

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ  
ОСНОВЫ  
ДЕЙСТВИЯ  
ФЕРМЕНТОВ**



# **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ**

**Под редакцией  
академика С. Е. Северина  
и доктора  
биологических наук  
Г. А. Кочетова**

**ИЗДАТЕЛЬСТВО  
МОСКОВСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА  
1985**

Молекулярные основы действия ферментов: Сборник /Под ред. С. Е. Северина и Г. А. Кочетова.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985.— 189 с., ил.

Издание продолжает серию обзоров ведущих ученых МГУ (предыдущий выпуск вышел в 1981 г.) по актуальным проблемам современной энзимологии, начатую по инициативе биологического факультета и межфакультетской проблемной научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ. В настоящий сборник включены статьи по различным аспектам исследования структуры и функции ферментов; наряду с собственным экспериментальным материалом приводится широкий обзор данных литературы за последние годы. Особое внимание уделяется молекулярным основам каталитической активности ферментов и путям ее регуляции. Материал отражает последние достижения в данной области исследований.

Для научных работников, аспирантов и студентов, специализирующихся в области энзимологии, биохимии и молекулярной биологии.

Печатается по постановлению  
Редакционно-издательского совета  
Московского университета

Рецензенты:

докт. биол. наук, проф. Б. Ф. Поглазов,  
докт. биол. наук А. А. Болдырев

М 2001040000—011 — 155—85  
077(02)—85

## **ПРОСТАГЛАНДИН- И ТРОМБОКСАНСИНТЕАЗЫ. МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**

**С. Д. Варфоломеев, А. Т. Мевх, В. К. Муратов,  
Н. Д. Игумнова, В. В. Чурюканов**

(Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и бисорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ; кафедра фармакологии лечебного и санитарно-гигиенического факультетов 1-го Московского медицинского института)

Участие простагландинов в регуляции многих физиологических процессов делает их предметом весьма активного изучения как нового класса лекарственных препаратов, позволяющих на фармакологическом уровне вмешиваться в различные патологические процессы, протекающие в организме человека или животных.

Природные простагландины могут быть использованы непосредственно как лекарственные препараты [1—3]. Однако до настоящего времени их применение для нужд медицины остается весьма ограниченным, что связано в первую очередь с высокой стоимостью простагландинов, их нестабильностью как фармацевтических препаратов, слабой изученностью возможных вторичных эффектов.

Значительное развитие в последние годы получили методы химического синтеза простагландинов. В настоящее время созданы их синтетические аналоги, имеющие большой спрос в медицине и сельском хозяйстве (см. обзоры по химическому синтезу простагландинов [2, 4, 5]). Область синтетической химии простагландинов в настоящее время претерпевает большую эволюцию, и можно с уверенностью ожидать создание новых препаратов. Однако трудности на этом пути весьма велики. Они связаны главным образом с получением вещества, имеющего конфигурацию природного стереоизомера. Сложность задачи легко представить, если учесть, что в молекуле простагландина содержится 4—5 асимметрических атомов. Изменить уровень простагландинов в организме можно не только вводя их как лекарственные препараты. Другой развиваемый в настоящее время для этой цели подход основан на использовании фармацевтических препаратов, которые участвуют в регуляции ферментативного синтеза простагландинов (PG) (*in vivo*). Существенные физиологические изменения могут вызвать вещества, воздействующие на механизм синтеза простагландинов путем изменения активности ферментов, участвующих в их образовании.

Общая схема биосинтеза PG приведена на рис. 1. Субстрат (полиеновая 20-членная жирная кислота, главным представителем которой в организме человека и животных является арахидоновая

кислота) под действием простагландинсинтетазной системы претерпевает ряд последовательных превращений, осуществляемых двумя ферментами.

Окисление субстрата до двойной циклоперекиси (PGG) и восстановление перекисной группы у C<sub>15</sub> (PGH) осуществляются одним и тем же ферментом — эндопероксидпростагландинсинтетазой (PGH-синтетазой (EC 1.14.99.1) или циклооксигеназой жирных кислот [6—15]. Этот вывод основан на том, что циклооксигеназная и пероксидазная активности, которые могут быть определены независимо, не разделяются в ходе очистки фермента до гомогенного состояния по белку [6, 7].

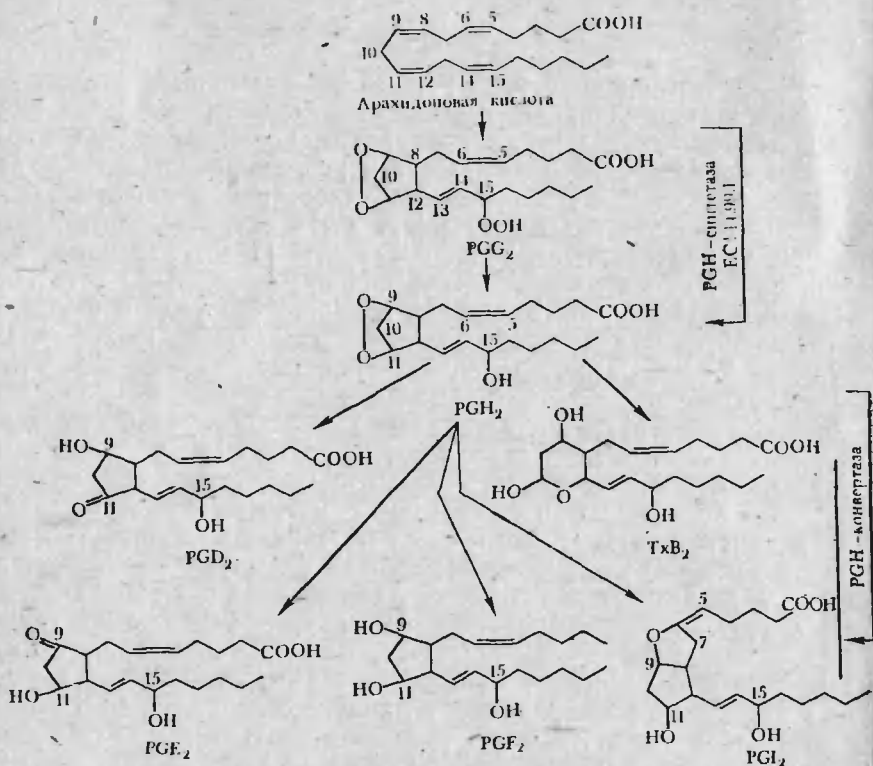


Рис. 1. Общая схема биосинтеза простагландинов

Превращение субстрата в PGH проходит через одни и те же стадии под действием простагландинсинтетазных систем из различных источников. Набор же конечных продуктов превращения PGH зависит от источника выделения полиферментного комплекса. Природа конечного продукта связана со специфичностью последнего фермента биферментного комплекса, который в общем случае мы называем эндопероксидпростагландинконвертазой (PGH-конвертазой). Так например, PGH-конвертаза из везикулярных желез

быка и барана в зависимости от кофактора является либо простагландин Е-изомеразой либо простагландин F-редуктазой [7, 8], из сердца кролика [9] и эндотелиальных клеток [10] — простагландин I-изомеразой, или простациклинсинтетазой, из тромбоцитов человека [11] — тромбосан А-изомеразой, или тромбосансинтетазой и т. д.

Одним из способов воздействия на активность ферментов синтеза простагландинов является применение нестероидных противовоспалительных препаратов. Детальное исследование закономерностей действия веществ этого класса показало, что они влияют на образование простагландинов и это, по-видимому, обуславливает их терапевтический эффект. Проиллюстрируем данный подход анализом закономерностей ингибирования противовоспалительными нестероидными препаратами PGH-синтазы — первого и общего для всех органов и тканей фермента синтеза простагландинов и тромбосанов.

### **Кинетика и механизм ингибирования эндопероксидпростагландинсинтазы нестероидными противовоспалительными препаратами**

Любой воспалительный процесс в организме связан с изменением уровня простагландинов [16].

В 1971 г. Вайн [17] впервые показал, что ацетилсалициловая кислота нарушает биосинтез простагландинов, и высказал предположение о способности этого препарата ингибировать простагландинсинтазу. Впоследствии было установлено, что аналогичными свойствами обладают и другие нестероидные противовоспалительные средства [18—21]. Установлено, что ацетилсалициловая кислота необратимо блокирует простагландинсинтазу путем ацетилирования молекулы фермента [14, 22, 23]. Вместе с тем имеются основания полагать, что не все нестероидные противовоспалительные соединения являются необратимыми ингибиторами простагландинсинтазы. Так, индометацин не вступает в ковалентное взаимодействие с простагландинсинтазой, что послужило основанием для предположения об обратимом характере ингибирования фермента этим соединением [24]. В дальнейшем было проведено исследование механизмов ингибирования PGH-синтазы нестероидными противовоспалительными средствами [25]. В рамках поставленной проблемы решались следующие связанные между собой задачи:

1. Исследование кинетических закономерностей ингибирования PGH-синтазы широким набором противовоспалительных и сходных с ними препаратов с целью классификации механизмов ингибирования и оценки сравнительной эффективности различных препаратов в качестве ингибиторов этого фермента.

2. Изучение структурных соотношений ингибитор—активный центр фермента. Использование ингибиторов различной структуры

и сравнительный анализ механизмов ингибирования и его эффективности способны, с одной стороны, дать информацию о наиболее необходимых элементах структуры лекарственных препаратов, обеспечивающих их физиологическое действие, с другой стороны, привести к экспериментально обоснованным гипотезам о структуре активного центра фермента.

3. Использование ингибиторов для целей дальнейшей детализации кинетического механизма действия PGH-синтетазы. В общем случае взаимодействие ингибитора с активным центром фермента может происходить на различных стадиях механизма трансформации субстрата в конечные продукты (взаимодействия со свободной формой фермента или с возможными интермедиатами в ходе катализа). Использование эффективных ингибиторов способно дать дополнительную информацию о кинетическом механизме действия фермента.

Были получены препараты PGH-синтетазы из двух источников — из везикулярных желез барана и тромбоцитов человека — и проведено изучение ингибирования ферментов нестероидными противовоспалительными соединениями. Предварительное исследование показало, что наблюдаемые эффекты при воздействии нестероидных противовоспалительных соединений на активность PGH-синтетазы практически не зависят от чистоты используемого белкового препарата (гомогенный белок; фермент, включенный в мембрану микросомной фракции; фермент, солюбилизованный в мицеллах детергента).

### Аспирин — медленный необратимый ингибитор эндопероксидпростагландинсинтетазы

При добавлении к раствору PGH-синтетазы ацетилсалициловой кислоты наблюдается медленная потеря активности фермента в реакции окисления арахидоновой кислоты в  $PGH_2$ . Скорость инактивации фермента увеличивается с ростом концентрации аспирина. Типичные наблюдаемые зависимости активности PGH-синтетазы от времени для фермента в микросомной фракции везикулярных желез барана представлены на рис. 2. Аналогичные зависимости наблюдаются для фермента из тромбоцитов человека.

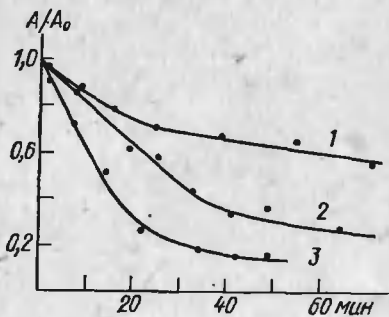


Рис. 2. Кинетика изменения активности PGH-синтетазы при инкубации фермента (микросомы везикулярных желез барана) в растворах аспирина разной концентрации (мМ).

1 — 0,81; 2 — 2,35; 3 — 4,36. Условия:  $32^{\circ}\text{C}$ , pH 7,2, 20 мМ фосфата, 1,7% этанола, 0,1% твин-20.  $A_0$  — активность фермента в отсутствие ингибитора,  $A$  — активность фермента в момент времени  $t$  при инкубации с ингибитором

Процесс инактивации фермента необратим. Существенное уменьшение концентрации ингибитора в среде путем разбавления раствора фермента с аспирином не приводит к появлению его активности. Инактивацию фермента нельзя объяснить его денатурацией, поскольку в контрольном опыте в отсутствие аспирина фермент практически полностью сохраняет свою активность.

Простейший кинетический механизм, описывающий наблюдаемые экспериментальные зависимости, имеет вид



где  $E$  — свободная форма фермента;  $I$  — ингибитор;  $EI$  — соединение ингибитора с активным центром фермента.

В условиях избытка ингибитора по сравнению с концентрацией активных центров фермента (в случаях с нестероидными противовоспалительными соединениями это соотношение всегда имеет место) кинетику изменения концентрации активного фермента во времени будет описывать уравнение

$$E = E_0 e^{-kI_0 t}, \quad (2)$$

где  $E_0$  — начальная концентрация активных центров;  $I_0$  — начальная и постоянная концентрация ингибитора ( $I_0 \gg E_0$ ). Поскольку измеряемая на опыте активность РGH-синтетазы линейно зависит от концентрации фермента, по тому же закону должна меняться и активность катализатора.

Зависимость (2) при ингибировании аспирином действительно имеет место, что иллюстрирует рис. 3. Кинетические кривые описываются уравнением первого порядка, при этом показатель экспоненты линейно зависит от концентрации ингибитора (рис. 3б). Тангенс угла наклона этой зависимости позволяет определить константу скорости необратимого взаимодействия аспирина с активным центром фермента. Видно, что необратимая инактивация РGH-синтетазы аспирином сравнительно медленный процесс.

Соответствие кинетики инактивации фермента уравнению первого порядка в условиях избытка ингибитора указывает на то, что реакция между активным центром фермента и аспирином действительно протекает в стехиометрическом соотношении 1:1. Эти количественные результаты, полученные кинетическими методами, полностью согласуются с известными литературными данными [14, 22, 23].

### **Индометацин и вольтарен — медленные, эффективные, обратимые ингибиторы РGH-синтетазы**

Инкубация РGH-синтетазы с индометацином так же, как и в случае с аспирином, приводит к потере ферментом его активности, и этот процесс также развивается во времени (рис. 4). Принципиальное отличие в механизмах действия этих лекарственных пре-

паратов заключается в том, что индометацин представляет собой обратимый ингибитор PGH-синтетазы.

Этот вывод основывается на двух сериях экспериментов.

1. Обратимость взаимодействия индометацина с PGH-синтетазой следует из того факта, что после отделения ингибитора от фермента активность PGH-синтетазы восстанавливается. Так, PGH-синтетазу микросомной фракции тромбоцитов человека обрабатывали индометацином в концентрации  $7,5 \cdot 10^{-6}$  М в течение

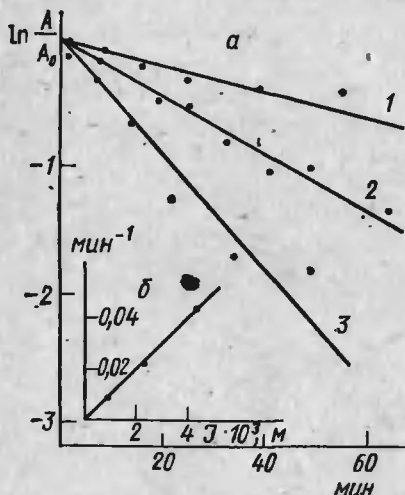


Рис. 3. Ингибирование PGH-синтетазы аспирином.

*a* — линейаризация данных рис. 2 в полулогарифмических координатах; концентрации аспирина (мМ): 1 — 0,81; 2 — 2,35; 3 — 4,36; *б* — зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка от концентрации аспирина

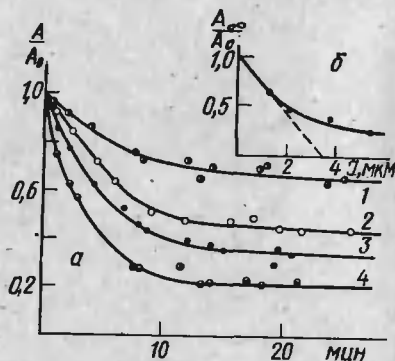


Рис. 4. Ингибирование PGH-синтетазы индометацином.

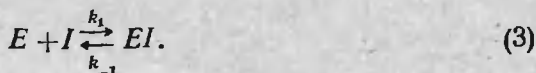
*a* — кинетические кривые изменения активности PGH-синтетазы из везикулярных желез барана при инкубации фермента в растворах индометацина разной концентрации (мкМ); 1 — 1,4; 2 — 2,2; 3 — 3,8; 4 — 5,4. Условия:  $32^{\circ}\text{C}$ , pH 7,2, 20 мМ фосфата, 1,7% этанола, 0,1% твин-20; *б* — зависимость относительной предельной активности фермента от концентрации индометацина

40 мин. Остаточная активность в результате такой обработки составляла 28%. Однако после отделения микросом от раствора центрифугированием (105 000 g, 1,5 ч) и промывки их буферным раствором активность фермента восстанавливалась практически полностью (составляла 95% от исходной).

PGH-синтетазу из везикулярных желез иммобилизовали на DEAE-сефадексе. В результате обработки иммобилизованного фермента раствором  $2,6 \cdot 10^{-5}$  М индометацина в течение часа активность фермента падала до 23%; после отфильтровывания и промывки иммобилизованного фермента буферным раствором его активность увеличивалась и составляла 70% от исходной.

Из этих данных следует, что взаимодействие РGH-синтетазы с индометацином имеет обратимый характер.

2. Кинетические измерения показали, что схема взаимодействия РGH-синтетазы с индометацином имеет вид



Кинетические кривые изменения активности РGH-синтетазы в процессе инкубации фермента с индометацином приведены на рис. 4. Видно, что даже при длительном времени инкубации активность фермента не падает до нуля, а достигает некоторого предельного значения, зависящего от концентрации ингибитора.

Рассмотрим особенности кинетики процесса для обоих этих случаев. Для необратимой инактивации в условиях соизмеримости  $I_0$  и  $E_0$  справедливо соотношение

$$\frac{E_0(I_0 - EI)}{I_0(E_0 - EI)} = e^{-k(E_0 - I_0)t}. \quad (4)$$

При  $E_0 > I_0$  (условие сохранения остаточной активности фермента при бесконечном времени) и  $t \rightarrow \infty$  имеют место условия:  $E_0 I / I_0 E \rightarrow 0$  или  $I \rightarrow 0$ . Для них концентрация соединения  $EI$  при бесконечном времени равна  $I_0$ . Из уравнения материального баланса следует

$$E_\infty = E_0 - I_0, \text{ или } \frac{E_\infty}{E_0} = 1 - \frac{I_0}{E_0}, \quad (5)$$

где  $E_\infty$  — остаточная предельная концентрация фермента. Из соотношения (5) при пропорциональности активности концентрации фермента следует, что для случая необратимой инактивации в условиях  $I_0 \sim E_0$  относительная активность фермента должна линейно падать с ростом концентрации ингибитора.

Зависимость предельной относительной активности от концентрации ингибитора приведена на рис. 4б. Видно, что уравнение (5) (пунктирная линия) не описывает существующей зависимости.

Кинетические данные согласуются со схемой (3), согласно которой индометацин представляет собой медленный обратимый ингибитор РGH-синтетазы. В соответствии с этой схемой изменение концентрации комплекса фермент—ингибитор во времени должно быть представлено уравнением

$$EI = \frac{k_1 E_0 I_0}{k_1 I_0 + k_{-1}} [1 - e^{-(k_1 I_0 + k_{-1})t}], \quad (6)$$

а относительное изменение активности уравнением

$$\frac{A_t}{A_0} = 1 - \frac{k_1 I_0^2}{k_1 I_0 + k_{-1}} [1 - e^{-(k_1 I_0 + k_{-1})t}]. \quad (7)$$

Соответствие экспериментальных данных уравнению (7) иллюстрирует рис. 5. Зависимость обратного наблюдаемого характерис-

тического времени представлена линейной функцией концентрации ингибитора, из которой следуют константы скорости прямой и обратной реакции и соответственно константа равновесия образования комплекса.

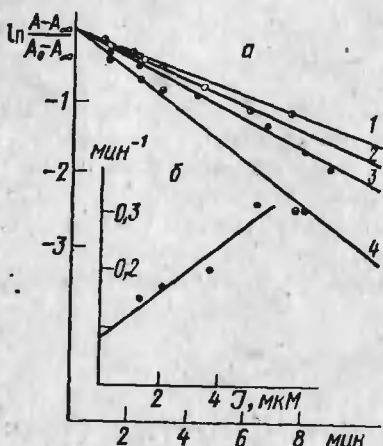


Рис. 5. Кинетические характеристики ингибирования PGH-синтетазы индометацином.

*a* — линейаризация данных рис. 4а по ингибированию PGH-синтетазы индометацином в координатах уравнения (7); концентрации ингибитора (мкМ): 1 — 1,4; 2 — 2,2; 3 — 3,8; 4 — 5,4; *б* — зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка от концентрации индометацина;  $A_{\infty}$  — активность фермента при длительном (бесконечно большом) времени инкубации с ингибитором

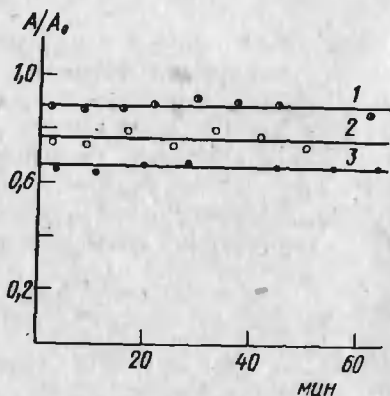


Рис. 6. Изменение во времени активности PGH-синтетазы при инкубации фермента (микросомная фракция везикулярных желез) с бутаденом (мМ).  
1 — 0,62; 2 — 3,4; 3 — 4,2. Условия: 32°C, pH 7,2, 20 мМ фосфат, 1,6% этанола, 0,1% твин-20

Совершенно аналогично индометацину ведет себя в реакции ингибирования PGH-синтетазы вольтарен. Кинетические кривые падения активности фермента при различных концентрациях вольтарена подобны приведенным на рис. 4а. Они так же спрямляются в рамках координат уравнения (7), давая зависимость обратного характеристического времени от концентрации ингибитора, из которой могут быть найдены константы скорости прямой и обратной реакций взаимодействия вольтарена с активным центром фермента.

Индометацин и вольтарен относительно медленно взаимодействуют с активным центром PGH-синтетазы. Процесс установления равновесия занимает более 10 мин. Если в реакцию смесь для измерения активности фермента вводить равновесную реакцию смесь фермент — ингибитор, по детектируемой активности можно «оттитровать» находящийся в растворе свободный фермент.

При этом из зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при различных концентрациях ингибитора можно было бы наблюдать кажущийся эффект неконкурентного ингибирования (влияние концентрации ингибитора на максимальную скорость при постоянном значении наблюдаемой константы Михаэлиса). В реакции ингибирования РGH-синтетазы индометацином такой кажущийся эффект неконкурентного ингибирования действительно имеет место. В раствор РGH-синтетазы вводили индометацин в различных концентрациях, смесь фермента с ингибитором инкубировали около часа для установления равновесия, «замораживали» равновесие понижением температуры до 4°C, после чего изучали зависимость скорости от концентрации арахидоновой кислоты, вводя в реакционную ячейку смесь фермента с ингибитором. Действительно, наблюдаемые закономерности формально эквивалентны случаю неконкурентного ингибирования. Однако смысл этой зависимости для системы индометацин — РGH-синтетаза совершенно отличен от смысла механизма классического неконкурентного ингибирования. В обсуждаемой системе ингибитор блокирует часть активных центров фермента, при этом, естественно, характеристики свободной формы фермента, такие, как наблюдаемая константа Михаэлиса, остаются без изменения.

**Бруфен, напроксен, бутадион, аналгин —  
быстрые, обратимые ингибиторы  
РGH-синтетазы**

Исследование ряда других нестероидных противовоспалительных препаратов показало, что они являются быстродействующими и обратимыми ингибиторами исследуемого фермента. При добавлении их к раствору фермента можно наблюдать быстрое подавление активности катализатора, которое постоянно во времени (см., например, рис. 6). Изучение этого класса ингибиторов было проведено в рамках известных подходов к исследованию влияния их на скорость ферментативной реакции в присутствии субстратов [26].

Были исследованы зависимости скорости реакции от концентрации субстратов при различных концентрациях ингибиторов. Как известно, в реакции, катализируемой РGH-синтетазой, принимают участие следующие субстраты: арахидоновая кислота, кислород и восстановитель — донор электронов [27]. Зависимости скорости реакции от концентрации арахидоновой кислоты и адреналина при различных концентрациях бруфена приведены на рис. 7. Эти же зависимости для напроксена аналогичны. Бутадион и аналгин также являются обратимыми ингибиторами РGH-синтетазы, однако эффективность ингибирования бутадионом и аналгином несколько ниже, чем бруфеном и напроксеном.

С формально кинетической точки зрения указанные ингибиторы (бруфен, напроксен, бутадион, аналгин) выступают в качестве конкурентных ингибиторов по отношению к арахидоновой кислоте и в качестве бесконкурентных ингибиторов по отношению

к донору электронов. Эти эффекты ингибирования для случая многосубстратной реакции потребовали специального рассмотрения.

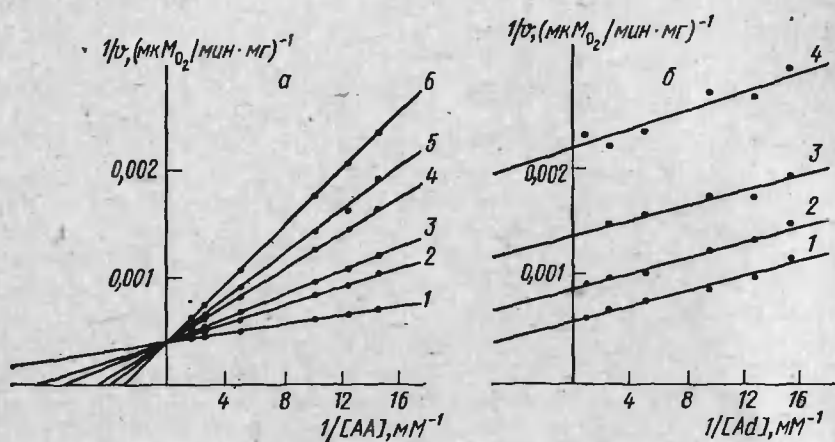


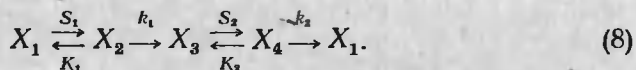
Рис. 7. Зависимость скорости РGH-синтетазной реакции (микросомная фракция везикулярных желез) от концентрации арахидоновой кислоты (а) и адреналина (б) в обратных координатах при различных концентрациях бруфена (мкМ). На а: 1—0; 2—8; 3—15; 4—25; 5—35; 6—50; на б: 1—0; 2—25; 3—50; 4—126. Условия: 32°C, pH 7,2, 20 мМ фосфат, 1,6% этанола, 0,1% твин-20, гемин 1,8 мкМ, 1,1 мМ адреналина (а); 73,5 мкМ арахидоновой кислоты (б)

### Обратимое ингибирование многосубстратных ферментативных реакций

Изучение механизмов обратимого ингибирования ферментативных реакций — предмет детального анализа в энзимологической литературе [28]. Однако анализ закономерностей ингибирования ферментов был посвящен в основном односубстратным реакциям. Очевидно, что многосубстратная природа реакций должна весьма специфическим образом отражаться в кинетике ингибирования, и для многосубстратных реакций должны существовать особые закономерности ингибирования. Рассмотрим эти закономерности для случая упорядоченных механизмов реакций.

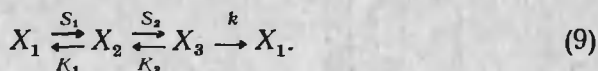
Как показано ранее, механизмы двухсубстратных ферментативных реакций можно разбить на два принципиально различающихся класса по зависимости скорости реакции от концентрации обоих субстратов. Первую категорию реакций составляют процессы, уравнения скорости для которых не содержат произведения концентраций двух субстратов. Эта категория реакций, механизмы которых получили название механизмов с немultiплицирующими субстратами. Было показано, что необходимым условием для реализации данного типа механизма является наличие по крайней мере одной необратимой стадии между двумя пунктами ввода суб-

стратов в механизм превращения. Простейшую каноническую схему такой реакции можно представить в виде



Для простоты примем, что стадии ввода субстратов являются обратимыми и быстрыми и могут быть охарактеризованы константами равновесия (комплексы субстратов с активными центрами ферментов).

Второй класс реакций образуют процессы, уравнения скорости для которых включают произведение концентраций субстратов. Это реакции с так называемыми мультиплицирующими субстратами. Необходимым условием реализации мультиплицирующего механизма является обратимость всех стадий между двумя точками ввода двух различных субстратов. Простейшая каноническая схема для механизма с мультиплицирующими субстратами может быть записана в виде



Предполагается, что стадии ввода субстратов являются обратимыми, быстрыми и могут быть охарактеризованы константами равновесия  $K_1$  и  $K_2$ .

Рассмотрим зависимости скорости от концентраций обоих субстратов и концентрации обратимого ингибитора для механизмов обоих классов. Очевидно, что ингибитор может взаимодействовать со свободной формой фермента  $X_1$  или с различными интермедиями ферментсубстратных превращений.

Кинетические закономерности ингибирования двухсубстратной реакции с немультимплицирующим механизмом суммированы в табл. 1. В ней приведены кинетические схемы взаимодействия ингибитора с ферментом, уравнения стационарной скорости реакции в обратной форме, а также координаты точки пересечения прямых зависимости  $1/v$  от  $1/S_1$  или от  $1/S_2$  при различных концентрациях ингибитора (если такая точка пересечения существует). Рассмотрены механизмы, по которым ингибитор взаимодействует с одной из форм активного центра ( $X_1, X_2, X_3, X_4$ ), с какими-либо двумя, тремя формами либо со всеми четырьмя состояниями активного центра.

Вариация стадий взаимодействия ингибиторов с интермедиями ферментативной реакции приводит к 14 различным механизмам.

Проводя экспериментальное изучение зависимости скорости реакции от концентрации субстратов и ингибитора, механизмы реакций можно в значительной степени дискриминировать. Анализ данных, приведенных в табл. 1, показывает, что все представленные механизмы приводят к шести различным вариантам зависимости скорости от концентрации первого или второго субстрата

Закономерности ингибирования двухсубстратной реакции. Случай упорядоченного механизма для немультиплицирующих субстратов, схема  $X_1 \xrightleftharpoons[k_1]{S_1} X_2 \xrightarrow{k_2} X_3 \xrightleftharpoons[k_3]{S_2} X_4 \xrightarrow{K_4} X_1$

№ п/п	Стадии взаимодействия с ингибитором	Уравнение стационарной скорости	Координата точки пересечения прямых при различных концентрациях ингибитора	зависимость $1/v$ от $1/S_1$	зависимость $1/v$ от $1/S_2$
1	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2}$	$(1/S_1)_n = 0$	—	—
2	$X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1}{k_1 S_1} + \frac{1}{k_2} + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right)$	—	—	—
3	$X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1}{k_1 S_1} + \frac{1}{k_1} + \frac{K_2}{k_2 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right) + \frac{1}{k_2}$	—	—	$(1/S_2)_n = 0$
4	$X_4 + I \rightleftharpoons X_4 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1}{k_1 S_1} + \frac{1}{k_1} + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right)$	—	—	—

№ п/п	Стадии взаимодействия с ингибитором	Уравнение стационарной скорости	Координата точки пересечения прямых при различных концентрациях ингибитора	зависимость $1/\nu$ от $1/S_2$
5	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$ $X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(1)}} \right) + \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(2)}} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_2}$	$(1/S_1)_n = - \frac{K_I^{(1)}}{K_I^{(2)} K_1}$	—
6	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$ $X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(1)}} \right) + \frac{1}{k_1} + \frac{K_2}{k_2 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(2)}} \right) + \frac{1}{k_2}$	$(1/S_1)_n = - \frac{k_1 K_I^{(1)} K_2}{k_2 S_2 K_I^{(2)} K_1}$	$(1/S_2)_n = - \frac{k_2 K_I^{(2)} K_1}{k_1 S_1 K_I^{(1)} K_2}$
7	$X_1 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_4 + I \rightleftharpoons X_4 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(1)}} \right) + \frac{1}{k_1} + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_2} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(2)}} \right)$	$(1/S_1)_n = - \frac{k_1 K_I^{(1)}}{k_2 K_I^{(2)} K_1}$	—
8	$X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_1 S_1} + \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(1)}} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(2)}} \right) + \frac{1}{k_2}$	—	$(1/S_2)_n = - \frac{k_2 K_I^{(2)}}{k_1 K_I^{(1)} K_2}$
9	$X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_4 + I \rightleftharpoons X_4 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_1 S_1} + \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(1)}} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_2} \left( 1 + \frac{I}{K_I^{(2)}} \right)$	—	—

№ п/п	Стадии взаимодействия с ингибитором	Уравнение стационарной скорости	Координата точки пересечения прямых при различных концентрациях ингибитора	зависимость $1/\nu$ от $1/S_1$	зависимость $1/\nu$ от $1/S_2$
10	$X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$ $X_4 + I \rightleftharpoons X_4 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_2 S_1} + \frac{1}{k_2} + \frac{K_2}{k_2 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(1)}} \right) + \frac{1}{k_2} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(2)}} \right)$	—	—	$(1/S_2)_n = \frac{K_1^{(1)}}{K_1^{(2)} K_2}$
11	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$ $X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(1)}} \right) + \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(2)}} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(3)}} \right) + \frac{1}{k_2}$	$(1/S_1)_n = \frac{K_1^{(1)}}{K_1 K_1^{(2)}} \frac{1}{S_2}$	$(1/S_2)_n = \frac{k_2 K_1^{(3)}}{K_2 k_1 K_1^{(2)}}$	$\frac{1}{S_1} = \frac{k_2 K_1^{(3)} K_1}{K_2 K_1 K_1^{(1)}} \cdot \frac{1}{S_1}$
12	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$ $X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_4 + I \rightleftharpoons X_4 I$	$\frac{E_0}{\nu} = \frac{K_1}{k_2 S_1} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(1)}} \right) + \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(2)}} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_2} \left( 1 + \frac{I}{K_1^{(2)}} \right)$	$(1/S_1)_n = \frac{K_1^{(1)}}{K_1 K_1^{(2)}} \frac{1}{S_2}$	$(1/S_1)_n = \frac{K_1^{(1)} k_2}{k_2 K_1 K_1^{(3)}}$	—

Продолжение табл. 1

№ п/п	Стадии взаимодействия с ингибитором	Уравнение стационарной скорости	Координата точки пересечения прямых при различных концентрациях ингибитора	зависимость $1/v$ от $1/S_2$
13	$X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$ $X_4 + I \rightleftharpoons X_4 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1}{k_1 S_1} + \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(1)}} \right) +$ $+ \frac{K_2}{k_2 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(2)}} \right) + \frac{1}{k_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(3)}} \right)$	---	$(1/S_2)_n = \frac{k_2 K_i^{(2)}}{K_2 k_1 K_i^{(1)}} -$ $- \frac{K_i^{(2)}}{K_2 K_i^{(3)}}$
14	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$ $X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$ $X_4 + I \rightleftharpoons X_4 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(1)}} \right) +$ $+ \frac{1}{k_1} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(2)}} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(3)}} \right) +$ $+ \frac{1}{k_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(4)}} \right)$	$(1/S_1)_n = \frac{K_i^{(1)}}{K_1 K_i^{(2)}} -$ $- \frac{k_1 K_2 K_i^{(1)}}{k_2 K_i^{(3)} K_1} \cdot \frac{1}{S_2} -$ $- \frac{k_1 K_i^{(1)}}{k_2 K_1 K_i^{(4)}}$	$(1/S_2)_n = \frac{k_2 K_1 K_i^{(3)}}{k_1 K_2 K_i^{(1)}} -$ $- \frac{k_2 K_i^{(3)}}{k_1 K_2 K_i^{(2)}} - \frac{K_i^{(3)}}{K_2 K_i^{(4)}}$

Закономерности ингибирования двухсубстратной реакции. Случай упорядоченного механизма для мультиплицирующих субстратов, схема  $X_1 \xrightleftharpoons[K_1]{S_1} X_2 \xrightleftharpoons[K_2]{S_2} X_3 \xrightarrow{I} X_1$

№ п/п	Степени взаимодействия с ингибитором	Уравнение стационарной скорости	Координата точки пересечения прямых при различных концентрациях ингибитора
1	$X_1 + I \xrightleftharpoons{K_i} X_1 I$	$\frac{F_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right) + \frac{K_2}{k S_2} + \frac{1}{k}$	$(1/S_1)_n = 0$ $(1/S_2)_n = 0$
2	$X_2 + I \xrightleftharpoons{K_i} X_2 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} + \frac{K_2}{k S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right) + \frac{1}{k}$	$(1/S_2)_n = 0$
3	$X_3 + I \xrightleftharpoons{K_i} X_3 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} + \frac{K_2}{k S_2} + \frac{1}{k} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right)$	—

№ п/п	Стадии взаимодействия с ингибитором	Уравнение стационарной скорости	Координата точки пересечения прямых при различных концентрациях ингибитора	зависимость $1/\nu$ от $1/S_1$	зависимость $1/\nu$ от $1/S_2$
4	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$ $X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(1)}} \right) + \frac{K_2}{k S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(2)}} \right) + \frac{1}{k}$	$(1/S_1)_n = - \frac{K_i^{(1)}}{K_1 K_i^{(2)}}$	$(1/S_2)_n = 0$	
5	$X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} + \frac{K_2}{k S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(1)}} \right) + \frac{1}{k} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(2)}} \right)$	$-$	$(1/S_2)_n = - \frac{K_i^{(1)}}{K_2 K_i^{(2)}}$	
6	$X_1 + I \rightleftharpoons X_1 I$ $X_2 + I \rightleftharpoons X_2 I$ $X_3 + I \rightleftharpoons X_3 I$	$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(1)}} \right) + \frac{K_2}{k S_2} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(2)}} \right) + \frac{1}{k} \left( 1 + \frac{I}{K_i^{(3)}} \right)$	$(1/S_1)_n = - \frac{K_i^{(1)}}{K_1 K_i^{(2)}} - \frac{K_i^{(1)} S_2}{K_1 K_2 K_i^{(3)}}$	$(1/S_2)_n = \frac{1}{K_i^{(3)}} = \frac{K_2}{S_1 K_i^{(1)} + K_i^{(2)}}$	

при различных концентрациях ингибитора. Графический вид этих вариантов также различен.

Кинетические закономерности ингибирования реакций, протекающих по мультиплицирующему механизму, приведены в табл. 2. Как и в случае немультимплицирующих субстратов, в таблице даны кинетические схемы, отличающиеся по интермедиатам, с которыми реагирует ингибитор.

Для каждого механизма ингибирования характерен свой собственный вид зависимости скорости от концентрации субстратов и ингибиторов. Другими словами, механизм ингибирования может быть строго идентифицирован из данных по стационарной кинетике реакции.

Проведенный анализ иллюстрирует многообразие как возможных экспериментально наблюдаемых зависимостей, так и кинетических механизмов ингибирования многосубстратных реакций. Однако для случая нестероидных противовоспалительных средств — быстрых обратимых ингибиторов РGH-синтетазы — может быть строго выявлен однозначный механизм ингибирования.

**Нестероидные противовоспалительные препараты (бруфен, напроксен, бутадиион, аналгин) конкурентно вытесняют арахидоновую кислоту из активного центра РGH-синтетазы**

В реакции окисления арахидоновой кислоты до простагландина  $H_2$  арахидоновая кислота и донор электронов выступают как немультимплицирующие субстраты. В работах [27, 29] были детально рассмотрены результаты исследования кинетики действия РGH-синтетазы и строго показана немультимпликативность этих двух субстратов. Кинетика действия РGH-синтетазы включает целый набор интермедиатов, однако без ущерба для общности рассмотрения она может быть описана простейшей кинетической схемой (8), где  $X_1$  — свободная форма фермента,  $X_2$  — комплекс фермента с арахидоновой кислотой,  $X_4$  — комплекс фермента со вторым субстратом,  $k_1, k_2$  — лимитирующие стадии химической трансформации.

Сопоставление экспериментально наблюдаемых зависимостей скорости реакции от концентраций субстратов и ингибитора (см. рис. 7) с теоретическими зависимостями, приведенными в табл. 1, показывает, что экспериментальные данные соответствуют кинетической схеме (1) в табл. 1 и имеют единственное истолкование: ингибитор взаимодействует со свободной формой фермента, конкурентно вытесняя арахидоновую кислоту из активного центра.

Следует отметить важную особенность механизма обсуждаемой реакции. Механизм (8) симметричен относительно четных или нечетных индексов состояний активного центра. Каталитическое превращение субстратов в продукты реакции представляет собой замкнутый цикл. Индексация интермедиатов имеет условный характер, и ее удобно начинать с первого продукта любой необрати-

мой стадии. В рамках схемы (8) это может быть как интермедиат  $X_1$ , так и интермедиат  $X_3$ .

Другими словами, формально эквивалентно, является ли первым субстратом  $S_1$  арахидоновая кислота или восстановитель — донор электрона.

Если предположить, что  $S_1$  — донор электронов, то экспериментальные данные будут соответствовать механизму 3 (табл. 1). Согласно этому механизму ингибитор обратимо комплексуется с интермедиатом  $X_3$ , т. е. формой фермента, которая взаимодействует с арахидоновой кислотой. В этом случае ингибитор выводит из реакции интермедиат  $X_3$ , который в комплексе с ингибитором теряет способность взаимодействовать с арахидоновой кислотой.

Это замечание еще раз подчеркивает однозначность главного вывода: нестероидные противовоспалительные препараты (напроксен, бруфен, бутадиион, анальгин) конкурентно вытесняют арахидоновую кислоту из активного центра PGH-синтетазы.

### **Парацетамол и фенацетин не ингибируют PGH-синтетазу**

Из изученных нами соединений парацетамол и фенацетин (родственные структуры) не являются ингибиторами первого фермента синтеза простагландинов. Вплоть до концентраций  $1 \cdot 10^{-2}$  М они не оказывают практически никакого влияния на скорость окисления арахидоновой кислоты до простагландина  $H_2$ .

Изучение взаимодействия этих веществ с PGH-синтетазой представляет интерес потому, что они не являются собственно нестероидными противовоспалительными средствами, поскольку не оказывают отчетливого противовоспалительного действия на различных моделях воспаления в эксперименте и не обладают заметной эффективностью при воспалительных заболеваниях у человека. Однако парацетамол и фенацетин подобно нестероидным противовоспалительным соединениям оказывают болеутоляющее и жаропонижающее действие. Между тем известно, что в механизмах развития этих эффектов, так же как и в механизмах противовоспалительного эффекта, принципиально важное значение имеет подавление биосинтеза простагландинов. (см. обзоры: [20, 30, 31 и др.]). Таким образом, парацетамол и фенацетин сходны с нестероидными противовоспалительными соединениями в том, что оказывают болеутоляющий и жаропонижающий эффекты, опосредуемые влиянием на биосинтез PG, но не вызывают противовоспалительного эффекта, опосредуемого теми же самыми механизмами влияния на биосинтез PG.

Парацетамол вызывает жаропонижающий эффект, не оказывая при этом (как аспирин и другие нестероидные противовоспалительные средства) противовоспалительного действия. Это может быть связано с разной чувствительностью PGH-синтетаз периферических тканей и мозга к их ингибиторам.

Приведенные данные подтверждают основное положение настоящей работы: сильные нестероидные противовоспалительные препараты являются ингибиторами PGH-синтетазы.

### **Классификация нестероидных противовоспалительных соединений — ингибиторов PGH-синтетазы**

Было изучено ингибирование первичной реакции образования простагландинов широким рядом соединений, активно используемых в настоящее время в качестве нестероидных противовоспалительных препаратов. Практически все изученные соединения являются сильными ингибиторами PGH-синтетазы.

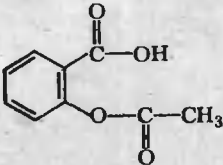
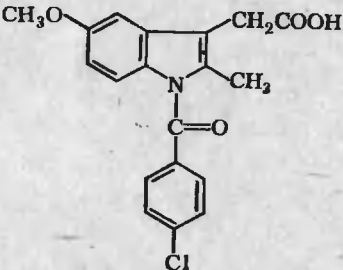
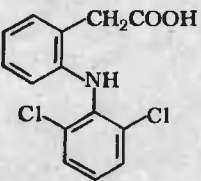
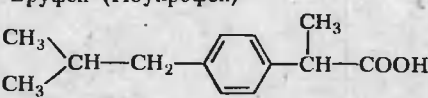
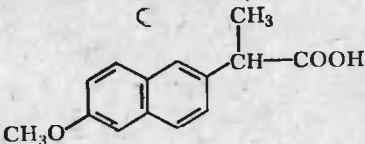
Детальное изучение кинетических закономерностей ингибирования обнаружило большое разнообразие в механизмах действия лекарственных препаратов на активность PGH-синтетазы. Данные по ингибированию фермента суммирует табл. 3. Она показывает, что существуют по крайней мере три класса противовоспалительных препаратов — ингибиторов PGH-синтетазы.

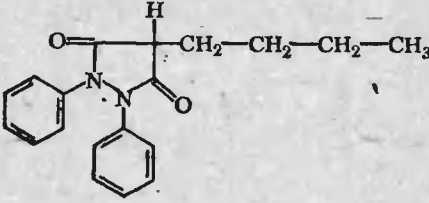
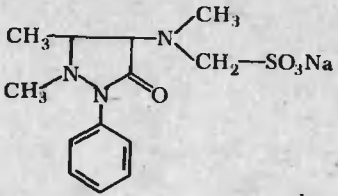
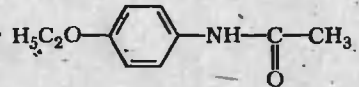
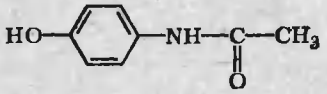
Аспирин является медленным и необратимым ингибитором фермента. В работах Дж. Рота и др. [22, 23] с помощью изотопной метки было показано, что аспирин необратимо реагирует с PGH-синтетазой, в результате реакции ацильная группа переносится на белок. Обсужденные выше кинетические данные подтверждают необратимое взаимодействие аспирина с PGH-синтетазой.

Определенную группу ингибиторов составляют вещества, быстро и обратимо блокирующие активность PGH-синтетазы (бруфен, напроксен, бутадиион). Эти соединения действуют как конкурентные ингибиторы по отношению к арахидоновой кислоте.

Достаточно удивительным и необычным представляются наблюдаемые в данной работе эффекты медленного обратимого взаимодействия индометацина и вольтарена с активным центром PGH-синтетазы. Как правило, низкомолекулярные соединения, обратимо образующие комплексы с белками, реагируют с ними достаточно быстро. Скорости комплексообразования достаточно велики, и равновесие устанавливается в микросекундном или миллисекундном диапазоне [32, 33]. В указанных работах проанализированы статистические данные по константам скоростей взаимодействий белок-органический лиганд. Наиболее часто встречаются процессы, имеющие константу скорости около  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Бимолекулярные стадии реакций с константами скоростей порядка  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  попадают в разряд реакций, скорость которых контролируется диффузией реагентов в растворе. За счет стерических эффектов или влияния электростатических взаимодействий диффузионно контролируемый процесс с участием белковой молекулы может быть замедлен и иметь константу скорости до  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Реакция образования комплекса индометацин — PGH-синтетаза имеет константу скорости бимолекулярного взаимодействия  $6,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Это значение на семь порядков ниже диффузионно контролируемого предела. Однако в настоящее время все

Закономерности ингибирования эндопероксидпростагландинсинтазы  
нестероидными противовоспалительными препаратами

№ п/п	Структура и название соединения	Механизм ингибирования	Кинетические и равновесные параметры ингибирования (32°C)
1	<p>Аспирин</p> 	медленный, необратимый ингибитор	$k = 0,17 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$
2	<p>Индометацин</p> 	медленный, обратимый ингибитор	$k_1 = (6,4 \pm 1,4) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ $k_{-1} = (1,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ $K_i = (2,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $K_i = (9 \pm 1) \cdot 10^{-7} \text{ M} (4^\circ \text{C})$
3	<p>Вольтарен</p> 	медленный, обратимый ингибитор	$k_1 = (7,2 \pm 1,4) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ $k_{-1} = (2 \pm 0,4) \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ $K_i = (2,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-6} \text{ M}$
4	<p>Бруфен (Ибупрофен)</p> 	быстрый, обратимый, конкурентный ингибитор	$K_i = (1 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} \text{ M}$
5	<p>Напроксен</p> 	быстрый, обратимый, конкурентный ингибитор	$K_i = (9,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-6} \text{ M}$

№ п/п	Структура и название соединения	Механизм ингибирования	Кинетические и равновесные параметры ингибирования (32°C)
6	Бутадион 	быстрый, обратимый, конкурентный ингибитор	$K_i = (3,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-4} \text{M}$
7	Анальгин 	быстрый, обратимый, конкурентный ингибитор	$K_i = (9,8 \pm 2,2) \cdot 10^{-4} \text{M}$
8	Фенацетин 	не ингибирует	
9	Парацетамол 	не ингибирует	

больше накапливается фактов, свидетельствующих в пользу того, что кинетика образования комплексов с низкомолекулярными лигандами может быть чувствительна к структуре органического лиганда. Так, введение в аспарагиновую кислоту метильной группы почти в  $10^4$  раз уменьшает константу скорости комплексообразования этого субстрата с активным центром аспаратамино-трансферазы. При переходе от профлавина к роданину 6G, имеющему геометрически большую молекулу, процесс комплексообразования лиганда с активным центром  $\alpha$ -химотрипсина замед-

ляется в  $10^6$  раз, константа равновесия практически не меняется [34].

- Можно полагать, что близкий механизм имеет место и в случае обратимых ингибиторов PGH-синтетазы. Напроксен и бруфен, представляющие собой небольшие и в значительной степени плоские молекулы, достаточно легко достигают активный центр фермента. Вольтарен и индометацин, имеющие разветвленную структуру, проникают в активный центр фермента, преодолевая барьер конформационных изменений белка, несколько раздвигая полипептидные цепи биополимера.

В настоящее время можно в первом приближении выделить структурные элементы соединения, обеспечивающие ему высокий уровень ингибиторной способности. Сравнение структур соединений, представленных в табл. 3, показывает, что эффективными ингибиторами PGH-синтетазы являются молекулы, имеющие в своей структуре достаточно выраженную ароматическую гидрофобность и свободную карбоксильную группу. Так, например, фенацетин и парацетамол, не несущие в себе отрицательного заряда карбоксильной группы, не являются ингибиторами PGH-синтетазы; бутадон, в котором также отсутствует свободная карбоксильная группа, но при высокой гидрофобности соединения слабо ингибирует данный фермент.

#### **Ингибирование PGH-синтетазы из различных источников (везикулярные железы барана и тромбоциты человека)**

Сравнительное изучение свойств PGH-синтетазы из различных источников показало, что каталитические свойства ферментов этого класса достаточно близки. Так, было проведено [27] сравнение PGH-синтетазы из тромбоцитов человека и везикулярных желез барана. Оказалось, что как для одного, так и для другого фермента реакция образования простагландина  $H_2$  является трехсубстратной; оба фермента инактивируются в процессе реакции; кинетические параметры процессов, осуществляемых различными ферментами, весьма близки.

Представляет интерес сравнение способности ингибиторов PGH-синтетазы блокировать активности ферментов из различных источников. Такое сравнительное изучение было проведено с использованием в качестве ингибиторов аспирина и индометацина.

Результаты опытов по ингибированию PGH-синтетазной активности в микросомах везикулярных желез барана и тромбоцитов человека в условиях предынкубации с ацетилсалициловой кислотой и индометацином обсуждаются в работе [25]. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти препараты вызывают концентрационно зависимое ингибирование изучаемой PGH-синтетазы. Ацетилсалициловая кислота необратимо ингибирует PGH-синтетазу из обоих источников, однако фермент из везикулярных желез ингибируется в 10 раз медленнее. Скорости ингибирования соизмеримы при концентрациях аспирина для везикулярных желез —

$1 \cdot 10^{-3}$  М и  $1 \cdot 10^{-4}$  М — для тромбоцитов. Аналогичное соотношение имеет место и при ингибировании индометацином. В этом случае для ферментов из обоих источников ингибирование имеет обратимый характер, однако фермент из тромбоцитов ингибируется существенно эффективнее фермента из везикулярных желез.

Важно подчеркнуть, что для обоих ферментов имеется принципиальная разница в механизме ингибирования индометацином и аспирином. Аспирин является необратимым ингибитором фермента, в то время как индометацин действует обратимо.

Эти результаты позволили интерпретировать имеющиеся в литературе данные об особенностях влияния ацетилсалициловой кислоты и индометацина на агрегацию тромбоцитов. Известно, что даже после однократного приема ацетилсалициловой кислоты клинически значимое снижение агрегации тромбоцитов у человека наблюдается в течение 48 ч и более [35—37]. При применении индометацина восстановление исходного уровня агрегации тромбоцитов происходит параллельно снижению его концентрации в крови [38]. Указанные особенности антиагрегаторного эффекта ацетилсалициловой кислоты и индометацина обусловлены, по-видимому, главным образом различиями в механизмах ингибирования этими препаратами PGH-синтазы тромбоцитов, ответственной за синтез в них тромбосана — наиболее мощного инициатора агрегации тромбоцитов. Необратимое ингибирование данного фермента ацетилсалициловой кислотой сопровождается длительным подавлением агрегации тромбоцитов, так как последние являются безъядерными клетками и лишены способности к синтезу белков — ферментов *de novo*. В таких условиях восстановление агрегационной способности происходит, очевидно, за счет появления в кровяном русле новых популяций тромбоцитов из костного мозга. При применении обратимого ингибитора PGH-синтазы — индометацина — по мере падения его концентрации в крови происходит восстановление агрегационной способности циркулирующих в сосудистом русле тромбоцитов. Таким образом, при применении нестероидных противовоспалительных соединений в качестве антиагрегантов следует иметь в виду, что длительность антиагрегаторного эффекта обратимых ингибиторов коррелирует со временем их циркуляции в крови. При применении ацетилсалициловой кислоты и других необратимых ингибиторов такая зависимость отсутствует. Следовательно, в процессе разработки рациональных схем применения нестероидных противовоспалительных препаратов для целей антиагрегационной терапии необходимо учитывать не только сведения о фармакокинетике этих соединений, но и данные о характере их взаимодействия с PGH-синтазой тромбоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ажгихин И. С. (ред.) (1978) Простагландины. Медицина. М.
2. Nelson N. A., Kelly R. C., Johnson R. A. (1982) Chem. Eng. News 16, 30—44.
3. Персианинов Л. С., Мануилова И. А., Чернуха Е. А. (1972) Акуш., гинекол., 7, 3—8.

4. Nicolaou K. C., Gasic G. P., Barnette W. E. (1978) *Angewandte Chemie* 17, 293—378.
5. Фрейманис Я. Ф. (отв. ред.) (1982) *Мат-лы I Всесоюз. совещ. «Синтез и использование простагландинов»*, Рига.
6. Miyamoto T., Ogino N., Yamamoto S., Hayashi O. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2629—2636.
7. Van der Ouderaa F. J., Buytenhek M., Nugteren D. H., Van Dorp D. A. (1977) *Biochim., Biophys. Acta* 487, 315—331.
8. Marnett L. J., Wilcox C. L. (1977) *Biochim., Biophys. Acta* 487, 222—230.
9. Isakson P. G., Raz A., Denny S. E., Pure E., Needleman P. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 101—105.
10. Marcus A. J., Weksler B. B., Jaff E. A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7138—7141.
11. Ho P. P. K., Towner R. D., Esterman M. A. (1978) *Fed. Proc.* 37, N 272, 1317.
12. Morita J., Murota S. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90, 441—449.
13. Malik K. V., McGiff J. C., Wong P. Y.-K. (1978) *Fed. Proc.* 37, N 281, 1319.
14. Roth G. J., Siok C. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3782—3784.
15. Van Dorp D. A., Buytenhek M., Christ Hazelhof E. et al. (1978) *Acta Biol. Med. Germ.* 37, 691—699.
16. Kuehl F. A. (1980) *Sciens* 210, 978—984.
17. Vane J. R. (1971) *Nature* 231, 232—235.
18. Gryglewski R. J. (1974) in *Prostaglandin synthetase inhibitors* (Robinson H. J., Vane J. R., eds) Raven Press, New York, 33—77.
19. Samuelson B., Goldyne M., Granström E. et al. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47, 997—1019.
20. Moncada S., Vane J. R. (1979) *Pharmacol. Rev.* 30, 293—332.
21. Humes J. L., Winter C. A., Sadowski S. J., Kuehl F. A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2053—2056.
22. Roth G. J., Stanford N., Jacobs J. W., Majerus P. W. (1977) *Biochemistry* 16, 4244—4248.
23. Roth G. J., Stanford N., Majerus P. W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3073—3076.
24. Stanford N., Roth G. J., Shen T. Y., Majerus P. W. (1977) *Prostaglandins* 13, 669—678.
25. Муратов В. К., Игумнова Н. Д., Басевич В. В. и др. (1983) *Фармакол. токсикол.* 5.
26. Узбб Л. (1966) *Ингибиторы ферментов и метаболизма*. Мир, М.
27. Мевх А. Т., Вржещ П. В., Басевич В. В., Варфоломеев С. Д. (1983) *Химическая и биологическая кинетика* (Эмануэль Н. М., Березин И. В. и Варфоломеев С. Д., ред.) Изд-во Моск. ун-та, М., 224—292.
28. Березин И. В., Мартинек К. (1977) *Основы физической химии ферментативного катализа*, Высшая школа, М.
29. Вржещ П. В. Автореф. канд. дис., М., 1983.
30. Ferreira S. H., Vane J. R. (1974) *Ann. Rev. Pharmacol.* 14, 57—73.
31. Ferreira S. H. (1979) in *Simposiums of pain and analgesic compounds* (Peers R. F., Passett E. G., eds) Raven Press, N. Y., 309—321.
32. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. (1979) *Биокинетика*, Наука, М.
33. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. (1982) *Кинетические методы в биохимических исследованиях*. Изд-во Моск. ун-та, М.
34. Варфоломеев С. Д., Мартинек К., Березин И. В. (1973) *Мол. биол.* 7, 115—123.
35. Kocsis J. J., Hernandovich J., Silver M. J. et al. (1973) *Prostaglandins* 3, 141—144.
36. Preston F. E., Whipps S., Jackson C. A. et al. (1981) *N. Engl. Med.* 304, 76—79.
37. Vinazzer H., Pütter J., Loew D. (1975) *Haemostasis* 4, 12—18.
38. Rane A., Oelz O., Frolich J. C. et al. (1978) *Clin. Pharmacol. Ther.* 23, 658—668.

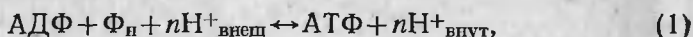
## О РЕЛАКСАЦИОННЫХ СВОЙСТВАХ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТФазы

А. Д. Виноградов и Е. А. Васильева

(Кафедра биохимии биологического факультета МГУ)

### Введение

С середины 70-х годов считается общепризнанным, что движущей силой эндергонического фосфорилирования АДФ неорганическим фосфатом в мембранных структурах митохондрий, хлоропластов и бактерий является разность электрохимических потенциалов ионов водорода ( $\Delta\mu \text{H}^+$ ) по разные стороны сопрягающей мембраны [1]. Утилизация энергии  $\Delta\mu \text{H}^+$  для фосфорилирования осуществляется сложным липопротеиновым комплексом ферментов, состоящим из более чем 10 индивидуальных пептидов [2]. АТФ-синтетазный аппарат митохондрий, часто обозначаемый в литературе как  $F_0 \cdot F_1$ , или  $\text{H}^+$ -АТРаза, состоит из двух частей:  $F_0$ -комплекса пептидов, обеспечивающего специфическую проницаемость мембраны для протонов, и  $F_1$ -комплекса пептидов, непосредственно взаимодействующего с нуклеотидами и неорганическим фосфатом. Комплекс  $F_0 \cdot F_1$  катализирует реакцию



где реакции  $\text{H}^+_{\text{внеш}} \leftrightarrow \text{H}^+_{\text{внут}}$  обозначают векторный перенос ионов водорода по протонному каналу ( $F_0$ ) из внемитохондриального пространства в матрикс митохондрий.

Химический механизм сопряжения векторного переноса протонов с реакцией образования терминальной пирофосфатной связи в молекуле АТФ неизвестен.

В литературе отсутствуют какие бы то ни было указания на прямое взаимодействие субстратов (или продуктов) окислительного фосфорилирования с компонентами протонного канала ( $F_0$ ). С другой стороны, изолированный фактор  $F_1$ , во-первых, обладает высокой АТФазной активностью [3], а во-вторых, имеет специфические места для связывания нуклеотидов [4, 5], неорганического фосфата [6—8] и ионов  $\text{Mg}^{+2}$  [9], т. е. для всех субстратов окислительного фосфорилирования. Таким образом, есть все основания полагать, что  $F_1$  является той химической «машиной», которая способна трансформировать энергию электрохимического потенциала ионов водорода в фосфорильный остаток АТФ.

Изолированный фактор  $F_1$  состоит из 5 типов субъединиц ( $3\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) [10] и способен связывать 6 молекул нуклеотидов [4, 5], 1 или 2 молекулы неорганического фосфата [6—8] и 1—2 иона  $\text{Mg}^{+2}$  [9] на одну молекулу олигомерного фермента.

Олигомерный комплекс  $F_1$  функционирует кооперативно, что недвусмысленно доказано с использованием нескольких экспериментальных подходов. Кратко перечислим наиболее убедительные доказательства структурной и функциональной кооперативности  $F_1$ :

1) включение 1 молекулы ковалентного модификатора на 1 молекулу олигомерного комплекса полностью блокирует АТФазную активность  $F_1$  [11, 12];

2) отрицательная кооперативность при связывании нуклеотидов с фактором  $F_1$  [4, 13] и резко выраженная положительная кооперативность в проявлении гидролитической активности фермента при последовательном связывании АТФ или его аналогов [14—17];

3) качественная и количественная картина реакций изотопного обмена, катализируемых митохондриальной АТФазой, сильно зависит от концентраций нуклеотидов [18];

4) стационарная кинетика гидролиза АТФ растворимым фактором  $F_1$  [19, 20] (но не субмитохондриальными частицами) не подчиняется кинетике Михаэлиса.

Недавно было убедительно показано, что при гидролизе АТФ растворимой АТФазой не образуется ковалентносвязанных интермедиатов реакции [21]. В связи с этим основным методологическим подходом к изучению механизма функционирования АТФ-синтетазного комплекса с использованием либо растворимого фактора  $F_1$  (АТФ-гидролазная реакция), либо субмитохондриальных частиц (АТФ-гидролазная и АТФ-синтетазная реакции) было и остается изучение кинетики катализируемых ими реакций. Существование на молекуле фермента нескольких центров связывания субстрата позволяет постулировать практически сколь угодно сложные кинетические схемы АТФазной и АТФ-синтетазной реакций. В настоящее время наиболее популярна, хотя отнюдь не доказана, схема Бойера [22]. Эта схема основана главным образом на анализе реакций изотопных обменов, катализируемых субмитохондриальными частицами [23—25], и является развитием моделей, предложенных ранее Репке [26] и Лаздунским [27] для описания механизмов функционирования кооперативных ферментов.

