## МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГАОУ ВО "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет"

Факультет естественных наук

Госкультет Тетественных

Наук

**УТВЕРЖДАЮ** 

Декан ФЕН НГУ, профессор

Резников В.А.

«<u>29</u>» <u>августа</u> 2014 г.

## ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Программа лекционного курса и самостоятельной работы студентов

Курс 4-й, VII семестр Учебно-методический комплекс

Новосибирск – 2014

Учебно-методический комплекс предназначен для студентов 4 курса факультета естественных наук, направление подготовки 020100 "Химия" (бакалавриат). В состав разработки включены: программа курса лекций, структура курса.

Составитель

Лаврик Ольга Ивановна

© Новосибирский государственный университет, 2014

## Содержание

Аннотация рабочей программы					
1. Цели освоения дисциплины	4				
2. Место дисциплины в структуре ООП	5				
3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины «Физическая химия биополимеров»	5				
4. Структура и содержание дисциплины	6				
Рабочий план	7				
Краткий курс лекций	8				
План семинаров	104				
Примеры вопросов к экзамену	104				
5. Образовательные технологии	105				
6. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины	106				
7. Материально-техническое обеспечение дисциплины	107				

### Аннотация рабочей программы

Дисциплина «Физическая химия биополимеров» относится к вариативной части профессионального (специального) цикла ООП по направлению подготовки «020100 ХИМИЯ» (квалификация (степень) бакалавр). Дисциплина реализуется на Факультете естественных наук Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Новосибирского государственного университета (НГУ) кафедрой молекулярной биологии.

Содержание дисциплины охватывает кинетические и физико-химические принципы ферментативного катализа, строения и функций ферментов.

Дисциплина предназначена для формирования у студентов химического мировоззрения, которое необходимо для освоения теоретических основ ферментативной кинетики и их применения для описания экспериментальных закономерностей ферментативных реакций, а также для понимания строения и функций ферментов и нацелена на формирование у выпускника общекультурной компетенции ОК-6, а также профессиональных компетенций: ПК-1, ПК-2, ПК-3.

Преподавание дисциплины предусматривает следующие формы организации учебного процесса: аудиторные занятия проводятся в виде лекций и семинарских занятий; самостоятельная работа студентов включает поиск информации, содержательную работу с ней, подготовку к семинарским занятиям и докладов на заданную тему.

Лекционные занятия строятся с преобладанием контекстных форм обучения – проблемная лекция, лекция в диалоговом режиме, чередование сложного теоретического материала с закреплением его в виде кратких тестов по теме; традиционная лекция.

Результатом прохождения дисциплины является итоговая оценка по пятибалльной шкале (экзамен).

Общая трудоемкость дисциплины "Физическая химия биополимеров" составляет 108 часов (3 зачетных единицы). Программой предусмотрены 32 лекционных часа, 16 часов семинаров, 16 часов на сдачу домашних заданий и экзамена, а также 44 часа самостоятельной работы студентов, включая подготовку домашних заданий. Формой текущего контроля при прохождении дисциплины «Биоорганическая химия» является контроль посещаемости занятий, сдача домашних заданий и доклады студентов на заданную тему.

#### 1. Цели освоения дисциплины

<u>Дисциплина «Физическая химия биополимеров» имеет своей целью</u> формирование у студентов профессиональных научно-исследовательских навыков по использованию современных биологических и химических знаний за счет теоретического и практического усвоения:

- теоретических основ, достижений и проблем современной науки о ферментах и их лиганлах:
- широкого спектра кинетических методов и подходов в биологической химии;
- структурных и функциональных особенностей ферментов и их лигандов и вытекающих из них физико-химических свойств для получения на их основе новых современных препаратов для лечения социально значимых заболеваний.

В рамках курса даются базовые знания по основным положениям ферментативного катализа. Это в первую очередь структурная организация ферментов, методы исследования специфических взаимодействий ферментов с лигандами, методы определения кинетических параметров.

Основной целью освоения дисциплины является получение и творческое освоение студентами систематизированных знаний, формирование умения анализа полученных структурных и экспериментальных данных для активного использования их в своей научно-исследовательской работе.

## 2 Место дисциплины в структуре ООП

Учебная дисциплина «Физическая химия биополимеров» относится к вариативной части профессионального (специального) цикла ООП по направлению подготовки «020100 ХИМИЯ» (квалификация (степень) бакалавр). Дисциплина опирается на следующие дисциплины данной ООП:

- Высшая алгебра;
- Математический анализ;
- Теория вероятностей и математическая статистика;
- Физика (электромагнитное излучение, кулоновское взаимодействие, дифракция);
- Неорганическая химия (строение и свойства атомов, периодический закон, строение молекул, теория химической связи, стереохимия);
- Физическая химия (природа химической связи в молекулах и кристаллах, химическая термодинамика, фазовые диаграммы);
- Органическая химия (классификация и номенклатура соединений, строение молекул, изомерия);
- Основы молекулярной биологии (структура и функции белков и нуклеиновых кислот, гены и геномы, самоорганизация живых систем, биотехнология, биология и медицина);
- Биохимия;
- Высокомолекулярные соединения.

Результаты освоения дисциплины «Физическая химия биополимеров» используются в следующих дисциплинах данной ООП:

- Научно-исследовательская практика;
- Итоговая государственная аттестация.

## 3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины «Физическая химия биополимеров»:

## • общекультурные компетенции:

• использует основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применяет методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования (ОК-6);

#### • профессиональные компетенции:

- понимает сущность и социальную значимость профессии, основных перспектив и проблем, определяющих конкретную область деятельности (ПК-1);
- владеет основами теории фундаментальных разделов химии (неорганической, аналитической, органической, физической, химии высокомолекулярных соединений, биохимии, химической технологии) (ПК-2);
- обладает способностью применять основные законы химии при обсуждении полученных результатов, в том числе с привлечением информационных баз данных (ПК-3).

#### В результате освоения дисциплины обучающийся должен:

• **иметь представление о** физико-химической сущности и механизмах процессов, происходящих в живых организмах; об актуальных направлениях современной

ферментативной кинетики, касающихся разработки подходов к созданию химических инструментов для изучения молекулярных механизмов функционирования клетки, геномных и постгеномных технологий создания новых лекарственных средств, систем их адресной доставки, разработки диагностикумов на социально значимые заболевания, развития технологий получения биосовместимых материалов для нужд трансляционной медицины;

- **знать** строение, структуру и свойства ферментов и их лигандов, методические аспекты анализа их взаимодействий и надмолекулярных комплексов; закономерности химического поведения на молекулярном и клеточном уровнях биологически важных молекул во взаимосвязи с их строением;
- уметь выстраивать логическую взаимосвязь между строением вещества, его свойствами и реакционной способностью; рассматривать процессы, протекающие в живом организме на молекулярном и клеточном уровне с позиции взаимосвязи структуры соединения с механизмом его биологического функционирования, т. е. устанавливать взаимосвязь структура-функция. В процессе изучения студент должен выработать умение и навыки самостоятельного отбора среди изобилия методов и подходов ферментативной кинетики для работы только те из них, которые наиболее всего подходят для решения конкретной задачи;

## 4. Структура и содержание дисциплины

Общая трудоемкость дисциплины составляет 3 зачетных единицы, всего 108 академических часов.

№	Разлеп лисциппины	Сем.	Нед.	Вид:	Формы текущего контроля успеваемости Форма промежуточной аттестации			
п/п				Лекции	Семи- нары	Самост. работа, включая подготовку доклада	Дом. зад., экза- мен	
1	Введение.	7	1	2				
	Структурная организация активных центров ферментов. Строение активных центров ферментов на примерах карбоксипептидазы, рибонуклеазы, химотрипсина	7	2,3	4		4		
3	Специфические взаимодействия биополимеров с лигандами	7	4	2	2	5	3	Сдача домашнего задания, включая доклад
	Стационарная кинетика ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса – Ментен	7	5	2	2			
	Ингибирование ферментативных реакций	7	6	2	2			
6	Механизмы аллостерической регуляции в ферментативном катализе	7	7	2	2	3	3	Сдача домашнего задания, включая доклад
7	Многосубстратные	7	8	2				

Итого			32	16	44	16	
					18	4	Экзамен
Вклад рентгеноструктурного анализа в изучение структуры и функции ферментов	7	16	2				
Механизмы специфического отбора субстратов	7	15	2	2	3	3	Сдача домашнего задания, включая доклад
Сайт-направленный мутагенез. Применение для исследования механизмов ферментативного катализа	7	14	2	2	2		
Аффинная модификация ферментов	7	12,13	4	2	3	3	Сдача домашнего задания, включая доклад
Нестационарная кинетика ферментативных реакций Применение группоспецифической химической модификации для изучения структуры и функции активных центров ферментов	7	9,1	2	2	3		
ферментативные реакции							

## Рабочий план

- Лекция 1. Предмет ферментативного катализа. Объекты изучения. Методы исследования. Основные задачи. Актуальные направления современной ферментативной кинетики.
- Лекции 2 и 3. Структурная организация активных центров ферментов. Строение активных центров ферментов на примерах карбоксипептидазы, рибонуклеазы, химотрипсина
- Лекция 4. Специфические взаимодействия биополимеров с лигандами
- Лекция 5. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса Ментен
- Лекция 6. Ингибирование ферментативных реакций
- Лекция 7. Механизмы аллостерической регуляции в ферментативном катализе
- Лекция 8. Многосубстратные ферментативные реакции
- Лекции 9 и 10. Нестационарная кинетика ферментативных реакций
- Лекция 11. Применение группоспецифической химической модификации для изучения структуры и функции активных центров ферментов
- Лекция 12 и 13. Аффинная модификация ферментов
- Лекция 14. Сайт-направленный мутагенез. Применение для исследования механизмов ферментативного катализа
- Лекция 15. Механизмы специфического отбора субстратов
- Лекция 16. Вклад рентгеноструктурного анализа в изучение структуры и функции ферментов

## Краткий курс лекций

## 1. ПРЕДМЕТ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА.

Главной целью курса «Основы ферментативного катализа» является изучение кинетических и физико-химических принципов ферментативного катализа, строения и функций ферментов. Задачи курса состоят в освоении теоретических основ ферментативной кинетики и их применении для описания экспериментальных закономерностей ферментативных реакций, а также для понимания строения и функций ферментов. Курс построен на основе фундаментальных принципов ферментативного катализа, а также с использованием последних достижений в области изучения функций и структуры ферментов. Теоретические основы необходимы для описания физико-химических механизмов специфических взаимодействий биополимер—лиганд и структуры биополимеров, исследуемых в молекулярной биологии.

Биологические катализаторы играют центральную роль в жизнедеятельности клеток и организмов благодаря их способности эффективно и специфично проводить химические реакции. Основными биологическими катализаторами являются ферменты. Они имеют белковую природу либо являются рибозимами (РНК, обладающие каталитической активностью). До открытия каталитических свойств РНК в конце XX в. ферменты-белки, обладающие каталитическими свойствами, считались единственными биоорганическими катализаторами. В 1989 г. Т. Чек и С. Алтман получили Нобелевскую премию по химии за открытие рибозимов. Однако большинство из них достаточно редко встречается в клетках, и основную функциональную нагрузку в качестве ферментов в живых организмах несут белки, катализируя тысячи разнообразных химических реакций, таких как гидролиз, окисление, изомеризация, синтез и др. Согласно механизму катализируемой реакции белки-ферменты подразделяются на 6 классов, которые в свою очередь делятся на подклассы.

- 1. Оксидоредуктазы катализируют окисление или восстановление с переносом электронов или атомов водорода (электрон + протон). Подклассы: дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, редуктазы, монооксидазы, диоксигеназы. Примеры: каталаза, алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа.
- 2. Трансферазы катализируют перенос различных групп как единого целого от одного субстрата к другому. Подклассы: аминотрансферазы, фосфотрансферазы, С1-трансферазы, гликозилтрансферазы. Примером трансфераз являются киназы (фосфотрансферазы), переносящие фосфатную группу и использующие в качестве субстрата ATP. Трансферазами являются также ДНК- и РНК-полимеразы, осуществляющие синтез ДНК и РНК соответственно.
- 3. *Гидролазы* катализируют гидролиз химических связей, а именно присоединение молекулы воды с разрывом связи в молекуле субстрата, т. е. гидролазы также участвуют в переносе групп, однако акцептором в этом случае всегда является молекула воды. Подклассы: эстеразы, липазы, фосфатазы, гликозидазы, протеазы (пептидазы), нуклеазы. Примеры: пепсин, трипсин, химотрипсин, амилаза.
- 4. *Лиазы* катализируют расщепление или образование химических соединений, при этом образуются или исчезают двойные связи. Подклассы: С-О-лиаза, С-S-лиаза, С-N-лиаза, С-С-лиаза. Примеры: альдолаза, декарбоксилаза.
- 5. *Изомеразы* катализируют структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата, перемещая группы в пределах молекулы. Изомеразы изменяют положение атома или группы атомов в пределах одной молекулы или же изменяют пространственное строение молекул, как, например, цис-транс-изомеразы. Другой пример рацемазы, осуществляющие взаимное превращение L- и D-изомеров.

6. *Лигазы (синтетазы)* катализируют образование химических связей между субстратами с использованием гидролиза ATP или GTP, т. е. проводят синтез с использованием энергии макроэргической связи. Подклассы: С-О-лигаза, С-S-лигаза, С-N-лигаза, С-С-лигаза. Пример: аминоацил-тРНК-синтетазы, катализирующие синтез аминоацил-тРНК.

Ферменты обладают необычайно высокой субстратной специфичностью. В ряде случаев они катализируют превращение только одного вещества, не взаимодействуя с его производными и гомологами. Например, уреаза катализирует гидролиз мочевины и не катализирует реакции гидролиза других амидов. Кроме того, катализ, осуществляемый ферментами, значительно эффективнее, чем катализ при воздействии органических катализаторов. Фермент в нано- или микромолярной концентрации может ускорить реакцию на несколько порядков. Так, карбоангидраза в цитоплазме эритроцита, катализирующая обратимую реакцию образования угольной кислоты из диоксида углерода и воды в процессе дыхания, ускоряет реакцию в 2000 раз по сравнению с аналогичной реакцией, протекающей в плазме крови, где нет карбоангидразы.

Некоторым ферментам для выполнения каталитической функции необходимы дополнительные компоненты небелковой природы — кофакторы. Эти кофакторы могут быть как неорганическими молекулами, например ионы металлов, так и органическими. Большинство кофакторов связано с белком либо нековалентными, но довольно прочными взаимодействиями, либо ковалентными, например тиаминпирофосфат в пируватдегидрогеназе или пиридоксальфосфат в реакциях трансаминирования и декарбоксилирования аминокислот. Такие кофакторы, прочно связанные с ферментом, называют простетическими группами. Кофакторы, способные диссоциировать из комплекса с белком, называют коферментами или специализированными субстратами. Примерами коферментов являются АТР и GTP в реакциях, катализируемых синтетазами (лигазами).

Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации и активности фермента, от концентрации субстрата, присутствия активаторов и ингибиторов, температуры, рН и ионной силы раствора. Каждый фермент характеризуется оптимумами рН и температуры. В главах курса будут рассмотрены строение ферментов, их функции, кинетические закономерности ферментативных реакций и методы исследования ферментов.

## 2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ФЕРМЕНТОВ.

Высокая субстратная специфичность ферментов обеспечивается уникальной структурной организацией белковой глобулы.

Ферменты обычно состоят из сотен аминокислот, но только небольшая часть из них в структуре белка взаимодействует с субстратом в процессе комплексообразования, и еще меньшее число, в среднем 3–4 аминокислоты, напрямую участвуют в катализе. Таким образом, как узнавание субстрата, так и катализ ферментативной реакции осуществляется ограниченным числом аминокислотных остатков, организованных в уникальную функциональную структуру активного центра фермента. Как правило, аминокислотные остатки, входящие в активный центр, расположены достаточно далеко друг от друга в первичной последовательности аминокислот белка. Их сближение и организация структуры активного центра является результатом формирования вторичной и третичной структуры белка (folding) на основе его первичной последовательности. Часть активного центра, ответственная за специфичное связывание с субстратом, называется центром связывания, а часть, принимающая непосредственное участие в катализе, – каталитическим центром. Эти два участка могут перекрываться в активном центре, в формировании которого могут также принимать участие кофакторы.

Работу активного центра фермента можно условно описать двумя стадиями. На первой стадии он «узнает», связывает и удерживает субстрат в комплексе, а на второй происходит собственно химическое превращение.

Первый этап — это специфическое узнавание субстрата. Высокая специфичность фермента обеспечивается структурой активного центра. Взаимодействие фермента с субстратом на первой стадии схематически можно описать следующим образом:

$$E+S \xrightarrow{k_1} ES \tag{2.1}$$

где  $k_1$  – константа скорости ассоциации и  $k_{-1}$  – константа скорости диссоциации.

Фермент взаимодействует с субстратом, и это взаимодействие обратимо. Сродство субстрата к ферменту определяется величиной константы диссоциации комплекса фермента с субстратом ( $K_d$ ). Величина  $K_d$  определяется как отношение констант  $k_1/k_1$ :

$$K_d = k_{-1}/k_1 [ моль/л = M ].$$

Сродство субстрата к ферменту тем выше, чем ниже величина  $K_d$ , т. е. чем прочнее фермент-субстратный комплекс. Величина  $K_d$  может варьировать от  $10^{-3}$  М — при таких значениях связывание субстрата с ферментом неэффективно, сродство субстрата к ферменту низкое, до  $10^{-10}$  М — это высокоэффективное связывание, практически такое же прочное, как ковалентное.

На следующей стадии взаимодействия фермента с субстратом происходит каталитическое превращение субстрата в продукт реакции. Для случая самого упрощенного механизма ферментативной реакции имеем:

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P \tag{2.2}$$

Константа  $k_2 = k_{cat} \ [c^{-1}]$  характеризует число оборотов ферментативной реакции. Как правило, ферменты без кофакторов (например, трипсин, химотрипсин) работают довольно медленно, величина их  $k_{cat}$  от  $10^2\ c^{-1}$ . Ферменты, использующие для катализа реакции кофакторы (например, оксидоредуктазы), работают с большей эффективностью, величина их  $k_{cat}$  до  $10^7\ c^{-1}$ . Предполагается, что после акта катализа происходит диссоциация продукта реакции, т. е. фермент освобождается из комплекса и становится вновь активным для осуществления следующего цикла катализа.

Высокая субстратная специфичность и высокая каталитическая эффективность ферментов — это два свойства биологического катализа. Фермент может быть высокоспецифичным и медленно проводить катализ реакции либо работать высокоспецифично и эффективно. Некоторые ферменты каталитически эффективны и при этом обладают широким спектром субстратной специфичности.

Рассмотрим принципы работы активных центров на следующих примерах: панкреатическая рибонуклеаза (рис. 2.1–2.3), химотрипсин (рис. 2.4), карбоксипептидаза A (рис. 2.5).

Фосфодиэфирные связи в молекуле РНК легко гидролизуются в щелочных условиях. Однако реакция, катализируемая ферментом *панкреатической рибонуклеазой (РНКазой А)*, протекает специфично по сравнению с химическим гидролизом в щелочных условиях. Фермент расщепляет фосфодиэфирные связи между фосфатом, присоединенным к атому С-3'-пиримидинового нуклеотида, и С-5'-кислородом соседнего нуклеотида. Фермент катализирует только гидролиз 3',5'-фосфодиэфирных связей поли- и олигонуклеотидов; фосфодиэфирные 2',5'- и 5',5'-связи устойчивы к действию рибонуклеаз, в отличие от действия щелочного гидролиза. Ферментативный катализ протекает в две стадии (см. рис. 2.1–2.3).

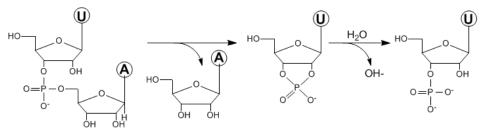
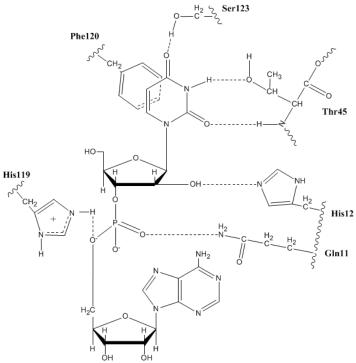


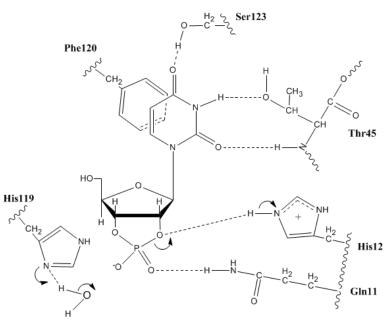
Рис. 2.1. Схема реакции, катализируемой панкреатической рибонуклеазой

При гидролизе нуклеозид-2',3'-циклофосфата продуктом ферментативной реакции, катализируемой рибонуклеазой, является исключительно нуклеозид-3'-фосфат, а химического гидролиза – его 2'- и 3'-изомеры.

В распознавании субстрата ферментом участвует несколько аминокислотных остатков активного центра (см. рис. 2.2-2.3). Связывание фосфата обеспечивают остатки His119 и Gln11. В связывании гетероцикла участвуют остатки Ser123 и Phe120, находящиеся в частичном стэкинге с пиримидиновым кольцом субстрата, и две группы остатка Thr45. Для такого взаимодействия необходимо, чтобы пиримидиновый нуклеотид находился в анти-конформации. Размеры области активного центра, в которой располагается гетероцикл, недостаточны для размещения в ней пурина, что объясняет специфичность рибонуклеазы в отношении пиримидинов. На первой стадии реакции (см. рис. 2.2) происходит внутримолекулярная атака на фосфодиэфирную связь при участии 2'гидроксильной группы с образованием нуклеозид-2',3'-циклофосфата. Это происходит благодаря присутствию в активном центре фермента двух имидазольных колец остатков гистидина, His12 и His119, которые работают как основной и кислотный катализаторы соответственно. Заряженный имидазольный остаток His119 отдает протон на 3'-ОН группу аденозина, а непротонированный His12 отнимает протон от 2'-OH группы, атакуемой атомом Р. На второй стадии (см. рис. 2.3) происходит гидролиз с разрывом пятичленного фосфодиэфирного цикла: вместо «ушедшего» из активного центра остатка аденозина связывается молекула воды и происходит обратный процесс, теперь His12 является кислотным, а His119 – основным катализатором.



**Рис. 2.2.** Схема активного центра рибонуклеазы в форме, благоприятствующей первой стадии реакции



**Рис. 1.3.** Схема активного центра рибонуклеазы в форме, благоприятствующей второй стадии реакции

В результате происходит образование пиримидин-3'-фосфата или же олигонуклеотида с пиримидин-3'-фосфатным нуклеотидом на конце. Реакция, катализируемая рибонуклеазой, является примером кислотно-основного катализа.

Сериновые протеазы, к которым относится химотрипсин, осуществляют нуклеофильный катализ реакции гидролиза пептидных связей. Различные сериновые протеазы отличаются специфичностью к природе аминокислотного остатка, по карбонильной группе которого происходит расщепление полипетидной цепи.

Эта специфичность определяется размером и структурой участка связывания активного центра, в котором размещается боковой радикал атакуемого аминокислотного остатка. В случае химотрипсина гидролиз происходит вблизи остатков ароматических аминокислот, а именно вблизи остатков фенилаланина, тирозина и триптофана.

В каталитический центр сериновых протеаз входят остатки серина, гистидина и аспартата, в случае химотрипсина это остатки Ser195, His57, Asp102 (см. рис. 2.4). Протонирование имидазольного цикла His57 осуществляется с помощью расположенной рядом с ним карбоксильной группы остатка Asp102. Наличие рядом положительно заряженного имидазольного цикла His57 облегчает ионизацию гидроксильной группы серина Ser195. Интересно, что величина р $K_a$  гидроксильной группы аминокислоты серина равна 10, в то время как в составе активного центра химотрипсина величина р $K_a$  остатка серина близка к 6-7. Подобному влиянию окружения подвергаются и другие остатки аминокислот в активных центрах, что значительно изменяет их кислотно-основные свойства. В виде аниона остаток Ser195 осуществляет нуклеофильную атаку пептидной связи с отщеплением полипептида с С-концевой стороны и образованием ацилфермента, а именно ковалентной связи между ферментом по остатку Ser195 и полипептидом с Nконцевой стороны полипептидной цепи. На следующей сталии ацилфермент гидролизуется с отщеплением N-концевой половины гидролизуемого полипептида и «регенерацией» исходной структуры активного центра для осуществления следующего акта каталитического процесса. Механизм действия химотрипсина, как и других сериновых протеаз, является примером нуклеофильного катализа.

**Рис. 2.4.** Схема активного центра сериновых протеаз (на примере химотрипсина) и механизм их действия: l – область активного центра, участвующая в узнавании бокового радикала  $R_i$ 

Примером фермента, работающего c участием кофактора, карбоксипептидаза А. Схема строения активного центра этого фермента показана на рис. Карбоксипептидаза Α пищеварительный фермент, \_ катализирующий гидролитическое отщепление С-концевых аминокислотных остатков белков. Этот фермент специфичен к L-конфигурации отщепляемого остатка. Фермент отщепляет от пептидов все аминокислотные остатки, расположенные на С-конце полипептидной цепи, за исключением аргинина, лизина, пролина и гидроксипролина. Эта избирательность объясняется тем, что гидрофобный кластер (Tyr198, Tyr248 и Ile247) активного центра обеспечивает преимущественную фиксацию в нем гидрофобных боковых радикалов Сконцевых остатков. Фиксация С-концевой части гидролизуемого пептида в активном центре обеспечивается также взаимодействием отрицательно заряженной С-концевой карбоксильной группы с двумя положительно заряженными остатками аргинина (Arg127 и Arg145) по типу электростатических контактов. Гидролиз протекает по механизму электрофильного катализа за счет присутствия в активном центре иона цинка, который фиксируется с помощью образования координационных связей с тремя аминокислотными остатками: His69, His196 и Glu72. Для иона цинка характерна тетраэдрическая sp<sub>3</sub>конфигурация координационных связей. Четвертая координата направлена карбонильную группу гидролизуемой пептидной связи. Ион  $\mathrm{Zn}^{2+}$  поляризует C=O-группу,

стабилизирует на атоме кислорода отрицательный заряд, а атом углерода становится более подверженным нуклеофильной атаке.

Рис. 2.5. Схема активного центра карбоксипептидазы А

Рассмотренные примеры механизма действия ферментов указывают на то, что ферментами могут быть реализованы различные типы катализа химических превращений (например, кислотно-основной, нуклеофильный и электрофильный).

## 3. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОПОЛИМЕРОВ С ЛИГАНДАМИ

## 3.1. Комплексы биополимер-лиганд. Модель двух состояний

Важнейшей особенностью биополимеров — белков и нуклеиновых кислот является их способность к специфическому взаимодействию со строго определенными партнерамилигандами, которые могут быть как низкомолекулярными соединениями, так и полимерами. Прочность комплекса биополимера со специфичным лигандом, как правило, существенно превышает прочность комплексов с другими лигандами, по крайней мере, из числа тех, которые могут встретиться в соответствующей живой системе. В силу уникальной селективности такого комплексообразования к нему часто применяют термин «узнавание».

Способность биополимера узнавать определенный лиганд, заданная его пространственной структурой, реализуется за счет многоточечного взаимодействия с определенным сочетанием групп лиганда. Узнавание лиганда биополимером основано на электростатических, гидрофобных и диполь-дипольных взаимодействиях, а также на образовании водородных связей. Комплексообразование специфического субстрата с активным центром фермента является примером многоточечного высокоспецифичного взаимодействия.

Поскольку специфическое взаимодействие является многоточечным, то можно ожидать, что наряду с комплексом, в котором реализованы все возможные точки контакта биополимер—лиганд, в системе могут образовываться и присутствовать различные

комплексы с неполностью реализованными контактами. Кроме того, биополимер (P) может находиться в различных конформационных состояниях, которые также могут образовывать различные комплексы (PL) с лигандами (L). Поэтому как процесс образования комплекса, так и равновесная система PL–L–P являются достаточно сложными. Тем не менее, для ряда систем и задач, связанных с их рассмотрением, широко используется модель, учитывающая лишь два состояния — отсутствие и наличие комплекса, т. е. следующий процесс:

$$P + L \stackrel{\longrightarrow}{\longleftarrow} PL$$
 (3.1)

Этот процесс характеризуется двумя кинетическими параметрами — константой скорости ассоциации  $\mathbf{k}_d$ . Их отношение представляет собой константу равновесия

$$K_a = \frac{\mathbf{k}_a}{\mathbf{k}_d} = \frac{\mathbf{[PI]}}{\mathbf{[P][]}}$$
 или  $K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{\mathbf{k}_d}{\mathbf{k}_a} = \frac{\mathbf{[P][L]}}{\mathbf{[PL]}},$  (3.2)

где [P], [L], [PL] – равновесные концентрации участников реакции.

Размерность константы скорости ассоциации  $k_a$  равна  $[M^{-1}c^{-1}]$ , константы скорости диссоциации  $k_d - [c^{-1}]$ , констант равновесия: константы ассоциации  $K_a - [M^{-1}]$ , константы диссоциации  $K_d - [M]$ .

В ферментативной кинетике в основном оперируют параметром  $K_d$ . Константа диссоциации характеризует эффективность связывания лиганда с биополимером. Широко распространенным является термин «сродство лиганда к биополимеру», оцениваемое величиной константы диссоциации. Сродство лиганда к биополимеру тем выше, т. е. комплекс PL прочнее, чем ниже величина  $K_d$ .

Для определения параметров комплексообразования используются уравнения материального баланса для биополимера и лиганда, поскольку их общие (начальные) концентрации являются заданными экспериментально величинами, т. е. известными, в отличие от величин равновесных концентраций:

$$P_0 = [P] + [PL],$$
 (3.3)

$$L_0 = [L] + [PL].$$
 (3.4)

Критерием практической применимости модели двух состояний является совпадение значений величин, полученных из серии экспериментов, проведенных при разных начальных концентрациях компонентов реакции. Другой способ проверить, применима ли модель, заключается в сопоставлении полученной экспериментально кинетической кривой с рассчитанной по уравнению для данной модели реакции. При этом нагляднее получить некоторые линейные зависимости и проверить, насколько хорошо на графике в соответствующих координатах экспериментальные точки укладываются на прямую линию (хотя на сегодняшний день при тотальной компьютеризации часто используются нелинейные методы расчета констант).

Для модели двух состояний одним из классических методов описания связывания лиганда L с биополимером P является представление данных в координатах Скэтчарда. При рассмотрении экспериментальных данных по комплексообразованию в этих координатах вводят понятие равновесных концентраций связанного в комплекс лиганда  $L_b$  (bound, эквивалентно концентрации фермент-субстратного комплекса PL) и свободного лиганда  $L_f$  (free). Выражение для константы ассоциации в этих обозначениях запишется в виде

$$\frac{\mathbf{L}_{b}}{\mathbf{L}_{f}(\mathbf{P}_{0} - \mathbf{L}_{b})} = \mathbf{K}_{a}.$$
(3.5)

После преобразования уравнения (3.5) получается выражение, связывающее отношение  $L_b/L_f$  с величиной  $L_b$  линейным уравнением:

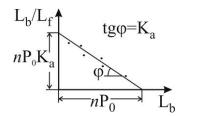
$$\frac{L_{b}}{L_{f}} = K_{a}P_{0} - K_{a}L_{b}. \tag{3.6}$$

Если выполнима модель двух состояний, то в координатах  $L_b/L_f$  ( $L_b$ ) экспериментальные данные, полученные при разных концентрациях лиганда и одинаковой концентрации полимера, должны уложиться на одну прямую линию.

Уравнение Скэтчарда иногда приводят в более общем виде, предполагая, что полимер имеет несколько одинаковых центров связывания n. В этом случае в выражение для константы ассоциации (3.6) вместо  $P_0$  нужно подставить  $nP_0$ , а само уравнение Скэтчарда записать в виде (3.7). Это выражение применимо, например, если белок состоит из нескольких идентичных субъединиц при условии отсутствия кооперативности между сайтами связывания:

$$\frac{L_{b}}{L_{f}} = nP_{0}K_{a} - K_{a}L_{b}. \tag{3.7}$$

В этом случае из экспериментальной зависимости определяется не только константа ассоциации, но и величина n (рис. 3.1). Невыполнение зависимости Скэтчарда свидетельствует о неприменимости модели двух состояний.



**Рис. 3.1.** Определение из экспериментальной зависимости параметров  $K_a$  и  $nP_0$ 

Выражение (3.6) при условии образования комплекса биополимера с предельным количеством связанного лиганда ( $L_{b\infty}$ ) можно записать в виде

$$\frac{L_{b}}{L_{f}} = K_{a}(L_{b\infty} - L_{b}). \tag{3.8}$$

Вместо величин  $L_b$ ,  $L_{b\infty}$  также используется другое свойство системы, пропорциональное концентрации комплекса. В частности, в случае реакций, катализируемых ферментами (E), процесс превращения лиганда, который в этом случае принято называть субстратом и обозначать буквой S, происходит в комплексе фермент—субстрат, и скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации комплекса (см. гл. 4).

Если лиганд присутствует в большом избытке, то концентрация свободного лиганда практически совпадает с полной концентрацией лиганда  $L_0$ , и можно записать выражение для зависимости концентрации связанного лиганда или пропорционального ему свойства от концентрации введенного в реакционную смесь лиганда в виде:

$$\frac{L_{b}}{L_{0}} = K_{a}(L_{b\infty} - L_{b}) \text{ или } L_{b} = \frac{K_{a}L_{b\infty}L_{0}}{1 + K_{a}L_{0}}.$$
(3.9)

#### 3.2 Методы определения констант равновесия

Для определения констант диссоциации комплексов биополимеров с лигандами используется широкий арсенал методов. Судя по уравнению (3.2), определить этот параметр нетрудно, если возможно разделить комплекс биополимер—лиганд и свободный биополимер или комплекс биполимер—лиганд и несвязанный в комплекс лиганд, а также определить их количественное соотношение.

Довольно быстрой классической процедурой разделения биополимера и лиганда является фильтрование через нитроцеллюлозные мембраны (миллипоровые фильтры). На таких фильтрах задерживаются белки и их комплексы с низкомолекулярными лигандами и нуклеиновыми кислотами, но не задерживаются свободные лиганды. Время контакта с фильтром измеряется секундами или долями секунд. Удобно использовать этот метод, если лиганд содержит радиоактивную метку, для определения соотношения связанного в комплекс с белком на фильтре лиганда с лигандом, прошедшим через фильтр. При использовании фильтрования возможны следующие источники ошибок: связывание может осуществляться менее чем на 100 %, и насыщение фильтров наступает при довольно низких концентрациях белка.

Широко используемым методом для оценки образования и прочности комплексов является метод задержки в геле (gel retardation, или electrophoretic mobility shift assay – EMSA), который применяется, например, для слежения за комплексами ДНК-белок (или РНК-белок). Анализ ДНК-белковых взаимодействий в этом случае основан на том, что комплексы крупнее мигрируют электрофореза ДНК-белковые И В ходе полиакриламидном или агарозном геле медленнее, чем несвязанная ДНК. Скорость, с которой различные молекулы и их комплексы проходят через гель, определяется их размером и зарядом, а также в меньшей степени – их формой. Дорожка геля с контрольным образцом, т. е. с ДНК без белка, содержит одну полосу, соответствующую ДНК, не связанной с белком. На дорожке, где содержится и ДНК, и белок, если они образуют комплекс, присутствует вторая полоса, соответствующая комплексу. Эта полоса «сдвинута» на геле ближе к старту, так как комплекс ДНК-белок из-за большего размера (молекулярной массы) перемещается в геле более медленно. Для визуализации образцов в дорожках геля используется радиоактивная метка, которая вводится в состав ДНК, а также различные методы окрашивания. Соотношение интенсивностей полос в дорожке, соответствующих несвязанной ДНК и комплексу ДНК-белок, отражает долю свободных и связанных молекул ДНК и позволяет определить константу диссоциации комплекса ДНКбелок. Для этого должны быть известны начальные концентрации белка и ДНК. Метод задержки в геле позволяет также оценить стехиометрию комплекса.

Для определения константы диссоциации комплекса биополимер-лиганд можно воспользоваться методом гель-фильтрации (гель-фильтрационная, ситовая, эксклюзионная хроматография), разделяющим проникающая или за минуты высокомолекулярную низкомолекулярную фракции. Гель-фильтрационная хроматография – это метод разделения смеси веществ путем фильтрации через различные ячеистые гели (например, сефадекс, сефароза, агароза и др.). Разделение происходит за счет разной способности проникать в поры геля, находящегося в хроматографической колонке. Метод позволяет разделять белки с различными молекулярными массами, размерами и формами. Этот метод широко используется для очистки белков, определения их молекулярной массы и обессоливания растворов белков.

