

ческих уровней различных промежуточных форм и понижение активационных барьеров. В этом и проявляется комплементарность профилей химической (электронной) и конформационной свободных энергий (с. 196). Комплементарность определяется ЭКВ.

К проблеме ЭКВ эффективно применяются качественные методы квантовой химии, позволяющие наглядно представить электронную оболочку субстрата, находящегося под возмущающим действием групп активного центра. В физике ферментов сейчас особенно существенны обоснованные качественные модели, позволяющие понять смысл наблюдаемых явлений и оценить порядки величин характерных параметров.

§ 6.7. Кооперативные свойства ферментов

Стационарная кинетика ферментативных реакций зачастую отличается от кинетики Михаэлиса — Ментен (с. 178). На кривой зависимости скорости реакции v от концентрации субстрата S или (и) концентрации модификатора наблюдаются перегибы, максимумы, плато. На рис. 6.13 для примера показана кривая

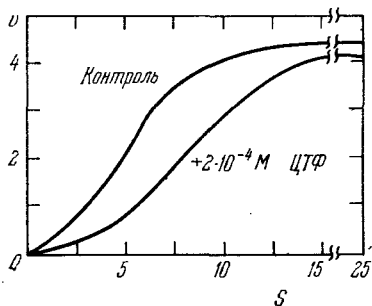


Рис. 6.13. Кривые $v(S)$ для аспарат-транс-карбамиллазы. По оси абсцисс — концентрация аспартата в 10^{-3} моль/л

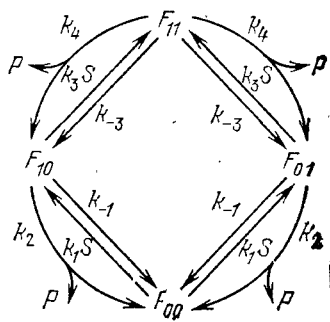


Рис. 6.14. Схема реакции с ферментом, состоящим из двух тождественных субъединиц

$v(S)$ для аспарат-транскарбамиллазы (S — аспарат) в отсутствие и в присутствии модификатора — ЦТФ. В первом случае кривая имеет S-образную, а не гиперболическую форму.

Как правило, эти особенности объясняются наличием у фермента четвертичной структуры и взаимодействием субъединиц. Тем самым, поведение фермента кооперативно — средство к субстрату и каталитическая активность данной субъединицы (промера) зависят от того, в каких состояниях находятся остальные субъединицы — связали они субстрат или нет.

Рассмотрим простую модель молекулы фермента, состоящей из двух взаимодействующих тождественных субъединиц. Каждая субъединица имеет активный центр. Схема стационарного

процесса показана на рис. 6.14. Молекула фермента может существовать в трех состояниях: F_{00} (оба центра свободны), $F_{01} = F_{10}$ (один центр занят субстратом, другой свободен) и F_{11} (оба центра заняты субстратом). Уравнения стационарной кинетики имеют вид (ср. рис. 6.14)

$$\begin{aligned} \dot{F}_{00} &= -2k_1SF_{00} + 2(k_{-1} + k_2)F_{10} = 0, \\ 2\dot{F}_{10} &= 2k_1SF_{00} - 2(k_{-1} + k_2 + k_3S)F_{10} + 2(k_{-3} + k_4)F_{11} = 0, \\ \dot{F}_{11} &= 2k_3SF_{10} - 2(k_{-3} + k_4)F_{11} = 0, \end{aligned} \quad (6.49)$$

причем

$$F_{00} + 2F_{10} + F_{11} = E = \text{const.} \quad (6.50)$$

Скорость образования продукта, согласно рис. 6.14, равна

$$v = 2k_2F_{10} + 2k_4F_{11}. \quad (6.51)$$

При помощи уравнений (6.49) и (6.50) находим

$$v = 2k_2ES \frac{\alpha S + \beta K}{S^2 + 2\beta KS + \beta K^2} \quad (6.52)$$

где $\alpha = k_1/k_2$, $\beta = K'/K$, $K = (k_{-1} + k_2)/k_1$, $K' = (k_{-3} + k_4)/k_3$.

Кооперативность, т. е. взаимодействие двух активных центров, выражается отличием α и (или) β от единицы. Действительно, при условии $\alpha = \beta = 1$

$$v = 2k_2ES \frac{K + S}{(K + S)^2} = \frac{v_{\max}S}{K + S} \quad (6.53)$$

т. е. кинетика совпадает с кинетикой Михаэлиса — Ментен. Напротив, если это условие не выполнено, то на кривой $v(S)$ возможно появление точки перегиба, максимума или и того, и другого. Анализ формулы (6.52) показывает, что точки перегиба возможны при следующих условиях:

- при $\alpha < 0,5$ и любых β ,
- при $1 > \alpha > 0,5$ и $\alpha/(2\alpha - 1) > \beta > \alpha^2/(2\alpha - 1)$,
- при $\alpha > 1$ и $\alpha^2/(2\alpha - 1) > \beta > \alpha/(2\alpha - 1)$.

