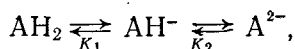


рентгенографических структур, их единственная общая особенность состоит в том, что внутренняя поверхность полости образована преимущественно неполярными остатками. Вследствие гидрофобных взаимодействий полярные остатки выведены наружу (см. стр. 223). неполярное «внутри» белковой молекулы имеет малую диэлектрическую проницаемость, что облегчает электрические взаимодействия [88]. Значение этого рассмотрено далее (см. стр. 403).

§ 6.6. ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ФЕРМЕНТ

Очевидно, что ферментативная активность должна существенно зависеть от pH среды. Макромолекулы белка содержат ионизируемые группы. То же относится к большинству субстратов, модификаторов и коферментов. Подробная классификация возможных влияний pH на ферменты дана Уэббом [16] (см. также [68]). Изменение pH может изменить состояние ионизируемых групп в активном центре или соседствующих с ним; оно может также влиять на состояние неферментных компонент системы и на структуру глобулы локально или в целом.

Фермент может существовать в различных состояниях ионизации, находящийся в равновесии друг с другом. Рассмотрим простейшую модель системы с двумя состояниями ионизации [96]. Такова любая двухосновная кислота. Имеем



где K_1 и K_2 — первая и вторая константы ионизации. Обозначим сумму концентраций всех трех форм через A_t

$$A_t = [\text{AH}_2] + [\text{AH}^-] + [\text{A}^{2-}]. \quad (6,59)$$

Константы K_1 и K_2 равны

$$K_1 = \frac{[\text{AH}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}_2]}, \quad K_2 = \frac{[\text{A}^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{AH}^-]} = \frac{[\text{A}^{2-}][\text{H}^+]^2}{[\text{AH}_2]K_1}. \quad (6,60)$$

Следовательно,

$$A_t = [\text{AH}_2]f = [\text{AH}^-]f^- = [\text{A}^{2-}]f^{2-}, \quad (6,61)$$

где f , f^- , f^{2-} — так называемые pH-функции Михаэлиса:

$$f = 1 + \frac{K_1}{[\text{H}^+]} + \frac{K_1K_2}{[\text{H}^+]^2}, \quad f^- = 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[\text{H}^+]}, \quad (6,62)$$

$$f^{2-} = 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_1K_2}.$$

Применим эту грубую модель к ферменту, приняв, что активный центр может существовать в трех указанных формах, но

лишь одна из них АН^- реакционноспособна. Тогда скорость реакции пропорциональна концентрации этой формы, т. е.

$$v = k [\text{АН}^-], \quad (6,63)$$

и мы получаем

$$v = kA_i / \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[\text{H}^+]} \right). \quad (6,64)$$

График зависимости v от $[\text{H}^+]$, т. е. от pH, проходит через максимум, отвечающий условию $[\text{H}^+] = \sqrt{K_1 K_2}$, т. е.

$$\text{pH} = 1/2(\text{p}K_1 + \text{p}K_2). \quad (6,65)$$

Действительно, во многих случаях зависимость активности фермента от pH имеет колоколообразную форму. Изложенная феноменологическая теория это объясняет и приводит к удобным для расчетов формулам [15, 16]. Однако зависимость скорости реакции от pH можно истолковать и иначе. Кирквуд и Шомейкер рассмотрели флуктуации электрических зарядов в молекуле фермента [97, 98]. Если свободные энергии различных состояний ионизации молекулы мало отличаются друг от друга, то заряды могут перемещаться, флуктуировать. Эти флуктуации могут привести к добавочному электростатическому взаимодействию фермента с субстратом.

Пусть U — потенциальная энергия ФСК при данном распределении зарядов. Усредним эту энергию по всем распределениям зарядов

$$\exp(-W/kT) = \langle \exp(-U/kT) \rangle. \quad (6,66)$$

Имеем

$$W = \langle U \rangle - \frac{1}{2kT} [\langle U^2 \rangle - \langle U \rangle^2] + \dots \quad (6,67)$$

В отсутствие флуктуаций $\langle U^2 \rangle = \langle U \rangle^2$ и $W = \langle U \rangle$. Допустим, что белок содержит n основных групп с зарядами $Z_i e$. Обозначив дипольный момент молекулы субстрата через \mathbf{p} , расстояние между i -й группой активного центра и субстратом через \mathbf{R}_i , угол между \mathbf{p} и \mathbf{R}_i через γ_i и диэлектрическую проницаемость через ϵ , получим

$$U = \sum_{i=1}^n \frac{(z_i + x_i) e p \cos \gamma_i}{\epsilon R_i^2}. \quad (6,68)$$

Величина x_i равна 1 или 0 в зависимости от того, присоединен ли к i -й группе протон или нет. Вычислим W . Имеем

$$\langle U \rangle = \sum_{i=1}^n \frac{z_i + \bar{x}_i}{\epsilon R_i^2} e p \cos \gamma_i \quad (6,69)$$

и

$$\bar{x}_i = \frac{[A_iH]}{[A_iH] + [A_i]} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_i}, \quad (6,70)$$