Смесь белка с лигандом вносят в колонку с гелем и элюируют буферным раствором. Малые молекулы лиганда могут проникать внутрь гранул, в результате они задерживаются на колонке и выходят из нее медленнее. Крупные молекулы, которые не могут проникнуть в ячейки гранул геля через поры, фильтруются сквозь пространство между гранулами и проходят через колонку быстрее, чем более мелкие. Молекулы промежуточных размеров, для которых из-за разброса значений эффективных диаметров

пор внутри гранул неподвижной фазы доступна только часть ее объема, перемещаются вдоль колонки с промежуточной скоростью. При элюции первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры. В простейшем варианте этого вида хроматографии белок и лиганд разделяются полностью, поскольку комплекс белок—лиганд на колонке диссоциирует. Для определения константы диссоциации комплекса должны быть подобраны условия, не нарушающие процесса связывания. Эффективность гельфильтрации определяется размерами пор между гранулами геля и величиной ячеек каждой гранулы. Путем подбора соответствующего геля можно варьировать границу выхода и тем самым эффект разделения. На выходе из колонки элюат собирают в виде отдельных фракций. В случае смеси белок—лиганд, образующей комплекс, первой фракцией будет комплекс белка с лигандом, промежуточной — белок, и последней — несвязанный лиганд. К недостаткам метода гель-фильтрации относится большой расход белка, что затрудняет его использование.

Константу диссоциации комплекса биополимер—лиганд можно определить, если у свободного биополимера или свободного лиганда какое-либо измеряемое физическое свойство изменяется при комплексообразовании и может быть представлено в виде линейной комбинации:

$$\Phi = \alpha_P \Phi_P + \alpha_{PL} \Phi_{PL}$$
 для полимера или  $\Phi = \alpha_L \Phi_L + \alpha_{PL} \Phi_{PL}$  для лиганда, (3.10) где  $\alpha_P$ ,  $\alpha_{PL}$ ,  $\alpha_L$  – соответствующие мольные доли.

Величины  $\Phi_P$  для полимера или  $\Phi_L$  для лиганда находятся измерением в отсутствие второго партнера. Величина  $\Phi_{PL}$  находится путем измерения при таком избытке второго партнера, что можно считать первого партнера практически полностью связанным в комплекс. Для этого проводят серию измерений при возрастающей концентрации второго партнера до тех пор, пока измеряемое физическое свойство не перестанет изменяться, т. е. зависимость измеряемой величины от концентрации этого партнера не выйдет на плато. Поскольку при данном подходе физическое свойство измеряется при наборе возрастающих концентраций второго партнера, то такие методы часто фигурируют как методы титрования (например, флуоресцентное титрование). Если обозначить значение измеряемой величины в отсутствие второго партнера через  $\Phi_0$ , а предельное значение через  $\Phi_\infty$ , то величина  $\alpha_{PL}$  равна:

$$\alpha_{PL} = \frac{\Phi_{PL} - \Phi_0}{\Phi_{\infty} - \Phi_0} \tag{3.11}$$

Далее концентрация комплекса находится как  $\alpha_{PL}P_0$ , если измеряется физическое свойство полимера, или  $\alpha_{PL}L_0$  — если измеряется физическое свойство лиганда.

Большая группа спектрофотометрических методов кинетических исследований реакций, катализируемых ферментами, основана на том, что многие молекулы поглощают свет в видимой или ультрафиолетовой области спектра. Другими словами, в данном случае измеряемым физическим свойством является оптическая плотность (поглощение) раствора (A). Величина поглощения зависит от типа и концентрации вещества, а также от длины волны используемого света, поэтому применяется монохроматический свет. Согласно закону Бугера – Ламберта – Бера  $A = \varepsilon cl$ , где  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции, с – концентрация вещества, l – оптический путь в растворе. Оптическая плотность  $A = lg(I_0/I)$ , где  $I_0$  – интенсивность падающего света, I – интенсивность света, прошедшего через образец. При присоединении лиганда к ферменту могут произойти изменения в спектре поглощения лиганда или биополимера или в величине оптической плотности, позволяющие найти долю связанного белка. Обычно к раствору биополимер—белок с

постоянной начальной концентрацией  $P_0$  добавляют возрастающие концентрации лиганда и строят график зависимости изменения оптической плотности от концентрации лиганда.

Другим примером физического свойства, часто используемого для исследования является флуоресценция. Некоторые соединения-флуорофоры поглощать свет, а затем испускать его с большей длиной волны. Интенсивность флуоресценции характеризуется квантовым выходом, который равен отношению числа испускаемых квантов к числу поглощаемых. Метод спектрофлуорометрии на два порядка чувствительнее спектрофотометрии. В составе белков способностью к флуоресценции обладают остатки ароматических аминокислот. Наиболее существенный вклад во флуоресценцию вносят остатки триптофана (Тгр), которые при облучении светом с длиной волны 280–290 нм испускают свет с длиной волны 330–340 нм. Интенсивность квантовым флуоресценции определяется ee выходом, который непосредственного окружения флуорофора. Если при комплексообразовании биополимера с лигандом это окружение меняется, то меняется и интенсивность флуоресценции. Исследование тушения флуоресценции триптофана в составе белковой молекулы фермента при комплексообразовании с субстратом является широко распространенным методом оценки эффективности связывания. В том случае, если белок не имеет остатков триптофана, спектр флуоресценции которых изменяется при связывании лиганда, их можно ввести в белок с помощью метода сайт-направленного мутагенеза (см. гл. 11).

В исследованиях комплексообразования ферментов с субстратами можно использовать аналог субстрата, содержащий флуоресцентную метку, поскольку интенсивность флуоресценции при комплексообразовании может изменяться не только для фермента, но и для субстрата. Флуоресценция триптофана и флуоресцентных меток в ферменте или субстрате может не только тушиться, но и увеличиваться, разгораясь, это зависит от характера конформационных перестроек белка при комплексообразовании.

При исследовании взаимодействия белка, содержащего остатки триптофана, с субстратом можно следить за флуоресценцией триптофана при комплексообразовании белка (P) с лигандом (L). Концентрации свободного биополимера [P] и комплекса [PL], необходимые для определения константы диссоциации, можно определить из измерения флуоресценции. Если обозначить как  $F_P$  флуоресценцию полимера, не связанного с лигандом, а как  $F_{PL}$  — флуоресценцию полимера, связанного в комплекс, то суммарная флуоресценция F равна:

$$F = F_{P} \frac{[P]}{P_{0}} + F_{PL} \frac{[PL]}{P_{0}}.$$
 (3.12)

Величина  $F_P$  измеряется в отсутствие лиганда, а величина  $F_{PL}$  – в присутствии насыщающей концентрации лиганда. Для нахождения последней проводят серию измерений флуоресценции при возрастающих концентрациях лиганда (флуоресцентное титрование) до тех пор, пока дальнейшее увеличение не перестанет сопровождаться изменением флуоресценции. Учитывая уравнение материального баланса (3.3), выражение (2.12) можно записать в виде

$$FP_0 = F_P[P] + F_{PL}(P_0 - [P]), \tag{3.13}$$

откуда определяются концентрации [P] и [PL] в виде

$$[P] = P_0 \frac{F - F_{PL}}{F_P - F_{PL}},$$

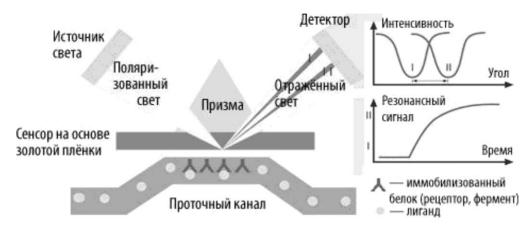
$$[PL] = P_0 \frac{F - F_P}{F_{PL} - F_P}.$$
(3.14)

Далее константа диссоциации вычисляется по формуле:

$$K_{d} = \frac{(\mathbf{L}_{o} - [\mathbf{P})\mathbf{H}]}{[\mathbf{P}\mathbf{L}]}.$$
(3.15)

Аналогично можно определить константу диссоциации комплекса биополимера с флуоресцирующим лигандом, измеряя флуоресценцию лиганда, связанного и не связанного в комплекс с биополимером, с помощью соотношений, аналогичных (3.12)—(3.15). Чтобы определить интенсивность флуоресценции лиганда, связанного в комплекс, нужно провести флуоресцентное титрование лиганда при возрастающих концентрациях биополимера.

Описанные выше методы являются классическими методами исследования взаимодействия биополимеров с лигандами. Одним из современных методов изучения взаимодействия биомолекул является применение *приборов «Biacore»* (рис. 3.2). Детекция в этом случае основана на явлении поверхностного плазмонного резонанса ППР (surface plasmon resonance – SPR). С помощью этого метода можно изучать взаимодействие не только биополимеров от малых молекул (180 Da), но и бактериальных и эукариотических клеток. В ферментативной кинетике метод применяется для определения концентраций участников реакции и позволяет изучать взаимодействия типа белок-белок, белокнизкомолекулярный лиганд и белок-нуклеиновая кислота. Оптические биосенсоры на эффекте ППР позволяют регистрировать межмолекулярные взаимодействия in vitro в режиме реального времени. Метод регистрации ППР имеет преимущества перед классическими методами исследования межмолекулярного взаимодействия, поскольку не требует мечения реагентов химическими, флуоресцентными или радиоактивными метками, а также используется без сопряженных реакций или введения в систему дополнительных компонентов, облегчающих детекцию. Кроме того, для определения равновесных параметров взаимодействия биомолекул не требуется разделения свободных и связанных форм.



**Рис. 3.2.** Принцип работы приборов «Віасоге». Свет лазера фокусируется на сенсорной поверхности и связывание «аналита» регистрируется по изменению резонансного угла (эффект ППР)

При работе на приборе «Biacore» на поверхности оптического чипа иммобилизован взаимодействующий лиганд (биологические макромолекулы: белки, нуклеиновые кислоты и др.; низкомолекулярные соединения; молекулярные комплексы; мембранные системы; вирусы и др.). Лиганд может быть иммобилизован различными способами: ковалентно либо с помощью аффинных взаимодействий (например, антитела, хелаты, рецепторы, биотин/авидин) или взаимодействий для создания мембранных систем (липидный монослой, липидный бислой, липосомы). Свободный партнер в растворе, от простых веществ до клеток, называется «аналит».

Детекция межмолекулярных взаимодействий осуществляется путем регистрации с помощью ППР массопереноса аналита между свободным объемом и поверхностью оптического чипа, на которой иммобилизован лиганд. Регистрируемым параметром детекции в приборах «Віасоге» является угол падения плоскополяризованного монохроматического света, при котором регистрируется нарушение полного внутреннего отражения. Уменьшение интенсивности отраженного света при увеличении угла падения свыше критического для полного внутреннего отражения регистрируется линейкой фотодиодных детекторов в реальном времени. Это позволяет исследовать быстро протекающие процессы, в частности кинетику ферментативных реакций. Такое быстродействие объясняется конструкцией прибора, в которой нет движущихся элементов, предназначенных для испускания и регистрации света. Характер изменения единиц резонанса отражает поведение взаимодействующих биомолекул. Например, рост единиц резонансного сигнала указывает на высокую скорость быстрый взаимодействия. Медленное падение после достижения максимума свидетельствует о стабильности образовавшегося комплекса, в то время как быстрое падение значений резонанса говорит о его нестабильности. Специальное компьютерное обеспечение дает возможность предварительно моделировать эксперимент и позволяет проводить подробную обработку результатов. С целью обработки применяется широкий спектр математических моделей для определения концентрации исследуемых веществ, кинетических параметров реакции (констант скоростей образования и распада комплексов. констант диссоциации/ассоциации), термодинамических параметров равновесного состояния и термодинамики переходов (величин изменения свободной энергии Гиббса  $\Delta G$ , энтальпии  $\Delta H$  и энтропии  $\Delta S$ ).

К достоинствам метода относится его чувствительность, позволяющая работать с минимальным объемом образцов в пределах 10 мкл. Более того, поскольку экспериментальные образцы часто бывают доступны в ограниченных количествах, часть образца, не связавшаяся с поверхностью, может быть собрана во время опыта и вновь использована в дальнейшем. Дополнительным достоинством метода является то, что связанные с детектором молекулярные комплексы можно затем анализировать соответствующими способами, например масс-спектрометрией.

Приборы «Biacore» применяются в различных областях фундаментальной науки и медицины, для исследований в области иммунологии, онкологии, инфекционных заболеваний. Метод имеет прикладное значение для:

- изучения функций белков, молекулярного узнавания;
- экспериментальной проверки компьютерных предсказаний межмолекулярных взаимодействий;
- селекции антител и аптамеров;
- скрининга прототипов лекарств и физиологически активных веществ;
- анализа маркеров заболеваний;
- определения следового количества гормонов, антибиотиков, анаболиков и др.;
- анализа качества фармацевтических препаратов;
- разработки диагностических тест-систем;
- разработки вакцин.

## 4. СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ. УРАВНЕНИЕ МИХАЭЛИСА – МЕНТЕН.

4.1. Определение эффективности комплексообразования субстратов с ферментами и кинетических характеристик ферментативных реакций

Для установления механизмов ферментативных реакций необходимы кинетические исследования, состоящие в определении кинетических параметров реакции. Рассмотрим основные уравнения ферментативной кинетики.

Почти 100 лет назад Леонор Михаэлис и Мод Леонора Ментен в журнале «Biochem» опубликовали работу «Die Kinetik der Invertinwirkung» (1913), в которой показали, что скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермент-субстратного комплекса [1]. Они развили идеи других исследователей, предложив следующую схему реакции, катализируемой ферментом Е:

$$E + S \stackrel{Ks}{\longleftrightarrow} ES \stackrel{k_{cat}}{\longleftrightarrow} E + P \tag{4.1}$$

На первой стадии процесса фермент и субстрат взаимодействуют и образуют фермент-субстратный комплекс ES. Было сделано предположение, что в этом случае данная обратимая стадия не сопровождается какими-либо химическими превращениями и может быть охарактеризована константой равновесия:

$$Ks = \frac{[E][S]}{[ES]}.$$
 (4.2)

Фермент (E) и субстрат (S) находятся в термодинамическом равновесии с фермент-субстратным комплексом (ES). Размерность величины константы равновесия  $K_S$  [M = моль/л], поскольку  $K_S = k_{-1}/k_1$ , и размерность  $k_{-1}$  [ $c^{-1}$ ], а  $k_1$  [ $M^{-1}$ ].

На второй стадии протекают химические процессы, характеризующиеся константой скорости первого порядка  $k_{cat}$  [c<sup>-1</sup>]. Согласно реакции первого порядка скорость ферментативной реакции в целом, т. е. скорость образования продукта, представляет собой скорость распада фермент-субстратного комплекса с константой  $k_{cat}$ :

$$v = k_{cat}[ES]. (4.3)$$

При выводе уравнений предполагается, что начальная концентрация фермента много меньше начальной концентрации субстрата ( $E_0 << S_0$ ). Поскольку фермент в процессе реакции находится как в виде фермент-субстратного комплекса, так и в виде свободного фермента, суммарная концентрация фермента  $E_0$  равна:

$$E_0 = [E] + [ES].$$
 (4.4)

Преобразуем уравнение (4.2) с учетом выражения (4.4):

[ES] = 
$$\frac{E_0[S]}{K_s + [S]}$$
 (4.5)

и подставим в уравнение (4.3):

$$v = \frac{k_{cat}E_0[S]}{K_S + [S]}$$
 (4.6)

Итак, рассмотренный механизм Михаэлиса — Ментен предполагает, что ферментсубстратный комплекс находится в термодинамическом равновесии со свободным ферментом и субстратом.

Бриггс и Холдейн проанализировали обобщенный механизм, когда величина  $k_2$  может быть сравнима с  $k_1$ :

$$E+S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} EP \tag{4.7}$$

При расчете концентрации комплекса ES используется условие стационарности, т. е. считается, что концентрация промежуточного соединения – комплекса фермента с

субстратом [ES] постоянна во времени. Этот факт можно описать следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_{-1}[ES] = 0.$$
 (4.8)

Из уравнений (4.4) и (4.8) получаем:

[ES] = 
$$\frac{E_0[S]}{[S] + \frac{k_2 + k_1}{k_1}}$$
. (4.9)

Поскольку  $v = k_2[ES]$ , то

$$v = \frac{k_2 E_0[S]}{[S] + \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}}.$$
 (4.10)

Это уравнение подобно уравнению (4.6). Выражение в знаменателе  $\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$  может быть отнесено в данном случае к константе Михаэлиса ( $K_M$ ). Этот кинетический параметр имеет размерность [M = моль/л], т. е. такую же, как константа равновесия  $K_S$ :

$$\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_M, (4.11)$$

$$k_2E_0=V_{max},$$
 (4.12)

где  $V_{max}$  [M/c] — максимальная скорость реакции, которая достигается, когда концентрация фермент-субстратного комплекса равна общей концентрации фермента, т. е. согласно механизму реакции все активные центры фермента находятся в комплексе с субстратом и катализируют данную реакцию. Таким образом, уравнение (4.10) можно записать в виде

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}.$$
(4.13)

Уравнение (4.13) называется уравнением Михаэлиса — Ментен и является фундаментальным уравнением ферментативной кинетики, описывающим зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Поскольку константа диссоциации комплекса [ES] равна  $Ks = k_{-1}/k_1$ , то:

$$K_{M} = K_{S} + k_{2}/k_{1}. \tag{4.14}$$

В том случае, если  $k_1 >> k_2$ , уравнение (4.13) сводится к виду (4.6), где  $K_M = K_S$ , т. е. константа Михаэлиса представляет собой константу диссоциации фермент-субстратного комплекса, характеризующую взаимодействие фермента с субстратом в равновесных условиях.

При низких значениях [S], когда [S]  $<< K_M$ , уравнение (4.13) принимает вид:

$$v = E_0[S]k_{cat}/K_M.$$
 (4.15)

Уравнение Михаэлиса — Ментен описывает многие механизмы ферментативных реакций. Это уравнение можно использовать не только для схемы (3.1), но и для анализа самых разных процессов, в том числе таких, когда в ходе реакции происходит образование дополнительных ковалентно или нековалентно связанных промежуточных соединений (при этом всегда  $K_M \le K_S$ ).

Например, возможно, что реакция протекает с образованием ряда промежуточных соединений (4.16), и конечная каталитическая стадия является медленной:

$$E + S \stackrel{K_s}{\longleftrightarrow} ES \stackrel{K'}{\longleftrightarrow} ES' \stackrel{K''}{\longleftrightarrow} ES'' \stackrel{k_4}{\longleftrightarrow} E + P$$
 (4.16) где [ES'] = K'[ES], а [ES''] = K''[ES'].

Следовательно,

$$K_{M} = K_{S}/(1+K'+K'K''),$$
 (4.17)  
 $k_{cat} = k_{4}K'K''/(1+K'+K'K'').$  (4.18)

$$k_{cat} = k_4 K' K'' / (1 + K' + K' K'').$$
 (4.18)

Катализируемый химотрипсином гидролиз эфиров и амидов протекает согласно следующему механизму:

$$E+S \xrightarrow{K_S} ES \xrightarrow{k_2} EA \xrightarrow{k_3} EP_2$$

$$P_1 \qquad (4.19)$$

где EA – «ацилфермент», промежуточный ковалентный интермедиат.

В том случае, если концентрация комплекса ЕА стационарна, уравнение для скорости ферментативной реакции выглядит следующим образом:

$$v = [E_0][S] \frac{k_2 k_3}{(k_2 + k_3)}$$

$$[S] + K_3 k_3 / (k_2 + k_3)$$

$$(4.20)$$

Уравнение (3.20) похоже на уравнение Михаэлиса – Ментен, но значения кинетических параметров имеют более сложный вид:

$$K_M = K_S k_3 / (k_2 + k_3),$$
 (4.21)

$$k_{\text{cat}} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$$
, или (4.22)  $1/k_{\text{cat}} = 1/k_2 + 1/k_3$ . (4.23)

$$1/k_{cat} = 1/k_2 + 1/k_3 \tag{4.23}$$

В сложных случаях соотношение  $K_M < K_S$  может не выполняться.

В случае механизма, для которого  $k_2 >> k_{-1}$ , отношение  $k_{cat}/K_M$  равно  $k_1$  – константе скорости связывания фермента и субстрата.

Константы скорости связывания субстрата (k1) в ферментативной кинетике обычно порядка  $1\cdot 10^6 - 1\cdot 10^8$  с $^{-1}$ . Для механизма Бриггса — Холдейна отношение  $k_{cat}/K_M$  равно  $\sim 1.10^{7} - 1.10^{8} \,\mathrm{M}^{-1} \mathrm{c}^{-1}$ . Например, каталаза, ацетилхолинэстераза, карбоангидраза, кротоназа, фумараза и триозофосфатизомераза – все эти ферменты укладываются в данный диапазон кинетических параметров катализируемых реакций. Еще одним ферментом такого типа является пероксидаза, выделенная из хрена, один из первых ферментов, к которому были применены методы исследования быстрых реакций. Сначала пероксидаза образует с перекисью водорода комплекс Михаэлиса, который затем взаимодействует с донором водорода (реакция второго порядка). При достаточно высоких концентрациях донора скорость второй реакции значительно превышает скорость диссоциации комплекса Михаэлиса.

фермент-субстратным Образование вслед за комплексом промежуточных соединений, как в схеме (4.19), – достаточно распространенное явление в ферментативном катализе. В условиях, когда такие промежуточные соединения не накапливаются и медленной стадией в последовательности реакций (4.19) является стадия с константой скорости k2, константа Михаэлиса K<sub>м</sub> равна константе диссоциации K<sub>S</sub>. В таком случае первоначально предложенный механизм Михаэлиса – Ментен оказывается выполненным.

#### 4.2. Физический смысл параметров уравнения Михаэлиса – Ментен

#### A) Константа $k_{cat}$

Параметр  $k_{cat}$  называют числом оборотов ферментативной реакции, поскольку он определяет максимальное число молекул субстрата, превращающихся в продукт в единицу времени при полном насыщении фермента субстратом.

В том случае, когда имеется один фермент-субстратный комплекс и все стадии связывания достаточно быстрые, параметр  $k_{cat}$  в уравнении Михаэлиса — Ментен представляет собой константу скорости первого порядка для химического превращения  $ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$ . В более сложных случаях  $k_{cat}$  является функцией всех констант скорости первого порядка и не может быть отнесена ни к какому конкретному процессу, за некоторыми исключениями.

Из рассмотрения примера на схеме (4.19) видно, что в этом случае  $k_{cat}$  является функцией констант  $k_2$  и  $k_3$  (4.22). Однако, если одна из этих констант много меньше другой,  $k_{cat}$  становится равной меньшей константе. Например, если  $k_3 < k_2$ , то  $k_{cat} = k_3$ .

Таким образом,  $k_{cat}$  не может превышать ни одной из констант скорости первого порядка для реакционного пути в прямом направлении и представляет собой нижний предел для констант скорости химических реакций.

Параметр реакции  $V_{max}$  дает характеристику каталитической активности фермента, т. е. определяет максимальную эффективность образования продукта при данной концентрации фермента в условиях избытка субстрата.

## E) Величина $K_{M}$

Величина  $K_M$  характеризует сродство фермента к данному субстрату и является величиной постоянной, не зависящей от концентрации фермента. Сродство фермента к субстрату тем выше, чем ниже величина  $K_M$ . В этом случае начальная скорость реакции выше, а значит равновесие первого этапа ферментативной реакции сдвинуто вправо, в сторону образования фермент-субстратного комплекса. Таким образом, создаются наилучшие условия для протекания и второго этапа ферментативного процесса. При таких условиях для достижения эффективного превращения субстрата требуется малая концентрация субстрата. Следовательно, величина  $V_{max}$  теоретически может быть достигнута при малых концентрациях субстрата. Если  $K_M$  высока, то это означает, что сродство фермента к такому субстрату низкое и реакция при небольших концентрациях субстрата протекает неэффективно.

Выше было отмечено, что величина  $K_M$  равна  $K_S$  – истинной константе диссоциации фермент-субстратного комплекса, только для простого механизма Михаэлиса – Ментен или в аналогичных случаях. При решении определенных задач величину  $K_M$  можно рассматривать как кажущуюся константу диссоциации. Например, концентрацию свободного фермента можно рассчитать из соотношения

$$\frac{[E[S]]}{\sum [ES]} = K_{M}, \tag{4.24}$$

где ∑[ES] – сумма концентраций всех форм, содержащих фермент.

Величина  $K_M$  определяется количеством фермента, связанного в той или иной форме с субстратом, что иллюстрируется следующей схемой (на примере механизма действия химотрипсина):

$$E+S \xrightarrow{K_S} ES \xrightarrow{k_2} ES' \xrightarrow{k_3} E+P \tag{4.25}$$

Применяя условия стационарности к комплексу ES', получаем:

$$[ES'] = [ES]k_2/k_3.$$
 (4.26)

В том случае, когда  $k_2 >> k_3$ , [ES'] намного превышает [ES], и [ES'] вносит в величину  $K_M$  больший вклад, чем [ES], поскольку является преобладающей формой, содержащей фермент. В этом случае  $K_M$  меньше  $K_S$  в  $k_3/k_2$  раз:  $K_M \approx K_S(k_3/k_2)$ .

## B) Параметр $k_{cat}/K_M$

Как было показано в уравнении (4.15), скорость реакции при низких концентрациях субстрата определяется уравнением  $v=(k_{cat}/K_M)E_0[S]$ , т. е. отношение  $k_{cat}/K_M$  представляет собой кажущуюся константу скорости реакции второго порядка. Этот параметр не является истинной микроскопической константой, за исключением крайнего случая, когда реакция лимитируется столкновением фермента с субстратом.

Параметр  $k_{cat}/K_M$  связывает скорость реакции с концентрацией свободного фермента, а не с его общей концентрацией. В этом нетрудно убедиться из рассмотрения приведенного выше уравнения (4.3), поскольку при низкой концентрации субстрата фермент находится преимущественно в свободном состоянии ([E]  $\approx$  E<sub>0</sub>), и, следовательно, скорость реакции может быть описана следующим уравнением:  $v = (k_{cat}/K_M)[E][S]$ .

Отношение  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  не может превышать ни одну из констант скорости второго порядка для последовательности реакций, идущих в прямом направлении, и представляет собой, таким образом, нижний предел для константы скорости при связывании фермента с субстратом.

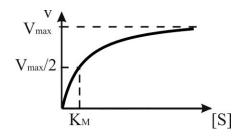
## 4.3. Графическое представление данных стационарной кинетики

Уравнение Михаэлиса — Ментен как зависимость v([S]) при  $E_0$  = const и  $S_0 >> E_0$  графически выражается гиперболой с асимптотой  $v = V_{max}$  для ординаты v и асимптотой  $[S] = -K_M$  для абсциссы [S] (рис. 4.1). При увеличении количества субстрата начальная скорость ферментативной реакции возрастает.

Если концентрация субстрата значительно меньше  $K_M$  ([S]  $<< K_M$ ), то сумма ( $K_M$  + [S]) примерно равна  $K_M$ , следовательно,  $v = V_{max}[S]/K_M$ , т. е. в данном случае скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата (реакция имеет первый порядок, уравнение (4.15)).

В случае, когда скорость реакции равна половине максимальной ( $v = V_{max}/2$ ),  $K_M = [S]$ . Таким образом, константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимального значения (см. рис. 4.1).

Если концентрация субстрата значительно больше  $K_M$  ([S] >>  $K_M$ ), то скорость реакции становится равной максимальной скорости:  $V = V_{max}$ . В этих условиях реакция имеет нулевой порядок, т. е. не зависит от концентрации субстрата.  $V_{max}$  — величина постоянная для данной концентрации фермента, не зависящая от концентрации субстрата. В этих условиях фермент становится полностью насыщенным субстратом, т. е. происходит максимально возможное при данной концентрации фермента формирование фермент-субстратного комплекса. Дальнейшее повышение концентрации субстрата не приводит к росту выхода продукта реакции.



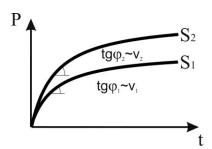
**Рис. 4.1.** График зависимости скорости ферментативной реакции v от концентрации субстрата [S]

При экспериментальной обработке данных можно следить за временной зависимостью исчезновения субстрата либо, что используется чаще, за зависимостью

накопления продукта от времени. По полученным данным можно графически представить кинетическую кривую ферментативной реакции (рис. 4.2).

На начальном линейном участке кинетической кривой скорость ферментативной реакции можно оценить как тангенс угла наклона графика P(t). Такой график позволяет получить набор скоростей реакции v при вариации концентраций субстрата [S].

Однако для графического анализа данных при оценке параметров  $K_M$  и  $V_{max}$  удобнее использовать линейные графики. Для этого уравнение Михаэлиса — Ментен следует преобразовать в линейную форму.

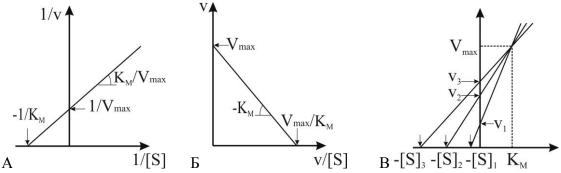


**Рис. 4.2.** График зависимости образования продукта от времени при постоянной концентрации фермента и различных концентрациях субстрата [S]

Одним из методов линеаризации уравнения Михаэлиса — Ментен является представление данных в виде анаморфоз Лайнуивера — Берка.

$$1/v = 1/V_{max} + K_M/V_{max}[S]. (4.27)$$

График, построенный в координатах 1/v (1/[S]) (рис. 4.3, A), представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен  $K_M/V_{max}$ . Отрезок, отсекаемый на оси ординат (при 1/[S] = 0), есть  $1/V_{max}$ , а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен  $1/K_M$ . Недостаток графика Лайнуивера — Берка состоит в том, что при высоких концентрациях субстрата экспериментальные точки расположены в пределах небольшого отрезка, в результате чего точкам, соответствующим низким концентрациям, придается слишком большой вес. Достоинство же этого графика в том, что он позволяет достаточно просто оценить значение скорости v при данной концентрации субстрата [S].



**Рис. 4.3.** Способы графического определения кинетических параметров ферментативной реакции с использованием следующих координат: A — Лайнуивера — Берка, B — Эди — Хофсти, B — зависимость  $V_{\rm max}$  от  $K_{\rm M}$ 

Другой способ графического представления данных — график Эди — Хофсти (уравнение (4.28), рис. 4.3,  $\mathcal{E}$ ). Преобразование уравнений (4.1) и (4.2) приводит к выражению

$$v = V_{max} - vK_M/[S].$$
 (4.28)

График зависимости, построенный в координатах v (v/[S]) (см. рис. 4.3,  $\mathit{E}$ ), представляет собой прямую, которая отсекает на оси ординат (при v/[S] = 0) отрезок, равный  $V_{max}$ . Тангенс угла наклона этой прямой равен  $K_{M}$ , а отрезок, отсекаемый ею на

оси абсцисс —  $V_{max}/K_M$ . График Эдди — Хофсти лишен указанного выше для графика Лайнуивера — Берка недостатка. Считается, что при определении параметров  $K_M$  и  $V_{max}$  этот график дает более точные результаты. Однако недостаток представления данных в координатах v (v/[S]) состоит в том, что скорость реакции v, обычно рассматриваемая как зависимая переменная, входит как в величину, обозначенную на оси ординат, так и в величину, обозначенную на оси абсцисс.

Эйзенталь и Корниш-Боуден предложили третий метод графического представления результатов исследования кинетики ферментативных реакций, называемый «прямым линейным графиком» (рис. 4.3, В). Уравнение Михаэлиса — Ментен в этом случае записывается в виде

$$V_{\text{max}} = v + v K_{\text{M}}/[S].$$
 (4.29)

Таким образом, для любой пары значений [S] и v можно построить зависимость  $V_{max}$ от K<sub>M</sub>. Зависимость представляет собой прямую с наклоном, равным v/[S], и отрезками, отсекаемыми на осях, равными [S] и v. Каждая прямая соответствует одной экспериментальной точке и проводится таким образом, что отрезок, отсекаемый ею на оси абсцисс, равен [S], а на оси ординат – v. Если подобным образом провести прямые для нескольких пар значений [S] и v, то эти прямые пересекутся в одной точке, координаты которой дадут значения  $K_M$  и  $V_{max}$ , удовлетворяющие всем сочетаниям значений [S] и v (см. рис. 4.3, В). В реальном эксперименте положение точки пересечения определяется чем в идеальном случае, менее точно, представленном рисунке, экспериментальной ошибки. Однако, как правило, при этом можно найти оптимальную точку пересечения, где прямые располагаются наиболее плотно. Подобным методом можно выявить ошибочные данные, поскольку соответствующие прямые будут выпадать из основной совокупности пересекающихся прямых.

## 5. ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

На скорость ферментативной реакции могут влиять активаторы, стимулирующие каталитическую активность ферментов, и ингибиторы, подавляющие активность. Ингибирование — это действие веществ-ингибиторов, которые, взаимодействуя с ферментом, по тому или иному механизму тормозят катализ и уменьшают скорость ферментативной реакции. На основе ингибиторов ферментов создают различные лекарства, поэтому исследование ингибирования ферментативных реакций природными и синтетическими соединениями является одним из основных направлений в разработке лекарственных препаратов.

Природные ингибиторы – это чаще всего продукты биохимической цепи и в то же время ее регуляторы. Рассмотрим пример действия природного ингибитора. Фермент фосфофруктокиназа катализирует превращение фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6дифосфат с расщеплением ATP до ADP. Данная реакция является одним из этапов сложной цепи окисления глюкозы. В результате всего этого процесса происходит фосфорилирование ADP до ATP для накопления энергетических запасов клетки в виде АТР. При появлении в системе достаточного количества АТР процесс целесообразно затормозить, это и имеет место на этапе действия фосфофруктокиназы. У данного фермента, кроме активного центра связывания АТР как субстрата, есть другой сайт связывания АТР. Когда АТР с ним связывается, снижается скорость реакции фосфорилирования фруктозо-6-фосфата, и, таким образом, накопление АТР в цепи окисления глюкозы прекращается. Однако АТР в клетке расходуется, накапливается АDР и АМР, что свидетельствует о потребности в АТР, и это вновь вызывает активацию фосфофруктокиназы. Данный фермент связывает также ADP и AMP. Приведенный случай является примером аллостерического влияния - когда эффектор связывается с другими центрами, не с теми, с которыми связывается субстрат, и влияет на активность фермента

(см. разд. 6.1). ATP в данном случае называется аллостерическим ингибитором, а ADP и AMP – аллостерическими активаторами.

На основе ингибиторов ферментов создано множество лекарственных препаратов. Например, для воздействия на фермент ревертазу ВИЧ разработаны различные типы ингибиторов. В этом случае ингибирующие субстраты являются аналогами природных субстратов, т. е. встраиваются ферментом в цепь ДНК с помощью ДНК-полимеразной активности ревертазы, но при этом блокируют дальнейшее удлинение цепи ввиду замещения гидроксильной группы в 3'-положении дезоксирибозы. Эта группа необходима для удлинения растущей цепи ДНК-полимеразой. На рис. 5.1 показан пример ингибитора ревертазы — противовирусный препарат азидотимидин. Как правило, такие аналоги нуклеотидов используются в виде нуклеозидов, фосфорилирующихся в организме и уже в виде 5'-дезоксинуклеозидтрифосфатов являющихся субстратами в реакции синтеза нуклеиновой кислоты при репликации вирусной РНК или ДНК.

$$\begin{array}{c} O \\ HN \\ O \\ N_3 \end{array}$$

Рис. 5.1. Азидотимидин

Связывание ингибитора с ферментом может быть обратимым и необратимым. При обратимом связывании активность фермента восстанавливается при удалении ингибитора, т. е. между свободной формой фермента и ингибитором существует равновесие. Обратимое ингибирование характеризуется константой равновесия комплекса фермента с ингибитором и их свободными формами. Необратимое ингибирование при избытке ингибитора по отношению к ферменту приводит к полной инактивации фермента, поскольку при этом образуется

ковалентная связь ингибитора с аминокислотным остатком фермента.

Необратимыми ингибиторами являются, например, фосфорорганические соединения, используемые в качестве пестицидов или боевых отравляющих веществ. В организме человека, животных и насекомых такие нервнопаралитические яды фосфорилируют активный центр холинэстеразы и образуют ковалентную связь с этим ферментом. Другим примером необратимого ингибитора является хлормеркурийбензоат (n-ClHg-бензоат, рис. 5.2), который образует ковалентную связь с SH-группой аминокислоты цистеина, блокируя активность ферментов, имеющих функционально важные остатки цистеина. Взаимодействие этого реагента нуклеофильной группой (SH-группой цистеина) показано на рис. 5.2.