Предпосылкой подавляющего большинства работ, посвященных экспериментальному изучению гидролиза АТФ митохондриальной АТФазой или построению моделей функционирования этого фермента, является представление об АТФазной реакции как об обратной последовательности элементарных актов, происходящих при синтезе АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Впервые это представление было сформулировано Ларди и Уэлманом применительно к интактным митохондриям [28] и с тех пор в явном или неявном виде оно используется при анализе АТФазных реакций, катализируемых различными митохондриальными препаратами; следует, однако, отметить, что альтернативные точки зрения время от времени предлагались различными авторами [29—33].

В последние годы из нескольких лабораторий появились сообщения о «релаксационном» поведении  $F_1$ -АТФазы [34—43]. Под

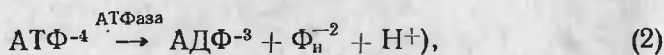
релаксационным, или «гистерезисным», поведением понимают медленные во времени (на порядок и более меньшие, чем время, необходимое для одного оборота в каталитическом акте) изменения активности фермента. Значимость экспериментально наблюдаемого релаксационного поведения  $F_1$ -АТФазы *in vivo* в настоящее время неизвестна. В то же время сам факт его существования вносит существенные особенности в трактовку кинетических экспериментов, направленных на изучение механизма реакций синтеза и гидролиза АТФ.

Несколько лет назад в нашей группе было обнаружено, что АДФ — субстрат окислительного фосфорилирования — вызывает необычное торможение АТФазной активности, по ряду параметров принципиально отличающееся от обычного конкурентного торможения [46, 47] и по всем параметрам соответствующее понятию о гистерезисных явлениях в энзимологии [44, 45]. Детальное изучение взаимодействия митохондриальной АТФазы с АДФ было предметом исследования нашей группы в течение последних четырех лет. Результаты этих работ опубликованы [48—55] и были доложены на нескольких конференциях.

В объеме обычных журнальных публикаций, посвященных экспериментальным исследованиям, не принято обсуждать более общие, чем это вытекает из конкретных результатов, положения. Цель настоящего очерка — кратко суммировать наши опубликованные результаты и дать более или менее развернутое обсуждение вытекающих из них рабочих гипотез, проверка которых, по нашему мнению, полезна для понимания механизма окислительного фосфорилирования. Основные сведения об АТФазной реакции, необходимые для такого обсуждения в очень краткой форме, даны выше. Более детальную информацию о митохондриальной АТФазе читатель может найти в ряде исчерпывающих обзоров [56—60].

### **Взаимодействие АДФ и митохондриальной АТФазы**

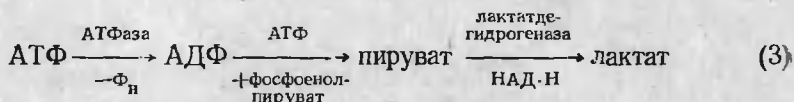
*Торможение АТФазы низкими концентрациями АДФ* [48, 49]. При измерении АТФазной активности субмитохондриальных частиц, освобожденных от белкового ингибитора (AS-частицы [61]), в системе, где происходит накопление АДФ (регистрация реакции по изменению активности ионов водорода [62]):



мы обнаружили, что при концентрации  $\text{АТФ} \ll K_m$  происходит быстрое (1—2 мин) торможение активности фермента. На первый взгляд такой результат не удивителен, так как давно известно, что АДФ является конкурентным по отношению к АТФ ингибитором АТФазы [46, 47]. В случае, если развивающееся во времени торможение реакции было бы обусловлено убылью субстрата (АТФ) и появлением конкурентного ингибитора (АДФ), следовало ожидать, что повторное добавление фермента в количестве, равном

исходному, к системе, в которой начальная скорость реакции сильно заторможена, вызовет в начальный момент времени удвоение скорости гидролиза АТФ, так как скорость ферментативной реакции в присутствии субстрата и конкурентного ингибитора прямо пропорциональна концентрации фермента. Однако оказалось, что это не так. Повторное добавление АS-частиц к реакционной смеси приводило к резкой (значительно большей, чем двукратной) активации гидролиза, и скорость реакции затем быстро уменьшалась, как и после добавления первой порции фермента. Другими словами, создавалось впечатление, что в среде измерения активности происходит быстрая необратимая инактивация АТФазы.

Контрольные эксперименты показали, что ни неорганический фосфат, ни увеличение концентрации  $H^+$ , ни убыль субстрата, ни преинкубация фермента в течение времени измерения не приводят к торможению АТФазной активности АS-частиц. На основании этих простых опытов мы предположили, что АДФ «необратимо» тормозит АТФазу. Для подтверждения этого предположения мы воспользовались следующим приемом. Субмитохондриальные частицы преинкубировали с АДФ и определяли их начальную АТФазную активность в системе, которая обеспечивает необратимое удаление АДФ, образующейся в ходе реакции



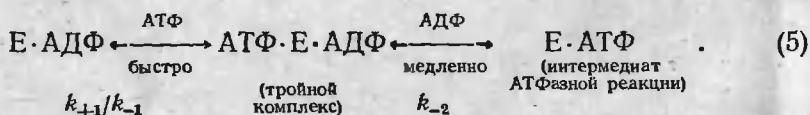
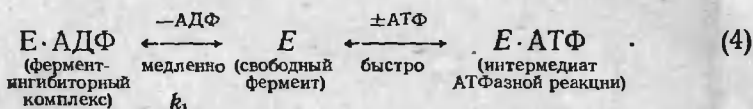
при большом избытке пируваткиназы, лактатдегидрогеназы и их субстратов.

Такая система обеспечивает постоянный уровень АТФ, а скорость ее гидролиза легко прослеживается по изменению концентрации НАД·Н [63]. Оказалось, что в этой системе при измерении активности фермента, преинкубированного с АДФ, наблюдается отчетливая лаг-фаза в образовании продуктов реакции: другими словами, скорость диссоциации АДФ из неактивного Е·АДФ-комплекса достаточно низка для того, чтобы ее можно было измерить обычными методами. По величинам начальных скоростей реакций, катализируемых препаратами, преинкубированными с различными концентрациями АДФ, легко определить константу диссоциации фермент-ингибиторного комплекса; она оказалась равной  $2 \cdot 10^{-8} M^1$ . В дальнейшем было показано, что аналогичная картина наблюдается и при использовании растворимого фактора  $F_1$ . Влияние АДФ специфично: преинкубация АТФазы с другими нуклеозиддифосфатами (ГДФ, ИТФ), взятыми как в низких, так и в высоких концентрациях, не влияет на кинетику гидролиза АТФ. Гидролиз других нуклеозидтрифосфатов (ГТФ, ИТФ) после преинкубации фермента с АДФ оказывается заторможенным, подобно

<sup>1</sup> При расчете константы диссоциации использовано уравнение для системы с взаимным истощением [64].

тому, как это происходит при использовании АТФ в качестве субстрата. Торможение реакции, индуцированное АДФ, требует ионов  $Mg^{+2}$  или других двухвалентных металлов.

*АТФ-зависимая активация АДФ-блокированного фермента* [48, 50]. Как было отмечено выше, если АТФазная реакция начинается добавлением фермента, преинкубированного с АДФ, к системе, содержащей АТФ и АТФ-регенерирующую систему, наблюдается лаг-фаза, а конечная скорость реакции спустя некоторое время достигает контрольных величин. Это означает, что диссоциация комплекса Е·АДФ происходит значительно медленнее, чем реакция, катализируемая свободным от ингибитора ферментом. Возможны два принципиально различных механизма активации фермента:



В соответствии с моделью (4) АТФ способна образовывать фермент-субстратный комплекс только после диссоциации ингибитора (АДФ). В случае (5) АТФ взаимодействует с фермент-ингибиторным комплексом, в результате чего происходит отщепление ингибитора с образованием активного интермедиата АТФазной реакции. Следует подчеркнуть, что если первая схема требует участия в процессе активации единственного места связывания для нуклеотида (фермент связывает либо АДФ, либо АТФ), то для осуществления реакции (5) необходимо существование по крайней мере двух мест связывания нуклеотидов молекулой фермента. Как было отмечено выше, структурных ограничений для рассмотрения обеих возможностей не существует ( $F_1$  способен связывать до 6 нуклеотидов на молекулу фермента). Схемы (4) и (5) можно различить кинетически, по зависимости кажущейся константы скорости активации фермента ( $k_{\text{наб}}$ ) от концентрации АТФ.

В первом случае

$$k_{\text{наб}} = k_1 \quad (6)$$

и не зависит от АТФ.

Во втором

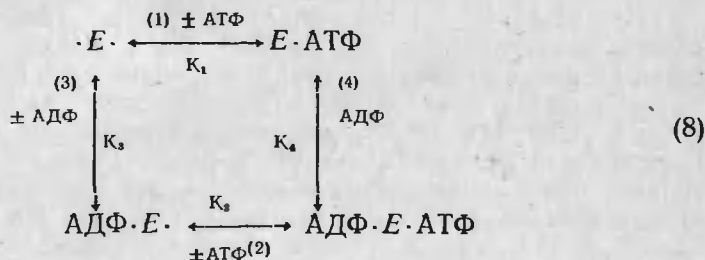
$$k_{\text{наб}} = \frac{k_{-2} \cdot [\text{АТФ}]}{[\text{АТФ}] + K_{\text{акт}}} \quad (7)$$

где  $K_{\text{акт}} = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_{+1}}$ .

Сравнение выражений (6) и (7) показывает, что, если активация фермента происходит по механизму (7), следует ожидать зависимости скорости активации от концентрации АТФ согласно уравнению Михаэлиса. Экспериментальные результаты показали, что на самом деле скорость активации гиперболически зависит от концентрации АТФ; значение константы скорости первого порядка для распада тройного комплекса (насыщающие концентрации АТФ) равно  $2 \text{ мин}^{-1}$  ( $25^\circ \text{C}$ ), а величина  $K_{\text{акт}} \approx 1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$  и совпадает со значением константы Михаэлиса, измеренной в тех же условиях, что для АТФазной реакции. Сказанное дает основание полагать, что: 1) при образовании  $E \cdot \text{АДФ}$ -комплекса ингибитор не связан в центре фермента, из которого АДФ отщепляется в ходе гидролиза АТФ (если бы это было так, то число оборотов АТФазы было бы  $2 \text{ мин}^{-1}$ , тогда как реальные величины имеют порядок  $1 \cdot 10^4 \text{ мин}^{-1}$ ); 2) АТФ связывается с одним и тем же центром фермента в ходе как каталитического акта, так и активации фермент-ингибиторного комплекса.

Величина «спонтанной», АТФ-независимой константы скорости активации фермента была определена следующим образом. Фермент блокировали АДФ (концентрации  $E$  и АДФ подбирали таким образом, чтобы в системе практически не оставалось ни свободного фермента, ни свободного ингибитора, что легко достижимо, так как константа диссоциации равна  $2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ), добавляли большой избыток пируваткиназы и фосфоенолпирувата и во времени определяли появляющуюся по ходу инкубации АТФазную активность (начальные скорости реакции). Определяемая таким образом константа первого порядка скорости диссоциации  $E \cdot \text{АДФ}$  комплекса оказалась равной  $\sim 0,2 \text{ мин}^{-1}$ , т. е. на порядок меньше, чем константа скорости диссоциации тройного комплекса  $\text{АТФ} \cdot E \cdot \text{АДФ}$  ( $2 \text{ мин}^{-1}$ ). Другими словами, связывание АТФ в активном центре АТФазы вызывает 10-кратное ускорение диссоциации АДФ из центра, где последний связывается с высоким сродством.

Для анализа событий, происходящих при диссоциации АДФ из тройного комплекса, воспользуемся следующей схемой:



Существование реакции (1) следует из сродства фермента к АТФ при гидролизе последнего ( $K_1 = 10^{-4} \text{ M}$ ), реакции (3) — из экспериментально наблюдаемого образования комплекса фермента с АДФ, где последний связан в центре, отличном от ката-



связанной АТФазы, естественно, поднимает вопрос о возможном вовлечении мембранного потенциала в этот процесс. Однако мы показали, что ни искусственное сопряжение AS-частиц низкими концентрациями олигомицина [68], ни добавление разбавителей не меняют кинетики активации фермента.

*Влияние АДФ на окислительное фосфорилирование* [53]. Изучение влияния АДФ на АТФазную реакцию, катализируемую митохондриальным АТФ-синтетазным комплексом, представляет интерес главным образом потому, что АДФ — субстрат окислительного фосфорилирования. Можно предположить, что, если АДФ является аллостерическим эффектором фермента, блокирующим АТФазную реакцию, насыщение АДФ-специфичного центра связывания лигандом должно отразиться и на процесс окислительного фосфорилирования. С другой стороны, если АДФ-специфичный центр «регулирующий» АТФазной активности представляет собой активный центр АТФ-синтазы, начальные скорости процесса окислительного фосфорилирования будут одинаковыми в обоих случаях: когда реакция начинается внесением свободного фермента или фермент-субстратного комплекса. Для выбора между этими возможностями мы сравнили кинетику АТФазной и АТФ-синтетазной реакций, катализируемых субмитохондриальными частицами. Оказалось, что в условиях, когда гидролиз АТФ происходит с отчетливым лаг-периодом, индуцированным АДФ (измерение с АТФ-регенерирующей системой), скорость окислительного фосфорилирования (измерение с АДФ-регенерирующей системой) постоянна во времени. Другими словами, АТФ-синтетазный комплекс, АТФазная активность которого полностью заблокирована АДФ, способен катализировать реакцию окислительного фосфорилирования. Ясно, что оба направления реакции нельзя измерить в строго одинаковых условиях: их идентичность может соблюдаться с точностью до нуклеотида — субстрата. В связи с этим для исключения эффектов нуклеотидов на возможные  $\Delta\mu_{H^+}$ -зависимые изменения сродства  $F_1$  к лигандам начальные скорости обоих процессов были измерены при различных концентрациях АДФ (окислительное фосфорилирование) и АТФ (АТФазная реакция). При этом различия в кинетике обоих процессов, катализируемых препаратами, преинкубированными с АДФ, сохранились. Таким образом, АДФ можно рассматривать как ингибитор фермента с однонаправленным (по отношению к направлению реакции) действием.

#### **Анализ кинетики АТФазной реакции и механизм действия некоторых ингибиторов и активаторов АТФазы [51, 52]**

Крайне высокое сродство АДФ к митохондриальной АТФазе и АТФ-зависимая активация фермента приводят к тому, что постоянная скорость гидролиза АТФ во времени в присутствии АТФ-регенерирующей системы различными препаратами субмитохондриальных частиц скорее исключение, чем правило. Это, по-

видимому, обусловлено различным содержанием АДФ, а следовательно, деактивированного  $F_1$  в различных препаратах частиц. Кинетическое поведение митохондриальной АТФазы может быть унифицировано их «активацией» смесью содержащей фосфоенолпируват и пируваткиназу. После такой обработки ( $\sim 30$  мин,  $25^\circ\text{C}$ , напомним, что константа скорости АТФ-независимой активации равна  $0,2 \text{ мин}^{-1}$ ) субмитохондриальные частицы или растворимый фактор  $F_1$  катализирует гидролиз АТФ в присутствии АТФ-регенерирующей системы двухфазно: быстрая начальная фаза катализа сменяется более медленной. Следующие параметры кинетики нуклеозидтрифосфатазной активности оказались существенными для дальнейшего анализа. Двухфазность наблюдается только при гидролизе АТФ; другие нуклеозидтрифосфаты гидролизуются ферментом с постоянной скоростью. Уместно напомнить, что только АДФ обладает способностью образовывать «медленный» комплекс с АТФазой. Скорость перехода от первой ко второй медленной фазе гидролиза прямо пропорциональна скорости реакции, вариации которой достигаются использованием различных концентраций АТФ. Активация фермента обработкой пируваткиназой или его торможение в ходе гидролиза АТФ неконкурентны по отношению к АТФ: изменение каталитической активности сопровождается изменением  $V_{\text{max}}$  при постоянном значении  $K_m$  для АТФ. Ни скорость перехода от быстрой фазы к медленной, ни соотношение между активностями фермента в первой и второй фазах реакции не зависят от количества пируваткиназы и фосфоенолпирувата, использующихся в АТФ-регенерирующей системе.

Простейшая схема, хорошо соответствующая такому набору экспериментальных данных, может быть представлена в виде

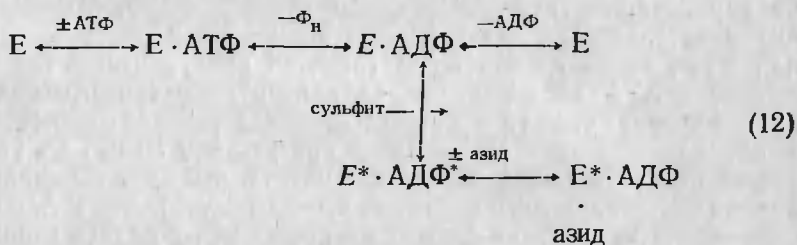


Схема (11) описывает обычную ферментативную реакцию, один из фермент-субстратных комплексов которой подвергается медленной изомеризации с образованием неактивного фермента. Сопоставление перечисленных выше параметров двухфазности гидролиза АТФ со свойствами «медленного» комплекса, образующегося при преинкубации АТФазы с низкими концентрациями АДФ, дает достаточные основания полагать, что неактивный комплекс  $E \cdot \text{АДФ}^*$ , образующийся в результате изомеризации (схема 11), и неактивный  $E \cdot \text{АДФ}$  комплекс идентичны.

Из приведенной выше схемы следует, что должны существовать эффекторы, по-разному влияющие на две фазы гидролиза АТФ; это казалось особенно вероятным для тех модуляторов АТФазы,

влияние которых проявляется медленно и (или) конечный результат их действия зависит от природы гидролизующегося нуклеотида. Действительно, нам удалось показать, что влияние азид-ингибитора АТФазы [69—71] и сульфита — ее активатора [72, 73] опосредуется АДФ. Оказалось, что ни азид, ни сульфит не влияют на начальную стадию гидролиза АТФ, будучи ингибитором и активатором (соответственно) второй стадии реакции. Более того, скорость торможения АТФазы азидом, как и скорость перехода реакции во вторую, медленную фазу, прямо пропорциональна начальной скорости реакции. Сульфит предотвращает переход к медленной фазе реакции, когда он добавлен к среде раньше фермента, и активирует реакцию во второй ее фазе, или на фоне торможения азидом. Ни тот, ни другой эффекторы не влияют на скорость гидролиза ИТФ, а кинетический механизм их ингибирующего (азид) и активирующего (сульфит) влияния на гидролиз АТФ неконкурентен по отношению к АТФ.

Принимая во внимание схему (11) и перечисленные выше факты, легко описать формальный механизм действия азид и сульфита:



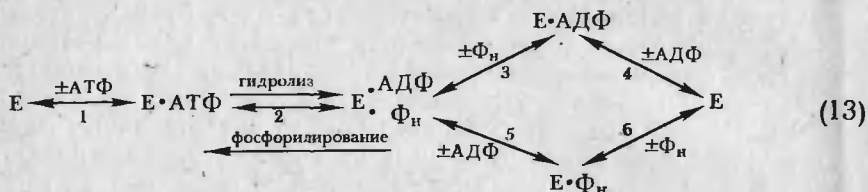
Как видно из схемы, оба эффектора не влияют на собственно АТФазную реакцию, а их действие связано с реакциями, приводящими к изомеризации «быстрого»  $E \cdot \text{АДФ}$ -комплекса в «медленный» ( $E^* \cdot \text{АДФ}$ ).

В подтверждение предложенной схемы мы показали, что сульфит предотвращает торможение АТФазы, вызванное преинкубацией фермента с низкими концентрациями АДФ, а азид блокирует активацию АТФазы фосфоенолпируватом и пируваткиназой.

### Взаимодействие неорганического фосфата и митохондриальной АТФазы [54]

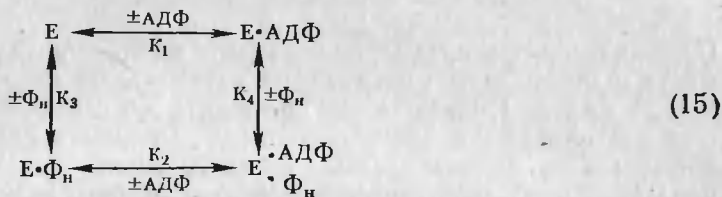
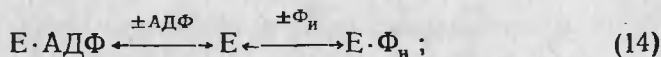
Поскольку неорганический фосфат является субстратом окислительного фосфорилирования, можно думать, что  $F_1$  имеет специфический центр его связывания. Действительно, растворимая АТФаза может связывать фосфат [6—8] с  $K_{\text{дис}}$ , соизмеримым со значениями  $K_m$  для этого субстрата в процессе окислительного фосфорилирования [74]. Если фосфотрансферазные реакции, происходящие при гидролизе АТФ, катализируемому растворимым  $F_1$  или субмитохондриальными частицами, рассматривать как про-

цесс, обратный окислительному фосфорилированию, протекающий по пути либо 1, 2, 3, 4, либо 1, 2, 5, 6 (либо по обоим), и реакции 3 или 6 обратимы, то неорганический фосфат *должен* быть ингибитором АТФазной реакции.



Однако это не так: фактически фосфат активирует АТФазную реакцию [75—77], а его влияние на АТФ-зависимые эндергонические реакции субмитохондриальных частиц сложное и зависит от присутствия АДФ [78]. Такое парадоксальное влияние фосфата на АТФазную активность послужило предпосылкой для наших исследований, в которых было обнаружено сильное воздействие  $\text{F}_n$  на образование «медленного» комплекса  $\text{E} \cdot \text{АДФ}$ . Мы показали, что неорганический фосфат практически не влияет ни на  $K_m$  для АТФ, ни на  $K_i$  для АДФ (простой конкурентный тип торможения) в АТФазной реакции, катализируемой субмитохондриальными частицами. В то же время величина константы диссоциации медленного комплекса  $\text{E} \cdot \text{АДФ}$  в присутствии 10 мМ  $\text{F}_n$  увеличивается на два порядка. Следует отметить, что предложенная нами ранее гипотеза, согласно которой высокоспецифичное к АДФ место связывания нуклеотида служит активным центром АТФазной реакции [50, 53], количественно плохо согласовывалось с величинами  $K_m$  для АДФ в процессе окислительного фосфорилирования. Сильное уменьшение сродства фермента к АДФ в присутствии фосфата, во-первых, сняло это противоречие, а во-вторых; позволило дать простую интерпретацию ряду ранее известных, но не объясненных фактов. Давно известно, что азид, будучи ингибитором АТФазы, ингибирует связывание фосфата фактором  $\text{F}_1$ , а сульфит увеличивает это связывание [7]. Образование комплекса  $\text{F}_1$  с фосфатом — медленный процесс [6, 7], что плохо соответствует представлению о его вовлечении в каталитический цикл окислительного фосфорилирования. Оба этих явления логически вытекают из схемы (12), так же как и не объясненная ранее стимуляция АТФазной реакции после преинкубации с неорганическим фосфатом [75—77]. Нам удалось показать, что неорганический фосфат, уменьшая сродство АТФазы к АДФ, медленно (с такой же скоростью, как и АТФ-регенерирующая система) активирует АДФ-блокированную АТФазу, и эта активация чувствительна к азиду.

К сожалению, из-за методических трудностей мы не можем различить два возможных варианта взаимозависимого связывания АДФ и  $\text{F}_n$  с митохондриальной АТФазой:



где  $K_1 < K_4$  и  $K_3 < K_4$ . Первый вариант (14) соответствует конкуренции между АДФ и  $\Phi_{\text{H}}$  за общее место связывания, а второй (15) — отрицательной кооперативности между связыванием АДФ и  $\Phi_{\text{H}}$ . Решение этой альтернативы позволило бы пролить свет на кинетический механизм окислительного фосфорилирования [79, 80] (см. альтернативные пути на схеме (13)). Важно подчеркнуть, что АТФаза, блокированная относительно высокими концентрациями АДФ в присутствии  $\Phi_{\text{H}}$  также *медленно* активируется, как и фермент, блокированный АДФ в присутствии  $\Phi_{\text{H}}$ . Последнее обстоятельство заслуживает краткого обсуждения. В одной из последних публикаций Бойера [81] в противоположность ранее развиваемой им точки зрения [82] о регуляторном характере обнаруженного нами торможения АТФазы АДФ приведена схема, согласно которой «медленный» комплекс  $E \cdot \text{АДФ}$  рассматривается как результат «неправильного» отщепления фосфата из тройного комплекса, где АДФ связан в активном центре АТФазы (или АТФ-синтетазы):



Из схемы следует, что неорганический фосфат в стационарном состоянии должен стимулировать АТФазную реакцию, что противоречит нашим результатам [54]. Кроме того, если вслед за Бойером принять, что АДФ в тройном комплексе  $E \cdot \text{АДФ} \cdot \Phi_{\text{H}}$  локализован в описанном нами центре с высоким сродством, то даже в присутствии фосфата число оборотов АТФазы не может быть больше  $2 \text{ мин}^{-1}$  (см. с. 000).

Последнее явно противоречит фактам.

**«Полная» модель кинетики гидролиза  
АТФ митохондриальной АТФазой и проблема  
обратимости гидролиза/синтеза АТФ**

Суммированные в предыдущем разделе экспериментальные данные могут быть описаны минимальной кинетической схемой, представленной на рис. 1. Прежде чем обсуждать эту схему, целесообразно еще раз кратко повторить основные экспериментальные факты, послужившие предпосылками ее построения. Левый, бóльший цикл описывает простейшую последовательность реакций гидролиза АТФ. Существование последовательности реакций правого, малого цикла 5, 6, 7 следует из кинетики АТФ-зависимой активации

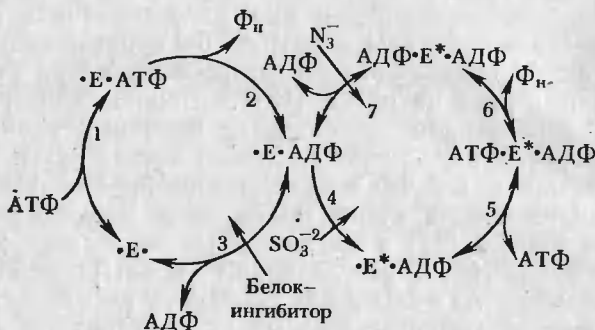


Рис. 1. Кинетическая схема гидролиза АТФ митохондриальной АТФазой. Прямыми стрелками показаны предполагаемые места действия ингибиторов и активаторов фермента. Подробное объяснение в тексте

АТФазы, заторможенной после преинкубации с низкими концентрациями АДФ. Связь между двумя циклами осуществляется реакцией 4, описывающей медленную изомеризацию фермент-продуктного комплекса  $\text{E} \cdot \text{ADP}$  в комплекс  $\text{E}^* \cdot \text{ADP}$ , где АДФ связан в центре, отличном от того, где связывается АТФ при гидролизе последнего (см. схему (11)). Превращение комплекса  $\text{E} \cdot \text{ADP}$  в  $\text{E}^* \cdot \text{ADP}$  за счет изомеризации (или транслокации) нуклеотида из одного центра в другой без появления в растворе следует из зависящего от времени торможения освобожденной от АДФ АТФазы при гидролизе АТФ (но не других нуклеотидов) и отсутствия зависимости этого торможения от количества добавленной пируваткиназы.

Действие сульфита, по-видимому, обусловлено предотвращением реакции 4. Азид предотвращает АТФ-зависимую активацию АТФазы, блокированной АДФ; таким образом, его влияние направлено на одну из стадий: 5, 6, 7. По ряду соображений нам кажется наиболее вероятным, что азид предотвращает диссоциацию АДФ из тройного неактивного комплекса  $\text{ADP} \cdot \text{E}^* \cdot \text{ADP}$ .

Полное выражение для скорости гидролиза АТФ в реакции, описываемой этой моделью, достаточно громоздко. Однако без

искажения сути модель может быть заменена более простой, эквивалентной:

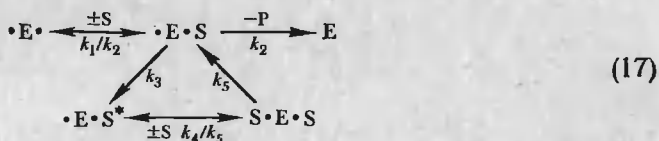


Схема (17) сохраняет все основные свойства более детализированной модели (рис. 1). Согласно этой упрощенной схеме фермент-субстратный комплекс одностадийной реакции ( $E \cdot S$ ) претерпевает необратимую изомеризацию (напомним, что константа диссоциации комплекса  $E \cdot \text{АДФ}$  очень мала,  $\sim 10^{-8}$  М). Неактивный комплекс  $\bullet E \cdot S$  может быть активирован субстратом через стадию образования тройного комплекса  $S \cdot E \cdot S$  (АТФ-зависимая активация АДФ-блокированного фермента). В присутствии избытка пируваткиназы стадии, описываемые константами скоростей  $k_2$  и  $k_5$ , необратимы. Сравним теперь кинетику АТФазной реакции, катализируемой «активированной» АТФазой, полностью освобожденной от АДФ и регистрируемой по начальным скоростям реакции (малый цикл — рис. 1 — не функционирует), с кинетикой реакции в стационарном состоянии, когда функционируют оба цикла.

В первом случае («активированная» АТФаза, начальные скорости):

$$v = k_2 [E \cdot S] \quad (18)$$

и

$$\frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S}{[S] + K_m^S},$$

где

$$K_m^S = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}}. \quad (19)$$

Для стационарного состояния (функционируют оба цикла, измеряются скорости после установления медленного равновесия между комплексами  $E \cdot S$ ,  $E \cdot S^*$  и  $S \cdot E \cdot S$ ):

$$v = k_2 \cdot [E \cdot S] + k_5 [S \cdot E \cdot S]. \quad (20)$$

Членом  $k_5 [S \cdot E \cdot S]$  в выражении (19) можно пренебречь, так как  $k_5$  примерно на четыре порядка меньше, чем  $k_2$ . Другими словами, можно считать, что образование продукта реакции (АДФ) происходит только за счет собственно гидролитической реакции, а процесс активации АТФазы влияет на скорость за счет изменения концентрации  $E \cdot S$ , а не за счет образования  $P$  в результате его отщепления из тройного комплекса  $S \cdot E \cdot S$ .

Решение системы уравнений, описывающих стационарное состояние (вывод не приводится), выглядит следующим образом:

$$v = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S}{S \left( 1 + \frac{k_3}{k_5} \right) + K_m^S + \frac{k_3}{k_5} \cdot K_m^a}, \quad (21)$$

где  $K_m^a = \frac{k_{-4} + k_5}{k_{+4}}$  (константа Михаэлиса для АТФ в процессе окислительной активации фермента). Как обсуждалось в предыдущем разделе,  $K_m^a$  численно равна  $K_m^S$ . Выражение (20) тогда может быть преобразовано:

$$v = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S}{(S + K_m^S) \left( 1 + \frac{k_3}{k_5} \right)}. \quad (22)$$

Выражение (22) отличается от (19) добавочным членом в знаменателе, характеризующим относительные скорости изомеризации фермент-субстратного комплекса (ES) в неактивный ( $ES^*$ ) и активации под действием субстрата. Выражение (21) описывает неконкурентный тип торможения (по сравнению с (19)), что соответствует экспериментальным данным о неконкурентной по отношению к АТФ активации АТФазы инкубацией в присутствии фосфоенолпирувата и пируваткиназы и о неконкурентном торможении второй фазы реакции гидролиза АТФ по сравнению с первой (см. выше).

Модель, приведенная на рис. 1, не только качественно, но и количественно хорошо описывает экспериментальные данные. Величина  $k_3$  легко измеряется как константа скорости торможения АТФазной реакции в присутствии избытка АТФ и азида (см. схему (17)). Она равна  $\sim 0,7 \text{ мин}^{-1}$ . Величина  $k_5$  соответствует максимальной скорости активации АДФ-блокированного фермента в присутствии насыщающих концентраций АТФ; она равна  $\sim 2 \text{ мин}^{-1}$ . Отношение начальной скорости активированной АТФазы к установившейся после перехода во вторую фазу гидролиза АТФ определяется в соответствии с рассматриваемой моделью отношением выражений (19) и (22):

$$\frac{v_{\text{нач}}}{v_{\text{уст}}} = \frac{k_5 + k_3}{k_5} = 1,35. \quad (23)$$

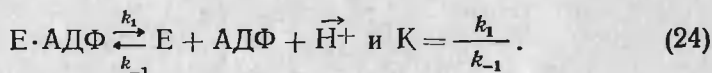
Полученная величина хорошо соответствует примерно 30%-ному торможению второй фазы реакции по сравнению с первой, особенно если принять во внимание, что величины  $k_3$  и  $k_5$  определены в независимых экспериментах. Модель предсказывает, что степень торможения во второй фазе реакции не зависит от концентрации АТФ, что при относительно больших концентрациях субстрата хорошо согласуется с экспериментальными данными; при концентрации АТФ  $\ll K_m$  двухфазности не наблюдается, по-

видимому, из-за очень длительного времени установления стационарного состояния.

Основная цель многочисленных (в том числе и наших) исследований, посвященных кинетике гидролиза АТФ митохондриальной АТФазой, состоит в выяснении механизма «обратной» реакции — синтеза АТФ. В связи с этим возникает вопрос: какова роль кинетически значимых интермедиатов реакции гидролиза АТФ (см. рис. 1) в реакции фосфорилирования?

При обсуждении этой проблемы возможны два принципиально различающихся подхода.

Первый, пожалуй, наиболее популярный, основан на прямом приложении принципа микрообратимости к реакциям, катализируемым любым ферментом. При таком подходе фосфорилирование АДФ должно описываться обратной последовательностью реакций большого цикла схемы. Влияние электрохимического потенциала ионов водорода на АТФазную активность сводится при этом к обеспечению ее термодинамической обратимости. Последнее в соответствии с принципом Холдейна [83] неизбежно должно сказаться на кинетических параметрах фермента:  $K_m$  для субстратов и значении максимальных скоростей. В более конкретной, хотя и чисто гипотетической форме сказанное можно проиллюстрировать следующим образом. Допустим, что реакция (3) большого цикла схемы на рис. 1 непосредственно сопряжена с векторным переносом протона через  $F_0$ :



Это означает, что кажущаяся константа равновесия  $K$  для диссоциации комплекса  $E \cdot \text{АДФ}$  обратно пропорционально зависит от  $\Delta\mu H^+$ .

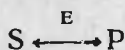
Эта зависимость может выражаться в уменьшении константы скорости  $k_1$  при увеличении  $\Delta\mu H^+$ . В условиях необратимой утилизации АДФ пируваткиназной системой скорость гидролиза АТФ ( $v$ ) будет определяться стационарной концентрацией  $E \cdot \text{АДФ}$  и константой скорости  $k_1$ :

$$v = k_1 [E \cdot \text{АДФ}]. \quad (25)$$

Уменьшение величины  $\Delta\mu H^+$  добавлением разобщителей или возникновением неспецифических утечек протонов через сопрягающую мембрану либо невозможность векторного переноса протонов (растворимый  $F_1$ ) приведет в этом случае к увеличению скорости АТФазной реакции вследствие увеличения  $k_1$ . Так как в величину  $K_m$  для АДФ в процессе окислительного фосфорилирования входит константа скорости распада комплекса  $E \cdot \text{АДФ}$ :

$$K_m^{\text{АДФ}} = \frac{k_1 + A}{k_{-1}}, \quad (26)$$

где  $A$  — комбинация кинетических констант стадий 2 и 1 большого цикла, снижение  $\Delta\mu^+$ , приводящее к увеличению  $k_1$ , должно привести к увеличению  $K_m$  для АДФ. Сказанное является простой иллюстрацией соотношения Холдейна, согласно которому кинетические параметры прямой и обратной реакций, катализируемых *единственным* ферментом, не могут быть произвольными, а должны зависеть от константы равновесия реакции. Более детальное теоретическое рассмотрение принципа Холдейна можно найти в обзоре Клиланда [84], а его возможное приложение к функционированию митохондриальной АТФазы в обзоре Бойера [82]. Следует отметить, что недавно три независимые группы исследователей сообщили об экспериментально наблюдаемом увеличении констант Михаэлиса для АДФ и неорганического фосфата в процессе окислительного фосфорилирования [74, 85, 86]. Легко показать, что, если обратимая ферментативная реакция катализируется *единственным* ферментом, из принципа микрообратимости следует невозможность избирательного торможения любым ингибитором только одного направления реакции при условии, что ингибитор не влияет на положение равновесия (не реагирует с субстратами или продуктами реакции). Действительно, для реакции



соотношение Холдейна может быть записано так:

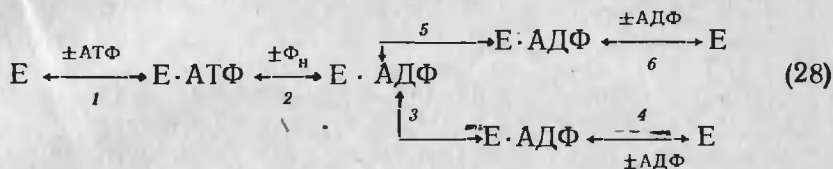
$$\frac{P_p}{|S_p|} = K_p = \frac{V_{\max}^f \cdot K_m^P}{V_{\max}^b \cdot K_m^S}, \quad (27)$$

где  $P_p$  и  $S_p$  — концентрации субстрата и продукта в равновесии, определяемом константой  $K_p$ ;  $V_{\max}^f$  и  $V_{\max}^b$  — значения максимальных скоростей прямой и обратной реакции соответственно;  $K_m^S$  и  $K_m^P$  — константы Михаэлиса для субстрата и продукта при протекании реакции в прямом и обратном направлениях. Если ингибитор (или активатор) изменяет  $V_{\max}^f$ , то неизменность константы равновесия требует пропорционального изменения одного или одновременного изменения всех трех других параметров ( $V_{\max}^b$ ,  $K_m^S$ ,  $K_m^P$ ). Сообщения об одностороннем торможении АТФазной реакции обычно касаются изменений скоростей, измеренных в оптимальных для данного направления условиях, т. е. величин, близких, но не идентичных  $V_{\max}$ . К сожалению, нам не известно ни одной работы, где влияние «одностороннего» ингибитора на «оптимальную» активность сопровождалось бы анализом его эффектов на три другие параметра, входящие в соотношение Холдейна [83].

Таким образом, существование «односторонних» ингибиторов в той мере, в какой изучена феноменология их действия, не противоречит представлению об АТФазной реакции как о реакции фосфорилирования, протекающей в обратном направлении (см.

краткое обсуждение проблемы односторонних ингибиторов в работе [87]).

Существует возможность принципиально иного подхода к проблеме обратимости окислительного фосфорилирования. Рассмотрим гипотетическую ферментативную реакцию гидролиза АТФ, сопряженную с векторным перемещением протона и происходящую по стадиям 1—4:



Пусть, как и в предыдущем случае, стадия 4 сопряжена с переносом протона. Тогда все сказанное выше применительно к большому циклу схемы рис. 1 окажется справедливым для циклической реакции 1—4, и фосфорилирование АДФ представляет собой последовательность реакций 4—1. Уместно подчеркнуть, что сопрягающая функция фермента (гидролиз/перенос протона), по-видимому, должна состоять в строго детерминированной последовательности элементарных актов, следующих после активации кинетически инертной и термодинамически нестабильной молекулы АТФ при ее связывании в активном центре.

Допустим теперь, что при солибилизации  $F_1$  или при получении субмитохондриальных фрагментов происходит «незначительное» изменение структуры фермента, приводящее к тому, что вместо специфической изомеризации комплекса «фермент-продукт» (реакции 3) происходит диссоциация комплекса в соответствии с последовательностью реакций 5 и 6. Суммарная АТФазная реакция в этом случае катализируется циклической последовательностью реакций 1, 2, 5 и 6, а если одна из новых стадий, например 5, необратима, невозможно обращение и всей последовательности реакций. При таком рассмотрении АТФазная и АТФ-синтетазная реакции протекают по различным механизмам. Для необратимой последовательности реакций 1, 2, 5 и 6 соотношение Холдейна не имеет смысла. В том случае, если обе последовательности: 1—4 и 1, 2, 5, 6 обратимы, то для каждой из них существуют два соотношения, связывающие кинетические параметры с константой равновесия, каждое из которых однозначно. Очевидно, что константа Михаэлиса для АТФ и значения максимальных скоростей гидролиза, протекающего по различным механизмам, могут существенно различаться; это в полной мере справедливо и для обратных реакций. При таком рассмотрении существование «односторонних» ингибиторов фермента не только возможно, но и прямо следует из схемы [28]. Действительно, ингибитор, действие которого направлено, например, на стадию 5, не окажет влияния на реакцию фосфорилирования, но будет сильно влиять на реакцию гидролиза АТФ.

Следует отметить, что существование различных путей синтеза и гидролиза АТФ в митохондриях в неявном виде неоднократно предлагалось различными авторами в течение двух последних десятилетий [29—33], однако, по-видимому, из-за недостаточно четких формулировок подобные гипотезы не получили развития. Частным случаем общей схемы [28] является представление, развиваемое Шефером и сотрудниками, согласно которому электрохимический потенциал ионов водорода является регулятором соотношения между потоками реагентов, проходящими по пути 1—6 и 1—4 [88—90]. Согласно Шеферу, конформация  $F_1$ , определяемая по сродству фермента к аналогам нуклеотидов, сильно зависит от  $\Delta\mu H^+$ . Следствием этого является существование аналогов нуклеотидов, избирательно блокирующих либо гидролиз, либо синтез АТФ [91].

Существование медленных переходов фактора  $F_1$  из активного в неактивное состояние, индуцируемых АДФ и нечувствительных к изменению  $\Delta\mu H^+$  (медленность изменений активности фермента сама по себе служит сильным указанием на конформационные перестройки в молекуле белка [92]) открывает, на наш взгляд, новую возможность обсуждения соотношений между путями синтеза и гидролиза АТФ митохондриальной АТФазой.

Три экспериментально обоснованных факта служат основной предпосылкой нашей гипотезы. Во-первых, в присутствии второго субстрата окислительного фосфорилирования — неорганического фосфата — величина константы диссоциации медленного  $F_1$ -АДФ-комплекса соизмерима с величиной  $K_m$  для АДФ в процессе окислительного фосфорилирования. Во-вторых, преинкубация субмитохондриальных частиц с АДФ блокирует АТФ-гидролазную реакцию и не влияет на кинетику окислительного фосфорилирования. В-третьих, АТФ-зависимая активация АДФ-блокированной АТФазы (последовательность реакций 5—7 малого цикла на схеме рис. 1) сама по себе должна представлять АТФазную реакцию с числом оборотов  $2 \text{ мин}^{-1}$  (см. обсуждение механизма АТФ-зависимой активации выше). Такое число оборотов этой АТФазной реакции в пересчете на величины активности составляет  $\sim 0,8$  нмоль/мин на 1 мг белка (содержание  $F_1$ , определяемое по титру олигомицина в наших препаратах, составляет  $\sim 0,4$  нмоль/мин на 1 мг белка), или 0,01% от скорости АТФазной реакции, протекающей в соответствии с последовательностью 1—3 большого цикла схемы рис. 1. Можно представить, что обращение малого цикла и является последовательностью реакций, происходящих при окислительном фосфорилировании, где обнаруженный нами медленный комплекс  $E \cdot \text{АДФ}^*$  служит фермент-субстратным комплексом нормального каталитического цикла<sup>2</sup>. Сказанное может быть

<sup>2</sup> Ситуация, очевидно, значительно сложнее, так как такой упрощенный подход предсказывает, что максимальная активность АТФ-зависимых эндогенных реакций (обратный перенос, трансгидрогеназа) должна быть меньше или равна 0,8 нМ/мин на 1 мг белка субмитохондриальных частиц. Реальные величины примерно в 100 раз выше этого значения; это, конечно, требует модификации простейшей схемы, приведенной на рис. 1.

иллюстрировано схемой, изображенной на рис. 2, в соответствии с которой существуют две конформации фактора  $F_1$  — «гидролазная» и «синтезная», а равновесие между ними контролируется нуклеотидами — субстратом и продуктом окислительного фосфорилирования (или АТФазной реакции).

Кинетически такая схема эквивалентна модели, представленной на рис. 1, в которой пути синтеза и гидролиза АТФ различаются. Существование двух форм фермента, катализирующих одну и ту же реакцию с различными кинетическими параметрами, на первый взгляд должно было бы привести к аномальной, не михаэлисовской кинетике гидролиза АТФ препаратами субмитохондриальных частиц, что экспериментально не наблюдается [50]. Кажущееся противоречие, по-видимому, объясняется чрезвычайно низкой АТФазной активностью малого цикла (см. выше), и гидролиз АТФ, максимальная скорость которого составляет лишь доли процента от общей скорости гидролиза, не вносит ощутимого вклада в измеряемые кинетические параметры.

Наиболее существенное следствие предложенной нами модели состоит в том, что понимание механизма окислительного фосфорилирования требует детального изучения реакций малого цикла, а не большого. Следует подчеркнуть, что в настоящее время количество экспериментальных работ по изучению кинетики АТФазной реакции необозримо (см. [56—60]), тогда как кинетике реакций, непосредственно связанных с синтезом АТФ, посвящены лишь единичные работы [74, 79, 80]. По-видимому, это связано, во-первых, с экспериментальными трудностями изучения кинетики окислительного фосфорилирования, а во-вторых, с тем, что необычные эффекты АДФ до самого последнего времени рассматривались как регуляторные. Последнее заслуживает краткого обсуждения. Появление аномального кинетического поведения ферментов в биохимии вообще и применительно к АТФазе в частности нередко связывают с особенностями ферментов как регулируемых катализаторов. Весьма часто, однако (и это справедливо в отношении функционирования АТФ-синтазы митохондрий), в стороне от обсуждения остается вопрос: что именно и для каких физиологических нужд регулируется аномальным немихаэлисовским поведением. Кроме явной несостоятельности общего утверждения о существовании «регуляторных» мест связывания для нуклеотидов в молекуле  $F_1$  слабой их стороной является отсутствие количественных оценок. Сродство  $F_1$  к АДФ при образовании «медленного» комплекса неактивной АТФазы чрезвычайно велико ( $K \sim 10^{-8}$  — в отсутствие фосфата и  $K \sim 10^{-6}$  М — в присутствии «физиологических» концентраций фосфата). Это означает, что при реальных концентрациях АДФ в матриксе митохондрий специфическое для АДФ место связывания всегда насыщено нуклеотидом, и «регулирование» активности фермента внешним сигналом, реализующимся небольшими изменениями концентрации АДФ, неосуществимо. С другой стороны, так как основной функцией  $F_1$  является синтез АТФ, логично предположить, что постоянная насыщенность фер-

мента субстратом хорошо соответствует его физиологической функции.

Если принять, что гипотеза о различии путей синтеза и гидролиза АТФ митохондриальной АТФазой в предложенном нами виде [53] верна, то возникает вопрос: какова роль АТФазной реакции, протекающей по механизму, представленному большим циклом схемы рис. 1, или, другими словами, какова роль «гидролазной» конформации фермента (рис. 2).

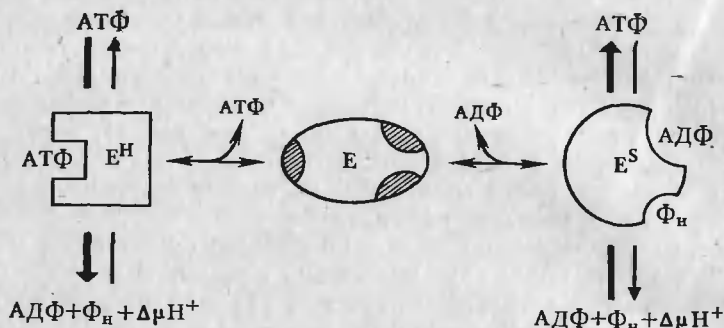


Рис. 2. Схема медленной трансформации митохондриальной АТФ-синтетазы, индуцируемой субстратом и продуктами.

Толстыми стрелками показаны кинетически предпочтительные направления реакции, катализируемые «гидролазной» ( $E^H$ ) и «синтетазной» ( $E^S$ ) конформациями фермента ( $E$ )

Ответить на этот вопрос можно двояко.

Одна из возможностей, на наш взгляд, состоит в том, что высокая АТФазная активность митохондриальной АТФ-синтетазы является биохимическим артефактом, вызванным воздействием, необходимыми для получения субмитохондриальных частиц или растворимого  $F_1$ . В связи с этим уместно отметить, что АТФазная активность сопрягающих факторов из других организмов (хлоропласты растений [93], некоторые микроорганизмы [94]) очень низка, но она может быть активирована сильными химическими воздействиями (тепловая обработка, обработка меркаптоэтанолом, трипсином). Митохондриальный АТФ-синтетазный комплекс также содержит специальный низкомолекулярный белковый ингибитор (см. обзор [95]), и препараты растворимого  $F_1$  или субмитохондриальных частиц быстро теряют гидролазную активность при их инкубации с белковым ингибитором и АТФ [96]. Фактически для получения активной митохондриальной АТФазы приходится применять специальные воздействия для удаления белкового ингибитора [61]. Интересно, что, блокируя гидролазную реакцию, белковый ингибитор практически не влияет на окислительное фосфорилирование [97]. Для объяснения этого явления была предложена гипотеза о  $\Delta\mu H^+$ -зависимой диссоциации комплекса АТФазы с белковым ингибитором [98]. Эта гипотеза экспериментально не доказана. Более того, далеко не все экспериментальные факты

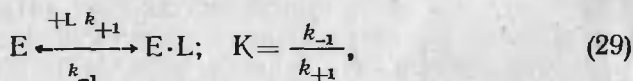
укладываются в представление о потенциал-зависимой диссоциации ингибитора. Так, например, известно, что гидролиз АТФ «сопряженными» субмитохондриальными частицами приводит к возникновению  $\Delta\mu_{H^+}$  на сопрягающей мембране, который в свою очередь должен активировать АТФазу за счет снятия торможения белковым ингибитором. Другими словами, АТФ-зависимые эндогенные реакции в субмитохондриальных частицах, содержащих белок-ингибитор, должны протекать автокаталитически. Экспериментально этого не наблюдается; напротив, торможение АТФазной активности белком-ингибитором требует гидролитического акта [99]. В рамках предложенной нами модели действие белка-ингибитора легко объясняется, если предположить, что оно направлено на одну из стадий большого цикла схемы рис. 1. Функциональная роль белка-ингибитора при таком рассмотрении состоит в обеспечении надежности сопряженной АТФазной реакции<sup>3</sup>.

Не исключено, что существование двух каталитических циклов, осуществляемых митохондриальной АТФазой, не является биохимическим артефактом, а имеет физиологический смысл. Можно себе представить, что в тех случаях, когда в гиалоплазме клетки создается дефицит АДФ, митохондрии, обладая потенциально высокой АТФазной активностью, способны быстро обеспечить необходимое количество АДФ за счет активации гидролитического цикла, не сопряженного с возникновением электрохимического потенциала ионов водорода на сопрягающей мембране. Это предположение, однако, весьма гипотетично, и в настоящее время не слишком продуктивно из-за отсутствия четких экспериментальных подходов к его проверке.

В заключение настоящего очерка хотелось бы подчеркнуть, что представление о различных путях синтеза и гидролиза АТФ в митохондриях может рассматриваться как частный случай более общей ситуации, возникающей при рассмотрении обратимости реакций, катализируемых ферментами. Хорошо известно, что многие метаболические реакции в клетке, обеспечивающие распад и синтез некоторых соединений, катализируются различными наборами ферментов (распад и синтез гликогена, окисление и синтез жирных кислот, синтез и деградация белков). На более простом уровне этот принцип, согласно которому прямая и обратная реакции протекают различными путями, может быть иллюстрирован существованием изозимов — ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию, но обладающих различными кинетическими параметрами. По-видимому, проблема функционирования изозимов прямо связана с термодинамической предопределенностью кинети-

<sup>3</sup> Белок-ингибитор тормозит АТФазу медленно и для этого торможения необходим АТФ. Можно было бы думать, что действие белка-ингибитора, так же как и азида или сульфита, опосредовано медленной изомеризацией комплекса E·АДФ. Специальное исследование, проведенное в нашей группе, показало, что это не так, и белковый ингибитор тормозит АТФазную активность AS-частиц независимо от АДФ.

ческих параметров ферментов (соотношение Холдейна). В случае олигомерных ферментов (*медленно* диссоциирующие / ассоциирующие системы, ферменты с несколькими активными центрами) «кинетический изозимный» состав может определяться равновесием между каталитически активными единицами, построенными из одного и того же белкового материала. Биологическая целесообразность такого способа регулирования очевидна, так как для его реализации требуется не кодирование и синтез новых полипептидных цепей, а только «разумное» использование «готовых» активных центров и каталитических механизмов, предсуществующих в отдельных блоках, из которых можно построить систему, не описываемую соотношением Холдейна. Простейшей разновидностью таких систем могла бы стать система, построенная из белка и «прочностязанного» лиганда-регулятора, причем высокое сродство фермента к такому лиганду-регулятору является необходимым условием создания «кинетических» изозимов. Действительно, для системы



где  $E$  — блок-катализатор, значения  $k_{+1}$  обычно составляют величины порядка  $10^{-7} \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ , т. е. немного меньше, чем диффузионно контролируемый предел. Это означает, что при величине  $K \sim 10^{-8} - 10^{-9} \text{ M}$  значения  $k_{-1}$  должны быть порядка  $10^{-1} - 10^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$ , и при обычном для ферментов числе оборотов порядка  $10^3 - 10^4 \text{ мин}^{-1}$  система, состоящая из свободного белка и его комплекса с лигандом-регулятором, *должна* проявлять гистерезис при быстром изменении концентрации  $L$ . Важно подчеркнуть, что медленное изменение активности по сравнению с числом оборотов фермента является необходимым условием такого типа регулирования; если равновесие устанавливается быстрее или со скоростями, равными скорости ферментативной реакции, концентрация является одним из параметров, входящих в соотношение Холдейна для более сложных систем [100].

В какой мере сказанное можно применить к реакциям синтеза и гидролиза АТФ в митохондриях, сказать трудно, хотя сам факт гистерезисного поведения этой ферментной системы не вызывает сомнений.

Авторы благодарны своим коллегам А. Ф. Фитину, И. Б. Минкову, М. В. Яламовой, принимавшим участие в экспериментальных работах группы и в их обсуждении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mitchell P. (1979) Science 206, 1148—1159.
2. Capaldi R. A. (1975) in Mammalian Cell Membranes (Jamieson G. A., and Robinson D. M., eds.), v. 2, pp. 141—164, Butterworths, London.

3. Pullman M. E., Penefsky H. S., Datta A., Racker E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3322—3329.
4. Garret N. E., Penefsky H. S. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 6640—6647.
5. Cross R. L., Nalin C. M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2874—2881.
6. Penefsky H. S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2891—2899.
7. Kasahara M., Penefsky H. S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4180—4187.
8. Lauquin G., Pougeois R., Vignais P. V. (1980) *Biochemistry* 19, 4620—4626.
9. Senior A. E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11319—11322.
10. Yoshida M., Sone N., Hirata H. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9525—9533.
11. Esch F. S., Allison W. S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6100—6106.
12. Pougeois R., Satre M., Vignais P. V. (1979) *Biochemistry* 18, 1408—1413.
13. Hilborn D. A., Hammes G. G. (1973) *Biochemistry* 12, 983—990.
14. Grubmeyer C., Penefsky H. S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3718—3727.
15. Grubmeyer C., Penefsky H. S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3728—3734.
16. Grubmeyer C., Cross R. L., Penefsky H. S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12092—12100.
17. Cross R. L., Grubmeyer C., Penefsky H. S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12101—12105.
18. Mitchell R. A., Lamos C. M., Russo J. A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 592, 406—414.
19. Schuster S. M., Ebel R. E., Lardy H. A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7848—7853.
20. Chernyak B. V., Chenyak V. Y., Gladysheva T. B. et al. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 635, 552—570.
21. Webb M. R., Grubmeyer C., Penefsky H. S. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11637—11639.
22. Boyer P. D. (1979) in *Membrane Bioenergetics* (Lee C. P., Schatz G., Ernster L., eds.), p. 461—480, Addison—Wesley Publishing Company, L.
23. Rosing J., Kayalar C., Boyer P. D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2478—2485.
24. Kayalar C., Rosing J., Boyer P. D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2486—2491.
25. Hutton R. L., Boyer P. D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9990—9993.
26. Repke K. R. H., Schon R. (1974) *Acta Biol. Med. Germ.* 33, K27—K38.
27. Lazdunski M. (1972) *Curr. Tp. Cell. Regul.* 6, 267—310.
28. Lardy H. A., Wellman H. (1953) *J. Biol. Chem.* 201, 357—364.
29. Cooper C. (1958) *Biochem. Biophys. Acta* 30, 484—491.
30. Vasington F. D., Greenwalt J. W. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 133—140.
31. Huang C. H., Mitchell R. A. (1972) *Biochemistry* 11, 2278—2283.
32. Penefsky H. S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3579—3585.
33. Pedersen P. L. (1975) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 64, 610—616.
34. Moyle J. Mitchell P. (1975) *FEBS Lett.* 56, 55—61.
35. Rectenwald D., Hess B. (1977) *FEBS Lett.* 80, 187—189.
36. Rectenwald D., Hess B. (1979) *FEBS Lett.* 108, 257—260.
37. Lowe P. N., Beechey R. B. (1981) *Biochem. J.* 196, 433—442.
38. Lowe P. N., Beechey R. B. (1981) *Biochem. J.* 196, 443—449.
39. Roveri O. A., Muller L. M., Wiilms S. et al. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 589, 241—255.
40. Hackney D. D. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 233—238.
41. Pedersen P. L. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 934—940.
42. Penin F., Godinot C., Gautheron D. C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 548, 63—67.
43. Di Pietro A., Penin F., Godinot C. et al. (1980) *Biochemistry* 19, 5671—5678.
44. Frieden C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5788—5799.
45. Frieden C. (1979) *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 471—489.

46. Hammes G. G., Hilborn D. A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 233, 580—590.
47. Акименко В. К., Минков И. Б., Бакеева Л. Е., Виноградов А. Д. (1972) *Биохимия* 37, 348—359.
48. Fitin A. F., Vasilyeva E. A., Vinogradov A. D. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 434—439.
49. Minkov I. B., Fitin A. F., Vasilyeva E. A., Vinogradov A. D. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89, 1300—1306.
50. Vasilyeva E. A., Minkov I. B., Fitin A. F., Vinogradov A. D. (1980) *Biochem. J.* 188, 807—815.
51. Minkov I. B., Vasilyeva E. A., Fitin A. F., Vinogradov A. D. (1980) *Biochem. Int. J.* 1, 478—485.
52. Minkov I. B., Vasilyeva E. A., Fitin A. F., Vinogradov A. D. (1982) *Biochem. J.* 202, 15—23.
53. Vasilyeva E. A., Minkov I. B., Fitin A. F., Vinogradov A. D. (1982) *Biochem. J.*, 202, 9—14.
54. Yalamova M. V., Vasilyeva E. A., Vinogradov A. D. (1982) *Biochem. Int.* 4, 334—344.
55. Vinogradov A. D., Vasilyeva E. A., Yalamova M. V. (1982) 2nd EBEC-Reports, v. 2, p. 113—114, Lyon.
56. Boyer P. D., Chance B., Ernster L. et al. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 955—1026.
57. Скулачев В. П., Козлов И. А. (1977) Протонные аденозинтрифосфатазы, Наука, М.
58. Penefsky H. (1979) *Adv. Enzymol.* 49, 223—280.
59. Shavit N. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 111—138.
60. Cross R. L. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50, 681—714.
61. Racker E., Horstman L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2547—2556.
62. Chance B., Nishimura M. (1967) *Meth. Enzymol.* 10, 641—650.
63. McClure (1969) *Biochemistry* 8, 2782—2787.
64. Уэбб Л. (1966) Ингибиторы ферментов и метаболизма, Мир, М., с. 188—191.
65. Hiromi K. (1979) Kinetics of fast enzyme reaction, Kodansha LTD, Tokyo, Japan.
66. Hammes G. G., Schimmel P. R. (1970) in *The Enzymes* (Boyer P. D. ed.), p. 67—115, Acad. Press. N. Y.
67. Яламова М. В. (1980) Дипломная работа, хранящаяся на биологическом факультете МГУ.
68. Lee C. P., Ernster L. (1968) *Eur. J. Biochem.* 3, 391—397.
69. Novikoff A. V., Hecht L., Podber E., Ryan J. (1952) *J. Biol. Chem.* 194, 153—170.
70. Robertson H. S., Boyer P. D. (1955) *J. Biol. Chem.* 214, 295—305.
71. Mitchell P., Moyle J. (1971) *Bioenergetics* 2, 1—11.
72. Stockdale, Selwyn M. J. (1971) *Eur. J. Biochem.* 21, 416—423.
73. Ebel R. E., Lardy H. A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 191—196.
74. Kayalar C., Rosing J., Boyer P. D. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 1153—1159.
75. Mitchell P., Moyle J. (1970) *FEBS Lett.* 9, 305—308.
76. Soper J. W., Pedersen P. L. (1976) *Biochemistry* 15, 2682—2690.
77. Skye G. E., Shavit N., Boyer P. D. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 724—729.
78. Huang C., Mitchell R. A. (1972) *Biochemistry* 11, 2278—2282.
79. Cooper C. (1965) *Biochemistry* 4, 335—342.
80. Schuster S. M., Reinhart G. D., Lardy H. A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 427—432.
81. Boyer P. D., Kohlbrenner W. E., Smith L. T., Feldman R. E. (1982) 2nd EBEC-Reports, v. 2, p. 23—24. Lyon.
82. Boyer P. D. (1981) in *Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes* (Skulachev V. P., Hinkle P. C., eds.), pp. 395—406, Addison—Wesley Publishing Company, L.