где

$$K_i = \frac{[A_i][H^+]}{[A_iH]}. \quad (6,71)$$

Аналогичным образом находим

$$\begin{aligned} \langle U^2 \rangle = & \sum_i (z_i^2 + 2z_i\bar{x}_i + \bar{x}_i^2) \frac{e^2 p^2 \cos^2 \gamma_i}{e^2 R_i^4} + \\ & + \sum'_{i,j} \overline{(z_i + x_i)(z_j + x_j)} \frac{e^2 p^2 \cos \gamma_i \cos \gamma_j}{e^2 R_i^2 R_j^2}, \end{aligned} \quad (6,72)$$

причем

$$\overline{x_i^2} = \bar{x}_i^2, \quad \overline{x_i x_j} = \bar{x}_i \bar{x}_j = \frac{[H^+]^2}{([H^+] + K_i)^2}. \quad (6,73)$$

Следовательно,

$$\langle U^2 \rangle - \langle U \rangle^2 = \sum_i (\overline{x_i^2} - \bar{x}_i^2) \frac{e^2 p^2 \cos^2 \gamma_i}{e^2 R_i^4}, \quad (6,74)$$

где

$$\overline{x_i^2} - \bar{x}_i^2 = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_i} \left(1 - \frac{[H^+]}{[H^+] + K_i} \right) = \frac{[H^+] K_i}{([H^+] + K_i)^2}. \quad (6,75)$$

Итак,

$$\begin{aligned} W = & \sum_{i=1}^n \left(z_i + \frac{[H^+]}{[H^+] + K_i} \right) \frac{ep \cos \gamma_i}{e R_i^2} - \\ & - \frac{1}{2kT} \sum_{i=1}^n \frac{K_i [H^+]}{([H^+] + K_i)^2} \frac{e^2 p^2 \cos^2 \gamma_i}{e^2 R_i^4} + \dots \end{aligned} \quad (6,76)$$

Энергию, связанную с флуктуациями зарядов, можно записать в виде

$$\Delta W = - \frac{n_\alpha e^2 p^2}{4e^2 R_\alpha^4 kT} \frac{K_\alpha [H^+]}{([H^+] + K_\alpha)^2}. \quad (6,77)$$

Здесь n_α , R_α , K_α — эффективные величины.

Вследствие флуктуаций зарядов должны изменяться и константа Михаэлиса (см. стр. 363) и константа скорости k_2 в финальной реакции образования продукта. Можно принять, что

$$\ln \frac{k_2}{k_2^0} = - \frac{W^* - W_0^*}{kT} = - \frac{\Delta W^*}{kT}, \quad (6,78)$$

где W^* и W_0^* — энергии активации при наличии флуктуаций зарядов и в отсутствие флуктуаций. Если ΔW^* выражается формулой типа (6,77), то

$$\ln \frac{k_2}{k_2^0} = \frac{n_a e^2 \Delta p^2}{4\epsilon^2 R_a^4 k^2 T^2} \frac{K_a [H^+]}{([H^+] + K_a)^2}, \quad (6,79)$$

где Δp^2 — разность квадратов дипольных моментов субстрата в активированном и неактивированном состояниях. Формула (6,79) дает колоколообразную зависимость k_2 от pH. Максимуму k_2 соответствует $pH = pK_a$.

Очевидно, что форма кривой $k_2(pH)$ объясняется в этой теории причинами, совершенно отличными от рассматриваемых в теории Михаэлиса. Прямые доказательства существования флуктуаций зарядов пока не получены. Кирквуд и Шомейкер показали, что флуктуации должны привести к появлению добавочных компонент в спектре времен релаксации. Позднее было установлено, что это не так [99], и сейчас трудно указать способ экспериментального обнаружения и изучения зарядовых флуктуаций.

Кирквуд считал механизм флуктуационного взаимодействия фермента и субстрата универсальным и определяющим явление ферментативной активности в целом [97, 98, 100]. Все изложенное показывает, что за ферментативную активность ответствен ряд факторов, и здесь весьма важны конформационные явления. Теория Кирквуда не решает проблему. Вместе с тем и механизм Михаэлиса, и механизм Кирквуда отражают реальные свойства полиэлектролитной системы. Остается неясным, в какой мере, так как отсутствуют строгие количественные оценки и получить их трудно.

Следует рассмотреть еще один механизм влияния pH на фермент — прямое влияние pH на конформационную структуру белка. Если считать, что реализуется индуцированный контакт фермента с субстратом, то повороты связей сопровождаются перемещением зарядов. Конечно, электростатические взаимодействия (включая образование ионных пар) между боковыми группами могут играть не меньшую роль, чем состояние водородных связей в α -спиралях и β -формах. Ясно, что концентрация водородных ионов должна влиять на конформационные свойства белка. Она не может не сказываться также на гидрофобных взаимодействиях, формирующих глобулу. Зависимость гидрофобных взаимодействий от pH мало изучена.