**Рис. 5.2.** Реакция присоединения реагента *n*-ClHg-бензоат по SH-группе цистеина

Обратимые ингибиторы (как правило, аналоги субстратов) применяются для изучения строения активных центров и механизма действия ферментов. Такие ингибиторы используются для определения порядка присоединения субстратов. Например, аналогом фенилаланина является фенилаланинол — ингибитор реакции аминоацилирования, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой (рис. 5.3).

$$K_d$$
 (Phe)~ $1\cdot 10^{-6}$  М, Фенилаланин Фенилаланин

**Рис. 5.3.** Формулы фенилаланина и фенилаланинола – аналога фенилаланина, конкурентного ингибитора фенилаланил-тРНК-синтетазы, и величины констант диссоциации их комплексов с фенилаланин-тРНК-синтетазой

Аминоацил-тРНК-синтетазы катализируют присоединение аминоацильного остатка аминокислоты к 2'- или 3'-гидроксильному остатку 3'-концевого аденозина транспортной РНК (тРНК) в ходе процесса трансляции. Модификация фенилаланина по карбоксильной группе, например замена этой группы на спиртовую, приводит к снижению сродства на порядок. Величина  $K_{\rm M}$  для фенилаланина  $\sim 1\cdot 10^{-6}$  M, а для фенилаланинола  $\sim 1\cdot 10^{-5}$  M. Карбоксильная группа необходима для активации аминокислоты и переноса аминоацильного остатка на тРНК, поэтому данный аналог взаимодействует с центром связывания фенилаланина, но не участвует в каталитическом превращении. Фенилаланинол является конкурентным ингибитором реакции аминоацилирования по отношению к фенилаланину. Это условие является необходимым для того, чтобы использовать аналог субстрата для определения порядка присоединения субстратов в ходе этой реакции (см. гл. 7).

## 5.1. Типы ингибирования

Рассмотрим, как влияет присутствие обратимого ингибитора на кинетические параметры на примере односубстратной реакции. В общем случае влияние ингибитора может быть описано следующей схемой взаимодействия фермента (E) с субстратом (S) и ингибитором (I) с образованием продукта реакции (P):

Здесь  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$ ,  $k_{-3}$ ,  $k_{-4}$ ,  $k_{\alpha}$ ,  $k_{\beta}$  — константы скорости соответствующих реакций,  $K_S$ ,  $K_S'$ ,  $K_I$ ,  $K_{I'}$  — константы диссоциации комплексов фермента с субстратом и/или ингибитором,  $\gamma$ ,  $\gamma'$ ,  $\delta$  — численные коэффициенты. В случае, когда продукт образуется из комплексов ES и ESI, скорость его образования является суммой скоростей двух реакций:

$$v = k_{\alpha}[ES] + k_{\beta}[ESI].$$

Далее рассмотрим случай  $k_{\beta}=0$ , т. е. когда тройной комплекс ESI не образует продукта. При этом скорость реакции образования продукта равна  $v=k_{\alpha}[ES]$  (при  $[S]_0$ ,  $[I]_0$  >>  $[E]_0$ ). В зависимости от значений численных коэффициентов различают несколько типов ингибирования. Рассмотрим четыре частных случая, разделяющихся по типу влияния на кинетические параметры реакции, имеющих особое значение и широко применимых для описания кинетики ферментативных процессов.

- 1. Конкурентное ингибирование.
- 2. Неконкурентное ингибирование.
- 3. Бесконкурентное ингибирование.
- 4. Смешанное ингибирование.

## 1. Конкурентное ингибирование ( $\delta = \gamma = 0$ )

$$E \xrightarrow{k_1 S \atop K_1} ES \xrightarrow{k_{\alpha}} P$$

$$EI$$

Уравнение баланса ферментных форм:  $E_0 = [E] + [ES] + [EI]$ .

а) В квазиравновесном приближении  $\mathbf{K}_{\mathbf{S}} = \frac{\mathbf{E} \mathbf{S}}{\mathbf{E} \mathbf{S}}, \mathbf{K}_{\mathbf{I}} = \frac{\mathbf{E} \mathbf{D}}{\mathbf{E} \mathbf{I}}.$ 

Из предыдущих трех уравнений получаем:

$$K_{I}[EI] = [I](E_{0} - [ES] - [EI]) \rightarrow [EI] = \frac{[I] E_{0} - [ES]}{I_{1} + [I]},$$

Таким образом, скорость образования продукта равна:

$$v = k_{\alpha}[ES] = k_{\alpha} \frac{K_{\alpha}E_{0}}{1 + K_{S}} = \frac{K_{\alpha}E_{0}}{1 + K_{S}} \left[1 + \frac{II}{K_{S}}\right] = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_{S}}{|S|}\left(1 + \frac{|I|}{|S|}\right)}. \quad (5.1)$$

б) В квазистационарном приближении



Выражение для скорости образования продукта отличается от выражения для квазиравновесных условий тем, что в него входит константа Михаэлиса вместо константы диссоциации фермент-субстратного комплекса:

$$v = k_{\alpha}[ES] = \frac{k_{\alpha} + k_{\alpha}}{1 + k_{\alpha} + k_{\alpha}} \left(1 + \frac{k_{\alpha}}{k_{\alpha}}\right) = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{\alpha}}{k_{\alpha}} \left(1 + \frac{|I|}{k_{\alpha}}\right)}.$$
(5.2)

В условиях конкурентного ингибирования  $V_{max}$  не изменяется, а эффективная величина  $K_M$  возрастает в  $\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)$  раз. Процесс замедляется, но при больших количествах субстрата может идти с прежней скоростью.

2. Неконкурентное ингибирование ( $\delta = \gamma = 1, K_S = K_S', K_I = K_I'$ )

$$E \xrightarrow{k_{1}S} ES \xrightarrow{k_{\alpha}} P$$

$$K_{I} \xrightarrow{k_{3}} \downarrow k_{3}I \xrightarrow{k_{1}} k_{4}I \xrightarrow{k_{4}} P$$

$$EI \xrightarrow{k_{2}S} ESI$$

$$K_{S} \xrightarrow{K_{S}} ESI$$

Уравнение баланса ферментных форм:  $E_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$ .

$$\mathbf{K} = \mathbf{K} + \mathbf{K} +$$

$$\begin{array}{c|c} \mathbf{F} & \mathbf{F} & \mathbf{F} \\ \mathbf{F} & \mathbf{F} & \mathbf{F} \\ \mathbf{F} & \mathbf{F} & \mathbf{F} \end{array} (\mathbf{K} = \begin{matrix} \mathbf{K}_3 & \mathbf{K}_4 \\ \mathbf{K}_3 & \mathbf{K}_4 \end{matrix}).$$

Подставляем в выражения для констант диссоциации значение [E] ( $[E] = E_0 - [ES] - [EI] - [ESI]$ ), полученное из уравнения материального баланса, и выводим систему уравнений, откуда легко можно выразить [ES] и получить уравнение для скорости образования продукта:

$$\begin{split} &(E_0 - [ES] - [EI] - [ESI])[S] = K_S[ES], \\ &(E_0 - [ES] - [EI] - [ESI])[I] = K_I[EI], \\ &[EI][S] = K_S[ESI], \\ &[ES][I] = K_I[ESI]. \end{split}$$

$$\mathbf{v} = \mathbf{k}_{\alpha}[\mathbf{ES}] = \boxed{ \begin{bmatrix} V_{\text{max}} \\ I + \frac{|I|}{K_1} \\ I + \frac{K_s}{|S|} \end{bmatrix}}. \tag{5.3}$$

Неконкурентное ингибирование приводит к изменению скорости насыщения, сохраняя значение эффективной константы (фермент действует с той же эффективностью, но медленнее).

## 3. Смешанное ингибирование ( $\delta = \gamma \neq 1$ , $K_S \neq K_S'$ , $K_I \neq K_I'$ )

$$\frac{K_I}{K_I'} = \frac{K_S}{K_S'}.$$

Скорость образования продукта:

$$v = k_{\alpha}[ES] = \frac{\mathbf{X}_{\mathbf{1}\mathbf{a}\mathbf{x}}}{\mathbf{1}+\mathbf{K}_{\mathbf{1}}^{\mathbf{L}}+\mathbf{K}_{\mathbf{1}}^{\mathbf{L}}} = \begin{bmatrix} \mathbf{V}_{\max} / \begin{pmatrix} 1 + |\mathbf{I}| / \\ |\mathbf{K}_{1}| \end{pmatrix} \\ 1 + \frac{\mathbf{K}_{s}}{|\mathbf{S}|} \begin{pmatrix} 1 + |\mathbf{I}| / \\ |\mathbf{K}_{1}| \end{pmatrix} \\ 1 + \frac{\mathbf{K}_{s}}{|\mathbf{S}|} \begin{pmatrix} 1 + |\mathbf{I}| / \\ |\mathbf{K}_{1}| \end{pmatrix} \end{bmatrix}.$$
 (5.4)

Присутствие ингибитора, действующего по смешанному типу, сходно по действию с неконкурентным ингибитором, однако влияет не только на  $V_{max}$ , но и на значение эффективной константы.  $V_{max}$  снижается в  $\left(1+\frac{[I]}{K_I'}\right)$  раз,  $K_S$  повышается при  $K_I < K_I'$  и снижается при  $K_I > K_I'$ .

## 4. Бесконкурентное ингибирование ( $\delta = \gamma' = 0$ )

$$E \xrightarrow{k_{1}S} ES \xrightarrow{k_{\alpha}} P$$

$$ESI$$

$$ESI$$

Уравнение баланса ферментных форм:  $E_0 = [E] + [ES] + [ESI]$ .

$$\begin{split} \mathbf{K}_{\!\!\!\mathbf{f}} &= & \underbrace{\mathbf{[E\$\!I]}}_{\!\!\!\!\mathbf{[EI]\!S}} \to \underbrace{\mathbf{[EI]\!S}}_{\!\!\!\!\mathbf{K}_{\!\!\!\mathbf{K}}}, \\ \mathbf{K}_{\!\!\!\mathbf{S}} &= & \underbrace{\mathbf{[E]\!S]}}_{\!\!\!\!\mathbf{[ES]}} \to (E_0 - [ES] - \underbrace{\frac{[ES][I]}{K_I}}) \, [S] = K_S[ES]. \end{split}$$

Таким образом, скорость образования продукта равна:

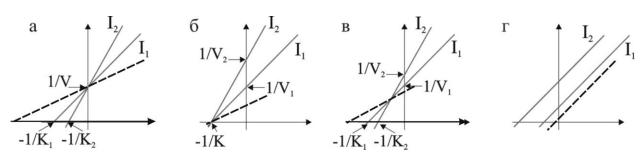
$$\mathbf{v} = \mathbf{k}_{\alpha}[\mathbf{ES}] = \boxed{ \begin{bmatrix} \frac{V_{\text{max}}}{I_{1}} \\ \frac{1}{|S|} \\ \frac{1}{|S|} \end{bmatrix} } . \tag{5.5}$$

Величины  $V_{max}$  и эффективной константы  $K_S$  изменяются пропорционально.

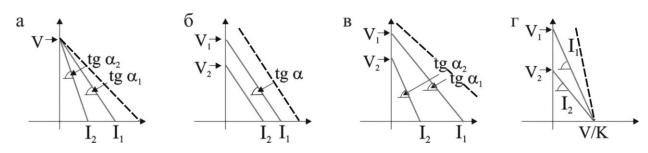
## 5.2. Графические методы определения кинетических параметров реакции, в том числе констант ингибирования

Обработка экспериментальных данных по влиянию ингибиторов на кинетику ферментативных реакций может быть проведена путем линеаризации кинетических кривых с помощью математических операций. Далее схематически показаны графики для всех четырех рассмотренных типов ингибирования в координатах Лайнуивера — Берка (1/v, 1/[S]), Эди — Хофсти (v, v/[S]), Диксона (1/v, [I]) и Корниш-Боуден ([S]/v, [I]) (рис. 5.4). Два последних метода (Диксона и Корниш-Боуден) обладают тем преимуществом, что позволяют определять значение константы ингибирования непосредственно из кинетических данных и не прибегать к дополнительным построениям. С другой стороны, вид графика в этих координатах не позволяет отличить смешанный тип ингибирования от конкурентного (метод Диксона) или бесконкурентный тип от смешанного (метод Корниш-Боуден). Таким образом, в ряде случаев ингибирования наиболее эффективным методом обработки экспериментальных данных является совокупный анализ графиков в различных координатах (например, Диксона и Лайнуивера — Берка).

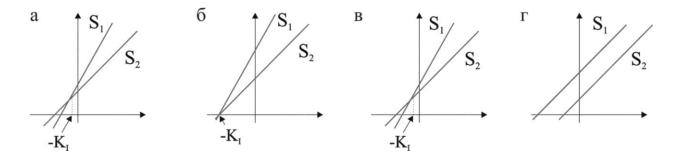
1) Метод Лайнуивера — Берка: 1/v (1/[S]),  $I_2 > I_1$ ,  $-1/K = -1/K_M(1 + [I]/K_I)$ .



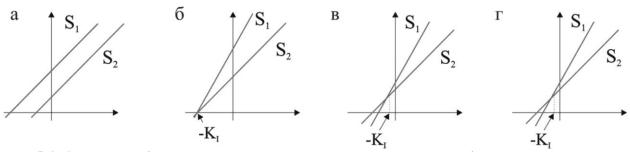
2) Метод Эди – Хофсти: v (v/[S]),  $I_2 > I_1$ , tg  $\alpha = -K = -K_M(1 + [I]/K_I)$ .



3) Метод Диксона: 1/v ([I]),  $S_2 > S_1$ .



4) Метод Корниш-Боуден: [S]/v ([I]),  $S_2 > S_1$ .



**Рис. 5.4.** Способы графического определения кинетических параметров ферментативной реакции для четырех рассмотренных типов ингибирования (a – конкурентное,  $\delta$  – неконкурентное,  $\epsilon$  – смешанное,  $\epsilon$  – бесконкурентное ингибирование) в координатах: I – Лайнуивера – Берка (1/v; 1/[S]), 2 – Эди – Хофсти (v; v/[S]), 3 – Диксона (1/v; [I]) и 4 – Корниш-Боуден ([S]/v; [I]); V – максимальная скорость реакции, K – эффективная константа,  $K_I$  – константа ингибирования. Пунктирной линией показаны графики для случаев в отсутствие ингибитора ([I] = 0)

# 5.3. Применение элементов теории графов для вывода кинетических уравнений в стационарном режиме

Зарождение теории графов относится к середине XVIII в. Приведем два графа, отображающих типичные задачи теории, изначально созданной для решения топологических задач.

Леонард Эйлер, прогуливаясь по набережным Кенигсберга (Калининграда), обратил внимание на оригинальное расположение семи мостов города. В 1736 г. им была сформулирована задача, положившая начало развитию теории графов: как пройти по всем семи мостам, при этом не проходя ни по одному дважды. Для решения этой задачи Эйлер ввел понятие «сети» – графа. На рис. 5.5, слева изображена схема задачи: два острова на реке, а справа – граф. Доказав, что эта задача не имеет решения, он придумал теорему: если сеть имеет не более двух «странных» (с нечетным количеством связей) вершин, есть, по крайней мере, один подобный путь.



**Рис. 5.5.** Граф Эйлера, 1736 г. «Проблема мостов Кенигсберга»: *слева* – схема задачи: два острова на реке и семь мостов; *справа* – граф

В химической кинетике было предложено использовать теорию графов для анализа кинетических схем в 1960-х гг. М. В. Волькенштейном. Данный подход был развит в работах Б. Н. Гольдштейна, а также Е. Кинга, К. А. Альтмана, М. И. Темкина и др.

## Определения метода графов

Граф – это схематическое изображение некоторого множества элементов и их взаимосвязей. Графы характеризуют какое-то определенное состояние системы: карту местности, схему электрических цепей, административное деление, схемы химических производств и установок; взаимосвязи атомов в химических соединениях: структурные формулы, кристаллические структуры; схему мероприятий: расписание игр, план путешествия, последовательность операций. В общем случае граф состоит из вершин узлов (баз) и соединяющих их линий. В применении к ферментативной кинетике узлам ферментные формы при условии приближенного сопоставляются концентрации лигандов ( $[S] \gg [E]$ ).

Ветви графа – линии, соединяющие узлы и имеющие направление. Ветвям графа соответствуют элементарные стадии ферментативной реакции.

Вес ветви – число, характеризующее ветвь графа и эквивалентное константе скорости реакции.

Путь графа – непрерывная совокупность ветвей, в которой ни одна из вершин не встречается более одного раза, является незамкнутой (отсутствуют циклы).

Базовое дерево – совокупность ветвей, проходящих через все узлы и ведущих к узлубазе.

Определитель узла (базы) (D) – сумма величин (базовых) деревьев.

Скорость ферментативной реакции можно выразить следующей формулой:

$$v = E_0 \frac{\sum k_r D_r}{\sum D_i},$$
(5.6)

где  $k_r$  – константа скорости реакции, приводящей к образованию продукта.

Таким образом, для того, чтобы найти выражение для скорости, нужно найти все определители узлов. Для упрощения расчетов есть несколько правил систематизации, процедура которой заключается в выборе вспомогательного начального узла, сжатии пути из начального узла в базовый и сложении параллельных ветвей. Пути, выходящие из базового узла, не учитываются, для того чтобы исключить образование замкнутых циклов.

Рассмотрим несколько примеров.

1.

Односубстратную ферментативную реакцию 
$$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} P$$

можно представить в виде графа

$$E \xrightarrow{k_{1}S} P$$

$$E \xrightarrow{k_{1}S} ES$$

В данном случае  $k_r = \mathbf{k}_2$ .

Вес параллельных ветвей, ведущих от узла ES к узлу E, складывается:

$$D_E = k_{-1} + k_2;$$

$$D_r = D_{ES} = k_1 S;$$

$$v = E_0 = \frac{\mathbf{k} \mathbf{S}}{\mathbf{k} \mathbf{S} \mathbf{k} \mathbf{S}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{E} \mathbf{S}}{\mathbf{k} \mathbf{S}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{E} \mathbf{S}}{\mathbf{k} \mathbf{S}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{E} \mathbf{S}}{\mathbf{k} \mathbf{S}}$$

помощью метода графов быть ингибирование может описано ферментативной реакции.

Например, конкурентное ингибирование представляется в виде графа:

$$EI \stackrel{k_i}{\longleftrightarrow} E \stackrel{k_2}{\longleftrightarrow} ES$$

Определители (D<sub>i</sub>) и их деревья (показаны стрелками):

$$D_{ES} = k_{.i}k_{1}S$$

$$D_{EI} = k_{.i}k_{i}I + k_{i}Ik_{2}$$

$$D_{E} = k_{.i}k_{.1} + k_{.i}k_{2}$$

$$v = E_{0}$$

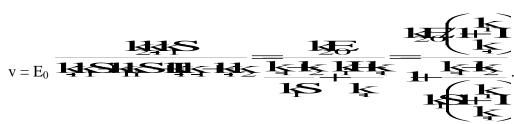
$$_{3\text{десь}} \frac{\mathbf{k}_{_{-i}}}{\mathbf{k}_{_{i}}} = \mathbf{K}_{_{\mathrm{I}}} - _{\mathrm{KOHCTAHTA}}$$
 ингибирования, а  $\frac{\mathbf{k}_{_{-i}} + \mathbf{k}_{_{2}}}{\mathbf{k}_{_{1}}} = \mathbf{K}_{_{-i}}$ 

Величина максимальной скорости в этом случае не зависит от концентрации ингибитора.

3. Бесконкурентное ингибирование можно представить в виде графа:

$$E \xrightarrow{k_1 S} ES \xrightarrow{k_1 I} ESI$$

Определители (D<sub>i</sub>) и их деревья (показаны стрелками):



B этом случае величина максимальной скорости и величина эффективной  $K_{M}$  изменяются пропорционально.

## 6. МЕХАНИЗМЫ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ

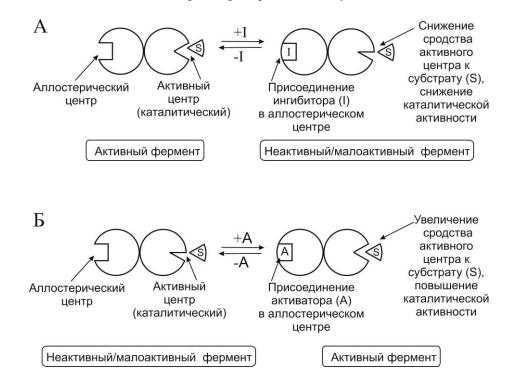
#### 6.1. Аллостерические ферменты

В ферментативном катализе существуют механизмы регуляции активности ферментов. Одному из таких механизмов регуляции подвергается определенный тип ферментов, получивших название аллостерических, от греч. «инопространственный»: «allo» – «другие» и «stereos» – «пространственный». Аллостерическими называют ферменты, активность которых регулируется веществами, называемыми эффекторами. Аллостерические ферменты имеют каталитический и регуляторный (аллостерический) центры, пространственно разобщенные, но функционально тесно взаимосвязанные. Каталитическая активность фермента меняется в результате связывания эффекторов с его регуляторным центром. Эти ферменты, как правило, занимают ключевые позиции в обмене веществ, располагаясь в «стратегических» пунктах клеточного метаболизма – начале метаболических путей или местах разветвлений, где расходятся или сходятся

несколько путей. Аллостерические ферменты сами бывают метаболитами того пути, регуляцию которого они осуществляют.

Эффектор, вызывающий снижение (ингибирование) активности фермента, является отрицательным эффектором, или аллостерическим ингибитором. Эффектор, вызывающий повышение (активацию) активности, является положительным эффектором, или аллостерическим активатором. Более редкий случай аллостерической регуляции — это когда сам субстрат может выступать в качестве эффектора. Такая регуляция называется гомотропной, в этом случае эффектор и субстрат — одно и то же вещество. Аллостерические ферменты имеют несколько центров связывания субстрата, которые могут выполнять как каталитическую, так и регуляторную функции. Аллостерические ферменты играют важную роль в метаболизме, так как они чрезвычайно быстро реагируют на малейшие изменения процессов метаболизма.

Как правило, аллостерические ферменты — это олигомерные белки, имеющие развитую четвертичную структуру и состоящие из 2, 4 или 6 субъединиц. Эффекторы взаимодействуют с дополнительным аллостерическим (регуляторным) центром фермента, отличным от активного центра и пространственно удаленным от него.



**Рис. 6.1.** Строение и функционирование аллостерических ферментов при взаимодействии с аллостерическим ингибитором (A) и аллостерическим активатором (B)

Некоторые ферменты имеют несколько аллостерических центров, часть из них специфична к активаторам, а другая — к ингибиторам. Регуляция аллостерических ферментов обратима: диссоциация эффектора от регуляторной субъединицы восстанавливает исходную каталитическую активность фермента. Взаимодействие фермента с эффектором влияет на кинетические параметры процесса. Это является результатом изменения конформации фермента и его активного центра при взаимодействии с эффектором.

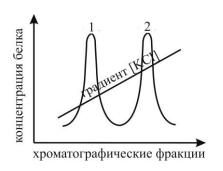
Один из примеров аллостерической регуляции, регуляция активности фосфофруктокиназы, был приведен в разд. 5.1. В данном примере осуществляется регуляция метаболического пути распада глюкозы. В ходе этого процесса накапливается ATP. Наряду с основным центром связывания ATP, у фосфофруктокиназы существует дополнительный центр. С помощью аллостерической регуляции фосфофруктокиназы

осуществляется контроль количества ATP — «энергетического запаса» клетки. ATP в данном случае является аллостерическим ингибитором, а ADP и AMP — аллостерическими активаторами.

Первым ферментом, для которого было показано, что центр связывания эффекторов, как правило, отличается по структурной организации от каталитического центра, была аспартат-карбамоил-трансфераза (АКТ-аза). АКТ-аза является ключевым ферментом биосинтеза пиримидинов. Этот фермент катализирует перенос карбамоильного остатка от карбамоилфосфата на аминогруппу L-аспартата, тем самым обеспечивая образование карбамоиласпартата, одного из промежуточных продуктов синтеза цитидинтрифосфата. Бактериальная АКТ-аза E. Coli состоит из шести каталитических (молекулярной массой 34 кДа) и шести регуляторных (16 кДа) субъединиц. Регуляторные субъединицы связывают аллостерические эффекторы CTP Работа фермента ингибируется И ATP. цитидинтрифосфатом (СТР) – конечным продуктом биосинтеза пиримидинов и активируется начальным участником процесса – АТР. Протекание реакции во времени приводит, в конце концов, к появлению СТР – конечного продукта этой метаболической цепи. По мере накопления СТР и его связывания с ферментом сродство к субстратам реакции снижается. При этом максимальная скорость реакции остается неизменной, и в этих условиях фермент включается в работу только при более высоких концентрациях субстрата. АТР конкурирует с СТР и может устранять его ингибирующее действие. Регуляция является обратимой, и при изменении в клетке концентрации АТР или СТР эффективность работы фермента изменяется. Таким образом фермент обеспечивает постоянное присутствие в клетке нужных количеств цитидинтрифосфата.

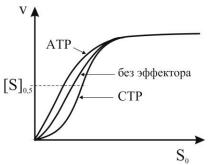
Для АКТ-азы было показано, что основная реакция может идти и в отсутствие регуляторных субъединиц. Однако при этом исчезает чувствительность к СТР. Установлено, что блокирование активности АКТ-азы эффектором (СТР) связано со вкладом остатков цистеина (Суѕ). Регуляторные субъединицы (молекулярной массой 16 кДа) содержат по две SH-группы цистеина на каждую субъединицу. Модификация остатков цистеина с помощью *n*-ClHg-бензоата (см. разд. 5.1, рис. 5.2) снижает эффективность связывания аллостерического ингибитора – СТР.

Оказалось, что каталитические и регуляторные субъединицы АКТ-азы можно разделить хроматографией (рис. 5.2), поскольку при модификации цистеинов *n*-ClHgбензоатом в полипептидные цепи вводятся два отрицательных заряда карбоксильных групп данного химического реагента. Карбоксильные группы теряют протон в нейтральной или щелочной среде, и регуляторные субъединицы в этих условиях связываются более прочно с положительно заряженным анионообменником, например, с диэтиламиноэтилцеллюлозой (ДЕАЕ). Дополнительно нужно разрушить ассоциацию субъединиц в ферменте, что может быть осуществлено в 8 М растворе мочевины, которая разрушает различные типы белок-белковых взаимодействий, в том числе водородные связи. Каталитические и регуляторные субъединицы были разделены на анионообменнике в градиенте концентрации соли в присутствии 8 М мочевины. Затем после диализа исследованы свойства каталитических субъединиц. Комплекс каталитических субъединиц в отсутствие регуляторных способен катализировать реакцию карбамоилирования, но при этом не наблюдается действия эффектора (СТР).



**Рис. 6.2.** Схема разделения каталитических и регуляторных субъединиц аспартат-карбамоилтрансферазы (АКТ-азы) с помощью анионообменной хроматографии в градиенте концентрации соли [KCI]. Первый пик 1 — выход каталитических субъединиц, второй пик 2 — выход регуляторных субъединиц

Выявить ферменты с аллостерической регуляцией можно, изучая кинетику их действия. Эти ферменты, как правило, не подчиняются закономерностям, описываемым уравнением Михаэлиса — Ментен. Кривые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в этом случае, как правило, имеют характерную S-образную форму (рис. 6.3). Такой S-образной кривой характеризуется взаимодействие центров фермента, связывающих лиганд, при котором сродство к нему растет по мере насыщения связывающих центров.



**Рис. 6.3.** График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в виде S-образной кривой на примере АКТ-азы: без эффектора, с АТР, с СТР. Субстрат – аспартат

Впервые S-образные функции насыщения ферментов субстратами были выявлены в 1909 г., когда А. Хилл предложил модель связывания кислорода с гемоглобином, которая описывала экспериментальные данные. Согласно этой модели центры связывания кислорода на молекулах гемоглобина не являются независимыми. Присоединение одной молекулы кислорода к одному из центров увеличивает сродство к кислороду других центров. Связывание двух молекул кислорода еще более облегчает связывание третьей. Такое связывание, при котором константы связывания идентичных центров изменяются по мере их заполнения лигандами, называется кооперативным. Аллостерические ферменты обладают способностью к кооперативным взаимодействиям: взаимодействие аллостерического эффектора с аллостерическим центром вызывает последовательное кооперативное изменение конформации всех субъединиц, приводящее к изменению конформации активного центра и изменению сродства фермента к субстрату, что или снижает, или увеличивает каталитическую активность фермента.

Для описания S-образных зависимостей насыщения активных центров используют так называемый коэффициент Хилла (h). Это безразмерная величина, характеризующая кооперативность связывания лиганда ферментом. Коэффициент Хилла является параметром следующего эмпирического уравнения:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{L}^{\mathbf{h}} \mathbf{J}$$

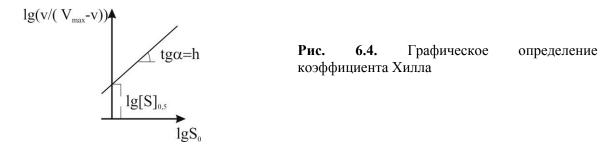
$$[\mathbf{L}_{\mathbf{g}}] \mathbf{H} \mathbf{L}^{\mathbf{h}}, \tag{6.1}$$

где Y – степень насыщения, [L] – равновесная концентрация лиганда и  $[L]_{0,5}$  – равновесная концентрация лиганда, при которой Y = 0,5 от максимального насыщения.

При переходе от функций насыщения к кривым зависимости скорости ферментативной реакции (v) от концентрации субстрата (S) уравнение принимает следующий вид:

$$\begin{array}{c}
\begin{array}{c}
\begin{array}{c}
\begin{array}{c}
\begin{array}{c}
\begin{array}{c}
\end{array}\\
\end{array}\\
\end{array}
\end{array}$$
(6.2)

Здесь  $V_{max}$  — максимальная скорость при  $S_0 \to \infty$ ,  $[S]_{0,5}$  — концентрация субстрата, при которой достигается половина от максимальной скорости реакции. Эта величина входит в данное уравнение вместо константы Михаэлиса  $K_M$ . Если известна величина  $V_{max}$ , то другие члены этого уравнения могут быть найдены путем линеаризации в координатах  $lg(v/(V_{max}-v))$  от  $lgS_0$  (рис. 5.4). Из тангенса угла наклона прямой определяется коэффициент Хилла (h):  $lg(v/(V_{max}-v)) = hlgS_0 - lg[S]_{0.5}$ .



Для ферментов, у которых кооперативного взаимодействия между активными центрами нет, т. е. сродство фермента к субстрату в этом случае не зависит от уже присоединенных молекул субстрата, h = 1. По величине коэффициента Хилла можно кооперативности между центрами фермента. типе Положительная кооперативность (h > 1) характеризуется тем, что присоединение одной молекулы субстрата к активному центру фермента увеличивает сродство к субстрату остальных активных центров. S-образные кривые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата характерны для положительной кооперативности. Например, коэффициент Хилла для связывания кислорода с гемоглобином, имеющим четыре центра связывания, равен h = 2,9. Отрицательная кооперативность характеризуется тем, что присоединение одной молекулы лиганда к активному центру фермента уменьшает сродство к лиганду остальных активных центров. Соответственно коэффициент Хилла в этом случае меньше единицы (h < 1). Отчетливым проявлением взаимодействия центров, связывающих аллостерический ингибитор в молекуле аллостерического фермента, является S-образная зависимость скорости реакции от концентрации ингибитора.

Модели аллостерических ферментов, предложенные к настоящему времени, различаются допущениями о числе возможных конформационных состояний, о степени согласования конформационных изменений протомеров в олигомере фермента и об относительном сродстве отдельных конформационных состояний фермента к различным аллостерическим лигандам.

Общий механизм аллостерических взаимодействий для тетрамерного белка (белка, состоящего из четырех равноценных субъединиц) может быть представлен схемой, предложенной на рис. 6.5. Белок построен из идентичных протомеров. Белковый олигомер может находиться в одном из двух взаимопревращающихся конформационных состояний: в менее активном Т-состоянии (от англ. «tense» — напряженное), с большей энергией взаимодействия протомеров в белке, и в более активном R-состоянии (от англ. «relaxed» — расслабленное), с меньшей энергией взаимодействия протомеров. На рис. 6.5 Т-состояние обозначено квадратом, а R-состояние — кругом. Конформации белка, соответствующие диагонали, проведенной из верхнего левого угла в правый нижний, представляют собой состояния, для которых переход из одного в другое индуцируется лигандом.

Например, аспартат-карбамоил-трансфераза может существовать в Т- и R-формах. Субстрат и эффекторы влияют на равновесие между этими состояниями и тем самым на сигмоидность кривой. С возрастанием концентрации аспартата равновесие смещается к R-форме. ATP стабилизирует R-состояние путем связывания с регуляторной субъединицей. Напротив, присоединение CTP содействует переходу в Т-состояние.

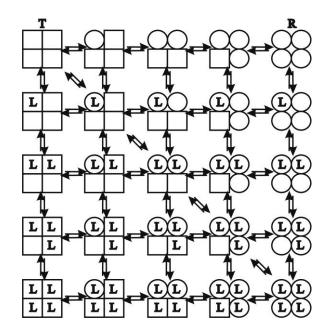


Рис. 6.5. Конформационные состояния и возможные переходы между ними при аллостерических взаимодействиях протомеров тетрамерного белка

Аллостерическая регуляция является одним из главных механизмов регуляции активности ферментов. Важнейшее значение в изменении скорости метаболических путей играет изменение каталитической активности одного или нескольких ключевых ферментов данного метаболического пути. Это высокоэффективный и быстрый способ регуляции метаболизма.

#### 6.2. Функциональные димеры

Многие ферменты имеют несколько активных центров, которые попарно эквивалентны, например оксидоредуктазы, аминоацил-тРНК-синтетазы и др. О структуре олигомерных ферментов накоплен значительный объем знаний. Получены результаты рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии белков по установлению их структуры. В большом числе случаев субъединицы таких ферментов идентичны, а их ассоциация осуществляется за счет нековалентных взаимодействий. Наиболее характерным свойством является высокая степень симметрии субъединиц. Например, молекулы алкогольдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы построены из двух эквивалентных субъединиц. Это наиболее распространенная структура ( $\alpha_2$ ), когда полипетидная цепь кодируется одним геном и сборка фермента происходит из двух эквивалентных субъединиц. Данные рентгеноструктурного анализа, полученные для аминоацил-тРНК-синтетаз со структурой α2-типа, также указывают на симметрию пространственной организации. Мышечная глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа состоит из четырех эквивалентных субъединиц.

Жак Моно, французский профессор, лауреат Нобелевской премии, предположил, что ассоциация мономеров позволяет уменьшить объем гидрофобной поверхности белка. Как он считал, более экономично иметь ассоциированные мономеры, чем увеличивать молекулярный вес белка в пересчете на активный центр. Существование кооперативных взаимодействий активных центров является следствием существования структур такого типа. Кроме того, это позволяет организовать в олигомер субъединицы различной химической природы, на которых в случае регуляторных ферментов можно расположить активные центры и регуляторные участки, разделив их в пространстве.

Как уже упоминалось выше, для аллостерических ферментов характерна кинетика сигмоидного типа в зависимости от концентрации субстрата и ингибитора. Для такого характера кинетических зависимостей необходимы полимерные структуры с непрямыми взаимодействиями различных активных центров. Однако обнаружилось, что целый ряд

ферментов, имеющих олигомерную структуру, тем не менее, подчиняется кинетике Михаэлиса и в то же время проявляет свойство отрицательной кооперативности при связывании субстратов.

Ухудшение связывания второго субстрата для фермента, состоящего из двух субъединиц, может объясняться различными причинами.

- 1. Активные центры, расположенные на различных субъединицах, изначально неравноценны.
- 2. Центры изначально равноценны, но их неэквивалентность возникает в результате гетерологической укладки субъединиц.
- 3. Один из центров экранирован, сродство фермента ко второму субстрату снижается по стерическим причинам.
- 4. Изменение структуры второго центра приводит к уменьшению сродства фермента к субстрату в результате конформационных перестроек субъединиц.

Отрицательная кооперативность может проявляться не только при связывании субстратов, но и в процессе образования продуктов реакции. Это явление рассматривается как механизм «реакционной способности половины активных центров» (half-of-the-sites reactivity). При таком механизме только один активный центр функционирует в единицу времени. В этом случае продукт формируется только на одном из центров функционального димера.

Тот факт, что олигомерные ферменты, имеющие несколько активных центров, подчиняются кинетике Михаэлиса, еще ничего не значит, так как допустимо независимое функционирование каждого из активных центров. Однако если при этом проявляется отрицательная кооперативность в связывании субстратов, то возникает парадокс, разрешить который удается в рамках механизма «реакционной способности половины активных центров» фермента. Механизм был обоснован на примере действия фермента щелочной фосфатазы из  $E.\ Coli$ , которая является димером ( $\alpha_2$ -типа) с молекулярным весом 94 000 кДа. Фермент катализирует гидролиз с отщеплением фосфата (реакция дефосфорилирования) от многих типов молекул, нуклеотидов и белков. Фермент проявляет наибольшую активность в щелочной среде. При катализе фермент связывает ионы двухвалентных металлов  $Zn^{2+}$  (а также  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и др.). Механизм действия фосфатазы сопровождается образованием фосфорилированной формы фермента и схематически выглядит следующим образом:

$$E + ROPO_3^{2-} \longrightarrow E \sim O-PO_3^{2-} + ROH \longrightarrow E + HPO_4^{2-}$$

Фосфорилирование гидроксильной группы остатка серина в активном центре происходит как при взаимодействии с субстратом, так и с продуктом реакции. Нековалентное связывание ортофосфата с Zn<sup>2+</sup> идет по двум центрам фосфатазы. Однако соответствующие константы диссоциации отличаются на порядок. Скорее всего, это объяснено наличием выраженной отрицательной кооперативности связывания. Для выяснения вопроса о том, имеет ли место отрицательная образовании ковалентных кооперативность при производных, было проведено фосфорилирование активных центров фосфатазы в условиях пониженных значений рН (кислых), когда эти производные устойчивы. В таких условиях была обнаружена отрицательная кооперативность. Кинетика фосфорилирования фермента, содержащего две фосфатные группы, была исследована с помощью изотопного обмена и оказалась двухфазной. При щелочном рН, который оптимален для катализа, обнаруживается фосфорилирование фермента только по одному из центров. Была исследована стабильность монофосфорилированных производных фосфатазы. Для объяснения механизма действия этого фермента была предложена схема, представленная на рис. 6.6.