83. Haldane J. B. C. (1965) *Enzymes*, M. I. T. Press.
84. Cleland W. W. (1967) *Ann. Rev. Biochem* 36, 77—86.
85. Hatefi Y., Yagi T., Phelps D. C. et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1756—1760.
86. Vincler C. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 1095—1100.
87. Kohlbrenner W. E., Boyer P. D. (1980—1\*st EBEC-Reports, v. 1, pp. 205—206, Patron Editore, Bologna.
88. Schäfer G. (1978) in *Energy Conservation in Biological Membranes* (Schäfer G., Klingenberg M., eds.), pp. 243—246, Springer—Verlag, Heidelberg—New-York.
89. Schäfer G. (1978) in *Frentiers of Biological Energetics* (Dutton P. L. et al. eds.), p. 484—493, Acad. Press, N. Y.
90. Schäfer G. (1982) *FEBSLett.* 139, 271—275.
91. Schäfer G., Onur G., Strotman H. (1978) in *Energy Conservation in Biological Membranes* (Schäfer G. and Klingenberg M., eds.), p. 220—227, Springer—Verlag, Heidelberg — New York.
92. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. Мир, М., 224—252.
93. Vambutas V. K., Racker E. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2660—2667.
94. Fergusson S. J., John P., Lloyd W. J. et al. (1976) *FEBSLett.* 62, 272—275.
95. Ernster L., Carlsson C., Hundal T. et al. (1979) *Methm. Enzymol.* 55F, 399—407.
96. Gomez-Puyou A., Gomez-Puyou M. T., Ernster L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 252—257.
97. Pullman M. E., Monroy G. C. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3762—3769.
98. Van de Stadt R. J., Boer B. L. de, Dam K. van (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 392, 338—349.
99. Минков И. В., Виноградов А. Д. (1973) *Биохимия* 38, 542—547.
100. Sedel I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*, John Wiley, N. Y.

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА И РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КИНАЗЫ ФОСФОРИЛАЗЫ<sup>1</sup>

П. Л. Вульфсон

(Кафедра биохимии биологического факультета МГУ)

Киназа фосфорилазы (АТФ-фосфорилаза Б фосфотрансфераза КФ 2.7.1.38) катализирует фосфорилирование фосфорилазы Б, превращая ее в активную форму — ФА [1]. Киназа фосфорилазы является ключевым ферментом регуляции обмена гликогена [2—4]. Регуляция скорости гликогенолиза особо важное значение имеет для скелетной мускулатуры, так как функция мышечной ткани зависит от скорости распада и синтеза гликогена — основного источника энергии мышечного сокращения. В зависимости от состояния ткани активность ферментов, участвующих в этих реакциях — КФ, фосфорилазы и гликогенсинтазы — регулируется путем ковалентной модификации: реакции фосфорилирования — дефосфорилирования, приводящей эти ферменты в активированную или неактивированную форму [1—6]. С открытием цАМФ-зависимой протеинкиназы, активирующей КФ путем фосфорилирования [7], связан новый этап исследований, показавших, что фосфорилирование белков является общебиологическим механизмом регуляции физиологической активности тканей млекопитающих [2, 6]. Первым примером такого способа регуляции ферментативной активности была реакция, катализируемая КФ.

Установлено, что выделение ионов  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума в цитоплазму, происходящее при сокращении мышц, сопровождается активацией КФ. При этом для активации фермента требуется такая же концентрация  $Ca^{2+}$ , которая необходима для сократительного акта ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М). КФ проявляет свою активность только в присутствии  $Ca^{2+}$ , независимо от того, находится ли она в неактивированной или в активированной форме [8, 9]. С другой стороны, неактивированная КФ (с низкой активностью при pH 6,8) при фосфорилировании под влиянием цАМФ-зависимой протеинкиназы превращается в активированную форму [3, 4, 6]. Этот процесс обусловлен повышением концентрации цАМФ в клетке в ответ на взаимодействие адреналина с  $\beta$ -адренорецепторами, вызывающее активацию аденилатциклазы [10, 11].

<sup>1</sup> Приняты в статье сокращения: киназа фосфорилазы — КФ, фосфорилаза Б — ФБ, фосфорилаза А — ФА, кальмодулин — КМ, саркоплазматический ретикулум — СПР, этиленгликоль бис (2-аминоэтиловый эфир)  $N_1N'$ -тетраацетат — ЭТА, гликогенсинтаза — ГС, циклический 3',5' — АМФ — цАМФ, додецилсульфат натрия — DS-Na, неорганический фосфор — Р<sub>n</sub>.

Таким образом, значительное ускорение гликогенолиза при усиленной мышечной деятельности достигается с помощью каскада реакций, связанного с фосфорилированием КФ, которая в свою очередь фосфорилирует ФБ и ГС. Фосфорилированная форма КФ, обладающая большим сродством к своим белковым субстратам, повышает скорость распада гликогена и обеспечивает образование АТФ для мышечного сокращения. В последние годы в ряде работ было показано, что КФ способна фосфорилировать не только ФБ, но и ГС, активность которой при этом подавляется [12—16]. Следовательно, две противоположные реакции — распад и синтез гликогена — синхронно регулируются с помощью КФ. Кроме того, предполагается, что участие КФ в сопряжении процессов гликогенолиза и мышечного сокращения связано с активацией ее тропином С [17—19].

КФ характеризуется сложной молекулярной структурой: ее молекула, состоящая из 4 различных субъединиц, имеет молекулярный вес выше 1 млн. [20—23]. Изучение физико-химических и кинетических свойств и функции субъединиц направлено на выяснение механизмов каталитической реакции и регуляции фермента [24].

В настоящей статье мы попытались обобщить накопившиеся в литературе данные, уделив основное внимание рассмотрению работ, посвященных изучению молекулярных свойств фермента, роли субъединиц КФ в каталитической реакции и в регуляции ферментативной активности.

### Молекулярные свойства киназы фосфорилазы

В 1956 г. был описан фермент, катализирующий перенос фосфорильного остатка АТФ на ФБ, названный «киназой фосфорилазы» [1]. Стехиометрия ферментативной реакции соответствовала переносу 4 молей фосфата на моль ФБ и практически считалась необратимой:  $2\text{ФБ} + 4\text{Mg-ATP} \rightarrow \text{ФА} + 4\text{Mg-ADP}$  [25]. Димер ФБ, неактивный в отсутствие АМФ, превращался в тетрамер фосфорилазы А, не требующий для активности АМФ [26, 27]. Было показано, что фосфорилирование остатков серина в молекуле ФБ может происходить поэтапно, так что образуются не полностью фосфорилированные «гибридные» формы фосфорилазы [28]. Несколько лет тому назад появилась работа, в которой была обнаружена обратимость киназной реакции [29]. Необходимым условием обратимости реакции являлось присутствие в реакционной среде глюкозы, связанное, по-видимому, с влиянием ее на диссоциацию тетрамера ФА на димеры [30, 31]. Очевидно, субстратом КФ служит димерная форма фермента.

КФ составляет примерно 1% растворимых белков мышц [3, 23] и находится в двух молекулярных формах, называемых «активированная» и «неактивированная» киназа. Максимальная активность обеих форм проявляется при рН 8,2—9,0. Первая форма почти неактивна при нейтральных рН, а активность ее при рН 8,2 состав-

ляет около 70% от активности второй [21, 23]. Соотношение активностей, определяемых при рН 6,8 и 8,2, служит мерой степени активации фермента. Для неактивированной формы это соотношение равно 0,01—0,05, для активированной — от 0,3 до 1,0. Для проявления ферментативной активности обе формы киназы нуждаются в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [3, 21]. Судя по отношению активностей при рН 6,8 и 8,2, в покоящейся мышце фермент находится в неактивированной форме, а при возбуждении ткани — в активированной, при этом при нейтральном значении рН активность увеличивается в несколько десятков раз [3, 32—34].

В высокоочищенном состоянии КФ получена из скелетных мышц [20, 23, 35], сердца [36, 37, 38] и печени [39—42], а в частично очищенном виде она выделена из ряда других тканей. В качестве объектов для выделения фермента были использованы ткани кролика, акулы, крысы, быка, а также человека. Разработанный Кребсом и др. [35] метод выделения КФ основан на изoeлектрическом осаждении и дифференциальном центрифугировании. Дополнительные этапы очистки включают осаждение сульфатом аммония, гель-хроматографию на сефарозе 4В и ионообменную хроматографию на ДЭАЭЦ [20, 23]. Описаны и другие методы выделения — с помощью гидрофобной хроматографии [43], хроматографии по сродству на иммобилизованной фосфорилазе, специфических антителах, на кальмодулин-сефарозе [44—46]. Очищенная до гомогенного состояния КФ из скелетных мышц представляет собой большую молекулу с м. в.  $1,27 \times 10^6$ — $1,33 \times 10^6$  [20, 23, 35]. Коэффициент седиментации ее равен 23—26 S [20, 23, 47, 48]. При хранении фермента появляются агрегаты с коэффициентами седиментации 37 S и 48 S [23]. В двух разных лабораториях был определен аминокислотный состав молекулы КФ [20, 23]. Изoeлектрическая точка фермента рI равна 5,77 [21]. В спектре поглощения имеется максимум при 279 нм и минимум при 251 нм [21].

КФ может диссоциировать на субъединицы только после обработки DS-Na. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na дифференцировали сперва три полосы, соответствующие трем субъединицам КФ, обозначенным  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Полоса, принадлежащая  $\alpha$ -субъединице, была разделена на две  $\alpha$  и  $\alpha'$ . Недавно Коэн и др. [49] обнаружили в молекуле КФ еще одну субъединицу — с м. в. 17 000 — и показали, что по своим физико-химическим параметрам, первичной структуре [50], а также по функции она близка к кальмодулину —  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающему белку, активирующему фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов [51—53]. Ряд авторов проводил определение молекулярного веса субъединиц [20, 22, 23, 37, 38, 54]. Наибольшие колебания м. в. наблюдали для  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц:  $\alpha$  — от 118 000 до 145 000,  $\alpha'$  — от 133 000 до 140 000,  $\beta$  — от 108 000 до 130 000,  $\gamma$  — от 41 000 до 48 000. На основе определения молекулярных весов и их весовых соотношений рассчитывали стехиометрию субъединиц [20, 23]. Результаты, полученные разными методами исследования,

показали, что субъединицы присутствуют в эквимольных количествах и м. в. протомера равен 320 000 [23]. Не всегда, однако, соблюдалось такое соотношение субъединиц. Так, в работе Хаякавы и др. [20] оно было равно 1:1:2, а при анализе КФ из мышц тихоокеанской акулы (*Squalus acanthias*) нашли, что отношение между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами сохраняется постоянным, а соотношение  $\gamma$ -субъединицы варьирует от 1 до 8 и более [54]. Исследуя природу этого явления, авторы установили сходство между  $\gamma$ -субъединицей и G-актином. Оба белка имеют одинаковый молекулярный вес (45 000) и сходный аминокислотный состав, за исключением 3-метилгистидина, найденного только в молекуле G-актина.

Наличие  $\alpha'$ -субъединицы явилось следствием различия субъединичного состава КФ в красных и белых мышцах [22, 25], и количество ее отражает соотношение белых и красных мышц в смеси мышц конечностей и спины, используемых обычно для выделения фермента. В препаратах КФ из мышц кролика соотношение  $\alpha : \alpha'$  равно 10 : 1, а для мышинового фермента — отношение  $\alpha : \alpha'$  равно 1 : 1 [45]. И действительно, в белых и красных мышцах было показано существование 2 изоформ [55]. Благодаря тому что изоформы обладают различным сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ , их удалось разделить на колонке с кальмодулинсефарозой 4В [46].

Исходя из молекулярного веса фермента, равного в среднем  $1,3 \times 10^6$ , и молярных соотношений субъединиц, принято считать, что структура КФ из скелетных мышц отвечает формуле  $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$  или  $(\alpha'\beta\gamma\delta)_4$ . Выделенная в гомогенном состоянии КФ из сердца также содержит по 4 моля  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, а количество  $\gamma$ -субъединицы все же варьирует от 1 до 5, 6 [37, 38].

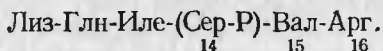
В лаборатории Хейльмейера была выделена КФ из мембран саркоплазматического ретикулума, в структуре которой не обнаружено  $\gamma$ -субъединицы [56]. Высокоочищенный фермент печени имел структуру, сходную с мышечной КФ [42, 57]. Как уже указывалось, КФ в нативном состоянии не диссоциирует на субъединицы. Попытки вызвать диссоциацию путем разведения, повышением ионной силы в присутствии солей  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaClO}_4$ , выдерживанием при низкой температуре не увенчались успехом [3]. Однако в работе Скастера и др. [58] удалось отделить  $\gamma$ -субъединицу от комплекса путем обработки фермента 1,8 M  $\text{LiBr}$  в присутствии 100 mM АТФ. Авторы получили при этом белок с м. в. 86 000, считая его димером  $\gamma_2$ . В дальнейшем в той же лаборатории таким способом были изолированы два комплекса —  $\gamma\delta$  и  $\alpha\gamma\delta$ , которые, как и  $\gamma_2$ , обладали ферментативной активностью [59].

Вопрос о наименьшем молекулярном весе активной формы нативного фермента до сих пор не нашел разрешения. Исследования КФ, активированной путем фосфорилирования [3, 6], органическими растворителями [60], не дали ответа. Оказывает ли действие белковый субстрат ФБ на четвертичную структуру КФ, пока тоже не ясно. Хотя, если учесть, что между ФБ и КФ обнаружено образование комплекса с м. в. 750 000, то как будто такое влияние

имеет место [61]. С другой стороны, выяснилось, что, в отличие от неактивированной киназы, КФ, активированная протеолизом в присутствии АТФ при 5°C, превращается в компоненты с меньшим молекулярным весом — 350 000 и ниже [3]. Основываясь, однако, на результатах кинетики ингибирования КФ аналогами АТФ, инактивация фермента происходила при связывании 4 молекул необратимого ингибитора на молекулу киназы, и, следовательно, это указывало, что активной является высокомолекулярная форма фермента  $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$  [62, 63].

### Специфичность киназы фосфорилазы

Фишер и сотр. [64] установили, что продукт киназной реакции ФА характеризуется наличием фосфосеринового остатка. В полученном путем протеолиза ФА гексапептиде, а затем тетрадекапептиде [65], содержащем центр фосфорилирования, была определена последовательность аминокислот и показано, что фосфорилированный остаток серина, занимающий положение 14 от N-конца, окружен двумя гидрофобными аминокислотами — изолейцином и валином, рядом с последним находится аргинин:



Эта последовательность аминокислот повторяется у фосфорилаз различных животных и человека [23, 66—68], и, по всей вероятности, поэтому КФ из мышц кролика способна катализировать фосфорилирование всех до сих пор известных фосфорилаз животного происхождения [68], в то время как дрожжевую ФБ, имеющую в этом участке иную последовательность, КФ не фосфорилирует [69]. Специфичность действия КФ исследовали с помощью синтетических пептидов. Кинетические свойства неактивированной и активированной КФ, изученные в модельной системе, содержащей вместо ФБ синтетический тетрадекапептид, указывали на сходство величин константы Михаэлиса  $K_m$  для ФБ и пептида и на различие величин  $V_m$  [70, 71]. Определив, что первые шесть аминокислот не имеют существенного значения для активности КФ, авторы использовали в дальнейшем октапептид, соответствующий центру фосфорилирования, и его аналоги [72]. Оказалось, что для узнавания центра фосфорилирования важными являются шесть аминокислот, среди которых особое значение имеют гидрофобные аминокислотные остатки — Вал-15 и Иле-13, а также Арг-16.

В последние годы выяснилось, что КФ может фосфорилировать не только ФБ и собственную молекулу, но и ряд других белков, таких, как ГС [12, 13, 73] и компоненты тропонинового комплекса, тропонин Т и тропонин I [74, 75]. Фосфорилируемый участок в тропонине I очень сходен с центром фосфорилирования ФБ, за исключением того, что вместо серина он содержит треонин. Однако скорость фосфорилирования тропонина во много раз ниже, чем



## Роль субъединиц в регуляции и каталитической активности КФ

Активация КФ под влиянием адреналина была замечена задолго до открытия цАМФ-зависимой протеинкиназы. В опытах *in vivo* и на очищенных препаратах КФ [6, 83, 84] это наблюдение привело к тому, что был открыт фермент, присутствующий в следовых количествах в препаратах КФ [7, 21, 23]. Фермент был выделен в гомогенном состоянии из ряда источников. Он состоит из двух типов субъединиц: регуляторной, связывающей цАМФ, и каталитической, на которой локализован активный центр. При образовании комплекса цАМФ с регуляторной субъединицей молекула фермента диссоциирует с выделением свободной каталитической субъединицы, способной фосфорилировать КФ [3, 85]. Влияние адреналина на превращение ФБ в ФА в скелетной мышце связано с увеличением концентрации внутриклеточного цАМФ. Образовавшаяся при этом цАМФ-зависимая протеинкиназа, фосфорилируя КФ, переводит ее в активированную форму, в свою очередь фосфорилирующую ФБ, вызывая тем самым активацию гликолиза. Таким образом, адреналин стимулирует деградацию гликогена посредством «каскадного» механизма, включающего активацию нескольких ферментных систем (рис. 1).

Справедливость приведенной схемы была доказана экспериментально не только для скелетной мускулатуры, но и для других тканей. Стимуляция гликолиза адреналином в сердечной мышце также связана с активацией КФ [37, 38]. Добавление адреналина



Рис. 1. Каскад реакций, связанный с регуляцией распада и синтеза гликогена в скелетной мускулатуре

в среду при перфузии изолированного сердца крысы приводило к быстрому увеличению активности ФА и увеличению уровня цАМФ [36, 86—90]. Наличие зависимости от цАМФ механизма активации КФ установлено также для гладкой мускулатуры [91, 92]. Аденилатциклазная система обеспечивает регуляцию активности КФ не только адреналином, но и другими гормонами. Так, было показано, что глюкагон активировал фосфорилирование КФ путем увеличения уровня цАМФ в печени [40].

В настоящее время известно, что очищенные препараты КФ *in vitro* могут фосфорилироваться другими протеинкиназами: цГМФ-зависимой [93],  $\text{Ca}^{2+}$ - и фосфолипид-зависимой [94, 95], цАМФ-независимой [96], цАМФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой [97]. Однако наиболее высокая степень активации КФ происходит под действием цАМФ-зависимой протеинкиназы; именно этот процесс является ключевой ступенью в регуляции гликогенолиза. В последние годы большое внимание было уделено изучению молекулярных механизмов активации КФ.

Считают, что полностью дефосфорилированная КФ характеризуется отношением активностей при pH 6,8 и 8,2, равным 0,01—0,05. При инкубации такого фермента с цАМФ, АТФ,  $\text{Mg}^{2+}$  и протеинкиназой активность КФ возрастала при pH 6,8 в 25—50 раз, а при pH 8,2 — в 1,4 раза, т. е. отношение увеличивалось до 0,36 [3, 21, 23]. Активацию КФ цАМФ-зависимой протеинкиназой проводили при низкой концентрации АТФ (0,2 мМ) и  $\text{Mg}^{2+}$  (2,0 мМ), чтобы исключить аутофосфорилирование. Установлено что в этих условиях происходит включение 2 молей фосфата на моль  $\alpha\beta\gamma\delta$ . Активация КФ коррелирует с внедрением 1 моля фосфата в  $\beta$ -субъединицу;  $\alpha$ -субъединица фосфорилируется более медленно, и ранее считали, что ее модификация не влияет на активность фермента [25, 24, 98];  $\gamma$ -субъединица не подвергалась фосфорилированию [21, 23]. Доказательством фосфорилирования  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц служили опыты с использованием протеин-гликогеновых частиц [99—102]. Кроме того, была показана идентичность фосфопептидов, выделенных из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц после фосфорилирования КФ *in vitro* [98] и из КФ, активированной внутривенным введением кролику адреналина [101]. Коэн и Антонив [102, 103] предположили, что фосфорилирование  $\alpha$ -субъединицы связано с регуляцией процесса дефосфорилирования  $\beta$ -субъединицы. Однако работы последнего времени позволили пересмотреть эту точку зрения. Были подобраны условия, в которых  $\alpha$ -субъединица не оказывала влияния на дефосфорилирование  $\beta$ -субъединицы [104—107]. Кроме того, с помощью различных протеинкиназ, фосфорилирующих КФ, показали, что на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах фосфорилируются одни и те же остатки серина, причем во всех случаях  $\beta$ -субъединица фосфорилируется быстрее, чем  $\alpha$ - или  $\alpha'$ -субъединица. Но более полная активация КФ зависит от фосфорилирования обеих субъединиц [21, 96, 97, 106].

При высоких концентрациях  $\text{Mg}^{2+}$  (10 мМ) и АТФ (3 мМ) КФ способна катализировать фосфорилирование своей собственной мо-

лекулы, сопровождающееся активацией фермента. Эта реакция полностью зависит от  $\text{Ca}^{2+}$  и ингибируется ЭГТА [3, 33, 47, 108]. В условиях благоприятных для аутофосфорилирования (3 мМ АТФ, 10—20 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ ), происходило включение фосфата в  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы фермента. Характерной особенностью этого процесса является также зависимость его от pH [3, 109]. При pH 8,2 оно происходит быстрее, чем при pH 6,8, при этом в  $\beta$ -субъединицу фосфат внедряется с постоянной скоростью при любом pH, фосфорилирование  $\alpha$ -субъединицы при pH 6,8 имеет лаг-стадию [3, 21, 110]. Внедрение максимального количества фосфата, равного 7—9 молям на 1 моль  $\alpha\beta\gamma\delta$ , приводит к активации фермента, в 2—3 раза превышающей активацию при фосфорилировании цАМФ-зависимой протеинкиназой.

Хотя механизм аутофосфорилирования остается неясным, на основании имеющихся экспериментальных данных можно заключить, что КФ, активированная самофосфорилированием, характеризуется большим сродством к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и к субстрату (ФБ). Кроме того, установлено, что в молекуле фермента различаются два типа остатков серина. Два остатка 1-го типа модифицируются при низкой концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и АТФ, остальные 5—7 остатков 2-го типа фосфорилируются более медленно и только при высокой концентрации  $\text{Mg-ATP}$  [3, 108, 110].

Известен еще один способ активации КФ, связанный с действием протеолитических ферментов [23, 24, 48, 111—113]. В ранних работах в препаратах КФ из мышц был обнаружен белковый «киназо-активирующий» фактор (КАФ), повышающий активность фермента при pH 6,8 [113—115]. Этим фактором оказалась  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая протеиназа [116]. Эффект активации фермента при ограниченном протеолизе трипсином и химотрипсином наблюдали также при изучении КФ из сердца и мозга [38, 115, 117]. Активирующее действие эндогенных протеиназ выявлялось при хранении очищенных препаратов КФ, которые за две недели при 4°C активировались в 12 раз [23]. Имеет ли физиологическое значение активация КФ протеолизом, пока остается неясным. Однако он широко использовался для изучения регуляторных свойств и функциональной роли субъединиц КФ [21, 23, 54, 112, 113, 118, 119]. В нашей работе с этой целью был применен субтилизин, действие которого вызывало 10-кратное увеличение активности КФ при pH 6,8. Одновременно с активацией фермента исчезала зависимость активности от  $\text{Ca}^{2+}$ . Такое же явление оказывало действие трипсина [14]. Протеолиз КФ субтилизином протекал более медленно, чем протеолиз трипсином, и это давало возможность детально анализировать изменение активности и структуры фермента во времени. Под действием протеиназ первой разрушалась  $\alpha$ -субъединица. Если сравнить активацию фермента цАМФ-зависимой протеинкиназой, которая главным образом зависела от фосфорилирования  $\beta$ -субъединицы, то активация протеолизом коррелировала с деградацией  $\alpha$ -субъединицы. Следовательно, механизмы этих двух путей активации различны, хотя в обоих случаях

повышалось сродство к белковому субстрату. Можно предположить, что в молекуле КФ, как и других регуляторных ферментов, каталитический компонент поддерживается в неактивном состоянии за счет взаимодействия с регуляторным, функцию которого выполняет, по-видимому,  $\alpha$ -субъединица.

Фракционирование фермента, обработанного субтилизином, на колонке с фосфоцеллюлозой позволило разделить две фракции. Наиболее слабо связанная с ионообменником фракция, обладавшая активностью при рН 6,8, характеризовалась полным отсутствием зависимости фермента от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 2) [48, 112].

Анализ этой фракции методом гель-хроматографии и электрофореза в градиенте полиакриламидного геля показал, что она представляет собой полипептид с м. в. 80 000—90 000 [34, 113]. В процессе протеолиза вслед за исчезновением  $\alpha$ -субъединицы начиналась деградация  $\beta$ -субъединицы;  $\gamma$ -субъединица оставалась без изменения [21—23, 34, 48]. Устойчивость  $\gamma$ -субъединицы к протеолизу служила одним из аргументов, позволившим предположить ее ответственной за выполнение каталитической функции [3, 21]. Однако, обработка КФ из мышц акулы и кролика химотрипсином, по отношению к которому оказалась устойчивой  $\beta$ -субъединица, Фишер и сотр. [54, 118, 119] получили данные, указывающие на

каталитическую роль  $\beta$ -субъединицы. Спустя несколько лет появилась работа Скастера и др. [58], в которой сообщалось, что 1,8 М LiBr в присутствии 100 мМ АТФ оказывает эффективное действие на диссоциацию КФ, в результате чего удалось отделить и очистить обладающую ферментативной активностью  $\gamma$ -субъединицу. Полученная  $\gamma$ -субъединица в виде димера  $\gamma_2$  с м. в. 86 000 была активна при рН 6,8. В отличие от холофермента —  $\gamma$ -субъединица полностью теряла зависимость активности от ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . В следующей серии работ эти же авторы также с помощью LiBr изолировали два комплекса —  $\gamma\delta$  и  $\alpha\gamma\delta$  [59, 120, 121]. Комплексы характеризовались частичной потерей чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$ , более высокой величиной константы Михаэлиса для АТФ, чем нативная неактивированная КФ. В то же время сродство комплексов к ФБ практически не изменялось. Добавление гликогена не приводило к активации  $\gamma\delta$ , характерной для холофермента, но актив-

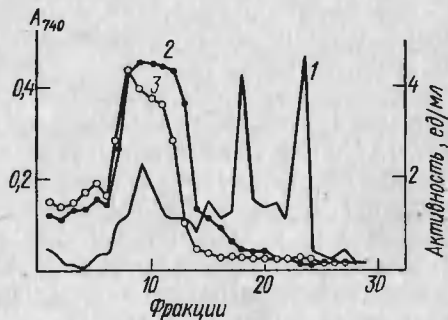


Рис. 2. Хроматографическое разделение киназы фосфорилазы, обработанной субтилизином.

На колонку с фосфоцеллюлозой наносили 5,4 мг КФ, обработанной субтилизином в течение 16 ч. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации  $\beta$ -глицерофосфата (0,03—0,3 М); определение активности проводили при рН 6,8.

1 — выход белка, 2 — активность КФ в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 — активность в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$

ность  $\alpha\gamma\delta$  комплекса повышалась. Из результатов работы можно было сделать заключение, что  $\alpha$ -субъединица выполняет многие регуляторные функции, а каталитическими свойствами наделена  $\gamma$ -субъединица. Следует также отметить, что сложно устроенная структура КФ и большой размер молекулы связаны с многообразными регуляторными свойствами фермента, в то время как катализировать ферментативную реакцию могли даже небольшие фрагменты, полученные после протеолиза КФ субтилизином [34, 48], хмотрипсином [54, 118, 119], и выделенная из молекулы белка с помощью LiBr  $\gamma$ -субъединица [58, 120, 121].

Не вызывает сомнения, что регуляция активности фермента тесно связана с пространственной организацией молекулы белка. В связи с этим безусловный интерес представляют результаты, полученные методом поперечной сшивки с помощью диметилсуберимидата [122, 123] и электронномикроскопические исследования [124]. Сшивающий агент может взаимодействовать с компонентами комплекса, расположенными на достаточно близком расстоянии друг от друга. Так, например, полученный после сшивки полилептид с м. в. 60 000 [122] был расшифрован как комплекс, состоящий из двух субъединиц —  $\gamma\delta$ . Исследуя субъединичную структуру сшитых комплексов на основе их чувствительности к действию определенных протеиназ, можно было предположить, что полученные сочетания субъединиц —  $\gamma\delta$ ,  $\beta\gamma$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\alpha$  — обусловлены более тесным контактом их в пространственной организации молекулы. Исследование КФ методом электронной микроскопии показало, что молекула имеет форму буквы Н: она представляет собой структуру, состоящую из двух больших доменов, соединенных узким мостиком. Каждый домен разделен на две половины, и мостик находится около участка их соединения. Размеры больших частей позволяют предположить наличие  $2\alpha$ - и  $2\beta$ -субъединиц в каждой части. Мостик, соединяющий эти части, может включать в себя  $\gamma$ -субъединицы. На основе данных электронной микроскопии и результатов, полученных при сшивании субъединиц, была предложена гипотетическая схема строения КФ, согласно которой  $2\alpha$ - и  $2\beta$ -субъединицы находятся в множественных контактах, а мостик, состоящий из 4  $\gamma$ -субъединиц, расположен таким образом, что  $\beta$ -субъединица одновременно может контактировать с  $2\gamma$ -субъединицами [123, 124].

Между тем появился ряд работ, сообщавших новые сведения о функциональной роли  $\beta$ -субъединицы. Это направление исследований представлено работами, в которых широко использовались различные аналоги субстрата — АТФ. В нашей работе были испытаны аналоги АТФ, содержащие алкилирующую группировку в трифосфатном участке молекулы [62, 63]. Среди испытанных аналогов АТФ наиболее эффективным ингибирующим действием характеризовался аденозин-5'-хлорметанпирофосфат, образующий необратимый фермент-ингибиторный комплекс. Наблюдаемый защитный эффект АТФ и стехиометрическое включение радиоактивных аналогов в молекулу КФ указывали на то, что эти соедине-

ния взаимодействуют с функциональными группами активного центра и, следовательно, связывались с теми субъединицами, на которых локализованы активные центры фермента. При изучении включения радиоактивной метки, содержащейся в аналогах АТФ, мы получили доказательство того, что они присоединяются к  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицам. Для полной инактивации фермента было достаточно, чтобы по одному молю аналога присоединилось к  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицам. Найденная нами зависимость между степенью инактивации фермента и степенью модификации  $\beta$ -субъединицы позволяет трактовать полученные данные как доказательство участия  $\beta$ -субъединицы в каталитическом процессе (табл. 2).

Весьма сходные результаты получены недавно другими авторами [125—128], наблюдавшими влияние ряда соединений, близких по структуре к АТФ, на ферментативную активность и на взаимодействие с субъединицами КФ. Полученные ими данные показали, что используемые соединения конкурируют за места связывания с АТФ или АДФ. Анализ взаимодействия с [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] 8-азидоаденозин-5'-трифосфатом указывал на преимущественное мечение  $\beta$ -субъединицы фермента и на защиту ее от включения метки в присутствии АТФ или АДФ [127, 128]. Таким образом, влияние аналогов АТФ на ферментативную активность в сочетании с включением их в  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы позволяет полагать, что  $\beta$ -субъединица играет существенную роль. Подтверждают эту точку зрения также данные недавно опубликованной работы, проведенной на КФ из сердца быка [38].

Поскольку выделить в индивидуальном виде  $\beta$ -субъединицу пока не удалось, нельзя решить однозначно, какова ее роль в каталитическом процессе. Однако для выяснения этого вопроса помимо вышеописанных могут быть использованы и другие подходы. В частности, могут быть полезны методы химической модификации функциональных групп, вовлекаемых в ферментативную реакцию или в регуляцию активности фермента. С этой целью проводилось изучение содержания и реакционной способности SH-групп КФ. В денатурированной молекуле определили 160 [20] или 200 [23] остатков цистеина. В работе этих же авторов было замечено, что SH-группы характеризуются различной реакционной способностью, но детально значение их не исследовалось.

В нашей работе было показано, что блокирование SH-групп дитионитробензоатом и йоданетамидом, обладающих наиболее высокой реакционной способностью, связано с активацией фер-

Таблица 2

Зависимость степени инактивации КФ от степени модификации  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц фермента аденозин-5'-хлорметапирфосфатом

Остаточная активность фермент-нгибиторного комплекса	Количество аналога, [связанного с субъединицами, моль/моль $\alpha\text{вуд}$ ]	
	$\beta$ -субъединица	$\gamma$ -субъединица
90	0,1	1,0
50	0,4	1,2
0	0,7—0,9	1,3

мента, в то время как медленно реагирующие SH-группы, подразделяющиеся на две категории, имели существенное значение для проявления ферментативной активности. Это подтверждалось зависимостью между скоростью блокирования SH-групп и наблюдавшейся инактивацией фермента [129, 130]. Принимая во внимание тот факт, что субстрат и продукт реакции, АТФ и АДФ, защищали фермент от инактивации, мы исследовали зависимость этого эффекта от концентрации нуклеотидов, добавленных порознь и совместно, и его связь с модификацией SH-групп. Результаты титрования, приведенные в табл. 3, позволили прийти к заключению о пространственной разделенности защищаемых SH-групп и о локализации их в области нуклеотид-связывающих центров. На основе зависимости защитного действия нуклеотидов от их концентрации можно было предположить что два остатка цистеина находятся в области АТФ-связывающих центров, отличающихся по сродству к субстрату, а один остаток — в области нуклеотид-связывающего участка, имеющий большее сродство к АДФ. Количество защищаемых нуклеотидами SH-групп не зависело от присутствия ионов  $Mg^{2+}$ .

Следующий этап нашей работы был связан с выяснением локализации SH-групп, важных для ферментативной активности, в субъединицах КФ. Для этого препараты фермента, предварительно обработанные  $^{14}C$ -йодацетамидом в присутствии и в отсутствие

Таблица 3

Влияние АТФ и АДФ на защиту остатков цистеина киназы фосфоорилазы от модификации дитионитробензоатом

Условия	Количество защищаемых +SN-групп на протомер $\alpha\beta\gamma\delta$
АТФ (0,05 мМ)	$0,98 \pm 0,29$
АТФ (0,3 мМ)	$0,83 \pm 0,26$
АТФ (3,0 мМ)	$2,63 \pm 0,20$
АДФ (0,05 мМ)	$1,16 \pm 0,10$
АДФ (0,3 мМ)	$0,68 \pm 0,20$
АДФ (3,0 мМ)	$1,96 \pm 0,15$
АТФ (0,3 мМ) + АДФ (0,3 мМ)	$1,98 \pm 0,10$
АТФ (0,3 мМ) + АДФ (3 мМ)	$1,95 \pm 0,47$
АТФ (3 мМ) + АДФ (3 мМ)	$2,88 \pm 0,33$

Примечание. Концентрация киназы — 0,4 мг/мл; дитионитробензоата — 40 мкМ.

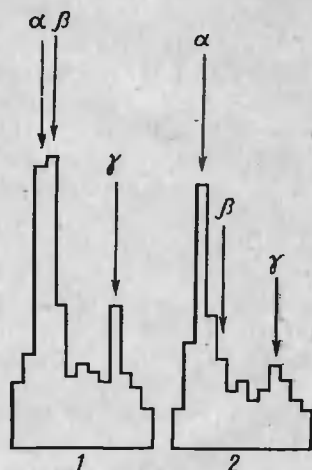


Рис. 3. Взаимодействие  $[^{14}C]$ -йодацетамидом с субъединицами киназы фосфоорилазы.

КФ (0,4 мг/мл) инкубировали с  $[^{14}C]$ -йодацетамидом при  $30^{\circ}C$  в 50 мМ  $\beta$ -глицерофосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 10%-ную сахарозу, 1 мМ ЭГТА. Радиоактивность измеряли в срезах полиакриламидного геля, полученных после электрофореза в присутствии DS-Na.

1 — в отсутствие  $Mg$ -АТФ,  
2 — в присутствии 10 мМ  $MgCl_2$  и 3 мМ АТФ

АТФ, анализировали путем электрофореза. Рис. 3 демонстрирует включение радиоактивной метки в субъединицы фермента. Как видно, в присутствии АТФ радиоактивность  $\alpha$ -субъединицы не изменялась, а включение радиоактивности в  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы заметно уменьшалось. Этот результат подтвердился при поэтапной обработке КФ йодацетамидом. На первом этапе инкубировали КФ с нерадиоактивным йодацетамидом в присутствии АТФ, а после диализа этот же препарат фермента обработали [ $^{14}\text{C}$ ]-йодацетамидом. Защищенные в присутствии АТФ SH-группы на первом этапе обработки прореагировали с [ $^{14}\text{C}$ ]-йодацетамидом на втором этапе. Радиоактивность в этом опыте была обнаружена на  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицах [130]. Взаимодействие КФ с [ $^{14}\text{C}$ ]-йодацетамидом в присутствии варьирующей концентрации АТФ или АДФ позволило подтвердить предположение о наличии двух нуклеотид-связывающих центров на  $\beta$ -субъединице и одного на  $\gamma$ -субъединице.

Таким образом, накопленные к настоящему времени результаты поддерживают гипотезу о значении  $\beta$ -субъединицы для каталитического процесса. Однако, участвует ли она непосредственно в реакции или выполняет регуляторную роль, влияя на ферментативную реакцию, путем кооперативных взаимодействий  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц, в настоящее время остается неясным.

#### Регуляция активности киназы фосфорилазы ионами $\text{Ca}^{2+}$ и кальмодулином

Одной из особенностей функционирования КФ скелетных мышц является полная зависимость ее активности от ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , обнаруженная впервые в работе Фишера и Кребса [131]. Особый интерес к исследованию этого явления появился после того, как была показана обратимость активации фермента при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [132] и когда в ряде работ подтвердилось, что КФ проявляет свою активность при физиологической концентрации металла [9, 132, 133]. Количество  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме мышечной клетки, как известно, зависит от состояния ткани. Установлено, что переход от покоящегося в возбужденное состояние сопровождается изменением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  от  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  до  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М [134]. Такое изменение концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  обусловлено механизмом сокращения мышц, связанным с выбросом  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму из саркоплазматического ретикулула, в котором локализована большая часть внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ .

Несмотря на то что многие вопросы сложных взаимодействий фермента с  $\text{Ca}^{2+}$  оставались неясными, описанные факты послужили основанием гипотезы, связавшей нервное возбуждение мышц и выделение  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму с ускорением процесса гликогенолиза [9, 47, 114].

Исследование кинетики активации КФ в зависимости от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и кинетики связывания его с ферментом показало, что между этими процессами существует корреляция. Величины

констант диссоциации и  $K_m$  довольно хорошо совпадали [9]. Однако оказалось, что различные формы КФ обладают различной чувствительностью к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ . Концентрация металла для полумаксимальной активации фосфорилированного фермента соответственно равна 1,6 и 0,6 мкМ при рН 6,8 и 8,2, а для неактивированной КФ эта величина равна 16 мкМ при рН 8,2 [19]. На основании этих данных можно было заключить, что изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , а также фосфорилирование фермента и, по-видимому, изменение концентрации ионов  $\text{H}^+$  в клетке взаимосвязаны и непосредственно влияют на регулирование активности КФ.

О связи между регуляцией активности КФ ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и мышечным сокращением свидетельствовали данные ингибирования ферментативной активности при добавлении изолированного СПР и реактивации ее при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$  [9], а также результаты, полученные на протеин-гликогеновом комплексе, содержащем все ферменты синтеза и распада гликогена и в какой-то степени имитировавшем функционирование фермента в мышечной клетке [8]. Гистохимические исследования, показавшие локализацию гликогеновых частиц вдоль тонких филаментов, указывали на возможность взаимодействия ферментов обмена гликогена с миофибриллярной фракцией [135]. Это подтверждалось также работой Поглазова и др. [136, 137], в которой наблюдали специфическую активацию КФ актином — основным структурным белком тонких мышечных волокон.

В изолированном протеин-гликогеновом комплексе не происходило превращение ФБ в ФА в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ . При микромолярной концентрации металла наблюдавшаяся активация процесса еще более возрастала при добавлении гликогена, который в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  ингибировал реакцию, несмотря на достаточное количество присутствующих  $\text{Mg}^{2+}$  и АТФ, также важных регуляторов активности КФ [8].

В пользу зависимо­го от  $\text{Ca}^{2+}$  связывания КФ со структурными компонентами клетки служили опыты, в которых происходила сорбция фермента на везикулах СПР в присутствии 10 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  и десорбция при уменьшении его концентрации в среде [138]. Образование комплекса КФ с мембранами СПР, сопровождавшееся повышением ферментативной активности, могло быть связано с действием липидной фракции мембран [60].

Полная зависимость КФ от  $\text{Ca}^{2+}$  была показана не только для фермента из скелетных мышц кролика, но и КФ из мышц других животных и КФ из сердца. Интересно отметить, что для фермента из мышц акулы активация  $\text{Ca}^{2+}$  является основным способом ее регуляции, так как она не фосфорилируется в присутствии различных протеинкиназ или путем аутофосфорилирования. Для полумаксимальной активации КФ акулы требовалось  $3 \times 10^{-7}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  [139]. Активность КФ из сердца полностью ингибировалась 0,5 мМ ЭГТА и восстанавливалась при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$ ; для неактивированной и фосфорилированной КФ сердца величины  $K_m$  для  $\text{Ca}^{2+}$

соответственно равны 1,94 и 1,35 мкМ [37]. Весьма высокая чувствительность к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  характерна для КФ кровяных пластинок, для которой определены две величины  $K_a$ : 0,25 и 2,5 мкМ [140]. Следует также отметить, что при агрегации тромбоцитов наблюдали значительную активацию гликогенолиза ионами  $\text{Ca}^{2+}$  [141]. Таким образом, исследованиями препаратов КФ, полученных из различных источников, подтверждалась активация их ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , однако характеристики этой активации зависели от физиологических особенностей ткани. В целом ряде случаев потребность в  $\text{Ca}^{2+}$  не являлась абсолютно необходимой, от 50 до 90% активности обнаруживалось при добавлении ЭГТА. Так, например, активность КФ печени зависит от  $\text{Ca}^{2+}$  не более чем на 30—40% [142—144]. В отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  активна также КФ жирового тела шелкопряда [145], летательных мышц мясной мухи [146]. Изучая активность КФ различных тканей крысы, японские авторы подразделили ее на два типа: мышечный и печеночный. К первому типу отнесли фермент, обладающий сильной зависимостью от  $\text{Ca}^{2+}$  — КФ из скелетных мышц и сердца, а ко второму — слабо зависимую от  $\text{Ca}^{2+}$  — фермент из печени, почек, селезенки и легких, КФ мозга занимала промежуточное положение [147]. При изучении активности КФ лейкоцитов человека оказалось, что требовавшаяся для неактивированной формы фермента концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  была равна  $10^{-7}$ — $5 \times 10^{-6}$  М, а активированная форма проявляла свою активность в области концентраций от  $10^{-9}$  до  $10^{-3}$  М [148].

В связи с высокой чувствительностью фермента к протеолизу, образованию разных форм КФ, активность которых в большей или меньшей степени зависит от  $\text{Ca}^{2+}$ , связано, возможно, с действием тканевых протеиназ. Но в литературе отсутствуют какие-либо сведения, подтверждающие это предположение. По данным Коэна [19], концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  для полумаксимальной активации даже при незначительной деградации КФ трипсином равна 0,05 и 0,07 мкМ соответственно при рН 8,2 и 6,8, что в 300 раз ниже, чем для неактивированной КФ. После протеолиза КФ трипсином [14] ее активность и активность выделенных из неактивированной киназы комплексов  $\gamma\delta$  и  $\alpha\gamma\delta$  на 25—30% проявлялась в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  [59, 120], а низкомолекулярный фрагмент, полученный после протеолиза КФ субтилизином, вообще не требовал для своей активности добавления металла (см. рис. 2) [34].

После того как в составе КФ был открыт термостабильный компонент, активирующий фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , и было установлено, что этот белок, сходный по своим свойствам с КМ, является четвертой  $\delta$ -субъединицей фермента [49, 149], появились новые работы, уделившие большое внимание детальному анализу  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих свойств изолированной  $\delta$ -субъединицы и в составе комплекса с КФ.

Известно, что КМ широко распространен в животных тканях и, являясь основным цитоплазматическим рецептором  $\text{Ca}^{2+}$ , уча-

ствуется в регуляции ферментов обмена гликогена и сократительных белков мышц. Связывание КМ с различными белками происходит при физиологической концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , а в отсутствие металла КМ отделяется от белков и находится в свободном состоянии. Среди известных ферментов, зависящих от КМ и от  $\text{Ca}^{2+}$ , КФ является единственным, содержащим прочносвязанный КМ ( $\delta$ -субъединицу), который не отделяется даже при обработке 8 М мочевиной при полном отсутствии  $\text{Ca}^{2+}$  [122]. Количество КМ, связанное в комплексе с субъединицами КФ, составляет около половины всего белка, имеющегося в мышцах [18, 24, 150]. В настоящее время вполне обоснованным можно считать мнение о том, что в молекуле КФ  $\delta$ -субъединица является ответственной за связывание  $\text{Ca}^{2+}$  [24, 151]. Теперь, когда стала известна функция  $\delta$ -субъединицы, можно было оценить кинетические свойства  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров, используя различные экспериментальные условия и методические приемы, как гель-фильтрацию, равновесный диализ, электрометрическое титрование, метод абсорбционной спектрофотометрии [19, 151—156]. Как и другие  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки, КМ и тропонин С,  $\delta$ -субъединица характеризовалась наличием  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров, обладающих различным сродством к металлу [9, 151—153]. Исследуя кинетику связывания  $\text{Ca}^{2+}$  с КФ в  $\beta$ -глицерофосфатном буфере (рН 6,8), Килиманн и др. [152] нашли, что в этих условиях на молекулу фермента ( $\alpha\beta\gamma\delta$ )<sub>4</sub> связывалось 12  $\text{Ca}^{2+}$  с величиной константы диссоциации ( $K_d$ ), равной  $1,5 \times 10^{-8}$  М, и 4  $\text{Ca}^{2+}$  с  $K_d = 6 \times 10^{-7}$  М. Так как КМ связывал 4  $\text{Ca}^{2+}$  на моль, то эти данные позволили считать, что центры связывания металла в молекуле КФ локализованы на  $\delta$ -субъединице. При измерении констант диссоциации оказалось, что в молекуле КМ три  $\text{Ca}^{2+}$  имели  $K_d = 2 \times 10^{-7}$  М и один  $\text{Ca}^{2+}$  —  $K_d = 1 \times 10^{-6}$  М [157, 158]. Сравнение величин констант диссоциации комплексов КФ с  $\text{Ca}^{2+}$  и КМ с  $\text{Ca}^{2+}$  показывает, что  $\delta$ -субъединица, входящая в структуру молекулы фермента, связывается с Са прочнее, чем свободный КМ.

Последующий анализ  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих свойств субъединицы, проведенный в условиях различной ионной силы и в зависимости от присутствия ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , позволил дифференцировать шесть центров связывания металлов в расчете на  $\alpha\beta\gamma\delta$ : два —  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , два центра  $\text{Ca}^{2+}$ -специфических и два центра  $\text{Mg}^{2+}$ -специфических [154]. Ранее аналогичные центры были определены в тропонине С [158]. Добавление  $\text{Mg}^{2+}$  оказывало влияние не только на  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие свойства  $\delta$ -субъединицы КФ, но и на число мест связывания металла [152—155]. Этот эффект  $\text{Mg}^{2+}$  имеющий, возможно, аллостерическую природу, был связан с хорошо выраженными конформационными изменениями белка, в результате которых открывались дополнительные центры связывания  $\text{Ca}^{2+}$  [151, 152]. Следует отметить, что  $\text{Mg}^{2+}$  оказывал более сильное влияние на сродство  $\text{Ca}^{2+}$  к  $\text{Ca}^{2+}$ -специфическим центрам холофермента, чем изолированной  $\delta$ -субъединицы [151, 154]. При совместном присутствии металлов наблюдалась конкуренция за центры с вы-

соким сродством и это сопровождалось уменьшением константы диссоциации  $\text{Ca}^{2+}$  по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$ -специфическим центрам. Взаимодействие КФ с  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии обоих металлов чрезвычайно сильно отражалось на изменении тирозиновой флуоресценции, свидетельствующей о влиянии металлов на конформационное состояние белка [154].

Таким образом, исследование  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих свойств холофермента и выделенной из него  $\delta$ -субъединицы хорошо демонстрировало значение четвертичной структуры фермента в регуляции его ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . По-видимому, на связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с  $\delta$ -субъединицей оказывает влияние не только прочносвязанная с ней  $\gamma$ -субъединица [122], но и другие,  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы, в отсутствие которых комплекс  $\gamma\delta$  лишь частично проявляет свою активность без добавления  $\text{Ca}^{2+}$  [120, 121].

В ряде работ была изучена зависимость между скоростью связывания  $\text{Ca}^{2+}$  и изменением ферментативной активности КФ. Повышение активности нефосфорилированной КФ отчетливо коррелировало в работе Бугера и др. [151] со связыванием трех молекул  $\text{Ca}^{2+}$  в расчете на  $\alpha\beta\gamma\delta$ ; одна из них имела более высокое сродство ( $K_d=0,31$  мкМ), чем две другие ( $K_d=2,15$  мкМ). Влияние четвертой молекулы  $\text{Ca}^{2+}$  авторам определить не удалось, так как в используемых ими экспериментальных условиях при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  100 мкМ фермент выпадал в осадок.

Весьма сложная зависимость между активацией фермента и связыванием металлов была выявлена в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  [155, 156]. На основе полученных данных авторы пытались дифференцировать центры связывания металлов, ответственные за специфичность фермента, используя в качестве субстратов ФБ, тропонин и собственную молекулу фермента, а также центры, ответственные за активность КФ при различных значениях рН. В зависимости от условий эксперимента (рН, ионной силы и концентрации металлов) рассматривались три типа активности:  $A_0$ ,  $A_1$  и  $A_2$ . Первый тип активности —  $A_0$ , — независимый от  $\text{Ca}^{2+}$  составлял незначительную часть общей активности и выявлялся при очень низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . При связывании  $\text{Ca}^{2+}$  в  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -центрах, характеризующихся высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ , проявлялась активность  $A_1$ . Вторая стадия активации фермента, связанная с активностью  $A_2$ , происходила, когда были заняты  $\text{Ca}^{2+}$ -специфические центры, индуцированные в присутствии высокой концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  [155].

О существенном значении  $\text{Mg}^{2+}$  для  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции активности КФ можно судить также на основании результатов определения ферментативной активности при рН 6,8 после предынкубации неактивированной КФ с металлами [159, 160]. Короткая инкубация (1,5 мин) с одним из металлов не влияла на активность, в то время как при их совместном добавлении активность при рН 6,8 возрастала в 7 раз, при этом исчезала характерная для неактивированной КФ лаг-стадия. Если активность определяли при рН 8,2 или предварительно активировали фер-

мент самофосфорилированием, то никакой активации металлами не обнаруживали. Синергизм действия  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  оказывал влияние на кинетические характеристики фермента.

Как мы уже отмечали, разные формы КФ сильно отличаются по сродству к  $\text{Ca}^{2+}$  [9, 19]. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  для полумаксимальной активации ( $C_{0,5}$ ) неактивированной КФ при рН 6,8 и 8,2 соответственно равна 23 и 16 мкМ [19]. Эти величины на порядок выше, чем найденные в более ранней работе [9]. Но при активации фермента фосфорилированием или путем ограниченного протеолиза величина  $C_{0,5}$  значительно уменьшалась. Связано ли это с повышением сродства  $\delta$ -субъединицы к металлу или с каким-то другим механизмом, пока не ясно. Можно, например, предположить, что  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие центры настолько высоко дифференцированы, что в зависимости от формы фермента присоединяется меньшее или большее число молекул  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако экспериментальных доказательств для такого предположения пока не существует.

В настоящее время еще нет достаточной ясности относительно взаимодействия КФ с ионами  $\text{Mg}^{2+}$ . Помимо того что уже было описано выше, можно отметить участие его в образовании комплекса КФ с гликогеном [47], а также участие в катализируемой киназой реакции путем образования комплекса  $\text{Mg}$ -АТФ [3]. Однако характер влияния свободного  $\text{Mg}^{2+}$  на ферментативную активность является спорным. Имеющиеся сведения довольно противоречивы. Клерх и др. [161] нашли стимулирующий эффект свободного  $\text{Mg}^{2+}$  на активность неактивированной КФ в условиях насыщающей концентрации  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ, постоянной концентрации, АТФ и варьирующей концентрации  $\text{Mg}^{2+}$ . Известны, однако, и другие данные, показавшие, что в зависимости от концентрации металла проявлялось активирующее или ингибирующее действие [162]. Более детальное выяснение роли  $\text{Mg}^{2+}$  в механизмах регуляции активности фермента, безусловно, представляет большой интерес для дальнейших исследований.

Значение  $\text{Ca}^{2+}$  состоит не только в том, что он непосредственно активирует КФ, но и влияет на некоторые белки, КМ и тропонин С, превращая их в активаторы фермента.

Активация КФ добавленным КМ была обнаружена почти одновременно в двух разных лабораториях [18, 111]. Она была обусловлена связыванием в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  второй молекулы КМ ( $\delta'$ -субъединицы) со вторым КМ-связывающим центром на молекуле фермента. Опыты, в которых совместно с КМ и  $\text{Ca}^{2+}$  добавляли антипсихотропный агент — трифлуороперазин или тропонин I, специфически связывающие КМ, демонстрировали полное отсутствие активации КФ, при этом наблюдалось сохранение зависимости ферментативной активности от  $\text{Ca}^{2+}$  [16, 18]. Существование второго центра для связывания КМ было обнаружено также при взаимодействии КФ с кальмодулин-сефарозой 4В в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Связавшийся фермент отделялся от сорбента элюирующим буфером, содержащим ЭГТА [18, 111]. Все эти данные

указывали, что  $\delta'$ -субъединица не прочно связывалась с ферментом и при удалении  $\text{Ca}^{2+}$  диссоциировала. Степень активации фермента КМ сильно варьировала от 1,5 до 8 раз, какой-либо закономерности в зависимости от определения активности при рН 6,8 или 8,2 не было обнаружено [16, 18, 111, 150]. КФ, обработанная трипсином, теряла способность активироваться КМ и связываться с кальмодулин-сефарозой 4В [111].

Вскоре было замечено, что препараты КФ, которые могли активироваться КМ в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , обладали способностью в той же степени активироваться тропонином С, частично сходным с КМ по первичной структуре, а также по  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим свойствам. Так как при совместном добавлении КМ и тропонина С не наблюдалось суммарного эффекта на активацию КФ, можно было считать, что они конкурируют за один и тот же центр на ферменте [17, 18]. Концентрация КМ для полумаксимальной активации КФ равна 9 нМ [19] или 15 нМ [16], в то время как для такой же активации фермента тропонином С или тропониновым комплексом требовалось в 100—200 раз более высокая концентрация. Тем не менее по целому ряду причин этот факт заслуживал большего внимания. Во-первых, тропонин С, требовавшийся для полумаксимальной активации КФ, добавлялся в микромольных количествах (36 мкМ/мл) [17]. Учитывая соотношение концентраций в мышцах: тропонина — 100 мкМ [163] и КФ 2,5 мкМ [24], с одной стороны, и КМ — 6 мкМ [18] — с другой, можно полагать, что такое большое количество тропонина в мышечной клетке вполне достаточно и для взаимодействия с тропонин-тропомиозиновым комплексом и для активации КФ. В то же время имеющееся количество КМ, 40% которого уже связано в комплексе с киназой ( $\delta$ -субъединица), должно использоваться также для активации других белков, например киназы легких цепей миозина [164]. Во-вторых, важным обстоятельством служит связь тропонина С — одного из компонентов тропонин-тропомиозинового комплекса — с тонкими мышечными волокнами, связанными в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  с гликогеновыми частицами, содержащими ферменты обмена гликогена [17].

Таким образом, если допустить возможность активации КФ тропонином С, а также актином — основным структурным белком тонких мышечных волокон, как было показано в работе Поглазова и др. [136, 137], то следует признать, что эти явления могут лежать в основе механизма сопряжения мышечного сокращения и гликогенолиза, в регуляции которого ключевую роль играет КФ.

В пользу этой гипотезы можно упомянуть данные о специфичности активирующего действия тропонина С, который не влияет на активность киназы легких цепей миозина и на фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов даже при концентрации в 1000 раз более высокой, чем та, которая требовалась для активации КФ [165]. Может быть, с этим же связан и тот факт, что сердечный тропонин С не активировал мышечную КФ [19].

В этой связи следует также отметить, что, по мнению Коэна,

тропонин С специфически активирует нефосфорилированную форму КФ. Несмотря на то что активность фосфорилированной формы фермента полностью зависит от  $\text{Ca}^{2+}$ , она лишь незначительно активируется тропонином. По-видимому, при гормональной активации фермента путем фосфорилирования цАМФ-зависимой протеинкиназой функцию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции выполняет  $\delta$ -субъединица, входящая в состав молекулы КФ.

Основываясь на результатах анализа скорости образования ФА при электрическом раздражении изолированной мышцы лягушки и кошки [166, 167], зависимой от частоты электрической стимуляции, позволяющей создать условия, при которых скорость образования ФА увеличивается в 100 раз, Коэн высказал предположение, что при такой ситуации активация КФ тропонином является специфической. Дело в том, что в указанных условиях сокращение мышцы происходило в отсутствие адреналина, и поэтому как в покое, так и в возбужденной мышце КФ находилась в неактивированном состоянии, т. е. была неактивной при рН 6,8 [168, 169]. Следовательно, КФ не могла обеспечить быстрое образование ФА в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , если бы она не активировалась тропонином С.



Рис. 4. Роль КФ,  $\text{Ca}^{2+}$ , кальмодулина, тропонина и актина в регуляции распада, синтеза гликогена и сокращения мышц

Взаимодействие КФ с  $\text{Ca}^{2+}$  и белковыми компонентами мышц, участвующими в процессе мышечного сокращения и в активации гликогенолиза, схематически представлено на рис. 4.

При изменении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в мышце от 0,1 до 3,0 мкМ активация КФ в присутствии тропонина С могла увеличиться, по

расчету Козна, в 180 раз [19]. Таким образом, благодаря связыванию с киназой фосфорилазы тропонин С, по-видимому, способен активировать и мышечное сокращение и гликогенолиз.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Krebs E. G., Fischer E. H. (1956) *Biochem. Biophys. Acta* 20, 150—157.
2. Krebs E. G., Beavo J. A. (1979) *Ann Rev. Biochem.* 48, 923—959.
3. Carlson G. M., Bechtel P. J., Graves D. J. (1979) *Adv. Enzymol.* 50, 41—115.
4. Nimmo G., Cohen P. (1977) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 8, 145—266.
5. Friedman D. L., Larner J. (1963) *Biochemistry* 2, 669—675.
6. Cohen P. (1980) in Recently discovered systems of enzyme regulation by reversible phosphorylation (Cohen P. ed.), 1—10, Biomedical Press, Elsevier.
7. Walsh P., Parkins J., Krebs E. G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3763—3765.
8. Heilmeyer L. M. G., Meyer F., Haschke H. et al. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 6649—6656.
9. Bromstrom C. O., Hunkeler F. L., Krebs E. G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1961—1967.
10. Mayer S. E., Stull T. (1971) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 185, 433.
11. Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 241—257.
12. Roach P. J., De Paoli-Roach A. A., Larner J. (1978) *J. Cyclic Nucleotide Res.* 4, 245—257.
13. Emby N., Rylatt D. B., Cohen P. (1979) *Eur. J. Biochem.* 100, 339—347.
14. De Paoli-Roach A. A., Roach P. J., Larner J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4212—4219.
15. Soderling T. R., Srivastava A. K., Bass M. A. et al. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 2536—2540.
16. Walsh K. J., Millikin D. M., Shlender K. K. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6611—6616.
17. Cohen P., Picton C., Klee C. B. (1979) *FEBS Lett.* 104, 25—30.
18. Shenolicar S., Cohen P. T. W., Cohen P., et al. (1979) *Eur. J. Biochem.* 100, 329—337.
19. Cohen P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 111, 563—574.
20. Hayakawa T., Perkins J. P., Walsh P., Krebs E. G. (1973) *Biochemistry* 12, 567—573.
21. Hayakawa T., Perkins J. P., Krebs E. G. (1973) *Biochemistry* 12, 574—580.
22. Jennissen H. P., Heilmeyer L. W. G. (1974) *FEBS Lett.* 42, 77—80.
23. Cohen P. (1973) *Eur. J. Biochem.* 34, 1—14.
24. Cohen P. (1978) *Current Topics in Cellular Regulation* 14, 117—196.
25. Krebs E. G., Kent A. B., Fischer E. H. (1958) *J. Biol. Chem.* 231, 73—83.
26. Krebs E., Fischer E. H. in *Methods in Enzymology* 5, 373—376.
27. Fischer E. H., Pocker A., Saari J. C. (1970) *Essays of Biochem.* 6, 23—68.
28. Hurd S. S., Teller D., Fischer E. (1966) *Biochem. Biophys. Res Commun* 24, 79—84.
29. Shizuta Y., Khandelwal R. L., Maller Y. L. et al. (1977) 252, 3408—3413.
30. Wang J., Shonka M., Graves D. J. (1965) *Biochemistry* 4, 2296—2301.
31. Вульфсон П. Л., Козлова Н. Б. (1970) *Биохимия* 35, 595—600.
32. Krebs E. G., Graves D. J., Fischer E. H. (1959) *J. Biochem.* 234, 2867—2873.
33. Walsh D. A., Perkins J. P., Bromstrom C. O. et al. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1968—1976.

34. Шур С. А., Пегова А. Н., Сколышева Л. К., Вульфсон П. Л. (1982) *Биохимия* 47, 266—271.
35. Krebs E. G., Love D., Bratvold G. et al. (1964) *Biochemistry* 3, 1022—1033.
36. Sul H. S., Cooper R. H., McCullough T. E. et al. (1981) *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Protein Phosphorylation*, v. 8, 343—355.
37. Cooper R. H., Sul H. S., McCullough T. E. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11794—11801.
38. Killilea S. D., Ky N. M. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 221, 333—342.
39. Sakai K., Matsumura S., Okimura Y. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6631—6637.
40. Vandenheede J. R., Wulf H., Merlevrde W. (1979) *Eur. J. Biochem.* 101, 51—58.
41. Livanova N. B., Andreeva I. E., Eronina T. B. et al. (1981) *Adv. in Enzyme Regulation* (Weber G. ed.) v. 20, 68—73.
42. Chrisman T. D., Yordan Y. E., Exton J. H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10798—10804.
43. Jennissen H., Heilmeyer L. (1975) *Biochemistry* 14, 754—759.
44. Jennissen H., Hörl W. H., Heilmeyer L. W. G. (1973) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 236—237.
45. Cohen P. T., Burchell A., Cohen P. (1976) *Eur. J. Biochem.* 66, 347—356.
46. Sharma R. K., Tam S. W., Weisman D. M., Wang J. H. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 11102—11105.
47. De Lange R., Kemp R. G., Riley W. D. et al. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2200—2208.
48. Шур С. А., Пегова А. Н., Сколышева Л. К., Вульфсон П. Л. (1981) *Биохимия* 46, 214—221.
49. Cohen P., Burchell A., Foulkes J. G. et al. (1978) *FEBS Lett.* 92, 287—293.
50. Grand R. J. A., Shenolikar S., Cohen P. (1981) *Eur. J. Biochem.* 113, 359—367.
51. Kakuichi S., Yamazaki R., Nakajima H. (1970) *Proc. Jpn. Acad.* 46, 589—592.
52. Cheung W. Y. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 38, 64—68.
53. Cheung W. Y. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2859—2869.
54. Fischer E., Becker J., Blum H. et al. (1975) in *Metabolic Interconversion of Enzymes* (Shaltiel S. ed.), 1—23, N. Y.
55. Jennissen H. P., Heilmeyer L. M. G. (1974) *FEBS Lett.* 42, 77—80.
56. Jennissen H., Hörl W., Gröschel-Stewart U., Velick S. et al. (1976) in *Metabolic interconversions of Enzymes*. N. P. 24—35.
57. Van de Werve G., Hue L., Hers H. (1977) *Biochem. J.* 162, 135—142.
58. Skuster J. R., Chan K.-F., Graves D. J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2203—2210.
59. Chan K.-F., Graves D. J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5939—5947.
60. Sigh T., Wang J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8466—8472.
61. Gergely P., Vereb Gy., Bot Gy. (1975) *Arch. Biophys. Biochem. Acad. Sci. Hung.* 10, 153—159.
62. Гуляева Н. В., Гуськова Р. А., Баранова Л. А. и др. (1977) *Докл. АН СССР* 235, 696—698.
63. Гуляева Н. В., Вульфсон П. Л., Северин Е. С. (1977) *Биохимия* 43, 373—381.
64. Fischer E., Graves D., Crittenden E. et al. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1698—1704.
65. Nolan C., Novoa W., Krebs E. et al. (1964) *Biochemistry* 3, 542—551.
66. Hughes R., Yunits A., Krebs E. G. et al. (1967) *J. Biol. Chem.* 237, 40—43.
67. Sevilla C. L., Fischer E. H. (1969) *Biochemistry* 8, 2161—2171.

