

—83 мл/моль, что менее 0,5% от объема белка. Непосредственное наблюдение этого эффекта затруднительно. Тем не менее высказанные предположения физически осмысленны. Изменение конформации белка, вытеснение воды из внутренней полости глобулы молекулой субстрата могут вызвать перестройку окружающей водной структуры.

«Водный» компенсационный эффект может иметь важное физиологическое значение для теплокровных организмов и, тем самым, для эволюции в целом. Малость изменений свободной энергии вследствие компенсации означает малую чувствительность соответствующих ферментативных процессов к температурным изменениям в окружающей среде.

Существование компенсационного эффекта и его объяснение нельзя, однако, считать строго доказанным. Эффект может объясняться просто неправильным применением уравнения Аррениуса, как это показал Блюменфельд (см. стр. 370). Вопрос остается открытым, пока нет достоверных определений истинных термодинамических параметров. Тем не менее результаты рассмотрения компенсационного эффекта указывают на важные особенности ферментативных процессов.

Как уже отмечалось, понимание структуры и свойств белковых молекул невозможно без учета их водного окружения (см. гл. 4). Рассмотрение ферментов в водном растворе как целостной системы необходимо и для изучения термодинамики ферментативных процессов. Такой системный подход характерен для методологии современной физики. Вычленение белковых молекул из окружающей их водной среды незаконмерно в строгой теории. Это относится и к кинетике. Теория абсолютных скоростей реакций, переносящая на ферменты положения, справедливые для газовых реакций, пригодна лишь для грубых оценок. Теория ферментативных реакций требует учета физических свойств среды.

6.4. ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Характерные особенности ферментативного катализа — большая активность и строгая специфичность по отношению к субстрату или группе субстратов.

Молекулярной активностью фермента называется число молекул субстрата, превращаемых в 1 мин одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата. Молекулярная активность может быть выражена и как *число оборотов* (Варбург) — число молей превращенного субстрата, приходящееся на моль фермента за 1 мин.

Хорошо разработаны методы выделения и очистки ферментов и множество ферментов получено в чистой кристаллической форме [15, 29, 30]. Это дает возможность изучать реакции и структуру ферментов и фермент-субстратных комплексов (ФСК) *in vitro*. Различие ситуаций *in vitro* и в клетке, *in vivo*, состоит в том, что клетка представляет собой открытую, а не замкнутую систему и в ней протекает одновременно множество ферментативных реакций, в том числе и сопряженных друг с другом. Тем не менее изучение ферментов *in vitro* дает реальную основу для понимания соответствующих биологических процессов.

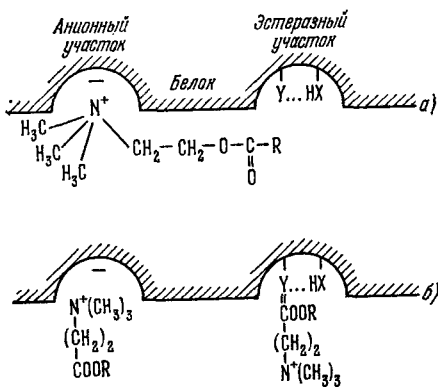


Рис. 6.7. Схема взаимодействия ацетилхолинэстеразы с ацетилхолином (а) и его каталитического расщепления (б).

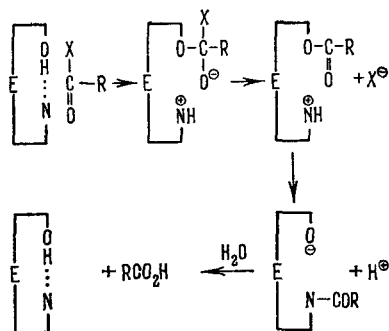


Рис. 6.8. Схема действия эстеразы.

При образовании ФСК малая молекула субстрата стехиометрически связывается с большой молекулой фермента. Очевидно, субстрат непосредственно взаимодействует с определенным малым участком молекулы фермента — с ее активным центром. Природа активного центра, т. е. совокупность и расположение аминокислотных остатков, а также кофакторов (см. стр. 94), входящих в его состав, устанавливается посредством химических и физических исследований. Изменения активности, возникающие в результате химической модификации белка, позволяют выявить функциональные группы активного центра. Сведения о его структуре дает спектроскопия, спектрополяриметрия, спектроскопия ЯМР и ЭПР (в последнем случае в белок вводится парамагнитная метка, см. стр. 344) и т. д. Рентгеноструктурный анализ непосредственно раскрывает картину взаимодействия фермента с субстратом (например, в случаях лизоцима, карбоксипептидазы и др.).

