

3. Если V изменяется, то изменяется ли в той же степени и K_m ? Иначе говоря, разобщены ли¹ реакция с ингибитором и реакция с варьируемым субстратом? Если K_m меняется в той же степени, то ингибирование бесконкурентное, *если нет* — неконкурентное.

Клеланд [6] подчеркивает исключительную важность таких исследований. Во второй своей статье из той же серии Клеланд детально рассматривает кинетику ингибирования продуктом реакции; но особенно интересна его третья статья, в которой прогнозируется вид кинетических зависимостей для начальных скоростей реакции.

Второй метод, разработанный Уонгом и Хейнсом [7], основан на использовании смесей субстратов. Рассмотрим, что произойдет, если в случае упорядоченного механизма для субстратов А и В будет использоваться смесь из двух субстратов, родственных А, которые мы назовем A_1 и A_2 . Если А реагирует с ферментом первым, то субстрат В должен будет взаимодействовать с двумя формами фермента (A_1E) и (A_2E). В результате реакция будет иметь второй порядок по В и стандартные графики будут криволинейными, если только случайно не окажется, что A_1 и A_2 оказывают одинаковое влияние на K_m^B . Если же А является вторым субстратом и В реагирует со свободным ферментом, порядок реакции возрастать не будет. Таким образом можно выяснить последовательность присоединения субстратов к ферменту. Этот метод не применим в случае механизма с замещением фермента, поскольку при таком механизме оба субстрата не бывают одновременно связаны с ферментом. Следует заметить, что при использовании этого теста для выявления первого субстрата в упорядоченном механизме с образованием тройного комплекса отсутствуют упомянутые выше трудности,

¹ Кинетическое разобшение обуславливается тем, что механизм осложняется какой-то побочной реакцией — либо отщеплением продукта реакции от фермента при нулевой концентрации продукта в растворе, либо присоединением субстрата, присутствующего в насыщающей концентрации. Это разобшение имеет тот же смысл, что и разобшение двух половин процесса в механизме двухтактного замещения, обусловленное отщеплением первого продукта от фермента.

связанные с обнаружением кривизны кинетических графиков. Возможность варьировать отношение субстратов в смеси и проводить прямое сравнение кинетических данных, полученных на одной и той же системе в опытах со смешанными субстратами и в опытах с единственным субстратом, позволяет найти такие условия, при которых кривизна будет достаточно заметной.

В заключение необходимо упомянуть об использовании «соотношения Холдейна» для различения разновидностей механизма с тройным комплексом. В выражение для суммарной константы равновесия любой обратимой ферментативной реакции входят не только максимальные скорости прямой и обратной реакции, но и значения констант Михаэлиса. Для простой односубстратной реакции соотношение Холдейна имеет вид

$$K_{eq} = \frac{(K_{m-}) V_{+}}{(K_{m+}) V_{-}},$$

где знаки «+» и «-» означают прямую и обратную реакции соответственно. Для двухсубстратных реакций соотношения Холдейна имеют более сложную форму, но некоторые из них можно все же использовать для отнесения механизма реакции к той или иной разновидности. Вид соотношений Холдейна применительно к различным механизмам двухсубстратных реакций можно найти у Альберти [1, 2], Дальциля [3], Уонга и Хейнса [7] и Клеланда [6].

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Mahler H. R., Cordes E. H., Biological Chemistry, Harper and Row, New York, 1966. (Маллер Г., Кордес Ю., Основы биологической химии, изд-во «Мир», М., 1970.)
 Dixon M., Webb E. C., Enzymes, 2nd ed., Academic, New York, 1964. (Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, изд-во «Мир», М., 1966.)
 Fisher J. R., Hoagland V. D., Jr., A Systematic Approach to Kinetic Studies of Enzyme Systems, Bulletin No. 26, Division of Biology and Medicine, U. S. Atomic Energy Commission.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Alberty R. A., Advan. Enzymol., 17, 1 (1956).
2. Bloomfield V., Peller L., Alberty R. A., J. Am. Chem. Soc., 84, 4367 (1962).

3. Dalziel K., *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706 (1957).
4. Dalziel K., *Trans. Faraday Soc.*, **54**, 1247 (1958).
5. Frieden C., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1894 (1957).
6. Cleland W. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 173, 188 (1963).
7. Wong J. T., Hanes C. S., *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 763 (1962).
8. King E. L., Altman C., *J. Phys. Chem.*, **60**, 1375 (1956).
9. Волькенштейн М. В., Гольдштейн Б. Н., *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 471 (1966).
10. Cleland W. W., *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 77 (1967).
11. Volini M., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5168 (1966).
12. Grisolia S., Cleland W. W., *Biochemistry*, **7**, 1115 (1968).
13. Reiner J. M., *Behavior of Enzyme Systems*, Burgess, Minneapolis, 1959, pp. 99—102.
14. Koster J. F., Veeger C., *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 11 (1968).
15. Copley M., Fromm H. T., *Biochemistry*, **6**, 3503 (1967).
16. Slater E. C., *Discussions Faraday Soc.*, **20**, 231 (1955).
17. Cleland W. W., *Advan. Enzymol.*, **29**, 1 (1967).

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА ДВУХСУБСТРАТНЫХ РЕАКЦИЙ МЕТОДАМИ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

В предыдущей главе было показано, что во многих случаях механизм ферментативной реакции можно установить, исследуя ее кинетику. Для этого определяют начальную скорость реакции при нескольких различных концентрациях одного субстрата А, сохраняя концентрацию другого субстрата, В, постоянной, а затем проводят те же измерения при различных концентрациях В. Результаты таких измерений, выраженные в виде графиков¹, позволяют судить о типе механизма. Чтобы изучить механизм реакции более детально и, в частности, установить число кинетически значимых фермент-субстратных комплексов и последовательность реакций с субстратами, изучают таким же образом кинетику обратной реакции или же выясняют, как влияют на прямой процесс отдельные продукты реакции или аналоги субстратов.

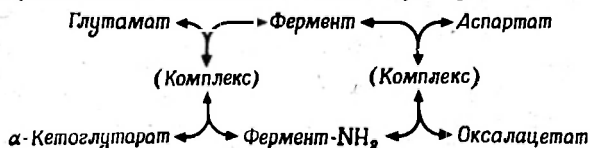
Ниже будут рассмотрены эксперименты, иллюстрирующие применение этих методов; более детальные сведения читатель может найти в оригинальных работах. Сейчас в литературе публикуется множество подобных исследований, и ввиду ценности метода их число, безусловно, будет неуклонно возрастать. Помимо методов стационарной кинетики, основанных на измерении начальных скоростей химических изменений системы, сейчас применяются методы измерения начальных скоростей изотопного обмена при химическом равновесии, которые дают в общем такую же информацию, а в некоторых случаях позволяют получить и ряд добавочных сведений о деталях механизма. В одной из рассмотрен-

¹ Существуют несколько способов графического представления результатов, однако в принципе все эти формы равнозначны. Кле-ланд, например, использует двойные обратные величины, сохраняя переменные разделенными, тогда как Уонг и Хейнс предпочитают вычерчивать зависимость v_0/A от А. Другие авторы считают более полезными графики зависимости v_0 от v_0/A . При использовании вычислительных машин все эти способы эквивалентны.

ных ниже работ, в которой изучался механизм трехсубстратной реакции, протекающей с образованием трех продуктов, были использованы оба метода.

ГЛУТАМАТ — ОКСАЛОАЦЕТАТ-ТРАНСАМИНАЗА

Хорошей иллюстрацией применения аналитического метода стационарной кинетики служит работа Хенсона и Клеланда [1] по изучению глутамат—оксалоацетат-трансминазы. Кинетический механизм этой реакции относится к типу механизма с замещением фермента. Графики двойных обратных величин, построенные для каждого субстрата при разных концентрациях другого субстрата, имеют вид параллельных прямых. При изучении этой легко обратимой реакции как в прямом, так и в обратном направлениях результаты оказываются одинаковыми. Было исследовано также ингибирование процесса продуктами реакции с целью выяснить кинетическую значимость обоих возможных двойных комплексов. Оказалось, что обе кетокислоты строго конкурируют друг с другом и обычно не конкурируют с аминокислотами, и наоборот. Было также показано, что при высокой концентрации α -глутарата фермент образует «тупиковый» комплекс с этим субстратом.



Полученные позже результаты подтвердили правильность уравнений Холдейна (уравнений, устанавливающих соотношение кинетических констант и суммарной константы равновесия), выведенных для механизма с замещением фермента. Эти представления о механизме реакции, полученные на основе использования кинетических методов, согласуются с результатами многих других исследований этого фермента.

КРЕАТИНКИНАЗА

Моррисону и Джеймсу [2] принадлежит отличное исследование механизма с образованием тройного комплекса для реакции, катализируемой креатинкиназой.

Эта реакция также легко обратима. При ее исследовании в обоих направлениях установлено, что графики двойных обратных величин пересекаются, как того требует механизм с тройным комплексом, независимо от того, концентрация какого субстрата варьирует. В таких случаях, однако, необходимо дальнейшее уточнение относительных величин различных констант скоростей, поскольку пересечение кинетических прямых характерно также для механизма Теорелла — Чанса, т. е. для случая, когда время жизни тройного комплекса ничтожно мало с кинетической точки зрения, а реальное значение имеет только образование двух двойных комплексов — начальных фермент-субстратных комплексов для двух направлений реакции. Моррисон и Джеймс исключили возможность механизма Теорелла — Чанса для креатинкиназы, опираясь на полученные ими данные об ингибировании прямого и обратного процессов продуктами реакции. Они показали, что кажущиеся ингибиторные константы, характеризующие некоторые реакции конкурентного ингибирования продуктом (нуклеотид — нуклеотид или гуанидинсодержащее соединение — гуанидинсодержащее соединение), зависят от концентрации фиксированного субстрата. Этот результат согласуется с механизмом, при котором все реакции, кроме взаимопревращения двух центральных тройных комплексов, быстро достигают равновесия, но не согласуется с механизмом Теорелла — Чанса.



(Порядок смешения реагентов не имеет значения для образования комплексов.)

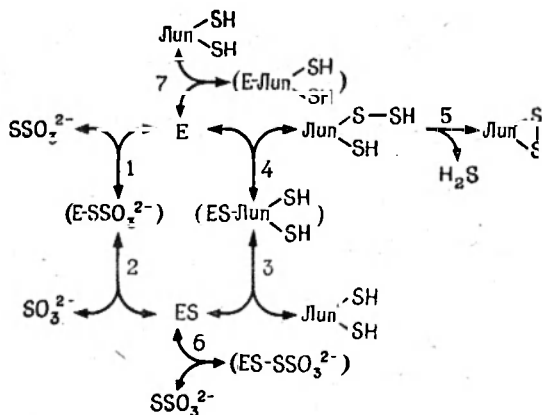
Данные об ингибировании продуктами реакции не соответствуют также обычному упорядоченному механизму (т. е. механизму, при котором субстраты взаимодействуют с ферментом в строго определенной последовательности) или упорядоченному механизму, содержащему стадии образования тупиковых комплексов.

Так же как в предыдущем случае, кинетические исследования приводят к тем же представлениям о механизме действия этого фермента, что и исследования, проведенные другими методами, в том числе методом изотопного обмена [3].

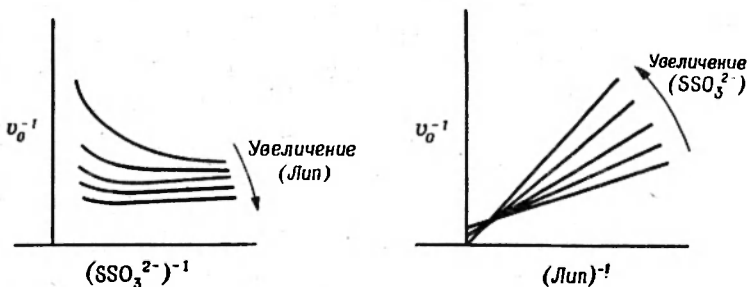
РОДАНЕЗА

Рассмотрим еще один пример использования метода стационарной кинетики для анализа механизма двухсубстратной реакции, который покажет, что не всегда требуется изучать кинетику реакции в обоих направлениях или кинетику ингибирования продуктом реакции. Волини и Уэстли [4] опубликовали результаты кинетического исследования взаимодействия липоата с тиосульфатом, катализируемого роданезой. Эта реакция практически необратима вследствие быстрого самопроизвольного распада продукта реакции — липоатперсульфида [5]. Ее механизм относится к типу механизмов с замещением фермента, о чем свидетельствует образование обоих возможных двойных фермент-субстратных комплексов, продемонстрированное кинетически. Механизм осложнен также образованием непродуктивных тупиковых комплексов с обоими субстратами.

Данные, на основании которых был установлен этот механизм, приведены на фиг. 19. При низких постоянных концентрациях одного из субстратов графики двойных обратных величин для другого субстрата прямолинейны и почти параллельны, как в случае простого механизма с замещением фермента. При возрастании концентрации фиксированного субстрата наблюдается конкурентное ингибирование, вызывающее соответствующий сдвиг графиков. На графиках зависимости v_0^{-1} от B^{-1} наблюдается картина, характерная для субстратного ингибирования, особенно при низких значениях A . Те же данные, вычерченные в виде зависимости v_0^{-1} от A^{-1} , показывают, что при более высоких значениях B эффект конкурентного ингибирования накладывается на простое смещение параллельных линий, вызываемое большими концентрациями фиксированного субстрата.



$$E_0/v_0 = k_{+2}^{-1} + k_{+4}^{-1} + \frac{1}{(SSO_3^{2-})} \left[\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1} k_{+2}} + \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1} k_{+2}} \cdot \frac{k_{+7}}{k_{-7}} (Lip) \right] + \frac{1}{(Lip)} \left[\frac{k_{-3} + k_{+4}}{k_{+3} k_{+4}} + \frac{k_{-3} + k_{+4}}{k_{+3} k_{+4}} \cdot \frac{k_{+6}}{k_{-6}} (SSO_3^{2-}) \right]$$



Фиг. 19. Схема реакции тиосульфата с липоатом, катализируемой роданезой, уравнения стационарной скорости реакции и соответствующие кинетические прямые [4].

(Лип) означает концентрацию восстановленного липоата. Приведенные прямые относятся к области низких значений рН (< 9), в которой преобладает ингибирование реакции тиосульфатом. Аналогичные результаты получены в области больших значений рН (> 10), в которой преобладает ингибирование липоатом.

Полученные кинетические данные характерны для механизма с замещением фермента, при котором два субстрата мешают друг другу. Никакой механизм с образованием тройного комплекса — включающий или не включающий конкурентные процессы ингибирования субстратом — не может давать такой кинетики.

В этой работе был получен также ответ на вопрос, образуется ли в ходе реакции один или два продуктивных двойных комплекса. Для этого был использован метод аналогов субстрата, развитый Уонгом и Хейнсом [6]. С самого начала было ясно, что по крайней мере один двойной комплекс должен образоваться, поскольку в противном случае максимальная скорость реакции должна была бы расти безгранично с увеличением концентрации обоих субстратов, а этого не происходило¹.

Если в катализируемой роданезой реакции с цианидом (играющим роль акцептора серы) использовать в качестве донора серы другой субстрат — метантиосульфат, то максимальная скорость оказывается значительно более высокой, чем при использовании тиосульфата [7]. Поскольку независимо от природы донорного субстрата образуется одна и та же серусодержащая замещенная форма фермента и последующие стадии процесса также одинаковы, указанное выше наблюдение совершенно ясно говорит о том, что распад двойного комплекса фермент — тиосульфат оказывает существенное кинетическое влияние на максимальную скорость реакции, протекающей с участием тиосульфата. Аналогичным образом было показано образование двойного комплекса замещенной формы фермента с дигидролипоатом; с этой целью сравнивали величины максимальной скорости для реакции с участием различных субстратов — акцепторов серы и тиосульфатом в качестве донора [4]. При $\text{pH} < 9$ максимальная скорость реакции с дигидролипоатом оказалась значительно ниже, чем

¹ Максимальные скорости должны лимитироваться мономолекулярными стадиями процесса, т. е. реакциями распада фермент-субстратных комплексов. Скорости, лимитируемые бимолекулярными стадиями, должны всегда расти с увеличением концентраций реагентов и, следовательно, не могут быть максимальными скоростями.

реакции с цианидом, что еще раз подтверждает образование кинетически значимого комплекса при участии в процессе дигидролипоата, когда реакция характеризуется меньшей максимальной скоростью.

Как и в случае других ферментов, о которых шла речь выше, формальный механизм действия роданезы (показанный на фиг. 19, где приведено также уравнение начальной скорости реакции, выведенное для этого механизма методом стационарной кинетики) согласуется с результатами, полученными другими методами. Как упомянуто в гл. VII, серусодержащее замещенное производное роданезы было выделено и стехиометрия реакции для субстратов и продуктов была исследована непосредственно.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОТОПНОГО РАВНОВЕСИЯ

Кинетическая теория начальных скоростей перераспределения изотопа при химическом равновесии была развита Бойером [8, 9]. Альберти и его коллегами [10], а также Уонгом и Хейнсом [11]. В дальнейшем метод исследования изотопного равновесия был использован в целом ряде работ.

Бойер и его сотрудники исследовали изотопный обмен в различных двухсубстратных ферментативных реакциях, которые были достаточно детально исследованы методами стационарной кинетики [12—15]. Моррисон и Келланд [3] изучили изотопный обмен в креатинкиназной реакции и получили данные, которые расширили представление о ее механизме, полученное при исследовании стационарной кинетики (см. выше). Розе и др. [16] с помощью этого метода окончательно установили, что реакция, катализируемая мышечной альдолазой, основана на механизме с замещением фермента. Дальцилю и Дикинсону [17] принадлежит особенно интересная работа, в которой для исследования алкогольдегидрогеназы печени были использованы и методы стационарной кинетики, и методы изотопного обмена. Было установлено, что если субстратами являются вторичные спирты, то максимальная скорость реакции лимитируется распадом тройного комплекса,

содержащего фермент и кофермент. В случае же первичных спиртов тройной комплекс реагирует столь быстро, что стационарная кинетика соответствует механизму Теорелла — Чанса. Исследования изотопного обмена подтвердили этот вывод.

Исследование, рассмотренное в конце этой главы, касается ферментативной реакции, в которой участвуют три субстрата и образуются три продукта. Эта работа представляет особый интерес, так как до сих пор не было опубликовано ни одного исчерпывающего анализа механизмов такой степени сложности методами стационарной кинетики. Приведенные авторами данные об изотопном обмене согласуются с результатами, полученными методами стационарной кинетики, что убедительно подтверждает правильность постулированного механизма этой ферментативной реакции.

Метод изотопного обмена, разработанный Бойером, основан на введении следовых количеств интенсивно меченого субстрата в систему, содержащую фермент и субстрат и находящуюся в равновесии. Концентрации субстратов и продуктов реакции при этом, конечно, не изменяются. Задача сводится к измерению начальной скорости появления метки в продуктах реакции. Преимущество такой системы заключается в том, что она находится в химическом равновесии; это упрощает теоретический анализ вообще, а также анализ тех случаев, когда растворитель принимает участие в реакции.

В принципе получаемые данные не отличаются существенно от того, что дает обычный метод измерения начальных скоростей [10], но они содержат все же некоторую информацию, которую нельзя было бы получить, пользуясь одним только методом стационарной кинетики¹.

С помощью этого метода анализ механизмов образования тройных (или четверных) комплексов может проводиться в трех основных направлениях. Во-первых,

¹ Некоторые дальнейшие соображения об исследованиях изотопного обмена будут изложены в гл. X. См. также первую ссылку в списке общей литературы к этой главе.

метод может служить весьма чувствительным тестом, позволяющим отличать полностью неупорядоченный механизм от механизма, в котором имеется некоторый элемент упорядоченности. При неупорядоченном механизме все скорости изотопного обмена по мере роста концентрации любого субстрата должны стремиться к максимуму (если только не образуются тупиковые комплексы). В случае же упорядоченного механизма некоторые скорости изотопного обмена должны сначала возрасти, а затем падать по мере роста концентрации некоторых субстратов. л

Второе направление вытекает из первого и основывается на том, что при упорядоченном механизме изотопный обмен для всех субстратов, кроме последнего, характеризуется двухфазным поведением в этой системе, тогда как изотопный обмен для последнего субстрата подчиняется тем же закономерностям, что и обмен для всех субстратов при неупорядоченном механизме: с увеличением его концентрации скорость возрастает до некоторой максимальной величины. Таким образом, помимо методов, описанных в гл. VIII, этот метод также дает возможность выяснить, какой из субстратов является последним в упорядоченном механизме реакции.

Третье направление, в котором может быть использован этот метод — определение стадии, лимитирующей максимальную скорость реакции. В механизмах, предусматривающих образование тройного (или четверного) комплекса, максимальную скорость может лимитировать взаимопревращение связанных с ферментом субстратов и продуктов, или, иными словами, взаимопревращение фермент-субстратных комплексов и соответствующих комплексов фермент — продукт. В таких случаях (например, в случае быстрого установления равновесия в неупорядоченной реакции, описанном в гл. VIII) скорость изотопного обмена для всех меченых субстратов и продуктов при максимальной скорости самой ферментативной реакции должна быть одинаковой. Если же лимитирующими являются другие стадии, должна наблюдаться значительная разница в скоростях обмена.

ФОРМИЛТЕТРАГИДРОФОЛАТ-СИНТЕТАЗА

Джойс и Хаймс исследовали реакцию, катализируемую формилтетрагидрофолат-синтетазой, как методом стационарной кинетики [18], так и методом изотопного равновесия [19]. Результаты, полученные первым методом, соответствовали представлению о неупорядоченном механизме присоединения трех субстратов с образованием четверного комплекса. (Анализ был несколько осложнен образованием некоторых тупиковых комплексов, но это не вызвало затруднений в интерпретации данных.) С повышением концентрации варьируемых субстратов все скорости изотопного обмена возрастали до некоторого максимального значения. Кроме того, различные скорости обмена были, неодинаковыми при насыщающих концентрациях реагентов, из чего следовало, что взаимопревращение четверных комплексов не лимитирует максимальную скорость реакции. Однако отсутствие *значительной* разницы в скоростях обмена свидетельствовало о том, что скорости взаимопревращения четверных комплексов и отщепления реагентов от фермента имеют один и тот же порядок величины. На основании полученных данных можно сделать вывод, что реакция протекает в обоих направлениях с обязательным образованием четверного комплекса, что ее механизм является неупорядоченным и что максимальная скорость процесса не лимитируется какой-то одной стадией.

Можно было бы привести много других примеров использования современных методов ферментативной кинетики. Тем, кто особенно интересуется такими исследованиями, мы рекомендуем ознакомиться с прекрасными работами Герша и Дженкса [20] по КоА-трансферазе и Рея с сотр. [21] по фосфоглюкомутазе.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Cleland W. W., Ann. Rev. Biochem., 36 (1967).
Rose I. A., Ann. Rev. Biochem., 35 (1966).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Henson C. P., Cleland W. W., Biochemistry, 3, 338 (1964).
2. Morrison J. F., James E., Biochem. J., 97, 37 (1965).

3. Morrison J. F., Cleland W. W., *J. Biol. Chem.*, **241**, 673 (1966).
4. Volini M., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5168 (1966).
5. Villarejo M., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **238**, 4016 (1963).
6. Wong J. T., Hanes C. S., *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 763 (1962).
7. Mintel R., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3381 (1966).
8. Boyer P. D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 387 (1959).
9. Boyer P. D., Silverstein E., *Acta Chem. Scand.*, **17**, Suppl. 1, 195 (1963).
10. Alberty R. A., Bloomfield V., Peller L., King E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4381 (1962).
11. Wong J. T., Hanes C. S., *Nature*, **203**, 492 (1964).
12. Fromm H. J., Silverstein E., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.*, **239**, 3645 (1964).
13. Silverstein E., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.*, **239**, 3901 (1964).
14. Silverstein E., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.*, **239**, 3908 (1964).
15. Graves D. J., Boyer P. D., *Biochemistry*, **1**, 739 (1962).
16. Rose I. A., O'Connell E. L., Mehler A., *J. Biol. Chem.*, **240**, 1758 (1965).
17. Dalziel K., Dickinson F. M., *Biochem. J.*, **100**, 34 (1966).
18. Joyce B. K., Himes R. H., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5725 (1966).
19. Joyce B. K., Himes R. H., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5716 (1966).
20. Hersh L. B., Jencks W. P., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3468 (1967).
21. Ray W. J., Jr., Roscelli G., Kirkpatrick D. S., *J. Biol. Chem.*, **241**, 2603 (1966).

Методы исследования механизмов ферментативных реакций

В первой части книги было указано, что в нашем распоряжении имеется уже достаточная теоретическая база для объяснения механизмов ферментативного катализа. Во второй части были изложены общие подходы к анализу индивидуальных стадий ферментативных процессов. Теперь мы должны найти методы, которые позволили бы определять константы скоростей индивидуальных стадий и идентифицировать функциональные группы ферментов, участвующие в катализе. Если наблюдаемые величины констант скоростей удастся объяснить исходя из каталитической функции этих групп, понятой на основе принципов физической органической химии, то механизм ферментативного катализа станет в значительной мере более понятным, по крайней мере в первом приближении.

В следующих главах мы обсудим методы стационарной и предстационарной кинетики,

пригодные для определения кинетических констант, а также методы, используемые для идентификации участвующих в катализе функциональных групп. Необходимо, однако, подчеркнуть, что исследования того или иного фермента в этом направлении малоэффективны, если предварительно или одновременно не изучается формальный механизм (схема) процесса. Не имеет большого смысла вычислять значения какого-либо кинетического параметра, не идентифицируя реакцию или цепь реакций, которую он характеризует.

Итак, сама структура книги подсказывает стратегию исследований механизмов ферментативного катализа. Приступая к таким исследованиям, разумнее всего сначала определить формальный механизм (схему) процесса, используя методы, описанные в части второй. На основе этих данных, позволяющих выделить отдельные этапы процесса, можно определить при различных условиях индивидуальные константы скорости и константы равновесия. Как мы увидим из дальнейшего, такие количественные данные в ряде случаев дают возможность установить каталитическую роль известных участков молекулы фермента.

