

где  $z_{1,2} = -A \pm \sqrt{A^2 - B}$  — корни соответствующего характеристического уравнения.

Если для сложной реакции справедлив принцип детального равновесия, то корни характеристического уравнения вещественны и отрицательны [119]. Такие реакции изображаются графами с разомкнутыми циклами, т. е. деревьями стадий, хотя общая схема реакции может содержать замкнутые циклы. Соответственно все реакции, графы которых представляются деревьями стадий, не могут привести к возникновению колебаний в предстационарном режиме. Если условие детального равновесия не выполняется, в системе могут возникать колебания. Трансформанта Лапласа — Карсона для скорости реакции является мероморфной функцией комплексного переменного  $z$ ; корни ее характеристического многочлена лежат в левой полуплоскости комплексных чисел для всех ферментативных реакций. Поэтому ферментная система в предстационарном режиме устойчива и в ней могут возникать лишь затухающие колебания. Для их появления необходимо, чтобы граф реакции содержал цикл по крайней мере из трех стадий.

Дальнейшие подробности, относящиеся к применению теории графов в стационарной и предстационарной кинетике ферментативных реакций, изложены в цитированных выше оригинальных работах, в приложении 1 в [33] и в работе Гольдштейна [115]. В кинетике ферментативных процессов метод направленных графов является удобным алгоритмом. Вместе с тем он позволяет выявить глубокую аналогию, существующую между процессами в сложных электронных цепях и ферментативными реакциями. Системы обоих типов работают на сигналах, связанных сходными функциональными зависимостями. В электронных цепях сигналами являются напряжения и токи, в ферментативных реакциях — концентрации и скорости стадий. Аналогом закона Ома служит закон действующих масс. Однако закон Ома требует учета разности напряжений на концах двухполюсников, а закон действующих масс учитывает концентрацию ферментного комплекса (аналог напряжения) лишь на входе двухполюсника (ветви графа). Это отличие определяет неприменимость графических правил, разработанных для электрических цепей, непосредственно к ферментативным реакциям и затрудняет прямое электрическое моделирование реакций [120, 121].

## § 7.7. ХИМИЧЕСКАЯ РЕЛАКСАЦИЯ

Механизм действия ферментов эффективно изучается методами химической релаксации, впервые развитыми Эйгеном [122]. Система выводится из равновесного или стационарного состояния быстрыми изменениями внешнего параметра и изучается

кинетика ее приближения к новому равновесному или стационарному состоянию. Доступны измерению времена релаксации  $\tau$  вплоть до  $10^{-10}$  сек. Применяются методы одномоментного и стационарного возмущений. Чаще всего пользуются скачком концентрации и температуры, возмущением электрическим полем, воздействием ультразвуком. Времена релаксации измеряются посредством скоростной спектрофотометрии. Обзоры экспериментальных основ и теорий методов даны в [123—126].

Релаксационные методы позволяют определять весь набор констант скоростей сложного процесса. Основное преимущество методов состоит в том, что при малых возмущениях равновесного или стационарного состояния жидкой смеси реагентов нелинейные кинетические уравнения линеаризуются.

Рассмотрим простейшую одностадийную реакцию ( $M$  — лиганд)  $F_0 + M \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} F_1$ . Кинетическое уравнение имеет вид

$$\dot{F}_0 = -k_1 F_0 M + k_{-1} F_1. \quad (7,102)$$

В стационарном состоянии  $\dot{F}_0 = \dot{F}_1 = \dot{M} = 0$ . При отклонениях от стационарных концентраций  $\bar{F}_0, \bar{F}_1, \bar{M}$

$$F_0 = \bar{F}_0 + \delta F_0, \quad M = \bar{M} + \delta M, \quad F_1 = \bar{F}_1 + \delta F_1.$$

Имеем

$$\frac{d(\delta F_0)}{dt} = -k_1 \bar{F}_0 \delta M - k_1 \bar{M} \delta F_0 - k_1 \delta F_0 \delta M + k_{-1} \delta F_1. \quad (7,103)$$

При малом возмущении пренебрегаем  $k_1 \delta F_0 \delta M$ . Из закона сохранения массы следует, что  $\delta F_0 = \delta M = -\delta F_1$ , и можно написать

$$\frac{d(\delta M)}{dt} = -(k_1 \bar{F}_0 + k_1 \bar{M} + k_{-1}) \delta M, \quad (7,104)$$

