

окружающей водной структуры. Компенсационный эффект может быть важен для теплокровных организмов. Малость изменений  $\Delta G$  и  $G^+$  вследствие компенсации означает малую чувствительность ферментативных процессов к температурным изменениям в окружающей среде.

Однако значения  $G^+$ ,  $H^+$  и  $S^+$  для ферментативных реакций условны. Кинетические измерения можно вести лишь в узком температурном интервале. Активационные параметры сильно зависят от ионного состава среды, от pH и т. д. При этом уравнение Аррениуса может не выполняться, так как глобула испытывает структурные перестройки, зависящие от температуры. Указанная интерпретация компенсационного эффекта может оказаться иллюзорной. Эти вопросы остаются пока открытыми.

Существенная зависимость ферментативной активности от pH среды определяется полиэлектролитной природой фермента. Ферментативная активность, характеризуемая, в частности, константой  $k_2$ , зависит от pH колоколообразно —  $k_2$  имеет максимум при некотором значении pH и убывает при уменьшении или увеличении pH. Предложен ряд теоретических моделей, объясняющих в общих чертах такую зависимость. Подлинная теория требует, однако, более подробных сведений о ферментах, чем нам пока известны.

### § 6.3. Химические аспекты действия ферментов

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

Молекулярной активностью или *числом оборотов* фермента называется число молей субстрата, превращаемых в одну минуту одним молем фермента при значительном избытке субстрата,  $S \gg E$ . Свойства ферментов изучаются *in vitro*. Многие ферменты получены в кристаллической форме.

Субстраты — малые молекулы или малые группы больших молекул. Напротив, фермент макромолекулярен. Следовательно, 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. с. 48), входящих в его состав, установлена для ряда ферментов. Мы уже упоминали о фермент-субстратном узнавании (с. 58). Изменения активности, возникающие в результате химической модификации белка, позволяяют выявить функциональные группы активного центра. Сведения о его структуре дают оптические и спектральные методы, а также рентгеноструктурный анализ комплексов фермента с конкурентными ингибиторами, строение которых близко к строению субстратов.

Разнообразие аминокислотных остатков фермента и атомных групп кофактора определяет полифункциональность активного центра — его способность связывать субстрат и каталитическую активность. Ферментативная реакция многостадийна, протекает через ряд химических превращений. Так, у *эстераз* в активном центре присутствует Сер, подвергающийся ацилированию на

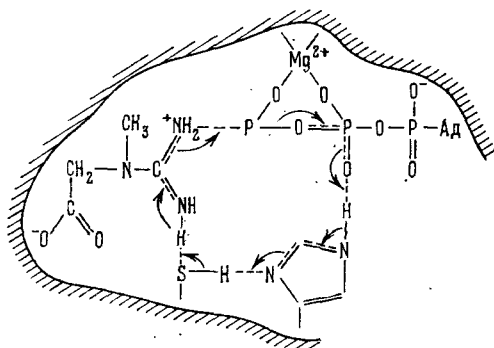
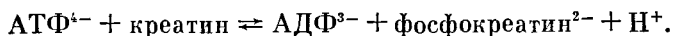


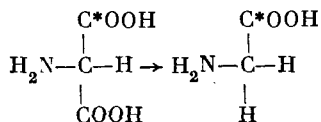
Рис. 6.5. Схема действия креатинкиназы. Переходные состояния

промежуточной стадии процесса. На субстрат действуют согласованно различные группы активного центра. Приведем пример *креатинкиназы*, катализирующей реакцию



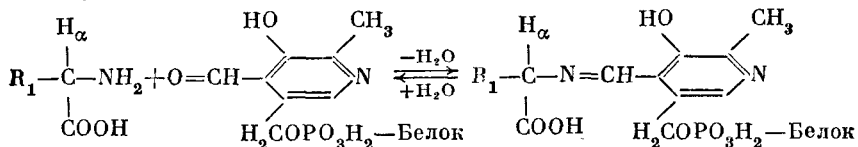
На рис. 6.5 изображена схема переходного состояния для этой реакции. Кофактором служит ион  $\text{Mg}^{2+}$ . Особенно важную роль в активном центре играет SH-группа. Фермент инактивируется йодацетамидом и йодацетатом. В присутствии  $\text{Mg}^{2+}$  и обоих субстратов SH-группа защищена от действия блокирующих агентов. По-видимому, SH-группа 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. На рис. 6.5 показаны сдвиги электронов в субстратах и группах активного центра.