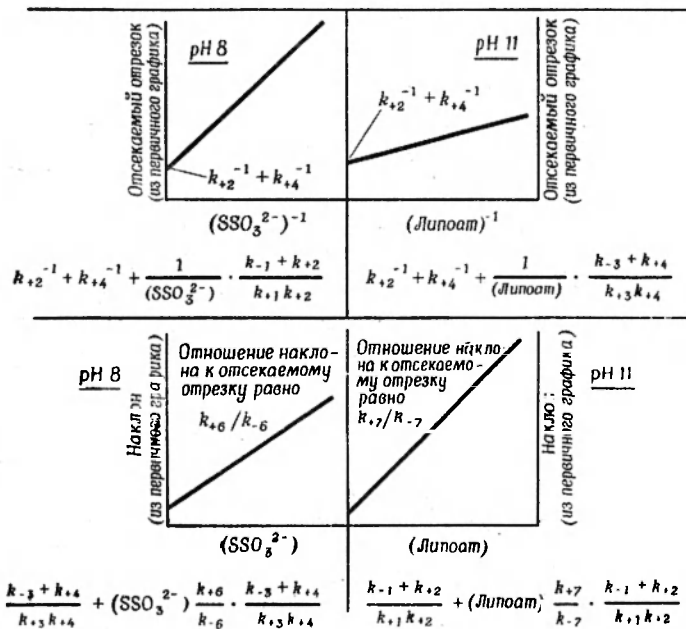
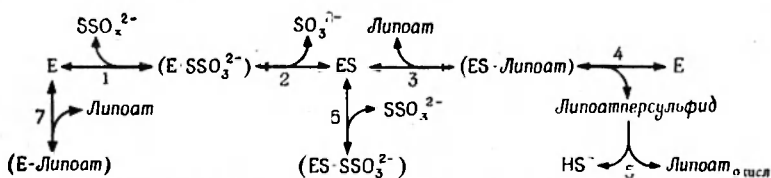
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ И КОНСТАНТ РАВНОВЕСИЯ МЕТОДАМИ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ И ИЗОТОПНОГО РАВНОВЕСИЯ

Методы формальной кинетики, описанные в гл. IX, позволяют вычислять некоторые индивидуальные константы скорости мономолекулярных стадий и константы равновесия для некоторых бимолекулярных стадий ферментативной реакции. Помимо того, с помощью методов стационарной кинетики иногда удаётся получить такую информацию об *относительных* величинах индивидуальных констант скорости, которая даёт возможность делать полезные приближённые оценки (как, например, в случае, когда различные формы фермента находятся в равновесии и $K_m \approx K_s$). Ниже мы обсудим стратегию и тактику, применяемые для этих целей. В следующих главах будет показано, как можно использовать эти константы для выявления важных функциональных групп в молекуле фермента и установления их роли в катализе.

ПОСТРОЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ ПРЯМЫХ НА ОСНОВЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ДВУХ СУБСТРАТОВ

Один из двух самых общих методов стационарной кинетики, применяющихся для оценки констант реакции, основан на построении вторичных кинетических прямых.

Любой график двойных обратных величин для какого-либо двухсубстратного механизма даёт возможность определить лишь кажущиеся значения констант (т. е. кинетические коэффициенты, зависящие от концентрации фиксированного субстрата). Однако для кажущихся значений K_m и V , найденных из ряда таких графиков, соответствующих различным концентрациям фиксированного субстрата, можно в свою очередь построить прямые, по наклону которых и отрезкам, отсекаемым ими на осях координат, вычисляются не зависящие от концентраций кинетические коэффициенты,



Фиг. 20. Вторичные кинетические прямые для реакции тиосульфата с липоатом, катализируемой роданезой [1].

Величины наклонов и отрезков, отсекаемых на осях координат, взяты из первичных графиков двойных обратных величин, приведенных на фиг. 19. Выражения для членов уравнений, содержащих величины наклонов и отсекаемых отрезков, взяты из уравнения стационарной кинетики (фиг. 19), соответствующего данному механизму.

смысл которых ясен, если известен формальный механизм реакции¹.

Некоторые примеры вторичных графиков для реакции, катализируемой роданезой (гл. IX), показаны на фиг. 20, где приведены также схема этой реакции и выражения для наклонов и для величин отрезков, отсекаемых на осях координат [1]. На основании таких вторичных графиков были вычислены значения $(k_{+2}^{-1} + k_{+4}^{-1})$, $[(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}]$ и $[(k_{-3} + k_{+4})/k_{+3}]$. Независимое определение k_{+2} и относительных величин k_{+2} и k_{-1} (метод см. ниже) позволило в конце концов оценить k_{+4} и k_{-1}/k_{+1} .

Величины ингибиторных констант равновесия для образования тупиковых комплексов, т. е. отношения k_{+6}/k_{-6} и k_{+7}/k_{-7} , были найдены в тех же исследованиях путем оценки констант конкурентного ингибирования.

Таким образом, на основании данных о начальных скоростях реакций, измеренных лишь в одном направлении, а также небольшой вспомогательной кинетической информации, полученной при использовании аналогов субстратов, удалось оценить обе мономолекулярные константы скорости для этого направления процесса и все, за исключением одной, константы равновесия для бимолекулярных стадий. Исследовать эту реакцию в обратном направлении невозможно, так как она практически необратима.

ИССЛЕДОВАНИЕ НАЧАЛЬНЫХ СКОРОСТЕЙ РЕАКЦИИ В ОБОИХ НАПРАВЛЕНИЯХ

В тех случаях, когда метод стационарной кинетики применим для исследования реакции в обоих направлениях в отсутствие и в присутствии одного из продуктов реакции, константы скорости можно рассчитать с помощью второго общего метода. Систематический анализ механизма двухсубстратных реакций, основанный на методе, изложенном в предыдущей главе, позволяет

¹ Как неоднократно отмечалось в предыдущих главах, в тех случаях, когда в ходе реакции может образовываться множество форм фермент-субстратного комплекса, применимы те же методы анализа. Если рассчитанная константа скорости является сложной константой, то найденное значение дает ее минимальную оценку.

оценить значения констант равновесия для всех стадий процесса. Ключевой принцип заключается в данном случае в том, что при ингибировании продуктом ингибиторные константы для продуктов реакции могут быть истинными константами равновесия¹.

Примерами такого рода исследований могут служить исследования креатинкиназной реакции (механизм с образованием тройного комплекса) [2] и трансаминазной реакции (механизм с замещением фермента) [3], упоминавшиеся в гл. IX.

На последнем примере легко пояснить основы этого метода определения кинетических констант.



Исследования начальных скоростей при использовании aa_1 и ka_2 в качестве субстратов позволяют определить K_2 в присутствии ka_1 (который должен быть конкурентным ингибитором по отношению к ka_2) и K_4 в присутствии aa_2 (который должен быть конкурентным ингибитором по отношению к aa_1). Аналогичным образом можно определить K_3 и K_1 в опытах с использованием aa_2 и ka_1 в качестве субстратов и отдельно aa_1 и ka_2 в качестве ингибиторов. Образование тупикового комплекса между одним из субстратов типа ka и свободным ферментом, хотя и усложняет ситуацию, но существенно не мешает анализу. Если значения констант равновесия известны, то с помощью некоторых описанных ниже способов определения мономолекулярных кон-

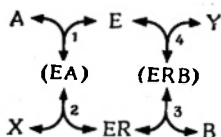
¹ Например, в случае трансаминазного механизма, когда первый продукт реакции является конкурентным ингибитором по отношению к второму субстрату, константа конкурентного ингибирования оказывается истинной константой равновесия. Поддерживая насыщенную концентрацию первого субстрата, можно создать ситуацию, подобную образованию тупикового комплекса в реакции ингибирования.

стант скорости для этих механизмов легко рассчитать и индивидуальные бимолекулярные константы скорости для соответствующих обратных реакций. Таким образом, в принципе исследование стационарной кинетики реакции в обоих направлениях позволяет оценить многие индивидуальные константы скорости для продуктивных направлений процесса, а бимолекулярные константы рассчитываются затем как отношение соответствующей константы равновесия к мономолекулярной константе скорости реакции в обратном направлении. Основные условия, при которых возможен относительно полный анализ процесса, заключаются в следующем: а) с помощью современных методов стационарной кинетики должны быть оценены все константы равновесия; б) с помощью некоторых (или всех) изложенных ниже методов должны быть оценены индивидуальные мономолекулярные константы скорости; в) механизм исследуемой реакции должен быть таким, чтобы ее можно было исследовать в обоих направлениях. Единственной альтернативой изложенной программы исследования является применение метода предстационарной кинетики, который будет рассматриваться в гл. XI; этот метод можно также сочетать с методом изотопного равновесия (см. стр. 152 и 173). Когда требуется вычислять константы скорости для реакций со сложными механизмами, часто приходится использовать несколько различных подходов одновременно.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛОГОВ СУБСТРАТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТАДИИ, ЛИМИТИРУЮЩЕЙ СКОРОСТЬ ПРОЦЕССА

В гл. IX было рассмотрено два направления использования аналогов субстрата: а) для выявления первого реагирующего субстрата в механизме с образованием тройного комплекса; б) для выявления кинетически значимых промежуточных комплексов. Третье направление связано со вторым, поскольку количественная обработка тех же данных позволяет найти одну из мономолекулярных констант скорости.

Рассмотрим случай механизма с замещением фермента:



Начальная скорость такой реакции при условии насыщения фермента обоими субстратами А и В должна определяться мономолекулярными константами k_{+2} и k_{+4} . Действительно, для данного механизма

$$E_0/V = \left(\frac{1}{k_{+2}} + \frac{1}{k_{+4}} \right)^{-1}.$$

Следовательно, если можно показать, что, скажем, несколько аналогов субстрата А дают различные значения V , а аналоги субстрата В дают одну и ту же величину V , то это означает, что константа k_{+2} очень мала и лимитирует скорость V , т. е. $V \approx k_{+2}E_0$. Если имеется возможность использовать несколько субстратов А, но лишь один-единственный субстрат В, то кинетический анализ все же возможен — при условии, что ряд субстратов А достаточно широк, чтобы величина V могла достигнуть максимального значения, определяемого константой k_{+4} . Кинетический анализ такой реакции возможен также в тех случаях, когда химическая природа стадии, характеризующейся константой скорости k_{+2} , позволяет предсказать характер количественной зависимости этой константы от химической природы субстратов А. В таких случаях значение k_{+2} можно найти по величине V для «медленных» субстратов А, а значение k_{+4} — либо непосредственно по лимитирующей величине V для более «быстрых» субстратов А, либо по разности между наблюдаемой и минимальной скоростью любой реакции, когда k_{+4} является существенным членом выражения для этой скорости. Заметим также, что симметричность механизма с замещением фермента позволяет использовать те же рассуждения для обратных случаев, когда $k_{+4} \ll k_{+2}$ и имеется возможность варьировать либо оба субстрата, либо лишь субстраты В.

Тот же подход можно применить и при анализе реакций, протекающих по механизму с образованием тройного комплекса. В этом случае использование аналогов субстратов позволяет отличить упорядоченный механизм с кинетически значимым тройным комплексом от механизма, в котором кинетически значимого комплекса не образуется (механизм Теорелла — Чанса)¹.

Примером анализа механизма с замещением фермента, в котором были использованы аналоги субстратов, может служить упоминавшееся выше кинетическое исследование роданезы. В этой работе в качестве субстрата В был использован цианид, а в качестве варьируемых субстратов А применялись тиосульфат, а также ароматические и алифатические тиосульфонаты. При этом наблюдалось почти 100-кратное увеличение V при переходе от тиосульфата к метантиосульфонату и снижение V в случае ароматических субстратов [4]. Из этих данных следует, что величину V в случае тиосульфата определяет k_{+2} . При использовании в качестве субстрата В липоата и в качестве субстрата А тиосульфата [1] было найдено, что обе мономолекулярные константы скорости влияют на величину V , и предварительное определение k_{+2} позволило рассчитать значение k_{+4} из приведенных выше соотношений.

Следует заметить, что использование в подобном исследовании «медленных» субстратов дает дополнительные возможности для кинетического анализа. В целом ряде ферментативных реакций один или несколько свободных субстратов и их связанная с ферментом форма

¹ В случае если распад тройного комплекса является кинетически значимым процессом (т. е. если k_{+3} не слишком превышает k_{+4} ; см. фиг. 18, I в гл. VIII), различные субстраты дают, вообще говоря, разные значения максимальной скорости. Если, однако, константа скорости распада тройного комплекса велика по сравнению с константой скорости диссоциации образующегося далее двойного комплекса, структура субстрата может не оказывать влияния на максимальную скорость. Тот факт, например, что при использовании в качестве субстрата различных первичных спиртов максимальная скорость реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой, оказывается одинаковой, строго доказывает, что этот процесс протекает по механизму Теорелла — Чанса, причем стадией, лимитирующей максимальную скорость, является распад комплекса фермент — НАД·Н.

практически находятся в равновесии. Иными словами, при этом частично или полностью выполняется первоначальное допущение Анри о состоянии равновесия в ферментативных реакциях. Исследование двухсубстратной реакции в обоих направлениях с использованием широкого ряда концентраций субстратов, в том числе изучение ингибирования продуктом реакции, позволяет различать указанные выше механизмы, поскольку удается измерить как оба значения K_m , так и обе константы равновесия. Однако для выявления случаев, когда K_m близка к константе равновесия, не прямое исследование должно базироваться на изучении поведения аналогов субстратов.

Оба подхода в исследованиях конкретных ферментов уже упоминались выше. Например, изучение креатинкиназы показало, что все субстраты и продукты (иначе говоря, все субстраты, если рассматривать оба направления реакции) находятся практически в равновесии с фермент-субстратными комплексами [2]. Точно так же в разобранный выше случае с трансаминазой константы Михаэлиса и константы ингибирования продуктом реакции (равновесные константы) совпадают, если субстратами являются аминокислоты, хотя различаются в случае кетокислот. В исследовании роданезы, когда реакция могла быть изучена лишь в одном направлении, пришлось использовать аналоги субстрата, и это позволило установить, что $K_m^{SSO_3^{2-}} \approx k_{-1}/k_{+1}$. Этот вывод был сделан на основании того, что 100-кратное возрастание величины k_{+2} при замене тиосульфата метантиосульфатом не сопровождалось соответствующим изменением величины K_m [4]. Но такой вывод справедлив лишь в предположении, что при замене субстрата не происходит компенсирующего увеличения k_{+1} . В данном конкретном случае это предположение подтверждено экспериментально, поскольку известно, что фермент содержит катионную группировку, связывающую анион тиосульфата [5], и тиосульфат имеет меньший заряд, чем тиосульфат.

В заключение отметим, что использованный принцип может быть распространен на любой случай, когда V и

K_m для аналогов субстрата изменяются прямо пропорционально друг другу. Такой случай имеет место, например, когда оба субстрата — А и В — являются «быстрыми», т. е. когда и k_{+2} и k_{+4} достаточно велики. При этом член k_{-1} не будет существенно влиять на величину K_m и, следовательно, K_m и V будут в значительной мере определяться величиной k_{+2} :

$$K_m \approx k_{+2}/k_{+1} \quad \text{и} \quad V \approx k_{+2}E_0.$$

Эти соотношения реализуются в случае карбоксипептидазы. Однако такая ситуация встречается не часто, поскольку для этого необходимо, чтобы соблюдалось неравенство $k_{-1} \ll k_{+2} \ll k_{+4}$.

НЕКОНКУРЕНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ; МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСКОРБАТОКСИДАЗЫ

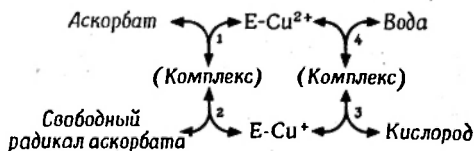
Задача интерпретации данных стационарной кинетики в терминах констант скорости и констант равновесия может быть облегчена еще одним способом. Речь идет о встречающихся иногда чисто неконкурентных эффектах, т. е. о случаях, когда изменение V не сопровождается изменением K_m . Когда такой эффект наблюдается при изменении строения субстрата, можно предполагать, что для самого «медленного» субстрата соблюдаются условия равновесия. Аналогичный вывод можно сделать и тогда, когда эффект достигается при добавлении в систему модификатора.

Моралес [7] показал, что простое неконкурентное поведение модификатора в односубстратной системе может объясняться либо равновесными условиями, либо пространственным блоком одного из двух путей образования тройного комплекса фермент — субстрат — модификатор (гл. IV). Для реакции, протекающей по схеме один субстрат \rightarrow один продукт, эффект *увеличения* V , не сопровождающийся изменением K_m , он рассматривал как доказательство того, что в отсутствие активатора $K_m \approx K_s$. Аналогичным образом влияние рН на V в отсутствие соответствующих изменений K_m Моралес считал свидетельством соблюдения равновесных условий в ферментативной реакции, поскольку

гидроний-ион столь невелик, что пространственные препятствия казались маловероятными.

Относительно такой интерпретации неконкурентного поведения необходимо сделать следующие четыре замечания. Во-первых, следует подчеркнуть, что обнаружение неконкурентного эффекта одного-единственного модификатора еще не может служить твердой основой для того, чтобы предполагать равновесное состояние, даже в случае односубстратной реакции, не осложненной возможными изменениями конформации фермента вследствие агрегации — дезагрегации или других причин. В этом случае может возникнуть и другое предположение (если нет доказательств обратного) — что изменение k_{+2} не сказывается на величине K_m просто потому, что оно сбалансировано примерно таким же изменением k_{+1} под влиянием модификатора. Для того чтобы предположение о равновесии выглядело более обоснованным, нужно показать, что не один, а несколько модификаторов, притом различного химического строения, обнаруживают неконкурентный эффект.

Так, при исследовании аскорбатоксидазы данные о неконкурентном влиянии рН были подкреплены данными о неконкурентной активации фермента ионами галогенов. Воздействие на фермент в его восстановленной форме хлорид-ионами может при определенных условиях увеличить V на несколько сот процентов, не изменяя K_m для аскорбата [8]. Эти два ряда данных позволяют уже довольно уверенно утверждать, что между различными формами фермента в данной реакции существует равновесие.



Во-вторых, причиной неконкурентного поведения могут служить конформационные изменения, в том числе процессы агрегации — дезагрегации. В качестве простого примера представим себе, что фермент построен из n субъединиц, диссоциирующих при изменении рН. Если

каждая субъединица обладает ферментативной активностью, но в агрегате активна лишь одна из них, то влияние рН будет носить неконкурентный характер. Изменение рН в направлении, благоприятствующем диссоциации, не приводя к изменению K_m , может вызвать n -кратное увеличение V (как если бы увеличилось количество фермента в системе). Мы привели нарочито грубый пример с целью отчетливо показать, что неконкурентное поведение могут вызвать причины, не имеющие отношения к равновесному состоянию системы, даже если имеет место активация фермента или действует модификатор столь малого размера, как гидроний-ион. Именно потому, что на практике можно встретиться с более тонкими конформационными изменениями фермента, сначала нужно попытаться выяснить, не обусловлено ли неконкурентное поведение изменениями физических свойств белка, и лишь в случае отрицательного ответа можно приписать его наличию равновесия. Например, в упомянутом выше случае аскорбатоксидазы при анализе активирующего влияния хлорида были использованы методы седиментации, гель-фильтрации и спектрофлуориметрии. При этом ни дезагрегации, ни конформационных изменений фермента обнаружено не было, что дало основание допустить возможность приближенного равенства K_m и K_s для аскорбата.

В-третьих, следует обсудить возможность использования критериев односубстратной системы к исследованию двухсубстратных систем. Естественно, возникает вопрос: если в двухсубстратной системе поддерживать насыщающую концентрацию одного из субстратов, то достаточно ли это для того, чтобы рассматривать систему как псевдоодносубстратную? В принципе этот вопрос был рассмотрен очень тщательно [9, 10]. Мы не будем касаться общего случая, а обратимся к конкретному примеру, поскольку это позволит лучше понять суть дела.

Рассмотрим механизм реакции, изображенный на фиг. 17. Это механизм с замещением фермента, примерами которого служат реакции, катализируемые трансаминазой, роданезой и аскорбатоксидазой. В этом случае одна из форм уравнения стационарной кинетики для

начальной скорости с использованием обратных величин имеет вид

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}k_{+2}} A^{-1} + \frac{k_{-3} + k_{+4}}{k_{+3}k_{+4}} B^{-1} + \frac{k_{+2} + k_{+4}}{k_{+2}k_{+4}}$$

На основании кинетических данных, полученных при варьировании концентрации субстрата А при насыщающей концентрации В, последний член этого уравнения может быть выражен как отношение E_0 к максимальной скорости реакции. Экспериментально найденная величина K_m^A (обратная величина отрезка, отсекаемого графиком двойных обратных величин на оси абсцисс, взятая с обратным знаком, или отношение наклона прямой к отрезку, отсекаемому на оси ординат) при этих условиях будет равна

$$\frac{k_{+4}(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+1}(k_{+2} + k_{+4})}$$

Если варьируемым субстратом является В, выражение имеет ту же форму (табл. 2). Полученный результат справедлив для любого механизма с замещением фермента.

Таблица 2

Кинетические коэффициенты для механизма с замещением фермента

Варьируемый субстрат	Общий случай		$k_{+2} \ll k_{+4}$		$k_{+4} \ll k_{+2}$	
	K_m	V/E_0	K_m	V/E_0	K_m	V/E_0
А	$\frac{k_{+4}(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+4}(k_{+2} + k_{+4})}$	$\frac{k_{+2}k_{+4}}{k_{+2} + k_{+4}}$	$\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$	k_{+2}	Линейно зависит от k_{+1}	k_{+4}
В	$\frac{k_{+2}(k_{-3} + k_{+4})}{k_{+3}(k_{+2} + k_{+4})}$	$\frac{k_{+2}k_{+4}}{k_{+2} + k_{+4}}$	Линейно зависит от k_{+2}	k_{+2}	$\frac{k_{-3} + k_{+4}}{k_{+3}}$	k_{+4}

Какие же причины могут привести к возникновению неконкурентных эффектов в этих условиях? Иными словами, в каких случаях модификатор будет изменять V , не воздействуя на K_m^A ? Это легко установить, выписав

сначала выражения для этих коэффициентов при различных условиях.

Из табл. 2 можно сделать ряд заключений относительно возможностей влияния на V без изменения K_m^A .

1. Никакое изменение k_{+3} или k_{-3} не влияет ни на V , ни на K_m^A .

2. Никакое изменение k_{+1} или k_{-1} не влияет на V .

3. Любое изменение k_{+4} должно влиять на V и на K_m^A в одинаковой степени, т. е. должно носить *неконкурентный* характер по отношению к A .

Из всего этого следует, что если и возможен какой-то простой неконкурентный эффект (для A), заключающийся в воздействии на одну из стадий механизма реакции, то это должно быть воздействие на стадию k_{+2} .

4. При изменении k_{+2} возможны два варианта:

а. Если $k_{+4} \ll k_{+2}$, то эффекты будут носить *конкурентный* по отношению к A характер (если они вообще будут наблюдаться).

б. Если $k_{+2} \ll k_{+4}$, будет наблюдаться смешанное ингибирование по отношению к A (изменяются и V и K_m^A). Но в том (и только в том) случае, когда соблюдается также неравенство $k_{+2} \ll k_{-1}$, поведение будет строго неконкурентным¹.

Короче говоря, в случае механизмов данного типа простейшим условием ингибирования или активации, неконкурентных по отношению к A , является воздействие на константу равновесия стадии 1 и на k_{+2} . Хотя к тому же результату могли бы привести и различные случайные факторы, в частности одинаковое воздействие на k_{-1} и k_{+4} , или сбалансированное изменение нескольких констант скорости одновременно, наличие строго неконкурентного поведения при воздействии различных по строению модификаторов свидетельствует в пользу более простого объяснения.

Применение описанного выше метода к анализу данных для аскорбатоксидазы, свидетельствующих о неконкурентных рН-эффектах и увеличении V без

¹ Напомним, что мы используем этот термин для обозначения случая, когда графики двойных обратных величин пересекаются на оси абсцисс.

воздействия на K_m^A , подтверждает сделанный ранее вывод: между ферментом и аскорбатом вполне может наблюдаться равновесие, и k_{+2} может иметь существенно меньшее значение, чем k_{+4} .

Наконец, в-четвертых, следует предостеречь от слишком поспешных выводов такого рода, поскольку активация, как и рН-эффекты, действительно может быть связана с пространственной блокадой. Она может объясняться просто удалением какой-то блокирующей группировки, скажем связанного ингибитора или одной из функциональных групп самого фермента, закрывающей активный центр и препятствующей тем самым образованию фермент-субстратного комплекса и каталитическому эффекту. Подобный механизм неконкурентного поведения весьма вероятен, особенно в случае фермента типа аскорбатоксидазы, когда в активный центр входит ион металла, играющий существенную роль как в каталитическом эффекте, так и в связывании субстрата. В подобном случае лиганд, связывающий ионы меди фермента, вполне может быть неконкурентным ингибитором, а другой лиганд, способный вытеснить первый, — неконкурентным активатором. Эти соображения не изменяют *кинетической* интерпретации, но влияют на выводы относительно химического механизма изучаемого процесса.

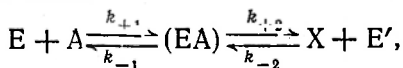
Таким образом, в отсутствие дополнительных данных окончательных выводов о механизме действия аскорбатоксидазы сделать нельзя. Такие дополнительные данные были получены с помощью двух подходов — исследования аналогов субстрата и прямого измерения некоторых констант скорости. Ямазаки и Пьетт [11] нашли, что максимальные скорости реакции, катализируемой аскорбатоксидазой, при использовании в качестве субстрата аскорбиновой и редуktiновой кислот одинаковы. Если исключить вероятность совпадения величин k_{+2} для этих субстратов, можно сделать заключение, что максимальная скорость определяется константой k_{+4} , а не k_{+2} . Позже было, однако, показано, что при таком значении рН, когда оба субстрата полностью ионизируются (активной формой субстрата является моноанион), максимальные скорости для этих субстратов различаются

в 10 раз; это дало основание заключить, что ранее полученный результат относится к условиям, когда величины k_{+2} для обоих субстратов совпадают [8]. Помимо того, прямые измерения констант скорости показали, что окисление восстановленной аскорбатоксидазы происходит очень быстро, тогда как восстановление фермента аскорбатом протекает сравнительно медленно [12]. Хотя ни одно из этих наблюдений полностью не исключает возможной роли блокирования или деблокирования фермента в рН-эффектах или явлении активации, вся совокупность экспериментальных данных указывает на то, что неконкурентное поведение в данном случае обусловлено равновесием различных форм фермента и тем, что скорость процесса лимитируется константой k_{+2} . Естественно, кинетические исследования аскорбатоксидазы должны быть продолжены.

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ИЗОТОПНОГО РАВНОВЕСИЯ

В гл. IX указывалось, что для изучения механизма ферментативных процессов с образованием тройного комплекса может быть использован метод изотопного равновесия, разработанный Бойером [13]. Метод заключается в измерении начальной скорости перераспределения изотопа в процессе ферментативной реакции, при условии что перед добавлением изотопа система находилась в химическом равновесии. В настоящей главе мы рассмотрим, как с помощью этого метода можно измерить некоторые индивидуальные константы скорости в механизмах с замещением фермента¹.

Многие ферментативные механизмы с замещением фермента характеризуются последовательностью процессов такого типа:



где E' — замещенная форма фермента. В случае если E и E' достаточно стабильны, система может быть

¹ Приведенный здесь вывод уравнений был указан автору С. Дэвидсоном. Клеланд [14] рассмотрел эту систему в несколько иной форме.