Разнообразие аминокислотных остатков фермента и атомных групп кофактора — определяет полифункциональность активного центра — его способность связывать молекулы субстрата или модификатора в нескольких «узлах» и каталитическую активность [31].

Так, у эстераз и эстеролитически активных протеиназ определено наличие в активном центре функционального остатка Сер, который подвергается ацилированию на промежуточной стадии процесса. Активный серил фигурирует в псевдохолинэстеразе, фосфоглюкомутазе,

в химотрипсине и трипсине и в ряде других ферментов. На рис. 6.7 изображена схема связывания субстрата ацетилхолина ацетилхолинэстеразой (АХЭ) и схема ингибирования ее активности при высокой концентрации субстрата [32]. В эстеразном участке АХЭ входят нуклеофильная группа Y и смежная с ней диссоциирующая кислотная группа НХ. Ацильный остаток в промежуточной реакции присоединяется к группе Y и далее отщепляется от нее под действием воды.

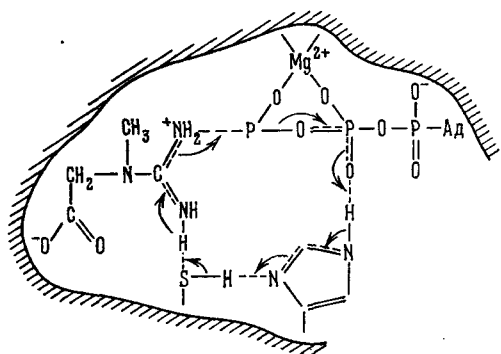
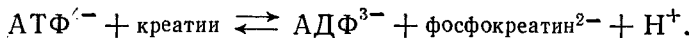


Рис. 6.9. Схема действия креатинкиназы. Переходное состояние.

Упрощенная схема действия эстераз показана на рис. 6.8 [33]. Согласно этой схеме эстеразы реализуют бифункциональный кислотно-основный катализ. Происходит ориентированная сопряженная атака нуклеофильных и электрофильных функциональных групп на молекулу субстрата [34].

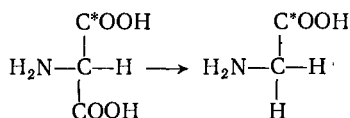
Согласованное воздействие на субстрат различных групп фермента можно иллюстрировать также примером креатинкиназы [33, 34], катализирующей реакцию



На рис. 6.9 изображена схема переходного состояния для этой реакции. Кофактором служит ион Mg^{2+} . Особо важную роль в активном центре играет SH-группа. Фермент инактивируется иодацетамидом и иодацетатом, причем скорость алкилирования SH-группы не зависит от pH в интервале 6,0—10,0. Начальная скорость реакции с иодацетатом сильно зависит от ионной силы среды. В присутствии Mg^{2+} и обоих субстратов SH-группы оказываются защищенными от действия блокирующих

реагентов. Из приведенных фактов следует, что SH-группа, вероятно, соединена водородной связью с одной из основных групп фермента. Благодаря легкому переходу протона в системе кислота — основание, соединенных водородной связью, такая система обладает высокой каталитической активностью.

Эти немногие примеры показывают, что при образовании ФСК существенна точная взаимная ориентация функциональных групп фермента и субстрата или модификатора. Будучи построен из L-аминокислотных остатков, активный центр стереоспецифичен. С помощью меченых атомов установлено, что реакции молекул типа СААВВ происходят на поверхности фермента асимметрично. Это относится, в частности, к ферментативному превращению аминоталоновой кислоты (содержащей меченый углерод в одном из двух карбоксилов) в глицин:



В реакцию вступает только одна группа, химически и геометрически неотличимая от другой. Это объясняется асимметрией активного центра. Так как группы Y и Z фермента, связывающиеся с карбоксилем, различны, неодинаковы и реакционные способности двух карбоксилов [34, 35]. Ферменты хорошо различают стереоизомеры, и оптический антипод данного субстрата субстратом уже не является.

Прямые рентгеноструктурные исследования комплексов ферментов с аналогами субстратов — конкурентными ингибиторами дают результаты, хорошо согласующиеся с химическими представлениями. Таких исследований пока немного, но они уже служат источником особенно ценной информации.

Филлипс и сотрудники, установившие структуру лизоцима, исследовали также строение комплексов лизоцима с ингибирующими аналогами субстратов-полисахаридов [36]. Установлено внедрение лиганда в полость, существующую в глобуле лизоцима, и выявлены контакты между функциональными группами фермента и лиганда. На рис. 6.10 показана структура комплекса лизоцима с β-N-ацетальглюкозамином. Эти работы позволили дать детальную расшифровку взаимодействий фермента с субстратом [37, 38].

