

раль является разверткой (эвольвентой) отверстия [42]. Механизм спирального закручивания волны возбуждения рассмотрен Балаховским [43].

Схема образования ревербератора показана на рис. 8.24 [44]. Жаботинский и Заикин наблюдали спиральные волны, вызванные нарушением однородности системы — локальным понижением кислотности (см. также § 8.10).

Наряду с ВЦ и ревербераторами при $D_u \neq D_w \neq 0$ возможно возникновение стационарных периодических структур, о чем уже говорилось в § 8.4. Образование таких структур было впервые рассмотрено Тьюрингом [30] и изучено Пригожиным и сотрудниками [1—3, 28, 29]. Эти стационарные структуры являются диссипативными. Такого рода химические структуры наблюдались в ряде работ [19, 45—47].

Приведем в заключение фотографию химических ревербераторов, полученную Жаботинским (рис. 8.25), и фотографию лишайника (рис. 8.26). Внешнее сходство бросается в глаза. Конечно, периодический рост лишайника не является аналогией поведения рассмотренных химических систем, но есть веские основания считать, что химические автоколебательные и автоволновые процессы моделируют важные биологические явления — в частности, «биологические часы» (автоколебания) и некоторые явления морфогенеза (стационарные автоволновые процессы).

Вслед за работами Жаботинского появились дальнейшие исследования концентрационных автоколебаний или «вращающихся» химических реакций, в частности, реакций, протекающих в трехмерном пространстве [48, 49].

§ 8.6. НЕЛИНЕЙНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ

В ферментативных процессах могут проявляться различные типы нелинейных зависимостей от концентраций реагентов; в частности, удастся наблюдать и периодические ферментативные реакции (см. § 8.7).

Стационарная кинетика ферментативных процессов может быть нелинейной в смысле нелинейной зависимости скорости превращения субстрата от его концентрации, а также от концентрации других эффекторов. С такими ситуациями мы встречаемся при рассмотрении белков-ферментов, обладающих четвертичной структурой и имеющих несколько активных центров, поведение которых взаимозависимо. Указанная нелинейность служит выражением кооперативности системы и проявляется в наличии особенностей (перегибов и максимумов) на кривых

зависимости стационарной скорости от концентраций лигандов. Эти явления, весьма существенные для понимания свойств аллостерических ферментов, рассмотрены в §§ 7.5, 7.6 книги [9]. Однако нелинейность стационарной кинетики в этих случаях никак не означает удаленности системы от состояния равновесия — она возникает и при равновесных соотношениях фермента с лигандами. В модели Моно, Уаймана и Шанжэ (модель МУШ) [9, 50, 51] присоединение лигандов приводит лишь к сдвигу равновесия.

Рассмотрим неравновесный ферментативный процесс. Неравновесность возникает в результате значительных различий в скоростях конформационных изменений ферментов, которые могут быть большими и малыми по сравнению со скоростями связывания субстратов и образования продуктов. Как уже сказано, классические модели аллостерических ферментов основаны на допущении быстрого наступления равновесия между всеми формами фермента, отличающимися друг от друга конформациями и степенью насыщения лигандами. Однако во многих случаях изменение конформации оказывается наиболее медленной, определяющей кинетику стадией. При этом стационарная реакция протекает вдали от равновесия, что и приводит к специфическим особенностям на кривых зависимости скорости реакции от концентраций лигандов. Эти особенности нельзя интерпретировать на основе равновесных моделей.

Кинетические проявления конформационных изменений были проанализированы для одноцентрового мономерного фермента в ряде работ [52—56]. Однако во многих случаях за своеобразное кинетическое поведение ответственны скорее медленные изменения четвертичной структуры олигомерных ферментов. В работе [57] рассмотрены их нелинейные свойства.

Модифицируем модель МУШ. Рассмотрим фермент, молекула которого содержит n субъединиц — протомеров. Молекула фермента может находиться в двух различных конформационных состояниях R и T , в которых она имеет различное химическое средство к лиганду S .

Будем считать, что переходы между этими состояниями происходят значительно медленнее, чем связывание и освобождение субстрата и образование продукта. Схема реакции представлена на рис. 8.27.

В неравновесном стационарном процессе фермент испытывает циклические конформационные изменения. Он лучше связывает субстрат в одной конформации, чем в другой, в которой он легче освобождает продукт, после чего возвращается в исходное конформационное состояние (ср. стр. 320). При равновесии конформеров, которое описывается условием (смысл

констант ясен из рис. 8.27)

$$k'_R/k'_T = \kappa_R/\kappa_T,$$

циклические конформационные превращения отсутствуют.