Максимум возможен лишь при $\alpha < 0,5$ и любых β .

Приведенная модель выражает *прямую кооперативность* — константы скоростей для состояний системы, в которых субстратом заняты один или два центра, различны.

Равновесная функция \bar{Y} насыщения фермента субстратом для рассмотренной двухцентральной модели выражается так:

$$\bar{Y} = \frac{2F_{10} + 2F_{11}}{2(F_{00} + 2F_{10} + F_{11})} = \frac{S^2 + \beta KS}{S^2 + 2\beta KS + \beta K^2}. \quad (6.54)$$

Выражение $\bar{Y}(S)$ обращается в формулу изотермы адсорбции Ленгмюра при $\beta = 1$. При $\beta \neq 1$ кривая $\bar{Y}(S)$ может иметь перегиб, но не максимум.

Таким образом, наличие особенностей на кривых $v(S)$, $\bar{Y}(S)$ в стационарных (соответственно, равновесных) условиях указывает на кооперативность. Отсутствие таких особенностей еще не означает, что кооперативности нет.

Другая модель — модель косвенной кооперативности — была предложена Моно, Уайменом и Шанжэ (модель МУШ). Молекула белка моделируется олигомером, состоящим из двух или

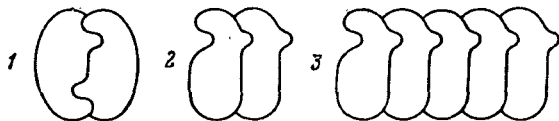


Рис. 6.15. Возможные структуры изологичного (1) и гетерологичного (2) димеров и гетерологичного полимера (3)

большого числа идентичных субъединиц — протомеров, занимающих эквивалентные пространственные положения. Тем самым, молекула обладает определенной симметрией. Она может быть построена изологично или гетерологично; в последнем случае возможна и большая длина олигомера (рис. 6.15). Каждому лиганду (субстрату или модификатору) отвечает один активный центр протомера.

Предполагается, что олигомер как целое может находиться в двух или нескольких конформационных состояниях. Средство к лиганду меняется при изменении состояния олигомера. Такая система кооперативна. Без ограничения общности рассмотрим димер, который может находиться в двух состояниях, обозначаемых R и T . В каждом из этих состояний димер способен присоединить 0, 1 или 2 молекулы лиганда S . Следовательно, число различных состояний димера равно шести: R_{00} , $R_{10} = R_{01}$, R_{11} , T_{00} , $T_{10} = T_{01}$, T_{11} . Условия равновесия имеют вид

$$\begin{aligned} T_{00} &= LR_{00}, \\ R_{10} &= 2R_{00}S/K_R, \quad R_{11} = \frac{1}{2}R_{10}S/K_R = R_{00}S^2/K_R^2, \\ T_{10} &= 2T_{00}S/K_T, \quad T_{11} = \frac{1}{2}T_{10}S/K_T = T_{00}S^2/K_T^2. \end{aligned} \quad (6.55)$$

Здесь K_R и K_T — константы диссоциации для S в состояниях R и T , L — константа равновесия для перехода $R \rightleftharpoons T$ в отсутствие S . Общая концентрация фермента постоянна:

$$R_{00} + R_{10} + R_{11} + T_{00} + T_{10} + T_{11} = E. \quad (6.56)$$

Функция насыщения фермента субстратом имеет вид

$$\begin{aligned} \bar{Y} &= \frac{R_{10} + 2R_{11} + T_{10} + 2T_{11}}{2(R_{00} + R_{10} + R_{11} + T_{00} + T_{10} + T_{11})} = \\ &= \frac{K_R(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1}S + S^2}{K_R^2(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1} + 2K_R(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1}S + S^2}, \end{aligned} \quad (6.57)$$

где $g = K_R/K_T$. Кривая $\bar{Y}(S)$ имеет перегиб. При $g=1$ или при L , стремящемся к нулю или бесконечности, кооперативность исчезает и последнее соотношение вновь обращается в выражение для изотермы Ленгмюра

$$\bar{Y} = \frac{S}{K_R + S}. \quad (6.58)$$

Соответствующее выражение для скорости реакции превращения субстрата, полученное из условий равновесия, имеет вид

$$v = 2Ek \frac{1 + \kappa Lg^2}{1 + Lg^2} \frac{K_R (1 + \kappa Lg) (1 + \kappa Lg^2)^{-1} S + S^2}{K_R^2 (1 + Lg) (1 + Lg^2)^{-1} + 2K_R (1 + Lg) (1 + Lg^2)^{-1} S + S^2}, \quad (6.59)$$

где k — константа скорости для состояний R_{10} и R_{11} , а κk — для состояний T_{10} и T_{11} .