приведена в химическое равновесие простым исключением второго субстрата из реакции. Если в такую равновесную систему ввести следовые количества меченого субстрата А, то концентрация (EA) в стационарном состоянии будет суммой двух составляющих: $(EA)_a$ — концентрации меченой формы и $(EA)_x$ — концентрации немеченой формы. Если ситуация такова, что изотопная метка А переходит в продукт X, а не в E' , то можно говорить о начальной скорости перехода метки из А в X. Эта скорость R должна быть равна произведению $k_{+2}(EA)_a$. Уравнения для равновесия, характеризующие индивидуальные стадии реакции, могут быть записаны следующим образом:

$$E = \frac{(EA)_a + (EA)_x}{K_1 A},$$

$$E' = \frac{K_2 [(EA)_a + (EA)_x]}{X}.$$

Уравнение постоянства суммы концентраций всех форм фермента имеет вид

$$E_0 = E + (EA)_a + (EA)_x + E'.$$

После подстановки E и E' из уравнений для равновесия получаем

$$E_0 = [(EA)_a + (EA)_x] \left(1 + \frac{1}{K_1 A} + \frac{K_2}{X} \right).$$

Из этого основного соотношения можно выразить начальную скорость перераспределения изотопа в системе и получить некоторые полезные соотношения.

$$\frac{d(EA)_a}{dt} = k_{+1}AE - (EA)_a(k_{-1} + k_{+2}).$$

При условии стационарности

$$\frac{d(EA)_a}{dt} = 0.$$

Тогда это уравнение упрощается к виду $k_{-1}(EA)_x = k_{+2}(EA)_a$ и уравнение постоянства концентрации

всех форм фермента принимает вид

$$E_0 = (EA)_a \left(\frac{k_{+2}}{k_{-1}} + 1 \right) \left(1 + \frac{1}{K_1 A} + \frac{K_2}{X} \right),$$

откуда

$$(EA)_a = \frac{k_{-1} E_0}{(k_{-1} + k_{+2}) \left(1 + \frac{1}{K_1 A} + \frac{K_2}{X} \right)}.$$

Следовательно, скорость R наступления изотопного равновесия, равная $k_{+2}(EA)_a$, связана с кинетическими параметрами следующим образом:

$$R = \frac{k_{-1} k_{+2} E_0}{(k_{-1} + k_{+2}) \left(1 + \frac{1}{K_1 A} + \frac{K_2}{X} \right)}. \quad (45)$$

Из этого уравнения с очевидностью следует, что при достаточно больших концентрациях A и X скорость наступления изотопного равновесия не будет зависеть от их концентрации и будет стремиться к величине

$$R_{\text{max}} = \frac{k_{-1} k_{+2} E_0}{k_{-1} + k_{+2}}.$$

Поскольку k_{+2} можно во многих случаях оценить независимо методами стационарной кинетики, определение R_{max} (условия насыщения субстратами A и X) позволяет прямо вычислить k_{-1} ; константы k_{+1} и k_{-2} можно найти путем измерения R при низких концентрациях A и X соответственно. Даже если измерение при насыщающих концентрациях A и X оказывается невозможным, исследование зависимости R от концентрации ненасыщающего реагента позволяет все же определить значения k_{+1} , k_{-1} и k_{-2} , если k_{+2} найдена независимым методом.

Поскольку замещенная форма фермента полностью симметрична, такой же метод анализа может быть использован и для другой пары фермент — продукт. Следует заметить, что экспериментальные системы подобного типа весьма похожи на системы для исследования обычной стационарной кинетики; здесь также необходимо оперировать концентрациями субстратов, значительно превышающими концентрацию фермента, и иметь возможность регулировать скорости процесса

в широком диапазоне путем варьирования концентрации фермента.

Для вычерчивания графиков, с помощью которых проводятся подобные оценки, уравнение (45) удобнее записать в виде

$$R^{-1} = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_{-1}k_{+2}E_0} \left(1 + \frac{1}{K_1A} + \frac{K_2}{X} \right). \quad (46)$$

Значения отрезков, отсекаемых такими прямыми на осях координат и наклонов прямых, приведены в табл. 3.

Таблица 3

Начальная скорость наступления изотопного равновесия в реакциях, основанных на механизме с замещением фермента ¹⁾

	Наклон прямой	Отсекаемый отрезок	Наклон/отрезок	
			при высокой концентрации А	при высокой концентрации X
Зависимость R^{-1} от X^{-1}	$\frac{K_2(k_{-1} + k_{+2})}{k_{-1}k_{+2}E_0} = R_{\text{max}}$	$\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-1}k_{+2}E_0} \left(\frac{1}{K_1A} + 1 \right)$	K_2	
Зависимость R^{-1} от A^{-1}	$\frac{k_{-1} + k_{+2}}{K_1k_{-1}k_{+2}E_0} = (K_1R_{\text{max}})^{-1}$	$\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-1}k_{+2}E_0} \left(\frac{K_2}{X} + 1 \right)$		K_1^{-1}

¹⁾ Если k_{+2} известна, то k_{-2} можно рассчитать по величине K_2 , а k_{-1} — из значения $R_{\text{max}} = \frac{k_{-1}k_{+2}E_0}{k_{-1} + k_{+2}}$. Тогда остается найти k_{+1} , для чего используется равенство $K_1k_{-1} = k_{+1}$.

Описанный метод весьма перспективен для систематического определения констант равновесия и констант скоростей ферментативных реакций (при определении констант скоростей необходимо, как всегда, соблюдать осторожность при интерпретации полученных результатов, поскольку в ходе реакции возможно образование множества переходных комплексов).

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Cleland W. W., *Ann. Rev. Biochem.*, **36** (1967).
Rose I. A., *Ann. Rev. Biochem.*, **35** (1966).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Volini M., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5168 (1966).
2. Morrison J. F., James E., *Biochem. J.*, **97**, 37 (1965).
3. Henson C. P., Cleland W. W., *Biochemistry*, **3**, 338 (1964).
4. Mintel R., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3381 (1966).
5. Mintel R., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3386 (1966).
6. Lumry R., Smith E. L., *Discussions Faraday Soc.*, **20**, 105 (1955).
7. Morales M. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4169 (1955).
8. Gerwin B. R., Westley J., Manuscript in preparation.
9. Hearn J., Bernhard S., Friess S., Boffs D., Morales M., in: Boyer P. D., Lardy H. A., Myrback K. (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 1, Academic, New York, 1959, p. 89.
10. Walter C., *Enzyme Kinetics*, The Ronald Press, New York, 1966, pp. 50—52. (Уолтер Ч., *Кинетика ферментативных реакций*, изд-во «Мир», М., 1969.)
11. Yamazaki I., Piette L. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 62 (1961).
12. Nakamura T., Ogura Y., *Symp. Abstr., Seventh Intern. Congr. Biochem., Tokyo*, **1**, 189 (1967).
13. Boyer P. D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 387 (1959).
14. Cleland W. W., *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 77 (1967).

ИЗМЕРЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ МЕТОДАМИ ПРЕДСТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

Помимо методов стационарной кинетики, описанных в гл. X, имеются и другие методы, позволяющие получать количественные данные, важные для характеристики отдельных стадий ферментативных реакций и, следовательно, для понимания их механизма. Речь идет о прямом измерении скоростей ферментативных реакций в условиях, когда наблюдаемое свойство системы характеризуется не стационарным состоянием системы в целом, а лишь отдельную стадию процесса. Такого типа методы заключаются в изучении переходной предстационарной стадии реакции с использованием специальных приборов, которые дают возможность регистрировать события, происходящие в течение милли- и микро-секунд.

ПЕРЕХОДНАЯ СТАДИЯ РЕАКЦИИ

Прежде чем рассматривать методы исследования предстационарной кинетики, необходимо остановиться на деталях хода ферментативной реакции во времени. Ранее было выведено дифференциальное уравнение, описывающее стационарное состояние односубстратной реакции. Интегрирование этого уравнения дает возможность построить кривые, описывающие временной ход реакции в стационарных условиях¹.

Для начальных скоростей в отсутствие продукта реакции и при условии $A \gg E$ нами были выведены следующие уравнения:

$$\frac{d(EA)}{dt} = k_{+1}A_0[E_0 - (EA)] - (EA)(k_{-1} + k_{+2}) \quad (47)$$

и

$$\frac{dX}{dt} = k_{+2}(EA). \quad (48)$$

¹) Этот вывод может быть проведен несколькими способами [1, 2]. Мы будем опираться в основном на вывод Лейдлера [3].

Используя приближение стационарной кинетики, из уравнения (47) можно получить $(EA)_0$ — гипотетическую концентрацию (EA) при $t = 0$:

$$(EA)_0 = \frac{k_{+1}A_0E_0}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}A_0} = \frac{A_0E_0}{K_m + A_0}. \quad (49)$$

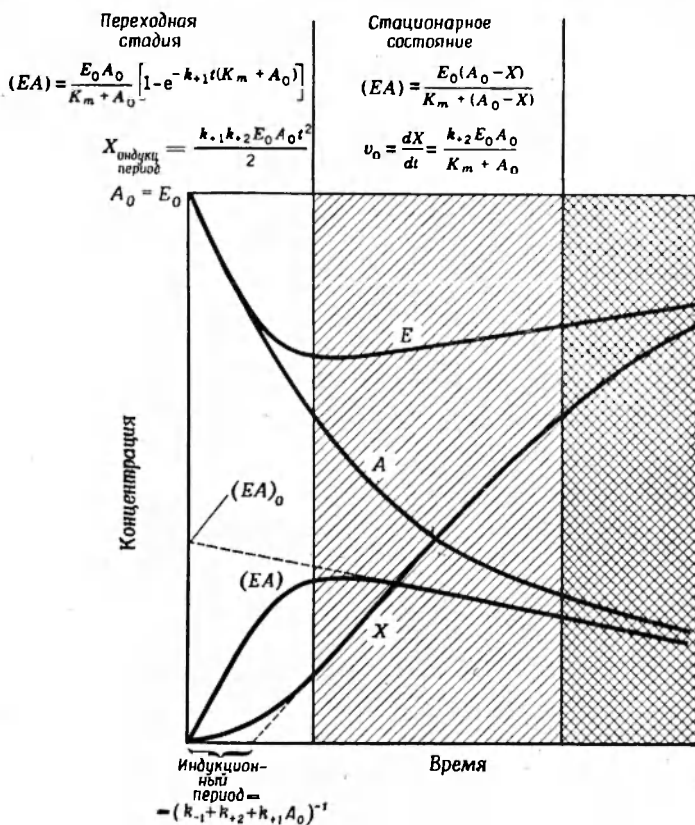
Это стационарный уровень, соответствующий начальной скорости реакции, как это принято в обычной стационарной кинетике (фиг. 21). Действительно, в промежуток времени между моментом, когда система достигла стационарного состояния, и моментом, когда накопится достаточное количество продукта, можно с хорошим приближением принять, что $(EA)_0$ равно (EA) . По истечении этого промежутка времени A_0 следует заменить выражением $(A_0 - X)$, и мы получим общее уравнение для изменения (EA) в течение стационарной стадии процесса (если $A_0 \gg E_0$). Для отыскания зависимости (EA) от $(EA)_0$ в предстационарный период нужно проинтегрировать уравнение (47):

$$(EA) = (EA)_0 \left(1 - e^{-[(k_{+1}E_0A_0t)/(EA)_0]} \right). \quad (50)$$

Подставив в уравнение (50) выражение для $(EA)_0$ из уравнения (49), получим

$$(EA) = \frac{E_0A_0}{K_m + A_0} \left(1 - e^{-k_{+1}t(K_m + A_0)} \right). \quad (51)$$

Можно видеть, что при достаточно большом t эта функция принимает значение первого сомножителя (т. е. гипотетического стационарного состояния $(EA)_0$). Экспоненциальный член имеет существенное значение только при малых t , обращая (EA) в нуль при $t = 0$. Таким образом, уравнение (51) описывает (EA) как функцию времени в течение переходной предстационарной стадии процесса. Кривая (EA) на фиг. 21 показывает действительный ход изменения (EA) во времени; там же изображены кривые, характеризующие изменение концентрации различных компонентов реакции в соответствии с приведенными выше уравнениями в различные промежутки времени.



Фиг. 21. Изменение концентраций различных компонентов ферментативной реакции в переходной стадии и в стационарном состоянии (ср. фиг. 4, случай II).

Приведенные выше соотношения позволяют анализировать экспериментальные данные, получаемые при прямом измерении концентрации промежуточного продукта, образующегося в процессе ферментативной реакции. Полезнее, однако, вывести кинетическое уравнение для продукта реакции, поскольку в эксперименте обычно определяют именно концентрацию продукта. Искомое

дифференциальное уравнение для переходной стадии можно получить из уравнений (48) и (51):

$$\frac{dX}{dt} = \frac{k_{+2}E_0A_0}{K_m + A_0} (1 - e^{-k_{+1}t(K_m + A_0)}). \quad (52)$$

Интегрирование этого уравнения в предположении, что $X = 0$ при $t = 0$ (начальные условия), дает зависимость концентрации продукта X от времени:

$$X = \frac{k_{+2}E_0A_0t}{K_m + A_0} - \frac{k_{+2}E_0A_0}{(K_m + A_0)(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}A_0)} [1 - e^{-k_{+1}t(K_m + A_0)}]. \quad (53)$$

Заметим, что при достаточно большом t эта зависимость выражается прямой, наклон которой, как и следовало ожидать, равен

$$\frac{k_{+2}E_0A_0}{K_m + A_0},$$

т. е. стационарной скорости процесса. Экстраполяция этой прямой к значению $X = 0$ дает соотношение

$$\frac{k_{+2}E_0A_0t}{K_m + A_0} = \frac{k_{+2}E_0A_0}{(K_m + A_0)(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}A_0)},$$

откуда

$$t_{X=0} = (k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}A_0)^{-1} = [k_{+1}(K_m + A)]^{-1}. \quad (54)$$

На фиг. 21 этот результат выражен графически. На практике этот полученный путем экстраполяции отрезок времени, называемый индукционным периодом, определяется при нескольких значениях A_0 и уравнение (54) используется для вычисления k_{+1} и суммы $(k_{-1} + k_{+2})$. Поскольку величина k_{+2} обычно бывает известна на основе определения стационарной максимальной скорости V , этот метод дает возможность рассчитать все константы скоростей для данного механизма.

Константы скоростей можно также оценить с помощью уравнения (53). Если измерение X удастся провести в течение такого короткого отрезка времени, когда функцию в основном определяет экспоненциальный член (т. е. когда $k_{+1}t(K_m + A_0) \ll 1$), то это

уравнение можно упростить, разложив в ряд экспоненциальный член и отбросив все члены, кроме первых двух; тогда с очень хорошим приближением получаем, что

$$X = \frac{k_{+1}k_{+2}E_0A_0t^2}{2}.$$

Константу k_{+2} можно найти по величине V , а константа Михаэлиса $K_m = (k_{+2} + k_{-1})/k_{+1}$ обычно известна на основании измерений, проведенных методом стационарной кинетики; исходя из этого, можно вычислить значения всех индивидуальных констант скоростей.

Таким образом, переходная стадия ферментативной реакции вполне поддается строгому теоретическому анализу (конечно, если исследуется односубстратная модельная система или некоторые другие системы, рассмотренные Лейдлером [3] и Гутфрейндом [1]). В некоторых отношениях такой подход оказывается более простым и более прямым, чем методы стационарной кинетики.

СТРУЙНЫЕ МЕТОДЫ

Что касается теоретических методов оценки констант скоростей по данным стационарной кинетики в сочетании с данными, полученными методами кинетики переходной стадии, то недостатка в таких методах у нас нет. Остается рассмотреть экспериментальные возможности непосредственных кинетических измерений в течение переходной стадии. Интервал времени, в течение которого должны проводиться такие измерения, весьма невелик и измеряется малыми долями секунды¹. Это вынуждает пользоваться весьма сложным оборудованием, позволяющим а) смешивать растворы субстратов и фермента настолько быстро, чтобы фермент не успел денатурировать; б) быстро и количественно улавливать весьма малые изменения

¹ Для того чтобы образование фермент-субстратных комплексов можно было наблюдать непосредственно, концентрации фермента и субстрата должны быть соизмеримыми. Следовательно, для наблюдения за этим процессом исследователь имеет время порядка $1/(k_{+1}A)$. Для реакций в диффузионной области k_{+1} должна иметь величину $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$,

концентрации продукта реакции и в) регистрировать эти изменения в ходе реакции. Чаще всего в приборах, отвечающих этим требованиям, используется спектрофотометрический метод измерения с осциллографической регистрацией сигнала от фотоумножителя.

Первая установка такого рода, позволяющая регистрировать времена реакции порядка миллисекунд, была создана Хартриджем и Рафтоном [4]. Она сконструирована таким образом, что отпадает необходимость в непосредственном измерении времени реакции, однако это достигается ценой расхода большого количества реактивов. Установка состоит из приспособления для быстрого смешивания и длинной трубки, через которую реакционная смесь непрерывно течет с большой скоростью (метод постоянного потока). Наблюдения за реакцией осуществляются в нескольких точках по длине трубки, что соответствует различным значениям времени реакции. Более широкое применение при исследовании ферментативных реакций нашел разработанный позже метод Чанса [5, 6], получивший наименование метода остановленного потока. Преимущество его состоит в том, что он требует меньших количеств фермента; однако регистрирующее устройство в приборе Чанса должно быть столь малоинерционным, чтобы его постоянная времени была меньше, чем у исследуемой химической системы. В настоящее время измерения методом остановленного потока чаще всего производят следующим образом: растворы фермента и субстратов из шприцев одновременно впрыскивают в смесительную камеру, после чего смесь поступает в измерительную кювету, где поток резко останавливается и начинаются спектрофотометрические измерения. Вся процедура продолжается при благоприятных условиях примерно 1 мс и требует лишь небольших объемов растворов. Техника и теория струйных методов описаны в книгах Чанса [7], Рафтона [8], Кэлдина [9] и Гутфрейнда [10].

Можно считать, следовательно, что как теоретические, так и методические проблемы изучения быстрых реакций в основном разрешены. Остается установить, каким требованиям должна отвечать сама реагирующая

система, для того, чтобы это изучение было возможно. Если цель состоит в том, чтобы проследить за концентрацией комплекса (EA) (фиг. 21), то необходимо, чтобы по своим спектральным (или флуоресцентным) свойствам этот комплекс сильно отличался как от E, так и от A и, *кроме того*, обладал большим коэффициентом поглощения. Конечно, не очень многие ферментативные реакции отвечают этим требованиям. Но реакции, катализируемые каталазой и пероксидазой, именно таковы, и потому Чансу удалось с успехом исследовать их в своей элегантной работе [7, 11].

Если же метод анализа базируется на измерении скорости образования продукта реакции, то отличительными спектральными свойствами должен обладать именно продукт. Такому требованию удовлетворяют многие гидролазы, особенно те из них, которые не обладают строгой специфичностью к некоторым элементам структуры субстрата. Синтез хромогенных субстратов некоторых протеаз и фосфатаз, например, позволил использовать метод остановленного потока для изучения этих ферментов. Ионные реакции, особенно протонирование, протекают, к счастью, очень быстро. Поэтому для изучения струйным методом реакций, протекающих с образованием или потреблением протона, во многих случаях можно использовать индикаторные красители. Потенциальные возможности этого метода значительно расширяет так называемый «метод закалки реакции в потоке». В этом методе растворы фермента и субстрата смешиваются так же, как и при использовании других струйных методов, но реакционная смесь поступает затем во второй смеситель (а не в фотометрическую ячейку), где она смешивается с химическим «закаливающим» реагентом (часто им служит сильная кислота), который очень быстро останавливает реакцию. При постоянной скорости потока время реакции в этом случае зависит только от расстояния между двумя смесителями. «Закаленную» реакционную смесь можно далее проанализировать любым подходящим методом. Этот способ [8—10] дает возможность изучать многие ферментативные реакции, для которых другие струйные методы оказываются неприменимыми.

РЕЛАКСАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ

Хотя струйные методы позволяют проводить измерения при длительности реакции порядка миллисекунд, а не секунд, все же значительное число важных реакций не удастся непосредственно исследовать этим методом и они нуждаются в еще более быстрой технике измерения. Даже «медленные» лимитирующие реакции в области максимальных скоростей процесса оказываются слишком быстрыми для измерений струйными методами. Помимо того, хотя скорость бимолекулярных стадий можно регулировать путем изменения концентрации, некоторые реакции, например ионные, вообще не поддаются прямому измерению с помощью струйных методов. Для того чтобы заполнить этот пробел в химической кинетике быстрых реакций, Эйген и его сотрудники разработали релаксационные методы, с помощью которых можно проводить кинетические измерения в промежутки времени порядка микросекунд. Эти мощные методы позволяют изучать бимолекулярные реакции, характеризующиеся константой скорости $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Они нашли применение и в исследовании многих ферментативных реакций (главным образом, в работах Хаммеса и сотрудников [12—17]).

Основной принцип релаксационного метода весьма прост. В системе, находящейся в состоянии равновесия или (если равновесие сдвинуто очень далеко) в стационарном состоянии, изменяют одну из интенсивных переменных (например, температуру или давление), в результате чего равновесие нарушается. Переход системы к новому равновесию регистрируется спектрофотометрическим или каким-либо иным методом.

Обычно эксперимент ставят следующим образом. Ферментативную реакцию проводят в специально оборудованной спектрофотометрической ячейке. Когда система достигает состояния равновесия, через раствор производится мощный конденсаторный разряд, вызывающий повышение температуры на 10° за 1 мс («температурный скачок»), и начинают регистрацию

измеряемой величины¹. Естественно, что осциллографическая регистрация процесса, происходящего в период «релаксации» (т. е. перехода к новому положению равновесия), должна начинаться сразу же после начала этого процесса. Важное преимущество этого метода заключается в том, что он не требует ни смешивания, ни передвижения реагирующих веществ перед началом наблюдения. Таким образом, здесь удается исключить факторы, лимитирующие быстродействие регистрирующего устройства в струйных методах.

Если сдвиг положения равновесия очень велик, то кинетические уравнения, описывающие поведение системы, оказываются достаточно сложными: они содержат величины концентраций в квадрате и произведения концентраций. Но при очень небольшом сдвиге эти высшие члены пренебрежимо малы и зависимость изменения концентрации от времени в период релаксации оказывается очень простой: это изменение пропорционально разности между текущей и равновесной концентрацией. Таким образом, в этих условиях (вблизи равновесия) все процессы протекают как простые реакции первого порядка.

Кинетическое уравнение для этого случая обычно записывают в виде

$$\frac{d\Delta C}{dt} = -\frac{\Delta C}{\tau},$$

где ΔC — весьма малое отклонение концентрации от равновесной и τ — константа, характеризующая данную реакцию (так называемое *время релаксации*). Совершенно ясно, что τ есть величина, обратная константе скорости псевдопервого порядка. Ее соотношение с истинной константой скорости и равновесными концентрациями определяется конкретными особенностями реакций, протекающих в исследуемой системе.

¹ Необходимо, разумеется, чтобы величина ΔH реакции была достаточно большой, чтобы такой «скачок» обеспечил измеримый сдвиг равновесия. Нужна также достаточно чувствительная детектирующая система, позволяющая с большой точностью измерять концентрацию хотя бы одного из реагирующих веществ.

Например, в изолированной реакции образования фермент-субстратного комплекса, результирующая скорость которой должна быть равна $k_{+1}AE - k_{-1}(EA)$ для любой концентрации A , а скорость при малом отклонении от равновесия определяется через величину τ приведенным выше соотношением, получаем, что $k_{-1} + k_{+1}(A_{\text{равн}} + E_{\text{равн}}) = \tau^{-1}$. Отсюда, определив τ для нескольких значений $(A_{\text{равн}} + E_{\text{равн}})$, можно найти обе константы скорости.

В реакциях изомеризации типа $(EA)_1 \rightleftharpoons (EA)_2$, которые, как правило, не поддаются анализу методом стационарной кинетики, величина τ^{-1} равна $(k_{+1} + k_{-1})$. В этом случае, если равновесные концентрации (и, следовательно, k_{+1}/k_{-1}) известны, тоже могут быть вычислены обе индивидуальные константы скорости. Если же реакционная система оказывается более сложной и характеризуется рядом последовательных стадий ферментативного катализа, то далеко не всегда можно безошибочно приписать каждое наблюдаемое значение времени релаксации одной из стадий. Хотя число различных значений времени релаксации должно соответствовать минимальной оценке числа элементарных стадий процесса, вычисление констант скорости в этом случае оказывается более трудной задачей, чем в упоминавшихся выше. Однако в принципе эта задача может быть решена.

Особенно интересной формой релаксационных методов является применение периодических воздействий на систему вместо ступенчатого воздействия («скачка»), описанного выше. Для этих целей используются ультразвуковые колебания, вызывающие периодические изменения давления. Такая система удобна тем, что она позволяет применять способ регистрации, не связанный ни с какими особыми свойствами реагирующих веществ. Принцип, на котором базируется этот метод, состоит в следующем.

Положение равновесия для многих реакций в растворах чувствительно к давлению (хотя этот факт весьма редко используется в эксперименте). Обзор работ в этой области сделан Лейдлером [18]. Теплота реакции складывается из изменения внутренней энергии

в стандартных условиях (ΔE^0) и произведения давления на увеличение объема в стандартных условиях ($p \Delta V^0$). Очевидно, что реакции, в которых происходит изменение объема реагирующих частиц — либо вследствие структурных изменений в молекуле, либо (что особенно существенно) вследствие изменения размера гидратной оболочки, — должны обладать чувствительностью к изменениям давления. Особенно чувствительными должны быть ионные реакции, так же как и реакции, сопровождающиеся конформационными изменениями белков.

Таким образом, если реакционные системы этого типа, находящиеся в равновесном состоянии, подвергнуть воздействию изменяющегося давления, положение равновесия будет сдвигаться, причем со скоростью, зависящей от времени релаксации системы. Эксперименты, в которых используется скачок давления, в принципе аналогичны экспериментам со скачком температуры. При периодическом возмущении давления равновесие будет колебаться между положениями, отвечающими двум экстремальным значениям давления. При некоторой характеристической частоте колебаний давления, определяющейся временем релаксации, система будет колебаться в фазе с ультразвуковыми колебаниями. С повышением частоты колебания в системе будут исчезать. Из этого, в частности, следует, что при повышении частоты доля ультразвуковых колебаний, поглощаемых системой, должна уменьшаться. Таким образом, измеряя пропускание возмущающего сигнала при изменяющейся его частоте, можно определить τ ¹.

Как было отмечено выше, релаксационные методы использовались при исследовании ряда ферментативных реакций. Итоги этих исследований позволяют сделать два важных обобщения. Во-первых, константы скорости очень многих реакций образования фермент-

¹ При современном состоянии экспериментальной техники, однако, релаксационные исследования с использованием ультразвука встречают затруднения как из-за сложности требуемого оборудования, так и из-за необходимости работать с довольно большими объемами раствора фермента.

субстратных комплексов близки к теоретически возможному максимуму (10^8 — 10^9 $M^{-1} s^{-1}$ для молекул такого размера). Следовательно, значительные различия в величинах констант равновесия при образовании таких комплексов объясняются различиями в величинах констант скорости диссоциации. Во-вторых, оказалось, что число элементарных стадий в ферментативных реакциях поразительно велико. По-видимому, перед каждой следующей реакцией комплексы обычно подвергаются изомеризации, т. е. той или иной перестройке. Это имеет весьма существенное значение. Если подобные конформационные изменения действительно всегда сопутствуют каждой индивидуальной стадии механизма и если они лимитируют скорость реакции, то это значит, что судить о деталях механизма ферментативного катализа на основании кинетических данных крайне трудно. Разумеется, форма кинетических уравнений сохраняется независимо от числа стадий, однако, пытаясь связать величины констант скорости с величиной смещения электронной плотности и т. п., необходимо иметь в виду, что все вычисленные значения констант являются лишь минимальной оценкой.