В модели МУШ предполагается, что лимитирующими являются стадии образования продуктов с константами скорости

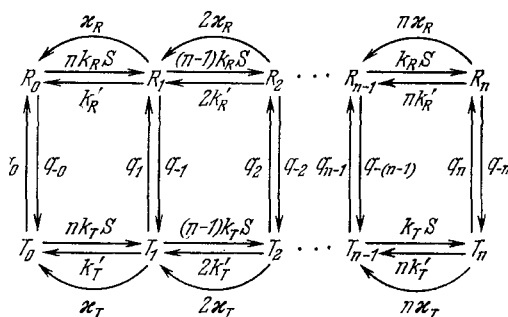


Рис. 8.27. Схема реакции, катализируемой n -мерным ферментом, имеющим два конформационных состояния.

κ_R и κ_T . При этом стационарный процесс соответствует равновесию всех конформационных состояний фермента R_i, T_i . Предположим, что равновесия нет, скорости переходов $R_i \rightleftharpoons T_i$ являются наименьшими (S — концентрация субстрата)

$$q_i, q_{-i} \ll k_T S, k_R S; \quad k'_T, k'_R; \quad \kappa_T, \kappa_R.$$

При этих условиях в стационарном процессе соотношения концентраций фермента в состояниях $R_i/R_j, T_i/T_j$ определяются только концентрацией субстрата и константами $K'_R = k_R/(k'_R + \kappa_R)$ и $K'_T = k'_T/(k'_T + \kappa_T)$, но не константами q_i, q_{-i} . Предположим далее, что концентрация продукта мала, следовательно, можно пренебречь стадией его связывания. Это упрощение не принципиально. Скорости конформационных переходов определяют только отношение общих концентраций фермента в двух конформациях R_i/T_i , где

$$R_t = \sum_{i=0}^n R_i, \quad T_t = \sum_{i=0}^n T_i. \quad (8.80)$$

В самом деле,

$$\frac{R_i}{R_0} = \frac{n(n-1) \dots (n-i)}{1 \cdot 2 \dots i} (K'_R S)^i, \quad (8.81)$$

$$\frac{T_i}{T_0} = \frac{n(n-1) \dots (n-i)}{1 \cdot 2 \dots i} (K'_T S)^i.$$

Условие стационарности процесса можно записать в виде

$$\sum_{i=0}^n R_i q_i = \sum_{i=0}^n T_i q_{-i}. \quad (8.82)$$

Из равенств (8.80) — (8.82) следует

$$\frac{R_i}{T_i} = \frac{(1 + K'_R S)^n \sum_{i=0}^n q_i (K'_T S)^i \frac{n(n-1) \dots (n-i)}{1 \cdot 2 \dots i}}{(1 + K'_T S)^n \sum_{i=0}^n q_{-i} (K'_R S)^i \frac{n(n-1) \dots (n-i)}{1 \cdot 2 \dots i}}. \quad (8.83)$$

Условие детального баланса при равновесии приводит к закономерному изменению констант равновесия q_i/q_{-i} в зависимости от индекса i :

$$\frac{q_i}{q_{-i}} = \frac{q_0}{q_{-0}} \left(\frac{K_R}{K_T} \right)^i, \quad (8.84)$$

где $K_R = k_R/k'_R$, $K_T = k_T/k'_T$.

Допустим, что константы q_i и q_{-i} изменяются монотонно по мере связывания субстрата активными центрами. Тогда в силу (8.84) получим

$$\frac{q_{i+1}}{q_i} = \frac{\alpha}{K_T} = \frac{1}{s} \quad (8.85)$$

и

$$\frac{q_{-(i+1)}}{q_{-i}} = \frac{\alpha}{K_R} = \frac{1}{r},$$

где α , s , r — константы.

Для системы глицеральдегидфосфатдегидрогеназа + НАД обнаружено именно монотонное изменение констант q_i , q_{-i} , причём $s = 25$, $r = 1$ [58].

С помощью (8.85) получаем из (8.83)

$$y = \frac{R_i}{T_i} \frac{q_{-0}}{q_0} = \left[\frac{(x+l)(rx+1)}{(x+1)(sx+l)} \right]^n, \quad (8.86)$$

где $x = K'_R S/r$ — безразмерная концентрация субстрата и $l = (1 + k_T/k'_T)/(1 + k_R/k'_R)$. Величина R_i/T_i изменяется от q_0/q_{-0} при $S = 0$ до q_n/q_{-n} при $S \rightarrow \infty$. Для равновесной модели МУШ R_i/T_i монотонно зависит от S [59]. При равновесиях происходит монотонный переход фермента из одной конформации в другую, обладающую большим сродством к субстрату.