или

$$\tau \frac{d(\delta M)}{dt} + \delta M = 0, \quad (7,105)$$

где

$$\tau^{-1} = k_1 (\bar{F}_0 + \bar{M}) + k_{-1}.$$

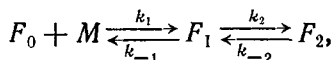
Решение (7,105) имеет вид

$$\delta M = (\delta M)_0 \exp(-t/\tau); \quad (7,106)$$

здесь  $(\delta M)_0$  — значение  $\delta M$  при  $t = 0$ . Измерение  $\tau$  при разных концентрациях  $F_0$  и  $M$  позволяет определить  $k_1$  и  $k_{-1}$ .

Рассмотрим более сложные модели ферментативных реакций.

Пусть фермент взаимодействует с неким модифицирующим, но не реагирующим лигандом  $M$ . Имеем для двухстадийной реакции модификации



где  $F_1$  и  $F_2$  — два модифицированных комплекса фермент — лиганд. Методы стационарной кинетики не позволяют определить четыре константы скорости.

Напишем соответствующие кинетические уравнения

$$\dot{M} = -k_1 F_0 M + k_{-1} F_1, \quad \dot{F}_1 = k_1 F_0 M - (k_{-1} + k_2) F_1 + k_{-2} F_2. \quad (7,107)$$

Введем малые отклонения  $x_i$  от стационарных концентраций:

$$M = \bar{M} + x_1, \quad F_0 = \bar{F}_0 + x_1, \quad F_1 = \bar{F}_1 + x_2, \quad F_2 = \bar{F}_2 - (x_1 + x_2).$$

Получаем в пренебрежении членами второго порядка относительно  $x_1, x_2$  два линейных уравнения

$$\dot{x}_1 = \alpha_{11} x_1 + \alpha_{12} x_2, \quad \dot{x}_2 = \alpha_{21} x_1 + \alpha_{22} x_2, \quad (7,108)$$

где

$$\alpha_{11} = -k_1(\bar{F}_0 + \bar{M}), \quad \alpha_{12} = k_{-1}, \quad \alpha_{21} = k_1(\bar{F}_0 + \bar{M}) - k_{-2}, \\ \alpha_{22} = -(k_{-1} + k_2 + k_{-2}).$$

Решение системы (7,108) записывается следующим образом:

$$x_1 = x_{10} \exp(-t/\tau), \quad x_2 = x_{20} \exp(-t/\tau).$$

Характеристическое уравнение имеет вид

$$\begin{vmatrix} \alpha_{11} + \tau^{-1} & \alpha_{12} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} + \tau^{-1} \end{vmatrix} = 0, \quad (7,109)$$

и мы получаем два вещественных значения

$$\tau_{1,2}^{-1} = -\frac{\alpha_{11} + \alpha_{22}}{2} \left[ 1 \pm \left( 1 - \frac{4(\alpha_{11}\alpha_{22} - \alpha_{12}\alpha_{21})}{(\alpha_{11} + \alpha_{22})^2} \right)^{1/2} \right], \quad (7,110)$$

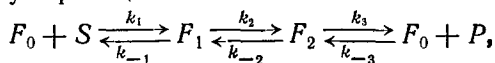
или

$$\left. \begin{aligned} \tau_1^{-1} + \tau_2^{-1} &= -(\alpha_{11} + \alpha_{22}) = k_1(F_0 + M) + k_{-1} + k_2 + k_{-2}, \\ \tau_1^{-1}\tau_2^{-1} &= \alpha_{11}\alpha_{22} - \alpha_{12}\alpha_{21} = \\ &= k_1(k_2 + k_{-2})(F_0 + M) + k_{-1}k_{-2}. \end{aligned} \right\} \quad (7,111)$$

Эти две комбинации  $\tau_1$  и  $\tau_2$  непосредственно дают все четыре константы скорости. Метод был применен для определения констант скорости в реакции  $\alpha$ -химотрипсина с профлавином [126].