Суть представленного механизма состоит в следующем. На первых двух стадиях фосфорилирование зависит от конформационного изменения, которое происходит при

связывании первой молекулы субстрата. Это внутрисубъединичная «активация», необходимая для стадии фосфорилирования. Фосфорилированная субъединица нуждается этапе взаимодействия, которое осуществляется посредством втором межсубъединичного сигнала при нековалентном связывании второго субстрата с центром связывания. Таким образом, внутрисубъединичная кооперативность обуславливает фосфорилирование, а межсубъединичная – дефосфорилирование.

Рис. 6.6. Схема механизма реакции,

Межсубъединичные взаимодействия необходимы как для фосфорилирования (\*Е), так и лля лефосфорилирования (\*\*F)

Рассмотрение стационарной кинетики механизма действия щелочной фосфатазы показывает, что кооперативное фосфорилирование и дефосфорилирование центров приводит, тем не менее, к кинетике Михаэлиса. Причина этого заключается в следующем.

На рис. 6.6 видно, что участвующие в каталитическом цикле ферментные формы E S и E S в отсутствие продуктов реакции идентичны, и поэтому реакция может быть представлена в виде следующей схемы (графа):

$$E \stackrel{k_1S}{\longleftrightarrow} ES \stackrel{k_2N}{\longleftrightarrow} EP \stackrel{k_3S}{\longleftrightarrow} EPS$$

В цикле взаимодействий, описываемых данной схемой, субстрат присоединяется к свободному ферменту только на одной стадии. Для этой схемы с помощью метода графов

можно получить следующее выражение для скорости реакции:  $v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{M}}{c}}$ , в котором  $V_{max}$ 

и К<sub>м</sub> имеют сложные значения:

$$Y_{n} = \frac{\frac{k_{2}k_{4}}{k_{2} + k_{4}}}{k_{2} + k_{4}} = \frac{k_{2}k_{4}}{k_{5} + k_{4}}$$

$$I_{5} = \frac{k_{2}k_{4}}{k_{5} + k_{4}}$$

$$I_{5} = \frac{k_{2}k_{4}}{k_{5} + k_{4}}$$

Функциональная димерность фермента нужна в основном для повышения числа оборотов ферментативной реакции, т. е. для повышения каталитической активности фермента. Действительно, для функционального димера можно ожидать, что диссоциация продукта реакции регулируетя более эффективно за счет межсубъединичных взаимодействий. Поскольку продукт реакции содержит структурные элементы исходной молекулы субстрата, дополнительный механизм, облегчающий диссоциацию продукта реакции, играет важную роль в увеличении числа оборотов ферментативной реакции.

В случае функционального димера на 1 моль фермента может приходиться 2 или 1,5 моля субстрата. Связывание менее двух молей субстрата на моль фермента можно наблюдать, когда вторая молекула субстрата связывается с ферментом с меньшим сродством. В этом случае действующими являются оба активных центра, но активность

второго во время функционирования первого подавляется. При связывании двух субстратов, как правило, величина Kd для второго субстрата выше, чем для первого. Отличия могут быть более одного порядка величины: для первого субстрата  $K_d(1) = [E][S]/[ES]$ , а для второго  $-K_d(2) = [ES][S]/[ES_2]$ .

Таким образом, регуляция активности в функциональных димерах осуществляется за счет межсубъединичных взаимодействий. Такие взаимодействия увеличивают число оборотов ферментативной реакции.

#### 7. МНОГОСУБСТРАТНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

Многие ферменты катализируют реакции превращения не одного, а нескольких ходе глицеральдегидфосфатдегидрогеназа субстратов. Например, гликолиза катализирует глицеральдегидфосфата 1,3-дифосфоглицерата окисление ДΟ  $HAД^{+}$ восстановлением второго субстрата \_ до НАД:Н. Односубстратных ферментативных реакций в природе много меньше, чем многосубстратных. К односубстратным можно отнести реакции изомеризации, в ходе которых происходят или геометрические изменения В молекуле одного (катализируются изомеразами), реакции отщепления от субстрата определенных групп с разрывом химических связей без гидролиза и с образованием двойной связи в одном из продуктов (катализируются лиазами). Реакции присоединения молекулы воды с разрывом связи в молекуле субстрата, катализируемые гидролазами, можно рассматривать как односубстратную реакцию только в водном растворе. Оксидоредуктазы, катализирующие окисление или восстановление, трансферазы, катализирующие перенос химических многоатомных групп как единого целого с одного субстрата на другой, и лигазы, катализирующие образование химических связей между субстратами, осуществляют катализ с участием двух или более субстратов.

#### 7.1. Определение кинетических параметров в стационарном режиме

Рассмотрим простейший случай многосубстратной реакции — реакцию с двумя субстратами. Здесь возможны два варианта механизмов, описывающих такой процесс.

Во-первых, возможен последовательный порядок связывания субстратов с ферментом с образованием тройного комплекса:

$$E+S_1 \xrightarrow{k_1} ES_1 + S_2 \xrightarrow{k_2} ES_1 S_2 \xrightarrow{k_3} E+P_1 + P_2$$

$$(7.1)$$

В том случае, если один из субстратов присутствует в большом избытке, рассмотрение двусубстратной реакции можно свести к односубстратной, причем в избытке должен быть субстрат, который присоединяется первым. Таким образом, для описания реального механизма реакции обязательно нужно знать порядок присоединения субстратов.

Для схемы с последовательным связыванием субстратов уравнение скорости образования продуктов реакции выглядит следующим образом:  $v=k_3[ES_1S_2]$ . Для нахождения значения  $[ES_1S_2]$  к системе уравнений добавляется уравнение баланса ферментных форм. Кроме того, процесс рассматривается как стационарный, т. е. концентрация промежуточных ферментных форм (комплексов фермента с субстратом) остается постоянной:

(7.2) 
$$\begin{cases} E_0 = [E] + [ES] + [ESS_2] \\ \frac{d[ES]}{dt} = 0 \\ \frac{d[ESS_2]}{dt} = 0 \end{cases}$$

При выводе уравнения скорости для этого механизма воспользуемся методом графов:

$$E \xrightarrow{k_1S_1} ES_1 \xrightarrow{k_2S_2} ES_1S_2$$

$$P_1P_2$$

Определители этого графа выглядят следующим образом:

 $D_E = k_{-1}k_{-2} + k_2S_2k_3 + k_{-1}k_3$ ;

 $D_{ES_1} = k_1 S_1 k_3 + k_1 S_1 k_{-2};$ 

 $D_{ES_1S_2} = k_1S_1k_2S_2$ .

Далее можно записать уравнение скорости образования продуктов реакции:

$$V = \frac{\mathbf{k} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}}{\mathbf{P}_{\mathbf{S}} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}}{\mathbf{P}_{\mathbf{S}} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}}{\mathbf{P}_{\mathbf{S}} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}}{\mathbf{P}_{\mathbf{S}} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}}{\mathbf{P}_{\mathbf{S}}} = \frac{\mathbf{k} \mathbf{P}_{\mathbf{S}}}{\mathbf{P}_{\mathbf{S}}}$$

Отметим, что в знаменатель уравнения скорости входит константа Михаэлиса для второго субстрата:  $K_{M(2)} = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}$ , а для первого субстрата — только сочетание констант  $k_3/k_1$ .

Для определения параметров реакции из экспериментальных данных это уравнение можно линеаризовать следующим образом:

Экспериментально для определения величин коэффициентов  $\varphi_i$  (параметров Дальциля) следят за накоплением продукта реакции во времени P(t), например по радиоактивности, флуоресценции или по изменению оптической плотности, при различных концентрациях  $S_1$  и  $S_2$  = const (рис. 6.1). Из построенных графиков определяется линейный участок зависимости P(t) и дальнейшие измерения проводят в этом диапазоне.

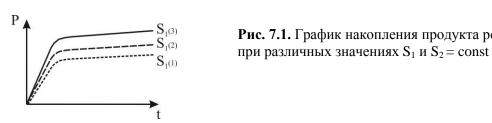


Рис. 7.1. График накопления продукта реакции Р во времени

Для графического определения параметров реакции строят график зависимости  $E_0/v(1/S_1)$  (желательно не менее 7 точек), из которого определяют величины  $a = \varphi_0 + \varphi_2/S_2$ и b =  $\phi_1 + \phi_{12}/S_2$  (рис. 7.2, A). Далее строят графики  $a(1/S_2)$  (рис. 7.2, B) и  $b(1/S_2)$  (рис. 7.2, B), из которых можно определить величины коэффициентов  $\phi_i$  и, таким образом, практически все константы скорости реакции, кроме  $k_2$  и k- $_2$ , которые могут быть определены в сочетании.

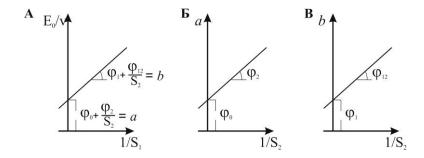


Рис. 7.2. Графическое определение параметров двусубстратной реакции с помощью параметров

Дальциля 
$$(\varphi_i)$$
:  $\varphi_0 = \frac{1}{k_3}$ ,  $\varphi_1 = \frac{1}{k_1}$ ,  $\varphi_2 = \frac{(k_2 + k_3)}{k_3 k_2}$ ,  $\varphi_2 = \frac{k_4 (k_2 + k_3)}{k_3 k_2}$ 

Если порядок присоединения двух субстратов в процессе образования тройного комплекса произвольный, а не последовательный (7.2), то схему реакции можно представить в виде (7.5).

$$E \xrightarrow{k_1 S_1} ES_1 \xrightarrow{k_2 S_2} ES_1 S_2 \xrightarrow{k_3} E+P_1+P_2$$

$$E \xrightarrow{k_2 S_2} ES_2 \xrightarrow{k_3 S_3} E+P_1+P_2$$

$$(7.5)$$

Кинетическая обработка этой схемы более сложная. Уравнение скорости реакции выводится с помощью метода графов согласно следующему уравнению:

$$v = \frac{1}{1 + 1} \frac{1}{1 + 1}$$

где  $D_{ES_1S_2}$  – определитель узла графа, в котором происходит образование продуктов реакции.

#### 7.2. Порядок присоединения субстратов. Методы его определения

Установление порядка присоединения субстратов является одной из самых важных задач, стоящих перед экспериментатором, поскольку от этого зависит, какой схемой будет описываться ферментативная реакция и как будут рассчитываться ее параметры.

Порядок присоединения субстратов можно оценить с помощью следующих методов:

- 1) гель-фильтрации;
- 2) метода задержки в геле (gel retardation, или electrophoretic mobility shift assay EMSA);
- 3) тушения флуоресценции (например, можно следить за изменением интенсивности флуоресценции остатков триптофана (Trp) в молекуле фермента при комплексообразовании с субстратом).

Однако экспериментов по комплексообразованию для определения порядка присоединения субстратов может быть недостаточно, поскольку существует вероятность, что фермент образует с субстратом «непродуктивный» комплекс, отличный от того комплекса, из которого в ходе реакции образуются продукты. Это может вносить

искажение в экспериментальные данные. Поэтому сделать окончательные выводы о порядке присоединения субстратов на основе таких экспериментов не всегда возможно.

Для определения порядка присоединения субстратов часто используют их аналоги. В случае аналога субстрата кинетические характеристики ферментативной реакции ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ) могут измениться, как правило, для тех стадий, в которых принимает участие данный субстрат. Это позволяет определить порядок присоединения субстратов в ходе ферментативной реакции.

Например, для исследования порядка присоединения субстратов в случае аминоацил-тРНК-синтетаз в качестве аналогов субстратов могут быть использованы фторированные аналоги фенилаланина для фенилаланил-тРНК-синтетазы (рис. 7.3) и фторированные аналоги триптофана для триптофанил-тРНК-синтетазы. Исследование порядка присоединения субстратов для триптофанил-тРНК-синтетазы было проведено таким методом [2].

Фторированные аналоги аминокислот являются субстратами аминоацил-тРНКсинтетаз и могут заменять в реакции природную аминокислоту. Их использование позволяет выявить стадии ферментативной реакции, в которых они принимают участие, поскольку изменяются кинетические параметры именно этих стадий.

$$H_2$$
 — СООН  $H_2$  — СООН  $H_$ 

**Рис. 7.3.** Пример аналога фенилаланина для эксперимента по установлению порядка присоединения субстратов в реакции, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой

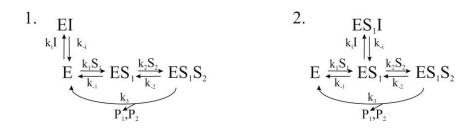
Для определения порядка присоединения субстратов применяется также метод конкурентных ингибиторов, в котором используются аналоги субстратов, ингибирующие ферментативную реакцию. В этом случае ингибитор влияет на ту стадию реакции, в которой принимает участие субстрат, аналогом которого является данный ингибитор.

Рассмотрим реакцию, катализируемую фенилаланил-тРНК-синтетазой (E). Этот фермент катализирует аминоацилирование тРНК с образованием фенилаланил-тРНК:

$$E + ATP + Phe \longrightarrow E \cdot [Phe \sim AMP] + pp_i$$
  
 $E \cdot [Phe \sim AMP] + TPHK^{Phe} \longrightarrow E + Phe \sim TPHK^{Phe} + AMP$ 

Для установления порядка присоединения субстратов методом конкурентных ингибиторов также можно использовать аналоги фенилаланина (Phe), которые должны сохранять в своей структуре аминогруппу, поскольку при ее замене сродство субстрата к ферменту резко падает, а также ароматическое кольцо, так как оно тоже участвует в узнавании субстрата. В качестве аналога аминокислоты использовали фенилаланинол (Phe-ol), являющийся конкурентным ингибитором фенилаланина в реакции аминоацилирования (см. разд. 5.1, рис. 5.3).

Рассмотрим два механизма двусубстратной реакции, которые возможны при использовании ингибиторов реакции. В первом случае ингибитор образует комплекс с ферментом EI, во втором — тройной комплекс  $\mathrm{ES}_1\mathrm{I}$ . Очевидно, что данным схемам реакции будут соответствовать различные уравнения, описывающие зависимость скорости реакции от концентраций субстратов и ингибитора. Отличие в кинетических схемах в присутствии ингибиторов позволяет определить порядок присоединения субстратов:



Если фенилаланин является первым субстратом, то ингибирование реакции фенилаланинолом осуществляется согласно первой схеме, и, следовательно, первым субстратом является аминокислота. Если фенилаланин — второй субстрат, то ингибирование происходит согласно второй схеме, и первым субстратом является АТР. Для установления порядка присоединения субстратов нужно вывести уравнения для механизмов 1 и 2. Для этого воспользуемся методом графов (см. разд. 5.4).

1. Определители для первого механизма выглядят следующим образом:

 $D_E = k_{-i}(k_{-1}k_{-2} + k_2S_2k_3 + k_{-1}k_3);$ 

 $D_{ES_1} = k_{-i}(k_1S_1k_3 + k_1S_1k_{-2});$ 

 $D_{ES_1S_2} = k_{-i}k_1S_1k_2S_2;$ 

 $D_{EI} = D_E k_i I/k_{-i} = k_i I(k_2 S_2 k_3 + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3).$ 

Далее представлено уравнение скорости образования продуктов реакции:



2. Определители графа для второго механизма выглядят следующим образом:

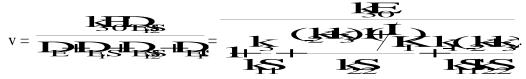
 $D_E = k_{\text{-}i}(k_{\text{-}1}k_{\text{-}2} + k_2S_2k_3 + k_{\text{-}1}k_3);$ 

 $D_{ES_1} = k_{-i}(k_1S_1k_3 + k_1S_1k_{-2});$ 

 $D_{ES_1S_2} = k_{-i}k_1S_1k_2S_2;$ 

 $D_{ES_1I} = D_{ES_1}k_iI/k_{-i} = k_iI(k_1S_1k_3+k_1S_1k_{-2}).$ 

Уравнение скорости образования продуктов реакции в случае этого механизма следующее:



Уравнения для скорости реакции могут быть представлены в виде линейных анаморфоз, которые с очевидностью будут различными для двух механизмов. Это позволит установить схему механизма, т. е. порядок присоединения субстратов в данной ферментативной реакции. На основании экпериментов, проведенных с использованием ингибитора, и последующего анализа предполагаемых схем механизмов реакции было установлено, что чаще всего, в том числе в реакции аминоацилирования тРНК, первым субстратом является специализированный субстрат. В реакции аминоацилирования это ATP, хотя комплекс  $ES_1$  может быть менее прочным, чем комплекс со вторым субстратом  $ES_2$ .

### 8. НЕСТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

## 8.1. Определение кинетических параметров ферментативных реакций в нестационарной кинетике

Кинетические исследования ферментативных реакций, протекающих стационарных условиях, обычно позволяют определить только два параметра: константу Михаэлиса  $K_{M}$  и константу скорости реакции  $k_{cat}$ . В некоторых случаях удается выявить промежуточные соединения и измерить константы скорости отдельных стадий. Чтобы обнаружить «короткоживущие» промежуточные соединения, необходимо измерить скорость приближения системы к стационарному состоянию. Индивидуальные константы скорости могут быть измерены за промежуток времени, в течение которого устанавливается ЭТО состояние. Переходная фаза реакции, предшествующая стационарной, получила название предстационарной. Как правило, нестационарная кинетика позволяет достаточно детально проанализировать стадийность процесса. Поскольку значения  $k_{cat}$  лежат в интервале  $1-1\cdot10^7$  с<sup>-1</sup>, измерения следует проводить за времена от  $1.10^{-7}$  до 1 с. Для этого требуется аппаратура для быстрого смешивания и последующего наблюдения за ферментом и субстратом. Кроме того, поскольку наблюдаемые события происходят на самом ферменте, необходимо подобрать такие концентрации фермента и субстрата, чтобы измерения происходили в рамках одного оборота ферментативной реакции.

Рассмотрим схему ферментативной реакции с участием одного промежуточного соединения:

$$E+S \xrightarrow{k_1} X \xrightarrow{k_2} E+P \tag{8.1}$$

где Х – промежуточный комплекс.

Кинетика данной реакции описывается системой уравнений:

Ее решение можно существенно упростить, если использовать некоторые условия экспериментального характера, позволяющие привести дифференциальные уравнения к линейному виду. При большом избытке субстрата ( $[S_0] >> [E_0]$  и  $[S] \approx [S_0]$ ) и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) систему можно описать с помощью следующих уравнений:

$$\begin{cases} \frac{d[X]}{dt} = k_1[E]S_0 - (k_2 + k_1)[X] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \\ E_0 = [E] + [X] \end{cases}$$
(8.3)

Исключением переменной [E] дифференциальное уравнение может быть преобразовано к виду

$$d[X]/dt + (k_1S_0 + k_{-1} + k_2)[X] = k_1E_0S_0.$$
(8.4)

Решение этого неоднородного уравнения имеет вид

$$[X] = C'(t)\exp[-(k_1S_0 + k_2 + k_1)t].$$
(8.5)

Чтобы найти C'(t), продифференцируем выражение (8.5) и подставим полученное значение в уравнение (8.4):

$$[X] = \frac{\mathbf{k_1 E_S}}{\mathbf{k_2 + k_2 + k_2}} + Ce^{-(k_1 S_1 + k_2 + k_1)t}.$$
 (8.6)

С учетом начальных условий [X](0) = 0 получим:

$$C = -\frac{k_1 E_0 S_0}{k_1 S_0 + k_2 + k_1}; [X] = \frac{E_0 S_0}{S_0 + K_M} (1 - e^{-k_1 S_0 + K_M})^{t}). (8.7)$$

Как видно из последнего уравнения, концентрация промежуточного интермедиата Х возрастает во времени и стремится к пределу:

$$[X]_{\text{lim}} = [X]_{\text{crau}} = \frac{E_0 S_0}{S_0 + K_M}.$$
 (8.8)

При  $S_0 >> K_M$  зависимость (8.7) концентрации промежуточного интермедиата X от времени имеет вид

$$[X] = E_0(1 - e^{-\frac{t}{N}} \int_0^{S} t). \tag{8.9}$$

При  $S_0 << K_M$ :

$$[X] = \frac{E_0 S_0}{K_M} (1 - e^{-k_1 K_M}). \tag{8.10}$$

Из кинетики накопления X может быть найдена константа скорости  $k_1$  и сумма констант скоростей  $k_{-1} + k_2$ . Для этого введем функцию  $\tau$ :

$$\tau^{-1} = k_1 S_0 + k_2 + k_{-1}. \tag{8.11}$$

Тогда из уравнения (8.7) получим:

$$\ln\left(\frac{1}{1} \underbrace{\mathbf{x}}_{m,q_{ij}} \underbrace{\mathbf{t}}_{\mathbf{z}}\right) \tag{8.12}$$

По тангенсу угла наклона прямой  $(\ln(1-[X]/[X]_{crau}), t)$  найдем  $\tau^{-1}$ . Проведя эксперименты при различных начальных концентрациях субстрата, можно построить график зависимости  $\tau^{-1}(S_0)$  и найти  $k_1$  и  $k_{-1}+k_2$  (рис. 8.1):

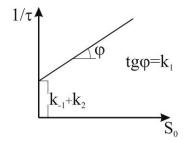


Рис. 8.1. Определение элементарных констант для  $E+S \xrightarrow{k_1} X \xrightarrow{k_2} E+P$  механизма из данных по предстационарной кинетике реакции

Константу  $k_2$  находят из стационарной скорости реакции, тогда  $k_{-1}$  можно определить из суммы  $k_{-1} + k_2$ .

Рассмотрим кинетическое появление лабильных интермедиатов в более общем случае — для реакции превращения субстрата в продукт с участием произвольного числа n промежуточных соединений:

 $E + S \xrightarrow{k_1} X_1 \xrightarrow{k_2} ... X_i ... X_n ... \xrightarrow{k_{n+1}} E + P$  (8.13)

При условии  $S_0 >> E_0$  нелинейный член уравнения  $k_1 \cdot E \cdot S$  можно заменить на псевдолинейный  $k_1 \cdot E \cdot S_0$ . В этом случае кинетику процесса (систему из n+1 линейных уравнений) можно записать в виде

Линейным дифференциальным уравнением с постоянными коэффициентами этой системы будет уравнение

$$d^{n}X_{n}/dt^{n} + a_{1}d^{n-1}X_{n}/dt^{n-1} + \dots + a_{n}X_{n} = b.$$
 (8.15)

Решение этого неоднородного уравнения имеет вид

$$X_n(t) = \sum A_i \exp(\lambda_i t) + b/a_n, \qquad (8.16)$$

где  $\lambda_i$  – однократные корни характеристического уравнения

$$\lambda_n + a_1 \lambda_{n-1} + \ldots + a_n = 0.$$

Корни этого уравнения имеют размерность обратного времени  $\tau^{-1} = -1/\lambda_i$ . После их подстановки в линейное дифференциальное уравнение (8.15) и интегрирования получаем:

$$P_{n}(t) = \sum_{i=1}^{n} k_{n+1} A_{i}(\exp(\lambda_{i}t) - 1) / \lambda_{i} + k_{n+1} bt / a_{n}.$$
(8.17)

Следует отметить две особенности изменения во времени концентрации продукта реакции.

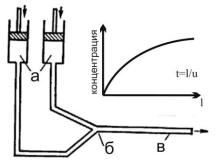
- 1. После протекания реакции в предстационарном режиме по истечении времени  $t >> \tau_i$ ,  $i=1,\ldots,n$ , реакция переходит в стационарный режим, характеризуемый стационарной скоростью  $v_{c\tau}=k_{n+1}bt/a_n$ , где величины  $a_n$  и b являются функциями элементарных констант и начальных скоростей фермента и субстрата и в каждом конкретном случае определяются как коэффициенты линейного дифференциального уравнения (8.15).
- 2. Концентрация промежуточного соединения описывается суммой экспоненциальных членов, а концентрация конечного продукта суммой экспонент и линейным членом, причем число экспонент соответствует числу промежуточных соединений в механизме реакции.

Реально в эксперименте может наблюдаться меньшее число экспоненциальных членов. Это связано с методическими особенностями регистрации кинетической кривой и временной разрешающей способностью установки. Поэтому наблюдаемое число экспоненциальных членов позволяет оценить лишь минимальное число промежуточных соединений, принимающих участие в реакции.

## 8.2. Экспериментальные методы исследования механизмов ферментативных реакций

При изучении кинетики ферментативных реакций в предстационарном режиме широко используются *струевые методы*, позволяющие смешивать два раствора за доли миллисекунды.

Струевые методы для измерения кинетики быстрых реакций в растворе впервые были использованы Г. Хартриджем и Ф. Роутоном в 1923 г. и позднее получили развитие благодаря работам Б. Чанса. Сущность этой группы методов заключается в том, что реакция инициируется быстрым смешиванием реагентов в проточных условиях. Различают три струевых метода: метод непрерывной, ускоренной и остановленной струи. В методе *непрерывной струи* два раствора реагирующих веществ поступают в смесительную камеру, а затем в трубку, в которой на некотором расстоянии от места смешения определяется концентрация одного из реагентов или продуктов реакции (рис. 8.2).



**Рис. 8.2.** Принципиальная схема установки, используемой в методе непрерывной струи:

a — растворы реагирующих веществ;

 $\delta$  — смесительная камера;

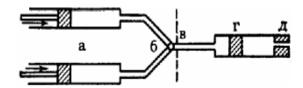
в – устройство для наблюдения за реакцией

Время t в этом методе при постоянной скорости потока u определяется расстоянием 1 от смесительной камеры: t = 1/u. Время протекания реакции прямо пропорционально расстоянию, пройденному реакционной смесью от смесительной камеры до места в трубке, где проводят измерения. Например, если скорость струи равна 10 м/c, то на расстоянии 1 см от смесителя «возраст» раствора будет равен 1 мc, на расстоянии 10 см - 10 мc и т. д. Меняя расстояние от точки смешения до места измерения, можно получить данные для построения кинетической кривой. Время смешивания растворов для этого метода составляет 1-2 мc. Скорость потока по трубке диаметром 1-2 мм обычно составляет несколько м/c. Это позволяет изучать кинетику реакций со временем полупревращения, равным нескольким миллисекундам. Погрешность измерения константы скорости составляет 2-5%.

По методу ускоренной струи растворы реагирующих веществ помещают в шприцы, поршни которых приводят в движение резким толчком в течение примерно 0,1 с. Наблюдение проводят в фиксированной точке вблизи смесительной камеры. При этом скорость течения жидкости и, следовательно, время протекания реакции постоянно меняются. Методика ускоренной струи позволяет использовать весьма малые объемы реагирующих веществ (до 0,1 мл), что является важным преимуществом при исследовании ферментативных реакций. Диапазон измеряемых констант скоростей составляет  $1\cdot10^2-1\cdot10^7$  л·моль $^{-1}\cdot c^{-1}$ .

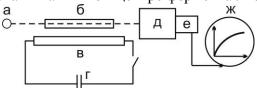
Наиболее широкое распространение нашел метод *остановленной струи*. Для остановки струи используют простое устройство, которое позволяет остановить поток за 1–2 мс. Это устройство представляет собой поршень, помещенный в конце трубки для наблюдений. Реакционная смесь толкает его, и он резко останавливается, доходя до внешних ограничителей (рис. 8.3).

**Рис. 8.3.** Принципиальная схема установки, используемой в методе остановленной струи: a — растворы реагирующих веществ;  $\delta$  — 52 смесительная камера;  $\epsilon$  — точка наблюдения;  $\epsilon$  — останавливающий поршень;  $\delta$  — ограничитель



При развитии методов исследования нестационарной кинетики необходимо было увеличить временную разрешающую способность. Подобное преимущество дает использование метода *импульсного фотолиза* (флеш-метод). Этот метод применяется для реакций, которые инициируются действием света за счет протекающих в системе фотохимических реакций. В отличие от «струевых» методов метод импульсного фотолиза не требует быстрого смешивания реагентов.

Реакция инициируется под действием мощного светового импульса, направленного на раствор фермента с веществом, которое под действием света превращается в субстрат или эффектор ферментативного процесса (рис. 8.4). Фотохимическая реакция может протекать в активном центре фермента либо вне него.



**Рис. 8.4.** Принципиальная схема установки импульсного фотолиза: a – источник света;  $\delta$  – кювета с исследуемым раствором;  $\epsilon$  – импульсная лампа;  $\epsilon$  – высоковольтный конденсатор;  $\delta$  – монохроматор;  $\epsilon$  – фотоумножитель;  $\epsilon$  – детектор

«Мертвое» время метода определяется двумя параметрами: временем импульсной вспышки и временем фотохимического образования соответствующего компонента ферментативной реакции. Ксеноновая импульсная техника позволяет получить мощные импульсы света продолжительностью 10–100 мксек. Время вспышки может быть уменьшено без уменьшения мощности при использовании лазерной техники.

Релаксационные методы исследования химической реакции основаны на принципе быстрого внешнего воздействия на систему путем изменения температуры, давления или электрического поля. Время, которое нужно системе для достижения нового равновесного, или стационарного, состояния, зависит от скорости химической реакции либо иногда от скорости диффузии реагентов. Переход системы к новым равновесным концентрациям реагентов называется «химической релаксацией». Если отклонение от равновесия, вызванное внешним воздействием, невелико, кинетика релаксации будет описываться линейным дифференциальным уравнением.

При анализе механизмов ферментативных реакций широкое применение нашел метод температурного скачка. Разработана достаточно простая и надежная аппаратура, позволяющая осуществить изменение температуры за несколько микросекунд. Данный метод позволяет работать с небольшим объемом исследуемого раствора (до 0,1 мл). Раствор инкубируют в кювете спектрофотометра или флуориметра, а затем менее чем за 1 мкс повышают температуру на 5–10 °C с помощью разряда конденсатора (или за 10–100 нс с помощью инфракрасного лазера). Если при этом изменяется энтальпия системы, то смещается и положение равновесия. Система оказывается неравновесной и начинает релаксировать к новому положению равновесия.

Внешнее влияние, возмущающее систему, может иметь разную физическую природу. В общем случае константа равновесия является функцией не только температуры, но и давления, электрического поля. Помимо рассмотренного метода температурного скачка внешнее воздействие на систему можно осуществить, изменяя давление (скачок давления, поглощение ультразвука) или электрическое поле (метод электрического импульса). Релаксационные методы имеют весьма высокую разрешающую способность, их применение позволяет исследовать процессы со временем релаксации до  $10^{-10}$  с (табл. 8.1).

Разрешающая способность релаксационных методов

Метод	Разрешающая способность, с
Поглощение ультразвука	$10^{-6} - 10^{-10}$
Температурный скачок	$10^{-4} - 10^{-6}$
Метод электрического импульса	$10^{-4} - 10^{-6}$
Скачок давления	10 <sup>-2</sup>

Рассмотрим принципы релаксационной кинетики на примере простейшей реакции комплексообразования фермента с каким-либо лигандом А:

$$E + A \xrightarrow{k_1} EA \tag{8.18}$$

В начальном состоянии система находится в равновесии, которое характеризуется равновесными концентрациями  $[\overline{E}], [\overline{A}], [\overline{EA}]$  и константой равновесия:

$$K = \frac{\overline{[E][A]}}{\overline{[EA]}}.$$
 (8.19)

Предположим, что в системе резко изменяется температура  $(T \rightarrow T_0 + \Delta T)$ . Это приводит к изменению константы равновесия  $(K \rightarrow K_0 + \Delta K)$ . После быстрого изменения температуры исходные концентрации компонентов не соответствуют новому равновесию, характеризующемуся константой  $K_0 + \Delta K$ , и система переходит в новое равновесное состояние. При этом кинетика реакции описывается дифференциальным уравнением

$$d[EA]/dt = k_1[E][A] - k_{-1}[EA], (8.20)$$

в котором текущие концентрации связаны с равновесными по уравнению:

$$[EA] = [\overline{EA}] + \Delta[EA]; [E] = [\overline{E}] + \Delta[E]; [A] = [\overline{A}] + \Delta[A].$$
(8.21)

Уравнение (8.20) нелинейно, поскольку содержит произведение переменных [Е][А]. Анализ кинетики существенно упрощается, если отклонение от равновесия, вызываемое внешним фактором, невелико, т. е.  $[E] >> \Delta[E], [A] >> \Delta[A]$ . В этом случае можно пренебречь произведением переменных. С учетом равенства (из материального баланса)  $\Delta[A] = \Delta[E] = -\Delta[EA]$  уравнение (8.20) становится линейным дифференциальным уравнением с постоянными коэффициентами:

$$d(\Delta[EA])/dt + (k_1([\,\overline{E}\,] + [A]\,k_{-1})\Delta[EA] = k_1[\,\overline{E}\,][\,\overline{A}\,] - k_{-1}[\,\overline{EA}\,]. \tag{8.22}$$

Решение этого дифференциального уравнения представляет собой экспоненциальную функцию времени, в которой показатель экспоненты связан с элементарными константами скорости реакции уравнением (8.23). Величина т называется временем релаксации. При анализе зависимости времени релаксации от равновесных концентраций фермента и лиганда могут быть найдены элементарные константы скорости реакции (8.18).

$$\tau^{-1} = k_1([\overline{E}] + [\overline{A}]) + k_{-1}.$$
 (8.23)

# 9. ПРИМЕНЕНИЕ ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ФЕРМЕНТОВ

Для изучения структуры и функций активных центров ферментов используются различные методы. Назовем наиболее распространенные среди них.

- **1.** Рентгеноструктурный анализ (PCA) и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) методы исследования структуры биополимеров и их комплексов с лигандами.
  - 2. Сайт-направленный мутагенез.
- **3.** Химическая модификация и ее более специфический тип аффинная модификация (см. гл. 10).

Изучение структуры и функции ферментов проводится и с помощью других методов, например, основанных на использовании флуоресцентных и спиновых меток.

Метод группоспецифической химической модификации является традиционным и давно известным методом исследования ферментов и их активных центров. Оценка реакционной способности различных аминокислотных остатков в составе фермента позволяет получить информацию о микроокружении этих функциональных групп и, следовательно, о состоянии различных участков молекулы фермента. Модификация реагентами, специфичными к определенным функциональным группам аминокислотных остатков, может быть применена для придания белку новых свойств, а также для изучения взаимодействия ферментов с субстратами, так как в области контакта фермента при образовании его комплексов с субстратами реакционноспособные группы оказываются модификации. При модификации защищенными химической фермента исследователями решаются следующие задачи.

- 1. Осуществляется выбор реагентов, специфичных к определенным аминокислотам.
- 2. Исследуется ковалентное присоединение химического реагента к белку и определяется стехиометрия его присоединения.
- 3. Определяется уровень инактивации фермента, как следствие такого воздействия.

При изучении структуры и функций ферментов их модификация должна проводиться в условиях, когда они сохраняют нативную, «физиологически активную» структуру. Это накладывает ограничения на возможность применения для модификации различных реагентов. Удобными для изучения структуры ферментов являются простые одностадийные реакции, приводящие к образованию аддукта с известной структурой и свойствами.

Определение уровня модификации удобно проводить при использовании радиоактивных или флуоресцентных «меток». Такую метку используют для слежения за модификацией, к тому же наличие ее в реагенте позволяет оценить стехиометрию его ковалентного присоединения.

После реакции модификации проводится анализ образовавшихся ковалентных аддуктов. Положение модифицированных аминокислотных остатков в структуре ферментов определяется с помощью протеолитического гидролиза и последующей идентификации позиций модификации. Для этой цели модифицированный фермент гидролизуют с помощью протеаз, например, пепсина, трипсина или химотрипсина. Пепсин предпочтительно расщепляет пептидные связи вблизи ароматических аминокислот (тирозина и фенилаланина). Трипсин расщепляет пептидные связи вблизи основных, положительно заряженных аминокислот (лизина, аргинина). Химотрипсин предпочтительно расщепляет пептидные связи вблизи остатков ароматических аминокислот (тирозина, фенилаланина, триптофана), но, кроме того, он способен

расщеплять также связи вблизи метионина и лейцина. После гидролиза протеазами для идентификации модифицированного аминокислотного остатка полученную смесь пептидов разделяют и очищают с помощью электрофореза или хроматографических методов. Ранее для идентификации ковалентно связанного с реагентом аминокислотного остатка применялось секвенирование по методу Эдмана. Сейчас для той же цели широко используются методы масс-спектрометрии.

С помощью химической модификации в структуре белков можно выявить аминокислотные остатки, интактность которых важна для того, чтобы белок мог функционировать, и остатки, модификация которых не влияет на активность белка. В зависимости от поставленной задачи в белках можно провести множественную химическую модификацию без существенного изменения их активности. Напротив, если химическая модификация определенных групп полностью инактивирует фермент или снижает его активность, возможно установление роли этих групп в функционировании белка. В том случае, если модифицированный остаток аминокислоты в активном центре важен для проявления ферментативной активности, то активность при модификации фермента должна падать. Для доказательства специфичности действия реагента применяется защита (экранирование) модифицируемого аминокислотного остатка субстратом при образовании его комплекса с ферментом. Если субстрат реакции защищает фермент от инактивации под действием модифицирующего агента, это является указанием на специфическую роль модифицируемого остатка аминокислоты.