Дальнейшее развитие изящных релаксационных методов представляет большой интерес. Путем сочетания метода остановленного потока и метода температурного скачка [16, 17] уже удалось получить весьма важную новую информацию о механизме действия рибонуклеазы, позволившую сформулировать представление о деталях процесса, катализируемого этим ферментом [17]. Сочетание этих двух методов применимо в тех случаях, когда положение равновесия изучаемой суммарной реакции таково, что равновесный фермент-субстратный комплекс, лимитирующий весь процесс, содержит лишь один из реагентов. Для изучения комплексов с другими реагентами фермент и исследуемый реагент смешивают в быстром потоке, который останавливают в ячейке для температурного скачка. После этого проводят исследование релаксационным методом в тот период времени, когда реакция еще не достигла такой степени, что прочно связанный продукт накапливается в количестве, мешающем измерению.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958.
- Amdur I., Hammes G. G., *Chemical Kinetics; Principles and Selected Topics*, McGraw-Hill, New York, 1966.
- Gutfreund H., *An Introduction to the Study of Enzymes*, Wiley, New York, 1965.
- Eigen M., Hammes G. G., *Advan. Enzymol.*, 25 (1963).
- Bernhard S. A., *The Structure and Function of Enzymes*, Benjamin, New York, 1968. (Бернхард С., *Структура и функция ферментов*, изд-во «Мир», М., 1971.)

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Gutfreund H., *Discussions Faraday Soc.*, 20, 167 (1955).
2. Morales M. F., Goldman D. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 6069 (1955).
3. Laidler K. J., *Canad. J. Chem.*, 33, 1614 (1955).
4. Hartridge H., Roughton F. J. R., *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. A, 104, 376 (1923).
5. Chance B., *J. Franklin Inst.*, 229, 455 (1940).
6. Chance B., *Discussions Faraday Soc.*, 17, 120 (1954).
7. Chance V., in: Friess S. L., Lewis E. S., Weissberger A. (eds.), *Technique of Organic Chemistry*, Vol. VIII: Investigation of Rates and Mechanisms of Reactions, Interscience, New York, 1963.
8. Roughton F. J. R., in: Friess S. L., Lewis E. S., Weissberger A. (eds.), *Technique of Organic Chemistry*, Vol. VIII: Investigation of Rates and Mechanisms of Reactions, Interscience, New York, 1964.
9. Caldin E. F., *Fast Reactions in Solution*, Wiley, New York, 1964.
10. Gutfreund H., *An Introduction to the Study of Enzymes*, Wiley, New York, 1965, pp. 120—133.
11. Chance B., *Advan. Enzymol.*, 12, 153 (1951).
12. Hammes G. G., *Science*, 151, 1507 (1966).
13. Cathou R. E., Hammes G. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3240 (1964).
14. French T. C., Hammes G. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 4669 (1965).
15. Cathou R. E., Hammes G. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 4674 (1965).
16. Erman J. E., Hammes G. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 5607 (1966).
17. Erman J. E., Hammes G. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 5614 (1966).
18. Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958, pp. 210—226.

НАПРАВЛЕНИЕ СМЕЩЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛОГОВ СУБСТРАТА

Во второй части книги мы рассмотрели методы, с помощью которых можно выяснить формально-кинетический механизм ферментативной реакции, а в гл. X и XI — методы, позволяющие установить число и тип кинетически значимых промежуточных соединений. Такого рода исследования позволяют оценить некоторые константы скорости и константы равновесия при определенных условиях реакции. Дальнейшая задача состоит в том, чтобы использовать эти данные для выявления тех особых химических свойств фермента, которые проявляются на каждой индивидуальной стадии процесса. Один из самых главных вопросов, который может быть исследован экспериментально, касается качественной оценки вызываемых ферментом изменений распределения электронов в молекуле субстрата.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Совершенно очевидно, что характерная функция ферментов, независимо от того, катализируют ли они процессы синтеза или распада, состоит в образовании и расщеплении химических связей, т. е. в воздействии на электронную систему субстратов. Это не значит, что механизм реакции на всех ее стадиях является по преимуществу электронным, однако конечный результат носит, разумеется, электронный характер. Отсюда следует, что для детального описания любой катализируемой реакции необходимо знать направление смещения электронной плотности. Наиболее плодотворным прямым подходом к этой проблеме является использование аналогов субстратов¹.

Принцип этого подхода весьма прост. Он состоит в том, чтобы постараться произвести в субстрате

¹ Следует заметить, что использование аналогов субстратов, о котором здесь пойдет речь, в принципе отличается от описанного в предыдущих главах.

смещение электронов, хотя бы частично подобное тому, что происходит при действии фермента. Если такое изменение структуры субстрата всегда облегчает катализ, разумно заключить, что фермент осуществляет смещение электронов в том же направлении.

Предположим, например, что при расщеплении субстрата АВ фермент смещает электронную плотность по направлению от А к В. Эту гипотезу можно проверить, измеряя константы скорости ферментативного расщепления для ряда субстратов А'В, где А' — остатки различной электроотрицательности. Если специфичность фермента не позволяет варьировать структуру А, аналогичное исследование можно провести, варьируя структуру В. При этом, разумеется, необходимо располагать способом определения индивидуальной константы скорости для стадии расщепления данной связи в молекуле субстрата. Описанный метод находит весьма широкое применение. Он непригоден *только* в тех случаях, когда стадией, лимитирующей максимальную скорость процесса, являются конформационные изменения фермента или отщепление продукта реакции, а не перераспределение электронов в субстрате или его комплексах.

Этот общий подход был до сих пор не очень популярен в энзимологии, вероятно, потому, что интерпретация некоторых результатов, полученных в ранних исследованиях, оказалась затруднительной. Эти трудности возникали не из-за отсутствия точных сведений об электронном строении субстратов; ранние представления Ингольда [1] об индуктивных эффектах были вполне достаточны для необходимых качественных оценок. Такие оценки можно было произвести на основе полуколичественных эмпирических уравнений Гаммета [2, 3] и Тафта [4]. Недоставало лишь строгой теории ферментативной кинетики. Формальные механизмы реакции были неясны, и невозможно было выяснить, какие именно константы скорости или их комбинации подверглись воздействию. Обычно предполагалась псевдоодносубстратная кинетика, и иногда это предположение дополнялось предположением о равновесных условиях реакции; редко гарантировалось определение истинных начальных ско-

ростей реакции. При этих обстоятельствах уверенно интерпретировать экспериментальные данные было, конечно, весьма трудно. Тем не менее это были отличные исследования, и современное переосмысление полученных ранее результатов говорит об их фундаментальном значении. В этом можно убедиться, обратившись к нескольким приведенным ниже примерам таких исследований.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА

В 1953 году Ормерод [5] исследовал гидролиз различных замещенных бензоилхолина, катализируемый холинэстеразой. Было найдено, что значение максимальной скорости гидролиза коррелирует с константой Гаммета σ для заместителей в бензольном ядре (т. е. со способностью заместителя оттягивать электроны)¹. Из этого наблюдения был сделан вывод, что уменьшение электронной плотности на атоме углерода эфирной группировки облегчает гидролитический распад субстрата. Отсюда Ормерод постулировал электрофильное воздействие фермента на атом кислорода карбонильной группы субстрата, облегчающее нуклеофильную атаку на атом углерода. Это исследование было проведено, исходя из наивной гипотезы, что максимальная скорость определяется лишь реакцией разрыва эфирной C—O-связи, но сейчас не составляет труда рассмотреть полученные результаты с позиции более поздней и более детальной теории механизма действия холинэстеразы [6]. Уилсон очень изящно использовал тот же принцип применительно к ингибиторам холинэстеразы, а не к ее субстратам, для выявления элек-

¹ Уравнение Гаммета имеет вид $\log(k/k_0) = \sigma\rho$, где k и k_0 — константы скорости реакций замещенного в ядре фенильного производного и незамещенного соединения соответственно. Заместитель характеризуется параметром σ , соответствующим его способности к оттягиванию электронов. Параметр ρ имеет разное значение для разных реакций и его величина характеризует чувствительность реакции к изменению электронной плотности в реакционном центре; положительное значение ρ указывает на то, что скорость реакции возрастает при оттягивании электронов, т. е. что замещенное соединение атакуется нуклеофильным реагентом.

трофильного компонента в каталитическом действии ацетилхолинэстеразы и других гидролаз [6, 7].

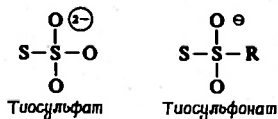
Нат и Райдон [8] также исследовали корреляцию V и K_m для β -глюкозидазы с константой Гаммета σ для заместителей, используя в качестве субстратов производные фенил- β -D-глюкозида. В этой работе, хотя она была выполнена с неочищенным ферментным препаратом и весьма наивна с точки зрения современной кинетики, были получены корреляции, свидетельствующие о возможности электрофильного смещения под влиянием одной из группировок фермента, облегчающего нуклеофильную атаку. Но, как и в случае холинэстеразы, нуклеофильным агентом здесь служит также одна из группировок фермента, а не гидроксильный ион, как предполагалось. Сейчас известно, что механизм действия обоих этих ферментов относится к типу механизмов двухтактного замещения (в качестве промежуточных соединений образуются замещенные формы фермента).

Аналогичные исследования были выполнены в это же время Гоуроном и сотр. [9] с липазой и Доджсоном и сотр. [10] с арилсульфатазой. Эти авторы также выявили корреляцию кинетических констант с константами Гаммета. Хотя упомянутые работы не опирались на простое представление о равновесном механизме реакции, однако они не содержали и кинетического анализа двухсубстратного механизма.

Современный энзимолог работает в более благоприятных условиях, и сейчас исследование направления смещения электронов в молекуле вполне может стать одним из стандартных методов анализа. В этом плане было выполнено несколько весьма успешных исследований. Эффектами такого типа интересуются, естественно, специалисты в области физической органической химии, которые исследовали разнообразные субстраты в реакции с химотрипсином. Результаты этих работ суммированы в отличном обзоре Бендера и Кежди [11]. Для нас особенно интересна работа Каплоу и Дженкса [12], которые показали, что для стадии деацилирования в механизме действия химотрипсина (т. е. для гидролиза ацилхимотрипсина) константа Гаммета ρ равна 2,1. Этот

результат ясно указывает на нуклеофильный механизм процесса, причем в данном случае источником нуклеофила является растворитель — вода. К сожалению, большинство ферментов, исследованных с помощью описанных нами кинетических подходов, не изучено с этой точки зрения.

Исключением является роданеза, механизм действия которой был описан в гл. IX. Исследование, в котором в качестве субстрата использовались аналоги тиосульфата, показало, что скорость реакции разрыва S—S-связи в тиосульфате лимитирует суммарную максимальную скорость катализируемой ферментом реакции тиосульфата с цианидом. Рассмотрение этих данных с точки зрения электронных представлений показывает, что смещение электронной плотности от переносимого атома серы к «внутреннему» атому серы облегчает катализируемое ферментом расщепление этой связи [13].



В соответствии с этим все испытанные органические тиосульфонаты расщепляются при максимальной скорости реакции значительно легче неорганического тиосульфата, хотя с ферментом тиосульфонаты связываются не лучше, чем тиосульфат. Поскольку из кинетических соображений ясно, что максимальная скорость реакции с тиосульфатом определяется константой скорости разрыва S—S-связи, полученные результаты свидетельствуют о большей близости тиосульфонатов с точки зрения электронного строения к переходному состоянию по сравнению с тиосульфатом. И если учесть, что все органические радикалы, входившие в структуру исследованных тиосульфонатов, характеризуются более высоким сродством к электронам, чем группировка O⁻, которую они заменяют в тиосульфате, можно сделать вывод, что смещение электронов от переносимого атома серы к центральному облегчает разрыв S—S-связи под действием фермента. Как было показано, наблюдаемая кинетика

ферментативной реакции качественно подобна кинетике некаталитического взаимодействия тиосульфата и тиосульфонов с таким нуклеофилом, как CN^- -ион (константа Гаммета $\rho = +0,5$).

На основании этих данных можно сделать вывод, что роданеза расщепляет тиосульфат вследствие взаимодействия ее электрофильной группировки с атомом кислорода субстрата, в результате чего распределение электронной плотности становится качественно подобным тому, которое характерно для тиосульфоната. Затем следует перенос внешнего атома серы к нуклеофильной группировке фермента и переход в раствор сульфит-иона, отщепляемого от S-замещенного фермента.

Рассмотренный пример показывает, что информация относительно направления смещения электронов в субстрате в ходе ферментативной реакции крайне важна для планирования дальнейших исследований. Согласно приведенным выше данным, роданеза должна содержать электрофильную группировку, взаимодействующую с атомом кислорода (но не серы) тиосульфата, а также близко расположенную к ней нуклеофильную группировку, взаимодействующую с внешним атомом серы. В соответствии с этим были предприняты попытки идентифицировать специфические аминокислотные остатки, принимающие участие в построении активного центра фермента. Эти попытки привели к предположению, что возможными электрофильными и нуклеофильными агентами в активном центре фермента являются связанный ион цинка [14] и одна из сульфгидрильных групп соответственно [15]. Следует подчеркнуть, однако, что эти достижения были бы невозможны, если бы не были известны кинетический механизм реакции и пути определения индивидуальных констант скорости.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Jencks W. P., Ann. Rev., 32 (1963).
Bender M. L., Kezdy F. J., Ann. Rev. Biochem., 34 (1965).
Westheimer F. H., Advan. Enzymol., 24 (1962).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ingold C. K., *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, 1953. (К. К. Ингольд, *Механизм реакций и строение органических соединений*, М., ИЛ, 1959.)
2. Hammett L. P., *Physical-Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 1940.
3. Jaffe H. H., *Chem. Rev.*, **53**, 191 (1953).
4. Taft R. W., Jr., *Steric Effects in Organic Chemistry*, **1**, 556 (1956).
5. Ormerod W. E., *Biochem. J.*, **54**, 701 (1953).
6. Wilson I. B., Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. 4, Academic, New York, 1960, p. 501.
7. Metzger H. P., Wilson I. B., *Biochemistry*, **3**, 926 (1954).
8. Nath R. L., Rydon H. N., *Biochem. J.*, **57**, 1 (1954).
9. Gawron O., Grelecki C. J., Duggan M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**, 455 (1953).
10. Dodgson K. S., Spencer B., Williams K., *Biochem. J.*, **64**, 216 (1956).
11. Bender M. L., Kezdy F. J., *Ann. Rev. Biochem.*, **34**, 49 (1965).
12. Caplow M., Jencks W. P., *Biochemistry*, **1**, 883 (1962).
13. Mintel R., Westley J., *Biol. Chem.*, **241**, 3381 (1966).
14. Volini M., DeToma F., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **242**, 5220 (1967).
15. Wang S. F., Volini M., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5465 (1968).

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ И АКТИВАЦИОННЫЕ
ПАРАМЕТРЫ:
ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ,
ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ
И ИОННОЙ СИЛЫ

Общеизвестно, что скорость химических реакций резко возрастает с температурой. Так же хорошо известно, что катализаторы направляют реакцию по пути, характеризующемуся меньшим значением свободной энергии активации. Это означает, что температура несколько меньше влияет на скорость каталитического процесса, чем на соответственные некаталитические реакции. Однако зависимость скорости ферментативных реакций от температуры представляется не столь простой, как в случае обычных каталитических реакций. Во-первых, необходимо учитывать повреждающее действие температуры на сам катализатор. Помимо того, отдельные стадии ферментативного катализа могут характеризоваться (и, скорее всего, характеризуются) разной температурной зависимостью. Вряд ли придется удивляться тому, что в прошлом многие энзимологи просто указывали «температурные оптимумы» для ферментов при определенных условиях, не отмечая (или не надеясь), что эти данные можно было бы использовать в целях анализа механизма данной реакции. Однако успешное использование термодинамических и активационных параметров в исследованиях механизма органических реакций и возможность кинетического изучения индивидуальных стадий ферментативных реакций дают основание думать, что такой взгляд, пожалуй, слишком пессимистичен.

Например, если оказывается, что константа Михаэлиса в разумном интервале температур близка к истинной константе равновесия, или если константу равновесия удастся определить прямым методом, то появляется возможность установить, какими конформационными изменениями молекулы фермента («принудительный контакт») или субстрата («замораживание»)

должно сопровождаться их связывание, поскольку эти изменения определяют величину неэлектростатического вклада в энтропию связывания. Аналогичным образом, если максимальная скорость ферментативной реакции в разумном температурном интервале определяется в основном одной из констант скорости, то возникает возможность определить, в какой мере электронные факторы влияют на процесс катализа, поскольку это влияние отражается на величине энтальпии активации¹.

В этой главе рассматриваются некоторые методы, с помощью которых можно получить такие данные и связать их с ролью различных группировок молекулы фермента в механизме катализа. Особенно важно найти ответ на следующие вопросы: а) Какие молекулярные силы обеспечивают связывание субстрата ферментом? б) Какие особенности механизма определяют ослабление химической связи? в) Сколь сильными должны быть нуклеофильная или электрофильная группировки фермента, чтобы они определяли скорость реакции? Основным экспериментальным методом, позволяющим решить эти проблемы, является исследование зависимости скоростей реакций и констант равновесия от температуры, диэлектрической проницаемости и ионной силы.

ОСНОВЫ ТЕОРИИ

Вспомним сначала наиболее важные положения физической химии. Основные термодинамические уравнения всем известны и не требуют особых пояснений. Константа равновесия связана с изменением стандартной свободной энергии уравнением

$$\Delta G^0 = -RT \ln K.$$

Изменение свободной энергии складывается из изменений энтальпии и энтропии:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0.$$

¹ Даже если признать, что это несколько упрощенная точка зрения, поскольку возникновение «напряжения» в молекуле может сказываться как на энтальпии, так и на неэлектростатической составляющей энтропии [1], все же информация такого рода представляет определенный интерес и дает важный ключ к пониманию механизма процесса.

Энтальпийный член можно оценить независимо, исследуя зависимость константы равновесия от температуры, описываемую уравнением Вант-Гоффа:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}, \quad \text{или} \quad \ln K = \frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \text{const.}$$

Энтропийный член можно представить в виде суммы двух составляющих — электростатической (ΔS_{es}) и неэлектростатической (ΔS_{nes}). Первую обычно связывают с освобождением сольватной оболочки при нейтрализации зарядов или с обратным эффектом образования такой оболочки при разделении зарядов. Ее можно оценить, исследуя зависимость константы равновесия либо от диэлектрической проницаемости среды, либо от ионной силы в соответствии с теорией, развитой Скотчардом [2] и Лейдлером [3]. Неэлектростатическую составляющую можно затем вычислить как разность $\Delta S^0 - \Delta S_{\text{es}}$.

Наклон графика $\ln K$ как функции обратной величины диэлектрической проницаемости равен $-Z_A Z_B e^2 / KTr$, где Z_A и Z_B — валентности взаимодействующих ионов, e — заряд электрона, K — постоянная Больцмана, а r — расстояние между центрами зарядов в образовавшемся соединении¹. Для водных растворов ΔS_{es} (в энтропийных единицах) примерно равно наклону прямой, умноженному на $1,1 \cdot 10^{-4}$. Далее можно определить либо $Z_A Z_B$, либо r , если другие параметры могут быть найдены независимым методом. Например, $\Delta S_{\text{es}} \sim -10Z_A Z_B$, если $r = 2\text{Å}$. Аналогичным образом из теории Дебая—Хюккеля следует, что наклон прямой, выражающей зависимость $\log K$ от корня квадратного из ионной силы, примерно равен $Z_A Z_B$ (для разбавленных водных растворов при комнатной температуре).

Как будет видно из дальнейшего, применение этих соотношений к анализу ферментативных реакций нельзя считать вполне строгим. Прежде всего, нельзя признать правильным предположение о том, что при добавлении

¹ Например, этим соединением может быть фермент-субстратный комплекс; тогда K соответствует константе ассоциации для реакции образования комплекса (K_S^{-1}).

органического растворителя (обычно метанола) диэлектрическая проницаемость в одинаковой степени изменяется и в области активного центра фермента, и в общем растворе. Кроме того, приведенные выше соотношения верны только в том случае, если в них входят скорости реакций, экстраполированные к нулевой ионной силе или по крайней мере найденные при таких значениях ионной силы, когда выполняется уравнение Дебая—Хюккеля. Но именно в наиболее интересных случаях, когда субстратами являются ионизированные соединения, сделать это очень трудно. Тем не менее, если результаты двух экспериментальных подходов (варьирование ионной силы и диэлектрической проницаемости) совпадают, полученные полуколичественные данные могут дать ценную информацию о механизме реакции. Ввиду того что современные кинетические методы позволяют сравнительно легко измерять индивидуальные константы равновесия, описанные здесь подходы должны найти широкое применение, особенно при оценке вклада ионных реакций в связывание субстрата ферментом. Некоторые примеры такого рода исследований будут приведены ниже.

Совершенно аналогичные соотношения получаются и для индивидуальных мономолекулярных констант скорости ферментативных реакций. Свободная энергия активации ΔG^* вычисляется по уравнению

$$\Delta G^* = \ln \frac{kT}{h} - \ln k,$$

где K — постоянная Больцмана, h — постоянная Планка, T — абсолютная температура. Свободная энергия активации, как и любого другого процесса, состоит из энтальпийного и энтропийного членов:

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

Энтальпия активации тесно связана с аррениусовой энергией активации E :

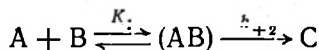
$$\Delta H^* = E - RT.$$

Последняя легко определяется экспериментально как отрицательное значение наклона прямой, описывающей

зависимость логарифма константы скорости реакции от величины, обратной абсолютной температуре:

$$\ln k = -\frac{E}{R} \cdot \frac{1}{T} + \text{const.}$$

Энтропия активации содержит электростатическую и неэлектростатическую составляющие. Эти составляющие определяются в основном так же, как для энтропии в состоянии равновесия, с той единственной разницей, что r^{-1} в этом случае нужно заменить разностью обратных расстояний, соответствующих начальному и переходному состояниям системы. Например, для последовательности реакций



приведенные выше уравнения для энтропии относятся к равновесию K_1 , причем r равно r_{AB} — расстоянию между центрами зарядов А и В в комплексе (АВ). Те же уравнения можно применить и к константе скорости k_{+2} , однако в этом случае вместо r_{AB}^{-1} нужно взять разность $(r_{AB}^{-1} - r_{AB}^{-1})$, где r_{AB}^{-1} относится к расстоянию между центрами зарядов в переходном комплексе, образующемся на пути от (АВ) к С. Применение этих уравнений к мономолекулярным стадиям, т. е. к стадиям, которые, как правило, лимитируют максимальную скорость реакции, позволяет получить информацию о факторах, определяющих величину каталитического эффекта. На основе этой информации иногда удается прийти к довольно широкому обобщению, касающимся механизма катализа, а также природы специфических группировок фермента, участвующих в каталитической реакции.

Однако, несмотря на несомненные достоинства описанного подхода, необходимо иметь в виду, что применять его нужно с известной осторожностью. Поверхность белковой молекулы в отличие от растворителя не является диэлектрически однородной; солевые эффекты *могут* носить главным образом кинетический характер, однако они *могут также* носить характер специфических ионных эффектов, вторичных солевых эффектов (например, влиять на величину pK функциональных групп фермен-

тов) или эффектов образования ионных пар [4]. И в любом случае расчеты не имеют смысла, если неизвестны значения индивидуальных кинетических констант. Необходимо помнить два важных момента: 1) Нельзя пользоваться упрощенными кинетическими методами. Необходимо твердо *установить*, что солевые эффекты носят кинетический характер, исключив экспериментально все другие возможные объяснения наблюдаемых результатов; обязательно нужно провести детальные кинетические исследования при различных условиях опыта с тем, чтобы иметь возможность получить экстраполированные значения кинетических коэффициентов. 2) Даже в лучшем случае не следует переоценивать значение результатов экспериментов данного типа при их интерпретации, поскольку сами теоретические выводы в этой области носят лишь приближенный характер.

НЕКОТОРЫЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

Величины активационных и термодинамических параметров были установлены для ряда ферментов, в том числе фумаразы [5], химотрипсина [6, 7] и других гидролаз [8—13]. При исследовании химотрипсина Бендер и Кежди [16] показали, что константы скорости индивидуальных стадий ферментативного гидролиза эфиров триптофана находятся в соответствии с константой равновесия суммарного процесса. Для этого процесса, следовательно, может быть построен полный энергетический профиль. Многие ранние работы такого рода подробно рассмотрены в обзорах Лейдлера [14] и Ламри [15]. Мы приведем в качестве иллюстрации две сравнительно новые работы.

Рибонуклеаза. При кинетическом исследовании рибонуклеазы релаксационным методом Като и Хаммес [17] изучили температурную зависимость бимолекулярных и мономолекулярных процессов, относящихся к связыванию цитидин-3'-фосфата ферментом. Бимолекулярный процесс, сам по себе являющийся реакцией комплексобразования, характеризуется очень большой константой скорости, приближающейся к величине, характерной для реакций, скорость которых лимитируется диффу-

зией¹. Однако энтальпия активации составляет 13—19 ккал/моль, т. е. превышает величину, характерную для процессов, скорость которых лимитируется диффузией. Далее, энтропия активации в этом случае равна 24—45 э. е., т. е. она больше, чем можно было бы ожидать для случая, когда электростатическое взаимодействие (около 10 э. е. для взаимодействия одновалентных катиона и аниона) сочетается с неэлектростатическим эффектом «отбора» (около —8 э. е.; стр. 102). Этим данным соответствует один-единственный механизм, в котором с ферментом взаимодействует только дианионная форма субстрата. В качестве альтернативы Като и Хаммес выдвинули другое предположение — что большое положительное изменение энтропии отражает разворачивание структуры фермента при связывании субстрата. Вследствие этого довольно большая величина энтальпии активации, требуемая для образования комплекса, может быть частично скомпенсирована возрастанием энтропии фермента [19], в результате чего значение ΔG^* будет благоприятствовать реакции, несмотря на большой энтальпийный член.

Мономолекулярной реакцией, сопровождающей ассоциацию цитидин-3'-фосфата с ферментом, является изомеризация комплекса. Като и Хаммес предполагают, что при этом образуется неактивный комплекс с «ошибочной ориентацией», в котором гидроксильная группа фосфата занимает положение, занимаемое в активном комплексе гидроксилом сахара. Активационные параметры процесса, измеренные экспериментально, согласуются с этим представлением.

Роданеза. Другим примером исследования такого типа является изучение механизма действия роданезы, рассматривавшегося в предыдущих главах с других позиций. Это исследование было поставлено с целью найти ответ на следующие три вопроса: 1) Играть ли существенную роль электростатические силы в связывании

¹ К лимитируемым диффузией реакциям относятся такие, при которых почти каждое соударение молекул приводит к взаимодействию [18]. Такие реакции характеризуются весьма малыми значениями энтальпии активации.