При образовании ФСК существенна точная взаимная ориентация функциональных групп фермента и субстрата или модификатора. Активный центр, естественно, хирален и, тем самым, стереоспецифичен. С помощью меченых атомов установлено, что реакции молекул типа СААВD происходят на поверхности фермента асимметрично. Это относится, например, к превращению аминомалоновой кислоты в глицин

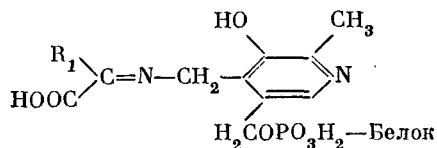


Здесь С\* — меченый атом углерода. В реакцию вступает только одна группа COOH, химически и геометрически неотличимая от другой. Это объясняется асимметрией активного центра. Так как группы фермента, связывающиеся с карбоксилатами, различны, то неодинаковы и реакции карбоксилатов. Ферменты хорошо различают стереоизомеры, и оптический антипод данного субстрата субстратом уже не является.

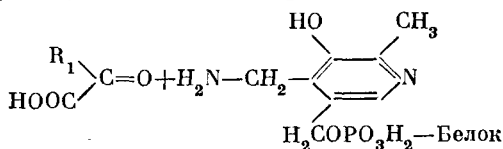
Прямое рентгенографическое исследование комплексов *лизоцима* с ингибирующими аналогами субстратов — полисахаридов — показало, что лиганд внедряется в полость, существующую в глобуле лизоцима, и контактирует с несколькими функциональными группами фермента (Филлипс). Структура такого комплекса показана на рис. 6.6. Внедрение субстрата установлено и для других систем. Для ряда ферментов подробно изучена последовательность химических превращений, т. е. стадий реакции, протекающей в активном центре ФСК. Так, Браунштейн и его сотрудники исследовали химию *аспартат-амиотрансферазы* (ААТ). Этот фермент содержит *пиридоксальфосфат* (ПАЛФ) в качестве кофермента. ПАЛФ, присоединенный к белку, реагирует с субстратом — аминокислотой — химически, образуя *альдимин* (*шиффово основание*)



Атом H<sub>α</sub> легко диссоциирует в альдимине. При реакциях переаминования альдимин таутомеризуется в кетимин



который гидролизуетс водой с образованием кетокислоты



Возникает пиридоксаминная форма фермента, реагирующая с другой кетокислотой, содержащей R<sub>2</sub> вместо R<sub>1</sub>, причем регенерируется исходный фермент и получается новая аминокислота R<sub>2</sub>CH(COOH)NH<sub>2</sub>. Такова схема реакции *трансаминирования* — переноса аминогруппы.

Практически все реакции, катализируемые ферментами, могут протекать и без ферментов, но с гораздо меньшей скоростью.