Как уже сказано выше (см. стр. 215—218), имеется возможность строгого анализа влияния pH среды на степень спирализации полипептида. Соответствующие модельные расчеты, проведенные в работах [101], показали, что форма зависимости

степени спиральности от рН определяется характером последовательности катионных и анионных групп цепи. Если эти группы регулярно чередуются, будучи разделены постоянным числом нейтральных групп, то кривая имеет форму симметричного колокола с максимумом при $\text{pH} = \frac{1}{2}(\text{pK}_a + \text{pK}_b)$ (см. стр. 217). В других случаях возможен минимум, а не максимум, и более сложные формы кривых.

Исследование ДОВ лактатдегидрогеназы (ЛДГ) показало колоколообразную зависимость констант в формулах Друде и Моффитта (см. стр. 304, 305) от рН. На рис. 6.24 изображены

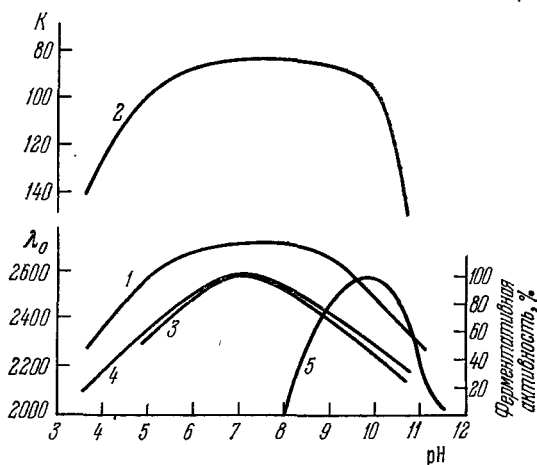


Рис. 6.24. Влияние рН на поведение ЛДГ.

1—зависимость λ_0 (формула Друде) от рН, 2—зависимость K (формула Друде (5,113)) от рН, 3—зависимость λ_0 от рН для ЛДГ + НАД-Н, 4—зависимость ферментативной активности ЛДГ от рН для реакции пируват \longrightarrow лактат, 5—то же для обратной реакции.

соответствующие кривые, а также кривые зависимости скоростей прямой и обратной реакции (пируват \rightleftharpoons лактат) от рН. Для прямой реакции имеется корреляция между ферментативной активностью и степенью α -спиральности фермента. Наибольшая скорость отвечает максимальной спиральности. Эта корреляция становится существенно лучше в присутствии кофермента НАД. НАД меняет вторичную структуру фермента (см. стр. 390), причем эти изменения зависят от рН. Анализ ДОВ по Блоуту — Шехтеру (см. стр. 318) показывает, что экспериментальные точки попадают на линейный график зависимости a_{2250} от a_{1930} , отвечающий $\epsilon < 30$, т. е. органическому растворителю. Тем самым, α -спиральные участки находятся в гидрофобном окружении. При изменении рН экспериментальные точки перемещаются вдоль той же прямой. Значит, изменения степени α -спирально-

сти, вызванные изменением рН в исследованном интервале, не сопровождаются разворачиванием глобулы.

Сходные результаты получены для глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, но здесь нет такой четкой корреляции, как для первого фермента (дальнейшие подробности см. в [68, 87]). Ряд данных о влиянии рН среды на вторичную структуру белков приводит Жоли [102].

Описанные выше результаты подтверждают общие представления об определяющей роли конформационных явлений в ферментативной активности и в этом смысле согласуются с теорией Кошланда. Установленная для лактатдегидрогеназы корреляция степени спиральности и скорости реакции весьма показательна. Конечно, нет оснований считать подобную корреляцию обязательной во всех случаях.

Но пока не существует метода — теоретического или экспериментального — для учета относительной роли всех трех механизмов: механизма, рассмотренного в феноменологической теории Михаэлиса и Давидсона (см. стр. 394), механизма Кирквуда и Шомейкера и конформационного механизма. Следует отметить, что наряду с флуктуациями зарядов, исследованными Кирквудом, должны существовать пространственные флуктуации, определяемые подвижностью полипептидных цепей.

§ 6.7. ФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Основная нерешенная задача физики и физической химии ферментов состоит в количественном объяснении их высокой каталитической активности.

Несомненно, что все рассмотренные выше эффекты дают свои вклады в ферментативную активность. Однако количественные оценки здесь недостаточно достоверны и не решают проблему.

В физическом аспекте должно поставить вопрос об едином механизме ферментативной активности, определяемом физическими свойствами глобулы как целостной системы. Мы не знаем пока, существует ли такой механизм или ферментативная активность полностью определяется уже рассмотренными химическими и физико-химическими факторами. Очевидно, что здесь интересен и положительный, и отрицательный ответ на вопрос о существовании единого физического механизма.

Следует подчеркнуть, что свойства глобулы как целого, за исключением наличия в ней полости с неполярными остатками, не учитываются ни в теории Кошланда, ни, тем более, в химических теориях взаимодействий в активных центрах ферментов.

Бряд ли осмысленно искать этот механизм в специальных полупроводниковых или иных электронных свойствах глобулы,