Снижение активности ферментов может происходить не только при модификации аминокислотных остатков активного центра, участвующих в связывании лигандов, но и за счет конформационных изменений пространственной структуры белка при модификации аминокислотных остатков, удаленных от активного центра фермента. Наблюдаемые эффекты в значительной степени определяются химической природой участков белков и могут варьировать при их модификации различными реагентами. Эмпирический опыт аминокислоты активном центре, показывает, что В как правило, реакционноспособны. Реакционная способность остатков аминокислот в активном центре повышена благодаря наличию направленных взаимодействий внутри активного центра, изменяющих реакционную способность аминокислотных остатков. Однако в некоторых случаях остаток на поверхности фермента может оказаться доступнее, чем остаток в активном центре, поэтому метод химической модификации не всегда дает однозначную информацию о принадлежности модифицированного аминокислотного остатка активному центру.

Химическая модификация, как правило, не является избирательной, и химической реакции подвергаются сразу несколько аминокислотных остатков белка. Ферменты в физиологических условиях имеют термодинамически выгодную упорядоченную структуру, определяемую последовательностью их аминокислотных остатков и стабилизируемую нековалентными взаимодействиями остатков. Химическая модификация в виде ковалентного присоединения новых групп фактически может привести к образованию фермента с измененной структурой и свойствами. Это происходит в результате реорганизации полимерной цепи белка с образованием новой энергетически выгодной структуры. Величина эффекта при этом зависит от свойств и структуры введенной группы и места ее присоединения. В ходе модификации за счет таких конформационных перестроек белка места атаки реагентом в каждой из белковых молекул определяются в значительной степени тем, куда присоединились предыдущие молекулы реагента. С другой стороны, такая множественная модификация может привести к существенному изменению структуры белка, развитию инактивационных и денатурационных процессов и в конечном счете к полной потере ферментативной активности даже в том случае, если модифицировались остатки, не входящие в активный центр.

Более эффективному применению метода химической модификации способствует увеличение его селективности. Селективность модификации повышается, например, с помощью методики дифференциального мечения, обеспечивающегося применением химически неактивных, прочно связанных специфических лигандов, защищающих сайт их связывания от модификации. Это позволяет проводить реакцию только по другим участкам белка, если они содержат соответствующие реакционноспособные остатки. Удаление такого защищающего лиганда с последующей заменой на аналогичный реакционноспособный агент, но в радиоактивной форме позволяет модифицировать только сайт, ранее защищенный лигандом. Указанный метод был разработан довольно давно. Главный его недостаток заключается в следующем: белок может изменять свою конформацию после удаления лиганда из комплекса с белком, что делает выводы на основе полученных экспериментальных данных не абсолютно однозначными.

Реакционная способность аминокислотных остатков в составе белков зависит от следующих факторов.

- 1. Происходит общее пространственное экранирование аминокислотного остатка вследствие его расположения внутри белковой глобулы полипептидной цепью или остатками других аминокислот, что делает группы недоступными для реагента. При этом аминокислотный остаток также недоступен, особенно для модификации реагентами, размер которых значителен. Такое экранирование функциональных групп фермента может наблюдаться и при его комплексообразовании с молекулой субстрата. Таким образом, метод химической модификации не всегда позволяет получить исчерпывающую информацию о функциональных группах аминокислотных остатков участниках катализа.
- 2. Важной характеристикой функциональных групп аминокислотных остатков, определяющей их реакционную способность, является  $pK_a$ . Значение  $pK_a$  аминокислотного остатка в составе активного центра фермента может существенно изменяться под действием окружения и отличаться от  $pK_a$  той же аминокислоты в свободном состоянии. К изменению кислотно-основных свойств аминокислотного остатка приводит наличие вблизи функциональной группы заряженных остатков аминокислот, ионов металлов, участие их в образовании водородных связей. Значения  $pK_a$  для одинаковых остатков аминокислот могут значительно отличаться в зависимости от их окружения в молекуле белка.

Asp102 
$$\xi$$
—CH<sub>2</sub>CO HN  $\delta$ +N : H- $\delta$ -C  $\delta$ -C Ser195

CH<sub>2</sub>

His 57

Рис. 9.1. Существование «триады переноса заряда» Ser195, His57, Asp102 в активном центре химотрипсина, в результате чего изменяются кислотно-основные свойства остатка серина (Ser195) и значительно повышается его нуклеофильность

Например, в активном центре сериновой протеазы химотрипсина существует триада аминокислотных остатков Ser195, His57, Asp102 (см. гл. 2). Рассмотрим пример модификации аминокислотных остатков химотрипсина следующими реагентами:  $BrCH_2C(O)NH_2$  (бромацетамид),  $BrCH_2COOH$  (бромуксусная кислота) или  $ICH_2COOH$  (йодуксусная кислота). Гидроксильная группа свободной аминокислоты серина имеет значение  $pK_a \sim 10$  и является слабым нуклеофилом. Исходное предположение при выборе этих реагентов состояло в том, что они будут модифицировать белок по остаткам гистидина, но реакция происходила по гидроксильной группе серина. При значениях pH 6—7 гидроксильные группы серина протонированы, однако в активных центрах сериновых протеаз (химотрипсина и трипсина) нуклеофильность серина существенно повышается как результат воздействия остатка гистидина (His57 для химотрипсина), расположенного в

непосредственной близости к остатку серина (Ser195 для химотрипсина) (рис. 9.1). Это облегчает последующее нуклеофильное присоединение (рис. 9.2). Структура Ser195, His57, Asp102 в активном центре химотрипсина названа «триадой переноса заряда».

**Рис. 9.2.** Схема реакции модификации остатка серина (Ser) в активных центрах протеаз с помощью бромацетамида (BrCH $_2$ C(O)NH $_2$ )

#### 9.1. Примеры группоспецифических реагентов по остаткам аминокислот

В данной главе приводятся примеры модификации различных остатков аминокислот, которые часто используются для исследования ферментов.

**Цистеин** (Cys). Одними из распространенных реагентов по сульфгидрильным группам цистеина являются бромуксусная и йодуксусная кислоты и их амиды (бромацетамид йодацетамид). Другим распространенным реагентом сульфгидрильным группам цистеина выступает *пара*-хлормеркурийбензоат (см. разд. 5.1). свойствами. Сульфгидрильные группы цистеина обладают нуклеофильными Модификацию проводят обычно в щелочной среде, поскольку рКа сульфгидрильной группы цистеина равна 8,3. Реакция модификации йодуксусной кислотой представлена на схеме:

**Лизин (Lys).**  $\epsilon$ -Аминогруппа остатков лизина является весьма удобной мишенью для модификации.  $pK_a$  этой группы около 9, поэтому реакцию модификации проводят, как правило, в щелочных условиях, в которых  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группа лизина депротонирована. Реакция с 1-фтор-2,4-динитробензолом, идущая по  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группе лизина, выглядит следующим образом:

$$\begin{array}{c} O \\ \\ N \\ CH \\ CH \\ CH_2)_4 \\ \\ NH_2 \end{array} + F \\ \begin{array}{c} O \\ \\ NO_2 \\ \\ pH>8,5 \end{array} + NO_2 \\ \begin{array}{c} O \\ \\ PH>8,5 \\ \\ (CH_2)_4 \\ \\ HN \\ \end{array} + NO_2 \\ \begin{array}{c} O \\ \\ (CH_2)_4 \\ \\ NO_2 \\ \end{array} + O_2N \\ \end{array}$$

Группоспецифический реагент пиридоксаль-5'-фосфат ( $\Pi\Phi$ ) имеет природное происхождение. Он относится к группе соединений, объединенных названием «витамин В6 (пиридоксин)». Витамином В<sub>6</sub> являются производные 3-гидрокси-2-метилпиридина, обладающие биологической активностью: пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, а также их фосфаты. Среди фосфатов наиболее важен  $\Pi\Phi$ , который является кофактором большого числа ферментов азотистого обмена (трансаминаз, декарбоксилаз аминокислот)

и других ферментов. В качестве кофермента  $\Pi\Phi$  образует основания Шиффа с  $\alpha$ - и є-аминогруппами аминокислотных остатков. Реакция образования оснований Шиффа между  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группой остатков лизина и  $\Pi\Phi$  широко используется для установления роли этих остатков в функционировании ферментов. При этом используется реакция восстановления основания Шиффа боргидридом натрия (NaBH<sub>4</sub>) для его стабилизации.

Этот реагент удобен тем, что наблюдать за модификацией можно с помощью спектрофотометрических методов. Было отмечено, что ПФ имеет повышенное сродство к участкам белков, взаимодействующим с субстратами нуклеотидной природы, такими как АТР или нуклеиновые кислоты. Таким образом, можно считать, что ПФ обладает специфичностью и модифицирует остатки лизинов, расположенных в определенных участках белков, т. е. в какой-то степени этот реагент может быть рассмотрен как аффинный (см. гл. 10).

**Аргинин (Arg).** Примером использования группоспецифического реагента по остаткам аргинина является модификация с помощью фенилглиоксаля. Реакция основана на конденсации гуанидиновой группы с дикетонами и диальдегидами, проходящей одновременно по двум атомам азота. При большей глубине реакции возможна дальнейшая модификация аминокислотного остатка второй молекулой фенилглиоксаля.

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N - C \\ NH_2$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3 - N = C$$

$$O = C \\ CH - (CH_2)_3$$

Остатки аминокислот лизина и аргинина входят в активные центры ферментов, взаимодействующих с отрицательно заряженными субстратами ферментативных реакций, в том числе с нуклеиновыми кислотами ДНК и РНК.

**Тирозин (Туг).** Бромирование аминокислотных остатков N-бромсукцинимидом широко используется в исследовании белков. Реакция электрофильного замещения по ароматическому кольцу остатков тирозина приводит к введению двух атомов брома.

**Гистидин** (**His**). Гистидин является хорошим нуклеофилом и единственной аминокислотой, значение  $pK_a$  которой близко к физиологическим нейтральным значениям pH 7. У гистидина атом азота пиррольного типа значительно менее нуклеофилен, поэтому алкилирование и ацилирование в нейтральных условиях идет преимущественно по азоту

пиридинового типа. В щелочных условиях незамещенный атом азота пиррольного типа депротонируется. Примером широко используемого реагента для модификации остатков гистидина в белках, в частности в активных центрах ферментов, является диэтилпирокарбонат, который при рН 5,5–7,5 достаточно специфично ацилирует гистидин по пиридиновому азоту имидазольного кольца.

$$\begin{array}{c} O \\ N \\ CH_2 \\ \hline \\ N \\ HN \\ \end{array}$$

Гистидин – довольно редкий в белках аминокислотный остаток, но в то же время он достаточно часто входит в состав активных центров ферментов. Его свойства обеспечивают, например, осуществление кислотно-основного катализа, идущего с обменом протонами между остатками гистидина в активном центре рибонуклеазы (см. гл. 2).

#### 8.2. Модификация белков бифункциональными реагентами

Реагенты, содержащие две реакционноспособные группировки, присоединяться к двум сближенным группам в составе одной молекулы белка или образовывать ковалентные связи с двумя молекулами белков, соединяя их. Расстояние между аминокислотными остатками, подвергающимися модификации одной молекулой реагента, ограничено его длиной. Поэтому исследование модификации с помощью бифункциональных реагентов различной структуры с варьируемой длиной линкера позволяет получить информацию о взаимном расположении различных остатков аминокислот в составе белков. Этот метод применяется для изучения пространственной организации комплексов биополимеров. С его помощью может быть получена информация о структуре белков, состоящих из нескольких полипептидных цепей, или о взаимном расположении макромолекул в сложных ансамблях, таких как рибосомы и хроматин. Бифункциональные реагенты позволяют также химически фиксировать, т. е. иммобилизовывать, белки на носителях различной природы.

Бифункциональные реагенты могут содержать две одинаковые реакционноспособные группы или быть гетерофункциональными — содержать две группы различной реакционной способности. В первом случае модификация осуществляется простой обработкой исследуемого биополимера или макромолекулярного комплекса с помощью реагента. Во втором случае модификация различными реакционноспособными группами реагента может быть осуществлена последовательно. Реагент сначала присоединяется к одной из макромолекул. Затем после образования комплекса этой макромолекулы с другими макромолекулами или после их помещения в какие-то новые условия может быть проведена модификация второй реакционноспособной группой.

Примерами бифункциональных реагентов для модификации белков являются диимидоэфиры, модифицирующие аминогруппы белков и менее специфичные алкил- и арилгалогениды, например 1,5-дифтор-2,4-динитробензол, модифицирующие сульфгидрильную, имидазольную и аминогруппы:

Другие бифункциональные реагенты — 2-хлорэтиламины и 2-хлорэтилсульфиды, а также диэпоксибутан — применялись для модификации нуклеиновых кислот и нуклеиново-белковых комплексов, так как они способны образовывать ковалентные связи и с нуклеиновыми кислотами, и с белками.

Примерами гетерофункциональных реагентов могут служить реагенты, содержащие азидогруппы и группы, специфично модифицирующие аминогруппы или SH-группы:

$$N_3$$
  $\longrightarrow$   $F$   $N_3$   $\longrightarrow$   $C$   $\longrightarrow$   $CH_2Br$ 

Первоначально можно присоединить эти реагенты к определенным группам в структуре белков за счет светонезависимых специфичных реакций. Затем может быть проведена активация азидогрупп реагента действием УФ-света определенной длины волны.

При использовании бифункциональных реагентов для изучения строения макромолекул и их комплексов наибольшие трудности возникают при идентификации модифицированных функциональных групп в структуре биополимеров. При исследовании сложных систем желательно использовать высокореакционноспособные группы. Это позволяет получить развернутую информацию о контактных группах макромолекул независимо от их химической природы. Такими реакционными группами могут быть, например, фотоактивируемые азидогруппировки. В то же время при использовании фотомодификации возникает необходимость анализировать большое количество химически гетерогенных продуктов.

Для того чтобы облегчить идентификацию природы модификаций и найти положение точек модификации в структуре биополимера, применяют расщепляемые бифункциональные реагенты, которые между реакционноспособными группами содержат специальный линкер. Расщепление после модификации этого линкера, соединяющего реакционноспособные группировки, облегчает идентификацию продуктов модификации. В качестве таких структур используют, например, дисульфидный мостик, который может быть разрушен окислением или восстановлением:

$$R_1 - S - S - R_2 \xrightarrow{H_2O_2} R_1 - SO_3 + R_2 - SO_3$$

или *цис*-гликольную группировку, которую можно разрушить окислением перйодатом. При модификации диэпоксибутаном *цис*-гликольная группировка возникает при следующей реакции:

$$Nu_1 + H_2C \xrightarrow{O} C \xrightarrow{C} CH_2 + Nu_2 \longrightarrow {}^{\dagger}Nu_1 \xrightarrow{H_2} C \xrightarrow{OH} CH_2 \xrightarrow{H_2} C \xrightarrow{OH} CH_2 + Nu_2 \xrightarrow{H_2} C \xrightarrow{C} C \xrightarrow{C} C \xrightarrow{C} C \xrightarrow{C} C \xrightarrow{C} C \xrightarrow{C} C$$

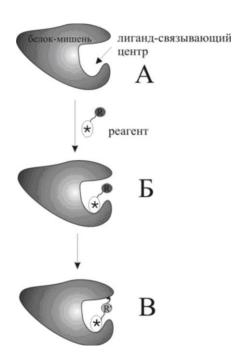
Идентификация продуктов модификации в случае применения расщепляемых реагентов ранее осуществлялась в основном с помощью так называемых «диагональных методов», например диагонального электрофореза при модификации белков. В соответствии с этим приемом смесь модифицированных белков разделяют электрофорезом в одном направлении. Белки, не извлекая их из геля, подвергают

расщеплению с помощью соответствующей процедуры, разрушающей реагент. Затем проводят электрофорез во втором направлении в условиях, идентичных условиям разделения в первом направлении. Белки с неизмененной электрофоретической подвижностью при этом оказываются на диагонали геля. Белки с измененной подвижностью в результате расщепления реагента, соединяющего их в агрегат, будут находиться в стороне от диагонали. Значительный вклад в идентификацию аминокислотных остатков белков на сегодняшний день вносит метод массспектрометрического анализа.

Химическая модификация белков являлась одним из основных подходов к исследованию взаимосвязи структуры и функций белков до развития и широкого распространения метода рентгеноструктурного анализа. Этот метод играл значительную роль на первоначальных этапах исследований белков. В настоящее время данные, полученные с помощью этого метода в растворе, являются хорошим дополнением к данным рентгеноструктурного анализа (см. гл. 12). К тому же при всех своих недостатках химическая модификация может отображать конформационные перестройки белка, которые не всегда проявляются при рентгеноструктурном анализе белков и их комплексов с субстратами.

#### 10. АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Аффинная модификация – один из распространенных методов анализа структуры и функции ферментов [3, 4]. Поскольку не все структурные элементы узнаваемого лиганда в равной мере существенны для его специфического узнавания, то можно изменить структуру молекулы, не нарушая значительно процесс узнавания лиганда активным свойство допускает введение фермента. Это В аналог реакционноспособных групп, которые могут взаимодействовать с теми или иными остатками фермента. В этом случае за образованием специфического комплекса фермента с реакционноспособным аналогом может последовать химическая реакция между реакционноспособной группой аналога и акцепторной группой белка. Это приводит к химической модификации белка и образованию ковалентного аддукта реагента с ферментом. При этом модификация произойдет в результате сближения при связывании реакционноспособного аналога субстрата и модифицируемого фрагмента белка, т. е. за счет сродства (аффинности) фермента и аналога. Реакционноспособная группа ориентируется по отношению к аминокислотному остатку/остаткам фермента благодаря специфическому взаимодействию узнающих участков субстрата с активным центром. Поэтому такая модификация может быть названа аффинной модификацией. Благодаря рассматриваемому подходу можно адресовать химическую реакцию в область активного центра или, по крайней мере, осуществить реакцию ковалентного присоединения субстрата в непосредственной близости от него. Принципиальная схема аффинной модификации представлена на рис. 10.1.



**Рис. 10.1.** Схема классической аффинной модификации: A — белок-мишень, содержащий лиганд-связывающий центр; B — образование комплекса между меченым реагентом и белком-мишенью; B — образование ковалентной связи между реакционноспособной группой реагента и белком-мишенью; R — реакционноспособная группа реагента; \* — метка, например, радиоактивная

Для идентификации модифицированного аминокислотного остатка белок после модификации аффинным реагентом подвергают гидролизу, например, с помощью трипсина или других протеаз. Полученную реакционную смесь разделяют хроматографически, очищая ковалентно связанный с реагентом пептид. Затем проводят идентификацию с помощью масс-спектрометрии.

Главной особенностью аффинных реагентов по сравнению с другими реагентами, использующимися для химической модификации биополимеров, является наличие двух функционально значимых элементов структуры: один из них обеспечивает специфичное нековалентное комплексообразование аффинного реагента с биополимером, а второй, собственно реакционноспособная группа — ковалентное присоединение реагента к биополимеру. Выбор химической группировки обуславливается не только природой изучаемого белка, но и целью, с которой осуществляется аффинная модификация.

#### 10.1. Кинетические закономерности аффинной модификации

Аффинный реагент X, сохраняя общие черты строения лиганда (субстрата), обладает способностью связываться с активным центром фермента E. Одновременно он несет реакционноспособную группу, вступающую в химическую реакцию с определенным участком фермента в активном центре или вблизи него. За образованием комплекса E с X следует реакция внутри комплекса, приводящая к ковалентному присоединению X и образованию продукта модификации EZ.

Простейшая схема аффинной модификации может быть записана в следующем виде:

$$E + X \stackrel{K_X}{\longleftarrow} EX$$

$$EX \stackrel{k}{\longrightarrow} EZ$$
(10.1)

где EX – комплекс E с X; EZ – продукт модификации;  $K_X$  – константа диссоциации комплекса EX, k – константа скорости превращения E в Z.

Обычно принимается, что по ходу всего процесса концентрации E, X и EX связаны соотношением

$$\frac{[E][X]}{[EX]} = K_X = \frac{k_{-1}}{k_{\perp}}, \qquad (10.2)$$

где  $k_1$  – константа скорости ассоциации комплекса фермента с реагентом;  $k_{-1}$  – константа скорости диссоциации этого комплекса.

Правомочность и границы такого приближения можно оценить, записав время релаксации для реакции (9.1) в виде

$$t_{pen} = \frac{1}{|\mathbf{k}(\mathbf{E} + \mathbf{X}) + \mathbf{k}|} = \frac{1}{|\mathbf{k}(\mathbf{E} + \mathbf{X} + \mathbf{k})|}$$

где  $E_0$  и  $X_0$  – полная концентрация полимера и реагента соответственно;  $k_1$  – константа скорости ассоциации;  $k_{-1}$  – константа скорости диссоциации [4].

Схема (10.1) содержит четыре частицы, следовательно, должна описываться четырьмя уравнениями, в том числе уравнением (10.2), а также условиями материального баланса (10.3) и (10.4) и дифференциальным уравнением (10.5):

$$[E] + [EX] + [EZ] = E_0,$$
 (10.3)

$$[X] + [EX] + [EZ] = X_0,$$
 (10.4)

$$\frac{d[EZ]}{dt} = k[EX]. \tag{10.5}$$

В том случае, если реагент находится в большом избытке по отношению к биополимеру, т. е.  $X_0 >> E_0$ , то  $[X] \approx X_0$  на протяжении всего процесса. Тогда из (10.2) и (10.3) следует, что:

$$[EX] = \frac{E_0 - [EZ]}{1 + \frac{K_x}{X_0}},$$

и (10.5) приводится к виду

$$\frac{d[EZ]}{dt} = \frac{k}{1+\frac{K}{X_0}} (E-EZ)$$
(10.6)

Это уравнение является уравнением скорости для реакции псевдопервого порядка с кажущейся константой скорости:

$$k_{\text{каж}} = \frac{k}{1 + \frac{K_x}{X_0}} \,. \tag{10.7}$$

Начальная скорость реакции при этом описывается следующим уравнением:

$$v_0 = \frac{V_{\text{max}}}{1 + \frac{K_x}{X_0}},$$
 (10.8)

где  $V_{\text{max}}$ =  $kE_0$  — максимальная скорость аффинной модификации, достигаемая при насыщающих концентрациях реагента.

Для аффинной модификации, в отличие от обычной химической модификации, зависимость величин  $k_{\text{каж}}$  и  $v_0$  от начальной концентрации реагента ( $X_0$ ) является гиперболической, а не линейной, функцией (рис. 9.2, A). Измерив начальную скорость или  $k_{\text{каж}}$  при нескольких (минимум двух) концентрациях реагента, можно определить k и  $k_x$ . Линейная анаморфоза (10.7) в виде

$$\frac{1}{\mathbf{k}_{\text{kax}}} = \frac{1}{\mathbf{k}} + \frac{\mathbf{K}}{\mathbf{k}}$$

позволяет найти величины  $K_X$  и k (рис. 10.3, E).

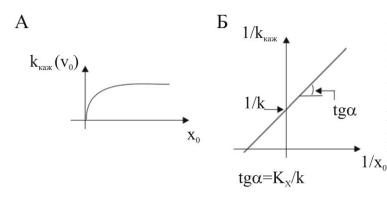


Рис. 10.2. Графическое представление кинетических данных аффинной модификации: A — гиперболическая зависимость кажущейся константы скорости инактивации  $k_{\text{каж}}$  (или начальной скорости реакции  $v_0$ ) от концентрации реагента  $X_0$ ; E — зависимость  $k_{\text{каж}}$  от концентрации реагента  $X_0$  (линейная анаморфоза)

Если наряду с реагентом X в реакционной смеси присутствует нереакционноспособный конкурент Y (чаще всего это природный субстрат) то уравнение баланса ферментных форм (9.7) следует заменить на

$$[E] + [EX] + [EY] + [EZ] = E_0$$
 (10.9)

Для взаимодействия этого субстрата с ферментом записывается условие материального баланса для лиганда Y и уравнение для  $K_Y$  — константы диссоциации комплекса нереакционноспособного конкурента:

$$\begin{split} [EY] + [Y] &= Y_0, \\ \frac{[E][Y]}{[EY]} &= K_Y. \end{split}$$

Если конкурент взят в количестве, намного превышающем количество фермента, то можно считать, что  $[Y] \approx Y_0$ . В этом случае кинетическое уравнение (10.5) остается уравнением псевдопервого порядка с кажущейся константой скорости:

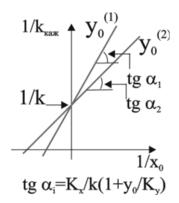
$$k_{\text{Kalk}} = \frac{K}{1 + \frac{K_x}{X_0} \left(1 + \frac{Y_0}{K_Y}\right)}$$
(10.10)

и начальной скоростью

$$v_0 = \frac{\mathbf{k} \mathbf{F}_{\sigma}}{1 + \frac{\mathbf{K}_{\mathbf{x}}}{\mathbf{X}_{\mathbf{0}}} \left( 1 + \frac{\mathbf{Y}_{\mathbf{0}}}{\mathbf{K}_{\mathbf{Y}}} \right)}.$$
 (10.11)

Для зависимостей  $k_{\text{каж}}$  и  $v_0$  от  $X_0$  и  $Y_0$  могут быть применены все графические анаморфозы, используемые при обработке данных ферментативной кинетики. Так, зависимость

есть линейная зависимость Лайнуивера — Берка для  $1/k_{\text{каж}}$  как функции  $1/X_0$ . В серии экспериментов с постоянным значением  $Y_0$  и изменяющимся значением  $X_0$  точки ложатся на прямую, пересекающую ось ординат при значении  $1/k_{\text{каж}} = 1/k$  (рис. 10.3). Несколько таких прямых, полученных при разных значениях  $Y_0$ , пересекаются на оси ординат в одной точке. Значение  $K_X$  определяется из экспериментов в отсутствие нереакционноспособного конкурента реакции аффинной модификации Y (рис. 10.2, E).



**Рис. 10.3.** Зависимость кажущейся константы скорости инактивации  $k_{\text{каж}}$  от концентрации реагента  $X_0$  в присутствии разных концентраций нереакционноспособного конкурента  $Y_0$ 

Из рис. 10.2 и 10.3 видно, что характер зависимости  $k_{\text{каж}}$  и  $v_0$  аффинной модификации от концентрации X и Y идентичен таковой для связывания лиганда в присутствии конкурента (см. гл. 5). Следовательно, ее характер совпадает с зависимостью начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и конкурентного ингибитора. Следует лишь подчеркнуть, что при аффинной модификации фермента природный субстрат Y является конкурентным ингибитором по отношению X0 конкурентного аффинный реагент X1, являясь аналогом субстрата, может выступать в роли конкурентного ингибитора ферментативной реакции. Это можно наблюдать экспериментально, если ферментативная реакция проводится столь малое время, что не успевает пройти заметная модификация фермента реагентом.

Если речь идет об аффинной модификации одноцентрового фермента, а Y является его природным субстратом, то субстрат, связываясь в активном центре фермента, может превращаться в продукт реакции. В этом случае поведение субстрата Y описывается схемой

$$E+Y \xrightarrow{k'_{1}} EY \xrightarrow{k'_{2}} E+Q$$
 (10.12)

где Q – продукт/продукты превращения Y. Для описания ферментативного превращения Y обычно используют приближение

$$\frac{d[Y]}{dt} = k'_1[E][Y] - (k'_{-1} + k'_2)[EY] = 0,$$

следовательно,

$$\frac{[\mathbf{E}][\mathbf{Y}]}{[\mathbf{EY}]_{\mathbf{K}}} = (K_{\mathbf{M}})_{\mathbf{Y}},$$

где  $(K_M)_Y$  – константа Михаэлиса для субстрата Y. В этом случае в уравнениях (10.10) и (9.11) вместо  $K_Y$  следует подставить  $(K_M)_Y$ . Полученная величина может существенно превышать  $K_Y = k'_{-1}/k'_1$ , если  $k'_{-1}$  того же порядка или меньше, чем  $k'_2$ .

#### 10.2. Основные критерии аффинной модификации

Основные критерии аффинной модификации, т. е. критерии, совокупность которых позволяет заключить, что модификация биополимера является аффинной, основаны на анализе простейшей схемы аффинной модификации. Они заключаются в следующем:

1) модификация проходит по определенным группам в каждой молекуле биополимера или в каждой субъединице в самом активном центре или вблизи него и может сопровождаться потерей биополимером (ферментом) свойственной им активности;

- 2) начальная скорость модификации  $v_0$  изменяется в зависимости от начальной концентрации реагента  $X_0$  по гиперболическому закону, достигая предельного значения при достаточно высоких концентрациях реагента;
- 3) сродство реагента к биополимеру (ферменту), характеризуемое константой диссоциации комплекса биополимер-реагент  $K_X$ , может быть определено из зависимости  $v_0$  от  $X_0$  (10.8). Оно должно быть таким же, как и сродство реагента, проявляемое им в случае, когда он выступает как конкурент по отношению к природному лиганду при исследовании обратимого связывания последнего;
- 4) природный лиганд защищает биополимер (фермент) от аффинной модификации, т. е. тормозит процесс модификации. Из зависимости  $v_0$  от концентрации реагента и природного лиганда (10.11) можно определить величину константы диссоциации комплекса биополимер (фермент)—природный лиганд ( $K_Y$ ). Если речь идет об аффинной модификации односубстратного фермента, то можно определить величину константы Михаэлиса для субстрата  $K_M$ . Эта величина может быть больше  $K_Y$  или равна ей.

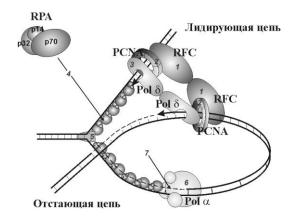
Следует отметить, что невыполнение некоторых из критериев, сформулированных на основе кинетического анализа простейшей схемы аффинной модификации, не означает неаффинности модификации. В случае более сложных ферментов и механизмов превращения реагента зависимость начальной скорости модификации от концентрации реагента может иметь насыщающий характер, но не являться гиперболической. Эта зависимость может проходить через максимум или иметь точки перегиба. В подобных случаях величина  $K_X$  не может быть определена из зависимости (10.8), и процесс описывается более сложно. В принципе, возможны ситуации, когда не наблюдается защитного эффекта природного лиганда от модификации или он резко занижен.

Для многосубстратных ферментов могут появиться другие критерии, сформулированные на основе кинетического анализа более сложных схем аффинной модификации. В случае функциональных димеров (см. разд. 6.2) можно наблюдать взаимодействие аффинного реагента с двумя активными центрами, что показывает различие в величинах  $K_X$  при взаимодействии с этими центрами в случае отрицательной кооперативности взаимодействия фермента с субстратами и их аналогами.

## 10.3. Фотоаффинная модификация как метод изучения сложных ферментативных систем

Фотоаффинное мечение белков — удобная и широко применяемая разновидность метода аффинной модификации. Удобство его применения связано с тем, что аффинные реагенты, содержащие фотоактивируемые группы, до облучения УФ-светом инертны. Это позволяет осуществить фотоприсоединение к белку после формирования специфического комплекса белок—лиганд (фермент—субстрат).

Фотоаффинная модификация является удобным методом изучения динамичных многокомпонентных систем, например таких, как репликативный комплекс (рис. 10.4). В репликации ДНК у эукариот принимает участие несколько ДНК-полимераз: ДНКполимераза α-праймаза, ДНК-полимераза δ, ДНК-полимераза ε. Синтез ДНК на ДНКматрицах, катализируемый данными ферментами, происходит с участием белковых факторов. Наиболее важными среди них являются репликативный белок A (RPA), стабилизирующий одноцепочечный участок ДНК-матрицы, **PCNA** способствующий процессивности синтеза, катализируемого ДНК-полимеразами б и є, а также репликативный фактор С (RFC), который способствует взаимодействию PCNA с комплексом ДНК и ДНК-полимераз. Многие из факторов репликации, такие как RPA и RFC, состоят из нескольких полипептидных цепей (субъединиц), что превращает исследование «архитектуры» и функций этих комплексов в весьма сложную задачу, недоступную для рентгеноструктурного анализа. Поэтому фотоаффинная модификация является в подобном случае весьма подходящим методом исследования.



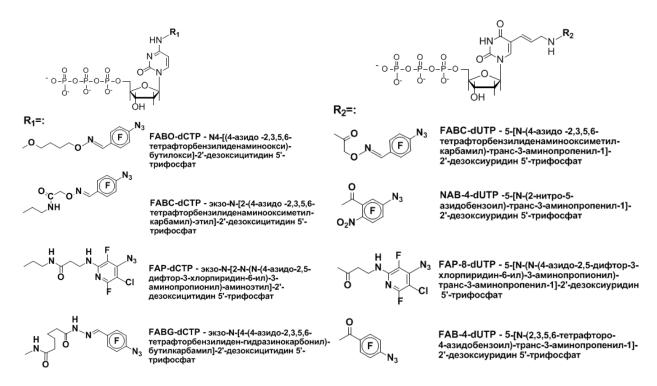
**Рис. 10.4.** Схема репликативной вилки высших эукариот с участием ключевых ДНК-полимераз и белковых факторов репликации ДНК: I – RFC; 2 – PCNA; 3 – ДНК-полимераза  $\delta(\varepsilon)$ ; 4 – RPA; 5 – геликаза; 6 –ДНК-полимераза  $\alpha$ -праймаза; 7 – PHK-ДНК-праймер [5]

События в репликативном комплексе при синтезе ДНК происходят динамично и сопровождаются перестройкой этого комплекса. Одним из способов изучения динамичных систем может быть фотоаффинная модификация: фотоактивируемые группы, введенные в ДНК, позволяют не только определить взаимное расположение отдельных субъединиц участников репликации относительно ДНК и друг друга, но и исследовать динамику функционирования таких систем. Например, для целей такого исследования была создана химическая база в виде фотоактивируемых аналогов dNTP и разработаны методы введения фотореакционноспособных нуклеотидных остатков (dNMP) в определенные участки ДНК в ходе ее синтеза, катализируемого ДНК-полимеразами. Был синтезирован широкий набор аналогов dNTP, несущих фотореакционноспособные арилазидогруппы, присоединенные через линкер к азотистому основанию dNMP [3, 6] (рис. 10.5).

В случае фотореагентов, содержащих арилазидогруппы, существует возможность вариации длины линкера и типа арилазидогруппы, что способствует повышению эффективности и селективности модификации биополимера. Аналоги dNMP, содержащие фотореакционноспособные группы, являются эффективными субстратами ДНК-полимераз [3]. Они могут быть использованы для ферментативного синтеза фотореакционноспособных ДНК-субстратов либо интермедиатов процессов метаболизма ДНК, в частности репликации и репарации ДНК. Использование таких структур позволяет провести модификацию ферментов-участников этих процессов [3, 6].

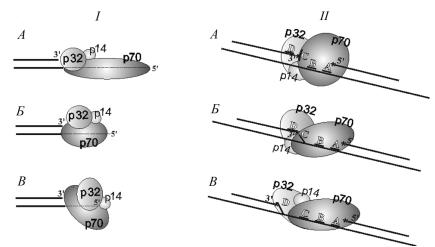
Репликативный белок А человека (RPA) является основным эукариотическим белком, связывающим одноцепочечную ДНК (single-stranded DNA binding protein – SSB). Как и прокариотические SSB, он играет ключевую роль в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК. По своей структуре RPA является стабильным гетеротримером, состоящим из трех субъединиц с молекулярными массами 70, 32 и 14 кДа. Как уже было сказано выше, основная функция этого белка состоит в стабилизации одноцепочечных участков ДНК после раскрытия ее структуры для матричного репликативного синтеза. Кроме того, RPA обладает способностью к дестабилизации двуспиральной структуры ДНК. Эта функция связана с его способностью прочно связывать одноцепочечные участки ДНК и удерживать их в расплетенном состоянии. С помощью метода фотоаффинной модификации была предложена модель взаимодействия RPA с различными ДНК-дуплексами, возникающими в процессе репликации ДНК (рис. 10.6). Было показано [7], что в случае фотореакционноспособных ДНК-дуплексов с выступающим участком матрицы в 30 и 18 нуклеотидов (см. рис. 10.6, І) преимущественно наблюдалось ковалентное присоединение p32-субъединицы RPA к 3'концу праймера, в то время как укорочение матричной цепи до 13 нуклеотидов и далее обеспечивало в основном ковалентное присоединение субъединицы р70. Такие ДНКдуплексы имитируют интермедиаты, возникающие в репликативной вилке на различных

этапах синтеза ДНК. Полученные данные выявили конформационные перестройки RPA, модулируемые длиной выступающего участка матричной цепи ДНК. Для имитации интермедиатов репликации, возникающих на отстающей нити ДНК, были использованы ДНК-структуры, содержащие бреши различного размера – от 8 до 30 нуклеотидов. Фотореакционноспособные остатки были введены с 3'- или 5'-стороны бреши. Было установлено что, если фотоактивируемый нуклеотид расположен на 3'-конце бреши, интенсивность мечения субъединицы р32 всегда выше для протяженной бреши и падает при уменьшении размера бреши. В то же время в случае расположения фотоактивируемой группы на 5'-конце бреши наблюдалось в основном мечение субъединицы р70 независимо от размеров бреши. Предложенная модель взаимодействия RPA с концами брешей в ДНК различной длины предполагает полярное связывание RPA с одноцепочечным участком наличие конформационных переходов, определяемых одноцепочечного участка – «бреши» (см. рис. 10.6, II). Интересно, что именно с помощью аффинной модификации было показано полярное связывание RPA с одноцепочечной ДНК, т. е. взаимодействие ДНК-связывающих доменов белка субъединицы р70, обладающих наибольшим сродством к ДНК, в первую очередь с ее 5'-концом [7]. Подобным образом с применением метода фотоаффинной модификации было исследовано взаимодействие с ДНК субъединиц другого фактора репликации – репликативного фактора С (RFC) [8].