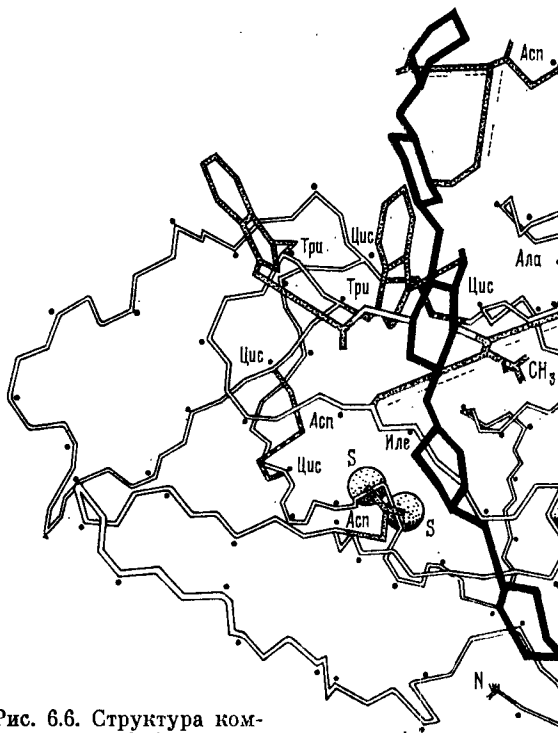
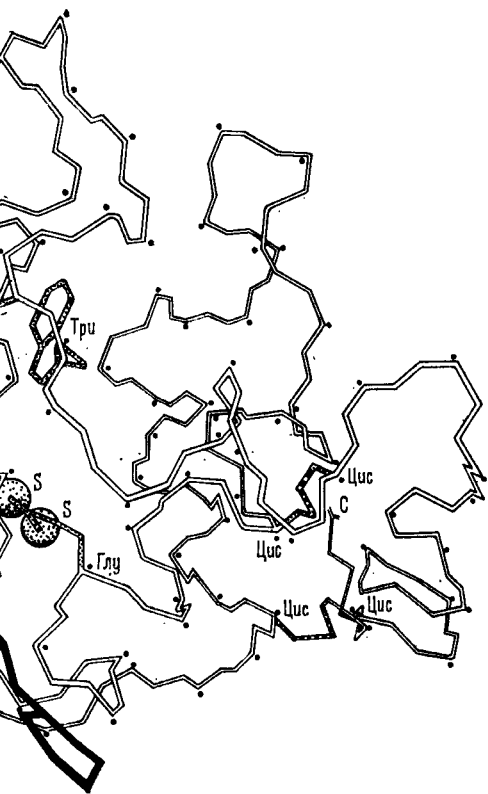


Рис. 6.6. Структура комплекса с  $\beta$ -N-ацеталь-глюкозамином (последний зачернен)



Поэтому можно моделировать стадии ферментативного процесса в низкомолекулярных «конгруэнтных системах».

Такая модель для реакции, катализируемой ААТ, была построена Ивановым и Карпейским. Первая стадия процесса состоит в слабом связывании аминокислоты активным центром. Вторая стадия — нуклеофильное присоединение аминогруппы субстрата

к связи  $N=C$  альдимины. Акцептором протона  $NH_2$ -группы

здесь является отрицательно заряженная фенольная группа кофермента. Таким образом, неионизованная нуклеофильная аминогруппа оказывается рядом с высокореактивной катионной формой кофермента. С помощью пространственных молекулярных моделей построена структура альдиминной формы ФСК. Далее происходят уже указанные превращения, причем в некоторых стадиях реализуются конформационные движения — повороты коферментного цикла. Схема последовательных событий в активном центре ААТ показана на рис. 6.7, повороты кофермента отмечены круговой стрелкой. Многоочечное связывание в активном центре является причиной стабилизации активной электронной конфигурации, термодинамически невыгодной в растворе, и причиной надлежащей ориентации взаимодействующих групп. В каждой стадии процесса происходит структурная перестройка, обеспечивающая оптимальность последующей стадии. На языке термодинамики это означает, что в активном центре происходит выравнивание уровней свободной энергии промежуточных соединений. Действительно, в спектре поглощения ФСК содержатся полосы поглощения всех важнейших промежуточных соединений реакции, в то время как в соответствующей конгруэнтной системе наблюдается лишь одна полоса 330 нм.

Мы остановились на этих примерах, чтобы показать возможности расшифровки взаимодействий между активным центром фермента и лигандами. Химия выявляет поведение функциональных групп фермента и кофакторов. Однако этого недостаточно для количественного объяснения ферментативной активности, характеризующейся понижением энергии активации. Для ферментативного катализа необходима вся белковая глобула. Нельзя отрезать часть белковой цепи без ущерба для активности фермента. Химия не отвечает на вопрос о роли глобулярной структуры, описывая лишь события в активном центре. Эти задачи стоят перед физикой.

Суммируя результаты химических исследований ферментов, Браунштейн указал качественные факторы, ответственные за их действие.

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

2. Строгая взаимная ориентация реагентов, кофакторов и активного центра (*эффект ориентации*). В обычных гомогенных

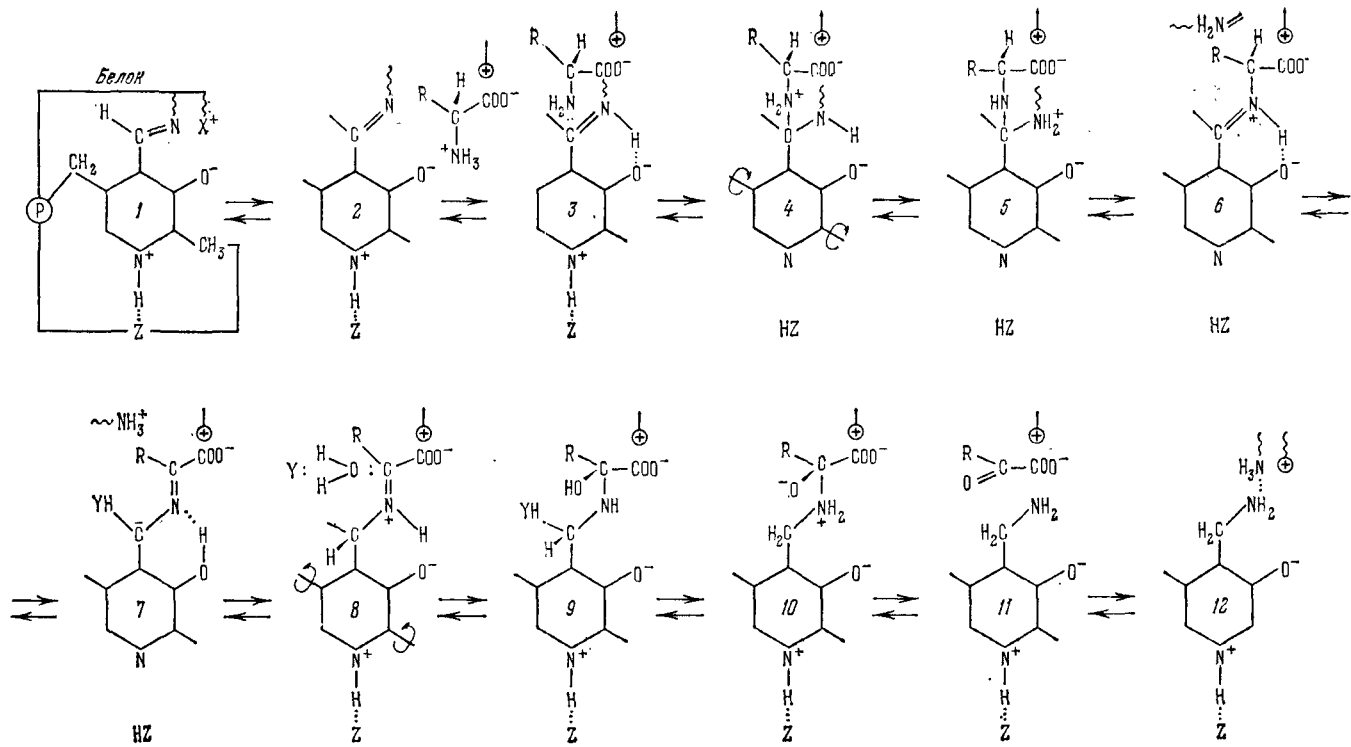
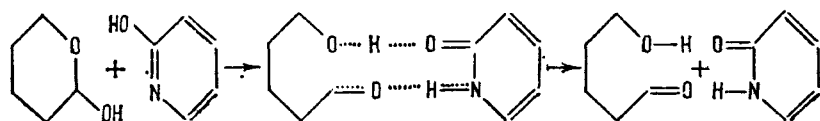


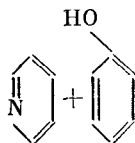
Рис. 6.7. Схема последовательных событий в активном центре ААТ

реакциях вероятность строгой взаимной ориентации трех или большего числа взаимодействующих молекул очень мала.