Вдали от равновесия при определенных значениях параметров r, s, l функция $y(x)$ может быть немонотонной. Допустим, что две конформации отличаются каталитической активностью, но не сродством к субстрату, т. е. $r = s$. В этом случае функция $y(x)$ проходит через максимум, а ее предельные значения при $x = 0$ и $x \rightarrow \infty$ совпадают. Если $r \neq s$, то $y(x)$ проходит через максимум, а предельные значения разнятся. При $r = 100, s = 150, l = 2$ и $n = 4$ максимум $y(x)$ отвечает $x = 0,1$. Это означает, что при увеличении x сначала происходит переход $T \rightarrow R$, а затем переход $R \rightarrow T$. Такое переключение конформационного перехода может проявиться в виде промежуточного плато на кривой зависимости стационарной скорости реакции от концентрации субстрата S . Формула (8.86) показывает, что немонотонность $y(x)$ возможна при отличии параметров r, s, l от единицы.

Начальная стационарная скорость реакции, отнесенная к полной концентрации фермента $R_t + T_t$, равна

$$v_0 = \frac{\kappa_R \sum_{i=1}^n i R_i + \kappa_T \sum_{i=1}^n i T_i}{R_t + T_t}. \quad (8.87)$$

Для рассматриваемой модели это выражение приобретает вид

$$v_0(x) = \frac{\kappa_R L r x (rx + 1)^{n-1} (x + l)^n + \kappa_T s x (sx + l)^{n-1} (x + 1)}{L (rx + 1)^n (x + l)^n + (sx + l)^n (x + 1)^n}, \quad (8.88)$$

где $L = q_0/q_{-0}$ — аллостерическая константа равновесия. Кривизна получаемых кривых $v_0(x)$ больше, чем в случае равновесной модели МУШ, так как концентрация субстрата x входит в уравнение (8.88) в степени $2n$, а в соответствующую равновесную функцию только в степени n . Равновесная функция получается из (8.88) при $l = 1$, она совпадает с формулой для модели МУШ [50]. Рассматриваемая модель учитывает два типа нелинейности — нелинейность, определяемую равновесными кооперативными свойствами, и нелинейность, вызванную медленностью конформационных превращений, т. е. удаленностью от равновесия.

Вследствие неравновесности на кривой $v_0(x)$ может появиться промежуточное плато. Соответствующая кривая $v(x)$, полученная при параметрах $\kappa_R/\kappa_T = 0,1, L = 10, l = 4, r = 100, s = 150, n = 4$, показана на рис. 8.28. Плато получается в области $x = 1$. Такая кривая может вырождаться в S-образную кривую или в кривую, лишенную особенностей. Равновесная модель МУШ объясняет только S-образные кривые $v(x)$ при

любом числе состояний фермента и любом числе субъединиц n [60].

Для $n = 4$ кривые с промежуточным плато могут быть получены на основе равновесной модели последовательных конформационных изменений Кошланда [61]. Однако при этом приходится вводить искусственное предположение о резком изменении характера кооперативности — замене отрицательной кооперативности на положительную при увеличении концентрации субстрата. Впрочем, для любой равновесной модели концентрация субстрата входит в выражение скорости реакции в степени, не меньшей n . Поэтому и модель Кошланда не всегда согласуется с опытом [62].

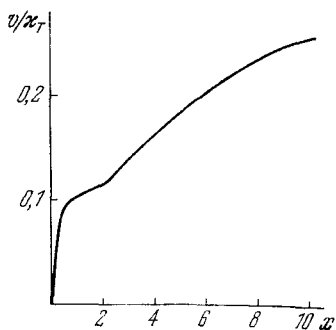


Рис. 8.28. График стационарной скорости с промежуточным плато.

Неравновесная модель очень чувствительна к значениям параметров и дает большое разнообразие кинетических кривых. Можно думать, что сходные ферменты, полученные из различных источников (например, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа из дрожжей, из мышц животных и насекомых), проявляют различный характер кооперативности именно вследствие неравновесности своего поведения.

Медленные изменения конформации могут приводить к предстационарному нарастанию или спаду активности фермента [56]. Приближение к стационарному состоянию может быть немонотонным, в частности иметь характер затухающих колебаний вследствие неравновесности (см. также [63]).

Следует подчеркнуть, что однонаправленность циклического ферментативного процесса возможна только в кинетическом режиме, вдали от равновесия. Ни одна из элементарных стадий цикла не может быть истинно необратимой. Поэтому применение термина «релаксация» (см. § 6.6) условно. На первый взгляд может показаться, что прямая и обратная реакции $S \rightarrow P$ и $P \rightarrow S$ способны идти разными путями и равновесие должно лишь уравнивать суммарные прямой и обратные потоки. Однако легко видеть, что в таком случае молекула фермента окажется вечным двигателем. В равновесии при неизменных концентрациях всех веществ в замкнутой системе молекулы фермента совершали бы циклические конформационные превращения и нагревали бы среду вследствие обычных потерь на трение. В действительности термодинамическое равновесие обязательно означает и детальное равновесие, т. е. равновесие на каждой эле-

ментарной стадии. В любой кинетической схеме, содержащей замкнутые циклы, условие детального равновесия накладывает связи на константы скорости (см., например, стр. 61).