68. Лисовская Н. П., Ливанова Н. В. (1975) в кн. Аллостерические ферменты. М., 110—163.
69. Leich C., Fischer E. H. (1975) *Biochemistry* 14, 2009.
70. Tessmer G., Skuster J. R., Tabatabai L. B. et al. (1977) 252, 5666—5671.
71. Tabatabai L. B., Graves D. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2196—2202.
72. Viriya J., Graves D. J. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 17—24.
73. Srivastawa A. K., Waisman D. M., Brostrom C. O. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 583—586.
74. Eugland P. J., Stull J. T., Huang T. S. et al. (1974) in *Metabolic Interconversion of Enzymes* (Fischer E., Krebs E. eds.), N. Y., 175—184.
75. Krebs E. G., Preiss J. (1975) *Biochemistry* 5, 337—389.
76. Rylatt D. B., Cohen P. (1979) *FEBS Lett.* 98, 71—75.
77. Titani K., Koide A., Hermann J. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4762—4766.
78. Soderling T. R., Shoorain V. A., Ericsson L. H. (1979) *FEBS Lett.* 106, 181—184.
79. Rylatt D., Aitken A., Bilham T. et al. (1980) *J. Biochem.* 107, 529—537.
80. Srivastawa A. K., Khatra B. S., Soderling T. R. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 291—296.
81. De Paoli-Roach A. A., Bingham E. W., Roach P. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 212, 229—236.
82. Dickneite G., Jennissen H. P., Heilmeyer L. M. G. (1978) *FEBS Lett.* 87, 297—302.
83. Krebs E., Graves D., Fischer E. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 2867—2873.
84. Jeaman S., Cohen P. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 93—104.
85. Frockhart D. A., Corbin J. D. (1982) *Critical Rev. in Biochem.* 12, 133—158.
86. Hammermeister K. E., Yunis A. A., Krebs E. G. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 986—991.
87. Namm D. H., Mayer S. E., Maltbie M. (1968) *Molec. Pharmacol.* 4, 522—530.
88. Stull J., Mayer S. E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5716—5723.
89. Dobson J. G., Mayer S. E. (1973) *Circulation Res.* 33, 412—420.
90. McCullough T., Walsh D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7345—7352.
91. Diamond J., Brody T. M. (1966) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 152, 202—211.
92. Brody T. M., Diamond J. (1967) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 139, 772—780.
93. Cohen P. (1980) *FEBS Lett.* 119, 301—306.
94. Nishizuka Y., Takai Y., Hashimoto E., et al. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 209—220.
95. Takai Y., Kishimoto A., Iwasa J. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4052—4057.
96. Sul H. S., Cooper R. H., Whitehouse S. et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3484—3490.
97. Singh T., Akatsuka A., Huang K-P. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13379—13384.
98. Yeaman S. J., Cohen P., Watson D. et al. (1977) *Biochem. J.* 162, 411—421.
99. Meyer F., Heilmeyer L. M. G., Haschke R. H. et al. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 6642—6648.
100. Fischer E. H., Heilmeyer L. M. G., Haschke R. H. (1971) *Curr. Top. in Cell. Regulation* 3, 211—251.
101. Cohen P., Watson D. C., Dixon G. H. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 79—92.
102. Yeman S. J., Cohen P. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 93—104.
103. Cohen P., Antoniw J. F. (1973) *FEBS Lett.* 34, 43—47.

104. Stewart A. A., Hemmings B. A., Cohen P. et al. (1981) *Eur. J. Biochem.* 115, 197—205.
105. Ganapathi M. K., Silberman S. R., Paris H., Lee E. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3213—3217.
106. Sul H. S., Walsh D. A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10324—10328.
107. Brautigan D. L., Khatra B. S., Soderling T. R. et al. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 219, 228—235.
108. Wang J., Stull J., Huang T. S., Krebs E. G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4521—4527.
109. Kim G., Graves D. (1973) *Biochemistry* 12, 2090—2095.
110. Carlson G. N., Graves D. J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 7480—7486.
111. De Paoli-Roach A. A., Gibbs J., Roach P. (1979) *FEBS Lett.* 105, 321—324.
112. Вульфсон П. Л., Шур С. А., Ткачук В. А. и др. (1979) *Всероссийский симпозиум: Макромолекулы клетки. М., (1979), 54.*
113. Severin S. E., Shur S. A., Pegova A. N., Vulfson P. L. (1981) *Biochem. International* 3, 125—130.
114. Meyer W., Fischer E. H., Krebs E. G. (1964) *Biochemistry* 3, 1033—1039.
115. Huston R. B., Krebs E. G. (1968) *Biochemistry* 7, 2116—2122.
116. Bird J. W., Carter J. H., Triemer R. E. et al. (1980) *Fed. Proc.* 39, 20—25.
117. Drummond G. J., Duncan J. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5532—5536.
118. Fischer E., Blum H., Byers B. et al. (1976) *Tenth International Congress Biochem. Hamburg*, 146.
119. Fischer E., Alaba J., Brautigan D. et al. (1978) *Versatility of Proteins. Proc. of the Symp. on Proteins (Li C. J. ed.)*. N. Y., 133—149.
120. Chan K-F., Graves D. J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5948—5955.
121. Chan K-F., Graves D. J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5956—5961.
122. Picton C., Klee C. B., Cohen P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 111, 555—561.
123. Lambooy P. K., Steiner K. F. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 551—556.
124. Cohen P. (1974) *Biochem. Soc. Symp.* 39, 51—73.
125. King M. M., Carlson G. M. (1981) *Biochemistry* 20, 4382—4387.
126. King M. M., Carlson G. M. (1982) *FEBS Lett.* 140, 131—141.
127. King M. M., Carlson G. M. (1981) *Biochemistry* 20, 4387—4393.
128. King M. M., Carlson G. M., Haley B. E. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14058—14065.
129. Шур С. А., Сколышева Л. К., Вульфсон П. Л. (1983) *Биохимия* 48, 1831—1837.
130. Shur S. A., Vulfson P. L., Severin S. E. (1983) *Biochem. International* 7, 197—206.
131. Fischer E. H., Krebs E. G. (1955) *J. Biol. Chem.* 216, 121—132.
132. Ozawa E., Hosoi K., Ebashi S. (1967) *J. Biochem.* 61, 531—533.
133. Krebs E. G., Huston R., Hunkeler F. (1968) *Adv. Enzyme Regulation* 6, 245—255.
134. Martonosi A. N. (1980) *Fed. Proc.* 39, 2401—2402.
135. Sigel P., Pette D. (1969) *J. Histochem. Citochem.* 17, 225—237.
136. Поглазов Б. Ф., Ливанова Н. В., Островская М. В. (1982) *ДАН СССР* 263, 221—224.
137. Livanova N. B., Poglasyov B. F. (1981) *Adv. Enzyme Regulation* 20, 323—336.
138. Jennissen H. P., Lahr P. (1980) *FEBS Lett.* 121, 143—148.
139. Pociwong S., Blum H., Malencik D. et al. (1981) *Biochemistry* 20, 7219—7226.
140. Gergely P., Castle A. G., Cannford N. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 612, 50—55.
141. Gear A. R. L., Schneider W. (1975) *Biochem. Biophys. Acta* 392, 111—120.
142. Khoo J. C., Steinberg D. L. (1975) *FEBS Lett.* 57, 68—72.

143. Sacai K., Matsumura S., Okimura Y. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6631—6637.
144. Chrisman T., Jordan J., Exton J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10798—10804.
145. Ashida M., Wyatt G. R. (1979) *Insect Biochem.* 9, 403—409.
146. Sacktor B., Lescure O., Reed D. (1974) *Biochem. J.* 137, 535—542.
147. Taira T., Sakai K., Tabucki H. et al. (1982) *J. Biochem.* 91, 883—888.
148. Sørensen N. B. (1979) *Biochem. Biophys. Acta* 568, 215—223.
149. Burger D., Malencik D., Pocinwong S. et al. (1979) *Experientia* 35, 932—933.
150. Daegelen-Proux D., Alexandre J., Dreyfus J. (1981) *Biochem. Biophys. Acta* 657, 84—93.
151. Burger D., Cox J., Fischer E. H. et al. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 632—638.
152. Killimann M., Heilmeyer L. M. G. (1977) *Eur. J. Biochem.* 73, 191—197.
153. Heilmeyer L. M., G., Groeschel-Steward U., Jahnke U. et al. (1980) *Adv. Enzyme Regulation* 18, 121—144.
154. Kohse K. P., Heilmeyer L. M. G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 507—513.
155. Killimann M., Heilmeyer L. M. G. (1982) *Biochemistry* 21, 1727—1734.
156. Killimann M., Heilmeyer L. M. G. (1982) *Biochemistry* 21, 1735—1739.
157. Wolf D. J., Poirier P. G., Bromstrom C. O. et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4108—4117.
158. Potter J. D., Gergely J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4628—4633.
159. King M., Carlson G. M. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 29, 517—523.
160. King M., Carlson G. M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11058—11064.
161. Clerch L. B., Huijing F. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 268, 654—662.
162. Singh T. J., Acatsuka A., Huang K-P. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 360—368.
163. Perry S. V. (1974) *Biochem. Soc. Symp.* 39, 115—132.
164. Vagi K., Jakawa M., Kakiuchi S. et al. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1338—1340.
165. Dedman J. R., Potter J. D., Means A. R. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2437—2440.
166. Danforth W., Heilmreich E. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3133—3138.
167. Danforth W., Lyon J. B. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 4047—4050.
168. Posner J. B., Krebs E. G. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 982—985.
169. Drummond G. I., Harwood J. P., Powell C. A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4235—4240.

## АКТИВНЫ ЛИ СУБЪЕДИНИЦЫ НАД-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ!

В. И. Муронец

(Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ)

НАД-зависимые дегидрогеназы представляют собой довольно обширный класс ферментов, важной особенностью строения которых является наличие четвертичной структуры. Нативная молекула НАД-зависимых дегидрогеназ состоит из нескольких (от двух до восьми) идентичных субъединиц, причем каждая из них формирует свой собственный активный центр. При исследовании таких ферментов возникает естественный вопрос — зачем же нужна олигомерная структура, если активный центр образуется без ее участия? Одна из функций четвертичной структуры — стабилизация белковой глобулы за счет образования общего гидрофобного ядра — была известна достаточно давно и не вызывала сомнений (например [1]). В отношении же роли ассоциации субъединиц в катализе и регуляции ферментативной активности долгое время сохранялись весьма неопределенные представления. С одной стороны, в каждой субъединице олигомера дегидрогеназ были все предпосылки для осуществления каталитического акта, а с другой — при проведении опытов в растворе накапливалось все большее количество данных об отсутствии активности у мономерных форм и о необходимости их ассоциации для появления активной молекулы фермента [2, 3]. Эти данные, а также факт существования кооперативных взаимодействий между субъединицами (что характерно для большинства дегидрогеназ) позволили ряду исследователей предложить следующую концепцию: катализ возможен только при объединении нескольких субъединиц, поскольку для полного протекания реакции в активном центре одной субъединицы необходимы определенные изменения в сопряженном с ним активном центре другой субъединицы. Например, в случае глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.12) фосфоролиз ацилфермента с образованием продукта реакции (а возможно, и отщепление НАДН) в активном центре одной субъединицы происходит только при связывании субстрата в соседней субъединице [4]. Сущность описанного механизма (получившего название «флип-флоп») заключается как бы во взаимопомощи двух активных центров, способствующей протеканию ферментативной реакции.

Не отрицая важности такого механизма реакции в условиях, близких к естественным (ненасыщающие концентрации кофакто-

ров и субстратов), мы полагали, однако, что взаимодействия субъединиц в катализе должны иметь минимальное значение при определении активности олигомерных ферментов в обычных экспериментальных условиях — при избытке кофакторов и субстратов, кратковременном измерении активности (до начала ингибирования реакции ее продуктами). В этом случае активностью могли обладать не только олигомерные, но и мономерные формы дегидрогеназ. Причиной же инактивации ферментов-олигомеров при их диссоциации в растворе мог быть не распад на субъединицы, а быстрая денатурация мономеров, обусловленная их нестабильностью в отсутствие контактов с соседними полипептидными цепями. К сожалению, многочисленные эксперименты по денатурации и реактивации различных НАД-зависимых дегидрогеназ, проведенные в растворе, не давали однозначного ответа на вопрос о персепричине потери мономерами ферментативной активности [2, 3, 5]. Факты инактивации мономеров при диссоциации исходных форм дегидрогеназ не вызывают сомнений, но установить на основании только кинетических данных, чем вызвана инактивация — собственно распадом на субъединицы или конформационными изменениями последних — на наш взгляд, практически невозможно.

Для исследования вопроса о каталитической активности мономерных форм НАД-зависимых дегидрогеназ мы прибегли к методу иммобилизации олигомеров этих ферментов на нерастворимом носителе — в нашем случае сефарозе 4В. Иммобилизация должна была бы предотвратить реассоциацию мономеров дегидрогеназ, а также, по нашим предположениям, оказать на мономеры стабилизирующее действие и, следовательно, помешать их инактивации. До начала нашей работы в литературе имелись противоречивые сведения о свойствах иммобилизованных мономеров одной из НАД-зависимых дегидрогеназ — лактатдегидрогеназы. В одной работе были получены иммобилизованные ковалентно на пористом стекле мономеры лактатдегидрогеназы, обладающие довольно низкой удельной активностью [6, 7], а в другой — полностью неактивные мономеры [8]. Мы изучали каталитические свойства иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из двух различных источников, а также мономеров лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27).

### **Особенности иммобилизации олигомерных ферментов, используемых для получения связанных с матрицей субъединиц**

Препараты иммобилизованных ферментов-олигомеров, которые используются для получения ковалентно связанных с матрицей мономерных форм, должны удовлетворять некоторым требованиям. Во-первых, олигомерная молекула белка должна быть связана с носителем только через одну из субъединиц, так как в противном случае невозможно будет получить иммобилизованные моно-

мерные формы. Во-вторых, необходимо иметь точную информацию о том, из скольких субъединиц состоит иммобилизованный олигомер. Без таких сведений трудно интерпретировать данные по диссоциации: например, снижение содержания белка на матрице в 2 раза может быть следствием диссоциации тетрамера на димеры или димера на мономеры.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, как зависит характер присоединения тетрамерной молекулы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы к сефарозе 4В от количества добавленного для активации носителя бромциана. Для определения числа субъединиц фермента, вовлеченных в ковалентное связывание с носителем, мы использовали жесткую обработку препаратов дегидрогеназы 8М мочевиной в течение 3—16 ч [9]. Из данных таблицы видно, что с увеличением степени активации возрастает число субъединиц, ковалентно связанных с матрицей, и одновременно снижается удельная активность фермента. При концентрациях

Таблица 1

Зависимость количества связанного с сефарозой фермента и его активности от степени активации носителя бромцианом

Дегидрогеназа	Количество ВгCN, добавленного на 1 мл геля, мг	Количество белка на сефарозе, мкг/мл геля	Активность дегидрогеназы, ед/мг белка	Количество белка на сефарозе после обработки 8 М мочевиной, мкг/мл геля
Из скелетных мышц крысы	4	60	54	14
	10	90	45	30
	20	160	30	65
	50	340	16	240
	100	430	14	320
	200	430	14	320
Из дрожжей	5	130	57	32
	30	320	26	—
	100	470	15	—
	150	500	15	—

ВгCN ниже 10 мг/мл уплотненного центрифугированием геля сефарозы фермент связывается только через одну из субъединиц. В опытах с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из разных источников и с лактатдегидрогеназой мы использовали степень активации носителя, соответствующую добавлению 5 мг ВгCN на 1 г влажного геля сефарозы или 3 мг на 1 мл уплотненного геля. Ни в одном из многочисленных экспериментов не наблюдалось связывания ферментов более чем через одну из субъединиц. Следует отметить, что количество связывающихся с носителем субъединиц зависит не только от количества добавленного для активации ВгCN, но и от присутствия в среде для иммобилизации различных компонентов буфера. Так, при введении

2-меркаптоэтанола в концентрации 4 мМ иммобилизация глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц осуществляется только через одну субъединицу даже при добавлении 20 мг ВгCN на 1 мл уплотненного геля сефарозы [9, 10].

Описанные выше опыты свидетельствуют также, что иммобилизации на матрице в указанных условиях подвергается именно тетрамерная форма фермента, поскольку при низких степенях активации носителя содержание белка на матрице после обработ-

ки мочевиной снижается в 4 раза. Из опытов с растворимыми глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназами известно, что степень олигомерности этого фермента никогда не превышает четырех, а диссоциация на димеры тетрамера дегидрогеназы начинается при концентрациях ниже 0,200 мг белка в 1 мл или в специфических условиях, вызывающих такую диссоциацию.

Более сложная ситуация наблюдалась нами с лататдегидрогеназой из скелетных мышц свиньи при ее иммобилизации на активированной ВгCN сефарозе [11]. При иммобилизации лактатдегидрогеназы на сефарозе Чан с соавт. обнаружили, что с матрицей связывается димерная форма фермента [8]. Аналогичные результаты были получены в нашей работе при иммобилизации препаратов лактатдегидрогеназы, хранившихся в течение года [11]. Непосредственно после иммобилизации с матрицей связывается тетрамерная форма фермента, но 16-часовая инкубация препарата при 4°С приводит к его диссоциации на димеры. Диссоциация «свежего» препарата лактатдегидрогеназы, иммобилизованного на сефарозе, происходит в незначительной степени [11]. В принципе оба препарата (иммобилизованные димеры и иммобилизованные тетрамеры) могут быть использованы для получения связанных с матрицей мономеров, но обязательным предварительным условием эксперимента является проведение опытов, позволяющих однозначно судить об исходной степени олигомерности иммобилизованных форм.

#### **Получение иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ**

Для получения связанных с матрицей мономерных форм ферментов используют, как правило, прием, предложенный Чаном в 1970 г. [12]. Метод заключается в обработке олигомерных белков, ковалентно иммобилизованных через одну из субъединиц, в жестких условиях, приводящих к полной денатурации всех субъединиц и разворачиванию всех полипептидных цепей. Несвязанные с матрицей ковалентной связью полипептидные цепи переходят в раствор, а последующее удаление денатурирующего агента должно приводить к постепенной ренатурации иммобилизованной субъединицы. Основным недостатком метода является наличие стадий денатурации и ренатурации иммобилизованного мономера, поскольку последний процесс никогда не протекает со 100%-ной эффективностью. С помощью описанного подхода авторам, предложившим его, удалось получить активные мономеры альдолазы и трансальдолазы, однако удельная активность изолированных мономеров была значительно ниже, чем исходных олигомерных форм [13, 14]. В большинстве же случаев активность выделенных таким способом мономеров ферментов полностью отсутствовала или была крайне низкой. Следует также отметить, что выделение мономерных форм с низкой удельной активностью практически не позволяет прийти ни к какому конкретному выводу о роли

четвертичной структуры в осуществлении катализа. Дело в том, что низкая удельная активность мономерных форм может объясняться по крайней мере тремя разными причинами. Во-первых, распад олигомера на субъединицы может приводить к уменьшению активности последних за счет разрыва межсубъединичных контактов, необходимых для эффективного протекания ферментативной реакции (и только эта ситуация могла бы представлять интерес с точки зрения понимания смысла олигомерного строения ферментов). Во-вторых, при получении иммобилизованных мономеров никогда нельзя полностью исключить возможность присутствия в препарате некоторого количества олигомерных форм, а также взаимодействия части иммобилизованных субъединиц друг с другом непосредственно на матрице. По этим причинам препарат иммобилизованных субъединиц, на самом деле полностью неактивных, может иметь незначительную способность к катализу. Третьей и, на наш взгляд, наиболее частой причиной снижения удельной активности мономерных форм может быть неполное восстановление их ферментативной активности в процессе ренатурации субъединиц.

Нами были проведены эксперименты по получению мономеров иммобилизованной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей по методу Чана. Оказалось, что в условиях, приводящих к полной денатурации субъединиц, полученные мономеры не обладали каталитической активностью. Добавление к используемому для денатурации раствору 8 М мочевины кофактора, дитиотрейтола или 2-меркаптоэтанола, оказывающих на фермент стабилизирующее действие, а также введение этих соединений на стадии ренатурации не приводит к получению активных мономеров [15, 16].

Кроме метода Чана существовал еще один подход, позволивший многим исследователям получить активные иммобилизованные формы с меньшей степенью олигомерности, чем исходный нативный фермент. Метод заключается в использовании специфических условий диссоциации, как правило, известных из опытов в растворе и достаточно мягких. В большинстве экспериментов в таких специфических условиях происходит распад иммобилизованного олигомера на активные субъединицы или на активные агрегаты субъединиц (например, димеры в случае глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы). Однако такой подход не всегда позволяет получить иммобилизованные мономерные формы. Так, для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы доказаны очень высокая прочность связи между мономерами, которые образуют так называемый «функциональный димер», и отсутствие в неденатурирующих условиях процесса распада фермента на отдельные субъединицы [17, 18]. По этой причине для дегидрогеназы не удается подобрать условия, специфически вызывающие диссоциацию фермента на активные субъединицы.

В наших работах был предложен новый методический прием, позволяющий получать активные субъединицы олигомерных фер-

ментов в денатурирующих условиях (например, при высоких концентрациях мочевины). Предложенный метод иллюстрирует рис. 1. Сущность метода заключается в подборе таких условий денатурации, в которых происходят инактивация и переход в растворимое состояние всех субъединиц, кроме связанных с матрицей ковалентно. Важно отметить, что последние не подвергаются де-

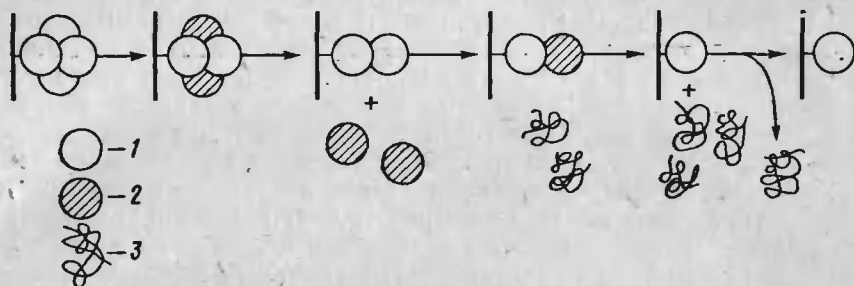


Рис. 1. Схема получения препаратов иммобилизованных мономеров в условиях, вызывающих денатурацию всех субъединиц фермента, за исключением субъединицы, связанной с матрицей ковалентно.

1 — каталитически активная конформация субъединицы, 2 — неактивная конформация, 3 — полностью денатурированные субъединицы

натурации и полностью сохраняют свою активность на всех стадиях обработки. Основной предпосылкой при разработке метода служили наблюдения о стабилизирующем действии иммобилизации на ковалентно связанные с матрицей субъединицы. Результаты опытов по инактивации иммобилизованных на сефарозе через одну субъединицу тетрамеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей приведены на рис. 2.

Из приведенных данных следует, что в начальный период инкубации в 8 М мочеvine происходит быстрая 50%-ная инактивация, а затем этот процесс замедляется. После снижения активности до 25% от исходной инактивация прекращается и в течение 2 ч активность препарата остается неизменной. Определение содержания белка в препарате на разных стадиях инкубации показывает, что 50%-ное снижение активности сопровождается двукратным снижением количества белка, т. е. с наибольшей скоростью инактивируется несвязанный непосредственно с носителем

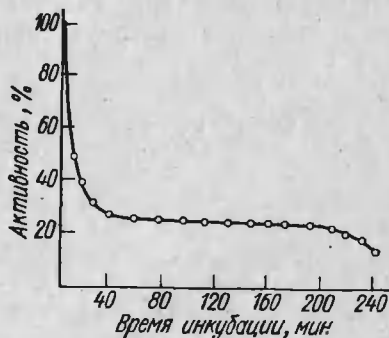


Рис. 2. Зависимость активности и содержания белка в иммобилизованных тетрамерах глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей. Фермент инкубировали в 8 М мочеvine, приготовленной на 0,1 М фосфате натрия (pH 7,6, 5 мМ ЭДТА и 2 мМ дитиотреитол), при температуре 28°C

димер дегидрогеназы. Более медленно инактивируется субъединица, ассоциированная с ковалентно иммобилизованным на носителе мономером (снижение активности до 25% от исходной), причем в течение 60—80 мин инкубации эта субъединица остается в связанном с носителем состоянии, так как содержание белка на носителе не изменяется. Через 140—180 мин инкубации полностью сохраняет свою активность ковалентно связанный с матрицей мономер дегидрогеназы. Следует отметить, что выделенный иммобилизованный мономер, вновь подвергнутый обработке мочевиной, довольно быстро (за 10 мин) полностью теряет свою активность. Вероятно, сохранение активности мономера в течение 3 ч инкубации обусловлено тем, что в составе тетрамера и димера связанные с ним уже неактивные субъединицы защищают мономер от денатурации. Снижение содержания белка на носителе до 75% от исходного происходит только через 140—180 мин инкубации, т. е. в период сохранения 25%-ной активности от исходной происходит постепенное удаление неактивной субъединицы из состава димера. Если через 140—160 мин инкубации в мочеvine отмыть препарат дегидрогеназы от денатурированного белка, то можно получить мономеры, связанные ковалентно с матрицей и полностью сохранившие свою активность.

Предложенный подход был апробирован нами при получении мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика. Дегидрогеназа из этого источника значительно менее устойчива к действию денатурирующих агентов, чем фермент из дрожжей, поэтому для получения мономеров мы использовали инкубацию при более низкой концентрации мочевины (4,0 М).

При инкубации препарата иммобилизованного фермента наблюдалась ситуация, аналогичная описанной выше для фермента из дрожжей. Подбор условий для получения мономеров заклю-

Таблица 2

Реактивация иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с денатурированными субъединицами из раствора

Тип препарата дегидрогеназы	Содержание белка		Удельная активность, %
	мкг/мл	%	
1. Иммобилизованные тетрамеры дегидрогеназы из дрожжей . . . . .	230±5	100	100
2. Иммобилизованные мономеры . . . . .	62±2	27	26
3. Реконструированные тетрамеры (после реассоциации с денатурированными субъединицами) . . . . .	202±4	88	84
1. Иммобилизованные тетрамеры из мышц кролика . . . . .	127±4	100	100
2. Иммобилизованные мономеры . . . . .	35±2	27	26,5
3. Реконструированные тетрамеры . . . . .	109±4	86	67

чается лишь в варьировании концентраций мочевины и в выборе такой концентрации, при которой наблюдается плато после снижения активности на 75% от исходной. В начале этого плато в препарате содержится димер, состоящий из одной активной и связанной ковалентно с матрицей субъединицы и ассоциированной с ней неактивной субъединицы, а в конце плато — только активная иммобилизованная субъединица. Для того чтобы инактивированная субъединица успела перейти в раствор, продолжительность плато должна быть не менее 30 мин.

Препараты иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из обоих источников были способны к реассоциации с субъединицами гомологичных ферментов из раствора (табл. 2). Для реассоциации использовали предварительно денатурированные в мочеvine субъединицы дегидрогеназ, которые трижды в 8-кратном избытке добавляли к препаратам мономеров.

Увеличение содержания связанного с носителем белка свидетельствует об образовании в ходе реассоциации тетрамерных форм, однако в случае фермента из мышц не удалось добиться полного восстановления их активности.

Удельная активность иммобилизованных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей и скелетных мышц кролика практически не отличается от активности иммобилизованных тетрамеров этих ферментов.

### **Получение иммобилизованных мономеров лактатдегидрогеназы**

Показанная выше возможность выделения активных мономеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ свидетельствовала, что для осуществления каталитического акта этим ферментом четвертичная структура не является обязательной. В то же время в литературе существовали данные, что для лактатдегидрогеназы, у которой в значительно меньшей степени выражены кооперативные взаимодействия между субъединицами, объединение по крайней мере двух субъединиц необходимо для протекания ферментативной реакции [8] или для ее значительного ускорения [6, 7].

Для выяснения причин имеющихся противоречий нами было проведено выделение мономеров лактатдегидрогеназы по разработанному для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы методу и сравнение свойств полученных мономеров со свойствами тетрамеров [11]. Оптимальными условиями для получения мономеров лактатдегидрогеназы является инкубация исходного препарата тетрамера в присутствии 4,6 М мочевины в течение 120—150 мин; 75%-ная инактивация фермента происходит через 70—100 минут инкубации, затем активность препарата остается неизменной в течение 50 мин, а содержание белка снижается до значений, характерных для мономерной формы. Таким образом, так же как для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, в ходе инактивации наблюдается плато, причем отобранные в конце этого плато пре-

параты содержат иммобилизованные мономеры. Время, необходимое для достижения плато, зависит от характеристик исходного препарата иммобилизованных тетрамеров: чем дольше до начала эксперимента хранились растворимый препарат дегидрогеназы или иммобилизованные тетрамеры, тем быстрее протекал процесс инактивации. Однако во всех случаях наблюдалось плато на кривой инактивации. Полученные иммобилизованные мономеры обладали способностью к реассоциации с субъединицами из раствора и удельной активностью, практически не отличающейся от активности иммобилизованных тетрамеров. Таким образом, для появления каталитической активности нет необходимости в объединении субъединиц в олигомер. Причиной низкой или нулевой активности мономеров лактатдегидрогеназы в других работах, по нашему мнению, может быть неспособность денатурированных субъединиц к восстановлению третичной структуры после удаления мочевины или крайняя медленность этого процесса. Возможно, восстановление структуры начинается только после добавления извне растворимых субъединиц, т. е. в ходе реассоциации. Вероятно, для полноценного сворачивания полипептидных цепей необходимо их взаимодействие. При получении мономеров по предложенной нами методике третичная структура связанных с матрицей мономеров не изменяется и, следовательно, стадия ренатурации может быть исключена.

В таблице 3 суммированы имеющиеся к настоящему времени сведения о каталитической активности мономерных форм дегидрогеназ. Из таблицы следует, что в большинстве случаев мономерные иммобилизованные формы дегидрогеназ обладают способно-

Таблица 3.

Каталитическая активность мономерных иммобилизованных форм  
НАД-зависимых дегидрогеназ

Фермент	Исходная степень олигомерности	Активность иммобилизованного мономера, %	Способ получения мономера	Активность после реассоциации, %	Ссылка
Лактатдегидрогеназа	тетрамер	14—23	контролируемая денатурация	62—75	[11]
Глицеральдегиддегидрогеназа из дрожжей	тетрамер	20—25	то же	84—88	[15, 16]
Глицеральдегиддегидрогеназа из мышц кролика	тетрамер	22—27	то же	65—70	
Малатдегидрогеназа	димер	77	диссоциация при pH 5,0	94	[19]
Алкогольдегидрогеназа	димер	2—8	полная денатурация	43	[20]
Лактатдегидрогеназа	тетрамер	10—16?	полная денатурация	108—114	[6, 7]
То же	димер	отсутствует	то же	58	[8]

стью к катализу в отсутствие межсубъединичных контактов. Причины возможной инактивации мономеров лактатдегидрогеназы в работах [6—8] были разобраны нами выше. Получение практически неактивных мономеров алкогольдегидрогеназы, вероятно, также обусловлено их денатурацией при обработке в жестких условиях, причем восстановления активности не наблюдается даже после реассоциации с субъединицами из раствора. Возможно, что применение иных условий обработки позволит и в этом случае получить полностью активные субъединицы.

### **Функциональное значение объединения субъединиц НАД-зависимых дегидрогеназ**

В настоящее время существует довольно ограниченная информация в отношении вынесенной в заголовок этого раздела проблемы. Наиболее очевидной и довольно давно доказанной функцией такого объединения является стабилизация субъединиц в составе олигомера. Поскольку в литературе долгое время главенствовали представления об отсутствии каталитической активности у мономерных форм дегидрогеназ, считалось очевидным также первостепенное значение объединения субъединиц для осуществления катализа и регуляции активности НАД-зависимых дегидрогеназ.

В наших работах с иммобилизованными димерными формами глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ из различных источников было установлено, что для проявления большинства кооперативных взаимодействий между субъединицами достаточно объединения двух субъединиц [21, 22]. Таким образом, осуществление катализа и регуляции возможно уже на уровне димерной формы. Мы обнаружили также, что иммобилизованные даже через одну субъединицу димеры обладают значительно большей стабильностью, чем димеры в растворе. Можно предположить, что *in vivo* такая стабилизация димеров, находящихся в равновесии с тетрамерами, осуществляется за счет их взаимодействия с функционально связанными ферментами или структурными белками, т. е. функционирующей формой фермента в клетке может являться не тетрамер, а стабилизированный димер.

Оставалось, однако, непонятным функциональное значение объединения двух субъединиц в димер. Дело в том, что, по мнению большинства исследователей, кооперативные взаимодействия между субъединицами глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы играют первостепенное значение в осуществлении каталитического акта, точнее в регуляции последовательного протекания различных его стадий на двух активных центрах «функционального димера» [23]. Эта концепция хорошо согласуется с предположением об отсутствии каталитической активности у отдельных субъединиц дегидрогеназ (эксперименты по диссоциации и инактивации дегидрогеназ в растворе [2]). Так как в наших работах было доказано, что мономерные формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы столь же эффективно катализируют реакцию, как и

тетрамеры, то роль объединения субъединиц и существование кооперативных взаимодействий между ними становились непонятными. Нами было высказано предположение, что различия между каталитической эффективностью иммобилизованных мономеров и тетрамеров нивелируются при определении их активности в искусственных условиях при концентрациях субстратов, близких к насыщающим. При недостатке какого-либо из субстратов или кофакторов эти различия могут быть более выражены. Наиболее вероятно, что именно изменение концентрации кофактора, для связывания которого характерна кооперативность, должно играть решающую роль в изменении каталитических свойств иммобилизованных мономеров и тетрамеров. Для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей нам не удалось обнаружить различий между иммобилизованными мономерами и тетрамерами в величинах  $V_{\max}$  и  $K_m$  для 3-фосфоглицеринового альдегида и НАД. Значения этих параметров были равны соответственно 50 мкмоль/мин на 1 мг белка,  $0,20 \pm 0,2$  мМ и  $0,05 \pm 0,01$  мМ. Однако такое определение активности не позволяет выяснить, как ведет себя фермент при очень низких концентрациях кофактора, поскольку в используемой системе последний не подвергается регенерации. Применяя для регенерации кофактора систему, содержащую лактатдегидрогеназу, пируват и НАДН, нам удалось измерить активность мономеров и тетрамеров глицеральдегид-3-фос-

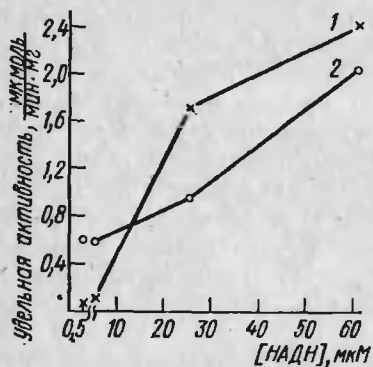


Рис. 3. Зависимость удельной активности иммобилизованных мономеров (1) и тетрамеров (2) глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы от концентрации кофактора

субстрата. Результаты опытов, приведенные на рис. 3, показывают, что при крайне низких концентрациях кофактора, близких к концентрации ферментов, активностью обладают только тетрамерные формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, а мономер полностью неактивен. Вероятно, сродство к кофактору у мономера значительно ниже, чем у тетрамера, и неспособность связать НАД

фосфатдегидрогеназы при концентрациях НАДН от 0,6 до 60 мкМ [24]. Для проведения эксперимента иммобилизованные формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы смешивали с иммобилизованной отдельно на сефарозе лактатдегидрогеназой, с НАДН в указанных на рис. 3 концентрациях и с субстратами обоих ферментов. НАДН окислялся лактатдегидрогеназой, и образующийся НАД использовался в глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной реакции. После завершения реакции инкубационную смесь отделяли от иммобилизованных ферментов фильтрованием и определяли активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы по убыли

не позволяет ему осуществить катализ. Иная картина наблюдается при концентрациях кофактора 20—60 мкМ, так как в этом случае мономер не только обладает активностью, но и катализирует реакцию в 1,5—2,0 раза более эффективно, чем тетрамер. Мы полагаем, что большая каталитическая эффективность мономера в этом случае обусловлена его меньшим сродством к кофакторам: поскольку фосфоролиз ацил-фермента невозможен без отщепления НАДН, облегчение последнего процесса должно приводить к ускорению реакции. При невысоких концентрациях НАД в среде отщепление НАДН от фермента и его замена на НАД более эффективно могут осуществляться на мономерах, обладающих меньшим сродством к кофакторам. При избытке НАД вытеснение НАДН из моно- и тетрамеров происходит одинаково эффективно, и отличий в их активности обнаружить не удастся. Вероятно, в данном случае основным преимуществом тетрамерной структуры является более прочное связывание кофактора и, как следствие, меньшая зависимость каталитической активности фермента от концентрации НАД в среде.

Несколько иная ситуация была обнаружена нами при сравнении свойств иммобилизованных моно- и тетрамеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика. Для этого фермента характерна выраженная отрицательная кооперативность по связыванию НАД: первая молекула НАД связывается с тетрамером мышечной дегидрогеназы с  $K_D$   $10^{-11}$ — $10^{-8}$  М (по данным разных авторов и при определении различными методами), а последняя, четвертая молекула НАД — с  $K_D$   $10^{-5}$  М [25, 26]. Величина  $K_m$  для этого фермента в отношении НАД близка к значению последней константы —  $1$ — $5 \cdot 10^{-5}$  М [27]. По последним данным Бойера [28], катализ происходит именно в тех активных центрах, которые содержат прочносвязанный НАД, а после образования ацил-фермента в этих центрах наступают конформационные изменения, приводящие к увеличению сродства в активном центре соседней субъединицы. Вероятно, причиной расхождений в величинах  $K_D$  и  $K_m$  являются постоянные конформационные изменения, приводящие к изменению сродства к кофакторам в ходе катализа и влияющие на скорость лимитирующих катализ стадий.

Указанные выводы были сделаны при исследовании тетрамеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из мышц, а какая ситуация наблюдается для мономерных форм? Определение величин  $K_m$  для иммобилизованных тетрамеров и мономеров дегидрогеназы показывает, что в отношении НАД они значительно отличаются: соответственно  $0,077 \pm 0,002$  и  $0,025 \pm 0,003$  мМ. Для 3-фосфоглицеринового альдегида  $K_m$  одинаковы и равны 0,2 мМ. Причиной отличий может быть увеличение сродства к кофактору у мономерной формы и, следовательно, снижение  $K_D$ . Однако нами было показано, что при добавлении 50-кратного молярного избытка НАД к препарату иммобилизованных мономеров после 10-минутной инкубации и последующего отмывания избытка кофактора не происходит его связывания с мономерами, тогда как с иммо-

билизованными тетрамерами НАД связывается при добавлении в эквимольном количестве. Таким образом, в иммобилизованных мономерах глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика сродство к кофактору значительно снижается, а  $K_m$  уменьшается. Это приводит к сближению величин  $K_m$  и  $K_D$  для кофактора, которые у исходных тетрамеров отличаются на 3—5 порядков.

По-видимому, биологический смысл образования четвертичной структуры с кооперативными взаимодействиями между активными центрами в данном случае и заключается в создании фермента, обладающего сильно отличающимися значениями  $K_m$  и  $K_D$  для кофактора. Такая особенность позволяет, с одной стороны, крайне прочно связывать кофактор в двух из четырех активных центров, что обеспечивает эффективную конкуренцию за НАД с другими дегидрогеназами и высокую стабильность молекулы фермента, а с другой — эффективно осуществлять катализ (практически так же, как и в мономерной форме). Кооперативные взаимодействия между субъединицами позволяют создать ферментативную систему, в минимальной степени зависящую от концентрации НАД. Учитывая, что глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа катализирует центральную стадию гликолиза, на которой возникает первое макроэргическое соединение, а НАД эффективно используется в целом ряде конкурирующих процессов, указанный механизм должен играть важную роль в обеспечении эффективного функционирования энергетического обмена.

Из результатов работ по получению и исследованию свойств иммобилизованных мономеров НАД-зависимых дегидрогеназ можно прийти к однозначному выводу, что для осуществления каталитического акта объединение субъединиц не является обязательным. Однако, как следует из опытов с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, возникновение четвертичной структуры создает предпосылки для совершенно иной регуляции протекания каталитического акта и делает его оптимально приспособленным для выполнения функции фермента. Возможно, последующие исследования моно- и олигомерных форм НАД-зависимых дегидрогеназ позволят обнаружить и другие случаи такого рода «приспособительных» изменений свойств фермента при возникновении олигомерной структуры.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Поляновский О. Л. (1971) Четвертичная структура и аллостерические свойства ферментов. В кн.: Биологическая химия, Изд-во ВИНТИ, М., 6—56.
2. Rudolph R., Heider I., Jaenicke R. (1977) Eur. J. Biochem., 81, 563—570.
3. Jaenicke R., Vogel W., Rudolph R. (1981) Eur. J. Biochem. 114, 525—531.
4. Stallcup W. B., Koshland D. E., Jr. (1973) J. Mol. Biol. 80. 77—91.

5. Hermann R., Rudolph R., Jaenicke R. (1979) *Nature*, 277, 243—245.
6. Cho I. C., Swaisgood H. E. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 258, 675—679.
7. Cho I. C., Swaisgood H. E. (1974) *Biochem. Biophys. Acta* 334, 243—256.
8. Chan W. W.-C., Mosbach K. (1976) *Biochemistry* 15, 4215—4222.
9. Муронец В. И., Чередникова Т. В., Наградова Н. К. (1981) *Биохимия* 46, 1731—1739.
10. Nagradova N. K., Golovina T. O., Mevkh A. T. (1974) *FEBS Lett.* 49, 242—245.
11. Ashmarina L. I., Muronetz V. I., Nagradova N. K. (1982) *Biochem. Intern.* 3, 415—423.
12. Chan W. W.-C. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 41, 1198—1201.
13. Chan W. W.-C. (1973) *Canad. J. Biochem.* 1, 258—260.
14. Chan W. W.-C., Schutt H., Brand K. (1973) *Eur. J. Biochem.* 40, 533—541.
15. Муронец В. И., Ашмарина Л. И., Наградова Н. К. (1982) *Биохимия* 47, 977—986.
16. Ashmarina L. I., Muronetz V. I., Nagradova N. K. (1980) *Biochem. Intern.* 1, 47—54.
17. Hoagland V. D., Jr., Teller D. C. (1969) *Biochemistry* 8, 594—602.
18. Ashmarina L. I., Muronetz V. I., Nagradova N. K. (1981) *FEBS Lett.* 128, 22—26.
19. Jurgensen S. R., Wood D. C., Mahler J. C. et al. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2383—2386.
20. Andersson L., Mosbach K. (1979) *Eur. J. Biochem.* 94, 557—563.
21. Muronetz V. I., Zueva V. S., Nagradova N. K. (1979) *FEBS Lett.* 107, 277—280.
22. Муронец В. И., Головина Т. О., Наградова Н. К. (1982) *Биохимия* 47, 3—12.
23. Stallcup W. B., Koshland D. E., Jr. (1973) *J. Mol. Biol.* 80, 41—62.
24. Ashmarina L. I., Muronetz V. I., Nagradova N. K. (1982) *FEBS Lett.* 144, 43—46.
25. Velik S. F., Baggot J. B., Sturtevant J. M. (1971) *Biochemistry* 10, 779—786.
26. De Vilder J. J. M., Boers W., Slater E. C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 167, 23—34.
27. Velick S. F., Furfine C. (1963) *The Enzymes* 7, 243—272.
28. Boyer P. D., Cardon I. W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7615—7622.

## СТРУКТУРА И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Е. А. Перфильева, Т. В. Буларгина,  
Е. С. Северин

(Биологический факультет МГУ; Всесоюзный  
научно-исследовательский институт по биологическим  
испытаниям химических соединений,  
Купавна Московской обл.)

### Структурная организация и взаимодействие отдельных компонентов аденилатциклазного комплекса

У высших организмов аденилатциклаза [АТФ-пирофосфатлиаза (циклизующая), КФ 4.6.1.1] является ферментом плазматических мембран. Вместе с рецепторным и регуляторным белками она образует аденилатциклазный комплекс, который благодаря своей структурной организации способен к тонкой регуляции каталитической активности аденилатциклазы.

Как отмечено в обзоре Росса и Джилмана [1], роль структуры и состава плазматической мембраны в регуляции активности аденилатциклазы — одна из наиболее туманных и наименее тщательно документированных областей исследования фермента. Основным наблюдением является то, что солиubilизация плазматических мембран или добавление к ним агентов, разрушающих мембранную структуру, вызывают потерю чувствительности к гормону. Хотя описана солиubilизация  $Mg^{2+}$ -зависимой аденилатциклазы, регуляторного N-белка и рецепторов, в настоящее время нет работ, в которых бы сообщалось о получении истинно солиubilизированной гормон-чувствительной активности, которая сохраняла бы специфичность действия гормона. Поэтому, не имея возможности описать исчерпывающим образом работу аденилатциклазного комплекса, в целом, перечислим имеющиеся сведения о структуре, расположении в мембране и взаимодействии его отдельных компонентов.

Показано, что все три белка аденилатциклазного комплекса (рецепторный, регуляторный и каталитический) являются продуктами отдельных генов. Разделение солиubilизированных белковых фракций, несущих связывающую активность  $\beta$ -адренергического рецептора и каталитическую активность аденилатциклазы, осуществлено с помощью гель-фильтрации [2, 3], центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [4] и аффинной хроматографии [5]. Регуляторный белок, обозначаемый разными исследователями как G-белок, G, N, G/F, или белок, связывающий гуаниловые нуклеотиды, достаточно полно отделили от каталитического, используя свойство N-белка связываться с ГТФ-агарозой. После

элюции *N*-белка с аффинной матрицы гуаниловыми нуклеотидами его можно было вновь реконструировать с каталитическим белком [6, 7]. Росс с сотр., используя различия в чувствительности регуляторного и каталитического компонентов к нагреванию и к обработке *N*-этилмалеимидом, выборочно инактивировали каталитический белок в экстрактах плазматических мембран различных клеток. Полученные таким образом препараты *N*-белка затем использовали для встраивания в мембраны *сус*-клеток<sup>1</sup>, и это приводило к восстановлению регуляторных свойств аденилатциклазы [8]. Полное разделение *N*-белка и каталитического белка с сохранением их активностей достигнуто гель-хроматографией натрий-хлоратных экстрактов мембран печени и мозга в растворах высокой ионной силы [9, 10].

$\beta$ -рецептор ретикулоцитов крыс, связанный с меченым антагонистом, также отделяли гель-фильтрацией от *N*-белка, меченого <sup>32</sup>P в катализируемой холерным токсином реакции АДФ-рибозилирования [12]. И наконец, из печени кролика [13, 14] и эритроцитов индюка [15] в лаборатории Джилмана в высокоочищенном виде получены препараты *N*-белка, свободные от примесей рецепторов или каталитического белка.

Все составные части аденилатциклазного комплекса являются интегральными белками мембран. Они имеют на своей поверхности гидрофобные участки, о чем свидетельствует связывание этих белков с неионными детергентами. В результате гидродинамических исследований детергентных экстрактов мембран было показано, что *N*-белок имеет сравнительно небольшую гидрофобную зону, так как он связывает меньшее количество детергента [16, 17], чем каталитический [4, 18] или рецепторный белок [4]. В эритроцитах человека *N*-белок обнаруживается на внутренней поверхности плазматической мембраны [19], однако какая-то часть его все же связана с липидным бислоем, так как селективные агенты, высвобождающие из мембран неинтегральные белки, не способны полностью солибилизовать *N*-белок [16, 20]. Каслов с сотр. предполагают, что *N*-белок имеет вытянутую форму и пронизывает мембрану таким образом, что его гидрофобный участок связывается с липидным бислоем, тогда как гидрофильная часть экспонирована в цитоплазму [16]. О прочной связи с бислоем каталитического и рецепторного белков может свидетельствовать тот факт, что хорошая реконструкция стимулируемой катехоламинами аденилатциклазной активности происходит только в тех случаях, когда в солибализованном виде находится *N*-белок, а каталитический белок и рецептор встроены в мембрану [8].

Следует отметить, что, в отличие от гидрофобного каталити-

<sup>1</sup> Клетки *сус* — генетический вариант клеток мышины лимфомы S49, содержащий в мембранах нормальный  $\beta$ -рецептор и каталитический белок аденилатциклазы, лишенный чувствительности к гормонам и к гуаниловым нуклеотидам. Эти клетки не содержат белковых субстратов для катализируемого холерным токсином АДФ-рибозилирования [11].

ческого белка, обнаруживаемого в мозге быка и в клетках лимфомы S 49 [4, 18], каталитический белок из мембран почек и семенников крыс почти не связывает детергента [21, 22]. Кроме того, в семенниках крыс и в сперме быка обнаружена цитоплазматическая форма аденилатциклазы [22, 23]. Возможно, что эти различающиеся по гидрофобности и молекулярным размерам формы фермента являются продуктами разных генов или же результатом протеолиза или дифференциальной солюбилизации различных субъединиц аденилатциклазы.

Для определения молекулярных размеров белков аденилатциклазной системы используют в основном два метода: гидродинамический анализ детергентных экстрактов мембран и метод молекулярных мишеней, который дает возможность изучать нативную структуру комплекса в мембране.

#### Молекулярная масса и субъединичная структура *N*-белка

В настоящее время наиболее подробно охарактеризованы молекулярная масса регуляторного *N*-белка. Данные, полученные с использованием трех методов идентификации *N*-белка, дают похожие результаты. Так, Пфейффер с помощью [ $^3\text{H}$ ] Р<sup>3</sup>-(4-азидоанилид) Р<sup>1</sup>-ГТФ при блокировании мембранных белков эритроцитов голубя показал включение метки в полипептиды с молекулярной массой 86 000, 53 000, 42 000 и 23 000 дальтон [6]. Из них только полипептид с молекулярной массой 42 000 дальтон был связан с аденилатциклазной активностью в детергентном экстракте при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Этот полипептид, проявляющий биологическую активность регуляторного белка в экспериментах по реконструкции, можно было отделить от аденилатциклазы на аффинном носителе, содержащем ГТФ [6, 7]. Примерно в то же время был обнаружен катализируемый субъединицей А<sub>1</sub> холерного токсина перенос [ $^{32}\text{P}$ ] АДФ-рибозы от [ $^{32}\text{P}$ ] НАД<sup>+</sup> на мембранный белок, который при денатурирующем электрофорезе дает меченый полипептид с молекулярной массой 42 000—45 000 дальтон [11, 24—27].

В ряде работ была доказана идентичность этого АДФ-рибозилируемого полипептида и полипептида, сорбирующегося на ГТФ-содержащих носителях и восстанавливающего чувствительность каталитического компонента аденилатциклазы к гуаниловым нуклеотидам и фториду [13, 16, 24, 26, 28]. Затем в мембранах клеток лимфомы S<sub>49</sub>, клеток крысиной гепатомы, в фибробластах легких, а также в тимусе было обнаружено специфическое включение метки в присутствии холерного токсина в полипептид с молекулярной массой 52 000 дальтон [11, 26, 29], который по биологической функции был похож на полипептид с молекулярной массой 42 000 дальтон [29].

При очистке *N*-белка из печени кролика [14] и эритроцитов индюка [15], осуществленной в лаборатории Джилмана, биоло-

гическую активность *N*-белка проверяли по реконструкции регулируемой аденилатциклазы с мембранами клеток *сус*<sup>-</sup>, содержащими каталитический компонент аденилатциклазы. Полученный высокоомогенный *N*-белок из печени кролика состоял из трех полипептидных цепей с молекулярной массой 52 000, 45 000 и 35 000 дальтон, а *N*-белок эритроцитов — из двух полипептидов массой 45 000 и 35 000 дальтон. Молекулярная масса неденатурированного *N*-белка, не подвергавшегося действию активаторов, при гидродинамическом измерении равнялась 70 000 и 81 000 дальтон соответственно. Если же гидродинамическое определение массы *N*-белка проводилось в неочищенных детергентных экстрактах, то, по данным ряда авторов, она равнялась 126 000—130 000 дальтон [16, 17]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что *N*-белок является мультисубъединичным олигомером, у которого еще не установлены количество и численное соотношение субъединиц.

По-видимому, биологическую функцию эффекторного белка аденилатциклазы выполняют полипептиды с молекулярной массой как 42 000—45 000, так и 52 000 дальтон. Это следует из наличия реконструктивной активности у фракций очищенного *N*-белка из печени кролика, обогащенных первым или вторым полипептидами [14]. Кроме того, биологической активностью обладают суммарные фракции *N*-белка из тех мембран, в которых при АДФ-рибозилировании метка включается или в полипептид с массой 45 000 дальтон [16, 28], или в полипептид с массой 52 000 дальтон [26, 29]. Для обоих полипептидов не было обнаружено существенных различий в способности активироваться под воздействием фторида или гуанозин-5'-( $P^3$ -тиотрифосфата) (ГТФ  $\gamma S$ ) [14]. Они одинаково хорошо подвергались АДФ-рибозилированию под воздействием холерного токсина [30]. Их пептидные карты существенно перекрываются [31]. Коопер с сотр. сделали предположение о том, что модулируемые ГТФ регуляторные белки, в том числе и *N*-белок, содержат одинаковые домены, узнающие холерный токсин, а процесс АДФ-рибозилирования изменяет характер их взаимодействия с гуаниловыми нуклеотидами [32]. Нортрап с сотр. считают, что биологическая функция полипептида с массой 35 000 дальтон [14, 15] заключается в ингибировании активности полипептидов с массой 45 000 и 52 000 дальтон и что для активации *N*-белка необходима диссоциация составляющих его субъединиц [33].

#### Молекулярная масса рецепторов и их взаимодействие с *N*-белком

Наиболее изученный из рецепторных белков, связанных с аденилатциклазой, —  $\beta$ -адренергический — имеет, по-видимому, также олигомерное строение. Молекулярная масса полипептидов из мембран крысиных миобластов [34] и эритроцитов индюка [35] составляет 32 000—41 000 дальтон, что меньше массы нативного ре-

цепторного белка эритроцитов индюка (90 000 дальтон) [36] и клеток лимфомы S49 (72 000 дальтон) [4].

Весьма важным является тот факт, что определяемая молекулярная масса  $\beta$ -рецептора существенно зависит от типа связанного с ним лиганда. В эритроцитах лягушки [37] он увеличивается в том случае, если мембраны перед солюбилизацией обрабатывают агонистом. В присутствии антагониста или в отсутствие лиганда увеличения молекулярной массы  $\beta$ -рецептора не происходит. Индуцированные агонистом изменения рецептора не объясняются образованием комплекса  $R-C^2$  [3]. Лимбидр с сотр. показали, что связанный с меченым агонистом рецептор ретикулоцитов крыс при гель-фильтрации элюируется вместе с [ $^{32}P$ ] АДФ рибозилированным  $N$ -белком аденилатциклазного комплекса [12]. Таким образом, агонист способствует физическому сопряжению  $\beta$ -рецептора с  $N$ -белком и комплекс  $H-R-N$  существует более или менее длительное время, достаточное для его обнаружения. Это явление распространяется, по крайней мере, на глюкоконовый рецептор печени крыс [38, 39] и на  $\alpha$ -адренергический рецептор тромбоцитов [40].

#### Молекулярная масса каталитического белка и взаимодействие его с $N$ -белком

$N$ -белок образует более или менее прочные комплексы с каталитической субъединицей. Об этом свидетельствуют накопленные к настоящему времени многочисленные данные, в том числе и весьма противоречивые сведения о молекулярных размерах каталитического белка аденилатциклазы.

Каталитический белок отдельно от  $N$ -белка по принятой многими ведущими исследователями концепции нестабилен и может использовать только нефизиологический субстрат  $Mn^{2+}$ -АТФ.  $Mg^{2+}$ -АТФ-зависимая активность у эукариотической аденилатциклазы присуща функциональному комплексу  $C=N$  [8, 22, 41, 42].

Показано, что  $Mn^{2+}$ -АТФ является физиологическим субстратом лишь для аденилатциклаз низших эукариот и прокариот [43—45], а также для цитоплазматической аденилатциклазы семяночков, не чувствительной к гуаниловым нуклеотидам и представляющей собой, по всей видимости, индивидуальный каталитический белок [46, 47]. При солюбилизации плазматических мембран некоторых эукариотических клеток увеличивается способность солюбилизованного фермента к использованию  $Mn^{2+}$  и уменьшается чувствительность к регуляции гуаниловыми нуклеотидами [22, 41, 42, 48]. В интактных мембранах большие концентрации  $Mn^{2+}$  могут приводить к нарушению сопряжения компонентов аденилатциклазного комплекса, т. е. к снижению гормональной стимуляции и ослаблению эффектов гуаниловых нуклеотидов [49, 50].

<sup>2</sup> Знаками  $R$ ,  $C$  и  $N$  обозначены рецепторный, каталитический и регуляторный белки аденилатциклазного комплекса соответственно.

В комплексе с регуляторным белком каталитический белок обнаруживается практически во всех экстрактах тканей, если для экстракции используют неионные детергенты типа луброл или тритон или дигитонин при низкой ионной силе [14]. О существовании связи каталитического белка с *N*-белком в экстрактах свидетельствуют и наличие регуляции фторидом и гуаниловыми нуклеотидами, и низкая величина отношения активности, измеряемой в присутствии  $Mn^{2+}$ , к активности, измеряемой в присутствии  $Mg^{2+}$ . Даже в том случае, когда Нир с сотр. разделяли аденилатциклазу на две фракции, одна из которых не была чувствительна к гуаниловым нуклеотидам, эта фракция не обладала свойствами собственно каталитического компонента и, как предполагают авторы, представляла собой слабодиссоциирующий комплекс каталитического белка с *N*-белком [51].

Равновесие  $C + N \rightleftharpoons N - C$  в экстрактах, по-видимому, настолько сдвинуто вправо [52], что возникает серьезная проблема полного разделения *C* и *N*. Она осложняется тем, что каталитический белок, взятый отдельно, весьма нестабилен при очистке. Методами гель-фильтрации [51], аффинной хроматографии *N*-белка [6] или аденилатциклазы, имеющей родство к кальмодулину [53, 54], удается добиться лишь частичного разделения *N*-белка и каталитического белка.

Определенные перспективы открылись при использовании холата натрия в сочетании с высокой ионной силой, создаваемой сульфатом аммония. Росс [9] показал, что в этих условиях сульфат аммония вызывает диссоциацию комплекса *C*—*N* и агрегацию каталитического белка и предотвращает инактивацию каталитической субъединицы. Таким же образом разделили *N*-белок и каталитический белок мозга Штриттматтер и Нир [10]. Лондос с сотрудниками, использовавшие для сольubilизации каталитического белка дезоксихолат натрия и меньшую ионную силу, получили в 20 раз более низкий выход активности по сравнению с результатами, полученными Россом [41]. Битонти с сотр. [55] недавно сообщили, что цвиттерионное производное холата также дает хорошее разделение *N*-белка и каталитического белка в отсутствие сульфата аммония, что позволяет повысить стабильность получаемых компонентов.

О реальном существовании комплекса *C*—*N* не только в экстрактах, но также в мембранах свидетельствует меньшая величина молекулярной массы аденилатциклазной мишени, определяемая в присутствии  $Mn^{2+}$  и в отсутствие других эффекторов аденилатциклазной системы, по сравнению с величиной, определяемой в присутствии  $Mg^{2+}$  [39].

По-видимому, состояние равновесия  $C + N \rightleftharpoons N - C$  отражается на определяемой величине молекулярной массы аденилатциклазы [51, 56, 57]. В тех случаях, когда *N*-белок не отделяли от каталитического, измеряемая молекулярная масса аденилатциклазы в экстрактах варьировала от 159 000 дальтон в почках крыс [21], 170 000 в почках морских свинок [58] и 119 000 дальтон в шито-

видной железе быка [59] до 220 000 и 199 000, 265 000 дальтон в мозговой ткани [18, 51]. После активации аденилатциклазы под действием гуанилил-5'-имидодифосфата ( $GppNHp$ ) или фторида определяемая молекулярная масса не изменялась сколько-нибудь существенно, она составляла в клетках лимфомы S49 220 000 дальтон [4], в печени крыс — 183—220 000 дальтон [60]. К сожалению, в тех случаях, когда каталитический белок не удавалось полностью отделить от  $N$ -белка, гидродинамический анализ размеров каталитического белка не проводился. Наименьшие величины его молекулярной массы были получены методом молекулярных мишеней при использовании в качестве субстрата  $Mn^{2+}$ -АТФ в мембранах эритроцитов индюка (92 000 дальтон) и печени крыс (150 000 дальтон) [36, 39]. У цитоплазматического каталитического белка из семенников крыс молекулярная масса составляет, по разным данным, от 56 000 [22] до 69 000—74 000 дальтон [61]. Однако этот белок может отличаться от типичного мембранно-связанного фермента эукариотических клеток так же, как и цитоплазматическая аденилатциклаза *Brevibacterium liguefaciens* — димерный белок, у которого молекулярная масса мономера равна 46 000 дальтон [62].

Таким образом, взаимодействие рецептора с  $N$ -белком и  $N$ -белка с каталитическим можно зарегистрировать экспериментально. В то же время доказательств взаимодействия рецептора с каталитическим белком не обнаружено. Например, в работе Нойфельда с сотр. [63] было показано, что при гибридизации клеток *сус*<sup>-</sup> или Friend с мембранами эритроцитов индюка разрушение каталитического белка в этих мембранах ацетилтрипсином не сказывалось на переносе в клетки функционирующего  $\beta$ -рецептора.