субстрата (тиосульфата) с ферментом? Иными словами, является ли связывающая группировка фермента катионом и если да, то каков его заряд? 2) Возникают ли какие-нибудь конформационные изменения в ферменте при связывании субстрата? 3) Есть ли основание предполагать участие сильной нуклеофильной группировки фермента на той стадии разрыва химической связи в субстрате, которая определяет максимальную скорость катализируемой роданезой реакции тиосульфата с цианидом? Иными словами, можно ли объяснить то обстоятельство, что бимолекулярная константа скорости некаталитического процесса в миллион раз меньше мономолекулярной константы скорости ферментативного расщепления S—S'-связи в тиосульфате, очевидным выигрышем в энтропии при ферментативном механизме и электрофильным замещением, обсуждавшимся в гл. XII? Если это так, то даже атака слабого нуклеофила фермента могла бы оказаться достаточной для разрыва S—S-связи в субстрате; если нет, то придется предположить, что в реакции участвует какой-то сильный нуклеофил. Рассмотрим эти вопросы последовательно.

1. Вспомним, что величина K_m роданезы по тиосульфату очень близка к K_S и что увеличение k_{+2} даже в 1000 раз не оказывает существенного влияния на K_m . Этот факт позволил исследовать образование фермент-субстратного комплекса в зависимости от ионной силы и диэлектрической проницаемости [20]¹. Для того чтобы исключить специфические эффекты, испытывались различные соли и растворители. Были также изучены вторичные эффекты и возможность образования ионных пар.

Полученные качественные результаты показали, что увеличение как ионной силы, так и диэлектрической проницаемости мешает связыванию тиосульфата. Найденная из графика $\ln(K_S^{-1})$ как функции D^{-1} электростатическая составляющая энтропии оказалась равной +16 э. е. Зависимость $\log(K_S^{-1})$ от квадратного корня из ионной

¹ Действительно, поскольку мономолекулярная стадия данного механизма оказалась нечувствительной к этим факторам, наблюдавшиеся эффекты можно было отнести к стадии связывания, даже если равновесные условия не достигались.

силы выражалась прямой с наклоном, равным -2 . Эти данные убедительно говорят о значительном вкладе ионного взаимодействия при связывании тиосульфата. Произведение $Z_A Z_B$ для взаимодействия однозарядного катионного центра фермента с тиосульфатом должно быть равно -2 , и, следовательно, при расстоянии между зарядами в 2 \AA электростатическая составляющая энтропии должна составлять около $+20$ э. е. Если учесть, что условия эксперимента (невозможность работать при нулевой ионной силе и невозможность снизить диэлектрическую проницаемость у поверхности фермента в той же степени, что и в среде) могли снизить эффект и что расстояние в 2 \AA , вероятно, надо считать преуменьшенным, когда речь идет о таких крупных ионах, как тиосульфат, можно предположить, что истинное значение произведения $Z_A Z_B$ равно -4 . В итоге работы был сделан вывод, что при образовании комплекса фермент—тиосульфат должна происходить нейтрализация заряда. Это указывает на наличие в молекуле фермента катионного центра для связывания тиосульфата.

Позже Ленинджер и Уэтли [21] повторили некоторые опыты по измерению ΔS_{es} и сравнили полученные данные с данными для аналогичной некаталитической реакции при тех же условиях. Как и следовало предполагать, последняя система оказалась далекой от идеальности и вывод о двухвалентном катионном центре связывания субстрата был подтвержден. На основании этих соображений были предприняты увенчавшиеся успехом поиски иона двухвалентного металла в активном центре, где он играет, по-видимому, роль центра связывания аниона субстрата, а также электрофильного агента, действующего на последующей стадии разрыва связи в молекуле субстрата [22].

2. Возможность измерения K_S для тиосульфата позволяет подойти к вопросу о конформационных изменениях при связывании субстрата с позиций кинетики. Это важно главным образом потому, что результаты кинетических экспериментов поддаются в этом случае однозначной интерпретации. Как указал Лейдлер [23], неэлектростатический вклад в энтропию, превышающий величину,

которую можно объяснить «отбором» или какими-либо другими механическими факторами, скорее всего связан с конформационными изменениями. Бендер и Кежди отметили, что к аналогичному эффекту может привести также торможение вращения в субстрате («замораживание»); однако в случае такого субстрата, как $\text{SSO}_3^{\ddagger-}$ -ион, такая возможность исключается. С использованием статистического метода Клеланда [24] была измерена $K_S^{\text{SSO}_3^{2-}}$ при различных значениях диэлектрической проницаемости и разных температурах. Рассчитанные значения термодинамических параметров с указанием стандартной ошибки определения приведены в табл. 4, из которой видно, что связывание тиосульфата характеризуется очень большой величиной неэлектростатической составляющей энтропии, что свидетельствует, вероятно, о значительных конформационных изменениях фермента.

Таблица 4

Термодинамические параметры диссоциации комплекса
(роданеза — SSO_3^{2-}) [21]

$\Delta G_{300^\circ}^0$ ккал/моль	$\Delta H_{300^\circ}^0$ ккал/моль	$\Delta S_{300^\circ}^0$ э. е.	$\Delta S_{\text{ес } 300^\circ}^0$ э. е.	$\Delta S_{\text{нес } 300^\circ}^0$ э. е.
$1,2 \pm 1$	11 ± 1	33 ± 3	-22 ± 1	55 ± 4

Данные о поляризации флуоресценции роданезы, полученные позднее [25], согласуются с этим выводом. Следует, однако, заметить, что обнаруженные конформационные изменения могут вообще не иметь никакого отношения к механизму действия фермента, а представлять собой ответ его подвижной структуры на существенные изменения среды. Изменения конформации роданезы свидетельствуют скорее о свертывании структуры, а не о ее разворачивании, чего можно было бы ожидать в соответствии с идеей Хаммеса [19] об «энтропийной компенсации», согласно которой конформационные изменения играют роль в катализе. Возникновение конформа-

ционных изменений в результате взаимодействия двухвалентного аниона с гидрофобным участком белка кажется вполне естественным, и было бы даже странно, если бы они не наблюдались.

3. После того как было выяснено, что константа скорости реакции расщепления S—S-связи в тиосульфате является лимитирующим фактором, ограничивающим максимальную скорость всего процесса, появилась возможность решить вопрос о вероятном участии сильной нуклеофильной группировки фермента в этой реакции. Этот вопрос возник в связи с весьма значительным выигрышем в энтропии, который давала ферментативная реакция по сравнению с некатализируемой реакцией тиосульфата с цианидом. Механизм двухтактного замещения благоприятствует реакции между двумя одноименно заряженными ионами, поскольку в этом случае заряд первого субстрата уходит в раствор вместе с продуктом реакции до того, как происходит реакция со вторым субстратом. Для реакции тиосульфата с цианидом этот электростатический энтропийный фактор сам по себе дает разницу в свободной энергии активации около 6 ккал/моль. Помимо того, замена бимолекулярной реакции на мономолекулярную на стадии, лимитирующей общую скорость, должна снижать ΔG^* на 1,4—2,4 ккал/моль за счет вклада неэлектростатической энтропии, определяющегося либо в соответствии с гипотезой о повышении концентрации до 10 M (стр. 102), либо в соответствии с представлением об энтропийном факторе «отбора», равном 8 э. е. Если учесть небольшой дополнительный вклад строгой ориентации тиосульфат-иона в комплексе, то общий выигрыш энтропии будет весьма близок к величине общего изменения ΔG^* . Если бы все перечисленные составляющие выигрыша энтропии могли быть реализованы, то для расщепления связи в субстрате с помощью нуклеофильной группировки фермента такой же силы, как цианид, было бы достаточно небольшого электрофильного смещения; альтернативно реакция могла бы проходить с очень слабым нуклеофилом, но тогда должно было бы существовать сильное электрофильное влияние, например со стороны иона металла, связанного с ферментом.

Это исследование проводилось одновременно с термодинамическим изучением $K_S^{SSO_3^{2-}}$, упоминавшимся выше [21]. При этом были измерены активационные параметры расщепления S—S-связи роданезой (табл. 5).

Таблица 5

Величины активационных параметров расщепления S—S-связи тиосульфата роданезой и оценка их вклада в катализ [21]

Параметр	Некаталитическая реакция с цианидом	Реакция с роданезой	Вклад в катализ	Возможный механизм
$\Delta S_{a_3}^*$	-9 э. е.	0	2,5 ккал/моль	Исключение анион-анионного взаимодействия Исключение «отбора» и факторов ориентации SSO_3^{2-} и возникновение новых напряжений связей в результате возможных конформационных изменений при воздействии нуклеофила фермента Ослабление S—S-связи под влиянием электрофильного воздействия и согласованной атаки сильного нуклеофила фермента
ΔS_{ces}^*	-29 э. е.	--25 э. е.	1 ккал/моль	
ΔH^*	12 ккал/моль	7 ккал/моль	5 ккал/моль	
ΔG^*	23,5 ккал/моль	15 ккал/моль	8,5 ккал/моль	

Из этих результатов следует, что весь теоретически возможный выигрыш энтропии практически не реализуется, по-видимому, потому (в основном), что фермент работает при довольно значительной ионной силе. Возможно также последующее конформационное «сжатие» фермента или какие-то другие помехи. Для реакции

необходимо значительное изменение энтальпии активации. Таким образом, даже при сильном электрофильном смещении расщепление связи в субстрате может произойти только в том случае, если фермент содержит нуклеофильную группировку, ненамного более слабую, чем цианид. Ранее постулированное на основе других данных [27] участие в реакции одной из сульфгидрильных групп фермента [26], вероятно, связано с этим механизмом.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958.
Lumry R., Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. I, Academic, New York, 1959.
Amis E. S., *Solvent Effects on Reaction Rates*, Academic, New York, 1966.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Jencks W. P., Kaplan N. O., Kennedy E. P. (eds.), *Current Aspects of Biochemical Energetics*, Academic, New York, 1966, p. 273.
2. Scatchard G., *Chem. Rev.*, **10**, 229 (1932).
3. Laidler K. J., *Reaction Kinetics*, Vol. II, Pergamon Press, Oxford, 1963.
4. Davies C. W., *Progr. Reaction Kinetics*, **1**, 161 (1961).
5. Brant D. A., Barnett L. B., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1526 (1957).
6. Snoke J. E., Neurath H., *J. Biol. Chem.*, **182**, 577 (1950).
7. Barnard M. L., Laidler K. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 6099 (1952).
8. Laidler K. J., Ethier M. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**, 338 (1953).
9. Lumry R., Smith E. L., Glantz R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4330 (1951).
10. Casey E. J., Laidler K. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2159 (1950).
11. Wall M. C., Laidler K. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 299 (1953).
12. Bernahrd S. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1966 (1955).
13. Wilson I. B., Cabib E., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 202 (1956).
14. Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958, Chapter 7.
15. Lumry R., Boyer P. D., Lardy M., Myrback K. (eds.), *The Enzymes* 2nd ed., Vol. I, Academic, New York, 1959, p. 157.
16. Bender M. L., Kezdy F. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3704 (1964).
17. Cathou R. E., Hammes G. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4674 (1965).

18. Alberty R. A., Hammes G. G., *J. Phys. Chem.*, **62**, 154 (1958).
19. Hammes G. G., *Nature*, **204**, 342 (1964).
20. Mintel R., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3386 (1966).
21. Lelninger K., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **243**, 1892 (1968).
22. Mintel R., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3381 (1966).
23. Laidler K. J., *Arch. Biochem.*, **30**, 226 (1951).
24. Cleland W. W., *Advan. Enzymol.*, **29**, 1 (1967).
25. Horowitz P., Westley J., Manuscript in preparation.
26. Wang S.-F., Volini M., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5465 (1968).
27. Sorbo B., *Acta Chem. Scand.*, **16**, 2455 (1962).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГРУППИРОВОК В ФЕРМЕНТЕ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ рН-ФУНКЦИЙ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ

Установив некоторые общие свойства участвующих в катализе группировок (суммарный заряд ионной группировки, степень нуклеофильности или электрофильности), исследователь обычно стремится точно идентифицировать их. Эта задача труднее, чем может показаться на первый взгляд, однако четкое знание условий, позволяющих изолировать отдельные стадии данного механизма, значительно облегчает ее. Как будет видно из дальнейшего, правильная интерпретация результатов исследования ингибирования или инактивации ферментов во многих случаях просто невозможна без понимания формального механизма катализа.

С одной стороны, в таких исследованиях удобнее использовать реагенты обратимого действия (в том числе H^+ -ионы), чем необратимо инактивирующие вещества, поскольку это позволяет кинетически изолировать реакцию, в которой принимает участие та или иная группировка фермента. С другой стороны, необратимые реагенты дают возможность с большей определенностью идентифицировать группировку, подвергающуюся воздействию, особенно в тех случаях, когда образовавшаяся связь ингибитора с ферментом устойчива к гидролизу, благодаря чему удается изолировать модифицированный остаток. Примером такой реакции служит высокоспецифическое взаимодействие фосфорорганических соединений с остатком серина в активном центре многих гидролаз.

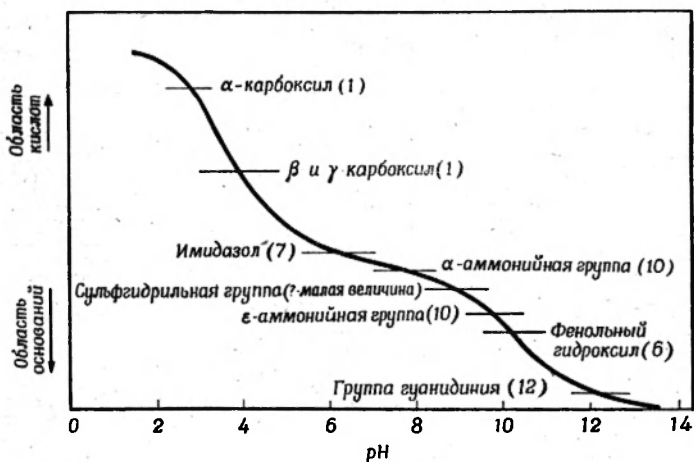
рН-ЭФФЕКТЫ

Значительная часть материала, изложенного в предыдущих главах, свидетельствует о том, что ионогенные группировки имеют ключевое значение для ферментативного катализа. Более того, кинетика протонирования и депротонирования может быть проанализирована теми же методами, что и реакции с другими модификато-

рами (гл. IV) и потому совершенно естественно, что рН-эффекты используются для выявления каталитически важных ионогенных группировок. Из этих исследований возникло одно из направлений ферментативной кинетики, позволяющее получать полезную и иногда весьма специфическую информацию об участвующих в катализе группировках, если удастся измерить индивидуальные константы скорости или равновесия при разных значениях рН.

ИОНОГЕННЫЕ ГРУППИРОВКИ ФЕРМЕНТОВ

На фиг. 22 приведена типичная кривая титрования белка, на которой горизонтальными отрезками указаны средние диапазоны рК для различных ионогенных группировок белков. Следует заметить, что эти диапазоны



Фиг. 22. Типичная кривая титрования белка и наиболее вероятные пределы значений рК для ионогенных группировок.

В скобках указаны приближенные значения теплот ионизации этих группировок в ккал/моль.

весьма широки и, более того, их нельзя считать строго определенными. Другое важное обстоятельство состоит в том, что указанные значения рК белковых групп не

совпадают со значениями pK свободных аминокислот, поскольку электростатические и индуктивные эффекты соседних группировок в значительной мере изменяются при соединении аминокислот в полипептидную цепь. Широкие границы значений pK связаны с тем, что в глобулярном белке ионогенная группировка может иметь различное по электронному влиянию и полярности окружение. Тем не менее вероятность того, что в белке будет найдена карбоксильная группа с $pK6$ или фенольная группа тирозильного остатка с $pK8$, крайне низка. Таким образом, фиг. 22 может все же служить практическим ориентиром при исследовании ионогенных функциональных групп ферментов.

Более того, поскольку эти группировки характеризуются различными значениями теплот ионизации (эти значения приведены на фиг. 22 в скобках) и различной чувствительностью величин pK к изменениям ионной силы и диэлектрической проницаемости, широкое исследование pH -функций позволяет получить достаточное экспериментальных данных для идентификации активных групп фермента. Так, например, значение $pK5$ свидетельствует о том, что в механизме действия фермента участвует сильно ионизированная карбоксильная группа или слабо ионизированный ион имидазолия. Чтобы произвести выбор между этими группировками, нужно изучить температурную зависимость pK , так как теплоты ионизации этих двух групп существенно отличаются друг от друга. Другой пример: $pK10,5$ может относиться либо к ϵ -аминогруппе лизина, либо к фенольному гидроксилу тирозина; эти группировки можно дифференцировать, исследуя влияние ионной силы, поскольку величина pK гидроксила (и карбоксила) в отличие от pK аммониевой группировки весьма чувствительна к этому параметру.

ГРАФИЧЕСКОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ pH -ЭФФЕКТОВ

Хотя активирующее или ингибирующее действие H^+ -ионов можно анализировать так же, как и влияние любого другого модификатора, Диксон [1] показал, что значение pK' легче всего оценивать по логарифмической зависимости. Рассмотрим простейший пример, взяв за ос-

нову уравнение (32) из гл. IV. Логарифмируя левую и правую часть уравнения, получим

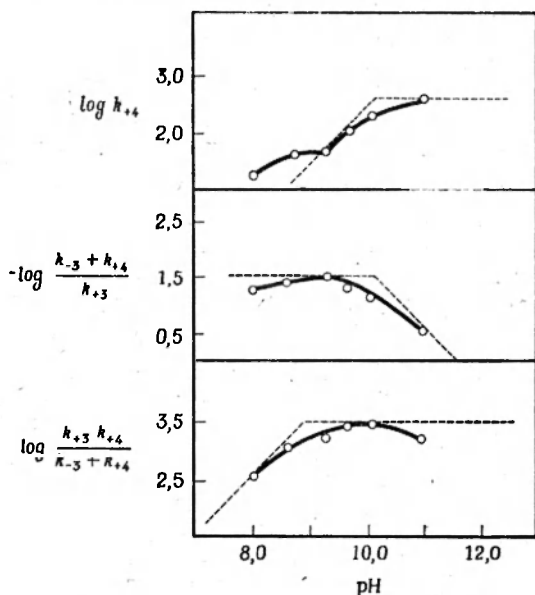
$$\log v_0 = \log (k_{+2}E_0A) - \log (K_m + A) - \log \left(1 + \frac{K_a}{H} \right).$$

Очевидно, что при $H \gg K_a$ последний член уравнения обращается в нуль, и, следовательно, $\log v_0$ не зависит от рН. Если же $H \ll K_a$, то последний член уравнения изменяется пропорционально рН и, следовательно, $\log v_0$ будет изменяться пропорционально рН.

На основании этих представлений было показано, что графики зависимости логарифмов V/K_m , V , K_s и K_m от рН должны состоять из прямолинейных отрезков, соединенных переходными криволинейными участками. Экстраполяция линейных участков до их пересечения друг с другом дает величины pK' группировок, так или иначе связанных с активностью фермента.

Из кинетических соображений следует, что график $\log V$ как функции рН отражает ионизацию группировок, влияющих на мономолекулярную стадию простого одно-субстратного механизма. Если же функцией рН является $\log V/K_m$, то, как опять-таки следует из кинетики (см. последний раздел гл. IV), график отражает влияние рН лишь на группировки, имеющие значение для комплексообразования, т. е. на группировки либо свободного фермента, либо субстрата. Интересно, что по логарифмическим графикам изменения константы Михаэлиса можно выявить эффекты обоих типов (фиг. 23).

Широкое распространение этих способов графического представления рН-функций и готовых правил их интерпретации привело к тому, что в ряде случаев исследования проводятся некорректно. Некоторые из них свидетельствуют просто о нерадивости их авторов, которые поленились либо оценить истинные значения начальных стационарных скоростей, либо провести необходимые кинетические эксперименты при всех значениях рН. В большинстве случаев, однако, эти работы страдают более серьезным недостатком — в них для анализа двухсубстратных реакций некритически используются уравнения, выведенные для простой односубстратной



Фиг. 23. Логарифмические графики pH-функций, иллюстрирующие методы определения pK для каталитически важных ионогенных группировок фермента, субстрата и фермент-субстратного комплекса [6].

Приведенные данные относятся к взаимодействию липоата с S замещенной роданезой в соответствии с механизмом, изображенным на фиг. 19. В классическом механизме односубстратной ферментативной реакции величинам, отложенным на осях ординат, соответствуют (сверху вниз) $\log V$, pK_m и $\log (V/K_m)$.

модели¹. Тем не менее разумное рассмотрение этого способа характеристики специфических группировок приводит к выводу о его потенциальной ценности. Использование H^+ -ионов может быть полезным для характеристики природы различных группировок точно так же, как использование любых других ингибиторов или активаторов.

¹ Эта проблема весьма важна. Простое графическое представление зависимости констант Михаэлиса и максимальных скоростей в случае мультисубстратных систем может привести к грубым ошибкам в оценке величин pK . Это объясняется кинетической сложностью таких систем, вследствие чего константа Михаэлиса, например, оказывается сложной функцией многих констант скоростей.

Как и при других методах исследования, в этом случае должна существовать уверенность в том, что измеренные кинетические параметры относятся к изолированным стадиям процесса. Для этих целей могут быть использованы современные методы стационарной кинетики, кинетики переходного состояния, релаксационные методы или любые другие методы, позволяющие измерять величину индивидуальных констант скоростей или определенных комбинаций этих констант при различных значениях рН. Если в эксперименте не выполнены все измерения, необходимые для адекватной оценки индивидуальных кинетических констант, то полученные результаты не поддаются удовлетворительной интерпретации.

Тщательное исследование рН-функций оказалось весьма ценным при изучении механизма действия гидролаз. Возможность изолировать индивидуальные кинетические стадии с помощью методов остановленного потока, стационарной кинетики и релаксационной техники позволила получить вполне четкие результаты. Наиболее определенные данные при использовании некоторых субстратов были получены для трипсина и химотрипсина [2, 3]. Именно с помощью такого подхода впервые было установлено участие остатков гистидина в механизме действия химотрипсина на стадиях ацилирования и деацилирования. Некоторые данные стационарной кинетики привели к полезным выводам о механизме действия негидролитических ферментов. Можно думать, что этот метод анализа механизмов ферментативных реакций будет быстро развиваться. Группа Альберти [4] провела очень тщательное измерение величин pK и энтальпии ионизации связывающих группировок фумаразы. Данные о влиянии рН на $K_m^{SSO_3^{2-}}$ роданезы в сочетании с другими данными, характеризующими механизм ее действия [6], впервые позволили выдвинуть предположение о рН-зависимой димеризации этого фермента [5].

Одно из самых подробных исследований рН-эффектов принадлежит Като и Хаммесу [7], которые изучали элементарные стадии взаимодействия цитидин-3'-фосфата с рибонуклеазой методом температурного скачка с использованием колориметрического индикатора.

Полученные результаты позволили сделать определенные выводы о трех группировках активного центра, значения pK' для которых составляли 5, 6 и 6, 7. На основании зависимости этих величин от температуры был сделан вывод, что наименьшее значение pK' относится к карбоксильной группе (слабая температурная зависимость), а наибольшее — к имидазольной группировке (сильная температурная зависимость). Природа группировки с промежуточным значением pK' , равным 6, оставалась (и остается до сих пор) неясной. Сама величина $pK'6$ может быть отнесена к имидазолу, но вместе с тем она не зависит от температуры, что характерно для карбоксила. Авторы предполагают, что это имидазол с аномальной величиной ΔH ионизации, однако признают, что для окончательного доказательства этого предположения нужны дополнительные данные. В этой работе были установлены детали механизма действия рибонуклеазы, в том числе обнаружены реакции изомеризации свободного фермента и комплекса фермент—продукт. Тщательность кинетического анализа, проведенного в этой работе, позволяет отнестись с доверием к предложенному авторами химическому механизму действия рибонуклеазы, хотя не вполне ясно, действительно ли все обнаруженные реакции изомеризации входят в последовательность каталитических реакций.

ДРУГИЕ ОБРАТИМЫЕ РЕАКЦИИ

Вообще говоря, экспериментаторы не слишком много занимались изысканием реагентов, которые можно было бы использовать аналогично гидроний-иону и которые бы обратимо и специфично взаимодействовали с определенными группировками ферментов или, шире, обладали заданным сродством к таким группировкам. В подавляющем большинстве случаев исследования обратимых реагентов касались аналогов субстратов. Активность полученных ингибиторов оценивалась по их способности конкурировать с истинным субстратом. Однако лишь очень немногие из них исследовались как специфические реагенты на функциональные группы аналогично необратимым модификаторам. Тем не менее использование

таких реагентов обладает большим преимуществом, поскольку оно позволяет легко определить стадию кинетического механизма, подвергающуюся воздействию. Например, если предполагается, что в механизме катализа участвует остаток триптофана, то для доказательства этого предположения можно использовать ароматический акцептор, способный к образованию комплекса с переносом заряда. Если формальный механизм реакции известен, то несложный кинетический эксперимент позволяет установить ту стадию, на которой в реакции участвует остаток триптофана, и, следовательно, роль этого остатка в катализе. Аналогичным образом в качестве обратимых реагентов могут быть использованы вещества, образующие координационные связи с ионами металлов (в том числе хелатирующие агенты, если ион металла очень прочно связан с ферментом), однако в этом случае исследование может быть осложнено необратимой реакцией отщепления иона металла от фермента. Ионы металлов также можно использовать в качестве обратимых реагентов, хотя и не очень специфичных. Высоким сродством к большинству ионов металлов обладают сульфгидрильные группы и остатки имидазола, но это свойство характерно также для карбоксильных групп, для аминок групп и даже для пептидных связей. Таким образом, в белке очень много возможностей для хелатирования ионов металлов.

К обратимым реагентам относятся и вещества, изменяющиеся при исследовании белков флуоресцентными методами, например, такие, как толуидиннафталинсульфонат [8], связывающийся лишь с гидрофобными группировками белка (и флуоресцирующий только в связанном состоянии).

НЕОБРАТИМЫЕ РЕАКЦИИ

Большинство так называемых специфических реагентов на функциональные группы взаимодействует с ними необратимо. Пользоваться ими необходимо с большой осторожностью, поскольку инактивацию ферментов могут вызывать самые разнообразные неспецифические воздействия. Такие исследования сопряжены с трудностями двоякого рода: а) группировки, которые должны

взаимодействовать с реагентом, не взаимодействуют с ним; б) группировки, которые не должны взаимодействовать с реагентом, взаимодействуют.

Затруднение первого типа связано с тем, что реакционноспособность группировки в глобулярном белке зависит от ее химического окружения, так что она может быть «замаскирована» в отношении потенциального инактивирующего реагента, хотя и доступна действию субстрата или какого-либо другого реагента. Таким образом, неспособность реагента инактивировать фермент может служить основанием для тех или иных выводов лишь в том случае, если показано, что сама реакция с ферментом произошла. Трудности второго типа возникают вследствие повышения реакционноспособности некоторых группировок, которые в результате начинают взаимодействовать с данным реагентом, хотя в нормальном случае они с ним не взаимодействуют. В качестве примера можно привести недавнюю работу Такахаси и др. [9], показавшую, что карбоксильная группа рибонуклеазы T_1 реагирует с иодацетатом, который известен как реагент на более сильные нуклеофильные группы типа сульфгидрильной или имидазольной. Можно сослаться также на другую работу [10], в которой показано, что *N*-этилмалеимид может реагировать с ϵ -аминогруппой лизина, а не с сульфгидрильной группой, в отношении которой он, как принято считать, специфичен.