В общем случае мы получаем систему  $n$  линеаризованных кинетических уравнений относительно  $x_1, x_2, \dots, x_n$  и

соответственно характеристическое уравнение  $n$ -го порядка, дающее  $n$  значений  $\tau_i$ . Общее решение трудно интерпретировать, но если величины  $\tau_i$  при разных  $i$  сильно различаются, то оно упрощается. Эйген рассматривает в качестве примера простую ферментативную реакцию



где  $F_1$  — комплекс фермент — субстрат,  $F_2$  — комплекс фермент — продукт. Предположим, что стадии 1 и 3 быстрые, а стадия  $F_1 \rightleftharpoons F_2$  медленная, лимитирующая превращение  $S \rightarrow P$ . Для быстрых стадий линеаризованные уравнения имеют прежнюю форму (7,108), где

$$x_1 = \delta S, \quad -x_1 = \delta F_1, \quad x_2 = \delta P, \quad -x_2 = \delta F_2, \quad x_1 + x_2 = \delta F_0,$$

и

$$\alpha_{11} = -[k_1(F_0 + S) + k_{-1}], \quad \alpha_{12} = -k_1 S, \quad \alpha_{21} = -k_{-3} P, \\ \alpha_{22} = -[k_{-3}(F_0 + P) + k_3].$$

Решение имеет вид

$$\left. \begin{aligned} \tau_1^{-1} + \tau_2^{-1} &= (k_1 + k_{-3})F_0 + (k_1 + k_{-3}K)S + k_{-1} + k_3, \\ \tau_1^{-1}\tau_2^{-1} &= k_1 k_{-3} F_0^2 + k_1 k_{-3} (1 + K) F_0 S + \\ &+ (k_1 k_3 + k_{-1} k_{-3}) F_0 + (k_1 k_3 + k_{-1} k_{-3} K) S + k_{-1} k_3, \end{aligned} \right\} (7,112)$$

где  $K$  — константа равновесия реакции  $S \rightleftharpoons P$ .

Уравнение для константы скорости медленной стадии имеет вид

$$\frac{d(S + F_1)}{dt} = -\frac{d(P + F_2)}{dt} = -k_2 F_1 + k_{-2} F_2. \quad (7,113)$$

Ему отвечает одно время релаксации

$$\tau_3^{-1} = \frac{k_2}{1 + (K_1/F_0) f_2} + \frac{k_{-2}}{1 + (K_2/F_0) f_1}, \quad (7,114)$$

где  $K_1, K_2$  — константы равновесия реакций связывания, т. е. образования  $F_1$  из  $F_0$  и  $S$  и  $F_2$  из  $F_0$  и  $P$ ,

$$f_1 = \frac{K_1 + F_0 + S + PK_1/K_2}{K_1 + F_0 + S + P}, \quad f_2 = \frac{K_2 + F_0 + S + PK_2/K_1}{K_2 + F_0 + S + P}. \quad (7,115)$$

Метод релаксационной кинетики позволяет определить все константы.

Если скорости всех стадий близки по порядку величины, ситуация усложняется. В этом случае оказывается целесообразным рассматривать усредненные значения  $\tau$ , также дающие ценную информацию о константах скорости [125, 127].

При малых концентрациях фермента реализуются стационарные значения концентраций промежуточных комплексов. Релаксационный спектр сводится к одному значению  $\tau$ , характерным образом зависящему от  $S$ .

Таким образом, релаксационная методика дает возможность получения детальной информации о промежуточных комплексах и соответствующих константах скоростей.

Обратимся теперь к спектру времен релаксации для аллостерического белка, также исследованному Эйгеном [125].

Согласно теории МУШ (см. стр. 457) аллостерический фермент характеризуется тремя параметрами — константами связывания лиганда в  $R$ - и  $T$ -состояниях и параметром, описывающим конформационный переход  $R \rightleftharpoons T$ . Соответственно система должна иметь не меньше трех временных постоянных. Предположим, что переход  $R \rightleftharpoons T$  есть наиболее медленная стадия. Связывание субъединицами в  $R$ -состоянии характеризуется одной наблюдаемой временной постоянной  $\tau_1$ , соответствующей реакции свободных молекул субстрата с незанятыми  $R$ -центрами. В случае тетрамера для концентрации свободных связывающих центров в  $R$ -состояниях имеем