Несмотря на достигнутые успехи, все же не известен ни субъединичный состав каталитического белка, ни стехиометрия взаимодействия белков аденилатциклазного комплекса в мембране. В начальной стадии находятся исследования химической природы контактов между компонентами аденилатциклазного комплекса.

Исследуя влияние сульфата аммония и других солей на стабильность комплекса  $N-C$  в луброльном экстракте мембран мозга [56], Нир и Сальтер пришли к выводу, что взаимодействие  $N$ -белка с каталитическим имеет преимущественно ионную природу. По-видимому, соли могут сдвигать равновесие  $N + C \rightleftharpoons N-C$  влево в сторону диссоциации комплекса. Гиллон с сотр. установили, что тиол-восстанавливающие агенты уменьшают кажущийся молекулярный размер аденилатциклазы и это также свидетельствует о диссоциации комплекса  $C-N$  [57]. В свете этих данных возможно, что SH-группа каталитического белка, впервые обнаруженная Россом с коллегами, существенна не только для проявления ферментативной активности, но и для реализации контакта каталитического белка с  $N$ -белком [8, 64].

Нет ясности в вопросе о том, один и тот же или разные нуклеотид-связывающие центры  $N$ -белка ответственны за модуляцию срoдства рецептора к агонисту и активности каталитического

белка. Ряд данных свидетельствует о том, что связующим звеном между рецептором и каталитическим белком является одна и та же популяция *N*-белков. Так,  $\beta$ -рецептор элюируется вместе с [ $^{32}\text{P}$ ] АДФ-рибозилированным *N*-белком, и в то же время степень ковалентной модификации *N*-белка соответствует степени увеличения чувствительной к ГТФ аденилатциклазной активности [12]. В экспериментах по реконструкции мембран мутантных клеток лимфомы *сус*<sup>-</sup> и *UNC* с *N*-белком одновременно восстанавливаются чувствительность аденилатциклазы к гормонам и модуляция сродства рецептора к агонистам гуаниловыми нуклеотидами, т. е. две функции, опосредуемые через *N*-белок, проявляются одновременно [8, 65]. Вельтон с сотр. [66] на основании разделения чувствительной к ГТФ формы рецептора с *GppNHp*-стимулируемой аденилатциклазной активностью предположили существование двух нуклеотид-связывающих центров: модулирующего глюкагоновый рецептор и отвечающего за активацию аденилатциклазы. Однако результаты этой работы не дают достаточных доказательств того, что с рецептором и с каталитическим белком связывались различные *N*-белки. Косвенные доказательства существования двух центров, представленные в ряде работ [70, 67—69] и основанные на различиях в концентрационных зависимостях эффектов, в специфичности к различным гуаниловым нуклеотидам, в чувствительности к фосфолипазам, в реакции на удаление несвязанных эндогенных нуклеотидов, допускают альтернативную интерпретацию с позиции существования одного регуляторного центра. Альтернативная точка зрения обсуждается Левицким [71], который предположил, что один регуляторный нуклеотид-связывающий центр может быть проводником воздействия *N*-белка как на рецептор, так и на каталитический белок. Он считает, что величину и скорость появления эффектов определяет не только сродство гуанилового нуклеотида к *N*-белку, но и конформационные переходы  $R \rightarrow R^*$  и  $C \rightarrow C^*$ , которые могут протекать неодновременно и относительно независимо друг от друга. В лаборатории Джилмана в опытах, проводившихся с высокомолекулярным *N*-белком, пока обнаружен лишь один нуклеотид-связывающий центр [33].

### **Механизм проведения гормонального сигнала через мембрану с помощью аденилатциклазного комплекса**

Суть цАМФ-зависимого проведения гормонального сигнала через клеточную мембрану состоит в изменении ферментативной активности аденилатциклазы в ответ на гормональный стимул. Очевидно, что передача сигнала осуществляется путем взаимодействия белков аденилатциклазного комплекса, а именно рецептора с *N*-белком и *N*-белка с каталитическим.

Взаимодействие рецептора с *N*-белком, о котором упоминалось в предыдущем разделе, необходимо для передачи гормонального сигнала на ферментативный белок или, иными словами, для сопряжения рецептора с аденилатциклазой. Об этом свидетельствует абсолютная необходимость гуаниловых нуклеотидов для реализации воздействия гормона. Впервые это явление было обнаружено для стимулируемой глюкоконом аденилатциклазы печени [72], а затем подтверждено для большого числа стимулируемых гормонами и в последние годы для ингибируемых гормонами [73] аденилатциклазных систем. Иногда эффект гуаниловых нуклеотидов бывает трудно обнаружить из-за присутствия их в виде примеси в препаратах АТФ [74] или вследствие наличия эндогенных нуклеотидов в мембранах. Роль гуаниловых нуклеотидов показана *in vivo*, когда искусственное уменьшение концентрации ГТФ внутри неразрушенных клеток уменьшало величину пика цАМФ в ответ на гормональный стимул [75]. В клетках лимфомы *сус* отсутствие функционирующего *N*-белка приводит к отсутствию гормональной чувствительности аденилатциклазы, хотя в этих клетках есть и рецепторы, и каталитический белок [69]. Лимбирд с сотр. [76] показали, что в созревающих ретикулоцитах крыс одновременно с потерей способности агониста стимулировать образование комплекса *N*-белка с рецептором уменьшается чувствительность аденилатциклазы к катехоламинам и к *GppNHp*.

В настоящее время в общих чертах уже определены факторы, способствующие сопряжению или диссоциации рецепторного и регуляторного белков, и описаны некоторые изменения, происходящие с молекулой рецептора под воздействием этих факторов. Для  $\beta$ -адренергических систем показано, что, в отличие от антагонистов, агонисты способны переводить часть  $\beta$ -рецепторов из состояния низкого сродства в состояние высокого сродства к агонисту [77]. Гуаниловые нуклеотиды обратимо переводят эту популяцию  $\beta$ -рецепторов снова в состояние низкого сродства, и одновременно происходит вызванное гуаниловыми нуклеотидами увеличение активности аденилатциклазы [12, 37, 69]. В присутствии антагонистов гуаниловые нуклеотиды не изменяют сродства рецептора [69, 78, 50].

Иными словами, состояния  $\beta$ -рецептора с разным сродством к агонисту могут обратимо переходить одно в другое под воздействием эффекторов аденилатциклазной системы. Неэффективные соединения (напротив, антагонисты) таких переходов не вызывают. То же показано для  $\alpha$ -рецептора в системе с ингибируемой аденилатциклазой [79].

Перечисленные факторы послужили толчком к формулированию модели «динамического сродства рецепторов» в лаборатории Лефковитца [80]. По этой модели сопрягаться с аденилатциклазой путем взаимодействия с *N*-белком может только  $\beta$ -рецептор, находящийся в строго определенном состоянии  $R^*$ . Это состояние

характеризуется примерно в 10 раз более высоким сродством к агонисту, поэтому  $R^*$  занят гормоном ( $H$ ) и комплекс  $R^*-H$  медленно диссоциирует.  $R^*$  — долгоживущее состояние рецептора, оно возникает только после взаимодействия рецептора с агонистом и существует до момента связывания гуанилового нуклеотида с  $N$ -белком, после чего рецептор переходит в исходное состояние  $R$ . Таким образом, индукция формирования комплекса  $R^*-H$  является фундаментальным свойством агонистов  $\beta$ -рецептора, антагонисты такой способностью не обладают.

Реальное существование комплекса  $R^*-H$  показано для различных  $\beta$ -адренергических систем [76, 78, 80—83], для дофаминового [84] и глюкагонового [85] рецепторов. Формирование этого комплекса происходит также при взаимодействии простагландина  $E_1$  с  $\alpha$ -рецептором тромбоцитов человека [40], в случае мускаринового рецептора [86] и дофаминового рецептора  $D_2$  передней доли гипофиза [87], т. е. в случае ингибируемых аденилатциклазных систем.

Чем различаются два состояния рецептора —  $R$  и  $R^*$ ? Возможно, что это две разные конформации одной и той же белковой молекулы. При переходе  $\beta$ -рецептора в состояние высокого сродства ряд исследователей наблюдали повышение реакционной способности SH-группы [50, 88, 89]. Повышения реакционной способности SH-группы не наблюдалось в клетках с нарушенным механизмом передачи гормонального сигнала (*сус*<sup>-</sup> и *UNC*) [50]. SH-группа была также необходима для осуществления отрицательного эффекта гуаниловых нуклеотидов на связывание [<sup>125</sup>J]-глюкагона глюкагоновым рецептором печени [70]. Однако более существенные данные о структурных характеристиках  $R^*$  и  $R$  отсутствуют. Ничего не известно также о химизме взаимодействия комплекса  $R^*-H$  с  $N$ -белком, о локализации этого взаимодействия в мембране. Временные характеристики формирования, существования и разрушения комплексов  $R^*-H$  и  $R^*-H-N$  также почти не изучены, хотя работа Цитри и Шрамма [88] по кинетике активации  $N$ -белка при взаимодействии с  $\beta$ -рецептором эритроцитов индюка свидетельствует о возможности длительного существования комплекса  $R^*-H$  и, следовательно, о возможности взаимодействия с несколькими регуляторными белками.

Имеются данные о том, что ионы  $Mg^{2+}$  участвуют во взаимопревращениях двух форм рецептора. На  $\beta$ -рецепторе и простагландиновом рецепторе эритроцитов лягушки [82], на  $\beta$ -рецепторе клеток S49 [81] и на  $\alpha$ -рецепторе тромбоцитов [79, 90] было показано, что свободные ионы двухвалентных металлов, особенно  $Mg^{2+}$ , в физиологической концентрации увеличивают сродство рецептора к агонисту на порядок, а ГТФ вновь снижает его. В отсутствие  $Mg^{2+}$  влияние гуаниловых нуклеотидов на связывание агониста не наблюдается [50]. Чеч с сотр. полагают [50], что свободный  $Mg^{2+}$  оказывает воздействие на связывание агониста рецептором через участок, расположенный на  $N$ -белке. По их гипотезе, взаимодействие агониста с рецептором вызывает ассоциацию

рецептора с *N*-белком, но еще не переводит рецептор в состояние высокого сродства. Это событие становится возможным только после взаимодействия  $Mg^{2+}$  с *N*-белком. Таким образом, необходимым предшественником для активации аденилатциклазы является комплекс  $H-R^*-N$  ( $Mg^{2+}$ ).

В последнее время начал изучаться вопрос о химической разнородности популяции рецепторов одного фармакологического класса. По-видимому, часть рецепторов не участвует в сопряжении с аденилатциклазой. Возможно, к таким рецепторам относится часть популяции  $\beta$ -рецепторов клеток лимфомы S49, которая после инактивации всех чувствительных к *N*-этилмалеимиду в присутствии агониста связывающих мест не переводится под влиянием  $Mg^{2+}$  в состояние высокого сродства [50, 91].

Хорошо известен тот факт, что гормон или нейротрансмиттер влияют не на величину активации аденилатциклазы гуаниловыми нуклеотидами, а на ее скорость [69, 92—94]. В связи с этим возникает вопрос: чем определяется специфичность действия гормонов? Показано, что эффективность действия частичных агонистов на активность аденилатциклазы хорошо коррелирует с количеством рецепторов, которое переводится в состояние высокого сродства и способно образовывать комплексы с *N*-белком [77]. Эффективности агонистов соответствует также количество инактивируемых *N*-этилмалеимидом  $\beta$ -рецепторов, т. е. находящихся в состоянии высокого сродства [50, 91]. Величина обратного сдвига сродства рецептора к агонисту, вызываемого гуаниловыми нуклеотидами, во многих мембранах также прямо пропорциональна его способности стимулировать аденилатциклазу [78]. Таким образом, количественной характеристикой сопряжения рецептора с *N*-белком может служить количество рецепторов, переводимых в состояние высокого сродства.

С другой стороны, в разных мембранах величина изменения сродства, вызываемого гуаниловыми нуклеотидами, может варьировать в зависимости от доступности нуклеотид-связывающего регуляторного участка *N*-белка для ГТФ. Так, величина изменения сродства сильно выражена в мембранах клеток лимфомы S49 [69], в эритроцитах лягушки [78], в ретикулоцитах крыс [12, 76] и плохо выражена в таких мембранах, как эритроциты индюка [95, 96]. Вытеснение эндогенных нуклеотидов в этих мембранах делает возможным переводение рецептора в состояние высокого сродства к агонисту [95].

#### Передача гормонального сигнала ГТФ-связывающим регуляторным белком

Известно, что связывающий гуаниловые нуклеотиды белок аденилатциклазной системы выполняет в ней по крайней мере три функции.

Во-первых, в его отсутствие каталитический белок аденилатциклазы не может использовать физиологический субстрат,  $Mg^{2+}$ -

АТФ, т. е. *N*-белок обеспечивает определенный уровень базальной активности фермента.

Во-вторых, *N*-белок, связавший ГТФ, прочно сопрягается с каталитическим белком и вызывает изменения его активности.

В-третьих, не только рецептор в комплексе с агонистом воздействует на *N*-белок, ускоряя обмен нуклеотидов в регуляторном центре, но и *N*-белок участвует во взаимопревращениях двух состояний рецептора. Так, его наличие является необходимым условием перехода рецептора в состояние высокого сродства. В присутствии же ГТФ *N*-белок вызывает обратный переход рецептора в форму, имеющую низкое сродство к агонисту.

Спорной является гуанозинтрифосфатазная функция *N*-белка. Существование во многих мембранах стимулируемой катехоламинами и гормонами ГТФазы [97—101] свидетельствует о важности стадии гидролиза ГТФ в цикле регуляции аденилатциклазы и о возможной ее роли как механизма, терминирующего активацию. Однако до сих пор попытки измерить ГТФазную активность в частично очищенных [51] или гомогенных [33] фракциях *N*-белка не имели успеха.

В совокупности перечисленные функции, очевидно, и обеспечивают передачу сигнала гормона через *N*-белок на каталитический. Роль гормона или нейротрансмиттера заключается в обеспечении посадки на *N*-белок физиологического регуляторного эффектора — ГТФ.

Что известно о механизме этой передачи? Многие факты свидетельствуют о том, что *N*-белок не является пассивным передатчиком сигнала гормона. С ним способны взаимодействовать несколько эффекторов, и такие из них, как гуаниловые нуклеотиды, анионы фтора и АДФ-рибозилтрансферазы [102], могут вмешиваться в регуляцию аденилатциклазной активности на уровне *N*-белка, минуя рецептор.

Взаимодействуя с *N*-белком, такие эффекторы вызывают обратимые изменения его физического состояния. Так, на содержащих  $\beta$ -рецептор аденилатциклазных системах эритроцитов было показано, что активация аденилатциклазы катехоламинами сопровождается высвобождением связанных с *N*-белком гуаниловых нуклеотидов и одновременным связыванием экзогенных нуклеотидов. Например, при оккупации  $\beta$ -рецептора агонистом происходит высвобождение из мембран [ $^3\text{H}$ ] *GppNHp* или [ $^3\text{H}$ ] ГДФ после предварительной инкубации с мембранами [ $^3\text{H}$ ] *GppNHp* [103—105] или [ $^3\text{H}$ ] ГТФ [104], а также эндогенно связанного ГДФ [95, 104]. С другой стороны, прочная активация аденилатциклазы под действием *GppNHp* снижается, если отмытые от избытка *GppNHp* мембраны проинкубировать с ГТФ, ГМФ или АТФ в присутствии  $\beta$ -агониста [105—108]. Иными словами, катехоламины стимулируют обмен нуклеотидов в нуклеотид-связывающем центре *N*-белка. По-видимому, найденное на  $\beta$ -адренергических системах влияние гормонов на *N*-белок является ключевым и для других гормон-зависимых аденилатциклазных систем. Подтверж-

дением этому служат недавно полученные данные о том, что в эритроцитах индюка аденозин, действующий через аденозиновый рецептор *R*-типа, также стимулирует вытеснение из мембран ГДФ в присутствии ГМФ и освобождает нуклеотидный центр белка для активации под действием *GppNHp*. При этом, по-видимому, общий набор *N*-белков участвует в стимуляции аденилатциклазы аденозиновым и катехоламиновым рецепторами [109]. Молекулярной основой для наблюдаемых изменений скорости нуклеотидного обмена, возможно, служат индуцируемые при взаимодействии комплекса « $\beta$ -рецептор — агонист» с *N*-белком изменения физического состояния *N*-белка. В пользу такого предположения свидетельствует обнаруженный в лаборатории Джилмана факт обратимого изменения под влиянием  $\beta$ -агониста картины протеолитического расщепления [ $^{32}\text{P}$ ] АДФ-рибозилированного *N*-белка мембран эритроцитов [110].

Гуаниловые нуклеотиды и фторид также изменяют состояние *N*-белка. Показано, что после освобождения от ГДФ и связывания ГТФ  $\gamma\text{S}$  у фракции *N*-белка из эритроцитов голубя, почти полностью свободной от каталитического белка, коэффициент седиментации уменьшался от 5,5 до 3,4 *S* [28]. В лаборатории Джилмана наблюдали уменьшение массы *N*-белка, солюбилизованного из мембран клеток *S49*, от 130 000 до 90 000 дальтон при активации ГТФ  $\gamma\text{S}$  или фторидом и восстановление прежней массы после удаления эффекторов [17]. Этот феномен был показан и при измерении гидродинамических характеристик высокоомогенного *N*-белка. После активации эффекторами молекулярная масса *N*-белка из печени кролика уменьшалась от 70 000 до 50 000 дальтон [14], а *N*-белка из эритроцитов индюка — от 81 000 до 50 000 дальтон [15]. Эти факты могут указывать либо на диссоциацию *N*-белка на субъединицы в результате действия лигандов-эффекторов, либо на конформационный переход с аномальным изменением в результате этого кажущейся молекулярной массы. Предварительные данные об ингибирующей функции, выполняемой в *N*-белке полипептидом с массой 35 000 дальтон [33], могут свидетельствовать в пользу первого предположения; они дали исследователям возможность сделать вывод о том, что активация полипептида с массой 45 000 дальтон происходит после отделения от нее ингибирующего полипептида с массой 35 000 дальтон.

Индуцированные гуаниловыми нуклеотидами изменения физического состояния *N*-белка эритроцитов голубя обнаруживали также по изменению характера протеолиза трипсином  $^{32}\text{P}$  АДФ-рибозилированного мембранносвязанного *N*-белка [110]. Эти изменения выражались в уменьшении прочности связи протеолитических фрагментов с мембранами и появлении вместо нескольких минорных фрагментов крупного полипептида с молекулярной массой 41 000 дальтон. Они происходили также в мембранах эритроцитов человека, в которых рецептор и каталитический белок практически отсутствуют, а значит, не были связаны с белок-белковым

взаимодействием между рецептором и *N*-белком, *N*-белком и каталитическим белком.

Взаимодействуя с *N*-белком, гуаниловые нуклеотиды, фторид и ионы магния вызывают прочную ассоциацию *N*-белка с каталитическим белком, что также свидетельствует об изменении физического состояния *N*-белка. Так, методом молекулярных мишеней было показано, что в мембранах эритроцитов индюка в присутствии фторида или *GppNHp*, а также  $Mg^{2+}$  размер аденилатциклазной мишени увеличивается на 130 000 дальтон [36]. Эти же эффекторы в присутствии  $Mg^{2+}$  могут стабилизировать взаимодействие *N*-белка с акцепторными мембранными препаратами аденилатциклазы из клеток *сус*<sup>-</sup> и *UNC* в процессе реконструкции [111—113] и взаимодействие его с солюбилизованным каталитическим белком, что отражается в увеличении размера аденилатциклазного комплекса, определяемого гель-фильтрацией и центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [28, 51, 57, 58].

Характерной чертой активации *N*-белка является наличие медленной стадии, которая проявляется в виде лаг-периодов на графиках накопления продукта реакции. Исследователи, пытаясь установить природу медленной кинетики, приходят к заключению, что основной вклад в нее вносят медленные изменения конформации *N*-белка или способа взаимодействия его субъединиц. Так, работы, проведенные в лабораториях Джилмана [14, 15], Шрамма [88], Нир [10] и других, показали, что активация индивидуальных фракций *N*-белка гуаниловыми нуклеотидами или фторидом растянута во времени на десятки минут. В ходе реконструкции с каталитическим белком лимитирующей стадией является как раз активация *N*-белка, а не процесс взаимодействия *N*-белка с каталитическим или следующие за этим конформационные изменения каталитического белка [10, 88, 113]. Исходя из такого предположения, Бирнбаумер считает [114], что аденилатциклазу можно отнести к гистерезисным ферментам [115]. Однако возможно, что и другие медленные процессы, такие, как вытеснение эндогенного ГДФ из комплекса с *N*-белком в эритроцитах индюка [95, 109], тоже имеют значение для возникновения лаг-периодов. Здесь следует отметить, что медленная стадия обычно находится под контролем гормона [92—95, 107, 116, 117] и ионов  $Mg^{2+}$  [118]. В определенных условиях она появляется при активации фермента под действием ГТФ [118]. Длительность лаг-периода может зависеть от химического строения активирующего нуклеотида [56, 119].

### **Регуляторный и активный центры аденилатциклазного комплекса**

#### **Центры связывания эффлекторов на *N*-белке**

В 1982 г. появилось сообщение из лаборатории Джилмана [33] о прямом исследовании нуклеотид-связывающего регуляторного центра *N*-белка. Значение этого события можно оценить, если

принять во внимание, что до сих пор о наличии этого центра свидетельствовали лишь сродство неочищенных фракций *N*-белка к аффинным ГТФ-содержащим носителям и способность элюироваться с этих носителей другими гуаниловыми нуклеотидами [6, 7, 116], а также ковалентное включение [ $^3\text{H}$ ]P $^3$ -(4-азидоанилид)P $^1$ -ГТФ в *N*-белок мембран эритроцитов голубя [75].

Однако непосредственное изучение регуляторного участка неочищенного *N*-белка по взаимодействию с ним меченых нуклеотидов было связано с методическими трудностями. Только около 1—5% мест связывания [ $^3\text{H}$ ]GppNHp в плазматических мембранах являются специфическими по отношению к аденилатциклазной системе [6, 66, 105]. Взаимодействующую с *N*-белком фракцию [ $^3\text{H}$ ]GppNHp удавалось вычленить лишь в мембранах эритроцитов, вытесняя меченый нуклеотид изопрогеренолом в присутствии ГТФ [105], и в мембранах из сердца собаки, где неспецифически связанные нуклеотиды высвобождались после обработки мембран аденилил-5-имидодифосфатом в присутствии пропранолола, ЭДТА и GppNHp [120].

При изучении активации высокоомогенного *N*-белка, которая происходила параллельно связыванию [ $^{35}\text{S}$ ]ГТФ $\gamma$ S, удалось обнаружить только один класс связывающих участков [33]. Их концентрация равнялась 0,34 моль на моль *N*-белка. Учет возможной денатурации *N*-белка позволил исследователям сделать заключение о том, что одна молекула *N*-белка содержит один нуклеотид-связывающий центр. Использование меченого по фосфору азида ГТФ ([ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-8-N $_3$  ГТФ) позволило прямо показать, что нуклеотид-связывающий центр расположен на субъединицах с молекулярной массой 45 000 и 52 000 дельтон, но не на полипептиде с молекулярной массой 35 000.

По конкуренции различных нуклеотидов с [ $^{35}\text{S}$ ]ГТФ $\gamma$ S за регуляторный центр установлен порядок сродства нуклеотидов: ГТФ $\gamma$ S > ГТФ > GppNHp > ГДФ > 8-N $_3$ ГТФ >> ИТФ >> ГМФ.

Эти данные, полученные на высокоомогенном *N*-белке, довольно хорошо соответствуют данным о порядке сродства нуклеотидов к малоочищенным препаратам *N*-белка. Они получены косвенными способами по конкуренции за активацию аденилатциклазы неактивирующих нуклеотидов с активирующими [69, 72, 121], по конкуренции нуклеотидов со специфически связанной с *N*-белком фракцией [ $^3\text{H}$ ]GppNHp [120] и по эффективности элюции *N*-белка с ГТФ-содержащего носителя различными нуклеотидами [28].

Кроме центра связывания гуаниловых нуклеотидов *N*-белок содержит также участок, подвергающийся АДФ-рибозилированию. По аналогии со строением небелковых и некоторых белковых субстратов, способных участвовать в реакции АДФ-рибозилирования [122], а также по ингибированию реакции АДФ-рибозилирования *N*-белка метиловым эфиром *L*-аргинина [123] можно предполагать, что этот участок содержит остатки аргинина. Несомненным является тот факт, что два вышеуказанных участка различны, хотя и находятся на одной и той же субъединице *N*-белка

[32]. Об этом свидетельствуют наличие сродства к ГТФ-содержащим носителям у АДФ-рибозилированного *N*-белка [24, 27], а также возможность включения АДФ-рибозы в полипептиды 42 000 и 47 000 дальтон из печени крыс после связывания с ними [ $^3\text{H}$ ]GppNHp [123]. Однако точная локализация этого участка не известна.

Отсутствуют сведения также о расположении катионных локусов *N*-белка, чувствительных к нефизиологическому активатору, фтор-аниону [124]. В ранних работах на основании различий активации аденилатциклазы под действием GppNHp и NaF в чувствительности к трипсину и по другим непрямым критериям заключали, что эти виды активации связаны с различными белками [8, 64]. Однако поздние многочисленные работы [6, 7, 24, 125—127] свидетельствовали о том, что действие фторида направлено именно на *N*-белок. Это мнение получило окончательное подтверждение в результате экспериментов по реконструкции, где использовались мембранные препараты *N*-белка, лишённые каталитического белка [125, 126], или высокоомогенные препараты *N*-белка, полученные из холатных экстрактов [14, 15]. Кроме того, было показано, что фторидная стимуляция не определяется рецептором, так как она имеет место в клетках *UNC*, в которых нарушено сопряжение рецептора с *N*-белком [50]. По данным реконструкции каталитический белок также имеет значение для фторидной стимуляции [8, 111].

В последнее время обсуждается роль  $\text{Mg}^{2+}$  в активации аденилатциклазы. Действие  $\text{Mg}^{2+}$  направлено как на рецептор (перевод рецептора в состояние высокого сродства к агонистам), так и на каталитический белок (увеличение максимальной скорости аденилатциклазной реакции). Для осуществления действия  $\text{Mg}^{2+}$  абсолютным требованием является наличие в аденилатциклазной системе *N*-белка [50, 65, 111, 128].

Отсюда следует, что на *N*-белке должен быть расположен участок связывания свободного  $\text{Mg}^{2+}$ . И в самом деле, в лаборатории Бирнбаумера [113, 118] показана регулирующая роль ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , которые ускоряли процесс активации фракции *N*-белка гуаниловыми нуклеотидами и фторидом. Известно также, что удаление  $\text{Mg}^{2+}$  из мембран с помощью высоких концентраций ЭДТА вызывает высвобождение связанных гуаниловых нуклеотидов и предотвращает активацию аденилатциклазы под действием GppNHp [104, 129]. Участок связывания двухвалентных катионов изучался и на высокоомогенном *N*-белке [33]. При этом было показано, что  $\text{Mg}^{2+}$  абсолютно необходим для поддержания активированного состояния *N*-белка. Авторы полагают, что двухвалентные катионы могут регулировать медленную диссоциацию субъединиц *N*-белка. В этой работе показано также, что процессы активации — инактивации чувствительны также к  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  и  $\text{Sr}^{2+}$ , т. е. что участок связывания двухвалентных металлов не имеет абсолютной специфичности к катионам. Однако одновалентные катионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  эффекта не вызывали.

Термин «активация *N*-белка» стал упоминаться в литературе с развитием работ по кинетике реконструкции фракций, содержащих отдельно *N*-белок и каталитический белок [10, 14, 15, 88, 113, 118, 125, 126, 130]. Его следует понимать как изменения *N*-белка, необходимые для перевода каталитического белка аденилатциклазы в высокоактивное состояние.

Молекулярные события, приводящие к активации *N*-белка, связаны в первую очередь с функционированием ГТФ-связывающего центра, расположенного на субъединице 42 000 или 52 000 дальтон.

В исследованиях, проводимых на аденилатциклазе, почти не изученными являются два вопроса: каково строение центра связывания гуаниловых нуклеотидов и какие особенности химической структуры нуклеотидов являются необходимыми и достаточными для активации?

Разрешение этих вопросов позволило бы с помощью аналогов нуклеотидов направленно изменять регуляторные свойства *N*-белка. До сих пор изучение характеристик топографии регуляторного центра проводилось в основном лишь косвенными методами.

Тем не менее некоторые заключения на основании имеющихся данных сделать можно. Так, Шпигель с сотр. [7] показали, что ГТФ-агароза не обладает сродством к ГТФ-связывающим белкам аденилатциклазного комплекса в том случае, если ГТФ «пришит» через рибозу, но является хорошим аффинным сорбентом, если ГТФ «пришит» через  $\gamma$ -фосфат. Эти данные свидетельствуют о значительном вкладе кольца рибозы в сродство нуклеотида к регуляторному участку. И в то же время небольшие изменения в рибозной части молекулы 3'-дезоксигТФ не мешают активации аденилатциклазы и даже усиливают ее [131]. Интересно, что активирующие свойства ГТФ сохраняются и в некоторых случаях усиливаются при таких модификациях  $\gamma$ -фосфата, которые не затрагивают гидроксильной группы. К таким соединениям относятся *p*-фенилендиамин-ГТФ [7], гуанозин-5'-тетрафосфат [132], ГТФ $\gamma$ S [33, 116], P<sup>3</sup>-(4-азидоанилид)P<sup>1</sup>-ГТФ и P<sup>3</sup>-(N-(аминоэтил)-1-нафтиламин-8-сульфонат)P<sup>1</sup>-ГТФ [133]. В то же время прямое изучение ГТФ-связывающего центра гомогенного *N*-белка показало, что сродство к нему нуклеотидов уменьшается в ряду ГТФ > ГДФ > > ГМФ, т. е. число зарядов в фосфатном участке молекулы нуклеотида также имеет определенное значение для сродства [33].

В пользу высокого сродства регуляторного участка *N*-белка к азотистому основанию свидетельствует отсутствие активирующего действия в отличие от ГТФ, у ЦТФ, УТФ и 2-аминопуририбозидтрифосфата [116]. Прямым методом показано также, что ИТФ имеет к регуляторному центру меньшее сродство, чем ГДФ [33]. По-видимому, положения 2 и 6 пуринового основания особенно значимы для сохранения сродства, так как введение по-

этим положениям заместителей в молекуле  $GppNHp$  значительно уменьшает активирующие свойства нуклеотида и его способность связываться с плазматическими мембранами эритроцитов [133].

Установлено пока одно условие, достаточное для выполнения нуклеотид-связывающим центром активирующей функции. Оно заключается в присутствии  $\gamma$ -фосфата в молекуле гуанилового нуклеотида. Причем механизм активации не предполагает использование этого фосфата для фосфорилирования или пиррофосфорилирования, так как нуклеотиды с негидролизуемыми  $\beta$ - $\gamma$ - и  $\gamma$ - $\beta$ -связями не только не вызывают меньшего по сравнению с ГТФ активирующего эффекта, но, наоборот, активируют аденилатциклазу в несколько раз лучше, чем ГТФ. ГДФ имеет хотя и меньшее сродство к регуляторному центру  $N$ -белка, чем ГТФ,  $GppNHp$  или ГТФ $\gamma$ S [33], однако вполне достаточное для довольно прочного связывания нуклеотида. При этом ГДФ в большинстве аденилатциклазных систем ингибирует стимуляцию аденилатциклазы с помощью  $GppNHp$  [92, 93, 134] или катехоламинов [135]. ГДФ, в отличие от ГТФ $\gamma$ S, не вызывает активированного состояния у гомогенного  $N$ -белка [14, 15] и в процессе реконструкции частично очищенного  $N$ -белка с каталитическим белком не вызывает активации сам [125] и останавливает активацию, происходящую под действием  $GppNHp$  [136]. Гуанозин-5'-( $\alpha$ ,  $\beta$ -метилен)дифосфат ( $GpCH_2p$ ) ингибирует базальную и стимулируемую аденилатциклазную активность в мембранах печени крыс [137]. ГДФ и ГДФ $\beta$ S, в отличие от нуклеозидтрифосфатов, препятствуют ассоциации  $N$ -белка с каталитическим белком [10, 27, 28, 125]. Эндогенно связанный ГДФ до тех пор, пока не будет вытеснен из нуклеотид-связывающего центра, мешает проявлению воз действия гуанозинтрифосфатов на связывание агониста с  $\beta$ -рецептором и на активацию аденилатциклазы в эритроцитах голубя [95].

Для наблюдаемого в ряде мембранных систем [67, 74, 138, 139] слабого активирующего действия на аденилатциклазу ГДФ и ГДФ $\beta$ S характерным и общим наблюдением является увеличение лишь стимуляции под действием гормона и ингибирование в отсутствие гормонов ГТФ- или  $GppNHp$ -зависимой стимуляции. Возможно, что во всех этих случаях активирующее действие ГДФ и ГДФ $\beta$ S объясняется увеличением под действием этих нуклеотидов степени сопряженности гормон-рецепторного комплекса с  $N$ -белком. Это предположение подтверждается тем, что действие гуаниловых нуклеотидов на рецептор находится под одинаковым контролем со стороны ГДФ и ГТФ в некоторых аденилатциклазных системах [70, 79, 84, 86].

Однако точная роль, которую играет  $\gamma$ -фосфат в изменениях  $N$ -белка, не известна.

Особый интерес исследователей привлекает до сих пор не расшифрованный механизм активации  $N$ -белка под действием фтор-анионов. Фтор-анионы вызывают такие же изменения гидродинамических параметров  $N$ -белка, как негидролизуемые гуаниловые нуклеотиды [14, 15, 17], что приводит к ассоциации  $N$ -белка

с каталитическим белком и активации каталитической субъединицы.  $Mg^{2+}$  увеличивает эффект фторида на мембранах [81] во время реконструкции [111]. Йенгр и Бирнбаумер [118] показали, что  $Mg^{2+}$  абсолютно необходим для фторидной стимуляции, так же как и для нуклеотидной. Однако есть данные о том, что фторидная активация соответствует менее устойчивым изменениям *N*-белка, чем нуклеотидная. Так, в растворе активация гомогенного *N*-белка из печени кролика фторидом, в отличие от активации под действием ГТФ $\gamma$ S, обращается при удалении ионов фтора гель-фильтрацией [14]. Тиол-восстанавливающие агенты уменьшают степень ассоциации *N*-белка с каталитическим белком, вызываемую фторидом, но не *GppNHp* [57]. Нестабильность фторидной активации в растворе явилась причиной уменьшенной молекулярной массы фтор-активированной аденилатциклазы по сравнению с молекулярной массой *GppNHp*-активированного фермента [58, 59].

Различия двух видов активации *N*-белка следуют также из того наблюдения, что модификация *N*-белка АДФ-рибозилированием увеличивает ГТФ-зависимую стимуляцию аденилатциклазной активности и в то же время ингибирует фторидную активацию [24, 72, 103, 140]. Причем для ингибирования фторидной стимуляции требуется большая глубина модификации *N*-белка, чем для появления высокой ГТФ-зависимой активации.

Фторид, по-видимому, может стимулировать *N*-белок, не занятый гуаниловыми нуклеотидами, так как после обработки мембран эритроцитов индюка ЭДТА в присутствии изопротеренола, вытесняющей гуаниловые нуклеотиды, фторидная активация в присутствии  $Mg^{2+}$  все равно происходит [141]. Фторид не изменяет параметров связывания нуклеотидов в регуляторном участке *N*-белка [127]. Однако гуаниловые нуклеотиды могут модулировать величину фторидной активации, так как посадка ГМФ в свободном нуклеотид-связывающем центре *N*-белка предотвращает ее [127]. ГДФ $\beta$ S также мешает фторидной стимуляции [127, 138] и возвращению фторидной чувствительности мембранам клеток *сус* при реконструкции [126]. Однако другие нуклеотиды (ГДФ, ГТФ, *GppNHp*) увеличивают фторидную стимуляцию [127, 142]. Фторид способствует также ассоциации оккупированного ГДФ *N*-белка с каталитическим [28, 118]. Таким образом, в механизме активирующего действия фторида по-прежнему остается много неясных моментов. На наш взгляд, особенно интересным является тот факт, что в присутствии ГДФ фторид может переводить *N*-белок в активированное состояние, т. е. отсутствие  $\gamma$ -фосфата у взаимодействующего с *N*-белком нуклеотида еще не является абсолютно ограничивающим активацию фактором.

Активация аденилатциклазы в ответ на гормональный сигнал происходит в результате прочного белок-белкового взаимодействия *N*-белка с каталитическим белком. В результате этого увеличивается максимальная скорость ферментативной реакции. В отличие от медленных изменений *N*-белка активация каталитического белка происходит быстро. Быструю и обратимую активацию каталитического белка может осуществлять дитерпен форсколин, выделяемый из корней *Coleus forskohlii* [143]. Эта активация не опосредована через *N*-белок, кальмодулин или через рецептор, так как осуществляется в мембранах клеток *сус*<sup>-</sup> и не ингибируется под действием ЭГТА,  $\beta$ -блокаторов или ГДФ $\beta$ S. Форсколин не изменяет структуру мембраны, так как активируется и растворимая аденилатциклаза из семенников крыс, и солюбилизованная аденилатциклаза из мозга крысы. Причем в семенниках крыс форсколин переводит каталитический белок из  $Mn^{2+}$ -чувствительного в  $Mg^{2+}$ -чувствительное состояние. Предполагают, что форсколин взаимодействует непосредственно с каталитическим белком или с еще не известным компонентом аденилатциклазного комплекса. Но не исключена возможность модуляции активности и *N*-белка, так как некоторые гормоны активируют аденилатциклазу сильнее в присутствии форсколина [144].

Примером другого взаимодействия, приводящего к активации каталитического белка, является его взаимодействие с кальмодулином. В лаборатории Нира отделенный от *N*-белка каталитический белок из мозга активировался кальмодулином, и при реконструкции с *N*-белком кальмодулин не влиял на скорость и величину активации аденилатциклазы под действием *GppNHp* [145]. Независимость кальмодулиновой активации от ГТФ и аддитивность ее с активацией аденилатциклазы под действием *GppNHp* показаны также на частично очищенной аденилатциклазе из мозга быка [146]. Кроме того, кальмодулин активирует нечувствительную к гуаниловым нуклеотидам и не содержащую *N*-белка аденилатциклазу из *Bordetella pertussis* [147]. В настоящее время трудно сказать, какое физиологическое значение может иметь стимуляция аденилатциклазы под действием кальмодулина, которая, судя по аддитивности двух эффектов, может осуществляться путем, отличным от механизма активации аденилатциклазы гормонами.

Как было показано недавно [148], каталитический белок аденилатциклазы из клеток *сус*<sup>-</sup> содержит аллостерический центр связывания двухвалентных катионов, который имеет высокое сродство к  $Mn^{2+}$  ( $K_m=0,3-0,7$  мМ) и низкое сродство к  $Mg^{2+}$  ( $K_m=2-6$  мМ). Во время реконструкции с предварительно активированным *N*-белком из мембран эритроцитов индюка активация каталитического белка существенно зависит от наличия в среде свободных ионов  $Mg^{2+}$ , т. е. определяется работой аллостерическо-

го центра, скорее всего, расположенного на каталитическом белке и идентичного аллостерическому центру, определяемому в отсутствие *N*-белка.

Не установлена роль так называемого *P*-участка, ответственного за ингибирование аденилатциклазы аденозином и его аналогами [149]. *P*-участок специфичен к пуриновому основанию и наибольший ингибирующий эффект дают модифицированные по рибозе аналоги аденозина. *P*-участок легко отличить от мембраносвязанного аденозинового рецептора, который активируется или ингибируется меньшими концентрациями аденозина, специфичен к рибозе и ингибируется метилксантинами. Ингибирование аденилатциклазы через *P*-участок обнаружено в подавляющем большинстве исследованных аденилатциклазных систем [149]. Он отличен от активного центра аденилатциклазы, так как 9-(тетрагидро-2-фурил)аденин [150, 151] и 2',5'-дидезоксиаденозин [151] и аденозин [152] ингибируют аденилатциклазу неконкурентно по отношению к  $Mg^{2+}$ -АТФ. Однако он не имеет отношения и к *N*-белку. Об этом свидетельствуют данные, полученные на эритроцитах индюка, где 2',5'-дидезоксиаденозин не влияет ни на обмен нуклеотидов в регуляторном центре *N*-белка, ни на взаимодействие с *N*-белком, но вызывает быстрое ингибирование аденилатциклазы, предварительно активированной *GppNHp* [109]. В гибридных клетках *NG* 108-15 2'-дидезоксиаденозин также быстро ингибирует аденилатциклазу в мембранах, предварительно обработанных *GppNHp*, однако эффект аналога аденозина обратим и активация фермента полностью восстанавливается после удаления нуклеозида из мембран отмывкой [153]. Вышеперечисленные данные могут свидетельствовать в пользу расположения *P*-участка на каталитическом белке, однако прямо это не показано. Ингибирующий эффект аналогов аденозина может заключаться в том, что они препятствуют реализации активирующего действия *N*-белка на уровне его взаимодействия с каталитическим белком или на уровне активации каталитического белка. Следует также отметить, что ингибирование аденилатциклазы через *P*-участок контролируется ионами  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  [149, 150, 152].

Физические свойства каталитического белка аденилатциклазы практически не изучены. Причиной отсутствия информации являются существенные потери каталитического белка, не связанного с *N*-белком, происходящие в процессе его очистки в результате инактивации [61]. Наиболее правильное представление о характеристиках каталитического белка можно получить, изучая биологические препараты, функционально лишенные *N*-белка. К ним относятся линия клеток лимфомы *S49, sus<sup>-</sup>* [115, 123], цитозольные фракции семенников крыс [22, 47], а также растворимые аденилатциклазы низших организмов [43—45]. Как уже упоминалось выше, общим свойством для этих белков является сильное увеличение активности в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ , но не  $Mg^{2+}$ . Определяется ли это обстоятельство свойствами связывающего ионы двухвалентных металлов аллостерического центра или раз-

личием в сродстве к активному центру Mg-АТФ<sup>2-</sup> и Mn-АТФ<sup>2-</sup>, не известно. В случае клеток *сус* было, например, показано, что  $K_m$  для обоих субстратов одинакова и составляет 0,1—0,2 мМ [148]. В луброльных экстрактах плазматических мембран клеток *сус*—Mn<sup>2+</sup>-зависимая активность аденилатциклазы чувствительна к некоторым протеазам и сульфгидрильным препаратам [115, 123].

#### Активный центр каталитического белка

Изучению активного центра аденилатциклазы посвящено относительно небольшое количество работ. С одной стороны, это обстоятельство связано с отсутствием методов получения стабильных гомогенных препаратов каталитического белка из тканей млекопитающих. С другой стороны, слабое развитие этого направления исследований в течение ряда лет определялось общей направленностью усилий экспериментаторов на разрешение вопросов регуляции аденилатциклазного комплекса.

В данном разделе будут обобщены разрозненные сведения, которые позволяют сделать некоторые выводы о строении активного центра аденилатциклазы.

Большинство из этих данных получено благодаря применению структурных аналогов субстрата реакции — АТФ. Использование аналогов субстрата расширяет методические возможности изучения механизмов каталитических реакций негомогенных ферментов.

К альтернативным субстратам аденилатциклазы относятся: 2'-дезоксаденозин-5'-трифосфат [154, 155], аденилил-5'-имидодифосфат [72], аденозин-5'-(P<sup>3</sup>-тиотрифосфат) [156], аденозин-5'-(P<sup>1</sup>-тиотрифосфат) [157], аденин-арабинонуклеозид-5'-трифосфат [158], туберцидин-5'-трифосфат [159] и формицин-5'-трифосфат [159, 160]. При сравнении их структуры обнаруживается, что субстратная специфичность ограничена, как правило, адениновым основанием. На сродстве субстрата к ферменту не отражается модификация пятичленного кольца гетероциклического основания в положениях 8 и 9, переводящая адениновое основание в формициновое [160]. Слабое ингибирование аденилатциклазы, свидетельствующее о низком сродстве к активному центру пиримидинового кольца, показано для пиримидиновых нуклеозид-5'-трифосфатов (ТТФ, ЦТФ, dТТФ и УТФ) [161].

Таким образом, важность вклада гетероциклического основания в сродство АТФ к активному центру аденилатциклазы не подлежит сомнению. Однако детерминанты этого сродства известны лишь приблизительно. Роль такой детерминанты, возможно, выполняет аминокгруппа аденина, расположенная в положении 6. Возможно, что она отвечает за взаимодействие с сульфгидрильной группой, о существовании которой свидетельствует чувствительность каталитического компонента аденилатциклазы из клеток *сус* к сульфгидрильным ядам [115, 123].

Особый интерес представляет характеристика взаимодействия с ферментом трифосфатного участка субстрата. Во-первых, этот

участок несет в себе группу, подвергающуюся нуклеофильной атаке во время каталитического акта ( $\alpha$ -фосфат), и одновременно пирофосфатную группу, отщепляющуюся в результе катализируемой реакции. Во-вторых, именно с поликатионным фосфатным участком связывается ион двухвалентного металла, без которого невозможна работа аденилатциклазы.

К настоящему времени изучено действие на аденилатциклазу нескольких аналогов АТФ, имеющих модификации по трифосфатной цепи. Аденозин-5'-( $\alpha,\beta$ -метилен)трифосфат и аденозин-5'-( $P^1$ -тиотрифосфат) обладают таким же сродством к ферменту, как и АТФ [148, 150]. В то же время показано, что аденозин-5'-( $\alpha,\beta$ -метилен)тетрафосфат ( $ApCH_2pppp$ ) является более сильным, а аденозин-5'-( $\alpha,\beta$ -метилен)дифосфат ( $ApCH_2p$ ) — более слабым ингибитором, чем аденозин-5'-( $\alpha,\beta$ -метилен)трифосфат ( $ApCH_2pp$ ) [150], а сродство к ферменту аналогов, содержащих серу, уменьшается в следующем порядке: аденозин-5'-( $P^1$ -тиотрифосфат) > аденозин-5'-( $P^1$ -тиодифосфат) > аденозин-5'-( $P^1$ -тиомонофосфат) [148]. Изменение сродства ингибиторов в данных случаях происходило, очевидно, только благодаря изменению числа фосфатных групп.

Так как введение метиленового мостика вместо кислородного в молекуле АТФ не влияет на заряд или общую длину полифосфатной цепи [57], можно считать, что вышерассмотренные примеры свидетельствуют об определенной роли фосфатного участка в связывании субстрата аденилатциклазой. Это заключение подтверждается также меньшим сродством к аденилатциклазе продукта реакции — цАМФ — по сравнению с субстратом [162].

Совершенно не исследованным является вопрос о реальной конформации субстрата в активном центре аденилатциклазы. Не известна ориентация основания относительно рибозы. Не ясно также расположение трифосфатного участка. Последний момент особенно важен в связи с тем, что для осуществления реакции циклизации необходимо сближение  $\alpha$ -фосфата с 3'-гидроксильной группой рибозы.

Некоторый свет на эти вопросы проливают данные о наличии субстратных свойств у формицин-5'-трифосфата [159, 160]. Рентгеноструктурное исследование кристаллов формицина показало, что, в отличие от аденозина, имеющего антиконформацию вокруг гликозидной связи и гош-гош-конформацию вокруг связи С(4')—С(5'), формицин имеет промежуточные син-анти- и гош-трансконформации. Как считают Прусинер с сотр. [35], перечисленные изменения сохраняются и у формицин-5'-монофосфата и у полиформицина. Поэтому участие формицин-5'-трифосфата в реакции циклизации может свидетельствовать о допустимости некоторой степени конформационной свободы вокруг этих связей у молекулы АТФ в активном центре аденилатциклазы.

Большой интерес представляют проведенные недавно Экштейном с соавт. [157] на аденилатциклазе мозга и другими авторами [163, 164] на бактериальном ферменте исследования стереохимии

реакции. Во всех трех работах обнаружена происходящая в ходе прямой или обратной реакции инверсия конфигурации при  $\alpha$ -атоме фосфора, свидетельствующая об одностадийном механизме без образования промежуточного аденилированного фермента.

Идентификация функциональных групп активного центра аденилатциклазы до сих пор фактически не проводилась. Необратимое ингибирование аденилатциклазы было показано только с помощью неспецифических реагентов, модифицирующих аргинин,— 2,3-бутандиона и фенолглиоксаля [165, 166]. Доказательством расположения модифицируемой группы в активном центре служила защита фермента от инактивации субстратом аденилатциклазы.

Чувствительность каталитического компонента аденилатциклазы к сульфгидрильным ядам [115, 123] свидетельствует о наличии необходимой для поддержания активности сульфгидрильной группы. Однако вышеперечисленные работы не дают более точных сведений о местонахождении этих функциональных групп в белке или их роли в катализе или связывании субстрата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ross E. M., Gilman A. G. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* 49, 533—564.
2. Limbird L. E., Lefkowitz R. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 799—802.
3. Limbird L. E., Hickey A. R., Lefkowitz R. J. (1979) *J. Cycl. Nucl. Res.* 5, 251—259.
4. Haga T., Haga K., Gilman A. G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5776—5782.
5. Vauquelin G., Geynet P., Hanoune J., Strosberg A. D. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3710—3714.
6. Pfeuffer T. (1977) *Biol. Chem.* 252, 7224—7234.
7. Speigel A. M., Downs R. W., Aurbach G. D. (1979) *J. Cycl. Nucl. Res.* 5, 3—17.
8. Ross E. M., Howlett A. C., Ferguson K. M., Gilman A. G. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6401—6412.
9. Ross E. M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1949—1953.
10. Strittmatter S., Neer E. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6344—6348.
11. Johnson G. L., Kaslow H. R., Bourne H. R. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7120—7123.
12. Limbird L. E., Gill D. M., Lefkowitz R. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 775—779.
13. Northup J. K., Sternweis P. C., Smigel M. D. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6516—6520.
14. Sternweis P. C., Northup J. K., Smigel M. D., Gilman A. G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11517—11526.
15. Hanski E., Sternweis P. C., Northup J. K. et al. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12911—12919.
16. Kaslow H. R., Johnson G. L., Brothers V. M. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3736—3741.
17. Howlett A. C., Gilman A. G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2861—2866.
18. Neer E. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1498—1502.
19. Farfel Z., Kaslow H. R., Bourne H. R. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1237—1241.
20. Coderre J. A., Gerlt J. A. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6594—6597.
21. Neer E. J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6527—6531.
22. Neer E. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5808—5812.

23. Herman C. A., Zahler W. L., Doak G. A., Campbell B. J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 622—629.
24. Cassel D., Pfeuffer T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2669—2673.
25. Gill D. M., Meren R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 3050—3054.
26. Kaslow H. R., Farfel Z., Johnson G. L. et al. (1979) *Mol. Pharmacol.* 15, 472—483.
27. Downs R. W., Reen S. A., Levine M. A. et al. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 284—290.
28. Pfeuffer T. (1979) *FEBS Lett.* 101, 85—89.
29. Kaslow H. R., Cox D., Groppi V. E., Bourne H. R. (1981) *Mol. Pharmacol.* 19, 406—410.
30. Schleifer L. S., Kahn R. A., Hanski E., et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 20—23.
31. Hudson T. H., Johnson G. L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7480—7486.
32. Cooper D. M. F., Jagus R., Somers R. L. S., Rodbell M. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1179—1185.
33. Northup J. K., Smigel M. D., Gilman A. G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11416—11423.
34. Atlas D., Levitski A. (1978) *Nature* 272, 370—371.
35. Prusiner P., Brennan T., Sundaralingam M. (1973) *Biochemistry* 12, 1196—1202.
36. Nielsen T. B., Lad P. M., Preston M. S. et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 722—726.
37. Limbird L. E., Lefkowitz R. J. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 228—232.
38. Houslay M. D., Ellory J. C., Smith G. A. et al. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 467, 208—219.
39. Schlegel W., Kempner E. S., Rodbell M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5168—5176.
40. Smith S. K., Limbird L. E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 4026—4030.
41. Londos C., Lad P. M., Nielsen T. B., Rodbell M. (1979) *J. Supramol. Struct.* 10, 31—37.
42. Naya-Vigne J., Johnson G. L., Bourne H. R., Coffino P. (1978) *Nature* 272, 720—722.
43. Flawia M. M., Torres H. N. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6880—6883.
44. Paveto C., Epstein A., Passaron S. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 449—457.
45. Franco daSilveira J., Zingales B., Colli W. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 481, 722—733.
46. Braun T., Dods R. F. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 1097—1101.
47. Braun T., Frank H., Dods R., Sepsenwol S. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 481, 227—235.
48. Neer E. J. (1981) *FEBS Lett.* 125, 134—136.
49. Limbird L. E., Hickey A. R., Lefkowitz R. J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2677—2683.
50. Cech S. Y., Broaddus W. C., Maguire M. E. (1980) *Mol. Cell. Biochem.* 33, 67—92.
51. Neer E. J., Echeverria D., Knox S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9782—9789.
52. Tolkovsky A. M., Braun S., Levitzki A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 213—217.
53. Westcott K. R., LaPorte D. C., Storm D. R. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 204—208.
54. Toscano W. A., Westcott K. R., LaPorte D. C. et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 5582—5586.
55. Bitonti A. J., Moss J., Hjeltnelund L. et al. (1982) *Biochemistry* 21, 3650—3653.

56. Neer E. J., Salter R. S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5497—5503.
57. Guillon G., Cantau B., Jard S. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 401—406.
58. Guillon G., Couraud P. O., Roy C. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 855—861.
59. Goldhammer A., Cook G. H., Wolff J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 6918—6922.
60. Stengel D., Hanoune J. (1979) *Eur. J. Biochem.* 102, 21—34.
61. Kornblihtt A. R., Flawia M. M., Torres H. N. (1981) *Biochemistry* 20, 1262—1266.
62. Takai K., Kurashina Y., Susuki-Hori C. et al. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1965—1972.
63. Neufeld G., Schramm M., Weinberg N. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9268—9274.
64. Ross E. M., Gilman A. G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6966—6969.
65. Sternweis P. C., Gilman A. G. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3333—3340.
66. Welton A. F., Lad P. M., Newby A. C. et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5947—5950.
67. Iyengar R., Birnbaumer L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 3189—3193.
68. Iyengar R., Swartz T. L., Birnbaumer L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1119—1123.
69. Ross E. M., Maguire M. E., Sturgill T. W. et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5761—5775.
70. Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L. et al. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1872—1876.
71. Levitzki A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 628, 419—424.
72. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H. M. J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1877—1882.
73. Jakobs K. H. (1979) *Mol. Cell. Endocrinol.* 16, 147—156.
74. Kimura N., Nagata N. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3829—3835.
75. Johnson G. S., Mukku V. R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 95—100.
76. Limbird L. E., Gill D. M., Stadel J. M. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1854—1861.
77. Kent R. S., DeLean A., Lefkowitz R. J. (1980) *Mol. Pharmacol.* 17, 14—23.
78. Lefkowitz R. J., Mullikin D., Caron M. G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4686—4692.
79. Lefkowitz R. J. (1979) *Mol. Pharmacol.* 16, 61—68.
80. Williams L. T., Lefkowitz R. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7207—7213.
81. Bird S. J., Maguire M. E. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8826—8834.
82. Williams L. T., Mullikin D., Lefkowitz R. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2984—2989.
83. Stadel J. M., DeLean A., Lefkowitz R. J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1436—1441.
84. Zahnizer N. R., Malinoff P. B. (1978) *Nature* 275, 453—455.
85. Lin M. C., Nicosia S., Lad P. M., Rodbell M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2790—2792.
86. Berrie C. P., Birdsall N. J. M., Burden A. S. V., Hulme E. C. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 1000—1005.
87. Sibley D. R., DeLean A., Creese I. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6351—6361.
88. Citri Y., Schramm M. (1980) *Nature* 287, 297—300.
89. Stadel J. M., Lefkowitz R. J. (1979) *Mol. Pharmacol.* 16, 709—718.
90. Tsai B. S., Lefkowitz R. J. (1978) *Mol. Pharmacol.* 14, 540—548.
91. Vauquelin G., Bottari S., Strosberg A. D. (1980) *Mol. Pharmacol.* 17, 163—171.
92. Salomon Y., Lin M. C., Londos C. et al. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4239—4245.

93. Blume A. J., Foster C. J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3399—3404.
94. Northup J. K., Mansour T. E. (1978) *Mol. Pharmacol.* 14, 820—833.
95. Lad P. M., Nielsen T. B., Preston M. S. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 988—995.
96. Limbird L. E., DeLean A., Hickey A. R. et al. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 586, 298—314.
97. Cassel D., Selinger Z. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 452, 538—551.
98. Pike L. J., Lefkowitz R. J. (1980) *J. Cycl. Nucl. Res.* 4, 27—34.
99. Bitonti A. J., Moss J., Tandon N. N., Vaughan M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2026—2029.
100. Lambert M., Svoboda M., Christophe J. (1979) *FEBS Lett.* 99, 303—307.
101. Kimura N., Shimada N. (1980) *FEBS Lett.* 117, 172—174.
102. Moss J., Vaughan M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 3621—3624.
103. Cassel D., Selinger Z. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 3307—3311.
104. Cassel D., Selinger Z. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4155—4159.
105. Cassel D., Selinger Z. (1977) *J. Cycl. Nucl. Res.* 3, 11—22.
106. Sevilla N., Levitzki A. (1977) *FEBS Lett.* 76, 129—134.
107. Sevilla N., Steer M. L., Levitzki A. (1976) *Biochemistry* 15, 3493—3499.
108. Arad H., Rimon G., Levitzki A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1593—1597.
109. Lad P. M., Nielsen T. B., Londos C. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10841—10846.
110. Hudson T. H., Roeber J. F., Johnson G. L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1459—1465.
111. Howlett A. C., Sternweis P. C., Macik B. A. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2287—2295.
112. Abramowitz J., Iyengar R., Birnbaumer L. (1979) *Mol. Cell. Endocrinol.* 16, 129—146.
113. Iyengar R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11042—11050.
114. Iyengar R., Abramowitz J., Bordelon-Riser M. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3558—3564.
115. Frieden C. (1979) in *Annu. Rev. Biochem.* (Snell E. E., Boyer P. D., Meister A., Richardson C. C., eds.), Vol. 48, p. 471—489, *Ann. Rev. INC.*
116. Pfeuffer T., Helmreich E. J. M. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 867—876.
117. Powell J. T., Brew K. (1976) *Biochemistry* 15, 3499—3505.
118. Iyengar R., Birnbaumer L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11036—11041.
119. Birnbaumer L., Swartz T. L., Abramowitz J. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3542—3551.
120. Baker P. S., Potter L. T. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7925—7931.
121. Lefkowitz R. J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6119—6124.
122. Moss J., Vaughan M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2455—2457.
123. Ward W. H. J., Van Heyningen S. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 928—934.
124. Drummond G. I., Duncan L. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 976—983.
125. Nielsen T. B., Lad P. M., Preston M. S., Rodbell M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 143—155.
126. Nielsen T. B., Downs R. W., Spiegel A. M. (1980) *Biochem. J.* 190, 439—443.
127. Downs R. W., Spiegel A. M., Singer M. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 949—954.
128. Bird S. J., Maguire M. E. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8826—8834.
129. Spiegel A. M., Brown E. M., Fedak S. A. et al. (1976) *J. Cycl. Nucl. Res.* 2, 47—56.
130. Neufeld G., Schramm M., Weinberg N. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9268—9274.

131. Salomon Y., Lin M. C., Londos C. et al. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4239—4245.
132. Ignarro L. J., Gross R. O. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541, 170—180.
133. Pfeuffer T., Eckstein F. (1976) *FEBS Lett.* 67, 354—358.
134. Levinson S. L., Blume A. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3766—3774.
135. Ткачук В. А., Авдонин П. В., Панченко М. П. (1981) *Биохимия* 46, 333—341.
136. Strittmatter S., Neer E. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6344—6348.
137. Londos C., Lin M. C., Welton A. F. et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5180—5182.
138. Eckstein F., Cassel D., Levkovitz H. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9829—9834.
139. Harwood J. P., Löw H., Rodbell M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6239—6245.
140. Lin M. C., Welton A. F., Berman M. F. (1978) *J. Cycl. Nucl. Res.* 4, 159—168.
141. Cassel D., Eckstein F., Lowe M. et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9835—9838.
142. Pfeuffer T. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7224—7234.
143. Seamon K., Daly J. W. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9799—9801.
144. Seamon K., Padgett W., Daly J. W. (1981) *Fed. Proc.* 40, 1728.
145. Salter R. S., Krinks M. H., Klee C. B., Neer E. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9830—9833.
146. Heideman W., Wierman B. M., Storm D. R. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 1462—1465.
147. Wolff J., Cook G. H., Goldhammer A. R., Berkowitz S. A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 3841—3844.
148. Somkuti S. G., Hildebrandt J. D., Herberg J. T. et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6387—6393.
149. Londos C., Wolff J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5482—5486.
150. Weinryb I., Michel I. M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334, 218—225.
151. Haslam R. J., Davidson M. M. L., Desjardins J. V. (1978) *Biochem. J.* 176, 83—95.
152. Londos C., Preston M. S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5951—5956.
153. Tolkovsky A. M. (1980) *FEBS Lett.* 116, 165—168.
154. Bär P., Hechter O. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 192, 141—144.
155. Tao M., Huberman A. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 236—240.
156. Bar H. P., Simonson L. P., Eckstein F. (1974) *FEBS Lett.* 41, 199—202.
157. Eckstein F., Romaniuk P. J., Heideman W. et al. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9118—9120.
158. Ortiz P. J. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1728—1733.
159. Zimmerman T. P., Wolberg G., Duncan G. S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8792—8797.
160. Rossomando E. F., Jahngen J. H., Eccleston J. F. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 2278—2282.
161. Perkins J. P. (1973) in *Advances in Cyclic Nucleotide Research* (Greengard P. and Robinson G. A. eds.), v. 3, p. 1—64, Raven Press, N. Y.
162. Weinryb I., Michel I. M., Hess S. M. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 240—249.
163. Gerlt J. A., Coderre J. A., Wolin M. S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 331—334.
164. Coderre J. A., Gerlt J. A. (1980) *J. Amer. Chem. Soc.* 102, 6549—6597.
165. Varimo K., Londesborough J. (1979) *FEBS Lett.* 106, 153—156.
166. Franks D. J., Tunncliffe G., Ngo T. T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 359—362.

# МОДЕЛЬ РЕЦЕПТОРА ЦИТОКИНИНОВ. II. СВЯЗЫВАНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЯ ПРИ N(6) АДЕНИНА

А. Б. Рахманинова, Л. С. Ягужинский

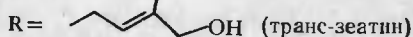
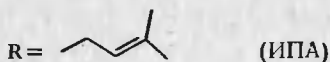
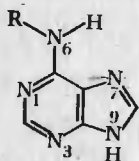
(Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ; ЦНИЛ 2-МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова)

Общепринятым подходом к изучению проблемы специфичности взаимодействия низкомолекулярных биологически активных веществ с субклеточными структурами является сопоставление химической структуры и биологической активности различных соединений [1—7]. Этот подход позволил установить организацию активных центров ряда ферментов [1, 2], а также структуру ряда гормональных рецепторов [3—7]<sup>1</sup>.