Эти примеры мы привели с целью подчеркнуть, что абсолютно специфичных реагентов не существует. Во всех случаях важно установить аналитическим методом, какой из остатков белковой молекулы модифицирован. Но даже и это может оказаться недостаточным (хотя результаты аналитического исследования обычно считают решающими). Рассмотрим опыты Уонга и Волини [11], выполненные на основе предварительного наблюдения Дэвидсона, обнаружившего, что роданеза очень чувствительна к действию динитрохлорбензола, являющегося заведомо реагентом на ϵ -аминогруппу лизина. Эти исследователи установили, что при инактивации фермента динитрохлорбензолом *не происходит* реакции ни с одним из остатков белковой молекулы и что даже сам динитрохлорбензол инактивирует фермент. В конце концов оказалось,

что инактивацию вызывает совершенно неожиданная причина — окисление одной из сульфгидрильных групп динитрофенильными соединениями. Если бы, однако, Уонг и Волини *нашли* динитрофениллизин в гидролизате белка, то в соответствии с общепринятой практикой они должны были бы на этом основании сделать вывод, что лизин имеет существенное значение для активности фермента.

Учитывая такого рода опыт, необходимо, по-видимому, ввести некоторый минимум требований, которые должны соблюдаться при использовании специфических реагентов для идентификации группировок активных центров ферментов.

1. Субстрат должен «защищать» фермент, т. е. субстрат и реагент должны в известной мере конкурировать друг с другом. Это означает, что предположение о действии на группировки активного центра можно считать правильным, если действие обратимого ингибитора конкурентно в отношении субстрата или если реакция с необратимым ингибитором в присутствии субстрата замедляется.

2. Снижение активности должно коррелировать с убылью концентрации одной из группировок. Такая корреляция может быть установлена на основе либо кинетических данных, либо стехиометрических отношений. Рей и Кошланд [12, 13] подчеркивают преимущества кинетических измерений; убедительным примером стехиометрического подхода служит упомянутая выше работа Уонга и Волини [11].

3. «Модельные реагенты» не должны влиять на активность фермента. Всегда необходимо испытать в качестве ингибиторов или активаторов вещества, химические и физические свойства которых, возможно, близки к свойствам данного реагента и которые отличаются от него лишь одним — отсутствием специфической реакционной способности в отношении фермента. При такого рода исследованиях необходимо соблюдать большую осторожность. Так, например, в цитированной выше работе, где использование динитробензола в качестве модельного реагента способствовало пониманию механизма действия динитрохлорбензола, динитрофенол не годился как

модельный реагент, так как он не инактивирует фермент в сравнимых условиях.

4. Всегда, когда это возможно, необходимо попытаться восстановить активность фермента с помощью какого-либо подходящего специфического воздействия. Это единственный эффективный метод контроля, позволяющий исключить вероятность того, что утрата активности обусловлена общей денатурацией фермента. Так, ацетилирование гидроксильной группы тирозина ацетилимидазолом следует предпочесть иодированию бензольного кольца тирозина, поскольку замещающая ацетильная группа может быть отщеплена с помощью реакции спонтанного гидролиза при слабощелочном значении рН. Аналогично инактивация фермента путем образования смешанного дисульфида при реакции с тиоловым соединением служит более подходящим способом доказательства участия SH-групп в катализе, чем реакция алкилирования сульфгидрильных групп иодацетатом или N-этилмалеимидом. Использование первого метода позволяет реактивировать фермент с помощью простой реакции восстановления, тогда как необратимая потеря активности в последнем случае может быть следствием либо специфического алкилирования SH-групп, либо вторичных конформационных изменений. Разумеется, оба типа экспериментов дополняют друг друга.

Перечисленные требования не следует рассматривать как правила для выявления группировок в активном центре фермента. Это просто минимальные критерии, которыми полезно руководствоваться при оценке достоверности такого рода заключений и которые приведены скорее в качестве иллюстрации тех направлений исследований, где использование специфических реагентов может дать наиболее четкие результаты. Автор надеется, что эти требования послужат противовесом от излишне упрощенного подхода к использованию специфических реагентов и от недооценки сложностей интерпретации получаемых результатов.

В книге не приводится всеобъемлющего каталога специфических реагентов. Хорошую сводку по этому вопросу читатель может найти в книге «Методы энзимологии», т. 11. Для иллюстрации возможностей, которые

Таблица 6

Действие специфических реагентов на активность роданзы

Реагент	Наблю- даемый результат ¹⁾	Группировки, подверженные действию данного реагента						Дена- тура- ция	
		гисти- дин	цистеин	тирозин	мочн. о-ян	-COOH	NH ₂		трипто- фан
H ₂ O ₂	++	+	+	+	+	-	-	+	
Фотоокисление	++	+	+	+	+	-	-	+	
Диазобензолсульфонат	-	+	+	+	+	-	-	-	
Динитрофторбензол	++	+	+	+	+	-	-	-	
Динитрохлорбензол	++	+	+	+	+	-	-	-	
Динитробензол	++	-	-	-	-	-	-	-	
Меркурибензоат	-	+	+	+	+	-	-	-	
Иодацетат	++	+	+	+	+	-	-	-	
N-этилмалеимид	++	+	+	+	+	-	-	-	
Меркаптэганол + O ₂	++	+	+	+	+	-	-	-	
N-бромсукцинимид	++	+	+	+	+	-	-	-	
Акцепторы, образующие КПЗ	++	-	-	-	-	-	-	-	

¹⁾ Знак плюс в этом столбце означает либо инактивацию, либо конкурентное ингибирование, знак минус — отсутствие эффекта.

²⁾ Отатки триптофана, вероятно, образуют комплексы с динитроарильными соединениями, которые окисляют сульфгидрильные группы.

³⁾ Динитроарильные соединения окисляют сульфгидрильные группы активно вентра роданзы с образованием неактивного димера, хотя они не способны к легкому окислению друг друга; тиоловых соединений.

⁴⁾ Сульфгидрильные группы нативной роданзы, по-видимому, не восприимчивы к действию меркурибензоата, хотя этот реагент в всех других случаях взаимодействует с SH-группами.

дает применение таких реагентов, в табл. 6 представлены результаты исследования роданезы. Суммарный вывод из данных этой таблицы состоит в том, что активный центр роданезы содержит остатки цистеина и триптофана и, вероятно, не содержит других остатков.

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

В последнее время стало ясно, что монофункциональные реагенты лучше всего использовать совместно с бифункциональными, так как результаты таких исследований дают возможность оценить расстояние между участвующими в катализе функциональными группами глобулярной структуры фермента. Часто это оказывается единственным методом, позволяющим убедиться в том, что существенная для катализа группировка локализована в активном центре, а не выполняет какую-то структурную функцию [14]. Так, конкурентный ингибитор, взаимодействующий с одной из функциональных групп фермента, может ослабить действие даже необратимого реагента, специфичного в отношении другой группировки, если эти две группировки находятся в активном центре: Если эти два вида реакционноспособности могут быть совмещены в одной молекуле, то исследование влияния такого бифункционального реагента на активность фермента может помочь в оценке расстояния между группировками. При этих условиях наличие обратимого компонента может не ослабить, а усилить действие необратимого компонента.

В качестве примера здесь можно снова привести роданезу. Как было указано в предыдущем разделе, одна из двух сульфгидрильных групп этого фермента, несомненно, имеет существенное значение для его активности [11]. Фермент содержит также остаток триптофана, разрушение которого приводит к утрате активности [15]. Помимо того, реагенты, образующие обратимые комплексы с индольными группировками, в том числе катионы пиридиния [15] и (довольно часто) ароматические анионы [11], являются ингибиторами фермента, конкурирующими с тиосульфатом. Возникает вопрос, не расположены ли эти группировки весьма близко в активном фер-

менте. Ответ на этот вопрос важен при формулировании представления о химическом механизме каталитического действия этого фермента.

Два факта заставляют думать, что упомянутые группировки действительно расположены в ферменте весьма близко. Во-первых, ароматические соединения, являющиеся конкурентными ингибиторами фермента, ингибируют также реакцию с сульфгидрильной группой, играющей существенную роль в катализе. Во-вторых, ароматические окислители (динитрофенильные соединения), обладающие незначительной реакционной способностью в отношении обычных сульфгидрильных групп, но способные к образованию комплексов с остатками триптофана, окисляют эту сульфгидрильную группу с большой скоростью. Эти факты убедительно свидетельствуют о том, что остаток триптофана и сульфгидрильная группа расположены поблизости друг от друга и что они близки (по меньшей мере) к центру связывания тиосульфата. В настоящее время метод бифункциональных ингибиторов используется достаточно широко. Шоу [16] описал группу специфических реагентов, взаимодействующих с активными центрами химотрипсина и трипсина. Уолд [17] обобщил опыт применения бифункциональных реагентов для поперечной сшивки пептидных цепей с помощью ковалентных связей.

РЕАГЕНТЫ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К МОЛЕКУЛЯРНОМУ ОКРУЖЕНИЮ

Общеизвестно, что абсорбционные и эмиссионные спектры органических соединений зависят от свойств физической среды. Тонкая структура спектров поглощения ароматических соединений, наблюдаемая при исследовании их в неполярных растворителях, исчезает при исследовании спектров тех же соединений в водных растворах. В полярных растворителях уменьшается также интенсивность флуоресценции, и иногда весьма значительно. Такого рода наблюдения навели на мысль о возможности исследовать природу физической среды внутри белковой молекулы с помощью спектральных исследований специфических группировок, присоединяемых для

этих целей к белку. Кошланд [18] назвал такие группировки «репортерскими группами».

Примером, иллюстрирующим указанный здесь принцип, служит применение 2-окси-5-нитробензилбромида, специфически реагирующего с остатками триптофана [19]. В том случае, когда этот реагент взаимодействует с остатками триптофана вблизи активного центра, присоединение субстрата влияет на его спектральную характеристику. В последнее время эта идея была использована в ряде исследований [20, 21]. Так, вид ультрафиолетового спектра поглощения продукта реакции флуоресцеинмеркуриацетата с сульфгидрильными группами активного центра роданезы позволил заключить, что в районе активного центра имеются гидрофобные участки [22]. Этот результат согласуется с неполярной природой пептидов, принадлежащих области активного центра и полученных путем триптического гидролиза роданезы [23].

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford, London, 1958.
Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, Academic, New York, 1964. (Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, изд-во «Мир», М., 1966.)
Hirs C. H. W., *Methods Enzymol.*, 11, 1967.
Baker B. R., *Design of Active-Site-Directed Irreversible Enzyme Inhibitors*, Wiley, New York, 1967.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Dixon M., *Biochem. J.*, 55, 161 (1953).
2. Bender M. L., Kaiser E. T., *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 2556 (1962).
3. Bender M. L., Kézdy F. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3704 (1964).
4. Brant D. A., Barnett L. B., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1526 (1957).
5. Volini M., DeToma F., Westley J., *J. Biol. Chem.*, 242, 5220 (1967).
6. Volini M., Westley J., *J. Biol. Chem.*, 241, 5168 (1966).
7. Cathou R. E., Hammes G. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 4669, 4674 (1965).
8. McClure W. O., Edelman G. M., *Biochemistry*, 5, 1908 (1966).
9. Takahashi K., Moore S., Stein W. H., *Federation Proc.*, 26, 601 (1967).

10. Brewer C. F., Riehm J. P., *Anal. Biochem.*, **18**, 248 (1967).
11. Wang S.-F., Volini M., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5465 (1968).
12. Ray W. J., Jr., Koshland D. E., Jr., *J. Biol. Chem.*, **237**, 2493 (1962).
13. Koshland D. E., Jr., Strumeyer D. H., Ray W. J., Jr., *Brookhaven Symp. Biol.*, **15**, 101 (1962).
14. Koshland D. E., Jr., *Advan. Enzymol.*, **22**, 45 (1960).
15. Davidson B., Westley J., *J. Biol. Chem.*, **240**, 4463 (1965).
16. Shaw E., *Methods Enzymol.*, **11**, 677 (1967).
17. Wold F., *Methods Enzymol.*, **11**, 617 (1967).
18. Horton H. R., Koshland D. E., Jr., *Methods Enzymol.*, **11**, 556, 856, 857 (1967).
19. Horton H. R., Koshland D. E., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1126 (1965).
20. Berliner L. J., McConnell H. M., *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **55**, 708 (1966).
21. Conway A., Koshland D. E., Jr., *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 593 (1967).
22. Horowitz P., Westley J., Manuscript in preparation.
23. DeToma F., Westley J., Manuscript in preparation.

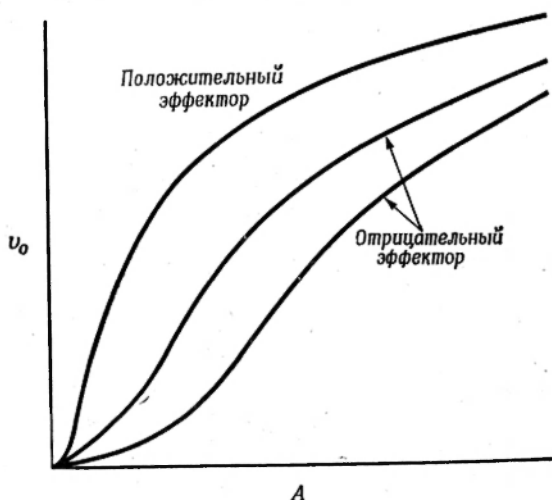
Регуляция метаболизма на уровне ферментов

Вообще говоря, энзимология с запозданием обратилась к исследованиям атипического поведения ферментов, участвующих в регуляции метаболизма. Энзимологи охотно работали с «линейными» системами, т. е. с системами, у которых графики линеаризованных функциональных зависимостей имеют вид прямых, и с неохотой брались за исследование систем, характеризующихся более сложным поведением. Однако в настоящее время обнаружено много ферментов, у которых зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата описывается не гиперболой, а сигмоидной кривой, и мы, несомненно, обязаны рассмотреть теоретические основы этого явления. Помимо того, учитывая огромное биохимическое значение регуляторных систем, мы должны также хотя бы кратко рассмотреть механизмы регуляции, и особенно саморегуляции, в системах простейшего типа, в которых участвует более

чем один фермент. Конечно, нам придется ограничиться элементарным рассмотрением этих двух проблем, поскольку они лежат несколько в стороне от основной темы книги. Изложенный ниже материал следует рассматривать лишь как общее введение в проблему регуляции метаболизма.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИГМОИДНАЯ КИНЕТИКА

Теоретические представления о действии регуляторных ферментов базируются главным образом на кинетических данных, свидетельствующих о том, что зависимость начальной скорости многих ферментативных реакций от концентрации субстрата при некоторых условиях



Фиг. 24. Сигмоидные кинетические кривые для реакции в присутствии и в отсутствие эффектора.

выражается не равнобочной гиперболой, а сигмоидной кривой (так называемая сигмоидная кинетика¹; фиг. 24). Чаще всего это наблюдается для ферментов,

¹ Помимо сигмоидного характера зависимости скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата (кооперативная кинетика) или аллостерического эффектора (фиг. 24), существуют и другие типы кинетических проявлений аллостерических взаимодействий, связанных с регуляторными свойствами ферментов (Б. И. Курганов и О. Л. Поляновский, Журн. Всес. хим. общ. им. Д. И. Менделеева, 16, 421 (1971)). — *Прим. ред.*

катализирующих реакции в точках разветвления биосинтетических путей, или для ферментов, предположительно играющих какую-то роль в регуляции потока метаболической энергии. Интуитивно ясно, что перемещение области, в которой скорость реакции наиболее сильно зависит от концентраций субстрата, в направлении физиологических их величин, должно иметь регуляторное значение. Одним из путей реализации такого механизма является использование сигмоидной кинетики. Обычно в регуляторном механизме участвует какой-либо активатор или ингибитор (положительный или отрицательный эффектор на фиг. 24), роль которого иногда играет сам субстрат.

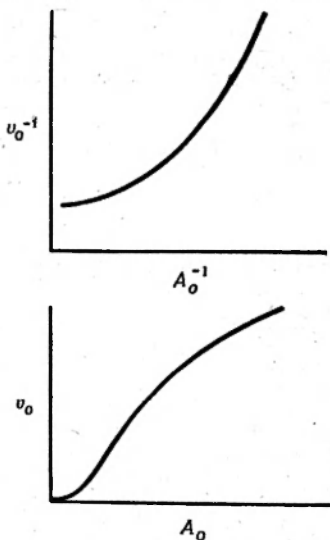
Многие теоретические представления в этой области базируются на аналогии между негиперболической зависимостью скорости реакции от концентрации субстрата в тех случаях, когда реакцию катализируют регуляторные ферменты, и сигмоидным характером зависимости связывания кислорода гемоглобином. Судя по тому, что рентгенограммы кристаллов гемоглобина и оксигемоглобина имеют различный вид, связывание кислорода сопровождается определенным изменением конформации; по аналогии возникло предположение, что механизм действия регуляторных ферментов также связан со структурными явлениями. Посмотрим, насколько удачна эта аналогия.

Можно представить себе по меньшей мере шесть разных причин возникновения сигмоидной кинетики. Некоторые из них тривиальны и могут быть легко выявлены, другие имеют, вероятно, более важное значение, однако их труднее проанализировать. Мы кратко рассмотрим каждую из них, а затем перейдем к другим типам регуляторных механизмов, которые не приводят к сигмоидной кинетике в обычном смысле слова¹.

¹ Помимо ситуаций, рассмотренных автором, сигмоидная зависимость скорости реакции от начальной концентрации субстрата может наблюдаться в тех случаях, когда в ходе ферментативной реакции возникает или стабилизируется такое конформационное состояние молекулы фермента, при котором его активность превосходит активность исходного фермента [Rabin B. B., *Biochem. J.*, 102, 226 (1967), Keleti T., *Acta biochim. biophys. Acad. Sci. Hung.* 3, 147

ОШИБКИ В ИЗМЕРЕНИИ РЕАЛЬНОЙ
КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

Как было показано в гл. IV, графики двойных обратных величин оказываются существенно нелинейными в тех случаях, когда в среде присутствует модификатор, необратимо реагирующий с субстратом, концентрация которого в эксперименте меняется. Такой график изображен на фиг. 25, где показана также сигмоидная зависимость v_0 от A . Это, конечно, тривиальный случай, когда молекула «эффектора» или какая-либо примесь просто стехиометрически взаимодействует с субстратом. То же самое наблюдается и тогда, когда растворы эффектора или фермента содержат субстрат в количестве, существенно изменяющем его общую низкую концентрацию в исследуемом растворе. Это тоже тривиальный случай нелинейной кинетики, однако о возможности такого рода явлений не следует забывать. При работе со сложными реакционными средами или при использовании не очень хорошо очищенных ферментов эффекты подобного типа возникают особенно часто, и они, конечно, мешают правильной интерпретации механизмов регуля-



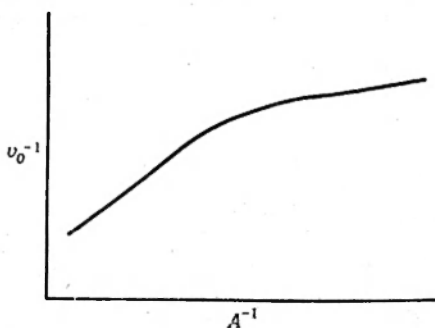
Фиг. 25. Кинетические кривые для системы, содержащей модификатор, обратимо реагирующий с субстратом.

(1968)}. Кооперативная кинетика может наблюдаться у ферментативных систем, в которых роль субстрата выполняет комплекс с ионом металла (London W. M., Steck T. L., *Biochemistry*, 8, 1767, 1969). Нестабильность фермента (Harding W. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 57, 1969) или изменение среды при высоких концентрациях субстрата [К. Мартинек, А. В. Левашев, В. Л. Рубайло, С. Д. Варфоломеев, И. В. Березин, *Биохимия*, 35, 1207 (1970)] также могут привести к кооперативной кинетике. — *Прим. ред.*

ции ферментативных реакций. Работая с тщательно очищенными реагентами и аккуратно измеряя их концентрации, можно обойти эти нежелательные осложнения.

СМЕСИ ФЕРМЕНТОВ

Если исследуемый раствор содержит не один, а несколько ферментов, воздействующих на варьируемый субстрат, то кинетические данные также могут выражаться сигмоидной кривой насыщения. На фиг. 26 показаны типичные результаты исследования смеси, содержащей два фермента, конкурирующие за один субстрат.



Фиг. 26. График двойных обратных величин для системы двух ферментов, действующих на один субстрат.

Строго говоря, зависимость v_0 от A в этом случае не должна быть сигмоидной. Но на практике, если скорость реакции измеряется по нарастанию концентрации продукта, кинетика действия смеси ферментов, катализирующих превращение одного субстрата в разные продукты, нередко имеет сигмоидный вид. Причиной кажущегося снижения скорости реакции при низкой концентрации субстрата является при этом превращение субстрата в конкурирующей реакции, протекающей с большей скоростью.

В этом случае «эффектор» является просто активатором одного из ферментов. Это явление легко распознать по расхождению кинетики использования субстрата и кинетики образования всех ожидаемых продуктов реакции. Чтобы обойти эти осложнения, нужно, конечно, работать с высокоочищенными ферментными препаратами, проверенными на содержание мешающих примесей, и измерять как расход субстрата, так и образование продукта реакции.

Могло бы показаться, что эта причина нелинейного поведения столь же тривиальна физиологически, как и упомянутые в предыдущем разделе, и является просто ловушкой для неосторожного или ленивого энзимолога. Однако ферменты *in vivo*, вероятно, конкурируют за дефицитные субстраты, особенно за коферменты, и такой механизм вполне может иметь отношение к регуляторным системам клетки.

НЕЛИНЕЙНЫЕ ДВУХСУБСТРАТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

В гл. VIII было показано, что даже если в растворе имеется один-единственный фермент, но он образует две формы, способные взаимодействовать с варьируемым субстратом, то кинетика реакции, катализируемой этим ферментом, будет нелинейной. Например, нелинейной кинетикой характеризуется двухсубстратный механизм с образованием тройного комплекса, когда порядок присоединения субстратов при образовании комплекса не имеет значения (т. е. если A может реагировать как со свободным E , так и с комплексом (EB)) и когда еще не достигнуты равновесные условия. При некоторых условиях зависимость v_0 от A будет сигмоидной. Таким образом, любое вещество, которое ускоряет разрушение тройного комплекса, может оказаться «эффектором», переводя систему из равновесного состояния в неравновесное¹.

Здесь приведен лишь один пример из относительно большого числа возможностей этого общего типа [1]. В действительности представление о линейном и разветвленном механизмах приводит также к пониманию других причин нелинейного поведения, рассмотренных далее. В этом разделе, как и в двух предыдущих, мы

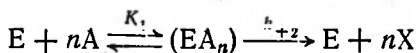
¹ В присутствии «эффектора» подобного типа зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата может приобрести S-образный характер. Этот случай кооперативной кинетики можно отличить от кооперативной кинетики, обусловленной кооперативным взаимодействием центров связывания субстрата в молекуле фермента, изучая скорость изотопного обмена между субстрами и продуктами в равновесных условиях [Engers H. D., Bridger W. A., Madsen N. V., *Biochemistry*, 9, 3281 (1970)]. — *Прим. ред.*

хотели показать возможность неспецифических и даже тривиальных причин такого кинетического поведения системы, которое некоторые авторы ошибочно рассматривали как доказательство регуляторной функции или, еще хуже, как доказательство особой структуры фермента.

МНОГОЦЕНТРОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Серьезное рассмотрение истинно регуляторных механизмов следует, вероятно, начать со случая, когда в молекуле фермента имеется множество эквивалентных центров связывания субстрата.

Такой механизм лучше всего описывается уравнением Хилла [2]. Следуя Аткинсону и сотр. [3], предположим, что число центров связывания равно n и в системе выполняются равновесные условия. Тогда



и

$$K_1 = \frac{EA^n}{(EA_n)}. \quad (55)$$

Здесь K_1 — константа диссоциации, аналогичная K_s . Если, помимо того, предположить, что связывание является выражено кооперативным (т. е. что связывание каждой молекулы субстрата увеличивает константу ассоциации для следующей молекулы), то в растворе будут присутствовать в значительной концентрации лишь две формы фермента — свободный и полностью насыщенный фермент:

$$E_0 = E + (EA_n). \quad (56)$$

Отсюда следует, что суммарная скорость катализируемой реакции будет определяться распадом полностью насыщенного фермента:

$$v_0 = k_{+2}(EA_n). \quad (57)$$

Принимая во внимание, что

$$V = k_{+2}E_0, \quad (58)$$

из уравнений (56—58) получим

$$k_{+2}E = V - v_0. \quad (59)$$

Отсюда следует, что

$$\frac{(EA)_n}{E} = \frac{v_0}{V - v_0} = \frac{A^n}{K_1}. \quad (60)$$

Логарифмируя уравнение (60), получаем обычную форму уравнения Хилла¹

$$\log \frac{v_0}{V - v_0} = n \log A - \log K_1.$$

Графически зависимость $\log [v_0/(V - v_0)]$ от $\log A$ выражается прямой, имеющей наклон, равный n и отсекающий на оси ординат отрезок, равный $(-\log K_1)$.

По поводу этого вывода следует сделать несколько замечаний. Прежде всего отметим, что предположения, положенные в его основу, являются произвольными и весьма условными. Пользуясь уравнением Хилла, нужно помнить, что истинный смысл коэффициента n неизвестен. Этот коэффициент должен быть сложной функцией числа связывающих центров и степени их взаимодействия². С исчезновением взаимодействия между центрами величина n становится равной единице³.

Аналогичным образом было бы ошибкой думать, что константа K_1 имеет определенный физический смысл, даже если считать ее суммарной константой равновесия в соответствии с уравнением (55). Как отмечали Хилл [2] и Аткинсон с сотр. [3], уравнение Хилла представляет собой обобщенное уравнение Анри и, следовательно, страдает тем же общим недостатком — оно выве-

¹ Заметим, что $\sqrt[n]{K_1}$ соответствует концентрации «полунасыщения» $A_{0,5}$, т. е. концентрации лиганда, при которой $v_0 = V/2$. — *Прим. ред.*

² Способ оценки энергии взаимодействия связывающих центров при помощи графика Хилла был предложен Уайменом [Wyman T., *Quart. Rev. Biophys.* 1, 35 (1968)]. — *Прим. ред.*

³ Это означает, что ферменты с несколькими активными центрами, между которыми нет взаимодействия, дают нормальную гиперболическую зависимость v_0 от A . Практически, однако, методами кинетики невозможно установить, сколько независимых каталитических центров содержит молекула фермента.

дено в предположении, что между всеми ферментсодержащими соединениями в системе существует равновесие. На самом деле K_1 представляет собой сложную константу стационарной кинетики. Ее величина, разумеется, зависит от сродства субстрата к ферменту, однако она может зависеть также и от констант скорости стадий, не имеющих отношения к связыванию субстрата. Эффекторы, которые влияют на концентрацию полунасыщения фермента субстратом, не изменяя величины V , предположительно оказывают воздействие на стадию связывания субстрата, но из этого, конечно, не следует, что равновесные условия в системе действительно достигнуты. Те же самые экспериментальные данные согласуются и с прямо противоположным представлением о механизме реакции (соответствующем полностью необратимому связыванию субстрата) или со случаем любого промежуточного механизма.