3. Воздействие на субстрат нуклеофильных и электрофильных групп активного центра (*эффект синхронного кислотно-основного катализа*). Поясним этот эффект на модели. Оксипиридин катализирует *мутаротацию* глюкозы, разрывая ее шестичленное кольцо и испытывая таутомерное превращение:



Такая же реакция с участием смеси пиридина и фенола



протекает в 7000 раз медленнее. Кооперация кислотных и основных групп, их совместное действие резко ускоряют реакцию.

Т а б л и ц а 6.1. Сравнение скоростей ферментативных реакций со скоростями неферментативных аналогов

Фермент	Неферментативный аналог	Скорость ферментативного процесса $v$ , $\text{с}^{-1}$	Скорость неферментативного процесса $v_0$ , $\text{с}^{-1}$	$\frac{v}{v_0}$
Лизоцим	Гидролиз ацеталля, основной катализ	$5 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^8$
Химотрипсин	Гидролиз амида, основной катализ	$4 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^3$
$\beta$ -амилаза	Гидролиз ацеталля, основной катализ	$1 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^6$
Фумараза	Гидрирование алкена, кислотный и основной катализ	$5 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^6$

Скорости неферментативных реакций умножены здесь на коэффициент, отвечающий эффекту сближения. Для двух молекул, имеющих размеры молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ , этот множитель равен 55, т. е. равен молярной концентрации воды.

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

5. Изменение конформаций белка и субстрата в ФСК (*эффект индуцированного контакта*).



Физика должна рассмотреть эту картину количественно, вы- явив попутно, в какой мере возможно разделение указанных эф- фектов.

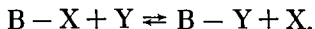
Приведем в заключение данные, характеризующие скорости ферментативных и аналогичных неферментативных процессов (табл. 6.1).

#### § 6.4. Конформационные свойства ферментов

Для понимания ферментативной активности необходимо рас- смотреть конформационное поведение макромолекулы белка. Конформационная лабильность белка обеспечивает возможность его специфического взаимодействия с субстратами и другими лигандами. В некоторых конформациях белок более эффективно связывает субстрат. Одновременно происходит отбор конформа- ций субстрата. В ФСК отбираются те конформации белка и суб- страта, которые находятся в *структурном соответствии* друг с другом, обеспечивающем оптимальное значение свободной энер- гии взаимодействия. При образовании ФСК происходит взаим- ная «подгонка» конформаций белка и субстрата, т. е. их специ- фический отбор. Посредством конформационных превращений реализуется структурное соответствие фермента и субстрата.

Конформационные эффекты определяют значительные изме- нения энтропии при образовании ФСК. Понижение энтропии при отборе определенной конформации может компенсироваться понижением энтальпии. Физический анализ событий такого ти- па требует учета явлений в окружающей водной среде.

В свое время Фишер предложил *модель «ключ — замок»* для рассмотрения фермент-субстратного взаимодействия. Фермент и субстрат обладают жесткими структурами, причем фермент «по- догнан» к субстрату как замок к ключу. Ряд фактов противор- ечит такой модели — взаимодействие фермента с субстратом имеет, по-видимому, не статический, а динамический характер. Кошланд предложил модельную теорию *индуцированного струк- турного соответствия* фермента и субстрата. Перечислим исход- ные положения этой теории, задачи которой состояли прежде всего в объяснении специфичности ферментов, катализирующих реакции переноса связи



1. Субстрат вызывает изменение геометрии фермента при своем проникновении в активный центр.

2. Для ферментативного действия необходима надлежащая взаимная ориентация каталитических групп.

3. Субстрат индуцирует такую ориентацию изменениями, ко- торые он вызывает в геометрии фермента.

Конечно, эта теория охватывает и те случаи, в которых из- меняется конформация субстрата, а не фермента, или изменя- ются конформации и того, и другого. Основная идея теории со-