Серия наших работ посвящена изучению принципов связывания гормонов со специфическими для них рецепторами [7, 4]. В то же время разработанная нами методология анализа связи химической структуры и биологической активности аналогов гормонов может быть использована и в энзимологии при изучении активных центров ферментов.

Данная работа является продолжением исследования структуры рецептора растительных гормонов класса цитокининов на основе систематического анализа данных литературы по цитокининовой активности различных соединений.

В природных  
гормонах:



Ранее, в первой части этой работы (см. подробно [4]), мы анализировали свойства соединений, модифицированных по адениновому ядру и имеющих сходные по свойствам  $R_{N(6)}$ . Было показано, что в связывании с цитокининовым рецептором участвуют атомы N(3) и N(7) аденина как доноры электронов и —N(6)H-группа аденина как донор подвижного протона. По нашим данным, размеры области связывания аденинового ядра должны существенно превышать его размеры [4]. Эти факты были объяснены в рамках модели индуцированного соответствия: исходно далекие друг от

<sup>1</sup> Здесь и ниже под рецептором подразумевается та часть его молекулы, в которой происходит непосредственное связывание гормона.

друга лиганды рецептора при сорбции цитокинина сближаются с адениновым ядром последнего [4]. Было показано также, что для образования активного гормон-рецепторного комплекса достаточно взаимодействия с рецептором любых двух из указанных выше центров аденина: функциональная роль этих связей, по нашему предположению, должна сводиться к фиксации плоскости аденинового ядра цитокининов относительно области сорбции  $R_{N(6)}$  (см. [4]).

Настоящая, вторая, часть нашего исследования посвящена изучению вопроса о том, как происходит сорбция на цитокининовом рецепторе второй части молекулы цитокининов —  $R_{N(6)}$ . При этом анализировались свойства  $N(6)$ -замещенных — производных немодифицированного аденина.

### Связывание $R_{N(6)}$ с цитокининовым рецептором

Известно, что цитокининовой активностью обладают только  $N(6)$ -замещенные производные аденина, и что цитокининовая активность сильно зависит от структуры  $R_{N(6)}$  [8—11].

Можно было бы принять модель, согласно которой с цитокининовым рецептором связывается только адениновое ядро гормона, а роль  $R_{N(6)}$  сводится к изменению способа связывания аденинового ядра. Действительно, известно, что введение уже метильной группы в положение 6 аденина меняет способность образования водородных связей атомов  $N(1)$  и  $N(6)H$  аденина [12]. Однако факт существования зависимости цитокининовой активности от строения  $R_{N(6)}$ , больших по размерам, чем метильная группа (см. табл. 1—3), а также факт наличия цитокининовой активности у 6-замещенных производных гипоксантина, 6-метилпурина и 6-меркаптопуринов [13—15] говорит о том, что  $R_{N(6)}$  непосредственно связывается с рецептором.

В соответствии с этими фактами единственно приемлемой представляется модель двухцентрового связывания цитокининов. Основным положением этой модели является предположение о существовании специального центра рецептора, на котором связывается  $R_{N(6)}$ . При этом цитокининовая активность соединения зависит от эффективности связывания как аденинового ядра, так и  $R_{N(6)}$ .

### Стерические параметры области связывания $R_{N(6)}$ на рецепторе

*Конфигурация области связывания  $R_{N(6)}$ .* В работах С. М. Хешта и Н. Дж. Леонарда [16] отмечено, что по-видимому, для связывания с рецептором оптимальной является «плоская» конформация  $R_{N(6)}$ , при которой все атомы углерода  $R_{N(6)}$  лежат в плоскости связи  $N(6)$ — $C_2$ . К этому выводу авторы пришли при анализе цитокининовой активности аналогов 6- $\Delta^2$ -*i*-пентениладенина (см. IX и V, XXXV, XXXVI в табл. 1).

Проведенное нами сравнение более широкого класса соедине-

Таблица I  
Цитохимическая активность N (6)-замещенных аденинов. Соединения, подчиняющиеся основным корреляциям I и II

№ п	RN(6)	Среднее зн.		Литература	№ п	RN(6)	Среднее зн.		Литература
		Сх, п	Сх, ИПА (тест I)				Сх, п	Сх, ИПА (тест I)	
1	2	3	4	5	6	7	8		

Соединения, подчиняющиеся основной корреляции I (рис. 2)

ба л к л а д е н и н ы									
I	метил <sup>1</sup>	4,10	[29]	II	этил	2,32	[30, 31]		
III	пропил	2,64	[30, 31]	IV	бутил	1,15	[30, 31, 22]		
V	i-амил	0,79	[30, 22, 32—36]	VI	n-амил	0,69	[30]		
VII	аллил	2,40	[30]	VIII	Δ <sup>2</sup> -бутенил	1,26	[22]		
IX	Δ <sup>2</sup> -i-пентенил	0,00	(по определению)	X	3-Cl-транс-Δ <sup>2</sup> -бутенил	-0,01	[16]		
XI	3-Cl-цис-Δ <sup>2</sup> -бутенил	0,25	[16]	XII	Δ <sup>2</sup> -i-пентил	0,28	[32]		
XIII	фенил <sup>2</sup>	0,74	[30, 31, 37]	XIV	бензил <sup>2</sup>	0,63	[30, 13, 38, 39]		
XV	o-Ф-бензил <sup>2,3</sup>	0,67	[40]	XVI	m-Ф-бензил <sup>2,3</sup>	1,15	[40]		
XVII	m-Ф-бензил <sup>2,3</sup>	0,67	[40]	XVIII	2-фурфурил	0,88	[30, 22, 32, 34]		
XIX	2-тенил	0,88	[30, 31, 27]	XX	транс-стрирал-пурин <sup>4</sup>	0,63	[15]		

ба ц и л а д е н и н ы<sup>5</sup>

XXI	ацетил	4,26	[41, 42]	XXII	пропионил	3,71	[41, 42]		
XXIII	бутироил	2,66	[41, 42]	XXIV	валероил	1,50	[41, 42]		
XXV	бензоил <sup>6</sup>	0,28	[41, 43]						
XXXVI	N-пропилкарбамоил	2,26	[37]	XXVII	N-i-пропилкарбамоил	1,87	[37]		
XXXVIII	N-аллилкарбамоил	2,17	[37]	XXIX	N-фенилкарбамоил	1,05	[37]		

Соединения, подчиняющиеся основной корреляции II (рис. 2)

б у р е и д о п у р и н ы									
XXX	i-бутил	2,49	[22]	XXXI	α, α-диметилалил	2,30	[30]		
XXXII	циклопропилметил	2,00	[30]	XXXIII	1-метилалил	1,05	[31]		
XXXIV	1,3-диметилбутил	1,05	[31]	XXXV	2-Br-Δ <sup>2</sup> -i-пентенил	1,43	[16]		
XXXVI	3,3-диметилбутил	0,86	[16]	XXXVII	S(-)-α-гидроксиметил-t-амил	3,80	[44]		

XXXVIII	S (-)- $\alpha$ -гидрохлорид- $\alpha$ -фенилметил-L (-)- $\alpha$ -карбоксиметил- $\alpha$ -амилциклогексил <sup>2</sup>	3,04	[44]	XXXIX	L (-)-карбоксиметил- $\beta$ -бутил	3,30	[45]
XL	L (-)- $\alpha$ -карбоксиметил- $\beta$ -амил	1,51	[45]	XLI	R (-)- $\alpha$ -метил- $\alpha$ -фенилметил	2,04	[44]
XLI	циклогексил <sup>2</sup>	2,08	[30, 31]				

Примечания.

1. Принята единая нумерация соединений в табл. 1—3.
2. Активность соединения (п) нормирована по активности контрольных цитокнинов — N(6)- $\Delta^2$ - $i$ -пентениладена (ИПА) или N(6)-бензиладена (6-БАП) и выражена в виде соотношений  $\frac{C_{x, п}}{C_{x, 6-БАП}}$  или  $\frac{C_{x, п}}{C_{x, ИПА}}$  — концентрация соединения (п), вызывающая биологический эффект, величина которого (х) выражена в процентах  $\frac{C_{x, п}}{C_{x, 6-БАП}}$  от величины максимального эффекта ИПА или 6-БАП в данной серии опытов. При расчете каждого соотношения типа  $\frac{C_{x, п}}{C_{x, ИПА}}$  сравнивались концентрации соединений (п) и ИПА, вызывающие одинаковый биологический эффект. В табл. 1—3 приведены соотношения  $\frac{C_{x, п}}{C_{x, ИПА}}$  или  $\frac{C_{x, п}}{C_{x, 6-БАП}}$ .

усредненные по всем доступным для расчета значениям (х). В тех случаях, когда в тесте на рост каллуса стебля табака в качестве контроля использовался 6-БАП, кинетин или  $i$ -амил, произведен пересчет на  $\frac{C_{x, п}}{C_{x, ИПА}}$ . Для этого были рассчита-

ны по всем известным работам переходные коэффициенты  $\frac{C_{x, БАП}}{C_{x, ИПА}}$ ,  $\frac{C_{x, кин}}{C_{x, ИПА}}$ ,  $\frac{C_{x, алк}}{C_{x, ИПА}}$  для всех доступных значений х.

3. Условная нумерация биотестов: 1 — рост каллуса сердцевинной паренхимы табака; 2 — стимуляция прорастания семян лагука; 3 — ускорение роста высечек листьев редиса; 4 — стимуляция деления клеток в суспензионной культуре ткани табака; 5 — рост каллуса сои.
4. Расчет велся для х=30.
5. Соединение имеет небольшие стерические затруднения при связывании в «щели» рецептора.
6. Данные теста № 4.
7. Данные для соединения XX не включены в корреляцию 1 (хотя они согласуются с ней, поскольку XX не является производным полного аденина).
8. Данные усреднены для работ [41], [42]. В первой использовался тест № 1, во второй — тест № 5. Проведенное нами дополнительное сравнение этих данных показало их хорошее совпадение.
9. По данным работы [27] активность XXV существенно ниже активности XXIV, что противоречит данным работ [41, 43].

ний с  $R_{N(6)}$ , способными принимать «плоскую» конформацию (I—XXIX, табл. 1), и соединений с объемными разветвленными алифатическими или алициклическими  $R_{N(6)}$  (XXX—XLII, табл. 1) показало, что, действительно, увеличение объема  $R_{N(6)}$  при одних и тех же линейных размерах и близких гидрофобных свойствах приводит к уменьшению сродства соответствующих соединений к рецептору (ср. VI и XXXIII, IV и XXX, IX и XXXI в табл. 1). Это показывает, что область рецептора, в которой связывается  $R_{N(6)}$ , представляет собой узкую «щель». Оптимальный размер  $R_{N(6)}$  по вертикали при связывании в такой щели примерно равен толщине бензольного ядра (см. активность соединений XIII и XIV в табл. 1), более объемные  $R_{N(6)}$  (XXX—XLII, табл. 1) плохо помещаются в «щели» рецептора (рис. 1).

**Конформация молекул активных цитокининов, связанных с рецептором.** Определение конформации молекулы цитокинина, связанного с рецептором, было проведено в рамках введенного ранее постулата [4, 7] о существовании одного способа связывания с рецептором всех активных гормонов данного класса. Поэтому ре-

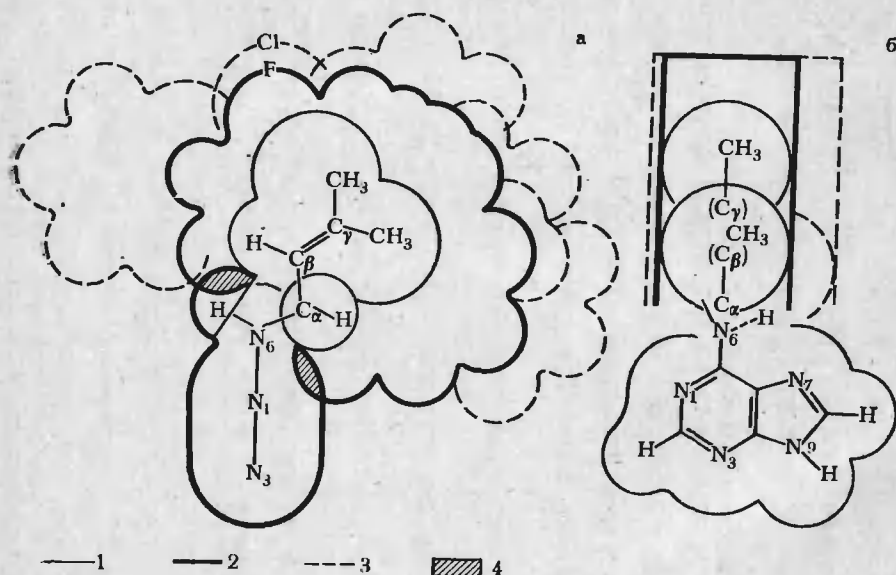


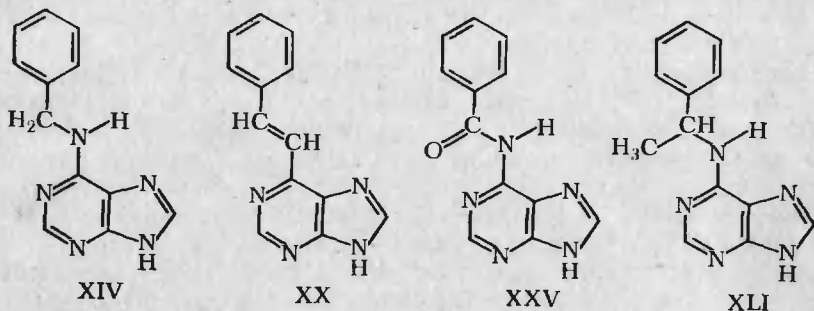
Рис. 1. Две проекции области связывания  $R_{N(6)}$ . Конформация связанного с рецептором активного цитокинина —  $N(6)$ - $\Delta^2$ - $i$ -пентениладенина (1).

Проекция (а) на плоскость рецептора активных соединений 6- $\alpha$ -нафтилметил, 6- $\beta$ -нафтил и 6-(пара- $F$ -бензил)аденинов (2). Проекция возможных конформаций неактивного 6-фенилбутил-аденина и 6-(пара- $Cl$ -бензил)аденина (3).

Стерическое взаимодействие между атомами водорода в ортоположениях бензильного и фенильного ядер соединений LVII, LVIII с адениновым ядром и  $H_{N(6)}$  (4). Проекция (б) «толщина» заместителя  $R_{N(6)}$  соединений, активность которых подчиняется корреляции I (см. рис. 2); показана сплошной линией. «Толщина» молекулы, имеющих  $\alpha$ -заместитель, активность которых подчиняется корреляции II (см. рис. 2), показана пунктирной линией

шение задачи сводится к определению общей конформации молекул цитокининов с жесткими  $R_{N(6)}$ .

Как показано выше, область связывания  $R_{N(6)}$  имеет форму узкой щели; это объясняет низкую цитокининовую активность соединений с разветвленными  $R_{N(6)}$ . Активность соединений XIV, XX, XXV существенно выше активности соединения XLI с разветвленным  $R_{N(6)}$  (см. табл. 1),



несмотря на более гидрофобные свойства заместителя в последнем соединении (см. раздел III). Поэтому высокая и примерно одинаковая цитокининовая активность соединений XIV, XXV и XX говорит о том, что при связывании этих соединений с рецептором реализуется плоская конформация их  $R_{N(6)}$ .

На следующем этапе анализа были сопоставлены все возможные конформации молекул соединений XX, XXV (при условии «плоской» конформации фрагмента —  $R_{N(6)}$ ) и все возможные конформации молекул активных цитокининов 6-фенил- и 6- $\alpha$ -нафтиладенинов (XIII, LVI). Построение и сравнение моделей Стюарта — Бриглебба показало, что единственной, общей для всех четырех указанных соединений является такая конформация молекулы, при которой  $R_{N(6)}$  лежит в плоскости, проходящей через атомы N(6) и N(3) аденина и перпендикулярной плоскости аденинового ядра (см. рис. 1).

Независимым доказательством в пользу выбранной выше конформации цитокининов, связанных с рецептором, может служить факт относительно высокой активности соединения XXXI (табл. 1). Построение молекулярной модели этого соединения показало, что стерически незатрудненной конформацией этого соединения является конформация, указанная на рис. 1.

Существенно, что определенная нами конформация молекулы цитокинина, связанного с рецептором, не совпадает с энергетически наиболее выгодной конформацией молекул цитокининов [12, 17].

*Размеры области связывания  $R_{N(6)}$ .* Ранее неоднократно отмечалось, что наибольшей цитокининовой активностью обладают соединения, в которых размеры  $R_{N(6)}$  близки к размерам амильного или гексильного радикалов [18—20, 10]. В работе Х. Ива-

муры и сотр. [21] найдена количественная корреляция между цитокининовой активностью N(6)-замещенного аденина и параметром  $W_{\max}$  — максимальным размером  $R_{N(6)}$  по оси, перпендикулярной оси связи N(6)—C $_{\alpha}$  при полнотью вытянутой конфигурации  $R_{N(6)}$ . Основным недостатком этой модели, на наш взгляд, является требование вытянутой конформации  $R_{N(6)}$ . Это требование предполагает существование стерических ограничений на рецепторе, отличающихся от описанных в работе [21].

В нашей работе сделана попытка дать более полное описание размеров области связывания  $R_{N(6)}$ .

Цитокининовая активность 6-( $\alpha$ -нафтилметил)- и 6- $\beta$ -нафтил-аденинов (LVIII, LVII, табл. 2) говорит о том, что молекулы этих соединений помешаются на рецепторе; положение  $R_{N(6)}$  этих соединений на рецепторе изображено на рис. 1. Высокой цитокининовой активностью обладают также 6-бензиладенин (и 6-) *n*-F-бензиладенин (XIV, XVII, табл. 1). Положение атома фтора в соединении XVII на рецепторе указано на рис. 1.

С другой стороны, известно, что введение заместителей больших, чем атом F, в паразоложение бензольного ядра соединения XIV резко снижает цитокининовую активность (XLIV—XLVIII, табл. 2), в то время как аналогичные ортозамещенные аналоги активны (LIX—LXIII, табл. 2). Различие в активности между этими двумя группами соединений говорит о том, что эффект замещения в паразоложении не связан ни с увеличением общего объема молекулы, ни с изменением распределения электронной плотности на бензольном ядре [18]. Рассмотрение разных паразамещенных аналогов 6-бензиладенина говорит о том, что эффект паразаместителя не зависит ни от его гидрофобных свойств (ср. XLIV и XLVI, табл. 2), ни от его донорноакцепторных свойств (ср. XLIV и XLVIII, табл. 2). Все эти факты говорят о том, что эффект всех паразаместителей, больших атома фтора, связан с увеличением линейных размеров  $R_{N(6)}$ . Соответственно в области локализации паразаместителей размеры рецептора должны быть меньше размеров *n*-Cl-бензильного радикала (см. рис. 1)<sup>2</sup>.

Известно, что N(6)-фенилбутиладенин — неактивное соединение (XLIX, табл. 2). Общий объем и гидрофобность  $R_{N(6)}$  в этом соединении такие же, как в активных соединениях LVI и LVIII (табл. 2); можно думать поэтому, что большие линейные размеры  $R_{N(6)}$  в соединении XLIX препятствуют связыванию с рецептором. Выше было показано, что углеводородная цепочка при связывании с рецептором должна принимать плоскую конформацию. Конформационный анализ, проведенный с учетом этого ограничения, дал ряд возможных положений  $R_{N(6)}$  соединения XLIX на рецепторе (размеры  $R_{N(6)}$  обозначены на рис. 1 пунктиром). Таким образом, истинные границы этой области рецептора должны находиться между пунктирной и сплошной линиями на рис. 1.

<sup>2</sup> Эта граница рецептора и описывается параметром  $W_{\max}$ , введенным в работе [21].

## Соединения, не подчиняющиеся основным корреляциям I и II

№ п	$R_N(6)$	Среднее значение $C_{x, п}$	$C_{x, п}$	Тест	Литература
		$C_{x, ИПА}$ (тест I)	$C_{x, 6-БАП}$		
XLIII	2-флуоренил	неактивен		3	[18]
XLIV	<i>n</i> -Cl-бензил	400		3	[18]
XLV	<i>n</i> -Br-бензил	неактивен		4	[40]
XLVI	<i>n</i> -NH <sub>2</sub> -бензил	неактивен		4	[40]
XLVII	<i>n</i> -N <sub>3</sub> -бензил	3,76			[38]
XLVIII	<i>n</i> -CH <sub>3</sub> -бензил		3 · 10 <sup>3</sup>	3	[18]
XLIX	γ-фенилбутил	2,84	130	3	[38]
		неактивен		2	[46]
L	N-( <i>m</i> -Cl-фенил)-карбамоил	1,66		3	[18]
					[37]

Соединения, в которых размеры  $R_N(6)$  превышают критические размеры рецептора

Соединения, размеры  $R_N(6)$  которых неоптимальны для связывания в ограниченной по линейным размерам «щели» рецептора

LI	<i>n</i> -гексил	1,30			[30, 31]
LII	<i>n</i> -гептил	2,16			[30, 31]
LIII	фенилэтил	1,20	~2,5	3	[31]
LIV	2-фурилэтил	1,18			[18]
LV	2-феноксиптил	0,98			[30]
LVI	α-нафтил	1,00	—	—	[30, 31]
			~1	2	[31]
LVII	β-нафтил	1,00			[46]
LVIII	α-нафтилметил		~1	2	[31]
			~1	3	[46]
LIX	<i>o</i> -Cl-бензил	1,36		4	[18]
			0,7	4	[40]
LX	<i>o</i> -Br-бензил	2,11		3	[18]
LXI	<i>o</i> -NH <sub>2</sub> -бензил		3	3	[18]
			5	1	[38]
LXII	<i>o</i> -N <sub>3</sub> -бензил	1,65			[38]
LXIII	<i>o</i> -CH <sub>3</sub> -бензил		0,5	3	[18]
LXIV	<i>m</i> -Cl-бензил	2,11		4	[40]
LXV	капроил	неактивен		5	[42]
LXVI	N-( <i>o</i> -CH <sub>3</sub> -фенил)-карбамоил	1,11			[37]
LXVII	S(-)-α-гидроксиметил-β-фенилэтил	4,05			[44]
LXVIII	L(-)-α-карбоксиметил-β-фенилэтил	1,87			[45]

Примечание 1. Неактивные L-изомеры соединений XXXVII—XL и LXVII—LXIII не приведены.

2. См. примечание к табл. 1.

Построение моделей Стюарта — Бриглебба показало, что в выбранной нами конформации молекул цитокининов на рецепторе должно существовать небольшое внутримолекулярное взаимодействие между адениновым ядром и атомами водорода в ортоположениях бензольных ядер соединений типа XIII и XIV (табл. 1). На рис. 1 это взаимодействие показано для соединений LVII и LVIII. Такого взаимодействия нет в случае N(6)- $\Delta^2$ -i-пентениладенина (IX), что объясняет его большую активность по сравнению с соединениями XIII и XIV (см. табл. 1). Таким образом, само адениновое ядро выступает в роли фактора, ограничивающего размеры области связывания  $R_{N(6)}$ .

### Природа связи $R_{N(6)}$ с цитокининовым рецептором

В ряде работ отмечалась возможность существования гидрофобного взаимодействия  $R_{N(6)}$  с рецептором [8, 9, 11, 22, 18]. Однако до сих пор не удавалось получить удовлетворительную количественную корреляцию между цитокининовой активностью N(6)-замещенных производных аденина и гидрофобностью  $R_{N(6)}$  [19, 21].

В отличие от предыдущих авторов мы проводили анализ зависимости активности цитокининов от параметра  $\Pi_R^3$ , рассчитанного по методу К. Ханша [23, 24] по следующей схеме:

1) использовались данные, полученные только в одном биотесте — тесте на стимуляцию роста каллуса сердцевинной паренхимы табака;

2) активность всех соединений (табл. 1—3) была нормирована на активности N(6)- $\Delta^2$ -i-пентениладенина (далее ИПА); это позволило корректно сравнивать данные разных работ;

3) отдельно рассматривались соединения, в которых размеры  $R_{N(6)}$  существенно превышают размеры амильного радикала (табл. 2);

4) соединения с разветвленными в  $\alpha$ - или  $\beta$ -положениях  $R_{N(6)}$ , а также соединения с высокополярными группировками в  $R_{N(6)}$  — группировками типа  $\text{OH}$ —,  $\text{—O}$ —,  $\geq\text{N}$  (см. табл. 3) при анализе были выделены в отдельные группы.

Принятая нами методология позволила показать существование количественной корреляции между активностью цитокининов и гидрофобными свойствами  $R_{N(6)}$  для группы веществ, в которых

<sup>3</sup> Параметр  $\pi$  для  $R_{N(6)}$  рассчитывался по общепринятому методу [23] или были взяты экспериментально найденные значения для соответствующих соединений [23, 24]. Рассмотрение экспериментальных значений  $\pi$  N-замещенных производных анилина показало, что в случае N(6)-алкил(-арил)аденинов и 6-ацил-аденинов влиянием N(6)H-группы на значение  $\pi$  для  $R_{N(6)}$  можно пренебречь. Для последней группы соединений  $\pi_{R_{N(6)}}$  принималось равным  $\pi$  соответствующего альдегида. В случае уреидопуринов такое упрощение недопустимо, поэтому было принято, что  $\pi_{\text{NHNCO}} = \pi_{\text{R}} + \pi_{\text{NHO}} \approx \pi_{\text{R}} + (\pi_{\text{дифенилметилен}} - \pi_{\text{анилина}} - \pi_{\text{бензола}})$ . При расчете  $\pi$  для  $R_{N(6)}$ , имеющих разветвление в  $\alpha$ -положении, вводился инкремент на разветвление [23].

размеры  $R_{N(6)}$  близки к размерам амильного радикала (рис. 2, корреляция I). Подобная корреляция наблюдается и для соединений с разветвленными в  $\alpha$ - или  $\beta$ -положениях  $R_{N(6)}$ , размеры которых также близки к размерам амила (см. рис. 2, корреляция II).

Соединения, имеющие большие размеры  $R_{N(6)}$ , не подчиняются описанному выше корреляциям независимо от гидрофобности  $R_{N(6)}$  (см. табл. 2).

*Гидрофобное взаимодействие — основной тип связи  $R_{N(6)}$  с рецептором.* Низкая цитокининовая активность соединений с  $R_{N(6)}$ ,

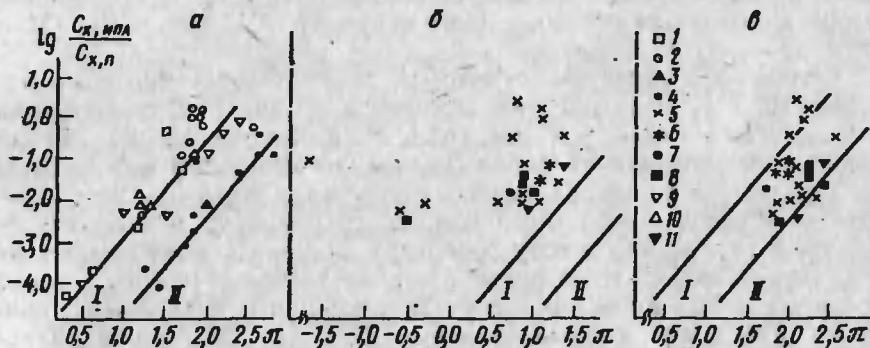


Рис. 2. Зависимость цитокининовой активности N(6)-замещенных аденинов от гидрофобности  $R_{N(6)}$ .

*a* — корреляции для цитокининов, имеющих гидрофобные  $R_{N(6)}$  (I, II); *б* — точки, соответствующие значениям активности и параметру  $\pi$  для веществ, содержащих полярные группы в  $R_{N(6)}$  ( $\pi$  рассчитаны с учетом инкремента полярных заместителей); *в* — корреляции активности от параметра  $\pi$  для цитокининов, имеющих гидрофобные и полярные заместители в  $R_{N(6)}$  (прямые I, II); значения  $\pi$  рассчитаны без учета инкрементов полярных группировок.

*Условные обозначения:*

I — ациладенины; 2 — 6-арил-, 6-арилметил-, 6-алкениладенины; 3 — соединения с алициклическими  $R_{N(6)}$ ; 4 — соединения с разветвленными в  $\alpha$ - или  $\beta$ -положениях  $R_{N(6)}$ ; 5 — 6-алканоладенины; 6 — 6-(пиридилметил)аденины; 7 — 6-алкоксилалкенины; 8 — 6-алканоладенины, имеющие разветвления в  $\alpha$ - или  $\beta$ -положениях  $R_{N(6)}$ ; 9 — 6-алкиладенины; 10 — 6-урейдопурины; 11 — 6-алкоксиалкиладенины, с разветвленными  $R_{N(6)}$ .

Для основной корреляции (I) (исключая соединения XIV—XVII, XXV):

$$\frac{C_{x,п}}{C_{x,ИПА}} = 2,1 \lg \pi + 4,8 (r = 0,98).$$

При включении данных для всех веществ, указанных в таблицах, уравнение принимает вид:

$$\frac{C_{x,п}}{C_{x,ИПА}} = -1,5 \lg \pi + 4,2 (r = 0,87)$$

Для основной корреляции II:

$$\frac{C_{x,п}}{C_{x,ИПА}} = -2,1 \lg \pi + 6,4 (r = 0,97)$$

содержащими отрицательно заряженные группы (COO<sup>-</sup>-группу, тетразолил [18, 25]) или положительно заряженные аммонийные группы [26, 27], говорит об отсутствии электростатического взаимодействия  $R_{N(6)}$  с рецептором.

Образование  $\pi$ -комплекса между  $R_{N(6)}$  и рецептором также мало вероятно, поскольку аналоги 6-бензиладенина, имеющие одинаковую гидрофобность, но содержащие в бензольном ядре электроноакцепторные (Cl) и электронодонорные (CH<sub>3</sub>) заместители, имеют одинаковую активность (ср. LIX и LXIII в табл. 2). В пользу такого вывода говорит также тот факт, что корреляциям I и II (рис. 2) подчиняются соединения с насыщенными и ненасыщенными алифатическими  $R_{N(6)}$  (ср., например, IV, V и VII—XII в табл. 1).

Основной трудностью, с которой сталкивались некоторые авторы [19, 21], была высокая активность соединений, содержащих в  $R_{N(6)}$  OH—, —O—,  $\geq N$  (см. табл. 3). Как видно из рис. 2Б, цитокининовая активность таких соединений выше, чем можно было бы ожидать, судя по гидрофобным свойствам их  $R_{N(6)}$ . Этот факт можно объяснить тем, что полярная группировка в  $R_{N(6)}$  не попадает в гидрофобную зону рецептора, оставаясь в полярной зоне (2). Для проверки этого предположения расчет Р для  $R_{N(6)}$  таких соединений был проведен без учета инкремента полярной группировки. Как видно из сравнения рис. 2Б и рис. 2В, при такой поправке активность соединений LXIX—XCVI (табл. 3) удовлетворительно описывается корреляциями I и II в зависимости от того, имеет ли  $R_{N(6)}$  разветвления в  $\alpha$ - или  $\beta$ -положениях, а также в зависимости от расположения полярной группировки в  $R_{N(6)}$  (ср., например, LXXVIII и LXXIX в табл. 3 и на рис. 2В)<sup>4</sup>.

Следует отметить, что полярные группировки в  $\alpha$ -положении  $R_{N(6)}$  (XXI—XXV, табл. 1; XXXVII—XXXIX, табл. 1), а также жестко фиксированные в районе  $\alpha$ -положения (XXVI—XXIX, табл. 1), попадают в гидрофобную зону рецептора, не «дотягиваясь» до полярной зоны. Эти соединения (XXI—XXIX, XXXVII—XXXIX, табл. 1) подчиняются корреляциям I и II (см. рис. 2А).

*Модель гидрофобной щели.* Как видно из рис. 2, значение параметра « $\alpha$ » в уравнении (см. подпись к рис. 2) близко к двум. Это означает, что энергия связывания  $R_{N(6)}$  с рецептором вдвое больше, чем соответствующее изменение свободной энергии при переносе заместителя из полярной среды в гидрофобную фазу. Объяснение этого эффекта было дано в рамках модели гидрофобной «щели», исходно заполненной водой [1, 28, 3]. В рамках этой модели связывание  $R_{N(6)}$  приводит к вытеснению воды из щели; свободная энергия связывания  $R_{N(6)}$  оказывается равной сумме свободных энергий дегидратации как самого  $R_{N(6)}$ , так и щели рецептора. Предположение о щелеобразной структуре рецептора в об-

<sup>4</sup> Предположение об образовании специфической связи полярной группировки в  $R_{N(6)}$  соединений LXIX—XCVI с рецептором кажется маловероятным: как видно из сравнения рис. 2Б и рис. 2В, энергия такой связи была бы в точности равна  $-2,303 R T \pi$ , где  $\pi$  — инкремент полярной группировки в  $R_{N(6)}$ .

Таблица 3

Соединения с высокополярными группировками в  $R_{N(6)}$

№ п	R	Среднее значение	Литература
		$\lg \frac{C_x, \text{п}}{C_x, \text{ИПА}} \text{ (тест 1)}$	
<i>6-алканоладенины</i>			
LXXIX	2-гидроксиэтил	неактивен	[20]
LXX	3-гидроксипропил	неактивен	[20]
LXXI	4-гидроксипропил	0,56	[20]
LXXII	5-гидроксиаллил	0,56	[20]
LXXIII	6-гидроксигексил <sup>2</sup>	0,56	[20]
LXXIV	4-гидрокси- <i>цис</i> - $\Delta^2$ -бутенил	1,94	[47]
LXXV	4-гидрокси-3-метил- <i>цис</i> - $\Delta^2$ -бутенил ( <i>цис</i> -зеатин)	1,08	[47]
LXXVI	4-гидрокси-3-метил- <i>транс</i> - $\Delta^2$ -бутенил ( <i>транс</i> -зеатин)	-0,36	[47, 32, 22, 26, 36, 33, 16]
LXXVII	4-гидрокси- <i>i</i> -амил (дегидро-зеатин-рацемат)	0,20	[36, 47, 33]
LXXVIII	R(+)-4-гидрокси- <i>i</i> -амил	0,15	[48]
LXXIX	S(-)-4-гидрокси- <i>i</i> -амил	1,85	[48]
LXXX	3-гидрокси- <i>i</i> -амил	1,75	[36, 32]
LXXXI	3,4-дигидрокси- <i>i</i> -амил (рацемат)	1,89	[36]
LXXXII	2-гидрокси- <i>i</i> -амил (рацемат)	1,41	[36]
LXXXIII	2,3-дигидрокси- <i>i</i> -амил (рацемат)	2,36	[36]
LXXXIV	2,3,4-тригидрокси- <i>i</i> -амил (рацемат)	1,9	[49]
<i>6-алканоладенины с разветвленными в <math>\beta</math>-положения <math>R_{N(6)}</math></i>			
LXXXV	2-метил-4-гидрокси- <i>n</i> -бутил (дегидрозеатин)	1,53	[47]
LXXXVI	2-метил-4-гидрокси- <i>цис</i> - <i>i</i> -бутенил ( <i>цис</i> - <i>i</i> -зеатин)	1,40	[47]
LXXXVII	2-метил-4-гидрокси- <i>транс</i> - $\Delta^2$ -бутенил ( <i>транс</i> - <i>i</i> -зеатин)	1,13	[47]
LXXXVIII	S-(1-метил-5-дезокс- $\beta$ -D-рибофуранозид)	2,20	[30]
<i>6-алкоксиалкаладенины</i>			
LXXXIX	этоксипропил	1,56	[19]
LXC	этоксинизопропил	1,91	[19]
LXCI	пропоксиэтил <sup>2</sup>	1,56	[19]
LXCII	бутоксиэтил <sup>2</sup>	2,26	[19]
LXCIII	2-тетрагидрофурурил	1,25	[31]
<i>6-(пиридилметил)аденины</i>			
LXCIV	2-пиридилметил	1,18	[30, 31]
LXCV	3-пиридилметил	0,91	[31]
LXCVI	4-пиридилметил	1,25	[31]

Примечания. 1. В работе [19] эффективные концентрации цитокининов выше, чем обычно, поэтому авторы могли не заметить слабой активности соединений LXIX и LXX.

2. Размеры  $R_{N(6)}$  неоптимальны для связывания с рецептором.

3. См. примечание к табл. 1.

ласти связывания  $R_{N(6)}$ , полученное в данном разделе, согласуется с результатами анализа стерических параметров рецептора (см. с. 126).

Таким образом, проведенный анализ данных литературы по цитокининовой активности  $N(6)$ -замещенных производных аденина с различными  $R_{N(6)}$  позволил доказать непосредственное участие  $R_{N(6)}$  в связывании с рецептором и доказать гидрофобную природу этого связывания. Кроме того, были определены размеры области связывания  $R_{N(6)}$  и конформация молекул цитокининов, связанных с рецептором. Полученные выводы объединены в рамках модели гидрофобной «щели».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А., Березин И. В. (1980) Ферментативный катализ. Часть первая — специфичность ферментативного катализа (простые субстраты). М.
2. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярная биология 4, 339—347.
3. Järv J., Barffai T. (1982) Acta Chem. Scand. B., 37, 487—498.
4. Рахманинова А. Б., Ягужинский Л. С. (1981) в кн. Функциональная активность ферментов и пути ее регуляции. Изд-во Моск. ун-та, М., 167—202.
5. Взаимодействие гормонов с рецепторами. (1979) М., Мир, 432.
6. Kier L. B. (1971) Molecular orbital theory in Drug Research. — N. Y. — L., Acad. Press.
7. Рахманинова А. Б., Хавкин Э. Е., Ягужинский Л. С. (1978) Биохимия 43, 806—823.
8. Кулаева О. Н. (1973) Цитокинины. Их структура и функция. М., Наука.
9. Letham D. S. (1978) in Phytohormones and Related Compounds. — A comprehensive treatise (ed. D. S. Letham, P. B. Goodwin, T. J. V. Higgins), v. 1, pp. 205—265, Amsterdam—Oxford—New York.
10. Matsubara S. (1980) Phytochemistry 19, 2239—2253.
11. Skoog F., Schmitz R. V. (1979) in Biochemical actions of hormones, v. 6, pp. 337—415, Acad. Press, New York — San Francisco — London.
12. Bugg C. E., Sternglanz H. (1974) in Mol. Quantum Pharmacol., Proc. 7th Jerusalem Symp. Quant. Chem. Biochem., v. 8, pp. 473—500.
13. Henderson T. R., Frihart C. R., Leonard N. J. et al. (1975) Phytochemistry, 14, 1687—1690.
14. Wilcox E. J., Selby C., Wain R. L. (1978) Ann. Appl. Biol. 88, 439—444.
15. Wilcox E. J., Wain R. L. (1976) Ann. Appl. Biol. 84, 403—407.
16. Hecht S. M., Leonard N. J., Schmitz R. Y., Skoog F. (1970) Phytochemistry 9, 1907—1913.
17. Soriano-Carcia M., Parthasarathy R. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 1062—1068.
18. Kuraishi S. (1959) Sci. Pap. Col. Gen. Educ. (Univers. of Tokyo) 9, 67—104.
19. Rothwell K., Wright S. T. C. (1967) Proc. Roy Soc. London, Ser. B. 167, 202—223.
20. Fawcett C. M., Wright S. T. C. (1968) Phytochemistry 7, 1719—1725.
21. Iwamura H., Fujita T., Koyama S. et al. (1980) Phytochemistry 19, 1309—1321.

22. Münsche D., Engelbrecht L., Cöhler R. D., Conrad K. (1968) *Flora Abt. A.*, 159, 268—273.
23. Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) *Chem. Rev.* 71, 525—616.
24. Rekler R. F. (1977) in: *The Hydrophobic Fragmental constant. Its Derivation and Application—Pharmacology library*, v. 1, p. 369. Elsevier Scient. Publ. Comp., Amsterdam—Oxford—New York.
25. Letham D. S., Young H. (1971) *Phytochemistry* 10, 23—28.
26. Datta S. P., Mittelman A., Chen C. M. et al. (1978) *J. Carbohydrates, Nucleotides* 5, 45—57.
27. Roussaux J., Tram Thanh Van, Adeline M. T. et al. (1977) *Phytochemistry*, 16, 1865—1869.
28. Березин И. В., Мартинек К. (1977) *Основы физической химии ферментативного катализа. Высшая школа. М.*
29. Klämbt D., Thies G., Skoog F. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 56, 52—60.
30. Skoog F., Hamzi H. O., Szweykowska A. M. et al. (1967) *Phytochemistry* 6, 1169—1192.
31. Strong F. M. (1956) *Topics in microbiol chemistry*, N. Y.: J. Niley & Sons, London: Champan, 123—131.
32. Leonard N. J., Hecht S. M., Skoog F., Schmitz R. Y. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 59, 15—21.
33. Schmitz R. Y., Skoog F., Hecht S. M. et al. (1972) *Phytochemistry*, 11, 1603—1610.
34. Rogozinska J. H., Kroon C., Salemink C. A. (1973) *Phytochemistry* 12, 2087—2092.
35. Hecht S. M., Bock R. M., Schmitz R. Y. et al. (1971) *Biochemistry* 10, 4224—4228.
36. Leonard E. O., Orme-Johnson W. H., McMurtray T. et al. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 99, 16—24.
37. McDonald J. J., Leonard N. J., Schmitz R. Y., Skoog F. (1971) *Phytochemistry* 10, 1429—1439.
38. Mornet R., Theiler J. B., Leonard N. J. et al. (1979) *Plant Physiol.* 64, 600—610.
39. Sprecker M. A., Morrice A. G., Gruber B. A. et al. (1976) *Phytochemistry* 15, 609—613.
40. Sussman M. R., Kende H. (1978) *Planta* 140, 251—259.
41. Martin J. H., Fox J. E., McChesney J. D. (1973) *Phytochemistry* 12, 749—752.
42. Dekhuijzen H. M., Overeem J. C. (1972) *Phytochemistry* 11, 1669—1672.
43. Matsubara S., Sugiyama T., Hashizume T. (1978) *Physiol. Plant* 42, 114—118.
44. Matsubara S., Koshimizu K., Fujita T. (1974) *Plant Growth Substances (Proc. 8th Intern. Confer. on Plant Growth Substances, Tokyo, 1973)*, Tokyo, 456—462.
45. Iwamura H., Yada M., Koshimizu K., Matsubara S. (1978) *Agric. Biol. Chrm.* 42, 1005—1014.
46. Skinner C. G., Claybrook J. R., Talbert F., Shive N. (1957) *Plant Physiol.* 32, 117—120.
47. Schmitz R. Y., Skoog F., Playts A. J., Leonard N. J. (1972) *Plant Physiol.* 50, 702—705.
48. Matsubara S., Shiojiki S., Fujita T. et al. (1977) *Phytochemistry* 16, 933—937.
49. Van Staden J., Drewes S. E. (1982) *Phytochemistry* 21, 1783—1784.

# ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА НАД-КИНАЗ И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

В. И. Телепнева

(Кафедра биохимии биологического факультета МГУ)

## Введение

Одной из наиболее актуальных и увлекательных проблем современной биохимии является выяснение молекулярных механизмов регуляции ферментативной активности. Необходимым этапом на пути к пониманию закономерностей, лежащих в основе жизнедеятельности клетки, является изучение структуры, свойств и способов регуляции каталитической активности изолированных ферментов. Однако при этом следует иметь в виду, что высокая степень очистки в отдельных случаях может привести к изменению или исчезновению регуляторных свойств фермента [1].

В последние годы пристальное внимание энзимологов привлекло изучение множественных молекулярных форм (ММФ) ферментов, в частности диссоциирующих ферментов, способных к обратной диссоциации — ассоциации.

Наличие ММФ в клетке является одним из тех инструментов, с помощью которых в организме обеспечивается быстрая, тонкая и точная регуляция активности ферментов.

Среди ферментов каталитического аппарата клетки важное место принадлежит НАД-киназе (КФ.2.7.1.23), синтезирующей НАДФ из НАД и АТФ. НАДФ в окисленной и восстановленной формах участвует во многих процессах обмена веществ и энергии: свыше 150 ферментов используют НАДФ(Н) в качестве субстрата или кофактора. Для НАД-киназы из ряда источников показана возможность существования более чем в одной молекулярной форме [2—14].

Относительно природы обнаруженных множественных форм в литературе нет единой точки зрения. Полагают, что ММФ НАД-киназы, обнаруженные в гиалоплазме и митохондриях дрожжей [11], у *Triatoma infestans* при интоксикации ДДТ [8], в частично очищенных препаратах из проростков гороха [9], являются изозимами. Можно думать, что ММФ фермента из наружных сегментов глаза быка [14] и из *Azotobacter vinelandii* [15] представлены конформерами, тогда как НАД-киназа из скелетных мышц кролика [2—4], сердца голубя [5, 7] и печени кролика [6] представляет собой диссоциирующую ферментную систему,

состоящую из олигомеров разной степени ассоциации, обладающих различной каталитической активностью.

В настоящем обзоре предпринята попытка обобщить результаты, полученные главным образом при изучении свойств НАД-киназы из трех последних источников: скелетных мышц кролика, сердца голубя и печени кролика. Основное внимание будет уделено рассмотрению тех изменений в четвертичной структуре фермента, которые происходят в процессе его очистки до гомогенного состояния, и выяснению возможных причин, лежащих в основе наблюдаемой при этом частичной или полной утраты очищенным ферментом регуляторных свойств.

### Четвертичная структура НАД-киназы

Для изучения четвертичной структуры НАД-киназы из скелетных мышц кролика использовали препараты фермента, очищенные в 150—300 раз. Тремя независимыми методами: электрофорезом в однородном геле и в градиенте концентрации полиакриламидного геля, путем разделения в тонком слое сефадекса G-200, с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-200 — была обнаружена большая гетерогенность препарата в отношении НАД-киназы [2, 4]. Локализацию фермента в геле определяли по измерению активности в элюатах, полученных после разрезания столбика геля на диски толщиной 2 мм. При этом оказалось, что по данным диск-электрофореза в однородном геле ферментативной активностью обладают четыре зоны, характеризующиеся значениями  $R_f$  0,1, 0,52, 0,73 и 0,98. Повторный электрофорез белка с электрофоретической подвижностью, близкой к 1,0, после его элюции и концентрирования обнаружил несколько белков с более низким, чем у исходного, значением  $R_f$  (0,73, 0,52, 0,07).

Пять белковых зон, проявляющих ферментативную активность, были выявлены с помощью метода тонкослойной гель-фильтрации через сефадекс G-200. Значения молекулярных весов обнаруженных форм фермента колебались в пределах от 40 000—45 000 до 280 000—300 000. Было показано, что каждая из пяти полученных в результате гель-фильтрации фракций при последующем диск-электрофорезе разделяется на несколько белковых зон, среди которых преобладают зоны с одинаковой электрофоретической подвижностью: 0,52, 0,73 и 0,98. Формы с более низким значением  $R_f$  обнаружены во фракциях, содержащих высокополимерные белки. Полученные при электрофоретическом анализе и гель-фильтрации экспериментальные данные свидетельствуют о присутствии в препаратах НАД-киназы нескольких форм фермента. Показана возможность перехода одних форм в другие. Иными словами, исследованные препараты фермента содержат равновесную систему множественных молекулярных форм, различающихся по молекулярному весу и способных осуществлять взаимные переходы. В процессе гель-фильтрации эти формы разделяются по молекулярному весу, а последующие процедуры элюции и концентриро-

вания белка перед электрофоретическим анализом и в процессе самого электрофореза создают условия для перехода одних форм в другие.

Присутствие ММФ в препаратах НАД-киназы из скелетных мышц кролика было продемонстрировано также при фракционировании на колонке с сефадексом G-200 (3), а значения молекулярных весов олигомеров фермента были уточнены с помощью метода электрофореза в линейном градиенте концентрации полиакриламидного геля (ПААГ) [16]. Результаты, полученные при исследовании фермента двумя указанными методами, показали, что в частично очищенных препаратах НАД-киназы присутствуют олигомеры фермента с молекулярными весами 31 000, 65 000, 94 000, 160 000, 220 000, 350 000. Наименее ассоциированной формой НАД-киназы является белок с молекулярным весом 31 000, который, по-видимому, можно считать субъединицей фермента на том основании, что после обработки додецилсульфатом натрия двух низкомолекулярных фракций, снятых с колонки (31 000, 65 000), и последующего электрофореза на электрофореграммах не был обнаружен белок с молекулярным весом, меньшим 30 000.

Проведенное исследование четвертичной структуры НАД-киназы из скелетных мышц кролика указывало на присутствие в препарате фермента равновесной системы диссоциирующих олигомеров, состоящих из различных сочетаний субъединиц с молекулярным весом равным 31 000.

При изучении свойств НАД-киназы из скелетных мышц использовали высокоочищенные, но не гомогенные препараты НАД-киназы. Препарат фермента из сердца голубя был электрофоретически получен в гомогенном состоянии. Метод выделения и очистки в качестве последних стадий включал ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефадексе А-50 и гель-фильтрацию на сефарозе 6В [5]. Сравнение свойств частично очищенных и гомогенных, по данным электрофореза, препаратов фермента позволило установить следующую закономерность. Частично очищенные ферментные препараты НАД-киназы из сердца голубя подобно ферменту из скелетных мышц кролика гетерогенны и представлены не менее чем пятью молекулярными формами, число которых могло варьировать от препарата к препарату: НАД-киназную активность проявляли формы с молекулярными весами, равными 300 000—270 000, 230 000—200 000, 180 000, 120 000 и 45 000. Из распределения общей активности фермента между различными молекулярными формами следует, что большая часть НАД-киназы представлена олигомерами с молекулярным весом 180 000.

Присутствие ММФ в частично очищенных препаратах НАД-киназы из сердца голубя было продемонстрировано также методом гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-200. На рис. 1 представлены профили элюции двух препаратов НАД-киназы. Можно видеть, что в процессе гель-фильтрации с колонки сходит один асимметричный пик белка. Активностью обладают фракции с молекулярными весами 270 000—240 000, 230 000—210 000,

180 000 и 85 000—90 000. Сравнение кривых элюирования двух препаратов НАД-киназы показало различия в количественном соотношении между олигомерами с высоким и низким молекулярными весами. В препарате I на долю олигомера с молекулярным весом 90 000 приходится до половины общей ферментативной активности, тогда как препарат II содержит преимущественно высокоассоциированные формы фермента.

Значения молекулярных весов разных форм НАД-киназы, определенные методом гель-фильтрации, совпадают с величинами, определенными методом электрофореза в градиенте концентрации ПААГ, за исключением низкомолекулярной формы НАД-киназы с молекулярным весом 45 000, которую при гель-фильтрации обнаружить не удалось. Однако при анализе сошедшей с колонки фракции НАД-киназы, имеющей молекулярный вес 90 000, методом электрофореза в градиенте концентрации ПААГ было показано наличие в ней, помимо белка с исходным молекулярным весом 90 000, еще двух с молекулярными весами 45 000 и 180 000. Эти данные указывают на возможность перехода одних молекулярных форм в другие. Смещением равновесия между олигомерными формами НАД-киназы можно объяснить и описанные выше различия в профилях элюции фермента в разных препаратах.

Результаты, полученные при электрофоретическом исследовании и гель-фильтрации НАД-киназы из сердца голубя, указывают на то, что частично очищенные препараты фермента, как и в случае НАД-киназы из скелетных мышц кролика, содержат несколько белковых фракций, различающихся по молекулярному весу и проявляющих каталитическую активность, которые можно рассматривать как в разной степени ассоциированные олигомеры фермента.

В противоположность частично очищенному препарату гомогенная по данным электрофореза НАД-киназа из сердца голубя утрачивает способность к ассоциации — диссоциации. При гель-фильтрации такого препарата через колонку с сефарозой 6В НАД-

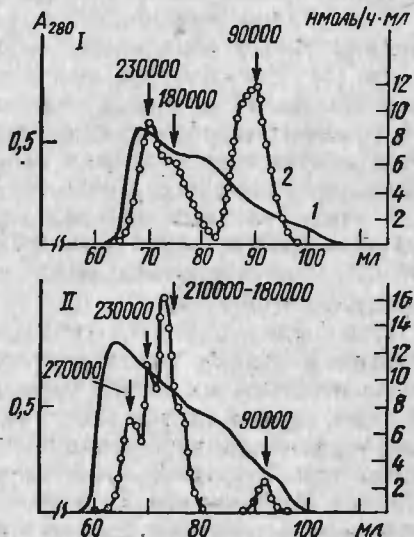


Рис. 1. Кривая элюирования белка и выход НАД-киназы при гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-200 двух ферментных препаратов (I и II) из сердца голубя.

По оси абсцисс — объем выхода фракций, по оси ординат: левая шкала —  $A_{280}$ , правая — активность; стрелками указан молекулярный вес фракций; сплошная линия — белок, прерывистая — активность

киназа элюируется в виде одной фракции с молекулярным весом 45 000. Высокомолекулярные формы исчезают, в том числе и форма с молекулярным весом 180 000, которая нередко преобладала в частично очищенных препаратах фермента (см. рис. 1).

При электрофорезе в однородном геле очищенный фермент давал одну полосу, что указывало на его гомогенность. Молекулярный вес субъединицы, определенный в присутствии додецилсульфата натрия, оказался также равным 45 000. Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе ионообменной хроматографии разрушается четвертичная структура фермента, и в разной степени ассоциированные олигомеры распадаются на субъединицы.

В частично очищенных препаратах НАД-киназы из печени кролика также обнаружено несколько молекулярных форм фермента [6]. Электрофоретическое разделение в однородном и градиентном гелях с последующим выявлением места локализации НАД-киназы тетразолиевым методом и элюцией фермента из отдельных участков столбика геля позволило выявить до 7 полос белка, проявляющих ферментативную активность. Молекулярные веса этих белковых зон оказались равными 650 000, 400 000, 380 000—370 000, 300 000—280 000, 230 000—210 000, 200 000, 180 000. В определенных условиях удавалось наблюдать переходы между формами.

При выделении НАД-киназы из печени кролика в качестве последней стадии очистки использовали также ионообменную хроматографию на ДЭАЭ сефадексе А-25. В отличие от НАД-киназы из сердца голубя, которая после ионообменной хроматографии утрачивала четвертичную структуру и была представлена только одной формой — мономером, фракционирование на ионообменнике НАД-киназы из печени кролика не сопровождалось разрушением четвертичной структуры. На этой стадии очистки было получено несколько электрофоретически гомогенных олигомеров с молекулярными весами 280 000—290 000, 180 000 и 150 000—160 000, 210 000—220 000 [17]. Как правило, все препараты фермента содержали форму с молекулярным весом 180 000—190 000. Число форм в разных препаратах, получаемых после ионообменной хроматографии, могло варьировать. Никогда не наблюдали присутствия всех форм в одном препарате одновременно. Всего было исследовано 40 препаратов НАД-киназы.

На основании анализа гомогенных препаратов фермента было сделано заключение о существовании в печени кролика двух типов НАД-киназы: относительно низкоактивного фермента, в формировании четвертичной структуры которого участвуют однорядные субъединицы с  $M_r$  33 000 ( $\alpha$ -тип), и высокоактивного фермента, олигомеры которого построены из субъединиц с  $M_r$  62 000 ( $\beta$ -тип). Каждый из указанных типов фермента может существовать в виде олигомерных форм разной степени ассоциации. В таблице 1 представлены результаты, полученные при определении молекулярных весов и удельной активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов НАД-киназы из печени кролика. Фермент  $\alpha$ -типа постоянно присутствует

Молекулярный вес и удельная активность олигомеров НАД-киназы  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов (17) -

Форма ( $M_r$ )	Удельная активность, ед./мг	Тип субъединиц	Молекулярный вес субъединиц	Количество препаратов, содержащих данную форму
280 000—290 000	130	$\beta$	62 000	4
280 000—290 000	20—30	$\alpha$	33 000	7
210 000—220 000	160	$\beta$	62 000	11
180 000—190 000	10—20	$\alpha$	33 000	40
150 000—160 000	3—6	$\alpha$	33 000	16

в печени кролика, тогда как фермент  $\beta$ -типа обнаруживается не в каждом препарате (в 15 из 40 препаратов). В процентном отношении доля высокоактивных форм фермента по белку меньше, а по активности больше, чем доля малоактивных форм. Так, в разных препаратах на долю  $\beta$ -формы НАД-киназы приходится от 66 до 80% общей активности и всего 15—20% ферментного белка, тогда как в случае  $\alpha$ -НАД-киназы наблюдается обратное соотношение: на ее долю приходится 15—20% общей активности и 60—70% белка ферментного препарата.

Выше было указано, что молекулярный вес субъединицы НАД-киназы из скелетных мышц кролика равен 31 000. Близкие по значению  $M_r$  субъединицы определены для фермента из печени крысы (35 000) и голубя (34 000), а также из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (31 000) и *Candida utilis* (32 000) [18, 19, 20, 10].

Основываясь на близких значениях молекулярных весов субъединицы  $\alpha$ -НАД-киназы и фермента из вышеуказанных объектов, можно считать, что фермент  $\alpha$ -типа из печени кролика подобен ферментам из других источников. Что касается  $\beta$ -НАД-киназы, то этот тип фермента обнаружен пока только в печени кролика.

Сравнительное изучение  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов НАД-киназы из печени кролика показало, что эти два типа фермента различаются по многим свойствам. Помимо описанных выше различий в субъединичном составе и удельной активности можно указать на разный характер взаимодействия двух типов фермента с ионообменником, на некоторые различия кинетических свойств и др.

Несмотря на то что из печени кролика можно выделить пять гомогенных форм фермента, а из сердца голубя только одну, общим свойством для фермента из обоих источников является то, что его гомогенные молекулярные формы не способны к ассоциации или диссоциации и представляют собой как бы застывшие, десенсибилизированные формы.

Весь изложенный выше материал убедительно свидетельствует о существовании НАД-киназ в скелетных мышцах кролика, сердце голубя и печени кролика в виде различающихся по молекулярному весу олигомеров, способных к взаимным переходам. Олиго-

меры фермента из скелетных мышц кролика, сердца голубя,  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов НАД-киназы из печени кролика формируются из различного числа идентичных субъединиц с  $M_r$  31 000, 45 000, 33 000 и 62 000 соответственно. Способность к ассоциации — диссоциации утрачивается после очистки фермента на ионообменнике. В дальнейшем изложении мы обсудим возможную причину влияния ионообменной хроматографии на четвертичную структуру фермента.

### Кинетические свойства НАД-киназы

Смещение равновесия между олигомерными формами фермента может обеспечить быструю и тонкую регуляцию активности фермента в том случае, когда эти формы сильно различаются по каталитической активности или когда одна или несколько форм вообще неактивны [21]. Поэтому самым характерным свойством диссоциирующих ферментных систем является зависимость удельной активности от концентрации фермента. Эта зависимость обусловлена переходами между олигомерами разной степени ассоциации, различающимися по каталитической активности. Большое число примеров диссоциирующих ферментов и подробный анализ их свойств приведены в монографии Б. И. Курганова [21]. Демонстрация зависимости  $a$  от  $[E]_0$  может служить убедительным доказательством принадлежности фермента к классу диссоциирующих ферментных систем. При этом с повышением концентрации белка можно наблюдать либо повышение, либо понижение удельной активности в зависимости от того, какая форма данного фермента, ассоциированная или диссоциированная, обладает более высокой ферментативной активностью [21].

Зависимостью  $a$  от  $[E]_0$  характеризовались препараты НАД-киназы из скелетных мышц кролика (рис. 2). Принимая во внимание то обстоятельство, что активность определяли в растворе, в условиях, при которых нельзя исключить взаимного перехода молекулярных форм, не представляется возможным судить об удельной активности каждой из них. Тем не менее форма кривой, представленной на рис. 2А, позволяет констатировать, что наиболее диссоциированные и наиболее ассоциированные в данных условиях формы фермента (левая и правая ветви кривой) способны осуществлять синтез НАДФ с заметно большей скоростью, чем промежуточные формы. Форма кривой  $a$  от  $[E]_0$  упрощалась, если ферментный препарат подвергался многократному замораживанию и оттаиванию в процессе его хранения. Изменение концентрации субстрата в среде инкубации также изменяло форму кривой  $a$  от  $[E]_0$ , что могло быть обусловлено его влиянием на равновесие между олигомерными формами белка [22].

Зависимость удельной активности от концентрации фермента демонстрировали также частично очищенные препараты НАД-киназы из сердца голубя (рис. 2Б, кривая 1). Подобно ферменту из скелетных мышц кролика НАД-киназа из сердца голубя про-

являла более высокую активность при низком содержании белка в инкубационной пробе. С повышением содержания белка активность фермента постепенно понижалась и выходила на плато. Описанный характер изменения удельной активности сохранялся при внесении в пробу разных количеств субстрата, что указывало на меньший вклад последнего в смещение равновесия между олигомерами НАД-киназы из сердца голубя по сравнению с изменением концентрации ферментного препарата в инкубационной пробе.

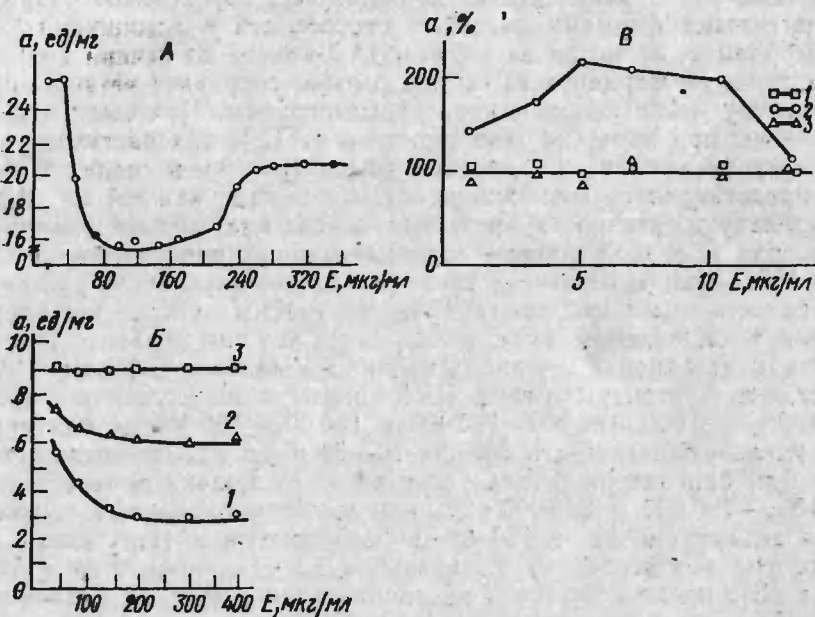


Рис. 2. Зависимость удельной активности от концентрации белка в инкубационной пробе.