**Рис. 10.5.** Примеры фотоактивируемых аналогов dNTP с боковыми радикалами  $R_1$  и  $R_2$ 

Аффинная модификация значительно более специфична, по сравнению с обычной группоспецифической химической модификацией, за счет того, что аффинная часть реагента «адресует» реакционноспособную группу преимущественно в активный центр фермента. Несмотря на это неспецифическая модификация при использовании указанного подхода все-таки возможна. Например, фотореагент на основе ДНК может модифицировать в многокомпонентных системах различные ДНК-связывающие белки, а не только целевой белок.

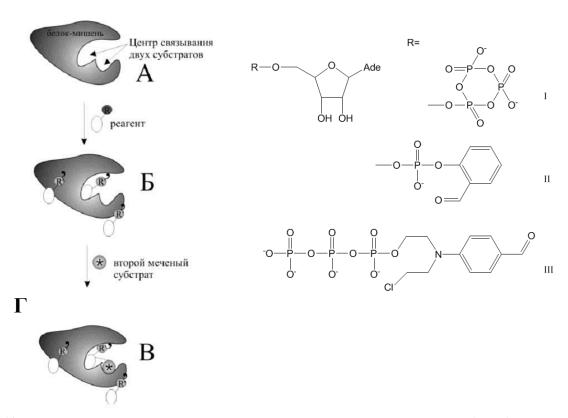


Эта неспецифическая модификация объясняется высокой реакционной способностью фотоактивируемой группировки (например, азидогруппы), что позволяет провести модификацию в комплексах, сформированных за счет слабых взаимодействий.

Ранее были предложены различные методы для высокоселективной модификации ферментов. В основе одного из них лежит использование реагентов, соответствующих аналогам субстрата, имитирующим переходное состояние ферментативной реакции. Разработан также ряд методов селективной модификации белков, которые были успешно применены для изучения белковых структур и их функций в многокомпонентных системах. К числу таких методов относятся каталитически компетентное мечение (ККМ) и модификация с использованием бинарной системы фотоаффинных реагентов (БСФР).

#### 10.4. Каталитически компетентное мечение

Каталитически компетентное мечение основано на способности ферментов сохранять каталитическую активность после ковалентной пришивки аффинного реагента вблизи активного центра белка. Метод применим для многосубстратных ферментов, способных к образованию в ходе реакции новых ковалентных связей, таких как трансферазы и лигазы. Подобные ферменты имеют участки связывания, по крайней мере, для двух субстратов (рис. 10.7, A). На первой стадии реакционноспособный, но не меченный радиоактивно аналог субстрата (реагент) ковалентно присоединяется к белкумишени в активном центре (рис. 10.7, E). Возможно ковалентное присоединение к другим мишеням многокомпонентной системы, например к различным субъединицам многосубъединичных белковых комплексов.



**Рис. 10.7.** Принципиальная схема каталитически компетентного мечения: A — белок-мишень содержит центр связывания двух лигандов;  $\mathcal{E}$  — реагент присоединяется к белку-мишени в пределах активного центра (специфично) и вне него (неспецифично); B — ковалентное присоединение радиоактивно меченного субстрата к реагенту в активном центре;  $\Gamma$  — структурные формулы аналогов инициирующих субстратов для каталитически компетентного мечения РНК-полимеразы *Escherichia Coli* [9]

На следующей стадии добавляется радиоактивно меченный, но нереакционноспособный второй субстрат для последующего присоединения к первому субстрату в ходе реакции, катализируемой ферментом. Доля реагента, ковалентно присоединенного вне активного центра, не детектируется во время последующего анализа, поскольку эти молекулы не участвуют в акте присоединения к радиоактивно меченному второму субстрату (рис. 10.7, В).

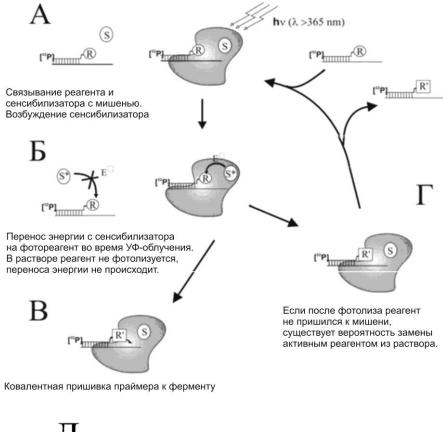
Метод каталитически компетентного мечения был разработан и успешно применен М. А. Грачевым и его коллегами для изучения инициирующего комплекса РНКполимеразы E. Coli [9]. Многосубъединичная ДНК-зависимая РНК-полимераза является ключевым ферментом экспрессии генетической информации. Наиболее изученная РНКполимераза  $E.\ Coli$  состоит из инициирующего фактора  $\sigma$  и «каталитического ядра (кора)» фермента (субъединичная композиция  $\alpha_2\beta\beta'$ ). Инициация транскрипции начинается с этапа связывания затравочного субстрата: холофермент РНК-полимеразы, связанный с районом промотора, подвергался обработке активными аналогами ATP или GTP, некоторые из этих аналогов приведены на рис. 10.7, Г. Аналог ковалентно присоединялся к ферменту в различных положениях, в том числе к участку связывания затравочного субстрата. На следующем этапе РНК-полимераза катализировала образование первой фосфодиэфирной связи динуклеотида и отщепление пирофосфата. На этой стадии вводилась радиоактивная метка. Добавление [α-<sup>32</sup>P]-NTP, комплементарного второму транскрибируемому нуклеотиду в матрице, приводило к ковалентному включению в цепь радиоактивного остатка NTP благодаря каталитической активности РНК-полимеразы. В результате осуществлялось мечение РНК-полимеразы. Реакционноспособные аналоги NTP, связанные вне активного центра, не присоединяли радиоактивный остаток нуклеотида и, следовательно, оставались невидимыми при последующем анализе. После

образования 8–12 звеньев инициирующей РНК σ-субъединица диссоциирует из комплекса с «коровой» основной частью фермента, и далее транскрипция переходит в стадию элонгации.

Следует заметить, что и данный метод селективного мечения не лишен недостатков. Как было указано выше, в этом случае используется два субстрата: первый – химически активный, но не меченный радиоактивно, второй – меченный, но не активный. Сродство фермента к первому субстрату может быть ниже в отсутствие второго субстрата, чем в его присутствии. Для компенсации меньшего сродства должны быть использованы высокие концентрации реакционноспособного аналога. Активная группа реагента должна быть полностью инактивирована перед добавлением второго меченого субстрата. Иначе может произойти образование химически активного меченого продукта, который после диссоциации из связывающего центра фермента может также взаимодействовать с мишенью, что приводит к потере преимущества ККМ перед другими методами аффинного мечения. Поскольку возможен вклад «псевдокаталитически компетентного мечения», использовать то следует аналоги инициирующего субстрата, реакционноспособная функция которых легко может быть инактивирована. К числу легко инактивируемых реагентов можно отнести аналоги инициирующего субстрата, содержащие реакционноспособную альдегидную группу, которая после восстановления боргидридом натрия (NaBH<sub>4</sub>) превращается в нереакционноспособную спиртовую группу. При использовании этого метода могут быть модифицированы также соседние мишени, а не только каталитический центр фермента, в особенности это происходит при условии, когда активная группа реагента соединена с аффинной частью длинным спейсером. Метод ККМ был применен для селективного мечения ферментов в многокомпонентных реконструированных системах и ядерных экстрактах эукариотических клеток.

#### 10.5. Бинарная система фотоаффинных реагентов

Впервые бинарная система фотоаффинных реагентов (БСФР) была предложена для высокоэффективной модификации ДНК-мишеней, а позднее — для увеличения селективности модификации ДНК-полимераз. Принципиальная схема модификации белков с помощью БСФР представлена на рис. 10.8. Белок-мишень имеет два соседних сайта связывания двух лигандов (см. рис. 10.8, *A*) и образует комплекс с реагентом — фотоактивируемым и радиоактивно меченным аналогом одного из лигандов, а также с фотосенсибилизатором — аналогом другого лиганда, содержащим хромофорную группу (см. рис. 10.8, *Б*). В комплексе активная группа реагента находится в непосредственной близости от фотоактивируемой группы сенсибилизатора. После облучения светом соответствующей длины волны (ближний УФ или видимый свет) энергия изначально поглощается сенсибилизатором и затем переносится на фотореагент.



**Рис. 9.8.** Бинарная система фотоаффинных реагентов: A — белок-мишень содержит центр связывания для двух субстратов; B — образование комплекса белка-мишени с радиоактивно меченным фотореагентом и сенсибилизатором; B — во время облучения энергия изначально поглощается сенсибилизатором, а затем переносится на фотоактивируемую группу реагента. Реагенты, связанные вне активного центра и находящиеся в растворе, не возбуждаются;  $\Gamma$  — реагент ковалентно присоединяется в связывающем центре белка-мишени;  $\mathcal{A}$  — структурная формула сенсибилизатора, используемого при создании бинарной системы реагентов при модификации ДНК-полимераз

Возможным механизмом является также перенос электронов (см. рис. 10.8, B). Возбужденный реагент активируется и ковалентно присоединяется к белку-мишени внутри или непосредственной близости от участка связывания (см. рис.  $10.8, \Gamma$ ). Природа фотоактивируемой группы и условия эксперимента не позволяют реагенту активироваться в растворе или на значительном расстоянии от сенсибилизатора. В качестве фотоактивируемых групп применяются производные ароматических арилазидов, а в качестве фотосенсибилизаторов — поликарбоциклы, такие как пирен, антрацен и перилен. Для активации реагента используют видимый или ближний УФ-свет ( $\lambda > 365$  нм), что позволяет проводить модификацию без значительной инактивации и денатурации белков.

Следует отметить, что реагент должен образовывать высокоактивные короткоживущие интермедиаты, чтобы избегать модификации после диссоциации из комплекса реагента с белком-мишенью. Другое ограничение – гидрофобность фотосенсибилизирующих групп (пирен, антрацен, перилен), приводящая к

неспецифическому связыванию сенсибилизатора с гидрофобными доменами белков или липидных фракций клеток и уменьшению специфичности мечения. Надо также иметь в виду, что в общем случае активация реакционноспособных групп не означает их локализации в активном центре фермента. Возможным является их расположение на расстоянии до 10 Å от сенсибилизатора.

БСФР была использована при модификации белков в клеточном экстракте мышиных фибробластов (МЕF) для селективной модификации ДНК-полимераз [10]. В качестве модифицирующего агента использовалось арилазидное производное dNTP, а в качестве сенсибилизатора — dNTP-аналог, содержащий пиреновую группу (см. рис. 10.8, Д). В существующих экспериментальных условиях в МЕF-экстракте модификации подвергалась преимущественно ДНК-полимераза β. ДНК-полимераза встраивала в цепь ДНК фотореакционноспособный остаток dNMP и связывала в качестве следующего субстрата dNTP, содержащий остаток пирена (перилена или антрацена). При воздействии УФ-света в отсутствие сенсибилизатора дополнительно модифицировались с такой же эффективностью, как ДНК-полимераза β и другие белки клеточного экстракта.

## 11. САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ. ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Введение большого числа точечных мутаций разной локализации в исследуемые части генов *in vitro* осуществляется с помощью химического мутагенеза одноцепочечных участков рекомбинантных ДНК. Принцип метода заключается в том, что некоторые химические мутагены, такие как бисульфит натрия, гидроксиламин или метоксиамин, действуют только на одноцепочечные участки ДНК. Следовательно, получив молекулы ДНК, содержащие одноцепочечные участки в исследуемых генах, с помощью бисульфита натрия можно дезаминировать остатки цитозина в этих участках, т. е. превратить их в остатки урацила. При использовании такой молекулы ДНК в качестве матрицы для ДНК-полимеразы происходит замена исходных G-C-пар на T-U. Затем мутантные молекулы ДНК с помощью трансформации вводят в бактериальные клетки, где по завершении первого раунда репликации в молекуле осуществляется замена остатков U на T и полная замена G-C-пары на A-T, т. е. имеет место транзиция.

Однако химический мутагенез накладывает ограничения на спектр возникающих мутаций, так как лишь определенные остатки нуклеотидов ДНК претерпевают изменения, поэтому различные мутации не могут быть получены только с помощью химических мутагенов. К недостатку метода химического мутагенеза относится также то, что молекулы ДНК из одной реакционной пробирки, подверженные мутации, представляют собой сложную смесь, в которой каждая молекула несет несколько независимо возникших мутаций. Для введения мутаций в определенный локус исследуемого гена необходимо проводить сложную процедуру отбора, сопряженную с анализом большого числа мутантов.

Можно вводить мутации в ДНК, используя для репарации одноцепочечных брешей ДНК химически модифицированные аналоги нуклеотидов, например гидроксицитидинтрифосфат, который в составе ДНК одинаково хорошо спаривается с А и G. Кроме того, мутации можно вводить, создавая такие условия, при которых ДНКполимераза начинает ошибочно включать В синтезируемую некомплементарные матрице нуклеотиды, т. е. используя ошибки, возникающие при репликации. Однако и эти методы введения мутаций не подразумевают высокой специфичности, поскольку в данных случаях также на выходе получается смесь молекул ДНК с различным набором мутаций.

Мутации в определенных сайтах создаются с помощью совокупности методов, основанных на использовании генно-инженерных подходов. Такой мутагенез называют сайт-направленным, или сайт-специфическим. Метод сайт-направленного мутагенеза

позволяет путем мугации в конкретном сайте клонированной последовательности ДНК и, следовательно, направленной замены аминокислотного остатка получать белки и измененными C ферменты свойствами. помощью ЭТОГО метода идентифицировать функционально значимые участки в молекулах белков. Понятно, что для его применения необходимо знать первичную последовательность генов белков, т. е. должны быть развиты методы секвенирования. Кроме того, для нуклеотидной замены в заранее известном сайте ДНК синтезируют короткие одноцепочечные фрагменты ДНК (праймеры), комплементарные целевой ДНК, т. е. содержащие замены нуклеотидов. Таким образом, изначально метод сайт-направленного мутагенеза возник в результате развития методов химического синтеза олигонуклеотидов. Он появился только в 70-х гг. ХХ в., когда перечисленные методы стали активно развиваться.

Метод сайт-направленного мутагенеза часто применяется в сочетании с рентгеноструктурным анализом (PCA) белков. Проводится PCA исходного белка дикого типа, затем получают мутантный белок с заданными свойствами. После этого изучают функциональные и другие отличия полученного белка от исходного с помощью PCA, методов ферментативной кинетики и других подходов. PCA мутантных ферментов проводится также для их комплексов с субстратами и ингибиторами этого фермента. Данные PCA позволяют выявить аминокислотные остатки активного центра, которые могут быть заменены другими остатками с определенными свойствами.

Метод сайт-направленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидных праймеров был впервые описан в 1978 г., а в 1993 г. его основоположник Майкл Смит (Michael Smith) был удостоен Нобелевской премии совместно с Кэрри Б. Муллис (Kary B. Mullis), независимо от него разработавшего метод ПЦР. ПЦР позволяет проводить сайтнаправленный мутагенез с использованием праймеров, несущих мутацию (рис. 11.1), а также случайный мутагенез, когда ошибки в последовательность ДНК, как было отмечено выше, вносятся ДНК-полимеразой в условиях, снижающих ее специфичность.

В основе метода сайт-направленного мутагенеза лежит получение клонированной ДНК, несущей нуклеотидную замену в одном из кодонов. Если заменяется один кодирующий триплет, то происходит замена одного аминокислотного остатка в белке (рис. 11.2). Синтезируется ДНК-праймер, несущий требуемую замену, который гибридизируется с участком ДНК, содержащим ген интересующего белка. При использовании в качестве праймеров олигонуклеотидов, содержащих замену и поэтому не полностью комплементарных матричной ДНК, повышаются требования к длине праймера. Длина должна быть не менее 15 нуклеотидов. Значительную роль играет комплементарность 3'-концевого нуклеотида праймера, который обеспечивает основной вклад в узнавание ДНК-полимеразами [11].

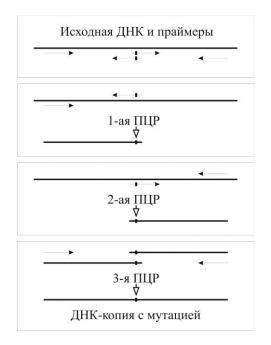


Рис. 11.1. Применение ПЦР для сайт-направленного мутагенеза: синтезируется пара праймеров, несущих мутацию, и пара праймеров, комплементарных концам нужного фрагмента ДНК. Штрихами по центру обозначена позиция мутации в исходных праймерах и ДНК-копии. В ходе первых двух реакций образуются фрагменты ДНК с мутацией, которые объединяются в третьей реакции. Полученный фрагмент вставляют в выбранную генно-инженерную конструкцию

С помощью ДНК-полимеразы синтезируется копия требуемого гена с нуклеотидной заменой/заменами (см. рис. 11.2). Среди ДНК-зависимых ДНК-полимераз наибольшее применение в генной инженерии находят ДНК-полимераза І Е. Coli и ее большой фрагмент — фрагмент Кленова, а также Т4-ДНК-полимераза и термостабильные ДНК-полимеразы, особенно ДНК-полимераза Thermus aquaticus (Таq-полимераза). Фрагмент Кленова — часть полипептидной цепи ДНК-полимеразы І с молекулярной массой около 76 кДа, у которой отсутствует домен, обеспечивающий 5'-3'-экзонуклеазную активность этого фермента. Все эти ферменты в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup> из четырех дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, dCTP, dGTP и TTP) осуществляют синтез ДНК, комплементарной матричной ДНК, и для функционирования требуют наличия затравки-праймера, т. е. олиго- или полидезоксирибонуклеотида со свободным 3'-ОН-концом, комплементарного матричной ДНК.

С использованием ДНК-лигазы I или ДНК-лигазы фага Т4 (АТР-зависимой) синтезируется двуцепочечная молекула ДНК, представляющая ген нужного белка. Ген трансформируется в клетки *E. Coli*, реже – дрожжей или бакуловирусов (для экспрессии эукариотических белков), где происходит экспрессия модифицированного белка. После очистки мутантной формы фермента исследуют его структуру и функции, а также кинетические характеристики катализируемой ферментативной реакции.

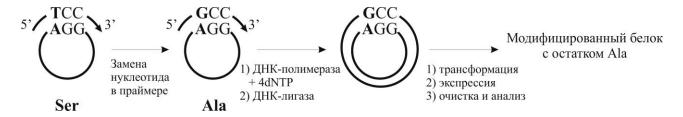
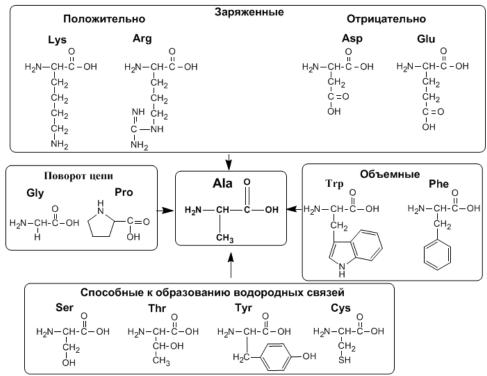


Рис. 11.2. Замена в гене нужного фермента в плазмиде путем замены последовательности кодона в комплементарном праймере: TCC (Ser)→GCC (Ala). Полимераза, лишенная 3'-5'-экзонуклеазной активности, удлиняет этот праймер, ДНК-лигаза восстанавливает целостность цепи. Модифицированный белок экпрессируется, выделяется из биомассы и подвергается дальнейшему анализу

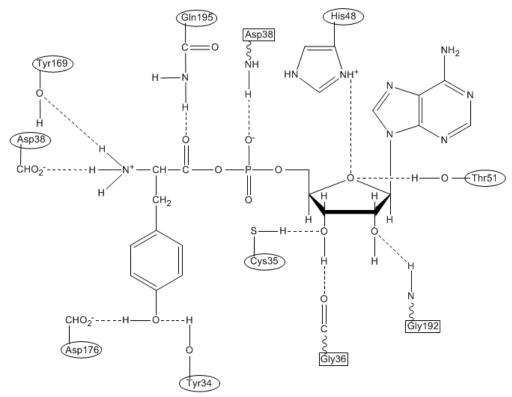
Отбор полученных мутантов на основе биохимических или иных параметров модифицированных форм (исчезновение, ослабление или усиление ферментативной активности, появление новой активности или новых иммунологических свойств и т. п.) позволяет идентифицировать остатки аминокислот в исследуемых белках, отвечающие за эти изменения. Часто для исследования функциональной значимости отдельных аминокислот в белках применяется целенаправленная замена на нейтральную аминокислоту, например, на аланин (Ala) – «сканирование аланином». Введение остатка Ala в полипептидные цепи не изменяет их конформации, как, например, при заменах на глицин или пролин, и не сопровождается электростатическими или стерическими эффектами (рис. 11.3). С помощью «сканирования аланином» можно выявить аминокислоты, образующие активный центр ферментов, т. е. влияющие на активность белка, а также исследовать участки полипептидных цепей, существенные для взаимодействия белков с другими макромолекулами и низкомолекулярными лигандами.

В работах А. Фершта и его коллег была исследована роль водородных связей в структуре и функции активных центров ферментов на примере реакции активации аминокислоты, катализируемой тирозил-тРНК-синтетазой из *Bacilus Stearothermophilus* [12, 13]. Были определены величины  $K_{\rm M}$  и  $k_{\rm cat}$  для исходного фермента и мутантов. Водородная связь является направленной и поэтому играет большую роль в проявлении специфичности ферментов, а образование сетки водородных связей — это эффективный способ ориентации субстрата в активном центре фермента (рис. 11.4).

Тирозил-тРНК-синтетаза является функциональным димером (α2). Тирозил-тРНК-синтетаза катализирует аминоацилирование тРНК, и промежуточным продуктом в цепи превращений является тирозиладенилат (Туг-АМР), синтезирующийся из АТР и аминокислоты и содержащий макроэргическую связь. Поэтому первая стадия реакции аминоацилирования называется стадией активации аминокислоты:



**Рис.** 11.3. Аминокислоты, остатки которых в составе белков заменяются другими аминокислотами, нейтральными, например, аланином (Ala), при применении метода сайтнаправленного мутагенеза. Сверху указаны свойства аминокислотных остатков, которые они вносят в белок



**Рис.** 11.4. Водородные связи, которые может образовать тирозил-тРНК-синтетаза с тирозиладенилатом (на основе данных рентгеноструктурного анализа [12]). Прямоугольниками обозначены аминокислотные остатки, предположительно образующие водородные связи за счет групп основной цепи

$$E + ATP + Tyr \xrightarrow{\longleftarrow} E \cdot [Tyr \sim AMP] + pp_i$$

$$E \cdot [Tyr \sim AMP] + TPHK^{Tyr} \xrightarrow{\longleftarrow} E + Tyr \sim TPHK^{Tyr} + AMP$$

Структура тирозил-тРНК-синтетазы из *B. Stearothermophilus* была разрешена методом рентгеноструктурного анализа. На основании этих данных можно было предположить, что при формировании тирозиладенилата образуются водородные связи между остатком рибозы тирозиладенилата и боковыми радикалами остатков Cys35, Thr51 и His48 (см. рис. 11.4).

Роль Cys35 в активности фермента была подтверждена исследованием кинетических параметров реакций, катализируемых мутантами Cys35→Gly и Cys35→Ser. Сродство к субстрату ATP (К<sub>М</sub> реакции аминоацилирования) снижалось для обоих мутантов, как для первого, лишенного потенциальной возможности образовывать водородную связь за счет удаления SH-группы, так и для второго, у которого SH-группа была заменена на ОНгруппу. Интересно, что фермент с заменой Cys35→Ser обладал более низким сродством к субстрату ATP, чем фермент с заменой на Gly35, хотя замена на Ser35 оставляла возможность образования водородной связи. Возможно, это является следствием другой природы остатка серина и неблагоприятных стерических параметров для формирования связи в фермент-субстратном комплексе. Было высказано предположение в пользу образования водородной связи остатка серина с молекулой воды вместо остатка рибозы в аминоациладенилате.

Замена остатка  $Cys35 \rightarrow Ala$  также указывает на роль SH-группы цистеина в функционировании активного центра фермента. Согласно данным PCA, SH-группа этого цистеина расположена вблизи 3'-OH группы субстрата, значит между указанными двумя группами возможно образование водородной связи. Однако с помощью PCA наличие этой связи подтвердить сложно. При замене  $Cys35 \rightarrow Ala$  величина  $K_M$  уменьшилась в 20 раз, а

величина  $k_{cat}$  для реакции активации аминокислоты — в 2 раза. Эффективность реакции  $(k_{cat}/K_M)$  образования аминоациладенилата увеличилась в 10 раз, в основном за счет снижения величины  $K_M$ .

При разрешении структуры тирозил-тРНК-синтетазы из B. Stearothermophilus с помощью PCA было установлено, что гидроксильная группа бокового радикала аминокислотного остатка Thr51 образует достаточно слабую водородную связь с AMP. Возможно, что в отсутствие субстрата гидроксильная группа Thr51 образует прочную водородную связь с молекулой воды. Поскольку гидроксильная группа Thr51 образует слабую водородную связь с атомом кислорода в рибозном кольце, ее удаление путем замены остатка треонина на аланин может повысить сродство фермента к ATP. Такая замена Thr51 $\rightarrow$ Ala приводит к незначительным изменениям величин параметра  $k_{cat}$  обеих реакций, но влияет на сродство фермента к ATP, увеличивая его, поскольку  $K_M$  снижается в два раза. Соответственно вдвое увеличиваются величины параметров  $k_{cat}/K_M$  (табл. 11.1).

Интересно, что в структуре гомологичного фермента из другого источника, а именно тирозил-тРНК-синтетазы из  $E.\ Coli$ , остаток Thr51 заменен на пролин, и это вызывает изгиб полипептидной цепи за счет нарушения структуры  $\alpha$ -спирали. На основе этой структуры был сконструирован мутант тирозил-тРНК-синтетазы из  $B.\ Stear other morphilus$  с заменой Thr51 $\rightarrow$ Pro. Водородная связь с кислородом рибозного кольца у этого фермента образовываться не может. Такая мутация приводит к значительным изменениям величин кинетических параметров (см. табл. 11.1). Для реакции образования аминоациладенилата значение величины  $k_{cat}$  вырастает почти в два раза, тогда как для реакции переноса аминоацильного остатка на тРНК — снижается в 2,6 раз. Сродство фермента к ATP ( $K_M$ ) повышается в обоих случаях в 15 и 130 раз соответственно. Для обеих реакций повышается их эффективность ( $k_{cat}/K_M$  для реакции активации аминокислоты — для ATP), наблюдается соответственно 25- и 50-кратный рост каталитической эффективности ферментативной реакции, в основном за счет снижения  $K_M$  для ATP. В результате получается мутант тирозил-тРНК-синтетазы, обладающий более высокой каталитической эффективностью.

 $Tаблица\ 11.1$  Величина кинетических параметров реакции образования аминоациладенилата/переноса аминоацильного остатка на тРНК для тирозил-тРНК-синтетазы дикого типа и мутантных форм фермента

Фермент	$k_{cat}$ ( $c^{-1}$ )	Км для АТР (мМ)	$k_{cat}/K_{M} (c^{-1}M^{-1})$
WT (Thr51)	7,6/4,7	0,9/2,5	8,4/1,86
Ala51	8,6/4,0	0,54/1,2	15,9/3,20
Pro51	12,0/1,8	0,058/0,019	208,0/95,8

С помощью сайт-направленного мутагенеза можно получать более совершенные ферменты, обладающие высокой каталитической эффективностью. Кроме того, этот метод, безусловно, очень важен для выяснения функций аминокислотных остатков в активном центре фермента, поскольку аминокислотные замены происходят в природе, что является движущим механизмом эволюции белков.

Дальнейшее развитие сайт-направленного мутагенеза повлекло за собой различные модификации и усовершенствования этого метода. Например, с помощью метода ПЦР удается получать множественные мутации в определенных участках ДНК. В этом случае амплификацию сегмента ДНК, подвергающегося мутации, производят в присутствии трех, вместо четырех, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, причем один из них вводят в реакционную смесь в высокой концентрации. Именно этот нуклеотид преимущественно включается в амплифицируемый фрагмент ДНК вместо недостающего нуклеотида, что сопровождается накоплением в ДНК-продукте множественных случайных мутаций в виде

соответствующих замен нуклеотидов. В таких искусственных условиях мутации возникают за счет снижения точности синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой.

При использовании в ПЦР вырожденных праймеров, которые представляют собой сложную смесь олигонуклеотидов, содержащих многие точечные мутации, мутациями можно сканировать определенные участки ДНК. В таком классическом варианте постановки ПЦР, кроме точечных мутаций, можно получать делеции и вставки. Целенаправленно получать точечные мутации, делеции и вставки, а также гибридные молекулы ДНК без применения ДНК-лигазы, можно при применении подхода к получению гибридных генов с помощью перекрывающихся праймеров.

Для замены определенных аминокислот в полипептидных цепях белков in vivo применяют метод амбер-супрессии с использованием аминоацилированных различными аминокислотами супрессорных тРНК, узнающих нонсенс-триплеты в мутантных мРНК в процессе трансляции. Вместо аминокислоты, присутствующей в белке дикого типа, встраивается аминокислота, которую несет аминоацилированная супрессорная тРНК. В дополнение к природным супрессорным тРНК E. Coli синтезированы in vitro гены, кодирующие супрессорные РНК новой специфичности. В итоге в синтезирующейся in vivo полипептидной цепи в результате супрессии кодона UAG (амбер-кодон) может быть произведено до 13 аминокислотных замен. С использованием такого подхода удалось произвести >1600 замен аминокислот Lac-репрессора E. Coli и локализовать участки полипептидной цепи, существенные для связывания индуктора, прочного связывания оператора и термостабильности белка. Преимуществом метода амбер-супрессии является то, что он не требует синтеза большого числа мутантных генов и их последующего отбора, так как введение одного мутантного гена в составе экспрессирующего вектора в клетки разных супрессорных штаммов E. Coli позволяет получать разные замены аминокислот с одновременной сверхпродукцией мутантного белка в бактериальных клетках.

Сайт-направленный мутагенез является в настоящее время одним из наиболее широко используемых и информативных методов изучения структуры и функций белков, в том числе ферментов. Совокупность таких подходов, как направленное получение мутаций в сегментах рекомбинантных генов, введение мутантных генов в организм и исследование влияния полученных мутаций на функционирование гена, получила название обратной генетики. Возможность замены конкретных аминокислот в белках с известной первичной структурой, а также объединение в одной полипептидной цепи доменов различных белков и ферментов позволили, по сути дела, конструировать *in vitro* новые белки, не встречающиеся в природе, и привели к созданию в молекулярной генетике нового направления – белковой инженерии.

### 12. МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ОТБОРА СУБСТРАТОВ

Важнейшей особенностью ферментов является их специфичность в отношении превращаемых субстратов. Рассмотрим, что происходит в процессе ферментативной реакции.

Во-первых, субстрат должен присоединиться к ферменту. Вследствие больших различий в размерах фермента и субстрата молекула субстрата может находиться в контакте лишь с ограниченной частью молекулы фермента — активным центром. Связывание субстрата с активным центром происходит за счет достаточно слабых взаимодействий (электростатических контактов, гидрофобного связывания, а также водородных связей). Если взаимодействие субстрата с ферментом многоточечное, то очевидно, что расположение активных группировок в молекуле субстрата должно соответствовать расположению активных групп в молекуле фермента. В том случае, если эти группировки расположены так, что не происходит образования необходимых контактов, то это влияет на величину константы диссоциации  $K_d = k_1/k_1$ . Возможно

влияние на кинетические характеристики реакции  $K_M$  и  $k_{cat}$ , тем более что  $K_M$  является функцией  $K_d$ .

Каталитические группы активного центра должны также быть ориентированы необходимым для катализа образом. В противном случае катализ неэффективен, что приводит к понижению величины  $k_{\text{cat}}$ . В случае двухсубстратных реакций оба субстрата должны быть расположены в соответствующих комплексах таким образом, чтобы реакция была возможна.

Некоторые из ферментов обладают достаточно широкой специфичностью, т. е. осуществляют превращение нескольких субстратов. К таким ферментам относится щелочная фосфатаза. Другие ферменты, напротив, обладают высокой избирательностью, например, дрожжевые лактатдегидрогеназы, которые имеют специфичность в окислении только L- либо D-изомера лактата. Аминоацил-тРНК-синтетазы проявляют высокую стереоспецифичность: D-аминокислоты не являются субстратами этих ферментов. Известен один пример возможного субстрата такой конфигурации – D-тирозин. Возможно образование D-тирозил-тРНК, и, по-видимому, по этой причине для гидролиза нежелательного продукта существует специальный фермент – D-тирозил-гидролаза, отщепляющая остаток D-тирозина от D-тирозил-тРНК.

Для того чтобы найти объяснение специфичности и эффективности ферментативного катализа, необходимо представлять закономерности, которые касаются взаимосвязи теории действия ферментов и общих теорий химического катализа. Главное свойство ферментов состоит в том, что они снижают энергию активации катализируемой химической реакции.

В 1930 г. Дж. Б. С. Холдейн высказал предположение, что энергия связывания субстрата используется для его деформации до структуры продукта. Были рассмотрены различные способы использования энергии связывания для понижения энергии активации химического превращения субстрата. Заметим, что теория переходного состояния не учитывает процессы столкновения реагентов. Эта теория рассматривает основное состояние (сами взаимодействующие вещества) и нестабильные соединения, образующиеся в ходе реакции (рис 12.1, I — переходное состояние  $ES^{\neq}$ ). Переходному состоянию соответствует максимум на кривой изменения энергии реагентов вдоль координаты реакции.

В этом состоянии химические связи непрерывно образуются и разрываются. Напротив, промежуточным соединениям со стабильными химическими связями соответствуют минимумы на рассматриваемой кривой. Простой способ расчета скорости реакции основан на допущении, что между основным и переходным состоянием существует термодинамическое равновесие. В данном случае концентрацию переходного состояния можно рассчитать из разности энергии этих состояний. Общую скорость реакции получают умножением концентрации переходного комплекса на константу скорости его распада.

Рассмотрим мономолекулярную реакцию. Предположим, что разность энергий Гиббса для переходного  $(X^{\neq})$  и основного (X) состояний равна  $\Delta G^{\neq}$ . Если воспользоваться хорошо известным соотношением равновесной термодинамики  $\Delta G^{\neq} = -RTlnK$ , то можно получить следующее соотношение:

$$[X^{\neq}] = [X] \exp(-\Delta G^{\neq}/RT).$$

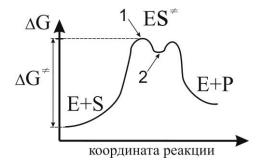


Рис. 12.1. График изменения энергии Гиббса в ходе реакции: 1 - переходное состояние  $(ES^{\neq})$ ; 2 — промежуточное состояние

Частота распада переходного комплекса совпадает с частотой колебаний разрываемой связи. Величина частоты может быть получена на основе равенства энергий возбужденного осциллятора, рассчитанных на основе квантовой теории (E = hv) и классической физики (E = kT), где h - постоянная Планка, <math>v - частота колебаний, <math>k - 1постоянная Больцмана: v = kT/h. Следовательно, скорость распада молекул X определяется уравнением

$$\exp(-\Delta G^{\neq}/RT). \tag{12.1}$$

Константа скорости первого порядка для распада молекул Х равна

$$k_1 = \frac{kT}{h} \exp(-\Delta G^{\neq}/RT). \tag{12.2}$$

Энергия активации Гиббса  $\Delta G^{\neq}$  может быть подразделена на энтальпийную и энтропийную составляющие в соответствии с соотношением равновесной термодинамики:

$$\Delta G^{\neq} = \Delta H^{\neq} - T\Delta S^{\neq}.$$

Соответственно

$$k_1 = \frac{kT}{h} \exp(-\Delta H^{\neq}/RT) \exp(\Delta S^{\neq}/R). \tag{12.3}$$

Теория применима переходного состояния ДЛЯ анализа ферментативного катализа. В случае простого механизма Михаэлиса – Ментен, когда энергия связывания уменьшает энергию активации перехода, определяемого кажущейся константой скорости второго порядка, равной  $k_{cat}/K_M$ , часть этой энергии используется для уменьшения энергии активации стадии химического превращения субстрата с константой скорости k<sub>cat</sub>.