Рентгенографически исследованы структуры комплексов карбоксипептидазы с субстратом глицил-L-тирозином (рис. 6.11) и с ингибиторами, например с β-(*n*-иодофенол)-пропионатом [39]. У этого фермента кофактором служит атом Zn. Лиганды входят в полость молекулы белка и присоединяются в области, в которой

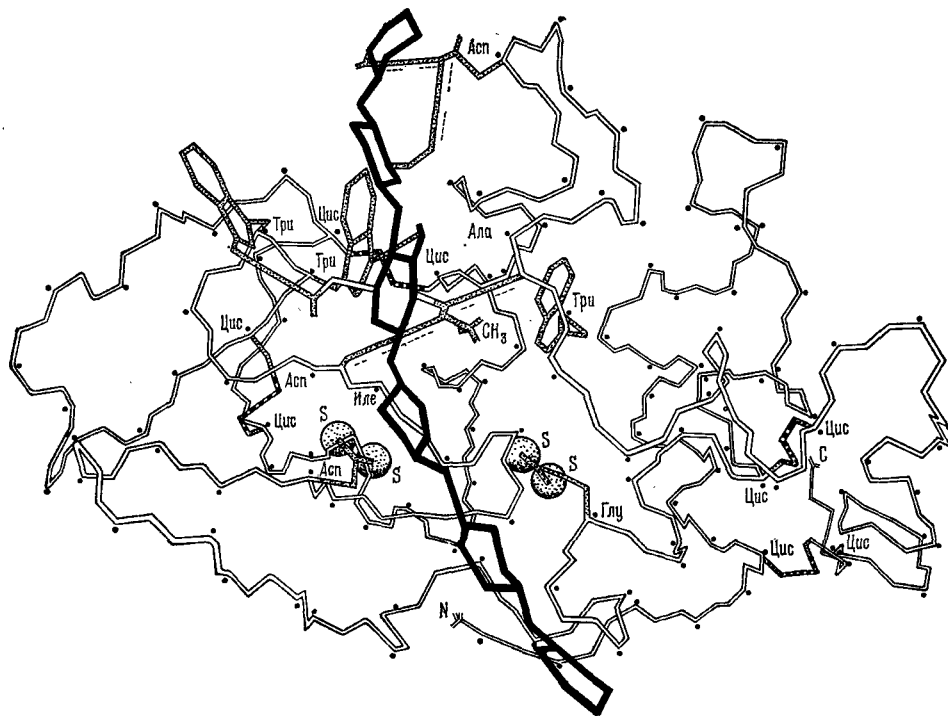


Рис. 6.10. Структура комплекса лизоцима с β -N-ацетальглюкозамином (последний зачернен).

находится Zn — этот атом принимает непосредственное участие в работе активного центра (см. стр. 393).

Остановимся еще на одном примере — на структуре и функции аспаратаминотрансферазы (ААТ), детально изученной Браунштейном и его сотрудниками. Аминотрансферазы содержат кофермент — пиридоксальфосфат (ПАЛФ). Общая теория действия таких ферментов была построена Браунштейном и

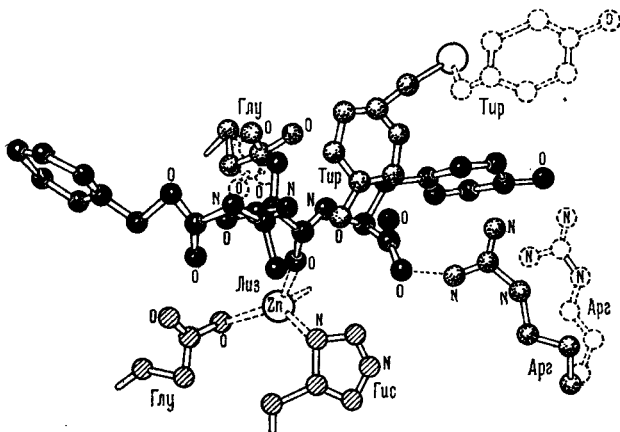
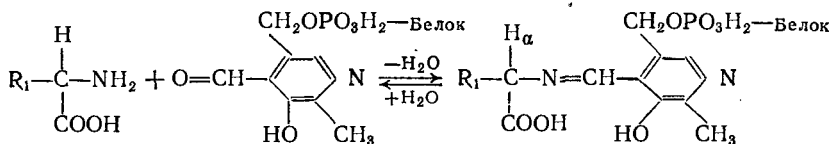
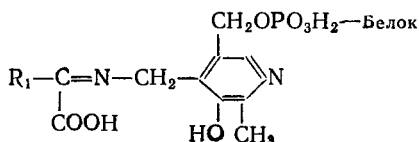


Рис. 6.11. Структура комплекса карбоксипептидазы с глицил-L-тирозином, Arg 145, Тир 248 и Глу 270 показаны до связывания субстрата (пунктир) и после него (сплошные линии).