$$\varphi_R = 4R_0 + 3R_1 + 2R_2 + R_3.$$

Величина  $1/\tau_1$  должна быть функцией суммы  $S$  и  $\varphi_R$ . То же относится к  $T$ -состоянию тетрамера, характеризующемуся  $\tau_2$ . Оба равновесия сопряжены посредством  $S$ , тогда как центр в  $T$ -состоянии реагирует с субстратом и изменение его концентрации влияет на более быстрое связывание центром в  $R$ -состоянии. Релаксационный спектр  $n$ -мерного фермента был вычислен Эйгеном в предположении о постоянстве концентрации  $S$  (буфер) или более быстром установлении равновесия с  $R$ -состоянием, чем с  $T$ -состоянием, т. е.  $n\tau_T^{-1} \ll \tau_R^{-1}$ . Имеем

$$\varphi_R = nR_0 + (n-1)R_1 + (n-2)R_2 + \dots + R_{n-1} \quad (7,116)$$

и при указанных условиях

$$\tau_{1R}^{-1} = k_A^R(S + \varphi_R) + k_D^R, \quad \tau_{2R}^{-1} = 2(k_A^R S + k_D^R), \dots, \\ \tau_{nR}^{-1} = n(k_A^R S + k_D^R), \quad (7,117)$$

$$\tau_{1T}^{-1} = k_A^T(S + f_R \varphi_T) + k_D^T, \quad \tau_{2T}^{-1} = 2(k_A^T S + k_D^T), \dots, \\ \tau_{nT}^{-1} = n(k_A^T S + k_D^T), \quad (7,118)$$

где  $k_A$  и  $k_D$  — константы скорости ассоциации с лигандом и диссоциации,  $\varphi_T$  аналогично  $\varphi_R$ ,

$$f_R = \frac{K_R + S}{K_R + S + \varphi_R},$$

$K_R$  — константа связывания для  $R$ -состояния.

Превращение  $R \rightleftharpoons T$  характеризуется одним временем релаксации  $\tau_{\text{конф}}$ , вообще говоря, зависящим от  $S$ . При малых  $S$  связывания, и система находится в  $T_0$ - и  $R_0$ -состояниях. При очень больших  $S$  центры насыщены и система находится в  $T_4$ - и  $R_4$ -состояниях. В этих двух случаях  $\tau_{\text{конф}}$  не зависят от  $S$ , но различны. Если состояние  $T_0$  более стабильно, чем  $R_0$ , но, напротив,  $R_4$  более стабильно, чем  $T_4$ , то получается  $S$ -образный переход от одного значения  $\tau_{\text{конф}}$  к другому. При  $S = \text{const}$  имеем

$$\sum R_i \rightleftharpoons \sum T_i,$$

$$\frac{d \sum R_i}{dt} = -k_0^{RT} R_0 + k_0^{TR} T_0 - k_1^{RT} R_1 + k_1^{TR} T_1 - \dots \quad (7,119)$$

Как и выше, линеаризуем кинетические уравнения, вводя малые отклонения от стационарных концентраций  $\delta R_0$  и т. д. Заменяя  $\delta R_0$  на

$$\frac{\delta \sum R_i}{1 + \delta R_1/\delta R_0 + (\delta R_2/\delta R_1)(\delta R_1/\delta R_0) + \dots}$$

и производя аналогичные замены для всех  $\delta R_i$  и  $\delta T_i$ , находим

$$\tau_{\text{конф}}^{-1} = \frac{k_0^{RT} + k_1^{RT}(\delta R_1/\delta R_0) + k_2^{RT}(\delta R_2/\delta R_1)(\delta R_1/\delta R_0) + \dots}{1 + (\delta R_1/\delta R_0) + (\delta R_2/\delta R_1)(\delta R_1/\delta R_0) + \dots} +$$

$$+ \frac{k_0^{TR} + k_1^{TR}(\delta T_1/\delta T_0) + \dots}{1 + (\delta T_1/\delta T_0) + \dots}. \quad (7,120)$$

Расчет при  $\delta S = 0$  дает приближенное значение

$$\tau_{\text{конф}}^{-1} = \left[ \frac{k_0^{TR}}{(1 + S/K_T)^n} + \frac{k_0^{RT}}{(1 + S/K_R)^n} \right] f(S/K_T), \quad (7,121)$$

где

$$f\left(\frac{S}{K_T}\right) = \sum_{i=0}^n \alpha_i^T \frac{n!}{(n-i)! i!} \left(\frac{S}{K_T}\right)^i,$$

$\alpha_i^T \equiv k_i^{TR}/k_0^{TR}$ . При  $\alpha_i^T \rightarrow 1$  функция  $f(S/K_T)$  принимает значение  $(1 + S/K_T)^n$ .