Для дальнейших рассмотрений примем, что  $K_M = K_S$ , т. е.  $K_M$  является кажущейся константой диссоциации. Это имеет место при низких значениях [S], когда [S] << K<sub>M</sub>:  $v = E[S]k_{cat}/K_M$  (гл. 4, уравнение (4.16)), т. е. в этом случае  $k_{cat}/K_M$  представляет собой кажущуюся константу скорости второго порядка. Параметр  $k_{cat}/K_{M}$  связывает скорость реакции с концентрацией свободного фермента, а не с его общей концентрацией:

$$E+S \xrightarrow{K_{M}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E+P$$

$$E+S \xrightarrow{K_{cat}/K_{M}} ES^{\neq}$$

$$(12.4)$$

$$E+S \xrightarrow{K_{cat}/K_{M}} ES^{\neq}$$

$$E+S \xrightarrow{\Lambda_{Caf} \cap \Lambda_{M_{\uparrow}}} ES^{\neq}$$

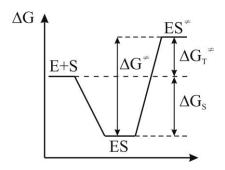
$$(12.5)$$

Напомним, что константа скорости для взаимодействия свободного фермента со свободным субстратом с образованием продуктов равна  $k_{cat}/K_{M}$ . В терминах теории переходного состояния константа равновесия для реакции (12.5) пропорциональна энергии активации  $\Delta G_{T}^{\neq}$ . Эта величина имеет две составляющие: одна из них,  $\Delta G^{\neq}$ , – положительная, отражающая энергию активации химических стадий, в ходе которых происходит образование и разрыв связей, а  $\Delta G_S$  – отрицательная величина, отражающая использование энергии связывания:

$$\Delta G_{\rm T}^{\neq} = \Delta G^{\neq} + \Delta G_{\rm S}. \tag{12.6}$$

Подставив это выражение в уравнение (12.2), получим:

$$RTln(k_{cat}/K_M) = RTln(kT/H) - \Delta G^{\neq} - \Delta G_S.$$
 (12.7)



**Рис. 12.2.** Изменение энергии Гиббса для реакции  $E + S \stackrel{K_S}{\longleftrightarrow} ES \stackrel{k_{cat}}{\longleftrightarrow} E + P$ 

В том случае, когда каждая взаимодействующая группа субстрата контактирует с соответствующим центром связывания фермента, энергия связывания принимает максимальное значение. В этом случае говорят, что фермент и субстрат комплементарны. Поскольку структура субстрата изменяется в ходе реакции – сначала образуется переходное состояние, а затем продукты, структура недеформированного фермента может быть комплементарна только одной форме субстрата (согласно теории А. Фершта). Можно предположить, что для фермента каталитически выгодно быть комплементарным переходному состоянию субстрата, а не исходному субстрату. В этом случае наблюдается увеличение энергии связывания по мере приближения структуры субстрата к структуре переходного состояния, и это уменьшает энергию активации стадии химического превращения. Наоборот, если фермент комплементарен исходному уменьшение энергии связывания при образовании переходного состояния будет увеличивать энергию активации химической стадии. Теория комплементарности при фермент-субстратном взаимодействии принадлежит Э. Фишеру, воплотившему ее в модели «ключ-замок». Далее была развита теория комплементарности фермента переходному состоянию, введенная Дж. Б. С. Холдейном и разработанная Л. Полингом.

## 12.1. Комплементарность фермента исходному субстрату

Максимальная внутренняя свободная энергии связывания ( $\Delta G_b$ ) реализуется в исходном фермент-субстратном комплексе ES, обеспечивая прочное связывание, при этом  $K_M$  будет малой величиной. Образование переходного состояния сопровождается изменением геометрии субстрата и ухудшением его соответствия ферменту, что приведет к уменьшению энергии связывания.

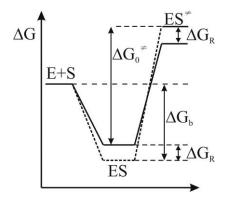


Рис. 12.3. Изменение энергии Гиббса для реакции  $E + S \stackrel{K_S}{\rightleftharpoons} ES \stackrel{k_{cat}}{\rightleftharpoons} E + P$ Пунктирная линия – фермент структурно комплементарен субстрату, сплошная – переходному состоянию ( $\Delta G_S = \Delta G_b$ – отрицательная величина,  $\Delta G_0$  и  $\Delta G_R$  – положительные)

Если увеличение свободной энергии, вызванное ухудшением структурного соответствия между ферментом и субстратом, обозначить через  $\Delta G_R$ , а свободную энергию активации для образования и разрыва химических связей на стадии, определяемой константой  $k_{\text{cat}}$  – через  $\Delta G_0^{\neq}$ , то наблюдаемая свободная энергия активации для стадии химического превращения субстрата с константой скорости  $k_{cat}$  будет равна:

$$\Delta G^{\neq} = \Delta G_0^{\neq} + \Delta G_R,$$

$$\Delta G_S = \Delta G_b.$$
(12.8)
(12.9)

$$\Delta G_{\rm S} = \Delta G_{\rm b}.\tag{12.9}$$

Энергия активации Гиббса для процесса (12.5) равна

$$\Delta G_{\mathrm{T}}^{\neq} = \Delta G_0^{\neq} + \Delta G_{\mathrm{R}} + \Delta G_{\mathrm{b}}. \tag{12.10}$$

#### 12.2. Комплементарность фермента переходному состоянию

Полная энергия связывания  $\Delta G_b$  реализуется в переходном состоянии. Исходному фермент-субстратному комплексу ES соответствует положительный член  $\Delta G_R$ , который отражает возрастание энергии за счет структурного несоответствия исходного состояния переходному. Этот член увеличивает К<sub>М</sub>, а прирост энергии связывания по мере приближения к переходному состоянию увеличивает  $k_{cat}$ . Таким образом,

$$\Delta G^{\neq} = \Delta G_0^{\neq} - \Delta G_R,$$

$$\Delta G_S = \Delta G_b + \Delta G_R.$$
(12.11)
(12.12)

$$\Delta G_{\rm S} = \Delta G_{\rm b} + \Delta G_{\rm R}.\tag{12.12}$$

Энергия активации Гиббса для перехода, характеризующегося константой  $k_{cat}/K_M$ , определяется выражением

$$\Delta G_{T}^{\neq} = \Delta G^{\neq} + \Delta G_{S} = \Delta G_{0}^{\neq} + \Delta G_{b}. \tag{12.13}$$

Сравнение уравнений (12.10) и (12.13) показывает, что, когда фермент комплементарен переходному состоянию субстрата, а не исходному субстрату,  $k_{cat}/K_{M}$ возрастает в  $\exp(\Delta G_R/RT)$  раз.

Существует экспериментальное подтверждение использования энергии связывания в ферментативном катализе, например, при кинетических исследованиях сериновых протеаз. В том случае, когда объемные боковые радикалы остатков аминокислот занимают в химотрипсине центр связывания уходящей группы, их энергия связывания используется для увеличения  $k_{cat}/K_M$ . К увеличению отношения  $k_{cat}/K_M$  приводит удлинение полипептидных цепей субстратов эластазы – это другой протеолитический фермент. Интересно, что энергия связывания добавочных групп используется для увеличения  $k_{cat}$ , а не для увеличения  $K_{M}$ , т. е. применяется не для связывания субстрата.

Одной из распространенных точек зрения является представление о том, что ферменты эволюционировали в сторону более прочного связывания переходных состояний субстратов, а не самих субстратов. Более того, слабое связывание субстратов является каталитически выгодным. Эти рассуждения опровергают распространенное мнение, что необходимым условием эффективного протекания ферментативной реакции является наличие прочного связывания фермента с субстратом или низкое значение величины  $K_{\rm M}$ . Согласно этой теории для катализа важны высокие значения  $K_{\rm M}$ .

В гл. 3 было показано, что уравнение Михаэлиса — Ментен можно представить в виде  $v = (k_{cat}/K_M)[E][S]$ . Исходя из этого уравнения процесс эволюции ферментов, направленный на увеличение скорости катализируемых ими реакций, можно разделить на два этапа:

- 1) увеличение  $k_{cat}/K_M$  за счет повышения комплементарности фермента переходному состоянию субстрата;
- 2) увеличение концентрации свободного фермента в стационарном состоянии за счет повышения  $K_{\rm M}$ , направленное на то, чтобы в свободном состоянии находилось максимально возможное количество активного фермента.

Однако это не совсем так для ферментов, выполняющих регуляторные функции. Для данных ферментов обеспечение высокой скорости реакции не является первостепенной задачей. Активность таких ферментов, как правило, регулируется путем изменения величины  $K_M$  соответствующих субстратов через аллостерическое взаимодействие. Иногда для первого фермента метаболического пути может оказаться выгодным низкое значение  $K_M$ . Это обеспечивает контроль скорости поступления субстрата в метаболический путь, предотвращает его перегрузку и накопление реакционноспособных промежуточных продуктов метаболического пути.

# 12.3. Предполагаемые механизмы связывания субстратов с ферментом

Рассмотрим механизмы, которые обеспечивают использование энергии связывания для достижения комплементарности фермента переходному состоянию.

В 1890 г. Э. Фишером была предложена модель взаимодействия субстрата с ферментом «ключ-замок», согласно которой специфичность ферментов определяется точным соответствием (комплементарностью) фермента и субстрата. Эта модель объясняла высокую специфичность ферментов, но не объясняла явления стабилизации переходного состояния, наблюдающегося на практике.

Далее была развита теория комплементарности фермента переходному состоянию. Ее первоначальное упоминание принадлежит Дж. Б. С. Холдейну, далее она была разработана Л. Полингом. Принцип ее состоит в том, что для фермента каталитически выгодно быть комплементарным переходному состоянию субстрата, а не исходному субстрату. При связывании с ферментом в субстрате возникают напряжения или деформации. По словам Холдейна, «в модели Фишера ключ не совсем подходит к замку, а подвергается в замке некоторой деформации». При связывании субстрата происходит стабилизация переходного состояния. Субстрат в переходном состоянии взаимодействует с ферментом более эффективно, чем при первоначальном связывании с ферментом, и поэтому полная энергия связывания не реализуется до тех пор, пока не сформируется переходное состояние.

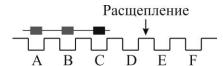
В 60-х гг. XX в. Д. Кошланд предложил модификацию модели «ключ-замок», которая получила название «рука-перчатка», или теория индуцированного соответствия. Теория была предложена для объяснения отсутствия ферментативной активности в случае субстратов маленького размера, таких как вода, в которых нет групп,

способных обеспечить продуктивное связывание и энергию для приведения фермента в активное состояние. Поскольку ферменты в основном не жесткие, а скорее гибкие молекулы, активный центр фермента может изменить конформацию после связывания субстрата. Боковые группы аминокислот активного центра принимают такое положение, которое позволяет ферменту выполнить свою каталитическую функцию. Таким образом, фермент становится комплементарным переходному состоянию только после связывания с субстратом. Перестройка области активного центра фермента при связывании названа процессом конформационной адаптации, или взаимной адаптацией субстрата и активного центра. В качестве примера Кошландом была рассмотрена реакция переноса у-фосфата АТР на гексозу или любой другой сахар, катализируемая ферментом гексокиназой, с образованием продуктов гексозо-6-фосфата и ADP. Был поставлен вопрос: почему фермент не переносит у-фосфат АТР на молекулы воды? При построении теории рассматривалась модификация сахара меньшего размера, при этом резко менялась каталитическая скорость реакции. Почему нужен субстрат именно такого размера, ведь меньший субстрат должен лучше входить в «карман» активного центра? Оказалось, что каталитические остатки аминокислот, проводящие реакцию, должны достичь особой ориентации в активном центре, поскольку задействуют все контакты субстрата с белком. Можно было бы предположить, что в конформационной адаптации задействована вся белковая глобула. Однако экспериментально доказано, что динамические подвижки могут быть различными, в том числе и небольшими. Примером фермент-субстратного взаимодействия, описываемого этой теорией, является взаимолействие карбоксипептидазы с субстратами (см. гл. 2 и 13).

Теория Кошланда не лишена недостатков. Следует полагать, что часть энергии расходуется на деформацию фермента. В концепции деформации считается, что  $K_{\rm M}$  возрастает за счет составляющей энергии связывания, которая отвечает за деформацию субстрата, а в теории индуцированного соответствия — за счет составляющей, отвечающей за деформацию фермента.

В настоящее время более распространена другая модель, сохраняющая основные положения гипотезы Кошланда, но фиксирует внимание на том, что специфичность действия ферментов объясняется в первую очередь узнаванием той части субстрата, которая не участвует в катализе. Между этой частью субстрата и субстратным центром фермента возникают многочисленные электростатические, гидрофобные взаимодействия и водородные связи. При этом должны быть зафиксированы все контакты между ферментом и субстратом в активном центре, но не обязательны динамические подвижки, хотя последние не исключаются. Такая модель объясняет не только специфичность ферментов, но и стабилизацию переходного состояния.

Механизм непродуктивного связывания приводит к эффектам, аналогичным возникающим при деформации и индуцированном соответствии. Он основывается на объяснении более высокой реакционной способности больших по размеру специфических субстратов по сравнению с меньшими неспецифическими субстратами. Помимо продуктивного связывания, в активном центре возможны другие способы, когда малые субстраты связываются, но не подвергаются каталитическому превращению. Например, в молекуле лизоцима активный центр имеет протяженную структуру, состоящую из шести центров связывания: A, B, C, D, E, F. Для осуществления реакции необходимо, чтобы молекула субстрата заняла центры D и E (рис. 12.4), но субстрат для этого «не дотягивает» по размерам.



**Рис. 12.4.** Непродуктивное связывание субстратов лизоцимом. Небольшие субстраты способны присоединяться с любой стороны вдоль вытянутого активного центра лизоцима, не связываясь с центрами D и E, где происходит расщепление

Деформация вносит положительный вклад катализ при условии В комплементарности фермента переходному состоянию субстрата, при ЭТОМ увеличиваются  $k_{cat}$  и  $K_M$ , что приводит к увеличению скорости реакции. Индуцированное соответствие уменьшает эффективность катализа, увеличивая К<sub>М</sub> без соответствующего увеличения k<sub>cat</sub> по сравнению с ферментом, находящимся в нативной форме в отсутствие субстрата. Механизм непродуктивного связывания не затрагивает каталитического превращения специфических субстратов, однако приводит к появлению дополнительных связывающих центров для конкурирующих между собой неспецифических субстратов.

С помощью различных методов, например с помощью метода рентгеноструктурного анализа, изучалась вероятность моделей деформации и индуцированного соответствия на примерах различных ферментов. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, выполненного для ферментов и их комплексов с субстратами, далеко не всегда при взаимодействии с субстратом наблюдаются значительные конформационные перестройки активного центра. Таких изменений в структуре не наблюдается, например, для лизоцима и гексокиназы, а также для сериновых протеаз. В этом случае механизм индуцированного соответствия, скорее всего, не работает, а имеют место другие механизмы. В то же время для такого фермента, как карбоксипептидаза, при связывании субстрата происходят конформационные перестройки белка ДЛЯ осуществления «продуктивных» контактов субстрата с активным центром фермента (см. гл. 2 и 13). Карбоксипептидаза не отщепляет С-концевой остаток аминокислоты от коротких пептидов менее пяти аминокислотных остатков в силу того, что короткие пептиды не способны осуществить процесс деформации, ведущий к образованию продуктивного комплекса.

В многосубстратных реакциях индуцированное соответствие субстрата участием активных центров. осуществляется c нескольких Примером взаимодействий является взаимодействие транспортной РНК, специфичной фенилаланину (тРНК Phe) с фенилаланил-тРНК-синтетазой из термофильной бактерии Thermus Termophilus. Этот фермент катализирует реакцию аминоацилирования тРНК, т. е. перенос аминоацильного остатка фенилаланина на концевой аденозин тРНК. Интересно, что в отсутствие низкомолекулярных лигандов концевой аденозин тРНК связывается с центром связывания фенилаланина. В то же время в присутствии фенилаланина и АТР либо аналога промежуточного интермедиата реакции фенилаланиладенилата акцепторный конец тРНК значительно перемещается и занимает положение, необходимое для переноса аминоацильного остатка на концевой аденозин тРНК. Такая подстройка акцепторного этом случае индуцируется низкомолекулярными лигандами аминоацилирования – аминокислотой и АТР. Этот механизм был подтвержден как экспериментами в растворе, так и методом рентгеноструктурного анализа [14].

# 12.4. Специфичность и относительная реакционная способность. Коррекция ошибок в реакциях, катализируемых аминоацил-тРНК-синтетазами

В применении к биологическим системам специфичность — это способность фермента узнавать определенный субстрат из нескольких, конкурирующих за данный активный центр. В этом смысле специфичность является функцией не только прочности связывания каждого из субстратов, но и скорости катализа и характеризуется отношением величин их  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ . Это «суммарная» специфичность, слагающаяся из специфичности связывания и кинетической (или каталитической) специфичности. Если какой-либо субстрат, реагируя с ферментом, имеет константу  $k_{\text{cat}}$  в 1000 раз меньше, чем  $k_{\text{cat}}$  для интересующего нас субстрата, фактор  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  может компенсировать эту разницу, и

наоборот. Поэтому действительно удобно, независимо от всех предыдущих рассуждений, характеризовать специфичность отношением  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ . Термин «специфичность» используется также при описании активности фермента в отсутствие специфического субстрата. При этом субстрат называют «плохим», если для него характерно либо высокое значение  $K_{\text{M}}$ , либо низкое  $k_{\text{cat}}$ . В биологических системах имеют значение оба эти параметра.

Центральную проблему специфичности можно сформулировать так: каким образом фермент отличает специфический субстрат от другого, меньшего или равного ему по размерам (изостерического) субстрата? Отличить больший по размеру субстрат от специфического нетрудно благодаря размерам активного центра. Однако реакции с участием меньших по размеру субстратов характеризуются меньшими по значению кинетическими параметрами  $k_{cat}$  и  $k_{cat}/K_M$ . Примерно такую задачу постоянно решают аминоацил-тРНК-синтетазы. Если синтетаза ( $E^X$ ) ошибочно активирует чужую аминокислоту (Y) и далее катализирует ее перенос на «свою» тРНКX:

$$E^{X}+Y+TPHK^{X} \xrightarrow{ATP} E^{X}+Y\sim TPHK^{X}$$
(12.14)

или если она ошибочно аминоацилирует субстратной аминокислотой X «чужую» (неспецифическую) тРНК:

$$E^{X} + X + TPHK^{Y} \xrightarrow{ATP} E^{X} + X \sim TPHK^{Y}$$
(12.15)

то каждое из этих событий приведет к ошибке в последовательности синтезируемой полипептидной цепи в процессе синтеза белка.

Способность фермента различать природные аминокислоты в основном изучалась применительно к аминокислотам, меньшим или изостеричным (равным по размеру) по отношению к специфическому субстрату. Дискриминация таких аминокислот, способных разместиться в активном центре фермента, определяется предпочтительным связыванием истинного субстрата за счет незначительных различий в структуре. Примерами такого рода могут служить связывание изолейцил-тРНК-синтетазой валина, отличающегося от изолейцина на одну метиленовую группу, и связывание валил-тРНК-синтетазой изостеричного валину треонина, содержащего гидроксильную группу вместо метиленовой. Наличие разницы в энергии связывания не до конца обеспечивает в этих случаях точность работы системы аминоацилирования.

Треонин связывается с валил-тРНК-синтетазой в 100–200 раз менее прочно, чем валин, несмотря на то, что он изостеричен валину, поскольку в гидрофобный карман в этом случае погружается гидроксильная группа. Энергия активации данной реакции представляет собой сумму двух составляющих: одна из них — энергия активации для стадии химического превращения, а вторая — энергия связывания фермента с субстратом.

Различие в энергии связывания специфичного субстрата RS и меньшего по размерам конкурирующего соединения HS равно дополнительной энергии связывания группы R, имеющейся у специфичного субстрата и отсутствующей у меньшего субстрата по отношению к водороду.

Поскольку энергия взаимодействия группы R не только входит в энергию связывания, но и понижает энергию активации стадии химического превращения, вклад заместителя R следует оценивать из сравнения параметров  $k_{cat}/K_M$  для двух субстратов: RS и HS. Например, если величину  $k_{cat}$  для валина в случае активации валил-тРНК-синтетазой принять за 1, то для других аминокислот эта величина будет следующей: для аланина -0.03, для изолейцина -0.0019, для серина -0.05.

Дополнительную энергию связывания группы R по отношению к водороду можно определить по формуле

$$\Delta G_b = RT \ln(k_{cat}/K_M)_{RS}/\ln(k_{cat}/K_M)_{HS}. \tag{12.16}$$

Были проведены оценки активации синтетазами различных аминокислот: для пары изолейцил-тРНК-синтетаза-валин неспецифический субстрат по критерию  $k_{cat}/K_M$  хуже в 140-200 раз [15]. Однако концентрация валина в клетках E. Coli выше, чем изолейцина: [Ile]/[Val] = 0,18. На стадии активации изолейцил-тРНК-синтетаза может допускать ошибки чаще, чем 0,03-0,04. Экспериментально обнаруженный уровень ошибок при замене изолейцина на валин в биосинтезе овальбумина цыпленка, как и гемоглобина кролика, равен 3·10<sup>-4</sup>. Следовательно, дискриминация валина изолейцил-тРНК-синтетазой на стадии активации недостаточна для достижения надлежащей точности белкового синтеза, и должны существовать дополнительные механизмы коррекции ошибочно активированной аминокислоты. Поскольку эта величина включает в себя ошибки, возникающие как при транскрипции, так и при трансляции, и она получена для пары близкородственных аминокислот, в целом точность функционирования аминоацил-тРНКсинтетаз должна превышать этот достаточно высокий уровень. Приблизительно такой же уровень ошибок  $(10^{-4})$  был выявлен в случае цистеина, ошибочно заменяющего аргинин во флагеллине E.Coli. На основании этих экспериментальных данных общее число ошибок для всех возможных аминокислот на транслируемый кодон может составлять 1·10<sup>-4</sup>–1·10<sup>-1</sup>

Чему соответствует такой уровень ошибок, если говорить о частоте синтеза дефектных молекул белка? При ошибочном включении одной аминокислоты на каждые 10 000 остатков одна из 20 белковых молекул длиной в 500 остатков будет содержать единственную ошибочную аминокислоту в каком-либо положении цепи. Если около 10 % всех ошибок серьезно сказываются на биологической функции белка, из этого следует, что одна молекула белка из 200 синтезированных окажется бесполезной или даже вредной в клеточном метаболизме.

Неблагоприятная ситуация наблюдается *in vivo* для валил-тРНК-синтетазы в люпине: концентрация валина в этом растении в несколько десятков раз ниже, чем треонина, цистеина, серина и аланина, а дискриминирующая способность валил-тРНК-синтетазы по отношению к каждой из этих аминокислот *in vivo* значительно ниже, чем относительная специфичность *in vitro*. Между тем на каждые 100 молекул валина может быть активировано 7 молекул треонина, а частота всех ошибок в серии, если суммировать вероятность ошибочной активации названных четырех аминокислот, может равняться 10.

Существование механизмов коррекции было впервые показано в классических исследованиях  $\Pi$ . Берга. Как указывалось выше, изолейцил-тРНК-синтетаза ошибочно активирует валин, при этом добавление тРНК<sup>Ile</sup> к комплексу с изолейциладенилатом приводит к образованию изолейцил-тРНК<sup>Ile</sup>, а у валиладенилат-ферментного комплекса не наблюдается образования валил-тРНК<sup>Ile</sup>, поскольку при добавлении тРНК<sup>Ile</sup> происходит гидролиз ошибочного аминоациладенилата:

$$E^{\text{Ile}} + \text{Val} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{-pp}_{i}} E^{\text{Ile}} \cdot [\text{Val} \sim \text{AMP}] \xrightarrow{\text{TPHK}^{\text{Ile}}} E^{\text{Ile}} + \text{Val} + \text{AMP}$$
(12.17)

Как видно из данной схемы, в присутствии тРНК<sup>Пе</sup> изолейцил-тРНК-синтетаза непроизводительно гидролизует АТР до АМР и пирофосфата, т. е. фактически работает как АТР-пирофосфогидролаза (АТР-пирофосфатаза). Избыточный по отношению к синтезированному продукту гидролиз АТР за счет АТР-пирофосфогидролазной активности синтетазы является критерием существования корректирующего механизма, включающего дополнительную стадию разрушения ошибочного продукта реакции. Так, у цистеинил- и тирозил-тРНК-синтетаз специфичность высокая и гидролиза АТР не наблюдается. В некоторых случаях, когда дискриминация аминокислот на стадии активации была недостаточной, наблюдался быстрый гидролиз ошибочного

аминоациладенилата вместо переноса «неправильной» аминокислоты на субстратную тРНК. Таким образом, эта макроэргическая форма промежуточного продукта реакции аминоацилирования является весьма важной в обеспечении специфичности реакции.

В приведенной выше схеме (12.17), описывающей конечный результат процесса коррекции, не раскрывается роль тРНК: индуцирует ли она гидролиз аминоациладенилата или же служит акцептором ошибочно активированной аминокислоты, а затем подвергается ферментативному деацилированию. Возможные последовательности реакций, катализируемых синтетазами, можно записать в виде следующей схемы (АА-аминокислота, от англ. «amino acid»):

$$E+AA+ATP \xrightarrow{-pp_{i}} E \cdot [AA\sim AMP] \xrightarrow{TPHK,-AMP} E \cdot AA-TPHK \xrightarrow{3} E+AA-TPHK$$

$$H_{2}O \downarrow 4 \qquad H_{2}O \downarrow 5$$

$$E+AA+AMP \qquad E+AA+TPHK \qquad (12.18)$$

Все предложенные механизмы коррекции можно разделить на две группы в зависимости от того, какое соединение в них гидролизуется. В рамках данной схемы (12.18) механизм отбраковки ошибочной аминокислоты может включать стадии 1, 2, 5 (гидролиз аминоацил-тРНК) или же стадии 1 и 4 (гидролиз аминоациладенилата). Если путь 1, 4 реализуется для валина и изолейцил-тРНК-синтетазы, то тогда реакцию 4 катализирует не фермент, а его комплекс с тРНК: Е-тРНК в каждом из возможных маршрутов коррекции исправление ошибки достигается благодаря введению в реакционный путь «необратимого» ответвления (реакции 4 или 5), обеспечивающего гидролиз нежелательных соединений.

В начале 1970-х гг. было обнаружено, что аминоацил-тРНК-синтетазы обладают гидролитической активностью по отношению к аминоацил-тРНК. Поскольку этот процесс наблюдался в отсутствие АМР и пирофосфата, эта реакция не могла быть обратной аминоацилированию тРНК. Доказательство существования этого механизма было получено при изучении аминоацилирования тРНК $^{\rm Val}$  треонином, катализируемого валил-тРНК-синтетазой из *В. Stearothermophilus*. Как и в случае взаимодействия изолейцил-тРНК-синтетазы с валином, валил-тРНК-синтетаза с треонином образует стабильный комплекс, который быстро гидролизуется при добавлении тРНК $^{\rm Val}$  (за 36 сек.). Для решения вопроса о том, предшествует ли гидролизу перенос аминоацильного остатка на тРНК $^{\rm Val}$ , использовали импульсный метод «замороженной» струи. При смешивании комплекса [ $^{\rm I4}$ C]-треонил-АМР·Е $^{\rm Val}$  с тРНК $^{\rm Val}$  наблюдали кратковременное образование [ $^{\rm I4}$ C]-треонил-тРНК $^{\rm Val}$ , количество которой составляло до 22 % от количества комплекса  ${\rm E}\cdot[{\rm AA}{\sim}{\rm AMP}]$ . Выделив треонил-тРНК $^{\rm Val}$  при помощи быстрой фенольной обработки и осаждения из водной фазы, определили константу ее гидролиза в присутствии валил-тРНК-синтетазы, она равна 40 с $^{\rm -1}$ , тогда как для специфичной валил-тРНК $^{\rm Val}$  — 0,015 с $^{\rm -1}$ , т. е. более чем в 2000 раз ниже.

А. Фершт предложил механизм «двойного сита» в качестве механизма коррекции ошибок валил-тРНК-синтетазой. На первом этапе природные аминокислоты, большие, чем специфический субстрат, «отсеиваются» за счет стерического исключения, тогда как меньшие по размерам аминокислоты попадают в аминоацилирующий центр и активируются в соответствии с величинами их кинетических характеристик взаимодействия и превращения данной аминоацил-тРНК-синтетазой. Отбраковка неправильных аминокислот осуществляется в гидролитическом центре за счет гидролиза «неправильного» аминоациладенилата. Последний процесс идет более эффективно для неспецифического аминоацильного остатка, поскольку он «узнается» хуже активным центром.

Механизм коррекции за счет гидролиза промежуточного аминоациладенилата был сформулирован Дж. Хопфилдом:

$$E \cdot AA \xrightarrow{ATP, -pp_{1}} E \cdot [AA \sim AMP] \xrightarrow{TPHK, k_{1}} AA \sim TPHK + E$$

$$k_{1} \downarrow k_{1} \qquad k_{2} \downarrow k_{2}$$

$$E + AA \qquad E + [AA \sim AMP] \xrightarrow{H_{2}O} AA + AMP + E \qquad (12.19)$$

Основное условие функционирования этого механизма состоит в том, что в ходе реакции должно образовываться легко гидролизующееся промежуточное соединение или продукт. Нежелательные промежуточные соединения диффундируют в раствор, где подвергаются неферментативному гидролизу, поскольку нестабильны. В предположении о необратимой стадии формирования аминоациладенилата *in vivo* (в связи с низкой концентрацией пирофосфата) образовавшийся комплекс аминоациладенилата с ферментом может либо реагировать с тРНК, либо диффундировать в раствор и гидролизоваться. Ошибочный аминоациладенилат диссоциирует из комплекса с ферментом и гидролизуется быстрее, чем специфический. Для специфического аминоациладенилата скорость переноса на тРНК выше, чем скорость диссоциации, т. е. коррекция определяется соотношением кинетических констант определенных стадий.

Этот механизм получил название кинетической коррекции, при которой более эффективное связывание специфического субстрата используется дважды: при образовании комплекса Михаэлиса и при связывании промежуточного соединения (аминоациладенилата). Если имеет место кинетическая коррекция, то ошибочное промежуточное соединение, например валиладенилат из комплекса с изолейцил-тРНК-синтетазой, диффундирует в раствор и гидролизуется быстрее, чем успевает прореагировать с образованием продуктов реакции аминоацилирования. Данный механизм подтверждается тем, что  $K_{\rm S}$  правильных и неправильных аминоациладенилатов различались пропорционально вкладу их аминоацильной, а не аденилатной части в энергию связывания с ферментом.

Экспериментальное доказательство такого механизма было получено для системы аминоацилирования из желтого люпина. Для валил-тРНК-синтетазы в отсутствие тРНК наблюдался гидролиз АТР до АМР и пирофосфата, зависящий от присутствия несубстратных аминокислот (цистеина, треонина, серина и α-аминомасляной кислоты). Показано, что ход реакции обусловлен быстрым образованием комплекса и последующим медленным гидролизом с константой скорости от 0,7 до 13 мин<sup>-1</sup> при 25 °C. Специфический комплекс валиладенилата с ферментом гидролизуется с константой скорости 0,018 мин<sup>-1</sup>, т. е. в 720 раз медленнее, чем, например, комплекс валил-тРНК-синтетазы с цистеиниладенилатом.

В том случае, когда механизмы дискриминации с участием совершившей ошибку аминоацил-тРНК-синтетазы недостаточно эффективны и ошибочно образовавшаяся АА~тРНК диссоциировала из комплекса с ферментом, в качестве возможных дополнительных механизмов может вступать в действие гидролиз образованных продуктов. Одним из способов такого контроля является повторное связывание аминоацил-тРНК и ее деацилирование аминоацил-тРНК-синтетазами. Однако гидролиз уже диссоциировавшей от синтетазы АА~тРНК кажется маловероятным *in vivo*, так как практически сразу же АА~тРНК связывается с фактором элонгации и используется в белковом синтезе.

#### 12.5. Механизм коррекции ошибок при репликации ДНК

Процесс репликации ДНК характеризуется чрезвычайно высокой точностью. Частота мутаций для E. Coli составляет  $1\cdot 10^{-6}-1\cdot 10^{-8}$ , и следовательно точность репликации ДНК либо равна этим величинам, либо еще выше. Молекула ДНК

синтезируется в направлении 5'-3', нуклеотиды присоединяются к 3'-гидроксильной группе растущей цепи ДНК. При синтезе ДНК ошибка исправляется уже после завершения полимеризации (у прокариот). ДНК-полимеразы прокариот обладают корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью, выщепляющей из цепи ошибочно встроенный нуклеотид. В пользу механизма выщепления свидетельствуют данные о том, что экзонуклеаза наиболее эффективно гидролизует участки, содержащие ошибочные основания, а также одноцепочечную ДНК. Частота мутации фага Т4 коррелирует с экзонуклеазной активностью, проявляемой ДНК-полимеразой.

Штаммы, обладающие очень высокой скоростью мутации, синтезируют ДНК с помощью ДНК-полимеразы с низкой экзонуклезной активностью. ДНК-полимераза І Е. Coli состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой около 109 кДа и обладает тремя активностями: полимеризующей в направлении 5'-3', 5'-3'-экзонуклеазной и 3'-5'-экзонуклеазной. Для ДНК-полимеразы І из Е. Coli с помощью обработки фермента субтилизином может быть получен фрагмент Кленова с молекулярной массой около 76 кДа, не обладающий 5'-3'-экзонуклеазной активностью. ДНК-полимераза І при синтезе ДНК «прокладывает» себе путь с помощью 5'-3'-экзонуклеазной активности, а фрагмент Кленова «механически» вытесняет цепь ДНК с 5'-конца.

Если ошибки не исправлены в ходе репликативного синтеза с помощью 3'-5'- экзонуклеазной активности, то они исправляются с помощью специальных систем репарации ДНК. Система репарации ошибочно встроенных нуклеотидов (mismatch repair) предназначена специально для этого. Доказано, что эта система играет ключевую роль в обеспечении точности репликации, поскольку не все репликативные ДНК-полимеразы обладают 3'-5'-экзонуклеазной активностью.

Нарушения структуры ДНК могут быть обусловлены не только ошибками в работе синтезирующего аппарата ДНК-полимераз при репликации, но и в результате внешних воздействий, таких как ионизирующее и ультрафиолетовое облучение (см. гл. 13). Кроме того, в организмах протекают активные метаболические процессы, генерирующие радикалы кислорода. Таким образом, структура ДНК может подвергаться повреждениям под действием окислительного стресса. Схема возможных воздействий на ДНК, приводящих к повреждению ее структуры, и описание некоторых механизмов репарации повреждений ДНК, работающих в организмах млекопитающих, приведена в гл. 13. Система эксцизионной репарации оснований исправляет повреждения возникающие в результате окислительного стресса, т. е. модифицированные (окисленные) основания и разрывы в одной из цепей ДНК. Система эксцизионной репарации нуклеотидов удаляет из ДНК объемные повреждения: фотодимеры, возникающие под действием ультрафиолетового облучения, объемные аддукты метаболитов, попадающих из окружающей среды, например, антрацены и бензопирены. Таким образом, возможна различная пострепликационная коррекция структуры ДНК. В целом считается, что процессы репликации ДНК сопряжены с процессами репарации.

Механизмы репарации участвуют и в восстановлении нарушенной структуры ДНК, которая возникает в результате репликативного синтеза с использованием поврежденной ДНК-матрицы. В этом случае репликация проводится так называемыми транслезионными (translesion) ДНК-полимеразами: например,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$ . Для подобных ДНК-полимераз стоит задача во чтобы то ни стало осуществить репликативный синтез, чтобы избежать остановки репликативной вилки на повреждении. ДНК-полимеразы, ведущие синтез через повреждение матрицы, не обладают корректирующей активностью, поскольку их задачей является ввести нуклеотидное звено в любом случае. Затем поврежденный участок ДНК восстанавливается системами репарации.

Следует заметить, что мутации, вводимые репликативными ДНК-полимеразами в ходе синтеза ДНК, необязательно играют только вредную роль. Мутации в ДНК являются движущей силой эволюции.

# 13. ВКЛАД РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА В ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Рентгеноструктурный анализ (PCA) является на сегодняшний день одним из основных методов исследования структуры ферментов и их активных центров. Этот метод широко используется для установления механизма действия ферментов, основываясь почти целиком на анализе структуры фермент-субстратных комплексов в кристалле. Продуктивным для понимания механизма действия является сочетание PCA с данными, полученными другими методами, например, химической модификацией ферментов или исследованием кинетики катализируемых реакций. Данные рентгеноструктурного анализа являются основой для сайт-направленного мутагенеза в ходе изучения каталитических функций активных центров ферментов.