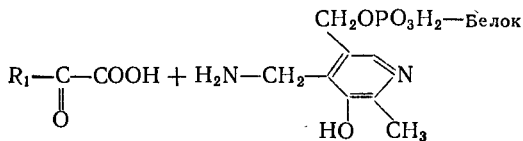
его школой (см. [40, 41]). Согласно этой теории ПАЛФ, присоединенный к белку, реагирует с аминокислотой, образуя так называемое шиффово основание или альдимин



В шиффовом основании существенно изменено распределение электронов в аминокислотном остатке по сравнению с аминокислотой и атом H_α легко диссоциирует. При реакции переаминирования альдимин испытывает таутомерное превращение в кетимин



который гидролизуется водой с образованием кетокислоты



В результате возникает фосфопиридоксаминная форма фермента. Она реагирует с другой кетокислотой, содержащей R_2 , причем регенерируется исходный фермент и получается новая аминокислота. Сходная схема была независимо предложена Снеллом [42, 43].

Практически все реакции, катализируемые ферментами, могут протекать и в отсутствие ферментов, но, конечно, с гораздо меньшей скоростью. В ряде случаев стадии ферментативного процесса можно моделировать в низкомолекулярных системах — в «конгруэнтных модельных системах» [44].

Реакции трансаминирования были изучены в системе, содержащей ПАЛФ, ионы тяжелых металлов и субстраты. Добавление слабого основания к системе, содержащей пиридоксаль и аминокислоту, полностью подавляет все реакции, кроме расщепления $C_\alpha - H$ -связи; в такой модели происходит только трансаминирование [45, 46]. В работе [47] были определены индивидуальные константы скорости для стадии образования альдимины. Их значения для реакции аминокислоты (глутамата) с анионной, биполярной и катионной формами модельного соединения 3-оксиридин-4-альдегида равны соответственно $k_{ан} = 80,2 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, $k_{бип} = 1,12 \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, $k_{кат} = 2,3 \cdot 10^6 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. Константа скорости ферментативной реакции много больше, а именно $k = 10^8 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. Теоретический расчет показывает, что скорость нуклеофильного присоединения к карбонильной группе возрастает в 10^3 — 10^4 раз, если бимолекулярная реакция трансформируется в мономолекулярную с надлежащим пространственным расположением взаимодействующих групп [48]. Можно предположить, что фермент обеспечивает такую ориентацию этих групп на всех последовательных стадиях процесса и стабилизирует наиболее активные в соответствующих стадиях ионные формы субстратов, коферментов и функциональных групп активного центра [49].

Основываясь на изложенной выше гипотезе, Иванов и Карпейский предложили трехмерную динамическую модель для реакции, катализируемой ААТ [49]. В спектре этого фермента имеется полоса поглощения при 3620 Å, а при понижении рН появляется полоса при 4260 Å, что определяется ионизацией фенольной группы кофермента (рК перехода равно 6,2). Оптическая

активность ПАЛФ индуцирована апоферментом [50] (см. стр. 312). Фермент с пиридоксаминфосфатом, в отличие от фермента с ПАЛФ, имеет полосу при 3300 Å. Таким образом, кофермент служит выразительной спектральной меткой. Так как субстраты ААТ содержат две карбоксильные группы, можно считать, что специфичность фермента определяется взаимодействием COO^- субстратов с комплементарными катионными группами фермента. Это доказывается тем, что дикарбоновые кислоты служат конкурентными ингибиторами ААТ. При обработке фермента борогидридом Na и при кислотном гидролизе был изолирован ϵ -N-пиридоксиллизил. Фосфатная группа ПАЛФ также связана с апоферментом (рис. 6.12). Изучение спектров поглощения и кругового дихроизма ААТ в различных формах (рис. 6.13) дало метод идентификации протонодонорной группы Апо—ААТ, связывающей атом N пиридина [49, 51, 52]. Этой группой оказался Тир. Изучение кинетики ассоциации Апо—ААТ с рядом алкильных аналогов ПАЛФ пока-

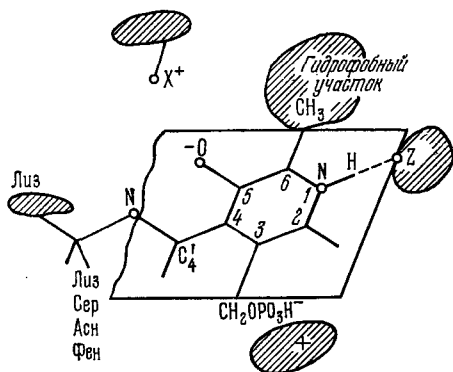


Рис. 6.12. Связывание кофермента активным центром ААТ.