Для регулирования активности фермента существенно то, что по крайней мере в одной из конформаций образование продукта происходит быстрее, чем переход между конформационными состояниями фермента. Возникающие нелинейные эффекты очень чувствительны к регулирующим факторам.

Изложенная теория с успехом применима, в частности, для интерпретации своеобразного кинетического поведения лактатдегидрогеназы [64].

Неравновесные свойства ферментов весьма существенны. В работе Марковича и Крапивинского [110] были обнаружены медленные конформационные изменения фермента, продолжающиеся до 20—30 мин. Такovy конформационные изменения окружения SH-групп активного центра D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) в присутствии ингибитора — АТФ. Эти изменения проявляются в дифференциальных спектрах поглощения и в спектрах кругового дихроизма, в полосе поглощения специфических флуоресцентных меток. Предполагается, что малая скорость перестроек активного центра, индуцированных АТФ, объясняется их сопряжением с перестройками контактных площадок между субъединицами (ГАФД — тетрамер) и с последующими изменениями расположения субъединиц. В компактной тетрамерной структуре последние изменения невозможны из-за стерических ограничений. Конформационный переход реализуется на промежуточной стадии димера или «рыхлого» тетрамера с подвижными контактами субъединиц. Медленность перехода обусловлена низкой константой скорости диссоциации тетрамера. После перехода, вызванного АТФ, происходит ассоциация промежуточных форм, причем образуется тетрамер с иным расположением субъединиц. Эти представления подтверждаются исследованиями миграции энергии электронного возбуждения между хромофорами, расположенными на различных субъединицах. В последующих работах [111, 112] было проведено детальное изучение кинетики ферментативных реакций ГАФД, кинетики связывания ферментом АТФ и кофермента (НАД), подтвердившее изложенные представления и раскрывшее природу кооперативных свойств фермента, определяемых его четвертичной структурой и неравновесным состоянием.

Возможность весьма медленных конформационных перестроек фермента непосредственно свидетельствует о необходимости учета неравновесности и нелинейности ферментативных процессов в такого рода случаях.

Рассмотренное в данном параграфе нелинейное поведение ферментов не является организованным во времени — система

не может выполнять незатухающие колебания, если в ней нет автокаталитических стадий, обратных связей.

Мы видим, однако, что отдаленность от равновесия приводит к разнообразным видам регулируемого поведения биохимических систем. Можно думать, что эти возможности реализуются, в частности, в сопрягающих мембранах (см. гл. 6 и 7).

§ 8.7. АВТОКОЛЕБАНИЯ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

Нелинейности в кинетике биохимических, ферментативных, процессов проявляются в ряде случаев в наблюдаемой их периодичности. Происхождение колебаний в биохимических системах в целом понятно — они определяются автокаталитической системой реакций и в этом общем смысле моделируются периодическими реакциями в неживой природе. Таковы процессы, изученные Жаботинским и описанные в § 8.5, периодические окислительные реакции, теория которых развита Франк-Каменецким [65], и т. д. Общие обзоры, посвященные биохимическим колебаниям, содержатся в сборнике [66] (см. также статью Селькова [67] и монографию Жаботинского [19]).

Особенно четко периодичность биохимических процессов проявляется в реакциях гликолиза (анаэробного превращения шестичленных сахаров в трикарбоновые кислоты), сопровождающегося синтезом АТФ [68, 69]. Упрощенная схема процесса показана на рис. 8.29 [68]. В опытах Чанса, Гесса и сотрудников были обнаружены сначала затухающие концентрационные колебания в гликолизе [70—72], затем были найдены условия возникновения незатухающих автоколебаний [73—75]. На рис. 8.30 показаны колебания концентрации одного из продуктов реакции гликолиза — НАД-Н [73], примечательные своим почти синусоидальным характером.

Реакция гликолиза реализуется в сложной полиферментной системе. Возможности возникновения автоколебаний в таких системах были исследованы Сельковым ([67, 76—82], см. также [19]).

Проведем рассмотрение этой проблемы, следуя работе [79]. Химические процессы, подчиняющиеся закону действия масс, как правило, нелинейны. Нелинейны взаимодействия элементов полиферментной системы и взаимодействия таких систем друг с другом. В результате возникают регуляторные системы, так как их устойчивость непосредственно связана с нелинейностью. Сельков выделяет ключевые этапы в полиферментной системе, характеризующиеся наиболее сильной нелинейностью и ответственные за регуляцию процесса. Эта основная нелинейность проявляется в гистерезисной зависимости квазистационарной скорости