Кооперативность в модели МУШ косвенная, так как присоединение лиганда вызывает сдвиг равновесия конформаций. При обобщении уравнения (6.57) на систему с n протомерами получаем

$$\bar{Y} = \frac{Lg x (1 + gx)^{n-1} + x (1 + x)^{n-1}}{L (1 + gx)^n + (1 + x)^n}, \quad (6.60)$$

где $x = S/K_R$.

При $g \ll 1$ и не слишком больших L и κ формулы (6.57) и (6.59) для димера принимают вид

$$\bar{Y} \approx x \frac{1 + x}{L + (1 + x)^2}, \quad (6.61)$$

$$v \approx 2kx \frac{1 + x}{L + (1 + x)^2}. \quad (6.62)$$

Допустим, что наряду с субстратом S на димер действуют ингибитор I и активатор A и каждый из двух протомеров содержит по три активных центра — по одному для S , I и A . Считая для простоты, что димер присоединяет I только в T -состоянии и A — только в R -состоянии, получаем при $g \ll 1$ функцию насыщения фермента субстратом

$$\bar{Y} \approx x \frac{1 + x}{L' + (1 + x)^2}, \quad (6.63)$$

где $L' = L(1 + I/K_I)^2 (1 + A/K_A)^{-2}$. Ингибитор повышает косвенную кооперативность, активатор ее уменьшает.

Если кооперативность положительна, т. е. присоединение лиганда активирует фермент, модели прямой и косвенной кооперативности могут приводить к эквивалентным результатам. Однако, в отличие от модели МУШ, модель прямой кооперативности может описывать и отрицательную кооперативность, т. е. уменьшение сродства к лиганду по мере насыщения активных центров (Кошланд).

Умбаргер в 1956 г. обнаружил существование последовательных ферментативных реакций, в которых конечный метаболит влияет на активность фермента, катализирующего первую реакцию последовательности. Сейчас известно множество таких систем, называемых *аллостерическими* («инопространственными» по-гречески). В частности, установлены случаи ингибирования,

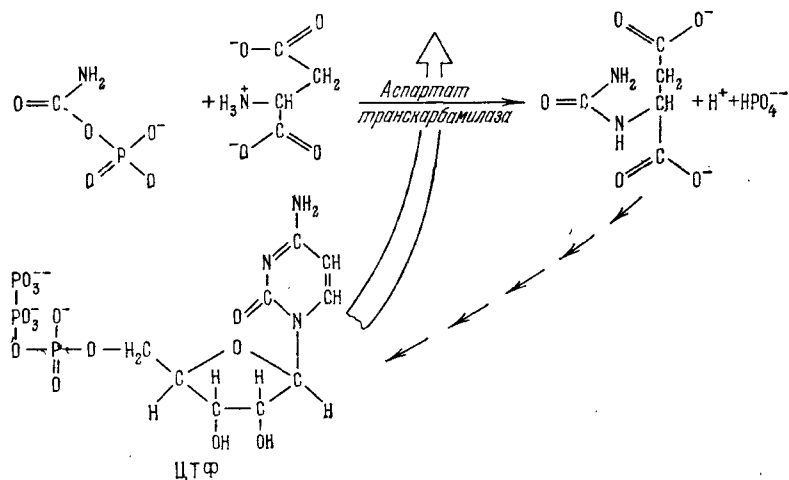


Рис. 6.16. Схема аллостерической обратной связи

кинетики которого сходна с кинетикой конкурентного ингибирования, хотя структура аллостерического ингибитора отлична от структуры субстрата. Так, аспартат-транскарбамилаза (АТК) является ферментом, катализирующим первое звено в цепи превращений, ведущих к синтезу ЦТФ. Этот конечный продукт цепи ингибирует АТК (рис. 6.16). Очевидна целесообразность такой системы.

Если конечный метаболит немедленно потребляется в последующих реакциях, то вся система работает. Однако, если возникает избыток конечного метаболита, то он прекращает работу всей системы.