зало, что метильная группа ПАЛФ находится в тесном контакте с апоферментом [52]. Наконец, установлены электростатические взаимодействия фенольной группы ПАЛФ с апоферментом. Иванов и Карпейский приходят к выводу о связи всех функциональных групп кофермента с белком. Вследствие такой многоточечной связи сопряженная система кофермента находится в активном центре в состоянии с высокой энергией и с высокой реакционной способностью.

Модель связывания ПАЛФ апоферментом дает возможность детально рассмотреть механизм ферментативного трансаминирования [49]. Первая стадия процесса состоит в нековалентном связывании аминокислоты активным центром. Вторая стадия — нуклеофильное присоединение аминогруппы субстрата к связи

>C=N — альдимины. Акцептором протона —NH_2 -группы здесь, видимо, является отрицательно заряженная фенольная группа кофермента. Таким образом, неионизованная нуклеофильная аминогруппа оказывается по соседству с высокореактивной катионной формой кофермента. Фиксированное активным центром

пространственное расположение аспарагиновой кислоты должно отвечать *цис*-конформации карбоксилов, так как малеиновая кислота (*цис*-соединение), в отличие от фумаровой (*транс*-соединение), является конкурентным ингибитором ААТ. Это расположение показано на рис. 6.14. Из такой модели следует, что реакционная координата для нуклеофильного присоединения к карбоксилу направлена вдоль орбитали p_z карбонильного углерода. С помощью пространственных молекулярных моделей построена структура альдиминной формы комплекса фермент — субстрат (рис. 6.15). Образование альдиминной формы субстрата происходит в результате поворота коферментного цикла приблизительно на 40° вокруг оси, соединяющей группы CH_3 в положении 2 и CH_2 в положении 5 (см. рис. 6.15).

Общая схема процесса показана на рис. 6.16. Правильность описанных и последующих стадий подтверждается рядом экспериментальных фактов [49]. Предложенная теория объясняет важнейшие свойства ААТ.

Иванов и Карпейский считают многоточечное связывание причиной стабилизации активной электронной конфигурации, термодинамически невыгодной в гомогенном растворе, и причиной надлежащей ориентации реагирующих групп. Существование в активном центре по крайней мере двух пространственно различных структур (в случае ААТ двух различных ориентаций коферментного цикла) обеспечивает выполнение указанных условий в многостадийной ферментативной реакции. Условия оптимальности каждой последовательной стадии обеспечиваются структурной перестройкой, происходящей в предыдущей стадии. На языке термодинамики изложенное означает, что в активном центре происходит выравнивание уровней свободной энергии промежуточных соединений. В случае ААТ этот эффект проявляется в спектре поглощения ФСК (рис. 6.17), содержащем полосы поглощения практически всех

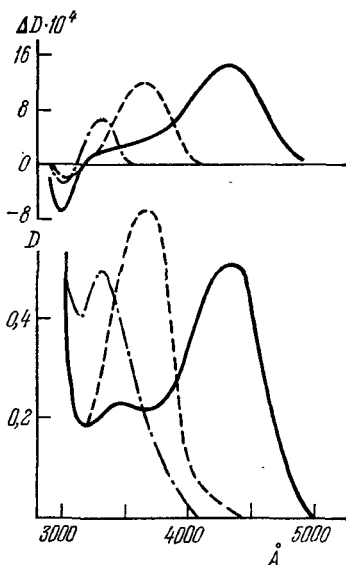


Рис. 6.13. Спектры кругового дихроизма (вверху) и спектры поглощения (внизу) различных форм свободного фермента.

Сплошная кривая — альдиминная форма, pH 5,2; пунктирная — то же, pH 8,3; штрихпунктирная — амноформа. D — оптическая плотность, ΔD — разность величин D для левого и правого циркулярно-поляризованного света.

важнейших промежуточных соединений реакции. В соответствующей конгруэнтной системе наблюдается лишь одна полоса 3300 А.