Последние 20 лет метод РСА интенсивно развивался благодаря улучшению качества очистки белков, оптимизации методов кристаллизации белков, улучшению технического оснащения РСА и в связи с глобальной компьютеризацией – благодаря внедрению машинной и компьютерной обработки данных. На заре использования РСА для кристаллизации требовалось порядка 100 мг белка, на сегодняшний день – не более 10 мг и даже меньше. Однако очистка такого количества белка – это довольно трудоемкая процедура, и не все белки легко получить в достаточном для кристаллизации количестве. Сейчас редко выделяют белки из биомассы. Гораздо чаще получают рекомбинантную молекулу ДНК со встроенным геном, кодирующим целевой белок. Затем в клетках Е. Coli или бакуловируса инициируют направленную экспрессию требуемого белка. Некоторые белки трудно экспрессировать с помощью рекомбинантных молекул, в частности, может возникнуть следующая проблема – многосубъединичные белки не собираются в комплекс, поскольку для правильной экспрессии и сборки нужны собственные белки-шейпероны. Можно столкнуться и с другой трудностью, когда в процессе очистки целевой белок сложно отделить от примесей без значительных потерь. Кроме того, многие качественно очищенные белки сложно закристаллизовать. Как правило, хорошо кристаллизуются термофильные ферменты в силу особенностей их структуры. В то же время белки, имеющие, помимо «кора», дополнительные неструктурированные домены, обычно кристаллизуются плохо. Для получения фрагментов белков, которые лучше кристаллизуются, чем полные молекулы, в РСА применяют протеолитический гидролиз.

При получении дифракционной картины кристаллов белков достаточно хорошим считается разрешение 2—3 Å (табл. 13.1). Ему могут препятствовать различные факторы при получении кристалла белка, например аморфность белковой глобулы. Кроме того, возможен протеолитический гидролиз в процессе выделения белка. Для определения структуры белка необходимо привлекать дополнительную информацию, например известную структуру его гомолога или хотя бы примерную схему хода полипептидной цепи и расположения в молекуле ковалентных связей. Такая схема конструируется на основе установленной ранее последовательности аминокислот в полипептидной цепи и данных об их стереохимии. Для расшифровки структуры комплексов белков с субстратами активно используют биохимические данные, полученные для исследуемой системы в растворе.

Для многих классов ферментов, имеющих схожие функции, с помощью метода РСА была обнаружена подобная структурная организация. Определенное характерное сочетание  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур часто обозначают как «структурные мотивы» в белках. Некоторые из таких мотивов были обнаружены с помощью метода РСА. Например, общий класс  $\alpha$  белков разделяется на  $\alpha$  белки (домены) и  $\alpha$ + $\beta$ -белки (домены). В  $\alpha$  белменах  $\beta$ -складки параллельны друг другу и  $\alpha$ -спирали также параллельны друг другу (но антипараллельны  $\beta$ - участкам).

Выявляемые с помощью РСА молекулярные структуры и соответствующее разрешение

Разрешение, Å	Выявляемая структура		
5,5	Общая конфигурация молекулы. Спирали в виде интенсивно рассеивающих		
	лучи палочек		
3,5	Полипептидный остов, нечетко		
3,0	Боковые цепи, нечетко		
2,5	Разрешение боковых цепей, плоскости пептидной группы. Расположение		
	атомов может быть определено с точностью $\pm 0.4 \ { m \AA}$		
1,5	Расположение атомов может быть определено с точностью $\pm 0.1~{\rm \AA}$		

Характерное чередование участков в цепи имеет вид  $-\beta-\alpha-\beta-\alpha-\beta-$ . В  $\alpha+\beta-$ доменах не соблюдается параллельность и правильное чередование α- и β-участков. Например, есть два характерных мотива строения  $\alpha/\beta$ -белков:  $\alpha/\beta$ -цилиндр, где  $\beta$ -цилиндр лежит внутри цилиндра, сложенного из α-спиралей, и «складка Россманна» (βαβαβ-элемент, т. е. два сегмента α-спирали, вставленные между тремя параллельными β-цепями), где β-слой лежит между комплементарно ему скрученными слоями α-спиралей. α/β-Домены обычно имеют два гидрофобных сайта: в укладке Россманна – между β-листом и каждым из слоев спиралей; в  $\alpha/\beta$ -цилиндре – внутри  $\beta$ -цилиндра (меньший сайт) и между  $\alpha$ - и  $\beta$ цилиндрами (бо́льший сайт). Структурный мотив «α-спираль-поворот-α-спираль» обнаружен во многих ДНК-связывающих белках. Более длинная α-спираль располагается в большой бороздке ДНК, а более короткая α-спираль – поперек бороздки. Структура «цинковый палец», где атом цинка связан с радикалами четырех аминокислот, также часто встречается в ДНК-связывающих белках. Молекулы гистонов объединяются в комплексы с помощью «лейциновых застежек», в которых лейциновые остатки α-спирали одного белка взаимодействуют с помощью гидрофобных взаимодействий с лейциновыми остатками другого.

# 13.1. Применение метода рентгеноструктурного анализа для определения структуры ферментов

Первым ферментом, для которого У. Стейн и С. Мур в 1960 г. установили полностью первичную структуру, является панкреатическая рибонуклеаза (РНКаза). На основании результатов исследования ренатурации рибонуклеазы К. Анфинсен впервые четко сформулировал представление о том, что пространственное строение белка определяется его первичной структурой. Рибонуклеаза гидролизует межнуклеотидные фосфодиэфирные связи в РНК около пиримидиновых звеньев, которые при этом остаются этерифицированными ПО 3'-положению. Механизм реакции, катализируемой рибонуклеазой (см. гл. 2), установлен с помощью методов РСА, ЯМР и химической модификации. Фермент, наряду с другими нуклеазами, широко используется при анализе структуры РНК. Было показано, что субтилизин расщепляет в РНКазе пептидную связь Ala20-Ser21. Образующиеся фрагменты были названы S-пептидом (остатки 1–20) и Sбелком (остатки 21–124). Они образуют комплекс за счет нековалентных взаимодействий, названный РНКазой S. Этот комплекс обладает почти полной каталитической активностью нативного фермента. В изолированном виде S-пептид и S-белок неактивны. Было установлено, что синтетический пептид, идентичный по последовательности фрагменту S-пептида, содержащему остатки 1–13, восстанавливает ферментативную активность. Однако более короткий пептид, содержащий остатки с 1-11, такой способностью не обладает. Полученные данные позволили сделать вывод, соответствующие остатки His12 или Met13 (или оба этих остатка) входят в активный центр фермента. При исследовании влияния рН на активность РНКазы была выяснена

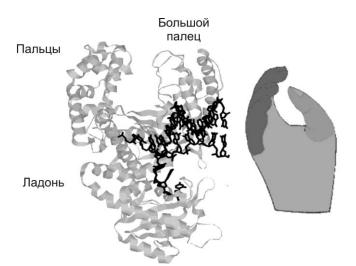
важная роль функциональных групп белка с рК<sub>а</sub> 5,2 и 6,8. Это позволило предположить участие в каталитическом акте остатков гистидина. При карбоксиметилировании РНКазы йодацетатом при рН 5,5, т. е. в условиях, при которых преимущественно происходит модификация остатков гистидина, наблюдалась полная утрата активности фермента. В результате были обнаружены две монокарбоксиметилированные формы фермента. В одной из них карбоксиметилированным является остаток His12, а в другой – His119. Модификации подвергался преимущественно His119. Эти данные предположить, что остатки His12 и His119 находятся в активном центре. В результате рентгеноструктурных исследований было выяснено пространственное строение РНКазы S и комплекса РНКазы S с ингибиторами. Выявлено, что активный центр молекулы локализован в углублении, где находятся остатки His12 и His119. Гидролиз происходит в результате сопряженного действия остатков His12 и His119, осуществляющих кислотноосновный катализ. Схема активного центра и механизм действия рибонуклеазы показаны на рис. 2.2 и 2.3 в гл. 2.

Выяснение механизма действия карбоксипептидазы A (см. гл. 2) оказалось после проведения рентгеноструктурных исследований. возможным только Пространственная структура фермента и его комплекса с дипептидом Gly-Tyr, как с моделью субстрата, была установлена с разрешением 2 Å группой профессора У. Липскомба в 1967 г. Фермент секретируется в виде профермента поджелудочной железой животных, затем происходит образование активного фермента в тонком кишечнике при участии химотрипсина. Карбоксипептидаза последовательно отщепляет от полипептидной цепи остатки С-концевых аминокислот, т. е. является экзопептидазой. В зоне активного центра локализован ион цинка (его лигандами являются боковые цепи остатков Glu72, His196, His69 и молекула воды), а также функциональные группы остатков Arg145 и Туг248, участвующие в связывании субстрата и катализе. Схема каталитического процесса, осуществляемого карбоксипептидазой А, показана на рис. 1.5 (см. гл. 2). Ранее считалось, что гидроксильная группа остатка Туг248 непосредственно участвует в катализе, координируя молекулу воды при расщеплении пептидной связи. Однако такая модель реакции была отклонена после проведения экспериментов по сайт-направленному мутагенезу. При замене остатка Tyr248 на Phe величина k<sub>cat</sub> реакции не изменялась. В то же время с помощью РСА подтвердилось, что остаток Туг248 участвует в фиксации Сконцевого карбоксильного остатка в активном центре. При сравнительном анализе структур фермента и его комплекса с дипептидом Gly-Tyr была получена детальная информация об организации фермент-субстратного комплекса. В частности, установлено, что при его образовании остаток тирозина Туг248 перемещается на 12 Å по отношению к своему положению в свободном ферменте (т. е. примерно на 1/3 диаметра молекулы белка).

Трехмерная структура *химотрипсина* с разрешением 2 Å была установлена методом рентгеноструктурного анализа Д. Блоу в 1976 г. Химотрипсин секретируется в форме профермента – химотрипсиногена поджелудочной железой позвоночных животных; активация профермента происходит в двенадцатиперстной кишке под действием трипсина. Химотрипсин гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами преимущественно остатков тирозина, триптофана, фенилаланина и метионина. Первичная структура фермента установлена Б. Хартли в 1964 г. Еще до установления пространственной структуры методом РСА были идентифицированы функциональные группы активного центра химотрипсина с помощью необратимых ингибиторов и катализа, предложен механизм осуществляемого ферментом. Результаты кристаллографических исследований подтвердили предположение, что остатки Ser195 и His57 сближены в активном центре. Схема каталитического процесса, осуществляемого химотрипсином, показана на рис. 2.4 в гл. 2. Следует отметить, что химические исследования не могли выявить участия Asp102 в функционировании активного центра, поскольку этот остаток погружен внутрь молекулы. В настоящее время считается, что три

остатка — Asp102, His57 и Ser195 — образуют цепь переноса заряда, которая играет решающую роль в процессе катализа, так как увеличивает нуклеофильность остатка серина. Этот остаток является основным акцептором карбоксильной группы расщепляемой пептидной связи, что приводит к формированию промежуточного интермедиата реакции гидролиза.

Первой ДНК-полимеразой, структура которой разрешена методом РСА, был фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I Е. Coli. Фрагмент Кленова лишен 5'-3'экзонуклеазного домена ДНК-полимеразы І и обладает, таким образом, двумя ДНК-полимеразной И 3'-5'-экзонуклеазной. активностями: 3'-5'-экзонуклеазная активность полимераз необходима для удаления ошибочно введенных остатков нуклеотидов в ходе репликации, т. е. для коррекции ошибок репликации (см. разд. 12.5). Рентгеноструктурный анализ фрагмента Кленова, проведенный в лаборатории профессора Т. Стэйтца (Йельский университет, США), впервые выявил специфическую архитектуру полимеразного домена, который по форме напоминает кисть правой руки. Этот домен состоит из доменов, называемых «ладонь», «большой палец», который взаимодействует с праймер-матричным двунитевым участком, И «пальцы», который удерживает однонитевую матрицу (рис. 13.1).



**Рис. 13.1.** Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. Coli* (структура 1KLN)

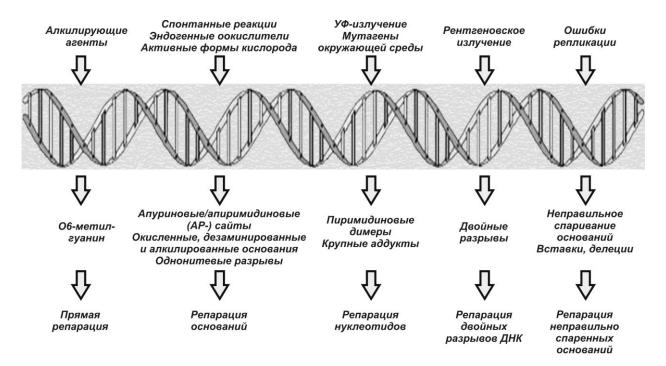
Аналогичную трехмерную организацию имеют полимеразные домены других ДНКиммунодефицита обратной транскриптазы вируса полимераз Рентгеноструктурный анализ позволяет как детализировать, так и модифицировать эту модель применительно к различным типам ДНК-полимераз эукариот. Наиболее консервативна топология каталитического домена «ладонь», состоящего из β-слоя, фланкированного двумя α-спиралями. В этом домене расположены консервативные мотивы. В целом, для архитектуры полимеразного домена характерно существование внутренней полости для связывания ДНК и входящего dNTP, основанием которой является домен «ладонь». Как правило, в этом домене расположена триада отрицательно заряженных аминокислотных остатков (Asp или Glu), взаимодействующих с ионами магния.  ${\sf Mg}^{2+}$  участвует в связывании dNTP и последующем катализе. Обратная транскриптаза (ревертаза) ВИЧ является димером р66-р51, р66 является субъединицей, содержащей каталитический центр. С помощью РСА была получена структура целого фермента. Строение его также напоминает кисть правой руки с каталитическим центром – «ладонью». На дне «ладони» расположено три аминокислотных остатка – Asp-Glu-Glu, которые координируют ион  ${
m Mg}^{2+}$ . Эта триада отрицательно заряженных аминокислотных остатков, как и в случае фрагмента Кленова, является каталитическим центром фермента.

# 13.2. Рентгеноструктурный анализ в исследованиях структуры ферментов процесса эксцизионной репарации оснований ДНК

В настоящее время перспективными объектами для изучения с помощью дифракции рентгеновских лучей являются сложные белковые системы, ответственные за регуляцию и координацию всех процессов жизнедеятельности в клетке. Примерами подобных систем являются комплексы белков, осуществляющие репарацию поврежденной ДНК.

ДНК выступает основным носителем генетической информации в клетке. Механизмы, осуществляющие сохранность ДНК, обеспечивают стабильность клеточного генома. ДНК состоит из двух цепей, взаимодействие между которыми обеспечивается комплементарным взаимодействием пар оснований (рис. 13.2). Последовательность ДНК строго детерминирована. Генетическая информация, заложенная в этой молекуле, передается из поколения в поколение в процессе репликации обеих нитей ДНК. Для того, чтобы информация была скопирована точно, ДНК-матрица не должна быть повреждена. В то же время различные агенты из окружающей среды, а также агенты эндогенного происхождения, возникающие в процессах метаболизма, постоянно повреждают ДНК. К повреждающим воздействиям относятся ионизирующее и ультрафиолетовое облучение. Повреждения ДНК могут быть вызваны антропогенными загрязнениями, такими как продукты сгорания бензина и табакокурения. Все эти агенты вызывают модификации либо оснований ДНК, либо ее сахарофосфатного остова и нарушают целостность ее структуры.

В процессе эволюции возникло несколько сложных систем, способных исправить большинство модификаций структуры ДНК. Как правило, системы репарации ДНК представляют собой ансамбли, состоящие из разных белков, и эти ансамбли специализируются на восстановлении определенного типа повреждений ДНК. Повреждающие воздействия, приводящие к модификации структуры ДНК, и механизмы восстановления (репарации) структуры обозначены на рис. 13.2.



**Рис. 13.2.** Наиболее распространенные повреждения ДНК под воздействием разных агентов и механизмы их репарации

Один из механизмов, направленных на устранение повреждений, — это эксцизионная репарация поврежденых азотистых оснований ДНК. Другой механизм удаляет объемные повреждения с ДНК, в том числе создаваемые УФ-светом, и называется репарацией нуклеотидов. Очень важные процессы репарации разрывов ДНК — это гомологичная и негомологичная рекомбинация. Существует также процесс исправления ошибок, которые возникают во время репликации ДНК (см. разд. 12.5). Несмотря на то, что человеческая клетка в день получает до миллиона повреждений в ДНК, это процесс естественный, потому что большое число повреждений создается за счет оксидативного стресса, постоянно происходяшего в организме, в том числе в результате протекания метаболических процессов. Структура ДНК после исправления повреждений системами репарации восстанавливается. Если в системах репарации имеются дефекты, это приводит к тяжелым болезням у человека. К таким болезням, которые зависят непосредственно от интенсивности работы систем репарации, относятся раковые заболевания (рис. 13.3).

Говоря о важности исследований систем репарации, нельзя не отметить еще одну сторону этого вопроса. Многие средства, которые создаются человечеством для лечения онкологических заболеваний, направлены на повреждение структуры ДНК, в частности химиотерапия и радиотерапия. В случае такого лечения нужно ингибировать интенсивность работы систем репарации, поскольку ИΧ эффективная восстанавливает дефекты в структуре ДНК даже при больших дозах радиооблучения и химиотерапевтических агентов. В связи с этим создание ингибиторов систем репарации является одной из важнейших областей современной медицинской химии и молекулярной биологии. Эффективная разработка лекарств (ингибиторов систем репарации) путем их рационального конструирования невозможна без знания детальной организации этих систем, в том числе очень важным является рентгеноструктурный анализ белков и их комплексов с лигандами.

Механизм эксцизионной (от англ. «excision» — «выщепление») репарации оснований работает так, чтобы исправить повреждения, вносимые эндогенным стрессом, т. е. окислительными процессами, происходящими в организмах (рис. 12.4). При этом повреждаются основания в ДНК, а нередко более интенсивный процесс приводит к разрыву цепей ДНК. Поврежденное основание удаляется специфическими ферментами — ДНК-гликозилазами. Эти ферменты опознают повреждение и выщепляют его. При этом в ДНК формируется сайт, лишенный кодирующего основания — апуриновый/апиримидиновый (АР-) сайт. Затем ДНК «разрезается» с 5'-стороны от АР-сайта специальным ферментом, который называется апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (АРЕ1), и вместо поврежденного основания в разрыв вводится остаток неповрежденного нуклеотида.



Рис. 13.3. Влияние дефектов в системах репарации ДНК на организм человека

За эту функцию отвечает фермент, называющийся ДНК-полимераза в (Pol в). Являясь ключевой ДНК-полимеразой процесса репарации, этот фермент имеет дополнительную и очень важную активность – удаляет остаток дезоксирибозы с 5'-конца разрыва. После удаления дезоксирибозного остатка и последующего введения остатка дезоксинуклеозид-5'-монофосфата разрыв в ДНК «зашивается» с помощью ДНК лигазы III. В этой системе по исправлению повреждения координированно работает несколько белков. Остаток дезоксирибозы на 5'-конце разрыва, лишенный основания, тоже должен быть удален; если этого не происходит, то репарация идет по другому пути. При этом стимулируется достаточно протяженный синтез ДНК вдоль разрыва, катализируется вначале ДНК-полимеразой В, и далее синтез ДНК продолжает ДНКполимераза δ. Свисающий фрагмент цепи ДНК из противоположной цепи удаляется ферментом флэпэндонуклеазой-1 (FEN1), и разрыв «зашивается». Интересно отметить, что этот механизм, называемый «длиннозаплаточным», осуществляется другим набором белков. В нем принимает участие PCNA, стимулирующий активность ДНК-полимеразы в и флэп-эндонуклеазы 1. Таким образом, в альтернативном механизме принимают участие белки процесса репликации ДНК. В целом, механизм репарации достаточно сложный. Поврежденная ДНК переходит от одного белка к другому в процессе исправления повреждения, подобно эстафетной палочке. Важным является вопрос о том, как осуществляется координация этого процесса, а также его точность при замене поврежденного основания на новое, поскольку ДНК-полимераза в, ключевая полимераза репарации, делает много ошибок. Возможно существование дополнительных факторов репарации, которые обеспечивают эффективность работы этих машин на уровне клеток и организма. Таким образом, репарация поврежденных оснований осуществляется сложной мультиферментной машиной. настоящее время рентгеноструктурный анализ выполнен только для индивидуальных белков систем репарации.

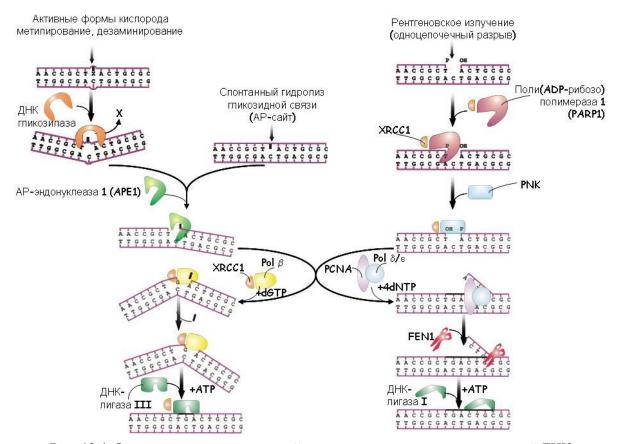
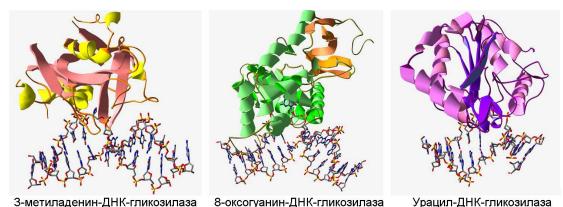


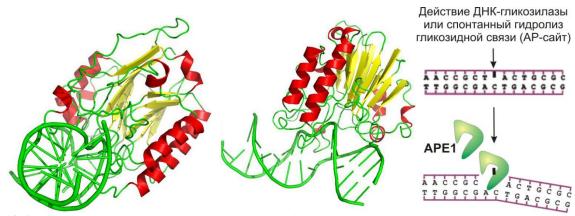
Рис. 13.4. Основные пути эксцизионной репарации поврежденных оснований ДНК

Рентгеноструктурный анализ осуществлен для ряда ДНК-гликозилаз, узнающих повреждения определенного типа, а также их комплексов с модельными структурами ДНК, содержащими повреждения (рис. 13.5). Один из главных установленных фактов состоит в том, что поврежденное основание «выворачивается» из структуры ДНК в процессе взаимодействия с такими ферментами и затем удаляется в процессе катализа.



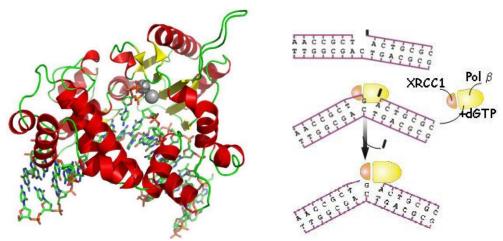
**Рис. 13.5.** Общий вид трехмерных структур комплексов ДНК-гликозилаз с модельными ДНК-субстратами, по данным РСА [16—18]

Кристаллическая структура получена для следующего фермента в схеме путей эксцизионной репарации ДНК – АР-эндонуклеазы 1 (рис. 13.6). Этот фермент работает с высокой каталитической эффективностью, поэтому закристаллизовать его комплекс с субстратом очень сложно. Расшифрована структура комплекса фермента только с продуктом реакции. Тем не менее, эта структура дает детальное представление о расположении и строении активного центра фермента.



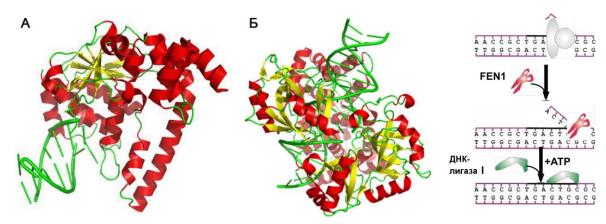
**Рис. 13.6.** Трехмерная структура комплекса APE1 человека с продуктом катализируемой этим ферментом реакции. *Слева* и *в центре* показаны две проекции модели по данным работы [19]. *Справа* – фрагмент схемы репарации ДНК с участием APE1

Наиболее детально с помощью PCA изучен механизм ДНК-полимеразы β человека: установлена структура комплексов фермента с разными фрагментами ДНК в отсутствие и в присутствии низкомолекулярных субстратов – дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов. ДНК-полимераза β к тому же способна выщеплять остаток дезоксирибозы с 5'-конца разрыва ДНК за счет своей лиазной активности. При получении кристаллов комплекса фермента с субстратом применялись аналоги dNTP – дидезоксидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (ddNTP). Структура одного из полученных комплексов показана на рис. 13.7. В организации активного центра ДНК-полимеразы β также можно обнаружить подобие структуры «правой руки», как и в случае других ранее описанных ДНК-полимераз.



**Рис. 13.7.** Трехмерная структура комплекса ДНК-полимеразы  $\beta$  человека с субстратами: дезоксицитидин-5'-трифосфатом и двуцепочечной ДНК, содержащей в одной из цепей однонуклеотидную брешь [20] (*слева*); фрагмент схемы репарации ДНК с участием ДНК-полимеразы  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) (*справа*)

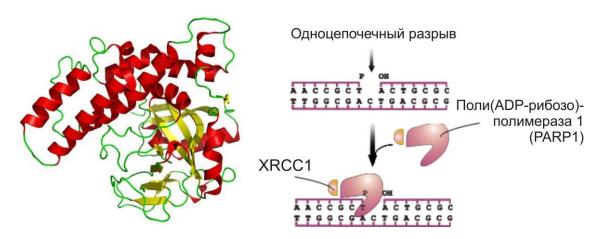
Установлена структура комплексов с ДНК и для других участников процесса репарации: флэп-эндонуклеазы 1 (FEN1) и ДНК-лигазы I, катализирующих две последовательные реакции по так называемому «длиннозаплаточному» механизму репарации (рис. 13.8).



**Рис. 13.8.** Трехмерные структуры флэп-эндонуклеазы 1 (FEN1) (A) и ДНК-лигазы I (Б) в комплексах с соответствующими ДНК-субстратами [21, 22] (слева и в центре); фрагмент схемы репарации ДНК с участием этих ферментов (справа)

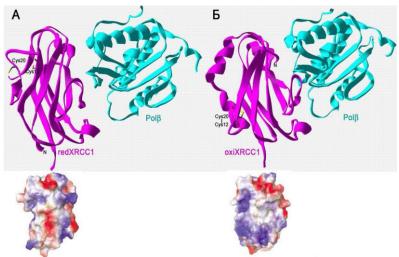
Механизм репарации ДНК осуществляется ансамблем белков, и действие отдельных белков по исправлению повреждений в ДНК строго координировано. Координация осуществляется за счет образования временных комплексов на ДНК. Надо заметить, что эти комплексы очень специфические и формируются за счет белок-белковых и белокнуклеиновых взаимодействий. Одним из ключевых координаторов репарации ДНК считается фермент поли(ADP-рибозо)-полимераза 1 (PARP1), который регулирует активность ферментов репарации. Этот белок «чувствует» разрывы в ДНК и связывается с ними. PARP1 также является ферментом, модифицирующим белки, катализируя реакцию синтеза полимера — поли(ADP-рибозы) на других белках и самом PARP1. Считается, что такая модификация помогает белкам диссоциировать из комплекса с ДНК. PARP1 является центральной мишенью для разработки ингибиторов систем репарации в терапевтических целях. Ингибирование этого белка приводит к подавлению некоторых механизмов репарации. С помощью PCA установлена структура его каталитического

домена (рис. 13.9), эти данные активно используются в работах по конструированию ингибиторов PARP1.

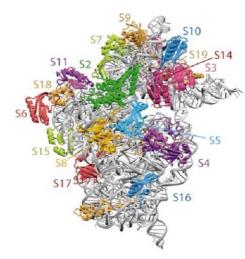


**Рис. 13.9.** Трехмерная структура каталитического домена PARP1 по данным PCA [23] (*слева*); фрагмент схемы репарации ДНК с участием этого фермента (*справа*)

Еще один фактор репарации, белок XRCC1, не обладает никакой каталитической активностью, но образует комплексы с ДНК-полимеразой β и ДНК-лигазой III и является важным фактором репарации оснований и одноцепочечных разрывов в ДНК. При открытии белка XRCC1 было обнаружено, что он защищает клетки от воздействия ионизирующей радиации. Мутации гена XRCC1 и особенно его делеция делает клетки очень чувствительными к воздействию алкилирующих агентов и оксидативному стрессу. Было установлено, что этот белок улучшает комплексообразование ДНК-полимеразы β с ДНК. На современном этапе изучения системы эксцизионной репарации оснований представляет большой интерес исследование комплексов белков репарации, которые формируются на повреждениях, т. е. важным является получение кристаллов нескольких белков-участников репарации на поврежденной ДНК. Эти комплексы должны быть высокоспецифичными. Были получены кристаллы двух форм концевого фрагмента XRCC1 в комплексе с каталитическим доменом ДНК-полимеразы β, которые различаются наличием в одной из форм дисульфидного мостика между остатками цистеина (рис. 13.10).



**Рис. 13.10**. Структура комплексов восстановленной (A) и окисленной (B) форм фрагмента XRCC1 с ДНК-полимеразой  $\beta$  (Pol  $\beta$ ). Показаны остатки цистеина, ответственные за структурные перестройки разных форм XRCC1, и электростатический потенциал на поверхности соответствующих форм белка [24]



13.11. Рис. Строение субчастицы белков выделены разными цветами, полинуклеотидные цепи рРНК показаны серым цветом [25]

Оказалось, что образование дисульфидной связи приводит к значительным изменениям не только во вторичной и третичной структуре XRCC1, но и в распределении электростатического потенциала на поверхности белка. Такие изменения оказывают сильное влияние на формирование контактов XRCC1 как с ДНК-полимеразой β, так и с ДНК.

что система исключено, репарации оснований ДНК может оказаться не слишком доступной для рентгеноструктурных исследований белок-белковых комплексов в силу динамичности рассматриваемого процесса. В то же время кристаллизация И определение структуры малой нескольких белков репарации при рибосомы взаимодействии с поврежденной ДНК является Полипептидные цепи рибосомных наиболее перспективным направлением в этой области исследований. Следует заметить, что задача структуры динамического решения комплекса репарации гораздо более сложная, чем, например, установление структуры рибосомы (рис. 13.11).

Рибосома представляет собой изначально высокоорганизованный, достаточно стабильный комплекс, сформированный большим набором молекул белков и РНК. В то время решение подобных задач демонстрирует современные возможности кристаллографии. Именно за решение структуры рибосомы прокариот получена Нобелевская премия по химии 2009 г.

#### План семинаров

Тема 1. Введение в кинетику ферментативных реакций. Кинетика как инструмент изучения механизмов ферментативных реакций. Скорость ферментативных реакций, способы выражения. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента. Причины отклонения от линейности. Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативных реакций. Условие стационарности. Справедливость допущений принципа стационарности. Уравнение Михаэлиса-Ментен. Субстратная константа — Кѕ и константа Михаэлиса — Км. Максимальная скорость реакции. Число оборотов фермента. Определение кинетических констант (метод Лайнуивера-Берка, Вульфа-Хайнса, Иди-Хофсти, Эйзенталя и Корниш-Боуден). Решение практических задач на вычисление  $k_1, k_2$ , в условиях Михаэлиса.

Тема 2. Кинетическая классификация ингибиторов. Необратимое и обратимое ингибирование. Типы ингибирования — конкурентный, неконкурентный, бесконкурентный, смешанный. Константа ингибирования — Кі, методы ее определения. Графический анализ разных типов ингибирования. Метод Диксона. Решение задач на вычисление  $K_i$  при разных типах ингибирования.

Тема 3. Теория графов (теоретическая часть). Терминология. Упрощения. Детальный разбор решения задачи на закрепление теоретической части.

Тема 4. Теория графов (решение задач). Нахождение скорости одно-субстратных реакций. Нахождение скорости двух-субстратных реакций. Нахождение скорости реакций в сложных кинетических схемах, в том числе в случаях ингибирования.

Тема 5. Аффинная модификация биополимеров. Теоретические закономерности.

Тема 6. Практическое занятие по применению современных программ для обработки кинетических данных. Основные характеристики современных программа. Программа DynaFit. Программа KinTekSim. Программа Scientist. Программа Berkeley Madonna.

### Примеры вопросов к экзамену

- 1. Основные положения химической кинетики.
- 2. Скорость ферментативных реакций, способы выражения.

- 3. Понятие стационарности ферментативного процесса.
- 4. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента. Причины отклонения от линейности.
- 5. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Уравнение Михаэлиса- Ментен.
- 6. Константы  $K_S$ ,  $K_M$ ,  $V_{MAX}$ . Число оборотов ферментов.
- 7. Методы определения K<sub>M</sub> и V<sub>MAX</sub> (Лайнуивера-Берка, Вульфа-Хайнса, Иди-Хофсти, Эйзенталя-Корниш-Боуден).
- 8. Кинетика одно-субстратных ферментативных реакций.
- 9. Кинетика двух-субстратных ферментативных реакций.
- 10. Кинетическая классификация ингибиторов. Константа ингибирования (Кі).
- 11. Конкурентное ингибирование.
- 12. Неконкурентное ингибирование.
- 13. Смешанное ингибирование.
- 14. Бесконкурентное ингибирование.
- 15. Методы расчета ингибиторных констант. Графические методы анализа типов ингибирования. Метод Диксона.
- 16. Необратимые ингибиторы. Способы анализа необратимого торможения.
- 17. Субстратное ингибирование. Способы обработки экспериментальных данных.
- 18. Обработка экспериментальных данных при изучении кинетики двухсубстратных ферментативных реакций. Анализ первичных и вторичных графиков.

### 5. Образовательные технологии

В курсе "Физическая химия биополимеров" используются как классические, так и самые новые представления по ферментативному катализу. В течение семестра постоянно контролируется уровень знаний студента. Наличие семинарских занятий и обязательных для итоговой аттестации сдачи домашних заданий принуждает студента к активной работе в течение всего семестра.

### 6. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

### А) Литература:

- 1. Аффинная модификация биополимеров / Под ред. Д. Г. Кнорре Новосибирск: Наука, 1981.
- 2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: в 3 т. М.: Мир, 1982.
- 3. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. М.: Высш. шк., 2003.
- 4. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979.
- 5. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Мир, 1980.
- 6. Лаврик О. И. Методы количественной оценки взаимодействия биополимеров с лигандами. Новосибирск: НГУ, 1988.
- 7. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
- 8. О.И. Лаврик, Н.С. Дырхеева « Основы ферментативного катализа», НГУ,2012
- 9. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология: Учебник. М.: Издательский центр «Академия», 2005.

# Б) Ресурсы сети Интернет

Научная библиотека eLIBRARY.RU, более 50 полнотекстовых версий журналов по тематике курса.

Электронные версии журналов

РОССИЙСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ

УСПЕХИ ХИМИИ

на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru)

Реферативные журналы ВИНИТИ РАН – полные тексты - на сайте Отделения ГПНТБ СО РАН (http://www.prometeus.nsc.ru)

Биология (доступ с 2006 г.)

Химия (доступ с 1981 г.)

Медицина (доступ с 1998 г.)

"Патенты России"- полнотекстовая БД на сайте Отделения ГПНТБ СО РАН (http://www.prometeus.nsc.ru).

Полнотекстовая электронная библиотечная система "КнигаФонд" на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Полные тексты статей к журналам издательства Эльзевир "Freedom Collection" на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Полнотекстовой доступ к журналам издательства American Chemical Society на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Полнотекстовой доступ к журналам издательства NPG:

Nature

Nature Chemistry

**Nature Materials** 

Nature Methods

Nature Nanotechnology

Nature Biotechnology

на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Полнотекстовой доступ к журналу Science на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Полнотекстовой доступ к журналам университетского издательства Oxford University Press на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Полнотекстовой доступ к журналам издательства Taylor & Francis сайте ИХБФМ CO PAH (www.niboch.nsc.ru).

Полнотекстовой доступ к журналам издательства Wiley сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Полнотекстовой доступ к журналам издательства Springer на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Доступ к базе структурного поиска Reaxys на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Reaxys – новый информационный ресурс для химиков-аналитиков.

Доступ к реферативной базе Web of Science самой авторитетной в мире базе данных по научному цитированию Института научной информации США на сайте ИХБФМ СО РАН (www.niboch.nsc.ru).

Все полнотекстовые базы данных доступны по IP-адресам Института, они приобретены за счет грантов РФФИ, а так же по подписке и покупке за счет собственных средств ИХБФМ СО РАН.

Свободные источники:

SciGuide

Free Medical Journals

PubMed Central (PMC)

Stanford University's HighWire Press

Библиотека электронных журналов в г. Регенсбург (Германия)

### 7. Материально-техническое обеспечение дисциплины

- 1. В качестве технического обеспечения лекционного процесса используется ноутбук, мультимедийный проектор, доска.
- 2. Для демонстрации иллюстрационного материала используется программа Microsoft Power Point 2003.

Программа составлена в соответствии с требованиями ФГОС ВПО и с ОС ВПО, принятым в ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, с учетом рекомендаций ООП ВПО по направлению «020100 ХИМИЯ».

Автор Лаврик Ольга Ивановна, член-корр. РАН, д.х.н., профессор кафедры молекулярной биологии ФЕН, зав. лаб. ИХБФМ СО РАН.

Программа одобрена на заседании кафедры молекулярной биологии "22" августа 2014 г.

Секретарь кафедры к.х.н. Доси Л.М. Халимская