Аллостеризм — важное явление, обеспечивающее регуляцию действия ферментов на молекулярном уровне. Наличие регуляции биохимических процессов означает существование каналов прямой и обратной связи, по которым передается надлежащая информация. Передача информации в клетке есть передача химических сигналов, т. е. молекул и ионов. В клетке функционируют вещества, реактивность которых определяется воздействием на них молекулярных сигналов. Поскольку источником таких сигналов служат ферменты, именно они подлежат влиянию химических обратных связей. Можно прийти к логическому выводу о существовании регуляторных ферментных систем. Уже говорилось, что фермент можно рассматривать как преобразова-

тель сигналов: входной сигнал, т. е. субстрат, преобразуется в выходной сигнал, т. е. продукт. Если выходной сигнал влияет на работу преобразователя, то реализуется обратная связь, положительная или отрицательная, в зависимости от того, активизирует или ингибирует конечный продукт функцию фермента.

Исследование аллостерических ферментов (АСФ) показало, что они обладают четвертичной структурой и кооперативностью. Об этом свидетельствует кривая $v(S)$ для аспаргат-транскарбамилазы, показанная на рис. 6.13. ЦТФ, в присутствии которого исчезает S-образность кривой, является аллостерическим ингибитором. Другой пример АСФ — треоиндезаминаза. Кинетику превращения треоина этим ферментом можно представить формулой

$$\lg \frac{v}{v_{\max} - v} = n \lg S - \lg K, \quad (6.64)$$

а кинетику аллостерического ингибирования — формулой

$$\lg \frac{v}{v_0 - v} = \lg K' - n' \lg I. \quad (6.65)$$

Здесь v — стационарная скорость, v_{\max} — максимальная скорость, v_0 — скорость при $I=0$, K и K' — константы. Для кинетики Михаэлиса — Ментен должно быть $n = n' = 1$. Шанжé нашел $n = 1,37$, $n' = 1,86$. Эти результаты без труда объясняются кооперативностью — взаимодействием субъединиц. В следующем разделе сходные явления будут разобраны на примере гемоглобина. Установлено, что каждая субъединица АСФ имеет активный центр для субстрата и другой активный центр — для аллостерического эффектора. Наблюдаются и более сложные случаи.

Наличие четвертичной структуры у АСФ определяет возможность их диссоциации на субъединицы под действием субстратов и аллостерических эффекторов. Происходит смещение равновесия между олигомерными формами АСФ. Это также проявляется в кинетике.

Особенности на кривых $v(S)$, $v(I)$ могут возникать и в отсутствие кооперативных взаимодействий вследствие неравновесных конформационных свойств фермента. Допустим, что молекула фермента, переработавшая субстрат в продукт, выходит из реакции в активном конформационном состоянии. Если время релаксации, т. е. время возвращения в исходное невозмущенное состояние, больше времени между встречами фермента с субстратом или того же порядка, то кинетика может имитировать кооперативную. Схема такого процесса показана на рис. 6.17. Здесь F_0 — свободная от субстрата молекула фермента в исходной конформации, F_1 — неактивный ФСК, F_2 — активный ФСК, F_3 — свободный фермент в активной конформации. Решая соответствующие уравнения стационарной кинетики, получаем скорость реакции

$$v = \frac{AS^2 + BS}{CS^2 + DS + K^2} \quad (6.66)$$

где A, B, C, D, K — комбинации кинетических констант. Выражение (6.60) сходно с (6.59), несмотря на отсутствие кооперативных взаимодействий. Особенности на кривой $v(S)$ исчезают, если $k_3 = 0$ или $k_5 = 0$. Действительно, в некоторых случаях наблюдались очень большие времена конформационных перестроек ферментов — порядка минут и даже десятков минут. Такие особенности на кривых $v(S)$, как промежуточные плато, по-видимому, объясняются неравновесностью ферментативных систем. Однако большей частью наличие перегибов и даже максимумов объясняется взаимодействием субъединиц в белке, обладающем четвертичной структурой (см. § 6.8).

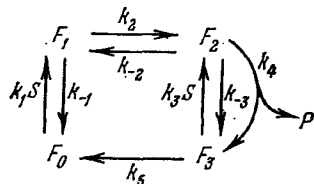


Рис. 6.17. Схема реакции по Рабину

Мы рассматривали здесь лишь сравнительно простые ферментативные процессы. В более сложных случаях расчеты даже в условиях стационарности становятся громоздкими — приходится решать совместно большое число уравнений. Для этих задач разработаны алгоритмы, в частности, основанные на теории графов (Гольдштейн, Волькенштейн). Графом в математике называется топологическая схема, построенная из узловых точек и линий, их соединяющих. В сущности, схемы на рис. 6.14, 6.17 являются графами. Такого рода алгоритмы позволяют получать аналитические выражения для скоростей реакций, не решая кинетических уравнений.