Если принять во внимание оговорки относительно исходных предположений, положенных в основу уравнения Хилла, то можно только удивляться, насколько хорошо для некоторых ферментов выполняются условия, допускающие сравнительно простую интерпретацию в терминах этой теории. Отличным примером служит исследование дрожжевой НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (Аткинсон и сотр. [3]). В этой работе графики уравнения Хилла для всех субстратов и эффекторов оказались прямолинейными, причем наклоны прямых были целночисленными при самых различных условиях эксперимента. Это доказывает, что в данном случае коэффициент n , по-видимому, действительно соответствует числу связывающих центров, т. е. что степень кооперативности весьма велика. Действительно, если признать верным найденное число эквивалентных центров связывания субстратов и эффекторов и предположить, что фактор взаимодействия для субстратных центров ≥ 20 (по меньшей мере двадцатикратное увеличение константы сродства для каждой последующей реакции связывания цитрата), то, сделав некоторые добавочные несущественные предположения (число их поразительно мало), можно создать кинетическую модель, которая очень хорошо соответствует эксперимен-

тальным данным, характеризующим сложную регуляторную кинетику действия этого фермента. Незначительное варьирование задаваемых параметров взаимодействия может привести к сколь угодно близкому соответствию с экспериментальными данными.

Совершенно ясно, что такая простая зависимость не может быть распространена на все регуляторные ферменты, однако сам факт существования такого «чистого случая» доказывает, что основные принципы этого анализа, возможно, справедливы для большинства регуляторных механизмов. Примечательно, что эта модель в отличие от других описанных далее моделей соответствует экспериментальным данным и в том отношении, что не требует уменьшения сигмоидности при увеличении концентрации положительного эффектора. Кривые для фермента, полностью насыщенного положительным эффектором, сохраняют свою сигмоидную форму.

Следует также заметить, что эта модель не предусматривает никакого специального физического механизма взаимодействия центров. Ее авторы считают, что оно может быть объяснено на основе гипотезы «принудительного контакта» Кошланда, согласно которой образование комплекса с одной из молекул субстрата приводит к конформационным изменениям фермента, которые каким-то образом повышают его сродство к следующим молекулам субстрата. Конформационные изменения лежат в основе и других, более сложных моделей регуляторной кинетики, рассматриваемых ниже.

РАЗДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНЫХ И ЭФФЕКТОРНЫХ СУБЪЕДИНИЦ

К представлению о том, что молекулы субстрата и молекулы регуляторных метаболитов связываются с отдельными (а не с перекрывающимися) центрами фермента, привело часто наблюдаемое различие химического строения специфических субстратов и специфических эффекторов (отсюда, кстати сказать, произошел термин «аллостерический» эффектор). Герхарт и Парди [4] использовали эту концепцию при исследовании аспартат-транскарбамилазы, для которой отрицательным эффек-

тором является цитидинтрифосфат (ЦТФ), а положительным — АТФ. Эта работа завершилась, выделением индивидуальных каталитических и эффекторсвязывающих субъединиц [5]. Выделенные каталитические субъединицы обнаруживали нормальную (несигмоидную) кинетику и были нечувствительны к ЦТФ и АТФ. Из выделенных субъединиц удалось реконструировать регуляторный фермент. Таким образом, в этом случае разделение центров и наличие конформационных изменений при взаимодействии субъединиц продемонстрировано совершенно четко. Пока еще не вполне ясно, лежит ли такой механизм в основе действия всех регуляторных ферментов.

Фриден [6, 7] предпринял интересное теоретическое исследование, исходя из гипотезы разделения центров. В первой своей работе он вывел кинетические уравнения для случая канонического односубстратного механизма, осложненного участием эффектора и центра его связывания в молекуле фермента. С помощью этих уравнений оказалось возможным выразить регуляторное поведение фермента, не прибегая к представлению о множестве взаимодействующих центров связывания субстрата. Во второй работе автор усложнил систему, введя представление о множестве центров, и провел сравнение различных моделей механизма. Этот метод позволяет различать механизмы процесса, не прибегая к предположению о существовании неактивных субъединиц. В предложенной модели, которая представляет собой дальнейшее развитие модели Моно (см. ниже), вводится представление о частичном связывании субстрата как субъединицами, так и олигомерной формой фермента¹.

¹ Идея о том, что смещение равновесия между олигомерными формами фермента под действием субстрата может привести к кооперативной кинетике, была независимо от Фридена высказана и в других работах [Курганов Б. И., Химия и технология полимеров, 11, 140 (1967); Nichol L. W., Tackson W. T. H., Winzor O. T., Biochemistry, 6, 2449 (1967)]. Следует, однако, отметить, что подобная идея была впервые использована в 1912 году Холдейном и др. [Douglas C. G., Haldane T. S., Haldane T. B. S., I. Physiol., 44, 275 (1912)] для объяснения сигмоидного характера кривой, описывающей зависимость степени насыщения гемоглобина от парциального давления кислорода. — *Прим. ред.*

МНОЖЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СУБЪЕДИНИЦ
С НЕКООПЕРАТИВНЫМ СВЯЗЫВАНИЕМ

Пытаясь найти модель, которая могла бы описать в наиболее общей форме механизм действия регуляторных ферментов, Моно и сотр. [8] высказали предположение, что каждая субъединица фермента содержит один центр, связывающий субстрат, и один центр, связывающий эффектор. При действии эффектора изменяется соотношение концентраций двух олигомерных форм фермента, имеющих разную конформацию и разное сродство к субстрату. Эта модель объясняет сигмоидную кинетику, характерную для значительного числа ферментов, исследованных Моно и сотр. [8], а также глутаматдегидрогеназы [9], глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы млекопитающих [10] и дрожжевой глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы [11]. Вместе с тем ее нельзя считать общей, так как она не позволяет объяснить результаты исследования аспартаттранскарбамилазы, приведенные выше¹. Более того, в условиях насыщения эффектором, когда весь фермент должен существовать в одной форме, модель предсказывает отсутствие сигмоидной кинетики; на самом деле, как показал Аткинсон [15], это неверно в отношении упоминавшейся выше дрожжевой изоцитратдегидрогеназы и фосфофруктокиназы *E. coli* [16]. Таким образом, оказывается невозможным кинетически различить модель Моно и сотр. и более общую модель многоцентрового фермента с кооперативностью².

¹ Недавно, однако, вышли три работы, в которых показана возможность преодолеть это затруднение путем пересмотра модели механизма действия аспартаттранскарбамилазы [12—14].

² Это утверждение не совсем верно. В последнее время было показано, что кинетические подходы могут быть использованы для обнаружения аллостерических взаимодействий, обусловленных изменением степени диссоциации ферментативного олигомера под действием субстрата и аллостерических эффекторов [Курганов Б. И., Мол. биол. 2, 430 (1968)], и для доказательства выполнимости модели Моно, Уаймена и Шанжэ [Курганов Б. И., Яковлев В. А., Мол. биол. 7, № 1 (1972)]. Кроме того, методы исследования быстрой кинетики могут оказаться полезными для дифференциации механизмов аллостерических взаимодействий [см., например, Kirschner K., Gallego E., Echuster I., Goodall O., I. Mol. Biol. 58, 29 (1971); Kirschner K., I. Mol. Biol., 58, 51 (1968)]. — *Прим. ред.*

Кошланд и сотр. [17] рассмотрели четыре из возможных способов взаимодействия четырех субъединиц, каждая из которых имеет один центр связывания субстрата. Предполагалось, что субъединицы могут существовать в двух формах — связывающей и не связывающей субстрат. При этом рассмотрении предшествующие выводы Моно [8] и Аткинсона [3] умышленно не принимались во внимание. В результате тщательного сравнения кинетических следствий, проистекающих из постулируемых схем взаимодействия, было установлено два весьма важных общих положения: а) системы с взаимодействующими субъединицами *могут* давать нормальные гиперболические кривые насыщения (это следует сопоставить с приведенными в начале этой главы данными о том, что сигмоидные кривые *могут* быть получены при разных условиях, не обязательно связанных с субъединицами или с взаимодействием субстратных центров); б) для объяснения одних и тех же опытных данных (одной кривой насыщения) пригодны почти в равной мере многие разные модели; следовательно, кинетический анализ сам по себе не позволяет сделать выбор среди возможных формальных механизмов регуляции активности ферментов.

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ

Аткинсон [18, 19] исследовал недавно вопрос о том, как влияет на кинетику процесса изменение концентрации субстрата в условиях, когда сумма концентраций субстрата и продукта реакции сохраняется на постоянном уровне и продукт является конкурентным ингибитором. Явление конкурентного связывания субстрата и продукта одноцентровой молекулой фермента хорошо известно. Новое здесь — условие сохранения постоянной общей концентрации конкурирующих реагентов. Иными словами, речь идет о реакции $A \rightarrow X$, начальная скорость которой исследуется в зависимости от A при $A + X = \text{const}$. Такого рода ситуация характерна для реакций с участием коферментов, при которых происходит взаимопревращение молекулярных форм, имеющее значительно большую скорость, чем реакции синтеза или распада основной структуры.

Аткинсон и его сотрудники обнаружили высокую чувствительность системы к A (резко выраженную сигмоидную зависимость) при каждом фиксированном уровне $A + X$. Авторы отмечают, что такая зависимость должна наблюдаться в том случае, если скорость реакции зависит от соотношения концентраций. В частности, они применяют найденную закономерность к системе энергетических путей обмена, предполагая, что у всех ферментов этой системы, использующих АТФ, кинетика характеризуется именно такой зависимостью от «энергетического заряда» клетки. Под «энергетическим зарядом» подразумевается половина среднего числа фосфатных остатков ангидридного характера, приходящихся на молекулу аденозина; величина заряда колеблется от нуля (все фосфаты в форме АМФ) до единицы (все фосфаты в форме АТФ).

Было найдено, что аналогичное поведение обнаруживает фермент расщепления цитрата из печени крыс [18] и фосфорибозилпирофосфатсинтетаза *E. coli* [19]. В обоих случаях АДФ конкурирует с АТФ, хотя непосредственным продуктом реакции в последнем случае является АМФ.

Естественно возникает предположение, что высокая чувствительность системы к концентрации АТФ, постулируемая в рассматриваемом здесь механизме, лежит в основе общего механизма регуляции процессов, связанных с запасанием метаболической энергии, на которые накладываются процессы регуляции потребления энергии, действующие по принципу «обратной связи».

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Atkinson D. E., Ann. Rev. Biochem., 35 (1966).
Stadtman E. R., Advan. Enzymol., 28 (1966).
*Koshland D. E., Jr., Neef K. E., Ann. Rev. Biochem., 37, 359, 1968.
*Whitehead E., Progr. Bioph. and Molec. Biol., 21, 321, 1970.
*Алlostерическая регуляция действия ферментов, Итоги науки, сер. биологическая химия, под ред. В. Л. Кретовича, ВИНТИ, М., 1971.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Sweeney J. R., Fisher J. R., Biochemistry, 7, 561 (1968).
2. Hill A. J., Biochem. J., 7, 471 (1913).
3. Atkinson D. E., Hathaway J. A., Smith E. C., J. Biol. Chem., 240, 2682 (1965).

4. Gerhart J. C., Pardee A. B., *J. Biol. Chem.*, **237**, 891 (1962).
5. Gerhart J. C., Holoubek H., *J. Biol. Chem.*, **242**, 2886 (1967).
6. Frieden C., *J. Biol. Chem.*, **239**, 3522 (1964).
7. Frieden C., *J. Biol. Chem.*, **242**, 4045 (1967).
8. Monod J., Wyman J., Changeux J. P., *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
9. Bitensky M. W., Yielding K. L., Tomkins G. M., *J. Biol. Chem.*, **240**, 663, 668 (1965).
10. Levy H. R., Raineri R. R., Nevaldine B. H., *J. Biol. Chem.*, **241**, 2181 (1966).
11. Kirschner K., Eigen M., Bittman R., Voigt B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **56**, 1661 (1966).
12. Changeux J.-P., Gerhart J. C., Schachman H. K., *Biochemistry*, **7**, 531 (1968).
13. Gerhart J. C., Schachman H. K., *Biochemistry*, **7**, 538 (1968).
14. Changeux J.-P., Rubin M. M., *Biochemistry*, **7**, 553 (1968).
15. Atkinson D. E., *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 85 (1966).
16. Atkinson D. E., *J. Biol. Chem.*, **240**, 757 (1966).
17. Koshland D. E., Jr., Némethy G., Filmer D., *Biochemistry*, **5**, 365 (1965).
18. Atkinson D. E., Walton D. M., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3239 (1967).
19. Atkinson D. E., Fall L., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3241 (1967).

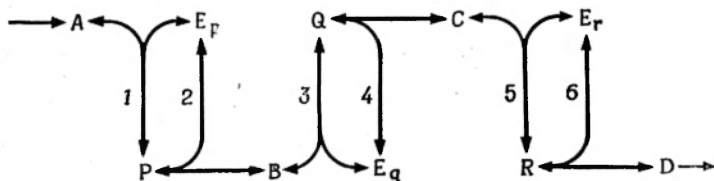
СОПРЯЖЕННЫЕ И ЦИКЛИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Как мы видели, существует достаточно много возможных регуляторных механизмов на уровне индивидуальных ферментов. Исследуем теперь механизмы регуляции, которые могли бы возникать при одновременном действии более чем одного фермента. Это необходимо потому, что вполне можно представить себе такие свойства фермента, которые будут понятны только в том случае, если рассматривать их в связи с сопряженными реакциями. Конкретный вопрос, стоящий перед нами, заключается в следующем: является ли способность к регуляции неотъемлемым свойством системы последовательных реакций и важен ли в этом отношении характер реакционной системы? Чтобы ответить на этот вопрос, мы рассмотрим стационарную кинетику участка открытой системы с линейной последовательностью реакций, а затем то же для циклической системы. Для открытых систем характерен постоянный стационарный приток и отток веществ, обеспечивающий минимум энтропии (аналогично равновесному состоянию в замкнутой системе) [1, 2].

ЛИНЕЙНЫЕ СОПРЯЖЕННЫЕ СИСТЕМЫ

Кинетический анализ открытой системы существенно не отличается от анализа последовательности стадий индивидуальной каталитической реакции, рассмотренного в первых главах. Исходным предположением является стационарное поступление в систему первого промежуточного продукта и выход последнего промежуточного продукта в раствор, содержащий этот продукт в стационарной концентрации. Помимо того что в этом случае нельзя использовать понятие о начальной скорости, никаких других осложнений не возникает. Как и ранее, мы будем предполагать, что в основном кинетическое поведение системы может быть описано с помощью последовательности мономолекулярных и бимолекулярных реакций¹.

¹ Правильность этого предположения показана достаточно строго Хироном [3].



Фиг. 27. Линейная сопряженная система ферментов.

E_p , E_q и E_r — различные ферменты, P, Q и R — их комплексы с субстратами A, B и C.

На фиг. 27 изображена подлежащая рассмотрению модель. Вещество A постоянно поступает в систему, вещество D постоянно удаляется; система функционирует в соответствии с законами стационарной кинетики¹. Тогда

$$v = k_{+2}P - k_{-2}BE_p = k_{+4}Q - k_{-4}CE_q = \dots, \quad (61)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_{+1}AE_p + k_{-2}BE_p - k_{-1}P - k_{+2}P. \quad (62)$$

В стационарном состоянии системы левая часть уравнения (62) обращается в нуль. Уравнение постоянства суммы концентраций всех форм фермента для E_p имеет вид

$$(E_p)_0 = E_p + P. \quad (63)$$

Из уравнений (62) и (63) получаем

$$P = \frac{(E_p)_0 (k_{+1}A + k_{-2}B)}{k_{+1}A + k_{-2}B + k_{-1} + k_{+2}}, \quad (64)$$

а из уравнений (61), (63) и (64) —

$$v = (E_p)_0 \left[(k_{+2} + k_{-2}B) \left(\frac{k_{+1}A + k_{-2}B}{k_{+1}A + k_{-2}B + k_{-1} + k_{+2}} \right) - k_{-2}B \right]. \quad (65)$$

¹ Чтобы эта модель отвечала любой реальной системе, будем считать, что концентрации всех необходимых кофакторов и других добавочных реагентов поддерживаются постоянными.

Введя величину K_m для фермента E_p , получим

$$\begin{aligned} v &= (E_p)_0 \left[(k_{+2} + k_{-2}B) \left(\frac{A/K_{mp}^A + B/K_{mp}^B}{A/K_{mp}^A + B/K_{mp}^B + 1} \right) - k_{-2}B \right] = \\ &= (E_q)_0 \left[(k_{+4} + k_{-4}C) \left(\frac{B/K_{mq}^B + C/K_{mq}^C}{B/K_{mq}^B + C/K_{mq}^C + 1} \right) - k_{-4}C \right] \dots, \end{aligned} \quad (66)$$

где

$$K_{mp}^A = \frac{k_{+2} + k_{-1}}{k_{+1}}$$

и

$$K_{mp}^B = \frac{k_{+2} + k_{-1}}{k_{-2}}.$$

Можно видеть, что максимально достижимая скорость реакции в прямом направлении для каждого участка системы, рассматриваемого в отдельности, равна произведению общей концентрации фермента на константу скорости с четным индексом (так как при $A \gg K_{mp}^A$ дробь в правой части уравнения приближается к единице и, следовательно, v приближается к $k_{+2}(E_p)_0 = V$). Отсюда вытекает, что максимальная скорость процесса для системы в целом лимитируется, как обычно, ферментом, характеризующимся наименьшей максимальной скоростью. Концентрации промежуточных соединений, реагирующих со всеми другими ферментами в сопряженной системе, будут достигать максимальных значений, определяющих эту же скорость в реакции с соответствующими ферментами. Поэтому добавление извне в систему *любого* промежуточного соединения может вызвать лишь временное изменение соотношения концентраций, но *не* постоянное изменение общей скорости процесса. Таким образом, эта очень простая сопряженная система обладает известной внутренней способностью к саморегуляции.

К тому же выводу приводит и рассмотрение действия ингибиторов на стационарную сопряженную систему. Если, например, лимитирующей стадией является E_q и в систему вводится неконкурентный ингибитор для E_q (влияющий главным образом на V), то скорость реакции

будет снижаться совершенно особым образом. В системе будет накапливаться продукт В, что приведет к двум последствиям: а) скорость $k_{+3}B$ будет увеличиваться, приближаясь к предельному значению, т. е. общее изменение скорости будет тем самым уменьшаться; б) скорость $k_{-2}B$ также будет увеличиваться, вызывая снижение результирующей скорости реакции с участием Р; тем самым скорость реакции, катализируемой ферментом E_r , автоматически снизится до соответствующего нового уровня. Таким образом, нарушение общей скорости сводится к минимуму и накопление продукта В сдерживается автоматически. Система приходит к новому стационарному состоянию.

Посмотрим теперь, что произойдет, если скорость реакции будет по-прежнему лимитироваться ферментом E_d , а фермент E_r будет частично ингибирован реагентом, влияющим главным образом на максимальную скорость катализируемой им реакции. Концентрация продукта С будет расти¹, однако это вызовет ничтожно малое изменение общей скорости V (если только ингибирование не будет столь сильным, что лимитирующей стадией станет превращение С в D).

Рассмотрим, далее, случай конкурентного ингибирования. Конкурентный ингибитор лимитирующего фермента E_d будет вызывать накопление В точно так же, как и неконкурентный ингибитор, рассмотренный выше, но в этом случае регуляция системы может быть весьма эффективной и общая скорость процесса практически не изменится. Влияние конкурентных ингибиторов на другие ферменты системы будет, вероятно, столь же слабым.

Таким образом, анализ ингибирования в сопряженных системах далеко не прост, и могут потребоваться очень высокие концентрации ингибиторов, чтобы достигнуть заметного снижения скорости реакции. Сопряженные системы этого типа обнаруживают весьма выражен-

¹ Даже и этот эффект будет выражен слабо, поскольку стационарная концентрация С должна быть ниже величины K_m^c для E_r , и потому скорость реакции на этой стадии сильно зависит от концентрации.

ную внутреннюю способность к саморегуляции *скорости*. Однако уровни концентраций в таких системах, как правило, не сохраняются постоянными (в отличие от регуляторных систем, рассмотренных в предыдущей главе), и потому ингибиторный анализ для этих систем легче проводить, исследуя влияние не на общую скорость процесса, а на концентрации промежуточных продуктов. Концентрации субстрата ингибированной реакции, как и концентрации субстратов предшествующих реакций, должны увеличиваться, а концентрации продуктов ингибированной реакции и всех последующих стадий — уменьшаться. Идентификация промежуточного соединения, концентрация которого при ингибировании остается неизменной, позволяет установить, на какую стадию процесса действует ингибитор.

При анализе линейной сопряженной системы полезно выяснить еще один вопрос: что произойдет, если одна из стадий процесса будет необратимой? Очевидно, в этих условиях процесс будет односторонним и влияние ингибитора будет совершенно иным. Большинство случаев такого рода не представляет интереса. Так, например, если необратима стадия, лимитирующая общую скорость процесса (скажем, если концентрация продукта реакции в растворе поддерживается на уровне, близком к нулю), ингибиторы влияют на V или на K_m точно так же, как в рассмотренном выше случае обратимого процесса. Продукт B будет накапливаться, и регулирование будет осуществляться по тем же законам. Аналогичным образом, если скорость процесса лимитирует стадия, предшествующая необратимой, то при ингибировании этой лимитирующей стадии сопряженная система будет вести себя так же, как в предыдущем случае. Только в том случае, когда лимитирующая стадия *следует* за необратимой, поведение системы оказывается более интересным. Пусть стадия E_p (фиг. 27) является необратимой, а стадия E_q — лимитирующей. При конкурентном ингибировании E_q будет накапливаться B , что будет препятствовать ингибированию; но если E_q ингибируется неконкурентно или бесконкурентно (или необратимо), накопление B будет лишь ограниченно восстанавливать скорость реакции. В этих условиях E_q работает, так сказать, столь

быстро, сколь может. Поэтому накопление В не может замедлить реакцию E_p и, следовательно, его концентрация будет безгранично увеличиваться. В этом единственном случае, когда неконкурентное или бесконкурентное (или необратимое) ингибирование затрагивает стадию, следующую за необратимой, сопряженная система не способна к саморегуляции. Коротко говоря, такая система вообще не способна к поддержанию заданного стационарного состояния и «захлебывается».

Итак, простую линейную систему сопряженных реакций можно охарактеризовать следующим образом.

А. Если все стадии процесса обратимы, то конкурентное ингибирование даже на стадии, лимитирующей скорость в целом, приводит лишь к незначительному изменению скорости, хотя и вызывает резкое изменение стационарной концентрации по крайней мере одного из промежуточных продуктов. Даже неконкурентные или необратимо действующие ингибиторы вызывают в большинстве случаев лишь переход системы в новое стационарное состояние.

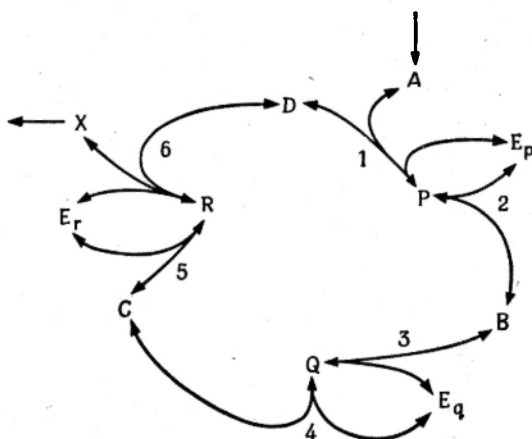
Б. Появление в системе необратимой стадии нарушает способность системы к саморегуляции (система «захлебывается») только в том случае, если неконкурентные или необратимые ингибиторы действуют на стадии, лимитирующей общую скорость процесса и *следующей* за необратимой стадией.

В заключение отметим еще два свойства сопряженных систем. Точное соотношение констант скорости и концентраций ферментов позволяет ферментным системам оперировать весьма неустойчивыми промежуточными соединениями, стационарная концентрация которых может быть весьма незначительной. Тем же целям служит структурная организация ферментов *in vivo*, в соответствии с которой даже весьма малые абсолютные количества ключевых промежуточных соединений могут создавать эффективные локальные концентрации.

ЦИКЛИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Описанные выше представления во многих отношениях, конечно, слишком упрощают действительное положение дел. Для биологических систем характерна не

простая линейная последовательность реакций, а сложная сеть реакций с петлями и циклами. Ферментативные реакции протекают часто с участием двух-трех субстратов и с образованием нескольких продуктов. Промежуточные продукты не могут накапливаться безгранично — либо они выводятся из организма, либо он гибнет. Концентрация ферментов не является строго фиксированной



Фиг. 28. Циклическая сопряженная система ферментов.
Обозначения те же, что на фиг. 27.

и регулируется в зависимости от потребностей клетки. В этом разделе нам хотелось бы отметить некоторые трудности, сопряженные с анализом ферментных систем в условиях, близких к физиологическим.

Поскольку чаще всего кинетические условия, встречающиеся при анализе физиологических систем, связаны с циклической формой процессов, рассмотрим, к чему приводит превращение простой сопряженной системы в циклическую.

Система, изображенная на фиг. 28, является циклической, но открытой: поступление первого субстрата и выход последнего продукта осуществляется непрерывно. Единственное отличие от линейной системы состоит в том, что один из начальных субстратов на более поздней

стадии регенерируется. Система находится в стационарных условиях, и уравнение общей скорости реакции, катализируемой, скажем, ферментом E_q , не отличается от уравнения для линейной системы. Другие показанные на схеме ферменты катализируют в одном из направлений двухсубстратные реакции, но это само по себе не влияет качественно на кинетику процесса.

В циклической системе, как и в линейной, обычно существует стадия, лимитирующая скорость процесса в целом; скорость этой стадии, зависящая от концентрации ферментов и величин мономолекулярных констант скорости, определяет максимальную скорость всего циклического процесса. Как и в случае линейной системы, частичное ингибирование этой лимитирующей стадии приводит к накоплению некоторых промежуточных продуктов. Однако в циклической системе непосредственные последствия этого накопления не всегда будут одними и теми же. Примем, что лимитирующей является реакция, катализируемая E_p , и посмотрим, что произойдет при уменьшении концентрации этого фермента вследствие воздействия необратимого ингибитора или при уменьшении V вследствие воздействия неконкурентного ингибитора. Вначале будет накапливаться D , что приведет к уменьшению результирующей скорости реакции на стадии E_r в направлении часовой стрелки. Помимо того, будет падать концентрация B . Концентрация C будет при этом подвергаться двоякому влиянию: накопление D повышает ее, а убыль B — понижает. Результирующее изменение C может быть и положительным, и отрицательным, но оно всегда меньше, чем изменение концентраций B или D . Заметим, что идентификация промежуточного соединения, концентрация которого при ингибировании не меняется, как и в случае линейной системы, позволяет установить ингибируемую стадию, однако направление изменений концентраций компонентов системы, не связанных непосредственно с этой стадией, предвидеть невозможно.

Рассмотрим теперь случай конкурентного ингибирования E_p . При этом D будет увеличиваться до тех пор, пока первоначальная скорость не восстановится почти полностью; B будет изменяться сравнительно мало, а C будет скорее всего увеличиваться, а не уменьшаться. Пред-

положение о том, что именно стадия E_p является лимитирующей, не имеет решающего значения — выбор любой другой стадии приведет к тому же результату.

Теперь остается посмотреть, что произойдет с циклической системой, если одна из стадий будет необратима. Примем сначала, что лимитирующей является стадия E_r ; поскольку на этой стадии выделяется продукт X , ее легко сделать практически необратимой, удаляя продукт. Ингибирование фермента E_r приведет в этом случае к тем же результатам, которые рассмотрены выше. Если лимитирующей стадией является стадия E_q , предшествующая необратимой, и ингибируется фермент E_q , то в системе будет накапливаться промежуточный продукт B ; но даже если будет накапливаться D , это не повлияет на стадию E_r . В любом случае будет уменьшаться C , вызывая некоторое снижение скорости на стадии E_r , но этот эффект вряд ли будет значительным, поскольку концентрация C близка к насыщающей, так что система просто достигнет нового стационарного состояния. Наконец, рассмотрим ингибирование фермента E_p , когда стадия E_p является лимитирующей, а стадия E_r необратима. В такой системе будет накапливаться D , падать концентрации B , C и уменьшаться скорость на стадии E_r . Но в отличие от случая аналогичной линейной системы накопление D будет ограниченным. Таким образом, подобная циклическая система способна к автоматической саморегуляции при всех типах ингибирования и даже при наличии необратимой стадии в цепи реакций независимо от взаимного расположения лимитирующей и необратимой стадии¹.

Результаты этого чисто интуитивного анализа весьма простой модели можно было бы, конечно, значительно углубить. Но даже в таком виде ими можно в какой-то мере руководствоваться при исследовании влияния ингибиторов на сложные системы и при изучении некоторых аспектов регуляции метаболизма. Особого внимания заслуживает взаимосвязь механизмов двух типов — гомео-

¹ Релаксация циклических ферментативных реакций обсуждается в работе Черлинского [Czerlinski G. H., T. Theor. Biol. 21, 387, 398, 408 (1968)]. — *Прим. ред.*

стаза скоростей (за счет изменений концентрации) в сетях сопряженных реакций и гомеостаза концентраций (за счет изменений скоростей) при регуляции в соответствии с концепцией энергетического заряда (гл. XV). Значительный интерес представляет характерная для циклических систем способность к высокочувствительной регуляции. Если циклическая система функционирует при субоптимальных концентрациях субстратов, то введение в эту систему любого промежуточного продукта даже в небольшом количестве вызывает заметный каталитический эффект (принцип химического усиления).

Читатели, желающие изучить эти вопросы более широко и с большей математической строгостью, должны обратиться к оригинальным работам [4—8]. Особого внимания заслуживают работы Б. Чанса и его сотрудников [9—11], которые провели фундаментальные исследования в области формального анализа механизмов сложной метаболической регуляции, используя моделирование на вычислительных машинах и изучая реальные биологические системы.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Reiner J. M., *The Organism as an Adaptive Control System*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1968.
- Webb J. L., *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, vol. 1, Academic, New York, 1963. (Уэбб Л., Ингибиторы ферментов и метаболизма, изд-во «Мир», М., 1966.)
- Gray H. G., White K., *Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry*, 2nd ed., Academic, New York, 1966. (Есть перевод 1-го издания: Дж. Брей и К. Уайт, Кинетика и термодинамика биохимических процессов, ИЛ, М., 1959.)
- Chance B. et al.: *Control of Energy Metabolism*, Academic, New York, 1966.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Prigogine I., *Introduction to Thermodynamics of Irreversible Processes*, Interscience, New York, 1961. (Есть перевод 1-го издания: И. Пригожин, Введение в термодинамику необратимых процессов, ИЛ, М., 1960.)
2. Eyring H., Boyce R. P., Spikes J. D., in: Florkin M., Mason H. S. (eds.), *Comparative Biochemistry*, Academic, New York, 1960.
3. Hearon J. Z., *Bull. Math. Biophys.*, 12, 57 (1950).
4. Waley S. G., *Biochem. J.*, 91, 514 (1964).

5. Hearon J. Z., *Physiol. Rev.*, **32**, 499 (1952).
6. Ličko V., *Bull. Math. Biophys.*, **25**, 141 (1963).
7. Ličko V., *Bull. Math. Biophys.*, **28**, 379 (1966).
8. Ličko V., *Bull. Math. Biophys.*, **29**, 1 (1967).
9. Chance B., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 289 (1961).
10. Chance B., Garfinkel D., Higgins J., Hess B., *J. Biol. Chem.*, **235**, 2426 (1960).
11. Chance B., Schoener B., Elsaesser S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **52**, 337 (1964).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Во многих случаях решение задач — наилучший путь к истинному пониманию методов той или иной науки и путей их использования. Читатель, решивший приведенные ниже задачи, — сначала легкие, а затем более трудные, — может считать, что он достаточно хорошо усвоил материал по кинетике.

1. Докажите эквивалентность трех линейных форм простого уравнения Анри.

2. а. Найдите с помощью всех трех форм значения V , K_m и k_{+2} по данным, приведенным в таблице. Какой из методов наиболее удобен?

б. Оцените три формы уравнения при условии, что систематическая ошибка измерения v_0 составляет $2 \cdot 10^{-6}$. В какой степени эта ошибка скажется на рассчитанных значениях констант?

в. Оцените три формы уравнения при условии торможения субстратом, когда при $A = 2 \cdot 10^{-3} M$ скорость реакции $v_0 = 2,60 \cdot 10^{-5}$, а при $A = 1,5 \cdot 10^{-3} M$ скорость реакции $v_0 = 2,50 \cdot 10^{-5}$. Как легче всего обнаружить этот эффект?

Таблица данных для задачи 2

A , моль/л	v_0 , моль/(л·мин)
$1,0 \cdot 10^{-1}$	$6,70 \cdot 10^{-7}$
$2,0 \cdot 10^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-5}$
$4,0 \cdot 10^{-1}$	$1,70 \cdot 10^{-5}$
$6,0 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$
$1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,40 \cdot 10^{-5}$
$1,5 \cdot 10^{-2}$	$2,65 \cdot 10^{-5}$
$2,0 \cdot 10^{-2}$	$2,80 \cdot 10^{-5}$

Концентрация фермента во всех случаях $1,0 \cdot 10^{-9} M$.

3. Рассмотрите кинетическое поведение системы для следующего простейшего случая ошибочной ориентации субстрата в активном центре фермента: фермент E катализирует односубстратную реакцию, в которой нормальный субстрат PQ связывается на ферменте в центре P' , что позволяет осуществить перенос группы Q к центру Q' фермента. Самопроизвольное отщепление Q от Q' регенерирует свободный фермент. Поскольку P имеет сродство лишь с P' , ошибочная ориентация исключается. Если же субстрат имеет строение RQ , ситуация изменяется. Хотя группировка R имеет то же сродство к P' , как и P , она способна связываться отчасти и с Q' , в результате чего RQ иногда образует с ферментом комплекс с обратной ориентацией, не способный к расщеплению. В обоих случаях субстрат связывается с ферментом обратимо, причем в каждый момент времени одна молекула фермента может связывать лишь одну молекулу субстрата.

Покажите путем вывода соответствующих уравнений или объясните качественно, к каким кинетическим эффектам приведет ошибочная ориентация субстрата. Сравните графики двойных обратных величин для катализируемых ферментом реакций расщепления PQ и RQ , а также относительные значения кинетических констант, которые можно получить экстраполяцией этих графиков.

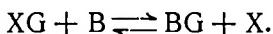
4. Энзимолог исследует реакцию, одним из субстратов которой во всем интервале pH является двухвалентный катион A^{2+} . Энзимолога беспокоит возможность обратимого образования ионных пар, поскольку ионные пары A^{2+} , вероятно, не активны как субстраты. Каковы будут кинетические следствия образования ионных пар в случае односубстратного механизма? Как можно было бы отличить этот механизм от других случаев подобного поведения, например некоторых случаев ингибирования фермента?

5. Известно, что многие реакции катализируются ионообменными смолами, содержащими кислотные или основные группировки. Перечислите типы реакций, которые, по Вашему мнению, будут катализироваться ионо-

обменными смолами, и объясните их возможный механизм. Будут ли эти реакции катализа существенно отличаться от ферментативных реакций и чем именно?

6. Покажите, как можно найти значения k_{+1} и k_{-1} из данных о влиянии концентрации модификатора на K_m в случае односубстратного механизма, если модификатор действует лишь на скорость превращения фермент-субстратного комплекса в свободный фермент и конечные продукты реакции.

7. Фермент E катализирует реакцию



При инкубации E с XG и меченым X в отсутствие B и BG изотопная метка входит в XG со скоростью, близкой к суммарной скорости реакции (измеренной в отдельном опыте при наличии в среде как E и XG, так и B). Фермент E высокоспецифичен в отношении XG, тогда как его специфичность в отношении B является менее строгой.

С помощью каких кинетических методов можно использовать приведенные данные для достаточно обоснованного суждения о механизме действия E? Какие эксперименты необходимо провести и как можно интерпретировать возможные альтернативные результаты?

8. С помощью графиков двойных обратных величин, построенных на основании измерения начальных скоростей реакции $A + B \rightleftharpoons C + D$ при варьировании концентрации A для трех фиксированных концентраций B, получены следующие результаты:

Концентрация B, моль/л	V^{app} , произвольные единицы	K_m^{app} для A
10^{-1}	1,4	0,0032
10^{-2}	7,0	0,016
0,1	12,0	0,027

Какие выводы о механизме реакции могут быть сделаны на основании этих данных?

9. Кинетическим доказательством механизма двух-тактного замещения фермента мы считаем параллельность прямых на графиках двойных обратных величин. Можете ли Вы привести качественные аргументы в пользу обязательности такой формы графика? Следует ли из них, что такие графики должны быть получены для обоих субстратов, и объясняют ли они причину этого явления? При бесконкурентном ингибировании (предполагается, что оно возникает вследствие взаимодействия ингибитора с (ЕА), но не с Е и А порознь) и при ошибочной ориентации субстрата графики двойных обратных величин также имеют вид прямых, параллельных прямым для «нормальной» системы. Как можно было бы объяснить это явление на основе Ваших аргументов?

10. Некоторые энзимологи предпочитают выражать кинетические данные в виде линейной зависимости v_0/A от v_0 ; Келланд использует двойные обратные величины, Уонг и Хейнс — зависимость A/v_0 от A . Какую форму будут иметь графики каждого из этих типов, построенные для следующих двухсубстратных систем:

1) упорядоченный механизм с образованием тройного комплекса;

2) механизм с образованием замещенной формы фермента.

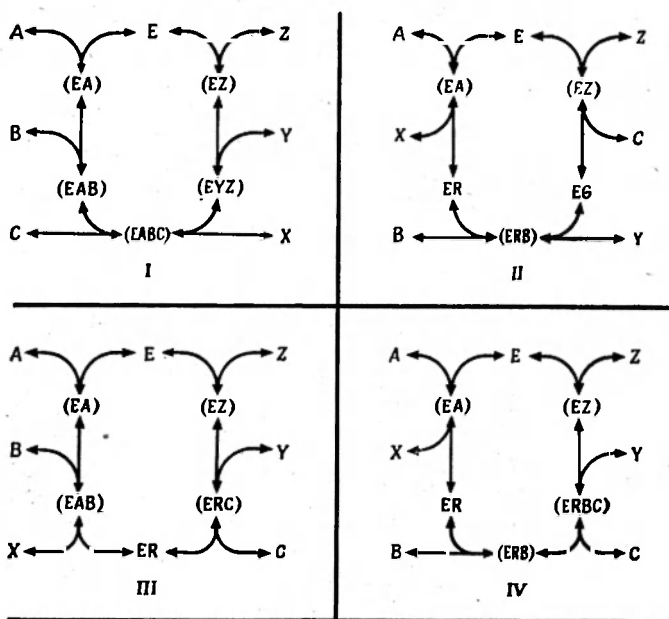
11. Как скажется на кинетических данных, характеризующих двухсубстратную реакцию, отсутствие в качестве промежуточного продукта какого-либо кинетически значимого фермент-субстратного комплекса?

12. Рассмотрите изображенные на стр. 260 схемы трехсубстратных реакций и покажите, как можно различить эти механизмы, варьируя концентрацию одного субстрата при насыщающих концентрациях других субстратов в присутствии одного из продуктов реакции.

а. Можно ли отличить механизм I от механизма II, исследуя ингибирование реакции продуктом Y?

б. Можно ли отличить механизм III от механизма IV, используя Z?

в. Можно ли отличить друг от друга все четыре механизма, используя X и Y?

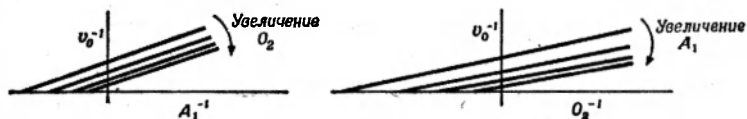


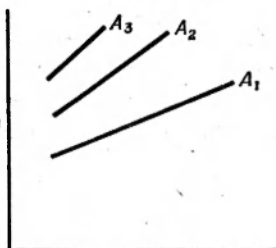
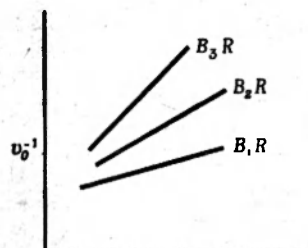
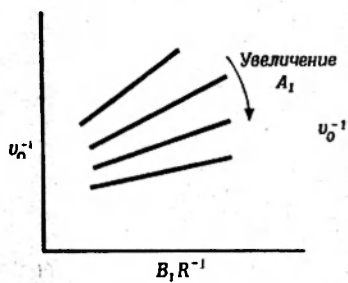
13. Что можно сказать о формальных механизмах следующих двух реакций на основании приведенных кинетических графиков (символы субстратов с нижними индексами обозначают аналоги субстратов, содержащие одинаковые с основным субстратом переносимые группировки)?

а. $BR + A \rightleftharpoons AR + B$ (графики на стр. 261).

б. $CR + D \rightleftharpoons DR + C$ (графики на стр. 262).

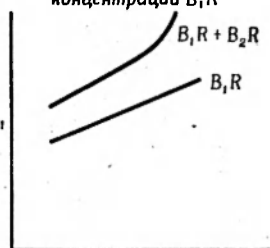
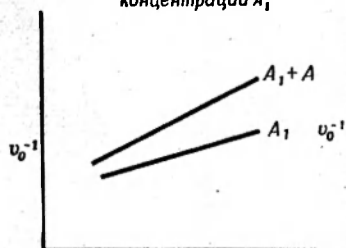
14. Для аминоксидазы получены следующие кинетические графики (A_1 обозначает концентрацию амина, являющегося субстратом):





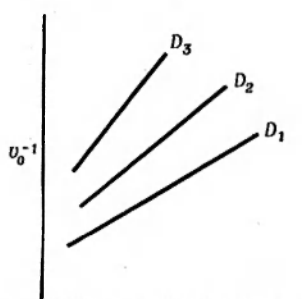
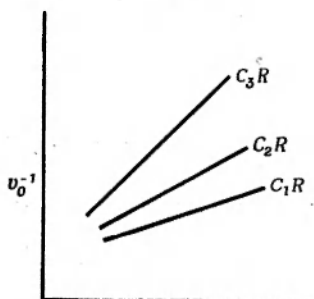
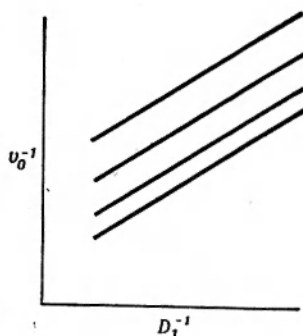
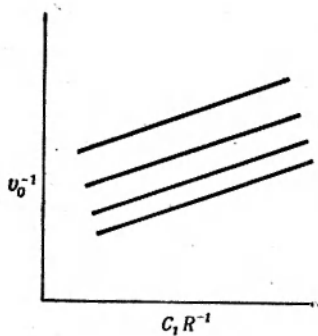
BR^{-1} при постоянной концентрации A_1

A^{-1} при постоянной концентрации $B_1 R$



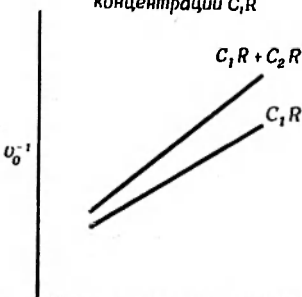
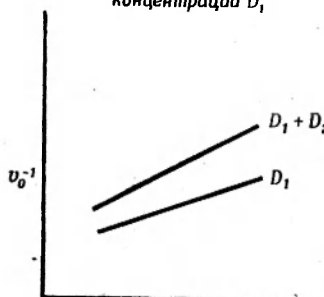
$B_1 R^{-1}$ при постоянной общей концентрации A

A_1^{-1} при постоянной общей концентрации $B_1 R$



CR^{-1} при постоянной концентрации D_1

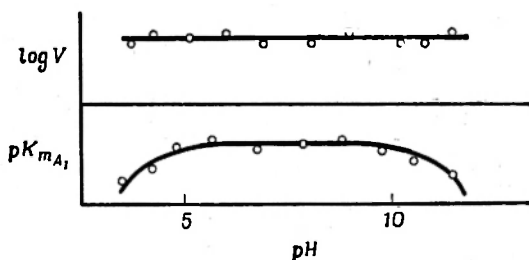
D^{-1} при постоянной концентрации $C_1 R$



CR_1^{-1} при постоянной общей концентрации D

D_1^{-1} при постоянной общей концентрации CR

Зависимости кинетических коэффициентов от рН, найденные при использовании A_1 в качестве варьируемого субстрата и экстраполированные к бесконечно большой концентрации O_2 , описываются следующими двумя кривыми:



Для второго аминного субстрата A_2 получены данные, весьма близкие к данным для A_1 при тех же условиях эксперимента, за исключением того, что V в случае A_2 была значительно выше.

Изучение зависимости кинетического поведения системы от ионной силы при использовании A_1 в качестве варьируемого субстрата и поддержании насыщающей концентрации O_2 показало, что V сохраняется на постоянном уровне, тогда как зависимость $\log K_m^A$ от $\mu^{1/2}$ при низких значениях ионной силы выражается прямой с наклоном $+0,9$. Изменение диэлектрической проницаемости при низкой ионной силе и том же соотношении концентраций субстратов, что и в предыдущем эксперименте, также не влияет на величину V ; график зависимости $\log K_m^A$ от D^{-1} тоже имеет вид прямой и рассчитанный с его помощью электростатический вклад в энтропию составляет -8 э. е. Общий энтропийный член, рассчитанный на основании данных о температурной зависимости реакции, равен -1 э. е.

Какое заключение о механизме ферментативного окисления A_1 можно сделать?

15. Высокоочищенный фермент катализирует гидролиз фосфорного эфира MP до MON и неорганического фосфата. Графики двойных обратных величин, построен-

ные при варьировании концентрации МР, являются прямыми. При проведении реакции в H_2O^{18} образующийся в качестве продукта неорганический фосфат содержит O^{18} . Помимо того, фермент катализирует быстрое включение O^{18} из меченого неорганического фосфата в воду в отсутствие МР или МОН. График зависимости $\log v_0$ от рН при очень низкой концентрации МР дает плато в интервале рН от 3 до 8,2, где он изгибается книзу; второй изгиб наблюдается при рН 10. При рН ниже 8,2 добавление в реакционную среду метанола вызывает значительное увеличение скорости реакции при низкой концентрации МР (метанол не является субстратом этого фермента). Добавление сульфата аммония при тех же значениях рН и тех же концентрациях субстратов замедляет реакцию. При более высоких значениях рН влияние и метанола, и соли заметно снижается. В присутствии небольших количеств солей диазония, парамеркурибензоатов или диалкилфторфосфатов (нервный газ), фермент быстро инактивируется.

На основе приведенных данных сформулируйте возможно более полно механизм действия этого фермента.

16. Реакция $\text{A} + \text{B} \rightleftharpoons \text{X} + \text{Y}$ катализируется ферментом Е. Согласно полученным кинетическим данным, графики двойных обратных величин для А дают при низких концентрациях В прямые, пересекающиеся слева от оси ординат, а при высоких концентрациях В — кривые, вогнутые сверху. В то же время графики двойных обратных величин для В дают пересекающиеся прямые при высоких концентрациях А и вогнутые сверху кривые при низких концентрациях А. Экспериментатор, обнаруживший эти факты, не разобрался в них, однако шесть энзимологов-теоретиков быстро пришли к выводу, что полученные данные не оставляют сомнения относительно механизма реакции. К сожалению, правда, все они предложили разные механизмы. Вы должны установить, какой из них правилен.

Согласуются ли какие-нибудь из предложенных механизмов, перечисленных ниже, с экспериментальными данными? Или, быть может, все? Какие дополнительные экспериментальные данные могли бы прояснить вопрос?

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	5
Из предисловия автора	8
Условные обозначения	9
Список обозначений	11
Введение	15

Часть первая. Основы энзимологии

Глава I. Химия ферментов	19
Первичная структура	19
Вторичная структура	25
Третичная структура	26
Четвертичная структура	30
Коферменты и простетические группы	30
Общая литература	32
Цитированная литература	33
Глава II. Скорости ферментативных реакций	34
Экспериментальное изучение каталитических реакций	34
Вывод уравнений ферментативной кинетики на основе простых моделей	41
Обоснованность гипотезы стационарности	52
Общая литература	53
Цитированная литература	53
Глава III. Фермент-субстратные промежуточные комплексы	55
Связывание белков с другими молекулами	56
Прямые доказательства образования фермент-субстратных комплексов	60
Общая литература	64
Цитированная литература	64
Глава IV. Ингибирование, активация, инактивация, влияние рН	67
Вещества, реагирующие со свободным ферментом	68
Вещества, реагирующие с субстратом	72
Вещества, реагирующие только с фермент-субстратным комплексом	74
Вещества, реагирующие более чем с одним компонентом ферментативной реакции	81

Активация	85
Влияние pH	87
Общая литература	90
Цитированная литература	90
Глава V. Субстратная специфичность	92
Образование комплекса и разрыв связей	92
Асимметрические реакции симметричных субстратов	94
Другие примеры субстратной специфичности	96
Субстратная специфичность и изучение механизма действия ферментов	98
Общая литература	100
Цитированная литература	100
Глава VI. Теории ферментативного катализа	101
Эффекты сближения и ориентации	101
Изменение реагирующих веществ	102
Электронные эффекты	103
Общий кислотно-основный катализ	106
Влияние растворителя	108
Изменения конформации фермента и субстрата; эффекты напряжения	111
Отрицательный катализ и специфичность	112
α -Химотрипсин	114
Общая литература	116
Цитированная литература	116
 Часть вторая. Типы механизмов ферментативного катализа	
Глава VII. Механизмы однократного и двухкратного замещения	121
Общая литература	127
Цитированная литература	127
Глава VIII. Замещенные формы фермента и тройные комплексы	129
Механизмы с замещением фермента	130
Механизмы с образованием тройного комплекса	135
Общая литература	144
Цитированная литература	144
Глава IX. Анализ механизма двухсубстратных реакций методами стационарной кинетики	146
Глутамат — оксалоацетат-трансаминаза	147
Креатинкиназа	147
Роданеза	149
Исследование изотопного равновесия	152
Формилтетрагидрофолат-синтаза	155
Общая литература	155
Цитированная литература	155

**Часть третья. Методы исследования механизмов
ферментативных реакций**

Глава X. Определение констант скоростей и констант равновесия методами стационарной кинетики и изотопного равновесия	159
Построение вторичных кинетических прямых на основе исследований двух субстратов	159
Исследование начальных скоростей реакции в обоих направлениях	161
Использование аналогов субстратов для выявления стадии, лимитирующей скорость процесса	163
Неконкурентные эффекты; механизм действия аскорбатоксидазы	167
Исследования методом изотопного равновесия	173
Общая литература	177
Цитированная литература	177
Глава XI. Измерение констант скоростей методами предстационарной кинетики	178
Переходная стадия реакции	178
Струйные методы	182
Релаксационные методы	185
Общая литература	190
Цитированная литература	190
Глава XII. Направление смещения электронной плотности: использование аналогов субстрата	191
Принцип метода	191
Практическое использование метода	193
Общая литература	196
Цитированная литература	197
Глава XIII. Термодинамические и активационные параметры: влияние температуры, диэлектрической проницаемости и ионной силы	198
Основы теории	199
Некоторые приложения	203
Общая литература	210
Цитированная литература	210
Глава XIV. Идентификация специфических группировок в ферменте: использование рН-функций и специфических реагентов 212	
рН-эффекты	212
Ионогенные группировки ферментов	213
Графическое представление рН-эффектов	214
Другие обратимые реакции	218
Необратимые реакции	219
Бифункциональные реагенты	224

Реагенты, чувствительные к молекулярному окружению . . .	225
Общая литература	226
Цитированная литература	226
Часть четвертая. Регуляция метаболизма на уровне ферментов	
Глава XV. Регуляторные ферменты и сигмоидная кинетика . . .	231
Ошибки в измерении реальной концентрации субстрата . . .	233
Смеси ферментов	234
Нелинейные двухсубстратные механизмы	235
Многоцентровые ферменты	236
Разделение субстратных и эффекторных субъединиц . . .	239
Множество идентичных субъединиц с некооперативным свя- зыванием	241
Влияние соотношения концентраций	242
Общая литература	243
Цитированная литература	243
Глава XVI. Сопряженные и циклические системы	245
Линейные сопряженные системы	245
Циклические системы	250
Общая литература	254
Цитированная литература	254
Приложение	256

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».

ДЖ. УЭСТЛИ

Ферментативный катализ

Редактор *А. Б. Левина*
Художник *А. Д. Смеляков*
Художественный редактор *Ю. Л. Максимов*
Технический редактор *Н. Д. Толстякова*
Корректор *Л. Д. Панова*

Сдано в набор 6/XII 1971 г.
Подписано к печати 3/IV 1972 г.
Бумага № 3 84×108¹/₃₂—4,25 бум. л. 14,28 усл. печ. л.
Уч.-изд. л. 12,81 Изд. № 4/6148
Цена 1 р. 35 к. Зак. 1361.

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

Ордена Трудового Красного Знамени
Ленинградская типография № 2
имени Евгении Соколовой Главполиграфпрома
Комитета по печати при Совете Министров СССР,
Измайловский проспект, 29.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Выйдет в свет в 1972 г.

Кеньон Д., Стейнман Г., Биохимическое предопределение, перевод с английского, 21 л.

Популярный, но вместе с тем написанный на строго научном уровне очерк современного состояния проблемы происхождения жизни. Авторы книги — молодые ученые, биофизик и химик, — поставили себе цель не только всесторонне изложить главные экспериментальные подходы к исследованию происхождения жизни, но и дать критический анализ всех гипотез и допущений, на которых основаны эти подходы. В книге намечены также увлекательные перспективы дальнейших исследований в этой области.

Предназначена для студентов (биологов, геологов, геофизиков, палеонтологов, астрономов, философов и др.), а также для широкого круга читателей, не занимающихся непосредственно биологией, но интересующихся современными проблемами этой науки.