В предельных случаях находим:

$$\text{если } S/K_T \ll 1, S/K_R \ll 1, \text{ то } \tau^{-1} = k_0^{TR} + k_0^{RT},$$

$$\text{если } S/K_T \ll 1, S/K_R \gg 1, \text{ то } \tau^{-1} = k_0^{TR} + k_n^{RT},$$

$$\text{если } S/K_T \gg 1, S/K_R \gg 1, \text{ то } \tau^{-1} = k_n^{TR} + k_n^{RT}.$$

Наличие первых двух релаксационных эффектов, для которых  $\tau^{-1}$  линейно растет с концентрацией, дает детальную информацию о связывании в обоих состояниях. Третье значение  $\tau$  ука-

зывает на конформационное превращение. Если  $\tau_{\text{конф}}$  переходит от одного постоянного значения к другому, то имеются лишь две конформации. Резкость перехода характеризует кооперативность. Киришнер исследовал релаксационными методами D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФД) и действительно установил все отмеченные особенности релаксационного спектра в согласии с теорией МУШ. Эти данные не исключают, однако, альтернативной модели Кошланда и соавторов (см. стр. 460).

Недавно Шварц предложил теорию химической релаксации при кооперативных конформационных переходах в линейных биополимерах [128]. Исследована релаксация в переходах спираль — клубок в полипептидах на основе модели Изинга. Теория применима как к коротким, так и к длинным цепям. Показано, что конформационный переход контролируется наибольшим временем релаксации.

Очевидно, что именно изучение релаксационного спектра дает наиболее непосредственные сведения об ЭКВ, позволяя раздельно изучать быстрые и медленные движения в ФСК. Было бы особенно интересно исследовать оксигенацию гемоглобина с целью прямой проверки динамической модели, предложенной Перутцом (см. стр. 430). Можно думать, что широкое развитие релаксационных исследований — дело ближайшего будущего. Эффективные методы быстрых возмущений системы и скоростной регистрации релаксационных процессов успешно применяются [123—127, 129, 130, 129, 130], однако нет сомнений в том, что здесь имеется много неиспользованных возможностей.

## Литература

1. M. Perutz, Proc. Roy. Soc. **B167**, 448 (1967).
2. М. Вейсблут, Физика гемоглобина, в сб. «Структура и связь», «Мир», 1969.
3. A. Rossi-Fanelli, E. Antonini, A. Caputo, Biochim. Biophys. Acta **35**, 93 (1959).
4. T. Samejima, J. Yang, J. Mol. Biol. **8**, 863 (1964).
5. К. Бальхаузен, Введение в теорию поля лигандов, «Мир», 1964.
6. K. Ohno, Y. Tanabe, F. Tasaki, Theor. Chim. Acta **1**, 378 (1963).
7. A. Veillard, B. Pullmann, J. Theor. Biol. **8**, 317 (1965).
8. M. Zerner, M. Gouterman, H. Kobayashi, Theor. Chim. Acta **6**, 363 (1966).
9. Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев, Спектроскопия хлорофиллов и родственных соединений, «Наука и техника», Минск, 1968.
10. C. Johnson, Physics Today **24**, 35 (1971).
11. G. Lang, T. Asakura, T. Yonetani, Biochim. Biophys. Acta **214**, 381 (1970).
12. A. Hill, J. Physiol. **40**, IV (1910).
13. E. Antonini, A. Rossi-Fanelli, A. Caputo, Arch. Biochem. Biophys. **97**, 343 (1962).
14. G. Adair, J. Biol. Chem. **63**, 529 (1925); Proc. Roy. Soc. **A109**, 282 (1925).
15. L. Pauling, Proc. Nat. Acad. Sci. US **21**, 186 (1935).
16. J. Wyman, Adv. Protein Chem. **4**, 407 (1948).