По оси абсцисс — концентрация белка; по оси ординат — удельная активность НАД-киназы.

А — НАД-киназа из скелетных мышц кролика; Б — НАД-киназа из сердца голубя: 1 — частично очищенный свежевыделенный препарат; 2 — тот же препарат, исследованный через месяц; 3 — гомогенный препарат; В — НАД-киназа из печени кролика (α-форма, M<sub>r</sub> 180 000): 1 — гомогенный фермент без добавок; 2 — добавлена фракция, содержащая активатор в 5-кратном количестве по отношению к концентрации фермента; 3 — добавлен БСА в 5-кратном количестве по отношению к концентрации фермента

Меньшую степень зависимости  $a$  от  $[E]$  наблюдали для постаревшего (хранившегося в течение месяца при  $-9^{\circ}\text{C}$ ) препарата (рис. 2 Б, кривая 2). Уменьшение зависимости  $a$  от  $[E]$  можно объяснить, по-видимому, частичной утратой способности к ассоциации при старении ферментного препарата. В то же время удельная активность электрофоретически гомогенных препаратов

не зависела от концентрации фермента в инкубационной пробе, что можно рассматривать в качестве еще одного доказательства полной утраты таким ферментом способности к ассоциации при повышении концентрации белка ферментного препарата в среде инкубации.

Как можно было ожидать, частично очищенные препараты НАД-киназы из печени кролика тоже обнаруживали зависимость  $a$  от  $[E]$ , тогда как удельная активность гомогенных препаратов не зависела от концентрации фермента (рис. 2 В, кривая 1). Отсутствие такой зависимости, по-видимому, обусловлено утратой гомогенными формами фермента способности к ассоциации или диссоциации, несмотря на то, что НАД-киназа из печени кролика, в отличие от фермента из сердца голубя, сохраняет четвертичную структуру после ионообменной хроматографии. Как было отмечено выше, при изучении зависимости  $a$  от  $[E]$  для частично очищенных ферментов из скелетных мышц кролика и сердца голубя не представлялось возможным оценить вклад каждой из форм в удельную активность препарата вследствие легкого взаимного перехода в разной степени ассоциированных олигомеров. В случае НАД-киназы из печени кролика удалось определить удельную активность отдельных олигомеров, получаемых после фракционирования на ионообменнике, в силу того, что они утратили способность к ассоциации — диссоциации. Из данных таблицы 1 следует, что олигомеры  $\alpha$ -типа НАД-киназы с молекулярным весом 280 000—290 000, 180 000—190 000 и 150 000—160 000 демонстрируют удельную активность 20—30, 10—20 и 3,6 ед./мг соответственно. Для олигомеров  $\beta$ -типа фермента с молекулярным весом 280 000—290 000 и 210 000—220 000 удельная активность выражается величинами 130 и 160 ед./мг соответственно. Полученные результаты подтверждают высказанное на основании зависимости  $a$  от  $[E]$  предположение о различной каталитической активности множественных молекулярных форм НАД-киназы.

Молекулярная гетерогенность НАД-киназы и различная каталитическая активность олигомеров находят свое выражение в сложном кинетическом поведении фермента. На кривой зависимости  $v$  от  $[S]$  для фермента из скелетных мышц кролика проявляются перегибы и промежуточный максимум (рис. 3 А, кривая 1). Форма таких кривых варьирует при изменении рН инкубационной среды и зависит от длительности хранения ферментного препарата и концентрации фермента. НАД-киназа из скелетных мышц кролика имеет несколько оптимумов рН [23].

Следует заметить, что при значительном повышении концентрации белка в пробе (рис. 3 А, кривая 2) сложная кривая зависимости  $v$  от  $[S]$  значительно упрощается и представляет собой гиперболу. Выражение той же зависимости в обратных координатах дает возможность рассчитать значение  $K_m^{(НАД)}$ , равное  $0,67 \cdot 10^{-3}$  М.

Упрощение сложной кинетической кривой  $v$  от  $[НАД]$  до ги-

перболы наблюдали и при внесении в среду инкубации цАМФ в конечной концентрации  $10^{-5}$  М [4]. Возможно, что цАМФ, как и повышение концентрации белка, способствует ассоциации олигомеров.

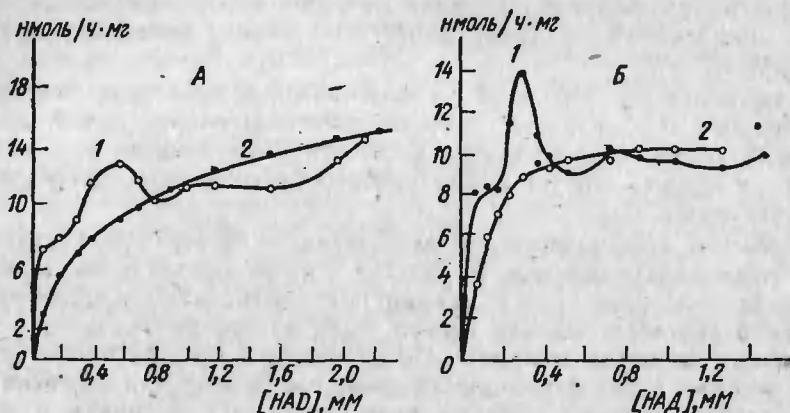


Рис. 3. Зависимость скорости синтеза НАДФ от концентрации НАД. А — НАД-киназа из скелетных мышц кролика: 1 — концентрация фермента в инкубационной пробе 56 мкг/мл; 2 — концентрация фермента в инкубационной пробе 224 мкг/мл; Б — НАД-киназа из сердца голубя: 1 — частично очищенный фермент; 2 — гомогенный фермент

Частично очищенные препараты НАД-киназы из сердца голубя по кинетическим параметрам во многом напоминают свойства фермента из скелетных мышц. Зависимость скорости синтеза НАДФ от концентрации НАД таких препаратов описывается, как и в случае НАД-киназы из скелетных мышц, сложными по форме кривыми, имеющими промежуточный максимум и плато (рис. 3 Б, кривая 1). Поскольку исследуемые препараты фермента из сердца голубя всегда содержат несколько олигомерных форм, сложную кинетическую кривую можно рассматривать как сумму кинетических кривых, характеризующих отдельные олигомеры [7, 24]. Отмечено изменение формы кривой  $v$  от [НАД] при добавлении в инкубационную среду разных количеств белка препарата НАД-киназы. Десятикратное увеличение содержания фермента в пробе (с 47 мкг до 470 мкг) сопровождается некоторым упрощением кинетической кривой, однако она не превращается в гиперболу, как это имело место в случае НАД-киназы из скелетных мышц кролика.

С целью проверки специфичности эффекта повышения концентрации фермента на его удельную активность в реакционные пробы, содержавшие препарат фермента, добавляли четырехкратный избыток сывороточного альбумина быка. Альбумин существенно не влиял ни на удельную активность фермента, ни на форму кинетической кривой.

Выше было показано, что НАД-киназа из сердца голубя после

очистки до гомогенного состояния утрачивает способность к олигомеризации. Изменение четвертичной структуры находит свое отражение и в кинетических свойствах фермента (рис. 3 Б, кривая 2). Удельная активность таких препаратов не зависит от концентрации фермента в среде инкубации, а зависимость  $v$  от  $[S]$  описывается гиперболой.  $K_m^{(НАД)}$  таких препаратов равна 0,1 мМ.

Наблюдаемые различия в кинетических свойствах частично очищенных и электрофоретически гомогенных препаратов, по-видимому, сопряжены с утратой ферментом при очистке до гомогенного состояния присущих ему свойств диссоциирующей ферментной системы.

Очистка сопровождается разрушением четвертичной структуры, гомогенный фермент из сердца голубя представлен мономером, не способным к ассоциации при повышении концентрации белка в растворе. Однако нельзя было полностью исключить возможности перехода мономера НАД-киназы в присутствии субстратов реакции в более ассоциированное состояние. Для решения поставленного вопроса провели иммобилизацию фермента и показали, что иммобилизованный мономер способен осуществлять синтез НАДФ. Последнее обстоятельство явилось доказательством того, что мономер обладает каталитической активностью и, по-видимому, не способен в присутствии субстратов к ассоциации.

Возвращаясь к частично очищенным препаратам НАД-киназы, рассмотрим вопрос о типе взаимных переходов олигомерных форм фермента. Хорошо известно, что для быстро диссоциирующих ферментных систем форма кривой зависимости  $v$  от  $[S]$  определяется концентрацией фермента только в реакционной среде, но не в исходном растворе. Для медленно диссоциирующей системы, кинетическое поведение которой зависит от состояния равновесия между олигомерами в исходном растворе фермента, решающее значение приобретает его «предыстория», т. е. условия хранения ферментного препарата и его концентрация до внесения в реакционную среду [21].

Результаты опытов по определению зависимости удельной активности фермента от его концентрации, при проведении которых фермент разводили непосредственно перед началом инкубации, а также влияние концентрации фермента на ход кинетических кривых  $v$  от  $[S]$ , указывают на возможность достаточно быстрых по сравнению со скоростью НАД-киназой реакции процессов диссоциации.

При исследовании влияния разведения на удельную активность НАД-киназы из скелетных мышц кролика было отмечено любопытное явление — колебание активности в разведенных растворах фермента [25]. Если ферментный препарат, хранившийся при  $-15^{\circ}\text{C}$ , разморозить, развести буфером и выдержать при  $0^{\circ}\text{C}$  определенное время, до добавления в среду инкубации, то активность НАД-киназы изменяется во времени. Колебания наблюдали

на протяжении двух часов после разведения. В размороженном, но не разведенном растворе колебаний активности при выдерживании его при 0° С в течение четырех часов не наблюдали. В случае преинкубации в присутствии НАД и АТФ (без Mg<sup>2+</sup>) колебания ферментативной активности прекращались.

При хранении в течение месяца при —9° С частично очищенных препаратов из сердца голубя также наблюдали периодические спонтанные колебания ферментативной активности.

В процессе хранения препарата происходит попеременное повышение и понижение ферментативной активности. Амплитуда колебаний зависит от концентрации белка в хранящейся пробе. Для неразведенного фермента отмечено плавное изменение активности на протяжении всего срока хранения. Для разведенного в 100 раз препарата характерны резкие скачки ферментативной активности. Если хранить такие препараты в присутствии субстрата (1 мМ НАД), то разведенный препарат НАД-киназы ведет себя при хранении подобно неразведенному [24].

Спонтанные колебания активности фермента во времени после разведения были описаны для препаратов белков актомиозинового комплекса, креатинкиназы и некоторых других ферментов [26, 27]. По мнению авторов, в основе отмеченных колебаний лежат периодические синхронные конформационные изменения молекул белка.

Мы склонны объяснить обнаруженные при хранении препаратов НАД-киназы из скелетных мышц кролика и сердца голубя колебания ферментативной активности медленными процессами ассоциации — диссоциации олигомерных форм фермента, обладающих различной каталитической активностью. В разбавленных растворах амплитуда колебаний увеличивается. Добавленные субстраты прекращают колебание активности, очевидно, фиксируя имеющееся в системе в момент их добавления равновесие между олигомерными формами фермента или стабилизируя одну из олигомерных форм.

Таким образом, изучение четвертичной структуры и некоторых кинетических свойств НАД-киназы из скелетных мышц кролика, сердца голубя и печени кролика позволило обнаружить большое сходство между этими ферментами. Анализ изложенного выше материала, на наш взгляд, убедительно свидетельствует в пользу принадлежности всех трех НАД-киназ к диссоциирующим ферментным системам, регуляция активности которых может осуществляться путем смещения равновесия между олигомерными формами, обладающими различной каталитической активностью. При этом обнаружены некоторые различия между ферментом из скелетных мышц кролика и сердца голубя в регуляции ферментативной активности. Из данных кинетических исследований препарата НАД-киназы из скелетных мышц кролика следует, что смещение равновесия между олигомерными формами происходит при изменении концентрации субстратов, рН среды инкубации, в присутствии цАМФ или при добавлении разных концентраций

фермента. В двух последних случаях удавалось наблюдать нормализацию зависимости  $v$  от  $[S]_0$ , которая из сложной превращалась в гиперболическую, что могло служить указанием на смещение равновесия в сторону одной из форм фермента.

Изменение концентрации субстрата практически не влияло на форму кривой  $a$  от  $[E]_0$  для препарата из сердца голубя, что, по-видимому, можно объяснить большим вкладом в смещение равновесия между олигомерами изменения концентрации фермента, хотя даже при десятикратном повышении концентрации последнего в пробе кривая  $v$  от  $[S]_0$  не превращалась в гиперболу. Эти данные можно рассматривать как указание на то, что сдвиг равновесия между молекулярными формами в препарате фермента из сердца голубя осуществляется менее легко, чем в ферментном препарате из скелетных мышц.

Известно, что кооперативные эффекты в диссоциирующих ферментных системах могут быть обусловлены как смещением равновесия между олигомерами, так и взаимодействием активных центров внутри каждого олигомера [21]. Рассмотренные факты позволяют оценить вклад первого типа взаимодействий.

Следует подчеркнуть, что характерные для диссоциирующих систем свойства НАД-киназы утрачивает после очистки до гомогенного состояния. По-видимому, НАД-киназа принадлежит к ферментам, слишком высокая степень очистки которых приводит к изменению или даже исчезновению регуляторных свойств.

Точку зрения о необходимости осторожного подхода к оценке результатов, получаемых при исследовании высокоочищенных ферментов, высказывают в своей монографии Э. Ньюсхолм и К. Старт [1]. Они указывают на то, что следует стремиться к достижению известного компромисса между использованием частично очищенных препаратов, в которых с наибольшей вероятностью сохраняются регуляторные свойства фермента, и изучением свойств очищенных до гомогенного состояния ферментов.

### Регулятор НАД-киназы

Теперь попытаемся ответить на вопрос, что же происходит с НАД-киназой после фракционирования на ионообменнике и очистки фермента до гомогенного состояния.

Электрофоретически гомогенные ферменты отличаются большой лабильностью и быстро инактивируются при хранении. Отмечали также крайнюю неустойчивость фермента после ионообменной хроматографии НАД-киназы из пивных дрожжей [20] и проростков гороха [9]. Причем фермент из растений в отдельных случаях, а НАД-киназа из яиц морского ежа постоянно [28] после указанной процедуры инактивировались полностью. Причина инактивации заключалась в том, что в процессе ионообменной хроматографии от фермента отделялся фактор, в отсутствие которого НАД-киназа не проявляла активности. Фактор более прочно, чем фермент, связывался с ДЭАЭЦ и сходил с колонки при

более высоком значении ионной силы буфера. Этим термостабильным, недиализуемым фактором оказался кальмодулин [29, 30]. Помимо фермента из проростков гороха фактор активировал НАД-киназу из большого числа растительных объектов [9, 29]. Активирующий эффект кальмодулина проявлялся только в присутствии ионов кальция. При добавлении кальмодулина или содержащей его фракции, получаемой при фракционировании на ионообменнике, к неактивной НАД-киназе из проростков гороха фермент полностью восстанавливал активность. Полное восстановление активности наблюдали также при добавлении кальмодулина из мозга свиньи к НАД-киназе из яиц морского ежа, инактивированной после пропускания через колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-25 [28].

Идентичность кальмодулина из растительных и животных тканей была продемонстрирована в опытах по перекрестной активации ферментов [29]. Кальмодулин растительного происхождения активировал фосфодиэстеразу из мозга быка, и, наоборот, кальмодулин, полученный из мозга свиньи, восстанавливал активность НАД-киназы из проростков гороха. Кальмодулины растительного и животного происхождения обнаружили сходство и по ряду других свойств, таких, как молекулярный вес, аминокислотный состав, способность взаимодействовать с тропонином I, утрачивать активирующее действие в присутствии фенотиазина [30].

НАД-киназа из сердца голубя и печени кролика не теряла активности после ионообменной хроматографии в отличие от фермента из проростков гороха, однако очищенный фермент утрачивал прежние свойства диссоциирующей ферментной системы.

В настоящее время трудно ответить на вопрос о том, почему фракционирование на ионообменнике сопряжено с разрушением четвертичной структуры НАД-киназы из сердца голубя. Можно высказать лишь предположение, что по аналогии с ферментом из проростков гороха в процессе ионообменной хроматографии от НАД-киназы отделяется фактор; в отсутствие которого последняя утрачивает свойства регуляторной диссоциирующей ферментной системы. Принципиальная возможность регуляции степени ассоциации фермента при помощи специфического фактора показана для 3-фосфоглицераткиназы из ряда объектов [31]. Авторы работы установили, что молекулярный вес частично очищенного фермента может колебаться от 43 000 до 160 000 в зависимости от условий гель-фильтрации через колонки с сефадексом G-100 или G-150, а после фракционирования на ионообменнике ДЭАЭ-сефадексе А-50 фермент утрачивает способность к ассоциации — диссоциации, и независимо от условий гель-фильтрации молекулярный вес его остается неизменным и равным 43 000. При этом было замечено, что в процессе ионообменной хроматографии с колонки смывается фракция, содержащая низкомолекулярный, термостабильный фактор, при добавлении которого к очищенному ферменту с молекулярным весом 43 000 последний вновь приобретает утраченную способность образовывать более высокомолеку-

лярные формы. Фактор прочно сорбировался на колонке и элюировался при более высоком значении ионной силы раствора, чем фермент.

При анализе белковых фракций, смываемых с колонки при ионообменной хроматографии НАД-киназы из печени кролика, был обнаружен фактор, способный изменять активность фермента. Этот фактор не связывается с ионообменником и выходит при нанесении образца фермента на колонку в первой белковой фракции. Вопрос о том, какова его природа и не является ли он кальмодулином, будет рассмотрен ниже. Фактор не обладает ферментативной активностью, термостабилен (его эффект сохраняется после прогревания в течение 5—7 мин при 100°С), не проходит через мембрану при диализе или ультрафильтрации. При исследовании действия фактора на НАД-киназу из печени кролика мы не всегда наблюдали однозначный эффект, что выражалось в следующем. Во-первых, степень активации варьировала в широких пределах (от 30 до 150%), а при большом избытке фактора наблюдали даже десятикратную активацию. Причина неодинаковой активации, по-видимому, кроется в различном содержании самого активатора в разных частично очищенных препаратах, используемых в опыте. Во-вторых, фактор оказывал влияние не на все препараты фермента. Степень активации зависела также от типа НАД-киназы ( $\alpha$  или  $\beta$ ). Было выяснено, что более выражено активирующее действие фактора на  $\alpha$ -форму НАД-киназы [17]. При этом из двух форм фермента  $\alpha$ -типа с молекулярным весом 150 000 и 180 000 в большей степени активируется первая, наименее активная форма. На первый взгляд эти данные трудно объяснить действием одного активатора. Для интерпретации полученных результатов проще всего было бы допустить присутствие в использованных частично очищенных препаратах, помимо активатора, еще и ингибитора фермента. Для многих ферментов показана возможность регуляции каталитической активности при участии как активатора, так и ингибитора. Очевидно, что конечный эффект будет зависеть только от соотношения активатор/ингибитор в используемых препаратах. Активация может наблюдаться, когда действие активатора преобладает над действием ингибитора. В противном случае выявляется ингибирование фермента. Эффект отсутствует, когда действие активатора уравновешивается действием ингибитора.

Мы придерживаемся иной точки зрения при объяснении полученных результатов и исходим из того, что между ферментом и регулятором в зависимости от концентрационных соотношений могут образовываться различающиеся по стехиометрии комплексы с разной каталитической активностью. Высказанная точка зрения нашла экспериментальное подтверждение. Как следует из данных, представленных на рис. 4, можно наблюдать оба эффекта — активацию и ингибирование, добавляя разные количества частично очищенного препарата регулятора к одному и тому же количеству фермента.

Особое внимание следует обратить на тот факт, что обнаруженный регулятор активности при добавлении к гомогенному ферменту возвращает НАД-киназе утраченное ею свойство, характерное для диссоциирующей ферментной системы, а именно зависимость удельной активности от концентрации фермента (см. рис. 2 В, 2). Как можно видеть, действие фактора специфическое, так как добавление сывороточного альбумина быка к очищенному ферменту в тех же концентрациях не оказывает влияния на активность фермента при изменении концентрации последнего в инкубационной среде (рис. 2 В, 3).

Рис. 4. Кривая титрования НАД-киназы из печени кролика регулятором.

По оси ординат — активность, % (за 100% принята активность пробы без добавления регулятора), по оси абсцисс — количество добавленного регулятора в мкг белка частично очищенного препарата, мкг.

Фермент:  $\beta$ -форма НАД-киназы, М, 210 000, добавлен в количестве 5 мкг на пробу



В настоящее время мы не располагаем прямыми данными относительно изменения четвертичной структуры НАД-киназы из печени при добавлении активатора к гомогенному ферменту. Однако тот факт, что в присутствии активатора очищенный фермент вновь демонстрирует зависимость удельной активности от концентрации белка в среде инкубации, дает основание предположить, что фактор, отделяемый от фермента при ионообменной хроматографии, может способствовать, как и в случае 3-фосфоглицераткиназы, переходу фермента из одного олигомерного состояния в другое.

В сердце голубя также был обнаружен фактор, способный активировать НАД-киназу. В качестве источника активатора использовали надосадочную жидкость, остающуюся после осаждения комплекса НАД-киназы с протаминсульфатом на одной из стадий очистки. Супернатант прогревали в течение 10 мин на кипящей водяной бане, отделяли коагулировавшие белки и фракцию, содержащую активатор, получали путем высаливания сульфатом аммония до 60%-ного насыщения с последующим диализом. Как следует из данных табл. 2, эта термостабильная белковая фракция активирует НАД-киназу из сердца голубя в 1,3—2,0 раза в зависимости от добавленного количества. По-видимому, как и в случае фермента из печени, эффект активатора на НАД-киназу из сердца голубя специфичен, так как добавление БСА в том же количестве не оказывало никакого влияния на активность фермента.

Следует заметить, что активирующая НАД-киназу фракция

Таблица 2

Влияние активатора на активность НАД-киназы из сердца голубя (24)

№ пробы	Фермент, мкг	Активатор, мкг	БСА, мкг	Активность, ед./мг
1	96	—	—	0,80
2	96	120	—	1,06
3	96	360	—	1,37
4	96	600	—	1,61
5	96	—	120	0,80
6	96	—	360	0,80
7	96	—	600	0,80

из сердца голубя способна также активировать НАД-киназу из печени кролика. В свою очередь добавление фракции, содержащей активатор из печени кролика, вызывает активацию фермента из сердца голубя.

В настоящее время фактор — регулятор активности НАД-киназы из печени кролика и сердца голубя — не выделен в гомогенном состоянии. Выделение и очистка регулятора активности НАД-киназы представляются задачей перв-

востепенной важности. Имея очищенный активатор, можно будет однозначно решить вопрос о его участии в поддержании четвертичной структуры и о влиянии на степень олигомеризации фермента, а следовательно, о той роли, которую он играет в регуляции каталитической активности.

Возникает вопрос, не является ли этот фактор белком, подобным кальмодулину. Судя по имеющимся данным, активатор НАД-киназы из сердца голубя и печени кролика существенно отличается от кальмодулина. Так, кальмодулин-активатор НАД-киназы из высших растений и яиц морского ежа прочно связывается с ионообменником и сходит с колонки значительно позже НАД-киназы, тогда как активатор фермента из печени кролика в тех же условиях вовсе не связывается с ионообменником. Далее, фермент из растительных объектов после отделения кальмодулина полностью утрачивает активность, что дало основание рассматривать кальмодулин как субъединицу этих ферментов. НАД-киназа из сердца голубя и печени кролика после ионообменной хроматографии сохраняет активность; более того, наблюдается значительная очистка фермента за счет отделения примесных белков. Однако при этом разрушается четвертичная структура фермента из сердца голубя, который после такой процедуры представляет собой мономер, не способный к ассоциации.

Следует признать, что сам факт сохранения активности фермента после фракционирования на ионообменнике хотя и является признаком, по которому различаются НАД-киназы животного и растительного происхождения, тем не менее он не исключает возможности регуляции кальмодулином активности фермента из животных тканей. Прямой ответ на поставленный вопрос можно было бы получить только исследуя влияние очищенного кальмодулина на гомогенный препарат фермента из печени кролика и сердца голубя.

Интересно отметить, что НАД-киназа из проростков гороха также представлена множественными формами. Было обнаруже-

но [9] по крайней мере 5 таких форм. Вопрос о природе множественных форм НАД-киназы из проростков гороха остался открытым. Отсутствуют какие-либо сведения о молекулярном весе этих форм. Нельзя исключить, однако, возможности того, что добавление кальмодулина к неактивному или частично сохранившему активность ферменту могло бы наряду с активацией привести к изменению степени ассоциации белка.

Как было уже сказано, фермент из печени кролика, в отличие от фермента из сердца голубя, сохраняет четвертичную структуру после ионообменной хроматографии, однако получаемые олигомеры утрачивают способность к взаимным переходам. Последнее обстоятельство позволило определить удельную активность каждого из выделяемых в электрофоретически гомогенном состоянии олигомеров и показать, что олигомеры разной степени ассоциации проявляют различную каталитическую активность.

Определяя в растворе активность того или иного фермента, обладающего четвертичной структурой, экспериментатор часто не имеет возможности составить представление о том, как изменяется и меняется ли вообще эта структура в процессе каталитического акта. Такой вопрос просто не возникает, если кинетическое поведение ферментов не обнаруживает отклонений от простых кинетических закономерностей типа гиперболического закона Михаэлиса—Ментен.

Отсутствие зависимости  $a$  от  $[E]_0$  для гомогенных препаратов НАД-киназы из печени кролика исключало возможность кооперативных эффектов, опосредованных смещением равновесия между олигомерами разной степени сложности. Между тем исследование гомогенных  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм фермента методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы в условиях протекания ферментативной реакции обнаружило молекулярную гетерогенность таких препаратов и позволило установить ряд интересных закономерностей.

#### **Четвертичная структура НАД-киназы в условиях протекания ферментативной реакции**

В том случае, когда диссоциирующий фермент представлен равновесной системой нескольких олигомеров, определение активности фермента при насыщающих концентрациях субстратов не может дать представления о том, какие из этих форм каталитически активны. Положение еще больше усложняется, когда олигомеры различаются по каталитической активности.

Использование метода ультрацентрифугирования (УЦ) в присутствии субстратов ферментативной реакции, с одной стороны, позволяет решить вопрос о вкладе каждого из олигомеров в общую активность фермента, с другой — определить молекулярный вес нативного фермента, а также число и  $M_r$  «активно работающих» форм. Этот метод имеет еще и то преимущество, что позволяет использовать малое количество фермента — всего 1 мкг

[32]. Несмотря на очевидные достоинства метод УЦ не нашел пока широкого применения. Лишь для органиченного числа ферментов, обладающих четвертичной структурой, определен молекулярный вес активно работающей формы [33—38].

Как правило, место локализации фермента в пробирке при проведении УЦ определяют по активности, а за распределением белка в градиенте сахарозы не следят. При седиментационном анализе НАД-киназы мы определяли место локализации фермента как по активности, так и по белку. УЦ подвергали электрофоретически гомогенные препараты  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы НАД-киназы с молекулярным весом 180 000 и 210 000 соответственно. УЦ проводили как в присутствии, так и в отсутствие субстратов. По окончании УЦ градиенты фракционировали на 25—35 фракций и в каждой помимо активности определяли белок методом с кумаси G-250 [39]. На рис. 5 представлены кривые распределения ак-

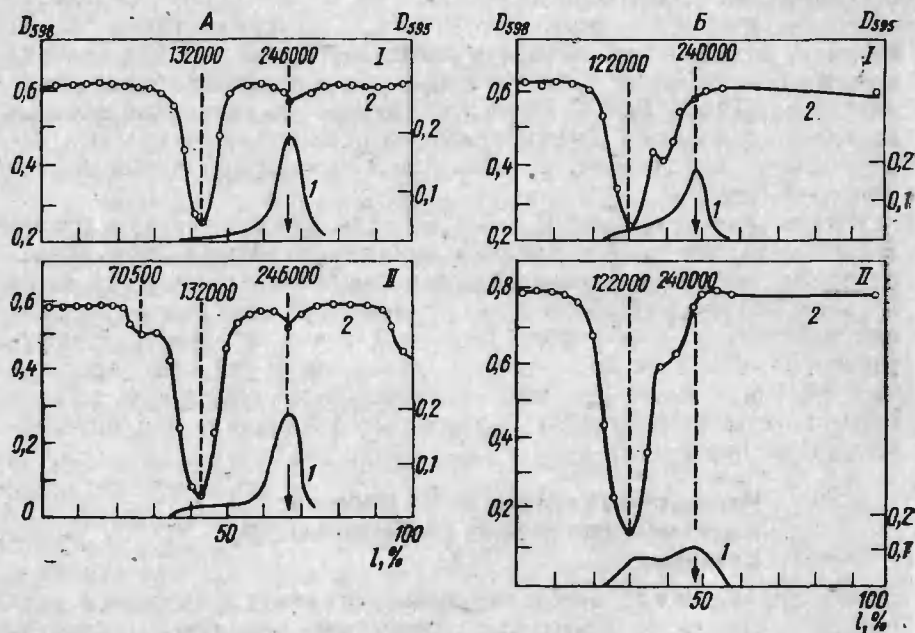


Рис. 5. Ультрацентрифугирование  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм НАД-киназы.

А —  $\alpha$ -форма фермента,  $M_r$  180 000; Б —  $\beta$ -форма фермента,  $M_r$  210 000; 1 — в отсутствие субстратов; II — в присутствии субстратов (1,2 мМ НАД, 1,5 мМ АТФ и 10 мМ  $MgCl_2$ ); 1 — белок ( $D_{595}$ ); 2 — активность ( $D_{598}$ ); стрелкой показано положение каталазы ( $M_r$  240 000). В случае УЦ в присутствии субстратов проводили дополнительную выкубацию после фракционирования градиента

тивности и белка в градиенте сахарозы после УЦ. Как можно видеть, при УЦ формы фермента в отсутствие субстратов (рис. 5. А, I) выявлены два пика активности, соответствующие белкам с  $M_r$  130 000—135 000 и 240 000. Преобладающей по активности оказывается первая форма: на ее долю приходится до 90% общей

активности образца. Вторая форма является минорной по активности. Обратные соотношения наблюдаются в распределении белка по фракциям градиента. На минорную по активности форму с  $M_r$  240 000 приходится до 95% белка исследованного образца фермента. Исходя из молекулярного веса субъединицы  $\alpha$ -формы НАД-киназы (33 000), можно считать, что форма с  $M_r$  130 000 является тетрамером. При УЦ в присутствии субстратов (НАД+ + Mg АТФ) картина распределения белка и профиль активности фермента незначительно изменялись в качественном отношении, но при этом происходили количественные изменения (рис. 5 А, В). Преобладающей по активности, как и при УЦ в отсутствие субстратов, остается форма с  $M_r$  130 000, однако доля этой формы по белку увеличивается с 5 до 10—15% и, что особенно важно, общая активность образца при УЦ в условиях работы фермента увеличивается примерно в 2,5 раза.

Создается впечатление, что в присутствии субстратов происходит переход некоторой части фермента из малоактивной или неактивной формы с  $M_r$  240 000 в высокоактивную форму с  $M_r$  130 000. По-видимому, следствием этого перехода в присутствии субстратов является активация фермента. Пятикратное увеличение концентрации субстратов не повышает доли активной формы белка. Значение  $M_r$  последней не зависит от ионной силы используемого буфера. При УЦ в присутствии субстратов, кроме двух основных форм, можно заметить целый ряд минорных, число которых варьирует от препарата к препарату. Среди них можно назвать мономер, димер и форму с  $M_r$  370 000. Помимо названных, всегда обнаруживается еще одна минорная, быстро седиментирующая форма, которая за время УЦ (4—5 ч) доходит до дна центрифужного стакана. В дальнейшем было выяснено, что появление этой высокомолекулярной формы обусловлено образованием неспецифических агрегатов фермента.

Тот факт, что, несмотря на электрофоретическую гомогенность используемых в опытах по УЦ препаратов НАД-киназы, основная масса белка или обладает очень низкой каталитической активностью или не обладает совсем, может ставить под сомнение принадлежность этого белка к собственно НАД-киназе. Для решения возникшего вопроса проводили повторное УЦ неактивного белка. С этой целью из нескольких пробирок объединяли фракции, содержавшие неактивный белок, и после соответствующего разведения и концентрирования около 40 мкг белка подвергали повторному УЦ. Снова обнаруживали активную форму с  $M_r$  130 000.

Полученный результат дает основание полагать, что неактивный белок представляет собой потенциально активную форму фермента, способную в определенных условиях переходить в каталитически активную.

Мы попытались обнаружить активную тетрамерную форму методом электрофореза в градиенте ПААГ. Для повышения доли активной формы гомогениный препарат фермента  $\alpha$ -типа с  $M_r$  180 000 инкубировали с субстратами в течение 2 сут при +4° С,

после чего подвергали электрофорезу. Оказалось, что электрофо-реграмма белка после такой обработки не изменилась и демонст-рировала всего одну белковую полосу с  $M_r$  180 000; тетрамера обнаружить не удалось. В то же время анализ этого же препара-та методом УЦ показал значительный переход неактивной формы фермента в активную, тетрамерную. По-видимому, активная фор-ма отличается большой лабильностью и при электрофорезе может переходить в неактивную.

Исследовали влияние каждого из субстратов и их компонен-тов (НАД, Mg-АТФ, АТФ,  $MgCl_2$ ) на структуру фермента при УЦ. Оказалось, что решающее влияние на четвертичную структу-ру фермента оказывает Mg-АТФ. Общая активность образца после УЦ в присутствии НАД или АТФ не изменялась по сравнению с активностью, определенной после УЦ в отсутствие субстратов, тогда как в присутствии только Mg-АТФ картина распределения активности и белка аналогична наблюдаемой при УЦ в полной системе (НАД+Mg-АТФ). В обоих последних случаях доля ак-тивной формы составляет 15% общего белка фермента.

Открытым остается вопрос о том, обладает ли основная по-белку форма фермента с  $M_r$  240 000 некоторой активностью. Ско-рее всего эта форма совсем неактивна, а незначительная актив-ность, обнаруживаемая во фракции градиента данной формой, обусловлена переходом некоторой части белка из неактивной в активную форму с момента фракционирования градиента саха-розы по окончании УЦ до определения активности во фракциях.

При анализе методом УЦ другой формы  $\alpha$ -типа НАД-киназы с меньшей удельной активностью ( $M_r$  150 000) было показано, что она также ведет себя как система, состоящая из активной и неак-тивной форм. Активная форма, как и в случае олигомера с  $M_r$  180 000, имеет тетрамерную структуру.

Частично очищенные препараты НАД-киназы, подвергнутые УЦ в присутствии субстратов, обнаруживают в качестве основной каталитически активной все ту же форму с  $M_r$  130 000.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют, что ос-новной, если не единственной активно работающей формой фер-мента  $\alpha$ -типа как в гомогенных, так и частично очищенных пре-паратах является тетрамерная форма ( $\alpha_4$ ), которая, по-видимому, находится в равновесии с неактивной формой.

При УЦ препарата НАД-киназы  $\beta$ -типа были получены анало-гичные результаты. Электрофоретически гомогенный препарат ( $M_r$  210 000) также разделяется при центрифугировании на ак-тивную (с  $M_r$  120 000—130 000) и неактивную (с  $M_r$  240 000) фор-мы. Но по сравнению с ферментом  $\alpha$ -типа большая часть фермен-та  $\beta$ -типа присутствует в активной форме: в отсутствие субстра-тов на долю этой формы приходится 15% белка, а в их присутст-вии — 40%. При этом наблюдается повышение активности иссле-дуемого образца фермента в 2,5 раза.

Так как молекулярный вес субъединицы  $\beta$ -типа НАД-киназы равен 62 000, активная форма является димером. Помимо актив-

ной димерной формы в препарате фермента  $\beta$ -типа обнаруживается еще одна — с  $M_r$  190 000 (тример), доля которого при УЦ в присутствии субстратов уменьшается (см. рис. 5 Б, II).

Таким образом, на основании результатов, полученных при исследовании электрофоретически гомогенных препаратов  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов НАД-киназы с помощью метода УЦ в градиенте плотности сахарозы, можно сделать следующее заключение: (1) гомогенный, по данным электрофореза, фермент при УЦ разделяется на две основные формы — каталитически активную и неактивную. (2) В присутствии субстратов (НАД и Mg-АТФ) наблюдается переход фермента из неактивной формы в каталитически активную. При этом в активную форму может перейти только часть неактивного фермента. В случае  $\alpha$ -типа НАД-киназы доля эта незначительна и составляет 15%, для  $\beta$ -типа фермента показан переход в активную форму 40% неактивного белка. (3) Переход большего количества белка в активную форму в присутствии субстратов сопровождается повышением общей активности образца фермента. (4) Каталитически активными формами  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов НАД-киназы являются тетрамер и димер соответственно.

Можно думать, что разные значения удельной активности, полученные для отдельных гомогенных форм  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов (см. табл. 1), обусловлены различным содержанием в них каталитически активной формы.

Механизм перехода неактивного гекса- или тетрамера в активный тетрамер ( $\alpha$ -форма) или димер ( $\beta$ -форма) неизвестен. Непонятной остается причина лишь частичного перехода неактивной формы в активную. Нам не удалось повысить долю активной формы такими воздействиями, как продолжительная инкубация в присутствии субстратов, или увеличение в 5 раз концентраций НАД и Mg-АТФ.

Мы не нашли в доступной нам литературе аналогичных данных о разделении при УЦ в присутствии субстратов олигомерных белков на каталитически активные и неактивные формы. Возможно, что отсутствие подобных результатов объясняется тем, что при исследовании четвертичной структуры ферментов методом УЦ в условиях протекания ферментативной реакции место локализации фермента в центрифужной пробирке определяли исключительно по активности. По этой причине присутствие неактивной белковой фракции могло остаться просто незамеченным. Между тем нельзя, по-видимому, полностью исключить возможности существования и для других ферментов каталитически активной и неактивной форм. Высказанное соображение можно проиллюстрировать следующим примером. Из данных литературы известно, что молекулярный вес гомогенного препарата НАД-киназы из печени голубя, определенный методом гель-фильтрации, равен 270 000 [19]. Мы анализировали методом УЦ в присутствии субстратов частично очищенные препараты фермента из печени голубя и не смогли обнаружить каталитически активной формы с таким высоким молекулярным весом. Однако 60% активности

приходилось на форму с  $M_r$  133 000. Эти результаты указывают на то, что в данных условиях каталитически активной формой фермента из печени голубя является, по-видимому, тетрамер (напомним, что  $M_r$  субъединицы фермента равен 34 000).

Как и следовало ожидать, для диссоциирующих ферментов молекулярный вес активно работающей формы зависел от количества взятого на анализ белка. Так, при низких концентрациях фермента ( $<12$  мкг/мл) фосфофруктокиназа (ФФК) из мышц кролика представлена в основном мономером; при высоких концентрациях фермента активно работающей формой фермента становится тетрамер [33]. При всех условиях (в отсутствие субстратов, при относительно низких концентрациях фермента и др.) работающая форма ФФК исходно присутствует в растворе и находится в равновесии с другими формами фермента. В присутствии субстрата ее доля увеличивается, и она становится преобладающей в системе [34, 40]. В этом отношении ФФК напоминает НАД-киназу из печени кролика, препараты которой при анализе в отсутствие субстратов обнаруживают незначительное количество активной формы. Доля последней увеличивается при УЦ в полной системе. Однако сходство это относительное и полной аналогии между поведением обоих ферментов провести нельзя уже потому, что олигомерное состояние активной формы ФФК может меняться при изменении концентрации исследуемого образца, тогда как гомогенные препараты НАД-киназы, как уже неоднократно подчеркивалось, утратили способность к такого рода переходам. Кроме того, мы ничего не знаем о существовании каталитически неактивных форм ФФК.

### Заключение

Вся совокупность изложенных данных указывает на существование достаточно сложной, многоступенчатой системы регуляции активности НАД-киназы в исследованных животных тканях. Регуляция ферментативной активности может осуществляться на разных уровнях. Это прежде всего регуляция на уровне субстратов и их аналогов. Вопрос о такого рода регуляции достаточно полно освещен в литературе. Показано, что  $Mg$ -АТФ играет более важную роль в регуляции НАД-киназной активности, чем НАД [41—43], и поэтому именно концентрация АТФ может явиться лимитирующим фактором в синтезе НАДФ в организме. Хорошо известно, что НАД-киназа почти из всех источников ингибируется восстановленными формами пиридиновых нуклеотидов НАДН и НАДФН [44, 19, 45—48] и аналогами АТФ: АДФ [46, 47, 49], АДФР, аденозином, 2'-, 3'- и 5' АМФ [50]. Свободные  $ATP^{4-}$  и  $Mg^{2+}$  также ингибируют фермент [51]. Предполагают, что ингибция НАДН и НАДФН может лежать в основе регуляции активности фермента *in vivo*. Расчеты показали, что при физиологических концентрациях НАДН и НАДФН в печени крысы активность НАД-киназы может быть заторможена на 80% [43].

В обзоре основное внимание было уделено анализу возможных механизмов регуляции ферментативной активности на уровне четвертичной структуры и показана целесообразность и необходимость сравнительного изучения свойств частично очищенного и гомогенного фермента для выявления многообразных способов регуляции НАД-киназы. Было показано, что фермент в скелетных мышцах кролика, сердце голубя и печени кролика представлен множественными формами и проявляет свойства диссоциирующей ферментной системы. Приведены данные о наличии в ткани печени двух типов фермента ( $\alpha$  и  $\beta$ ), различающихся по субъединичному составу, каталитической активности и целому ряду физико-химических свойств.

В регуляцию синтеза НАДФ в животных тканях, опосредованной смещением равновесия между олигомерами разной степени ассоциации, проявляющими различную каталитическую активность, определенную роль может играть термостабильный регулятор. Механизм взаимодействия фермента с регулятором не ясен, однако присутствие последнего, по-видимому, способствует сохранению ферментом способности к регуляции активности путем изменения степени олигомеризации.

Очистка фермента до гомогенного состояния сопровождается полным разрушением четвертичной структуры НАД-киназы из сердца голубя. Фермент из печени кролика после фракционирования на ионообменнике сохраняет четвертичную структуру, но получаемые при этом отдельные олигомеры утрачивают способность к взаимным переходам и представляют собой десенсибилизированные формы фермента.

Седиментационный анализ таких олигомеров позволил обнаружить еще один, не описанный ранее в доступной нам литературе способ регуляции ферментативной активности НАД-киназы. Было установлено, что каждый из гомогенных, по данным электрофореза, олигомеров существует в двух формах: активной, которая собственно и осуществляет каталитический акт, и неактивной, доля которой по белку значительно превосходит долю активно работающей формы. В присутствии субстратов происходит частичный переход из неактивной формы в активную, количество которой зависит как от типа ( $\alpha$  или  $\beta$ ), так и от молекулярного веса олигомеров.

По-видимому, указанные способы регуляции ферментативной активности НАД-киназы могут реализоваться в клетке *in vivo*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ньюсколы Э., Старт К. (1977) Регуляция метаболизма. Мир, М.
2. Телепнева В. И., Иссарова И. Д. (1974) Докл. АН СССР, 218, 234—237.
3. Иссарова И. Д., Лебедев А. Н., Телепнева В. И. (1974). Докл. АН СССР 219, 488—491.
4. Иссарова И. Д., Телепнева В. И. (1977) Укр. биохим. журн. 49, 124—129.
5. Булыгина Е. Р., Телепнева В. И. (1980) Биохимия 45, 2019—2027.
6. Нгуен Ван Тхьет, Телепнева В. И. (1981) Биохимия 46, 435—443.

7. Bulygina E. R., Telepneva V. I. (1982) *Biochem. Intern.* 4, 135—142.
8. Agosin M., Ilivicky J., Litvak S. (1967) *Canad. J. Biochem.* 45, 619—626.
9. Muto S., Miyachi S. (1977) *Plant. Physiol.* 59, 55—60.
10. Butler J. R., McGuinness E. T. (1982) *Int. J. Biochem.* 14, 839—844.
11. Apps D. K. (1970) *Europ. J. Biochem.* 13, 223—230.
12. Афанасьева Т. П., Филиппович С. Ю., Крицкий М. С. (1982) *Прикладная биохимия и микробиология* 18, 376—382.
13. Murata K., Uchida T., Tani K. et al. (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44, 61—68.
14. Жучихина А. А., Этингер Р. Н. (1973) *Докл. АН СССР*, 212, 996—999.
15. Chung A. E. (1968) *BBA* 159, 490—495.
16. Kopperschlager G., Diezel W., Bierwagen B., Hofmann E. (1969) *FEBS Lett.* 5, 221—224.
17. Nguyen Van Thiet, Telepneva V. I. (1982) *Biochem. Intern.*, 4, 409—416.
18. Немчинская В. Л., Божков В. М., Кушнер В. П. (1970) *Биохимия* 35, 1067—1072.
19. Apps D. K. (1975) *Europ. J. Biochem.* 55, 475—483.
20. Tseng Y.-M., Harris V. G., Jacobson M. K. (1979) *BBA*, 568, 205—214.
21. Курганов Б. И. (1978) *Аллостерические ферменты*, Наука, М.
22. Беляева Н. Ф., Телепнева В. И. (1973) *Докл. АН СССР*, 209, 977—979.
23. Беляева Н. Ф., Телепнева В. И. (1974) *Биохимия* 39, 975—983.
24. Булыгина Е. Р., Телепнева В. И. (1983) *Биохимия*, 48, 906—913.
25. Инсарова И. Д., Беляева Н. Ф., Телепнева В. И. (1976) *Бюлл. экпер. биол. н мед.*, 82, 957—959.
26. Шноль С. Э., Коломбет В. А., Иванова Н. П., Брницкая Г. Я. (1980) *Биофизика*, 25, 409—416.
27. Четверикова Е. П. (1972) в кн. *Механизмы мышечного сокращения*, с. 26—32, Наука, М.
28. Meijer L., Guerrier P. (1982) *BBA*, 702, 143—146.
29. Anderson J. M., Cormier M. J. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 595—602.
30. Anderson J. M., Charbonneau H., Jones H. P. et al. (1970) *Biochemistry* 19, 3113—3120.
31. Gupta S. K., Rothstein M. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 48—54.
32. Cohen R., Mire M. (1971) *Europ. J. Biochem.* 23, 267—281.
33. Hesterberg L. K., Lee J. C. (1980) *Biochemistry* 19, 2030—2039.
34. Hesterberg L. K., Lee J. C., Erickson H. P. (1981) *JBC*, 256, 9724—9730.
35. Ireland C. R., Wolfe R. G. (1979) *BBA*, 566, 397—399.
36. Karadsheh N. S., Uyeda K. (1977) *JBC*, 252, 3515—3524.
37. Taylor B. L., Barden R. E., Utter M. F. (1972) *JBC*, 247, 7383—7390.
38. Taylor B. L., Frey W. H., Barden R. E. et al. (1978) *JBC*, 253, 3062—3069.
39. Spector T. (1978) *Anal. Biochem.*, 86, 142—146.
40. Hesterberg L. K., Lee J. C. (1982) *Biochemistry* 21, 216—222.
41. Slater T. F. (1966) *Biochem. J.* 99, p. 2P.
42. Greenbaum A. L., Clark J. B., McLean P. (1964) 93, 17—19.
43. Ока Н., Field J. B. (1968) *JBC*, 243, 815—819.
44. Немчинская В. Л., Смирнова Т. Б. (1967) *Биохимия* 32, 854—858.
45. Blomquist Ch. H. (1973) *JBC*, 248, 7044—7048.
46. Северин С. Е., Телепнева В. И., Цейтлин Л. А. (1970) *Биохимия* 35, 329—335.
47. Телепнева В. И., Мештер Р. (1971) *Вопр. мед. химии* 17, 20—26.
48. Yamamoto Y. (1966) *Plant Physiol.* 41, 523—528.
49. Apps D. K. (1968) *Europ. J. Biochem.* 5, 444—450.
50. Wang T. P., Kaplan N. O. (1954) *JBC*, 206, 311—325.
51. Apps D. K. (1969) *Europ. J. Biochem.* 7, 260—266.

# ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ПОД ВЫСОКИМ ДАВЛЕНИЕМ

В. Я. Черняк

(Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ)

Ровно 100 лет тому назад глубоководная драга экспедиционного корабля «Талисман» принесла живые организмы со дна моря, с глубины 6000 м. На такой глубине гидростатическое давление превышает 600 атм, и это сразу привлекло внимание к вопросу о влиянии давления на биологическую активность. Исследования, начатые на клеточном уровне (они продолжаются и по сей день), вскоре были дополнены изучением активности изолированных ферментов.

Однако увлечение техникой эксперимента привело к тому, что на протяжении нескольких десятилетий опыты проводили в области гидростатических давлений, по большей части намного превышавших 1200 атм — предельное давление в Мировом океане [1, 2]. В результате длительное время преобладало ошибочное убеждение, что наиболее общим эффектом гидростатического давления является денатурация белков. Лишь после появления теории абсолютных скоростей реакций и разработки термодинамического аспекта ферментативных реакций под давлением [3, 4] появилось понимание важной роли объемных эффектов, сопровождающих эти реакции, и оживился интерес к умеренным гидростатическим давлениям, которые могут играть важную роль в жизнедеятельности глубоководных организмов.

В 60-е годы было обнаружено, что межсубъединичные белок-белковые взаимодействия также могут сопровождаться значительными изменениями парциальных объемов. В зависимости от знака этих изменений гидростатическое давление приводит к многократному увеличению или уменьшению константы ассоциации белков, состоящих из нескольких субъединиц. Интересные проявления этих эффектов обнаруживаются в скоростных опытах на ультрацентрифугах [6—8].

Способность умеренно высокого гидростатического давления вызывать диссоциацию олигомерных белков в отсутствие таких денатурирующих агентов, как мочевины, гуанидин-хлорид, детергенты, придает этим исследованиям двойкий интерес: во-первых, количественное определение изменения парциального молярного объема позволяет делать некоторые заключения о природе межсубъединичных контактных участков, во-вторых, высокая степень обратимости диссоциации под давлением дает возможность при-

близиться к моделированию естественных условий формирования четвертичной структуры [9].

Экспериментальные способы наблюдения эффектов давления весьма разнообразны и охватывают практически все методы, применяющиеся для изучения белков и ферментов.

В данной работе кратко излагаются теоретические основы воздействия умеренного гидростатического давления на ферменты, описывается разработанная в Межфакультетской лаборатории им. А. Н. Белозерского МГУ оригинальная оптическая кювета для спектрофотометрического изучения ферментативной кинетики под давлением и приводятся некоторые результаты исследования лактадегидрогеназы.

### Основные понятия

Гидростатическое давление оказывает воздействие на химические реакции, в том числе на ферментативные, прежде всего через объемные эффекты этих реакций [10]. Только такой тип воздействия мы будем здесь рассматривать, оставив в стороне другие возможные эффекты, как, например, сдвиг рК буферных солей, увеличение парциального давления растворенных газов и т. д. Точно так же не будут затронуты вопросы, возникающие при воздействии на систему сжатыми газами.

В теории абсолютных скоростей реакции постулируется, что все химические реакции проходят через промежуточное активированное состояние  $X^\ddagger$ , которое находится в равновесии с реагентами:



Важнейший вывод теории заключается в том, что скорость образования продуктов С и D пропорциональна концентрации промежуточных активированных комплексов  $[X^\ddagger]$ , и следовательно, константа скорости реакции  $k$  пропорциональна константе квазиравновесия<sup>1</sup>

$$K^\ddagger = \frac{[X^\ddagger]}{[A][B]}.$$

В равновесной термодинамике константа равновесия связана с приращением стандартной свободной энергии Гиббса:  $\Delta G^0 = -RT \ln K$ , а следовательно,  $\Delta G^{0\ddagger} = -RT \ln K^\ddagger = -RT \ln k + \text{const}$ . Отсюда вытекает, что константы  $K^\ddagger$  и  $k$  являются функциями давления  $P$  [12]:

$$\left( \frac{\partial \ln K^\ddagger}{\partial P} \right)_T = \left( \frac{\partial \ln k}{\partial P} \right)_T = -\frac{1}{RT} \left( \frac{\partial \Delta G^{0\ddagger}}{\partial P} \right)_T = -\frac{\Delta \bar{V}^\ddagger}{RT}, \quad (2)$$

где «активационный объем»  $\Delta \bar{V}^\ddagger$  есть

<sup>1</sup> Глубокое обсуждение физического смысла  $K^\ddagger$  и последующих термодинамических соотношений читатель найдет в [22].

$$\Delta \bar{V}^\ddagger = \bar{V}_{X^\ddagger} - (\bar{V}_A + \bar{V}_B), \quad (3)$$

т. е. равен приращению парциального мольного объема реагентов при образовании активированного комплекса.

Формула (2) показывает, что  $\Delta \bar{V}^\ddagger$  можно определить из наклона графика зависимости  $\ln k$  от  $P$ . Если же  $\Delta \bar{V}^\ddagger$  от давления не зависит, то уравнение (2) интегрируется. В этом случае

$$K^\ddagger = K_0^\ddagger e^{-P\Delta \bar{V}^\ddagger/RT}, \quad (4)$$

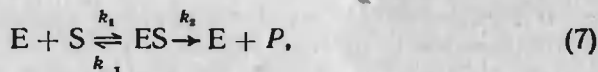
$$k = k_0 e^{-P\Delta \bar{V}^\ddagger/RT}. \quad (5)$$

(где индекс «0» обозначает атмосферное давление) и

$$\Delta \bar{V}^\ddagger = -RT \frac{\ln k_{P_2} - \ln k_{P_1}}{P_2 - P_1}. \quad (6)$$

Важно отметить, что непосредственно измерить парциальный объем активированного комплекса практически невозможно, и поэтому  $\Delta \bar{V}^\ddagger$  оказывается единственной доступной измерению объемной характеристикой, указывающей на те изменения, которые сопровождают образование (и распад) этих промежуточных состояний.

Написанные соотношения применим к простейшей ферментативной реакции



сделав добавочные упрощающие предположения.

1. Рассмотрим случай, когда  $k_2 \ll k_{-1}$ .

При этом уравнение для скорости реакции  $v = dP/dt$  можно переписать в виде [3]

$$v = \frac{k_2 \tilde{K} [E] [S]}{1 + \tilde{K} [S]}, \quad (8)$$

где константа равновесия

$$\tilde{K} = \frac{[ES]}{[E] [S]} = \frac{k_1}{k_{-1}}, \quad (9)$$

и следовательно,

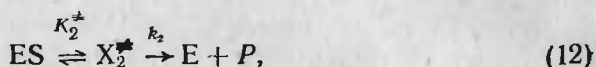
$$\tilde{K} = \tilde{K}_0 e^{-P\Delta \bar{V}/RT}. \quad (10)$$

Здесь  $\Delta \bar{V}$  — парциальный мольный объем реакции  $E + S \rightleftharpoons ES$ , т. е.

$$\Delta \bar{V} = \bar{V}_{ES} - (\bar{V}_E + \bar{V}_S), \quad (11)$$

и предполагается, что  $\Delta \bar{V}$  от давления не зависит.  $k_2$  в уравнении (8) зависит от давления согласно формулам (2) или (5). Но что-

бы вскрыть смысл, который в рамках уравнения (7) (и при условии  $k_2 \ll k_{-1}$ ) имеет измеряемый на опыте объем активации, запишем вторую стадию реакции (7) в соответствии с теорией абсолютных скоростей реакций:



где

$$K_2^{\ddagger} = \frac{[X_2^{\ddagger}]}{[ES]} = K_{2,0}^{\ddagger} e^{-P\Delta\bar{V}_2^{\ddagger}/RT}, \quad (13)$$

и как в (5)

$$k_2 = k_{2,0} e^{-P\Delta\bar{V}_2^{\ddagger}/RT}, \quad (14)$$

где аналогично (3)

$$\Delta\bar{V}_2^{\ddagger} = \bar{V}_{X_2^{\ddagger}} - \bar{V}_{ES}, \quad (15)$$

т. е.  $\Delta\bar{V}_2^{\ddagger}$  есть приращение парциального мольного объема комплекса ES при переходе в промежуточное активированное состояние  $X_2^{\ddagger}$ .

Подставив теперь (10) и (14) в (8), получаем

$$v = \frac{k_{2,0} \tilde{K}_0 [E] [S] e^{-P(\Delta\bar{V}_2^{\ddagger} + \Delta\bar{V})/RT}}{1 + \tilde{K}_0 [S] e^{-P\Delta\bar{V}/RT}}. \quad (16)$$

В двух крайних экспериментальных ситуациях это уравнение упрощается и позволяет извлечь из опыта полезную информацию:

а) если  $\tilde{K}[S] \gg 1$ , то из (8) и (14) находим

$$v = k_2 [E] = k_{2,0} [E] e^{-P\Delta\bar{V}_2^{\ddagger}/RT}; \quad (17)$$

б) если, наоборот,  $\tilde{K}[S] \ll 1$ , то из (8), (10) и (14) имеем

$$v = k_{2,0} \tilde{K}_0 [E] [S] e^{-P(\Delta\bar{V}_2^{\ddagger} + \Delta\bar{V})/RT}. \quad (18)$$

Следовательно, измерения, произведенные при большой концентрации субстрата (точнее, при  $[S] \gg 1/\tilde{K}$ ), позволяют с помощью (17) определить  $\Delta\bar{V}_2^{\ddagger}$  — активационный объем реакции диссоциации продуктивного комплекса ES. При низкой концентрации субстрата аналогичные измерения под давлением дают возможность с помощью (18) вычислить суммарный объемный эффект  $\Delta V^* = \Delta\bar{V}_2^{\ddagger} + \Delta\bar{V}$ . Для дальнейшего это выражение удобно с помощью (15) и (11) переписать в виде

$$\Delta V^* = \bar{V}_{X_2^{\ddagger}} - (\bar{V}_E + \bar{V}_S). \quad (19)$$

Таким образом, произведя две серии опытов под давлением, мы получаем возможность найти  $\Delta\bar{V}_2^{\ddagger}$  и  $\Delta\bar{V}$  — парциальный объ-

ем реакции образования комплекса ES (см. формулу (11)). Если из независимых измерений (например, денситометрических [13]) определен парциальный объем фермента  $\bar{V}_E$ , то, пренебрегая обычно сравнительно малым парциальным мольным объемом субстрата, из (19) можно вычислить парциальный мольный объем активированного промежуточного состояния  $X_2^*$  стадии диссоциации комплекса ES:

$$\bar{V}_{X_2^*} \cong \bar{V}_E + \Delta V^* \quad (20)$$

2. Случай, когда  $k_2 \gg k_{-1}$ .  
При этом вместо (8) имеем

$$v = \frac{k_1 k_2 [E] [S]}{k_2 + k_1 [S]} \quad (21)$$

а) если  $k_1 [S] \gg k_2$ , то

$$v = k_2 [E] = k_{2,0} [E] e^{-p \Delta \bar{V}_2^* / RT},$$

что в точности совпадает с результатом, полученным в случае 1а.

б) если  $k_1 [S] \ll k_2$ , то

$$v = k_1 [E] [S], \quad (22)$$

где в соответствии с (5)

$$k_1 = k_{1,0} e^{-p \Delta \bar{V}_1^* / RT} \quad (23)$$

Здесь  $\Delta \bar{V}_1^*$  есть приращение суммы парциальных мольных объемов фермента и субстрата при образовании активированного комплекса процесса  $E + S \rightarrow (ES)^*$  [4].

Из всего изложенного можно заключить, что исследование ферментативной кинетики под гидростатическим давлением позволяет определить либо изменения парциальных мольных объемов исходных реагентов при образовании активированных комплексов, либо — в благоприятном случае  $k_2 \ll k_{-1}$  — найти величину парциального мольного объема активированного комплекса  $X_2^*$ .

Надо, однако, иметь в виду, что величина парциального объема не совпадает с физическим объемом макромолекулы. Действительно, определение парциального удельного объема  $\bar{v}$  гласит [14], что это есть увеличение объема при добавлении 1 г сухого белка к очень большому объему раствора. Размерность  $\bar{v}$  — см<sup>3</sup>/г. Парциальный мольный объем (см<sup>3</sup>/моль) получается умножением  $\bar{v}$  на молекулярный вес (массу) белка  $M$ .

Из этого определения видно, что величина парциального объема, а следовательно, и  $\Delta \bar{V}^*$ , отражает не только изменение физического объема белковой молекулы, но и ее воздействие на окружающую воду — воздействие, которое называют гидратацией и которое все еще остается плохо изученным, несмотря на громад-

Оценка изменений в  $\Delta\bar{V}^{\ddagger}$  при различных химических и физических реакциях (при 1 атм) (17)

Реакция	Вклад в $\Delta\bar{V}^{\ddagger}$ , см <sup>3</sup> /моль
Разрыв связи . . . . .	+10
Деформация связи . . . . .	~0
Образование связи . . . . .	-10
Замещение . . . . .	-5
Компенсация диффузии . . . . .	>+20
Циклизация . . . . .	~0
Ионизация . . . . .	-20
Стерические ограничения . . . . .	(-)
Нейтрализация . . . . .	+20
Рассредоточение зарядов . . . . .	+5
Концентрация зарядов . . . . .	-5

ное число посвященных ему исследований (см., например, обзоры [15, 16]).

Физическая сущность гидратации состоит, по-видимому, главным образом в небольшом торможении теплового движения молекул воды в непосредственной близости от заряженных и полярных групп белка [16]. И хотя эту воду нельзя считать иммобилизованной, все же ее асимметричные дипольные молекулы ориентируются в этих местах «специфической гидратации» не столь беспорядочно, как в свободной воде, благодаря че-

му уменьшается занимаемый ими объем. Поэтому перезарядка боковых групп в белке, в частности при взаимодействии с лигандами, обязательно сопровождается изменениями гидратации и соответственно парциального мольного объема.

Согласно формуле (5), если  $\Delta\bar{V}^{\ddagger} \neq 0$ , то давление будет либо замедлять скорость реакции (при  $\Delta\bar{V}^{\ddagger} > 0$ ), либо увеличивать ее (при  $\Delta\bar{V}^{\ddagger} < 0$ ). Ориентировочное представление о том, какого порядка вклад могут вносить в изменение парциального мольного объема активации различные химические и физические реакции, дает таблица, составленная по данным о низкомолекулярных соединениях [17].

Для сравнения укажем, что при инактивации митохондриальной АТФазы в процессе гидролиза АТФ  $\Delta\bar{V}^{\ddagger} = 184$  см<sup>3</sup>/моль [18].