Рассмотренный пример показывает, какую информацию о ФСК, о механизме действия фермента дает спектроскопия и

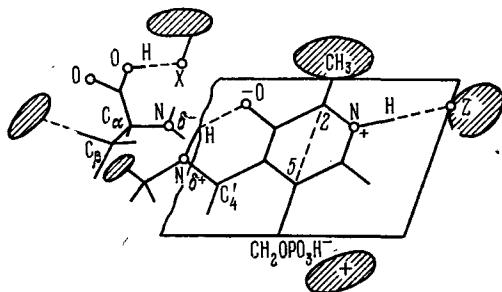


Рис. 6.14. Предполагаемая структура комплекса ААТ — субстрат.

спектрополяриметрия. Здесь особенно ценны также методы ЯМР, ЭПР, люминесценции и методы релаксационной кинетики реакций (см. § 7.7).

Сtereoхимическая картина, изображающая ситуацию в активном центре, получается на основе большой совокупности

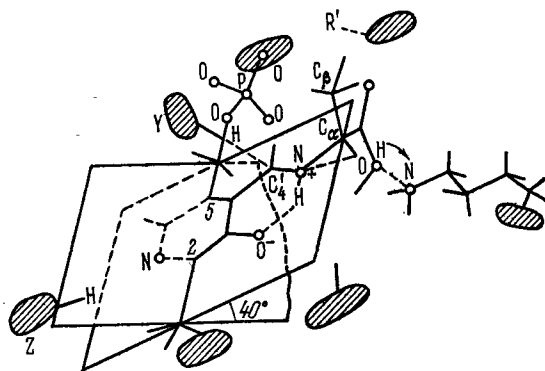


Рис. 6.15. Предполагаемая структура альдиминной формы комплекса фермент — субстрат.

разнообразных экспериментальных данных с помощью атомных моделей. В последнее время были развиты математические методы расчета этой картины, эффективно применяющие ЭВМ [53].

Итак, существуют реальные возможности для расшифровки взаимодействий между активным центром фермента и

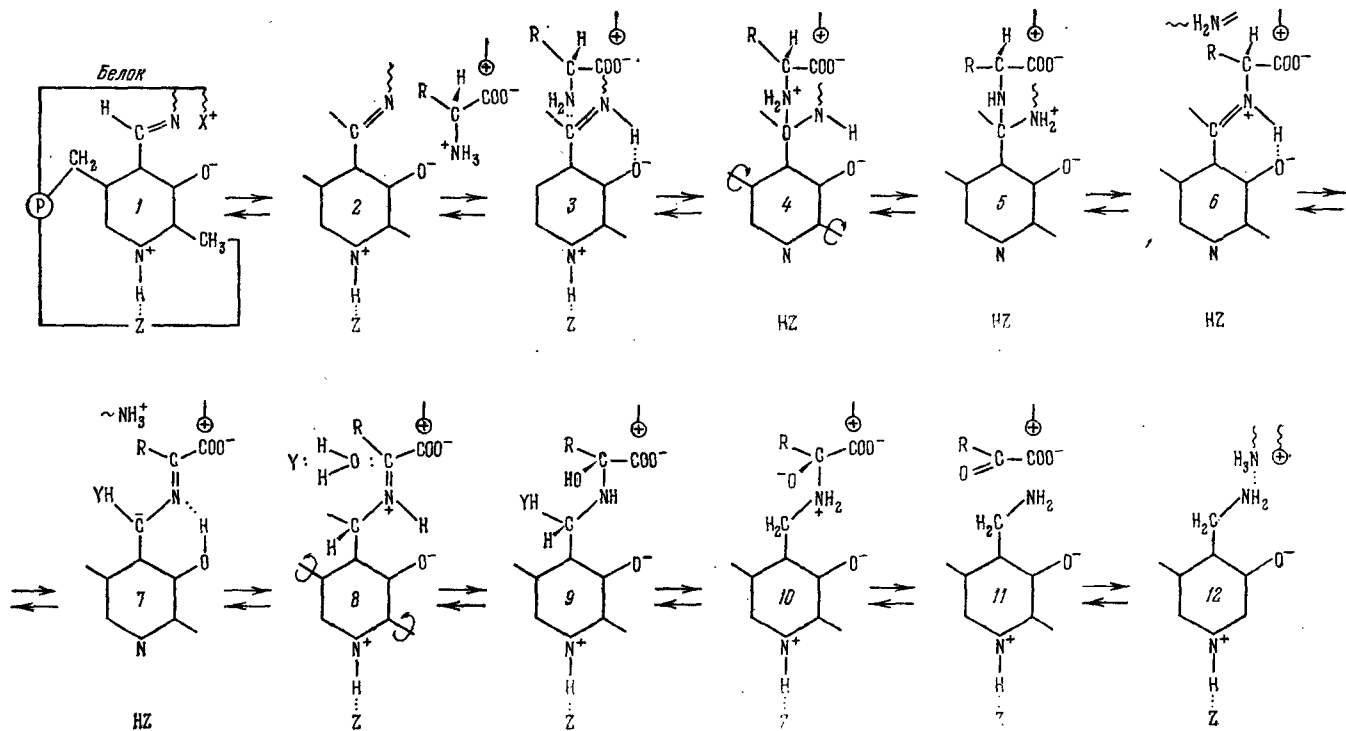


Рис. 6.16. Схема последовательных событий в активном центре ААТ.

лигандами. В химическом аспекте проблемы получается качественная картина взаимодействий, выявляется поведение функциональных групп фермента и кофакторов. Однако химический аспект недостаточен для построения количественной теории. Рассмотрение взаимодействий в активном центре показывает, что энергия активации должна быть понижена по сравнению с конгруэнтной реакцией, но неизвестно, на какую величину. Достаточно ли этих взаимодействий для количественного объяснения активности ферментов?

Химический аспект исходит из существования активного центра определенной структуры. Ясно, что эта структура возникает в организованной белковой глобуле таким образом, что в состав активного центра входят аминокислотные остатки, сильно удаленные друг от друга вдоль полипептидной цепи. Анализ взаимодействий в активном центре не дает ответа ни на вопрос о роли глобулы как целостной системы, ни на вопрос о влиянии окружающей среды.

Несомненно, что в катализе участвует вся белковая глобула. В некоторых работах утверждалось, что можно отрезать значительную часть белковой цепи без изменения активности фермента (см., например, [54]). В дальнейшем эти данные были опровергнуты [55, 56].

Браунштейн суммировал качественные причины, ответственные за каталитическое действие фермента [57].

1. Большое сродство фермента и субстрата, т. е. большая вероятность образования ФСК, эквивалентная резкому увеличению концентрации реагентов в обычных условиях (*эффект сближения*).

2. Строгая взаимная ориентация реагентов, кофакторов и активного центра (*эффект ориентации*). В обычных гомогенных реакциях вероятность строгой взаимной ориентации трех или большего числа взаимодействующих молекул очень мала.

3. Воздействие на субстрат в контактном участке ФСК нуклеофильных и электрофильных групп активного центра (*эффект синхронного внутримолекулярного кислотно-основного катализа*).

Кооперация нескольких групп катализатора моделируется некоторыми явлениями гомогенного кислотно-основного катализа. Так, 2-оксипиридин катализирует мутаротацию глюкозы,

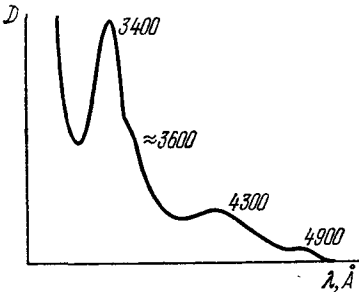


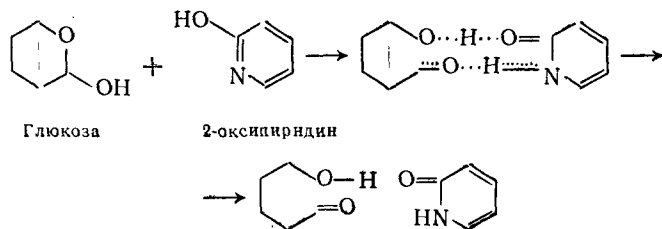
Рис. 6.17. Спектр поглощения ААТ в присутствии L-аспартата.

Таблица 6.3

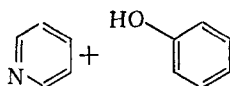
Оценка каталитических факторов для двух гипотетических реакций с двумя субстратами

		Реакция 1	Реакция 2
Характеристика реакции	Концентрация субстрата	$S_1 = 10^{-3}$ $S_2 = 10^{-4}$	$S_1 = 10^{-3}$ $S_2 = 55$ (вода)
	Заряд на субстрате	Нет	Нет
	Заряд в переходном состоянии	Малый	Полный положительный
Факторы, разумно оцененные на основании известных химических данных	Каталитические остатки	Один кислотный, один основной	Один кислотный, одна отрицательно заряженная группа
	Ковалентное промежуточное соединение	Есть	Нет
	Эффект сближения субстратов	$5,5 \cdot 10^3$	10^{-2}
	Общий эффект осидвного катализа	4	—
	Общий эффект кислотного катализа	10	20
	Эффект сближения каталитических групп	$3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$
	Эффект промежуточного ковалентного соединения	10	—
	Эффект растворителя	10^{-2}	10^{-5}
	Эффект образования ионных пар	10^2	10^5
	Произведение этих факторов	$7 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^2$
Число оборотов фермента, деленное на скорость реакции субстратов в отсутствие катализатора	$7 \cdot 10^{18}$	$6 \cdot 10^{14}$	
Множитель, требующий объяснения	10^9	10^{12}	

разрывая ее шестичленное кольцо и испытывая таутомерное превращение



Такая же реакция с участием смеси пиридина и фенола



протекает в 7000 раз медленнее [58].

В результате трех перечисленных эффектов происходит резкое увеличение абсолютной скорости реакции, так как маловероятные реакции высших порядков, требующие соударений трех и большего числа молекул, заменяются высокоэффективными реакциями первого порядка — реакциями внутримолекулярного полифункционального катализа.

4. Активация субстрата путем перераспределения электронной плотности под действием электроактивных групп фермента (*эффект поляризации*).

5. Изменение конформации белка при взаимодействии с субстратом (*эффект индуцированного контакта*).

Влияние первых четырех причин иллюстрируется рассмотренными примерами. О пятой рассказано в следующем параграфе.

Данные современной физической органической химии позволяют грубо оценить порядки величин этих и других каталитических факторов, т. е. ускорение реакции, ими вызванное. Эти оценки приведены в табл. 6.3 [59].

Таблица 6.4

Сравнение скоростей ферментативных реакций со скоростями неферментативных аналогов

Фермент	Неферментативный аналог	Скорость ферментативного процесса v , сек^{-1}	Скорость неферментативного процесса v_0 , сек^{-1}	v/v_0
Лизоцим	Гидролиз ацеталя, основной катализ	$5 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^8$
Химотрипсин	Гидролиз амида, основной катализ	$4 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^3$
β -амилаза	Гидролиз ацеталя, основной катализ	$1 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{11}$
Фумараза	Гидрирование алкена, кислотный и основной катализ	$5 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{11}$

В табл. 6.4 сопоставлены скорости конкретных ферментативных и неферментативных процессов. Скорости последних умножены на коэффициент, отвечающий эффекту сближения. Для двух молекул, имеющих размеры молекулы H_2O , этот множи-

тель равен 55, т. е. молярной концентрации воды; иными словами, молярная концентрация пар взаимодействующих молекул равна произведению молярных концентраций реагентов, деленному на 55 и умноженному на координационное число в водном растворе [60, 61] (см. также [62]).

Задача состоит в заполнении «разрыва», в количественном объяснении ферментативного катализа. Существует ли какой-либо основной фактор, ответственный за большую скорость ферментативных реакций, или необходимо «концертное» действие всех факторов? Пока нет ответа на эти вопросы, но можно наметить некоторые пути их исследования.

§ 6.5. КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Из конформационной лабильности макромолекулы белка следует специфическое взаимодействие фермента с субстратом и другими лигандами. Возможно, что в некоторых конформациях белок более эффективно связывает субстрат, чем в других. При связывании может происходить отбор конформаций субстрата. Каруш объяснил способность альбумина плазмы связывать различные вещества «конфигурационной адаптативностью» этого белка [63].

Можно думать, что в ФСК отбираются те конформации белка и субстрата, которые находятся в структурном соответствии друг с другом, обеспечивающем оптимальное значение свободной энергии взаимодействия [64, 65]. Структурное соответствие при образовании ФСК можно считать динамическим, индуцируемым. Таким образом, при образовании ФСК могут происходить изменения реальных конформаций белка и субстрата или одного из них. Васлов и Доэрти констатировали наличие конформационных эффектов при связывании химотрипсина молекул субстратов и конкурентных ингибиторов [66]. Структурное соответствие в ФСК до некоторой степени подобно соответствию в гетерогенном катализе (см. стр. 359). Исходя из своей мультиплетной теории, Баландин предложил качественную схему структурного соответствия фермента, кофермента и субстрата [67, 68].

Можно думать, что значительные изменения энтропии при образовании ФСК происходят именно в результате конформационных эффектов. Понижение энтропии при отборе определенной конформации может компенсироваться понижением энтальпии вследствие взаимодействия и повышением энтропии других участков глобулы. Как мы видели, физический анализ событий такого типа в белке требует учета явлений в окружающей водной среде (см. стр. 371).