Следует подчеркнуть, что в сколько-нибудь сложных случаях число констант скоростей настолько велико, что они не могут быть установлены на основе экспериментов, проводимых в стационарных условиях. Нестационарная ферментативная кинетика и, тем самым, механизм действия ферментов эффективно изучаются методами химической релаксации, развитыми Эйгеном. Система выводится из равновесного или стационарного состояния быстрым изменением внешнего параметра и изучается кинетика ее приближения к новому равновесному или стационарному состоянию. Чаще всего пользуются скачком концентрации или температуры, воздействием ультразвука и др. Доступны измерению времена релаксации вплоть до 10^{-10} с.

Рассмотрим простейшую одностадийную реакцию (S — лиганд)

$$F_0 + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} F_1. \text{ Кинетическое уравнение имеет вид}$$

$$\dot{F}_0 = -k_1 S + k_{-1} F_1. \quad (6.67)$$

Имеем отклонения от стационарных концентраций F_0, S, F_1 : $F_0 = \bar{F}_0 + x_0$, $F_1 = \bar{F}_1 + x_1$, $S = \bar{S} + y$. Уравнение (6.67) дает

$$\dot{x}_0 = -k_1 \bar{F}_0 y - k_1 S x_0 - k_1 x_0 y + k_{-1} x_1. \quad (6.68)$$

При малом возмущении пренебрегаем $k_1 x_0 y$. Из закона сохранения массы следует, что $x_0 = -x_1 = y$. Следовательно,

$$\dot{y} = -(k_1 \bar{F}_0 + k_1 \bar{S} + k_{-1}) y \quad (6.69)$$

или

$$\dot{y} + \tau^{-1}y = 0, \quad (6.70)$$

где $\tau^{-1} = k_1\bar{F}_0 + k_1\bar{S} + k_1$. Решение (6.67) имеет вид

$$y = y(0)e^{-t/\tau}. \quad (6.71)$$

Значение y в момент $t = 0$ обозначено $y(0)$. Измерение τ при разных концентрациях \bar{F}_0 и \bar{S} позволяет определить k_1 и k_{-1} .

Мы воспользовались здесь обычным приемом линеаризации нелинейного уравнения (см. § 15.2).

§ 6.8. Миоглобин и гемоглобин

Гемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb) — не ферменты. Их функция состоит в обратимом связывании молекулярного кислорода O_2 . Миоглобин служит депо кислорода, запаса его для последующего потребления. Поэтому большие количества Mb содержатся в организмах китообразных, проводящих длительное время под водой. Гемоглобин — функциональный белок эритроцитов, служащий для переноса кислорода от легких ко всем органам и тканям и участвующий в обратном транспорте углекислоты.

Исследование Mb и Hb дает, однако, информацию, весьма ценную для понимания свойств обычных и аллостерических ферментов, для понимания электронно-конформационных взаимодействий. Связывание O_2 и других лигандов этими белками вполне сходно со связыванием субстрата ферментом. Молекулярный кислород проникает в полость молекул Mb и Hb, но, в отличие от субстрата, не подвергается химическому превращению. Иногда Mb и Hb называют «почетными ферментами».

Миоглобин и гемоглобин получают в кристаллической форме. Оба белка детально изучены методом рентгеноструктурного анализа с разрешением до 0,28 нм, как в оксигенированной (MbO_2 , HbO_2), так и в дезоксигенированной форме (Mb, Hb). Наличие в Mb и Hb протетических групп *гема*, обладающего специфическими электронными свойствами, позволяет эффективно пользоваться при изучении Mb и Hb методами спектроскопии, ЭПР, а также магнитной восприимчивостью, эффектом Мёсбауэра (см. с. 139) и т. д.

Mb не имеет четвертичной структуры (с. 113), молекула Hb состоит из четырех субъединиц — двух единиц α и двух β , каждая из которых подобна, но не тождественна молекуле Mb. Соответственно Hb обладает, в отличие от Mb, кооперативными свойствами — в Hb реализуется так называемое *гем-гем-взаимодействие*.

Кислород и другие лиганды присоединяются к группе гема, насыщая шестую координационную валентность атома железа. Образование этой связи вызывает ряд событий в молекуле белка.

Гем представляет собой ферропротопорфирин (см. рис. 2.14). Атом Fe, находящийся в двухвалентном ферросостоянии (Fe^{2+}), координационно связан с четырьмя атомами азота пиррольных