Интересное наблюдение было сделано Пеннистоном [19]. Исследовав большое число ферментов, он пришел к заключению, что в случае мономерных ферментов  $\Delta\bar{V}^{\ddagger} < 0$ , т. е. давление активирует их, в то время как для мультисубъединичных ферментов, наоборот,  $\Delta\bar{V}^{\ddagger} > 0$ , и под давлением они инактивируются. Пример с АТФазой укладывается в эту схему, но тем не менее заключение Пеннистона нельзя рассматривать как общую закономерность [2, 10]. К тому же, как отмечалось и в [19], инактивация мультимерных ферментов под давлением полностью или частично вызывается их диссоциацией на субъединицы. В таком случае по формулам (2) или (5) уже нельзя определить активационный объем, так как на скорость реакции оказывают воздействие не только изменения в активном центре, но и на межсубъединичных участках.

Формально это вытекает из следующих простых рассуждений.

В общем случае мультисубъединичного фермента, состоящего

из  $n$  ковалентно не связанных между собой субъединиц  $E_i$   $m$  типов, константу ассоциации и ее зависимость от давления можно записать в виде

$$K = \frac{[E]}{\prod_i [E_i]^{v_i}} = K_0 e^{-P\Delta\bar{V}_s/RT}, \quad (24)$$

где  $E$  — интактный активный фермент,  $v_i$  — число субъединиц  $i$ -того типа ( $i=1, 2, \dots, m$ ),  $\Delta\bar{V}_s$  — парциальный мольный объем реакции ассоциации субъединиц. Обозначив парциальный мольный объем свободных субъединиц  $\bar{V}_i$ , имеем

$$\Delta\bar{V}_s = \bar{V}_E - \sum_{i=1}^m v_i \bar{V}_i. \quad (25)$$

Когда изолированные субъединицы  $E_i$  не обладают каталитической активностью, уравнение скорости ферментативной реакции  $v = k[E]$  с учетом (5) и (24) принимает вид

$$v = k_0 K_0 \prod_i [E_i]^{v_i} e^{-P(\Delta\bar{V}_s^\ddagger + \Delta\bar{V}_s)/RT}. \quad (26)$$

Отмеченная Пеннистоном [19] часто встречающаяся инактивация давлением мультимерных ферментов в рамках (26) означает, что  $(\Delta\bar{V}_s^\ddagger + \Delta\bar{V}_s) > 0$ . Могут встречаться разные типы и размеры приращения активационного объема и объема реакции ассоциации, но распространенной ситуацией является, по-видимому, большое и положительное значение  $\Delta\bar{V}_s$ . Это означает в соответствии с (25), что

$\sum_{i=1}^m v_i \bar{V}_i < \bar{V}_E$ . Иными словами, когда субъ-

единицы выходят в раствор, их парциальный мольный объем уменьшается. Это может происходить из-за гидратации межсубъединичных участков, вступающих в контакт с водой, и, в частности, из-за заполнения водой пустот, которые иногда существуют в этих местах в интактной мультимерной макромолекуле [20].

Таким образом, опыты под давлением не дают однозначной информации об объемных эффектах в мультисубъединичных ферментах.

Однако важной особенностью исследований ряда ферментов под давлением является обратимость реакции диссоциации — ассоциации и сопряженной с ней инактивацией — реактивацией [21]. Поскольку обратная ассоциация субъединиц в нативный фермент в тех случаях, когда она возможна, требует некоторого времени, главным критерием того, что опыты под давлением дают истинные активационные объемы  $\Delta\bar{V}_s^\ddagger$ , должна быть быстрая обратимость действия давления на скорость реакции. Действительно, если единственной причиной изменения скорости является

непосредственное воздействие давления на стадию образования активированного комплекса, то согласно формулам (4) и (5) снятие давления должно приводить к очень быстрому восстановлению исходной активности фермента.

Морилд [10] подробно разобрал важный частный случай исследования фермента, состоящего из двух субъединиц.

### Техника эксперимента

Устройства для изучения влияния гидростатического давления на ферменты различаются в зависимости от цели исследований, избранного способа наблюдения и от диапазона давлений. Выше 2—3 тыс. атм изучаются преимущественно денатурационные изменения, а при давлениях до 1—2 тыс. атм — главным образом объемные эффекты, сопровождающие ферментативные реакции.

В исследованиях ферментативной кинетики наибольшие затруднения вызывает проблема сокращения интервала времени между началом реакции и началом ее регистрации. Чаще всего (см. например, [23—26]) реакция запускается при атмосферном давлении, после чего кювету герметизируют, устанавливают в регистрирующий прибор и поднимают давление. И лишь через 1—3 мин, в течение которых устанавливается на заданном уровне температура раствора, возрастающая при адиабатическом повышении давления примерно на  $2^\circ\text{C}/1000$  атм [24], начинают регистрировать ход реакции. Таким образом, начальный участок реакции на протяжении 2—8 мин остается вне наблюдения. Более того, в большей части работ (например, [19, 23—26]) активность измерялась лишь после извлечения раствора из кюветы, в которой он определенное время выдерживался под давлением.

Для запуска реакции под давлением предложены кюветы с бойком, который в нужное время разбивает перегородку, отделяющую друг от друга находящиеся под давлением реагенты, и перемешивает их [27—28]. Первая из этих кювет ([27]) рассчитана на последующую регистрацию кинетики в спектрофотометре, но мертвое время между запуском реакции и началом измерений едва ли можно сделать меньше 10 с. Вторая кювета ([28]) не предназначена для непосредственных оптических измерений. Она снабжена шприцевым устройством для отбора проб без декомпрессии раствора и определения активности через заданные промежутки времени.

Много информации получено с помощью разнообразных устройств для исследований релаксационной кинетики после скачкообразного изменения какого-либо параметра, в частности давления [29]. Очень интересный прибор для исследования быстрой кинетики под давлением (до 1200 атм) с помощью метода остановленной струи описан недавно Эремansom [30].

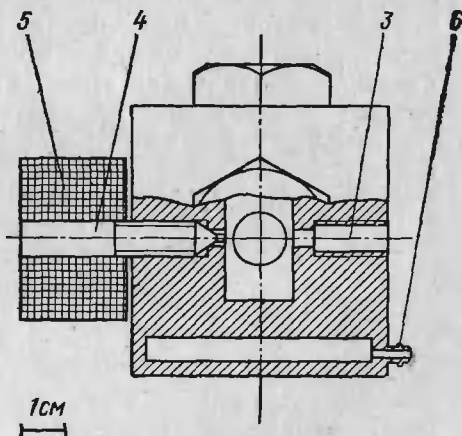
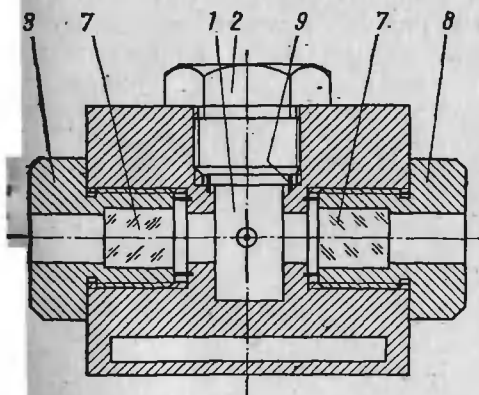
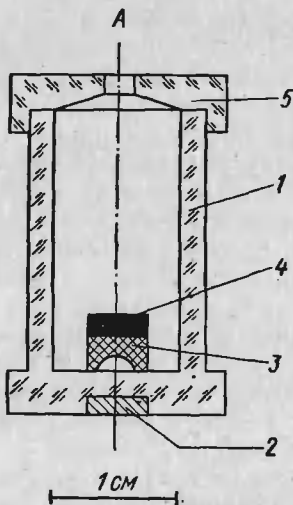
В тех случаях, когда ферментативная реакция сопровождается изменением оптической плотности реакционной среды, естественно использовать абсорбционную спектрофотометрию.

В Межфакультетской проблемной лаборатории молекулярной биологии и биорганической химии им. А. Н. Белозерского Московского университета разработана спектрофотометрическая кювета, позволяющая начинать реакцию через произвольное время после повышения давления, причем до начала реакции фермент может находиться либо под высоким давлением, либо при 1 атм. В любом случае регистрация кинетики начинается примерно через секунду (или раньше) после начала реакции [31].

На рис. 1 А и 1 Б показаны схемы ячейки для проведения реакции и кюветы высокого давления. Ячейка (1) имеет цилиндрическую форму, изготовлена из полированного снаружи и изнутри

Рис. 1. Кювета высокого давления. А — ячейка для запуска и проведения ферментативной реакции под гидростатическим давлением: 1 — цилиндрическая ячейка; 2 — стальная шайба, закрепленная в дне ячейки; 3 — пластмассовая чашка; 4 — постоянный магнит, приклеенный к чашке; 5 — коническая крышка с отверстием для заполнения ячейки и передачи давления.

Б — оптическая кювета высокого давления (изготавливается из немагнитной нержавеющей стали): 1 — цилиндрическая полость для установки реакционной ячейки; 2 — запорная крышка; 3 — канал для подключения к гидравлическому насосу высокого давления; 4 — магнитопровод; 5 — съемный соленоид для запуска реакции; 6 — штуцер для подключения к ультратермостату; 7 — кварцевые цилиндрические окна; 8 — гайки для крепления окон; 9 — тефлоновые уплотняющие кольца — прокладки



плексигласа и ее объем составляет около 2,5 мл. Снаружи в дне ячейки имеется круглое углубление, в котором закрепляется и изолируется от внешней среды стальной диск (2). Сверху ячейка закрывается крышкой (5) с конической внутренней поверхностью и отверстием. Для проведения опыта в углубление миниатюрной пластмассовой чашечки (3) микрошприцом вводят строго дозированное количество (например, 10 мкл) одного из главных реагентов — фермента или субстрата. Чашечка имеет полированный бортик, которым она прижимается ко дну ячейки, как показано на рис. 1. К наружной поверхности дна чашечки приклеен плоский цилиндрический постоянный магнит (4) (диаметром примерно 5 мм, толщиной 3 мм), который, притягиваясь к диску (2), удерживает чашечку в прижатом ко дну ячейки положении вплоть до сигнала о начале реакции. Для улучшения контакта чашечки с дном ячейки контактные поверхности предварительно смазывают очень тонким слоем инертной смазки (например, вазелиновым маслом).

После установления заполненной чашечки на место ячейку споласкивают водой (избыток которой отсасывают шприцем с пластиковым наконечником) и заполняют реакционной средой со вторым необходимым реагентом. Среду наливают с небольшим избытком, так, чтобы образовался выпуклый мениск, и закрывают ячейку крышкой (5). Коническая форма крышки и отверстие помогают полностью удалить из ячейки пузыри воздуха. В заключение сборки ячейки отверстие заклеивают с помощью вазелиновой смазки небольшим лоскутом гибкого тонкого полиэтилена.

Собранную ячейку вставляют в предварительно заполненную водой цилиндрическую полость (1) в кювете, которая показана на рис. 1 Б, плотно завинчивают верхнюю крышку (2), с помощью гибкой стальной трубки подключают кювету через канал (3) к поршневому гидравлическому насосу и устанавливают в спектрофотометр. На выступающий магнитопровод (4) надвигают соленоид (5), на штуцера (6) надевают резиновые шланги от ультрагермостата. Кварцевые окна (7) в стальных оправках (8) с помощью тефлоновых колец (9) герметизируют кювету. Крышку кюветного отделения спектрофотометра закрывают и поднимают давление. Реакция при этом не запускается, и поэтому можно выждать столько времени, сколько необходимо для выравнивания температуры на заданном уровне. Содержимое ячейки находится все это время под заданным гидростатическим давлением, которое передается от заполняющей кювету воды через гибкий полиэтилен, закрывающий отверстие в ячейке. Если после этого заполнения ячейки в ней не осталось пузырей воздуха, то полиэтилен не продавливается и не пропускает воду в ячейку.

Для запуска реакции соленоид с помощью кнопочного выключателя кратковременно ( $\sim 0,5$  с) подключается к источнику переменного тока (регулируемого автотрансформатора), напряжение которого должно быть подобрано так, чтобы (при данном соленоиде) переменное магнитное поле отрывало от дна ячейки

чашечку с приклеенным магнитиком и заставляло ее совершить достаточное для полного перемешивания среды число оборотов.

Регистрацию оптической плотности на избранной длине волны начинают за некоторое время (10—20 с) до включения соленоида, и это дает возможность точно зафиксировать на диаграммной бумаге момент начала реакции (а также проконтролировать отсутствие реакции до этого момента из-за подтекания реагента из чашечки) (рис. 2).

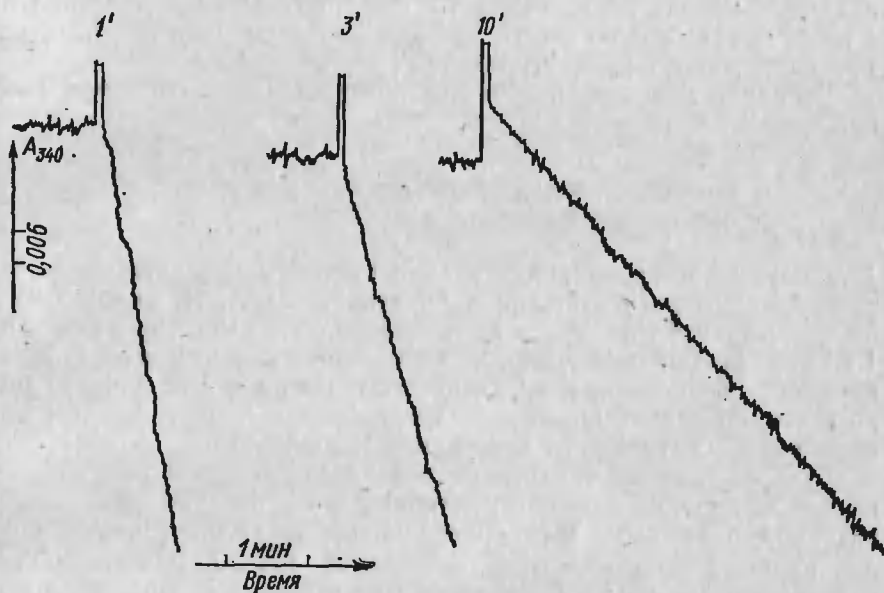


Рис. 2. Кинетика лактатдегидрогеназной реакции под давлением 1000 атм. «Спекорд УФ-ВИЗ», 340 нм, 25°C; 0,2 М трис-НСI буфер: рН 7,5, 10 мМ дитиозритритол, 1 мМ ЭДТА, 0,4 мкг/мл ЛДГ, 0,8 мМ пируват Na, 0,16 мМ НАДН. Надписи 1', 3' и 10' указывают на экспозицию фермента под давлением 1000 атм до начала реакции (время в минутах)

Описанное устройство позволяет варьировать условия проведения эксперимента. Так, например, помещая в чашечку субстрат, а фермент вводя с самого начала в раствор, заполняющий ячейку, можно выдерживать нужное время фермент под давлением без контакта с субстратом. Если при этом активность фермента изменяется, то после начала реакции сразу выясняется, оказывает ли данный субстрат стабилизирующее действие (см. с. 173).

Устройство дает возможность исследовать квазирелаксационную кинетику при быстром (~5 с) повышении или понижении давления в ходе реакции. Правда в таких опытах относительно быстрое изменение давления приводит и к температурному скачку, но это неустранимая особенность релаксационных опытов: как

уже отмечалось, адиабатическое изменение температуры составляет  $2^\circ/1000$  атм.

Описываемый вариант кюветы не имеет встроенного термодатчика, и температурный режим калибровали в специальных опытах по ртутному термометру, погруженному в заполненную водой и подключенную к ультратермостату кювету высокого давления. Многократные измерения позволяют заключить, что точность установки температуры в кинетических опытах составляла  $\pm 0,3^\circ$  С. Время, необходимое для выравнивания температуры на заданном уровне после быстрого (5 с) повышения давления от 1 до 1000 атм, можно свести примерно к 1 мин, если кювета была предварительно термостатирована.

Величина давления измеряется контрольным манометром с ценой деления 10 атм.

### Кинетика лактатдегидрогеназной реакции под гидростатическим давлением

Для первых исследований в кювете высокого давления, разработанной в Межфакультетской лаборатории им. А. Н. Белозерского МГУ, была избрана лактатдегидрогеназа из мышц кролика (ЕС 1.1.1.27), сокращенно ЛДГ-М<sub>4</sub>. Она является одним из наиболее изученных ферментов гликолитического цикла и, что для нас было особенно важно, интенсивно исследовалась с применением высокого гидростатического давления [24, 26, 32—35].

ЛДГ состоит из четырех субъединиц, ковалентно не связанных между собой, и поэтому потенциально способна диссоциировать под давлением, если определенный согласно формуле (25) парциальный мольный объем ассоциации  $\Delta\bar{V}_s > 0$ . Действительно, как показано в [26, 36], после 20 мин выдержки при 2000 атм ЛДГ-М<sub>4</sub> (из мышцы свиньи) диссоциирует на лишние активности мономеры. Кроме того, оказалось, что при  $P \leq 1000$  атм диссоциация и инактивация полностью обратимы. Исследовав кинетические и равновесные характеристики этих реакций, авторы [26] нашли, что для холо-ЛДГ-М<sub>4</sub> из мышцы свиньи парциальный активационный объем диссоциации  $\Delta\bar{V}^\ddagger = -231$  мл/моль, а парциальный объем реакции диссоциации  $\Delta\bar{V} = -390$  мл/моль.

В наших опытах использовалась лактатдегидрогеназа из мышц кролика (ЛДГ-М<sub>4</sub>) («Серва») с удельной активностью 550 ИЕ/мг. В качестве буфера был избран трис («Сигма»), поскольку в нем мал эффект давления на рН [37]. Стандартная реакционная среда состояла из 0,2 М трис-НСl буфера рН 7,6, 10 мМ дитиоэритритола («Серва»), 1 мМ ЭДТА («Реанал»), 0,8 мМ пирувата Na («Сигма») и 0,16 — 0,2 мМ НАДН («Реанал»).

Концентрация ЛДГ-М<sub>4</sub> составляла 0,093 мкг/мл в опытах при 1 атм и 0,372 мкг/мл в измерениях при 1000 атм. Эти концентрации фермента были подобраны так, чтобы начальные скорости

реакций при 1 атм и при 1000 атм не сильно различались и составляли примерно  $\leq 0,1$  ед. оптической плотности (340 нм) в мин. Все опыты проводили при  $25^\circ\text{C}$  в диапазоне давлений от 1 атм до 1000 атм.

Изменение оптической плотности в процессе лактатдегидрогеназной реакции регистрировали в модифицированном спектрофотометре «Спекорд УФ-ВИЗ» (Цейсс, ГДР). Модификация была направлена на то, чтобы получить возможность измерять изменения оптической плотности с максимальной для данного прибора чувствительностью — примерно 0,1 ед. оптической плотности на шкалу (в диапазоне 80—100% пропускания) — при начальной оптической плотности 1—1,2. Для решения этой задачи в линию сравнения спектрофотометра в кюветном отделении вставляли круговой оптический ослабитель. Управление ослабителем вывели наружу, так что его положение можно быстро изменять при закрытой крышке кюветного отделения и компенсировать исходную абсорбцию реакционной среды. Это позволило измерять начальные скорости реакции при достаточно высокой концентрации НАДН ( $K_m = 11$  мкМ [38]) и небольшой глубине превращения субстрата (менее 2% пирувата). На рис. 2 показана типичная запись кинетики лактатдегидрогеназной реакции для определения начальной скорости. В описанных условиях кинетика, как показали контрольные опыты, оставалась линейной не менее 10 мин.

На рис. 3 представлен один из экспериментальных графиков зависимости активности ЛДГ от времени при давлении 1000 атм. Отрезки горизонтальных прямых, которые начинаются в момент запуска реакции, показывают, что при взаимодействии с пируватом ЛДГ из мышц кролика приобретает устойчивость к давлению (по крайней мере в присутствии достаточного количества пирувата).

Пунктиром на рис. 3 показана экстраполяция экспериментальных данных к моменту приложения давления ( $t=0$ ). Как видно, найденная таким способом «начальная скорость»  $v_P^{t=0} \approx 0,053$  мкмоль НАДН/мин уже существенно отличается от  $v_{P=0} = 0,091$  мкмоль НАДН/мин, измеренной при тех же условиях, но при 1 атм. Падение  $v_P^{t=0}$  по сравнению с  $v_{P=0}$  происходит со скоростью, которая превышает возможности наблюдения нашим методом и либо характеризует первую фазу воздействия высокого

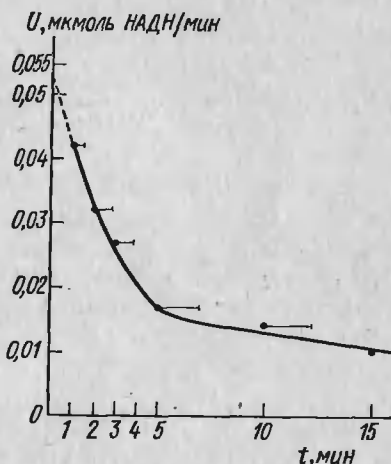


Рис. 3. Зависимость активности ЛДГ от продолжительности выдержки под давлением 1000 атм до пуска реакции

давления на ЛДГ, либо в исследовавшейся серии фермента присутствовала фракция с повышенной пьезолабильностью.

На отрезке времени от 1 до 5 мин инактивация происходит с измеримой кинетикой первого порядка, но тем не менее с очень высокой константой скорости  $37,5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Это примерно в 60 раз больше, чем наблюдали в своих опытах с ЛДГ из мышц свиньи Шаде и др. [26]. Вероятнее всего причина заключается в значительно более низкой концентрации ЛДГ в наших опытах, из-за чего фермент был менее стабилен. Действительно, в то время как в [39] фермент при  $c=2,5$  мкг/мл за 150 ч стояния при 1 атм терял всего 20% активности, в нашем растворе с концентрацией 0,3 мкг/мл активность падала на 40% за 19 ч.

В заключение отметим, что после декомпрессии частично активированной ЛДГ немедленного возрастания активности не наблюдается. Между тем согласно (5) если активационный объем  $\Delta \bar{V}^\ddagger$  ферментативной реакции отличен от нуля, то сразу после снятия давления константа скорости реакции должна вернуться к значению  $k_0$ . Следовательно, в наших опытах с ЛДГ  $\Delta \bar{V}^\ddagger \approx 0$ , а инактивация под давлением происходит только из-за диссоциации тетрамерной ЛДГ на неактивные димеры и мономеры субъединиц [39].

Для определения парциального мольного объема ассоциации субъединиц  $\Delta \bar{V}_s$  согласно (24) и (26) необходимо проводить измерения  $v$  после достижения равновесия при разных давлениях. Это не входило в цель данной работы, так как не требует быстрого запуска реакции под давлением — главного назначения описанного прибора.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson F. H., Eyring H., Stover B. J. (1974) in *The Theory of Rate Processes in Biology and Medicine*, p. 273—369, Wiley, N. Y.
2. Jaenicke R. (1981) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 10, 49—67.
3. Laidler K. J. (1951) *Arch. Biochem.* 30, 226—236.
4. Laidler K. J., Bunting P. S. (1973) *The Chemical Kinetics of Enzyme Actions* (2nd edn.), p. 471, Clarendon Press, Oxford.
5. Harrington W. F., Kegeles G. (1973) *Methods Enzymol.* 27, 306—345.
6. Kegeles G., Rhodes L., Bethune J. L. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58, 45—51.
7. Chernyak V. Ya., Kozhanova Z. E., Chernyak B. V., Kozlov I. A. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98, 585—589.
8. TenEyck L. F., Kauzmann W. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58, 888—894.
9. Heremans K. (1979) in *High Pressure Science and Technology*, v. 1 (Timmerhaus K. D. and Barber M. S., eds.), p. 699—705.
10. Morild E. (1981) *Advances Protein Chem.* 34, 93—166.
11. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. (1969) *Курс химической кинетики*. 2-е изд. Высшая школа, М.
12. Гоникберг М. Г. (1969) *Химическое равновесие и скорость реакций при высоких давлениях*. 3-е изд. Химия, М.
13. Kratky O., Leopold H., Stabinger H. (1973) *Methods Enzymol.* 27, 98—110.

14. Эдсалл Дж. (1956) в кн. Белки (ред. Г. Нейрат, К. Бэйли), т. 2, с. 191, ИЛ, М.
15. Kuntz I. D. Jr., Kauzmann W. (1974) *Advances Protein Chem.* 28, 239—345.
16. Nemethy G., Peier W. J., Scheraga H. A. (1981) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 10, 459—497.
17. Asano T., le Noble W. J. (1978) *Chem. Rev.* 78, 407—489.
18. Черныак В. В., Черныак В. Я., Gladysheva T. B. et al. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 635, 552—570.
19. Penniston J. T. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 322—332.
20. Paladini A. A., Weber G. (1981) *Biochemistry* 20, 2587—2593.
21. Müller K., Lüdemann H.-D., Jaenicke R. (1981) *Biochemistry* 20, 5411—5416.
22. Johnson F. H., Eyring H. (1970) in *High Pressure effects on cellular processes*, p. 1—44, Acad. Press, N. Y.
23. Mustafa T., Moon Th. W., Hochachka P. W. (1971) *Amer. Zool.* 11, 451—466.
24. Schmid G., Lüdemann H.-D., Jaenicke R. (1975) *Biophys. Chem.* 3, 90—98.
25. Carter J. V., Knox D. G., Rosenberg A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1947—1953.
26. Schade B. C., Rudolph R., Lüdemann H.-D., Jaenicke R. (1980) *Biochemistry* 19, 1121—1126.
27. Шаховской Г. П., Эльянов Б. С., Прохоров Н. И. (1972) *Приборы и техника эксперимента*, № 2, 164—166.
28. Grieger R. A., Eckert C. A. (1970) *AJChE J.* 16, 766—770.
29. Kegeles G. (1978) *Methods Enzymol.* 48, 308—320.
30. Heremans K., Snauwaert J., Rijkenberg J. (1980) *Rev. Sci. Instrum.* 51, 806—808.
31. Черныак В. Я., Драчев В. А. (1983) *Бюллетень открытий и изобретений*, № 26, 134—135. Авт. свидет. № 1029014.
32. Moon T. W., Mustafa T., Hochachka P. W. (1971) *Amer. Zool.* 11, 473—478.
33. Schmid G., Lüdemann H.-D., Jaenicke R. (1978) *Eur. J. Biochem.* 86, 219—224.
34. Swezey R. R., Somero G. N. (1982) *Biochemistry* 21, 4496—4503.
35. Jaenicke R., Knof S. (1968) *Eur. J. Biochem.* 4, 157—163.
36. Schade B. C., Lüdemann H.-D., Rudolph R. et al. (1980) *Biophys. Chem.* 11, 257—263.
37. Hardman M. J., Coates J. H., Gutfreund H. (1978) *Biochem. J.* 171, 215—223.
38. Duggleby R. G., Morrison J. F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 481, 297—312.
39. Schmid G., Lüdemann H.-D., Jaenicke R. (1979) *Eur. J. Biochem.* 97, 407—413.

## СЕДИМЕНТАЦИЯ АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА

В. Я. Черняк

(Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ)

Коэффициент седиментации фермента определяют обычно в аналитической ультрацентрифуге методом скорости седиментации [1, 2]. Для этих опытов необходимо располагать примерно 1 мг фермента довольно высокой степени чистоты — не менее 90%. Концентрацию белка даже в ультрацентрифуге с фотоэлектрической абсорбционной сканирующей системой с трудом удается снизить до ~50 мкг/мл, и поэтому в ряде случаев для экстраполяции коэффициента седиментации к бесконечному разбавлению приходится проводить серию опытов с различными концентрациями.

В 1963 г. Коэн [3] предложил наслаивать в границеобразующей ячейке клапанного типа небольшой объем раствора фермента на более плотный буферный раствор с субстратами и регистрировать седиментацию зоны, содержащей фермент. Если в результате ферментативной реакции изменяется оптическая плотность раствора, то с помощью абсорбционной оптики можно даже в грубом экстракте наблюдать седиментацию одного лишь интересующего нас фермента: в месте его встречи со своими субстратами оптическая плотность будет либо возрастать, либо уменьшаться. Таким образом, для определения коэффициента седиментации нет необходимости добиваться высокой степени гомогенности ферментного препарата.

Особый интерес придает этому методу его главная особенность — непрерывная фермент-субстратная реакция в течение всего опыта в ультрацентрифуге, из-за чего метод и получил название «седиментация активного фермента» (САФ). Поэтому коэффициент седиментации, определенный в таких опытах, отражает динамическое состояние реагирующего фермента и может отличаться от коэффициента седиментации, измеренного в обычных опытах без субстрата [5].

В дальнейшем САФ стали проводить в ячейках, разработанных для «полосового» аналитического ультрацентрифугирования [4, 6] в ультрацентрифугах с фотоэлектрической абсорбционной сканирующей системой [2]. Эти ячейки позволили уменьшить необходимое количество фермента до долей микрограмма, а сканирующая система существенно упрощает обработку седиментационных диаграмм.

Наряду со многими достоинствами метод САФ может приводить к таким ошибкам, которые несвойственны обычным методам седиментационного анализа и которые могут происходить из-за неправильной постановки эксперимента [7, 8] или из-за особых свойств изучаемого фермента [9].

В этой статье мы кратко изложим теоретические и экспериментальные основы метода САФ и опишем главные источники возможных артефактов.

### Теоретические и экспериментальные основы

В обычном зональном препаративном ультрацентрифугировании стабильность наслоенной зоны с биополимерами обеспечивается предсозданным градиентом плотности. Наиболее широко для этого применяют сахарозу.

В методе САФ тонкий слой забуференного раствора фермента в начале опыта (при скорости вращения ротора 1000—2000 об/мин) наслаивается на однородный раствор субстратов в том же буфере, но с добавленным низкомолекулярным веществом. Стабилизация достигается также с помощью градиента плотности, но в этом случае он образуется уже после наслоения благодаря диффузии низкомолекулярного вещества в слой — «полосу» с ферментом. Для эффективного протекания этого процесса самогенерации градиента в качестве низкомолекулярных веществ применяют нейтральную соль,  $D_2O$ , глицерин и т. п., но не сахарозу, у которой для таких опытов недостаточно велик коэффициент диффузии.

Ультрацентрифугирование с самогенерирующимся градиентом плотности в отличие от зонального было названо «полосовым» (band), и так же называются специальные сердечники к аналитическим ячейкам [4, 6]. Чаще всего используют двухсекторные полосовые сердечники типа I (рис. 1), и опыты проводят в двухлучевом режиме. Низкомолекулярное вещество, создающее градиент плотности, обязательно присутствует в обоих секторах.

*Регистрация седиментации активного фермента.* Регистрация седиментации активного фермента осуществляется разными способами в зависимости от тех изменений в растворе, которые влечет за собой реакция.

Случай 1: в результате реакции оптическая плотность среды уменьшается. Примером может служить восстановление пирувата лактатдегидрогеназой с одновременным окислением НАДН. Как пируват, так и НАДН вводят лишь в тот сектор, в котором будет

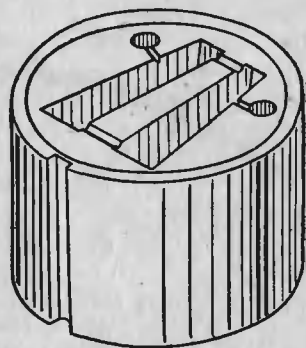


Рис. 1. Двухсекторный сердечник типа I для полосового аналитического ультрацентрифугирования

седиментировать лактатдегидрогеназа (сектор А). Поэтому на длине волны поглощения НАДН (максимум при 340 нм) начальная оптическая плотность будет определяться исходной концентрацией НАДН ( $\epsilon_{340 \text{ нм}}^{1 \text{ мм}, 1 \text{ см}} = 6,22$ ). По мере продвижения фермента оптическая плотность понижается и последовательное сканирование дает между областью, где НАДН уже окислен до НАД<sup>+</sup>, и областью с исходным НАДН систему границ (рис. 2 А). Каждая граница соответствует положению зоны с ферментом в момент сканирования.

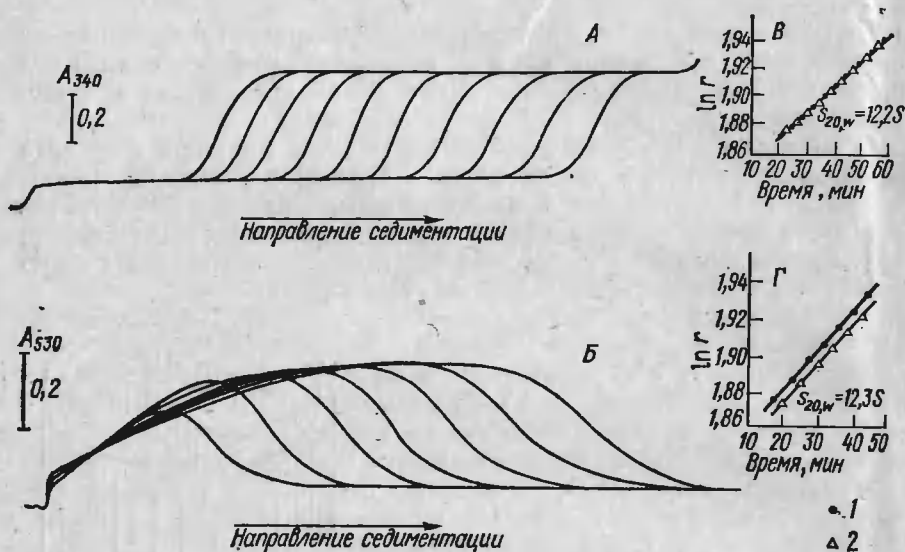


Рис. 2. Два типа седиментационных диаграмм в опытах по методу САФ с митохондриальной Н<sup>+</sup>АТФазой из сердца быка.

А — совмещенные сканы границ седиментации в опыте с сопряженной системой и окислением НАДН; Б — опыт с рН-индикатором «нейтральный красный»; В, Г — графики для вычисления коэффициентов седиментации по методу разностных кривых (2) и по полувысоте границ (1), соответствующие опытам А и Б

Случай 2: оптическая плотность среды возрастает. Это может иметь место, если, например, зона с лактатдегидрогеназой седиментирует через среду, содержащую достаточно много лактата и НАД<sup>+</sup>, в результате чего лактат окисляется до пирувата, а НАД<sup>+</sup> восстанавливается до НАДН. В таком опыте ячейку можно снаряжать так же, как в случае 1, но лучше вводить лактат и НАД<sup>+</sup> в оба сектора, чтобы более уверенно фиксировать базовый уровень.

Седиментационные диаграммы в этом случае имеют в принципе тот же вид, что и на рис. 2 А, но как если бы седиментация происходила справа налево.

Случай 3: фермент-субстратная реакция приводит к изменению рН среды. Пример — гидролиз АТФ митохондриальной  $H^+$  АТФазой. Изменение рН среды можно с помощью подходящего индикатора преобразовать в изменение оптической плотности в области длин волн, характерных для данного индикатора. На рис. 2Б приведена последовательность границ седиментации полосы  $H^+$  АТФазы в присутствии субстрата Mg-АТФ и рН-индикатора «нейтральный красный». В обоих секторах полосовой ячейки находились и субстрат, и индикатор.

Для таких исследований рН-индикатор должен обладать двумя обязательными качествами: во-первых, не влиять на активность и физико-химические свойства фермента; во-вторых, оптическая плотность реакционной среды с этим индикатором должна уменьшаться или возрастать при каждом ферментном акте («обороте» фермента) на одну и ту же величину при всех значениях рН в седиментирующей полосе фермента.

Подобрать такой рН-индикатор весьма не просто. Кроме того, при высокой скорости вращения ротора любой индикатор неизбежно во время опыта перераспределится в ультрацентрифужной ячейке в соответствии со своими коэффициентами седиментации и диффузии, что в большей или меньшей степени исказит абсорбционную седиментограмму. Все это побуждает применять в опытах с ферментами, которые сами не изменяют оптической плотности реакционной среды, сопряженные фермент-субстратные системы, подобранные так, чтобы выполнялись оба указанные условия. Пример такой системы будет приведен в разделе «Некоторые результаты применения метода САФ».

Успешное проведение экспериментов по САФ требует соблюдения ряда предосторожностей.

**Стабильность полосы.** Прежде всего необходимо обеспечить стабильность полосы с ферментом. Чтобы избежать появления конвекций, которые исказят форму границы и сделают невозможным измерение коэффициента седиментации, должно быть соблюдено условие [7], связывающее суммарный градиент плотности в седиментирующей полосе  $\left(\frac{\partial \rho}{\partial r}\right)$  с его составляющими: самогенерирующимся градиентом плотности низкомолекулярного вещества, диффундирующего из реакционной среды в полосу с ферментом  $\left(\frac{\partial \rho}{\partial r}\right)_{\text{HM}}$ , и градиентом плотности самого фермента в этой полосе  $\left(\frac{\partial \rho}{\partial r}\right)_{\text{E}}$ :

$$\frac{\partial \rho}{\partial r} = \left(\frac{\partial \rho}{\partial r}\right)_{\text{HM}} + \left(\frac{\partial \rho}{\partial r}\right)_{\text{E}} > 0,$$

Физический смысл этого условия, графически изображенного на рис. 3А, становится понятным из соответствующих интегральных кривых на рис. 3Б: суммарная плотность раствора нигде в ячейке не должна убывать с увеличением расстояния  $r$  от оси враще-

ния ротора. В противном случае фермент будет «проваливаться» на переднем крае полосы и возникнет конвекция. Чтобы избежать этого, надо правильно выбрать наслаиваемый объем и концентрацию фермента, а также концентрацию низкомолекулярного вещества.

**Постоянство скорости реакции.** Следующим важным требованием является постоянство скорости ферментативной реакции в пределах всей полосы.

Если реакция необратима, то удовлетворить этому требованию с достаточной точностью можно взяв такие концентрации субстрата и фермента, чтобы при продвижении полосы концентрация

субстрата  $[S]$  уменьшалась менее чем на 10%. Ограничившись такой глубиной реакции, в случае кинетики Михаэлиса—Ментен легко рассчитать, что при  $[S]_0 \gg \geq 3K_m$  скорость реакции на хвосте полосы будет менее чем на 3% ниже скорости на фронте, что в ряде случаев вполне допустимо.

Для обратимой реакции положение усложняется тем, что на хвосте полосы, в отличие от переднего края, присутствует определенное количество продукта, и в результате скорость реакции может заметно снизиться. Чтобы этого не произошло, в среде создают очень высокую начальную концентрацию субстрата, например  $20 K_m$  [7].

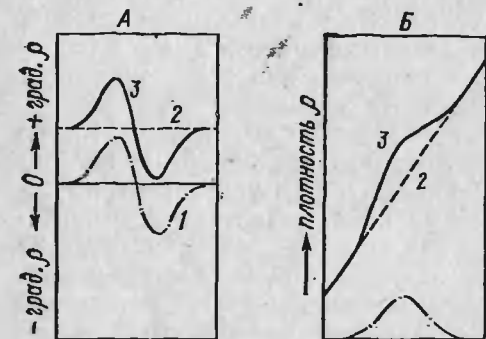


Рис. 3. Условие стабилизации полосы с ферментом посредством градиента плотности.

1 — градиент плотности и плотность фермента в полосе; 2 — градиент (линейный) плотности и плотность низкомолекулярного вещества (подробности в тексте); 3 — суммарный градиент плотности и плотность. А — градиенты, Б — интегральные кривые

Скорость реакции может уменьшаться в пределах полосы, если продукт является сильным ингибитором, или возрастать, если ингибирующими свойствами обладает находящийся в избытке субстрат.

Наконец, скорость реакции понижается со временем, когда в ходе опыта происходит денатурация фермента. Активность многосубъединичных ферментов может падать из-за диссоциации на субъединицы под влиянием гидростатического давления, быстро возрастающего в полосе по мере ее седиментации ко дну ячейки [9, 10]. Все эти факторы, искажающие правильный ход опытов, следует уметь распознавать и принимать меры для их устранения.

## Измерение коэффициента седиментации

Измерение коэффициента седиментации в опытах по методу САФ можно произвести разными способами. Математически строгие подходы описаны в [8, 11]. Мы ограничимся здесь указанием на два приближенных способа, широко использующихся и приводящих к вполне удовлетворительным результатам.

*Способ разностных кривых* [7]. Границы седиментации на рис. 2А и 2Б являются функциями координаты  $r$  и параметра  $t$  — момента времени, когда производилось данное сканирование  $A_t(r)$ . Разностная кривая

$$D_t^{t+\Delta t}(r) = A_{t+\Delta t}(r) - A_t(r),$$

полученная вычитанием в каждой точке  $r$  двух последовательно просканированных с интервалом времени  $\Delta t$  границ, характеризует накопление продукта за этот интервал времени (если  $\Delta t$  достаточно мало, чтобы седиментацией и диффузией продукта можно было пренебречь). Предполагая, что каждая молекула фермента в любом месте полосы реагирует с субстратом с одинаковой скоростью, легко заключить, что максимум разностной кривой совпадает с максимумом распределения фермента в полосе в момент времени  $t + \Delta t/2$ . Поэтому коэффициент седиментации вычисляется по обычной формуле  $s = \Delta \ln \hat{r} / \omega^2 \Delta t$  из графика зависимости  $\ln \hat{r}$  от  $t$  [1, 2].

*Способ деления границы пополам* [8]. В тех случаях, когда границы седиментации достаточно симметричны, максимуму полосы (координате  $\hat{r}(t)$ ) соответствует полувысота границы. Если снизу и сверху граница имеет горизонтальные плато, полувысота есть просто половина расстояния между плато [8]. Если же симметрия границы почему-либо нарушена и одно или оба плато отсутствуют, то можно прибегнуть к «способу прозрачной линейки» [2], найти середину квазилинейного участка границы и принять координату этой точки за искомую координату  $\hat{r}$ . Ошибка в величине  $s$  при этом, конечно, возрастает, но остается все же в пределах  $\pm 5\%$  (при том условии, что все перечисленные выше требования к проведению опыта удовлетворены).

### Неправильное определение $s$ при чрезмерной активности фермента в полосе

Грубая ошибка может быть допущена при измерении  $s$ , если концентрация активного фермента столь велика, что где-то внутри полосы концентрация субстрата падает до такого уровня, когда уже не фермент, а субстрат начинает лимитировать скорость реакции. Это деформирует границу седиментации таким образом, что во фронтальной части полосы граница на ленте самописца ультрацентрифуги круто поднимается вверх, а затем полого выходит на нижнее плато. Точка перегиба с координатой  $\hat{r}$  оказывается смещенной вперед относительно вершины кривой распре-

ления фермента в полосе и соответственно завышена величина коэффициента седиментации. Эта погрешность может составлять десятки процентов.

Необходимо, однако, указать на работу [12], теоретически и экспериментально расширившую рамки метода САФ в область больших (до 1 мг/мл) концентраций активного фермента. Это открывает новые возможности для изучения концентрационной зависимости ассоциации — диссоциации и инактивации много-субъединичных ферментов (см. также [13]).

### Ферменты сопряженной системы

При выборе сопряженной системы для опытов по методу САФ необходимо обеспечить выполнение двух условий. Во-первых, ферменты такой системы должны иметь заметно меньший коэффициент седиментации по сравнению с изучаемым ферментом. Так, например, при исследовании пируваткиназы, у которой  $s=9,7 S$ , в качестве сопряженного фермента можно взять лактатдегидрогеназу с  $s=7,0 S$ , благодаря чему она не будет опережать седиментацию пируваткиназы. Во-вторых, сопряженные ферменты следует брать в такой высокой концентрации, чтобы они ни в коем случае не лимитировали суммарную реакцию.

### Техника эксперимента

На рис. 1 показан двухсекторный сердечник для полосового опыта. Сердечник выполнен из эпоксидной смолы с древесным углем в качестве наполнителя, придающего сердечнику добавочную прочность и черный цвет. Боковые круглые отверстия представляют собой колодцы с дном и вмещают до 20 мкл жидкости. Узкие и мелкие канавки соединяют колодцы с обычными сквозными секториальными прорезями (так называемыми «секторами»). Секторы в свою очередь соединены друг с другом канавками, пересекающими перегородку на обоих концах. Кроме того, секторы имеют в своей узкой части, как обычно, тонкие каналы (не видны на рисунке) для заполнения в собранной ячейке.

Подготовку ячейки для САФ производят следующим образом. Сердечник помещают отверстиями колодцев кверху в корпус ячейки на уже установленное на свое место нижнее окно. В правый колодец микрошприцем вводят 10—15 мкл фермента в легком буфере, левый наполняют таким же объемом буфера либо оставляют пустым. После этого осторожно, следя за тем, чтобы из колодцев не выдавились растворы, вставляют оправу с верхним окном и заканчивают сборку ячейки. Если секторы сохранились в чистоте, в правый сектор (сектор А) вводят 0,33—0,35 мл раствора субстратов в буфере с повышенной плотностью. В левый сектор (сектор В) помещают либо такой же объем, либо, если левый колодец оставлен пустым, соответственно больший объем тяжелого буфера. Субстрат, изменяющий под действием фермен-

та свою оптическую плотность, или рН-индикатор вводят в сектор А или в оба сектора с таким расчетом, чтобы при сканировании получить границы того или иного типа из представленных на рис. 2.

В качестве низкомолекулярного вещества применяют глицерин (5%) [9], D<sub>2</sub>O (50%) [14], NaCl (0,1 М) или (в опытах без рН-индикатора) буферные соли (0,1 М) [8, 15].

Количество наслаиваемого фермента подбирают, исходя из его удельной активности, ожидаемого коэффициента седиментации, объема, который будет налит в колодец, скорости вращения ротора и экстинкции того из реагентов, который изменяет в ходе реакции оптическую плотность раствора. Ориентироваться при этом следует на такую активность в ячейке, чтобы за время седиментации фермента на ширину зоны оптическая плотность изменялась не менее чем на 0,25 ед. и не более чем на 1,00 [7]. Скорость вращения должна быть максимальной, чтобы седиментация происходила быстрее, чем диффузионное расплывание полосы. (Последнее протекает в полосовых опытах намного быстрее, чем в обычных [4]; так, в опыте с глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой в центре полосы концентрация через 40 мин составляла всего 27% от начальной [7]). Однако для ферментов с большим коэффициентом седиментации скорость вращения должна позволить произвести по меньшей мере 6 сканирований с интервалом не менее времени перемещения полосы на свою толщину. Для ориентировочных расчетов при подготовке опытов в табл. 1 приводится начальная толщина

Таблица 1

Начальная толщина полосы с ферментом ( $\delta r_0$ ) при разных объемах ( $v$ ) в колодце и скорости вращения ротора в об/мин

$v$ , мкл	5	10	15
$\delta r_0$ , см	0,015	0,031	0,046

Таблица 2

Время ( $\Delta t$ ), за которое полоса, образующаяся при  $v = 10$  мкл, перемещается на свою толщину (0,031 см) в зависимости от  $s$  фермента и скорости вращения ротора в об/мин

$s$ (S)	$\Delta t$ , мин		
	68 000	60 000	52 000
2	8,1	10,4	13,8
3	5,4	6,9	9,2
5	3,2	4,2	5,5
7	2,3	3,0	4,0
10	1,6	2,1	2,8
13	1,3	1,6	2,1

на полосы при разных объемах фермента, вычисленная из геометрических соображений, а в табл. 2 — время перемещения полосы (образующейся при объеме 10 мкл) на свою толщину (0,031 см) в зависимости от коэффициента седиментации фермента и скорости вращения ротора.

Для подбора такого количества фермента, которое обеспечит изменение оптической плотности в данном растворе субстратов примерно на 1,0 (в полосовой двухсекторной ячейке), можно воспользоваться приближенной формулой:

$$u = 3,40 \cdot 10^{-12} n^2 s(S).$$

Здесь количество фермента  $u$  измеряется в единицах, определенных так, что в спектрофотометрической кювете с 3 мл того же раствора субстратов одна единица фермента вызывает изменение абсорбции на 0,01 за минуту (при длине оптического пути 1 см);  $n$  — скорость вращения ротора в об/мин;  $s(S)$  — коэффициент седиментации фермента в сведбергах. Если принято решение ограничиться в опыте изменением оптической плотности менее чем на 1,0, то надо соответственно уменьшить  $u$ .

После того как по этой формуле вычислено количество фермента, необходимо убедиться, что будет выполняться условие постоянства скорости реакции во всей полосе. Проще всего это сделать в спектрофотометре, проверив, постоянна ли активность выбранного количества фермента в заданном диапазоне оптической плотности.

Окончательное подтверждение правильности полученного результата можно получить только путем повторения полосовых опытов, варьируя концентрации (объем, заливаемый в колодец, сохраняют неизменным): в некотором диапазоне коэффициент седиментации воспроизводится с точностью не хуже  $\pm(2-3)\%$ , а при дальнейшем увеличении концентрации быстро возрастает из-за перегрузки полосы. Дополнительным критерием служит близость результатов вычислений, проделанных по методам полувисоты границы и разностных кривых.

Как уже отмечалось, в сопряженной системе лимитирующим скорость реакции фактором должен быть во всей полосе только исследуемый фермент. Поэтому в таких экспериментах желательно проверять соблюдение этого условия, проведя серию опытов по методу САФ, постепенно повышая концентрацию второго фермента (и третьего, если таковой участвует в сопряженной системе): в области, где скорость реакции лимитируют вспомогательные ферменты, значения коэффициента седиментации будут возрастать и стремиться к «насыщению», т. е. к коэффициенту седиментации исследуемого фермента [7].

В разделе «Теоретические и экспериментальные основы» было указано, что для получения правильных результатов важно, чтобы скорость реакции оставалась постоянной во времени в течение всего опыта. Для проверки следует построить график накопления продукта со временем и убедиться в его прямолинейности от начала до конца опыта. При любой постановке эксперимента для построения графика надо вычислить площади разностных кривых или промежутков между последовательно просканированными границами седиментации (после перерисовки их с приведением к единому началу отсчета времени — см., например, [9]); возрастающую сумму этих площадей откладывают по оси ординат против соответствующих моментов времени на оси абсцисс. Такие расчеты и построения удобнее вести, если сканирование проводить через постоянные интервалы времени (2—8 мин в за-

висимости от скорости вращения ротора и скорости седиментации фермента).

Если график оказывается искривленным к оси времени, то имеет смысл повторить опыты при других скоростях вращения ротора: гидростатическое давление в ячейке ультрацентрифуги пропорционально квадрату угловой скорости [16], и поэтому, если имеет место увеличение изгиба графика при большей скорости, то это указывает на диссоциацию фермента на неактивные (или менее активные) субъединицы [10].

В заключение эксперимента, когда после всех перечисленных предосторожностей и проверок вычислено значение коэффициента седиментации  $S_{\text{набл}}$ , в него необходимо внести поправки на вязкость, плотность и температуру раствора субстратов в опыте по известной формуле

$$S_{20,w} = S_{\text{набл}} \left( \frac{\eta_t}{\eta_{20}} \right)_w \left( \frac{\eta}{\eta_w} \right)_t \frac{1 - \bar{V}_{20}\rho_{20,w}}{1 - \bar{V}_t\rho_t}$$

где главные поправочные члены — отношение вязкости воды ( $w$ ) при температуре опыта к вязкости при 20° С и относительная вязкость раствора при температуре опыта; меньшую роль играет поправка на плотность, где  $\rho_{20,w}$  плотность воды при 20° С,  $\rho_t$  — плотность раствора при температуре опыта,  $\bar{V}_{20}$  и  $\bar{V}_t$  — парциальный удельный объем фермента при 20° С и при температуре опыта соответственно (если известно значение  $\bar{V}$  при какой-либо температуре  $t$ , то при  $t_1$  объем  $\bar{V}_{t_2} \cong \bar{V}_{t_1} \{1 + 5 \cdot 10^{-4} (t_2 - t_1)\}$ ).

*Примеры экспериментов со сложными ферментами.* Изучение сложных ферментов с помощью метода САФ позволяет в некоторых случаях выяснить роль четвертичной структуры в их каталитической функции.

Тейлор с сотр. [17] применяли метод САФ для исследования пируваткарбоксилазы (ПКК) из печени цыпленка и крысы. Опыты проводили в сопряженной системе с малатдегидрогеназой. Для создания градиента плотности реакционная среда содержала 50% D<sub>2</sub>O. Скорость вращения ротора составляла 52 000 об/мин.

Были обнаружены две активные формы ПКК цыпленка с коэффициентами седиментации 16 S и 22 S. Интересно отметить, что обе формы наблюдались одновременно, но без твердых указаний на наличие обратимой реакции ассоциации — диссоциации между ними. Добавочные опыты с обычной скоростной седиментацией при большой концентрации белка позволили авторам заключить, что 22 S компонента не является артефактом из-за возможной перегрузки полосы. В работе делается вывод, что 16 S — это тетрамеры, а 22 S — октамеры 7 S субъединиц.

Пируваткарбоксилаза из печени крысы также седиментировала двумя активными формами, но в разных средах: в присутствии ацетил-СоА с  $s=16,3$  S, а без этого активатора — с  $s=12,3$  S. Переход из 16 S- в 12 S-форму происходил и при увеличении ион-

ной силы ( $\text{KHCO}_3$ ). Авторы полагают, что быстрая форма представляет собой тетрамеры, а медленная — димеры.

Еще один интересный результат этой работы заключается в том, что в отсутствие ацетил-СоА ни одна форма ПКК из печени цыпленка не обладает активностью, в то время как оба олигомера ПКК крысы (и даже ее мономер) активны, хотя и в меньшей мере, чем при наличии активатора.

Важные данные получены методом САФ для фосфофруктокиназы (ФФК) из мышцы кролика [5, 18]. Опыты проводили в сопряженной системе с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой + триозофосфат изомеразой, а также с рН-индикатором «крезол красный». В первом случае удельная активность ФФК составляла 190 ед./мг, во втором — 90 ед./мг. Скорость вращения ротора была 60 000 об/мин. Коэффициент седиментации активной ФФК  $S_{20,w} = 12,2 S$  в тех и других опытах [18]. В следующей работе [5] было, кроме того, установлено, что в отсутствие субстратов, а также у инактивированной ФФК  $s_{c} = 13,5 S$ . Авторы считают, что и 12 S- и 13,5 S-формы являются тетрамерами, но, очевидно, активная форма менее симметрична или каким-то образом разрыхлена.

В заключение упомянем о работе, выполненной в нашей лаборатории [9].

При исследовании растворимой митохондриальной  $\text{H}^+$ АТФазы из сердца быка (фактор  $F_1$ ) как в сопряженной регенерирующей системе, содержащей пируваткиназу с ее субстратом фосфоенолпируватом + лактатдегидрогеназа (рис. 2А, В), так и в системе с рН-индикатором «нейтральный красный» (рис. 2Б, Г) (уд. активность соответственно 50 ед./мг и 20 ед./мг) было установлено, что коэффициент седиментации активного фермента ( $12,4 \pm 0,4 S$ ) с точностью до ошибки измерений совпадает с данными, которые получаются при обычной скоростной седиментации в отсутствие субстрата  $\text{Mg-ATP}$ . По-видимому, этот фермент не изменяет своей общей конфигурации при гидролизе АТФ. В ходе этой работы было обнаружено, что гидростатическое давление в ячейке ультрацентрифуги инактивирует  $F_1$ , причем тем скорее, чем выше скорость вращения ротора (измерения проводили при 48 000, 60 000 и 68 000 об/мин). Инактивация приводила к искривлению графиков  $\ln r(t)$ , из наклона которых вычисляется  $s$ , и это вынудило искать пути к стабилизации фермента. Измерения удалось произвести в двух вариантах. 1. Фактор  $F_1$  был обработан бифункциональным сшивающим агентом — диметилсуберимидатом — в условиях, когда в среднем на молекулу фермента приходилась одна сшивка; при этом сохранялась около 40% активности и исчезала чувствительность к давлению (по крайней мере до 300 атм). 2. Как оказалось, чувствительность  $F_1$  к давлению быстро снижалась с уменьшением скорости реакции. Это позволило осуществить опыты нужной продолжительности при высокой концентрации АТФ, но низкой концентрации  $\text{Mg}^{2+}$ .

Инактивация  $F_1$  под гидростатическим давлением объясняется

диссоциацией фермента на субъединицы, что свидетельствует об отличии от нуля парциального мольного объема реакции диссоциации [10].

Приведенные примеры иллюстрируют некоторые возможности метода САФ, хотя далеко не исчерпывают их. В частности, из-за ограниченности места и сложности проблемы оставлены в стороне теория и ее приложение к обратимо-взаимодействующим ферментным системам.

Подводя итоги всему изложенному в этой статье, следует отметить, что при известной настойчивости метод САФ в сочетании с другими методами может дать такую информацию о физико-химических и каталитических свойствах ферментов, которую затруднительно или вовсе невозможно получить другими методами.

Вместе с тем необходимо помнить об опасности появления артефактов, если пренебречь теми многочисленными контрольными опытами, о которых мы здесь кратко упоминали.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Боуэн Т. (1973) Введение в ультрацентрифугирование, Мир, М.
2. Черняк В. Я. (1978) в сб. Физико-химические методы в молекулярной биологии, Изд-во Моск. ун-та, М., 65—95.
3. Cohen R. (1963) C. R. Acad. Sci. (Paris), 256, 3513—3515.
4. Vinograd J., Bruner R., Kent R., Weigle J. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 49, 902—910.
5. Luther M. A., Gilbert H. F., Lee J. C. (1983) Biophys. J. 41, 272a.
6. Vinograd J., Bruner R. (1966) Fractions N 1, 2—9.
7. Cohen R., Mire M. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 267—275.
8. Kemper D. L., Everse J. (1973) Methods Enzymol. 27, 67—82.
9. Chernyak V. Ya., Kozhanova Z. E., Chernyak B. V., Kozlov I. A. (1979) Eur. J. Biochem. 98, 585—589.
10. Черняк В. Я. (1984) здесь, 161—175.
11. Cohen R., Giraud B., Messiaen A. (1967) Biopolymers 5, 203—225.
12. Wei G. J., Deal W. C. (1979) Biochemistry 18, 1129—1137.
13. Cohen R., Claverie J.-M. (1975) Biopolymers 14, 1701—1716.
14. Taylor B. L., Barden R. E., Utter M. F. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7383—7390.
15. Cohen R., Mire M. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 276—281.
16. Harrington W. F., Kegeles G. (1973) Methods Enzymol. 27, 306—345.
17. Taylor B. L., Frey W. H., Barden R. E., Scrutton M. C., Utter M. F. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3062—3069.
18. Hesterberg L. K., Lee J. C. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 197, 500—502.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Варфоломеев С. Д., Мевх А. Т., Муратов В. К., Игумнова Н. Д., Чурюканов В. В. ПРОСТАГЛАНДИН- И ТРОМБОКСАНСИНТЕТАЗЫ. МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ . . . . .	3
Виноградов А. Д., Васильева Е. А. О РЕЛАКСАЦИОННЫХ СВОЙСТВАХ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТФазы . . . . .	28
Вульфсон П. Л. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА И РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КИНАЗЫ ФОСФОРИЛАЗЫ . . . . .	54
Муронец В. И. АКТИВНЫ ЛИ СУБЪЕДИНИЦЫ НАД-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ? . . . . .	80
Перфильева Е. А., Буларгина Т. В., Северин Е. С. СТРУКТУРА И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА . . . . .	94
Рахманинова А. Б., Ягужинский Л. С. МОДЕЛЬ РЕЦЕПТОРА ЦИТОКИНИНОВ. II. СВЯЗЫВАНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЯ ПРИ N(6) АДЕНИНА . . . . .	122
Телепнева В. И. ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА НАД-КИНАЗ И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА . . . . .	136
Черняк В. Я. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ПОД ВЫСОКИМ ДАВЛЕНИЕМ . . . . .	161
Черняк В. Я. СЕДИМЕНТАЦИЯ АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА . . . . .	176

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ  
ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ**

Зав. редакцией Н. М. Глазкова  
Редактор Г. Г. Есакова  
Переплет художника В. Б. Гордона  
Художественный редактор М. Ф. Евстафиева  
Технический редактор Е. Д. Захарова  
Корректоры В. П. Кададинская, Л. С. Ключкова

Тематический план 1985 г. № 155

ИБ № 2101

Сдано в набор 29.05.84.

Подписано к печати 10.01.85

Л-68020 Формат 60×90/16 Бумага тип. № 2.

Гарнитура литературная. Высокая печать

Усл. печ. л. 12,0 Уч.-изд. л. 13,78

Тираж 1260 экз. Заказ 423

Цена 2 р. 10 к. Изд. № 3218

Ордена «Знак Почета» издательство  
Московского университета.  
103009, Москва, ул. Герцена, 5/7.  
Типография ордена «Знак Почета»  
изд-ва МГУ.  
119899, Москва, Ленинские горы.

**ИЗДАТЕЛЬСТВО  
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**  
в 1985 году  
готовит к выпуску  
книгу

**ВАРФОЛОМЕЕВ С. Д., МЕВХ А. Т.**  
**ПРОСТАГЛАНДИНЫ —**  
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ**

В монографии обсуждаются проблемы ферментативного синтеза простагландинов, являющихся внутриклеточными регуляторами практически всех жизненно важных функций живых организмов; рассматриваются свойства синтезирующих их ферментов, а также вопросы управления ферментативной активностью с помощью лекарственных препаратов.

Для специалистов химиков, биологов, биотехнологов, медиков, студентов и аспирантов.

**ИЗДАТЕЛЬСТВО  
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**

**в 1985 году**

**готовит к выпуску**

**книгу**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ  
ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ**

**Под редакцией**

**Н. М. Эмануэля и М. Г. Кузьмина**

В учебном пособии изложены теоретические основы физико-химических методов исследования: электронного парамагнитного и ядерного магнитного резонанса, люминесцентных и фотохимических методов, импульсного фотолиза, газожидкостной хроматографии. Описание методов рассчитано на то, чтобы читатель, имеющий общую физико-химическую подготовку, мог освоить эти методы, не пользуясь дополнительной литературой. Рассмотрено применение методов для изучения кинетики и механизмов химических реакций. Даны примеры экспериментальных работ.

Для студентов и аспирантов, специализирующихся в области химической кинетики, физической химии, химической физики; может быть использовано для ознакомления с кинетическими методами исследования специалистами смежных областей.

**ИЗДАТЕЛЬСТВО  
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**

**в 1985 году  
готовит к выпуску  
книгу**

**СПИЦЫН В. А.  
БИОХИМИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЧЕЛОВЕКА**

В монографии рассматривается широкий круг вопросов по генетически обусловленному биохимическому полиморфизму у человека. Представлен исторический очерк изучения генетико-биохимической изменчивости в популяциях и проанализированы собственные результаты исследования биохимического полиморфизма по значительному числу генетических систем ферментных и других белков крови. Составлены геногеографические карты, существенно расширяющие картину генетико-антропологической дифференциации на территории СССР. Содержится новая информация о формировании этнических групп и антропологических типов Северной Азии и сопредельных территорий в пространстве и времени. Критически проанализированы данные по эволюционной адаптации человека на биохимическом уровне. Дается оценка одного из важнейших факторов генетической динамики — скорости мутационного процесса в некоторых популяциях СССР.

Для биологов широкого профиля, генетиков, антропологов, медиков, этнографов и специалистов, работающих в смежных областях.

2р. 10к.



ИЗДАТЕЛЬСТВО  
МОСКОВСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА