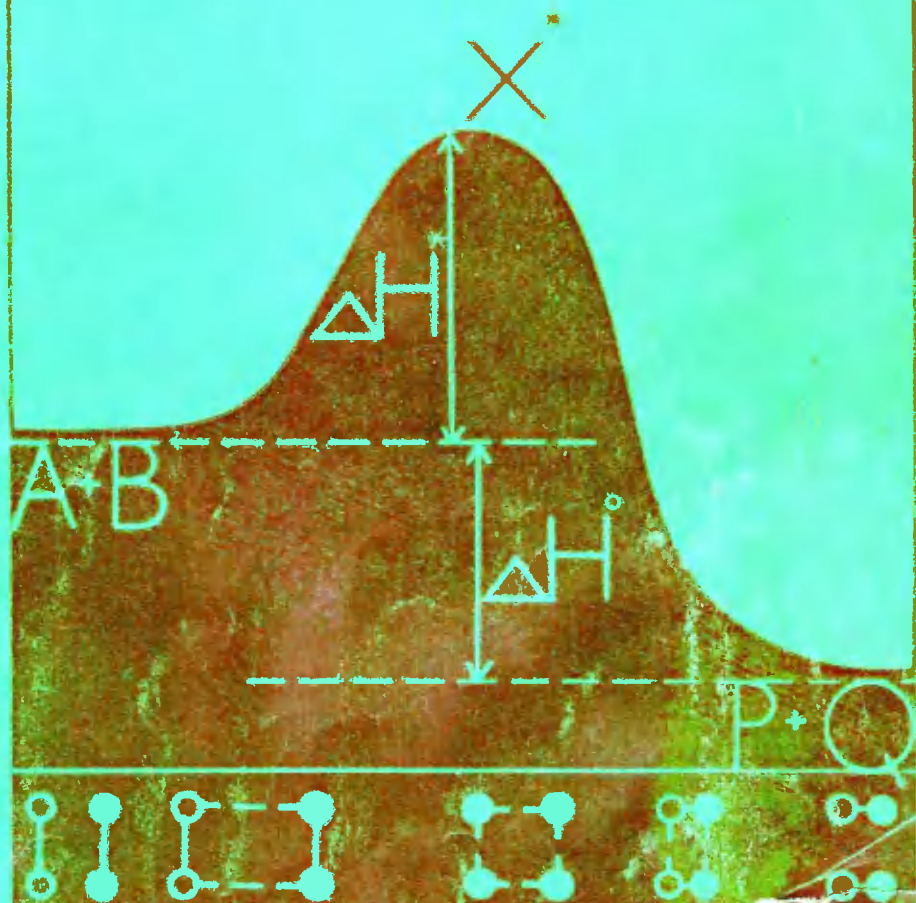


Э.Корниш-Боуден



ОСНОВЫ
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
КИНЕТИКИ

Principles of Enzyme Kinetics

ATHEL CORNISH-BOWDEN

M. A., D. Phil. (Oxon)

Lecturer in Biochemistry, University of Birmingham

BUTTERWORTHS

LONDON — BOSTON

Sydney — Wellington — Durban — Toronto

Э.Корниш-Боуден

ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ

Перевод с английского и предисловие
д-ра хим. наук **Б. И. Курганова**

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

МОСКВА 1979

В книге освещены наиболее важные аспекты ферментативной кинетики — способы вывода уравнений стационарной скорости, действие ингибиторов и активаторов на ферменты, кинетические механизмы ферментативных реакций, влияние pH и температуры на скорость ферментативных процессов, кинетические свойства аллостерических ферментов, интегральные формы кинетических уравнений, использование методов быстрой кинетики для исследования протекания ферментативных реакций и принципы статистической обработки данных кинетических измерений.

Книга может быть рекомендована исследователям, работающим в области энзимологии, а также в качестве учебного пособия аспирантам и студентам старших курсов биологических и химических факультетов университетов и медицинских вузов, специализирующимся в области физико-химической и медицинской энзимологии.

Редакция литературы по биологии

К $\frac{21005-119}{041(01)-79}$ 119-79 © Butterworth & Co. 1976
© Перевод на русский язык, «Мир», 1979

Э. Корниш-Боуден

ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ

Редактор Н. Шафрановская Художник В. Чернецов
Художественный редактор Л. Безрученко Технический редактор В. Сизова
Корректор Н. Спичкина

ИБ № 1913

Сдано в набор 04.04.78. Подписано к печати 17.10.78. Формат 60×90¹/₁₆. Вумага
кн. журн. № 2. Гарнитура обыкновенная. Высокая печать. Объем 8,75 бум. л.
17,50 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 16,87 Изд. № 4/9766 Цена 2 р. 10 к. Тираж 4.000 Зак. 282.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете
Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

Предисловие переводчика

Измерения скорости реакций, катализируемых ферментами преследуют двоякую цель. Во-первых, они позволяют биологу ответить на вопрос, как быстро данное количество фермента может превратить данное количество субстрата в продукт или как быстро образуется и исчезает то или иное промежуточное соединение. Во-вторых, кинетические исследования являются основой большинства методов, используемых для установления механизма ферментативных реакций.

На протяжении 1975—1977 гг. было опубликовано несколько книг, специально посвященных анализу кинетики действия ферментных систем (Wong J.T.-F., *Kinetics of Enzyme Mechanisms*, London, Acad. Press, 1975; Fromm H. J., *Initial Rate Enzyme Kinetics*, Berlin, Springer-Verlag, 1975; Segel I. H., *Enzyme Kinetics*, New York, John Wiley and Sons, 1975; Roberts D. V., *Enzyme Kinetics*, Cambridge, Cambridge University Press, 1977 и книга Корниш-Боудена). Их появление было не случайным; за последние годы достигнуты большие успехи в изучении кинетических механизмов сложных ферментативных процессов, в дальнейшей разработке правил вывода уравнений стационарной скорости, в анализе сложной кинетики действия аллостерических ферментов и многокомпонентных ферментных систем.

Относительно небольшая по объему книга известного специалиста в области ферментативной кинетики Корниш-Боудена затрагивает наиболее важные аспекты кинетики протекания реакций, катализируемых ферментами. В гл. 2, 4, 5 и 6 изложены основные кинетические свойства ферментативных реакций (вывод уравнения Михаэлиса—Ментен, действие ингибиторов и активаторов, кинетические механизмы, влияние pH и температуры). В гл. 3 представлен предложенный Кингом и Альтманом метод

вывода уравнений стационарной скорости и более поздние модификации этого метода. В этой главе используется математическая теория графов, и если у читателя возникнет желание ознакомиться с этой теорией более детально, он может воспользоваться, например, недавно переведенной книгой Р. Уилсона «Введение в теорию графов» (М., «Мир», 1977).

Гл. 7 содержит основные сведения по кинетике действия ферментов, занимающих ключевые позиции в клеточном метаболизме, — аллостерических ферментов. Необычные кинетические свойства аллостерических ферментов, важные для выполнения ими регуляторных функций (положительная или отрицательная кинетическая кооперативность по субстрату, т. е. случаи, когда коэффициент Хилла больше или меньше единицы), связаны с их субъединичной структурой и как следствие с наличием в молекуле фермента нескольких активных центров. Если каталитическая эффективность активных центров изменяется по мере насыщения их субстратом в молекуле фермента (это означает, что существуют взаимодействия между активными центрами), то зависимость скорости ферментативной реакции (v) от концентрации субстрата (S) обнаруживает отклонения от закона Михаэлиса—Ментен. Следует подчеркнуть, что положительная и отрицательная кинетическая кооперативность по субстрату не являются единственными типами кинетического проявления взаимодействия активных центров в аллостерических ферментах. Аллостерические взаимодействия могут приводить также к появлению максимумов и промежуточных плато на кривых зависимости v от $[S]$. Для исследования подобных сложных зависимостей потребовалось изменить привычную «стратегию» постановки кинетического эксперимента, пригодную для изучения гиперболических зависимостей v от $[S]$: во-первых, экспериментаторам пришлось существенно увеличивать интервал концентраций субстрата, в котором проводились измерения начальных скоростей ферментативной реакции, и, во-вторых, более «густо» располагать точки по оси концентраций субстрата. Кроме того, потребовалось повысить точность кинетических экспериментов. Применение подобной измененной стратегии к изучению ферментов, не являющихся объектом аллостерической регуляции в клетке, показало, что утверждение, гласящее, что большинство ферментов следует кинетике Михаэлиса—

Ментен, является малообоснованным [см., например, критическую статью Hill C. M., Waight R. D., Bardsley W. G., *Mol. Cell. Biochemistry*, 15, 173 (1977)]. Автор настоящей книги воздержался от обсуждения вопроса о том, как часто выполняется уравнение Михаэлиса—Ментен, и у читателя может сложиться впечатление, что отклонения от гиперболического типа зависимости v от $[S]_0$ возникают довольно редко. Между тем следовало бы обратить внимание энзимологов (особенно молодых исследователей) на необходимость более тщательной постановки кинетических экспериментов.

Вопрос о кинетике действия диссоциирующих аллостерических ферментных систем практически не обсуждается в этой книге, хотя хорошо известно, что многие аллостерические ферменты в условиях определения ферментативной активности обнаруживают способность к диссоциации на отдельные субъединицы (или к ассоциации с образованием ассоциатов большего размера), причем степень диссоциации зависит от присутствия субстратов и аллостерических эффекторов. Для ознакомления с кинетическими свойствами диссоциирующих аллостерических ферментных систем (а также для более детального изучения кинетики действия аллостерических ферментов) можно рекомендовать недавно вышедшую книгу Б. И. Курганова «Аллостерические ферменты» (М., «Наука», 1978).

Тем читателям, которые после прочтения гл. 9, посвященной обсуждению применения методов исследования быстрых реакций в энзимологии, захотят разобраться в этих вопросах более детально, можно посоветовать обратиться к сборнику «Методы исследования быстрых реакций» под редакцией Г. Неммиса (М., «Мир», 1977). В этой книге читатель может найти весьма подробное изложение экспериментальных и теоретических основ струевых методов, методов релаксационной спектроскопии и ультразвуковых методов.

Последняя глава книги, в которой обсуждается использование статистических методов для обработки данных ферментативной кинетики, представляет, на мой взгляд, особый интерес, поскольку обычно этот вопрос либо совсем не обсуждается в руководствах по кинетике ферментативных реакций, либо обсуждается очень поверхностно. Между тем если исследователь желает оце-

нить точность рассчитываемых им кинетических параметров или желает выяснить, какая из гипотетических схем ферментативного процесса лучше описывает экспериментальные данные, то без статистической обработки результатов измерений ему не обойтись. Совместное использование методов графического представления экспериментальных данных и статистических методов позволяет добиться более надежной интерпретации экспериментальных результатов. Среди графических способов представления уравнения Михаэлиса—Ментен следует отдать предпочтение графику зависимости $[S]_0/v$ от $[S]_0$ и прямому линейному графику, предложенному автором книги совместно с Эйзендалем. Можно надеяться на то, что после сделанного Корниш-Боуденом тщательного анализа недостатков широко применяемой анаморфозы, предложенной Лайнуивером и Бэрком (речь идет о зависимости $1/v$ от $1/[S]_0$), энзимологи наконец откажутся от использования ее при анализе данных ферментативной кинетики.

При подготовке перевода английского издания были исправлены ошибки (в основном технического характера), замеченные автором и нами при переводе.

Книга Корниш-Боудена, несомненно, послужит полезным учебным пособием для студентов и аспирантов, специализирующихся в области энзимологии, и хорошим руководством для биохимиков, изучающих механизмы ферментативных реакций. Думаю, что эта книга окажется полезной и для исследователей различных специальностей, занимающихся вопросами практического использования ферментов в медицине и в химической промышленности.

Б. И. Курганов

Предисловие к английскому изданию

Кинетика — дисциплина таинственная и могущественная. Она таинственна для многих ученых, не сумевших преодолеть страх и благоговение перед математическими методами. В то же время кинетика является мощным оружием в руках многих других исследователей, так как ни один другой научный подход по своей универсальности не может с ней сравниться. Конечно, такими свойствами обладают многие методы, однако кинетика занимает особое место по способности «поляризовать» исследователей на два лагеря, внутри которых характерно различное отношение к этой науке.

Те, кто не понимает и боится математики, часто либо относятся к кинетике с чрезмерным восхищением («Это слишком трудно для меня»), либо выражают ей чрезмерное неуважение («Кинетика никогда не позволяет доказать выполнимость определенного механизма процесса; она просто опровергает его»). Последнее утверждение, однако, применимо и к любому другому научному методу. Почему же именно кинетика является мишенью для подобной критики? Существуют две близкие причины, объясняющие это: а) описания методики проведения кинетических опытов часто бывают запутанными и неточными; б) возможности кинетики часто переоцениваются, что приводит к ошибкам.

Автор этой книги, Э. Корниш-Боуден, провел замечательную работу, искусно «лавируя между Сциллой и Харибдой». Во-первых, основные положения ферментативной кинетики изложены достаточно просто и доступны для понимания специалисту «нематематического склада», получившему типичное биологическое образование. Во-вторых, в книге четко указаны ограничения кинетических подходов и подчеркиваются опасности, связанные с переоценкой возможностей этих подходов. Читатель получает мощное оружие, но его предупреждают, что, если с ним не обра-

щаться должным образом, результат может оказаться обратным желаемому. Это хорошо продуманная книга. Она не охватывает всего того, что составляет предмет кинетики, и это является одним из ее достоинств. Автор выбрал материал из наиболее важных областей кинетики, снабдив его строгими и ясными иллюстрациями, что должно способствовать росту популярности кинетики и лучшему пониманию ее возможностей в решении биологических и энзимологических задач.

Д. Кошланд мл.

От автора

Эта книга предназначена в первую очередь для исследователей, только приступающих к изучению ферментативной кинетики, но я надеюсь, что она окажется полезной и для более подготовленных читателей — научных работников и выпускников высших учебных заведений. Молодым ученым, делающим в науке лишь первые шаги, в особенности химикам и биологам, как правило, довольно трудно найти пособие, с одной стороны выходящее за рамки элементарного, идеализированного представления о ферментативной кинетике, а с другой — не требующее специальной подготовки. В ферментативной кинетике имеется ряд вопросов (например, вывод уравнений стационарной скорости, анализ кинетических кривых и статистическая обработка результатов), достаточно важных для того, чтобы рассмотреть их хотя бы на элементарном уровне, тогда как до сих пор они либо вовсе не обсуждались, либо обсуждались недостаточно.

Хорошо разбираясь в основах ферментативной кинетики, можно с легкостью ориентироваться во всех вопросах этой науки. По мере своего развития она становится лишь более разветвленной, но не более трудной для понимания. Поэтому, с моей точки зрения, важно тщательно осветить фундаментальные аспекты ферментативной кинетики, и меня скорее можно упрекнуть в повторном объяснении простых вещей, чем в замалчивании сложных. Однако я не ставил перед собой задачи написать исчерпывающе полный научный труд — в книге, например, почти не рассматриваются трехсубстратные реакции. Это сделано не потому, что они имеют второстепенное значение; просто для их изучения можно использовать аппарат, разработанный для более простых реакций, и, следовательно, включение этого вопроса в книгу могло бы привести к усложнению материала в ущерб пониманию.

Стремясь быть последовательным в принципиальных вопросах, я тем не менее намеренно отказался от попытки слепо придерживаться принятой системы обозначений. Например, в одних случаях мне казалось удобнее использовать для обозначения субстрата символ S , а в других — символы A , B и т. д. Аналогичным образом я поступил и при рассмотрении двух основных теорий кооперативности. К сожалению, одна из этих теорий оперирует с константами диссоциации, а другая — с константами ассоциации. Я считаю, что, пытаясь единообразно обозначить эти константы в книге, я оказал бы медвежью услугу исследователям, которые могут запутаться при чтении оригинальной литературы.

Основной акцент в книге делается на изложение принципов ферментативной кинетики, а не сведений об отдельных ферментах; это ни в коей мере не перечень свойств ферментов. Дело не только в том, что уже издан ряд книг, прекрасно выполняющих эту функцию, но также и в том, что имеется настоятельная потребность в пособии, где основы ферментативной кинетики рассматривались бы на промежуточном уровне. Я надеюсь, что настоящее издание поможет выполнить эту задачу.

Многие книги по кинетике, использующие математический аппарат, начинаются с вводной части, предназначенной, по-видимому, для того, чтобы внушить читателю чувство уверенности. Данная книга построена по другому принципу, поскольку, как мне кажется, каждому ясно с самого начала, что бесполезно изучать ферментативную кинетику, если бояться простой алгебры и несложных вычислений. Гл. 1 содержит основные выводы химической кинетики. Многие из них должны быть хорошо известны читателю; включены они для того, чтобы яснее были те допущения, которые используются в последующих главах. В этой главе также кратко рассмотрен анализ размерности величин, который, по моему мнению, является простым и в то же время мощным методом обнаружения алгебраических ошибок.

Гл. 2, 4, 5 и 6 посвящены основным вопросам стационарной кинетики, обычно рассматриваемым в многочисленных курсах по биохимии, и требуют небольшого специального обсуждения в предисловии. Я несколько отклонился от общепринятой практики, рассматривая отношение V/K_M как параметр, имеющий право на само-

стоятельное использование (по крайней мере столь же важный, как и параметр K_M), потому что многие аспекты ферментативной кинетики оказываются гораздо более простыми для понимания и классификации в терминах V и V/K_M , чем в терминах V и K_M . Может показаться, что вопросы, посвященные температурной зависимости скорости ферментативных реакций (гл. 6), рассмотрены слишком кратко. Объясняется это тем, что, на мой взгляд, из большого числа исследований по температурной зависимости ферментативной активности представляют ценность лишь очень немногие работы: как правило, условия эксперимента оказываются выбранными недостаточно удачно для изучения температурной зависимости.

В гл. 3 предпринята попытка объяснить в максимально простой форме наиболее полезные методы, используемые при выводе уравнений стационарной скорости. Исследователь, приступающий к изучению сложных кинетических механизмов, очень быстро сталкивается с тем, что методы, которыми он пользовался в случае очень простых механизмов, фактически бесполезны из-за безнадежно сложных алгебраических выражений, к которым они приводят. Несмотря на то что метод Кинга—Альтмана рассмотрен в общих чертах в нескольких учебниках, сущность его, как мне кажется, можно понять, прочитав лишь оригинальную, довольно сложную статью. Вместе с тем я думаю, что любой, кто пользуется этим важным методом, должен понимать его теоретические основы. Поэтому я попытался объяснить суть метода в возможно более простой форме. Эта глава включает также некоторые важные усовершенствования метода Кинга—Альтмана, сделанные в последние годы.

Изучение кооперативности (гл. 7) развивалось в отрыве от основных направлений ферментативной кинетики, и этот вопрос, как правило, не рассматривается в учебниках. В процессе формирования данного раздела сложились определенные традиции в отношении терминологии (например, совместное использование констант ассоциации и диссоциации). При изложении материала в этой главе в частности и до некоторой степени на протяжении всей книги возникал соблазн ввести новые символы и термины, однако я сознательно не уступил ему нигде, за исключением случая, когда для обозначения коэффициента Хилла я ввел сим-

вол h . Этот шаг вполне оправдан, поскольку использование для этой цели буквы h может ввести в заблуждение, а кроме того, это неудобно с типографской точки зрения — обозначение h_n слишком громоздко (особенно если h_n стоит в показателе степени).

В гл. 8 рассматривается раздел ферментативной кинетики, который биохимики почти полностью игнорировали в течение 60 лет по причинам, уже утратившим силу. Я думаю, что настало время восстановить роль интегральных форм уравнений скорости, которую они утратили с появлением классической работы Михаэлиса и Ментен.

Гл. 9 является введением к изучению быстрых реакций. Однако в ней не дается исчерпывающего анализа вопроса, это потребовало бы написания специальной книги. Вместо этого я попытался осветить те аспекты быстрых реакций, которые должны быть знакомы каждому исследователю, оперирующему в основном стационарными скоростями, но понимающему, что иногда может возникнуть необходимость в изучении предстационарных стадий.

Гл. 10 является введением к методам статистической обработки данных. Многие биохимики совершенно необоснованно считают, что владеть этими методами не обязательно. Возрастающая с каждым годом популярность уравнения Лайнуивера—Бэрка говорит о нежелании большинства исследователей тратить время на знакомство с более фундаментальной литературой по анализу экспериментальных данных.

Я очень благодарен д-рам Дж. Ноулису и Д. Кошланду, пробудившим мой интерес к ферментативной кинетике, и некоторым моим коллегам, особенно д-рам Р. Эйзенталу, А. Стореру, К. Вортопу и К. Рену, за многие ценные комментарии по первому варианту этой книги. Благодаря этим советам она значительно выиграла и была избавлена от многочисленных ошибок. Несомненно, часть ошибок все же осталась, как и во всех книгах, содержащих много уравнений, и я буду очень благодарен читателям, если они сообщат мне о них.

Основные принципы химической кинетики

1.1. Порядок реакции

Химическая реакция может быть охарактеризована либо *молекулярностью*, либо *порядком*. Молекулярность определяется числом молекул, претерпевающих изменение в реакции. Так, реакция $A \rightarrow \text{Продукты}$ является *унимолекулярной*, или *мономолекулярной*, реакция $A + B \rightarrow \text{Продукты}$ или $2A \rightarrow \text{Продукты}$ — *бимолекулярной* и реакция $A + B + C \rightarrow \text{Продукты}$ — *тримолекулярной*, или *термолекулярной*. (Причиной подобных разночтений является неоправданное стремление ученых образовывать новые слова, как они полагают, от классических корней, не задумываясь о том, что эти корни означают. В настоящей книге я, хотя и с некоторыми опасениями, буду использовать из всех вышеупомянутых альтернативных названий только первое.) Порядок представляет собой число концентрационных членов, перемножаемых в выражении для скорости реакции. Следовательно, для реакции первого порядка скорость пропорциональна одному концентрационному члену, для реакции второго порядка — произведению двух концентрационных членов или квадрату одного концентрационного члена и т. д.

Для простой реакции, в которой имеется только одна стадия, или для отдельной стадии сложной реакции порядок обычно совпадает с молекулярностью. Однако многие реакции протекают в несколько последовательных унимолекулярных и бимолекулярных стадий, и молекулярность полной реакции совсем не обязательно должна совпадать с порядком. Реакции, молекулярность которых больше 2, распространены очень широко, в то время как реакции, имеющие порядок, больший 2, весьма редки. Следует отметить также, что молекулярность и порядок обратной реакции вовсе не должны совпадать с таковыми для прямой реакции. Это соображение особенно важно при рассмотрении метаболических реакций, часто являющихся обратимыми; их можно заставить протекать в любом направлении, регулируя концентрации реагентов.

Для реакции первого порядка $A \rightarrow P$ скорость v задается следующим выражением:

$$v = dp/dt = ka = k(a_0 - p), \quad (1.1)$$

где a и p — концентрации веществ A и P соответственно, свя-

занные соотношением $a+p=a_0$, t — время и k — константа скорости реакции первого порядка. Это уравнение легко проинтегрировать:

$$\int \frac{dp}{a_0 - p} = \int k dt;$$

$$-\ln(a_0 - p) = kt + \alpha,$$

где α — константа, которую можно оценить, выбрав начальный момент времени таким образом, чтобы $a=a_0$ и $p=0$ при $t=0$. Следовательно, $\alpha = -\ln(a_0)$, и, значит, мы получаем соотношение

$$\ln[(a_0 - p)/a_0] = -kt,$$

которое можно преобразовать к виду

$$p = a_0[1 - \exp(-kt)]. \quad (1.2)$$

Отметим один важный момент: при выводе этого уравнения мы учли константу интегрирования α и нашли ее значение, которое оказалось отличным от нуля. Так следует поступать всегда при интегрировании кинетических уравнений, поскольку константы интегрирования, как правило, не равны нулю.

Простая бимолекулярная реакция $2A \rightarrow P$ является скорее всего реакцией второго порядка; скорость ее v определяется следующим выражением:

$$v = dp/dt = ka^2 = k(a_0 - 2p)^2, \quad (1.3)$$

где k теперь константа скорости реакции второго порядка. (Заметим, что принятая система обозначений не дает, к сожалению, никаких указаний на порядок соответствующей реакции.)

Проинтегрировав уравнение (1.3), получим

$$\int \frac{dp}{(a_0 - 2p)^2} = \int k dt;$$

$$\frac{1}{2(a_0 - 2p)} = kt + \alpha.$$

Подставив сюда $p=0$ при $t=0$, находим $\alpha = 1/2a_0$; следовательно,

$$p = \frac{a_0^2 kt}{1 + 2a_0 kt}. \quad (1.4)$$

Реакции такого типа встречаются довольно редко, как правило, бимолекулярные реакции — это реакции типа $A+B \rightarrow P$, в которых две реагирующие молекулы имеют различную природу. В этом случае

$$v = dp/dt = kab = k(a_0 - p)(b_0 - p). \quad (1.5)$$

Проинтегрировав уравнение, получаем

$$\int dp / [(a_0 - p)(b_0 - p)] = \int k dt,$$

$$\left(\frac{1}{b_0 - a_0} \right) \ln \left(\frac{b_0 - p}{a_0 - p} \right) = kt + a.$$

Подставляя $p=0$ при $t=0$ и преобразуя полученное соотношение, приходим к уравнению

$$\ln \left[\frac{a_0(b_0 - p)}{b_0(a_0 - p)} \right] = (b_0 - a_0) kt,$$

или

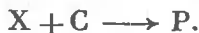
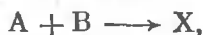
$$\frac{a_0(b_0 - p)}{b_0(a_0 - p)} = \exp[(b_0 - a_0) kt]. \quad (1.6)$$

Особый интерес представляет случай, когда $a_0 \gg b_0$. Тогда в любой момент времени p много меньше, чем a_0 , и поэтому величину $(a_0 - p)$ можно принять равной просто a_0 . В этом случае уравнение (1.6) сводится к

$$p = b_0 [1 - \exp(-ka_0 t)].$$

Полученное уравнение совершенно идентично уравнению (1.2), относящемуся к реакции первого порядка. Рассмотренный тип реакции известен как реакция *псевдопервого порядка*, а величину ka_0 называют *константой скорости реакции псевдопервого порядка*. Такие реакции имеют место чаще всего в тех случаях, когда один из реагентов представляет собой растворитель, как это бывает, например, в большинстве реакций гидролиза. Однако имеет смысл специально создавать такие условия проведения изучаемой реакции, чтобы она протекала как реакция псевдопервого порядка. Тогда гораздо проще оценить константу скорости (этот вопрос будет рассмотрен в разд. 1.5).

Тримолекулярные реакции типа $A+B+C \rightarrow P$, как правило, не протекают в одну стадию, и поэтому их порядок обычно не равен 3. Такие реакции чаще всего состоят из двух или более *элементарных стадий*, например



Если одна из стадий этой реакции протекает гораздо медленнее, чем другие, то скорость полной реакции равна скорости этой медленной стадии, которую поэтому называют *лимитирующей*. Если отчетливо выраженной лимитирующей стадии нет, то уравнение скорости реакции имеет, как правило, сложный вид и реакция характеризуется непостоянным порядком. Для некоторых

тримолекулярных реакций действительно выявляется кинетика третьего порядка и $v = kabc$ (где k — константа скорости *третьего порядка*), однако в этом случае для объяснения наблюдаемой кинетики *нет* необходимости вводить допущение о столкновении трех молекул, что само по себе маловероятно. Вместо этого мы можем предположить, что имеет место двухстадийный механизм, подобно приведенному выше, однако первая стадия является обратимой, причем равновесие очень быстро устанавливается, так что для концентрации реагента X (обозначаемой далее как x) справедливо выражение $x = K ab$, где K — константа равновесия. Скорость всей реакции определяется скоростью второй, относительно медленной стадии:

$$v = k' xc = k' K abc,$$

где k' — константа скорости для второй стадии. Следовательно, наблюдаемая константа скорости третьего порядка фактически представляет собой произведение константы скорости второго порядка и константы равновесия.

Некоторые реакции характеризуются *нулевым порядком*, т. е. их скорость оказывается постоянной величиной, не зависящей от концентрации реагента. Если реакция имеет нулевой порядок только по отношению к одному реагенту, это может просто означать, что данный реагент вступает в реакцию на стадии, следующей за лимитирующей. Однако некоторые реакции имеют нулевой порядок по каждому из реагентов, т. е. скорость реакции не зависит от концентраций всех реагентов. Такие реакции всегда оказываются каталитическими и имеют место в том случае, когда каждый реагент присутствует в избытке, так что потенциальные возможности катализатора полностью реализуются. Примеры подобных реакций мы рассмотрим при обсуждении вопросов ферментативного катализа.

1.2. Определение порядка реакции

Наиболее простой способ определения порядка реакции состоит в измерении скорости при различных концентрациях реагентов. График зависимости логарифма скорости от логарифма концентрации представляет собой прямую, наклон которой равен порядку реакции. Если изменять концентрации всех реагентов так, чтобы соотношение между ними оставалось неизменным, то наклон прямой даст общий порядок. Однако, как правило, определяют порядок по отношению к каждому реагенту в отдельности; для этого меняют концентрацию данного реагента, поддерживая концентрации всех остальных реагентов постоянными. Тогда наклон прямой будет равен порядку реакции по отношению к реагенту, концентрация которого меняется. На-

пример, если реакция имеет второй порядок по веществу А и первый порядок по веществу В, т. е.

$$dp/dt = ka^2b,$$

то

$$\lg(dp/dt) = \lg k + 2\lg a + \lg b.$$

Следовательно, наклон прямой, изображающей зависимость $\lg(dp/dt)$ от $\lg a$ (при $b = \text{const}$), будет равен 2, а прямой $\lg(dp/dt)$ от $\lg b$ (при $a = \text{const}$) равен 1. Отметим следующее важное обстоятельство: когда скорости определяются из наклонов кинетической кривой (т. е. графика зависимости концентрации от времени), происходит изменение концентраций всех реагентов. Поэтому для получения правильных результатов необходимо либо брать начальные концентрации всех реагентов в соотношении, соответствующем стехиометрическому (в этом случае определяется общий порядок), либо (и это более распространенный вариант) с самого начала реакции обеспечивать большой избыток тех реагентов, концентрацию которых хотя бы поддерживать постоянной, тогда изменения в их концентрации будут не существенными. Если ни один из этих вариантов постановки эксперимента осуществить не удастся, то скорости получают из серии измерений наклона в нулевой момент времени, т. е. из измерений начальных скоростей. Этим методом обычно пользуются в случае реакций, катализируемых ферментами, поскольку кинетические кривые ферментативных реакций при выборе достаточно протяженных интервалов времени не могут быть описаны строго простыми уравнениями скорости. Как правило, кинетическая кривая ферментативной реакции описывается более сложным уравнением, чем интегральная форма уравнения скорости полученного для начальной скорости.

1.3. Размерности констант скорости

Анализ размерностей кинетических параметров является методом, который заслуживает большего внимания, чем ему уделяется сейчас. Если концентрацию реагентов выражать в молях на 1 л (М, или моль·л⁻¹), а скорость реакции — в М·с⁻¹, то в соотношении типа $v = ka$ константа скорости k должна быть выражена в с⁻¹, чтобы левая и правая части уравнения имели одинаковую размерность. Все константы скорости первого порядка имеют размерность (время)⁻¹. Аналогичным образом можно показать, что константа скорости реакций второго порядка имеет размерность (концентрация)⁻¹·(время)⁻¹, константа скорости реакции третьего порядка — (концентрация)⁻²·(вре

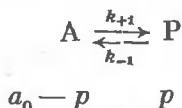
мя)⁻¹ и реакция нулевого порядка — (концентрация) · (время)⁻¹.

Зная размерности констант скорости, можно предложить полезный метод проверки корректности полученных уравнений: левая и правая части уравнения (или неравенства) должны всегда иметь одну и ту же размерность; все члены какой-либо суммы также должны иметь одну и ту же размерность. Например, если в уравнении встречается член $(1+t)$, где t имеет размерность времени, то либо это уравнение неверно, либо 1 представляет собой время, численное значение которого оказалось равным единице. Величины, имеющие разные размерности, можно умножать или делить друг на друга, но не складывать или вычитать. Так, если k_1 и k_2 представляют собой константы скорости соответственно первого и второго порядка, то утверждение, что $k_1 \gg k_2$, бессмысленно, так же как бессмысленно утверждение $5 \text{ г} \gg 25^\circ \text{С}$. Однако такая величина, как $k_2 a$, имеет размерность (концентрация)⁻¹ · (время)⁻¹ · (концентрация), т. е. (время)⁻¹, — такую же, как и константа скорости реакции первого порядка, и ее можно сопоставлять с другими константами скорости первого порядка.

Эти рассуждения кажутся совершенно очевидными, однако, как это ни удивительно, некорректные сопоставления констант скорости, ведущие к ошибочным выводам, — не такое уж редкое явление. Подобного типа ошибки случаются особенно часто, когда имеют дело с константами скорости и константой равновесия, поскольку алгебраические символы, используемые для обозначения этих констант, обычно не содержат никаких указаний на размерность и, кроме того, эти символы практически одинаковы.

1.4. Обратимые реакции

Многие реакции являются легко обратимыми, и при составлении для них уравнения скорости необходимо учитывать обратную реакцию:



В этом случае

$$v = dp/dt = k_{+1}(a_0 - p) - k_{-1}p = k_{+1}a_0 - (k_{+1} + k_{-1})p. \quad (1.7)$$

Следовательно,

$$\int \frac{dp}{k_{+1}a_0 - (k_{+1} + k_{-1})p} = \int dt$$

и

$$\frac{\ln [k_{+1} a_0 - (k_{+1} + k_{-1}) p]}{-(k_{+1} + k_{-1})} = t + \alpha.$$

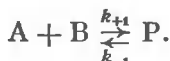
Подставляя $p = 0$ при $t = 0$, получаем $\alpha = -\ln (k_{+1} a_0) / (k_{+1} + k_{-1})$ и, следовательно,

$$\ln \left[\frac{k_{+1} a_0 - (k_{+1} + k_{-1}) p}{k_{+1} a_0} \right] = -(k_{+1} + k_{-1}) t.$$

Наконец,

$$p = \frac{k_{+1} a_0 \{1 - \exp [-(k_{+1} + k_{-1}) t]\}}{k_{+1} + k_{-1}}. \quad (1.8)$$

Несколько более сложной является обратимая бимолекулярная реакция



В этом случае

$$v = dp/dt = k_{+1} ab - k_{-1} p. \quad (1.9)$$

При бесконечно больших временах суммарная скорость реакции становится равной нулю, и концентрации реагентов достигают равновесных значений, a_∞ , b_∞ и p_∞ , т. е.

$$k_{+1} a_\infty b_\infty - k_{-1} p_\infty = 0.$$

Следовательно,

$$k_{-1} = k_{+1} a_\infty b_\infty / p_\infty$$

и

$$v = dp/dt = k_{+1} ab - (k_{+1} a_\infty b_\infty p / p_\infty).$$

Учитывая стехиометрию реакции, мы можем записать равенства $a = a_0 - p$ и $b = b_0 - p$ и далее

$$\begin{aligned} dp/dt &= k_{+1} (a_0 - p)(b_0 - p) - [k_{+1} (a_0 - p_\infty)(b_0 - p_\infty) p / p_\infty] = \\ &= (k_{+1} / p_\infty) (a_0 b_0 - p p_\infty) (p_\infty - p). \end{aligned}$$

Интегрирование этого уравнения дает

$$\begin{aligned} \int \frac{dp}{(a_0 b_0 - p p_\infty) (p_\infty - p)} &= \int \frac{k_{+1} dt}{p_\infty}, \\ \left(\frac{1}{-a_0 b_0 + p_\infty^2} \right) \ln \left(\frac{p_\infty - p}{a_0 b_0 - p p_\infty} \right) &= \frac{k_{+1} t}{p_\infty} + \alpha. \end{aligned}$$

Подставляя сюда $p=0$ при $t=0$, получаем

$$\alpha = \left(\frac{1}{-a_0 b_0 + p_\infty^2} \right) \ln \left(\frac{p_\infty}{a_0 b_0} \right).$$

Наконец,

$$\frac{1}{-a_0 b_0 + p_\infty^2} \ln \left[\frac{a_0 b_0 (p_\infty - p)}{p_\infty (a_0 b_0 - p p_\infty)} \right] = \frac{k_{+1} t}{p_\infty}. \quad (1.10)$$

При желании это уравнение можно разрешить относительно p .

Для дифференциальных уравнений, которые получаются при рассмотрении реакций, состоящих из нескольких последовательных стадий, включая и обратимые, например



в общем случае нельзя получить решения в явном виде. Это позволяют сделать современные численные методы, однако, поскольку некаталитические реакции этого типа для биохимии особого интереса не представляют, в дальнейшем мы их рассматривать не будем. Каталитические реакции подобного типа будут рассмотрены ниже.

1.5. Определение констант скорости первого порядка

Очень многие реакции являются реакциями первого порядка по каждому из реагентов. В этих случаях часто оказывается возможным проводить реакцию в таких условиях, чтобы она протекала как реакция псевдопервого порядка; для этого все реагенты, кроме одного, берут в избытке. Таким образом, во многих конкретных случаях проблема определения констант скорости сводится к определению константы скорости для реакции первого порядка. Мы видели [см. уравнение (1.2)], что для простой реакции первого порядка справедливо уравнение

$$p = a_0 [1 - \exp(-kt)],$$

а для более общего случая обратимой реакции [см. уравнение (1.8)] — уравнение

$$p = \left(\frac{k_{+1} a_0}{k_{+1} + k_{-1}} \right) \{1 - \exp[-(k_{+1} + k_{-1})t]\}.$$

Поскольку экспоненциальный член при достаточно больших значениях t стремится к нулю, множитель $k_{+1} a_0 / (k_{+1} + k_{-1})$ представляет собой равновесное значение p , т.е. p_∞ , и, таким образом,

$$p_\infty - p = p_\infty \exp[-(k_{+1} + k_{-1})t]. \quad (1.11)$$

Преобразуя выражение, получаем

$$\ln(p_{\infty} - p) = \ln p_{\infty} - (k_{+1} + k_{-1})t$$

или в более удобной форме

$$\lg(p_{\infty} - p) = \lg p_{\infty} - [(k_{+1} + k_{-1})t/2,303].$$

Таким образом, зависимость $\lg(p_{\infty} - p)$ от t графически представляется прямой с наклоном, равным $-(k_{+1} + k_{-1})/2,303$.

Главный недостаток этого графика, как отметил Гуттенгейм [60], состоит в том, что для его построения необходимо знать точное значение p_{∞} . Даже для частного случая необратимой реакции, когда $p_{\infty} = a_0$, точное измерение мгновенной концентрации реагента А в начальный момент времени представляет собой непростую задачу, а в общем случае, когда $p_{\infty} \neq a_0$, определить p_{∞} еще труднее. Гуттенгейм предложил измерять две серии величин, p_i и p'_i , в моменты времени t_i и t'_i при условии, что $t'_i = t_i + \tau$, где τ — постоянная величина. Тогда, согласно (1.11), можно записать:

$$\begin{cases} p_{\infty} - p_i = p_{\infty} \exp[-(k_{+1} + k_{-1})t_i], \\ p_{\infty} - p'_i = p_{\infty} \exp[-(k_{+1} + k_{-1})(t_i + \tau)]. \end{cases} \quad (1.12)$$

Вычитая одно уравнение из другого, получаем

$$p'_i - p_i = p_{\infty} \{1 - \exp[-(k_{+1} + k_{-1})\tau]\} \exp[-(k_{+1} + k_{-1})t_i],$$

откуда

$$\ln(p'_i - p_i) + (k_{+1} + k_{-1})t_i = \text{const.} \quad (1.13)$$

Таким образом, $\ln(p'_i - p_i)$ от t графически изображается прямой с наклоном $-(k_{+1} + k_{-1})$. Эту зависимость называют графиком Гуттенгейма.

Основное достоинство графика Гуттенгейма состоит в том, что при его использовании отпадает необходимость в предварительном определении величины p_{∞} . Поскольку отношение k_{+1}/k_{-1} равно константе равновесия, которую можно определить независимо, комбинация этих двух подходов (построение графика Гуттенгейма и нахождение константы равновесия) позволяет рассчитать значения индивидуальных констант скорости k_{+1} и k_{-1} .

Другой способ комбинации уравнений (1.12) заключается в делении одного уравнения на другое:

$$\frac{p_{\infty} - p_i}{p_{\infty} - p'_i} = \exp[(k_{+1} + k_{-1})\tau].$$

Это выражение можно преобразовать к виду

$$p_i' = p_{\infty} \{1 - \exp[-(k_{+1} + k_{-1})\tau]\} + p_i \exp[-(k_{+1} + k_{-1})\tau]. \quad (1.14)$$

Таким образом, зависимость p_i' от p_i также изображается прямой с наклоном, равным $\exp[-(k_{+1} + k_{-1})\tau]$. Этот график был предложен Кезди и др. [88] и Свинборном [140]. Он характеризуется примерно такой же точностью, что и более широко при-

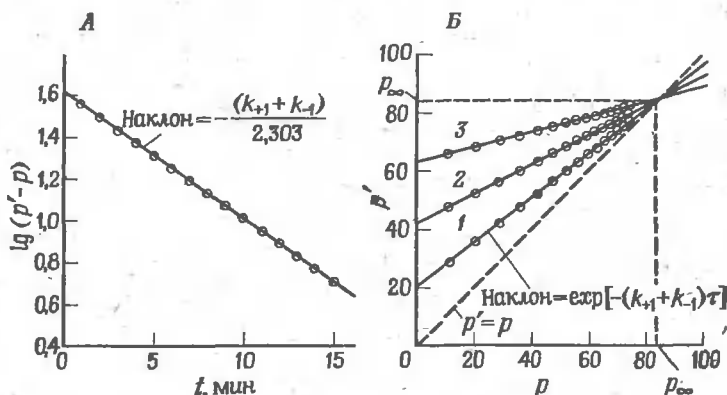


Рис. 1.1. Определение констант скорости реакций первого порядка при помощи графика Гуттенгейма (А) и графика Кезди—Свинборна (Б).

p и p' — концентрации продукта при значениях времени, различающихся на постоянную величину τ . Для графика Гуттенгейма $\tau = 5$ мин, для графика Кезди—Свинборна значения τ (в мин) составили: 1 — 2, 2 — 5 и 3 — 10.

меняемый график Гуттенгейма, но его легче строить. Поскольку при $t \rightarrow \infty$ справедливо равенство $p_i' = p_i = p_{\infty}$, с помощью обсуждаемого графика можно очень просто определить p_{∞} : если провести прямую $p_i' = p_i$, то точка пересечения ее с экстраполированными участками прямых p_i' от p_i даст величину p_{∞} . Оба типа графиков представлены на рис.1.1.

Для первого графика, согласно Гуттенгейму, лучше всего использовать значения τ , в несколько раз превышающие величину $t_{1/2}$ (время полупревращения, т.е. время, требуемое для достижения глубины реакции, составляющей половину максимальной). Для графика второго типа, напротив, по мнению Свинборна, оптимальными являются значения τ от $0,5t_{1/2}$ до $t_{1/2}$. Свинборн рекомендовал также представлять графически одни и те же экспериментальные данные несколько раз с различными значениями τ , для того чтобы проверить, согласуются ли между собой получаемые результаты. Подобную операцию можно проделывать, конечно, и с графиком Гуттенгейма, однако в этом случае она будет более трудоемкой.

Форма зависимостей, представляемых на обоих графиках, нечувствительна к отклонениям от кинетики первого порядка, иначе говоря, вполне удовлетворительные прямые могут получаться даже в тех случаях, когда реакция не следует точно кинетике первого порядка. По этой причине ни один из обсуждаемых графиков нельзя использовать для определения порядка реакции; его нужно устанавливать независимым путем.

1.6. Влияние температуры на константы скорости

Уже самые первые исследования скоростей реакций показали, что они сильно зависят от температуры. Первый вывод, который следует из этого факта, заключается в том, что для получения из кинетических экспериментов однозначных результатов необходимо строго контролировать температуру. В то же время, учитывая это обстоятельство, можно использовать температурный фактор для получения важной информации о механизмах реакций путем измерения скоростей при нескольких температурах.

Отправным пунктом для всех современных теорий, объясняющих температурную зависимость констант скорости, послужили исследования Вант-Гоффа [144] и Аррениуса [7]. Харкорт [71] отметил, что значения скоростей многих реакций при повышении температуры на каждые 10°C приблизительно удваиваются, а Вант-Гофф и Аррениус, сопоставляя кинетические данные с известными свойствами констант равновесия, попытались уточнить это соотношение. Согласно общепринятой точке зрения, константы равновесия, будучи термодинамическими величинами, имеют более строгий физический смысл, чем кинетические константы. Любая константа равновесия K изменяется при варьировании абсолютной температуры T в соответствии с уравнением Вант-Гоффа

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2}, \quad (1.15)$$

где R — газовая постоянная, ΔH — стандартное изменение энтальпии при протекании реакции. По аналогии с этим уравнением Аррениус предложил уравнение для изменения константы скорости k с температурой

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}, \quad (1.16)$$

где E_a — энергия активации. Хотя это уравнение нельзя строго получить из уравнения (1.15), Аррениус, а затем и другие исследователи нашли, что на практике оно выполняется для многих реакций. Интегрирование по T дает уравнение

$$\ln k = \ln A - E_a/RT, \quad (1.17)$$

где $\ln A$ — константа интегрирования. Эта форма уравнения Аррениуса особенно удобна для графического представления результатов, поскольку зависимость $\ln k$ от $1/T$ является прямой с наклоном, равным $-E_a/R$. На практике удобнее строить зависимость $\lg k$ от $1/T$, в этом случае наклон равен $-E_a/2,303R$. Этот график, представленный на рис.1.2, известен как график

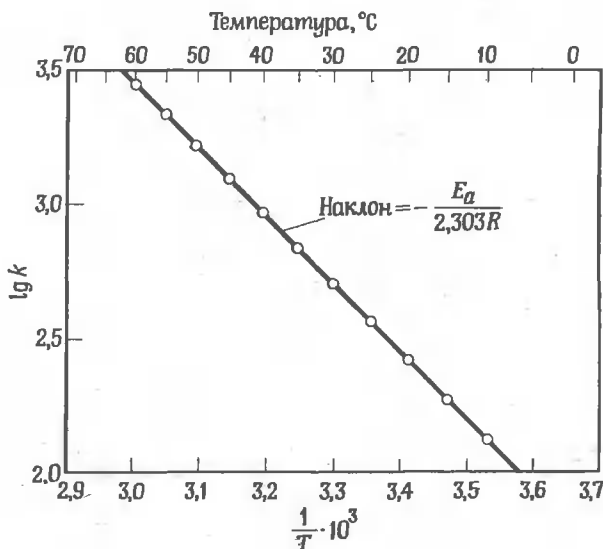


Рис. 1.2. График Аррениуса.

Аррениуса, он позволяет очень просто определить величину E_a .

Чтобы понять физический смысл энергии активации, перепишем уравнение (1.17) следующим образом:

$$k = A \exp(-E_a/RT).$$

Экспоненциальный член $\exp(-E_a/RT)$ часто называют множителем Больцмана, поскольку, согласно предложенной Больцманом теории распределения молекул по энергиям, число молекул в смеси, имеющих энергию выше чем E_a , пропорционально величине $\exp(-E_a/RT)$. Следовательно, уравнение Аррениуса можно интерпретировать следующим образом: молекулы способны принимать участие в реакции только в том случае, когда их энергия превышает некоторую пороговую величину — энергию активации. Если придерживаться такой интерпретации, то константа A (по крайней мере для бимолекулярных реакций) должна быть равна частоте столкновений молекул Z . Для некоторых простых реакций в газовой фазе, например для распада иодистого водорода,

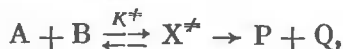
коэффициент A действительно равен Z , однако в общем случае необходимо ввести дополнительный множитель P :

$$k = PZ \exp(-E_a/RT)$$

и допустить, что для протекания химической реакции сталкивающиеся молекулы должны не только обладать достаточно высокой энергией, но и быть соответствующим образом ориентированы относительно друг друга. В таком случае множитель P приобретает смысл вероятности того, что молекулы случайно окажутся правильно ориентированы. Сейчас можно сказать, что вышеприведенное уравнение удовлетворительно согласуется с современными теориями скоростей реакций, однако для большинства задач полезно подойти к анализу этой проблемы с другой стороны, а именно с позиций теории переходного состояния.

1.7. Теория переходного состояния

Теория переходного состояния возникла в основном из работы Эйринга [53] и получила свое название потому, что она пытается связать скорости химических реакций с термодинамическими свойствами определенного состояния реагирующих молекул, обладающего высокой энергией и называемого *переходным состоянием* или *активированным комплексом*. Когда реагирующая система «движется» вдоль воображаемой «координаты реакции», она проходит непрерывный спектр энергетических состояний, как это показано на рис.1.3, проходя на некотором этапе состояние с максимальной энергией. Это состояние с максимальной энергией представляет собой переходное состояние, и его следует отличать от промежуточного, являющегося метастабильным состоянием с минимальной энергией (речь идет не о минимуме в обычном смысле слова, а о минимуме в математическом смысле). Таким образом, реакция может быть представлена следующим образом:



где X^\ddagger — переходное состояние. Предполагается, что концентрация X^\ddagger определяется законами термодинамики, поэтому $[X^\ddagger] = K^\ddagger[A][B]$, причем для константы K^\ddagger справедливо следующее термодинамическое соотношение:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger,$$

где ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger — соответственно свободная энергия, энтальпия и энтропия образования переходного состояния из реагентов. Таким образом, концентрация X^\ddagger задается следующим

выражением:

$$[X^\ddagger] = [A][B] \exp(\Delta S^\ddagger/R) \exp(-\Delta H^\ddagger/RT).$$

Это уравнение в том виде, как оно написано, как и любое истинное термодинамическое уравнение, не учитывает временного протекания процесса. Чтобы ввести фактор времени, мы должны использовать принципы квантовой механики, обсуждение которых

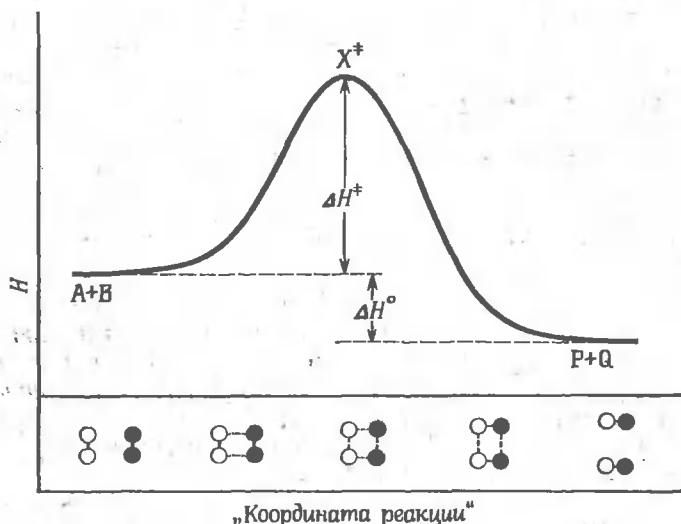


Рис. 1.3. «Профиль реакции» в соответствии с теорией переходного состояния. Схематические изображения вдоль оси абсцисс показывают смысл «координаты реакции» для простой бимолекулярной реакции.

выходит за рамки настоящей книги (см., например, [101]). Исходя из постулатов квантовой механики, можно показать, что константа скорости распада X^\ddagger равна RT/Nh , где R — газовая постоянная, N — число Авогадро и h — постоянная Планка. (Численное значение величины RT/Nh составляет приблизительно $6,25 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ при 300 К.) Следовательно, константа скорости реакции второго порядка для полной реакции равна

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp(\Delta S^\ddagger/R) \exp(-\Delta H^\ddagger/RT). \quad (1.18)$$

Логарифмируя и дифференцируя выражение, получаем

$$\frac{d \ln k}{dT} = (\Delta H^\ddagger + RT)/RT^2.$$

Сопоставляя это уравнение с уравнением Аррениуса (1.16), мы видим, что энергия активации E_a равна не ΔH^\ddagger , а $(\Delta H^\ddagger + RT)$. Кроме того, строго говоря, E_a не является величиной, не зависящей от температуры, и поэтому график Аррениуса должен обнаруживать искривление. Насколько сильно будут проявляться столь явные аномалии? Оказывается, что ожидаемое искривление так мало, что обычно его трудно обнаружить. Действительно, при описании температурной зависимости k уравнением (1.18) вклад члена $\frac{RT}{Nh}$ оказывается незначительным по сравнению с вкладом, вносимым экспоненциальным членом. В то же время разность RT между E_a и ΔH^\ddagger составляет около $2,6 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ при обычных температурах, и ею нельзя пренебречь.

Так как оба параметра уравнения Аррениуса, A и E_a , можно легко определить из графика Аррениуса, величины ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger далее очень просто рассчитать из соотношений

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \approx E_a - 2490 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1},$$

$$\Delta S^\ddagger = R \ln(Ah/RT) - R \approx 19,1 \lg A + 253 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1},$$

в которых числовые значения рассчитаны при допущении, что $T = 300 \text{ К}$ и величина A измерена в с^{-1} . Для значений T в интервале от 273 до 343 К (т.е. $0 - 70^\circ\text{C}$, максимально возможный интервал температур, пригодный для проведения исследований по ферментативной кинетике) изменение величины $\ln T$, как правило, пренебрежимо мало по сравнению с ошибкой измерения величин E_a и A . На самом деле эту ошибку можно устранить совсем, если вместо обычного графика Аррениуса (графика зависимости $\lg k$ от $1/T$) строить график $\lg(k/T)$ от $1/T$. Из уравнения (1.18) прямо следует, что в этом случае наклон прямой равен $-\Delta H^\ddagger/2,303R$, а отсекаемый отрезок $-\lg(R/Nh) + \Delta S^\ddagger/2,303R$.

Значения энтальпии и энтропии активации для химической реакции дают ценную информацию о природе переходного состояния и, следовательно, о механизме реакции. Высокое значение энтальпии активации указывает на то, что для образования переходного состояния необходимы сильное растяжение, искажение или даже разрыв химических связей. Для многих химических реакций, которые легко протекают при комнатной температуре (включая многие ферментативные реакции), величина ΔH^\ddagger оказалась равной примерно $50 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$. Это значит, что энергетическая природа процесса активации сходна для большого круга реакций и, кроме того, объясняет данные Харкорта, согласно которому при повышении температуры на 10°C скорость реакции, как правило, удваивается.

Энтропия активации характеризует меру вероятности существования переходного состояния как такового без учета энерге-

тики процесса. Если величина ΔS^\ddagger велика и отрицательна, это означает, что для образования переходного состояния реагирующие молекулы должны принять строго определенные конформации и приблизиться одна к другой под определенным углом. Поскольку молекулы сильно различаются по конформационной стабильности (т.е. по своей жесткости) и по своей сложности, можно было ожидать, что для реакций различных классов величины ΔS^\ddagger будут существенно разными. Это действительно имеет место. Как правило, молекулы, участвующие в метаболических процессах, обладают большими размерами и достаточной гибкостью. Поэтому некаталитические реакции между ними маловероятны, т.е. значение ΔS^\ddagger обычно велико.

Уравнение (1.18) показывает, что катализатор может повышать скорость реакции, снижая либо $-\Delta S^\ddagger$, либо ΔH^\ddagger , либо обе величины. Вероятно, в ферментативном катализе важны оба эффекта, хотя в большинстве случаев однозначно ответить на вопрос о том, как изменяются энтропия и энтальпия активации, невозможно, потому что некаталитические реакции слишком медленны, чтобы для них можно было измерить $-\Delta S^\ddagger$ и ΔH^\ddagger .

Введение в ферментативную кинетику

2.1. Ранние исследования

Первые работы по измерению скоростей реакций, катализируемых ферментами, появились в конце девятнадцатого столетия; они были выполнены сразу несколькими исследователями. В то время ни один из ферментов не был доступен в чистом виде, методы определения их активности были примитивными и не вошло в практику применение буферов для контроля pH. Кроме того, обычно постановка эксперимента состояла в наблюдении за ходом реакции в течение определенного промежутка времени, а современный подход основан на измерении начальных скоростей для нескольких концентраций субстрата; результаты таких измерений обычно легче интерпретировать. Замечательно, что, несмотря на несовершенство методики, ранние исследования привели к значительным успехам.

Большинство первых исследований было посвящено изучению ферментов брожения, в особенности инвертазы¹, которая катализирует гидролиз сахарозы:



Изучив эту реакцию, О'Сулливан и Томпсон [122] сделали ряд важных открытий. Они обнаружили, что реакция сильно зависит от кислотности смеси и что в условиях, когда «кислотность находится в наиболее благоприятной пропорции», скорость пропорциональна количеству фермента. По мере расходования субстрата скорость реакции понижается; по-видимому, она пропорциональна концентрации сахарозы, хотя имеют место небольшие отклонения от теоретической кривой. При относительно низких температурах скорость реакции с участием этого фермента примерно удваивается при повышении температуры на 10°C. Однако в отличие от большинства обычных химических реакций для реакции, катализируемой инвертазой, наблюдается отчетливо выраженный температурный оптимум, и при температурах выше оптимальной скорость быстро падает до нуля. Было доказано, что инвертаза является истинным катализатором, поскольку в ходе

¹ Рекомендованное в настоящее время тривиальное название — β-фруктофуранозидаса (КФ 3.2.1.26) (см. Номенклатура ферментов, ВИНТИ, М., 1978). — *Прим. перев.*

реакции она не разрушается и не изменяется. Кроме того, препарат фермента сохранял активность после проведения каталитического гидролиза сахарозы, взятой в количестве, превышающем вес фермента в 100 000 раз. Наконец, термостабильность фермента была во много раз выше в присутствии своего субстрата, сахарозы, чем в его отсутствие. Как отмечали авторы, «в присутствии тростникового сахара инвертаза выдерживала без потери активности температуру на целых 25°C выше, чем в его отсутствие; это чрезвычайно интересный факт, и, насколько мы можем судить, его можно объяснить единственным образом: инвертаза вступает в комбинацию с сахаром». К аналогичному заключению пришел Вюртц [155], который, изучая катализируемый папаином гидролиз фибрина, наблюдал появление осадка, представляющего собой, по его мнению, соединение папаина с фибрином, выступающее в роли промежуточного соединения при гидролизе.

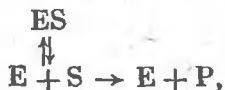
Идея фермент-субстратного комплекса приобрела чисто кинетический смысл благодаря работе Брауна [22]. Как и ряд других исследователей, Браун установил, что скорости ферментативных реакций не соответствуют скоростям реакций второго порядка. Прежде всего он показал, что скорость гидролиза сахарозы при брожении, осуществляемом живыми дрожжами, не зависит от концентрации сахарозы. Противоречию между результатами Брауна, полученными с живыми дрожжами, и результатами О'Сулливана и Томпсона для выделенного препарата инвертазы не придавали особого значения, поскольку считалось, что катализ изолированными ферментами принципиально отличается от брожения, осуществляемого живыми организмами. Однако открытие Бухнера [24], показавшего, что бесклеточный (т.е. неживой) экстракт дрожжей может катализировать спиртовое брожение, заставило Брауна [23] проверить свои более ранние результаты. Убедившись прежде всего в том, что они корректны, Браун показал, что аналогичные данные можно получить и для очищенной инвертазы. На основании этого он сделал предположение, что если имеет место механизм с образованием фермент-субстратного комплекса, то скорость реакции не может превышать некоторого предельного значения. При условии, что до своего каталитического распада комплекс существует в течение какого-то промежутка времени, скорость должна достигать максимального значения при такой концентрации субстрата, которой в соответствии с законом действующих масс достаточно, чтобы перевести весь фермент в комплекс. При меньших концентрациях субстрата существенное значение приобретает скорость образования комплекса, и поэтому скорость гидролиза будет зависеть от концентрации субстрата.

Апри [73,74] высказал критические соображения по поводу модели Брауна в связи с тем, что в этой модели время жизни фер-

мент-субстратного комплекса (т.е. время, прошедшее с момента внезапного возникновения комплекса до его распада) принимается фиксированным. Анри предложил механизм, который в принципе сходен с механизмом Брауна, но сформулирован в более четких математических и химических терминах и включает равновесие между свободным ферментом и фермент-субстратным и фермент-продуктным комплексами. Анри показал, что независимо от того, постулируем ли мы в качестве промежуточного вещества реакции один из этих комплексов или оба, схема, в которой продукты образуются путем распада фермент-субстратного комплекса,



и схема, когда свободный фермент выступает в роли вещества, обладающего активностью, в реакции второго порядка



с кинетической точки зрения равноценны. Последняя схема в настоящее время не рассматривается как реальная и применяется очень редко (например, Вайслом [145]). Однако она соответствовала идеям того времени, что катализатор действует только своим присутствием. Кроме того, исследования Анри привели к мысли о том, что одно и то же уравнение скорости можно получить, рассматривая несколько разных механизмов протекания ферментативной реакции (подобную ситуацию иногда называют гомеоморфизмом). Это обстоятельство следует учитывать при интерпретации результатов кинетических измерений.

Интересно, что Анри в своей схеме допускал образование комплекса фермент—продукт и что в полученном им уравнении уже заложена идея конкурентного ингибирования продукта:

$$v = \frac{\frac{k}{K_s} e_0 s}{1 + \frac{s}{K_s} + \frac{p}{K_p}}. \quad (2.1)$$

В этом выражении v — скорость; e_0 — общая концентрация фермента; s и p — концентрации свободного субстрата и свободного продукта соответственно; k , K_s и K_p — константы. При $p = 0$ уравнение (2.1) дает значение начальных скоростей для различных концентраций субстрата. Более общая форма уравнения скорости, использованная Анри, особенно удобна для описания полученных им экспериментальных данных, поскольку он, как и другие исследователи того времени, следил за ходом реакции в течение достаточно больших интервалов времени. Тем не менее уравнение

Анри является неполным, потому что оно не учитывает всегда имеющей место обратной реакции: это уравнение предполагает торможение прямой реакции вследствие накопления продукта, которое, однако, не препятствует полному протеканию реакции. В уравнении, учитывающем более реальную ситуацию [например, в приведенном ниже уравнении (2.18)], допускается возможность того, что реакция при равновесии не доходит до конца.

2.2. Работа Михаэлиса и Ментен

Хотя Браун и Анри пришли по существу к правильным выводам, они опирались на эксперименты, постановка которых вызвала серьезные возражения. О'Сулливан и Томпсон никак не могли получить согласующиеся результаты до тех пор, пока они не осознали, как важно учитывать концентрацию кислоты. Браун выделял фермент другим способом и пришел к выводу, что добавлять кислоту не обязательно (возможно, использованные им растворы были слабо забуферены природными соединениями, содержащимися в дрожжах), а Анри совсем не обсуждал этого вопроса. Если не считать О'Сулливана и Томпсона, то в ранних исследованиях действия инвертазы использовались условия, препятствующие протеканию мутаротации глюкозы, образующейся в реакции, хотя этот процесс, несомненно, оказывал влияние на получаемые результаты.

После введения Сёренсеном понятия концентрации водородных ионов, выражаемой в логарифмических единицах шкалы рН [134], Михаэлис и Ментен [113] пришли к выводу о необходимости проведения решающих экспериментов с инвертазой. Эти исследователи регулировали рН реакции при помощи ацетатных буферов, использовали условия, препятствующие протеканию мутаротации продукта, и измеряли *начальные скорости* реакции при различных концентрациях субстрата. В том случае, когда используются начальные скорости, обратной реакцией и другими эффектами продукта можно с полным основанием пренебречь и, следовательно, применять значительно менее сложное уравнение скорости. Несмотря на более строгую постановку эксперимента, Михаэлис и Ментен получили результаты, удовлетворительно согласующиеся с результатами Анри. Михаэлис и Ментен оценили заслуги Анри и Брауна, сформулировав следующий обобщающий механизм:



Так же как и Анри, Михаэлис и Ментен сделали допущение, что первая, обратимая стадия является достаточно быстрой и поэтому может быть охарактеризована константой равновесия $K_s = es/x$, где x — концентрация промежуточного соединения

ES; следовательно, $x = es/K_s$. Однако мгновенные концентрации свободного фермента и субстрата нельзя измерить непосредственно, и поэтому их нужно выразить через доступные измерению начальные концентрации e_0 и s_0 :

$$e_0 = e + x,$$

$$s_0 = s + x.$$

Из первого из этих соотношений следует, что x не может быть больше e_0 . Поэтому, если s_0 намного превышает e_0 , она должна быть также значительно больше, чем x . Следовательно, с хорошей точностью выполняется равенство $s = s_0$. Тогда выражение для x принимает следующий вид:

$$x = (e_0 - x) s / K_s.$$

Его можно преобразовать к виду

$$x = \frac{e_0}{(K_s/s) + 1}.$$

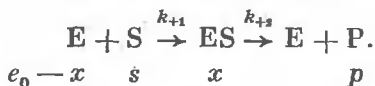
Вторая стадия реакции, $ES \rightarrow E + P$, является простой реакцией первого порядка с константой скорости k_{+2} , поэтому

$$v = k_{+2} x = \frac{k_{+2} e_0}{(K_s/s) + 1} = \frac{k_{+2} e_0 s}{K_s + s}. \quad (2.2)$$

Это уравнение в частном случае, когда $p = 0$, идентично уравнению (2.1), полученному Анри.

Михаэлис и Ментен показали, что предложенная теория и уравнение (2.2) могут полностью объяснить результаты, полученные ими для инвертазы. Классические эксперименты Михаэлиса и Ментен послужили эталоном почти для всех последующих исследований в области ферментативной кинетики, поэтому этих ученых считают основателями современной энзимологии, а уравнение (2.2) [в современной форме уравнение (2.8), приведенное ниже] обычно называют *уравнением Михаэлиса — Ментен*.

Примерно в то же время ван Слейк и Куллен [143] получили сходные результаты с ферментом уреазой. Они предложили аналогичный механизм, существенное отличие которого состояло в том, что первая стадия считалась необратимой:



В этом случае x , конечно, нельзя выразить через константу равновесия. Вместо этого мы имеем

$$dx/dt = k_{+1}(e_0 - x)s - k_{+2}x.$$

Ван Слейк и Куллен молчаливо подразумевали, что концентрация промежуточного соединения постоянна, т. е. $dx/dt = 0$, и поэтому

$$x = \frac{k_{+1}[e_0][s]}{k_{+2} + k_{+1}[s]}.$$

Следовательно,

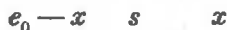
$$v = k_{+2}x = \frac{k_{+1}k_{+2}e_0s}{k_{+2} + k_{+1}s} = \frac{k_{+2}e_0s}{(k_{+2}/k_{+1}) + s}. \quad (2.3)$$

Это уравнение по форме совпадает с уравнением (2.2), и различить их экспериментально не представляется возможным.

Примерно в то время, когда были достигнуты первые успехи в понимании природы ферментативного катализа, к сходным результатам пришел Лэнгмюр [102, 103], изучая адсорбцию газов твердыми телами. Подход Лэнгмюра был значительно более общим, однако случай, который он назвал «простая адсорбция», очень близок к схеме связывания, предложенной Анри, с одной стороны, и Михаэлисом и Ментен — с другой. Лэнгмюр пришел к убеждению о существовании сходства между твердыми поверхностями и ферментами, хотя, по его представлениям, активной является вся поверхность фермента, а не какие-то отдельные области или *активные центры*. Хитчкок [76] обратил внимание на сходство уравнений, описывающих связывание лигандов твердыми поверхностями и белками. Развитие этих представлений получило логическое завершение в работе Лайнуивера и Бэрка [106], распространивших идеи Хитчкока на область катализа.

2.3. Принцип стационарности

Как в схеме Михаэлиса и Ментен, рассматривающих первую стадию ферментативного катализа как равновесный процесс, так и в схеме ван Слейка и Куллена, считавших эту стадию необратимой, делаются малообоснованные и излишние допущения о константах скорости. Как мы видели, обе схемы приводят к одинаковым уравнениям скорости. Бриггс и Холдейн [18] проанализировали обобщенный механизм, который включает оба частных случая:



Здесь

$$dx/dt = k_{+1}(e_0 - x)s - k_{-1}x - k_{+2}x. \quad (2.4)$$

Если допустить, что достигается стационарное состояние, в котором концентрация промежуточного соединения постоянна, т.е. $dx/dt = 0$, то

$$k_{+1} e_0 s = (k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2}) x. \quad (2.5)$$

Следовательно,

$$x = \frac{k_{+1} e_0 s}{k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2}}, \quad (2.6)$$

и поэтому

$$v = k_{+2} x = \frac{k_{+1} k_{+2} e_0 s}{k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2}} = \frac{k_{+2} e_0 s}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + s}. \quad (2.7)$$

Это уравнение можно переписать в более общей форме

$$v = Vs / (K_M + s), \quad (2.8)$$

где константа K_M , называемая *константой Михаэлиса*, определяется отношением констант $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$, а величина V , называемая *максимальной скоростью*, — произведением $k_{+2}e_0$. Уравнение (2.8) является фундаментальным уравнением ферментативной кинетики и обычно называется *уравнением Михаэлиса—Ментен*. Это уравнение выполняется для многих механизмов, более сложных, чем механизм Михаэлиса—Ментен, однако в этих случаях выражения для K_M и V имеют более сложный вид. Поэтому на самом деле нельзя считать, что K_M всегда определяется просто как $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$, а V — как $k_{+2}e_0$. Величина V не является фундаментальной характеристикой фермента, поскольку она зависит от его концентрации. Если концентрация фермента известна, то целесообразно ввести величину $k_{кат}$ — *каталитическую константу* (или *число оборотов*), определяемую выражением V/e_0 . Для механизма Михаэлиса — Ментен $k_{кат}$ идентична константе k_{+2} , однако в общем случае лучше пользоваться менее определенным обозначением, а именно $k_{кат}$.

Графически уравнение (2.8) представлено на рис. 2.1. Кривая представляет собой равнобочную гиперболу с асимптотами $s = -K_M$ и $v = V$. При достаточно малых s величина v прямо пропорциональна s :

$$v \approx Vs/K_M,$$

и поэтому реакция имеет, очевидно, первый порядок по отношению к s . Необходимо ясно представлять смысл величины V/K_M : она является константой скорости для реакции $E + S \rightarrow E + P$ при низких концентрациях субстрата и не должна рассматриваться просто как отношение величин V и K_M . Когда $s = K_M$, скорость

является «полунасыщенной», т.е. $v = 0,5V$. При очень высоких значениях s величина v приближается к V и реакция имеет, очевидно, нулевой порядок по отношению к s ; при этих условиях фермент, как говорят, насыщен субстратом. В действительности величина v приближается к V очень медленно, и, даже когда $s = 10K_M$, величина v составляет только $0,91V$. По этой причине

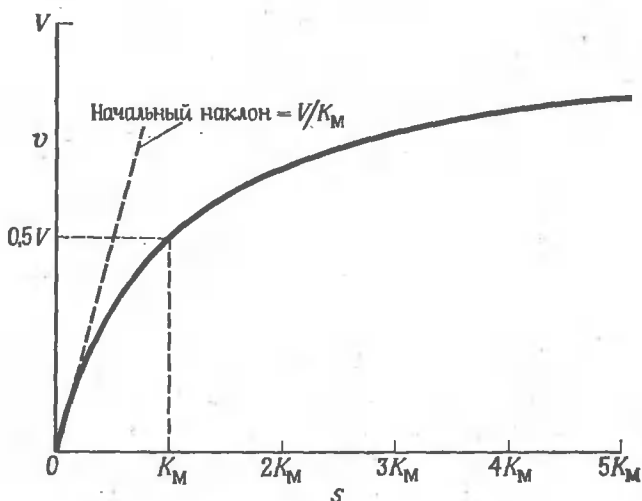


Рис. 2.1. График зависимости начальной скорости v от концентрации субстрата s для реакции, подчиняющейся уравнению Михаэлиса — Ментен. (Михаэлис и Ментен этот график не использовали и предложений применять его не давали.)

значение V часто нельзя прямо измерить, его приходится рассчитывать из скоростей, наблюдаемых при значениях s ниже насыщающих. Определить точно асимптоты равнобочной гиперболы почти невозможно из-за того, что их стремятся провести слишком близко к кривой. Эту трудность можно обойти, если изображать результаты графически иным способом. Эти графические методы обсуждаются в разд. 2.5.

С практической точки зрения было бы очень заманчиво допустить, что константа K_M является мерой истинной константы связывания K_s , т.е. что константа k_{+2} пренебрежимо мала по сравнению с k_{-1} . Однако в отсутствие доказательств, полученных каким-либо иным способом, это допущение нужно принимать с большой осторожностью. Значения индивидуальных констант k_{-1} и k_{+2} определены лишь для небольшого числа ферментов. (Эти данные суммированы в обзоре Эйгена и Хэммеса [49]), и как раз для пероксидазы хрена (первого фермента, для которого были изме-

рены индивидуальные константы скорости) оказалось, что $k_{+2} \gg k_{-1}$ [28]. Этот результат гораздо лучше согласуется с допущениями ван Слейка и Куллена, чем с допущениями Михаэлиса и Ментен. Особенно важно то обстоятельство, что существует много механизмов, более сложных, чем механизм, предложенный Бриггсом и Холдейном, приводящих к уравнению стационарной скорости, которое совпадает по виду с уравнением (2.8). В подобных случаях константа K_M определяется более сложными выражениями, и нет никаких оснований считать, что эти выражения в реальных условиях всегда будут упрощаться до K_s . Фактически K_M нельзя считать даже верхним пределом величины K_s [41]; это было бы справедливо в том случае, если бы подход Бриггса — Холдейна был более общим.

После всех этих рассуждений у читателя может возникнуть вполне законный вопрос: какой смысл измерять K_M , если ее нельзя использовать как характеристику прочности связывания субстрата? В действительности же измерять K_M целесообразно по целому ряду причин. Во-первых, обычно при анализе какого-либо сложного механизма стремятся выразить сложные кинетические эффекты через простые величины, для этого исследуют изменение основных кинетических параметров (K_M , V и V/K_M) с изменением условий эксперимента. Во-вторых, K_M полезна как параметр, обладающий предсказательной силой и позволяющий корректно поставить опыт по определению активности ферментов. При постановке таких опытов желательно, чтобы измеряемая скорость зависела только от концентрации фермента и была нечувствительна к небольшим отклонениям в концентрациях субстратов. В идеальном случае каждый субстрат поэтому должен испытываться в насыщающей (т.е. бесконечно большой) концентрации, однако на практике, чтобы скорость была нечувствительной к ошибкам в концентрации субстрата, достаточна концентрация, соответствующая $10 K_M$. Наконец, если K_M рассматривается в совокупности с данными по измерению констант связывания для аналогов субстрата, выступающих в роли ингибитора (эти константы часто являются истинными термодинамическими величинами; см. разд. 3.7 и 4.2), она в некоторых случаях *может* интерпретироваться (конечно, с известной осторожностью) как мера K_s . Например, все три стереоизомера субстрата пепсина, ацетил-L-фенилаланил-L-фенилаланина, характеризуются константами конкурентного ингибирования (K_i), сходными по величине с K_M для этого субстрата [92], и в этом случае было бы неразумно настаивать на том, что K_M не является характеристикой K_s . Конечно, полученный результат нельзя рассматривать как доказательство того, что $k_{+2} \ll k_{-1}$; он скорее означает, что неверно обратное соотношение, $k_{+2} \gg k_{-1}$. K_M , по-видимому, равна K_s также в тех случаях, когда она остается неизменной при

варьировании pH или концентрации эффектора, приводящем к изменениям величины V (этот вопрос рассмотрен в разд. 6.4).

2.4. Справедливость допущения о стационарном протекании реакции

Принцип стационарности был введен Боденштейном [14] для объяснения наблюдаемых скоростей фотохимических реакций определенного типа. Как мы видели, ван Слейк и Куллен [143] при выводе уравнений скорости ферментативной реакции считали само собой разумеющимся соблюдение стационарности, а Бриггс и Холдейн применяли этот принцип в явной форме. Ни один из этих авторов не получил строгого подтверждения выполнимости условия стационарности, и, к сожалению, появилась тенденция рассматривать принцип стационарности как самоочевидный или по крайней мере как всегда выполняющийся. В действительности этот принцип *не* выполняется в строгом смысле для некоторых некаталитических реакций типа



где на первый взгляд стационарность, как и в случае схемы Бриггса—Холдейна, как раз должна иметь место. Допущение о стационарном протекании реакции стало главным допущением, лежащим в основе методов вывода большинства уравнений скорости, используемых в энзимологической химии, поэтому важно ясно понимать, что по крайней мере в случае механизма Михаэлиса—Ментен к нему довольно просто прийти.

Если не вводить допущения стационарности, то дифференциальное уравнение [уравнение (2.4)] нельзя решить, принимая $dx/dt = 0$. Вместо этого необходимо провести интегрирование:

$$\int \frac{dx}{k_{+1}e_0s - (k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})x} = \int dt.$$

Отсюда

$$\frac{\ln [k_{+1}e_0s - (k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})x]}{-(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})} = t + \alpha.$$

В момент начала реакции промежуточное соединение отсутствует, т.е. $x = 0$ при $t = 0$, и, следовательно,

$$\alpha = \frac{\ln [k_{+1}e_0s]}{-(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})},$$

что дает

$$\ln \frac{k_{+1}e_0s - (k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})x}{k_{+1}e_0s} = -(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})t.$$

Преобразуя выражение, получаем

$$1 - \frac{(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})x}{k_{+1}e_0s} = \exp[-(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})t].$$

Следовательно,

$$x = \frac{k_{+1}e_0s \{1 - \exp[-(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})t]\}}{k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}}$$

и

$$v = \frac{Vs \{1 - \exp[-(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})t]\}}{K_M + s}, \quad (2.9)$$

где V и K_M определяются так же, как и ранее, т.е. равны $k_{+2}e_0$ и $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ соответственно. При достаточно больших значениях t , когда экспоненциальный член становится бесконечно малым, выражение (2.9) превращается в более простое уравнение стационарной скорости [уравнение (2.8)]. Значения t , при которых это происходит, зависят от величины $(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})$. Однако тот факт, что для большинства ферментативных реакций справедливо уравнение (2.8) (если не принимать во внимание начальную стадию реакции, протекающую в течение первых долей секунд после смешивания), можно рассматривать как доказательство того, что, как правило, величина $(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})$ намного больше, чем 1 с^{-1} .

Уравнение вида (2.9) было получено Лейдлером [100] как частный случай, вытекающий из более общего подхода, чем приведенный выше. Лейдлер рассмотрел ситуацию, когда реакция протекает достаточно долго и вследствие этого концентрация субстрата понижается настолько, что допущение о постоянстве s и равенстве ее s_0 (начальной величине s) перестает выполняться. Он нашел, что в этом случае система достигает стационарного состояния, в котором

$$x = \frac{k_{+1}e_0(s_0 - p)}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}(s_0 - p)} \quad (2.10)$$

и, следовательно,

$$v = \frac{k_{+1}k_{+2}e_0(s_0 - p)}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}(s_0 - p)} = \frac{V(s_0 - p)}{K_M + s_0 - p} \quad (2.11)$$

Уравнения (2.10) и (2.11) идентичны уравнениям (2.6) и (2.8), за исключением того, что величина s в последних уравнениях заменена на $(s_0 - p)$. На первый взгляд может показаться, что нелогично говорить о стационарном состоянии, в котором x выражено через зависимость от времени величину p . Этот парадокс легко разрешить, если принять во внимание тот факт, что зависимость x от времени, описываемая уравнением (2.10), дает менее

значительные изменения этой величины, чем в переходной фазе, т.е. за время достижения стационарного состояния. Исходная точка зрения Бриггса и Холдейна мало изменится, если заменить допущение $dx/dt = 0$ тем, что dx/dt очень мала: уравнение (2.5) перестает строго выполняться и становится просто хорошим приближением.

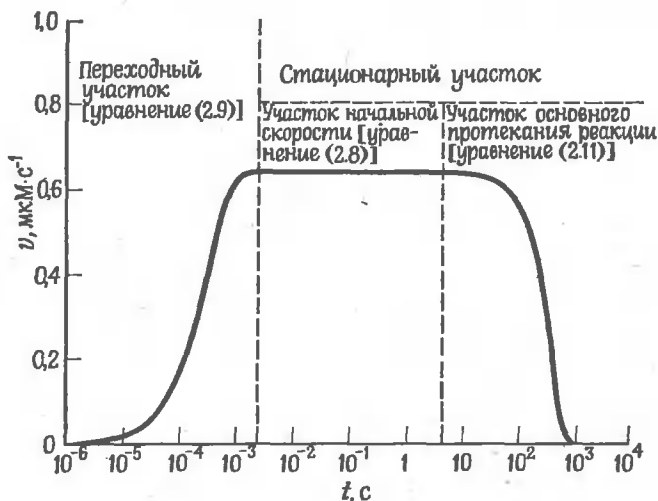


Рис. 2.2. Временной ход реакции, подчиняющейся механизму Михаэлиса—Ментен, при следующих значениях параметров: $k_{+1} = 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; $k_{-1} = 1000 \text{ с}^{-1}$; $k_{+2} = 100 \text{ с}^{-1}$; $k_{-2} = 0$; $s_0 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ и $e_0 = 10^{-8} \text{ М}$.

Резюмируя все изложенное выше, можно сказать, что кинетическая кривая ферментативной реакции обычно состоит из трех участков, четко разграниченных по времени, как это показано на рис. 2.2. Первый, переходный участок описывается уравнениями, сходными с уравнением (2.9); более детально он рассмотрен в гл. 9. Второй участок (участок начальной скорости) является единственным, для которого скорость процесса действительно постоянна. После опубликования работы Михаэлиса и Ментен большая часть исследований была посвящена изучению именно этого участка кинетической кривой. Наибольшее внимание уделено ему и в настоящей книге. Для описания конечного участка, где концентрации субстрата и продукта существенно изменяются и скорость процесса снижается до нуля, требуются уравнения, сходные с уравнением (2.11); обычно они применяются в интегральной форме. Этот участок рассмотрен в гл. 8.

До сих пор при выводе уравнений скорости мы полагали, что $s_0 \gg e_0$ (подобная ситуация обычно имеет место на практике при

исследовании стационарных участков кинетических кривых). Лейдлер [100] рассмотрел вопрос о том, к чему приведет допущение о стационарном протекании реакции при менее жестких ограничениях. Он пришел к выводу, что при выполнении по крайней мере одного из следующих допущений:

$$(1) s_0 \gg e_0; \quad (2) e_0 \gg s_0; \quad (3) (k_{-1} + k_{+2}) \gg k_{+1} e_0;$$

$$(4) (k_{-1} + k_{+2}) \gg k_{+1} s_0$$

уравнение скорости принимает вид, несколько отличный от уравнения (2.11):

$$v = \frac{V(s_0 - p)}{K_M + e_0 + s_0 - p}.$$

Поскольку экспериментатор, как правило, имеет большую свободу в выборе значений e_0 и s_0 , добиться выполнения хотя бы одного из этих условий не составляет труда.

В заключение отметим, что при обсуждении принципа стационарности мы не касались эффекта ингибирования продуктом реакции, которое может иметь место. Это явление рассматривается в разд. 2.7.

2.5. Графическое представление уравнения Михаэлиса — Ментен

Результаты измерений начальных скоростей при различных концентрациях субстрата удобнее всего представлять графически, с тем чтобы можно было оценить значения кинетических параметров и точность эксперимента. Самый простой способ графического представления данных, описываемых уравнением (2.8), состоит в построении графика зависимости v от s ; в результате получается равнобочная гипербола (рис.2.1) с асимптотой $v = V$ для ординаты v и с асимптотой $s = -K_M$ для абсциссы s . Однако для практических целей этот график оказывается наименее пригодным; обусловлено это тем, что, во-первых, довольно трудно точно построить равнобочные гиперболы; во-вторых, определенные трудности возникают и при построении асимптот: всегда хочется провести их как можно ближе к кривой; в-третьих, трудно проводить сопоставление гипербол между собой и, в-четвертых, очень трудно обнаружить отклонения от ожидаемой кривой, если они существуют. Михаэлис и Ментен [113], отдавая себе отчет во всех этих трудностях, строили график в координатах $(v; \lg s)$. Этот график, как видно из рис. 2.3, представляет собой симметричную S-образную кривую, которая имеет максимальный наклон при $s = K_M$. Дифференцирование уравнения (2.8) показывает, что

$$\frac{dv}{d \ln s} = \frac{K_M V s}{(K_M + s)^2},$$

или

$$\frac{dv}{d \lg s} = \frac{2,303 K_M V s}{(K_M + s)^2}$$

Максимальный наклон имеет место при $s = K_M$; он равен $2,303V/4$, т.е. $0,576V$. Следовательно, V можно рассчитать, разделив значение максимального наклона на $0,576$.

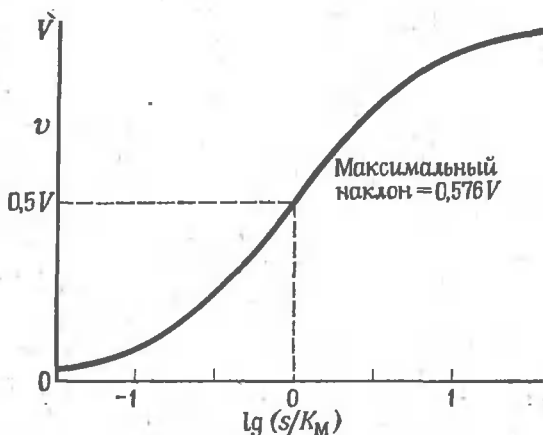


Рис. 2.3. Определение параметров V и K_M методом Михаэлиса и Ментен. Для достаточно большого интервала значений скорости зависимость v от $\lg(s/K_M)$ является почти линейной, что позволяет без труда найти максимальный наклон.

Михаэлис и Ментен определяли затем константу K_M как значение s , при котором скорость составляет половину V . Подобный способ расчета дает более точное значение K_M , чем оценка, основанная на нахождении точки максимального наклона кривой. В настоящее время этот график обычно не применяется, однако он представляет интерес по ряду соображений. Во-первых, он подчеркивает взаимосвязь между насыщением белка субстратом и ионизацией кислоты (последняя представляется кривой титрования — зависимостью степени ионизации от pH); во-вторых, этот график удобен для представления в более общей форме данных по насыщению белков, имеющих несколько связывающих центров; в-третьих, он характеризуется меньшим разбросом данных, чем линейные графики (которые будут рассмотрены далее), хотя результатом наблюдений в середине интервала концентраций субстрата придается большее значение при расчете параметров, чем на его краях; наконец, этот график представляет исторический интерес.

После опубликования работы Лайнуивера и Бэрка [106] большинство исследователей стали использовать уравнение Михаэлиса—Ментен в форме, позволяющей представлять результаты в виде прямой. Линеаризацию можно проводить тремя способами:

$$\frac{s}{v} = \frac{K_M}{V} + \frac{s}{V}, \quad (2.12)$$

$$v = V - \frac{K_M v}{s}, \quad (2.13)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_M}{Vs}. \quad (2.14)$$

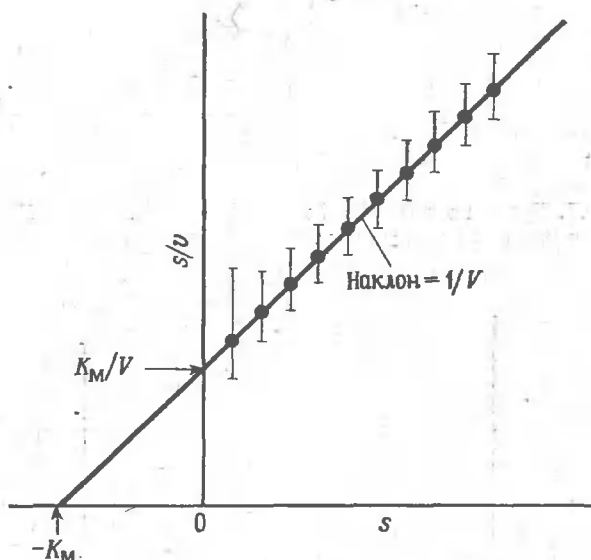


Рис. 2.4. График зависимости s/v от s .

Вертикальные отрезки соответствуют ошибке измерения v , составляющей $\pm 0,05V$.

В первом случае зависимость s/v от s графически изображается прямой с наклоном $1/V$ и отсекает на осях s/v и s отрезки K_M/V и $-K_M$ соответственно. Аналогичным образом, откладывая v от v/s и $1/v$ от $1/s$, строят линейные графики зависимостей (2.13) и (2.14). Все три графика изображены на рис. 2.4—2.6.

Уравнение, совпадающее по форме с уравнением (2.12), было предложено Лэнгмюром [103], когда он изучал адсорбцию газов на твердых поверхностях, и было введено в ферментативную кинетику Хейнсом [70]. Этот автор использовал уравнение для

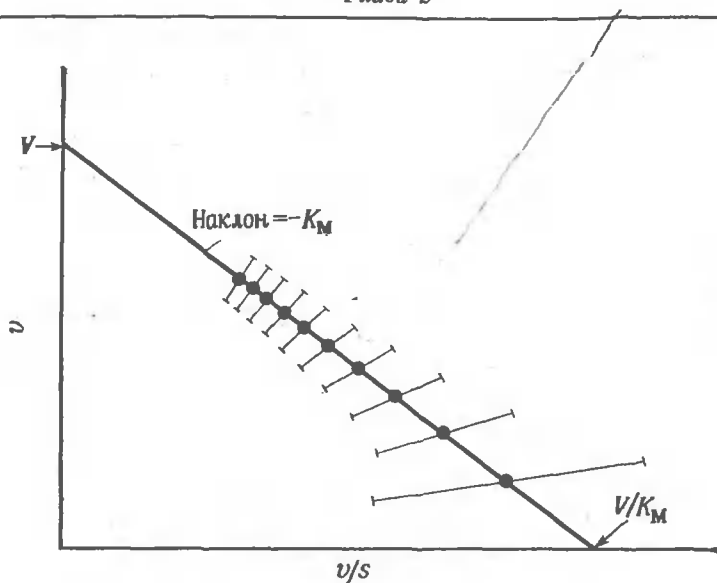


Рис. 2.5. График зависимости v от v/s (график Эди—Хофсти). Длина отрезков соответствует ошибке измерения v , составляющей $\pm 0,05V$.

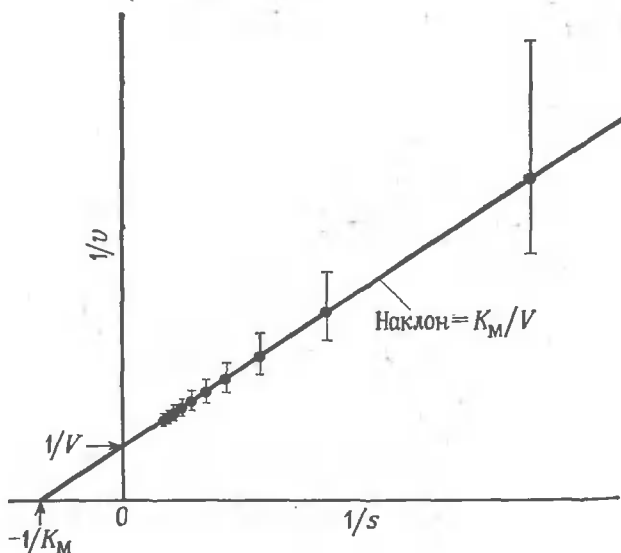


Рис. 2.6. График зависимости $1/v$ от $1/s$ (график Лайнуивера—Бэрка, или график двойных обратных координат).

Вертикальные отрезки соответствуют ошибке измерения v , составляющей $\pm 0,05V$.

анализа своих результатов, которые, однако, не были представлены графически. Две другие линейные анаморфозы и все три графика были введены Вульфом [453]. Широкую известность они получили лишь после Лайнуивера и Бэрка [106], а также Эди [47] и Хофсти [77]. Наиболее часто применяется график двойных обратных координат $\{1/v; 1/s\}$, обычно называемый графиком Лайнуивера—Бэрка. Однако, поскольку он является также и наименее точным, от его использования следует воздержаться.

До 1961 г. обсуждение относительных достоинств трех линейных графиков касалось в основном вопросов о том, насколько они удобны и как четко выявляют отклонения от уравнения Михаэлиса—Ментен. Пока обсуждение ограничивалось рассмотрением только этих вопросов, никаких серьезных доводов, позволяющих отдать предпочтение какому-либо линейному графику, фактически не существовало. Это положение убедительно подтверждается результатами обобщений, проведенных Диксоном и Уэббом (см. [78]). Совсем недавно Уилкинсон [149], с одной стороны, и Иоханес и Ламри [86], с другой, поставили вопрос о статистическом разбросе данных для всех линейных анаморфоз уравнения Михаэлиса—Ментен¹. Полученные этими авторами результаты и соответствующие выводы детально рассмотрены в гл.10, однако некоторые важные моменты стоит отметить здесь. Для определения параметров, строго говоря, вообще нецелесообразно использовать графики (линейные или любые другие). Для этой цели следует применять ЭВМ (см. гл. 10), а один из линейных графиков можно представлять далее только для иллюстраций. Иногда высказывается точка зрения, что, поскольку неудовлетворительными являются все три графика, имеет смысл использовать наиболее привычный из них — график двойных обратных координат. Однако это предложение противоречит принципу, гласящему, что задача правосудия состоит не только в том, чтобы добиться справедливости, но и в том, чтобы показать, каким путем оно этого добилось. Если результаты эксперимента представить в двойных обратных координатах и здесь же показать линию, полученную путем независимых (не дающих, очевидно, разброса) вычислений, то эта расчетная линия из-за больших отклонений ряда точек в области малых концентраций субстрата покажется проведенной некорректно. Аналогичная ситуация возникает и при использовании двух других линейных графиков, однако в этих случаях данному вопросу не придают особого значения.

¹ Еще Хейнс [70] в своей первой работе, где он использовал линейную анаморфозу уравнения Михаэлиса — Ментен, указывал на возможность статистического разброса. Однако он не придал этому особого значения, что вполне оправданно при использовании уравнения (2.12), для которого разброс незначителен. К сожалению, при переходе к уравнению (2.14) и соответствующему ему графику двойных обратных величин ситуация меняется.

Представление данных в координатах $\{v; v/s\}$ имеет тот недостаток, что v , обычно рассматриваемая как зависимая переменная, входит как в величину, откладываемую по оси ординат, так и в величину, откладываемую по оси абсцисс. В то же время график зависимости s/v от s свободен от этого недостатка и является поэтому самым удовлетворительным из всех трех линейных графиков.

Эйзенталь и Корниш-Боуден [50] предложили недавно принципиально иной метод графического представления результатов исследования кинетики ферментативных реакций; их график был назван ими *прямым линейным графиком*. Вместо обычной формы записи уравнения Михаэлиса—Ментен в виде зависимости v от s авторы используют преобразованную форму — зависимость V от K_M :

$$V = v + \frac{v}{s} K_M. \quad (2.15)$$

Таким образом, для любой пары значений s и v можно построить зависимость V от K_M ; зависимость представляет собой прямую с наклоном, равным v/s , и отрезками, отсекаемыми на осях K_M и V , соответственно — s и v . Эта прямая связывает все

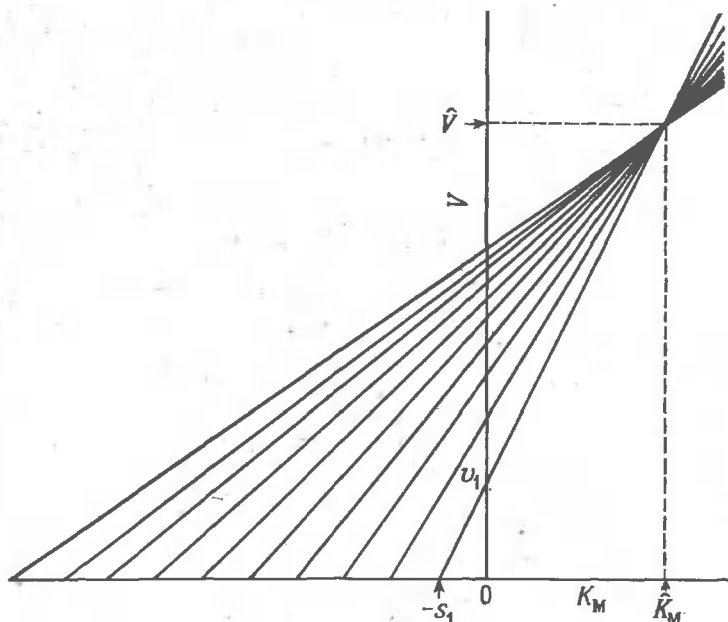


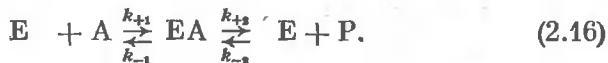
Рис. 2.7. Прямой линейный график (график зависимости V от K_M).

Каждая прямая соответствует одному наблюдению и проведена таким образом, что отрезок, отсекаемый ею на оси абсцисс, составляет $-s$, а на оси ординат — v . Координаты точки пересечения дают значения \hat{K}_M и \hat{V} , позволяющие наилучшим образом описать экспериментальные данные.

значения V и K_M , которые точно удовлетворяют выбранной паре значений s и v . Если подобным образом провести прямые для нескольких пар значений s и v , то эти прямые пересекутся в одной точке, координаты которой дадут единственные значения V и K_M , удовлетворяющие всем парам значений s и v (рис. 2.7). В реальном эксперименте положение точки пересечения определяется менее точно, чем в идеальном случае, представленном на рис. 2.7, из-за экспериментальной ошибки. Однако не представляет особого труда найти оптимальную точку пересечения, где прямые располагаются наиболее плотно. Подобным методом очень просто выявить ошибочные данные, поскольку соответствующие прямые будут выпадать из основной совокупности прямых. Самое очевидное преимущество прямого линейного графика по сравнению с другими линейными графиками состоит в том, что для его построения не требуется никаких расчетов, даже расчетов по определению обратных значений. Этот график обладает также определенными достоинствами с точки зрения статистической обработки результатов, что будет обсуждено в разд. 10.9.

2.6. Механизм Михаэлиса — Ментен для обратимой ферментативной реакции

Все реакции, в том числе и многие реакции, имеющие большое значение для биохимии, в принципе являются обратимыми в том смысле, что в равновесных условиях ни концентрации субстратов, ни концентрации продуктов нельзя считать пренебрежимо малыми. Ясно поэтому, что механизм Михаэлиса—Ментен в том виде, в котором он приведен выше, является неполным: для этого необходимо ввести стадию, соответствующую обратной реакции.



(Рассматривая реакции, протекающие с участием более чем одного субстрата, нецелесообразно применять символ S для обозначения какого-либо отдельного субстрата; лучше сохранить его для обозначения субстратов как таковых. В общем случае субстраты прямой реакции мы обозначаем буквами A, B, \dots , а обратной — буквами P, Q, \dots .) Условие стационарного протекания процесса выражается теперь следующим образом:

$$dx/dt = k_{+1}(e_0 - x)a + k_{-2}(e_0 - x)p - (k_{-1} + k_{+2})x = 0.$$

Преобразуя это выражение, получаем

$$x = \frac{k_{+1} e_0 a + k_{-2} e_0 p}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1} a + k_{-2} p}.$$

Суммарная скорость образования Р представляет собой разность между скоростями прямой и обратной реакции

$$v = k_{+2} x - k_{-2} (e_0 - x) p.$$

Подставляя в это уравнение выражение для x , получаем

$$v = \frac{k_{+1} k_{+2} e_0 a - k_{-1} k_{-2} e_0 p}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1} a + k_{-2} p}. \quad (2.17)$$

В частном случае при $p = 0$ мы приходим к полученному выше уравнению (2.7) (хотя величина a должна быть заменена на a_0 , поскольку строго скорость можно считать начальной только в начальный момент времени). В то же время в частном случае при $a = 0$ получаем соответствующее выражение для начальной скорости обратной реакции

$$v = \frac{-k_{-1} k_{-2} e_0 p_0}{k_{-1} + k_{+2} + k_{-2} p_0}.$$

Как и выражение для скорости прямой реакции, это уравнение совпадает по форме с уравнением Михаэлиса — Ментен [уравнение (2.8)], и поэтому мы можем ввести следующие обозначения для максимальной скорости и константы Михаэлиса обратной реакции:

$$V_r = k_{-2} e_0,$$

$$K_M^P = (k_{-1} + k_{+2})/k_{-2}.$$

Аналогичным образом вводятся обозначения для V и K_M в случае прямой реакции:

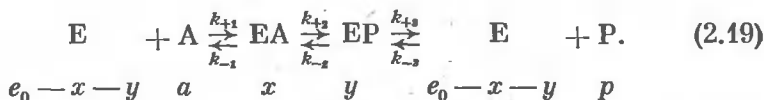
$$V_f = k_{+2} e_0,$$

$$K_M^A = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}.$$

Используя эти четыре обозначения, можно переписать уравнение (2.17) в виде

$$v = \frac{\frac{V_f a}{K_M^A} - \frac{V_r p}{K_M^P}}{1 + \frac{a}{K_M^A} + \frac{p}{K_M^P}}. \quad (2.18)$$

Это уравнение представляет собой уравнение Михаэлиса — Ментен в общем виде, справедливое для обратимой ферментативной реакции. Его преимущество по сравнению с уравнением (2.17) состоит в том, что оно не связано ни с каким конкретным механизмом и его можно рассматривать как чисто эмпирическое уравнение. Иными словами, существует много механизмов, более сложных, чем механизм (2.16), которые тем не менее описываются уравнением скорости типа (2.18). Наиболее важным среди этих механизмов является механизм обратимой ферментативной реакции, который наиболее близок к реальной ситуации, поскольку в нем стадия превращения А в Р и стадия высвобождения продукта Р из комплекса с ферментом рассматриваются как отдельные реакции:



Уравнение стационарной скорости можно получить, приравняв к нулю скорости измерения концентраций обоих промежуточных соединений:

$$dx/dt = k_{+1} a (e_0 - x - y) + k_{-2} y - (k_{-1} + k_{+2}) x = 0,$$

$$dy/dt = k_{-3} p (e_0 - x - y) + k_{+2} x - (k_{-2} + k_{+3}) y = 0$$

и решая полученную систему уравнений относительно x и y :

$$x = \frac{k_{+1} (k_{-2} + k_{+3}) e_0 a + k_{-2} k_{-3} e_0 p}{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_{+3} + k_{+2} k_{+3} + k_{+1} (k_{-2} + k_{+2} + k_{+3}) a + (k_{-1} + k_{-2} + k_{+2}) k_{-3} p},$$

$$y = \frac{k_{+1} k_{+2} e_0 a + (k_{-1} + k_{+2}) k_{-3} e_0 p}{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_{+3} + k_{+2} k_{+3} + k_{+1} (k_{-2} + k_{+2} + k_{+3}) a + (k_{-1} + k_{-2} + k_{+2}) k_{-3} p}.$$

Суммарная скорость представляет собой разность скоростей прямой и обратной реакций для любой стадии, например

$$v = k_{+2} x - k_{-2} y =$$

$$= \frac{k_{+1} k_{+2} k_{+3} e_0 a - k_{-1} k_{-2} k_{-3} e_0 p}{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_{+3} + k_{+2} k_{+3} + k_{+1} (k_{-2} + k_{+2} + k_{+3}) a + (k_{-1} + k_{-2} + k_{+2}) k_{-3} p}.$$

Это уравнение по форме совпадает с уравнением (2.18), однако параметры V и K_M для прямой и обратной реакций определяются теперь следующим образом:

$$V_f = \frac{k_{+2} k_{+3} e_0}{k_{-2} + k_{+2} + k_{+3}},$$

$$V_r = \frac{k_{-1} k_{-2} e_0}{k_{-1} + k_{-2} + k_{+2}},$$

$$K_M^A = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}{k_{+1}(k_{-2} + k_{+2} + k_{+3})}, \quad (2.20)$$

$$K_M^P = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}}{(k_{-1} + k_{-2} + k_{+2})k_{-3}}. \quad (2.21)$$

Уравнение (2.20) выглядит довольно сложно, но, если константа k_{+2} мала по сравнению с величиной $(k_{-2} + k_{+3})$, его можно упростить: $K_M^A = k_{-1}/k_{+1} = K_s^A$ (где K_s^A — истинная константа диссоциации комплекса ЕА). Аналогичным образом если k_{-2} мала по сравнению с $(k_{-1} + k_{+2})$, то $K_M^P \approx K_s^P$. Оба эти приближения могут выполняться одновременно, если справедливы неравенства $k_{+2} \ll \ll k_{+3}$ и $k_{-2} \ll k_{-1}$ или, иными словами, если стадия превращения $EA \rightleftharpoons EP$ является лимитирующей для обоих направлений реакции.

В равновесных условиях суммарная скорость реакции равна нулю, поэтому из уравнения (2.18) следует, что

$$\frac{V_f a_\infty}{K_M^A} - \frac{V_r p_\infty}{K_M^P} = 0$$

(a_∞ и p_∞ — равновесные значения величин a и p). Отсюда

$$\frac{V_f K_M^P}{V_r K_M^A} = \frac{p_\infty}{a_\infty} = K,$$

где K — константа равновесия ферментативной реакции. Это соотношение является очень важным и известно как *соотношение Холдейна* [64]. Оно выполняется не только для простого механизма Михаэлиса — Ментен, но и для любого механизма, приводящего к уравнению скорости типа (2.18). Если уравнение скорости имеет более сложный вид (например, уравнений скорости для механизмов, включающих несколько субстратов), соотношения Холдейна также выглядят сложнее, однако следует подчеркнуть, что в любом случае между кинетическими параметрами и константой равновесия должно существовать по меньшей мере одно соотношение подобного типа.

Соотношение Холдейна на самом деле является обобщением уравнения, использованного ранее фон Ойлером и Джозефсоном [52] для сопоставления кинетических параметров ферментативного гидролиза β -метилглюкозы с константой равновесия для ферментативной реакции. Однако значение этого соотношения не было должным образом оценено до тех пор, пока Бок и Альберти [13] не применили соотношение Холдейна для анализа кинетических параметров ферментативной реакции, катализируемой фумаразой¹.

¹ Рекомендованное в настоящее время тривиальное название — фумарат-гидратаза (КФ 4.2.1.2). — *Прим. перев.*

После этой работы проверка выполнимости соотношения Холдейна для получаемых результатов стала обычной процедурой, позволяющей избежать ошибок при интерпретации кинетического механизма (если, конечно, удастся наблюдать как за прямой, так и за обратной реакцией).

2.7. Ингибирование продуктом

Ингибирование продуктом представляет собой просто особый случай ингибирования, механизмы которого детально будут рассмотрены в гл. 5. Однако, учитывая то обстоятельство, что ингибирование продуктом естественно вытекает из проведенного в предыдущем разделе обсуждения, целесообразно кратко рассмотреть этот вопрос в настоящей главе. Если уравнение (2.18) выполняется, то скорость реакции должна уменьшаться по мере накопления продукта даже в том случае, когда снижение концентрации субстрата пренебрежимо мало, поскольку относительный вклад отрицательного члена в числителе существенно возрастает по мере приближения к равновесию, а также из-за роста третьего члена в знаменателе. Независимо от типа изучаемой реакции отрицательный член в числителе дает заметный вклад только в том случае, если реакция в значительной мере обратима. В то же время для многих практически необратимых реакций, например для классического случая гидролиза сахарозы, катализируемого инвертазой, ингибирование продуктом имеет существенное значение. Этот результат согласуется с простейшим механизмом (2.16) только в том случае, если необратимой является *первая*, но не вторая стадия. Подобная ситуация является маловероятной; во всяком случае, ее нельзя рассматривать как общее явление. В то же время для механизма, допускающего образование двух промежуточных соединений [схема (2.19)], ингибирование продуктом в случае необратимой реакции может иметь место лишь при условии, что необратимой является именно вторая стадия. Тогда накопление продукта приводит к «перекачиванию» фермента из свободной формы в форму ЕР. Для необратимой реакции уравнение (2.18) принимает следующий вид:

$$v = \frac{V_f a / K_M^A}{1 + \frac{a}{K_M^A} + \frac{p}{K_s^P}} = \frac{V_f a}{K_M^A (1 + p / K_s^P) + a}. \quad (2.22)$$

Когда реакция является необратимой, величину K_M^P можно с полным основанием записать как K_s^P , поскольку, если константа k_{-2} стремится к нулю, она неизбежно станет много меньше, чем $(k_{-1} + k_{+2})$ [см. уравнение (2.21)].

Очевидно, что добавляемый в систему продукт должен оказывать то же действие, что и продукт, накапливающийся в ходе реак-

ции, и, следовательно, можно было бы измерять начальные скорости в присутствии различных количеств добавленного продукта. Для каждой концентрации продукта зависимость начальной скорости от концентрации субстрата должна подчиняться уравнению Михаэлиса — Ментен со следующими значениями параметров: $V = V_f$ и $K_M = K_M^A (1 + p/K_s^P)$. Таким образом, V не зависит от p , а K_M увеличивается с p линейно. Действительно, в некоторых случаях процесс ингибирования продуктом подчиняется этим закономерностям (как это имеет место, например, для ингибирования инвертазы фруктозой). Однако известны случаи, когда подобные закономерности не выполняются (например, при ингибировании инвертазы другим продуктом, глюкозой [114]). Кроме того, ингибировать ферменты могут не только продукты реакции, но и другие соединения. Ясно, что для объяснения этих фактов необходима более полная теория; она излагается в последующих главах.

Приложение.

Гиперболический характер уравнения Михаэлиса — Ментен

Зависимость v от s , описываемая уравнением Михаэлиса — Ментен, часто изображают графически как равнобочную гиперболу. Однако подобный вид графического представления этой зависимости иногда вызывает недоумение, поскольку те гиперболы, с которыми оперирует математика, всегда имеют две ветви, в то время как график зависимости v от s имеет, очевидно, только одну ветвь. Кроме того, уравнение Михаэлиса — Ментен $v = Vs/(K_M + s)$ имеет на первый взгляд мало общего с обычным выражением для равнобочной гиперболы, асимптотами которой являются оси x и y ,

$$xy = a, \quad (2.23)$$

и уж совсем, казалось бы, не похоже на другое выражение для равнобочной гиперболы, у которой асимптоты повернуты на 45° по отношению к осям x и y ,

$$x^2 - y^2 = a^2.$$

Однако подстановки в уравнение (2.23) $x = s + K_M$, т. е. $x = s - (-K_M)$, $y = (v - V)$ и $a = -VK_M$ дают выражение

$$(s + K_M)(v - V) = -VK_M,$$

которое представляет собой то же уравнение Михаэлиса — Ментен, но в преобразованном виде. Подобно тому как для гиперболы $xy = a$ асимптотами являются оси $x = 0$ и $y = 0$, график зависимости v от s имеет асимптоты $s = -K_M$ и $v = V$ (в этом случае роль оси x выполняет ось s , а оси y — ось v). Так как вертикаль-

ная асимптота лежит в области отрицательных значений s , становится ясным, почему кривая имеет только одну ветвь: вся отрицательная ветвь и часть положительной расположены в области значений v и s , не имеющих физического смысла, и поэтому соответствующие точки не могут быть измерены. Все эти соображения иллюстрируют рис. 2.8, на котором кривая представлена в более

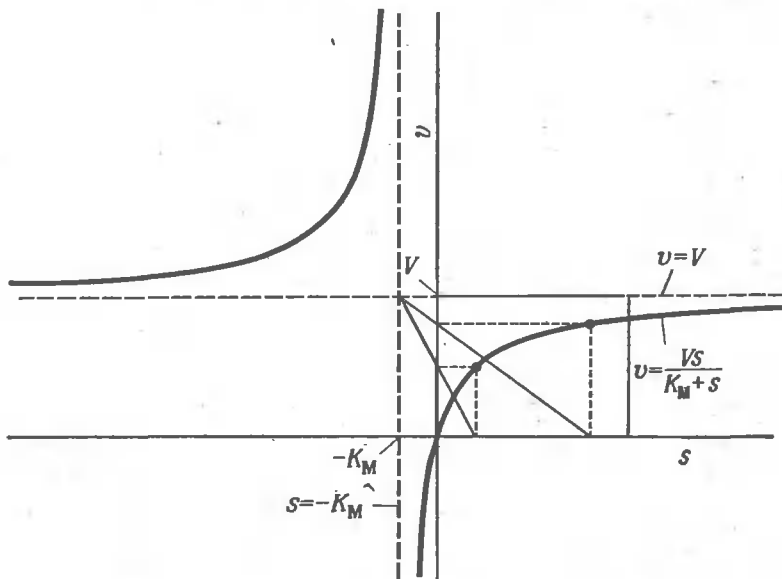


Рис. 2.8. График зависимости v от s , удовлетворяющей уравнению Михаэлиса — Ментен.

Участок кривой, соответствующий значениям s от 0 до $5K_M$, тот же, что и на рис. 2.1. Однако для того, чтобы показать положение асимптот ($s = -K_M$ и $v = V$) относительно кривой, на рис. 2.8 приведен более широкий интервал значений s , включая значения, не имеющие физического смысла.

полном виде (включая и те области, которые не измеряются экспериментально), и их следует иметь в виду на практике, поскольку обычно значения параметров K_M и V , определяющих форму целой гиперболы, находят из измерений v при значениях s , лежащих в сравнительно небольшом интервале.

Рис. 2.8 демонстрирует также свойство кривой, отмеченное де Мигуэлом Мерино [42]: любая прямая, проведенная через точку пересечения асимптот, отсекает на осях координат отрезки, длины которых соответствуют координатам точки, лежащей на кривой. Это свойство гиперболы лежит в основе прямого линейного графика, который является, однако, зеркальным отображением рис. 2.8 (относительно вертикальной оси), поскольку он строится как график зависимости V от K_M , а не v от s .

Как выводить уравнения стационарной скорости

3.1. Введение

В принципе уравнение стационарной скорости для любого механизма ферментативной реакции можно вывести так же, как и для простого механизма Михаэлиса — Ментен. Для этого нужно записать выражения для скоростей изменения концентраций всех промежуточных соединений, принять их равными нулю и решить систему полученных уравнений. Однако на практике этот метод оказывается чрезвычайно трудоемким и, за исключением самых простых механизмов, может привести к ошибочным результатам. К счастью, существует другой метод, предложенный Кингом и Альтманом [89], который основан на использовании схем и пригоден для любого механизма, представленного рядом реакций между различными формами одного и того же фермента. Этот метод неприменим к неферментативным реакциям, к реакциям, катализируемым смесью ферментов или включающим неферментативные стадии. Тем не менее он пригоден для большинства случаев, встречающихся в ферментативном катализе, и имеет большое практическое значение. Этому методу и посвящена настоящая глава.

Для того чтобы пользоваться методом Кинга — Альтмана, не обязательно понимать его теоретические основы, которые значительно сложнее практической стороны. Некоторые из читателей могут поэтому сразу перейти к изложению метода в разд. 3.3. Однако в любом случае лучше все-таки понимать сущность используемого метода, чтобы четко представлять себе границы его применимости. В этой связи в следующем разделе изложена теория метода Кинга — Альтмана.

3.2. Принцип метода Кинга — Альтмана

Рассмотрим механизм, предполагающий наличие n различных форм фермента (E_1, E_2, \dots, E_n)¹. Допустим, что для каждой пары форм переход $E_i \rightleftharpoons E_j$ из одной формы в другую является обратимым и следует кинетике первого порядка. Обозначим константу скорости для перехода $E_i \rightarrow E_j$ через k_{ij} , а константу скорости для перехода $E_j \rightarrow E_i$ — через k_{ji} и т. д. В таком случае скорость образования данной формы E_i будет равна $k_{i-1}E_{i-1} +$

¹ Речь идет о свободном ферменте и ферментсодержащих комплексах. —
Прим. ред.

$+ k_{2i}e_2 + \dots + k_{ni}e_n$, причем в эту сумму входят концентрации всех форм, за исключением концентрации самой формы E_i . Скорость исчезновения формы E_i равна $(k_{i1} + k_{i2} + \dots + k_{in})e_i$; это выражение мы будем записывать как $\sum k_{ij}e_i$. Скорость изменения e_i равна

$$\frac{de_i}{dt} = k_{i1}e_1 + k_{i2}e_2 + \dots + k_{ni}e_n + \dots - \sum k_{ij}e_i = 0.$$

Это выражение равно нулю, поскольку мы считаем, что выполняется условие стационарности. Число выражений подобного типа равно, очевидно, n (по одному для каждой из n форм), однако независимыми являются только $(n - 1)$ из них. Действительно, одно из уравнений равно сумме остальных $(n - 1)$ уравнений. Чтобы решить систему уравнений относительно n неизвестных, необходимо иметь еще одно уравнение; его можно получить исходя из условия, что сумма концентраций всех форм должна быть равна e_0 , общей концентрации фермента:

$$e_1 + e_2 + \dots + e_n = e_0. \quad (3.2)$$

Какое именно из n исходных уравнений заменяется уравнением (3.1), неважно, однако при разрешении системы относительно e_m удобно заменять m -е уравнение. В таком случае мы получаем следующую систему уравнений:

$$\begin{aligned} -\sum k_{1j}e_1 + k_{21}e_2 + \dots + k_{m1}e_m + \dots + k_{n1}e_n &= 0, \\ k_{12}e_1 - \sum k_{2j}e_2 + \dots + k_{m2}e_m + \dots + k_{n2}e_n &= 0, \\ \vdots & \\ e_1 + e_2 + \dots + e_m + \dots + e_n &= e_0, \\ \vdots & \\ k_{1n}e_1 + k_{2n}e_2 + \dots + k_{mn}e_m + \dots - \sum k_{nj}e_n &= 0. \end{aligned}$$

Эту систему уравнений можно решить, используя правило Крамера,

$$e_m = \frac{\begin{vmatrix} -\sum k_{1j} & k_{21} & \dots & 0 & \dots & k_{n1} \\ k_{12} & -\sum k_{2j} & \dots & 0 & \dots & k_{n2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & 1 & \dots & e_0 & \dots & 1 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ k_{1n} & k_{2n} & \dots & 0 & \dots & -\sum k_{nj} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} -\sum k_{1j} & k_{21} & \dots & k_{m1} & \dots & k_{n1} \\ k_{12} & -\sum k_{2j} & \dots & k_{m2} & \dots & k_{n2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & 1 & \dots & 1 & \dots & 1 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ k_{1n} & k_{2n} & \dots & k_{mn} & \dots & -\sum k_{nj} \end{vmatrix}} \quad (3.2)$$

[Предполагается, что читатель знаком с определителями и методом решения системы уравнений с помощью определителей (правило Крамера). Эти вопросы выходят за рамки настоящей книги; их изложение читатель может найти в любом учебнике алгебры.] В числителе выражения (3.2) m -й столбец состоит целиком из нулей, за исключением элемента m -й строки, равного e_0 . Элемент e_0 можно переместить в первую строку первого столбца путем m -кратной перестановки строк и m -кратной перестановки столбцов без изменения остальных элементов определителя. $2m$ — это всегда четное число, независимо от того, четным или нечетным является m , и поэтому знак определителя в результате проведенных операций остается неизменным. Поскольку первый столбец, за исключением элемента e_0 в первой строке, состоит теперь из нулей, e_0 можно вынести как множитель перед определителем. В результате мы получим определитель $(n - 1)$ -го порядка и числитель выражения (3.2) запишется следующим образом:

$$N_m = e_0 \begin{vmatrix} -\sum k_{1j} & k_{21} & \cdots & k_{n1} \\ k_{12} & -\sum k_{2j} & \cdots & k_{n2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ k_{1n} & k_{2n} & \cdots & -\sum k_{nj} \end{vmatrix}$$

Этот определитель имеет следующие свойства.

1. Он не содержит констант k_{mj} (у которых первым индексом является m), поэтому выражение, получаемое после разложения определителя, также не будет содержать этих констант.

2. Константы с одинаковым первым индексом находятся в одном и том же столбце. Поскольку каждое произведение констант в разложении определителя должно содержать по одному члену из каждого столбца, в разложении отсутствуют произведения, включающие две или более констант с одним и тем же первым индексом, и каждый индекс, отличный от m , должен встречаться в качестве первого индекса в каждом произведении только один раз.

3. Каждая константа k_{ij} , где $i \neq m$ и $j \neq m$, встречается в определителе дважды: один раз как недиагональный элемент, а другой — как один из членов суммы $-\sum k_{ij}$. Это обстоятельство приводит к следующему важному результату: каждое произведение, содержащее цикл индексов (например, произведение $k_{12}k_{23}k_{31}$ с циклом индексов $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$), в разложении определителя должно сокращаться (заметим, что в произведении каждый из индексов встречается один раз как первый индекс, а другой раз — как второй). Для того чтобы убедиться в этом, проще всего рассмотреть конкретный случай, например произведение $k_{12}k_{23}k_{31}$. Это произведение встречается в виде $(-k_{12})(-k_{23})(-k_{31})$ [что является частью произведения $(-\sum k_{1j})(-\sum k_{2j})(-\sum k_{3j})$] с сомножителями, являющимися элементами других строк и столбцов

определителя, а также в виде $+k_{12}k_{23}k_{31}$ (из недиагональных элементов) с сомножителями, являющимися теми же самыми членами из других строк и столбцов определителя. Вначале произведение имеет положительный знак, поскольку для того, чтобы переместить соответствующие элементы на главную диагональ, требуется четное число перестановок столбцов (речь идет о перестановках столбцов 1 и 2, затем столбцов 1 и 3). Таким образом, для каждого произведения, которое содержит член $-k_{12}k_{23}k_{31}$, составленный из диагональных элементов, найдется равное ему по величине и обратное по знаку произведение, содержащее член $+k_{12}k_{23}k_{31}$, который составлен из недиагональных элементов. В общем случае, если число констант в цикле является нечетным (как в рассмотренном примере), для того чтобы переместить недиагональные элементы на главную диагональ, потребуется четное число перестановок и в результате знак произведения будет положительным; однако соответствующее произведение из элементов главной диагонали будет содержать нечетное число отрицательных членов и иметь поэтому отрицательный знак. Если число констант в цикле является четным, то картина будет обратной и, следовательно, в любом случае произведения будут взаимно уничтожаться. Итак, мы можем заключить, что все произведения констант, содержащие циклы индексов, из разложения определителя исключаются.

4. Любое произведение, содержащее недиагональный элемент, должно содержать по меньшей мере еще один недиагональный элемент, поскольку присутствие в произведении какого-либо недиагонального элемента исключает присутствие в нем *двух* диагональных элементов (например, если в произведение входит третий элемент четвертой строки, то как третий, так и четвертый диагональные элементы уже не могут присутствовать в этом произведении, поскольку оно должно содержать только один элемент из каждой строки и только один элемент из каждого столбца). Операцию по выбору недиагональных элементов можно считать законченной, если мы дошли до элемента, первый и второй индексы которого уже использовались ранее как второй и первый; иными словами, цикл должен быть завершен. Однако мы видели, что все произведения, составленные из элементов, индексы которых образуют цикл, должны сокращаться. Следовательно, все произведения, которые входят в окончательное разложение определителя, составлены исключительно из диагональных элементов. Поскольку все константы, расположенные на диагонали, отрицательны, все произведения в разложении должны иметь один и тот же знак [положительный, если $(n - 1)$ число четное, и отрицательный, если нечетное].

5. Мы видели (см. пункт 2), что каждый индекс, за исключением индекса m , должен встречаться в качестве первого индекса по меньшей мере один раз. Каждое произведение содержит $(n - 1)$ кон-

стант, и поэтому индекс m по меньшей мере один раз должен встречаться в качестве второго индекса. Если бы это условие не выполнялось, то каждый индекс, который встретился в качестве второго индекса, должен был встретиться также в качестве первого индекса и произведение должно было содержать не менее одного цикла.

6. Каждый диагональный элемент $-\Sigma k_{ij}$ содержит константы, имеющие все возможные вторые индексы, за исключением i . Следовательно, каждое произведение, не противоречащее предыдущим требованиям, должно присутствовать в конечном разложении.

Итак, суммируем вкратце все вышесказанное. Разложение числителя уравнения (3.2) представляет собой сумму произведений $(n-1)$ констант k_{ij} , в каждом из которых (1) m не встречается в качестве первого индекса, (2) каждый другой индекс встречается как первый индекс только один раз, (3) отсутствуют члены, индексы которых образуют цикл, (4) все произведения в указанной сумме имеют одинаковый знак, (5) m в каждом произведении встречается по меньшей мере один раз в качестве второго индекса, (6) в сумме присутствуют все произведения, не противоречащие указанным требованиям.

После столь подробного анализа числителя выражения (3.2) нам очень приятно отметить, что разбирать так же детально знаменатель нет необходимости. Действительно, для всех форм фермента знаменатель имеет одно и то же значение, и, поскольку общая концентрация всех форм должна составлять e_0 , он должен быть равен сумме всех возможных числителей, деленной на e_0 . Учитывая это обстоятельство, а также тот факт, что все возможные числители имеют один и тот же знак, мы приходим к заключению, что знаменатель должен иметь тот же знак, что и числители и, следовательно, отношение должно быть положительным. Это естественно, поскольку все концентрации по своему физическому смыслу должны быть положительными величинами.

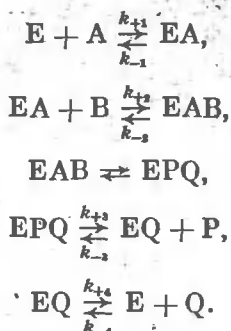
До сих пор мы предполагали, что взаимные переходы возможны для всех пар форм фермента. На самом деле это, конечно, не так, однако отсутствие определенных переходов легко учесть, приравняв к нулю значения соответствующих констант скорости. Произведения, в которые входят эти константы, будут равны нулю, и поэтому их можно опустить.

Еще одно обстоятельство, не учтенное выше, состоит в том, что между двумя формами фермента могут протекать две или более параллельных реакций. В этом случае общая скорость как прямой, так и обратной реакций будет представлять собой сумму индивидуальных скоростей. Следовательно, любую константу k_{ij} можно представить в виде суммы констант скорости для параллельных реакций.

Все произведения констант скорости, обсужденные в этом разделе, могут рассматриваться как «деревья» или пути (см. разд. 3.3), ведущие из одной конкретной формы к каждой из остальных форм. Поэтому метод, описанный в следующем разделе, прямо следует из проведенного выше обсуждения.

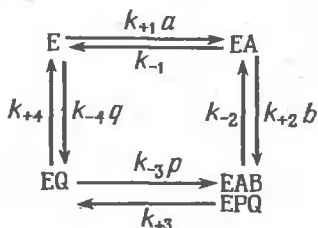
3.3. Метод Кинга — Альтмана

Рассмотрим метод, основанный на применении схем, с помощью которого можно вывести уравнение скорости для любого механизма ферментативной реакции. В качестве примера возьмем один из основных двухсубстратных механизмов:



Для третьей стадии константы скорости не указаны, поскольку измерения стационарной скорости не дают информации об изомеризации между промежуточными соединениями, в ходе которой не происходит связывания или высвобождения реагентов (обсуждение этого вопроса см. в разд. 3.7). Составляя соответствующие уравнения и анализируя их, мы должны поэтому рассматривать EAB и EPQ как одну и ту же форму, хотя с точки зрения механизма процесса было бы правильнее считать их отдельными формами.

Первый этап в выводе уравнения скорости по методу Кинга — Альтмана состоит в том, что механизм ферментативной реакции представляют в виде схемы, в которой указываются все формы фермента и реакции между ними:



Все реакции должны быть представлены как реакции первого порядка. Например, константа скорости k_{+1} заменяется константой скорости псевдопервого порядка $k_{+1}a$ умножением на концентрацию реагента А.

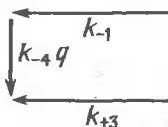
Следующий этап — построение *основного графа*, являющегося скелетом схемы; в рассматриваемом случае это квадрат:



Затем выбирают подграфы (деревья), удовлетворяющие следующим условиям: 1) подграф состоит только из линий, входящих в основной граф; 2) подграф связывает все формы фермента и 3) подграф не содержит циклов. Число ребер в каждом дереве на единицу меньше числа форм фермента; в нашем случае подобных дерева четыре:



Далее для каждой формы фермента и для каждого дерева записывают произведение констант скорости, соответствующих ребрам, направленным к выбранной форме. Например, для формы EQ второе дерево



дает произведение $k_{-1}k_{+3}k_{+4}q$. В этом дереве ребра ориентированы (или подразумевается, что ориентированы) таким образом, что из любой исходной вершины стрелки направлены к соответствующей форме EQ, причем эта форма соединена с любой другой формой только одной стрелкой. Это условие обеспечивает выполнение требований, определяемых правилами 1, 2 и 5 предыдущего раздела. Выполнимость остальных правил обеспечивается описанным выше принципом выбора подграфов. Так как число деревьев равно четырем, для каждой формы фермента можно записать четыре произведения, аналогичных тому, которое было выписано для формы EQ во втором дереве. В таком случае доля каждой формы в смеси в

условиях стационарного протекания реакции равна сумме четырех произведений, деленной на сумму всех шестнадцати произведений (Σ):

$$[E]/e_0 = (k_{-1}k_{-2}k_{+4} + k_{-1}k_{+3}k_{+4} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}b + k_{-1}k_{-2}k_{-3}p)/\Sigma, \quad (3.3)$$

$$[EA]/e_0 = (k_{+1}k_{-2}k_{+4}a + k_{+1}k_{+3}k_{+4}a + k_{-2}k_{-3}k_{-4}pq + k_{+1}k_{-2}k_{-3}ap)/\Sigma,$$

$$[EAB]/e_0 = (k_{+1}k_{+2}k_{+4}ab + k_{-1}k_{-3}k_{-4}pq + k_{+2}k_{-3}k_{-4}bpq + k_{+1}k_{+2}k_{-3}abp)/\Sigma,$$

$$[EQ]/e_0 = (k_{-1}k_{-2}k_{-4}q + k_{-1}k_{+3}k_{-4}q + k_{+2}k_{+3}k_{-4}bq + k_{+1}k_{+2}k_{+3}ab)/\Sigma.$$

Скорость реакции будет равна сумме скоростей стадий, ведущих к образованию определенного продукта, минус сумма скоростей стадий, в которых этот продукт расходуется. В рассматриваемом случае имеется одна стадия образования Р, стадия (EAB — EPQ) $\xrightarrow{k_{+3}}$ EQ, и одна стадия расходования Р, стадия EQ $\xrightarrow{k_{-3}p}$ (EAB — EPQ), и поэтому мы имеем

$$\begin{aligned} v &= \frac{dp}{dt} = k_{+3}[EAB] - k_{-3}[EQ]p = \\ &= e_0(k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}ab + k_{-1}k_{+3}k_{-3}k_{-4}pq + k_{+2}k_{+3}k_{-3}k_{-4}bpq + \\ &+ k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-3}abp - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}pq - k_{-1}k_{+3}k_{-3}k_{-4}pq - \\ &- k_{+2}k_{+3}k_{-3}k_{-4}bpq - k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-3}abp)/\Sigma = \\ &= e_0(k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}ab - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}pq)/\Sigma. \end{aligned}$$

Поскольку обычно измерить все индивидуальные константы скорости невозможно, имеет смысл представить уравнение скорости в форме, содержащей вместо кинетических констант коэффициенты:

$$v = \frac{e_0(c_1ab - c_2pq)}{c_3 + c_4a + c_5b + c_6p + c_7q + c_8ab + c_9ap + c_{10}bq + c_{11}pq + c_{12}abp + c_{13}bpq},$$

где

$$\begin{aligned} c_1 &= k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}, \\ c_2 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}, \\ c_3 &= k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{+4}, \\ c_4 &= k_{+1}(k_{-2} + k_{+3})k_{+4}, \\ c_5 &= k_{+2}k_{+3}k_{+4}, \\ c_6 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}, \\ c_7 &= k_{-1}(k_{-2} + k_{+3})k_{-4}, \\ c_8 &= k_{+1}k_{+2}(k_{+3} + k_{+4}), \\ c_9 &= k_{+1}k_{-2}k_{-3}, \end{aligned}$$

$$c_{10} = k_{+2} k_{+3} k_{-4},$$

$$c_{11} = (k_{-1} + k_{-2}) k_{-3} k_{-4},$$

$$c_{12} = k_{+1} k_{+2} k_{-3},$$

$$c_{13} = k_{+2} k_{-3} k_{-4}.$$

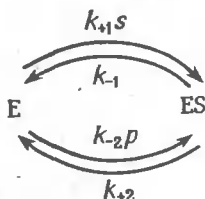
Такая форма записи позволяет легко предсказать кинетические свойства ферментативной реакции, для которой выполняется данный механизм.

В стационарном состоянии концентрации всех форм фермента постоянны. Отсюда непосредственно вытекает, что вещество Q образуется с такой же скоростью, что и P, а A и B расходуются с одинаковой скоростью. Поэтому не имеет значения, какой именно реагент рассматривается при выводе уравнения скорости. Отметим, что выражения для dq/dt , $-da/dt$ и $-db/dt$ полностью идентичны выражению для dp/dt , которое получено выше.

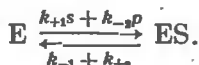
3.4. Варианты метода Кинга — Альтмана

Метод Кинга и Альтмана в том виде, как он здесь представлен, очень удобен для анализа любых более или менее простых механизмов ферментативных реакций. Однако для сложных механизмов, как правило, приходится отыскивать очень большое число деревьев. В таком случае вывод уравнения скорости становится весьма трудоемким и очень просто ошибиться, пропустив отдельные деревья или включив неправильные члены. Хотя задача подсчета общего числа деревьев в принципе разрешима, этот расчет (если не говорить об очень простых механизмах) весьма громоздкий, поскольку необходимо вводить поправки для каждого цикла реакций в обсуждаемом механизме. Так или иначе, даже знание числа деревьев не очень облегчает их отыскание и не сокращает времени, необходимого для выписывания соответствующих членов. В общем случае для сложных механизмов лучше всего попытаться упростить сам метод вывода уравнения скорости. С этой целью Волькенштейном и Гольдштейном [146] был предложен ряд правил; они использовали теорию графов для потоков, разработанную Мэзоном [110, 111] для анализа электрических цепей. Простейшие из этих правил таковы:

1. Если для одной и той же пары форм фермента имеется две или более стадий взаимопревращений, то, сложив константы скорости параллельных реакций, эти стадии можно слить в одну. Например, согласно Кингу — Альтману, механизм Михаэлиса — Ментен может быть представлен как



и дает, следовательно, два дерева: \curvearrowright и \curvearrowleft . Поскольку одна и та же пара форм фермента связана двумя реакциями, последние могут быть объединены:

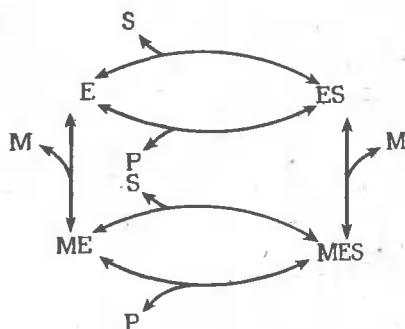


Эта схема сама по себе является одним деревом, и поэтому

$$[E]/e_0 = (k_{-1} + k_{+2})/(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}S + k_{-2}P),$$

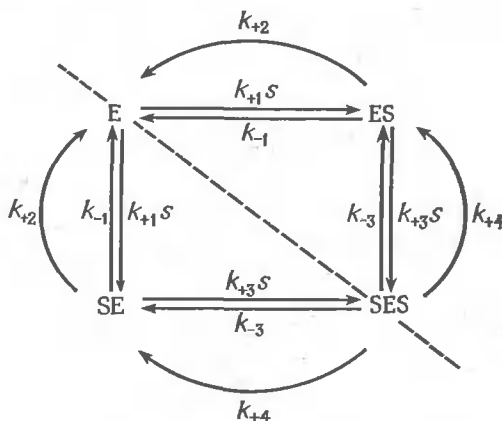
$$[ES]/e_0 = (k_{+1}S + k_{-2}P)/(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}S + k_{-2}P).$$

В более сложных случаях упрощение от использования этого приема еще существеннее. В качестве одного из примеров Кинг и Альтман рассмотрели общий механизм действия модификатора (механизм Боттса и Моралеса [16]):

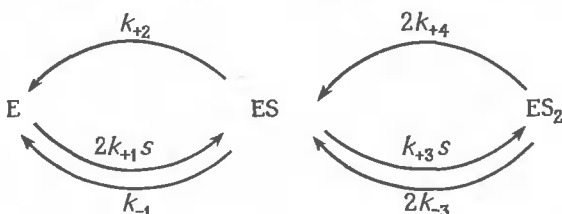


Для этого основного графа необходимо построить двенадцать деревьев. Если же объединить параллельные пути, то получится квадрат, для которого необходимо построить только четыре дерева.

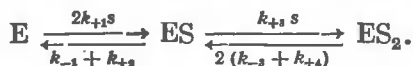
2. В том случае, когда механизм ферментативной реакции предполагает наличие различных форм фермента, обладающих идентичными свойствами, метод существенно упрощается, если рассматривать такие формы как одну. Например, если молекула содержит два *идентичных* активных центра, то соответствующий механизм представляется следующим образом:



Для этого механизма необходимо построить 32 дерева. Однако, поскольку ES и SE идентичны, граф симметричен относительно пунктирной линии и может быть существенно упрощен:



Дальнейшее упрощение можно получить, применив правило 1:



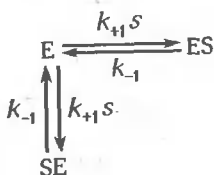
Таким образом, граф, требующий построения 32 деревьев, упростился до графа, представляющего собой одно дерево; это позволяет сразу получить выражения для концентраций трех форм фермента:

$$\frac{[E]}{e_0} = \frac{2(k_{-1} + k_{+2})(k_{-3} + k_{+4})}{2(k_{-1} + k_{+2})(k_{-3} + k_{+4}) + 4k_{+1}(k_{-3} + k_{+4})s + 2k_{+1}k_{+3}s^2}$$

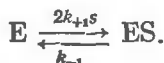
и т. д.

Во всех случаях, когда, используя симметрию основного графа, сводят его к более простому, следует вводить статистические множители. В последнем примере реакция $E \rightarrow ES$ может протекать по двум путям, поэтому полная скорость реакции равна сумме двух скоростей, а константа скорости для объединенного пути — удвоенному значению любой из индивидуальных констант скорости. Напротив, обратная реакция может протекать толь-

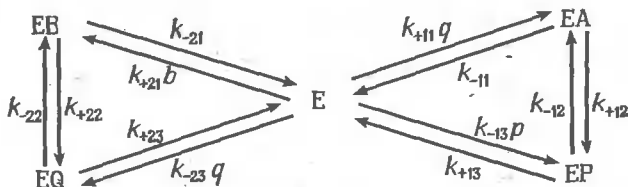
ко по одному пути и поэтому характеризуется статистическим фактором, равным единице. Следовательно, схема



превращается в схему



3. Если основной граф состоит из двух или большего числа обособленных частей, «соприкасающихся» в точках, соответствующих одной, общей для обеих частей форме, то удобно анализировать эти части порознь. В качестве простого примера можно рассмотреть случай *конкурентных субстратов*, когда один фермент катализирует одновременно две реакции с различными субстратами:



В этом случае каждое выражение, определяющее концентрацию той или иной формы фермента, представляет собой произведение соответствующих сумм для левой и правой частей основного графа:

Левая: 

Правая: 



$$\begin{aligned}
 [E]/e_0 &= (k_{+22} k_{+23} + k_{-21} k_{-22} + k_{-21} k_{+23}) \times \\
 &\quad \times (k_{+12} k_{+13} + k_{-11} k_{-12} + k_{-11} k_{+13}) / \Sigma, \\
 [EA]/e_0 &= (k_{+22} k_{+23} + k_{-21} k_{-22} + k_{-21} k_{+23}) \times \\
 &\quad \times (k_{-12} k_{-13} p + k_{+11} k_{-12} a + k_{+11} k_{+13} a) / \Sigma,
 \end{aligned}$$

$$[EP]/e_0 = (k_{+22}k_{+23} + k_{-21}k_{-22} + k_{-21}k_{+23}) \times \\ \times (k_{+12}k_{-13}p + k_{+11}k_{+12}a + k_{-11}k_{-13}p)/\Sigma,$$

$$[EB]/e_0 = (k_{-22}k_{-23}q + k_{+21}k_{-22}b + k_{+21}k_{+23}b) \times \\ \times (k_{+12}k_{+13} + k_{-11}k_{-12} + k_{-11}k_{+13})/\Sigma,$$

$$[EQ]/e_0 = (k_{+22}k_{-23}q + k_{+21}k_{+22}b + k_{-21}k_{-23}q) \times \\ \times (k_{+12}k_{+13} + k_{-11}k_{-12} + k_{-11}k_{+13})/\Sigma.$$

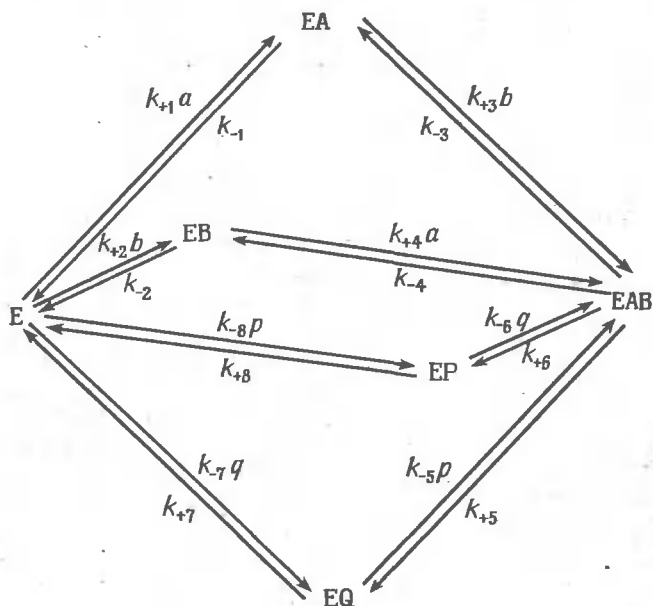
Это правило можно рассматривать как особый случай подхода, который мы обсудим в следующем разделе. Однако, поскольку оно очень удобно с практической точки зрения, мы сочли целесообразным обсудить его отдельно.

Существуют и другие способы вывода уравнения скорости, направленные на усовершенствование метода Кинга и Альтмана. Среди них стоит отметить метод Фромма [58], который может оказаться полезным для тех, кто предпочитает алгебраические операции геометрическим. Совершенно ясно, что любой метод, если он корректен, должен приводить к одному и тому же уравнению скорости реакции.

3.5. Представление графов в более компактной форме

Наиболее полезным является четвертый вариант метода Кинга—Альтмана, введенный Волькенштейном и Гольдштейном (фактически третий по их нумерации): это единственный практический метод анализа сложных механизмов, включающих шесть или более форм фермента. К сожалению, он также наиболее труден для понимания и практического использования, поскольку требует особого внимания и не может быть применен чисто механически, если хотят использовать все его возможности. По своей сути вариант Волькенштейна и Гольдштейна представляет собой способ выявления и использования повторяющихся особенностей основного графа, который позволяет получать соответствующие члены для нескольких деревьев одновременно.

Рассмотрим следующий механизм, соответствующий двухсубстратной-двухпродуктной реакции, в котором связывание субстратов и высвобождение продуктов могут происходить в любом порядке:



Ясно, что к такому сложному механизму вряд ли удастся применить метод Кинга—Альтмана в оригинальной форме, без каких либо упрощений, потому что для этой цели необходимо построить 32 дерева и, следовательно, очень легко ошибиться.

Из рассмотрения путей, заканчивающихся на EAB, ясно, что каждое правильно составленное дерево должно содержать пять линий и включать один и только один из маршрутов $E \rightarrow EA \rightarrow EAB$, $E \rightarrow EB \rightarrow EAB$, $E \rightarrow EP \rightarrow EAB$ или $E \rightarrow EQ \rightarrow EAB$. Любое дерево, включающее маршрут $E \rightarrow EA \rightarrow EAB$, должно содержать также либо ветвь $EB \rightarrow E$, либо ветвь $EB \rightarrow EAB$, но не обе ветви одновременно, чтобы, с одной стороны, обеспечить связь с EB, а с другой — избежать образования циклов. Поэтому сумма соответствующих членов для деревьев, содержащих маршрут $E \rightarrow EA \rightarrow EAB$, должна иметь в качестве множителя сложный член $(k_{-2} + k_{+4}a)$. Поскольку каждое дерево обязательно содержит также ветви, идущие к EP и EQ, рассуждая так же, как и раньше, получаем, что указанная сумма должна иметь в качестве множителей $(k_{-6}q + k_{+8})$ и $(k_{-5}p + k_{+7})$. Следовательно, для учета всех восьми деревьев, содержащих маршрут $E \rightarrow EA \rightarrow EAB$, мы можем записать единый член $k_{+1}k_{+3}ab(k_{-2} + k_{+4}a)(k_{-6}q + k_{+8}) \times (k_{-5}p + k_{+7})$. Аналогичным образом исследуются три других маршрута, включающих две ветви. В результате мы получаем, что выражение из 32 членов для концентрации EAB может быть пред-

ставлено в виде суммы четырех членов, содержащих соответствующие сомножители.

Члены выражения для концентрации Е можно получить путем простой замены соответствующих констант скорости на константы скорости реакций, имеющих противоположное направление. Так, маршрут $E \rightarrow EA \rightarrow EAB$ преобразуется в маршрут $E \leftarrow EA \leftarrow EAB$, и поэтому в первой сумме сомножитель $k_{+1}k_{+3}ab$ заменяется на $k_{-1}k_{-3}$ и т. д.

Получить члены выражения для [ЕА] несколько труднее, поскольку эта форма фермента занимает в основном графе позицию, топологически отличную от позиций, занимаемых формами Е и ЕАВ. Например, если фрагмент $E - EB - EAB$ связан с ЕА ветвью $EAB \rightarrow EA$, то он представляет собой маршрут $E \rightarrow \rightarrow EB \rightarrow EAB$ и характеризуется сомножителем $k_{+2}k_{+4}ab$. Если же фрагмент $E - EB - EAB$ связан с ЕА ветвью $E \rightarrow EA$, он представляет собой маршрут $E \leftarrow EB \leftarrow EAB$ и характеризуется сомножителем $k_{-2}k_{-4}$. Вывод членов выражения для [ЕА], а также для [ЕВ], [ЕР] и [ЕQ], имеющих аналогичный вид, мы оставляем читателю, поскольку освоить этот метод вывода уравнения скорости можно, только применяя его на практике, и дальнейшие объяснения, по-видимому, мало что дадут.

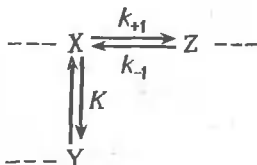
Главное достоинство метода, рассмотренного в этом разделе (помимо того что он позволяет вывести уравнение скорости реакции более простым путем), состоит также и в том, что в получаемом с его помощью уравнении скорости отчетливо проявляются повторяющиеся особенности основного графа и его симметрия, что очень полезно с точки зрения выявления ошибок.

3.6. Реакции, имеющие равновесные стадии

Существует ряд механизмов, достаточно важных, чтобы рассмотреть их подробно, и в то же время настолько сложных, что даже методы, описанные выше, приводят к чрезвычайно громоздким уравнениям скорости. В таких случаях для упрощения вывода уравнения приходится вводить ряд допущений. Зачастую хороший результат дает предположение, что для некоторых стадий (например, для стадий протонирования) на протяжении всей реакции выполняются условия равновесия. Эти допущения не всегда справедливы, но в качестве первого приближения они вполне подходят.

Один из таких методов анализа механизмов, в которых отдельные стадии являются равновесными, описал Ча [27]. Этот метод намного проще, чем полный анализ по методу Кинга—Альтмана, поскольку каждая группа форм фермента, находящихся в равновесии, может рассматриваться как единая форма. Допустим, например, что мы имеем две формы Х и Y, находящиеся в равнове-

сии ($[Y]/[X] = K$), и что X и третья форма, Z , связаны реакцией относительно медленного превращения:



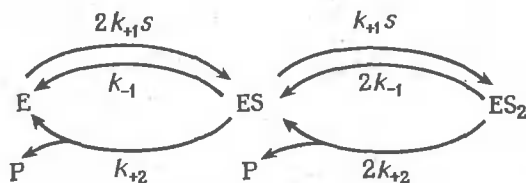
(Наличие пунктирных линий подчеркивает то обстоятельство, что эта диаграмма отражает не полный механизм, а лишь его часть.) Скорость медленной реакции в прямом направлении равна $k_{+1}[X]$, однако ее можно записать и как $k_{+1}[X]([X] + [Y])/([X] + [Y]) = k_{+1}([X] + [Y])/(1 + K)$. Другими словами, X и Y можно рассматривать как единую форму, концентрация которой равна $([X] + [Y])$; при этом константа скорости k_{+1} для распада формы X снижается до величины $k_{+1}/(1 + K)$, если рассматривать распад объединенной формы. В общем случае любое число форм, находящихся в равновесии, можно рассматривать как единую форму; каждая константа скорости k_i снижается при этом до величины $f_i k_i$, где f_i — доля реакционноспособных молекул в равновесной смеси. Если реакционноспособной является более чем одна форма, то константа скорости в соответствии с правилом 1 разд. 3.4 будет равна сумме уменьшенных значений констант скорости для параллельных реакций. Поэтому если в рассмотренном выше примере Y также распадается с образованием Z или формы, находящейся в равновесии с Z , с константой скорости k_{+2} , то константа скорости распада объединенной формы будет равна $(k_{+1} + k_{+2}K)/(1 + K)$.

Подобный способ упрощения вывода уравнения скорости особенно полезен при анализе рН-зависимости скорости ферментативной реакции (гл. 6) и при анализе механизмов с параллельными путями. В последнем случае удобно рассматривать альтернативные пути как равновесные, а единственно возможные — как медленные стадии. Уравнения, полученные подобным образом, обычно согласуются с экспериментом, однако *это не означает, что принятые допущения справедливы*. Действительно, Галбински и Клееланд [61], используя метод моделирования с применением ЭВМ, показали, что дополнительные члены, появляющиеся в точном выражении для стационарной скорости, могут оказаться весьма существенными. Тем не менее эти члены невозможно выявить, поскольку в любых приемлемых экспериментальных условиях они примерно пропорциональны другим членам уравнения.

3.7. Анализ механизмов по внешнему виду графа

Рассмотренный в разд. 3.5 метод представления графов в более компактной форме является ярким примером использования свойств графа при анализе различных механизмов. Исследователю, в совершенстве владеющему методом Кинга — Альтмана, зачастую достаточно просто посмотреть на основной граф, чтобы сделать вывод о виде уравнения скорости для данного механизма, не прибегая к детальным выкладкам.

Важным свойством метода Кинга — Альтмана является то, что каждое дерево дает положительный член и что каждый член появляется в знаменателе уравнения скорости. Поскольку отрицательные члены отсутствуют, взаимного уничтожения не происходит, и, следовательно, в уравнение скорости входит каждый член, для которого существует дерево. Единственное исключение из этого правила состоит в том, что иногда числитель и знаменатель содержат общий множитель, на который их можно сократить. Это имеет место только тогда, когда константы скорости связаны между собой, как, например, в механизме, включающем фермент с двумя независимыми и идентичными активными центрами:



В этом случае константы скорости для первого и второго центров совпадают (если не учитывать статистические факторы) и уравнение скорости имеет следующий вид:

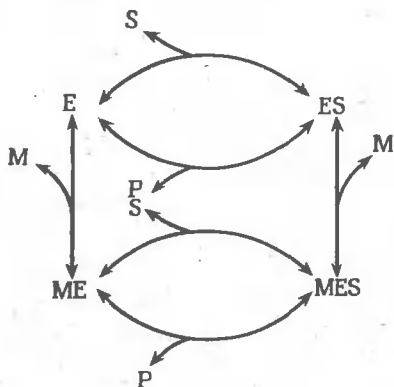
$$v = \frac{4k_{+1} k_{+2} e_0 s (k_{-1} + k_{+2}) + 4k_{+1} k_{+2} e_0 s^2}{2(k_{-1} + k_{+2})^2 + 4k_{+1} s (k_{-1} + k_{+2}) + 2k_{+1}^2 s^2}.$$

Это уравнение содержит члены с s^2 , однако, поскольку на самом деле числитель и знаменатель имеют общий множитель $2(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}s)$, оно упрощается до уравнения Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{2k_{+2} e_0 s}{\left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}\right) + s}.$$

Можно с уверенностью сказать, что для механизмов, в которых между константами скорости не существует никаких других соотношений, кроме тех, которые вытекают из законов термодинамики,

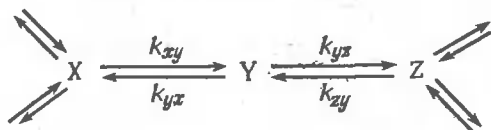
числитель и знаменатель не имеют общего множителя, поэтому каждый член, для которого существует дерево, должен присутствовать в уравнении скорости. Рассмотрим, например, общий механизм действия модификатора, предложенный Боттсом и Моралесом [16]:



Для того чтобы убедиться в том, что уравнение скорости для этого механизма содержит члены, включающие s^2 , совсем не обязательно выводить соответствующее уравнение. Достаточно обратить внимание на то, что имеются два дерева, обуславливающих появление этих членов:

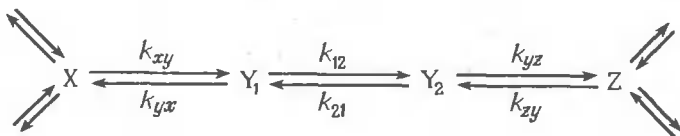


Анализ внешнего вида графа, помимо той пользы, какую он приносит при рассмотрении конкретных механизмов, позволяет сделать важные и далеко идущие выводы о механизмах вообще. Рассмотрим какой-либо механизм (он может быть очень сложным), который содержит следующий сегмент:



Здесь X, Y и Z — три формы фермента. Уравнение скорости будет содержать члены с k_{yx} , k_{yz} и члены, в которых обе константы отсутствуют, и не будет содержать членов, включающих обе конс-

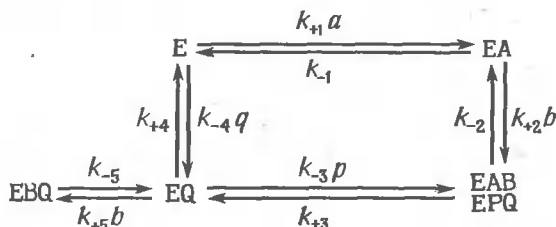
танта (т. е. произведение $k_{yx}k_{yz}$). Заменяем теперь Y смесью взаимно превращающихся форм Y_1 и Y_2 :



Как это повлияет на вид уравнения скорости? Прежде всего, любое произведение из первоначального уравнения войдет и в новое уравнение, добавятся только множители k_{12} или k_{21} , поэтому никакие комбинации концентраций реагентов не исчезнут. Однако, помимо этого, появятся произведения, которые не содержат ни k_{12} , ни k_{21} , но содержат как k_{yx} , так и k_{yz} . Если каждая из констант k_{yx} и k_{yz} является простой константой скорости первого порядка, то вид уравнения не изменится. Если же обе константы связаны с концентрациями реагентов (например, $k_{yx}a$ и $k_{yz}b$), то при модификации механизма в уравнении скорости появятся ранее отсутствовавшие члены, содержащие ab . Все изложенное позволяет сделать важный вывод: введение стадии изомеризации не влияет на форму уравнения скорости, если ни один из изомеров не способен связывать реагенты. Этот вывод означает, что, измеряя стационарные скорости, нельзя обнаружить многие типы изомеризации (для этого можно использовать предстационарную кинетику; см. гл. 9) и что константы скорости, входящие в уравнение скорости, на самом деле могут представлять собой комбинации констант для нескольких элементарных стадий механизма. Как и для «правила большого пальца», полезно различать изомеризацию свободного фермента, которую в принципе все-таки можно выявить на основе исследования стационарной кинетики, и изомеризацию промежуточных комплексов, обычно в стационарной кинетике не проявляющуюся. На самом деле все эти рассуждения представляют, по-видимому, чисто академический интерес, поскольку стадию изомеризации (будь то изомеризация свободного фермента или изомеризация других форм) никогда не удастся надежно идентифицировать на основании измерения стационарных скоростей реакции. Действительно, по крайней мере в одном случае было показано, что изомеризация, которую можно было зарегистрировать другими методами, в измерениях стационарной скорости не выявлялась. Этот случай будет рассмотрен далее, в разд. 5.10.

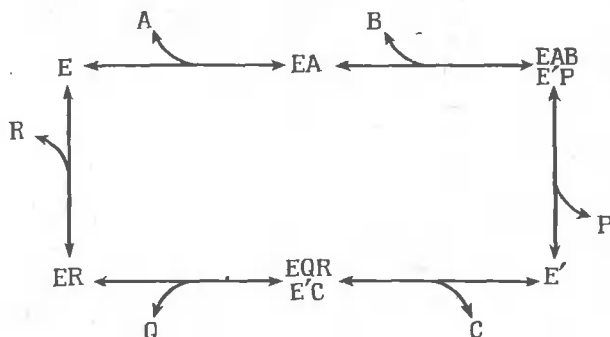
Обратимые стадии в механизме нельзя рассматривать как равновесные, поскольку наличие в какой-то стадии результирующего потока должно приводить к нарушению равновесия для других стадий. Однако в *тупиковой реакции* (dead-end reaction), т. е. в

реакции, присоединенной к остальной части механизма только с одного конца, результирующий поток отсутствует, и поэтому нет оснований считать, что равновесие не сможет поддерживаться. Рассмотрим, например, механизм, приведенный в разд. 3.3, добавив к нему стадию образования тупикового комплекса EQ :



Для каждой формы, за исключением EBQ , метод Кинга — Алтмана дает полученное ранее выражение, умноженное на k_{-5} . Выражение, соответствующее EBQ , получается путем умножения исходного выражения для EQ на $k_{+5}b$. Таким образом, $[EBQ]/[EQ] = k_{+5}b/k_{-5}$, и EQ , B и EBQ находятся в равновесии. Уравнение скорости для механизма, включающего ингибирование, которое связано с наличием в схеме тупика, совпадает поэтому с уравнением скорости для механизма, в котором ингибирование отсутствует, за исключением того, что члены в знаменателе, соответствующие EQ , должны быть умножены на $(1 + k_{+5}b/k_{-5})$.

Наконец, анализ вида графа ферментативной реакции может быть использован для установления общих свойств механизмов, содержащих две формы, не связанные мономолекулярными стадиями. Например, в приводимом ниже механизме E и E' связаны только бимолекулярными стадиями.



Поскольку каждое дерево, выбранное по методу Кинга — Алтмана, должно содержать ветви, ведущие от E , E' или от обеих форм, каждое слагаемое в уравнении скорости должно включать

по меньшей мере один концентрационный член. Другими словами, в уравнение скорости не должны входить члены, являющиеся константами. Развивая эти идеи, можно показать, что если в механизме имеются три подобные формы, то каждое слагаемое в уравнении скорости должно содержать по меньшей мере два концентрационных члена. Механизмы подобного типа называют *механизмами с замещением фермента* (substituted-enzyme mechanisms); они рассмотрены в гл. 5.

3.8. Представление уравнений скорости в форме, содержащей коэффициенты

Часто бывает удобным представить уравнения скорости в форме, содержащей вместо кинетических констант коэффициенты, как это было сделано в разд. 3.3 [уравнение (3.4)]. Во-первых, уравнение становится более простым по сравнению с уравнением, выраженным через константы скорости; во-вторых, следует иметь в виду, что константы скорости могут не быть истинными константами скорости отдельных стадий из-за процессов изомеризации, которые не проявляются в кинетических измерениях; в-третьих, коэффициенты — это в принципе измеримые величины. Однако, если ставится задача выбрать тот или иной кинетический механизм ферментативной реакции, очень важно установить, как связаны между собой коэффициенты. Рассмотрим следующие два уравнения:

$$v = \frac{Vs}{K_{M1} + s} + \frac{Vs}{K_{M2} + s}, \quad (3.5)$$

$$v = \frac{V[(Ls/K_T)(1 + s/K_T) + (s/K_R)(1 + s/K_R)]}{L(1 + s/K_T)^2 + (1 + s/K_R)^2}, \quad (3.6)$$

в которых K_{M1} , K_{M2} ; L , K_R и K_T — положительные константы. Оба уравнения применимы к ферментам, содержащим два активных центра. В то время как в случае уравнения (3.5) предполагается, что активные центры характеризуются различными значениями K_M и действуют независимо друг от друга, для уравнения (3.6) принято, что они взаимодействуют в соответствии с симметричной моделью Моно, Уаймена и Шанжэ ([116]; см. разд. 7.7). В обоих случаях допускается, что константы каталитического распада для двух центров идентичны. Однако конкретное содержание этих двух уравнений в данном случае неважно. Существенно то, что в форме, содержащей коэффициенты, оба уравнения идентичны:

$$v = \frac{c_1 s + c_2 s^2}{c_3 + c_4 s + s^2}.$$

В то же время было бы ошибочно думать, что уравнения (3.5)

и (3.6) совершенно одинаковы. Недостаток последнего уравнения состоит в том, что оно маскирует любые соотношения, которые существуют между коэффициентами. Рассмотрим коэффициенты c_3 и c_4 . Для уравнения (3.5) они выражаются следующим образом:

$$c_3 = K_{M1} K_{M2},$$

$$c_4 = K_{M1} + K_{M2}.$$

Поскольку как K_{M1} , так и K_{M2} должны быть положительными величинами, коэффициенты c_3 и c_4 не являются совершенно независимыми: они связаны неравенством

$$c_4^2 \geq 4c_3. \quad (3.7)$$

В случае уравнения (3.6) коэффициенты c_3 и c_4 выражаются следующим образом:

$$c_3 = \frac{L+1}{\frac{L}{K_T^2} + \frac{1}{K_R^2}},$$

$$c_4 = \frac{2\left(\frac{L}{K_T} + \frac{1}{K_R}\right)}{\frac{L}{K_T^2} + \frac{1}{K_R^2}}.$$

Из этих уравнений также вытекает определенное соотношение между коэффициентами c_3 и c_4 :

$$c_4^2 \leq 4c_3. \quad (3.8)$$

За исключением частного случая, когда $c_4^2 = 4c_3$, уравнения (3.7) и (3.8) исключают одно другое. Это означает, что исходные модели, определяемые уравнениями (3.5) и (3.6), не перекрываются и в любом эксперименте можно провести их дифференциацию.

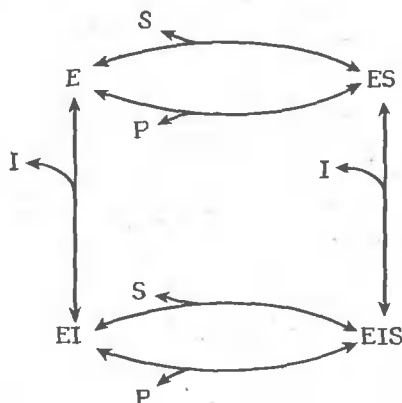
Ингибиторы и активаторы

4.1. Обратимые и необратимые ингибиторы

Соединения, которые при добавлении их в реакционную смесь вызывают уменьшение скорости ферментативной реакции, называются *ингибиторами*. Ингибирование может возникать по многим причинам, и поэтому существует много различных типов ингибиторов. Один из классов ингибиторов, не представляющих, впрочем, особого интереса для ферментативной кинетики (за исключением случаев, когда они выступают как фактор, искажающий результаты эксперимента), это необратимые ингибиторы, или каталитические яды. Ингибиторы этого типа, взаимодействуя с ферментом, снижают его активность до нуля. Многие ферменты отравляются следовыми количествами ионов тяжелых металлов, и поэтому кинетические исследования обычно проводят в присутствии комплексообразующих агентов, например этилендиаминтетрауксусной кислоты. Это обстоятельство особенно важно учитывать при очистке ферментов: в неочищенных препаратах общая концентрация белка довольно высока и многие примеси белкового происхождения связывают почти все присутствующие ионы металлов, однако по мере очистки препарата фермента защитное действие других белков уменьшается и добавление дополнительных связывающих агентов становится необходимым. В некоторых случаях введение необратимых ингибиторов, напротив, может оказаться полезным. Например, отравление ферментов соединениями двухвалентной ртути часто используется для выяснения вопроса о роли сульфгидрильных групп в активности ферментов. Однако этот аспект применения необратимых ингибиторов носит сугубо качественный характер и не имеет отношения к кинетике. Поэтому каталитические яды в дальнейшем обсуждаться не будут.

Гораздо более важным классом ингибиторов является класс обратимых ингибиторов. Эти ингибиторы образуют с ферментом динамические комплексы, которые отличаются по своим каталитическим свойствам от свободного фермента. Фермент в присутствии ингибитора может характеризоваться более высоким значением K_M (*конкурентное ингибирование*), более низким значением V (*чистое неконкурентное ингибирование*), значениями V и K_M , уменьшенными в одинаковой степени (*бесконкурентное ингибирование*), или определенной комбинацией этих эффектов (*смешанное ингибирование*).

Возьмем за основу механизм, предложенный Боттсом и Моралесом [16]. Большинство простых типов ингибирования являются частными случаями этого механизма.



Эта схема включает четыре формы фермента (E, ES, EI и EIS) и шесть реакций, протекающих между ними. Все простые случаи можно получить, если не учитывать некоторых реакций. Так, ингибирование является конкурентным (разд. 4.2), если отсутствуют форма EIS и протекающие с ее участием реакции; неконкурентным (разд. 4.4), если отсутствует EI, и смешанным (разд. 4.3), если в схеме присутствует как форма EI, так и форма EIS, однако прямой переход между ними невозможен. Схема Боттса — Моралеса особенно полезна при анализе ингибиторов, которые не являются продуктами реакции. Несмотря на то что продукты реакции составляют важный класс ингибиторов и по своим кинетическим свойствам близки к ингибиторам, не являющимся таковыми, их связь с рассмотренной схемой менее очевидна.

Некоторые исследователи дифференцируют форму EI, в которой ингибитор связан с субстратсвязывающим центром, и форму IE, в которой ингибитор связывается с другим центром. Это разграничение не имеет большого практического смысла, поскольку механизмы, содержащие одновременно как EI, так и IE, обычно не встречаются. В общем случае, если форма EIS реально существует, можно допустить, что ингибитор и субстрат связываются с разными центрами.

Схема Боттса — Моралеса описывает также некоторые механизмы действия *активатора*, когда добавленное вещество повышает скорость реакции. Поэтому ее можно рассматривать как общую схему, описывающую механизм действия *модификатора*, в котором под модификатором подразумевают как ингибиторы, так и активаторы.

4.2. Конкурентное ингибирование

Самый распространенный тип ингибирования назван *конкурентным ингибированием*, поскольку наиболее простое объяснение этого типа ингибирования сводится к тому, что ингибитор связывается с тем же самым центром молекулы фермента, что и субстрат, с образованием непродуктивного комплекса. Другими словами, субстрат и ингибитор конкурируют за один и тот же центр связывания и, следовательно, может образоваться только один комплекс фермента с ингибитором — EI . В простейшем случае конкурентного ингибирования EI представляет собой «тупиковый» комплекс, поскольку распадается он только в результате диссоциации на исходные компоненты ($E + I$). Поэтому концентрация комплекса EI определяется истинной константой равновесия $K_i = [E][I]/[EI]$ (см. разд. 3.7), которую называют *константой ингибирования*. Для многих более сложных типов ингибирования, включая и большинство типов ингибирования продуктом реакции, константу ингибирования нельзя рассматривать как истинную константу равновесия, потому что комплекс фермента с ингибитором не является «тупиковым».

Полное уравнение стационарной скорости для случая простого конкурентного ингибирования имеет следующий вид:

$$v = \frac{V_s}{K_M(1 + i/K_i) + s}, \quad (4.1)$$

где i — концентрация свободного ингибитора, а V и K_M имеют прежний смысл. Это уравнение совпадает по форме с уравнением Михаэлиса — Ментен, т. е. его можно записать как

$$v = \frac{V_{\text{каж}} s}{K_{M, \text{каж}} + s}.$$

где $V_{\text{каж}}$ и $K_{M, \text{каж}}$ — «кажущиеся» значения параметров V и K_M , которые определяются следующими выражениями:

$$\begin{aligned} V_{\text{каж}} &= V, \\ K_{M, \text{каж}} &= K_M(1 + i/K_i). \end{aligned}$$

При этом

$$V_{\text{каж}} / K_{M, \text{каж}} = \frac{V/K_M}{1 + i/K_i}.$$

Следовательно, влияние конкурентного ингибитора на скорость ферментативной реакции состоит в том, что он увеличивает кажущееся значение K_M в $(1 + i/K_i)$ раз, уменьшает в то же число раз кажущееся значение V/K_M и оставляет без изменения величину V .

Следует особо подчеркнуть, что отношение V/K_M приводится здесь потому, что, как правило (хотя и не в данном случае), его проще исследовать, чем параметр K_M .

4.3. Смешанное ингибирование

При самом элементарном рассмотрении процесса ингибирования ограничиваются обсуждением двух типов ингибирования: конкурентного и неконкурентного. Конкурентное ингибирование действительно распространено очень широко, в то время как случаи неконкурентного ингибирования довольно редки, и рассматривать их здесь детально нет необходимости. Понятие неконкурентного ингибирования возникло в связи с тем, что самые первые исследователи явления ингибирования, Михаэлис и его сотрудники, допускали, что определенные ингибиторы действуют на активность фермента, снижая кажущееся значение V , но не оказывая влияния на параметр K_M . Этот тип ингибирования должен был представлять собой случай, альтернативный конкурентному ингибированию, и был назван неконкурентным ингибированием. Однако реально представить себе такую ситуацию довольно трудно. Действительно, нужно предположить, что ингибитор снижает каталитическую эффективность фермента, но не оказывает влияния на связывание субстрата. Это допущение, по-видимому, справедливо лишь для ингибиторов очень малых размеров, например для протонов и ионов металлов, однако в других случаях подобная ситуация вряд ли может иметь место. Неконкурентное ингибирование или активация протонами — и в самом деле явление распространенное; известно несколько случаев неконкурентного ингибирования ионами тяжелых металлов. Однако неконкурентный характер ингибирования для веществ иной природы наблюдается крайне редко, и для наиболее часто цитированных в литературе примеров — ингибирования инвертазы α -глюкозой [118] и ингибирования аргиназы различными соединениями [81] — после повторения опытов оказалось, что имеет место смешанный тип ингибирования. В общем лучше всего рассматривать неконкурентное ингибирование как особый (и не очень интересный) случай смешанного ингибирования. Его мы и обсудим ниже.

Смешанное ингибирование наблюдается тогда, когда при варьировании концентрации ингибитора происходит изменение как величины $V_{\text{каж}}$, так и величины $V_{\text{каж}}/K_{M,\text{каж}}$. В простейшем случае выполняются следующие соотношения:

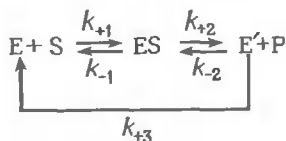
$$V_{\text{каж}} = \frac{V}{1 + i/K_i}, \quad (4.2)$$

$$K_{M, \text{ каж}} = \frac{K_M (1 + i/K_i)}{1 + i/K_i'} \quad (4.3)$$

$$V_{\text{ каж}}/K_{M, \text{ каж}} = \frac{V/K_M}{1 + i/K_i} \quad (4.4)$$

Этот тип ингибирования укладывается в схему Боттса — Моралеса, если форма EIS не распадается с образованием продуктов и если все реакции связывания можно рассматривать как равновесные. В этом случае K_i есть константа диссоциации для комплекса EI, K_i' — константа диссоциации для процесса высвобождения ингибитора из комплекса EIS и K_M — константа диссоциации для комплекса ES, т. е. K_s . На самом деле отклонения от этих уравнений, наблюдаемые в тех случаях, когда реакции связывания не являются истинно равновесными, обычно очень малы, и поэтому выполнимость уравнений (4.2) — (4.4) нельзя рассматривать как доказательство того, что K_M , K_i и K_i' являются истинными константами диссоциации.

Смешанное ингибирование — это чаще всего особый случай ингибирования продуктом. Если отщепление продукта происходит на стадии, приводящей к образованию формы свободного фермента, отличающейся от исходной формы, которая связывает субстрат, то следует ожидать ингибирования продуктом, описываемого уравнениями (4.2) — (4.4). Этот вывод не зависит от того, делаются ли какие-либо допущения о существовании равновесных процессов, и прямо следует из допущения стационарности, как это можно было видеть при изложении методов вывода уравнения стационарной скорости в гл. 3. Простейшим механизмом подобного типа является механизм, в котором продукт высвобождается на второй из трех стадий:



Примеры механизмов усложненного типа можно найти в большом количестве среди реакций, протекающих с участием более одного субстрата или продукта (гл. 5). В этих случаях константы K_i и K_i' нельзя рассматривать как константы диссоциации. Даже в разобранном выше простом случае K_i и K_i' выражаются следующим образом: $K_i = (k_{-1} + k_{+2})k_{+3}/k_{-1}k_{-2}$ и $K_i' = (k_{+2} + k_{+3})/k_{-2}$, т. е. ни одна из констант не является константой равновесия, за исключением особых случаев, когда $k_{+3} \ll k_{+2}$. Если $k_{-1} = k_{+3}$, то K_i равна K_i' , и уравнение (4.3) сводится к $K_{M, \text{ каж}} =$

$= K_M$. Этот случай, очевидно, соответствует неконкурентному ингибированию. Однако для равенства между собой k_{-1} и k_{+3} нет никаких серьезных оснований, и, следовательно, нельзя считать, что в этом случае ингибирования продуктом (или в любом другом) будет наблюдаться неконкурентное ингибирование.

Ввиду того что неконкурентное ингибирование встречается очень редко, некоторые энзимологи трактуют термин «неконкурентное ингибирование» более широко, включая в него случай смешанного ингибирования. Подобное нововведение не дает никаких преимуществ и является весьма неудачным, поскольку вносит еще большую неопределенность в и без того запутанную ситуацию. Для того чтобы избежать этой неопределенности, в тех редких случаях, когда хотят отметить, что имеет место именно неконкурентное ингибирование, приходится называть его *чисто* неконкурентным.

4.4. Бесконкурентное ингибирование

Последний из простых типов ингибирования, который следует обсудить, получил в литературе неудачное название *бесконкурентное* ингибирование; для него характерно то, что V и K_M изменяются в одинаковой степени, и поэтому отношение V/K_M остается неизменным:

$$V_{\text{каж}} = \frac{V}{1 + i/K_i'},$$

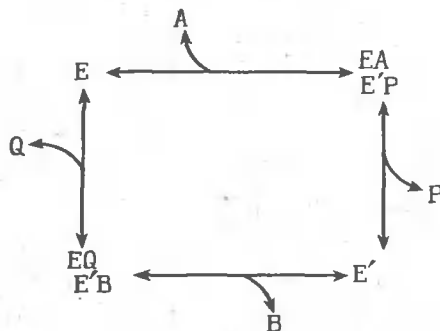
$$K_{M, \text{каж}} = \frac{K_M}{1 + i/K_i'},$$

$$V_{\text{каж}}/K_{M, \text{каж}} = V/K_M.$$

Сопоставление этих уравнений с уравнениями (4.2)–(4.4) показывает, что бесконкурентное ингибирование является предельным случаем смешанного, когда K_i стремится к бесконечности. Таким образом, бесконкурентное ингибирование является прямой противоположностью конкурентному, поскольку последнее является другим предельным случаем смешанного ингибирования, когда K_i' стремится к бесконечности.

Бесконкурентное ингибирование можно описать с помощью схемы Боттса—Моралеса, если допустить, что образование формы EI не происходит вообще, а форму EIS рассматривать как «тупиковый» комплекс. Это означает, что центр, связывающий ингибитор, становится доступным для ингибитора только после того, как свяжется субстрат. К такой модели мог бы привести механизм индуцированного соответствия (см. разд. 7.6), и она, по-видимому,

лучше всего объясняет случай бесконкурентного ингибирования щелочной фосфатазы L-фенилаланином [59]. В других случаях ингибитор может связываться с центром, который становится доступным после высвобождения одного из продуктов, как это имеет место для механизма, названного *механизмом с замещением фермента* (см. разд. 5.2):



В этом механизме «тупиковый» ингибитор, связывающийся только с E' , будет бесконкурентным по отношению к одному субстрату, A , в то время как ингибитор, связывающийся только с E , будет бесконкурентным ингибитором по отношению к другому субстрату, B .

Бесконкурентное ингибирование чаще всего встречается как случай ингибирования продуктом, в особенности для реакций, включающих три или более продуктов (разд. 5.8). В общем случае продукт выступает в роли бесконкурентного ингибитора, если отсутствуют обратимые стадии между формой фермента, с которой связывается этот продукт, и формой фермента, с которой связывается субстрат.

4.5. Графическое представление результатов ингибирования

Все типы ингибирования, которые были рассмотрены в трех предыдущих разделах, являются примерами *линейного ингибирования*. Это название предложено в связи с тем, что для всех рассмотренных типов ингибирования между величинами $1/V_{\text{каж}}$ и $K_{M,\text{каж}}/V_{\text{каж}}$ и концентрацией ингибитора существуют простые линейные зависимости. Линейное ингибирование называют иногда также *полным ингибированием*, поскольку при достаточно больших концентрациях ингибитора скорость ферментативной реакции приближается к нулю. Как мы увидим далее (разд. 4.7), возможны и другие типы ингибирования, однако здесь мы ограничимся рассмотрением линейного ингибирования.

Таблица 4.1

СВОЙСТВА ЛИНЕЙНЫХ ИНГИБИТОРОВ

Тип ингибирования	$V_{\text{каж}}$	$V_{\text{каж}}/K_{\text{М, каж}}$	$K_{\text{М, каж}}$
Конкурентное	V	$\frac{V/K_{\text{М}}}{1 + i/K_i}$	$K_{\text{М}}(1 + i/K_i)$
Смешанное	$\frac{V}{1 + i/K_i'}$	$\frac{V/K_{\text{М}}}{1 + i/K_i}$	$\frac{K_{\text{М}}(1 + i/K_i)}{1 + i/K_i'}$
Бесконкурентное	$\frac{V}{1 + i/K_i'}$	$V/K_{\text{М}}$	$\frac{K_{\text{М}}}{1 + i/K_i'}$

Свойства линейных ингибиторов суммированы в табл. 4.1. Из этой таблицы видно, что изменения величин $V_{\text{каж}}$ и $V_{\text{каж}}/K_{\text{М, каж}}$ в присутствии ингибиторов подчиняются простым закономерностям и легко запоминаются. Напротив, изменения величины $K_{\text{М, каж}}$ сложны и запутанны. Поэтому в целях запоминания лучше рассматривать величину $K_{\text{М, каж}}$ не как самостоятельный параметр, а как отношение величин $V_{\text{каж}}$ и $V_{\text{каж}}/K_{\text{М, каж}}$. Для установления типа ингибирования может быть использован любой из графиков, представленных в разд. 2.5, поскольку все они позволяют оценить кажущиеся значения кинетических параметров. Например, если построены зависимости s/v от s при различных значениях i , то при наличии конкурентной составляющей в эффекте ингибирования варьирование i приводит к изменению величины отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат ($K_{\text{М, каж}}/V_{\text{каж}}$), а при наличии бесконкурентной составляющей — к изменению наклона ($1/V_{\text{каж}}$). С другой стороны, если построены прямые, отображающие зависимость $V_{\text{каж}}$ от $K_{\text{М, каж}}$, то смещение точки пересечения характеризует тип ингибирования: для конкурентного ингибирования точка пересечения смещается вправо, для бесконкурентного она смещается по направлению к началу координат, а для смешанного ингибирования характер смещения точки пересечения промежуточный. Все описанные графики представлены на рис. 4.1.

Для определения действительных значений K_i и K_i' требуются графики иного рода. Простейший подход здесь состоит в определении кажущихся кинетических констант при нескольких значениях i и построении графиков зависимости $K_{\text{М, каж}}/V_{\text{каж}}$ и $1/V_{\text{каж}}$ от i . В каждом случае соответствующая зависимость является линейной, причем отрезок, отсекаемый на оси i , равен $-K_i$ для зависимости $K_{\text{М, каж}}/V_{\text{каж}}$ от i и $-K_i'$ для зависимости $1/V_{\text{каж}}$ от i . Может показаться, что естественнее определять K_i путем построения графика зависимости от i величины

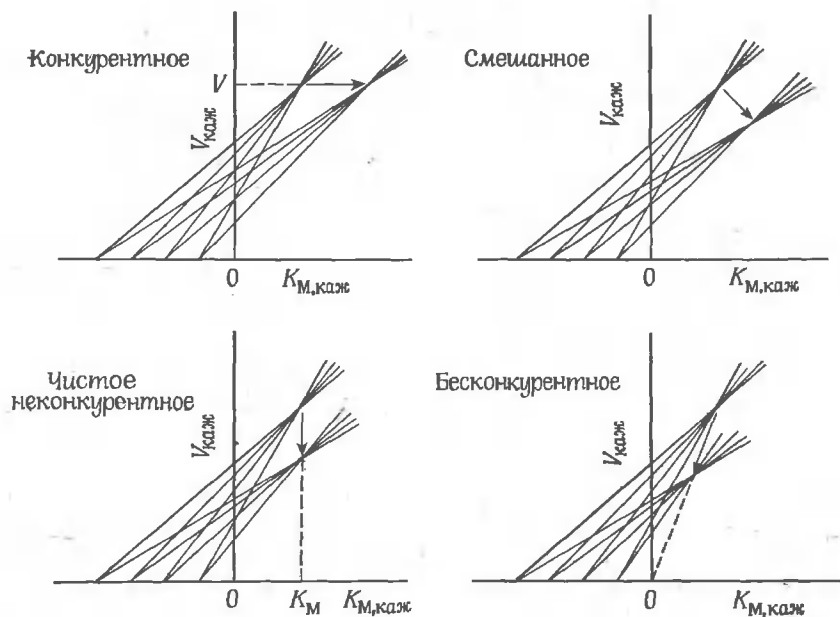


Рис. 4.1. Смещение точки пересечения прямых, построенных в координатах $\{K_{M, \text{каж}}; V_{\text{каж}}\}$ (см. рис. 2.7) для различных типов ингибирования.

$K_{M, \text{каж}}$, а не $K_{M, \text{каж}}/V_{\text{каж}}$, однако это нецелесообразно по следующим двум причинам. Во-первых, зависимость $K_{M, \text{каж}}$ от i является линейной только в случае конкурентного ингибирования; если ингибирование смешанное, то указанная зависимость отклоняется от линейности. Во-вторых, зависимость $K_{M, \text{каж}}$ от i является менее точной (даже в случае конкурентного ингибирования), поскольку величину $K_{M, \text{каж}}$ никогда нельзя определить с такой же точностью, как и величину $K_{M, \text{каж}}/V_{\text{каж}}$.

Другой широко применяемый в настоящее время метод определения K_i предложен Диксоном [44]. Если полное уравнение для смешанного ингибирования

$$v = \frac{V_s}{K_M(1 + i/K_i) + s(1 + i/K'_i)} \quad (4.5)$$

представить в перевернутой форме, то мы получим соотношение

$$\frac{1}{v} = \frac{(K_M + s)}{V_s} + \frac{(K_M/K_i + s/K'_i)i}{V_s}.$$

Зависимость $1/v$ от i графически изображается прямой. Если построены две подобные зависимости при различных значениях s , то абсциссу точки пересечения можно найти, приравняв два выра-

жения для $1/v$. Нетрудно показать, что прямые пересекаются в точке, где $i = -K_i$. Этот метод позволяет найти K_i для любого линейного типа ингибирования. В случае бесконкурентного типа ингибирования константа K_i равна бесконечности, и поэтому зависимости $1/v$ от i представляют собой серию параллельных прямых.

Следует отметить, что график Диксона не позволяет определить

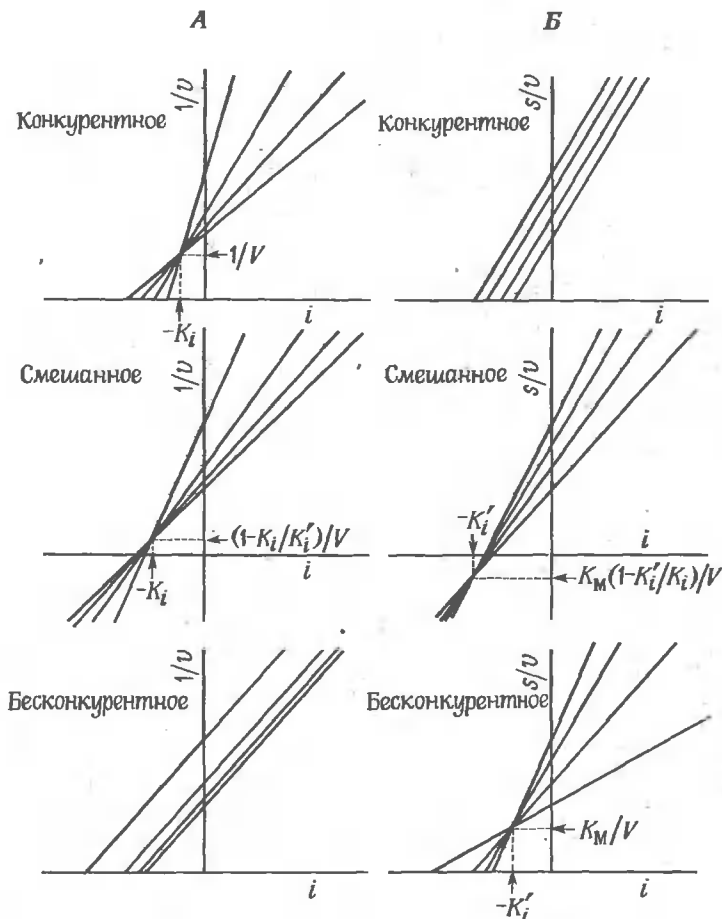


Рис. 4.2. Определение константы K_i из графиков зависимости $1/v$ от i , построенных при различных значениях s (А), и константы K_i' из графиков зависимости s/v от i , построенных при различных значениях s (Б).

В случае смешанного ингибирования точка пересечения может быть выше оси абсцисс для первого графика и ниже оси абсцисс для второго графика или наоборот; если $K_i = K_i'$ (чистое неконкурентное ингибирование), то для обоих графиков точка пересечения лежит на оси абсцисс.

константу бесконкурентного ингибирования K_i' . Эту константу можно найти, построив серию зависимостей s/v от i для ряда значений i [35]. Мы получим серию прямых, пересекающихся в точке с абсциссой $i = -K_i'$. Оба типа графиков представлены на рис. 4.2.

Чтобы найти K_i и K_i' из одного графика, можно в принципе воспользоваться графическим методом Хантера и Даунса [81]. Для этого нужно при каждой концентрации субстрата знать наряду со скоростью реакции в присутствии ингибитора v_i скорость реакции в его отсутствие v_0 ; эта задача обычно легко решается на практике. Если в уравнении (3.5) записать v_i вместо v , с одной стороны, и v_0 вместо $Vs/(K_M + s)$ — с другой, то после преобразования получим

$$\frac{iv_i}{v_0 - v_i} = \frac{K_M + s}{K_M/K_i + s/K_i'} \quad (4.6)$$

В случае конкурентного ингибирования ($K_i' \rightarrow \infty$) это уравнение упрощается:

$$\frac{iv_i}{v_0 - v_i} = K_i(1 + s/K_M).$$

Следовательно, зависимость $iv_i/(v_0 - v_i)$ от s представляет собой прямую, точка пересечения которой с осью ординат равна K_i . В случае смешанного ингибирования зависимость $iv_i/(v_0 - v_i)$ от s , согласно уравнению (4.6), графически представляется равнобочной гиперболой, причем отрезок, отсекаемый на оси ординат экстраполированным участком кривой, по-прежнему равен K_i . При

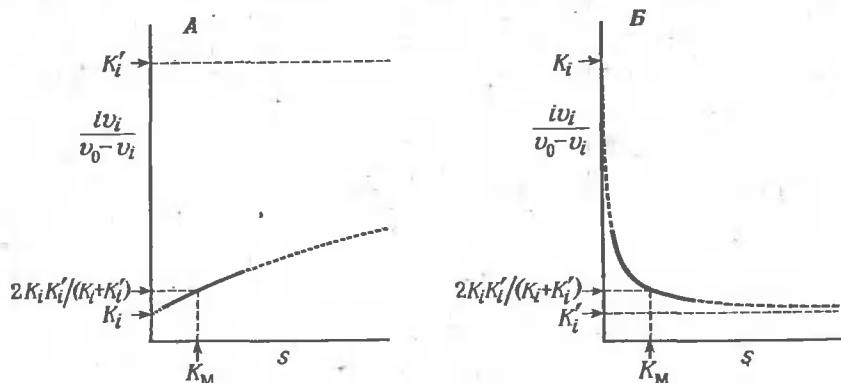


Рис. 4.3. Определение обеих констант ингибирования (K_i и K_i') при помощи одного графика — зависимости $iv_i/(v_0 - v_i)$ от s .

А. $K_i < K_i'$ (преимущественно конкурентное ингибирование). Б. $K_i > K_i'$ (преимущественно бесконкурентное ингибирование). В каждом случае зависимость $iv_i/(v_0 - v_i)$ от s изображена пунктиром, за исключением области значений s от 0,2 до $2K_M$. Это сделано с тем, чтобы подчеркнуть то обстоятельство, что если константы K_i и K_i' не являются величинами одного порядка, то одновременное определение обеих констант из-за слишком далекой экстраполяции весьма ненадежно.

возрастании s величина $iv_i/(v_0 - v_i)$ не растет до бесконечности, а стремится к предельному значению, равному K_i' (рис. 4.3.). На практике определить одновременно с достаточной точностью отсекаемый отрезок и асимптоту довольно трудно. Однако если величина K_M известна, то можно легко рассчитать ту константу ингибирования, которая определяется с меньшей точностью, воспользовавшись тем, что при $s = K_M$ величина $iv_i/(v_0 - v_i)$ равна $2/(1/K_i + 1/K_i')$, т. е. среднему гармоническому величин K_i и K_i' . С другой стороны, если строить зависимость величины $iv_i/(v_0 - v_i)$ не от $1/s$, а от s , то отсекаемый на оси ординат отрезок будет равен K_i' .

Следует отметить, что правая часть уравнения (4.6) не содержит концентрации ингибитора. Это приводит к тому, что скорости реакции могут быть измерены для случайной подборки значений i и s , однако при этом все экспериментальные точки в координатах $\{iv_i/(v_0 - v_i); s\}$ должны лежать на одной кривой. Таким образом, подобный график удобен для обработки данных, которые не могут быть представлены никаким иным путем. На первый взгляд может показаться, что это не дает никаких особых преимуществ. Однако в отличие от всех других графиков использование зависимости $iv_i/(v_0 - v_i)$ от s позволяет проводить исследования в гораздо большем интервале значений i и s при ограниченном числе измерений. Это обстоятельство может быть полезным в тех случаях, когда из-за экспериментальных трудностей удается поставить только несколько опытов.

Все графики, рассмотренные в этом разделе, весьма полезны для обработки данных по ингибированию, однако они не могут заменить расчетов, если необходимо точно определить константы ингибирования. Всякий раз, когда определяют кинетические константы графическим методом, возникают задачи по статической обработке результатов измерений, столь же важные при графическом анализе данных ингибирования, как и в более простых, всесторонне исследованных случаях.

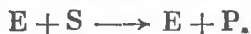
4.6. Качественный подход к линейному ингибированию

Для любого механизма наиболее надежный путь выяснения вопроса о том, какие из кинетических параметров изменяются под действием ингибитора, состоит в выводе соответствующего уравнения скорости и всестороннем его анализе. Однако не менее полезным при решении этой задачи оказывается качественный подход. Для того чтобы убедиться в этом, полезно взглянуть в смысл параметров K_M , V и V/K_M . Константа K_M первоначально использовалась как мера прочности связывания субстрата ферментом. Хотя подобная интерпретация параметра K_M должна применяться с большой осторожностью, в нашем случае она вполне оправдана. Инги-

битор, связывающийся с тем же самым центром молекулы фермента, что и субстрат, должен, очевидно, снижать способность фермента связывать субстрат и поэтому увеличивать $K_{M, \text{каж}}$. Если ингибитор не оказывает никакого другого действия, то он не будет изменять реакционную способность образующихся молекул ES и, следовательно, не будет влиять на $V_{\text{каж}}$. Термин «конкурентный» для этого типа ингибитора является, очевидно, вполне обоснованным. В известном смысле это обстоятельство сыграло неблагоприятную роль, потому что если бы не оно, то не имеющие физического смысла термины «неконкурентный» и «бесконкурентный» вряд ли вошли бы в научную литературу. Лучше всего рассматривать эти два термина просто как «ярлыки» и не пытаться искать связи между названием и сущностью явления.

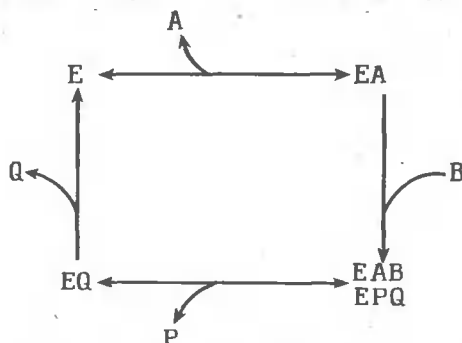
Параметр V характеризует предельную скорость ферментативной реакции, соответствующую случаю, когда весь фермент полностью переходит в форму ES. Любой ингибитор, который препятствует распаду комплекса ES на продукты, связываясь с одним из промежуточных соединений с образованием «тупикового» комплекса или вызывая обращение одной из стадий в соответствии с законом действующих масс, должен снижать величину $V_{\text{каж}}$. При подобном характере действия ингибитора относительные количества свободного фермента и комплекса ES будут, как правило, снижаться, что приведет также к изменению величины $K_{M, \text{каж}}$. Таким образом, можно ожидать, что любое соединение, препятствующее распаду комплекса ES на продукты, будет выступать в роли смешанного ингибитора.

Параметр V/K_M часто рассматривается просто как некая производная величина (а именно как отношение V к K_M), однако он имеет вполне определенный физический смысл: V/K_M — это константа скорости псевдопервого порядка для реакции



К этой простой схеме сводится механизм Михаэлиса — Ментен, если концентрация комплекса ES неизмеримо мала по сравнению с концентрацией свободного фермента, т. е. при очень низких концентрациях субстрата. В этих условиях система находится вдали от насыщения, поскольку то небольшое число комплексов ES, которое образуется, существует столь короткий промежуток времени, что не может заметно снизить концентрацию свободного фермента и, следовательно, существенно повлиять на вероятность столкновения между молекулами свободного фермента и субстрата. По этой причине зависимость v от s при достаточно малых концентрациях субстрата ($s < 0,1 K_M$) аппроксимируется прямой с наклоном, равным V/K_M . Если говорить об ингибировании, то эта аппроксимация особенно важна для бесконкурентных ингибиторов, характерной особенностью которых является отсутствие влияния

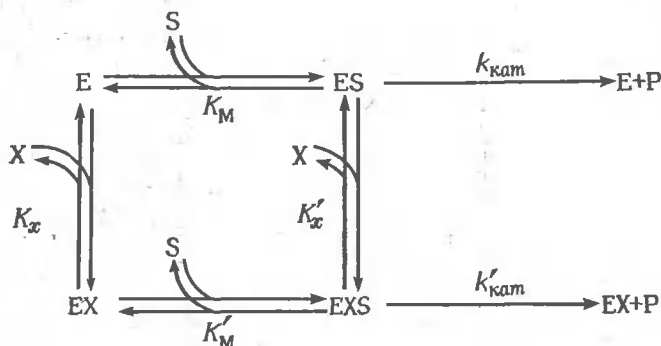
на величину $V_{\text{каж}}/K_{\text{М, каж}}$. Из проведенного анализа ясно следует, что бесконкурентные ингибиторы характеризуются ничтожно малым влиянием на скорость ферментативной реакции при очень низких концентрациях комплекса ES. Если ясно осознать это, то при рассмотрении какого-либо конкретного механизма нетрудно понять причину возникновения бесконкурентного ингибирования. Как видно из предыдущего раздела, существует два механизма этого процесса. В одном из них ингибитор присоединяется исключительно к комплексу ES или к другому промежуточному соединению, но не способен связываться со свободным ферментом. Однако при очень низких концентрациях субстрата свободный фермент является единственной формой фермента, присутствующей в ощутимой концентрации, и поэтому ингибитор, способный присоединяться только к другим формам, не может оказывать никакого влияния на скорость реакции. Второй (и более важный) случай бесконкурентного ингибирования — это ингибирование продуктом для механизмов, в которых обратимые стадии связывания субстрата и высвобождения продукта (они обозначены на приводимой ниже схеме как \leftrightarrow) отделены друг от друга с обеих сторон необратимыми стадиями (обозначенными как \rightarrow), т. е.



В этом механизме продукт P может оказывать ингибирующее действие только путем присоединения к форме EQ. Подобное ингибирование возможно при высоких концентрациях A, когда одна из стадий высвобождения продукта является лимитирующей, однако оно отсутствует при низких концентрациях A, когда лимитирующей становится стадия $E + A \rightarrow EA$ и E является практически единственной формой фермента. Таким образом, в данном случае P выступает в роли бесконкурентного ингибитора, поскольку он оказывает ингибирующее действие только при высоких концентрациях A. Отдельные стадии ферментативного механизма могут стать необратимыми либо в том случае, когда субстрат присутствует в насыщающей концентрации (например, B в рассмотренном примере), либо когда концентрация продукта равна нулю (например, продукт Q в начальный момент времени).

4.7. Гиперболическое ингибирование и активация

Большинство изученных ингибиторов рассматривается как линейные, хотя, по-видимому, исключений из этого положения гораздо больше, чем можно было ожидать. Основанием для таких сомнений может служить то, что схема Боттса — Моралеса вполне реальна и из нее следует, что в общем случае (за исключением узкой области значений кинетических параметров) ингибирование не должно быть линейным. Пользуясь полной схемой Боттса—Моралеса, удобно рассматривать ингибирование и активацию вместе, поскольку различие между ними носит скорее количественный, чем качественный характер, и для обоих случаев справедливы одни и те же алгебраические соотношения. Для обозначения любого модификатора (будь то ингибитор или активатор) будет использоваться символ X . Тогда если все стадии связывания в ферментативной реакции рассматривать как равновесные и обозначить константы диссоциации так, как это показано на приведенной ниже схеме,



то уравнение скорости примет следующий вид:

$$v = \frac{(k_{\text{кат}} + k'_{\text{кат}} x/K'_x) e_0 s}{K_M (1 + x/K_x) + s(1 + x/K'_x)} \quad (4.7)$$

На самом деле это уравнение применимо даже в том случае, когда стадии связывания в стационарном состоянии нельзя считать равновесными, потому что наблюдаемые в этом случае отклонения обычно слишком малы, чтобы их можно было обнаружить. Следовательно, параметры K_M , K_x и K'_x нельзя интерпретировать как константы равновесия, хотя при выводе уравнения предполагалось, что они являются таковыми.

Уравнение (4.7) по форме совпадает с уравнением Михаэлиса—

Монтен, если учесть, что

$$V_{\text{каж}} = \frac{(k_{\text{кат}} + k'_{\text{кат}} x/K'_x) e_0}{1 + x/K'_x}, \quad (4.8)$$

$$K_{M, \text{каж}} = \frac{K_M (1 + x/K'_x)}{1 + x/K'_x}, \quad (4.9)$$

$$V_{\text{каж}}/K_{M, \text{каж}} = \frac{(k_{\text{кат}} + k'_{\text{кат}} x/K'_x) e_0}{K_M (1 + x/K'_x)}. \quad (4.10)$$

Если $k'_{\text{кат}} > k_{\text{кат}}$, то $V_{\text{каж}}$ растет с увеличением x . Поэтому при достаточно больших s , когда $v \rightarrow V_{\text{каж}}$, X является активатором, если $k'_{\text{кат}} > k_{\text{кат}}$, но ингибитором, если $k'_{\text{кат}} < k_{\text{кат}}$. При достаточно малых значениях s , когда $v \rightarrow V_{\text{каж}} s/K_{M, \text{каж}}$, X оказывает влияние на скорость реакции в соответствии с уравнением (4.10). В этом случае, если $k'_{\text{кат}}/K'_x > k_{\text{кат}}/K_x$, $V_{\text{каж}}/K_{M, \text{каж}}$ растет с увеличением x . Поэтому данный модификатор может выступать в роли ингибитора при низких значениях s и в роли активатора при высоких. При $k'_{\text{кат}}/K'_x < k_{\text{кат}}/K_x$ наблюдается обратная картина. Таким образом, при использовании полной схемы Боттса — Моралеса граница между активаторами и ингибиторами становится весьма размытой.

Уравнения (4.8) — (4.10) имеют сходную структуру, и в каждом случае при построении зависимости левой части каждого уравнения от x или $1/x$ получается равнобочная гипербола, которая не проходит через начало координат. Преобразовать эти зависимости так, чтобы графически они представлялись прямыми, невозможно, поскольку каждая из них включает три независимые константы. Однако для приблизительного анализа кривых можно воспользоваться графическим методом, примененным ранее при анализе кривой такой же формы (рис. 4.3), хотя для получения более надежных результатов лучше воспользоваться статистическими методами (см. гл. 10). В связи с тем что зависимости параметров $V_{\text{каж}}$, $K_{M, \text{каж}}$ и $V_{\text{каж}}/K_{M, \text{каж}}$ от x являются гиперболическими, модификаторы, действие которых описывается полной схемой Боттса — Моралеса, часто называют гиперболическими активаторами или ингибиторами. Некоторые исследователи используют термин *частичное* ингибирование (partial inhibition), чтобы подчеркнуть то обстоятельство, что ферментативная активность при насыщенной концентрации ингибитора полностью не подавляется.

Рассмотрим теперь некоторые специальные случаи. Если $k'_{\text{кат}} = 0$, то уравнения (4.8) — (4.10) переходят в уравнения, характерные для линейного смешанного ингибирования (разд. 4.4). Если $k'_{\text{кат}} = k_{\text{кат}}$, то мы получаем гиперболическую конкурентную активацию или ингибирование. В этом случае термин «кон-

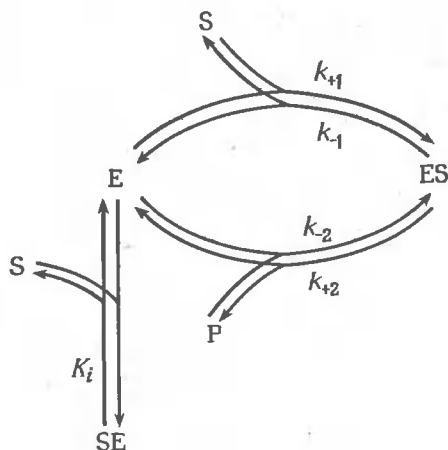
курентный» оказывается, конечно, неудачным, поскольку S и X могут связываться одновременно молекулой фермента и поэтому вряд ли конкурируют друг с другом. Появление этого термина связано с тем обстоятельством, что уравнение (4.8) сводится к уравнению $V_{\text{каж}} = k_{\text{кат}}e_0 = V$, которое выполняется в случае линейного конкурентного ингибирования. Гиперболическое конкурентное ингибирование можно отличить от линейного, воспользовавшись тем, что в первом случае величина $V_{\text{каж}}/K_{M, \text{каж}}$ при $x \rightarrow \infty$ не уменьшается до нуля, а график зависимости $K_{M, \text{каж}}/V_{\text{каж}}$ от x представляет собой гиперболу, а не прямую.

Для того чтобы надежно установить гиперболический тип ингибирования, необходимо провести измерения скоростей ферментативной реакции в широком диапазоне значений i . Трудности, с которыми приходится при этом сталкиваться, делают постановку таких экспериментов очень затруднительной. Вероятно, это обстоятельство и послужило основной причиной редкости сообщений о гиперболическом ингибировании. По-видимому, линейные ингибиторы встречаются только в двух распространенных случаях: при ингибировании продуктами реакции (гл. 5) и при ингибировании близкими аналогами субстрата, т. е. соединениями, которые настолько близки по структуре к субстрату, что конкуренция их с субстратом за связывание с одним и тем же центром становится неизбежной. Однако даже близкие аналоги субстрата могут быть гиперболическими ингибиторами (например, при ингибировании алкогольдегидрогеназы метанолом [154]). В этом случае связывающий центр является, по-видимому, достаточно вместительным, чтобы связать одновременно и этанол, и метанол. Для всех других типов ингибитора (независимо от того, имеют они физиологическое значение или нет) гиперболическое ингибирование следует рассматривать как норму, а линейное — как отклонение от нее (раньше эта точка зрения не была общепринятой).

Часто оказывается, что ферменты, занимающие ключевые позиции в контроле метаболизма, ингибируются или активируются соединениями, не имеющими структурного сходства с субстратами или продуктами метаболических реакций. Во многих случаях имеются надежные доказательства того, что связывающие центры для субстрата и модификатора пространственно разделены. Это явление часто называют *аллостерическим* ингибированием или активацией, и оно имеет явное сходство с гиперболическим ингибированием или активацией. Однако аллостерические ферменты имеют и другие аномальные кинетические свойства (эти ферменты рассмотрены в гл. 7). Обсуждая вопросы контроля метаболизма, вместо термина «модификатор» часто используют термин «эффе́ктор», желая подчеркнуть то обстоятельство, что действие модификаторов имеет физиологическое значение.

4.3. Непродуктивное связывание

Основные сведения о свойствах ферментов получены при изучении небольшой их группы, а именно внеклеточных гидролитических ферментов — пепсина, лизоцима, рибонуклеазы и в особенности химотрипсина. Эти ферменты обладают рядом общих свойств, делающих их исключительно удобными для детального изучения: они могут быть получены в большом количестве, легко кристаллизуются¹, стабильны, присутствуют в виде мономеров и могут рассматриваться как односубстратные ферменты, поскольку для каждого из них в роли второго субстрата выступает вода. Однако при интерпретации кинетических данных следует всегда помнить, что указанные ферменты имеют один общий недостаток: исследования их кинетических свойств, как правило, проводятся с более простыми, синтетическими субстратами. Последние являются гораздо менее высокомолекулярными, чем соответствующие им природные субстраты, которые представляют собой полимеры и не могут быть столь же хорошо охарактеризованы, как их синтетические аналоги. Фермент, способный связывать полимер, вероятно, может связывать малые молекулы несколькими разными способами. Таким образом, наряду с единственным фермент-субстратным комплексом, который распадается с образованием продуктов, могут существовать многочисленные *непродуктивные комплексы*, не способные к каталитическому распаду. Эта ситуация иллюстрируется на следующей схеме:



¹ Заметим, что по современным представлениям способность к кристаллизации не является надежной гарантией чистоты ферментов; например, хотя как трипсин, так и уреазы уже в течение многих лет доступны в кристаллическом состоянии, оказалось, что чистота этих ферментных препаратов была очень низкой.

Здесь через SE обозначены непродуктивные комплексы. Эта схема аналогична схеме для линейного конкурентного ингибирования (разд. 4.2); единственное отличие состоит в том, что ингибитор заменен на субстрат. Уравнение скорости в случае образования непродуктивных комплексов имеет следующий вид [сравните с уравнением (4.1)]:

$$v = \frac{k_{+2} e_0 s}{\left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \right) \left(1 + \frac{s}{K_i} \right) + s} \quad (4.11)$$

Будем называть *ожидаемыми* значениями V и K_M значения, которые имели бы эти параметры в условиях, когда образования непродуктивных комплексов не происходит: $V_{\text{ожд}} = k_{+2} e_0$ и $K_{M, \text{ожд}} = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ (сравните с константами, скорректированными с учетом ионизации форм фермента; разд. 6.3). В таком случае уравнение (4.11) можно преобразовать к виду

$$v = \frac{V_s}{K_M + s},$$

где

$$V = \frac{V_{\text{ожд}}}{1 + K_{M, \text{ожд}}/K_i},$$

$$K_M = \frac{K_{M, \text{ожд}}}{1 + K_{M, \text{ожд}}/K_i},$$

$$V/K_M = V_{\text{ожд}}/K_{M, \text{ожд}}.$$

Таким образом, для обсуждаемого механизма строго выполняется уравнение Михаэлиса — Ментен и наблюдаемая кинетика не позволяет ответить на вопрос о том, существует непродуктивное связывание или нет. Однако, как правило, из эксперимента хотят получить именно ожидаемые величины, поскольку они характеризуют основной каталитический путь к образованию продукта. В то же время измеряемые значения V и K_M меньше ожидаемых на неизвестную величину, оценить которую не представляется возможным. Действительной характеристикой каталитических свойств фермента является только отношение V/K_M .

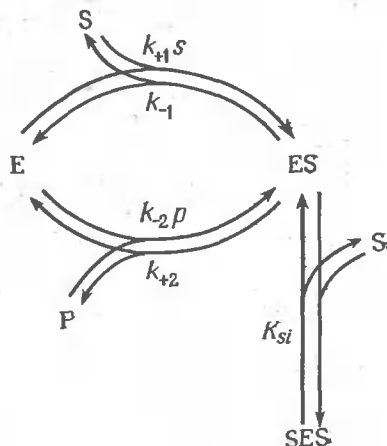
Для ферментов, обладающих высокой специфичностью, непродуктивное связывание во внимание не принимается. Обусловлено это тем, что вероятность непродуктивного связывания в этом случае мала. Однако для ферментов с низкой специфичностью, таких, как химотрипсин, сопоставление результатов, полученных с различными субстратами, может иногда выявить наличие непродуктивного связывания. Например, Инглес и Ноулис [83], измеряя скорость гидролиза ряда ацилхимотрипсинов и используя ацильные группы с различной реакционной способностью, показали,

что в случае производных L-аминокислот скорость гидролиза наиболее высока для аминокислот с большими гидрофобными группами (например, для ацетил-L-триптофанилхимоотрипсина). Для соответствующих же производных D-аминокислот картина обратная. Полученные результаты проще всего объяснить, если допустить наличие непродуктивного связывания: для ацильных групп с благоприятной для катализа L-конфигурацией большие гидрофобные боковые группы обеспечивают прочное и жесткое связывание, характеризующееся правильной ориентацией, благодаря чему образование непродуктивных комплексов практически исключается. В то же время для ацильных групп с D-конфигурацией прочное и жесткое связывание тех же групп приводит к образованию непродуктивных комплексов.

Непродуктивное связывание при обсуждении вопросов ингибирования ферментов, как правило, не рассматривается; более того, о нем вообще редко упоминают. Между тем ясно, что непродуктивное связывание является особым случаем конкурентного ингибирования и его необходимо принимать во внимание при интерпретации результатов, полученных с несколькими субстратами для фермента, обладающего низкой специфичностью. Следует отметить, что термин «субстратное ингибирование» обычно используют в применении к бесконкурентному варианту непродуктивного связывания. Субстратному ингибированию посвящен следующий раздел.

4.9. Субстратное ингибирование

В случае некоторых ферментов к фермент-субстратному комплексу ES присоединяется вторая молекула субстрата, в результате чего образуется неактивный комплекс SES. Схема такой реакции имеет следующий вид:



Она аналогична схеме бесконкурентного ингибирования (разд. 4.5) и дает следующее уравнение для начальной скорости:

$$v = \frac{k_{+2} e_0 s}{\left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \right) + s (1 + s/K_{si})} = \frac{V_s}{K_M + s + s^2/K_{si}},$$

где V и K_M определяются так же, как и ранее, т. е. $V = k_{+2}e_0$ и $K_M = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$. Поскольку это уравнение содержит член,

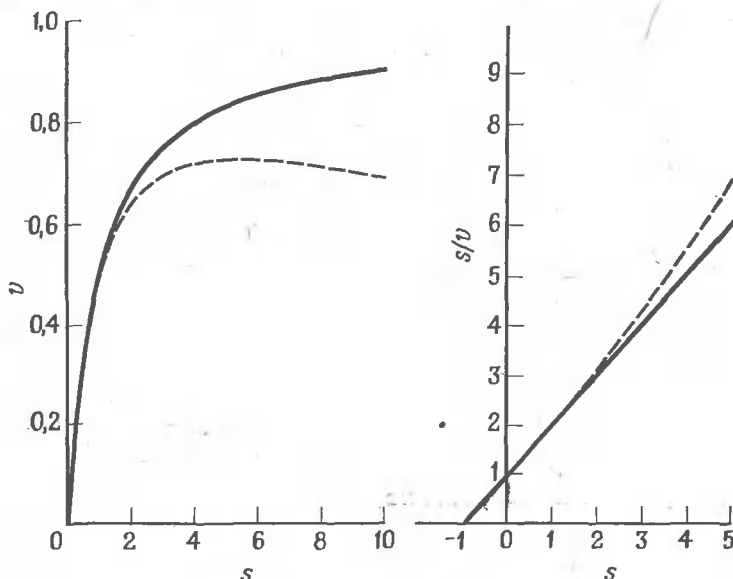


Рис. 4.4. Влияние субстратного ингибирования на форму кривых зависимости v от s и s/v от s .

Для обоих графиков сплошные кривые рассчитаны для $K_M=1$ и $V=1$ при отсутствии субстратного ингибирования, а пунктирные линии — для тех же значений K_M и V и $K_{si}=30$.

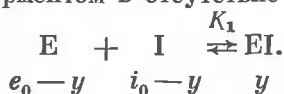
включающий s^2 , оно отличается от уравнения Михаэлиса — Ментен. Вклад члена s^2/K_{si} становится заметным только при высоких концентрациях субстрата, поэтому, если s достаточно мала, скорости реакции приближаются к значениям, удовлетворяющим уравнению Михаэлиса — Ментен, однако при больших значениях s величина v стремится не к V , а к нулю. Дифференцируя выражение для v по s и приравняв dv/ds к нулю, можно легко показать, что скорость достигает максимального значения, когда $s^2 = K_M K_{si}$, причем это максимальное значение не равно V . Зависимость v от s представлена на рис. 4.4. На этом же рисунке приведена зависимость s/v от s , которая является не прямой, а параболой. Если K_{si} намного превышает K_M (а обычно это так), то зави-

симось s/v от s при малых значениях s является почти строго линейной и может быть использована, как и обычно, для оценки V и K_m .

Если концентрации субстрата поддерживаются равными или ниже предполагаемых концентраций его в физиологических условиях, субстратное ингибирование обычно не играет существенной роли; однако при высоких концентрациях субстрата оно может стать весьма значительным. Кроме того, субстратное ингибирование является тем «пробным камнем», который позволяет разграничить возможные механизмы ферментативных реакций (этот вопрос обсуждается в разд. 5.6).

4.10. Ингибиторы, обладающие высоким сродством

В начале этой главы мы разграничили обратимые и необратимые ингибиторы. Хотя это разграничение весьма полезно, оно вызывает возражения с теоретической точки зрения, поскольку при этом подразумевается, что различие носит принципиальный характер. В то же время многие «необратимые» ингибиторы на самом деле являются обратимыми, но характеризуются очень высоким сродством к ферменту. Страус и Гольдштейн [137] показали, что механизм действия ингибиторов с высоким сродством можно понять и без привлечения каких-либо допущений качественного характера. Рассмотрим сначала простейший случай, когда ингибитор связывается ферментом в отсутствие субстрата:



Следует отметить, что при этом не вводится допущения о том, что концентрация свободного ингибитора идентична общей концентрации ингибитора i_0 . В равновесных условиях концентрация y комплекса EI определяется следующим выражением:

$$y = (e_0 - y)(i_0 - y)/K_i. \quad (4.12)$$

Это уравнение можно преобразовать в квадратное уравнение относительно y . Однако лучше иметь дело с другой величиной — долей, которую составляет форма фермента, находящаяся в несвязанном состоянии, от общего количества фермента, $\alpha = (e_0 - y)/e_0$, поскольку экспериментально скорее всего удастся измерить именно ее, а не y . Исключив y из уравнения (4.12) и преобразовав полученное выражение, приходим к уравнению

$$i_0 = (1 - \alpha) e_0 + \left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right) K_i. \quad (4.13)$$

Это уравнение дает значение i_0 при любом конкретном значении α . Уравнение (4.13) можно представить в виде функциональной

зависимости α от i_0 , однако последняя является менее удобной. Уравнение (4.13) упрощается в двух предельных случаях. Если $e_0 \ll K_i$, то

$$i_0 = \left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right) K_i, \quad \text{или} \quad \alpha = \frac{1}{1 + i_0/K_i}; \quad (4.14)$$

если $e_0 \gg K_i$, то

$$i_0 = (1 - \alpha) e_0, \quad \text{или} \quad \alpha = 1 - i_0/e_0. \quad (4.15)$$

Таким образом, вид функции насыщения фермента лигандом зависит от концентрации фермента. Страус и Гольдштейн выделили

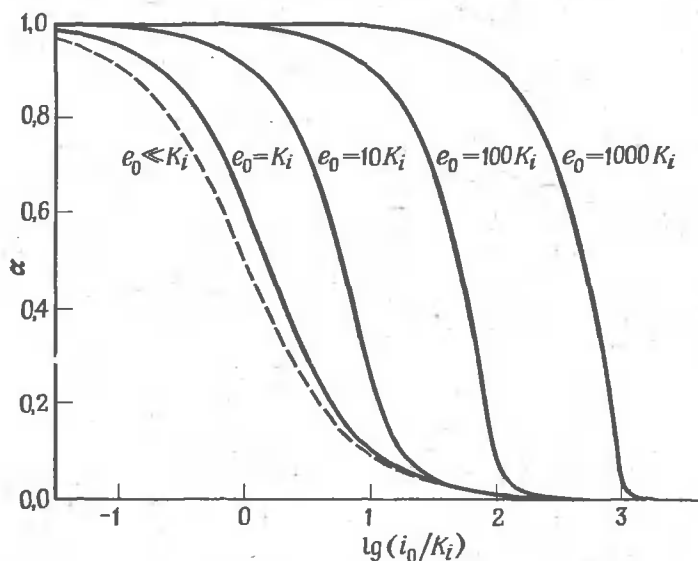


Рис. 4.5. Зависимость доли формы фермента, находящейся в несвязанном состоянии (α), от общей концентрации ингибитора i_0 для системы $E + I \rightleftharpoons EI$, характеризующейся константой равновесия K_i , при различных значениях общей концентрации фермента e_0 .

три области ингибирования: область А, где применимо уравнение (4.14), область С, где применимо уравнение (4.15), и промежуточную область В, где следует использовать уравнение (4.13). Ряд кривых связывания представлен на рис. 4.5. Из уравнения (4.14) следует, что при малых значениях e_0 (меньших, чем приблизительно $0,1 K_i$) форма кривой связывания не зависит от величины K_i . В экспериментах по изучению стационарных скоростей ферментативных реакций концентрации фермента обычно очень низки (как правило, 10^{-10} — 10^{-7} М). Поэтому при проведении подобных экс-

периментов заметные отклонения от уравнения (4.14) будут наблюдаться только для ингибиторов, обладающих очень высоким сродством. Однако в живых клетках концентрационные условия скорее всего иные: Спир [135] обнаружил, например, что значения концентраций некоторых важных ферментов в клетке находятся в интервале от 10^{-7} до 10^{-4} М. Область ингибирования, обозначенная как область А, при физиологических условиях может встречаться поэтому гораздо реже, чем в опытах *in vitro*, а многие субстраты и ингибиторы *in vivo*, по-видимому, существуют преимущественно в виде комплексов с ферментами. Высокие концентрации фермента обычно применяются также в опытах по равновесному связыванию и при изучении быстро протекающих стадий ферментативной реакции. В обоих этих случаях допущение о том, что концентрация свободного лиганда (ингибитора или субстрата) и общая концентрация лиганда одинаковы, по-видимому, не выполняется.

Следует отметить, что уравнение (4.13) выведено для равновесных условий при отсутствии в системе субстрата. Если в реакционную смесь внесен субстрат, то кинетические соотношения становятся гораздо более сложными, поскольку для всех типов ингибирования (за исключением чистого неконкурентного ингибирования) добавление субстрата приводит к смещению равновесия между свободным и связанным ингибиторами. В том случае, когда связывание субстрата происходит очень быстро, единственно возможным подход к выяснению механизма действия ингибитора состоит в отыскании полного решения сложных уравнений, описывающих конкурентное ингибирование в области В. К счастью, по крайней мере для некоторых ингибиторов, обладающих высоким сродством к ферменту, высвобождение ингибитора из комплекса ЕІ происходит настолько медленно, что смещением равновесия $E + I \rightleftharpoons EI$ под действием субстрата можно пренебречь. Например, Майерсу [117] удалось описать ингибирование псевдохолинэстеразы мощным конкурентным ингибитором Nc 683 при помощи уравнения (4.13). Таким образом, низкая скорость взаимодействия фермента с ингибитором привела фактически к тому, что торможение реакции приобрело характер неконкурентного ингибирования. Рассматривая только случай 50 %-ного ингибирования ($\alpha = 0,5$), Майерс преобразовал уравнение (4.13) к очень простому виду:

$$i_{0,5} = K_i + 0,5 e_0,$$

где $i_{0,5}$ — значение i_0 , при котором α равно 0,5. Такой подход, конечно, справедлив только в том случае, если скорость ферментативной реакции измеряется непосредственно после добавления субстрата к ферменту, до того как вытеснение ингибитора из комплекса с ферментом станет заметным.

Типы механизмов ферментативного катализа

5.1. Введение

До сих пор мы рассматривали в основном ферментативные реакции, в которых имеется один субстрат и один продукт. В действительности подобные реакции в биохимии встречаются крайне редко; к их числу относятся лишь несколько реакций изомеризации (например, реакция взаимного превращения глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата, катализируемая фосфоглюкомутазой). Однако следует иметь в виду, что развитию ферментативной кинетики в значительной степени способствовали два обстоятельства. Во-первых, многие гидролитические ферменты можно обычно рассматривать как односубстратные ферменты, поскольку второй субстрат — вода — всегда присутствует в таком избытке, что ее концентрацию можно считать постоянной. Во-вторых, большинство ферментов в условиях, когда варьируется концентрация только одного субстрата, по своим свойствам очень близки к односубстратным ферментам. Это станет ясно при рассмотрении уравнений скорости реакции, которые будут введены в настоящей главе. Здесь нужно, однако, сделать оговорку, что константа K_m для отдельного субстрата имеет в этом случае физический смысл только тогда, когда условия эксперимента строго определены и постоянны (причем оба условия должны выполняться одновременно).

Следует отметить, что механизмы односубстратных реакций совсем не так просты, как может показаться на первый взгляд, потому что из более близких к реальности моделей катализа, учитывающих изомеризацию фермента, следует, что свободный фермент высвобождается при каталитическом распаде фермент-субстратного комплекса в форме, отличающейся от исходной формы, которая связывает субстрат. Поэтому более вероятным является механизм



а не простой механизм Михаэлиса — Ментен. Конечную изомеризацию $E' \rightarrow E$ можно в принципе обнаружить в опытах по ингибированию продуктом реакции. Однако при этом возникают трудности, обусловленные тем, что при исследовании ингиби-

рования продуктом в однопродуктной реакции невозможно предотвратить протекание обратной реакции. Этот вопрос будет рассмотрен далее в разд.5.10.

Существуют три основных кинетических метода установления механизма ферментативной реакции: измерение начальных скоростей в отсутствие продукта, выяснение природы ингибирования продуктами реакции и изотопные исследования с субстратами, содержащими радиоактивные метки. Все методы рассмотрены в настоящей главе на примере двухсубстратной-двухпродуктной реакции



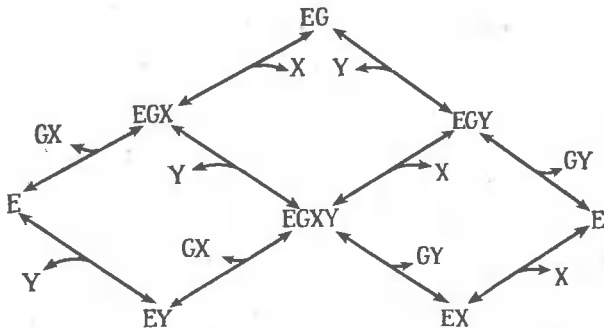
Это самый распространенный тип реакций в биохимии: к нему относится около 60% всех известных ферментативных реакций. Существуют более сложные реакции, число субстратов в которых достигает четырех и выше. Однако для их анализа могут быть применены модифицированные соответствующим образом подходы, разработанные для изучения двухсубстратных-двухпродуктных реакций.

5.2. Обзор двухсубстратных-двухпродуктных механизмов

Почти все двухсубстратные-двухпродуктные реакции формально представляют собой реакции *переноса группы*, т. е. реакции, в которых определенная группа (G) переносится от одного радикала, X, к другому, Y:



Уонг и Хейнс [150] предположили, что наиболее вероятные пути этого переноса могут быть представлены следующей схемой:



При анализе схемы по методу Кинга—Альтмана требуется учесть 96 деревьев, и получаемое уравнение стационарной ско-

рости чрезвычайно сложно (оно содержит, например, члены, включающие $[Y]^3$). Однако маловероятно, что для каждого отдельного фермента будут иметь место все стадии, указанные на этой схеме, и тот факт, что кинетика действия ряда ферментов все-таки описывается такой сложной схемой, на самом деле является чистой случайностью. Механизмы реакций, катализируемых биотинзависимыми ферментами, например метилмалонил-КоА-карбоксилтрансферазой [121] и пируваткарбоксилазой [8], по-видимому, включают большую часть стадий (или даже все стадии) схемы Уонга—Хейнса. Однако для каждого из ферментов реакция идет в основном по одному пути — через EG — и, кроме того, многие стадии можно рассматривать как равновесные (разд. 3.6). Поэтому наблюдаемые кинетические свойства этих ферментов намного проще, чем этого можно ожидать исходя из строгого уравнения.

Механизм большинства ферментативных реакций гораздо проще, чем механизм Уонга—Хейнса. Среди этих механизмов можно выделить две основные группы: для одних реакция протекает с образованием в качестве промежуточного соединения *тройного комплекса* EGXY (названного тройным в связи с тем, что он содержит три реагента — фермент и оба субстрата), а для других — *замещенной формы фермента* EG. Ранние исследователи, например Вульф [151, 152] и Холдейн [64], предполагали, что реакция должна протекать через промежуточную стадию образования тройного комплекса, который возникает либо из двойного комплекса EGX, либо из двойного комплекса EY. Иными словами, субстраты могут связываться с ферментом в произвольном порядке, как это показано на рис. 5.1. Строгое уравнение стационарной скорости для этого механизма имеет сложный вид и содержит члены, включающие $[GX]^2$ и $[Y]^2$. Однако вклад этих членов в скорость реакции невелик, и Гулбински и Клеланд [61], используя метод моделирования с применением ЭВМ, показали, что если не брать маловероятные значения для констант скорости, то получаемые зависимости скорости от концентраций субстратов имеют точно такой же вид, как и соответствующие зависимости для случая, когда все стадии, за исключением стадии взаимного превращения $EXG \cdot Y$ и $EX \cdot GY$, являются равновесными. При этом уравнение скорости не содержит квадратичных членов, и для простоты мы будем использовать уравнения, выведенные в предположении, что скорость установления равновесий очень велика (речь идет только о механизмах с неупорядоченным присоединением субстратов). Следует, однако, подчеркнуть, что факт выполнимости подобных уравнений *нельзя* рассматривать как доказательство быстрого установления равновесия, точно так же как на основании выполнимости уравнения Михаэлиса—Ментен для большинства ферментов нельзя сделать вывод, что при этом справедливо до-

пущение Михаэлиса и Ментен о равновесном связывании субстрата. Измеряя стационарную скорость, стадию $EXG \cdot Y \rightleftharpoons EX \cdot GY$ обнаружить нельзя (см. разд. 3.7), однако логично включить ее в механизм с неупорядоченным присоединением субстратов, поскольку при выводе уравнения скорости эта стадия формально рассматривается как лимитирующая.

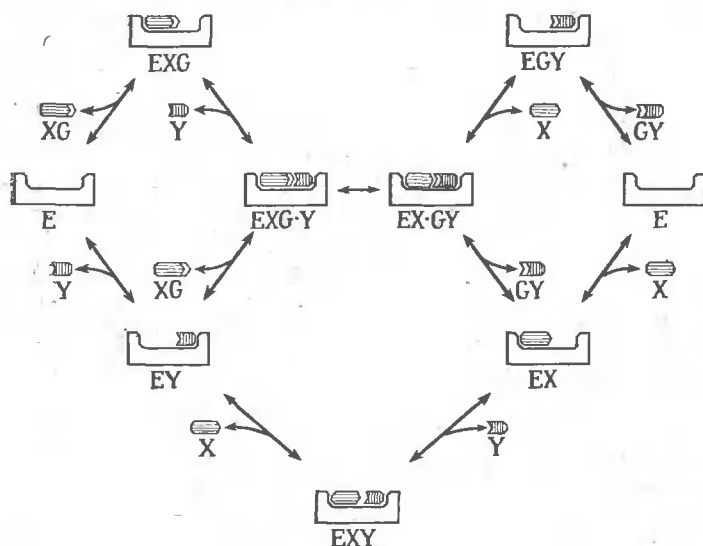


Рис. 5.1. Механизм с образованием тройного комплекса и неупорядоченным присоединением субстратов к ферменту и неупорядоченным высвобождением продуктов для двухсубстратной-двухпродуктной реакции.

Непродуктивный комплекс EXY является, по-видимому, кинетически значимым только при высоких концентрациях как X , так и Y и в простых методах анализа механизма часто не принимается во внимание.

Образование непродуктивного комплекса EXY для механизма с неупорядоченным присоединением субстратов не является обязательным, но о такой возможности не следует забывать, поскольку, если образование промежуточных соединений EY и EX существенно, нет никаких оснований исключать из схемы этот непродуктивный комплекс. Еще один непродуктивный комплекс (не обозначенный на рис.5.1) может образоваться в том случае, если переносимая группа $-G$ не слишком велика по размерам: к возникновению комплекса $EXG \cdot GY$ может привести присоединение GY к EGX или GX к EGY . Однако вероятность образования этого комплекса намного меньше, чем для комплекса EXY .

В настоящее время общепринятой является точка зрения, что многие ферменты нельзя рассматривать как жесткие шаблоны (как это предполагает рис.5.1). Более адекватными являются модели, в которых конформации и фермента, и субстрата при образовании

комплекса изменяются в соответствии с гипотезой «индуцированного соответствия» [95—97] (см. также разд. 7.6). Следовательно, вполне возможна ситуация, что пока фермент не свяжет один из двух субстратов, у него не будет связывающего центра для другого. В таких случаях реализуется *принудительный порядок* (compulsory order) связывания субстратов, представ-

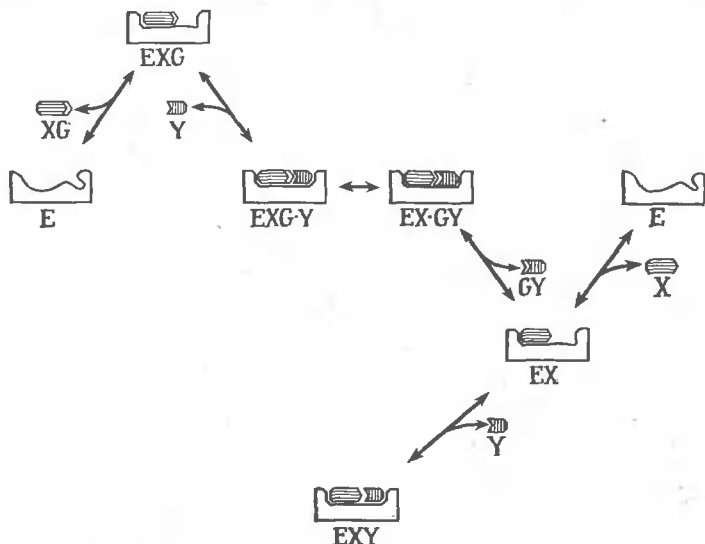


Рис. 5.2. Механизм с образованием тройного комплекса и упорядоченным присоединением субстратов к ферменту и упорядоченным отщеплением продуктов для двухсубстратной-двухпродуктной реакции.

Предполагается, что упорядоченный характер связывания субстратов возникает вследствие того, что связывающий центр для второго субстрата формируется только после соответствующего изменения конформации, вызванного связыванием первого субстрата. Непродуктивный комплекс EXY является, по-видимому, кинетически значимым только при высоких концентрациях как X, так и Y и в простых методах анализа механизма часто не принимается во внимание.

ленный на рис. 5.2. На самом деле упорядоченное связывание субстратов совместимо с моделью жесткого шаблона, если второй субстрат так же сильно взаимодействует с первым субстратом, как и с ферментом, но это, как правило, приводит к механизму с неупорядоченным связыванием субстратов, в котором один путь предпочтительнее другого. Если принимать во внимание и субстраты и продукты, то окажется, что возможны четыре различных порядка присоединения субстратов и отщепления продуктов. Однако рассмотрение механизмов с упорядоченным присоединением субстратов с точки зрения гипотезы индуцированного соответствия показывает, что обратная реакция должна быть структурно аналогична прямой и поэтому второй субстрат должен быть структурным аналогом первого. Таким образом, скорее всего

реализуются только два из четырех возможных порядков присоединения субстратов и отщепления продуктов. Это согласуется с экспериментальными данными, и, например, в случае реакций, катализируемых НАД-зависимыми дегидрогеназами, коферменты обычно выступают в роли первого субстрата и второго продукта.

По тем же самым причинам, которые рассматривались при обсуждении механизма с неупорядоченным присоединением субстратов, в механизмах с упорядоченным связыванием субстратов обычно образуется непродуктивный комплекс EXY в результате присоединения X к EY или Y к EX.

На заре развития кинетики мультисубстратных реакций Дудоров, Бэркер и Хессид [45], применив метод изотопного обмена, показали, что реакция, катализируемая сахарозо-глюкозилтрансферазой, включает в качестве промежуточного соединения замещенную форму фермента, а не тройной комплекс. Позднее исследования, проведенные на многочисленных ферментах (включая α -химотрипсин, аминотрансферазы и флавоферменты), показали, что механизм, включающий замещенную форму фермента, распространен так же широко, как и механизм с тройным комплексом. Механизм с замещением фермента предусмотрен схемой Уонга—Хейнса и представлен схематически на рис.5.3. В обычном («классическом») варианте этого механизма образование тройного комплекса невозможно вследствие того, что связывающие центры для X и Y либо совпадают, либо перекрываются. Для amino-

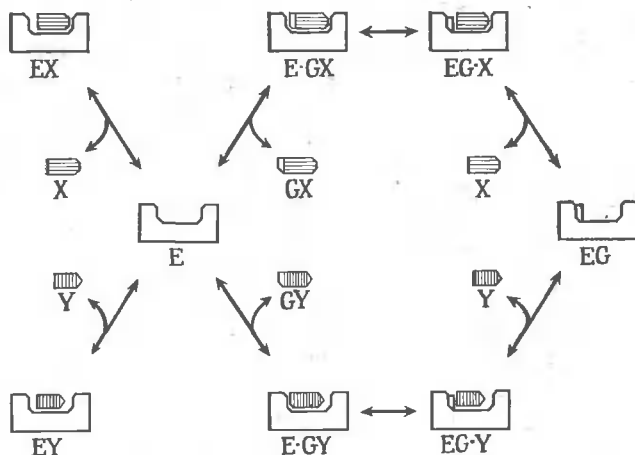
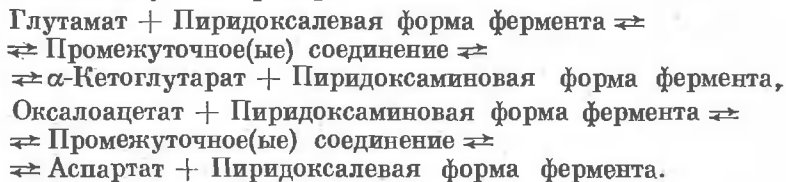


Рис. 5.3. Механизм с замещением фермента для двухсубстратной-двухпродуктной реакции.

В отличие от механизмов с образованием тройного комплекса (см. рис. 5.1 и 5.2) предполагается, что связывающие центры для X и Y совпадают или перекрываются. Непродуктивные комплексы EX и EY являются, по-видимому, кинетически значимыми только при высоких концентрациях X и Y соответственно и в простых методах анализа механизма часто не принимаются во внимание.

трансфераз (основной группы ферментов, действие которых подчиняется этому механизму) все четыре участника реакции обладают структурным сходством. Поэтому естественно ожидать, что связывающие центры для X и Y будут практически идентичными и что вторая половина реакции очень похожа на «перевернутую» первую половину. Например,

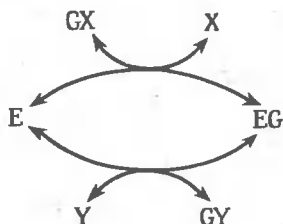


Для этого механизма субстраты часто связываются «ошибочной» формой фермента, что приводит к ингибированию высокими концентрациями субстрата (см. разд.5.6). Так бывает практически всегда для E, X и Y; однако для EG, GX и GY такая ситуация возникает реже, что обусловлено стерическими затруднениями, вызываемыми близостью двух G-групп.

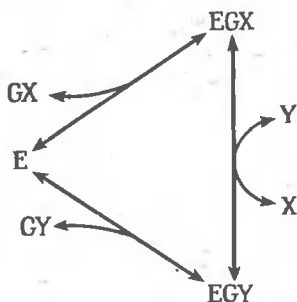
Механизм с замещением фермента является одновременно механизмом с упорядоченным присоединением субстратов. Однако это обстоятельство не имеет здесь такого значения, как для механизмов с образованием тройного комплекса, поскольку для механизмов с замещением фермента существует единственно возможный порядок присоединения субстратов и альтернативный вариант с неупорядоченным связыванием субстратов исключен: хотя E часто может связывать X или Y, образующиеся комплексы не способны к каталитическому распаду с образованием GX или GY.

Как упоминалось ранее, определенные реакции, катализируемые биотинсодержащими ферментами, в основном следуют механизму с замещением фермента, однако эти реакции нетипичны в том отношении, что связывающие центры для X и Y независимы и наряду с замещенными формами фермента в качестве промежуточных соединений образуются тройные комплексы. В последующих разделах главы (и в литературе) под нормальным вариантом механизма с замещением фермента, если не делается специальных оговорок, подразумевается механизм с перекрывающимися или идентичными связывающими центрами для X и Y.

Для любого из приведенных выше механизмов можно в качестве частного случая рассмотреть такую ситуацию, когда две или больше стадий протекают согласованно, т.е. представляют собой фактически единую стадию. Таким, например, является механизм Дудорова—Баркера—Хессада, предложенный первоначально для сахарозо-глюкозилтрансферазы [45] и представляющий собой частный случай механизма с замещением фермента:



Аналогичным образом механизм Теорелла—Чанса, предложенный первоначально для алкогольдегидрогеназы [142], является частным случаем механизма с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов:



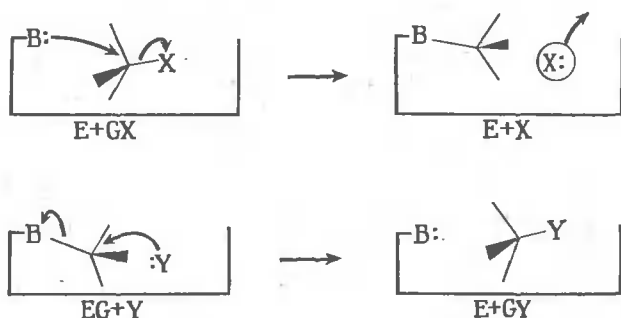
Хотя первый механизм не включает в качестве промежуточного соединения формы $EGXY$, эта форма появляется в роли переходного состояния, и рассмотренный механизм относится к механизмам с тройным комплексом в такой же степени, как и обычные типы подобных механизмов.

Механизмы с согласованно протекающими стадиями представляют в основном исторический интерес, поскольку в настоящее время обычно удается выявить не учитывающиеся в этих механизмах промежуточные соединения, однако на их примере удобно демонстрировать химическую природу двух типов механизмов ферментативных реакций. В случае механизмов с образованием тройного комплекса на поверхности молекулы фермента протекает прямая реакция между субстратами, поскольку атакующая группа Y замещает уходящую группу X :



Может показаться, что фермент не принимает прямого участия в этом процессе. Однако он, несомненно, выполняет две важные функции: вынуждает субстраты принять конформацию и расположение, благоприятствующие протеканию реакции, и, кроме того, вызывая поляризацию молекул субстратов, делает их более реакционноспособными. Кошланд [93] предложил называть обсуждаемый механизм механизмом *однотактного замещения* (single-displacement reaction). Он отметил, что между реакциями, подчиняющимися подобному механизму, и хорошо известными в органической химии реакциями S_N2 -замещения (реакциями бимолекулярного нуклеофильного замещения) существует тесная взаимосвязь, и предположил, что реакции однотактного замещения, по-видимому, обычно сопровождаются обращением конфигурации у асимметрического атома.

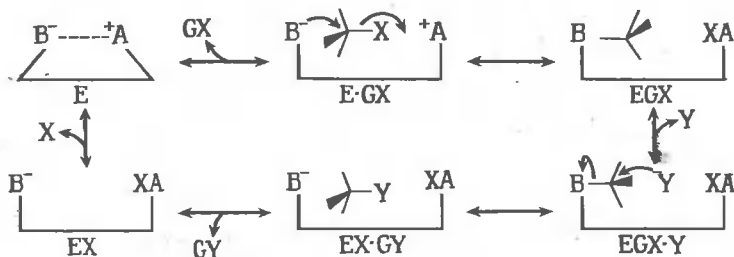
Механизм с замещением фермента Кошланд назвал механизмом *двухтактного замещения*, поскольку за первоначальным замещением X атакующей группой В, принадлежащей молекуле фермента, следует замещение В вторым субстратом, Y:



Эти реакции аналогичны реакциям в органической химии, в которых проявляются «эффекты соседней группы». Конечным результатом двух обращений конфигурации является восстановление исходной конфигурации у асимметрического атома.

Сохранение конфигурации может иметь место и в реакции однотактного замещения, если атакующая группа приближается с той же стороны, где находится уходящая группа («атака с тыла»). Речь идет о реакциях S_Ni -замещения (реакции внутреннего нуклеофильного замещения). Подобный механизм в органической химии встречается крайне редко (в основном лишь для реакций, протекающих с участием тионилхлорида или фосгена), однако в случае ферментативных реакций он, по-видимому, распространен более широко, поскольку условия, в которых протекает реакция на поверхности молекулы фермента, довольно необычны.

Изучение стереохимии ферментативных реакций является полезным методом исследования их механизмов, дополняющим рассмотренные ниже кинетические методы. Однако совсем не обязательно кинетические методы и методы изучения стереохимии реакции должны давать совпадающие результаты, поскольку в реакциях однократного замещения может иметь место сохранение конфигурации (в случае атаки с тыла), а реакции двухтактного замещения могут протекать через стадию образования тройного комплекса, если первая уходящая группа (X) остается связанной ферментом вплоть до второго замещения. Подобная ситуация может реализоваться в том случае, когда группа X остается присоединенной к кислой группе A^+ до тех пор, пока основная группа B^- не образует ионной связи с A^+ :



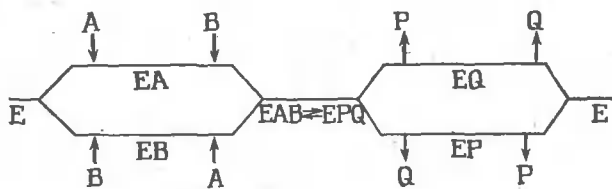
Предложенное Уонгом и Хейнсом схематическое изображение реакций переноса групп с использованием обозначений X, Y и G особенно полезно для качественного обсуждения механизмов, проведенного в данном разделе, поскольку оно позволяет наглядно представить каждый выделенный механизм. Однако для количественного описания кинетики действия ферментов подобный подход оказывается непригодным, потому что в нем не проводится четкого разграничения между субстратами и продуктами; кроме того, этот подход не позволяет обозначить концентрации реагентов простыми символами. Далее в этой главе мы вернемся поэтому к способу представления реагентов при помощи отдельных букв: A, B, ..., P, Q.... В механизмах с образованием тройного комплекса и упорядоченным присоединением субстратов через A и Q обозначаются реагенты, которые связываются со свободным ферментом; в механизме с неупорядоченным связыванием субстратов реагенты обозначаются произвольно; в механизмах с замещением фермента принимается, что к E присоединяются A и Q, а к E' — B и P, хотя направление пути, связывающего E с E', выбирается произвольно. Эти правила можно легко обобщить на случай реакций, включающих более двух субстратов или продуктов.

5.3. Классификация механизмов ферментативных реакций и схематическое их представление

Клеланд [30] предложил следующий способ представления механизмов ферментативных реакций: различные формы фермента записывают ниже горизонтальной линии, а стрелками обозначают присоединение субстратов и отщепление продуктов. Так, механизм с образованием тройного комплекса и упорядоченным присоединением субстратов и упорядоченным отщеплением продуктов представляется следующим образом:



Для обозначения «неупорядоченных» стадий используют разветвленные линии, как, например, в механизме с образованием тройного комплекса и неупорядоченным связыванием субстратов и неупорядоченным отщеплением продуктов:

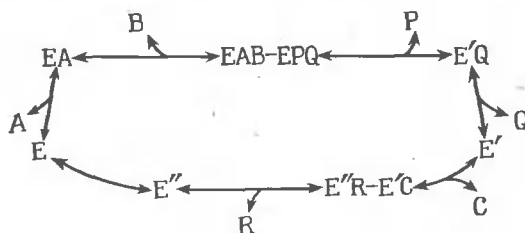


Идя вдоль схемы слева направо и придерживаясь указанного направления стрелок, получаем прямую реакцию. Обратной реакции соответствует обратный порядок образования ферментосодержащих комплексов и обратное направление стрелок. Подход Клеланда позволяет представлять механизмы ферментативных реакций в компактной форме и особенно удобен для представления простых механизмов с упорядоченным присоединением субстратов. Однако для механизмов, включающих «неупорядоченные» стадии или стадии взаимодействия с ингибитором, он менее удобен и не позволяет простым путем ввести константы скорости.

Клеланд [30] предложил также общую классификацию кинетических механизмов ферментативных реакций. Прежде всего, все двухсубстратные-двухпродуктные реакции названы *би-би*-реакциями. Механизм *би-би*-реакций с образованием тройного комплекса и неупорядоченным связыванием субстратов назван просто *неупорядоченным би-би-механизмом* (random bi bi mechanism), а механизм с образованием тройного комплекса и упорядочен-

ным связыванием субстратов — *упорядоченным би-би-механизмом* (ordered bi bi mechanism). Следует отметить, что если специально не оговорить вопросы, связанные с терминологией, название, которое дано последнему механизму, не позволяет отличить его от механизма с замещением фермента. Поэтому механизм с замещением фермента назван иначе — *пинг-понг-би-би-механизмом* (ping pong bi bi mechanism). Все механизмы, предполагающие, что отщеплению какого-либо продукта должно предшествовать связывание каждого из участвующих в реакции субстратов (в случае двухсубстратных-двухпродуктных реакций это механизмы с образованием тройного комплекса), называют *последовательными механизмами* (sequential mechanisms). Напротив, механизмы, в которых некоторые продукты освобождаются раньше, чем все субстраты свяжутся молекулой фермента, называют *пинг-понг-механизмами* (ping pong mechanisms). Для механизмов, содержащих стадию изомеризации свободного фермента, в название механизма включают приставку *изо*. Для обозначения числа стадий присоединения субстрата или отщепления продукта в тех случаях, когда может возникнуть неопределенность, используются приставки *уни*, *би*, *тер* и *квад*.

Подход Келланда в принципе применим ко всем сложным механизмам, хотя на практике словесное описание механизма или представление соответствующей кинетической схемы дает более ясную картину. Например, вряд ли такое название механизма, как *изо-би-би-уни-уни-пинг-понг* воспринимается легче, чем его словесное описание: «трехсубстратный-трехпродуктный механизм, в котором упорядоченное связывание первых двух субстратов сопровождается отщеплением двух продуктов; после этого происходит связывание третьего субстрата, высвобождение третьего продукта и, наконец, изомеризация фермента в исходную форму». В свою очередь кинетическая схема дает более ясное представление об этом механизме, чем любой из первых двух способов.



5.4. Уравнения скорости

Измерения стационарных скоростей сыграли исключительно важную роль для дифференциации различных механизмов реакций переноса групп. Необходимость разработки методов анализа кинетических механизмов обусловлена тем, что для подобных реакций существует большое число возможных механизмов, которые относительно мало различаются по кинетическим свойствам. Одними из первых осознали необходимость систематического подхода в исследовании кинетических свойств различных механизмов ферментативных реакций и вывели уравнения скорости для некоторых из них Сигал, Кахмар и Бойер [132]. Основные успехи в понимании механизмов реакций переноса групп были достигнуты в проведенных позднее исследованиях Альберти [3, 4] и Диила¹ [40]. Большинство методов, описанных в данной главе, разработано именно этими авторами.

Поскольку все методы дифференциации механизмов, построенные на измерении стационарных скоростей, используют различия в полных уравнениях скорости, целесообразно до обсуждения этих методов кратко рассмотреть уравнения скорости для механизмов различных типов. Уравнение скорости для механизма с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов было выведено в разд. 3.3 в качестве иллюстрации применения метода Кинга—Альмана. Оно имеет следующий вид:

$$v = \frac{e_0 (c_1 ab - c_2 pq)}{[c_3 + c_4 a + c_5 b + c_6 p + c_7 q + c_8 ab + c_9 ap + c_{10} bq + c_{11} pq + c_{12} abp + c_{13} bpq]} \quad (5.1)$$

Это уравнение содержит тринадцать коэффициентов, которые определяются комбинациями только восьми констант скорости. Следовательно, между коэффициентами должны существовать определенные соотношения, которые, однако, не отражаются в уравнении. Кроме того, коэффициенты не имеют четкого физического смысла. Были предприняты многочисленные попытки представить уравнения скорости в форме, содержащей параметры, имеющие более определенный физический смысл (см., например, [3.12, 30, 40, 108]). Простейшим из подходов с точки зрения понимания и использования является метод Клееланда, слегка видоизмененный в настоящей книге в соответствии с рекомендациями Комиссии по ферментам при Международном биохимическом союзе [84]. Для любого механизма максимальные скорости в прямом и обратном направлениях обозначаются через V_f и V_r соответственно (в достаточно ясных случаях индексы могут быть опущены). Кроме того, для каждого реагента задается константа Михаэлиса

¹ Некоторые советские авторы не совсем правильно пишут фамилию этого автора как Дальцил. — *Прим. перев.*

(K_M^A , K_M^B и т.д.) и «константа ингибирования» (K_i^A , K_i^B и т.д.). Физический смысл этих параметров станет ясен из последующих разделов этой главы, однако в общем константы Михаэлиса соответствуют K_M в односубстратной реакции, а константы ингибирования связаны (но не обязательно равны) с K_i и K_i' через величины, которые измеряются в экспериментах по ингибированию продуктами реакции. В определенных условиях константы ингибирования являются истинными константами диссоциации для фермент-субстратных комплексов, и поэтому некоторые исследователи обозначают их через K_s , а не через K_i .

В этой системе обозначений уравнение (5.1) принимает следующий вид:

$$v = \frac{\frac{V_f ab}{K_i^A K_M^B} - \frac{V_r pq}{K_M^P K_i^Q}}{1 + \frac{a}{K_i^A} + \frac{K_M^A b}{K_i^A K_M^B} + \frac{K_M^Q p}{K_M^P K_i^Q} + \frac{q}{K_i^Q} + \frac{ab}{K_i^A K_M^B} + \frac{K_M^Q ap}{K_i^A K_M^P K_i^Q} + \frac{K_M^A bq}{K_i^A K_M^B K_i^Q} + \frac{pq}{K_M^P K_i^Q} + \frac{abp}{K_i^A K_M^B K_i^Q} + \frac{bpq}{K_i^B K_M^P K_i^Q}}. \quad (5.2)$$

Соотношения, связывающие кинетические параметры уравнения (5.2) с константами скорости отдельных стадий, представлены в табл. 5.1.

Соответствующее уравнение для механизма с образованием тройного комплекса и неупорядоченным связыванием субстрата имеет следующий вид:

$$v = \frac{\frac{V_f ab}{K_i^A K_M^B} - \frac{V_r pq}{K_M^P K_i^Q}}{1 + \frac{a}{K_i^A} + \frac{b}{K_i^B} + \frac{p}{K_i^P} + \frac{q}{K_i^Q} + \frac{ab}{K_i^A K_M^B} + \frac{pq}{K_M^P K_i^Q}}. \quad (5.3)$$

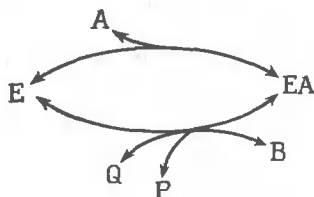
При выводе этого уравнения предполагается, что все стадии (за исключением стадии взаимного превращения форм ЕАВ и ЕРQ) равновесны. При сделанном допущении параметры K_i^A , K_i^B , K_i^P и K_i^Q представляют собой константы диссоциации комплексов ЕА, ЕВ, ЕР и ЕQ соответственно; K_M^A и K_M^B — константы диссоциации комплекса ЕАВ для отщепления А и В соответственно; K_M^P и K_M^Q — константы диссоциации комплекса ЕРQ для отщепления Р и Q соответственно. [Хотя уравнение (5.3) не содержит параметров K_M^A и K_M^Q , их нетрудно ввести, поскольку в обсуждаемом механизме $K_M^A K_i^B$ можно заменить на $K_i^A \times$

Для механизма с замещением фермента уравнение скорости записывается следующим образом:

$$v = \frac{\frac{V_f ab}{K_i^A K_M^B} - \frac{V_r pq}{K_i^P K_M^Q}}{\frac{a}{K_i^A} + \frac{K_M^A b}{K_i^A K_M^B} + \frac{p}{K_i^P} + \frac{K_M^P q}{K_i^P K_M^Q} + \frac{ab}{K_i^A K_M^B} + \frac{ap}{K_i^A K_i^P} + + \frac{K_M^A bq}{K_i^A K_M^B K_i^Q} + \frac{pq}{K_i^P K_M^Q}} \quad (5.4)$$

Смысл кинетических параметров понятен из табл. 5.1. В форме, записанной через коэффициенты, это уравнение совпадает с уравнением (5.1), за исключением того, что в знаменателе отсутствуют константа и члены, содержащие abr и $bprq$. Однако соотношения между параметрами в уравнении (5.4) иные: всюду, где можно было из сопоставления с уравнением (5.2) ожидать появления параметра $K_M^P K_i^Q$, оно содержит параметр $K_i^P K_M^Q$.

Уравнения скорости для вариантов рассмотренных механизмов, содержащих объединенные стадии, похожи, как правило, на исходные уравнения, однако в них отсутствуют определенные члены. Например, уравнение скорости для механизма Теорелла—Чанса, в котором связывание В и отщепление Р объединены в одну стадию, не содержит члена, включающего произведение концентраций b и p . Поэтому уравнение скорости для этого механизма совпадает по виду с уравнением (5.2), в котором исключены члены, содержащие abr и $bprq$. Если представить обсуждаемый механизм в еще более сжатой форме, добавив к объединенной стадии стадию отщепления Q, как это показано ниже, можно сделать интересное предсказание.



В этом случае из знаменателя выражения скорости реакции исчезают все члены, включающие ab , ap , bq , abr и $bprq$, и скорость реакции уже не приближается к конечной величине при одновременном увеличении a и b : при $a \rightarrow \infty$ и $b \rightarrow \infty$ v стремится к бесконечности. Подобный механизм выполняется, по-видимому, для каталазы [29]; скорость ферментативной реакции, катализи-

руемой каталазой, при высоких концентрациях обоих субстратов не обнаруживает тенденции к насыщению. Аналогичным свойством обладает и механизм Дудорова—Бэркера—Хессиды, однако экспериментальные данные подобного рода отсутствуют.

5.5. Измерение начальной скорости в отсутствие продуктов реакции

Если реакционная смесь не содержит продуктов реакции, то начальная скорость реакции, которая следует механизму с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов, определяется следующим выражением:

$$v = \frac{Vab}{K_i^A K_M^B + K_M^B a + K_M^A b + ab} \quad (5.5)$$

Это уравнение получается из уравнения (5.2) исключением членов, содержащих произведения концентраций. Чтобы выяснить смысл параметров V , K_i^A , K_M^B и K_M^A , необходимо проанализировать уравнение (5.5) при крайних значениях a и b . Если a и b очень велики, то уравнение принимает простой вид: $v = V$. Следовательно, V — это скорость реакции в условиях, когда концентрации обоих субстратов являются насыщающими; она соответствует, очевидно, максимальной скорости V в одно-субстратной реакции. Если b очень велика, то уравнение (5.5) принимает следующий вид:

$$v = \frac{Va}{K_M^A + a}$$

Это уравнение совпадает с уравнением Михаэлиса—Ментен. Таким образом, параметр K_M^A — это предельное значение константы Михаэлиса для реагента А при насыщающих концентрациях реагента В. Аналогичным образом параметр K_M^B представляет собой предельное значение константы Михаэлиса для реагента В при насыщающих концентрациях реагента А. Параметр K_i^A не идентичен параметру K_M^A , и его смысл становится ясным, если рассмотреть уравнение (5.5) в условиях, когда b очень мала (но не равна нулю):

$$v = \frac{(Vb/K_M^B)a}{K_i^A + a}$$

Следовательно, параметр K_i^A представляет собой предельное значение константы Михаэлиса для реагента А при $b \rightarrow 0$. Этот

параметр является также истинной константой диссоциации комплекса ЕА, поскольку в условиях, когда b стремится к нулю, скорость взаимодействия В с ЕА также уменьшается до нуля. В этих условиях реакцию связывания А с Е можно рассматривать как равновесную и считать, что выполняется допущение Михаэлиса—Ментен о равновесном связывании.

В уравнение (5.5) не входит параметр K_I^B , поскольку реагент В не связывается свободным ферментом. Тем не менее измерение начальных скоростей в отсутствие продуктов реакции не позволяет провести различия между реагентами А и В, потому что форма уравнения при взаимной замене реагентов остается неизменной.

Если варьировать концентрацию одного субстрата при фиксированных (но не насыщающих) концентрациях другого, то уравнение (5.5) по-прежнему можно будет представить в форме уравнения Михаэлиса—Ментен. Например, если варьируется a при постоянной b , то зависимость v от a имеет следующий вид:

$$v = \frac{\left(\frac{Vb}{K_M^B + b} \right) a}{\left(\frac{K_I^A K_M^B + K_M^A b}{K_M^B + b} \right) + a}.$$

Однако $V_{\text{каж}}$ и $K_{M, \text{каж}}$ (кажущиеся значения V и K_M^A) в этом случае зависят от b :

$$V_{\text{каж}} = \frac{Vb}{K_M^B + b}, \quad (5.6)$$

$$K_{M, \text{каж}} = \frac{K_I^A K_M^B + K_M^A b}{K_M^B + b}, \quad (5.7)$$

$$\frac{V_{\text{каж}}}{K_{M, \text{каж}}} = \frac{Vb}{K_I^A K_M^B + K_M^A b} = \frac{\frac{V}{K_M^A} \cdot b}{\frac{K_I^A K_M^B}{K_M^A} + b}. \quad (5.8)$$

При проведении эксперимента необходимо выбрать несколько разных значений b и далее при каждом из них измерить скорости при различных значениях a . Затем, точно так же как и в случае односубстратной реакции, например, из графика зависимости a/v от a (разд. 2.5), при каждом значении b можно определить $V_{\text{каж}}$ и $K_{M, \text{каж}}$. Подобный график называют *первичным* в отличие от вторичных графиков, которые будут кратко рассмотрены ниже. На

рис. 5.4 представлена типичная серия первичных зависимостей a/v от a для ферментативной реакции, описываемой уравнением (5.5). Для механизмов с образованием тройного комплекса характерно то обстоятельство, что первичные линейные зависимости

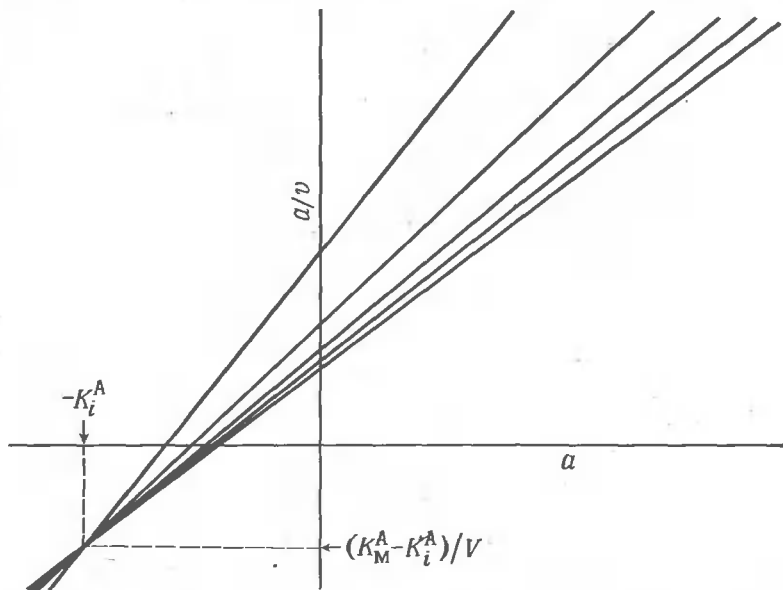


Рис. 5.4. Первичные графики зависимости a/v от a при различных фиксированных значениях b для механизмов с образованием тройного комплекса. Предполагается, что ингибирование избытком субстрата отсутствует. Зависимости b/v от b при различных фиксированных значениях a имеют аналогичный вид.

пересекаются в одной точке с координатами $a = -K_i^A$ и $a/v = (K_M^A - K_i^A)/V$. Точка пересечения должна быть расположена слева от оси ординат (a/v), причем положение ее относительно оси абсцисс (выше или ниже) зависит от того, больше или меньше параметр K_M^A величины K_i^A .

Уравнения (5.6) и (5.8) имеют тот же самый вид, что и уравнение Михаэлиса — Ментен. Иначе говоря, зависимости $V_{\text{каж}}$ или $V_{\text{каж}}/K_{M,\text{каж}}$ от a представляют собой равнобочные гиперболы, проходящие через начало координат, и их можно анализировать точно таким же образом, как и зависимости от a или b . Следовательно, уравнение (5.6) можно переписать следующим образом:

$$\frac{b}{V_{\text{каж}}} = \frac{K_M^B}{V} + \frac{1}{V} \cdot b.$$

Поэтому вторичный график зависимости $b/V_{\text{каж}}$ от b является пря-

мой с наклоном, равным $1/V$, и отрезком, отсекаемым на оси $b/V_{\text{каж}}$, равным K_M^B/V . Аналогичным образом из уравнения (5.8) получаем

$$\frac{bK_{M, \text{каж}}}{V_{\text{каж}}} = \frac{K_i^A K_M^B}{V} + \frac{K_M^A}{V} \cdot b.$$

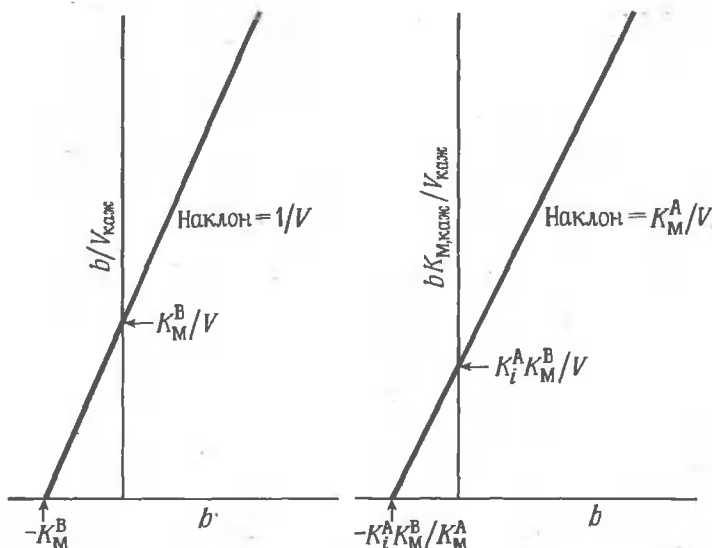


Рис. 5.5. Вторичные графики для механизмов с образованием тройного комплекса.

График зависимости $b/V_{\text{каж}}$ от b применим также для механизмов с замещением фермента.

Поэтому вторичный график зависимости $bK_{M, \text{каж}}/V_{\text{каж}}$ от b является прямой с наклоном, равным K_M^A/V , и отрезком, отсекаемым на оси $bK_{M, \text{каж}}/V_{\text{каж}}$, равным $K_i^A K_M^B/V$. Из этих вторичных графиков, представленных на рис. 5.5, можно легко рассчитать все четыре параметра уравнения (5.5): V , K_i^A , K_M^A и K_M^B .

Уравнение (5.7) графически также представляется равнобочной гиперболой, которая, однако, не проходит через начало координат, поскольку при $b \rightarrow 0$ $K_{M, \text{каж}} = K_i^A$. Эта гипербола определяется тремя параметрами и не может быть представлена в линейной форме. Как и в других случаях, $K_{M, \text{каж}}$ является менее удобным параметром, чем $K_{M, \text{каж}}/V_{\text{каж}}$.

Если субстратом с варьируемой концентрацией является В, нужно строить первичные графики зависимости b/v от b при различных фиксированных значениях a . Анализируют эти зависимос-

ти так же, как и в предыдущем случае. Единственное существенное отличие здесь состоит в том, что в уравнение (5.5) не входит K_i^B ; кроме того, всюду, где из простой замены А на В можно ожидать появления параметра K_i^B , следует вводить величину $K_i^A K_M^B / K_M^A$.

Первичные и вторичные графики используются главным образом для предварительного анализа кинетических данных и их графического представления. При определении кинетических констант следует отдать предпочтение статистическим методам, позволяющим проводить анализ всех экспериментальных данных одновременно. Эти методы рассмотрены в гл.10.

В случае механизма с образованием тройного комплекса и неупорядоченным связыванием субстратов для начальной скорости в отсутствие продукта реакции также выполняется уравнение (5.5), и поэтому только на основании измерения начальной скорости нельзя сделать вывод о том, каким является связывание субстратов — упорядоченным или неупорядоченным. Поскольку обсуждаемый механизм симметричен относительно А и В, величину $K_i^A K_M^B$ можно заменять на $K_i^B K_M^A$: эти два произведения равны между собой. В том случае, когда справедливо допущение о равновесном связывании субстратов (т.е. когда скорость распада ЕАВ с образованием продуктов гораздо меньше, чем скорость других стадий, имеющих первый порядок по концентрации реагента), K_i^A и K_i^B представляют собой константы диссоциации для комплексов ЕА и ЕВ соответственно, а K_M^A и K_M^B — две константы диссоциации для комплекса ЕАВ, соответствующие отщеплению А и В. Для графического анализа и для определения кинетических констант используются те же методы, что и в случае механизма с упорядоченным присоединением субстратов.

Для механизма с замещением фермента выражение для начальной скорости в отсутствие продукта имеет следующий вид:

$$v = \frac{Vab}{K_M^B a + K_M^A b + ab} \quad (5.9)$$

Наиболее замечательная особенность этого уравнения состоит в отсутствии константы в знаменателе. (Эта особенность является общей для всех механизмов с замещением фермента, о которых говорилось в разд 3.7.) Первичные зависимости, получаемые при варьировании концентрации одного из субстратов, имеют для данного механизма отличительные особенности. Например, если в опыте варьируется a , то кажущиеся значения V и K_M выражаются следующим образом:

$$V_{\text{кж}} = \frac{Vb}{K_M^B + b},$$

$$K_{M, \text{ каж}} = \frac{K_M^A b}{K_M^B + b},$$

$$\frac{V_{\text{ каж}}}{K_{M, \text{ каж}}} = \frac{V}{K_M^A}.$$

Из этих параметров при изменении b только один параметр — $V_{\text{ каж}}$ — меняется таким же образом, как и в случае механизмов с образованием тройного комплекса. Важным свойством механизма с замещением фермента является постоянство отношения $V_{\text{ каж}}/K_{M, \text{ каж}}$; оно равно V/K_M^A . $V_{\text{ каж}}/K_{M, \text{ каж}}$ не меняется при изменении b , однако в этом случае оно равно V/K_M^B . Первичные графики зависимости a/v от a или b/v от b представляют собой серии прямых, пересекающихся в одной точке, лежащей на оси a/v или b/v (рис. 5.6). Таким образом, за исключением довольно редкого случая, когда $K_i^A \ll K_M^A$, между первичными графиками, соответствующими механизмам с замещением фермента и механизмам с образованием тройного комплекса, существует четкое различие (сравните рис. 5.6 и 5.4).

Единственным вторичным графиком, необходимым для анализа механизма с замещением фермента, является график зависимости $b/V_{\text{ каж}}$ от b , который имеет те же особенности, что

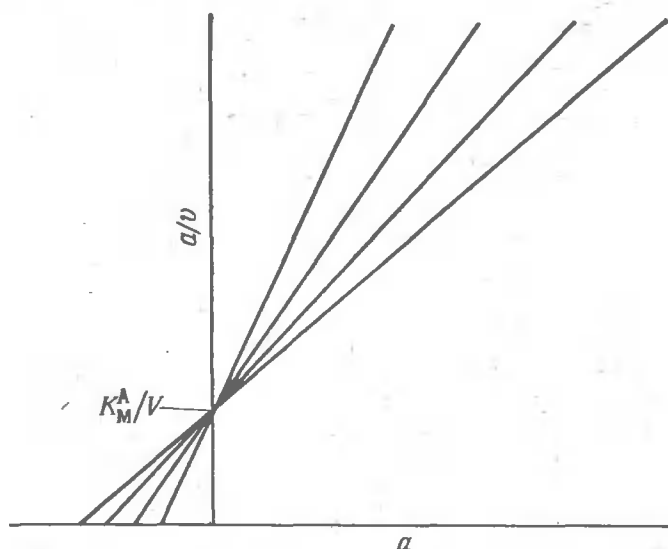


Рис. 5.6. Первичные графики зависимости a/v от a при различных фиксированных значениях b для механизмов с замещением фермента.

Предполагается, что ингибирование избытком субстрата отсутствует. Зависимости b/v от b при различных фиксированных значениях a имеют аналогичный вид.

и аналогичный график для механизмов с образованием тройных комплексов (рис.5.5).

Нетрудно понять, почему величина $V_{\text{каж}}/K_{\text{М,каж}}$ не зависит от концентрации того субстрата, концентрация которого в опыте не меняется. Достаточно вспомнить (см. разд.2.3), что величина $V/K_{\text{М}}$ представляет собой константу скорости псевдопервого порядка для ферментативной реакции при очень малых концентрациях субстрата. При $a \rightarrow 0$ скорость образования E' становится настолько малой, что B реагирует с этой формой с такой скоростью, с какой она образуется (при условии, что концентрация самого реагента B не стремится к нулю). Поскольку в начальный момент времени стадии отщепления обоих субстратов можно рассматривать как необратимые, изменение концентрации B в этих условиях может не оказывать никакого влияния на скорость полной реакции. Иными словами, величина $V_{\text{каж}}/K_{\text{М,каж}}$ не должна зависеть от b . По тем же соображениям в опытах, когда варьируется b , величина $V_{\text{каж}}/K_{\text{М,каж}}$ не должна зависеть от a . Напротив, в механизме с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов две стадии связывания субстратов не отделены друг от друга необратимой стадией. Поэтому, какой бы малой ни была a , скорость стадии $EA + B \rightleftharpoons EAB$ по-прежнему будет зависеть от b , и какой бы малой ни была b , скорость этой стадии продолжает зависеть от концентрации комплекса EA , которая в свою очередь зависит от a . Аналогичные рассуждения применимы к механизму с образованием тройного комплекса и неупорядоченным связыванием субстратов.

5.6. Ингибирование избытком субстрата

Выводы, к которым мы пришли в предыдущем разделе, строго говоря, справедливы только при малых концентрациях субстрата, поскольку для всех реальных механизмов двухсубстратных ферментативных реакций по меньшей мере один из четырех реагентов может присоединяться к «ошибочным» формам фермента. В механизме с замещением фермента субстрат и продукт, в которых отсутствует переносимая группа, обычно присоединяются к «ошибочной» форме свободного фермента. В механизме с образованием тройного комплекса и неупорядоченным связыванием субстратов субстрат и продукт присоединяются к «ошибочному» двойному комплексу. В механизме с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов к «ошибочному» двойному комплексу присоединяются либо второй субстрат, либо первый продукт, и субстратное ингибирование может наблюдаться либо для прямой, либо для обратной реакции (но не для обоих направлений), потому что только один из двух двойных комплексов может выступать в роли «ошибочного».

Для удобства примем, что в каждом механизме субстратом, являющимся в больших концентрациях ингибитором, является реагент В. Однако полученные результаты легко можно будет распространить и на другие реагенты.

В разд. 3.7 при обсуждении механизма с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов рассматривался непродуктивный комплекс ЕВQ. Для его учета каждый член для EQ в уравнении скорости нужно умножить на $(1 + k_{+5} b/k_{-5})$, где k_{-5}/k_{+5} — константа диссоциации комплекса ЕВQ. Уравнение (5.5) примет поэтому следующий вид:

$$v = \frac{V_{ab}}{K_i^A K_M^B + K_M^B a + K_M^A b + ab(1 + b/K_{si}^B)}, \quad (5.10)$$

причем параметр K_{si}^B не равен отношению k_{-5}/k_{+5} , поскольку член, включающий ab , относится к комплексу EQ только частично. В зависимости от соотношения между (ЕАВ—ЕРQ) и EQ в стационарном состоянии параметр K_{si}^B становится либо близким к отношению k_{-5}/k_{+5} , либо заметно больше его. Таким образом, для обсуждаемого механизма субстратное ингибирование ни при каких разумных концентрациях реагента В выявить не удастся.

Субстратное ингибирование, описываемое уравнением (5.10), эффективно только при высоких концентрациях реагента А и, следовательно, относится к бесконкурентному типу. Первичные зависимости b/v от b представляют собой параболы и пересекаются в точке $b = -K_i^A K_M^B/K_M^A$. Первичные зависимости a/v от a являются линейными, однако не имеют общей точки пересечения; эти зависимости представлены на рис.5.7.

Для механизма с образованием тройного комплекса и неупорядоченным связыванием субстратов при условии достаточно быстрого установления равновесия концентрация комплекса EQ в отсутствие Q равна нулю. Поскольку субстрат В не может связываться с формой, которая отсутствует, для обсуждаемого механизма субстратное ингибирование не обнаруживается до тех пор, пока не добавлен продукт Q. Если же допущение о быстро устанавливаемом равновесии не выполняется, то нет никаких оснований полагать, что субстратное ингибирование будет отсутствовать. Однако с уверенностью сказать, каков будет характер субстратного ингибирования, довольно трудно, поскольку уравнение скорости имеет весьма сложный вид. Комплекс ЕВQ в этой ситуации не является «тупиковым» (хотя некоторые исследователи свободно пользуются этим термином), потому что он может образоваться либо из ЕВ, либо из EQ и не должен обязательно находиться в равновесии с тем или иным двойным комплексом.

В механизме с замещением фермента в результате связывания В с Е образуется непродуктивный комплекс ЕВ. Комплекс ЕВ является «тупиковым», и поэтому $[ЕВ]/[Е] = b/K_{st}^B$, где K_{st}^B — константа диссоциации этого комплекса. Уравнение (5.9) принимает поэтому следующий вид:

$$v = \frac{Vab}{K_M^B a + K_M^A b (1 + b/K_{st}^B) + ab} \quad (5.11)$$

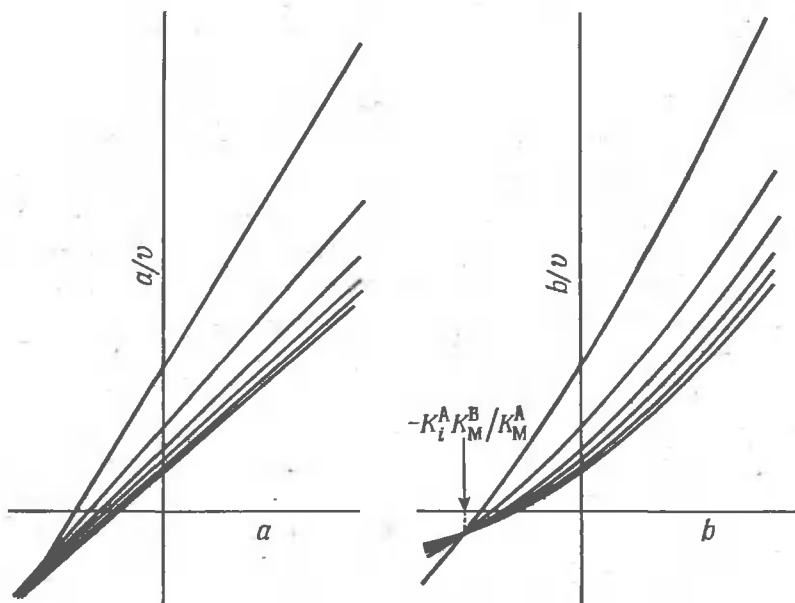


Рис. 5.7. Влияние ингибирования избытком субстрата В (при $K_{st}^B = 10K_M^B$) на первичные зависимости для механизмов с образованием тройного комплекса (сравните с рис. 5.4).

В соответствии с этим уравнением субстратное ингибирование наиболее эффективно при малых значениях a и, следовательно, относится к бесконкурентному типу. Первичные зависимости b/v от b графически снова представляются параболой, однако пересекаются они при $b = 0$, т.е. точка пересечения лежит на оси b/v . Первичные зависимости a/v от a линейны, причем не имеют общей точки пересечения, однако каждая пара прямых пересекается при положительных значениях a . Эти зависимости представлены на рис. 5.8.

На первый взгляд может показаться, что субстратное ингибирование серьезно усложняет анализ кинетических данных. На

самом деле оно очень информативно, так как позволяет обнаружить различие между механизмом, включающим образование тройного комплекса, и механизмом с замещением фермента. Кроме того, интерпретация данных по субстратному ингибированию обычно не представляет трудностей. Поскольку субстраты, как правило, обладают большим сродством к «правильным» формам

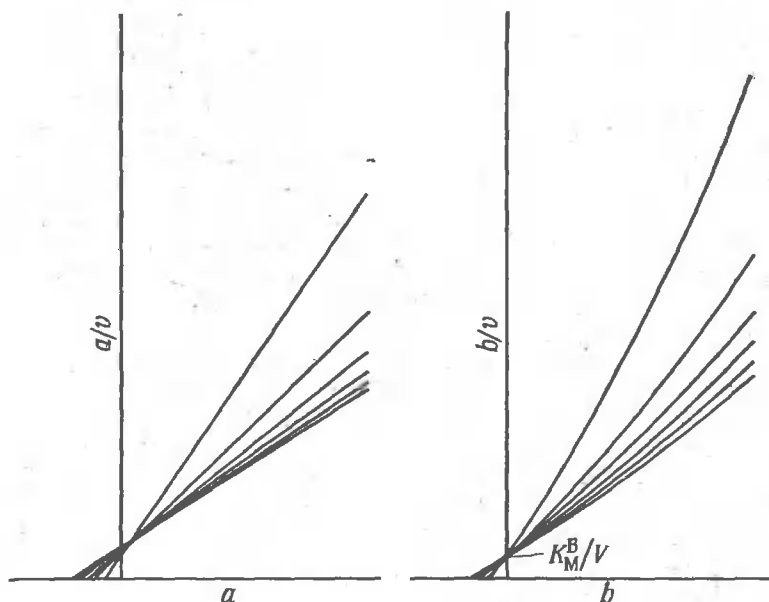


Рис. 5.8. Влияние ингибирования избытком субстрата В (при $K_{si}^B = 10 K_M^B$) на первичные зависимости для механизмов с замещением фермента (сравните с рис. 5.6).

фермента, чем к «ошибочным», субстратное ингибирование очень редко бывает настолько сильным, чтобы при низких концентрациях субстрата повлиять на анализ стационарных скоростей ферментативных реакций (разд. 5.5). Конкурентный характер субстратного ингибирования является убедительным доказательством подчинения реакции механизму с замещением фермента. Напротив, тот факт, что точка пересечения первичных зависимостей лежит на оси a/v или b/v , свидетельствует о невыполнимости этого механизма, поскольку он отражает особый случай образования тройного комплекса. Наконец, для механизма с образованием тройного комплекса и упорядоченным присоединением субстратов субстратное ингибирование позволяет идентифици-

ровать второй субстрат; в отсутствие субстратного ингибирования для решения этой задачи потребовалось бы проведение экспериментов по ингибированию продуктами реакции.

5.7. Обратимая реакция

Если можно изучить не только прямую, но и обратную ферментативную реакцию, то обычно имеет смысл провести такие исследования, поскольку они позволяют подтвердить и дополнить данные о механизме реакции, полученные из опытов по изучению прямой реакции. Для каждого из рассмотренных механизмов переноса групп обратная реакция полностью аналогична прямой. Например, опуская в полном уравнении скорости для механизма с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов [в уравнении (5.2)] члены, содержащие a и b , получаем

$$v = \frac{-V_r p q}{K_M^P K_I^Q + K_M^Q p + K_M^P q + p q} \quad (5.12)$$

Это уравнение можно сопоставить с уравнением (5.5) для прямой реакции. Знак минус означает, что уравнение относится к обратной реакции; если нет необходимости анализировать полное уравнение, содержащее концентрации всех четырех реагентов, его можно опустить.

Как и в случае односубстратных-однопродуктных реакций (разд.2.6), кинетические константы для прямого и обратного направлений мультисубстратной реакции связаны с константой равновесия K соотношениями Холдейна. Для любого механизма скорость реакции в равновесии должна быть равна нулю; на практике это означает, что должен быть равен нулю числитель в выражении для скорости реакции. Поэтому для уравнения (5.2) имеем

$$\frac{V_f a_\infty b_\infty}{K_I^A K_M^B} - \frac{V_r p_\infty q_\infty}{K_M^P K_I^Q} = 0,$$

т. е.

$$K = \frac{p_\infty q_\infty}{a_\infty b_\infty} = \frac{V_f K_M^P K_I^Q}{V_r K_I^A K_M^B}, \quad (5.13)$$

где a_∞ , b_∞ и т. д. — это значения концентраций при $t \rightarrow \infty$, т.е. в равновесии.

Второе соотношение Холдейна можно получить путем преобразований выражений для кинетических параметров, приве-

денных в табл.5.1:

$$K = \left(\frac{V_f}{V_r} \right)^2 \frac{K_i^P K_M^Q}{K_M^A K_i^B}. \quad (5.14)$$

Справедливость уравнения (5.13) не зависит от того, какой смысл имеют кинетические параметры, и поэтому это уравнение, очевидно, справедливо для любого механизма, описываемого уравнением (5.2), т.е. для механизмов, включающих изомеризацию EA, EAB или EQ. Удивительно, пожалуй, то, что уравнение (5.14) также носит общий характер и поэтому применимо к механизмам, включающим изомеризацию. Это совсем не очевидно и нелегко доказать, однако сделанное утверждение верно и следует из того, что в условиях, когда полная реакция достигает равновесия, не только полная скорость реакции равна нулю, но и каждая индивидуальная стадия также является равновесной. Для каждого механизма всегда можно получить одно соотношение Холдейна, воспользовавшись тем, что скорость реакции в равновесии равна нулю, а также приняв во внимание дополнительные соотношения, обычно вытекающие из рассмотрения кинетических параметров, выраженных через константы скорости. Например, для механизма с замещением фермента имеем

$$K = \frac{K_i^P K_i^Q}{K_i^A K_i^B} = \frac{V_f K_i^P K_M^Q}{V_r K_i^A K_M^B} = \frac{V_f K_M^P K_i^Q}{V_r K_M^A K_i^B} = \left(\frac{V_f}{V_r} \right)^2 \frac{K_M^P K_M^Q}{K_M^A K_M^B}.$$

Аналогичные соотношения имеют место и для других механизмов. Хотя в принципе соотношения Холдейна можно использовать для дифференциации механизмов ферментативных реакций, на практике этот подход не всегда оказывается самым лучшим, поскольку обычно измерить кинетические константы с такой точностью, чтобы дать однозначный ответ, не удается. Целесообразнее использовать уравнения Холдейна для проверки внутренней согласованности результатов, полученных другими методами. Если эксперимент позволяет рассчитать все кинетические параметры, то проверить выполнимость соотношений Холдейна не составляет труда, и каждую серию экспериментов рекомендуется всегда заканчивать именно такой проверкой.

Параметры уравнения скорости могут быть связаны рядом дополнительных соотношений, которые бывают иногда весьма полезными для выявления изомеризации промежуточных соединений. Другие подходы, основанные на измерении стационарных скоростей, не позволяют сделать этого. Введение стадий изомеризации промежуточных соединений не влияет на вид уравнения скорости (разд.3.7), однако может приводить к невыполнимости соотношений, связывающих определенные кинетические парамет-

ры. Например, если в механизме с образованием тройного комплекса и упорядоченным присоединением субстратов отсутствуют стадии изомеризации, то, преобразуя выражения для кинетических параметров, приведенные в табл.5.1, можно получить следующее соотношение:

$$\frac{V_f K_i^A}{V_r K_M^A} = 1 + \frac{k_{-1}}{k_{-2}}.$$

Поскольку как константа k_{-1} , так и константа k_{-2} должны быть положительными, справедливо следующее неравенство:

$$\frac{V_f K_i^A}{V_r K_M^A} \geq 1. \quad (5.15)$$

Аналогичным образом получаем

$$\frac{V_r K_i^Q}{V_f K_M^Q} \geq 1. \quad (5.16)$$

В отличие от соотношений Холдейна выполнимость неравенств (5.15) и (5.16) зависит от того, какой смысл имеют кинетические параметры, и эти соотношения для механизмов, включающих стадии изомеризации, выполняются не всегда: если способна к изомеризации форма ЕА, то перестает выполняться соотношение (5.15); если изомеризуется форма ЕQ, то неприменимым оказывается соотношение (5.16). Следовательно, тот факт, что экспериментально определенные значения кинетических параметров не удовлетворяют соотношениям (5.15) или (5.16), указывает на изомеризацию форм ЕА или ЕQ. Однако обратное утверждение *неверно*, т.е. выполнимость соотношений (5.15) или (5.16) не означает, что стадии изомеризации ЕА или ЕQ отсутствуют. Кроме того, подобный подход не позволяет выяснить, сколько стадий имеет изомеризация промежуточного соединения, и обнаружить изомеризацию самого тройного комплекса. (Для получения подобной информации необходимо провести исследования переходной фазы реакции; этот вопрос рассмотрен в гл.9). Тем не менее описанный подход был использован для доказательства существования стадий изомеризации в случае фосфатазы картофеля [79] и ряда других ферментов.

5.8. Ингибирование продуктом реакции

Среди всех существующих методов установления механизмов ферментативных реакций к числу наиболее полезных и простых относится метод изучения ингибирования продуктами реакции.

В том случае, когда в реакционную смесь добавляется только один продукт, член, соответствующий обратной реакции в уравнении скорости, равен нулю (за исключением редко встречающихся односубстратных реакций, которые обсуждаются в разд.5.10). Единственный эффект, который оказывает введение продукта реакции, состоит поэтому в том, что оно приводит к увеличению знаменателя в уравнении скорости и, следовательно, к торможению реакции. На вопрос о том, в какой роли будет выступать ингибитор — как конкурентный, бесконкурентный или смешанный, — готового ответа не существует. Характер ингибирующего действия продукта реакции зависит от того, концентрация какого субстрата меняется в опыте. Однако если вопрос о выборе субстрата с варьируемой концентрацией решен, то анализ ингибирования продуктом становится очень простым. Знаменатель каждого уравнения скорости разбивают на «варьируемые» и «постоянные» члены; первые содержат субстрат с варьируемой концентрацией, а вторые — нет. Как было показано в разд.5.5, $V_{\text{каж}}$ зависит от «варьируемых» членов, в то время как $V_{\text{каж}}/K_{\text{М,каж}}$ — от «постоянных». Поэтому (если мы вспомним, что говорилось о типах ингибиторов в гл.4) продукт выступает в роли конкурентного ингибитора в том случае, когда его концентрация входит только в постоянные члены, в роли бесконкурентного ингибитора — когда его концентрация входит только в «варьируемые» члены, и в роли смешанного ингибитора — когда концентрация продукта входит в оба члена. Если продукт может присоединяться только к одной из форм фермента, то в уравнение скорости входят члены, содержащие концентрацию продукта только в первой степени, и поэтому ингибирование будет линейным. Однако в том случае, когда продукт связывается также с «ошибочными» формами фермента и образуются «тушиковые» комплексы, возможно нелинейное ингибирование.

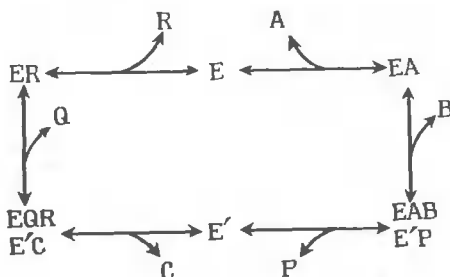
Приложение этих принципов анализа ингибирования продуктом реакции к механизму с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов [уравнение (5.2)] показывает, что Р является смешанным ингибитором независимо от того, концентрация какого субстрата (А или В) меняется в опыте, потому что для обоих субстратов член, содержащий Р, является «постоянным», а член, содержащий abp , — «варьируемым». В то же время q входит в виде множителя в произведение $b \times q$, произведение же $a \times q$ отсутствует, и поэтому Q выступает в роли конкурентного ингибитора, когда в опыте варьируется концентрация А, и в роли смешанного — когда варьируется концентрация В. Дополнительные данные можно получить, рассмотрев обратную реакцию: А является смешанным ингибитором по отношению к Р, но конкурентным по отношению к Q, в то время как В является смешанным ингибитором по отношению как к Р, так и к

Q. Все эти ингибиторы являются линейными, если образованием «тупикового» комплекса EBQ можно пренебречь. Для механизма с образованием этого комплекса в уравнении скорости появляются члены, содержащие b^2q и ab^2 (см. разд. 3.3 и 3.7), в результате чего ингибирование обратной реакции реагентом В становится нелинейным.

В том случае, когда субстрат, концентрация которого остается в опыте постоянной, используется в насыщающей концентрации, определенные типы ингибирования продуктом реакции исчезают. Например, если насыщающей является концентрация А, то члены уравнения (5.2), которые не содержат a , становятся несущественными, и q исчезает из уравнения скорости. Поэтому Q перестает быть ингибитором, когда варьируется b . В то же время p как в «постоянном», так и в «варьируемом» членах знаменателя сохраняется, и поэтому тип ингибирования, оказываемого Р, остается прежним. Напротив, если насыщающей является концентрация В и в опыте варьируется a , то Р становится бесконкурентным ингибитором, в то время как Q остается конкурентным ингибитором.

Нетрудно предсказать далее характер ингибирования продуктом реакции для любого другого механизма. Поскольку для анализа остальных двухсубстратных-двухпродуктных механизмов не требуется ничего принципиально нового, мы предлагаем читателю в качестве упражнения провести подобный анализ самостоятельно. Наиболее надежные данные об ингибировании продуктом реакции удастся получить, анализируя уравнение скорости, однако те же результаты может дать исследование механизма реакции без вывода уравнения. Конкурентное ингибирование возникает в одном из двух случаев: во-первых, когда ингибитор присоединяется к тем же формам, что и субстрат с варьируемой концентрацией, причем связывание одного лиганда исключает связывание другого, и, во-вторых, когда ингибитор, связываясь, вытесняет субстрат с варьируемой концентрацией (как это имеет место, например, в механизме Теорелла—Чанса). Обе ситуации означают, что связывание ингибитора препятствует связыванию субстрата, и приводят к одинаковому изменению уравнения скорости. Бесконкурентное ингибирование наблюдается в том случае, когда отсутствуют обратимые пути между стадиями связывания субстрата и связывания продукта. Для двухпродуктных механизмов бесконкурентное ингибирование в основном ограничивается уже рассмотренным случаем: ингибирование первым продуктом для механизма с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстрата при насыщающей концентрации второго субстрата. Однако для реакций с тремя и большим числом продуктов бесконкурентное ингибирование встречается чаще, а, например, для механизмов с упо-

рядоченным присоединением субстратов наблюдается неизменно по крайней мере для одного продукта. Рассмотрим следующий механизм:



Если присутствует только один продукт, то стадии, в которых высвобождаются другие продукты, являются необратимыми, поэтому Q выступает в роли бесконкурентного ингибитора при использовании в качестве субстрата с варьируемой концентрацией либо A, либо B; R является бесконкурентным ингибитором по отношению к C; однако P не является бесконкурентным ингибитором ни для какого субстрата. В то же время P при насыщающей концентрации B становится бесконкурентным ингибитором по отношению к A, потому что связывание B формой EA принимает необратимый характер.

Если полная реакция в эксперименте является обратимой, то механизм ее не может содержать никаких необратимых по своей природе стадий. Однако в двух упомянутых случаях отдельные стадии могут стать необратимыми: либо когда концентрация субстрата является насыщающей, либо когда отсутствует продукт реакции. К этому утверждению следует подходить с известной осторожностью. Насыщающая концентрация — это концентрация, которая приближается к бесконечности, а не просто высокая концентрация, и, чтобы сделать определенную стадию необратимой, может понадобиться концентрация, существенно превышающая достижимую экспериментально. С такой же осторожностью следует подходить к условию отсутствия продукта. В некоторых случаях, особенно если изучается реакция, направление которой термодинамически невыгодно, продукт реакции может быть настолько сильным ингибитором, что его действие становится заметным с самого начала реакции. Хорошим примером подобной ситуации может служить фумараза: Альберти и др. [6] обнаружили, что для получения более или менее надежных значений начальной скорости следует использовать начальные участки кинетических кривых с глубиной реакции, не превышаю-

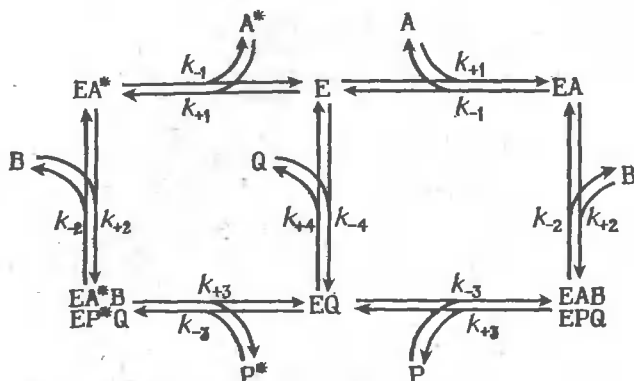
щей нескольких процентов. При этом следует применять также низкие концентрации субстрата как для прямой, так и для обратной реакции.

5.9. Изотопный обмен

Изучение начальных скоростей многосубстратных реакций в обоих направлениях, проводимое в присутствии и в отсутствие продуктов реакции, обычно позволяет исключить многие возможные типы механизмов и выяснить основные свойства механизма изучаемой реакции. Однако этот подход, как правило, не дает никакой информации о второстепенных путях реакции, которые вносят настолько малый вклад в общую скорость, что обнаружить их практически невозможно. Поэтому для окончательного решения вопроса о механизме реакции требуется дополнительная информация. Даже в том случае, когда результаты исследования начальных скоростей и ингибирования продуктом ясно указывают на определенный механизм, справедливость вывода целесообразно подтвердить независимым путем. Зачастую при этом весьма полезным оказывается метод изотопного обмена, который был введен в ферментативную кинетику Бойером [17].

Применяя метод изотопного обмена в ферментативной кинетике, делают два важных допущения. Эти допущения, как правило, выполняются, и часто их выполнимость просто подразумевается, однако во избежание недоразумений целесообразно еще раз четко сформулировать их. Первое допущение состоит в том, что реакция, протекающая с участием радиоактивных субстратов, имеет тот же механизм, что и нормальная реакция, и характеризуется теми же константами скорости. Иными словами, предполагается, что изотопные эффекты пренебрежимо малы. Это допущение в большинстве случаев выполняется, если радиоактивным атомом не является тритий. Однако если атом трития не участвует непосредственно в реакции и в связывании субстрата ферментом, то и в этом случае изотопными эффектами можно, по-видимому, пренебречь. Второе допущение состоит в том, что концентрации всех радиоактивных форм пренебрежимо малы по сравнению с концентрациями немеченых форм. Это допущение очень важно, поскольку оно позволяет существенно упростить анализ данных, обеспечить же его выполнимость не составляет труда.

Принципиальную основу метода изотопного обмена проще всего понять, рассмотрев в качестве примера перенос радиоактивного атома (обозначенного звездочкой) от A^* к P^* в механизме с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов:



Поскольку обмен протекает через стадию связывания A^* формой E , он может иметь место только при значительных концентрациях E . Ясно поэтому, что при высоких концентрациях A или Q обменная реакция будет тормозиться, так как соединения конкурируют с A^* за E . Зависимость обменной реакции от концентраций B и P носит более сложный характер. С одной стороны, обменная реакция протекает через стадию связывания B формой EA^* , и, чтобы мог идти обмен, вещество B должно присутствовать в конечной концентрации. С другой стороны, если концентрации B и P очень велики, фермент будет находиться преимущественно в форме (EA^*B-EP^*Q) , и поэтому форма E , к которой может присоединяться A^* , будет практически отсутствовать. Можно ожидать поэтому, что высокие концентрации B и P будут тормозить обмен; нетрудно показать, что это действительно так. Запишем выражения для скоростей изменения концентраций меченых промежуточных соединений и в соответствии с допущением о стационарном протекании процесса приравняем их к нулю:

$$\frac{d}{dt}[EA^*] = k_{+1}[E]a^* - (k_{-1} + k_{+2}b)[EA^*] + k_{-2}[EA^*B] = 0,$$

$$\frac{d}{dt}[EA^*B] = k_{+2}b[EA^*] - (k_{-2} + k_{+3})[EA^*B] + k_{-3}p^*[EQ] = 0.$$

Подставляя $p^* = 0$ и решая систему уравнений относительно $[EA^*B]$, получаем

$$[EA^*B] = \frac{k_{+1}k_{+2}[E]a^*b}{k_{-1}(k_{-2} + k_{+3}) + k_{+2}k_{+3}b}.$$

Начальная скорость обмена v^* равна $k_{+3}[EA^*B]$, следовательно,

$$v^* = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}[E]a^*b}{k_{-1}(k_{-2} + k_{+3}) + k_{+2}k_{+3}b}. \quad (5.17)$$

Чтобы пользоваться этим уравнением, необходимо знать величину $[E]$. Эта задача не представляет особых трудностей, если предварительно определены кинетические константы для реакции с немечеными субстратами. Проще всего (и это самый распространенный подход) изучать изотопный обмен в условиях, когда немеченные реагенты находятся в равновесии. В этом случае $[E]$ задается следующим соотношением:

$$[E] = \frac{e_0}{1 + \frac{k_{+1}a}{k_{-1}} + \frac{k_{+1}k_{+2}ab}{k_{-1}k_{-2}} + \frac{k_{-4}q}{k_{+4}}} \quad (5.18)$$

Подставляя выражение для $[E]$ в уравнение (5.17), получаем

$$v^* = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}e_0a^*b}{\left(1 + \frac{k_{+1}a}{k_{-1}} + \frac{k_{+1}k_{+2}ab}{k_{-1}k_{-2}} + \frac{k_{-4}q}{k_{+4}}\right)[k_{-1}(k_{-2} + k_{+3}) + k_{+2}k_{+3}b]} \quad (5.19)$$

Если в ходе реакции поддерживается равновесие, в выражение для v^* будут входить только три концентрации из четырех, какие именно — зависит от нашего выбора. Уравнение (5.19) содержит a , b и q , но не содержит p . Любую из трех концентраций (a , b или q) можно выразить через p , используя равенство

$$K = \frac{k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}}{k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}} = \frac{pq}{ab}$$

Пусть b и p изменяются таким образом, что их отношение остается постоянным (чтобы не нарушать равновесия), а значения a и q не меняются. Нетрудно видеть, как будет меняться при этом скорость изотопного обмена; для этого отметим, что знаменатель уравнения (5.19) является квадратичным относительно b , а числитель прямо пропорционален b . Следовательно, уравнение (5.19) имеет такой же вид, что и уравнение для простого субстратного ингибирования (разд.4.9). Поэтому при изменении a и b от нуля до насыщающих значений скорости обмена возрастает, достигает максимума и снижается до нуля.

Аналогичным образом можно вывести уравнения скорости для любой другой реакции обмена. Концентрации немеченых реагентов следует поддерживать равновесными (задача более простая, чем измерения стационарных скоростей), потому что уравнения для равновесных условий намного проще уравнений для стационарного состояния. Если в рассмотренном выше примере условия равновесия не выполняются, то уравнение (5.18) должно быть заменено соответствующим выражением для стационарной области реакции, т. е. уравнением (3.3), которое является гораздо более сложным.

В механизме с образованием тройного комплекса и упорядоченным связыванием субстратов переход радиоактивной метки

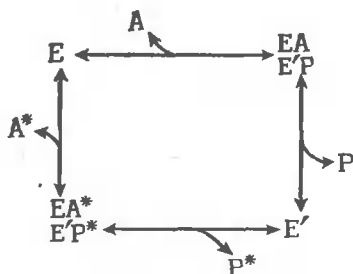
от B^* к R^* или Q^* не подавляется A , потому что при насыщающих концентрациях A форма EA не исчезает, а, напротив, ее концентрация растет. Сходные результаты получаются для обратной реакции: перенос радиоактивной метки от Q^* подавляется избытком R , а перенос от R^* не подавляется избытком Q .

Механизм с неупорядоченным присоединением субстратов отличается от механизма с упорядоченным присоединением тем, что ни одна из обменных реакций не подавляется избытком альтернативного субстрата полностью. Например, если B присутствует в избытке, то A^* не может связаться формой E , а вместо этого присоединяется к EB с образованием комплекса EA^*B , который может распадаться, давая R^* или Q^* . Поскольку радиоактивность определяется с очень высокой чувствительностью, метод изотопного обмена позволяет обнаружить второстепенные альтернативные пути реакции. Следует, однако, оговориться, что для получения методом изотопного обмена достаточно надежных результатов необходимы гораздо более очищенные препараты ферментов, чем при обычных кинетических измерениях. Причина этого очень проста. Допустим, что мы изучаем алкогольдегидрогеназу, которая катализирует реакцию



Если изучается полная реакция, присутствие небольших количеств балластных ферментов не имеет существенного значения, поскольку маловероятно, чтобы какая-либо из примесей была катализатором полной реакции. Однако, когда рассматривают обмен между НАД^+ и $\text{НАД} \cdot \text{Н}$, ситуация меняется: число ферментов, которые способны катализировать этот обмен, достаточно велико. Поэтому для того, чтобы получить надежные сведения об алкогольдегидрогеназе, нужно быть уверенным в том, что в препарате отсутствуют ферменты, катализирующие обмен между НАД^+ и $\text{НАД} \cdot \text{Н}$.

Метод изотопного обмена позволяет упростить анализ ферментативной реакции, подчиняющейся механизму с замещением фермента, поскольку в этом случае можно изучать только половину реакции:

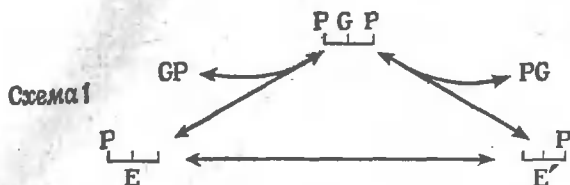


Этот механизм имеет такой же вид, что и полный механизм (он включает P^* и A^* вместо B и Q соответственно), однако характеризуется более простыми кинетическими свойствами, потому что константы скорости для обеих половин реакции одинаковы. Описанное свойство механизма с замещением фермента представляет собой его важное качественное отличие от механизмов с образованием тройного комплекса, поскольку для последних обмен отсутствует, пока ферментная система является неполной. Подобный метод дифференциации двух типов механизмов ферментативных реакций использовался и обсуждался в работах [45, 94] еще до применения метода изотопного обмена как кинетического метода.

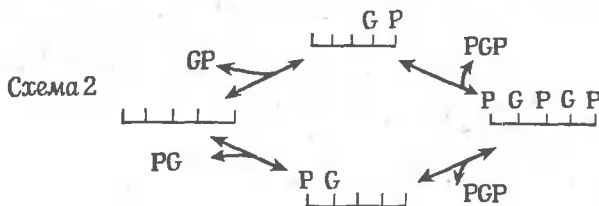
То обстоятельство, что изотопный метод позволяет изучать не механизмы в целом, а отдельные их части, особенно полезно при исследовании сложных механизмов с замещением фермента, включающих три или большее число субстратов. В подобных случаях любое упрощение кинетики действия фермента особенно желательно и дает хорошие результаты; подобный подход был довольно успешно использован Сидером и Шварцем [26] при изучении аспарагин-синтетазы.

5.10. Индуцированный перенос

Совершенно иной вариант использования метода изотопного обмена, известный как индуцированный перенос, был разработан Бриттоном [19, 20]. Он особенно полезен с точки зрения идентификации стадий изомеризации фермента в однопродуктных реакциях. Односубстратные-однопродуктные реакции во многих отношениях значительно проще мультисубстратных, однако при их изучении возникает одно существенное осложнение, обусловленное тем, что не удастся проанализировать характер ингибирования продуктом, исключив обратную реакцию. Это обстоятельство очень затрудняет однозначную идентификацию стадий изомеризации фермента. Далее, сама природа односубстратных-однопродуктных реакций, которые непременно должны представлять собой реакции изомеризации, обуславливает возможность появления стадий изомеризации фермента. Рассмотрим, например, фермент, катализирующий взаимное превращение глюкозо-1-фосфата (GP) и глюкозо-6-фосфата (PG), и допустим для простоты, что он представляет собой фосфофермент E , который в результате реакции превращается в другую форму фосфофермента, E' , причем механизм содержит еще одну (третью) стадию — стадию обратной изомеризации E' в E . Полный механизм может быть представлен следующей схемой:



Этот механизм учитывает одну (и, конечно, не единственную) возможность изомеризации фермента. Вторая возможность следует из того экспериментального факта, что фосфоглюкомутаза из скелетных мышц кролика требует для проявления каталитических свойств присутствия каталитических количеств глюкозо-1,6-дифосфата (PGP). Эту возможность можно учесть в схеме 1, если допустить, что PGP нужен для превращения дефосфорилированной формы фермента в активную форму. Еще одна возможность изомеризации фермента изображена на следующей схеме:



Здесь реакция протекает через образование тройного комплекса, причем PGP выступает одновременно в роли второго субстрата и первого продукта.

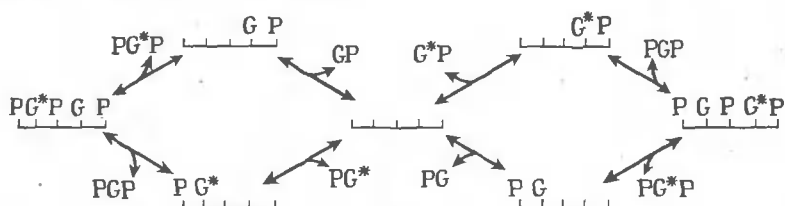
Возможны и другие механизмы односубстратных-однопродуктных реакций, но для иллюстрации достаточно обсудить два из них, приведенные выше. Отметим, что схема 1 в отличие от схемы 2 содержит стадию изомеризации фермента. Поэтому эти два механизма можно легко разграничить в опытах по ингибированию продуктом: если выполняется схема 1, то PG и GP должны быть смешанными ингибиторами; если выполняется схема 2, то PG и GP — это конкурентные по отношению друг к другу ингибиторы. В соответствии с этим Рэй и Росцелли [127], изучив реакцию, катализируемую фосфоглюкомутазой из скелетных мышц кролика, нашли, что ингибирование обоими фосфатами глюкозы носит чисто конкурентный характер, без всякой «примеси» неконкурентной составляющей. Они пришли к заключению, что в данном случае стадия изомеризации либо отсутствует, либо протекает так быстро, что формы E и E' можно рассматривать как единую форму. Тем не менее Бриттон и Кларк [21], проведя серию элегантных экспериментов (см. ниже), сумели однозначно показать, что для этого фермента выполняется схема 1.

Бриттон и Кларк изучали действие фосфоглюкомутазы, изме-

ряя обмен радиоактивной метки между GP и PG, однако их подход отличался от обычного следующим важным обстоятельством. Эти исследователи сначала дожидались установления равновесия между мечеными соединениями, а затем добавляли в большом избытке немеченый реагент (либо GP, либо PG) и наблюдали за удалением реакции с мечеными реагентами *от исходного* равновесия. Может показаться, что подобное направление реакции с мечеными реагентами противоречит законам термодинамики, однако оно возможно благодаря диссипации большого количества свободной энергии в реакции с немечеными реагентами. Используя ^{14}C -меченые реагенты (G^*P и PG^*), Бриттон и Кларк нашли, что реакция с мечеными соединениями протекает в обратном направлении по отношению к реакции с немечеными соединениями. Этот результат легко объясняется схемой 1: для того чтобы превратиться в PG^* , GP^* должен связаться первоначально с формой E; однако в присутствии больших количеств GP концентрация E пренебрежимо мала. В то же время, даже если константы k_{-3} и k_{+3} имеют высокие значения, небольшое количество формы E' всегда сможет связаться PG^* . Таким образом, отсутствие формы E препятствует протеканию реакции $\text{G}^*\text{P} \rightarrow \text{PG}^*$, а протеканию обратной реакции, $\text{PG}^* \rightarrow \text{G}^*\text{P}$, благоприятствует присутствие E'. Для ситуации, в которой в начальный момент времени между G^*P и PG^* существует равновесие, рассмотрим еще один путь, когда ферментативная реакция

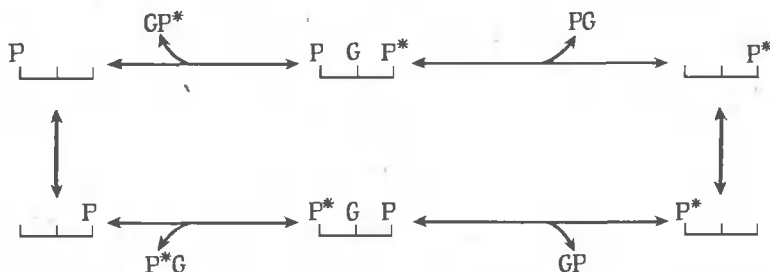


из-за нарушения баланса между E и E', вызванного сильным потоком немеченых реагентов, находится вдали от равновесия. Здесь быстрое превращение GP в PG должно сопровождаться медленным превращением PG^* и G^*P . Напротив, в присутствии большого избытка PG должна протекать медленная реакция превращения G^*P в PG^* . В схеме 2 для ^{14}C -обмена требуется участие немеченых реагентов:



В присутствии большого избытка GP все стадии в правом цикле направлены только по часовой стрелке, в то время как в левом цикле — только против. Таким образом, перенос метки от G^*P к PG^* возможен, а обратный перенос — нет. Следовательно, если ферментативная реакция следует схеме 2, то перенос метки дол-

жен происходить в направлении, совпадающем с направлением реакции с немечеными реагентами, что противоречит экспериментальным данным. Бриттон и Кларк подтвердили выполнимость механизма, описываемого схемой 1, используя также ^{32}P -меченые реагенты, GP^* и P^*G . Они нашли, что перенос происходит очень медленно, причем в том же направлении, что и реакция с немечеными реагентами. В случае схемы 1 перенос метки в фосфатной группе требует протекания реакции из 6 стадий, включающей образование в качестве промежуточного соединения ^{32}P -меченого фермента:



В этой схеме должен высвобождаться немеченый PG и связываться немеченый GP (движение по часовой стрелке). Избыток GP облегчает протекание обеих реакций, но тормозит обратные реакции. Таким образом, из-за отсутствия свободного фермента перенос метки от GP^* к P^*G возможен, хотя и протекает в неблагоприятных условиях, в то время как обратная реакция невозможна. Поэтому перенос ^{32}P -метки должен протекать с низкой скоростью, причем в направлении, соответствующем направлению реакции с немечеными реагентами, как и наблюдалось в опыте.

В схеме 2 перенос ^{32}P -атома должен осуществляться по сложному механизму, включающему три цикла. Анализ этого механизма приводит к такому же качественному выводу: перенос должен протекать в направлении, соответствующем протеканию реакции с немечеными реагентами. Однако кинетические свойства обсуждаемых двух схем различны, и Бриттон и Кларк показали, что их экспериментальные данные согласуются только со схемой 1.

Не желая слишком усложнять материал, мы рассмотрели процесс индуцированного переноса чисто качественно, но используя подходы, аналогичные тем, которые применялись при анализе обычного изотопного обмена, можно без труда получить соответствующие кинетические уравнения. Метод индуцированного переноса пока не получил широкого распространения, однако рассмотренный нами пример с фосфоглюкомутазой ясно показывает, насколько ценным он может быть для выяснения тех особенностей механизма ферментативных реакций, которые не обнаруживаются в экспериментах по ингибированию продуктом реакции.

Влияние pH и температуры на ферменты

6.1. pH и ферментативная кинетика

Главный недостаток, которым страдали ранние работы по ферментативной кинетике, состоял в том, что в них не придавали значения влиянию на ферментативный катализ H^+ -ионов. В водных растворах концентрация H^+ -ионов может меняться от 1 М до приблизительно 10^{-14} М. Этот огромный интервал обычно сжимают до разумных размеров введением логарифмической шкалы: $pH = -\lg[H^+]$. Свойства всех ферментов очень сильно зависят от pH, и механизм их действия невозможно понять, если не ввести как непременное условие проведения любого серьезного исследования контроль pH, что и было сделано Михаэлисом и его сотрудниками. На самом деле первый шаг в этом направлении сделал несколькими годами ранее Сёренсен [134], который ввел представление о шкале pH и описал использование буферных растворов в своей классической работе, показавшей, насколько важна концентрация водородных ионов в исследованиях ферментов. Несмотря на разногласия при интерпретации pH-эффектов в ферментативной кинетике, совершенно ясно, что любая попытка провести кинетическое исследование без соответствующего контроля pH бессмысленна.

Удивительным, пожалуй, является тот факт, что такое полезное для многих областей науки понятие, как pH, ввел энзимолог. Поэтому целесообразно обсудить те свойства ферментов, которые способствовали введению понятия pH в энзимологии до того, как это понадобилось сделать в гораздо более развитой области науки — в химической кинетике. За немногими исключениями (к числу которых относятся, например, пепсин и щелочная фосфатаза), наиболее изученные ферменты активны только в водном растворе при значениях pH в интервале от 5 до 9. На самом деле физиологически важную активность вне этого интервала обнаруживает только пепсин. Для области pH 5—9 значения концентраций водородных и гидроксильных ионов лежат в интервале от 10^{-9} до 10^{-5} М, т. е. весьма малы, и поэтому концентрации этих ионов очень чувствительны к примесям. Экстракты целых клеток и неочищенные препараты ферментов, как правило, обладают достаточной буферной емкостью из-за присутствия в них посторонних ферментов и других полиэлектролитов, однако в ходе очистки фермента эти соединения удаляются, так что при работе

с очищенными препаратами необходимо использовать искусственные буферы. До тех пор пока энзимологи не учитывали этого обстоятельства, ни о каких серьезных успехах в понимании особенностей ферментативной кинетики не могло быть и речи. Таким образом, развитие ферментативной кинетики на первых этапах сдерживалось недопониманием роли pH.

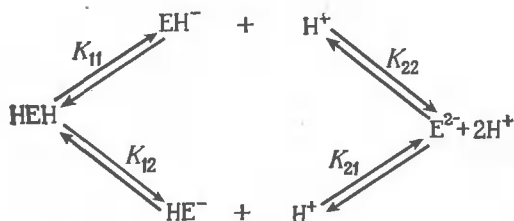
В общей химии ситуация совершенно иная: в водных растворах изучается лишь незначительная часть реакций, и при этом исследования проводят в основном либо при очень низких, либо при очень высоких значениях pH, когда концентрация водородных или соответственно гидроксильных ионов достаточно высока, чтобы ее можно было считать практически постоянной.

Простейший тип pH-зависимости скорости ферментативной реакции, наблюдаемый в том случае, когда в процессе ионизации участвует единственная кислая или основная группа, не отличается от общего случая гиперболического ингибирования или активации, рассмотренного в гл. 4. С формальной точки зрения протонирование основной группы фермента представляет собой просто частный случай связывания модификатора на особом центре, и поэтому приводить снова алгебраические выкладки для этого простейшего случая нет необходимости. Однако между протонами и другими модификаторами существуют определенные различия, вследствие чего протоны целесообразно рассматривать отдельно от модификаторов другого типа. Прежде всего активность практически всех ферментов зависит от концентрации протонов, и поэтому протон является гораздо более важным модификатором, чем любой другой модификатор. По своим размерам протон гораздо меньше всех химических соединений, и для него отсутствуют стерические ограничения. Это приводит к тому, что многие кинетические явления, невозможные для других модификаторов, для протона распространены весьма широко (например, чистое неконкурентное ингибирование). Концентрация протонов измеряется и контролируется в гораздо большем интервале, нежели при использовании любого другого модификатора, поэтому можно ожидать, что удастся зарегистрировать все вызываемые ими эффекты. Наконец, протоны обычно связываются с многими центрами в молекуле фермента, и для всестороннего анализа pH-зависимости скорости ферментативной реакции рассмотреть связывание протона только с одним центром, как правило, недостаточно.

6.2. Ионизация двухосновной кислоты

Молекула каждого фермента содержит большое число кислых и основных групп. В нейтральной области pH большая часть этих групп либо полностью депротонирована (аспартат и глутамат),

либо полностью протонирована (аргинин и лизин). Однако в молекуле фермента всегда имеется несколько групп со значениями pK_a в интервале от 5 до 9; это в первую очередь имидазольная группа гистидина и сульфгидрильная группа цистеина. Сюда могут попасть также N-концевые аминокислоты и некоторые другие группы, значения pK которых сдвигаются под влиянием соответствующего окружения в белковой молекуле. Следовательно, молекула фермента непременно содержит несколько групп, состояние ионизации которых меняется при варьировании pH , и это обстоятельство, конечно, усложняет изучение ионизации ферментов. Однако, к счастью, для описания поведения многих ферментов при варьировании pH в качестве первого приближения может быть использована простая модель, в которой принимаются во внимание только две ионизируемые группы. Эту модель впервые использовал Михаэлис [112]; в соответствии с ней фермент рассматривается как двухосновная кислота, HEH , с двумя разными кислыми группами:



Для каждой стадии ионизации на схеме указана соответствующая константа диссоциации. Обозначим для удобства концентрацию водородных ионов $[H^+]$ через h ; тогда в равновесных условиях концентрации всех форм фермента будут связаны с h соотношениями

$$[EN^-] = [HEH] K_{11}/h,$$

$$[HE^-] = [HEH] K_{12}/h,$$

$$[E^{2-}] = [HEH] K_{11} K_{22}/h^2 = [HEH] K_{12} K_{21}/h^2, \quad (6.1)$$

относительно которых следует сделать два замечания. Во-первых, хотя константы K_{11} и K_{21} характеризуют отщепление протона от одной и той же группы, K_{11} должна быть больше K_{21} , т.е. K_{11} не может быть равной K_{21} , поскольку форма HE^- имеет на один отрицательный заряд больше, чем HEH , и является, таким образом, менее сильной кислотой. По аналогичным соображениям $K_{12} > K_{22}$. Во-вторых, выражение для концентрации формы E^{2-} должно иметь один и тот же вид независимо от того, приходим мы к нему от HEH через EN^- или через HE^- (в против-

ном случае будет нарушен второй закон термодинамики). Поэтому два выражения для $[E^{2-}]$ в уравнении (6.1) должны быть эквивалентны друг другу, и, следовательно, $K_{11}K_{22} = K_{12}K_{21}$.

Учитывая, что полная концентрация фермента e_0 равна сумме концентраций всех его форм ($[HEN] + [EH^-] + [HE^-] + [E^{2-}]$), получаем

$$[HEN] = \frac{e_0}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}, \quad (6.2)$$

$$[EH^-] = \frac{e_0 K_{11}/h}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}, \quad (6.3)$$

$$[HE^-] = \frac{e_0 K_{12}/h}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}, \quad (6.4)$$

$$[E^{2-}] = \frac{e_0 K_{11}K_{22}/h^2}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}. \quad (6.5)$$

Эти выражения показывают, как зависят концентрации всех четырех форм от h (или — после несложных преобразований — от pH). Типичные зависимости $[HEN]$, $[EH^-]$, $[HE^-]$ и $[E^{2-}]$ от pH при произвольных значениях констант диссоциации представлены на рис. 6.1. В реальном эксперименте получить подобные кривые с такой же степенью точности никогда не удастся, поскольку невозможно одновременно определить все четыре константы диссоциации. Связано это с тем, что отношение $[EH^-]/[HE^-]$ равно K_{11}/K_{12} , т. е. постоянной величине, не зависящей от h . Это означает, что при любом изменении h изменение $[EH^-]$ сопровождается строго пропорциональным изменением $[HE^-]$. Следовательно, определить, какой вклад в данное свойство фермента дает форма EH^- , а какой — HE^- , невозможно. Поэтому на самом деле мы должны рассматривать EH^- и HE^- как единую форму, концентрация которой определяется выражением

$$[EH^-] + [HE^-] = e_0 \left/ \left(\frac{h}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{h} \right) \right., \quad (6.6)$$

где

$$K_1 = K_{11} + K_{12} = ([EH^-] + [HE^-])h/[HEN],$$

$$K_2 = K_{11}K_{22}/(K_{11} + K_{12}) = [E^{2-}]h/([EH^-] + [HE^-]).$$

Константы K_1 и K_2 называют молекулярными константами диссоциации, чтобы отличать их от констант диссоциации, харак-

теризующих ионизацию индивидуальных групп K_{11} , K_{12} , K_{21} и K_{22} . С практической точки зрения константы K_1 и K_2 имеют то преимущество, что их можно измерить, в то время как константы K_{11} , K_{12} , K_{21} и K_{22} , которые очень полезны для построения детальной схемы процесса ионизации фермента, определить из

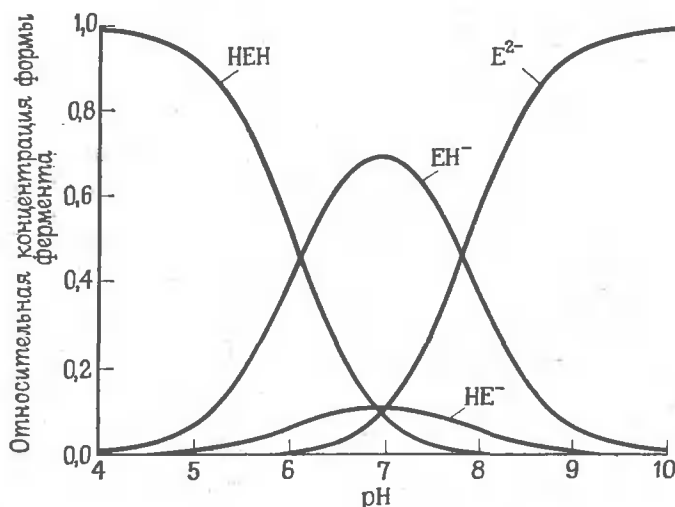


Рис. 6.1. Зависимости относительных концентраций форм фермента от pH для фермента HEN, содержащего две ионизируемые группы.

$pK_{11}=6,1$; $pK_{12}=6,9$; $pK_{21}=7,0$ и $pK_{22}=7,8$.

эксперимента не удастся, поскольку невозможно оценить величину K_{12}/K_{11} .

Выражения для $[HEN]$ и $[E^{2-}]$ можно записать с использованием молекулярных констант диссоциации:

$$[HEN] = e_0 \left/ \left(\frac{h^2}{K_1 K_2} + \frac{h}{K_2} + 1 \right) \right.,$$

$$[E^{2-}] = e_0 \left/ \left(1 + \frac{K_1}{h} + \frac{K_1 K_2}{h^2} \right) \right..$$

Уравнение (6.6) имеет смысл рассмотреть более детально, потому что для многих ферментов зависимость активности от pH графически представляется кривой колоколообразной формы, характерной для этого уравнения. С этой кривой связан ряд распространенных недоразумений. Во-первых, при некоторых значениях pK_1 и pK_2 (т. е. $-\lg K_1$ и $-\lg K_2$) она очень похожа на гауссову, однако на самом деле таковой не является. Это особенно хорошо

выявляется при $(pK_2 - pK_1) > 3$, когда максимум кривой сильно размывается. Во-вторых, значения pH, при которых $([EH^-] + [HE^-])$ составляет половину своего максимального значения, в общем случае нельзя считать равными соответственно pK_1 и pK_2 или даже близкими к этим параметрам, если только разность $(pK_2 - pK_1)$ не является достаточно большой, а это бывает не так

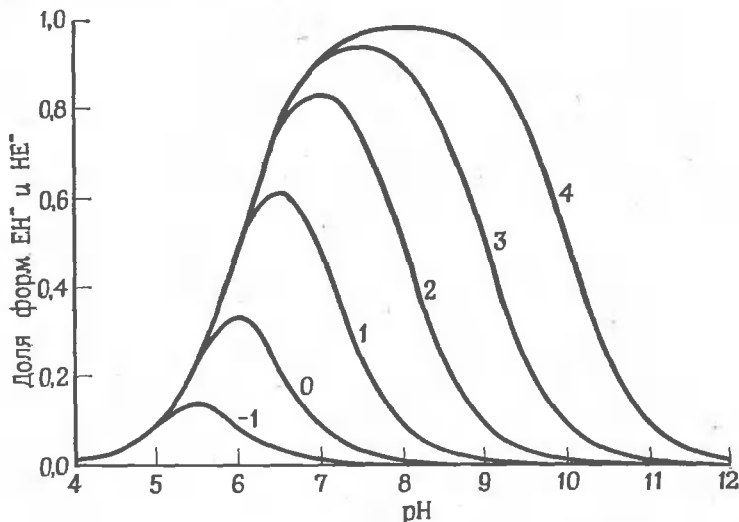


Рис. 6.2. Колоколообразные зависимости относительной концентрации однократно ионизированной формы фермента от pH, построенные исходя из уравнения (6.6) для $pK_1 = 6,0$ и значений pK_2 в интервале от 5,0 до 10,0.

Числа у кривых означают разность $(pK_2 - pK_1)$, которой и определяется форма кривой.

часто. Однако среднее указанных двух значений pH равно $(pK_1 + pK_2)/2$ и соответствует также величине pH, при которой кривая достигает максимума. Соотношения между полушириной кривой и разностью $(pK_2 - pK_1)$ представлены в табл. 6.1, а несколько характерных колоколообразных кривых приведено на рис. 6.2. В-третьих, даже если предположить, что pK_1 и pK_2 определены правильно, значения констант диссоциации, характеризующих ионизацию индивидуальных групп, остаются неизвестными; для этого необходимо привлекать соображения вероятностного характера, основанные, однако, на недоказуемых допущениях. Наконец, хотя условие $pK_2 < pK_1$ в принципе выполнимо, на самом деле оно реализуется очень редко, потому что в этом случае процесс протонирования должен быть кооперативным ([43], см. также гл. 7) и соотношения между константами диссоциации индивидуальных групп ($K_{11} > K_{21}$ и $K_{12} > K_{22}$) — те-

рять свою силу; если эти соотношения выполняются, то K_1 должна составлять по меньшей мере $4K_2$, т. е. $(pK_2 - pK_1) \geq 0,6$.

Таблица 6.1

СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ПОЛУШИРИНОЙ¹⁾ И РАЗНОСТЬЮ ЗНАЧЕНИЙ pK ДЛЯ КОЛОКОЛООБРАЗНЫХ pH -ЗАВИСИМОСТЕЙ

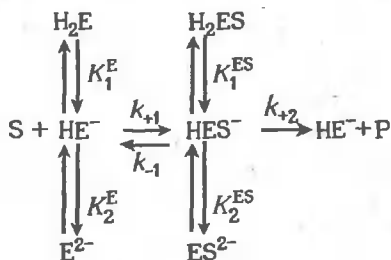
Полуширина	$pK_2 - pK_1$	Полуширина	$pK_2 - pK_1$	Полуширина	$pK_2 - pK_1$
1,14 ²⁾	$-\infty$	2,1	1,73	3,1	3,00
1,2	-1,27	2,2	1,88	3,2	3,11
1,3	-0,32	2,3	2,02	3,3	3,22
1,4	0,17	2,4	2,15	3,4	3,33
1,5	0,51	2,5	2,28	3,5	3,44
1,6	0,78	2,6	2,41	3,6	3,54
1,7	1,02	2,7	2,53	3,7	3,65
1,8	1,22	2,8	2,65	3,8	3,76
1,9	1,39	2,9	2,77	3,9	3,86
2,0	1,57	3,0	2,88	4,0	3,96

¹⁾ Под полушириной подразумевается разность значений pH для точек, значения ординаты которых составляют половину максимального.

²⁾ Значения полуширины, меньшие 1,14, возможны только для более сложного механизма ионизации, чем тот, который рассмотрен в тексте (например, для механизма, включающего более двух ионизируемых групп).

6.3. Влияние pH на константы скорости ферментативной реакции

Слегка модифицировав теорию ионизации двухосновной кислоты, можно использовать ее для анализа колоколообразных кривых, которым часто следуют pH -зависимости кинетических параметров ферментативной реакции V и V/K_M . (Анализ pH -зависимости параметра K_M , как будет видно ниже, довольно сложен.) Основной механизм ферментативной реакции с учетом ионизации фермента выглядит следующим образом:



Свободный фермент снова рассматривается как двухосновная кислота H_2E , характеризующаяся двумя молекулярными константами — K_1^E и K_2^E (как и в предыдущем разделе). Фермент-субстратный комплекс также считается двухосновной кислотой H_2ES , но с константами диссоциации K_1^{ES} и K_2^{ES} .

В рассматриваемой схеме к каталитическому превращению с образованием продуктов способен только однократно ионизованный комплекс HES^- . Необходимо отметить, что при составлении схемы сделан ряд неявных допущений, которые сильно упрощают картину. Прежде всего отсутствие стадий связывания субстрата для форм H_2E и E^{2-} означает, что стадии протонирования являются «тупиковыми» реакциями и поэтому их можно рассматривать как равновесные (разд. 3.6). Однако, поступая подобным образом, мы просто стремимся избежать трудностей в построении схемы, а не добраться до истины, потому что в большинстве случаев нет никаких оснований полагать, что субстрат (S) не может присоединяться непосредственно к H_2E и E^{2-} . Если в схему включить стадии связывания S формами H_2E и E^{2-} , то стадии протонирования перестают быть «тупиковыми» реакциями и их можно рассматривать как равновесные только в том случае, если допустить, что они являются очень быстрыми по сравнению с другими. Это допущение может показаться вполне естественным, если принять во внимание относительно простой характер рассматриваемой реакции, однако в некоторых случаях (в особенности когда протонирование индуцирует конформационное изменение) оно не выполняется.

В данной схеме подразумевается, что каталитическая реакция включает только две стадии, как и в простейшем механизме Михаэлиса — Ментен. Если ввести несколько дополнительных стадий и считать, что каждое промежуточное соединение способно к протонированию — депротонированию, то вид окончательного уравнения остается без изменений, однако при этом уже можно не надеяться, что нам удастся достаточно просто интерпретировать экспериментальные данные (сравните с результатом введения дополнительной стадии в простой механизм Михаэлиса — Ментен, разд. 2.6).

Наконец, допущение о том, что распадаться с образованием продуктов способна только форма HES^- , также не всегда верно; однако для многих ферментов, оно, по-видимому, вполне приемлемо, поскольку в большинстве случаев ферментативная активность приближается к нулю при высоких и низких значениях pH. Кроме того, согласно широко распространенной точке зрения, поразительная каталитическая эффективность многих ферментов обусловлена согласованным участием кислой и основной групп в каталитическом процессе.

Имея в виду, что рассмотренная схема выполняется лишь при самом благоприятном стечении обстоятельств, рассмотрим уравнение скорости, к которому она приводит. Если бы фермент был нечувствительным к изменению рН, т. е. если бы формы HE^- и HES^- были единственными формами фермента, то схема существенно упростилась бы и превратилась в обычный механизм Михаэлиса — Ментен, для которого скорость задается выражением

$$v = \frac{k_{+2} e_0 s}{\left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \right) + s} = \frac{\tilde{V} s}{\tilde{K}_M + s},$$

где $\tilde{V} = k_{+2} e_0$ и $\tilde{K}_M = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ — параметры V и K_M , скорректированные с учетом рН. Параметры \tilde{V} и \tilde{K}_M вводятся для удобства, они аналогичны «ожидаемым» значениям параметров (см. разд. 4.8, посвященный непродуктивному связыванию). Однако в действительности как HE^- не является единственной формой свободного фермента, так и HES^- не является единственной формой фермент-субстратного комплекса. Полное уравнение скорости имеет следующий вид:

$$v = \frac{k_{+2} e_0 s}{\left(\frac{h}{K_1^E} + 1 + \frac{K_2^E}{h} \right) \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + \left(\frac{h}{K_1^{ES}} + 1 + \frac{K_2^{ES}}{h} \right) s}.$$

Его можно записать в таком виде:

$$v = V s / (K_M + s),$$

где

$$V = \tilde{V} / \left(\frac{h}{K_1^{ES}} + 1 + \frac{K_2^{ES}}{h} \right), \quad (6.7)$$

$$K_M = \left(\frac{h}{K_1^E} + 1 + \frac{K_2^E}{h} \right) \tilde{K}_M / \left(\frac{h}{K_1^{ES}} + 1 + \frac{K_2^{ES}}{h} \right), \quad (6.8)$$

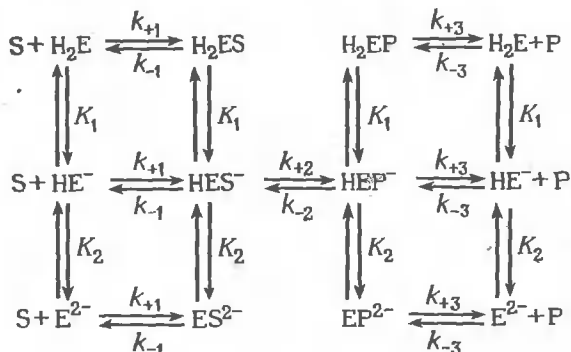
$$V/K_M = (\tilde{V}/\tilde{K}_M) / \left(\frac{h}{K_1^E} + 1 + \frac{K_2^E}{h} \right). \quad (6.9)$$

Зависимость V от h описывает ионизацию фермент-субстратного комплекса, а V/K_M от h — ионизацию свободного фермента. Зависимость же от рН параметра K_M , как и ранее, более сложна, поскольку K_M определяется ионизацией как свободной формы, так и фермент-субстратного комплекса. рН-зависимости параметров

V и V/K_M имеют симметричную колоколообразную форму. Что касается параметра K_M , то его pH-зависимость анализировать нет смысла, за исключением частного случая, рассмотренного в следующем разделе, когда эта зависимость очень проста.

6.4. Независимость K_M от pH

При изучении pH-зависимости кинетических параметров ферментативных реакций довольно часто наблюдается такая картина, когда параметр V заметно изменяется при варьировании pH, в то время как K_M остается постоянной. Постоянство K_M можно рассматривать как доказательство того, что она является истинной константой равновесия [64], но подобное заключение едва ли можно считать очевидным и необходимо тщательно его аргументировать. Действительно, согласно уравнению (6.8), K_M при $K_1^E = K_1^{ES}$ и $K_2^E = K_2^{ES}$ перестает зависеть от pH, каковы бы ни были значения k_{-1} и k_{+2} . Однако это утверждение неверно, поскольку, как обсуждалось в предыдущем разделе, уравнение (6.8) получено для слишком простой модели. Чтобы исправить положение, необходимо включить в схему стадии присоединения субстрата к формам H_2E и E^{2-} . Целесообразно также рассматривать стадии связывания отдельно от каталитических стадий, т. е. считать, что HES^- и HEP^- представляют собой отдельные формы. Далее вполне естественно допустить, что характер протонирования важен только для второй, каталитической стадии, но не для стадий связывания, т. е. протоны не оказывают влияния на связывание субстрата или продукта и наоборот. В таком случае модель принимает следующий вид:



Для этого сложного механизма нетрудно вывести уравнение стационарной скорости, даже применяя метод Кинга—Альтмана (см. гл. 3), хотя при этом нужно рассмотреть не менее 384 деревьев. К счастью, вывод существенно упрощается, если принять, что

стадии протонирования — депротонирования протекают очень быстро по сравнению с другими стадиями, и воспользоваться в полной мере упрощениями, введенными в разд. 3.6. Уравнение скорости оказывается идентичным уравнению Михаэлиса—Ментен с V и K_M , задаваемыми следующими выражениями:

$$V = \frac{k_{+2} k_{+3} e_0 f(h)}{(k_{+2} + k_{-2}) f(h) + k_{+3}}. \quad (6.10)$$

$$K_M = \frac{1}{k_{+1}} \left[k_{-1} + \frac{k_{+2} (k_{+3} - k_{-1}) f(h)}{(k_{+2} + k_{-2}) f(h) + k_{+3}} \right]. \quad (6.11)$$

В этих выражениях $f(h)$ — функция Михаэлиса

$$f(h) = 1 / \left(\frac{h}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{h} \right). \quad (6.12)$$

Из уравнений (6.10) и (6.11) можно найти условия, при которых V с изменением pH меняется, а K_M остается постоянной. Эти условия таковы: либо $k_{+3} = k_{-1}$, либо k_{+2} очень мала. В каждом из этих случаев выражение для K_M принимает простой вид: $K_M = = k_{-1}/k_{+1}$, т. е. K_M становится равной истинной константе диссоциации для комплекса HES^- . Таким образом, приняв данную модель, мы смогли доказать исходное утверждение. Фактически такой же результат мы получим, рассматривая и более общую модель: если каталитическая реакция включает более трех стадий, то просто становятся более сложными алгебраические выкладки, если же принимается, что все константы диссоциации для кислот H_2E , H_2ES и H_2EP имеют различные значения, то найти условия, при которых K_M не зависит от pH, не вводя в то же время гораздо менее правдоподобных допущений, очень трудно.

Интересно, что при $k_{-1} = k_{+3}$ для выполнения равенства $K_M = k_{-1}/k_{+1}$ совсем не обязательно, чтобы константа скорости k_{+2} была мала. На первый взгляд может показаться, что такое равенство констант очень маловероятно и не может быть предметом серьезного обсуждения. Вспомним, однако, что для многих метаболических реакций субстрат и продукт весьма близки по структуре и поэтому вполне могут связываться с ферментом в принципе одинаковым образом, а следовательно, константы скорости k_{-1} и k_{+3} будут примерно одинаковы.

Наконец, необходимо провести детальное сопоставление уравнений (6.7) и (6.10). Уравнение (6.7) более удобно для описания экспериментальных данных, но зато уравнение (6.10), по-видимому, лучше отражает реальную ситуацию. Подставляя выражение (6.12) для $f(h)$ в уравнение (6.10) и проведя преобразование, получаем

$$V = \frac{ak_{+2}e_0}{\frac{ah}{K_1} + 1 + \frac{aK_2}{h}}$$

где $\alpha = k_{+3}/(k_{+2} + k_{-2} + k_{+3})$. Из сопоставления этого уравнения с уравнением (6.7) видно, что все экспериментально измеряемые параметры (\tilde{V} , K_1^{ES} и K_2^{ES}) отличаются от соответствующих теоретических величин ($k_{+2}e_0$, K_1 и K_2) на неизвестный множитель α , т. е.

$$\tilde{V} / k_{+2}e_0 = K_1/K_1^{\text{ES}} = K_2^{\text{ES}}/K_2 = \alpha.$$

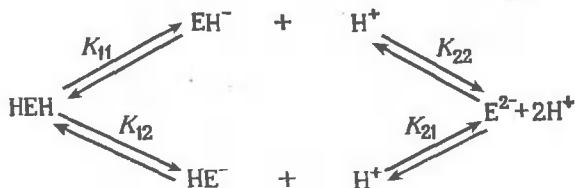
По определению α не может быть больше единицы, однако ничего другого об этой величине сказать нельзя. Далее, поскольку измеряемые константы диссоциации являются всегда молекулярными константами, а не константами, характеризующими ионизацию индивидуальных групп, встает вопрос, можно ли судить о стадиях протонирования фермента на основании измерений стационарных скоростей. Подобный скептицизм вполне оправдан, и при интерпретации экспериментальных данных по pH-зависимости кинетических параметров ферментативных реакций следует быть очень осторожными. Тем не менее почти во всех исследованиях эти зависимости интерпретируются в рамках модели, описанной в разд. 6.3, а измеряемые константы диссоциации обычно трактуются как константы, характеризующие ионизацию индивидуальных групп; до сих пор такие допущения не приводили к серьезным ошибкам при интерпретации pH-эффектов.

6.5. Ионизация групп, удаленных от активного центра

pH-эффекты для ферментативных реакций почти всегда об-суждаются в рамках моделей, предполагающих, что в молекуле фермента имеется лишь очень небольшое число ионогенных групп (часто только одна или две). Однако все ферменты содержат гораздо более чем две ионогенные группы, и поэтому возникает законный вопрос о том, обоснованно ли такое упрощение. Частично ответ на это дан уже в разд. 6.2: многие группы ионизируются в значительной степени только при значениях pH, лежащих за пределами рабочего интервала pH, и, следовательно, их ионизация не осложняет картины. Остальные ионогенные группы могут быть разделены на три класса: 1) группы, непосредственно участвующие в каталитическом процессе или в связывании субстрата; 2) группы, принимающие участие в этих процессах косвенным образом (например, либо потому, что они близки к каталитическим группам, либо потому, что они участвуют в поддержании конформации молекулы фермента и для выполнения

этой функции должны находиться в определенной ионной форме); 3) группы, которые удалены от активного центра и не оказывают практически никакого влияния на каталитическую активность. Любая более или менее реальная модель должна учитывать ионизацию групп первого класса и, как правило, второго. В тех случаях, когда число этих групп невелико, такая модель, позволяющая интерпретировать экспериментальные данные, достаточно проста. Группами третьего класса с полным основанием можно пренебречь. Это кажется очевидным, однако не следует рассматривать каждое непроверенное утверждение как очевидное и целесообразно показать его справедливость по крайней мере для простейшего случая.

Рассмотрим снова, как и в разд. 6.2, ионизацию двухосновной кислоты:



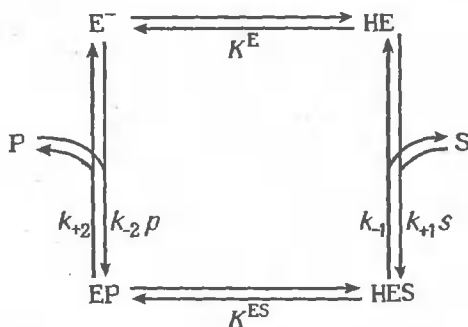
Допустим также, что ионизация двух групп происходит независимо друг от друга, т. е. $K_{21} = K_{11}$ и $K_{22} = K_{12}$, и что ферментативная активность определяется ионизацией только одной из двух ионогенных групп. Например, EH^- и E^{2-} обладают одинаковой активностью, а HEH и HE^- неактивны. В этом случае активность пропорциональна $([\text{EH}^-] + [\text{E}^{2-}])$. Подставляя в уравнения (6.3) и (6.5) равенство $K_{21} = K_{11}$ и $K_{22} = K_{12}$, получаем

$$[\text{EH}^-] + [\text{E}^{2-}] = \frac{e_0 \left(\frac{K_{11}}{h} + \frac{K_{11} K_{12}}{h^2} \right)}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11} K_{12}}{h^2}} = \frac{e_0}{\frac{h}{K_{11}} + 1}.$$

Таким образом, в уравнение не входит больше константа K_{12} , и рН-зависимость имеет точно такой же вид, как и для случая, когда ионизация второй группы не учитывается. Подобные упрощения возможны для всех моделей, в которых предполагается ионизация групп, не влияющих на ферментативную активность.

6.6. Смена одной лимитирующей стадии другой при варьировании pH

Для объяснения характера зависимости ферментативной активности от pH чаще всего используется подход Михаэлиса, в котором фермент рассматривается как двухосновная кислота; однако подобное объяснение не является ни единственным, ни даже самым простым. Альтернативный подход основан на использовании модели, рассматривающей только одну ионогенную группу, протонирование которой происходит на одной стадии реакции, а депротонирование — на другой. Например,



Из этой схемы видно, что при очень высоких значениях pH, когда концентрация формы HE бесконечно мала, связывание субстрата становится очень медленным и поэтому лимитирует скорость ферментативной реакции, а при очень низких значениях pH бесконечно малой становится концентрация формы EP и скорость реакции определяется скоростью высвобождения продукта. Скорость ферментативного процесса в целом в зависимости от pH должна поэтому представляться колоколообразной кривой, которая при экстремальных значениях pH стремится к нулю. К подобному выводу можно прийти и более строгим путем, рассмотрев уравнение скорости. Если стадии протонирования рассматривать как равновесные, скорость будет описываться уравнением Михаэлиса—Ментен с параметрами, зависящими от pH:

$$V = k_{+2} K^{ES} e_0 / (K^{ES} + h),$$

$$K_M = \frac{(k_{-1}h + k_{+2} K^{ES})(K^E + h)}{k_{+1}h (K^{ES} + h)},$$

$$V/K_M = k_{+1} k_{+2} K^{ES} e_0 h / (k_{-1}h + k_{+2} K^{ES})(K^E + h).$$

Нетрудно видеть, что зависимость V от pH представляет собой простой переход от нулевого значения до $K_2 e_0$. Положение этого

перехода относительно оси рН определяется единственной константой ионизации K^{ES} , соответствующей константе диссоциации кислоты HES; рН-зависимость V/K_M является колоколообразной, как и в подходе Михаэлиса. Зависимость параметра K_M от рН, как и ранее, имеет сложный вид, и ее нецелесообразно анализировать отдельно.

Если стадии протонирования не являются равновесными, то для рассматриваемого механизма, представляющего собой простой механизм с образованием тройного комплекса и упорядоченным присоединением субстратов и с водородными ионами в качестве как первого субстрата, так и первого продукта, уравнение скорости имеет еще не очень сложный вид. Так, можно воспользоваться выведенным для подобного механизма уравнением (5.2), изменив соответствующим образом обозначения. Строгий анализ показывает, что зависимость параметра V (так же как и V/K_M) представляется графически колоколообразной кривой.

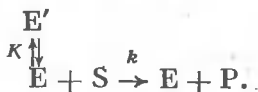
6.7. Температурная зависимость ферментативных реакций

Теоретические подходы, использованные в разд. 1.6 и 1.7 для объяснения температурной зависимости обычных химических реакций, в принципе применимы и к ферментативным реакциям. Однако на практике при изучении влияния температуры на скорость ферментативных реакций возникает целый ряд осложнений, о которых всегда нужно помнить, проводя подобные исследования. Прежде всего, почти все ферменты при температурах, заметно превышающих физиологические, денатурируют. При этом происходит изменение конформации молекулы фермента (часто необратимое) с одновременной потерей каталитической активности. По своей химической природе денатурация представляет собой очень сложный процесс и не получила еще полного объяснения. В данной книге этот вопрос рассмотрен в упрощенном виде. Будем считать процесс денатурации полностью обратимым и допустим, что в любой момент времени существует равновесие между активной и денатурированной формами фермента, причем денатурированный фермент представлен единственной формой.

При денатурации не происходит разрыва ковалентных связей, рвутся лишь водородные и другие слабые связи, участвующие в стабилизации конформации фермента, соответствующей активной форме. Хотя все эти связи существенно слабее ковалентных (энергия водородной связи составляет $20 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, в то время как энергия ковалентной связи равна приблизительно $400 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$), следует учитывать, что денатурация обычно сопровождается разрывом большого числа слабых связей. Поэтому стандартное изменение энтальпии (ΔH°) для реакции денатура-

ции, как правило, достаточно велико (200—500 кДж·моль⁻¹). Однако разрыв большого числа водородных связей существенно повышает число конформационных состояний молекулы фермента, вследствие чего денатурация характеризуется также очень большим стандартным изменением энтропии (ΔS°).

Влияние денатурации на экспериментально наблюдаемые константы скорости ферментативной реакции можно показать, рассмотрев следующую простую реакцию:



Здесь активный фермент E находится в равновесии с неактивной формой E' , а каталитический процесс представлен простой реакцией второго порядка, как это обычно имеет место при очень низких концентрациях субстрата. Зависимость константы равновесия (K) для процесса денатурации от температуры описывается уравнением Вант-Гоффа (разд. 1.6)

$$-RT \ln K = \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ,$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, ΔG° , ΔH° и ΔS° — стандартные изменения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии соответственно для процесса денатурации. Отсюда константу равновесия можно выразить следующим образом:

$$K = \exp(\Delta S^\circ/R - \Delta H^\circ/RT).$$

Зависимость константы скорости k от температуры подчиняется уравнению Аррениуса, представленному в интегральной форме:

$$k = A \exp(-E_a/RT),$$

где A — константа и E_a — энергия активации. Скорость реакции определяется выражением $v = k[E][S]$, в котором концентрацию активного фермента $[E]$ необходимо выразить через полную концентрацию фермента e_0 . В результате получаем

$$v = ke_0s/(1 + K).$$

Наблюдаемую константу скорости $k_{\text{набл}}$ можно записать как $k/(1 + K)$; она изменяется с температурой по следующему закону:

$$k_{\text{набл}} = \frac{A \exp(-E_a/RT)}{1 + \exp(\Delta S^\circ/R - \Delta H^\circ/RT)}.$$

При низких температурах, когда величина $\Delta S^\circ/R$ мала по сравнению с $\Delta H^\circ/RT$, вклад экспоненциального члена в знаменателе является несущественным, и поэтому зависимость $k_{\text{набл}}$ от темпе-

ратуры описывается обычным уравнением Аррениуса. Однако при температурах выше чем $\Delta H^\circ/\Delta S^\circ$ знаменатель очень быстро растет с увеличением температуры, в результате чего скорость резко падает до нуля.

Хотя эта модель является весьма упрощенной, она объясняет, почему уравнение Аррениуса оказывается неприменимым для описания температурной зависимости ферментативных реакций при высоких температурах. В ранних работах по ферментативной кинетике обычно приводился такой параметр, как *оптимальные температуры* для ферментов. Однако следует отметить, что температура, при которой $k_{\text{набл}}$ достигает максимального значения, с практической точки зрения не имеет особого смысла, поскольку, как оказалось, характер температурной зависимости ферментативных реакций зависит от постановки эксперимента. В частности, чем дольше инкубируется реакционная смесь перед определением активности, тем ниже наблюдаемая «оптимальная температура». Объясняется это тем, что денатурация, как правило, протекает довольно медленно, и, следовательно, эту стадию нельзя рассматривать как равновесную. Степень денатурации растет с увеличением времени инкубации, что нетрудно обнаружить современными экспериментальными методами: при непрерывной регистрации ферментативной реакции выявляются протекающие во времени процессы.

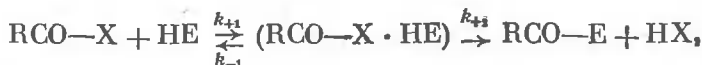
Из-за трудностей, связанных с денатурацией, исследования температурной зависимости скорости ферментативных реакций обычно дают надежные результаты только в относительно небольшом интервале температур (например, между 0 и 50°C). Однако даже в этом случае при интерпретации данных следует соблюдать известную осторожность. Вряд ли имеет смысл изучать температурные зависимости параметров V , V/K_M или K_M , если неясен их физический смысл. Так, если K_M является функцией нескольких констант скорости, то температурная зависимость этого параметра будет определяться сразу многими факторами и поэтому не будет представлять особого интереса. Однако если с достаточной достоверностью известно, что K_M представляет собой истинную константу диссоциации, то из температурной зависимости параметра K_M можно получить данные о термодинамике процесса связывания субстрата ферментом. Аналогичным образом температурная зависимость параметра V представляет интерес только в том случае, если известно, какую стадию ферментативной реакции этот параметр характеризует.

Другое обстоятельство, которое следует иметь в виду, состоит в том, что влияния pH и температуры не являются в общем случае независимыми, поскольку, как правило, константы ионизации зависят от температуры. Ясно поэтому, что, прежде чем интерпретировать результаты исследований, проведенных при различ-

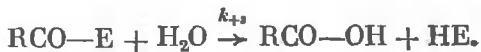
ных температурах, необходимо ввести соответствующие поправки, учитывающие pH (разд. 6.3). В связи с этим важно помнить также, что константа ионизации воды (K_w) сильно зависит от температуры и pK_w (т. е. $-\lg K_w$) равен 14,0 только при 24°C, а при температуре 37°C, часто используемой при изучении ферментативных реакций, $pK_w = 13,62$, и поэтому нейтральный pH равен 6,8, а не 7,0. С повышением температуры отклонения становятся еще большими. Это обстоятельство исключительно важно при изучении реакций, в которых ионы OH^- принимают непосредственное участие, в особенности при сопоставлении ферментативных реакций с реакциями, катализируемыми основаниями.

6.8. Использование температурного фактора для изучения специфичности фермента

В предыдущем разделе мы потратили очень много усилий на то, чтобы предостеречь читателя от поверхностного изучения температурной зависимости скоростей ферментативных реакций. Было бы ошибочным считать, однако, что такие исследования бесполезны; напротив, при соблюдении необходимых мер предосторожности они могут дать весьма ценную информацию о механизме ферментативной реакции. Подобный подход является особенно плодотворным при изучении специфичности фермента. Если достоверно известно, что сопоставляемые величины подобны (например, сравнение констант $k_{кат}$, т. е. V/e_0 , для двух субстратов будет корректным только в том случае, когда для каждого из субстратов $k_{кат}$ относится к одной и той же стадии реакции), то сопоставление параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger часто оказывается гораздо более информативным, чем сопоставление простых констант скорости. Классическим исследованием подобного типа может служить работа, проведенная Бендером, Кезди и Гантером [10] по изучению катализируемого α -химотрипсином гидролиза многочисленных субстратов. Считается, что для этой реакции выполняется механизм с образованием *ацилфермента*, т. е. механизм с замещением фермента, в котором сначала субстрат $RCO-X$ ацилирует фермент HE:



с одновременным высвобождением первого продукта HX , а затем ацилфермент $RCO-E$ реагирует с водой; на второй стадии происходит регенерация свободного фермента и отщепление второго продукта $RCO-OH$:



Поскольку для одних субстратов (в частности, в данном случае) $k_{+3} \gg k_{+2}$, а для других $k_{+2} \ll k_{+3}$, прямое сопоставление величин $k_{\text{кат}}$ очевидно, бессмысленно. Однако Бендер, Кезди и Гантер, сравнивая результаты, полученные с различными субстратами, смогли провести раздельное определение констант k_{+2} и k_{+3} . Например, серия эфирных производных ацетил-L-тирозина характеризуется одинаковым значением $k_{\text{кат}}$, которое отличается от значения $k_{\text{кат}}$ для аналогичной серии производных ацетил-L-триптофана. Это означает, что для этих субстратов $k_{+2} \gg k_{+3}$ и $k_{\text{кат}} = k_{+3}$. Таким образом, авторы измерили значения k_{+3} для ряда ацилхимотрипсинов при различных температурах и обнаружили большие различия между производными специфических субстратов (таких, как ацетил-L-тирозилхимотрипсин) и производными неспецифических субстратов (таких, как ацетилхимотрипсин). Отчасти эти вариации могут быть обусловлены различиями в реакционной способности самих ацильных групп, имеющей неферментативную природу. Для того чтобы учесть этот фактор, Бендер, Кезди и Гантер разделили каждое значение k_{+3} на константу скорости процесса омыления (т. е. гидролиза, катализируемого гидроксильными ионами) соответствующих этиловых эфиров. Скорректированные значения k_{+3} и рассчитанные из температурной зависимости этого параметра величины ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger представлены в табл. 6.2.

Таблица 6.2

АКТИВАЦИОННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА НЕКОТОРЫХ АЦИЛХИМОТРИПСИНОВ [10]

Ацильная группа	Относительное значение k_{+3} (скорректированное)	ΔH^\ddagger , кДж·моль ⁻¹	ΔS^\ddagger , Дж·моль ⁻¹ ·град ⁻¹
Ацетил-L-тирозильная	3540	43,3	-56,3
Ацетил-L-триптофавильная	942	50,4	-83,2
транс-Циннамоильная	15	47,0	-124,3
Ацетильная	1	40,7	-150,8

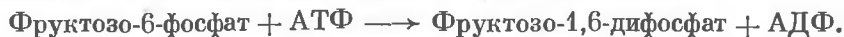
Наиболее удивительным в этих данных оказалось отсутствие какой-либо заметной корреляции между k_{+3} и ΔH^\ddagger . Действительно, величина ΔH^\ddagger меняется незначительно, и, по-видимому, энергетический фактор не играет существенной роли на стадии деацилирования. Изменение k_{+3} почти целиком обусловлено изменением в широком диапазоне величины ΔS^\ddagger . Это означает, что скорость реакции определяется в основном вероятностью того, что ацильная группа примет правильную ориентацию в активном центре. Для больших по размеру специфических групп (например, для ацил-

L-тирозильной группы) число возможных ориентаций ограничено, и поэтому вероятность правильной ориентации довольно высока. В случае же неспецифических групп небольшого размера существует очень много возможных ориентаций, вследствие чего вероятность правильной ориентации оказывается гораздо меньшей. Следует отметить, что подобные заключения о специфичности химотрипсина были сделаны на основании сопоставления ацилхимотрипсинов, полученных из L- и D-аминокислот [83] (разд. 4.8).

Контроль ферментативной активности

7.1. Необходимость контроля метаболических процессов

Очевидно, что метаболические процессы во всех живых организмах должны очень четко контролироваться, чтобы обеспечить строго направленные изменения, избежав при этом катастрофического срыва в направлении к состоянию термодинамического равновесия. Однако ферменты, имеющие рассмотренные в предыдущих главах кинетические свойства, вряд ли способны в должной мере обеспечить подобный контроль. Имеет смысл поэтому предварительно обсудить одну из важных стадий метаболизма — взаимное превращение фруктозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-дифосфата — и выяснить, какими кинетическими свойствами должны обладать «регулируемые» ферменты. Для превращения фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-дифосфат требуется АТФ:



Это превращение катализируется фосфофруктокиназой и представляет собой первую стадию гликолиза, которая присуща только этому процессу, иначе говоря, это стадия гликолиза, которая не входит ни в какие другие метаболические процессы. Стадия превращения фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-дифосфат вполне может поэтому контролировать весь процесс гликолиза и, несомненно, является его ключевой стадией. В физиологических условиях эта реакция практически необратима, и в глюконеогенезе обратная реакция протекает обходным путем, а именно путем гидролиза фруктозо-1,6-дифосфата, катализируемого фруктозо-дифосфатазой:



Эта реакция также практически необратима. Факт одновременного существования двух необратимых реакций имеет для метаболического контроля огромное значение: он означает, что направление потока может контролироваться активностями двух ферментов. Простая обратимая реакция не могла бы контролироваться подобным образом, потому что катализатор не способен влиять на направление потока реагирующих веществ, которое определяется исключительно термодинамическими факторами.

Если бы обе реакции протекали неконтролируемым образом с одинаковыми скоростями, то суммарный поток между фруктозо-6-фосфатом и фруктозо-1,6-дифосфатом оказался бы равным нулю, однако при этом должен был бы происходить непрерывный гидролиз АТФ, что неминуемо ведет к смерти. Подобная совокупность реакций названа «бесполезным циклом». Воспрепятствовать протеканию бесполезного цикла можно либо пространственным разделением двух процессов, либо обеспечением такого контроля, при котором активность одного из ферментов возможна только при подавлении активности другого. В какой-то степени контроль достигается компартиментализацией, однако в таких тканях, как почка и печень, где может происходить и гликолиз и глюконеогенез, подобный путь невозможен, и поэтому здесь необходим определенный контроль активности фосфофруктокиназы и фруктозодифосфатазы.

Рассмотрим теперь вопрос о том, возможен ли достаточно точный контроль активности фермента, свойства которого подчиняются обычным законам ферментативной кинетики, в частности следуют уравнению Михаэлиса — Ментен $v = Vs/(K_M + s)$. Простой расчет показывает, что в этом случае для увеличения скорости от 0,1 V до 0,9 V необходимо повысить концентрацию субстрата от $K_M/9$ до $9K_M$, т. е. в 81 раз. Заметим, что речь идет об относительно небольшом увеличении скорости. Аналогичным образом если для какого-либо фермента выполняется уравнение, характерное для простого конкурентного ингибирования, $v = Vs/[K_M(1 + i/K_i) + s]$, то для снижения скорости от 90 до 10% уровня активности в отсутствие ингибитора необходимо повысить концентрацию ингибитора в 81 раз. Если изменения концентраций ингибитора и субстрата происходят согласованно, то можно получить более быстрое изменение скорости реакции. Например, для приведенного выше уравнения 9-кратного увеличения v (от $V/13$ до $9V/13$) можно добиться увеличением s от $K_M/3$ до $3K_M$ и одновременным уменьшением i от $3K_i$ до $K_i/3$. Однако даже для случая, когда несколько факторов действуют согласованно, качественная картина остается прежней: для того чтобы добиться даже небольшого изменения скорости, необходимы существенные изменения состава окружающей среды. В то же время к метаболизму предъявляются совершенно противоположные требования: с одной стороны, концентрации основных метаболитов должны поддерживаться в довольно узких интервалах, а с другой — должна существовать возможность изменения скоростей реакций в широких пределах (по-видимому, изменения должны быть большими, чем те, которые многократно обсуждались выше, а именно от 0,1 V до 0,9 V) в ответ на очень небольшие изменения концентраций метаболитов.

Совершенно ясно, что обычные законы ферментативной кине-

тики не могут обеспечить такой контроль активности ферментов, который необходим для регуляции метаболизма. Напротив, многие ферменты, занимающие ключевые позиции в метаболических путях, обладают исключительно высокой чувствительностью к изменениям концентраций метаболитов. Это свойство ферментов обычно называют *кооперативностью*, потому что предполагается, что во многих случаях оно связано с кооперативным взаимодействием активных центров в молекулах полимерных ферментов¹. В этой главе рассмотрены основные теории, предложенные для объяснения кооперативности.

Реакция взаимного превращения фруктозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-дифосфата может служить иллюстрацией еще одного важного аспекта метаболического контроля. Продукт этой реакции и конечный продукт гликолитической цепи различаются между собой. Действительно, в реакции, катализируемой фосфофруктокиназой, АТФ выступает в роли субстрата, в то время как функцией гликолиза в целом, если его рассматривать как путь, ведущий к циклу трикарбоновых кислот и транспорту электронов, является «наработка» больших количеств АТФ. Таким образом, АТФ следует считать продуктом гликолиза, несмотря на то что он является субстратом реакции, контролирующей скорость гликолиза. Поэтому обычное ингибирование фосфофруктокиназы продуктом, АДФ, приводит к эффекту, обратному желаемому: для того чтобы обеспечить стационарное снабжение энергией, фосфофруктокиназа должна ингибироваться конечным продуктом цепи, АТФ, что и наблюдается в действительности. Подобный тип ингибирования не может быть реализован на основе обычных механизмов, т. е. путем связывания ингибитора, являющегося структурным аналогом субстрата. В одних случаях такие ингибиторы могут вызывать нежелательный эффект, а в других конечный продукт цепи может иметь незначительное структурное сходство с любым из участников стадии, которая является контролирующей (например, L-гистидин имеет очень мало сходства со своим предшественником в биосинтетической цепи — фосфорибозилпирофосфатом). Ингибирование или активация соответствующими метаболическими эффекторами возможны благодаря тому, что во многих регулируемых ферментах имеются центры связывания эффектора, которые пространственно удалены от каталитических центров. Эти центры названы

¹ Поскольку свойство повышенной чувствительности к варьированию концентрации метаболита не всегда отражает кооперативное взаимодействие центров, связывающих метаболит в молекуле фермента, более удачным следует считать термин «кинетическая кооперативность». Кинетическая кооперативность (положительная, как в обсуждаемом случае, или отрицательная) является характеристикой отклонений от простых кинетических законов типа Михаэлиса — Ментен (см. Б. И. Курганов, Аллостерические ферменты, «Наука», М., 1978, стр. 28, 35). — *Прим. перев.*

аллостерическими (от греческих слов *αλλος* — другой и *στερεός* — пространственный), с тем чтобы подчеркнуть структурное различие между субстратом и эффе́ктором, а ферменты, имеющие подобные центры, названы аллостерическими ферментами.

Многие ферменты, активность которых регулируется по аллостерическому механизму, обнаруживают также и кооперативную кинетику. Верно и *обратное*, поскольку оба свойства — аллостерический контроль активности и повышенная чувствительность к изменению концентрации метаболита — имеют большое значение для метаболического контроля. Однако это не означает, что данные термины эквивалентны: они описывают различные свойства и должны быть четко разграничены. Во многих случаях установление этих свойств происходило раздельно: для гемоглобина, например, кооперативный характер связывания кислорода был установлен более чем за 60 лет до открытия аллостерического эффекта 1,2-дифосфоглицерата; то, что первый фермент биосинтеза гистидина является аллостерическим, известно уже давно, однако кооперативных кинетических эффектов для него не обнаружено.

7.2. Связывание кислорода гемоглобином

Несмотря на то что гемоглобин является не ферментом, а белком-переносчиком, было бы нелепо говорить о кооперативности, не рассмотрев предварительно свойств этого белка. Во-первых, его кооперативность была установлена задолго до обнаружения подобных свойств у какого-либо фермента (Бор, 1903 г. [15]), и большая часть попыток создания теорий, объясняющих это явление, была направлена именно на выяснение природы кооперативности у гемоглобина. Во-вторых, связывание кислорода гемоглобином может быть непосредственно измерено в равновесных условиях, и, следовательно, отпадает необходимость во введении не очень обоснованных допущений о соотношении между равновесным связыванием и связыванием в стационарных условиях. В-третьих, гемоглобин в отличие от большинства ферментов, обнаруживающих кооперативность, достаточно стабилен и может быть получен в больших количествах, поэтому является очень удобным объектом для проведения экспериментов и изучен достаточно подробно. Наконец, наряду с гемоглобином существует миоглобин — аналог, который не проявляет кооперативных свойств и служит для запасаания кислорода в мышце. Это позволяет проводить прямое сопоставление, что невозможно ни в каком другом случае.

Связывание лиганда X простым мономерным белком E может быть представлено как



где K — константа ассоциации. Концентрация комплекса в равновесных условиях равна

$$[EX] = K [E][X]. \quad (7.1)$$

Сделаем здесь небольшое отступление для уяснения системы обозначений. Необходимо обратить внимание на два главных различия между символами, использованными в настоящей главе, с одной стороны, и символами, употребляющимися в других разделах книги, — с другой. Во-первых, при интерпретации данных равновесных исследований, особенно в случае гемоглобина, обычно пользуются константами ассоциации, а не более привычными для биохимиков константами диссоциации. Это упрощает вид многих уравнений. В то же время основополагающая теория кооперативности, симметричная модель Моно, Уаймена и Шанжё (разд. 7.7), обсуждается всегда в терминах констант диссоциации. Тем не менее попытка избежать существующей путаницы путем перевода литературных данных в другую систему обозначений еще больше запутала бы картину. Во-вторых, рассматривая вопросы кооперативности, мы не будем использовать символы-сокращения для обозначения концентраций (например, x для X), поскольку применять эту систему для концентраций более сложных соединений, таких, как EX_4 , неудобно, а также потому, что в равновесных опытах общая концентрация белка по порядку величины часто совпадает с общей концентрацией лиганда и в результате концентрация свободного лиганда может быть намного меньше общей концентрации лиганда, в то время как в стационарной кинетике картина обычно обратная.

Обозначим через Y степень насыщения белка лигандом, т.е. долю связывающих центров, занятых лигандом в любой момент времени. По определению

$$Y = \frac{\text{Число занятых связывающих центров}}{\text{Общее число связывающих центров}} = \frac{[EX]}{[E] + [EX]}.$$

Из уравнения (7.1) получаем

$$Y = \frac{K[X]}{1 + K[X]}. \quad (7.2)$$

Это уравнение представляет собой изотерму Лэнгмюра (разд. 2.2) и в координатах $\{Y; [X]\}$ представляется равнобочной гиперболой, проходящей через начало координат и асимптотически приближающейся к прямой $Y = 1$. Таким образом, это уравнение очень близко к уравнению Михаэлиса — Ментен (учитывая смысл величин K_M и V , мы должны при переходе к последнему уравнению заменить $1/K$ на K_M и 1 на V).

Экспериментально измеренная степень насыщения миоглобина в зависимости от парциального давления кислорода, конечно, описывается уравнением (7.2). Однако результаты аналогичных опытов с гемоглобином укладываются на совсем иную, необычную кривую — сигмовидную, или S-образную, изображенную на рис. 7.1. Уравнение (7.2) не позволяет объяснить форму этой кривой,

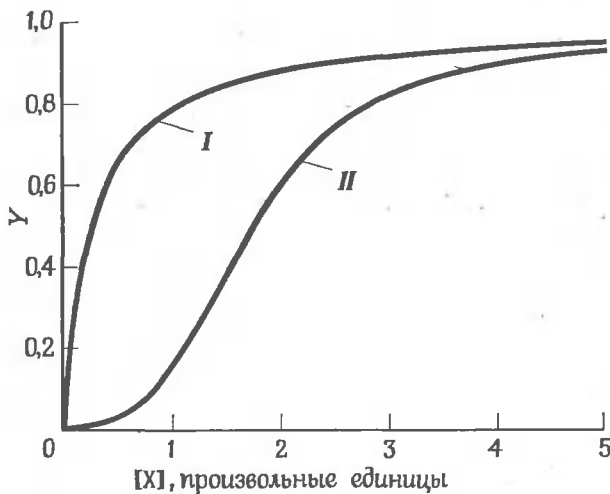


Рис. 7.1. Сопоставление гиперболической (I) и сигмовидной (II) кривых.

и начиная с 1910 г., после опубликования статьи Хилла [75], предпринимались многочисленные попытки построить физическую модель, объясняющую S-образный характер функции насыщения гемоглобина кислородом.

Прежде чем приступить к рассмотрению предложенных моделей кооперативности, полезно обратить внимание на значительные различия в структуре миоглобина и гемоглобина. Миоглобин — мономерный белок, молекула которого состоит из единственной полипептидной цепи и содержит один центр, связывающий кислород. Гемоглобин же — тетрамерный белок, его молекула состоит из четырех полипептидных цепей (или *субъединиц*), и каждая из них имеет центр, связывающий кислород. Молекула гемоглобина образована субъединицами двух типов (две α -субъединицы и две β -субъединицы), однако они сходны по структуре как между собой, так и с миоглобином, поэтому в первом приближении гемоглобин можно рассматривать как тетрамер, составленный из четырех молекул миоглобина. Ретроспективное рассмотрение показывает, что различия двух белков в отношении связывания кислорода

обусловлены различием в их олигомерном состоянии. Следует отметить, однако, что подробная информация о структуре миоглобина и гемоглобина была получена относительно недавно [87, 125], и первые исследователи кооперативных эффектов при связывании кислорода не располагали сведениями о структуре этих белков.

7.3. Уравнение Хилла

В 1910 г. Хилл [75] поставил перед собой задачу объяснить расхождение в значениях молекулярного веса гемоглобина, полученных им и рядом других исследователей. Хилл предположил, что мономерный гемоглобин в присутствии солей ассоциирует и что в определенных условиях степень ассоциации можно охарактеризовать по способности связывать кислород. Если каждый полимер E_h связывает h молекул лиганда, причем реакция протекает в одну стадию, т. е.



то концентрация комплекса $E_h X_h$ определяется соотношением

$$[E_h X_h] = K_h [E_h] [X]^h, \quad (7.3)$$

где K_h — соответствующая константа ассоциации. Для раствора, содержащего смесь мономеров E_1 ($h = 1$) и димеров ($h = 2$), зависимость степени насыщения Y от равновесной концентрации лиганда имеет следующий вид:

$$Y = \frac{\lambda K_2 [X]^2}{1 + K_2 [X]^2} + \frac{(1 - \lambda) K_1 [X]}{1 + K_1 [X]},$$

где λ и $(1 - \lambda)$ — доля белка (по весу), находящегося соответственно в димерной и мономерной формах. Хилл показал, что полученные к тому времени данные по связыванию кислорода гемоглобином в пределах ошибки измерения описываются этим уравнением, но он понимал, что ограничиваться рассмотрением только мономерной и димерной форм нет никаких оснований. Более реальной, по мнению Хилла, была бы модель, включающая олигомеры большего размера. Однако такая модель приводила к слишком сложному уравнению. Поэтому Хилл предложил использовать для описания экспериментальных данных чисто эмпирическое уравнение¹

$$Y = \frac{K_h [X]^h}{1 + K_h [X]^h}. \quad (7.4)$$

¹ Заметим, что величина $\frac{h}{\sqrt{K_h}}$ представляет собой концентрацию полунасыщения $[X]_{0.5}$, т. е. концентрацию X , при которой $Y = 0.5$. — *Прим. перев.*

Это уравнение может быть получено из уравнения (7.3), если допустить, что белок существует только в двух формах, E_h и $E_h X_h$. Хилл показал, что при помощи уравнения (7.4), известного теперь как *уравнение Хилла*, можно очень точно описать все полученные к тому времени экспериментальные данные, используя значения h в интервале от 1,0 до 3,2. Преобразуем уравнение (7.4) следующим образом:

$$\frac{Y}{1-Y} = K_h [X]^h,$$

$$\lg \left(\frac{Y}{1-Y} \right) = \lg K_h + h \lg [X]. \quad (7.5)$$

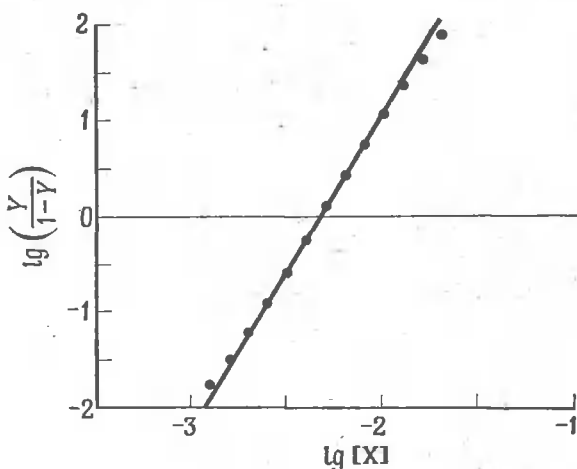


Рис. 7.2. График Хилла.

Прямая проведена в соответствии с уравнением Хилла [уравнение (7.5)]. За исключением области, вблизи $\lg [Y/(1-Y)] = 0$, точки не ложатся строго на прямую. Следует отметить, что, как правило, провести измерения вне интервала значений $\lg [Y/(1-Y)] \{-1; +1\}$ довольно трудно (этот интервал соответствует значениям Y от 0,09 до 0,91).

Тогда зависимость $\lg[Y/(1-Y)]$ от $\lg[X]$ графически будет представлена прямой с наклоном, равным h . Подобный график назван *графиком Хилла* (рис. 7.2); с его помощью можно легко определить параметры h и K_h . Оказалось, что график Хилла удивительно хорошо описывает множество данных по связыванию кислорода гемоглобином для значений Y в области от 0,1 до 0,9. Однако при экстремальных значениях Y всегда наблюдаются отклонения (как это видно на рис. 7.2), поскольку уравнение (7.4) в лучшем случае является лишь аппроксимацией какого-то более сложного выражения.

Хилл, проявляя осторожность, не вкладывал в параметры K_h и h никакого физического смысла. Однако многие современные исследователи полагают, что h должен быть равен числу субъединиц n в полностью ассоциированной форме фермента, и поэтому часто недоумевают по поводу того, что h , как правило, не является целым числом и редко бывает равным n . В то же время совершенно ясно, что нет никаких оснований считать h целым числом, а потому не стоит удивляться, если оно им не оказывается. По причинам, которые мы рассмотрим в следующем разделе, h не может превышать n , т. е. измеряемое значение h дает нижний предел величины n .

Показатель степени h называют обычно *коэффициентом Хилла*. Он широко используется как параметр, характеризующий степень кооперативности: чем больше значение h , тем она выше. Такеа и Погелл [141] предложили для характеристики кооперативности другой параметр, *показатель кооперативности* R_x , определяемый как отношение значений $[X]$, необходимых для получения значений Y , равных 0,1 и 0,9. Таким образом, R_x имеет более ясный смысл, чем h , и является более удобным параметром для оценки связи свойств кооперативных белков с их физиологической ролью. Дополнительное преимущество показателя R_x состоит в том, что он является чисто эмпирической величиной и не связан ни с какой теоретической моделью, которая всегда в той или иной степени является приближенной. Чтобы получить соотношение между двумя параметрами, нужно подставить значения $Y = 0,1$ и $Y = 0,9$ в уравнение (7.4) и найти в каждом случае $[X]$:

$$R_x = 81^{1/h}.$$

это соотношение выполняется, конечно, не с большей точностью, чем уравнение (7.4), однако для большинства задач оно оказывается вполне пригодным. Некоторые значения R_x и h , рассчитанные при помощи выведенного соотношения, представлены в табл. 7.1.

7.4. Уравнение Эдера

После того как было показано, что молекулярный вес гемоглобина приблизительно в 4 раза больше, чем думали раньше, Эдер [1, 2] предположил, что молекула гемоглобина содержит четыре центра, связывающих кислород, и что заполнение этих центров происходит не согласованно, как полагал Хилл, а постадийно:

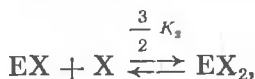
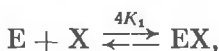
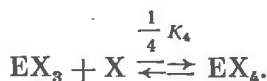
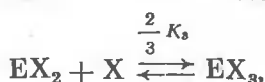


Таблица 7.1

СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ДВУМЯ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КООПЕРАТИВНОСТИ. В ТАБЛИЦЕ ПРИВЕДЕНЫ СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ КОЭФФИЦИЕНТОМ ХИЛЛА h И ПОКАЗАТЕЛЕМ КООПЕРАТИВНОСТИ R_x , ВВЕДЕННЫМ ТАКЕТОЙ И ПОГЕШЛОМ [141]. ЗНАЧЕНИЯ h И R_x РАССЧИТАНЫ В ПРЕДПОЛОЖЕНИИ СТРОГОЙ ВЫПОЛНИМОСТИ УРАВНЕНИЯ ХИЛЛА

h	R_x	Качественная характеристика
0,5	6560	Отрицательная кооперативность
0,6	1520	
0,7	533	
0,8	243	
0,9	132	
1,0	81,0	Отсутствие кооперативности
1,5	18,7	
2,0	9,00	
2,5	5,80	
3,0	4,33	
3,5	3,51	Положительная кооперативность
4,0	3,00	
5,0	2,41	
6,0	2,08	
8,0	1,73	
10	1,55	
15	1,34	
20	1,25	



Константы K_1 , K_2 , K_3 и K_4 в этой схеме являются *микроскопическими* (intrinsic), а не молекулярными константами ассоциации, и если четыре связывающих центра идентичны и действуют независимо друг от друга, то должно выполняться равенство $K_1 = K_2 = K_3 = K_4$.

Для модели Эдера концентрации комплексов определяются следующими выражениями:

$$\left. \begin{aligned} [EX] &= 4K_1[E][X], \\ [EX_2] &= \frac{3}{2} K_2[EX][X] = 6K_1 K_2[E][X]^2, \end{aligned} \right\} \quad (7.6)$$

$$\left. \begin{aligned} [\text{EX}_3] &= \frac{2}{3} K_3 [\text{EX}_2][\text{X}] = 4K_1 K_2 K_3 [\text{E}][\text{X}]^3, \\ [\text{EX}_4] &= \frac{1}{4} K_4 [\text{EX}_3][\text{X}] = K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{E}][\text{X}]^4. \end{aligned} \right\} \quad (7.6)$$

Используя эти соотношения, нетрудно получить уравнение для степени насыщения:

$$\begin{aligned} Y &= \frac{\text{Число занятых центров}}{\text{Общее число связывающих центров}} = \\ &= \frac{[\text{EX}] + 2[\text{EX}_2] + 3[\text{EX}_3] + 4[\text{EX}_4]}{4([\text{E}] + [\text{EX}] + [\text{EX}_2] + [\text{EX}_3] + [\text{EX}_4])} = \\ &= \frac{K_1 [\text{X}] + 3K_1 K_2 [\text{X}]^2 + 3K_1 K_2 K_3 [\text{X}]^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{X}]^4}{1 + 4K_1 [\text{X}] + 6K_1 K_2 [\text{X}]^2 + 4K_1 K_2 K_3 [\text{X}]^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{X}]^4}. \end{aligned} \quad (7.7)$$

Это уравнение известно как *уравнение Эдера* для четырех центров. (Аналогичные уравнения могут быть получены таким же путем для любого числа центров.) Если все четыре микроскопические константы ассоциации равны между собой, то уравнение Эдера существенно упрощается:

$$Y = \frac{K_1 [\text{X}] (1 + K_1 [\text{X}])^3}{(1 + K_1 [\text{X}])^4} = \frac{K_1 [\text{X}]}{1 + K_1 [\text{X}]} \quad (7.8)$$

Оно принимает вид уравнения (7.2), которое представляет собой уравнение гиперболы. Поскольку функция насыщения гемоглобина кислородом не является гиперболой, четыре константы ассоциации в случае гемоглобина не могут быть идентичными.

Если константа K_4 очень велика по сравнению с K_1 , K_2 и K_3 , то уравнение (7.7) сводится к виду

$$Y = \frac{K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{X}]^4}{1 + K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{X}]^4}$$

т. е. представляет собой уравнение Хилла с $K_h = K_1 K_2 K_3 K_4$ и $h = 4$. Следует отметить, что уравнение (7.7) ни при каких допущениях не может быть преобразовано в уравнение Хилла с коэффициентом Хилла, большим 4. Кроме того, если $[\text{X}]$ достаточно мала, то независимо от значений констант ассоциации величина $K_1 [\text{X}]$ станет в конце концов больше членов уравнения (7.7), содержащих $[\text{X}]$ в степени 2 и выше. Поэтому при очень малых значениях $[\text{X}]$ уравнение (7.7) упрощается:

$$Y = \frac{K_1 [\text{X}]}{1 + 4K_1 [\text{X}]}$$

Следовательно, уравнение (7.7) дает график Хилла, в котором наклон (т. е. h) при $[\text{X}] \rightarrow 0$ приближается к 1. Аналогичным обра-

вом $h \rightarrow 1$ и при $[X] \rightarrow \infty$. Резюмируя, можно сказать, что в общем случае при любых значениях констант ассоциации коэффициент Хилла должен приближаться к единице при экстремальных значениях $[X]$ и не может превышать числа связывающих центров при промежуточных значениях $[X]$.

Модель Эдера является самой общей из возможных моделей связывания лиганда «чистым» неассоциирующим белком в равновесных условиях. Под «чистым» белком понимается белок, способный находиться в различных изомерных формах, равновесие между которыми устанавливается очень быстро; кроме того, подразумевается, что изомеризация не включает процессы диссоциации—ассоциации белка. Рассмотрим модель Эдера для белка, содержащего четыре связывающих центра на молекулу и представленного двумя находящимися в равновесии формами — активной (E) и неактивной¹ (E'):



В этом случае функция насыщения имеет следующий вид:

$$Y = \frac{[EX] + 2[EX_2] + 3[EX_3] + 4[EX_4]}{4([E] + [E'] + [EX] + [EX_2] + [EX_3] + [EX_4])} = \\ = \frac{K_1[X] + 3K_1K_2[X]^2 + 3K_1K_2K_3[X]^3 + K_1K_2K_3K_4[X]^4}{(1 + K_0) + 4K_1[X] + 6K_1K_2[X]^2 + 4K_1K_2K_3[X]^3 + K_1K_2K_3K_4[X]^4}. \quad (7.9)$$

Если каждый член этого уравнения поделить на $(1 + K_0)$, то, как нетрудно видеть, оно совпадет по виду с уравнением Эдера. Действительно, если заменить в уравнении (7.7) K_1 на $K_1/(1 + K_0)$, то мы получим уравнение (7.9). К аналогичному результату мы придем и в том случае, если к изомеризации способна какая-либо другая или все формы фермента (EX, EX_2 и т. д.). Таким образом, изомеризация не влияет на характер зависимости степени насыщения от концентрации лиганда, и наоборот, рассматривая только характер функции насыщения, нельзя сделать никаких выводов о наличии или отсутствии изомеризации.

Если E' не находится в равновесии с E, то результат получается иной. В этом случае зависимость Y от [X] имеет следующий вид:

$$Y = \frac{K_1[X] + 3K_1K_2[X]^2 + 3K_1K_2K_3[X]^3 + K_1K_2K_3K_4[X]^4}{([E']/[E] + 1) + 4K_1[X] + 6K_1K_2[X]^2 + 4K_1K_2K_3[X]^3 + K_1K_2K_3K_4[X]^4}.$$

Это уравнение не аналогично уравнению (7.7): деление всех его членов на $([E']/[E] + 1)$ не эквивалентно делению на $(1 + K_0)$ членов уравнения (7.9), потому что [E] не является константой, не зависящей от [X].

¹ Имеется в виду неспособность связывать лиганд. — *Прим. перев.*

В более общем случае, когда в растворе присутствует смесь белков, различающихся по сродству к лиганду, функция насыщения принимает очень сложный вид и содержит члены до $[X]^{\Sigma n}$, где Σn — полное число связывающих центров различного сорта. Поскольку это уравнение совпадает по форме с уравнением Эдера для чистого белка с Σn связывающими центрами, можно было бы ожидать, что такая смесь будет обнаруживать большую кооперативность, чем любой из чистых белков, входящих в ее состав. Однако на самом деле это не так: интуитивно ясно, что если взаимодействие между связывающими центрами отсутствует, то лиганды будут наиболее сильно связываться с центрами, имеющими к ним наибольшее сродство. И хотя функции насыщения для смесей белков обнаруживают отклонения от соответствующих функций для чистых белков, эти отклонения всегда направлены в сторону усиления отрицательной кооперативности, т. е. в сторону увеличения R_x или уменьшения коэффициента h .

Из всего сказанного следует, что присутствие в выражении для степени насыщения членов, содержащих $[X]$ в степени 2 и выше, вовсе не означает, что функция насыщения позволит выявить кооперативность. Чтобы показать это более строго, рассмотрим уравнение Эдера для белка, содержащего два связывающих центра:

$$Y = \frac{K_1[X] + K_1 K_2 [X]^2}{1 + 2K_1[X] + K_1 K_2 [X]^2}.$$

Из этого уравнения нетрудно получить, что

$$\lg \left(\frac{Y}{1-Y} \right) = \lg K_1 + \lg [X] + \lg \left(\frac{1 + K_2[X]}{1 + K_1[X]} \right).$$

Дифференцируя по $[X]$, приходим к следующему выражению для h :

$$h = 1 + \frac{(K_2 - K_1)[X]}{(1 + K_1[X])(1 + K_2[X])}.$$

Из этого выражения следует, что $h > 1$ при $K_2 > K_1$, $h = 1$ при $K_2 = K_1$ и $h < 1$ при $K_2 < K_1$. Эти соотношения выполняются при любых $[X]$, хотя численные значения h при варьировании $[X]$, конечно, меняются и при очень больших и очень малых $[X]$ приближаются к единице. Кооперативное связывание ($K_2 > K_1$) невозможно без взаимодействия центров. Действительно, если молекула белка содержит связывающие центры, характеризующиеся различным сродством к лиганду, то первая молекула лиганда свяжется скорее всего с центром, обладающим более высоким сродством, и в результате функция насыщения будет обнаруживать отрицательную кооперативность. Поэтому экспериментально наблюдаемый кооперативный

характер функции насыщения является прямым указанием на существование взаимодействий между связывающими центрами. В то же время наличие отрицательной кооперативности для функции насыщения нельзя рассматривать как доказательство существования отрицательных взаимодействий между связывающими центрами¹, если предварительно не доказана чистота белка, потому что отрицательная кооперативность может быть обусловлена наличием в молекуле белка неэквивалентных центров, взаимодействие между которыми отсутствует.

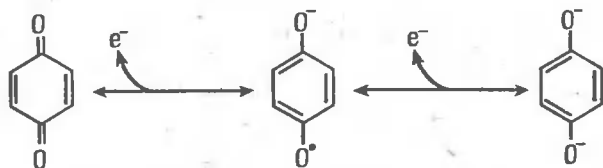
7.5. Подход Полинга

Подход Эдера позволяет описать экспериментально наблюдаемые свойства системы кислород—гемоглобин по крайней мере так же хорошо, как и любая другая модель, предложенная позднее. Недостатком этого подхода является то, что он не рассматривает физической природы взаимодействий, ведущих к появлению кооперативности. В последние годы предложен ряд объяснений этого эффекта, однако прежде всего стоит кратко упомянуть об одном более раннем подходе, сформулированном в 1935 г. Полингом [124]. Не располагая информацией о геометрии молекулы гемоглобина, Полинг постулировал, что четыре гема (центры связывания кислорода) взаимодействуют друг с другом парно таким образом, что связывание кислорода одним из центров пары приводит к увеличению константы ассоциации для связывания кислорода другим центром, причем степень увеличения константы ассоциации для обеих пар одинакова. Полинг показал, что если каждый гем взаимодействует только с одним гемом, т. е. если молекула содержит две независимые пары гемов, то соответствующее выражение для степени насыщения не может объяснить экспериментальные данные. Если же рассмотреть другую модель, в которой каждый гем взаимодействует с двумя другими (гемы располагаются в вершинах квадрата), то, подобрав соответствующим образом степень взаимодействия, удастся вполне удовлетворительно объяснить получаемые зависимости. Аналогичный результат получен и для модели, в которой каждый гем взаимодействует с тремя другими (гемы располагаются в вершинах тетраэдра). Поскольку с математической точки зрения модель Полинга эквивалентна рассмотренной далее последовательной модели, анализ соответствующих функций насыщения отложен до разд. 7.8.

Принципиальное преимущество модели Полинга перед моделью Эдера состоит в том, что она включает только две констан-

¹ Имеются в виду такого рода взаимодействия, когда сродство к лиганду уменьшается по мере заполнения связывающих центров. — *Прим. перев.*

ты, каждая из которых имеет ясный физический смысл: одна константа соответствует исходной константе ассоциации для каждого центра, а другая — «фактору возмущения», вызываемого связыванием кислорода на взаимодействующем связывающем центре. Если допустить, что гемы располагаются настолько близко, что между ними возможно электронное взаимодействие, то объяснить попарное взаимодействие не составляет труда, поскольку подобные взаимодействия хорошо известны в простых системах. Именно поэтому Полинг не считал необходимым обсуждать детально физическую природу гем-гемовых взаимодействий. Рассмотрим, например, «связывание» электронов хиноном:



В принципе в этом случае должно образовываться промежуточное соединение, несущее свободный радикал, однако электронное состояние этого промежуточного соединения таково, что оно нестабильно и стремится перейти в одно из крайних состояний. В результате этого в соответствии с уравнением Хилла для двух центров связывание является кооперативным. Что касается отрицательной кооперативности, то она представляет собой даже более распространенное явление в простых системах (в качестве примера можно указать на связывание двух протонов симметричными дианионами, например оксалатом или сукцинатом).

Полинг пришел к заключению, что при тетраэдрическом расположении гемов на поверхности молекулы гемоглобина расстояния между ними слишком велики (около 4,7 нм), чтобы можно было допустить существование гем-гемовых взаимодействий. Однако если группы гема образуют квадрат на одной стороне апобелка, то они могут располагаться достаточно близко друг от друга. Поэтому Полинг отдал предпочтение схеме расположения групп гема в виде квадрата, хотя он понимал, что экспериментальные данные одинаково хорошо описываются обеими моделями.

После того как была установлена трехмерная структура гемоглобина [125], стало ясно, что группы гема располагаются слишком далеко друг от друга (2,5 — 4,0 нм), чтобы можно было допустить существование взаимодействий, постулированных Полингом, даже если исходить из попарных взаимодействий гемов. Кроме того, в гемоглобине нет сопряженной системы химических связей, которая могла бы обеспечить взаимодействия на больших расстояниях (как, например, в витамине А и во многих других

окрашенных соединениях). Это открытие поставило под сомнение все объяснения кооперативного насыщения гемоглобина кислородом, выдвинутые не только Полингом, но и другими исследователями, включая объяснение Эдера, поскольку во всех этих случаях (в явной или неявной форме) предполагалось наличие прямых гем-гемовых взаимодействий. Явление кооперативности стало еще более загадочным, чем оно было после появления пионерской работы Хилла в 1910 г., и это произошло как раз в тот момент, когда выяснилось, что присуще оно не только гемоглобину, но и ферментам и поэтому играет исключительно важную роль в регуляции метаболизма.

7.6. Индуцированное соответствие

Все современные теории кооперативности вытекают из *теории индуцированного соответствия*, предложенной Кошландом [95—97], поскольку каждая из них включает допущение о том, что белковые молекулы не являются жесткими и могут существовать в нескольких *функционально* различающихся конформациях, число которых ограничено. Поэтому целесообразно несколько отклониться от изложения основного материала и обсудить экспериментальные и теоретические основы гипотезы индуцированного соответствия.

Уже с самых первых работ, еще до того, как были получены какие-либо сведения о физической и химической структуре ферментов, биохимиков удивила высокая степень специфичности, обнаруживаемая ферментами по отношению к субстратам. Фишер [55] был поражен способностью живых организмов абсолютно точно распознавать нужное соединение среди сахаров, лишь незначительно различающихся по структуре, причем эти изменения касались атомов, удаленных от реакционноспособных групп. Для того чтобы объяснить это свойство, Фишер предположил, что активный центр фермента представляет собой отпечаток, соответствующий его субстрату(ам), и что фермент катализирует превращение только тех соединений, которые в точности «вписываются» в его активный центр. Это очень похоже на открывание ключом обычного (нецилиндрического) замка, и предложенная модель действия ферментов давно известна как *фишеровская модель ключа и замка*. В течение многих лет казалось, что модель Фишера объясняет все известные факты, касающиеся специфичности ферментов. Однако в ходе дальнейших исследований накопились многочисленные данные, которые очень трудно было объяснить, исходя из представлений о жестком активном центре, как это постулировалось Фишером. К таким данным относятся, например, факт большой распространенности ферментов, катализирующих двухсубстратные реакции, в которых субстраты долж-

ны связываться в строго определенном порядке (об этом упоминалось в разд. 5.2). Еще более удивительным является тот факт, что в определенных ферментативных реакциях вода вопреки ожиданиям участия не принимает. Рассмотрим, например, гексокиназу, катализирующую фосфорилирование глюкозы:



Фермент не отличается особой специфичностью: довольно быстро каталитическому фосфорилированию подвергаются не только глюкоза, но и фруктоза, манноза и другие сахара. Хотя с химической точки зрения вода обладает по крайней мере такой же реакционной способностью, что и сахара — субстраты гексокиназы, она не является одним из субстратов этого фермента; более того, вода едва ли способна насытить гексокиназу при концентрации 56 М (что в $7 \cdot 10^6$ раз превышает константу Михаэлиса для глюкозы).

Кошланд высказал мнение, что эти и другие подобные им факты убедительно свидетельствуют о гибкости активного центра фермента. Кошланд предположил, что активный центр обладает способностью точно подстроиться под субстрат, однако он не принимает формы, комплементарной по отношению к субстрату, пока не произойдет связывания последнего. Благодаря этому конформационному изменению, сопровождающему связывание субстрата, достигается правильное расположение каталитических групп фермента и групп субстрата, претерпевающих изменения в ходе каталитической реакции. Гипотеза Кошланда позволяет легко объяснить свойства гексокиназы: молекула воды может, конечно, присоединяться к активному центру фермента, однако из-за недостаточных размеров она не способна вызывать необходимое для катализа конформационное изменение.

Идея Кошланда была названа гипотезой индуцированного соответствия, чтобы подчеркнуть ее отличие от теории Фишера, в которой допускается, что соответствие между ферментом и субстратом существует заранее и необходимость в индуцированном конформационном изменении отпадает. Если исходить из аналогии между ключом и замком, то концепцию Кошланда можно уподобить цилиндрическому замку, в котором ключ не просто подходит, но перед поворотом перестраивает подвижные части замка.

Теория индуцированного соответствия сыграла важную роль в некоторых областях энзимологии, однако особенно полезной оказалась она для понимания аллостерических и кооперативных явлений в белках, поскольку эта теория дает простое объяснение взаимодействий, осуществляющихся на больших расстояниях. Когда белковая молекула соединяет в себе жесткость и подвижность и таким образом обеспечивает выполнение определен-

ной функции и возможность контроля (как это имеет место в ножницах), индуцируемое субстратом конформационное изменение в одной точке молекулы может передаваться в другую точку на расстояния, достигающие нескольких нанометров.

7.7. Симметричная модель Моно, Уаймена и Шанжэ

Для объяснения кооперативных явлений в гемоглобине и аллостерических эффектов для многих ферментов необходимо допустить существование взаимодействий между центрами, значительно удаленными друг от друга. Ярким примером фермента с пространственно обособленными активным и аллостерическим центрами может служить фосфорибозил-АТФ-пирофосфорилаза, по отношению к которой гистидин выступает в роли аллостерического ингибитора; Мартин [109] показал, что мягкая обработка фермента ионами двухвалентной ртути приводит к полной потере чувствительности фермента к гистидину, однако при этом активность фермента и способность связывать гистидин остаются неизменными. Другими словами, ион металла, не затрагивая каталитического и аллостерического центров, нарушает связь между ними. Моно, Шанжэ и Жакоб [115] рассмотрели много примеров кооперативных и аллостерических явлений и пришли к заключению, что они тесно связаны между собой и что в основе их лежит, по-видимому, конформационная гибкость белковой молекулы. Позднее Моно, Уаймен и Шанжэ [116], сделав ряд простых допущений, предложили общую модель для объяснения кооперативных и аллостерических явлений. Эту модель часто называют *аллостерической моделью*, хотя более удачным является термин *симметричная модель*, поскольку он подчеркивает принципиальное различие между этой и более поздними моделями; кроме того, использование этого термина позволяет не касаться спорного вопроса о связи между аллостерическими и кооперативными явлениями.

Исходным пунктом для симметричной модели является тот факт, что многие (по-видимому, даже все) белки, обнаруживающие кооперативные эффекты, содержат несколько субъединиц на молекулу. (Для простоты мы будем рассматривать тетрамерный белок, однако модель пригодна для любого числа субъединиц на молекулу.) Модель Моно и др. основывается на следующих постулатах:

1. Каждая субъединица может существовать в двух различных конформациях, обозначаемых через R («расслабленная») и T («напряженная»).

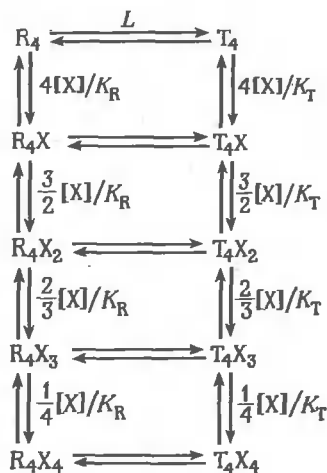
2. В любой момент времени все субъединицы молекулы имеют одну и ту же конформацию; следовательно, в случае тетрамерного белка единственными допустимыми конформационными состояниями

являются состояния R_4 и T_4 , а гибридные состояния (например, R_3T) запрещены.

3. Формы белка, соответствующие разным состояниям, находятся в равновесии; константа равновесия, обозначенная через L , равна $[T_4]/[R_4]$.

4. Лиганд может связываться с субъединицей, находящейся в любой конформации, однако константы диссоциации для R -состояния ($K_R = [R][X]/[RX]$) и для T -состояния ($K_T = [T][X]/[TX]$) различаются между собой; отношение констант обозначается через c ($c = K_R/K_T$).

На основе этих допущений переходы между различными формами белка можно представить в виде следующей совокупности равновесных стадий:



Концентрации десяти форм связаны между собой следующими соотношениями:

$$[R_4X] = 4[R_4][X]/K_R,$$

$$[R_4X_2] = \frac{3}{2}[R_4X][X]/K_R = 6[R_4][X]^2/K_R^2,$$

$$[R_4X_3] = \frac{2}{3}[R_4X_2][X]/K_R = 4[R_4][X]^3/K_R^3,$$

$$[R_4X_4] = \frac{1}{4}[R_4X_3][X]/K_R = [R_4][X]^4/K_R^4,$$

$$[T_4] = L[R_4],$$

$$[T_4X] = 4[T_4][X]/K_T = 4Lc[R_4][X]/K_R,$$

$$[T_4 X_2] = 6[T_4][X]^2/K_T^2 = 6Lc^2[R_4][X]^2/K_R^2,$$

$$[T_4 X_3] = 4[T_4][X]^3/K_T^3 = 4Lc^3[R_4][X]^3/K_R^3,$$

$$[T_4 X_4] = [T_4][X]^4/K_T^4 = Lc^4[R_4][X]^4/K_R^4.$$

Статистические множители ($4, 3/2$ и т. д.) появились в каждом уравнении в результате того, что K_R и K_T определены как микроскопические константы, характеризующие связывание лиганда индивидуальным центром белковой молекулы, в то время как приведенные соотношения записаны для полных молекул, а не для отдельных центров. Например, $K_R = [R][X]/[RX] = \frac{3}{2}[R_4X][X]/[R_4X_2]$; множитель $\frac{3}{2}$ означает, что в каждой молекуле R_4X имеется 3 R-субъединицы, не содержащие лиганда, а в каждой молекуле R_4X_2 — 2 R-субъединицы, содержащие связанный лиганд. Зависимость степени насыщения от концентрации свободного лиганда для тетрамерного белка модели Моно и др. имеет следующий вид:

$$Y = \frac{[R_4X] + 2[R_4X_2] + 3[R_4X_3] + 4[R_4X_4] + [T_4X] + 2[T_4X_2] + 3[T_4X_3] + [T_4X_4]}{4([R_4] + [R_4X] + [R_4X_2] + [R_4X_3] + [R_4X_4] + [T_4] + [T_4X] + [T_4X_2] + [T_4X_3] + [T_4X_4])} = \frac{(1 + [X]/K_R)^3[X]/K_R + Lc(1 + c[X]/K_R)^3[X]/K_R}{(1 + [X]/K_R)^4 + L(1 + c[X]/K_R)^4}. \quad (7.10)$$

Функция насыщения, задаваемая уравнением (7.10), зависит от значения величин L и c . Рассмотрим прежде всего некоторые случаи, соответствующие крайним значениям этих параметров. При $L = 0$ (форма Т не обнаруживается ни при каких условиях) уравнение (7.10) приобретает простой вид: $Y = [X]/(K_R + [X])$; это уравнение идентично изотерме Лэнгмюра. Аналогичным образом при $L \rightarrow \infty$ имеем $Y = [X]/(K_T + [X])$. Отсюда следует, что отклонение от гиперболического связывания наблюдается только в том случае, когда формы белка, соответствующие обоим конформационным состояниям, присутствуют в заметных количествах. Это естественно, поскольку, если присутствует только одна форма, модель Моно и др. становится эквивалентной модели Эдера с не взаимодействующими и идентичными связывающими центрами [сравните с уравнением (7.8)].

Гиперболическое связывание наблюдается также в том случае, когда формы R и T обладают одинаковым сродством к лиганду ($c = 1$), так как в этом случае неважно, в каком состоянии находится белок. При других значениях L и c , согласно уравнению (7.10), будет иметь место кооперативное связывание, хотя оче-

видным это становится только в частном случае, когда $c = 0$ (X связывается *только* формой R). Подобная ситуация естественна для теории индуцированного соответствия, однако Моно, Уаймен и Шанжэ не считают ее обязательной и для симметричной модели. При $c = 0$ уравнение (7.10) сводится к виду

$$Y = \frac{(1 + [X]/K_R)^3 [X]/K_R}{L + (1 + [X]/K_R)^4}. \quad (7.11)$$

При очень больших $[X]$, когда $[X]/K_R \gg L$ и величиной L в знаменателе можно пренебречь, выражение становится аналогичным изотерме Лэнгмюра. При очень малых $[X]$ величина L , напротив, становится определяющей, вследствие чего кривая насыщения выходит из начала координат очень полого. Другими словами, зависимость степени насыщения от концентрации лиганда должна быть сигмоидной, если $L \gg 1$.

Для того чтобы показать, почему из уравнения более общего типа (7.10) следует наличие кооперативного связывания, выявим его связь с уравнением Эдера. Если раскрыть все скобки в уравнении (7.10) и сгруппировать члены, содержащие $[X]$ в одинаковой степени, то уравнение примет вид уравнения Эдера для белка с четырьмя центрами (7.7). Константы ассоциации в этом уравнении определяются следующим образом:

$$\begin{aligned} K_1 &= \frac{1 + Lc}{K_R}, \\ K_2 &= \frac{1 + Lc^2}{(1 + Lc) K_R}, \\ K_3 &= \frac{1 + Lc^3}{(1 + Lc^2) K_R}, \\ K_4 &= \frac{1 + Lc^4}{(1 + Lc^3) K_R}. \end{aligned}$$

Рассмотрим теперь отношение какой-либо пары констант, например K_3 и K_2 :

$$\frac{K_3}{K_2} = \frac{(1 + Lc^3)(1 + Lc)}{(1 + Lc^2)^2} = \frac{1 + Lc(c^2 + 1) + L^2 c^4}{1 + 2Lc^2 + L^2 c^4}.$$

Поскольку при положительных L и c выполняется неравенство $Lc(c^2 + 1) \geq 2Lc^2$, правая часть выражения для K_3/K_2 не может быть меньше 1, т. е. $K_3 \geq K_2$. Аналогичные результаты получаются для всех других пар констант, а также при обобщении модели на случай более четырех связывающих центров на молекулу и более двух конформационных состояний. Поэтому симметричная модель должна давать положительную кооперативность

и не может привести к появлению отрицательной кооперативности. Некоторые характерные кривые связывания для модели Моно и др. показаны на рис. 7.3.

Моно, Уаймен и Шанжé проводили различие между *гомotropными* эффектами, обусловленными взаимодействием между идентичными лигандами, и *гетеротропными* эффектами, возникающими из-за взаимодействий между лигандами различной природы,

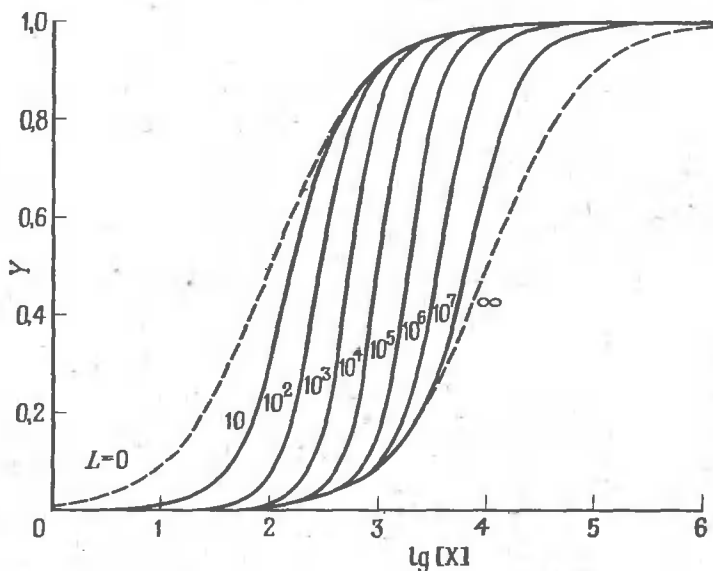


Рис. 7.3. Зависимости степени насыщения от логарифма концентрации лиганда для симметричной модели, рассчитанные при помощи уравнения (7.10) для $s = 0,01$ и значений L в интервале от 0 до ∞ (значения L приведены около кривых).

$[X]$ выражена в произвольных единицах. Кривая, соответствующая $L = 0$, отражает связывание лиганда чистой формой R , а кривая с $L = \infty$ — связывание лиганда чистой формой T . Если уравнение (7.10) представить в координатах Y от $[X]$, а не от $\lg [X]$, то кривые при этих крайних значениях L будут гиперболами (рис. 7.1), а при промежуточных L — сигмоидными.

например между субстратом и аллостерическим ингибитором. Хотя в модели Моно и др. гомотропные эффекты должны характеризоваться положительной кооперативностью, на гетеротропные взаимодействия подобные ограничения не распространяются. Одной из самых привлекательных особенностей симметричной модели является то обстоятельство, что при переходе к гетеротропным эффектам в этой модели не происходит дополнительного усложнения математических выражений. Рассмотрим случай, когда в системе присутствуют три лиганда: X , A и I . Допустим, что X и A свя-

зываются только R-конформацией (K_R и K_a — соответствующие константы диссоциации), а I — только T-конформацией (константа диссоциации обозначается через K_i). (Заметим, что связывание при таком упрощении описывается уравнением (7.11); можно рассмотреть, конечно, и более общий случай, однако при этом предсказания модели станут менее наглядными.) Тем же путем, что и ранее, для данной системы можно рассчитать функции насыщения для трех лигандов. Так, для связывания лиганда X функция насыщения имеет следующий вид:

$$Y_x = \frac{(1 + [X]/K_R)^3 [X]/K_R}{L \left(\frac{1 + [I]/K_i}{1 + [A]/K_a} \right)^4 + (1 + [X]/K_R)^4}.$$

Если ввести обозначение $\Lambda = L(1 + [I]/K_i)^4/(1 + [A]/K_a)^4$, то это выражение перейдет в

$$Y_x = \frac{(1 + [X]/K_R)^3 [X]/K_R}{\Lambda + (1 + [X]/K_R)^4}.$$

Полученное уравнение аналогично уравнению (7.11), только константа L заменена в нем на величину Λ , которая является функцией как $[I]$, так и $[A]$. Ясно, что I подавляет связывание X (потому, что Λ растет с увеличением $[I]$), а A, напротив, способствует связыванию. Таким образом, модель Моно и др. дает четкое объяснение как явлению аллостерического ингибирования, так и явлению аллостерической активации. Кроме того, поскольку Λ зависит от концентрации I и A, последние должны оказывать влияние и на степень кооперативности, причем, согласно модели Моно и др., аллостерический ингибитор должен усиливать кооперативность связывания субстрата, а аллостерический активатор, напротив, снижать ее.

Как отмечали Моно, Уаймен и Шанжэ, многие ферменты действительно обладают подобными кинетическими свойствами, если принять, конечно, что связывание субстрата в стационарных условиях точно отражает связывание в условиях равновесия. К сожалению, единственное оправдание для введения любого допущения подобного типа не только для простых систем, но и для сложных, состоит в том, что если таких допущений не делать, то мы должны проводить опыты по связыванию лигандов в истинно равновесных условиях (типа опытов по связыванию кислорода и других лигандов гемоглобином). Большинство биохимиков находят это ограничение неприемлемым, и на практике основная часть данных о гетеротропных эффектах (и, конечно, о гомотропных эффектах в случае кооперативных ферментов) получена из неравновесных исследований ферментов при допущении, что $Y = v/V$,

где v — стационарная скорость и V — предельное значение v при насыщающих концентрациях субстрата.

Доказать выполнимость допущения, что $Y = v/V$, очень трудно (или даже невозможно). Однако обычно обойтись без него не удастся, так как пытаться интерпретировать кинетические данные для кооперативных ферментов, не вводя никаких упрощающих предположений, — задача совершенно безнадежная. Это не является, конечно, свойством только симметричной модели — все другие модели кооперативности также построены при некоторых допущениях. Предположение о том, что $Y = v/V$, имеет по крайней мере то достоинство, что оно кажется весьма правдоподобным, чего нельзя сказать о ряде других допущений, используемых в симметричной модели. Таким является, в частности, основное допущение о симметрии конформации белковой молекулы, чья спорность не уменьшается от того, что его часто используют. Симметричная модель не рассматривает молекулярного механизма, объясняющего конформационную симметрию, и с физической точки зрения неясно, почему белки, имеющие субъединичную структуру, должны обладать подобным свойством. Другое не очень обоснованное допущение состоит в том, что многие ферменты рассматриваются как *истинные К-системы* (в терминологии Моно, Уаймена и Шанжё). Иными словами, допускается, что хотя R- и Т-состояния могут различаться в 1000 и более раз по степени сродства к субстрату, константы каталитического распада у них совершенно одинаковы. Вопрос о том, насколько вероятно существование истинных К-систем, никогда серьезно не обсуждался в литературе. Действительно, допущение о равенстве констант скорости каталитического распада для R- и Т-форм часто рассматривается как аксиома, не требующая доказательства.

Несмотря на эти критические замечания, следует отметить, что симметричная модель означала большой шаг вперед в понимании кооперативности белковых молекул. Хотя в настоящее время имеются данные по отрицательной кооперативности, которые не удастся объяснить с позиций симметричной модели, кинетические свойства ряда ферментов эта модель описывает вполне удовлетворительно. Например, Бланжи, Бюк и Моно [11] использовали симметричную модель для количественного описания кооперативных свойств фосфофруктокиназы из *Escherichia coli*. Этот фермент представлял особый интерес в связи с возможностью проводить измерения связывания одного субстрата, фруктозо-6-фосфата, в широком интервале концентраций аллостерического активатора, АДФ, и аллостерического ингибитора, фосфоенолпирувата. Точное согласие между теорией и экспериментом для всех полученных данных можно рассматривать как веский довод в пользу адекватности симметричной модели.

7.8. Последовательная модель Кошланда, Немети и Филмера

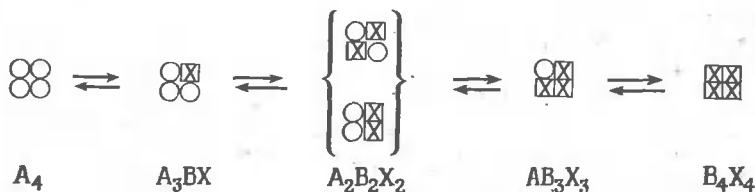
Хотя в симметричной модели используется идея функциональной важности конформационной подвижности белковой молекулы, она все же является отступлением от теории индуцированного соответствия, поскольку допускает, что лиганды могут связываться с обоими конформационными состояниями (R и T), хотя и имеют к ним разное сродство. В то же время Кошланд, Немети и Филмер [98] показали, что обычный подход, основанный на использовании теории индуцированного соответствия, также хорошо объясняет явление кооперативности. Подобно Моно, Уаймену и Шанжэ, эти исследователи постулировали существование двух конформаций, обозначенных ими как А- и В-конформации (соответствующие Т- и R-конформациям). Однако Кошланд, Немети и Филмер предположили, что конформация В индуцируется связыванием субстрата, поэтому Х оказывается связанным только В-конформацией, а В-конформация в свою очередь существует только в том случае, если она содержит связанный Х.

Кошланд, Немети и Филмер предположили, что кооперативность обусловлена изменением свойств каждой субъединицы при изменении конформационного состояния соседних субъединиц. Это допущение используется и в симметричной модели, но в последовательной модели оно более существенно, поскольку в ней делается акцент на детали взаимодействия и не привлекается произвольное допущение о том, что все субъединицы должны находиться одновременно в одной и той же конформации. Следовательно, существование таких конформационных гибридов, как AB_3 , A_2B_2 и т.д., не просто допускается; это с необходимостью вытекает из предположения о строгом индуцированном соответствии.

Поскольку симметричная модель не касается деталей взаимодействия субъединиц, в предыдущем разделе не было необходимости обсуждать геометрию ассоциации субъединиц, т.е. четвертичную структуру белков. Однако в последовательной модели учитывать геометрические факторы необходимо, потому что различное расположение субъединиц приводит к различным зависимостям степени насыщения от концентрации лиганда. То обстоятельство, что в последовательной модели уделяется большее внимание геометрическим факторам и что каждый тип «геометрии взаимодействия» субъединиц должен рассматриваться отдельно, привело к широко распространенному, но ошибочному заключению, что эта модель является более общей и более сложной, чем симметричная. Следует подчеркнуть, что для любой заданной геометрии взаимодействия субъединиц обе модели приблизительно одинаково сложны, причем ни одна из них не яв-

ляется частным случаем другой. Симметричную и последовательную модели можно свести к одной общей модели [63], если снять требование симметрии в первом случае и требование строго индуцированного соответствия во втором. Однако целесообразность такого обобщения весьма сомнительна, поскольку получаемое при этом окончательное уравнение слишком сложно, чтобы им можно было пользоваться на практике. В отдельных случаях имеет смысл называть обычный вариант последовательной модели как *простейшую* последовательную модель, чтобы отличать ее от общей модели.

Рассматривая последовательную модель, обсудим более детально так называемый *квадратный* тип взаимодействия субъединиц, когда каждая субъединица взаимодействует с двумя соседними (расположение субъединиц напоминает квадрат). Для четырех субъединиц в молекуле возможны также «тетраэдрический» и «линейный» типы взаимодействия субъединиц, однако методы анализа в этих случаях такие же, как и для квадратной модели (хотя окончательные результаты несколько различаются). Если обозначить А-конформацию кружочком, а В-конформацию — квадратиком, то шесть возможных форм для связывания X можно изобразить следующим образом:



Следует отметить, что существуют две различные формы $A_2 B_2 X_2$; каждую из них нужно рассматривать отдельно, потому что контакты субъединиц в них неодинаковы. Для получения выражений, описывающих концентрации различных форм, необходимо учесть те изменения конформации, которые должны произойти, чтобы получить эту форму из исходного состояния A_4 . Например, для превращения формы A_4 в форму $A B_3 X_3$ необходимы следующие изменения:

1. Для трех субъединиц должно произойти изменение конформации $A \rightarrow B$. Это изменение учитывается величиной K_i^3 , где K_i — воображаемая константа равновесия для изолированной субъединицы ($K_i = [B]/[A]$). В простейшей последовательной модели молчаливо принимается, что константа K_i очень мала; лишь в этом случае справедливо допущение о том, что переход в В-конформацию обусловлен только связыванием субстрата.

2. Три молекулы X должны присоединиться к трем субъединицам В. Это связывание учитывается величиной $K_x^3 [X]^3$, где

K — константа ассоциации для процесса связывания лиганда X изолированной субъединицей B ($K_x = [BX]/[B][X]$).

3. Для квадратного типа взаимодействия субъединиц число контактов равно 4. В исходном состоянии (A_4) каждый контакт можно обозначить как AA , поскольку обе контактирующие субъединицы находятся в A -конформации. В форме AB_3X_3 контакты AA отсутствуют, зато в ней имеются два AB -контакта и два BB -контакта. Им соответствуют параметр K_{AB} — константа равновесия для превращения AA -контакта в AB -контакт ($K_{AB} = [AB]/[AA]$) — и параметр K_{BB} — константа равновесия для превращения AA -контакта в BB контакт ($K_{BB} = [BB]/[AA]$). Суммарное изменение учитывается параметром $K_{AB}^2 K_{BB}^2$. Константа K_{AB} может рассматриваться также как абсолютная мера стабильности AB -контакта, однако в таком случае необходимо ввести еще один параметр — константу K_{AA} для AA -контакта, которая условно принимается равной единице. Проще и корректнее всего рассматривать K_{AB} как относительную меру стабильности AB -контакта по сравнению с AA -контактом; в таком случае нет необходимости вводить дополнительную константу K_{AA} . Аналогичным образом константу K_{BB} лучше рассматривать как относительную меру стабильности BB -контакта по сравнению с AA -контактом.

4. Наконец, необходимо ввести статистический множитель, равный 4, поскольку три субъединицы из четырех можно выбрать четырьмя эквивалентными способами. Эквивалентность способов необходима, поскольку в противном случае все варианты должны рассматриваться отдельно: для формы $A_2B_2X_2$ при диагональном расположении лигандов статистический множитель равен 2, а при расположении, когда B -субъединицы соприкасаются, — 4.

Перемножая все параметры, которые должны быть учтены, получаем следующее выражение для концентрации формы AB_3X_3 :

$$[AB_3X_3] = 4[A_4]K_x^3K_t^3K_{AB}^2K_{BB}^2[X]^3.$$

Аналогичным образом для концентраций других форм можно записать

$$[A_3BX] = 4[A_4]K_xK_tK_{AB}^2[X],$$

$$[A_2B_2X_2] = 2[A_4]K_x^2K_t^2(2K_{AB}^2K_{BB} + K_{AB}^4)[X]^2,$$

$$[B_4X_4] = [A_4]K_x^4K_t^4K_{BB}^4[X]^4.$$

Исходя из этих соотношений, приходим к уравнению, описывающему зависимость степени насыщения от концентрации лиганда:

$$Y = \frac{[A_3BX] + 2[A_2B_2X_2] + 3[AB_3X_3] + 4[B_4X_4]}{4[A_4] + [A_3BX] + [A_2B_2X_2] + [AB_3X_3] + [B_4X_4]} =$$

$$\frac{\{K_x K_t K_{AB}[X] + K_x^2 K_t^2 (2K_{AB}^2 K_{BB} + K_{AB}^4)[X]^2 +$$

$$+ 3K_x^3 K_t^3 K_{AB}^2 K_{BB}^2 [X]^3 + K_x^4 K_t^4 K_{BB}^4 [X]^4\}}{\{1 + 4K_x K_t K_{AB}^2 [X] + 2K_x^2 K_t^2 (2K_{AB}^2 K_{BB} + K_{AB}^4)[X]^2 +$$

$$+ 4K_x^3 K_t^3 K_{AB}^2 K_{BB}^2 [X]^3 + K_x^4 K_t^4 K_{BB}^4 [X]^4\}}. \quad (7.12)$$

В таком виде уравнение выглядит довольно сложно, так как отражает все детали связывания лиганда. На самом деле эта сложность кажущаяся, поскольку некоторые константы встречаются всегда в одних и тех же комбинациях. Например, K_x , K_t и $[X]$ входят только в виде произведения, согласно идее строго индуцированного соответствия. Имеются и другие, менее очевидные комбинации, обусловленные тем, что взаимодействия субъединиц не являются независимыми от связывания лиганда. Например, константа K_{BB} встречается только как член произведения, которое содержит $K_x^2 K_t^2 [X]^2$, потому что ВВ-взаимодействие подразумевает присутствие двух субъединиц. В результате уравнение (7.12) можно переписать, используя две константы:

$$Y = \frac{c^2 \bar{K} [X] + c^2 (2 + c^2) \bar{K}^2 [X]^2 + 3c^2 \bar{K}^3 [X]^3 + \bar{K}^4 [X]^4}{1 + 4c^2 \bar{K} [X] + 2c^2 (2 + c^2) \bar{K}^2 [X]^2 + 4c^2 \bar{K}^3 [X]^3 + \bar{K}^4 [X]^4}, \quad (7.13)$$

где $\bar{K}^4 = K_x^4 K_t^4 \bar{K}_{BB}^4 = [B_4X_4]/[A_4][X]^4$ — константа ассоциации для полного четырехступенчатого связывания и $c^2 = K_{AB}^2/K_{BB}$ — относительная мера стабильности АВ-контакта по сравнению с АА- и ВВ-контактами. Ценность уравнения (7.13) состоит в том, что именно в такой форме должно быть представлено уравнение для зависимости степени насыщения от концентрации лиганда при количественном описании экспериментальных данных. Уравнение связывания в исходном виде для этого не годится, потому что, например, любое изменение K_x может быть абсолютно точно компенсировано противоположным изменением констант K_t или K_{BB} . Некоторые кривые, рассчитанные при помощи уравнения (7.13), представлены на рис. 7.4.

Уравнение (7.13) оказывается полезным также при выяснении связи между последовательной моделью и моделью Эдера. Четыре константы уравнения Эдера связаны следующими соотношениями с константами \bar{K} из уравнения (7.13):

$$K_1 = c^2 \bar{K},$$

$$K_2 = \frac{1}{3} (2 + c^2) \bar{K},$$

$$K_3 = 3\bar{K} / (2 + c^2),$$

$$K_4 = \bar{K} / c^2.$$

Отношение любой пары констант зависит только от c ; например,

$$K_3/K_2 = 9/(2 + c^2)^2.$$

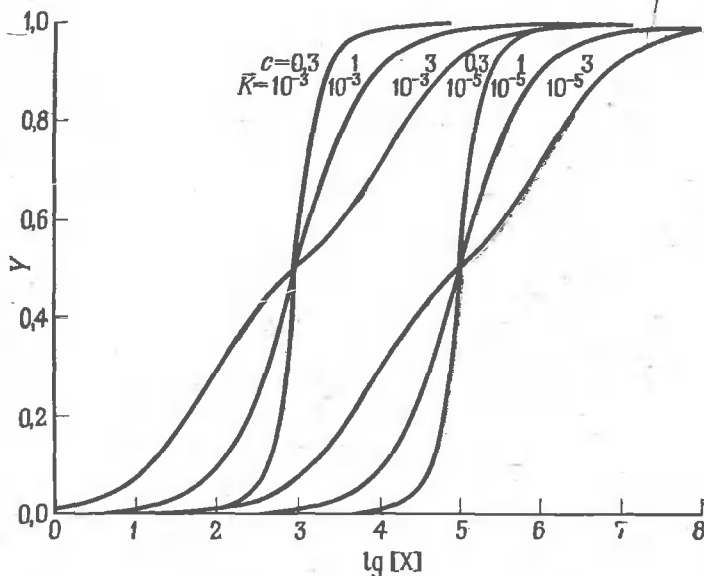


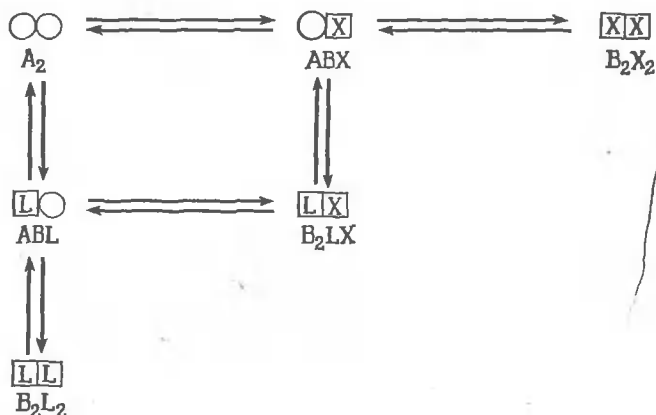
Рис. 7.4. Зависимости степени насыщения от логарифма концентрации лиганда для последовательной модели, рассчитанные при помощи уравнения (7.13) для различных значений \bar{K} и c (эти значения приведены около кривых). $[X]$ выражена в произвольных единицах. Положение точки полунасыщения для каждой кривой определяется только величиной \bar{K} , а форма — только величиной c .

Поэтому $K_3 < K_2$, если $c > 1$, и $K_3 > K_2$, если $c < 1$. Аналогичные соотношения справедливы и для других пар констант. Поскольку в последовательной модели никаких ограничений на параметр c не накладывается (он может быть меньше или больше единицы), эта модель объясняет как отрицательную кооперативность ($K_1 > K_2 > K_3 > K_4$), так и положительную ($K_1 < K_2 < K_3 < K_4$), в то время как в симметричной модели возможна только положительная кооперативность.

Кошланд, Немети и Филмер показали, что уравнение (7.13) и соответствующее уравнение для тетраэдрического типа взаи-

модействия субъединиц почти так же хорошо описывают экспериментальные данные по насыщению гемоглобина кислородом, как и симметричная модель. Поэтому на основании этих данных для гемоглобина и любых данных по кооперативному связыванию лигандов другими белками трудно сделать выбор между моделями. Однако это не означает, что кривые насыщения никогда не позволяют дифференцировать модели: для белка, обнаруживающего отрицательную кооперативность, сама форма кривой насыщения дает достаточные основания для того, чтобы исключить симметричную модель. В последние годы появились сообщения об отрицательной кооперативности для насыщения белков лигандами. В некоторых случаях подобный характер кривой насыщения обусловлен присутствием в препарате белка примесей. В то же время связывание НАД глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из скелетных мышц кролика обнаруживает настолько сильно выраженную отрицательную кооперативность [33], что такое объяснение вряд ли подходит.

Хотя первоначально последовательная модель была построена для объяснения гомотропных взаимодействий, позднее Киртли и Кошланд [90] обобщили ее на случай присутствия в системе аллостерического ингибитора и аллостерического активатора для объяснения гетеротропных взаимодействий. Подход Киртли и Кошланда трудно представить здесь в сжатой форме, поскольку эти авторы обсудили несколько возможных вариантов модели, каждый из которых с той или иной вероятностью может реализоваться для разных белков. Однако подход Киртли и Кошланда достаточно прост, и его нетрудно применить при любых исходных допущениях. Хотя Киртли и Кошланд понимали, что второй лиганд может индуцировать появление новых конформаций, отличных от А и В, они пришли к выводу, что, поскольку при этом модель становится чрезвычайно сложной, во всех случаях, когда нет прямых оснований отвергать модель с двумя конформациями, к более сложным моделям прибегать не следует. Поэтому авторы ограничились рассмотрением тех же самых двух конформаций (А и В) и допустили, что лиганд, представляющий основной интерес (Х), может связываться только с субъединицей в В-конформации. Далее мы ограничимся рассмотрением только одного из возможных способов связывания второго лиганда L (существуют, конечно, и другие способы связывания, однако их анализ проводится аналогичным образом). Допустим, что белок представляет собой димер и что лиганд L может связываться только субъединицей в В-конформации, причем L конкурирует с Х за связывание с одним и тем же центром. Иначе говоря, Х и L не могут быть связаны одновременно одной и той же субъединицей. При этих допущениях образуются следующие комплексы:



Если мы определим параметры K_x , K_t , K_{AB} и K_{BB} так же, как и ранее, а через K_L обозначим константу ассоциации для связывания L субъединицей в В-конформации ($K_L = [BL]/[B][L]$), то аналогично тому, как это было сделано выше, можно рассчитать концентрации всех форм. Например, концентрация формы B_2LX задается следующим выражением:

$$[B_2LX] = 2[A_2]K_x K_L K_t^2 K_{BB} [X][L].$$

Объединяя все такие соотношения, получаем уравнение для степени насыщения белка лигандом L:

$$Y_x = \frac{[ABX] + 2[B_2X_2] + [B_2LX]}{2([A_2] + [ABX] + [B_2X_2] + [ABL] + [B_2LX] + [B_2L_2])} =$$

$$= \frac{K_x K_t K_{AB} [X] + K_x^2 K_t^2 K_{BB} [X]^2 + K_x K_L K_t^2 K_{BB} [X][L]}{(1 + 2K_x K_t K_{AB} [X] + K_x^2 K_t^2 K_{BB} [X]^2 + 2K_L K_t K_{AB} [L] + 2K_x K_L K_t^2 K_{BB} [X][L] + K_L^2 K_t^2 K_{BB} [L]^2)}.$$

При любом фиксированном значении $[L]$ это уравнение совпадает по форме с уравнением Эдера для связывания X, только константы ассоциации в нем зависят от $[L]$:

$$K_1 = \frac{K_x K_t (K_{AB} + K_L K_t K_{BB} [L])}{1 + 2K_L K_t K_{AB} [L] + K_L^2 K_t^2 K_{BB} [L]^2},$$

$$K_2 = \frac{K_x K_t K_{BB}}{K_{AB} + K_L K_t K_{BB} [L]}.$$

Отношение K_2/K_1 равно

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{1 + 2K_L K_t K_{AB} [L] + K_L^2 K_t^2 K_{BB} [L]^2}{c^2 + 2K_L K_t K_{AB} [L] + K_L^2 K_t^2 K_{BB} [L]^2}. \quad (7.14)$$

Здесь c^2 , как и ранее, представляет собой отношение K_{AB}^2/K_{BB} . Из этих уравнений видно, что хотя лиганд L напоминает обычный конкурентный ингибитор, его влияние на связывание X осложняется взаимодействием субъединиц. Что касается второго связывающего центра в белковой молекуле, то L действует исключительно как ингибитор, так как K_2 монотонно падает с ростом $[L]$. Однако если $K_{BB} > 2K_{AB}^2$ (т. е. $c^2 < 1/2$), то L при низких концентрациях действует как активатор, потому что в этом случае числитель выражения для K_1 растет вначале с ростом $[L]$ более круто, чем знаменатель. Влияние L на кооперативность связывания X совершенно ясно; это видно из уравнения (7.14): независимо от того, что имеет место в отсутствие L — положительная или отрицательная кооперативность, повышение концентрации L сопровождается уменьшением кооперативности до полного ее исчезновения.

Поскольку имеется большое число других не менее приемлемых вариантов связывания лиганда L (например, этот лиганд может связываться только субъединицей в А-конформации, или одновременно с X , или индуцировать третью конформацию, или связываться после того, как связался X), ясно, что анализ общего случая связывания двух лигандов в рамках последовательной модели намного более сложен, чем в рамках симметричной модели. Однако возникает вопрос, можно ли считать симметричную модель более простой, если ее алгебраическая простота достигается ценою упрощения основной концепции: допущение о конформационной симметрии хотя и элегантно, по существу произвольно. Кроме того, последовательную модель можно применить для описания кинетических данных без введения другого произвольного допущения, используемого в симметричной модели, состоящего в том, что ферменты представляют собой истинные K -системы. В последовательной модели предполагается, что субстрат связывается только субъединицей в В-конформации. Следовательно, для всех каталитических стадий локальное окружение субстрата одинаково и, естественно, все они характеризуются одной и той же константой скорости.

Наконец, рассмотрим вкратце согласованную модель. Следует отметить, что на самом деле она не представляет собой еще одну, новую модель аллостерических взаимодействий; это название Кошланд, Немети и Филмер предложили для частного случая симметричной модели, описываемого уравнением (7.11). Для того чтобы облегчить сопоставление согласованной модели с последо-

вательной, эти авторы ввели свои обозначения, однако следует подчеркнуть, что согласованная модель не является частным случаем последовательной модели, и было бы ошибочным полагать, что это так.

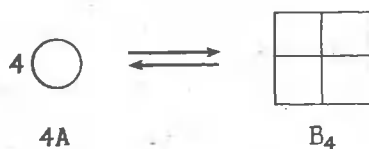
7.9. Реакционная способность половины связывающих центров

После открытия явления отрицательной кооперативности появилось очень много работ, посвященных этому вопросу (см. [104]). Некоторые примеры такого рода классифицированы как *реакционная способность половины связывающих центров* (half-of-the-sites reactivity) [105] — крайний случай отрицательной кооперативности, когда реакционную способность по отношению к субстрату или к другим реагентам обнаруживает только половина всех совершенно одинаковых субъединиц белковой молекулы. Этот тип отрицательной кооперативности согласуется с последовательной моделью, в особенности если учесть тот факт, что индивидуальные субъединицы любого белка асимметричны, и поэтому маловероятно, чтобы все контакты между субъединицами были одинаковыми [38]. Однако Мак-Кварри и Бернхард [107] предложили другое объяснение реакционной способности половины связывающих центров, которое исходит из *предсуществующей асимметрии*. Эти авторы считают, что в некоторых белках идентичные субъединицы располагаются таким образом, что в зависимости от окружения их можно разбить на две группы, т.е. белковая молекула асимметрична даже в отсутствие лиганда. Это не противоречит подходу, использованному в последовательной модели. Корниш-Боуден и Кошланд [39], исходя из проведенного ими при помощи ЭВМ анализа ассоциации субъединиц, пришли к заключению, что а priori нельзя считать, что идентичные субъединицы занимают в олигомере равноценные позиции. Однако сторонники последовательной модели (см., например, [136]) для простоты обычно допускают симметричное расположение субъединиц, если против этого нет веских возражений. Свидетельства в пользу предсуществующей асимметрии детально рассмотрены в работе [133]; здесь мы этот вопрос затрагивать не будем.

7.10. Другие равновесные модели кооперативности

Фриден [56], с одной стороны, и Николь, Джексон и Винзор [120] — с другой, высказали независимо друг от друга мнение, что в некоторых случаях кооперативность может быть связана с существованием равновесия между формами белка, различаю-

щимися по степени агрегации, например равновесия между мономером A и тетрамером B_4 ¹



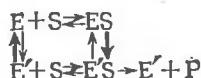
Если допустить, что эти формы обладают разным сродством к лиганду, то подобная модель по сути будет близка к симметричной и, как и последняя, будет предсказывать кооперативное связывание лиганда. Однако уравнения, описывающие связывание лиганда, имеют в этом случае гораздо более сложный вид: в них входит концентрация белка, так как от нее зависят относительные количества свободных форм A и B_4 .

Основное преимущество модели диссоциирующего белка состоит в том, что ее гораздо легче проверить экспериментально, чем модели, рассмотренные ранее: связывание лиганда в этом случае должно сопровождаться большим изменением молекулярного веса белка и степень кооперативности должна зависеть от концентрации последнего. Эти особенности связывания лиганда характерны только для модели диссоциирующего белка, и их легко выявить экспериментально. Фриден и Колмэн [57] показали, например, что обратимая ассоциация позволяет полностью объяснить связывание различных нуклеотидов глутаматдегидрогеназой. Процессы диссоциации—ассоциации белковой молекулы могут давать определенный вклад в кооперативность и в случае гемоглобина, который способен диссоциировать на димеры в растворах с высокой концентрацией соли. Однако одной только диссоциацией объяснить кооперативное связывание кислорода не удастся, поскольку оно наблюдается во многих случаях, когда диссоциация отсутствует. При работе с любым белком необходимо всегда проверять, зависит ли наблюдаемая кооперативность от концентрации белка. В тех случаях, когда обнаруживается изменение степени кооперативности белка, в качестве возможной причины следует рассматривать диссоциацию.

¹ Одновременно подобная идея была высказана Б. И. Кургановым (см. Б. И. Курганов, *Химия и технология полимеров*, 11, 140, 1967). В этой же работе был впервые указан принципиальный путь доказательства механизма кооперативности, в основе которого лежит смещение равновесия между олигомерными формами под действием лиганда. (Более подробно см. Б. И. Курганов, *Аллостерические ферменты*, М., «Наука», 1978.) — *Приж. перев.*

7.11. Кинетические модели кооперативности

Все рассмотренные выше модели являются по существу равновесными, и они пригодны для интерпретации кинетических данных только в том случае, если величину v/V можно считать истинной мерой Y . Для объяснения кооперативности построено также несколько чисто кинетических моделей, не имеющих аналогов среди равновесных моделей. Простейшей среди них является модель, предложенная Рабином [126]:



Если равновесие между E и E' сдвинуто в сторону образования E , а равновесие между ES и $E'S$ — в сторону образования $E'S$ (для того чтобы отметить это, мы воспользовались тонкими и жирными стрелками), то S должен связываться более прочно формой E' , чем формой E , поскольку для соблюдения второго закона термодинамики необходимо, чтобы константа равновесия для полной реакции $E + S \rightleftharpoons E'S$ была одинаковой независимо от пути, по которому совершается переход от E к $E'S$. Если реакция распада $E'S \rightarrow E' + P$ протекает гораздо быстрее, чем реакции изомеризации $E' \rightarrow E$ и $ES \rightarrow E'S$, то процесс связывания субстрата не может достичь равновесия. При низких концентрациях S форма E' изомеризуется в E еще до того, как S успеет с ней связаться. При высоких же концентрациях S последний имеет возможность связаться с E' , прежде чем эта форма превратится в E . Таким образом, кажущееся сродство фермента к субстрату растет при увеличении концентрации субстрата, или, иными словами, связывание субстрата является кооперативным. Важно подчеркнуть, что реакция $E'S \rightarrow E' + P$ должна быть быстрой: если эта стадия настолько медленна, что лимитирует скорость ферментативного процесса, нарушения равновесия в связывании субстрата не происходит и насыщение субстратом не может быть кооперативным.

Как видно из разд. 5.2, в том случае, когда субстраты связываются неупорядоченно, полное уравнение стационарной скорости для двухсубстратной реакции, протекающей через стадию образования тройного комплекса, содержит члены, в которые входят концентрации субстратов в квадрате. Фердинанд [54] показал, что эти квадратичные члены при соответствующих значениях констант скорости могут привести к появлению сигмобразной зависимости скорости реакции от концентрации любого субстрата. Этот механизм кооперативности можно в принципе отличить от механизма, описываемого равновесными моделями, по отсутствию кооперативного характера кривой насыщения при проведении

специального эксперимента по связыванию. На самом деле сделать это не так просто, поскольку хотя результаты экспериментов по связыванию интерпретировать гораздо легче, чем кинетические данные, их не удастся получить с такой же точностью.

Отклонения от уравнения Михаэлиса—Ментен должны наблюдаться и для многих других механизмов с разветвленными путями [139], однако эти отклонения могут быть настолько малы, что обнаружить их не удастся, как это и было показано, например, Гулбински и Клеландом [61] для галактокиназы (разд. 3.7 и 5.2). В настоящее время не известно ни одного случая кооперативности ферментативной кинетики подобного рода, и, по-видимому, энзимологи будут продолжать использовать равновесные модели, пока это будет целесообразно.

Хотя кинетическая кооперативность не представляет особой ценности для единичных ферментов, кинетический контроль метаболических путей двумя или большим числом ферментов может иметь исключительно важное значение для живых организмов. Ньюсхолм и Джеверс [119] показали, что появление цикла в ключевой точке контроля (например, цикла, состоящего из пары противоположно направленных реакций, катализируемых фосфофруктокиназой и фруктозодифосфатазой) может обеспечить более эффективный контроль суммарного потока по данному пути, чем кооперативные свойства отдельного фермента. Это обстоятельство объясняет присутствие фруктозодифосфатазы в мышце — факт, ранее казавшийся загадочным, поскольку глюконеогенез в мышце не протекает. Цикл, подобный описанному, представляет собой не что иное, как «бесполезный» цикл, так как налицо «лишние» затраты АТФ, который идет, однако, на выполнение очень важных регуляторных функций.

Анализ кинетических кривых

8.1. Уравнение скорости в интегральной форме

Кинетическое уравнение можно записать двумя различными способами: либо в виде зависимости концентрации реагента от времени, либо в виде зависимости скорости реакции от концентраций реагентов. В энзимологии чаще пользуются второй формой записи, в то время как в химии — первой. Химики отдают предпочтение, как правило, интегральным уравнениям скорости, имеющим то преимущество, что в них входят величины, непосредственно измеряемые экспериментально. Однако, как видно из гл. 2, первые исследователи ферментативной кинетики, пытаясь применить обычные приемы химической кинетики для описания экспериментальных данных при помощи интегральных уравнений, встретились с большими трудностями. Эти трудности были в значительной степени преодолены благодаря работе Михаэлиса и Ментен [113], показавших, что более простой способ изучения кинетических свойств ферментов состоит в измерении начальных скоростей реакций. В этом случае можно пренебречь накоплением продукта и расходом субстрата, которые осложняют анализ всей кинетической кривой. Нежелательным последствием широкого применения этого подхода явилось, однако, то, что биохимики теперь избегают применять интегральные уравнения скорости даже в тех случаях, когда это вполне оправданно.

На начальном этапе исследования кинетических свойств фермента, когда главная задача состоит в том, чтобы установить, какому уравнению подчиняются кинетические данные и каковы приблизительные значения кинетических параметров, измерения начальных скоростей вполне уместны. Следует стремиться при этом исключить влияние продуктов или вносить их в систему контролируемым образом. Однако по завершении этого предварительного этапа необходимо переходить к изучению реакции во времени (когда происходит накопление продукта и исчезновение субстрата), поскольку в полной кинетической кривой содержится гораздо больше информации, чем просто в значении скорости, полученном экстраполяцией к нулевому моменту времени. Точные значения кинетических параметров можно получить из относительно небольшого числа экспериментов. Важно также от-

метить, что анализ полных кинетических кривых позволяет избежать субъективных ошибок, неизбежных при определении начальных скоростей из нелинейных графиков.

8.2. Интегральная форма уравнения Михаэлиса — Ментен

Прежде чем приступить к интегрированию уравнения Михаэлиса—Ментен (или любого другого уравнения скорости), в него необходимо ввести все возможные соотношения, которые существуют между концентрациями реагентов. Так, концентрация субстрата s и концентрация продукта p не являются независимыми величинами, поскольку их сумма всегда постоянна. Одну из этих величин (либо s , либо p) нужно исключить из уравнения, воспользовавшись равенством $s + p = s_0$. Тогда соответствующей формой уравнения Михаэлиса—Ментен будет уравнение (2.11)

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V(s_0 - p)}{K_M + s_0 - p} \quad (8.1)$$

Проводя интегрирование

$$\int \frac{(K_M + s_0) dp}{s_0 - p} - \int \frac{p dp}{s_0 - p} = \int V dt,$$

получаем

$$-(K_M + s_0) \ln(s_0 - p) + p + s_0 \ln(s_0 - p) = Vt + \alpha.$$

Условие $p = 0$ при $t = 0$ дает $\alpha = -K_M$ и, следовательно,

$$Vt = p + K_M \ln[s_0/(s_0 - p)],$$

или

$$Vt = s_0 - s + K_M \ln(s_0/s). \quad (8.2)$$

Уравнение (8.2) представляет собой интегральную форму уравнения Михаэлиса—Ментен. Оно определяет временной ход (или кинетическую кривую) реакции, для которой уравнение Михаэлиса—Ментен продолжает выполняться на протяжении длительного промежутка времени после начала реакции. В уравнении (8.2) t выражено через p , а не наоборот, как нам хотелось бы, однако это не создает особых неудобств при его использовании.

Кроме того, из двух вариантов записи уравнения (и других уравнений скорости в интегральной форме) целесообразно использовать тот, при котором в уравнение входит член с $\ln(s_0/s)$, — это позволяет избежать недоразумений, которые могут возникнуть в том случае, когда в систему в начальный момент времени добавлен продукт, т. е. когда $p_0 \neq 0$.

Как и в случае дифференциальной формы уравнения Михаэлиса—Ментен, для уравнения (8.2) можно предложить несколько линейных анаморфоз:

$$\frac{t}{\ln(s_0/s)} = \frac{1}{V} \left[\frac{s_0 - s}{\ln(s_0/s)} \right] + \frac{K_M}{V}, \quad (8.3)$$

$$\frac{s_0 - s}{t} = V - \frac{K_M}{t} \ln(s_0/s), \quad (8.4)$$

$$\frac{t}{s_0 - s} = \frac{K_M}{V} \left[\frac{1}{(s_0 - s)} \right] \ln(s_0/s) + \frac{1}{V}. \quad (8.5)$$

В соответствии с уравнением (8.3) зависимость $t/\ln(s_0/s)$ от $(s_0 - s)/\ln(s_0/s)$ графически представляется прямой с наклоном, равным $1/V$; эта прямая отсекает на оси ординат отрезок, равный K_M/V . Таким образом, данная линейная анаморфоза подобна графику зависимости s/v от s при анализе начальных скоростей. Аналогичным образом могут быть построены линейные анаморфозы, соответствующие уравнениям (8.4) и (8.5) и сходные с графиками зависимости v от v/s и $1/v$ от $1/s$ соответственно. Во всех трех случаях можно в принципе определить параметры V и K_M из одной кинетической кривой. Чтобы это определение было надежным, необходимо, с одной стороны, использовать начальные концентрации субстрата s_0 , заметно превышающие K_M , и с другой — наблюдать за реакцией до тех пор, пока величина $(s_0 - s)$ не станет заметно больше, чем K_M . Кроме того, чтобы применять подобные подходы, необходимо быть уверенным в том, что ингибирование продуктом реакции практически отсутствует. При измерении начальных скоростей ингибированием продуктом, как правило, можно пренебречь, если следить за реакцией на протяжении небольшого промежутка времени, когда концентрация продукта практически равна нулю. Если же за реакцией наблюдают длительное время, то исключить ингибирование продуктом уже не удастся. Кроме того, располагая единственной кинетической кривой, нельзя отличить замедление реакции, связанное с расходом субстрата, от любого торможения процесса, обусловленного конкурентным ингибированием накапливающимся продуктом. Об этом удивительном свойстве подобных линейных анаморфоз никогда не следует забывать. Подробнее данный вопрос будет рассмотрен в следующем разделе.

Из трех линейных анаморфоз уравнения (8.2) наиболее часто, по-видимому, применяется анаморфоза (8.4). Впервые она была использована Уолкером и Шмидтом [147] при исследовании гистидин—аммиак-лиазы. Однако в соответствии с характером изложения материала по линейным анаморфозам в последующих разделах книги мы будем использовать вместо уравнения (8.4) уравнение (8.3) и аналогичные уравнения. Их несколько проще, чем

уравнение (8.4), можно преобразовать к виду, удобному для анализа очень важного случая конкурентного ингибирования продуктом реакции.

8.3. Конкурентное ингибирование продуктом реакции

Если мы не располагаем данными о том, насколько существенно ингибирование продуктом реакции, то из осторожности следует допустить, что оно существует, и в анализ кинетических кривых включить расчет константы ингибирования продуктом. В качестве основного дифференциального уравнения следует использовать не уравнение (8.1), а уравнение вида

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V(s_0 - p)}{K_M(1 + p/K_p) + s_0 - p}. \quad (8.6)$$

Оно получено преобразованием уравнения (2.22), однако a заменена на s , с тем чтобы подчеркнуть то обстоятельство, что мы ограничиваемся здесь рассмотрением необратимых реакций. По этим же соображениям V_f , K_M^A и K_s^P записаны просто как V , K_M и K_p ; величина s представлена как $(s_0 - p)$, поскольку s и p должны рассматриваться как переменные, связанные уравнением материального баланса $s + p = s_0$. Если преобразовать уравнение (8.6) к виду

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V(s_0 - p)}{K_M + s_0 - (1 - K_M/K_p)p}, \quad (8.7)$$

оно становится аналогичным уравнению (8.1). Поэтому при анализе единичной кинетической кривой влияние конкурентного ингибирования продуктом нельзя отличить от эффекта, вызываемого истощением запасов субстрата. Если же анализируются несколько кинетических кривых, полученных при различных значениях s_0 , то эти два случая становятся различными, так как «константа» ($K_M + s_0$) меняется при варьировании s_0 . Здесь следует сделать маленькую оговорку: коэффициент перед p в знаменателе уравнения (8.1) равен -1 , однако в уравнении (8.7) он равен $-(1 - K_M/K_p)$, т. е. нулю, если $K_M = K_p$, и положительной величине, если $K_M > K_p$. Может показаться, что случай $K_M = K_p$ настолько маловероятен, что его можно без опасений не рассматривать. Однако это не так: если величина K_M близка к K_s и если S и P содержат близкие по структуре группы, определяющие связывание с ферментом, то вполне может оказаться, что $K_p \approx K_M$. В этом случае уравнение (8.7) принимает следующий вид:

$$\frac{dp}{dt} = k(s_0 - p) = ks,$$

где k соответствует $V/(K_M + s_0)$ и является простой константой скорости первого порядка (гл. 1). Этот случай, однако, нетрудно отличить от обычной реакции первого порядка, так как «константа» скорости является функцией s_0 .

Поскольку уравнение (8.7) совпадает с уравнением (8.1), его можно проинтегрировать точно таким же образом [74, 80, 129]. После интегрирования получаем

$$Vt = (1 - K_M/K_P)(s_0 - s) + K_M(1 + s_0/K_P) \ln(s_0/s). \quad (8.8)$$

Это уравнение также можно представить в линейной форме, например

$$\frac{t}{\ln(s_0/s)} = \frac{1}{V} (1 - K_M/K_P) \left[\frac{s_0 - s}{\ln(s_0/s)} \right] + \frac{K_M}{V} (1 + s_0/K_P), \quad (8.9)$$

или двумя другими способами по аналогии с уравнениями (8.4) и (8.5). В этом случае в координатах $\{(s_0 - s)/\ln(s_0/s); t/\ln(s_0/s)\}$ мы снова получаем прямую, наклон которой равен теперь $(1 - K_M/K_P)/V$, а отсекаемый отрезок — $K_M(1 + s_0/K_P)/V$. Очевидно, что из одной прямой нельзя определить три константы, однако их легко найти из серии экспериментов, проведенных при различных s_0 . Один из методов, позволяющих определить кинетические параметры, основан на построении графика зависимости величины отсекаемого отрезка на первичных графиках от s_0 ; эта зависимость представляет собой прямую, наклон которой равен K_M/VK_P , а отрезок, отсекаемый от оси ординат, — K_M/V . Хотя этот метод позволяет определить три кинетических параметра, используемые соотношения не очень удобны. Гораздо более изычным является излагаемый ниже метод — один из трех, описанных Дженнингсом и Ниманном [85].

Прежде всего следует отметить, что размерности величин $t/\ln(s_0/s)$ и $(s_0 - s)/\ln(s_0/s)$ совпадают с размерностями величин s_0/V и s_0 соответственно. Рассмотрим, к чему приводит экстраполяция ординаты $t/\ln(s_0/s)$ к значению $(s_0 - s)/\ln(s_0/s)$, равному s_0 . Условие $(s_0 - s)/\ln(s_0/s) = s_0$ для уравнения (8.9) дает

$$\begin{aligned} \frac{t}{\ln(s_0/s)} &= \frac{1}{V} (1 - K_M/K_P) s_0 + \frac{K_M}{V} (1 + s_0/K_P) = \\ &= (s_0 + K_M)/V = s_0/v_0, \end{aligned}$$

где v_0 — начальная скорость реакции. Таким образом, простая экстраполяция дает точку $\{s_0; s_0/v_0\}$. Подобные точки определяются графически при исследованиях начальных скоростей. Строя линейные анаморфозы нескольких кинетических кривых на одном графике и проводя для каждой прямой описанную выше экстраполяцию, приходим к зависимости s_0/v_0 от s_0 , из которой

обычным путем могут быть получены параметры V и K_M . Эта графическая процедура представлена на рис. 8.1.

Может показаться, что для построения такого простого графика, как график зависимости s_0/v_0 от s_0 , нет необходимости прибегать к столь трудоемкому методу. Однако у него есть много преи-

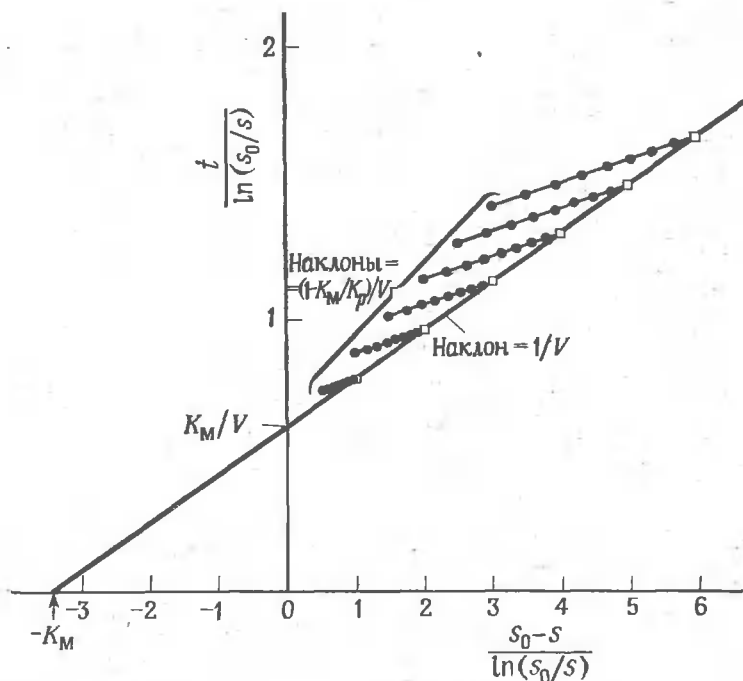


Рис. 8.1. Определение кинетических параметров из серии кинетических кривых, полученных при различных значениях начальной концентрации субстрата s_0 с помощью графика зависимости $t/\ln(s_0/s)$ от $(s_0 - s)/\ln(s_0/s)$. Предполагается, что фермент ингибируется продуктом реакции по конкурентному типу. Экспериментальные точки (черные кружки) рассчитаны из уравнения (8.9) при $K_M = 3,46$, $K_P = 6,55$, $V = 5,7$ и значениях s_0 в интервале от 1 до 6 (произвольные единицы). Значения s выбирались в интервале от $0,9 s_0$ до $0,2 s_0$ (что соответствует изменению глубины превращения субстрата от 10 до 80%) через каждые $0,1 s_0$. Точка, обозначенная квадратом, получается при каждом значении s_0 экстраполяцией прямой, проведенной через экспериментальные точки, к значению $(s_0 - s)/\ln(s_0/s)$, равному s_0 (что соответствует нулевой глубине превращения). Эти экстраполированные точки лежат на прямой; ее наклон равен $1/V$, а на оси абсцисс и оси ординат соответственно она отсекает отрезки $-K_M$ и K_M/V (см. рис. 2.4).

муществ: этот метод не только дает информацию об ингибировании продуктом реакции, но и позволяет определить значения величин s_0/v_0 более надежно, чем при обычных измерениях начальных скоростей. Экстраполяция к точке $\{s_0; s_0/v_0\}$ является достаточ-

но близкой и может быть проведена более точно и объективно, чем измерение наклона кривой, экстраполированной к нулевому моменту времени.

8.4. Ингибирование несколькими продуктами

В предыдущем разделе мы рассмотрели конкурентное ингибирование единственным продуктом. Однако в ходе ферментативной реакции может образовываться несколько продуктов, и в этом случае наблюдаемая константа конкурентного ингибирования будет представлять собой не константу ингибирования для какого-либо одного продукта, а обратное значение суммы обратных значений всех констант ингибирования продуктами. Следовательно, константа K_p , используемая в предыдущем разделе, должна быть заменена всюду на $1/(1/K_p + 1/K_q + \dots)$. Это следует из уравнения (8.6), потому что в нем величина p/K_p должна быть заменена на величину $(p/K_p + q/K_q + \dots)$. Последняя эквивалентна $p(1/K_p + 1/K_q + \dots)$, если в начальный момент времени отсутствуют все субстраты, так как в этом случае на всем протяжении $p = q = \dots$.

Вполне естественно, что нам хотелось бы дифференцировать влияние различных продуктов на ход реакции; для этого можно добавлять разные количества того или иного продукта до начала реакции. Рассмотрим случай, когда ферментативная реакция имеет два продукта, P и Q, из которых в начальный момент времени присутствует только один (Q) в концентрации q_0 . В таком случае

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V(s_0 - p)}{K_M \left(1 + \frac{p}{K_p} + \frac{p + q_0}{K_q}\right) + s_0 - p} \quad (8.10)$$

Проинтегрировав уравнение тем же методом, что и ранее, получаем

$$Vt = K_M \left[1 + \frac{q_0}{K_q} + s_0 \left(\frac{1}{K_p} + \frac{1}{K_q}\right)\right] \ln(s_0/s) + \\ + \left[1 - K_M \left(\frac{1}{K_p} + \frac{1}{K_q}\right)\right] (s_0 - s).$$

Используя подход, изложенный выше, мы можем построить график зависимости $t/\ln(s_0/s)$ от $(s_0 - s)/\ln(s_0/s)$ и далее, после экстраполяции, график зависимости s_0/v_0 от s_0 . В этом случае v_0 представляет собой начальную скорость реакции в особых условиях, а именно для случая, когда в системе в начальный момент времени присутствует конкурентный ингибитор Q в концентрации q_0 :

$$v_0 = \frac{Vs_0}{K_M (1 + q_0/K_q) + s_0} \quad (8.11)$$

Что касается параметра K_q , то его можно определить графически (гл. 4). Описанный подход используется не только в тех случаях, когда добавляемый ингибитор является продуктом реакции. Если до начала реакции в систему внесен конкурентный ингибитор I , не являющийся продуктом реакции, в концентрации i , то для определения константы ингибирования K_i можно поступить следующим образом. Если в уравнении (8.10) заменить $(p + q_0)/K_q$ на i/K_i , то в уравнение, соответствующее уравнению (8.11), вместо q_0/K_q будет входить i/K_i , и поэтому константа K_i определяется из точек, полученных экстраполяцией, как это описано в гл. 4.

8.5. Смешанное ингибирование продуктами

В гл. 5 указывалось, что ингибирование продуктом реакции совсем не обязательно должно быть конкурентным; более того, конкурентный тип ингибирования не является типичным. Более общим является случай, когда продукт представляет собой смешанный ингибитор с константами ингибирования K_p и K'_p соответственно:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V(s_0 - p)}{K_M(1 + p/K_p) + (s_0 - p)(1 + p/K'_p)}.$$

Это уравнение отличается от других уравнений, рассмотренных в этой главе, поскольку в знаменателе оно содержит член p^2 . Однако его можно все еще довольно просто проинтегрировать:

$$\int \frac{(K_M + s_0) dp}{s_0 - p} + \int \frac{\left(\frac{K_M}{K_p} + \frac{s_0}{K'_p} - 1\right) p dp}{s_0 - p} - \int \frac{p^2 dp}{K'_p(s_0 - p)} = \int V dt.$$

Следовательно,

$$\begin{aligned} & - (K_M + s_0) \ln(s_0 - p) - \left(\frac{K_M}{K_p} + \frac{s_0}{K'_p} - 1\right) [p + s_0 \ln(s_0 - p)] - \\ & - \frac{1}{K'_p} \left[\frac{1}{2} (s_0 - p)^2 - 2s_0(s_0 - p) + s_0^2 \ln(s_0 - p) \right] = Vt + \alpha. \end{aligned}$$

С учетом начальных условий ($p = 0$ при $t = 0$) это уравнение легко упрощается:

$$Vt = (1 - K_M/K_p)(s_0 - s) + \frac{(s_0 - s)^2}{2K'_p} + K_M(1 + s_0/K_p) \ln(s_0/s).$$

Полученное уравнение отличается от уравнения (8.8) только тем, что оно содержит член $(s_0 - s)^2 / 2K_p'$, который становится бесконечно малым при $K_p' \rightarrow \infty$. Случай чистого неконкурентного или бесконкурентного ингибирования можно получить, если подставить в уравнение $K_p \rightarrow \infty$ или $K_p = K_p'$ соответственно.

Из-за наличия квадратичного члена уравнение для случая смешанного ингибирования в координатах $\{(s_0 - s)/\ln(s_0/s); t/\ln(s_0/s)\}$ не дает прямой:

$$\frac{t}{\ln(s_0/s)} = \frac{1}{V} \left(1 - \frac{K_M}{K_p} + \frac{s_0 - s}{2K_p'} \right) \frac{s_0 - s}{\ln(s_0/s)} + \frac{K_M}{V} \left(1 + \frac{s_0}{K_p} \right). \quad (8.12)$$

Наклон не является постоянной величиной, а меняется с изменением s , в результате чего прямые искривляются. Кривые в указанных координатах приведены на рис. 8.2. Однако, если K_p'

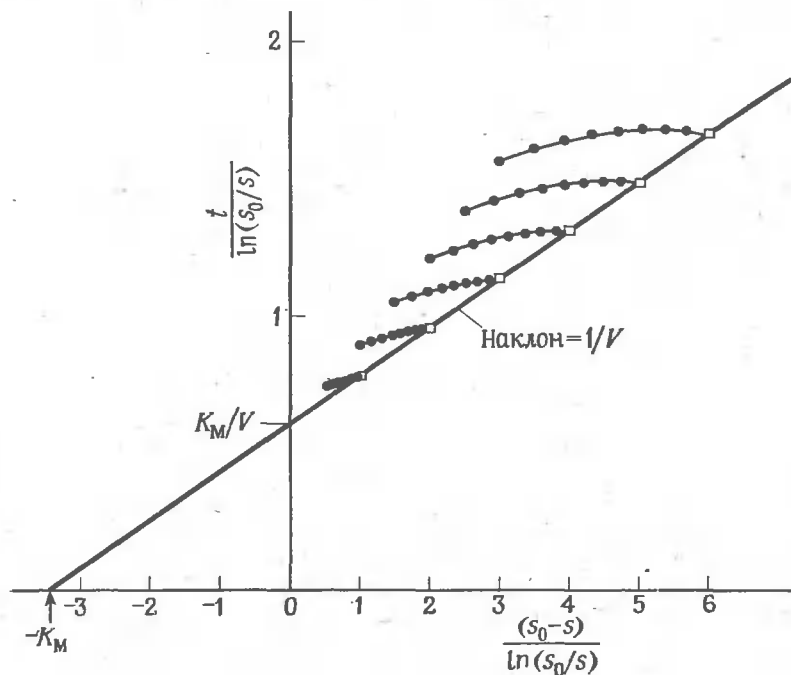


Рис. 8.2. Использование метода, представленного на рис. 8.1, в условиях смешанного ингибирования продуктами реакции.

Значения констант те же, что и в подписи к рис. 8.1, однако введена дополнительная константа $K_p' = 8.27$, а вместо уравнения (8.9) использовано уравнение (8.12). Переход от конкурентного к смешанному типу ингибирования продуктами реакции не влияет на положение точек, которые находятся путем экстраполяции (квадраты), так как при экстраполяции к нулевой глубине превращения субстрата эффекты ингибирования продуктом снимаются.

не слишком мала по сравнению с K_p , кривизна относительно невелика и становится заметной лишь при глубинах превращения субстрата 90 % и выше. Это обстоятельство приводит к двум важным последствиям. Во-первых, определение начальных скоростей путем экстраполяции может быть проведено достаточно точно, даже если смешанное ингибирование ошибочно принято за конкурентное. Во-вторых, можно не заметить существующей кривизны и получить неточные значения K_p . Это означает, с одной стороны, что смешанное ингибирование не мешает точной оценке параметров V и K_m , а с другой — что не следует определять константу K_p описанным способом, если не получено независимых доказательств конкурентного характера ингибирования. Кроме того, кажущийся линейный характер графиков зависимости $t/\ln(s_0/s)$ от $(s_0 - s)/\ln(s_0/s)$ нельзя рассматривать как указание на определенную природу ингибирования продуктом. Для установления типа ингибирования лучше воспользоваться методом, описанным в предыдущем разделе для определения индивидуальных констант ингибирования продуктом и основанным на добавлении к реакционной смеси различных количеств продукта.

Форма кинетических кривых в общем довольно нечувствительна к виду уравнения, используемого для их описания. Другими словами, нередко (и не только в рассмотренном выше случае) экспериментальная кинетическая кривая может быть вполне удовлетворительно описана неверным уравнением. Желательно поэтому всегда проводить несколько экспериментов при различных начальных концентрациях субстрата точно так же, как это делается при исследовании начальных скоростей. Тем не менее было бы ошибочно думать, что, как считают некоторые исследователи, интегральные формы уравнений скорости не имеют преимуществ перед дифференциальными: детальный анализ кинетической кривой в целом *всегда* дает больше информации, чем оценка начальной скорости из тех же самых данных. Даже если интегральная форма уравнения скорости используется только для оценки значения начальной скорости, эта оценка, проведенная корректным образом, дает более надежное значение v_0 , чем метод определения начального наклона, поскольку, как мы уже говорили, в методе интегральных кривых используется больше информации и он в меньшей степени подвержен ошибкам субъективного характера. Родственные методы определения начальных скоростей, основанные на использовании прямого линейного графика, обсуждаются в работе Корншиш-Боудена [36].

8.6. Более сложные случаи

Выше мы рассмотрели только относительно простой случай необратимой односубстратной реакции, однако эти же принципы могут быть использованы и для анализа большинства основных

типов ферментативных реакций. Большая часть соответствующих уравнений интегрируется гораздо проще, чем обычно полагают. Для этого нужно быть лишь немного знакомым с интегральным исчислением, а не просто уметь находить стандартные интегралы в таблице. Альберти и Корбер [5] проанализировали интегральную форму уравнения для обратимого механизма Михаэлиса — Ментен и применили его к фумаразе. Шверт [131] получил интегральные формы уравнений скорости для ряда более сложных механизмов. Хотя интегрирование этих уравнений не представляет особых трудностей, конечные выражения имеют обычно довольно сложный вид, и поэтому их анализ весьма трудоемок. Кроме того, интегральные уравнения так мало применялись в ферментативной кинетике, что дальнейшее более или менее детальное обсуждение этого вопроса нецелесообразно.

Даже если использование интегральной формы уравнения скорости недостаточно обоснованно (например, если не установлен механизм реакции или фермент теряет активность в ходе реакции), анализ кинетической кривой может быть весьма полезным. Вместо того чтобы искать истинное уравнение кривой, можно воспользоваться уравнением следующего типа:

$$p = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 t^2 + \beta_3 t^3 + \dots \quad (8.13)$$

Этим уравнением можно описать *любую* монотонную функцию одного параметра. Коэффициенты $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3 \dots$ определяются по методу наименьших квадратов (гл. 10). Начальная скорость находится далее из уравнения

$$\frac{dp}{dt} = \beta_1 + 2\beta_2 t + 3\beta_3 t^2 + \dots \quad (8.14)$$

Видно, что при $t=0$ $v = \beta_1$. В принципе чем больше членов содержит уравнение подобного типа, тем лучше можно описать кинетическую кривую. Однако на практике при анализе кинетических кривых ферментативной реакции оказывается, что почти вся необходимая информация содержится в первых трех или четырех членах уравнения (8.13); члены с коэффициентом β_4 и т. д. по порядку величины близки к случайной ошибке. Следовательно, члены, содержащие t в степени выше 3, брать не следует, во многих задачах для достаточно полного описания кривой вполне хватает предыдущих членов (см. [91]).

Метод определения v_0 с помощью степенного ряда по t обладает своими достоинствами и недостатками. С одной стороны, этот метод можно применять независимо от того, известно ли истинное уравнение скорости; он пригоден и в тех случаях, когда процесс осложняется протекающей во времени денатурацией фермента. С другой стороны, подобный подход дает гораздо меньше инфор-

мации о кривой. Коэффициенты $\beta_0, \beta_1, \beta_2 \dots$ не имеют физического смысла, и их нельзя преобразовать в параметры, связанные с механизмом ферментативного процесса. В частности, эти коэффициенты не равны соответствующим коэффициентам истинного уравнения скорости, представленного в виде бесконечного ряда (соответствие возможно только в том случае, если оба ряда являются бесконечными). Может показаться, что подстановка ряда значений t в уравнения (8.13) и (8.14) даст серию пар значений (p, v) , которые можно будет перевести в пары значений (s, v) и проанализировать их при помощи обычных уравнений скорости. Однако такой подход некорректен: пары значений, полученные подобным образом, не являются статистически независимыми и к ним нельзя применять методы статистической обработки результатов измерений.

8.7. Некоторые предостережения

Анализ кинетических кривых — это путь, на котором исследователи могут подстергать многие неожиданности. Именно поэтому большинство энзимологов, не желая рисковать, ограничиваются рассмотрением только начальных скоростей. В настоящем разделе обсуждаются некоторые наиболее серьезные ошибки, встречающиеся при использовании интегральных форм уравнений скорости.

В простых случаях, которые рассмотрены в настоящей главе, конкурентное ингибирование продуктом реакции не влияет на вид интегрального уравнения скорости. Следовательно, если конкурентное ингибирование продуктом не учтено, то анализ единственной кинетической кривой не позволяет обнаружить ошибку. Это утверждение верно и для более сложных случаев, потому что конкурентное ингибирование продуктом приводит к появлению члена, содержащего p , в знаменателе уравнения скорости. Однако там уже имеется отрицательный член, содержащий p , так как концентрация субстрата всегда входит в знаменатель в виде $(s_0 - p)$. Таким образом, член, соответствующий ингибированию продуктом, не влияет на вид интегрального уравнения скорости, если он не равен или не превышает члена, содержащего $(s_0 - p)$. Полезно сформулировать этот вывод и в обратной форме: тот факт, что кинетическая кривая описывается уравнением, не учитывающим ингибирования продуктом реакции, не означает, что конкурентное ингибирование продуктом отсутствует. По этой причине, если не доказано отсутствие ингибирования продуктом, следует всегда допускать его существование. Простой метод выявления ингибирования продуктом состоит в проведении экспериментов при различных значениях s_0 , как это обсуждалось в

разд. 8.3. Важно подчеркнуть, что ингибирование продуктом может быть существенным для реакции, которая на практике является необратимой (см. разд. 2.7). Таким образом, если известно, что константа равновесия очень высока, это еще не означает, что мы можем пренебречь ингибированием продуктом.

Ошибочным является допущение о том, что набор скоростей, получаемый при измерении наклона в различных точках кинетической кривой, можно считать начальными скоростями, определенными при различных значениях s и p . Например, казалось бы, определив s в различных точках, можно далее рассчитать скорость в середине интервалов между каждой парой точек как отношение разности значений s к временному интервалу. Этот подход можно рассматривать как обобщение очень распространенного когда-то ошибочного метода определения параметров линейных графиков. Он основывается на допущении, что набор наблюдаемых значений $y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$, выбранных через равные промежутки, таков, что y является линейной функцией x . Считается, что далее можно рассчитать серию наклонов $(y_2 - y_1)/\Delta x$, $(y_3 - y_2)/\Delta x, \dots, (y_n - y_{n-1})/\Delta x$ и найти их среднее значение. Однако среднее определяется следующим выражением:

$$\begin{aligned} \text{Измеряемый наклон} = \frac{1}{n-1} \left(\frac{y_2 - y_1}{\Delta x} + \frac{y_3 - y_2}{\Delta x} + \dots + \right. \\ \left. + \frac{y_n - y_{n-1}}{\Delta x} \right) = \frac{y_n - y_1}{(n-1) \Delta x}, \end{aligned}$$

из которого видно, что в конечную величину дают вклад только первый и последний члены. Кинетические кривые, встречающиеся в ферментативной кинетике, не могут быть проанализированы так же просто, однако сказанное выше справедливо и для них, и ясно, что в общем случае в методах описанного типа конечный результат мало зависит от промежуточных точек [34].

Не представляется целесообразным использование и другого, близкого подхода, основанного на нахождении полинома типа (8.13), наилучшим образом описывающего экспериментальные данные, и последующей подстановке в уравнение (8.14) различных значений t для получения набора значений скоростей. Соображения здесь несколько иные. Хотя в этом методе используются все данные, он тем не менее некорректен, потому что результирующие ошибки измерения скоростей связаны с самими измеряемыми величинами и не являются случайными. Все обычные статистические методы анализа данных требуют, чтобы наблюдения были независимыми. Если это условие не выполняется,

определяемые значения кинетических параметров могут тем не менее быть вполне правильными, однако любые оценки точности их определения становятся бессмысленными. Подход, основанный на применении полинома, является фактически методом «сглаживания» кривой, и он уничтожает большую часть информации о разбросе данных. Использование любой другой процедуры «сглаживания» (например, простого проведения плавной кривой через наблюдаемую линию или точки) наталкивается на те же самые возражения. Всякий раз, когда применяется «сглаживание» (какой бы метод при этом ни был выбран), использование более чем одного значения из каждой кривой для любого последующего статистического анализа некорректно. Естественнее всего брать в качестве такой единственной величины начальный наклон, однако этого бывает недостаточно.

Здравый смысл подсказывает, что если для анализа кривой выбирается, скажем, 50 точек, то вряд ли точность существенно повысится, если увеличить число точек до 500. Сомнительно, что дополнительные 450 точек существенно дополнят ту информацию, которая содержится в первых 50. Однако если рассчитать кинетические параметры из 50 и 500 точек одной и той же кривой и затем, не вдаваясь в детали, применить к ним статистические формулы для расчета стандартных отклонений, то обнаружится, что для 500 точек ошибки намного меньше, чем для 50. Эта парадоксальная ситуация становится ясной, если вспомнить, что для статистических расчетов необходимы *независимые* наблюдения: если выбранные точки располагаются слишком близко друг к другу, то они не могут быть независимыми. К сожалению, простого ответа на вопрос о том, как много точек необходимо брать для одной кривой, не существует. Если получение и анализ данных автоматизированы, то при выборе числа точек можно руководствоваться временем, необходимым для обработки данных при помощи ЭВМ, потому что включение большего числа точек, чем это необходимо, не повышает точности оценки параметров. Если же получение и анализ данных проводятся вручную, то, очевидно, разумно руководствоваться тем, чтобы не выполнять лишней работы. В большинстве подобных случаев для того, чтобы охарактеризовать кривую, по-видимому, достаточно приблизительно 10 точек и, конечно, не больше 20. Даже если число точек очень невелико, к оценке стандартных отклонений параметров следует подходить очень осторожно, потому что неясно, где находится то предельное число наблюдений, до которого их можно считать независимыми. В любом случае следует ожидать, что расхождения между кривыми будут намного больше расхождений между точками одной и той же кривой. Поэтому, если определение значений начальных скоростей проводится при помощи метода, описанного в разд. 8.3, разумнее всего рассмат-

ривать каждое экстраполированное значение начальной скорости как единичное наблюдение, а каждый наклон — как единичное наблюдение при оценке константы K_p .

Можно не сомневаться в том, что при соблюдении известной осторожности анализ полных кинетических кривых, несмотря на трудности, изложенные в этом разделе, дает ценную информацию и поэтому представляет собой важную область ферментативной кинетики.

Быстрые реакции

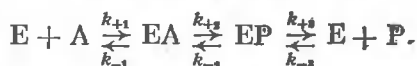
9.1. Ограничения метода измерения стационарных скоростей

Для удобства будем называть период реакции, предшествующий стационарному состоянию, переходным (transient phase). Термин «переходный» обычно применяют в физике и математике для обозначения членов типа $Ae^{-t/\tau}$, которые часто встречаются при решении дифференциальных уравнений. Эти члены достаточно велики при малых t и стремятся к 0, когда t становится много больше константы τ , называемой *временем релаксации*. Как мы увидим ниже, члены типа $Ae^{-t/\tau}$ всегда присутствуют в кинетических уравнениях, когда при их выводе не делается допущения о стационарности процесса.

Совершенно ясно, что для исследования очень быстрых реакций, у которых время полупревращения намного меньше 1 с, необходимо применять иные экспериментальные методы, чем при изучении более медленных реакций, поскольку обычно время смешивания реагентов составляет несколько секунд. На основе механических устройств для быстрого смешивания (таких, например, как устройство, используемое в методе «остановленной струи») можно разработать более или менее удобные подходы для изучения реакций с временами полупревращения порядка 10^{-3} с, однако в случае более быстрых реакций требуются другие методы. Менее очевидным является тот факт, что кинетические уравнения для быстрых реакций имеют другой вид. У большинства ферментативных реакций стационарное состояние достигается очень быстро; можно считать, что оно существует в течение всего времени наблюдения за ходом реакции, за исключением первых секунд после смешивания. Большая часть уравнений, рассмотренных в этой книге, выведена в предположении стационарности. Однако быстрые реакции аналогичны переходному периоду реакции, предшествующему установлению стационарного состояния, и их нельзя описывать уравнениями стационарной скорости. Настоящая глава посвящена выводу уравнений скорости для переходного периода, однако прежде всего она полезна с точки зрения обоснования целесообразности изучения этого периода ферментативной реакции.

Хотя измерения стационарных скоростей исключительно важны для установления механизма ферментативной реакции, их

основной недостаток заключается в том, что в лучшем случае стационарная скорость многостадийной реакции представляет собой скорость наиболее медленной стадии. Измерения стационарных скоростей обычно не дают информации о каких-либо более быстрых стадиях, а если мы хотим выяснить механизм ферментативной реакции, то такая информация необходима. Как указывалось в гл. 5, экспериментатор, варьируя концентрации субстратов, может существенно изменять относительные скорости различных стадий реакции. Поэтому, несмотря на указанное ограничение, часто удается охарактеризовать более чем одну стадию. К сожалению, подобным путем не выявляются стадии изомеризации. Рассмотрим простой пример:



Стационарная скорость для этого механизма дается уравнением (2.18):

$$v = \frac{(V_f a / K_M^A) - (V_r p / K_M^P)}{1 + (a / K_M^A) + (p / K_M^P)},$$

которое содержит только четыре параметра и поэтому не дает возможности найти значения всех шести независимых констант скорости. Приведенное уравнение применимо также и для значительно более сложных механизмов, в которых взаимное превращение EA и EP происходит с образованием нескольких промежуточных соединений. Измерения стационарных скоростей не только не дают никакой информации об индивидуальных стадиях, но и не позволяют установить их число. В общем случае, как подчеркивалось в разд. 3.3, для любой части реакционного пути, который состоит из ряда стадий изомеризации промежуточных соединений, все промежуточные соединения в стационарной кинетике должны рассматриваться как единая форма. Это обстоятельство существенно ограничивает возможности метода измерений стационарных скоростей и является главной причиной целесообразности изучения кинетики переходного периода, для которой подобных ограничений не существует.

Может показаться, что те преимущества, которые дает изучение быстрых стадий, сделают исследования стационарной кинетики ненужными. Однако по ряду причин эти исследования, по-видимому, еще многие годы не потеряют своей актуальности. Прежде всего теория для стационарных стадий ферментативной реакции намного проще, а для измерений стационарных скоростей не требуется дорогостоящего оборудования. Кроме того, для проведения измерений в стационарной области нужны лишь незначительные количества фермента. Хотя это обстоятельство может обернуться недостатком, если при этом условия опреде-

ления ферментативной активности сильно отличаются от условий, в которых фермент находится в клетке, оно останется решающим фактором при выборе метода исследования до тех пор, пока способы очистки ферментов не станут значительно более совершенными, чем сейчас. В связи с этим важно отметить, что большая часть исследований переходного периода реакций выполнена на ферментах, не представляющих особого интереса для метаболизма, например на химотрипсине, папаине, фичине и ли-

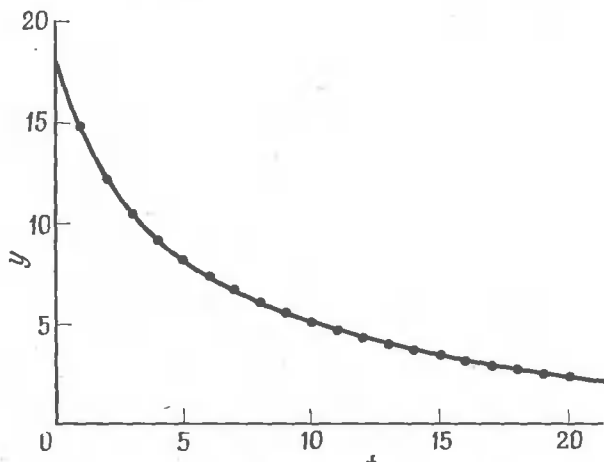


Рис. 9.1. Неоднозначное описание результатов в случае экспоненциальных функций.

Точки рассчитаны из уравнения $y = 5,1 \exp(-t/1,3) + 4,7 \exp(-t/4,4) + 9,3 \exp(-t/14,2)$, а сплошная кривая — из уравнения $y = 7,32 \exp(-t/2,162) + 10,914 \exp(-t/12,86)$.

зоциме; просто эти ферменты нетрудно получить в больших количествах. До тех пор пока подобные исследования нельзя будет проводить систематически с такими ферментами, как, например, фосфофруктокиназа и глутаминсинтетаза, методы изучения стационарной кинетики по-прежнему будут оставаться актуальными.

Следует также отдавать себе отчет в том, что при количественной обработке данных по переходному периоду реакции возникают большие трудности, связанные с неоднозначной трактовкой результатов («ill-conditioning»). Это означает, что *даже в отсутствие ошибок измерений* экспериментальные данные можно вполне удовлетворительно описать широким набором констант и, конечно, широким набором уравнений. Эта ситуация иллюстрируется рис. 9.1, на котором показаны совокупность точек и кривая, рассчитанные при помощи двух различных уравнений, которые обычно встречаются при анализе данных регистрации быстрой кинетики. Это означает, что вся дополнительная инфор-

мация, которую в принципе могут дать такие исследования, ускользает, если стадии не разделены достаточно сильно во времени.

Таким образом, все энзимологи, осознавая большие потенциальные возможности методов исследования переходного периода ферментативной реакции, не должны при этом полностью пренебрегать изучением стационарных скоростей.

9.2. Переходный период для механизма Михаэлиса—Ментен

В разд. 2.4 уравнение скорости для механизма Михаэлиса—Ментен было выведено без привлечения гипотезы стационарности, чтобы показать, что при определенных соотношениях кинетических констант стационарная скорость должна устанавливаться очень быстро. Рассмотрим теперь более детально переходный период для этого механизма. Ранее было показано [см. уравнение (2.9)], что скорость реакции можно представить следующим образом:

$$v = \frac{dp}{dt} = \frac{k_{+1} k_{+2} e_0 s \{1 - \exp[-(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2})t]\}}{k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}}. \quad (9.1)$$

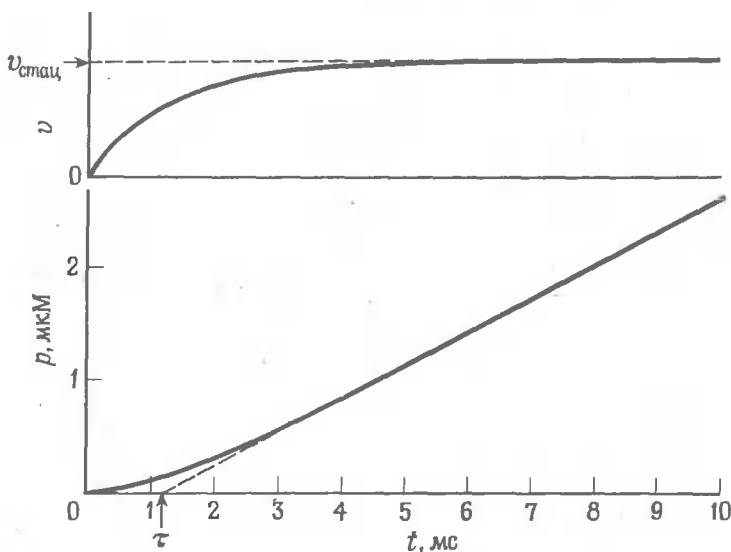


Рис. 9.2. Приближение к стационарному состоянию для ферментативной реакции, подчиняющейся механизму Михаэлиса—Ментен.

В верхней части рисунка представлена зависимость скорости реакции от времени; пунктирной линией обозначена стационарная скорость ($v_{\text{стационар}}$). В нижней части показана зависимость концентрации продукта p от времени (временные шкалы одинаковы для обоих графиков). Приведенные зависимости рассчитаны при помощи уравнений (9.1) и (9.2) при $k_{+1} = 50\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, $k_{-1} = 500 \text{ с}^{-1}$, $k_{+2} = 100 \text{ с}^{-1}$, $s = 0,005 \text{ M}$ и $e_0 = 0,00001 \text{ M}$.

Из этого уравнения видно, что вначале скорость равна нулю, но затем быстро растет, достигая стационарного значения по мере уменьшения экспоненциального члена. Проинтегрировав это уравнение и приняв во внимание начальные условия ($p = 0$ при $t = 0$), найдем зависимость p от t :

$$p = \frac{k_{+1} k_{+2} e_0 s t}{k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2}} - \frac{k_{+1} k_{+2} e_0 s \{1 - \exp[-(k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2}) t]\}}{(k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2})^2} \quad (9.2)$$

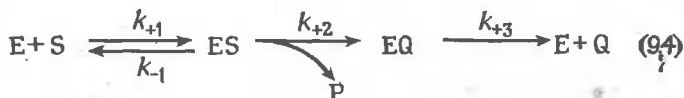
Зависимость p от t , изображенная на рис. 9.2, представляется вначале вогнутой кривой, а затем, когда экспоненциальный член уменьшается до нуля, выходит на прямую, описываемую следующим уравнением:

$$p = \frac{k_{+1} k_{+2} e_0 s}{k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2}} \left(t - \frac{1}{k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2}} \right) \quad (9.3)$$

Экстраполяция этого линейного участка до пересечения с осью t дает точку $\tau = 1/(k_{+1} s + k_{-1} + k_{+2})$. Зависимость $1/\tau$ от s изображается прямой с наклоном, равным k_{+1} , и отрезком, отсекаемым на оси $1/\tau$, равным $(k_{-1} + k_{+2})$, как это было показано Гутфройндом [62] на примере гидролиза этилового эфира бензоил-L-аргинина, катализируемого фичином.

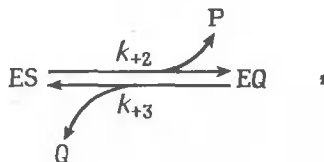
9.3. «Начальный всплеск»

При изучении катализируемого химотрипсином гидролиза нитрофенилэтилкарбоната Хартли и Килби [72] обнаружили, что, хотя высвобождение нитрофенола происходит практически линейно во времени, экстраполяция прямой к начальному моменту времени дает ненулевую точку пересечения с осью ординат. В связи с тем что выбранный субстрат оказался очень плохим, в этих опытах пришлось использовать высокие концентрации фермента, и величина отсекаемого отрезка, называемого «начальным всплеском» («burst») концентраций продукта, была пропорциональна концентрации фермента. Эти данные согласуются с механизмом, в котором высвобождение продуктов происходит в две стадии, причем нитрофенол высвобождается первым:



Если последняя стадия является лимитирующей, т. е. если k_{+3} мала по сравнению с $k_{+1}s$, k_{-1} и k_{+2} , то в стационарных условиях фермент почти полностью представлен формой EQ. Однако EQ не может образоваться прежде, чем не отщепится P, и поэтому в переходный период P может высвободиться со скоростью, намного превышающей стационарную скорость. Можно ожидать, что количество P, соответствующее начальному всплеску, должно быть равно, а не просто пропорционально количеству фермента. Это строго верно только в том случае, когда константа k_{+3} существенно меньше других констант скорости. Если это условие не выполняется, то величина отсекаемого отрезка будет меньше стехиометрического количества фермента. Для того чтобы показать это, рассмотрим вывод выражения для величины отсекаемого отрезка, проведенный Гутфройндом [62].

Если s настолько велика, что ее можно считать постоянной, и если $k_{+1}s$ много больше ($k_{-1} + k_{+2} + k_{+3}$), то спустя очень короткое время после смешивания схема ферментативного процесса будет иметь вид



так как можно считать, что реакция $E + S \rightarrow ES$ протекает мгновенно и необратимо и концентрация свободного фермента становится пренебрежимо малой. Эта схема представляет собой простую обратимую реакцию первого порядка (разд. 1.4). Изменения концентраций комплексов ES и EQ во времени описываются следующими выражениями:

$$[\text{ES}] = \frac{e_0 \{k_{+3} + k_{+2} \exp [-(k_{+2} + k_{+3}) t]\}}{k_{+2} + k_{+3}} ,$$

$$[\text{EQ}] = \frac{k_{+2} e_0 \{1 - \exp [-(k_{+2} + k_{+3}) t]\}}{k_{+2} + k_{+3}} .$$

Из этих уравнений нетрудно получить выражения для dp/dt и dq/dt :

$$\frac{dp}{dt} = k_{+2} [\text{ES}] = \frac{k_{+2} e_0 \{k_{+3} + k_{+2} \exp [-(k_{+2} + k_{+3}) t]\}}{k_{+2} + k_{+3}} ,$$

$$\frac{dq}{dt} = k_3 [\text{EQ}] = \frac{k_{+2} k_{+3} e_0 \{1 - \exp [-(k_{+2} + k_{+3}) t]\}}{k_{+2} + k_{+3}} .$$

В стационарных условиях, т. е. когда величина t велика, экспоненциальный член становится пренебрежимо малым и эти два уравнения принимают более простой вид:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{dq}{dt} = \frac{k_{+2} k_{+3} e_0}{k_{+2} + k_{+3}}.$$

Однако для переходного периода величина dp/dt вначале существенно превышает dq/dt . Поэтому, в то время как изменение $[P]$ во времени обнаруживает «начальный всплеск», для изменения $[Q]$ во времени наблюдается лаг-период (эти отклонения от линейности могут быть продемонстрированы экстраполяцией линейных участков до пересечения с осями координат). Проинтегрировав уравнения и подставив начальные условия ($p = 0$ и $q = 0$ при $t = 0$), получаем выражения для размеров отсекаемых отрезков:

$$p = \frac{k_{+2} k_{+3} e_0 t}{k_{+2} + k_{+3}} + \frac{k_{+2}^2 e_0 \{1 - \exp[-(k_{+2} + k_{+3}) t]\}}{(k_{+2} + k_{+3})^2}, \quad (9.5)$$

$$q = \frac{k_{+2} k_{+3} e_0 t}{k_{+2} + k_{+3}} - \frac{k_{+2} k_{+3} e_0 \{1 - \exp[-(k_{+2} + k_{+3}) t]\}}{(k_{+2} + k_{+3})^2}. \quad (9.6)$$

Если принять экспоненциальный член в уравнении (9.5) равным нулю, то мы получим линейную часть зависимости p от t . Далее экстраполицией к нулевому моменту времени находим величину начального всплеска π :

$$\pi = \frac{k_{+2}^2 e_0}{(k_{+2} + k_{+3})^2} = \frac{e_0}{\left(1 + \frac{k_{+3}}{k_{+2}}\right)^2}. \quad (9.7)$$

Таким образом, величина начального всплеска концентрации P не равна концентрации фермента, а приближается к ней, если $k_{+2} \gg k_{+3}$. Из этого уравнения следует, что π никогда не может превзойти концентрацию фермента. Однако экстраполяция «линейной» части кинетической кривой может иногда давать значения начального всплеска, превышающие истинное значение π . Это бывает в том случае, если скорость на стационарном участке реакции на самом деле не постоянна, а заметно снижается по ходу ферментативного процесса. Если же мы уверены, что кинетическая кривая на стационарном участке строго линейна, подобного искажения величины π быть не должно.

Аналогичным образом получают выражение для величины лаг-периода (τ) при образовании продукта Q :

$$\tau = 1/(k_{+2} + k_{+3}).$$

Очевидно, что лаг-период будет заметным лишь в том случае, если константа k_{+2} по порядку величины близка к константе k_{+3} .

Длительность лаг-периода для обсуждаемого механизма ферментативной реакции не зависит ни от концентрации фермента, ни от концентрации субстрата. Это обстоятельство позволяет легко отличить его от лаг-периода для обычного механизма Михаэлиса—Ментен, рассмотренного в предыдущем разделе.

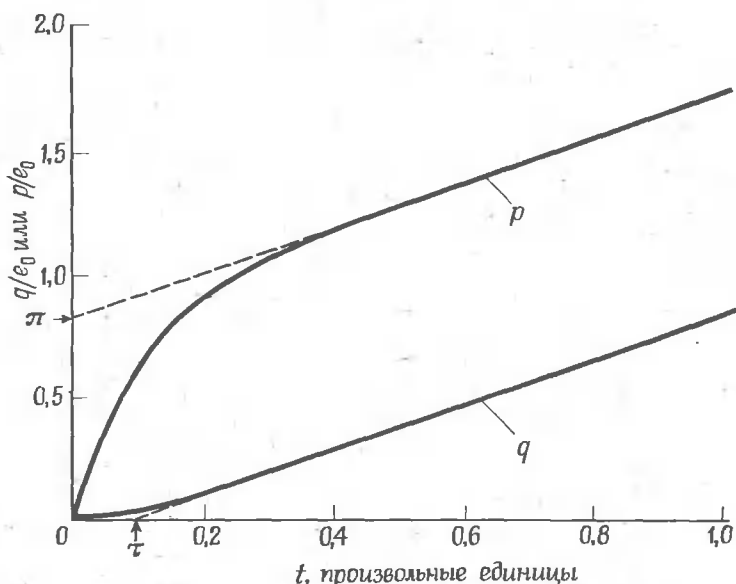


Рис. 9.3. Кинетика с «начальным всплеском».

Представлены зависимости концентраций P и Q от времени для ферментативной реакции, следующей механизму (9.4), при $k_{+2} = 10$, $k_{+3} = 1$ (в произвольных единицах) и насыщающих концентрациях субстрата, т. е. при $k_{+1}s \gg (k_{-1} + k_{+2} + k_{+3})$.

Для иллюстрации полученных результатов на рис. 9.3 представлены кинетические кривые накопления продуктов P и Q для механизма (9.4), рассчитанные при $k_{+2} = 10k_{+3}$.

Более строгий анализ механизма (9.4) без привлечения каких-либо допущений об относительных значениях констант скорости был проведен Ойллетом и Стюартом [123]. В полные выражения для концентраций продуктов входят теперь $k_{+1}s_0$ и k_{-1} вместе с дополнительным экспоненциальным членом, который приводит к появлению очень короткого лаг-периода перед участком кинетической кривой, дающим начальный всплеск. Анализ этого случая представляет существенный теоретический интерес, но поскольку большого практического значения он не имеет, обсуждаться далее не будет.

Методы, рассмотренные в этом разделе, позволили разработать важный способ определения концентрации фермента. В общем случае задача по определению точной молярной концентрации

фермента является довольно сложной: скорости ферментативных реакций дают концентрации в единицах активности на 1 мл, которые пригодны для сопоставлений, но не для оценки истинных концентраций. Большинство других методов анализа основаны на определении содержания белка и поэтому малоспецифичны. Однако из уравнения (9.7) видно, что если подобран субстрат, для которого константа скорости k_{+3} равна нулю (или очень мала), то величина начального всплеска (π) будет равна концентрации фермента. Когда k_{+3} очень мала, хорошо определяется также конечная точка «титрования». Для первоначально изученных субстратов химотрипсина (*n*-нитрофенилэтилкарбоната и *n*-нитрофенилацетата) константы скорости k_{+3} оказались слишком большими, чтобы можно было использовать указанный метод определения e_0 . Однако позднее Шонбаум, Зернер и Бендер [130] показали, что при соответствующих условиях с *транс*-циннамоил-имидазолом получаются прекрасные результаты. Этот субстрат очень быстро реагирует с химотрипсином с образованием имидазола и *транс*-циннамоилхимотрипсина, однако стадия деацилирования протекает гораздо медленнее. Измерение количества имидазола, высвобождающегося при добавлении раствора химотрипсина, позволяет рассчитать количество фермента. Для других ферментов также были найдены подходящие реагенты для титрования (см. [9]).

Метод титрования активных центров, основанный на измерении начального всплеска, отличается от метода определения скорости ферментативной реакции тем, что он относительно нечувствителен к изменениям констант скорости. Для того чтобы получить воспроизводимые значения скорости ферментативной реакции, необходимо поддерживать строго определенные значения pH, температуры, концентраций компонентов буфера и т. д. В то же время при относительно больших изменениях константы k_{+2} , вызываемых, например, химической модификацией фермента, величина начального всплеска остается неизменной, если только k_{+2} не уменьшается настолько, что ее уже не удастся измерить. Таким образом, химическая модификация либо совсем не влияет на значение молярной концентрации фермента, получаемое описанным методом, либо вызывает снижение его до нуля. По этой причине метод титрования фермента был назван испытанием по принципу «все или ничего» [99].

9.4. Последовательности обратимых реакций

Существует два типа реакций, для которых уравнения скорости имеют точные решения. Один из этих типов — обратимая бимолекулярная реакция, например реакция взаимодействия фермента с субстратом



Этот механизм обсуждался в разд. 1.4. Он имеет довольно ограниченное применение в биохимии, потому что столь простыми являются лишь очень немногие реакции. Даже для реакций, следующих этому механизму, чаще всего используются приближенные решения, рассмотренные в последующих разделах, потому что эти решения имеют широкую применимость. Тем не менее однажды использовалось и полное решение уравнения скорости для этого механизма — при описании связывания цианида пероксидазой [51].

Другой тип реакций, для которых существует точное решение уравнения, — последовательность n обратимых унимолекулярных стадий



То ограничение, что последовательность (9.8) образована унимолекулярными реакциями, не является, как это может показаться, препятствием к использованию этого механизма в случае ферментативных реакций: хотя они включают по меньшей мере одну бимолекулярную стадию, обычно удается создать условия, в которых бимолекулярная реакция может рассматриваться как реакция псевдопервого порядка. Уравнения скорости, описывающие обобщенный ферментативный механизм



могут быть решены с хорошей точностью в том случае, когда выполняется одно из следующих условий:

1. Если s практически постоянна, а p практически равна нулю. Тогда первая стадия ($E + S \rightarrow ES_1$) является реакцией псевдопервого порядка и первой стадией в обратном направлении ($E + P \rightarrow ES_n$) можно пренебречь. В этом случае справедливо уравнение (9.8).

2. Если реализуется стационарное состояние; тогда уравнения стационарной скорости можно проинтегрировать так, как это описано в гл. 8.

Для большинства ферментативных реакций какое-либо из этих условий выполняется на всех стадиях процесса. Решение для переходного периода (условие 1) всегда содержит члены типа $e^{-t/\tau}$. Если самый большой из этих членов становится пренебрежимо малым, прежде чем произойдут заметные изменения концентрации субстрата, переходный и стационарный периоды ферментативной реакции могут анализироваться отдельно друг от друга. При этом, рассматривая переходный период, пренебрегают изменениями s , а при анализе стационарного участка допускают, что изменения концентраций промежуточных соединений происходят очень медленно.

Существует третье условие, при котором также возможно точное решение уравнений скорости. Если реакция близка к равновесию, то все нелинейные члены в уравнении скорости включают произведения малых величин и, не слишком ухудшая точность расчета, ими можно пренебречь. Решения в этом случае близки по виду к решениям, получаемым при анализе переходного периода, и дают примерно такую же информацию, однако они часто гораздо более удобны с точки зрения постановки эксперимента. Эта ситуация обсуждается в конце настоящей главы.

Уравнение для схемы (9.8) имеет точное решение при любом числе стадий; мы же для простоты найдем здесь это решение для следующей конкретной схемы:



Запишем уравнение материального баланса типа

$$x_0 + x_1 + x_2 = x_{\text{полн}} \quad (9.10)$$

и три уравнения скорости:

$$dx_0/dt = -k_{+1}x_0 + k_{-1}x_1, \quad (9.11)$$

$$dx_1/dt = k_{+1}x_0 - (k_{-1} + k_{+2})x_1 + k_{-2}x_2, \quad (9.12)$$

$$dx_2/dt = k_{+2}x_1 - k_{-2}x_2. \quad (9.13)$$

Без одного из уравнений (9.11)–(9.12) можно обойтись, так как их сумма равна первой производной уравнения (9.10), т. е. $dx_0/dt + dx_1/dt + dx_2/dt = 0$. Таким образом, фактически мы имеем три независимых линейных дифференциальных уравнения, включающих три неизвестные величины. Прежде чем приступить к их решению, получим из них одно дифференциальное уравнение относительно одного неизвестного. Исключив величину x_2 из уравнений (9.10) и (9.12), приходим к следующему дифференциальному уравнению:

$$\begin{aligned} dx_1/dt &= k_{+1}x_0 - (k_{-1} + k_{+2})x_1 + k_{-2}(x_{\text{полн}} - x_0 - x_1) = \\ &= k_{-2}x_{\text{полн}} + (k_{+1} - k_{+2})x_0 - (k_{-1} + k_{+2} + k_{-2})x_1. \end{aligned} \quad (9.14)$$

Дифференцирование уравнения (9.11) дает

$$d^2x_0/dt^2 = -k_{+1}dx_0/dt + k_{-1}dx_1/dt. \quad (9.15)$$

Подставляя (9.14) в (9.15), исключаем в последнем dx_1/dt и получаем

$$\begin{aligned} d^2x_0/dt^2 &= -k_{+1}dx_0/dt + k_{-1}k_{-2}x_{\text{полн}} + \\ &+ (k_{+1} - k_{-2})k_{-1}x_0 - k_{-1}(k_{-1} + k_{+2} + k_{-2})x_1. \end{aligned} \quad (9.16)$$

Наконец, используя уравнения (9.11) и (9.16), исключаем x_1 :

$$d^2 x_0 / dt^2 + (k_{+1} + k_{-1} + k_{+2} + k_{-2}) dx_0 / dt + \\ + (k_{-1} k_{-2} + k_{+1} k_{+2} + k_{+1} k_{-2}) x_0 = k_{-1} k_{-2} x_{\text{полн}}.$$

Таким образом, мы получили уравнение вида $d^2 x_0 / dt^2 + P dx_0 / dt + Q x_0 = R$, которое имеет следующее решение:

$$x_0 = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2).$$

Здесь A_1 и A_2 — константы интегрирования, определяемые из начальных условий, а τ_1 и τ_2 выражаются следующим образом:

$$1/\tau_1 = \frac{1}{2}(P + \sqrt{P^2 - 4Q}),$$

$$1/\tau_2 = \frac{1}{2}(P - \sqrt{P^2 - 4Q}).$$

Если величина $k_{-1}k_{+2}$ мала по сравнению с $(k_{-1}k_{-2} + k_{+1}k_{+2} + k_{+1}k_{-2})$, то эти решения упрощаются и принимают более удобный вид:

$$1/\tau_1 = k_{+1} + k_{-1}, \quad (9.17)$$

$$1/\tau_2 = k_{+2} + k_{-2}. \quad (9.18)$$

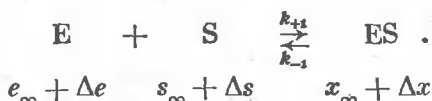
В общем случае, когда последовательность обратимых реакций включает n унимолекулярных стадий, поступая так же, как и при анализе схемы (9.9), исключают все неизвестные концентрации, кроме одной. Для исключения первой неизвестной концентрации используется уравнение материального баланса, а каждая последующая неизвестная концентрация исключается дифференцированием по t . Поэтому конечное дифференциальное уравнение с одним неизвестным представляет собой линейное дифференциальное уравнение n -го порядка, решение которого содержит n экспоненциальных членов. В благоприятных случаях некоторые времена релаксации относятся к определенным стадиям, как в случае уравнений (9.17) и (9.18), однако бывает это очень редко.

9.5. Кинетика при возмущении равновесия

Один из самых плодотворных методов изучения быстрых реакций состоит в регистрации процесса релаксации системы к равновесию после небольшого возмущения. Особенно важным для ферментативной кинетики является метод *температурного скачка*, в котором смещение равновесия происходит в результате резкого повышения температуры. Используя относительно простые устройства, можно добиться повышения температуры на

10°C за 10^{-6} с. Так как большинство кинетических параметров меняется при варьировании температуры, температурный скачок сопровождается обычно быстрой релаксацией к новому равновесию. Возможны и другие способы возмущения равновесия (например, скачок давления), однако они менее удобны, так как дают намного меньшие изменения кинетических параметров при сравнимых энергетических затратах. Однако принципы анализа кинетики релаксации одинаковы для всех способов возмущения.

Рассмотрим в качестве примера простую реакцию связывания



Если обозначить через e_{∞} , s_{∞} и x_{∞} окончательные равновесные концентрации E, S и ES соответственно, а через k_{+1} и k_{-1} — константы скорости после возмущающего воздействия, то мгновенные концентрации можно представить как $(e_{\infty} + \Delta e)$, $(s_{\infty} + \Delta s)$ и $(x_{\infty} + \Delta x)$ соответственно. Скорость изменения x выражается следующим образом:

$$dx/dt = k_{+1}(e_{\infty} + \Delta e)(s_{\infty} + \Delta s) - k_{-1}(x_{\infty} + \Delta x).$$

Однако $dx/dt = d\Delta x/dt$ и, исходя из стехиометрии реакции, $\Delta e = -\Delta s = -\Delta x$. Поэтому

$$d\Delta x/dt = k_{+1}(e_{\infty} - \Delta x)(s_{\infty} - \Delta x) - k_{-1}(x_{\infty} + \Delta x). \quad (9.19)$$

Поскольку в равновесии суммарная скорость реакции равна нулю, $k_{+1}e_{\infty}s_{\infty} = k_{-1}x_{\infty}$. Далее, если Δx мало, то членом, содержащим $(\Delta x)^2$, можно пренебречь. В результате уравнение (9.19) упрощается:

$$d\Delta x/dt = -[k_{+1}(e_{\infty} + s_{\infty}) + k_{-1}]\Delta x.$$

Таким образом, мы получаем простое линейное дифференциальное уравнение, решение которого имеет следующий вид:

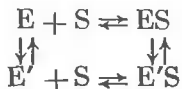
$$\Delta x = \Delta x_0 \exp \{ - [k_{+1}(e_{\infty} + s_{\infty}) + k_{-1}] t \},$$

где Δx_0 — отклонение в начальный момент времени. Следовательно, если начальное возмущение равновесия мало, то процесс релаксации для одностадийной реакции описывается одним экспоненциальным членом с временем релаксации τ , определяемым следующим выражением:

$$1/\tau = k_{+1}(e_{\infty} + s_{\infty}) + k_{-1}.$$

Так как величины e_∞ , s_∞ и k_{-1}/k_{+1} обычно можно определить независимым путем, измерение величины τ позволяет найти индивидуальные константы скорости k_{+1} и k_{-1} .

Аналогичным образом анализируются механизмы, включающие несколько стадий, хотя вывод соответствующих выражений более сложен. В общем случае для n -стадийного механизма процесс релаксации характеризуется n временами релаксации, если стадии не связаны термодинамически, как это имеет место, например, в схеме



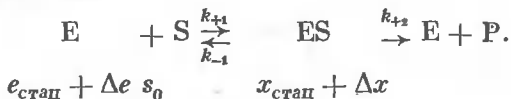
Хотя эта схема содержит четыре равновесные стадии, независимыми являются только три константы равновесия, четвертая однозначно определяется тремя другими. В подобных случаях число индивидуальных времен релаксации равно числу независимых равновесий. Механизмы этого типа часто встречаются при связывании протонов.

Распространенным типом многостадийных механизмов является механизм, в котором за начальной бимолекулярной реакцией следует несколько унимолекулярных стадий изомеризации:



Выражения для времен релаксации имеют тот же вид, что и в случае последовательности унимолекулярных стадий (разд. 9.4), за исключением того, что константа скорости k_{+1} в них заменена на константу скорости псевдопервого порядка для бимолекулярной реакции $E + S \rightarrow ES$, т. е. на $k_{+1}(e_\infty + s_\infty)$.

Хотя метод скачка обсуждался здесь в приложении к релаксации к новому равновесию, он применим и к релаксации к стационарному состоянию:



Скорость релаксации определяется следующим выражением:

$$d\Delta x/dt = k_{+1}(e_{\text{стац}} + \Delta e)s_0 - (k_{-1} + k_{+2})(x_{\text{стац}} + \Delta x).$$

После введения условия стационарности $k_{+1}e_{\text{стац}}s_0 = (k_{-1} + k_{+2})x_{\text{стац}}$ и равенства, вытекающего из стехиометрии реакции, $\Delta e = -\Delta x$, получаем

$$d\Delta x/dt = -(k_{+1}s_0 + k_{-1} + k_{+2})\Delta x.$$

Это уравнение имеет следующее решение:

$$\Delta x = \Delta x_0 \exp(-t/\tau).$$

Время релаксации τ связано с константами скорости соотношением

$$1/\tau = k_{+1}s_0 + k_{-1} + k_{+2}$$

и аналогично времени релаксации для переходного периода реакции, следующего за быстрым смешиванием реагентов (разд. 9.2).

Метод быстрого смешивания и метод температурного скачка существенно различаются по интервалам экспериментально измеряемых времен релаксации. Даже в самых совершенных аппаратах для полного смешивания требуется не менее 10^{-3} с, и их нельзя применять для измерения времен релаксации, меньших этой величины. При использовании метода температурного скачка все реагенты смешаны еще до возмущения, и лимитирующим фактором является время разогрева системы (около 10^{-6} с). Таким образом, этот метод позволяет измерить намного меньшие времена релаксации. В то же время из-за конвекционных эффектов метод температурного скачка неприменим для измерения времен релаксации, больших 10^{-2} с, и, следовательно, он не может полностью заменить методы быстрого смешивания.

Метод температурного скачка и ряд других релаксационных методов были предложены Эйгеном [48], который вместе со своими сотрудниками распространил их на широкий круг химических и биохимических систем. К ферментным системам методы быстрой кинетики были применены Хаммесом и Фазелой [66, 67], которые изучили методом температурного скачка взаимодействие различных соединений с глутамино-аспартикотрансaminaзой¹. В последние годы Хаммес и сотрудники применили релаксационные методы для исследования большого числа ферментов (см. [65, 69]).

9.6. Возмущения синусоидального типа

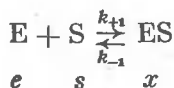
Рассматривая метод скачка, мы подразумевали, что возмущение происходит мгновенно, однако более реальным является приближение, согласно которому каждая константа скорости изменяется по экспоненциальному закону, так что

$$k = k_{\infty} [1 - A \exp(-t/\tau)].$$

τ имеет порядок 10^{-6} с, а A определяется степенью возмущения. Это уравнение сводится к уравнению, соответствующему мгновенному возмущению ($k = k_{\infty}$), если измерения проводятся при временах, больших 10^{-6} с. Реакции с меньшими временами релаксации можно изучать при помощи возмущений синусоидаль-

¹ Рекомендуемое тривиальное название—аспартат—аминотрансфераза (КФ 2.6.1.1) (см. Номенклатура ферментов, ВИНТИ, М., 1978). — *Прим. перев.*

ного типа. Их обычно создают пропусканием через реакционную смесь ультразвуковых волн с частотой 10^{14} с⁻¹. Ультразвуковые волны, проходя через среду, вызывают локальные флуктуации температуры и давления. Хотя в водных растворах флуктуации температуры очень малы, они оказывают гораздо большее влияние на кинетические параметры, чем флуктуации давления, потому что реакции в растворе характеризуются очень низкой чувствительностью к изменению давления. В том случае, когда флуктуации обоих типов совпадают по фазе, неважно, какие из них дают больший эффект. Если возмущения малы, то они вызывают пропорциональные изменения констант скорости. Поэтому для простой реакции связывания



каждая константа скорости под действием синусоидальной ультразвуковой волны изменяется по синусоидальному закону:

$$k_{+1} = \bar{k}_{+1} (1 + A \sin \omega t), \quad (9.20)$$

$$k_{-1} = \bar{k}_{-1} (1 + B \sin \omega t) \quad (9.21)$$

где \bar{k}_{+1} и \bar{k}_{-1} — средние значения k_{+1} и k_{-1} , ω — частота ультразвуковой волны, A и B — амплитуды. Уравнение скорости имеет следующий вид:

$$dx/dt = k_{+1} es - k_{-1} x. \quad (9.22)$$

Если \bar{e} , \bar{s} и \bar{x} — невозмущенные значения e , s и x , то из стехиометрии реакции следует, что

$$e - \bar{e} = s - \bar{s} = -(x - \bar{x}) = -\Delta x. \quad (9.23)$$

Подставляя уравнения (9.20), (9.21) и (9.23) в уравнение (9.22), получаем

$$\begin{aligned} d\Delta x/dt &= \bar{k}_{+1} (1 + A \sin \omega t) (\bar{e} - \Delta x) (\bar{s} - \Delta x) - \\ &- \bar{k}_{-1} (1 + B \sin \omega t) (\bar{x} + \Delta x). \end{aligned} \quad (9.24)$$

Далее, если невозмущенная система находится в равновесии (или в стационарном состоянии), то $\bar{k}_{+1} \bar{e} \bar{s} = \bar{k}_{-1} \bar{x}$. Величины Δx , A и B малы, поэтому членами, содержащими $(\Delta x)^2$, $A\Delta x$ и $B\Delta x$, можно пренебречь. Следовательно, уравнение (9.24) можно упростить:

$$d\Delta x/dt + [\bar{k}_{+1} (\bar{e} + \bar{s}) + \bar{k}_{-1}] \Delta x = \bar{k}_{+1} \bar{e} \bar{s} (A - B) \sin \omega t.$$

Полученное выражение является простым дифференциальным уравнением, решение которого имеет следующий вид:

$$\Delta x = \frac{\bar{k}_{+1} \bar{e} \bar{s} (A - B) \left(\frac{1}{\tau} \sin \omega t - \omega \cos \omega t \right)}{\frac{1}{\tau^2} + \omega^2} + R \exp(-t/\tau). \quad (9.25)$$

В этом выражении R — константа интегрирования, а величина τ определяется следующим образом:

$$\frac{1}{\tau} = \bar{k}_{+1} (\bar{e} + \bar{s}) + \bar{k}_{-1}.$$

При $t \gg \tau$ экспоненциальный член становится пренебрежимо малым и уравнение (9.25) упрощается:

$$\Delta x = \frac{\bar{k}_{+1} \bar{e} \bar{s} (A - B) (\tau \sin \omega t - \omega \tau^2 \cos \omega t)}{1 + \omega^2 \tau^2}.$$

Сопоставление этого уравнения с уравнением, описывающим изменение (недостигаемого) равновесного смещения,

$$\Delta x_{\text{равн}} = \bar{k}_{+1} \bar{e} \bar{s} (A - B) \tau \sin \omega t,$$

показывает, что фактическое смещение колеблется с той же частотой, что и равновесное, но отстает от последнего на $1/\text{tg}(\omega\tau)$ ($\omega\tau$ в радианах) и имеет меньшую амплитуду:

$$a = \frac{a_{\text{равн}}}{(1 + \omega^2 \tau^2)^{\frac{1}{2}}}.$$

В этом выражении $a_{\text{равн}}$ — амплитуда равновесного смещения:

$$a_{\text{равн}} = \bar{k}_{+1} \bar{e} \bar{s} (A - B) \tau.$$

Эту ситуацию для различных значений $\omega\tau$ иллюстрирует рис. 9.4. Когда величина $\omega\tau$ мала, реакция в любой момент времени близка к равновесию. Однако, когда частота и величина $\omega\tau$ растут, смещение отстает по фазе и его амплитуда уменьшается. При очень высоких частотах смещение практически отсутствует.

Поскольку химические реакции по своей природе не колеблются около положения равновесия, наблюдаемое колебание обусловлено поглощением энергии ультразвуковой волны. Эта энергия пропорциональна квадратам амплитуды и частоты колебания. Следовательно, поглощенная энергия, отнесенная к длине волны, должна быть пропорциональна $a_{\text{равн}}^2 \omega / (1 + \omega^2 \tau^2)$. Эта функция имеет максимум в точке, где $\omega = 1/\tau$, и поэтому измере-

ние поглощенной энергии при различных частотах дает простой способ измерения τ .

Метод поглощения ультразвука был использован для изучения большого числа простых реакций, например сольватации глицина и родственных соединений [68]. Исследования ферментов этим методом наталкиваются на ряд экспериментальных труд-

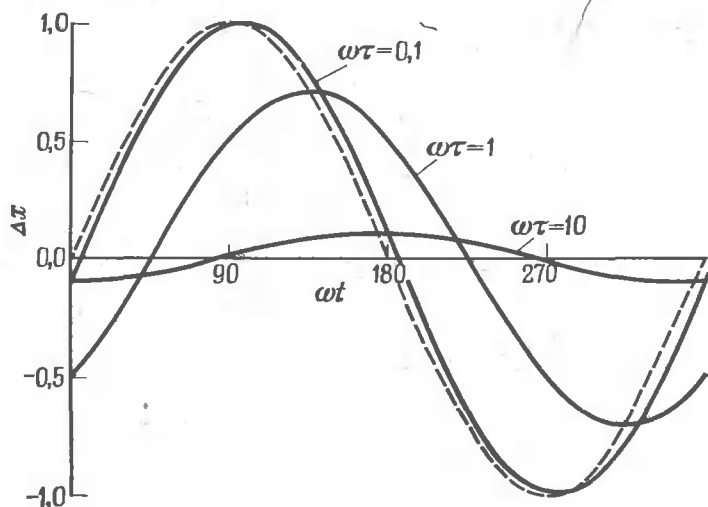


Рис. 9.4. Синусоидальное возмущение констант скорости реакции связывания $E + S \rightleftharpoons ES$.

Пунктирная кривая изображает недостижимое равновесное смещение Δx , а сплошные — действительное смещение для трех значений $\omega\tau$, указанных на рисунке.

ностей, связанных с тем, что для получения заметного поглощения ультразвука необходимы большие количества материала. Кроме того, смущает сложность интерпретации спектров релаксации. Однако можно не сомневаться в том, что метод поглощения ультразвука станет со временем наиболее ценным методом изучения очень быстрых стадий ферментативных реакций. В работе [25] он был использован для исследования конформационных изменений поли-L-глутаминовой кислоты. Полученные авторами этой работы результаты имеют прямое отношение к ферментативной кинетике. Это исследование и исследования простых систем важны для понимания ферментативного катализа, поскольку они позволяют дать разумные оценки скоростей многих элементарных процессов, таких, как сольватация, протонирование, депротонирование и конформационные изменения макромолекул. Так, хотя при изучении сольватации глицина время релаксации ока-

залось равным $2,5 \cdot 10^{-9}$ с, это не означает, что во всех реакциях сольватация должна протекать так же быстро; можно лишь говорить о значениях скоростей сольватации, которых можно ожидать в других системах. Аналогичным образом определение времени релаксации для перехода спираль—клубок в поли-L-глутаминовой кислоте ($5 \cdot 10^{-8}$ — 10^{-5} с) позволяет судить о скоростях конформационных изменений в случае ферментативных реакций.

Расчет констант скорости

10.1. Достоинства статистического подхода и пределы его применения

На протяжении последних 40 лет большая часть экспериментальных данных по ферментативной кинетике представлялась в виде линейных графиков, описанных в разд. 2.5. Чаще всего для этих целей использовался график двойных обратных координат, т. е. график зависимости $1/v$ от $1/s$. Однако именно он вызывает наиболее сильные нарекания со стороны статистики и дает весьма ненадежные значения K_M и V . Несмотря на успехи, достигнутые в последние годы в разработке методов обработки экспериментальных данных, график двойных обратных координат по-прежнему очень популярен; отчасти это объясняется тем, что он широко используется некоторыми ведущими энзимологами, не до конца, по-видимому, представляющими, каковы недостатки этого графического метода. С другой стороны, его популярность можно объяснить и тем, что этот метод несколько проще других.

В работах принципиального характера следует вообще отказаться от использования любых графиков и применять вместо них статистические методы анализа. Однако многие экспериментаторы считают статистические подходы утомительными и полагают, что те преимущества, которые они дают, не так уж велики, чтобы отказываться от применения более удобных графических методов. По этой причине целесообразно начать данную главу с рассмотрения достоинств статистического подхода и пределов его применения.

Если бы все эксперименты были выполнены с идеальной точностью, то не было бы никаких возражений против использования графических методов анализа. Все зависело бы только от способности экспериментатора представить данные графически и правильно их проанализировать. Однако реальные измерения всегда имеют ту или иную ошибку, и главная задача статистического анализа состоит в том, чтобы свести до минимума последствия этого факта. Графические методы в общем случае не позволяют выполнить эту задачу до конца, поскольку, если экспериментатор проводит линию на глаз, он не в состоянии правильно учесть вес разных измерений, в особенности если последний меняется от точки к точке. Любая прямая, проводимая через серию точек на глаз, носит субъективный характер и дает менее точные значения параметров, чем прямая, построенная с использова-

нием статистических методов. Очевидно, если используемый метод дает неоднозначные результаты, это снижает достоверность тех выводов, к которым приходит экспериментатор.

Второе возражение против применения графических методов состоит в том, что они не дают никакой информации о точности измерения кинетических констант (исключение составляет прямой линейный график; разд. 10.9). Статистические расчеты намного превосходят графические методы в том отношении, что они позволяют оценить ошибки в определении кинетических констант, обусловленные случайным разбросом данных.

Рассмотрим, какого типа ошибки возникают при проведении эксперимента. Случайные отклонения бывают двух типов: они возникают либо в результате ошибки измерения, либо в результате неидентичности образцов. Суммарная ошибка измерения включает неточности в отборе проб при помощи пипеток, шум прибора, неточности в снятии показаний с ленты самонисца и тому подобное. Многие энзимологи считают, что основной причиной случайных отклонений при регистрации ферментативной кинетики является ошибка измерения. Однако некоторые исследователи (например, Рейх [128]) полагают, что большое значение имеют и ошибки, связанные с неидентичностью образцов, а в отдельных случаях они становятся даже преобладающими: никто, например, не станет утверждать, что колебания в весе среди отобранных 100 крыс связаны с неточностью взвешивания; вместо этого экспериментатор сделает заключение, что крысы не одинаковы и их веса отклоняются, но не от «истинных» значений, а от некоторого идеализированного значения, характеризующего популяцию. Вопрос о том, имеются ли отклонения подобного типа среди молекул ферментов, остается открытым; даже если имеются, неясно, приводит ли это к заметным колебаниям в составе «образцов», отбираемых из исходного раствора и содержащих многие биллионы молекул. Тем не менее так просто отрицать эту возможность нельзя. В частности, Рейх подчеркивал, что случайные отклонения в экспериментах по ферментативной кинетике слишком велики, чтобы их можно было объяснить погрешностями используемой методики и приборов.

Систематические ошибки также бывают двух типов. Ошибки первого рода обусловлены неудовлетворительным описанием экспериментальных данных, а второго — факторами, одинаково влияющими на все измерения. Ошибки первого рода проявляются тогда, когда экспериментальные данные описываются неверно выбранным уравнением. Пусть, например, получены совершенно точные данные для фермента, подчиняющегося уравнению Михаэлиса—Ментен, но для их описания использовано уравнение кинетики первого порядка; тогда на проведенную наилучшим образом кривую попадут не все точки. Ошибки подобного типа, как

правило, выявляются при помощи статистических тестов (разд. 10.8) и исключаются при использовании правильного уравнения.

Более серьезными являются систематические отклонения второго типа, потому что они присутствуют во всех экспериментах и обнаружить их довольно трудно. Любые ошибки, касающиеся эксперимента в целом, такие, как неверная оценка концентраций фермента или субстрата в исходных растворах, приводят к погрешностям в константах уравнения, описывающего экспериментальные данные, но не вызывают увеличения определяемой статистической ошибки, так как не влияют на форму соответствующего уравнения. Единственный способ обнаружения систематических ошибок подобного типа состоит в повторении всего эксперимента от начала до конца, включая все предварительные приготовления. О статистических ошибках обсуждаемого типа можно говорить в том случае, когда отклонения в значениях констант, получаемых день ото дня, существенно больше статистической ошибки, определяемой из отклонений в единичном эксперименте.

Из факта существования систематических ошибок можно сделать важный в практическом отношении вывод: к значениям кинетических констант следует относиться с осторожностью. Это не означает, конечно, что статистические расчеты бесполезны: сопоставления величин, получаемых из одной серии экспериментов, могут быть проведены на вполне законных основаниях. Допустим, например, что вещество, предположительно обладающее ингибирующим действием, повышает определяемое значение K_M , как на величину, которая меньше отклонений, наблюдаемых день ото дня, но заметно выше отклонения в одной серии экспериментов, рассчитанного статистическим методом. Если этот результат воспроизводим и если скорости ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора измеряются в одной серии экспериментов с использованием одних и тех же исходных растворов, то можно сделать вывод о наличии заметного ингибирующего эффекта.

10.2. Дисперсия

В статистике следует всегда различать *истинное значение* величины, которое представляет собой неизвестную постоянную и обычно обозначается греческой буквой (например, β), и *оценку* (estimate) этой величины, которая является переменной (поскольку мы можем приписать ей любое значение, какое захотим) и обычно обозначается соответствующей буквой латинского алфавита (например, b). Можно также ввести *наилучшую* для выбранного критерия оценку величины, обозначаемую через \hat{b} ; \hat{b} вновь

является постоянной, поскольку, как правило, используемому критерию удовлетворяет только одно значение \hat{b} . (Эта неопределенность, связанная с применением того или иного критерия, не случайна; было бы ошибочным полагать, что существует уникальный критерий, позволяющий оценить, насколько хорошо предложенное уравнение описывает экспериментальные данные, и применимый строго к данным всех экспериментов.) Для обозначения b и β необходимо использовать разные символы, так как вопреки нашему желанию эти величины никогда не бывают равны друг другу. При проведении статистической обработки данных очень важно четко представлять себе, какие величины являются переменными, а какие — постоянными; следует отметить, что в общем случае постоянство или непостоянство величины не согласуется с тем, чего можно было бы ожидать. Так, если мы хотим оценить неизвестные константы α и β в уравнении $y = \alpha + \beta x$, их необходимо считать переменными (a и b); величины же x и y , которые являются переменными для экспериментатора, представляют собой константы для статистика, потому что они не могут изменяться при проведении статистического анализа.

Поскольку оценка величины (b) отличается от истинного значения (β), целесообразно ввести оценку величины ошибки ($b - \beta$). Анализируя различия значений b между собой, можно получить информацию о характере отклонений значений b от β . Если, определяя значение b_i много раз (n), мы получаем, что среднее значение $\frac{1}{n} \sum b_i$ при $n \rightarrow \infty$ приближается к β , то b по определению представляет собой несмещенную состоятельную оценку (estimator)¹ величины β . Далее мы считаем, что все оценки, с которыми мы имеем дело, — это несмещенные состоятельные оценки, хотя в физических экспериментах они никогда таковыми не бывают, поскольку учесть все источники систематических ошибок невозможно. Следовательно, средняя ошибка для несмещенной состоятельной оценки, т. е. $\frac{1}{n} \sum (b_i - \beta)$, при $n \rightarrow \infty$ стремится к нулю, и использовать ее в качестве характеристики изменчивости b бесполезно. Однако среднее *квадратов* ошибок $\frac{1}{n} \sum (b_i - \beta)^2$ уже не стремится к нулю при $n \rightarrow \infty$, потому что каждый член этой суммы является положительной величиной. С ростом n величина $\frac{1}{n} \sum (b_i - \beta)^2$ стремится к определенному пре-

¹Такое различие между *оценкой*, представляющей собой частную величину, используемую в особой ситуации, и *состоятельной оценкой*, определяющей общий класс оценок, проводят не все авторитетные специалисты в области статистических методов, однако иногда это разграничение полезно для уточнения картины, и поэтому оно используется в настоящей книге.

делу, называемому *дисперсией* (variance) b_i [или $\sigma^2(b_i)$]; эта величина может служить мерой изменчивости b_i .

Дисперсия b_i определяется следующим выражением:

$$\sigma^2(b_i) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum (b_i - \beta)^2. \quad (10.1)$$

Измерить ее нельзя, так как величина β неизвестна, а провести бесконечно большое число измерений невозможно. Однако $\sigma^2(b_i)$ можно определить из выборочной дисперсии $s^2(b_i) = \frac{1}{n} \sum (b_i - \hat{b})^2$, где n — конечная величина и \hat{b} — наилучшая оценка β для определенного критерия. В качестве простого критерия для определения \hat{b} можно воспользоваться критерием минимальности $s^2(b_i)$. В таком случае имеем

$$\frac{ds^2(b_i)}{d\hat{b}} = -\frac{2}{n} \sum (b_i - \hat{b}) = 0,$$

т. е. $\Sigma \hat{b} = \Sigma b_i$. Поскольку \hat{b} одинакова для всех i , $\Sigma \hat{b}$ равна просто $n\hat{b}$. Поэтому $\hat{b} = \frac{1}{n} \Sigma b_i$, т. е. \hat{b} равна среднему всех значений b_i .

В общем случае выборочная дисперсия $s^2(b_i)$ дает заниженное значение истинной дисперсии $\sigma^2(b_i)$, потому что среди всех возможных способов определения \hat{b} , как правило, выбирают такой, при котором $s^2(b_i)$ минимальна. Следовательно, $s^2(b_i)$ представляет смещенную состоятельную оценку $\sigma^2(b_i)$. Ясно, что на это смещение необходимо ввести поправку, но оценить величину этой поправки не просто. Обсуждение данного вопроса выходит за рамки настоящей книги, поэтому мы утверждаем (без доказательства), что смещение можно учесть умножением выборочной дисперсии на $n/(n-1)$. В более общем случае, когда из n наблюдений можно определить p параметров, поправочный множитель равен $n/(n-p)$, т. е.

$$\sigma^2(b_i) \approx \left(\frac{n}{n-p} \right) s^2(b_i).$$

Когда данные представляют в виде таблиц, дисперсию оценки обычно заменяют корнем квадратным из дисперсии; эту величину называют *стандартной ошибкой*. Целесообразность этой операции состоит в том, что стандартная ошибка любой величины имеет ту же размерность, что и сама величина. Например, мы можем записать $\hat{b} = 3,21 \pm 0,12$, где первое число представляет собой оценку β , а второе — стандартную ошибку этой оценки. Тем не менее

дисперсия более удобна при проведении алгебраических расчетов, так как проще иметь дело с квадратами, чем с квадратными корнями, и поэтому при обсуждении теоретических вопросов предпочтение отдается дисперсии.

На практике больший интерес представляет дисперсия наилучшей оценки \hat{b} , а не дисперсия индивидуальных значений b_i . Для того чтобы рассчитать дисперсию b , мы должны прежде всего определить дисперсию суммы. Рассмотрим поэтому сумму двух чисел x и y , дисперсии которых определяются следующими выражениями:

$$\sigma^2(x) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum (x_i - \mu_x)^2,$$

$$\sigma^2(y) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum (y_i - \mu_y)^2,$$

где μ_x и μ_y — («истинные») средние значения для популяций x_i и y_i соответственно. Считается, что каждое значение x_i или y_i выбрано из бесконечно большой совокупности возможных значений. В таком случае логично определить дисперсию $(x + y)$ как

$$\sigma^2(x + y) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum (x_i + y_i - \mu_x - \mu_y)^2.$$

Каждый член суммы можно представить следующим образом;
 $(x_i + y_i - \mu_x - \mu_y)^2 = (x_i - \mu_x)^2 + 2(x_i - \mu_x)(y_i - \mu_y) + (y_i - \mu_y)^2.$

Поэтому

$$\sigma^2(x + y) = \sigma^2(x) + 2\text{cov}(x, y) + \sigma^2(y). \quad (10.3)$$

В этом выражении $\text{cov}(x, y)$ — новая величина, называемая *ковариацией* x и y . Она определяется как

$$\text{cov}(x, y) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum (x_i - \mu_x)(y_i - \mu_y) \quad (10.4)$$

и характеризует синхронность изменения x и y : если существует какой-либо систематический источник ошибок, приводящих к изменениям как x , так и y , то ковариация будет велика. Если x и y изменяются в одном направлении, ковариация положительна, а если в противоположных — отрицательна. В отсутствие систематической ошибки ковариация равна нулю и уравнение (10.3) сводится к

$$\sigma^2(x + y) = \sigma^2(x) + \sigma^2(y). \quad (10.5)$$

Используя это соотношение, из равенства $\hat{b} = \frac{1}{n} \sum b_i$ получаем

$$\begin{aligned}\sigma^2(\hat{b}) &= \frac{1}{n^2} \sigma^2(\sum b_i) = \frac{1}{n^2} \sigma^2(b_1 + b_2 + \dots + b_n) = \\ &= \frac{1}{n^2} [\sigma^2(b_1) + \sigma^2(b_2) + \dots + \sigma^2(b_n)].\end{aligned}$$

Если все b_i имеют одну и ту же дисперсию, то

$$\sigma^2(\hat{b}) = \frac{1}{n^2} n \sigma^2(b_i) = \frac{1}{n} \sigma^2(b_i). \quad (10.6)$$

Рассмотрим теперь случай, когда требуется определить дисперсию произведения. Если индивидуальные дисперсии малы, то рассчитать дисперсию произведения xu довольно просто. Представим x как $(\mu_x + \epsilon_x)$, а y — как $(\mu_y + \epsilon_y)$. В таком случае

$$xu = (\mu_x + \epsilon_x)(\mu_y + \epsilon_y) = \mu_x \mu_y + \mu_y \epsilon_x + \mu_x \epsilon_y + \epsilon_x \epsilon_y.$$

Если $\epsilon_x \ll \mu_x$ и $\epsilon_y \ll \mu_y$, то произведение $\epsilon_x \epsilon_y$, а также его дисперсия являются пренебрежимо малыми величинами. Далее, поскольку μ_x и μ_y постоянны, дисперсия $\mu_x \mu_y$ равна нулю. Поэтому в выражении для дисперсии xu мы должны рассмотреть только два средних члена и, применяя уравнение (10.3), получаем

$$\sigma^2(xu) = \mu_y^2 \sigma^2(x) + 2\mu_x \mu_y \text{cov}(x, y) + \mu_x^2 \sigma^2(y). \quad (10.7)$$

Поскольку μ_x и μ_y обычно неизвестны, на практике они заменяются на оценки, \hat{x} и \hat{y} .

Дисперсия отношения может быть получена аналогичным образом:

$$\sigma^2(x/y) = \frac{\sigma^2(x)}{\mu_y^2} - \frac{2\mu_x \text{cov}(x, y)}{\mu_y^3} + \frac{\mu_x^2 \sigma^2(y)}{\mu_y^4}. \quad (10.8)$$

Как и предыдущие выражения, уравнение (10.8) является только приближением; оно верно для малых ошибок. Неизвестные μ_x и μ_y на практике опять-таки заменяются на оценки, \hat{x} и \hat{y} .

Наконец, определим дисперсию обратной величины. Это особенно полезно знать при обработке данных по ферментативной кинетике, поскольку позволяет понять отрицательные стороны графика двойных обратных координат (разд. 10.5). Ошибка для $1/x$ равна

$$\frac{1}{x} - \frac{1}{\mu} = (\mu - x)/x\mu = -\epsilon/x\mu,$$

где μ — истинное значение x , ϵ — ошибка измерения x . Дисперсия $1/x$ выражается следующим образом:

$$\sigma^2(1/x) = \sigma^2(x)/x^2 \mu^2 \approx \sigma^2(x)/x^2 \hat{x}^2 \approx \sigma^2(x)/x^4. \quad (10.9)$$

Последняя форма записи выражения для $\sigma^2(1/x)$ справедлива только в том случае, когда x является наилучшей доступной оценкой μ .

10.3. Простая линейная регрессия

Термин *регрессия* на первый взгляд означает движение назад, и уместность использования его в этом случае в статистике совсем не очевидна. На самом же деле, когда мы подбираем кривую, удовлетворяющую серии экспериментальных данных, мы надеемся, что «двинемся назад» к реальной физической картине, лежащей в основе наблюдений. Например, если мы имеем серию значений переменной y , измеренных для ряда значений другой переменной, x , и допускаем, что значения y ложатся на прямую, так что

$$y_i = \alpha + \beta x_i$$

(индекс i показывает, что уравнение относится к определенному i -му наблюдению), то мы можем попытаться «идти назад» к значениям констант α и β , которые лежат в основе измеряемых значений y . Эта процедура называется регрессией.

Во всех реальных экспериментах измерения производятся с определенной ошибкой, и поэтому мы не можем рассматривать каждое измеренное значение y как точную меру $(\alpha + \beta x_i)$, согласно записанному выше выражению. Вместо этого мы имеем

$$y_i = \alpha + \beta x_i + \varepsilon_i, \quad (10.10)$$

где ε_i — ошибка измерения y_i (предполагается, что для x_i ошибка равна 0). К сожалению, значения ε_i неизвестны, и они остаются неизвестными независимо от того, сколько проводится измерений и как тщательно они анализируются, потому что число неизвестных всегда на 2 больше, чем число уравнений. Следовательно, мы никогда не сможем рассчитать α и β . Все, что удастся сделать в этой ситуации, — это определить наиболее вероятные значения α и β , введя некоторые допущения о природе величин ε_i .

Прежде всего перепишем уравнение (10.10) так, чтобы оно было выражено через известные величины:

$$y_i = a + b x_i + e_i, \quad (10.11)$$

где a , b и e_i — *вымышленные* величины, являющиеся некоторым приближением к истинным значениям α , β и ε_i . Чтобы не слишком усложнять выражения, индексы i в остальной части главы опущены (за исключением случаев, когда они необходимы для ясности картины). Аналогичным образом во всех суммах знак Σ будет означать суммирование по всем наблюдениям, т. е. от $i = 1$ до $i = n$. Значения e называют отклонениями (или остатками),

а не ошибками, потому что они не обязательно должны быть равны истинным ошибкам ε . Как объяснялось в предыдущем разделе, это чересчур строгое разграничение истинных и оцененных величин необходимо для внесения ясности при обосновании теории регрессии. Если эксперимент не дает разброса, иначе говоря, если допустить, что среднее значение для распределения значений ε равно нулю, естественно предположить, что a и b будут наилучшими приближениями для α и β в том случае, когда достигнуто минимальное общее отклонение. Дадим прежде всего более точное определение расплывчатому (что сделано с умыслом) термину «общее отклонение». Проще всего, очевидно, задать его как Σe . Однако такое определение не корректно, поскольку оно не дает однозначных значений a и b . Действительно, для любого a существует значение b , при котором $\Sigma e = 0$, поскольку в сумму входят как положительные, так и отрицательные члены, которые могут компенсировать друг друга; таким образом, из равенства суммы нулю нельзя сделать вывод о том, что данные описаны наилучшим образом. Эту трудность можно обойти, если не учитывать знака e и минимизировать сумму абсолютных значений ошибок $\Sigma|e|$ или сумму квадратов ошибок Σe^2 . Использование $\Sigma|e|$ в качестве меры того, насколько хорошо описаны данные, не встречает принципиальных возражений, однако при решении любых практических задач (за исключением самых простейших) оказывается, что такой подход ведет к чрезвычайно сложным алгебраическим выражениям. Поэтому минимизируют Σe^2 , которая называется *суммой квадратов*. (Во многих элементарных руководствах настоятельно рекомендуют пользоваться суммой квадратов, утверждая, что она обладает принципиальными преимуществами перед другими критериями. Однако при ближайшем рассмотрении оказывается, что, хотя логические рассуждения выглядят безупречными, лежащие в их основе предпосылки неверны и обычно включают ряд явно ошибочных утверждений о природе экспериментальной ошибки. Вернее и безопаснее всего принять, что главное достоинство суммы квадратов состоит в том, что она просто более удобна для проведения алгебраических выкладок.)

В некоторых случаях а priori известно, что одни измерения более точны, чем другие. Тогда при рассмотрении вопроса о том, насколько оптимальным является описание результатов наблюдений, логично брать более надежные измерения с большим весом. Поэтому обычно лучше минимизировать не просто сумму квадратов Σe^2 , а сумму *взвешенных* квадратов $SS = \Sigma we^2$, где каждое значение w представляет собой весовой множитель. (Предполагается, конечно, что нам известно, как рассчитать веса измерений.) При нахождении средневзвешенного серии значений нетрудно показать, что дисперсия среднего минимальна в том случае, если вес каждого значения обратно пропорционален его дис-

персии. Это верно и для более общей задачи, при описании данных с помощью любого уравнения. [Сделанное заключение справедливо только в том случае, если ошибки измерений не коррелируют между собой, т. е. $\text{cov}(\epsilon_i, \epsilon_j) = 0$ для всех $i \neq j$. Вряд ли это допущение строго выполняется, однако его приходится принять, поскольку в противном случае рассчитать веса становится очень трудно.] Точные значения дисперсий данных, как правило, неизвестны, однако зачастую удается сделать правдоподобные заключения о том, как экспериментальная ошибка связана с измеряемыми величинами. Описание невзвешенных значений при помощи прямой непригодно для любых данных ферментативной кинетики. Поэтому в выражение для суммы квадратов всегда должны входить веса.

Преобразуя уравнение (10.11), получаем

$$e = y - a - bx.$$

Сумма квадратов выражается следующим образом:

$$SS = \sum w e^2 = \sum w (y - a - bx)^2.$$

При любом b величины SS и a связаны квадратным уравнением, и поэтому зависимость SS от a представляет собой параболу. Наклон касательной к этой параболе в любой точке равен

$$\frac{\partial SS}{\partial a} = -2 \sum w (y - a - bx) = -2 \sum wy + 2a \sum w + 2b \sum wx.$$

Аналогичным образом можно получить, что при любом a наклон касательной к кривой, представляющей графически зависимость SS от b , определяется следующим выражением:

$$\frac{\partial SS}{\partial b} = -2 \sum wx y + 2a \sum wx + 2b \sum wx^2.$$

Для того чтобы величина SS была минимальна, оба наклона должны быть одновременно равны нулю. Поэтому если определить \hat{a} и \hat{b} как значения a и b , при которых SS достигает минимума, то мы получим

$$\left. \begin{aligned} \hat{a} \sum w + \hat{b} \sum wx &= \sum wy \\ \hat{a} \sum wx + \hat{b} \sum wx^2 &= \sum wx y \end{aligned} \right\}. \quad (10.12)$$

Эту систему простых уравнений (иногда называемых *нормальными уравнениями*) довольно просто разрешить относительно неизвестных \hat{a} и \hat{b} :

$$\hat{b} = \frac{\sum w \sum wx y - \sum wx \sum wy}{\sum w \sum wx^2 - (\sum wx)^2}, \quad (10.13)$$

$$\hat{a} = \frac{\sum wy - \hat{b} \sum wx}{\sum w}. \quad (10.14)$$

Данные соотношения удобны для расчета \hat{a} и \hat{b} , однако из них непосредственно не видно, как найти дисперсию \hat{a} и \hat{b} . Все же, проявив небольшую изобретательность, мы можем преобразовать уравнение (10.13) к следующему виду:

$$\hat{b} = \frac{\sum (x - \bar{x}) wy}{\sum (x - \bar{x}) wx}, \quad (10.15)$$

где $\bar{x} = \sum wx / \sum w$ — средневзвешенное значений x . Это уравнение типа

$$\hat{b} = \sum uy, \quad (10.16)$$

в котором u — постоянная, определяемая следующим выражением:

$$u = \frac{(x - \bar{x}) w}{\sum (x - \bar{x}) wx}. \quad (10.17)$$

Поскольку, как предполагается, ошибки значений y не коррелируют между собой, дисперсию величины \hat{b} можно найти, применив обобщенную форму уравнения (10.5) к уравнению (10.16):

$$\sigma^2(\hat{b}) = \sum u^2 \sigma^2(y). \quad (10.18)$$

Каждый вес w по определению обратно пропорционален $\sigma^2(y)$, и мы можем записать: $\sigma^2(y_i) = \sigma_{\text{эксп}}^2 / w_i$, где $\sigma_{\text{эксп}}^2$ — постоянная величина, не зависящая от i и называемая *экспериментальной дисперсией*. Уравнение (10.18) можно поэтому представить следующим образом:

$$\sigma^2(\hat{b}) = \sigma_{\text{эксп}}^2 \sum u^2 / w. \quad (10.19)$$

После довольно скучных, но несложных алгебраических преобразований получаем

$$\sigma^2(\hat{b}) = \frac{\sigma_{\text{эксп}}^2 \sum w}{\sum w \sum wx^2 - (\sum wx)^2}. \quad (10.20)$$

Хотя это уравнение имеет более сложный вид, чем уравнение (10.19), им удобнее пользоваться, поскольку оно содержит только суммы, которые входят также в уравнение (10.13). Таким образом, для определения $\sigma^2(\hat{b})$ требуются лишь незначительные рас-

четы в дополнение к тем, которые необходимы для определения \hat{b} .

Аналогичным образом можно получить выражения для дисперсии \hat{a} и ковариации \hat{a} и \hat{b} . Они имеют следующий вид:

$$\sigma^2(\hat{a}) = \frac{\sigma_{\text{эксп}}^2 \sum w x^2}{\sum w \sum w x^2 - (\sum w x)^2}, \quad (10.21)$$

$$\text{cov}(\hat{a}, \hat{b}) = \frac{-\sigma_{\text{эксп}}^2 \sum w x}{\sum w \sum w x^2 - (\sum w x)^2}. \quad (10.22)$$

Во все эти уравнения входит неизвестная величина $\sigma_{\text{эксп}}^2$, которую, однако, можно легко рассчитать из суммы квадратов: $\sigma_{\text{эксп}}^2 \approx SS/(n-2)$. Величину SS делят на $(n-2)$, а не на n , чтобы ввести поправку на смещение, связанное с тем, что SS является минимальной величиной и поэтому меньше истинной величины $\sum w \epsilon^2$ [см. уравнение (10.2)].

Отметим, что ни одно из уравнений (10.13) — (10.22) не является симметричным относительно x и y , и поэтому регрессия x на y должна давать такую наилучшим образом проведенную прямую, которая отличается от соответствующей прямой для регрессии y на x . Эта асимметрия заложена в исходном допущении о том, что y (но не x) измеряется с ошибкой, т. е. отклонения от прямой измеряются в направлении, параллельном оси y , а не перпендикулярном прямой, как можно было бы полагать. Может показаться, что измерение ошибок в направлении, перпендикулярном прямой, позволяет избежать необходимости в выборе допущения о том, какая переменная измеряется с ошибкой. Однако на деле такой способ измерения ошибки создает гораздо большие трудности, не способствуя решению проблемы: помимо того что при этом усложняются алгебраические выкладки, проведенная оптимальным образом прямая изменяется в зависимости от того, в каких единицах измеряются x и y , потому что длины отрезков, проведенных на графике, имеют разумную размерность только в том случае, если они параллельны той или иной оси.

Модель, основанная на аппроксимации данных прямой $y = \alpha + \beta x + \epsilon$, представляет собой простейший случай общего класса моделей, известных как *линейные*. Термин «линейный» употребляется не для того, чтобы лишний раз подчеркнуть, что прямая есть прямая; он означает, что эта модель описывается математически выражением типа

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \dots + \epsilon_i,$$

где y_i — единственная переменная, измеряемая с ошибкой, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots$ — параметры модели и x_{1i}, x_{2i}, \dots — переменные,

которые известны точно. Иными словами, линейная модель описывается линейной функцией параметров. Она может быть также линейной относительно измерений, однако это не имеет значения. Следовательно, уравнение $y = \alpha + \beta x + \gamma x^2 + \epsilon$ соответствует линейной модели, хотя и описывает кривую, а не прямую. В то же время уравнение $x/\alpha + y/\beta = 1 + \epsilon$ не относится к линейной модели, хотя это есть уравнение прямой. Условие линейности важно потому, что оно существенно упрощает анализ: линейным моделям соответствуют уравнения, сходные с уравнениями (10.12), которые можно точно решить в один прием. К сожалению, многие модели, встречающиеся в ферментативной кинетике (и во многих физических науках), нелинейны, и поэтому для их анализа требуются особые приемы. Зачастую модели могут быть представлены таким образом, что для их анализа становятся пригодными методы линейной регрессии, в чем состоит большая ценность этих методов.

10.4. Описание данных при помощи уравнения Михаэлиса — Ментен

Подобно тому как в идеализированное уравнение прямой $y = \alpha + \beta x$ должна быть включена ошибка измерения ($y = \alpha + \beta x + \epsilon$), чтобы оно соответствовало реальному эксперименту, в уравнение Михаэлиса—Ментен $v = \mathcal{V} s / (\mathcal{K}_M + s)$ также необходимо ввести соответствующий член, иначе оно будет неполным:

$$v = \frac{\mathcal{V} s}{\mathcal{K}_M + s} + \delta. \quad (10.23)$$

(Из-за отсутствия подходящих букв греческого алфавита для обозначения истинных значений V и K_M использованы символы \mathcal{V} и \mathcal{K}_M . Кроме того, вместо ϵ , e и w применены символы δ , d и u , а исходные символы сохранены для использования их в разд. 10.3.) Это простое изменение тотчас выявляет отрицательные стороны графика двойных обратных координат и других линейных анаморфоз уравнения Михаэлиса—Ментен, рассмотренных в разд. 2.5: сначала исследователь с удивлением обнаруживает, что совершенно правильные алгебраические преобразования приводят к неверным результатам, и только потом осознает, что неверными являются не алгебраические преобразования, а исходная точка зрения.

Для того чтобы описать экспериментальные данные при помощи уравнения (10.23), мы должны минимизировать сумму взвешенных квадратов $SS = \sum u d^2$, где d — приближенное значение δ , полученное заменой \mathcal{V} и \mathcal{K}_M на оценки \hat{V} и \hat{K}_M соответственно. Следовательно, в принципе нам нужно решить такую же

задачу, как и в предыдущем разделе, однако здесь ситуация несколько сложнее, поскольку уравнение (10.23) нелинейно и минимизировать SS прямым образом не удастся. Тем не менее существует ряд способов нахождения минимума SS , из которых мы рассмотрим один, а именно тот, который основан главным образом на работах Иохансена и Ламри [86] и Уилкинсона [149].

Если член, соответствующий ошибке, введен в уравнение Мичаэлиса—Ментен после преобразования его в линейную форму, а не до, как следовало бы сделать, т. е.

$$\frac{s}{v} = \frac{\mathcal{K}_M}{\mathcal{V}} + \frac{1}{\mathcal{V}} s + \varepsilon,$$

то полученное выражение не является истинной анаморфозой уравнения (10.23) и величина ε не равна δ (вот почему потребовалось другое обозначение). Действительно, простыми алгебраическими преобразованиями мы можем показать, что

$$\delta = \frac{-\mathcal{V}^{ve}}{\mathcal{K}_M + s}. \quad (10.24)$$

Поскольку \mathcal{V} , \mathcal{K}_M , δ и ε неизвестны, мы должны заменить их оценками V , K_M , d и e соответственно. Уравнение (10.24) принимает тогда следующий вид:

$$d = \frac{-V^{ve}}{K_M + s}. \quad (10.25)$$

Для $V \approx \mathcal{V}$, $K_M \approx \mathcal{K}_M$ и $v \approx \mathcal{V}s/(\mathcal{K}_M + s)$, т. е. при значениях параметров, близких к оптимальным, $V/(K_M + s) \approx v/s$. Таким образом,

$$d \approx \frac{-v^{2e}}{s}. \quad (10.26)$$

Если нам удастся определить веса u , то полученные выражения позволят очень просто найти минимум SS . Согласно предыдущему разделу, веса должны точно отражать изменение дисперсии v с изменением v . На самом деле характер изменения дисперсии v при варьировании v неизвестен, однако истина лежит между двумя крайними случаями: а) ошибки измерения v являются простыми, т. е. каждая скорость характеризуется одной и той же стандартной ошибкой, и поэтому для каждого измерения $u = 1$; б) ошибки измерения v являются относительными, т. е. каждая скорость характеризуется стандартной ошибкой, пропорциональной истинной величине $\mathcal{V}s/(\mathcal{K}_M + s)$, и поэтому для каждого измерения $u = (\mathcal{K}_M + s)^2/\mathcal{V}^2 s^{21}$.

¹ Речь идет о постоянстве абсолютных ошибок (случай а) или постоянстве относительных ошибок (случай б). — *Прим. перев.*

В первом случае минимизация SS сводится просто к отысканию минимума суммы

$$SS = \sum d^2 = \sum \frac{V^2 v^2 e^2}{(K_M + s)^2} \approx \sum \frac{v^4 e^2}{s^2}. \quad (10.27)$$

Ценность приближенной формы этого выражения состоит в том, что она не содержит неизвестных величин; следовательно, первым шагом минимизации SS является отыскание минимума суммы $\sum v^4 e^2 / s^2$ при помощи формул линейной регрессии, приведенных в предыдущем разделе. После подстановки в уравнения (10.13) и (10.14) $\hat{a} = \hat{K}_M \hat{V}$, $\hat{b} = 1/\hat{V}$, $x = s$, $y = s/v$ и $w = v^4/s^2$ и проведения соответствующих преобразований получаем

$$\hat{V} \approx \frac{\sum v^4/s^2 \sum v^4 - (\sum v^4/s)^2}{\sum v^4/s^2 \sum v^3 - \sum v^4/s \sum v^3/s}, \quad (10.28)$$

$$\hat{K}_M \approx \frac{\sum v^4 \sum v^3/s - \sum v^4/s \sum v^3}{\sum v^4/s^2 \sum v^3 - \sum v^4/s \sum v^3/s}. \quad (10.29)$$

При решении многих задач достаточно остановиться на этом этапе. Могут, конечно, сказать, что любая попытка улучшить эти значения \hat{V} и \hat{K}_M излишня, поскольку, как правило, мы никогда не располагаем надежным способом определения веса. Однако для полноты картины покажем, как можно строго минимизировать SS . После того как найдены приближенные значения \hat{V} и \hat{K}_M , можно заменить значения весов, полученные в первом приближении, на более точные веса $V_0 v^2 / (K_0 + s)^2$, где V_0 и K_0 — приближенные значения \hat{V} и \hat{K}_M , найденные при помощи уравнений (10.28) и (10.29). Уточненные значения \hat{V} и \hat{K}_M равны

$$\hat{V} \approx \frac{\sum \frac{v^2}{(K_0 + s)^2} \sum \frac{s^2 v^2}{(K_0 + s)^2} - \left(\sum \frac{sv^2}{(K_0 + s)^2} \right)^2}{\sum \frac{v^2}{(K_0 + s)^2} \sum \frac{s^2 v}{(K_0 + s)^2} - \sum \frac{sv^2}{(K_0 + s)^2} \sum \frac{sv}{(K_0 + s)^2}}, \quad (10.30)$$

$$\hat{K}_M \approx \frac{\sum \frac{s^2 v^2}{(K_0 + s)^2} \sum \frac{sv}{(K_0 + s)^2} - \sum \frac{sv^2}{(K_0 + s)^2} \sum \frac{s^2 v}{(K_0 + s)^2}}{\sum \frac{v^2}{(K_0 + s)^2} \sum \frac{s^2 v}{(K_0 + s)^2} - \sum \frac{sv^2}{(K_0 + s)^2} \sum \frac{sv}{(K_0 + s)^2}}. \quad (10.31)$$

Этот процесс можно повторить, заменяя K_0 на новое значение \hat{K}_M и далее до тех пор, пока \hat{K}_M не перестанет заметно меняться от одного приближения к другому. Как правило, это бывает примерно на четвертом этапе. Заметим, что величина V_0 на самом деле в уравнения (10.30) и (10.31) не входит, так как ее можно сокра-

тить. Следовательно, оценивать \hat{V} до проведения последнего этапа приближения нет необходимости.

Перейдем теперь к обсуждению второго подхода к определению весов, основанного на допущении, что каждая скорость характеризуется стандартной ошибкой, пропорциональной истинному значению скорости. Здесь мы с удивлением обнаруживаем, что решение задачи становится намного более простым. В этом случае соответствующие веса u задаются выражением $u = (\hat{K}_M + s)^2 / \hat{V}^2 s^2$, где неизвестные \hat{K}_M и \hat{V} заменены на наилучшие оценки \hat{K}_M и \hat{V} . Следовательно, сумма квадратов равна

$$SS = \sum u d^2 = \sum \frac{(\hat{K}_M + s)^2 V^2 v^2 e^2}{\hat{V}^2 (K_M + s)^2 s^2}. \quad (10.32)$$

По определению в точке минимума $K_M = \hat{K}_M$ и $V = \hat{V}$, поэтому

$$SS = \sum v^2 e^2 / s^2. \quad (10.33)$$

Строго это уравнение выполняется только в точке минимума, но именно эта точка нас и интересует. Уравнение (10.33) не содержит неизвестных величин, поэтому минимизировать SS можно в один прием: подставляя $\hat{a} = \hat{K}_M / \hat{V}$, $\hat{b} = 1 / \hat{V}$, $x = s$, $y = s/v$ и $w = v^2/s^2$ в уравнения (10.13) и (10.14) и проводя соответствующие преобразования, получаем точные решения для \hat{V} и \hat{K}_M :

$$\hat{V} = \frac{\sum v^2/s = \sum v^2 - (\sum v^2/s)^2}{\sum v^2/s^2 \sum v - \sum v^2/s \sum v/s}, \quad (10.34)$$

$$\hat{K}_M = \frac{\sum v^2 \sum v/s - \sum v^2/s \sum v}{\sum v^2/s^2 \sum v - \sum v^2/s \sum v/s}. \quad (10.35)$$

Пользоваться этими уравнениями, впервые полученными Иохансенем и Ламри [86], намного проще, чем уравнениями (10.30) и (10.31), и остается только удивляться, почему они так редко применяются. На это можно было бы ответить, что выбор определяется (или должен определяться) не удобствами расчетов, а природой экспериментальных ошибок. Однако такой ответ звучит не очень убедительно, поскольку предполагается, что нам известна природа экспериментальной ошибки, а этого почти никогда не бывает. Честнее будет сказать, что просто линейная регрессия намного более удобна при работе с простыми ошибками, а исследователь невольно подходит к решению задачи, принимая желаемое за действительное, и считает ошибки простыми. В ферментативной кинетике на самом деле гораздо удобнее принять аль-

тернативную гипотезу (случай относительных ошибок), хотя и с меньшим на то основанием. На практике правильность схемы для определения весов можно оценить с помощью графиков зависимости d от v и d/v от v , используя для построения расчетных кривых те веса, которые желают проверить: если ошибки действительно являются простыми (или, выражаясь более строгим

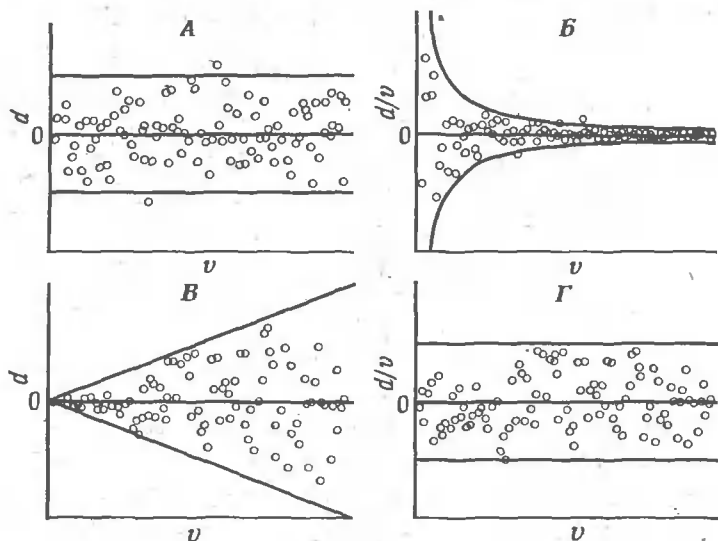


Рис. 10.1. Графики разброса экспериментальных точек, используемые для оценки правильности способа определения весов.

Верхняя пара рисунков (А и Б) показывает ожидаемый характер зависимости d (отклонения от расчетной кривой) от скорости v и зависимости d/v от v соответственно для случая, когда все скорости имеют одно и то же стандартное отклонение (случай «простых ошибок»). Нижняя пара рисунков (В и Г) показывает ожидаемый характер соответствующих зависимостей для случая, когда стандартное отклонение каждой скорости пропорционально ее истинному значению (случай «относительных ошибок»). На каждом рисунке обозначены границы, соответствующие удвоенному значению стандартного отклонения.

статистическим языком, если значения d являются гомоскедастичными), то на графике зависимости d от v точки должны быть разбросаны в полосе, параллельной оси v , а на графике зависимости d/v от v — в сужающейся при больших v полосе, как это показано в верхней части рис. 10.1. Если же ошибки являются строго относительными, так что гомоскедастичный характер носят значения d/v , а не d , то на графике зависимости d от v точки должны быть разбросаны внутри клиновидной полосы, а на графике зависимости d/v от v — внутри полосы, параллельной оси v , как это показано в нижней части рис. 10.1. Эта картина является, конечно, идеализированной, и на практике, чтобы четко определить ха-

рактен разброса точек, необходимо, чтобы их было не менее 50. Эту трудность можно обойти, комбинируя результаты нескольких экспериментов, проведенных при одинаковых условиях одним и тем же исследователем.

Иногда интуитивно ясно, что ни один из рассмотренных выше случаев не подходит и лучше всего взять нечто среднее между ними, используя веса $u = (\hat{K}_M + s)/\hat{V}s$. Тогда для описания эксперимен-

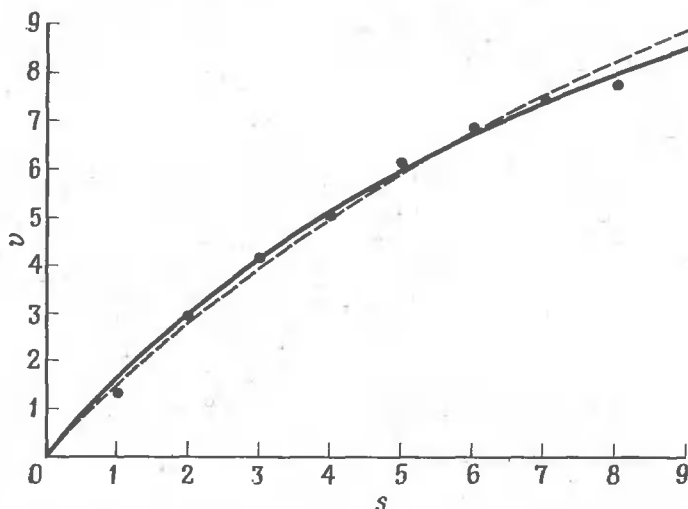


Рис. 10.2. Влияние способа определения весов на оценки кинетических параметров.

Экспериментальные данные описаны уравнением Михаэлиса—Ментен при $\hat{V} = 18,41$ и $\hat{K}_M = 10,41$ (сплошная кривая) для случая простых ошибок и при $\hat{V} = 23,61$ и $\hat{K}_M = 14,87$ (пунктирная кривая) для случая относительных ошибок. Различия в значениях параметров для двух способов определения весов особенно существенны в тех случаях, когда данные являются неудовлетворительными (например, расположены в неподходящем интервале значений s , как в приведенном случае) или когда для описания экспериментальных данных используется ошибочное уравнение (например, не учитывается отчетливо выраженное субстратное ингибирование).

тальных данных можно приспособить метод, предложенный для постоянных весов. Соответствующее выражение для суммы квадратов имеет теперь следующий вид:

$$SS = \sum \frac{\hat{V} v^2 e^2}{s (\hat{K}_M + s)} \approx \sum v^3 e^2 / s^2. \quad (10.36)$$

Можно сопоставить это уравнение с уравнением (10.27) и принять во внимание проведенное выше обсуждение вопросов, связанных

с его применением. Если характер распределения ошибок совершенно не известен (как это и бывает на самом деле), вернее всего остановиться именно на этом способе определения весов, а ни на одном из описанных ранее.

Рис. 10.2 показывает, как выбор способа определения весов влияет на расчет «наилучших» значений V и K_M . Следует особо подчеркнуть, что хотя две расчетные кривые, проведенные через экспериментальные точки, очень сходны, соответствующие им значения параметров плохо согласуются между собой.

10.5. Заключительные замечания об использовании графика двойных обратных координат

Мы можем подойти к результатам, полученным в последнем разделе, с несколько иных позиций, акцентируя внимание на проблеме проведения через экспериментальные точки прямой методом наименьших квадратов. В разд. 10.3 было показано, что в этом случае каждой точке (x, y) должен быть приписан вес, который обратно пропорционален дисперсии зависимой переменной y . Для графика двойных обратных величин зависимой переменной является $1/v$, ее дисперсия равна $\sigma^2(v)/v^2\hat{v}^2$, где \hat{v} — рассчитанное значение v , т. е. $\hat{v} = \hat{V}s/(\hat{K}_M + s)$. Следовательно, если все скорости имеют одну и ту же дисперсию (допущение, как сказано выше, далеко не всегда справедливое), то соответствующие веса для графика двойных обратных величин пропорциональны $v^2\hat{v}^2$. Поскольку расчетные значения скоростей вначале неизвестны, мы можем использовать в качестве первого приближения веса v^4 , рассчитанные из наблюдаемых значений скорости. Затем мы можем уточнять результат, используя веса $v^2\hat{v}^2$ до тех пор, пока данные не станут самосогласующимися, т. е. пока оценка \hat{K}_M при переходе от одного этапа приближения к следующему не будет оставаться постоянной. [Некоторые исследователи, например Кле-ланд [31], в качестве второго и последующего приближений предлагают использовать веса \hat{v}^4 , однако это предположение основано на неверной форме уравнения (10.9) для дисперсии обратной величины и не дает улучшения результата первого приближения.]

Если для графика двойных обратных величин берут веса $v^2\hat{v}^2$, то расчеты и конечные результаты оказываются идентичными тем, которые получены в предыдущем разделе [уравнения (10.28)—(10.31)]. Это же относится и к графику зависимости s/v от s . Тогда возникает естественный вопрос: в каком смысле график двойных обратных координат хуже графика зависимости s/v от s ? Основной недостаток графика двойных обратных коор-

динат состоит в том, что даже умеренному интервалу значений s соответствует огромный интервал значений весов: например, если s изменяется от $0,2K_M$ до $2K_M$ с одновременным изменением v от $0,167V$ до $0,667V$, то вес меняется при этом в 256 раз. Совершенно ясно, что, глядя на график, невозможно приписать одной точке в 256 раз больший вес, чем другой. Следовательно, график двойных обратных координат не дает почти никакой информации об экспериментальной ошибке. Для графика зависимости s/v от s картина иная: соответствующие веса пропорциональны $v^2\hat{v}^2/s^2$ (или приблизительно v^4/s^2) и в том же интервале значений v изменяются в 3,24 раза. Поэтому визуальный анализ графика зависимости s/v от s дает разумное представление об экспериментальной ошибке.

В этой главе мы до сих пор имели дело с простыми ошибками, т. е. считали, что все скорости имеют одну и ту же дисперсию. Рассмотрим теперь альтернативную гипотезу: допустим, что ошибки измерения v являются относительными. График двойных обратных координат по-прежнему является наименее удовлетворительным, однако различие между ним и другими линейными анаморфозами уменьшается: соответствующие веса для величины $1/v$ пропорциональны теперь v^2 и меняются при изменении v от $0,167V$ до $0,667V$ только в 16 раз, в то время как соответствующие веса для величины s/v пропорциональны v^2/s^2 и в том же интервале значений v изменяются в 6,25 раза. Какой бы линейный график ни применялся в этом случае, соответствующие веса должны быть рассчитаны из наблюдаемых значений скорости. «Уточнение» результата на основе использования расчетных значений скорости [31] представляет собой на деле отход от простого и точного решения к трудоемкой аппроксимации.

10.6. Стандартные ошибки величин \hat{V} и \hat{K}_M

Выражения для дисперсий величин \hat{K}_M/\hat{V} и $1/\hat{V}$ легко получить подстановкой в уравнения (10.20) и (10.21) $\hat{a} = \hat{K}_M/\hat{V}$, $\hat{b} = 1/\hat{V}$ и $x = s$:

$$\sigma^2(1/\hat{V}) = \frac{\sigma_{\text{эксп}}^2 \sum w}{\sum w \sum ws^2 - (\sum ws)^2}, \quad (10.37)$$

$$\sigma^2(\hat{K}_M/\hat{V}) = \frac{\sigma_{\text{эксп}}^2 \sum ws^2}{\sum w \sum ws^2 - (\sum ws)^2}, \quad (10.38)$$

$$\text{cov}(1/\hat{V}, \hat{K}_M/\hat{V}) = \frac{-\sigma_{\text{эксп}}^2 \sum ws}{\sum w \sum ws^2 - (\sum ws)^2}. \quad (10.39)$$

Эти уравнения одинаково хорошо применимы для любого способа определения весов. Дисперсия величины \hat{V} находится из уравнения (10.37) по формуле для дисперсии обратной величины (10.9):

$$\sigma^2(\hat{V}) \approx \frac{\hat{V}^4 \sigma_{\text{эксп}}^2 \sum w}{\sum w \sum ws^2 - (\sum ws)^2}. \quad (10.40)$$

Выражение для дисперсии величины \hat{K}_M получается из уравнений (10.37) — (10.39) по формуле для дисперсии отношения (10.8):

$$\sigma^2(\hat{K}_M) \approx \hat{V}^2 \sigma_{\text{эксп}}^2 \left[\frac{\sum ws^2 + 2 \hat{K}_M \sum ws + \hat{K}_M^2 \sum w}{\sum w \sum ws^2 - (\sum ws)^2} \right]. \quad (10.41)$$

Хотя это выражение выглядит довольно сложно, рассчитать дисперсию \hat{K}_M не составляет особого труда, так как все суммы, входящие в (10.41), были уже определены при нахождении \hat{V} и \hat{K}_M . Во всех этих уравнениях величина $\sigma_{\text{эксп}}^2$ определяется как $SS/(n-2)$ (разд. 10.3), и в каждом случае стандартная ошибка представляет собой квадратный корень из дисперсии.

Отметим, что из расчета стандартных ошибок величин \hat{V} и \hat{K}_M сразу не видно, что между оценками \hat{V} и \hat{K}_M всегда существует сильная положительная корреляция. На самом деле фактическая ошибка величины \hat{V} сильно зависит от ошибки \hat{K}_M и наоборот. Следовательно, следует рассматривать точность определения двух параметров совместно, а не порознь. Далее, хотя можно в принципе рассчитывать совместную доверительную область как область, ограниченную контуром с постоянным значением SS (см., например, [32]), использовать этот метод для повседневной работы неудобно, так как соответствующие расчеты очень трудоемки. Рассмотрим поэтому другие подходы. Проще всего воспользоваться тем качественным фактом, что между величинами \hat{V} и \hat{K}_M всегда существует отчетливо выраженная положительная корреляция и что вряд ли заметная положительная ошибка в одном параметре будет сопровождаться заметной отрицательной ошибкой в другом. Можно использовать и другую возможность — рассматривать стандартную ошибку величины \hat{K}_M/\hat{V} , которую так же легко рассчитать при помощи уравнения (10.38), как и стандартные ошибки параметров \hat{V} и \hat{K}_M . Относительная ошибка в расчете \hat{K}_M/\hat{V} всегда меньше, чем для \hat{K}_M , и часто меньше ошибки для \hat{V} . Поэтому целесообразно проверять, согласуются ли предполагаемые ошибки в расчете \hat{K}_M и \hat{V} со стандартной ошибкой для \hat{K}_M/\hat{V} .

Наконец, необходимо помнить, что при расчетах стандартных ошибок не учитываются те источники ошибок, которые смещают все точки в одну сторону. Они могут быть гораздо важнее источников рассмотренных нами ошибок, и нет никаких оснований полагать, что их влияние на \hat{V} и \hat{K}_M будет согласованным. Так, зачастую оказывается, что изменения обоих параметров, происходящие день ото дня, намного выше стандартных ошибок, рассчитанных для измерений, выполненных за один день. Рассмотрим, например, следующую серию значений \hat{K}_M и стандартных ошибок, полученную в работе [82] для бактериальной нитрогеназы в пяти экспериментах: $0,131 \pm 0,016$; $0,059 \pm 0,008$; $0,102 \pm 0,027$; $0,09 \pm 0,02$ и $0,12 \pm 0,03$ атм азота. Стандартное отклонение между этими результатами составляет $0,028$ атм азота. Таким образом, между самими опытами существует различие, не учтенное при вычислении индивидуальных стандартных ошибок. Более того, два крайних значения \hat{K}_M характеризуются наименьшими стандартными ошибками, так что кажется, что связь между рассчитанными и истинными ошибками для этих пяти значений очень слабая. Подобный результат отнюдь не является необычным (единственное, что здесь необычно, — это наглядность представленного примера), и он показывает, что к оценкам стандартной ошибки следует относиться с большой осторожностью. Поскольку неточность в определении концентрации фермента непосредственно сказывается на величине \hat{V} , весьма вероятно, что для значений \hat{V} будет наблюдаться еще меньшее согласие между вариациями, наблюдаемыми день ото дня, и оценками стандартной ошибки.

10.7. Общая линейная модель и ее приложения к более сложным случаям

Чтобы описать экспериментальные данные при помощи более сложных уравнений, чем уравнение Михаэлиса—Ментен, с тремя и большим числом параметров, мы должны прежде всего рассмотреть обобщенную прямую (*общую линейную модель*), задаваемую уравнением

$$y_i = \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \dots + \beta_p x_{pi} + \epsilon_i. \quad (10.42)$$

Здесь при каждом x стоит два индекса, из которых первый определяет природу x , а второй — номер наблюдения. Так, x_{1i} может представлять собой i -ю концентрацию субстрата, x_{2i} — i -ю концентрацию ингибитора и т. д. Хотя это уравнение не содержит постоянного члена в явном виде, его наличие не исключается, потому что для всех i можно принять x_{1i} равным единице и в этом случае β_1 будет константой, соответствующей константе α в разд.

10.3. (В некоторых руководствах константа обозначается через β_0 , однако это ведет к недоразумению, так как число параметров в этом случае становится равным не p , а $p + 1$.)

Для любых оценок параметров (b_1, b_2, \dots, b_p) уравнение (10.42) может быть записано следующим образом:

$$y_i = b_1 x_{1i} + b_2 x_{2i} + \dots + b_p x_{pi} + e_i, \quad (10.43)$$

и тогда сумма квадратов с учетом весов определяется как

$$SS = \sum w_i e_i^2 = \sum w_i (y_i - b_1 x_{1i} - b_2 x_{2i} - \dots - b_p x_{pi})^2.$$

Дифференцируя поочередно по каждому параметру, получаем

$$\begin{aligned} \frac{\partial SS}{\partial b_1} = & -2 \sum w_i x_{1i} y_i + 2b_1 \sum w_i x_{1i}^2 + 2b_2 \sum w_i x_{2i} x_{1i} + \dots + \\ & + 2b_p \sum w_i x_{pi} x_{1i}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial SS}{\partial b_2} = & -2 \sum w_i x_{2i} y_i + 2b_1 \sum w_i x_{1i} x_{2i} + 2b_2 \sum w_i x_{2i}^2 + \dots + \\ & + 2b_p \sum w_i x_{pi} x_{2i} \end{aligned}$$

и т. д. Чтобы найти оценки $\hat{b}_1, \hat{b}_2, \dots, \hat{b}_p$, при которых SS минимальна, мы должны приравнять все p выражений к нулю, заменить каждую величину b_j на \hat{b}_j и провести соответствующие преобразования:

$$\left\{ \begin{aligned} \hat{b}_1 \sum w_i x_{1i}^2 + \hat{b}_2 \sum w_i x_{2i} x_{1i} + \dots + \hat{b}_p \sum w_i x_{pi} x_{1i} &= \sum w_i x_{1i} y_i, \\ \hat{b}_1 \sum w_i x_{1i} x_{2i} + \hat{b}_2 \sum w_i x_{2i}^2 + \dots + \hat{b}_p \sum w_i x_{pi} x_{2i} &= \sum w_i x_{2i} y_i \end{aligned} \right. \quad (10.44)$$

и т. д. Вместо системы, состоящей из двух уравнений [системы (10.12) в случае прямой], мы теперь имеем систему p уравнений. Ее решение найти не так просто, как может показаться, из-за возникающих при этом серьезных арифметических трудностей, что характерно для всех систем с большим числом уравнений (подробнее об этом сказано в разд. 10.8). Мы можем формализовать задачу путем введения такого набора коэффициентов c_{jk} , что

$$\hat{b}_1 = c_{11} \sum w_i x_{1i} y_i + c_{21} \sum w_i x_{2i} y_i + \dots + c_{p1} \sum w_i x_{pi} y_i,$$

$$\hat{b}_2 = c_{12} \sum w_i x_{1i} y_i + c_{22} \sum w_i x_{2i} y_i + \dots + c_{p2} \sum w_i x_{pi} y_i$$

и т. д. Говорят, что исходная система уравнений инвертирована

в том смысле, что неизвестные $\hat{b}_1, \hat{b}_2, \dots, \hat{b}_p$ выражены теперь в явном виде, в то время как члены, стоящие в правой части уравнений (10.44), $\sum w_i x_{1i} y_i, \sum w_i x_{2i} y_i, \dots$, записаны теперь так, как если бы они были неизвестными. Таким образом, матрица из коэффициентов c_{jk} должна быть обратной исходной матрице из коэффициентов $\sum w_i x_{ji} x_{ki}$. Поскольку программы для нахождения обратных матриц имеются во всех библиотеках программ к современным ЭВМ, останавливаться здесь на технике расчета коэффициентов c_{jk} нет необходимости. Отметим только, что подобный подход не только позволяет рассчитать все значения \hat{b} , но и дает простой способ определения всех дисперсий и ковариаций. Для любого параметра

$$\sigma^2(\hat{b}_j) = c_{jj} \sigma_{\text{экср}}^2,$$

а для любой пары параметров

$$\text{cov}(\hat{b}_j, \hat{b}_k) = c_{jk} \sigma_{\text{экср}}^2,$$

где $\sigma_{\text{экср}}^2$ рассчитывается из суммы квадратов обычным путем: $\sigma_{\text{экср}}^2 = SS/(n-p)$. Справедливость этого соотношения совсем не очевидна, и ее трудно доказать, не углубляясь в матричную алгебру. Для более детального ознакомления с этими вопросами читатель должен обратиться к учебникам по регрессионному анализу (например, [46]).

Для нахождения параметров уравнений, обычно встречающихся в стационарной кинетике, может быть использована общая линейная модель. Рассмотрим, например, уравнение для начальной скорости необратимой реакции при наличии ингибирования продуктом [уравнение (2.22)]

$$v_i = \frac{V_f a_i}{K_M^A (1 + p_i/K_s^P) + a_i} + d_i. \quad (10.45)$$

Допустим, что мы хотим найти минимум суммы квадратов $SS = \sum u_i d_i^2$ с учетом веса. Уравнение (10.45) можно записать следующим образом:

$$\frac{a_i}{v_i} = \frac{K_M^A}{V_f} + \frac{K_M^A}{V_f K_s^P} p_i + \frac{1}{V_f} a_i + e_i. \quad (10.46)$$

Величина e_i не равна d_i , однако связана с ней следующим приближенным соотношением: $e_i = -d_i a_i / v_i^2$ [см. уравнение (10.26)]. Уравнение (10.46) аналогично уравнению (10.43), если принять $y_i = a_i / v_i$, $b_1 = K_M^A / V_f$, $b_2 = K_M^A / V_f K_s^P$, $b_3 = 1 / V_f$, $x_{1i} = 1$ (для всех i), $x_{2i} = p_i$ и $x_{3i} = a_i$. Соответствующие веса w_i в пер-

вом приближении можно считать равными $u_i v_i^4/a_i^2$ или $w_i = u_i v_i^2 \hat{v}_i^2/a_i^2$, где \hat{v}_i — скорость, рассчитанная с наилучшими оценками параметров. При определении весов u_i используются те же соображения, что и для более простого уравнения Михаэлиса—Ментен (разд. 10.4): если мы считаем, что ошибки определения скоростей простые, то $u_i = 1$ для каждого i ; если же ошибки относительные, то $u_i = 1/\hat{v}_i^2$. В последнем случае \hat{v}_i^2 исчезает из выражения для w_i , и поэтому равенство $w_i = v_i^2/a_i^2 b_i^2$ является строгим и не требует уточнения (опять как и в более простой ситуации).

Большая часть уравнений стационарной скорости имеет по существу такой же вид, что и уравнение (10.45), т. е. правая часть их является дробью, в которой числитель представлен одним членом, а знаменатель — линейным выражением. Все эти уравнения исследуются точно так же, как и уравнение (10.45). Уравнения, содержащие более одного члена в числителе, например уравнение (4.7), относящееся к случаю гиперболического ингибирования или активации, гораздо труднее использовать для описания экспериментальных данных; для их анализа требуются более сложные методы нелинейной регрессии. Большое число подобных методов обсудил Сванн [138], а в работах Вартона и др. [148] можно найти пример из области ферментативной кинетики.

10.8. Некоторые трудности, возникающие при описании экспериментальных данных расчетными кривыми

Для обсуждения практических трудностей, возникающих при использовании методов, описанных в этой главе, потребовалось бы написать отдельную книгу. Однако некоторые проблемы встречаются так часто, что о них стоит упомянуть.

Большие трудности бывают обусловлены причинами, совершенно неожиданными для неопытного исследователя. Речь идет об ошибке, связанной с округлением величин. Для большинства нестатистических задач, проводя расчеты, можно брать величины, содержащие на одну или две значащие цифры больше, чем мы хотим получить в окончательном ответе. Однако в статистических расчетах этого, как правило, бывает недостаточно, потому что на том или ином их этапе непременно приходится определять разность двух близких величин, что всегда ведет к потере нескольких значащих цифр. Рассмотрим, например, разность $1,38204 - 1,38195 = 0,00009$. Каждое из исходных чисел содержит шесть значащих цифр, а в разности мы имеем только одну. Полезно проделать расчет K_M при помощи уравнения (10.29) для серии данных, приведенных в табл. 10.1. Так как численные значе-

Таблица 10.1

ПОСЛЕДСТВИЯ, К КОТОРЫМ ПРИВОДИТ ОКРУГЛЕНИЕ ВЕЛИЧИН

Для серии, состоящей из пяти наблюдений (выраженных в произвольных единицах), рассчитанная при помощи уравнения (10.28) величина \hat{K}_M . Для данных, представленных в левой части таблицы, на каждом этапе расчетов использовались три знака после запятой, а в правой части—четыре.

s	v	v ²	v ³	v ² /s	v ³ /s	v ⁴ /s ²	v ²	v ³	v ² /s	v ³ /s	v ⁴ /s ²
1	0,22	0,011	0,002	0,011	0,002	0,002	0,0106	0,0023	0,0106	0,0023	0,0023
2	0,31	0,030	0,009	0,015	0,005	0,002	0,0298	0,0092	0,0149	0,0046	0,0023
3	0,41	0,069	0,028	0,023	0,009	0,003	0,0689	0,0283	0,0230	0,0094	0,0031
4	0,46	0,097	0,045	0,024	0,011	0,003	0,0973	0,0448	0,0243	0,0112	0,0028
5	0,48	0,111	0,053	0,022	0,011	0,002	0,1106	0,0531	0,0221	0,0106	0,0021
Суммы:		0,318	0,137	0,095	0,038	0,012	0,3172	0,1377	0,0949	0,0381	0,0126

$$\begin{aligned}
 \hat{K}_M &= \frac{0,137 \times 0,095 -}{0,012 \times 0,318 -} \\
 &\quad - \frac{0,038 \times 0,318}{0,038 \times 0,095} = \\
 &= \frac{0,013 - 0,012}{0,004 - 0,004} = \\
 &= \frac{0,001}{0,000} = \infty
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \hat{K}_M &= \frac{0,1377 \times 0,0949 -}{0,0126 \times 0,3172 -} \\
 &\quad - \frac{0,0381 \times 0,3172}{0,0381 \times 0,0949} = \\
 &= \frac{0,0131 - 0,0121}{0,0040 - 0,0036} = \\
 &= \frac{0,0010}{0,0004} = 2,50
 \end{aligned}$$

ния скоростей содержат только две значащие цифры после запятой и формула (10.29) дает величину K_M лишь в первом приближении, можно было бы просто предположить, что на каждом этапе расчета достаточно сохранять только три цифры после запятой. Однако, как видно из таблицы, это дает конечный ответ $K_M = 0,001/0,000 = \infty$. Взяв четыре значащие цифры после запятой, получаем $K_M = 0,0010/0,0004 = 2,5$, что уже гораздо лучше, но все же отклонение от точного ответа (2,359) составляет 6%.

Если для описания экспериментальных данных используются уравнения, содержащие несколько неизвестных, то трудности, к которым приводят ошибки, связанные с округлением величин, становятся еще более серьезными. На большинстве современных ЭВМ вычисления проводятся с двенадцатью или большим числом значащих цифр. Однако даже в этих случаях могут возникнуть затруднения при решении системы уравнений, если используется не очень хорошо отработанная программа. Эти трудности можно частично преодолеть, представляя все данные таким образом, чтобы их численные значения были как можно ближе к еди-

нице, желательно в интервале между 0,1 и 10. Гораздо проще, произведя все вычисления, вернуться затем к исходным размерностям, чем отыскивать в программе место, где неожиданно появился ноль.

Аналогичная проблема возникает и в случае, когда система уравнений составлена из *сингулярных* или *плохо обусловленных* уравнений. Говорят, что уравнения сингулярны, если они содержат на вид больше информации, чем это есть на самом деле. Например, следующие два уравнения

$$\begin{cases} x + y = 2, \\ 2x + 2y = 4 \end{cases}$$

являются сингулярными, так как второе из них содержит в точности ту же информацию, что и первое; система сингулярных уравнений никогда не может быть решена. Подобные уравнения появляются при решении задач регрессионного анализа, когда пытаются описать экспериментальные данные при помощи уравнений, содержащих большее число параметров, чем число наблюдений. Например, было бы бессмысленным пытаться применить уравнение (10.45), располагая только двумя наблюдениями. Все эти трудности легко устранить, руководствуясь просто здравым смыслом, однако гораздо чаще приходится иметь дело с системами плохо обусловленных уравнений, где это сделать гораздо труднее. Когда говорят о системе плохо обусловленных уравнений, то подразумевают, что, хотя уравнения и не строго сингулярны, они очень близки к таковым и для решения системы требуется проведение очень точных расчетов. Рассмотрим, например, следующую систему двух уравнений:

$$\begin{cases} x + y = 2, \\ x + 1,00001y = 2,00001. \end{cases}$$

Она имеет единственное решение: $x = 1$, $y = 1$. Однако увеличение правой части второго уравнения всего на 0,00001 приводит к изменению решения ($x = 0$, $y = 2$).

Плохо обусловленные уравнения появляются при решении задач регрессионного анализа в тех случаях, когда данные содержат мало информации о некоторых из параметров или не содержат ее совсем. Например, конкурентные ингибиторы оказывают наибольшее влияние при низких концентрациях субстрата, и серия наблюдений, проведенных исключительно при высоких концентрациях субстрата, часто не позволяет оценить константу ингибирования, сколь бы велико ни было число измерений. При решении более сложных задач указанием на наличие плохо

обусловленных уравнений может служить тот факт, что один из параметров имеет гораздо большую стандартную ошибку, чем все остальные. Если, например, при анализе смешанного ингибирования стандартные ошибки V , K_M и K_i оказываются равными приблизительно 5% величин измеряемых параметров, в то время как стандартная ошибка параметра K_i составляет приблизительно 50%, то это должно означать, что с точки зрения определения K_i эксперимент задуман плохо и необходимо провести большее число измерений при низких концентрациях субстрата. Рассмотренная ситуация представляет собой один из случаев, когда стандартные ошибки могут принести реальную пользу: численные значения стандартных ошибок сами по себе не представляют особой ценности, однако их сопоставление может оказаться очень полезным.

Следует отметить, что не всегда можно быть уверенным в том, что для описания экспериментальных данных используется корректное уравнение. В сложных случаях (как, например, при анализе многих моделей, рассмотренных в гл. 7) задача выбора корректного уравнения при современном уровне техники эксперимента часто оказывается неразрешимой, поскольку ожидаемые различия между моделями подчас меньше ошибки измерений. В подобной ситуации следует смириться с невозможностью дифференциации моделей, так как никакой статистический анализ не позволит извлечь из экспериментальных данных информацию, которая в них не содержится. Однако существуют приемы, позволяющие в отдельных случаях установить некорректность использования данного уравнения, т. е. его *непригодность* для описания экспериментальных данных. Самый простой и быстрый среди них состоит в определении знака разностей между экспериментальными точками и расчетной кривой. В том случае, когда уравнение выбрано верно, знак разностей меняется произвольным образом. Однако, если, например, первые из двадцати разностей имеют отрицательный знак, а остальные десять — положительный, это означает, что экспериментальные данные скорее всего описаны неудачно, поскольку при использовании корректного уравнения наличие подобных систематических расхождений между экспериментальными данными и расчетной кривой — событие а priori маловероятное. Подобную картину получают, например, в том случае, когда пытаются уравнением Михаэлиса — Ментен описать экспериментальные точки, лежащие на сигмоидной кривой.

Если некоторые измерения проведены дважды, возможен более строгий тест на корректность использования данного уравнения. Подобные наблюдения позволяют независимым способом оценить экспериментальную ошибку, которую далее можно сопоставить с ошибкой, получаемой из суммы квадратов отклонений, т. е. $\sigma^2_{\text{эксп}}$. Если число повторных измерений достаточно

велико (например, 10 из 30)¹, то значения ошибок, рассчитанные из суммы квадратов отклонений, с одной стороны, и из двойных измерений — с другой, должны быть величинами одного порядка. Если это не выполняется и ошибки в первом случае существенно меньше, чем во втором, то скорее всего экспериментальные данные описаны неудовлетворительно. Сопоставление ошибок может быть проведено количественно, и результаты проанализированы при помощи статистических таблиц (см. [46], стр. 26—32), однако почти так же верно и значительно быстрее можно ответить на поставленный вопрос, руководствуясь просто здравым смыслом. Тем, кто недостаточно хорошо знаком с теоретическими основами статистических тестов, лучше всего их не использовать, потому что, слепо применяя подходы, описанные в учебнике, можно прийти к явно ошибочным заключениям и попасть, таким образом, в глупое положение.

Когда установлено, что экспериментальные данные описаны неверно, перед исследователем возникает задача найти более подходящее уравнение. При этом недостаточно, чтобы новое уравнение давало меньшую сумму квадратов отклонений, так как введение в уравнение большего числа параметров всегда снижает величину SS . Нужно стремиться по крайней мере к тому, чтобы снизить величину экспериментальной дисперсии $\sigma^2_{\text{эксп}} = SS/(n-p)$ и добиться отсутствия систематических расхождений между экспериментальными данными и расчетной кривой. Как и ранее, можно использовать для этой цели статистические тесты, но лучше руководствоваться здравым смыслом.

10.9. Статистические аспекты использования прямого линейного графика

Метод наименьших квадратов в приложении к решению задач регрессионного анализа представлен в настоящей главе как самый удобный общий метод, а не как наилучший. Дело здесь в следующем: чтобы показать, что решение задачи, получаемое методом наименьших квадратов, является «оптимальным», мы должны допустить, что а) распределение случайных ошибок измерений является нормальным, б) экспериментальная ошибка определяется ошибкой только одной переменной, в) соответствующие веса измерений известны и г) возможными систематическими ошибками можно пренебречь. К сожалению, о том, в какой мере каждое из этих допущений выполняется на практике, известно очень мало. Большинство исследователей стремятся к тому, чтобы сделанные ими заключения зависели от как можно меньшего

¹ Проводить дважды все измерения нет необходимости, и, конечно, следует отказаться от подобной постановки эксперимента, если при этом заметно уменьшается ширина охвата данных.

числа необоснованных допущений, и на протяжении последних пятидесяти лет сформировалась отдельная область статистики, известная как *непараметрическая статистика* (или статистика, не использующая представлений о типе распределения генеральной совокупности), которая основывается на минимальном числе допущений. Из перечисленных выше допущений первые три отбрасываются. Если говорить о последнем допущении, то трудно представить себе такие систематические ошибки, которые невозможно было бы обнаружить, и его обычно выражают в более простой форме: если соответствующая информация отсутствует, то принимают, что ошибка любого измерения с равной вероятностью может быть как положительной, так и отрицательной величиной.

Простейшим примером непараметрической статистики может служить использование медианы в качестве «середины» выборки вместо среднего значения. Для того чтобы найти медиану ряда чисел, мы должны прежде всего расположить их в порядке возрастания, а затем выбрать число, занимающее среднее положение. Если число значений является четным, то выбирается среднее значение двух величин, занимающих среднее положение. Большая практическая польза от использования медианы состоит в том, что она почти не зависит от присутствия небольшого числа неверно измеренных величин (*выбросов*), в то время как среднее значение очень чувствительно к выбросам. Отрицательной стороной использования медианы является то обстоятельство, что если данные распределены нормально, медиана представляет собой менее «удачный» параметр, чем среднее значение, так как стандартное отклонение для медианы выборки приблизительно на 25% (в самых неблагоприятных случаях) больше соответствующей величины для среднего значения. Для небольшого числа измерений это различие будет меньше. Однако этот недостаток окупается тем, что, если распределение не является нормальным и содержит небольшую долю выбросов (например, 10% значений имеют в три раза большее стандартное отклонение, чем остальные 90%), медиана становится более удачным параметром, чем среднее значение. Еще одно важное преимущество использования медианы состоит в том, что при ее расчете не требуется учитывать веса, чтобы получить хорошую оценку, потому что лучшие значения в совокупности измерений имеют тенденцию располагаться в центре интервала, а худшие — на его краях. Таким образом, хотя в принципе и можно учитывать веса при расчете медианы, особой целесообразности в этом нет. Напротив, если хотят получить хорошую оценку среднего значения, то вводить поправку на вес измерения необходимо.

Прямой линейный график, предложенный Эйзендалем и Корниш-Боуденом [50] (см. разд. 2.5), представляет собой попытку

использовать идеи непараметрической статистики для оценки кинетических параметров ферментативной реакции и одновременно существенно упростить метод расчета и лежащие в его основе идеи. Для любой пары измерений v , проведенных при различных значениях концентрации субстрата, $(s_i; v_i)$ и $(s_j; v_j)$, существует единственная пара значений параметров уравнения Михаэлиса —

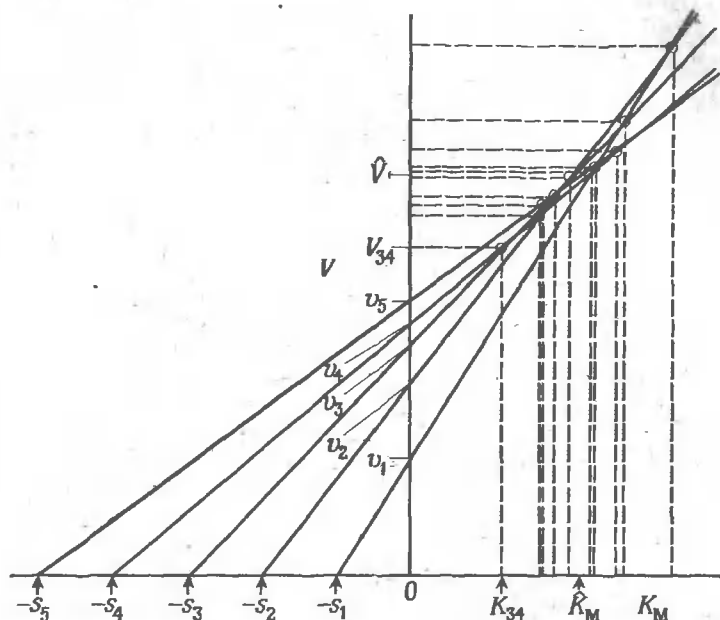


Рис. 10.3. Определение оценок медиан из прямого линейного графика. Прямые проведены так же, как и на рис. 2.7. и каждая точка пересечения (она обозначается кружком) дает оценку K_{ij} параметра K_M и оценку V_{ij} параметра V . Для ясности эти оценки отмечены на осях координат. \hat{K}_M определяется затем как медиана значений K_{ij} , а \hat{V} — как медиана значений V_{ij} . Если число точек пересечений является четным, как в данном случае, то медианой считается среднее между значениями двух величин, занимающих среднее положение.

Ментен ($K_{ij}; V_{ij}$), которая точно удовлетворяет обоим измерениям:

$$K_{ij} = \frac{v_j - v_i}{\frac{v_i}{s_i} - \frac{v_j}{s_j}},$$

$$V_{ij} = \frac{s_i - s_j}{\frac{s_i}{v_i} - \frac{s_j}{v_j}}.$$

Эти значения K_M и V соответствуют координатам точки пересечения прямых, проведенных для двух измерений так, как это описано в разд. 2.5; n измерений дают $n(n-1)/2$ таких пар значений K_M и V (или меньше, если имеются повторные измерения). Медиану совокупности значений K_{ij} можно определить как \hat{K}_M , а медиану совокупности значений V_{ij} — как \hat{V} . Эти медианы очень просто найти из прямого линейного графика, как это показано на рис. 10.3. Для того чтобы проверить правомочность подобной процедуры, Корниш-Боуден и Эйзенталь [37] провели моделирование с применением ЭВМ многих тысяч экспериментов, используя различные допущения о природе экспериментальной ошибки. Моделирование экспериментов с применением ЭВМ имеет ряд преимуществ перед постановкой реальных экспериментов: число таких модельных экспериментов может быть неизмеримо больше; истинные значения параметров и истинное распределение экспериментальной ошибки известны. Эти авторы показали, что оценки, полученные методом наименьших квадратов, лучше медианных оценок, найденных из опытов, в которых выполнялись все допущения, принимаемые в методе наименьших квадратов. Подобный результат можно было, конечно, предвидеть, однако различие оказалось на удивление маленьким, а приблизительно в 40% общего числа опытов медианные оценки были ближе к истинным значениям. В то же время в экспериментах, где допущения, используемые в методе наименьших квадратов, не выполнялись (например, когда данные содержали выбросы, когда схема определения весов измерений была неверна или когда ошибки содержались не только в v , но и в s), небольшое преимущество метода наименьших квадратов исчезало. Корниш-Боуден и Эйзенталь пришли к заключению, что если исходить из разумных допущений об экспериментальной ошибке, то никаких оснований отдавать предпочтение методу наименьших квадратов не остается.

Прямой линейный график позволяет также довольно легко определить совместные границы доверительного интервала для K_M и V . Уже простое рассмотрение характера разброса точек пересечения дает ясное качественное представление о том, какова точность определения параметров. Более точный результат получается, если учесть тот факт, что каждая область на графике, ограниченная прямыми, соответствует различному порядку изменения знака отклонений (рис. 10.4), поскольку каждая прямая представляет собой границу между совокупностью пар значений (K_M, V) , для которых соответствующее отклонение положительно, и совокупностью пар значений (K_M, V) , для которых отклонение отрицательно. Так как согласно основному допущению непараметрической статистики все изменения знаков для настоящих ошибок *a priori* равновероятны, найти совместные границы дове-

рительной области для K_M и V не составляет труда, как это показано на рис.10.4.

Если подсчитывать общее число положительных знаков, то можно получить не ограниченные с концов доверительные области, которые, хотя и соответствуют строгому подходу, весьма неудобны, поскольку не позволяют исключить некоторые заведомо ошибоч-

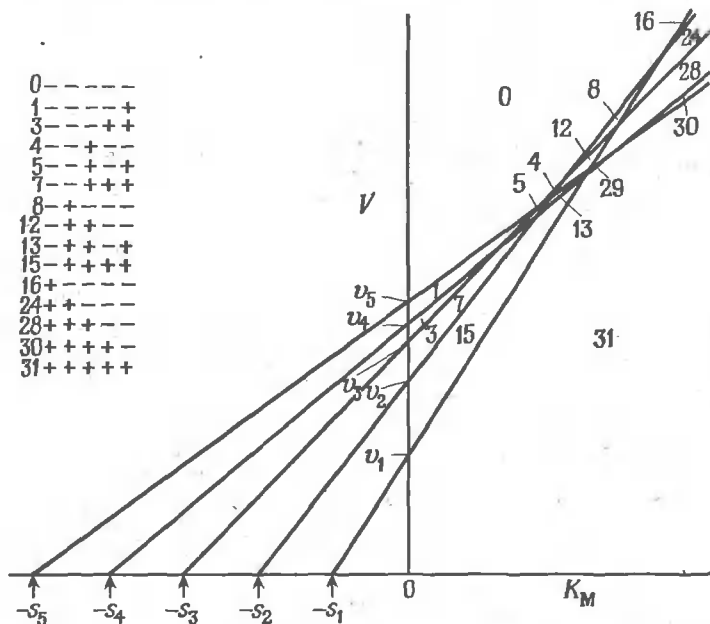


Рис. 10.4. Изменения знаков отклонений.

На графике представлены те же данные, что и на рис. 10.3, однако с новой разметкой, показывающей, что каждая область, ограниченная прямыми, характеризуется различным порядком изменения знака отклонений. Например, если первое отклонение отрицательно, а следующие четыре — положительны, то значения K_M и V должны лежать в области с номером 15. Обозначения построены по следующему принципу: каждый знак «минус» рассматривают как ноль в двоичной системе, а каждый знак «плюс» — как единицу; тогда получают число в двоичной системе, которое преобразуют затем в соответствующее число в десятичной системе (например, 0 1111 в 15). Таблица подобных преобразований представлена на рисунке. Некоторые в принципе допустимые области, например область 2 (с порядком изменения знаков — — — + —), на графике отсутствуют, потому что они соответствуют таким порядкам изменения знаков отклонений, которые в данном случае невозможны (хотя в принципе отрицать их существование нельзя).

ные оценки параметров. Это объясняется тем, что через совокупность экспериментальных точек можно провести такую кривую, которая заведомо является неверной, хотя половина точек располагается по одну сторону от нее, и половина — по другую.

Более приемлемые границы доверительной области получают, отыскивая такие оценки K_M и V , для которых наилучшим обра-

зом выполняется условие чередования положительных и отрицательных ошибок. Иными словами, ищут такую последовательность, в которой знак меняется максимальное число раз. В приложении к прямому линейному графику такой подход означает, что большее значение придается небольшим замкнутым областям вблизи медианных оценок, а не бесконечно протяженным областям по краям графика. Если принять за доверительную область неправильный многоугольник, образованный комбинацией всех замкнутых областей, то окажется, что фактический уровень надежности оценки параметров зависит от числа наблюдений, как это показано в табл. 10.2. Если число измерений больше 12, можно найти меньшую по размерам 95 (или более высокую)-процентную доверительную область. Более подробно сущность этого метода изложена в работе Корниш-Боудена и Эйзенталя [37]. Следует подчеркнуть, что для большинства задач достаточен, по-видимому, качественный анализ графика.

Таблица 10.2

ВЕРОЯТНОСТЬ (В %) ТОГО, ЧТО В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ n ЗНАКОВ, РАСПОЛОЖЕННЫХ СЛУЧАЙНЫМ ОБРАЗОМ, ЗНАК МЕНЯЕТСЯ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ m РАЗ

(Область с $m > 3$ можно найти из прямого линейного графика, если принять во внимание все полностью замкнутые области, ограниченные прямыми. Область с $m > 4$ легко находится из разметки на графике, представленном на рис. 10.4)

n	$m > 3$	$m > 4$
3	25,0	0,0
4	50,0	12,5
5	68,8	31,3
6	81,3	50,0
7	89,1	65,6
8	93,8	77,3
9	96,5	85,5
10	98,0	91,0
11	98,9	94,5
12	99,41	96,7
13	99,68	98,1
14	99,83	98,9
15	99,91	99,35

Основные достоинства метода определения \hat{K}_M и \hat{V} с помощью прямого линейного графика состоят в его простоте, нечувствительности к отдельным плохо выполненным измерениям, а также в том, что он не требует точного знания относительной ошибки каждого измерения. К сожалению, использовать этот метод для описания экспериментальных данных более сложными уравне-

ниями, зависящими от трех или большего числа параметров, не удастся, так как сложность расчетов при увеличении числа параметров и числа наблюдений очень быстро возрастает. Эти трудности можно обойти, используя подход, основанный на применении вторичных графиков и рассмотренный в первых главах книги при изложении обычных приемов построения графиков. Например, при анализе данных по двухсубстратной реакции можно использовать прямой линейный график как первичный для определения $\hat{K}_{M, \text{каж}}$, $\hat{V}_{\text{каж}}$ и $\hat{V}_{\text{каж}}/\hat{K}_{M, \text{каж}}$ при различных фиксированных концентрациях второго субстрата. Используя то благоприятное обстоятельство, что выражения для $V_{\text{каж}}$ и $V_{\text{каж}}/K_{M, \text{каж}}$ часто совпадают по форме с уравнением Михаэлиса—Ментен [например, в соответствии с уравнением (5.6) $V_{\text{каж}} = Vb/(K_M^B + b)$], можно затем построить вторичные графики (в рассматриваемом случае — график зависимости V от K_M^B с отсекаемыми на осях V и K_M^B отрезками, равными $V_{\text{каж}}$ и $-b$ соответственно) и рассчитать с их помощью значения четырех параметров.

10.10. Заключительные замечания

Настоящая глава представляет собой нечто среднее между очень поверхностным рассмотрением вопросов математической статистики, какое обычно можно найти в книгах по биохимии (иногда оно и вовсе отсутствует), и полноценной книгой по статистике, которую стоило бы написать. Пришлось отказаться от изложения многих вводных сведений из области статистики, полезных для понимания практических сторон использования метода регрессионного анализа. Об этом приходится особенно сожалеть, поскольку хороших книг по математической статистике, написанных на должном уровне, явно не хватает: преобладают книги, либо написанные хотя и строго, но в значительной степени малопонятно, либо дающие описание метода аппроксимации экспериментальных данных прямой лишь в последней короткой главе в конце изложения правил по применению t -тестов, F -тестов и тому подобных критериев классической статистики. К счастью, имеется одна книга — «Лекции по биостатистике» [32], — которая объединяет в себе такие качества, как удобство для чтения, трезвость суждений (автор прямо пишет о том, как мало мы обычно знаем о выполнимости используемых нами допущений) и должное внимание к реальным задачам, т.е. качества, которых, к сожалению, обычно недостает большинству других учебников по математической статистике.

Список литературы

(В конце каждой ссылки указаны разделы книги, в которых цитируется соответствующая работа)

1. *Adair G. S.* (1925), *J. biol. Chem.*, **63**, 529—545 [7.4].
2. *Adair G. S.* (1925), *Proc. Roy. Soc., Ser. A*, **109**, 292—300 [7.4].
3. *Alberty R. A.* (1953), *J. Amer. chem. Soc.*, **75**, 1928—1932 [5.4].
4. *Alberty R. A.* (1958), *J. Amer. chem. Soc.*, **80**, 1777—1782 [5.4].
5. *Alberty R. A., Koerber B. M.* (1957), *J. Amer. chem. Soc.*, **79**, 6379—6382 [8.6].
6. *Alberty R. A., Massey V., Frieden C., Fuhlbrigge A. R.* (1954), *J. Amer. chem. Soc.*, **76**, 2485—2493 [5.8].
7. *Arrhenius S.* (1889), *Z. physik. Chem.*, **4**, 226—248 [1.6].
8. *Barden R. E., Fung C.-H., Utter M. F., Scrutton M. C.* (1972), *J. biol. Chem.*, **247**, 1323—1333 [5.2].
9. *Bender M. L., Begué-Cantón M. L., Blakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Gunter C. R., Kézdy F. J., Killheffer J. V., Jr., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. K.* (1966), *J. Amer. chem. Soc.*, **88**, 5890—5913 [9.3].
10. *Bender M. L., Kézdy F. J., Gunter C. R.* (1964), *J. Amer. chem. Soc.*, **86**, 3714—3721 [6.8].
11. *Blangy D., Buc H., Monod J.* (1968), *J. Mol. Biol.*, **31**, 13—35 [7.7].
12. *Bloomfield V., Peller L., Alberty R. A.* (1962), *J. Amer. chem. Soc.*, **84**, 4367—4374 [5.4].
13. *Bock R. M., Alberty R. A.* (1953), *J. Amer. chem. Soc.*, **75**, 1921—1925 [2.6].
14. *Bodenstein M.* (1913), *Z. physik. Chem.*, **85**, 329—397 [2.4].
15. *Bohr C.* (1903), *Zentralbl. Physiol.*, **17**, 682—688 [7.2].
16. *Botts J., Morales M.* (1953), *Trans. Faraday Soc.*, **49**, 696—707 [3.4, 3.7, 4.1, 4.7].
17. *Boyer P. D.* (1959), *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 387—410 [5.9].
18. *Briggs G. E., Haldane J. B. S.* (1925), *Biochem. J.*, **19**, 338—339 [2.3, 2.4].
19. *Britton H. G.* (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 167—183 [5.10].
20. *Britton H. G.* (1973), *Biochem. J.*, **133**, 255—261 [5.10].
21. *Britton H. G., Clarke J. B.* (1968), *Biochem. J.*, **110**, 161—179 [5.10].
22. *Brown A. J.* (1892), *J. chem. Soc. (Trans.)*, **61**, 369—385 [2.1].
23. *Brown A. J.* (1902), *J. chem. Soc. (Trans.)*, **81**, 373—388 [2.1].
24. *Buchner E.* (1897), *Ber. dt. chem. Ges.*, **30**, 117—124 [2.1].
25. *Burke J. J., Hammes G. G., Lewis T. B.* (1965), *J. chem. Phys.*, **42**, 3520—3525 [9.6].
26. *Cedar H., Schwartz J. H.* (1969), *J. biol. Chem.*, **244**, 4122—4127 [5.9].
27. *Cha S.* (1968), *J. biol. Chem.*, **243**, 820—825 [3.6].
28. *Chance B.* (1943), *J. biol. Chem.*, **151**, 553—557 [2.3].
29. *Chance* (1963), in: *Technique of Organic Chemistry*, 2nd edn., *Friess S. L., Lewis E. S., Weissberger A.* (Editors), vol. 8, Part 2, Interscience, New York, pp. 1314—1360 [5.4].
30. *Cleland W. W.* (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104—137 [5.3, 5.4].
31. *Cleland W. W.* (1967), *Advan. Enzymol.*, **29**, 1—32 [10.5].

32. Colquhoun D. (1971), Lectures in Biostatistics, Clarendon Press, Oxford [10.6, 10.10].
33. Conway A., Koshland D. E., Jr. (1968), Biochemistry, 7, 4011—4023 [7.8].
34. Cornish-Bowden A. J. (1972), Biochem. J., 130, 637—639 [8.7].
35. Cornish-Bowden A. (1974), Biochem. J., 137, 143—144 [4.5].
36. Cornish-Bowden A. (1975), Biochem. J., 149, 304—312 [8.5].
37. Cornish-Bowden A., Eisinger R. (1974), Biochem. J., 139, 721—730 [10.9].
38. Cornish-Bowden A., Koshland D. E., Jr. (1970), J. biol. Chem., 245, 6241—6250 [7.9].
39. Cornish-Bowden A. J., Koshland D. E., Jr. (1971), J. biol. Chem., 246, 3092—3102 [7.9].
40. Dalziel K. (1957), Acta Chem. Scand., 11, 1706—1723 [5.4].
41. Dalziel K. (1962), Nature, Lond, 196, 1203—1205 [2.3].
42. De Miguel Merino F. (1974), Biochem. J., 143, 93—95 [приложение к разд. 2.1].
43. Dixon H. B. F. (1973), Biochem. J., 131, 149—154 [6.2].
44. Dixon M. (1953), Biochem. J., 55, 170—171 [4.5].
45. Doudoroff M., Barker H. A., Hassid W. Z. (1947), J. biol. Chem., 168, 725—732 [5.2, 5.9].
46. Draper N. R., Smith H. (1966), Applied Regression Analysis, Wiley, New York [10.7, 10.8].
47. Eadie G. S. (1942), J. biol. Chem., 146, 85—93 [2.5].
48. Eigen M. (1954), Discuss. Faraday Soc., 17, 194—205 [9.5].
49. Eigen M., Hammes G. G. (1963), Advan. Enzymol., 25, 1—38 [2.3].
50. Eisinger R., Cornish-Bowden A. (1974), Biochem. J., 139, 715—720 [2.5, 10.9].
51. Ellis W. D., Dunford H. B. (1968), Biochemistry, 7, 2054—2062 [9.4].
52. Von Euler H., Josephson K. (1924), Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 136, 30—44 [2.6].
53. Eyring H. (1935), J. chem. Phys., 3, 107—115 [1.7].
54. Ferdinand W. (1966), Biochem. J., 98, 278—283 [7.11].
55. Fischer E. (1894), Ber. dt. chem. Ges., 27, 2985—2993 [7.6].
56. Frieden C. (1967), J. biol. Chem., 242, 4045—4052 [7.10].
57. Frieden C., Colman R. F. (1967), J. biol. Chem., 242, 1705—1715 [7.10].
58. Fromm H. J. (1970), Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 692—697 [3.4].
59. Ghosh N. K., Fishman W. H. (1966), J. biol. Chem., 241, 2516—2522 [4.4].
60. Guggenheim E. A. (1926), Phil. Mag., Ser. VII, 2, 538—543 [1.5].
61. Gulbinsky J. S., Cleland W. W. (1968), Biochemistry, 7, 566—575 [3.6, 5.2, 7.11].
62. Gutfreund H. (1955), Discuss. Faraday Soc., 20, 167—173 [9.2].
63. Haber J. E., Koshland D. E., Jr. (1967), Proc. natn. Acad. Sci. U. S., 58, 2087—2093 [7.8].
64. Haldane J. B. S. (1930), Enzymes, Longmans Green, London [2.6, 5.2, 6.4].
65. Hammes G. G. (1968), Advan. Protein Chem., 23, 1—57 [9.5].
66. Hammes G. G., Fasella P. (1962), J. Amer. chem. Soc., 84, 4644—4650 [9.5].
67. Hammes G. G., Fasella P. (1963), J. Amer. chem. Soc., 85, 3929—3932 [9.5].
68. Hammes G. G., Pace C. N. (1968), J. phys. Chem., 72, 227—2230 [9.6].
69. Hammes G. G., Schimmel P. R. (1970), in: The Enzymes, 3rd edn, Boyer P. (Editor), vol. 2, Academic Press, New York, pp. 67—114 [9.5].
70. Hanes C. S. (1932), Biochem. J., 26, 1406—1421 [2.5].
71. Harcourt A. V. (1867), J. chem. Soc., 20, 460—492 [1.6].
72. Hartley B. S., Kolby B. A. (1954), Biochem. J., 56, 288—297 [9.3].
73. Henri V. (1902), C. r. hebdom. Acad. Sci., Paris, 135, 916—919 [2.1].
74. Henri V. (1903), Lois Générales de l'Action des Diastases, Hermann, Paris [2.1].
75. Hill A. V. (1910), J. Physiol., 40, iv—vii [7.2, 7.3].
76. Hitchcock D. I. (1926), J. Amer. chem. Soc., 48, 2870 [2.2].

77. Hofstee B. H. J. (1952), *J. biol. Chem.*, **199**, 375—364 [2.5].
78. Hofstee B. H. J. (1959), *Nature, Lond*, **184**, 1296—1298 (с дополнительными комментариями М. Dixon и Е. С. Webb) [2.5].
79. Hsu R. Y., Cleland W. W., Anderson L. (1966), *Biochemistry*, **5**, 799—807 [5.7].
80. Huang H. T., Niemann C. (1951), *J. Amer. chem. Soc.*, **73**, 1541—1548 [8.3].
81. Hunter A., Downs C. E. (1945), *J. biol. Chem.*, **157**, 427—446 [4.3, 4.4].
82. Hwang J. C., Chen C. H., Burris R. H. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 256—270 [10.6].
83. Ingles D. W., Knowles J. R., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 369—377 [4.8, 6.8].
84. International Union of Biochemistry (1961), Report of the Commission on Enzymes, Pergamon Press, Oxford [5.4].
85. Jennings R. R., Niemann C. (1955), *J. Amer. chem. Soc.*, **77**, 5432—5433 [8.3].
86. Johannes G., Lumry R. (1961), *C. r. trav. Lab. Carlsberg*, **32**, 185—214 [2.5, 10.4].
87. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. G., Davies D. R., Phillips D. C., Shore V. C. (1960), *Nature, Lond*, **185**, 422—427 [7.2].
88. Kézdy F. J., Jaz J., Bruylants A. (1958), *Bull. Soc. chem. Belg*, **67**, 687—706 [1.5].
89. King E. L., Altman C. (1956), *J. phys. Chem.*, **60**, 1375—1378 [3.1—3.7, 6.4].
90. Kirtley M. E., Koshland D. E., Jr. (1967), *J. biol. Chem.*, **242**, 4192—4205 [7.8].
91. Knowles J. R., (1965), *Biochem. J.*, **95**, 180—190 [8.6].
92. Knowles J. R., Sharp H., Greenwell P. (1969), *Biochem. J.*, **113**, 343—351 [2.3].
93. Koshland D. E., Jr. (1954), in: *A Symposium of the Mechanism of Enzyme Action*, McElroy W. D., Glass B. (Editors), Johns Hopkins Press, Baltimore, pp. 608—641 [5.2].
94. Koshland D. E., Jr. (1955), *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 142—148 [5.9].
95. Koshland D. E., Jr. (1958), *Proc. natn. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 98—99 [5.2, 7.6].
96. Koshland D. E., Jr. (1959), in: *The Enzymes*, 2nd edn, Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. (Editors), vol. 1, Academic Press, New York, pp. 305—346 [5.2, 7.6].
97. Koshland D. E., Jr. (1959), *J. cell. comp. Physiol.*, **54**, suppl., 245—258 [5.2, 7.6].
98. Koshland D. E., Jr., Némethy C., Filmer D. (1966), *Biochemistry*, **5**, 365—385 [7.8].
99. Koshland D. E., Jr., Strumeyer D. H., Ray W. J., Jr. (1962), *Brookhaven Symp. Biol.*, **15**, 101—133 [9.3].
100. Laidler K. J. (1955), *Can. J. Chem.*, **33**, 1614—1624 [2.4].
101. Laidler K. J. (1965), *Chemical Kinetics*, 2nd edn, McGraw Hill, New York, Ch. 3 [1.7].
102. Langmuir I. (1916), *J. Amer. chem. Soc.*, **38**, 2221—2295 [2.2].
103. Langmuir I. (1918), *J. Amer. chem. Soc.*, **40**, 1361—1403 [2.2, 2.5].
104. Levitzki A., Koshland D. E., Jr. (1969), *Proc. natn. Acad. Sci. U. S.*, **62**, 1121—1128 [7.9].
105. Levitzki A., Stallcup W. B., Koshland D. E., Jr. (1971), *Biochemistry*, **10**, 3371—3378 [7.9].
106. Lineveaver H., Burk D. (1934), *J. Amer. chem. Soc.*, **56**, 658—666 [2.2, 2.5].
107. MacQuarrie R. A., Bernhard S. A. (1971), *J. mol. Biol.*, **55**, 181—192 [7.9].
108. Mahler H. R., Cordes E. H. (1966), *Biological Chemistry*, Harper and Row, New York, pp. 219—277 [5.4].
109. Martin R. G. (1963), *J. biol. Chem.*, **238**, 257—268 [7.7].

110. *Mason S. J.* (1953), *Proc. Inst. Radio Engrs*, **41**, 1144—1156 [3.4].
111. *Mason S. J.* (1956), *Proc. Inst. Radio Engrs*, **44**, 920—926 [3.4].
112. *Michaelis L.* (1926), *Hydrogen Ion Concentration*, translated from 2nd German edn (1921), by W. A. Perlzweig W. A., Bailliere, Tindall and Cox, London, vol. 1 [6.2].
113. *Michaelis L., Menten M. L.* (1913), *Biochem. Z.*, **49**, 333—369 [2.2, 2.5, 8.1].
114. *Michaelis L., Pechstein H.* (1914), *Biochem. Z.*, **60**, 79—90 [2.7].
115. *Monod J., Changeux J.-P., Jacob F.* (1963), *J. mol. Biol.*, **6**, 306—329 [7.7].
116. *Monod J., Wyman J., Changeux J.-P.* (1965), *J. mol. Biol.*, **12**, 88—118 [3.8, 7.2, 7.7].
117. *Myers D. K.* (1952), *Biochem. J.*, **51**, 303—311 [4.10].
118. *Nelson J. M., Anderson R. S.* (1926), *J. biol. Chem.*, **69**, 443—448 [4.3].
119. *Newsholme E. A., Gevers W.* (1967), *Vitam. Horm.*, **25**, 1—87 [7.11].
120. *Nichol L. W., Jackson W. J. H., Winzor D. J.* (1967), *Biochemistry*, **6**, 2449—2456 [7.10].
121. *Northrop D. B.* (1969), *J. biol. Chem.*, **244**, 5808—5819 [5.2].
122. *O'Sullivan C., Tompson F. W.* (1890), *J. chem. Soc. (Trans.)*, **57**, 834—931 [2.1].
123. *Ouellet L., Stewart J. A.* (1959), *Can. J. Chem.*, **37**, 737—743 [9.3].
124. *Pauling L.* (1935), *Proc. natn. Acad. Sci. U. S.*, **21**, 186—191 [7.5].
125. *Perutz M. F., Rossmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T.* (1960), *Nature, Lond.*, **185**, 416—422 [7.2, 7.5].
126. *Rabin B. R.* (1967), *Biochem. J.*, **102**, 22c—23c [7.11].
127. *Ray W. J., Jr., Roscelli G. A.* (1964), *J. biol. Chem.*, **239**, 3935—3941 [5.10].
128. *Reich J. G.* (1970), *FEBS Letters*, **9**, 245—251 [10.1].
129. *Schönheyder F.* (1952), *Biochem. J.*, **50**, 378—384 [8.3].
130. *Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L.* (1961), *J. biol. Chem.*, **236**, 2930—2935 [9.3].
131. *Schwert G. W.* (1969), *J. biol. Chem.*, **244**, 1278—1284 [8.6].
132. *Segal H. L., Kachmar J. F., Boyer P. D.* (1952), *Enzymologia*, **15**, 187—198 [5.4].
133. *Seydoux F., Malhotra O. P., Bernhard S. A.* (1974), *Crit. Rev. Biochem.*, **2**, 227—257 [7.9].
134. *Sørensen S. P. L.* (1909), *C. r. trav. Lab. Carlsberg*, **8**, 1—168 (на французском; немецкий вариант см. *Biochem. Z.*, **21**, 131—304) [2.2, 6.1].
135. *Srere P. A.* (1968), in: *The Metabolic Roles of Citrate*, Goodwin T. W. (Editor), Academic Press, London, pp. 11—21 [4.10].
136. *Stallcup W. B., Koshland D. E., Jr.* (1973), *J. mol. Biol.*, **80**, 77—91 [7.9].
137. *Straus O. H., Goldstein A.* (1943), *J. gen. Physiol.*, **26**, 559—585 [4.10].
138. *Swann W. H.* (1969), *FEBS Lett.*, **2**, suppl., 39—55 [10.7].
139. *Sweeny J. R., Fisher J. R.* (1968), *Biochemistry*, **7**, 561—565 [7.11].
140. *Swinbourne E. S.* (1960), *J. chem. Soc.*, 2371—2372 [1.5].
141. *Taketa K., Pogell B. M.* (1965), *J. biol. Chem.*, **240**, 651—662 [7.3].
142. *Theorell H., Chance B.* (1951), *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1127—1144 [5.2].
143. *Van Slyke D. D., Cullen G. E.* (1914), *J. biol. Chem.*, **19**, 141—180 [2.2, 2.4].
144. *Van't Hoff J. H.* (1884), *Études de Dynamique Chimique*, Muller, Amsterdam, pp. 114—118 [1.6].
145. *Viale R. O.* (1970), *J. theor. Biol.*, **27**, 377—385 [2.1].
146. *Volkenstein M. V., Goldstein B. N.* (1966), *Biophys. Acta*, **115**, 471—477 [3.4—3.5].
147. *Walker A. C., Schmidt C. L. A.* (1944), *Arch. Biochem.*, **5**, 445—467 [8.2].
148. *Wharton C. W., Cornish-Bowden A., Brocklehurst K., Crook E. M.* (1974), *Biochem. J.*, **141**, 365—381 [10.7].
149. *Wilkinson G. N.* (1961), *Biochem. J.*, **80**, 324—332 [2.5, 10.4].

-
150. Wong J. T.-F., Hanes C. S. (1962), Can J. Biochem. Physiol., 40, 763—804 [5.2].
 151. Woolf B. (1929), Biochem. J., 23, 472—482 [5.2].
 152. Woolf B. (1931), Biochem. J., 25, 342—348 [5.2].
 153. Woolf B. (1932), цит. по Hardane J. B. S., Stern K. G., in: Allgemeine Chemie der Enzyme, Steinkopff, Dresden und Leipzig, pp. 119—120 [2.5].
 154. Wratten C. C., Cleland W. W. (1965), Biochemistry, 4, 2442—2451 [4.7].
 155. Wurtz A. (1880), C. r. hebd. Acad. Sci., Paris, 91, 787—791 [2.1].

Предметный указатель

- Адсорбция газов 36
Активации энергия 25—26
— — свободная 27—30
Активация 79, 92—94
Активированный комплекс 27
Активный центр 36
Алкогольдегидрогеназа 94, 109, 137—138
Алlostерическая модель 179
Алlostерические эффекты 94, 165, 179, 184, 191—194
Анализ данных 232—266
Анализ размерностей констант скорости 18—19
Аргиназа 81
Аргинин, протонированная форма 144
Аррениуса график 25—26, 28—29
— уравнение 157—158
Аспарагин-синтетаза 138
Аспартат, депротонированное состояние 143
«Атака с тыла» 110—111
Ацилфермента образование 159
- «Бесполезный цикл» 163
Бимолекулярная реакция 15, 16, 21—22
— — теория скорости 27—29
Бимолекулярное нуклеофильное замещение 110
Биотинзависимые ферменты 104, 108
Боттса и Моралеса схема 79, 82—83, 92—94
Брожение 31—32
Буферы 34
Быстрые реакции 213—231
- Вант-Гоффа уравнение 25, 157
«Варьируемый» член в уравнении скорости 131—132
Вероятность правильной ориентации 27, 161
— протекания реакции 27, 29—30
Взаимодействия субъединиц 186—191
Внеклеточные гидролитические ферменты 95
Внутреннее нуклеофильное замещение 110
Возмущения синусоидального типа 227—231
- Вода, влияние температуры на ионизацию 159
Временной ход реакции 40—43, 198—212
Время полупревращения 24
— релаксации 213
«Всё или ничего», принцип 221
Вторичный график 120—121, 123, 266
Второстепенные пути реакции, обнаружение 134—137
Вульфа графики 47
«Выбросы», влияние на оценку 261
Высокое сродство ингибиторов 99—101
- Гексокиназа 178
Гем-гемовые взаимодействия 176—177
Гемоглобин 165—168, 170—172, 191, 195
— расположение субъединиц 175—177
«Геометрия взаимодействия» субъединиц 186
Гетеротропные эффекты 183, 191—193
Гидролитические реакции 102
Гипербола, асимптоты 38, 43
— параметры 121
— свойства 54, 55
Гиперболическое ингибирование и активация 93—94, 143, 256
Гистидин-аммиак-лиаза 200
Гистидин, ионизация 144
Гликолиз 162—163
Глидериальдегид-3-фосфатдегидрогеназа 191
Глутамат, депротонированное состояние 143
Глутаматдегидрогеназа 195
Глутамино-аспартикотрансминаза 227
Глюконеогенез 162—163, 197
Гомеоморфизм 33
Гомоскедастичные ошибки 248
Гомотропные эффекты 183
График зависимости $1/v$ от i 86, 87
— — $1/v$ от $1/s$ 45—47, 200, 232, 250—251
— — s/v от i 87

- — s/v от s 45—47, 85, 200, 202, 203, 207
- — — — в многосубстратных реакциях 120, 125
- — — — определение веса 246, 251
- — — — парабола 98—99
- — v от lgs 43
- — v от s 37—38, 43
- — v от v/s 46—48, 200
- Графики разброса экспериментальных точек 248
- Графические методы 23—27, 43—49, 84—89, 118—128, 201—207
- — пределы применения 232—233
- Гуттенгейма график 24

- Двойные обратные координаты, график 46—47, 232, 244, 250—251
- Двухосновные кислоты, ионизация 143—148, 154
- Двухсубстратные-двухпродуктные реакции, обзор механизмов 103—112
- Двухтактное замещение 110—111
- Дегидрогеназы 107
- Денатурация при высоких температурах 156—159
- Диксона график 86—87
- Дисперсия 234—239, 251—253
- обратной величины 238
- отношения 238
- произведения 238
- суммы 237
- Диссоциирующий белок, модель 195
- Доверительный интервал \hat{V} и \hat{K}_M 252, 263—265.
- Дудорова — Баркера — Хессиды механизм 108, 118

- Изомеризация, влияние на уравнения связывания 173
- промежуточных соединений 61, 74, 129—130, 214
- свободного фермента 138
- «Изо»-механизмы 113
- Изотопные эффекты 134
- Изотопный обмен 134—141
- — чистота препаратов 137
- Имидазольная группа ионизация 144
- Инвертаза 31—35, 53—54, 81
- Ингибирование 33, 39, 53—54, 78—101, 124—128, 130—134, 138, 139, 163—164
- бесконкурентное 78, 90—91
- — в мультисубстратных реакциях 131—132
- — связь с субстратным ингибированием 98
- графики 84—89
- качественный подход 89—91
- конечным продуктом цепи 164
- конкурентное 33, 39, 78, 80—81, 90
- — в многосубстратных реакциях 131—133
- — неадекватность для контроля метаболизма 164
- — продуктом 201—204
- линейное 84
- — качественный подход 89—91
- неконкурентное 81—83
- — как синоним смешанного ингибирования 83
- — чистое 78, 83, 101, 143
- обратимое 78, 99
- полное 84
- продуктом 34, 53—54, 82, 85
- — влияние на кинетические кривые 201—207
- — в многосубстратных реакциях 130—134
- — — однопродуктных реакциях 138—139
- — при метаболическом контроле 164—165
- — связь со схемой Боттса — Моралеса 79
- протонами 81
- смешанное 79, 81—83
- — в многосубстратных реакциях 131
- — предельные случаи 83
- субстратное 97—99, 108, 124—128
- — частичное 93
- Ингибирования константа 39, 80
- — определение 85—89, 201—204
- «области» 100
- Ингибиторы необратимые 78, 99
- Индукцированное соответствие, теория 83—84, 106, 177—179
- Индукцированный перенос 138—141
- Ионизация воды, влияние температуры 159
- двухосновной кислоты 143—148, 154
- групп, удаленных от активного центра 153—154
- Ионы тяжелых металлов 78, 81
- Истинные K -системы 185, 193

- Истощение запасов субстрата, влияние на кинетические кривые 201
- Кажущиеся величины кинетических констант в мультисубстратных реакциях 118—119, 122—123, 130—131
- — — при активации 93
 - — — при ингибировании 80—83, 85, 92—93
- Каталаза 117—118
- Каталитическая константа 37
- «Квадратная» модель 176, 188
- Кинга—Альмана метод 56—77, 103—104, 151
- — алгебраическая альтернатива 68
 - — анализ по внешнему виду графов 72—76
 - — представление графов в компактной форме 68—80
 - — эффект равновесных стадий 70—71
- Кинетика при возмущении равновесия 224—227
- Кинетическая кривая 19, 42—43, 198—212
- «Кислотность» 31
- Ключа и замка модель 177—178
- Коварияция 237
- Колоколообразные рН-зависимости 146—148, 151, 155—156
- Комиссия по ферментам (при Международном биохимическом союзе) 114
- Комплексообразующие агенты 78
- Конкурентные субстраты 67
- Константа интегрирования 16
- ионизации группы 146
 - $k_{кат}$ 37
 - — зависимость от температуры 160
 - K_m 37—39
 - — влияние рН 148—151, 155—156
 - — в мультисубстратных реакциях 118—119
 - — в обратной реакции 49—52
 - — графики 43—49
 - — графическое определение 200
 - — корреляция с V 252
 - — независимость от рН 151—153
 - — оценка 244—250, 261—265
 - — связь с K_s 38—39
 - — смысл 89
 - — стандартная ошибка 251—253
 - — температурная зависимость 158
 - — точность определения 86
 - K_i 39, 80—82
 - — определение 84—89
 - K_s 34—35, 52
 - — связь с K_m 38—39
 - K_w , температурная зависимость 159
 - равновесия, связь с кинетическими константами 52, 128—129
- Константы скорости, определение 22—25
- Контроль метаболических процессов 94, 162—165
- ферментативной активности 162—197
- Конформационная гибкость 178
- Конформационные изменения, скорость 230—231
- Кооперативность 164
- модель 165—197
 - — кинетическая 196—197
 - — общая 187
 - модифицированная аллостерическими эффектами 184, 193
 - отрицательная 171, 174—175, 185, 191, 194
 - — невозможность появления в симметричной модели 182—183
 - — показатель 170
- «Координата» реакции 27—28
- Корреляция между наблюдениями, влияние на оценку 210—212
- Кристаллизация и чистота 95
- Лаг-период 217—219
- Лайнуисера—Бэрка график 46—47
- Лизин, протонированное состояние 144
- Линейная модель 243—244, 253—256
- Линейная регрессия 239—244
- Максимальная скорость (V) 37—38
- — влияние рН 148—151, 155—156
 - — в мультисубстратных реакциях 114, 119
 - — обратимых реакциях 50—51
 - — графики 43—49
 - — корреляция с K_m 252
 - — определение из кинетических кривых 199—203
 - — оценка 244—250, 260—266

- — смысл 89—90
- — стандартная ошибка 251—253
- — температурная зависимость 158—159
- Матрица обратная 255
- Медиана 261, 263
- Метилмалонил-КоА-карбоксилтрансфераза 104
- Метод быстрого смешивания 213, 227
- Механизм с замещением фермента 84, 104, 107—108, 110, 159
 - — — вторичный график 119—123
 - — — изотопный обмен 137
 - — — ингибирование субстратом 124, 126
 - — — определение кинетических констант 116
 - — — первичный график 120—124
 - — — уравнение скорости 117, 122—123
 - — — — — характер 75—76
- Механизм с неупорядоченным присоединением субстрата 104—105
 - — — и с образованием тройного комплекса 105
 - — — — — изотопный обмен 138
 - — — — — ингибирование субстратом 125
 - — — — — кооперативность 196
 - — — — — уравнение скорости 115, 122
 - — — — — вывод 68—70
- Механизм с образованием тройного комплекса 104—106, 109, 112, 120
 - — — — — вторичный график 120—122
 - — — — — обнаружение второстепенных путей реакции 131—137
 - — — — — субстратное ингибирование 124—125
- Механизмы с согласованно протекающими стадиями 108—110
 - — — упорядоченным присоединением субстратов 106—108
 - — — ферментативных реакций, классификация 112—113
- Микроскопические константы связывания 171
- Миоглобин 165, 167—168
- Михаэлиса константа 37
- Михаэлиса — Ментен механизм, переходный участок 40—43, 216—217
 - — — уравнение 35, 37—40
 - — — асимптоты 54—55
 - — — гиперболический характер 54—55
 - — — графики 43—49
 - — — для обратимой реакции 50—52
 - — — — — интегральная форма 208
 - — — — — интегральная форма 199—201
 - — — неприменимость для метаболического контроля 163—164
 - — — описание данных 244—250
 - — — отклонения 98, 197
 - — — применение к мульти-субстратным реакциям 119
- Михаэлиса функция 152
- Модификатор, механизм действия 78—79, 92—94
 - — — уравнение скорости 73
 - — — — — вывод 65
- Молекулярность 15
- Молекулярные константы диссоциации 145—146
- Молярная концентрация фермента, определение 220—221
- Мономолекулярная реакция 15
- Мутаротация, влияние на кинетику действия инвертазы 34
- НАД-зависимые дегидрогеназы 107
- Наименьших квадратов метод 239—244, 260
- Насыщение 38
- Начальная скорость, значение 34
 - — — оценка из кинетической кривой 202—204, 207—208, 210—211
 - — — участок 42
- «Начальный всплеск», кинетика 217—221
- Независимости наблюдений требование 210
- Нелинейная модель 244
- Непараметрические методы 261
- Непродуктивный комплекс 80
- Неупорядоченные механизмы 112—113
- Нормальное распределение 260
- Нормальные уравнения 241
- Нуклеофильное замещение 110

- Обратимые реакции 20—22, 34, 49—53, 128—130
 Обратная реакция 34
 Обращение конфигурации 110
 Общая линейная модель 253—256
 Однопродуктные реакции, проблемы 102, 138
 Однотактное замещение 110
 Ожидаемые значения кинетических параметров 96
 Оптимальные температуры 131, 158
 «Остановленной струи» метод 213
 Относительная ошибка измерения v 245—246
 Отношение V/K_m , влияние pH 148—151, 155—156
 — — графики 43—49
 — — смысл 37, 89—90, 123—124
 — — стандартная ошибка 251—253
 — — температурная зависимость 158—159
 — — точность 86
 Оценка, сравнение с состоятельной оценкой 235
 Очистка ферментов 78
 Ошибка из-за неидентичности образцов 233
 — — округления величин 257—258
- Папаин 32
 Параллельные стадии, добавление кинетических параметров 64—65
 Параметры, зависящие от pH 151
 Пепсин 39, 142
 Первичный график 119, 122—123
 — — влияние субстратного ингибирования 125
 Переноса группы реакции 103—104
 Переходный участок 42, 100, 213—231
 — — сравнение со стационарным участком 213—216
 Пероксидаза 38, 222
 Пинг-понг механизмы 113
 Пируваткарбоксилаза 104
 Поглощение ультразвука 227—231
 Полинга модель кооперативности 175—177
 Полиномы, использование при анализе кинетических кривых 208—211
 Порядок реакции 15—21
 Последовательная модель 186, 187, 194
 Последовательные механизмы 113
 Предсуществующая асимметрия 194
 Принудительный порядок 106
- — в механизмах с образованием тройного комплекса, изотопный обмен 134—137
 — — — — — ингибирование избытком субстрата 124—125
 — — — — — определение кинетических параметров 115—116
 — — — — — уравнение скорости 61—64, 114, 118, 128
 «Простая адсорбция» 36
 Простая ошибка определения v 245
 «Профиль реакции» 28
 Прямой линейный график 48—49, 55, 85—87
 — — — статистические аспекты 260—266
 Псевдохолинэстераза 101
 Пути реакции 102—141
 pH 34
 — — влияние на ферменты 142—156
 — — — — зависимость от температуры 158—159
- Рабина модель кооперативности 196—197
 Равновесность стадий 115—116, 119, 122, 125, 149, 151—152, 155—156
 Разброс в графических методах 47
 Реакции, катализируемые основаниями, температурная зависимость 159
 Реакционная способность половины связывающих центров 194
 Релаксация к равновесию 224—225
 — — стационарному состоянию 226—227
 R («расслабленное») состояние 179
- Сахарозо-глюкозилтрансфераза 107—108
 Сигмоидное связывание 167, 182
 Симметричная модель 179—185, 193, 195
 Систематическое отклонение 234
 Скачок давления 225
 Случайная ошибка, влияние на «подгоняемые» коэффициенты полинома 208
 Смесь белков, уравнение связывания 173—174
 Смещение, поправка 236, 243
 — при оценке 232
 Согласованная модель 193

- Сольватация, скорость 230—231
 Сохранение конфигурации 110
 Специфичность ферментов 159—161, 177
 Стадия реакции, определяющая скорость 17—18, 155—156
 Стандартная ошибка 236, 251—253, 259
 Статистические методы 232—266
 Статистические множители 67, 184, 188
 Стационарное состояние 37—43
 Степень насыщения 166
 Сульфгидрильная группа, ионизация 144
 — — чувствительность к тяжелым металлам 78
 Сумма квадратов 240
 SN_1 -замещение 110
 SN_2 -замещение 110

 Температура 25—30, 156—161
 — оптимум 31, 158
 Температурный скачок 224—225, 227
 Теорелла—Чанса механизм 109, 117, 132
 Тепловая денатурация 156—159
 Термолекулярная реакция 15
 «Тетраэдрическая» модель 175—176, 187, 190—191
 Титрование ферментов 220—221
 — — кривая, связь с уравнением Михаэлиса—Ментен 44
 Трансаминаза 107—108
 Тримолекулярные реакции 15, 18
 «Тушиковые реакции» 74—75, 80, 83—84, 126, 132, 149
 Т («напряженное») состояние 179

 Унимолекулярная реакция 15
 Уонга—Хейнса схема 104, 107
 Упорядоченные механизмы 112—113
 Уравнение скорости в форме, содержащей коэффициенты 63—64, 76—77
 — — вывод 56—77
 — — для двухсубстратных реакций 114—118
 — — интегральная форма 198—199
 — — «постоянный» член 131—132
 Уреаза 35

 Фермент-продуктный комплекс 33
 Фермент-субстратный комплекс 31—33
 Фицин 217
 Фосфоглюкомутаза 138—141
 Фосфорибозил-АТФ-пирофосфорилаза 179
 Фосфатаза картофеля 130
 Фруктофруктокиназа 163, 185, 197
 Фруктозодифосфатаза 162—163, 197
 Фумараза 52, 133, 208

 Хантера—Даунса график 88—89
 Хилла график 169
 — коэффициент 170, 172
 — уравнение 168—170, 172
 Химическая кинетика, принципы 15—30
 Химотрипсин 96, 107, 159—161, 217, 221
 Холдейна соотношение 52, 128—129
 Хофсти график 46

 Цикличность в метаболических реакциях 197
 Цистеин, ионизация 144

 Частота столкновений 26
 Четвертичная структура 186
 Число оборотов 37

 Щелочная фосфатаза 84

 Эдера уравнение 170—175
 — — связь с последовательной моделью 189, 192
 — — связь с симметричной моделью 182
 Эди—Хофсти график 46
 Экспериментальная дисперсия 242
 Экспоненциальные функции, неоднозначная трактовка результатов 215
 Элементарная стадия 17
 Энтальпия активации 27—30, 160
 — денатурация 156—157
 Энтропия активации 27—30, 160
 — денатурация 157
 Эффективность статистических оценок 261
 Эффектор 95
 «Эффекты соседней группы» 110

 Яды 78

Оглавление

Предисловие переводчика	5
Предисловие к английскому изданию	9
От автора	11
Глава 1. Основные принципы химической кинетики	15
1.1. Порядок реакции	15
1.2. Определение порядка реакции	18
1.3. Размерности констант скорости	19
1.4. Обратимые реакции	20
1.5. Определение констант скорости первого порядка	22
1.6. Влияние температуры на константы скорости	25
1.7. Теория переходного состояния	27
Глава 2. Введение в ферментативную кинетику	31
2.1. Ранние исследования	31
2.2. Работа Михаэлиса и Ментен	34
2.3. Принцип стационарности	36
2.4. Справедливость допущения о стационарном протекании реакции	40
2.5. Графическое представление уравнения Михаэлиса—Ментен	43
2.6. Механизм Михаэлиса—Ментен для обратимой ферментативной реакции	49
2.7. Ингибирование продуктом	53
Приложение. Гиперболический характер уравнения Михаэлиса—Ментен	54
Глава 3. Как выводить уравнения стационарной скорости	56
3.1. Введение	56
3.2. Принцип метода Кинга—Альтмана	56
3.3. Метод Кинга—Альтмана	61
3.4. Варианты метода Кинга—Альтмана	64
3.5. Представление графов в более компактной форме	68
3.6. Реакций, имеющие равновесные стадии	70
3.7. Анализ механизмов по внешнему виду графа	72
3.8. Представление уравнений скорости в форме, содержащей коэффициенты	76
Глава 4. Ингибиторы и активаторы	78
4.1. Обратимые и необратимые ингибиторы	78
4.2. Конкурентное ингибирование	80
4.3. Смешанное ингибирование	81
4.4. Бесконкурентное ингибирование	83
4.5. Графическое представление результатов ингибирования	84
4.6. Качественный подход к линейному ингибированию	89

4.7. Гиперболическое ингибирование и активация	92
4.8. Непродуктивное связывание	95
4.9. Субстратное ингибирование	97
4.10. Ингибиторы, обладающие высоким сродством	99
Глава 5. Типы механизмов ферментативного катализа	102
5.1. Введение	102
5.2. Обзор двухсубстратных-двухпродуктных механизмов	103
5.3. Классификация механизмов ферментативных реакций и схематическое их представление	112
5.4. Уравнения скорости	114
5.5. Измерение начальной скорости в отсутствие продуктов реакции	118
5.6. Ингибирование избытком субстрата	124
5.7. Обратимая реакция	128
5.8. Ингибирование продуктом реакции	130
5.9. Изотонный обмен	134
5.10. Индуцированный перенос	138
Глава 6. Влияние pH и температуры на ферменты	142
6.1. pH и ферментативная кинетика	142
6.2. Ионизация двухосновной кислоты	143
6.3. Влияние pH на константы скорости ферментативной реакции	148
6.4. Независимость K_m от pH	151
6.5. Ионизация групп, удаленных от активного центра	152
6.6. Смена одной лимитирующей стадии другой при варьировании pH	155
6.7. Температурная зависимость ферментативных реакций	155
6.8. Использование температурного фактора для изучения специфичности фермента	159
Глава 7. Контроль ферментативной активности	162
7.1. Необходимость контроля метаболических процессов	162
7.2. Связывание кислорода гемоглобином	165
7.3. Уравнение Хилла	168
7.4. Уравнение Эдера	170
7.5. Подход Полинга	175
7.6. Индуцированное соответствие	177
7.7. Симметричная модель Моно, Уаймена и Шанжэ	179
7.8. Последовательная модель Кошланда, Немети и Филмера	186
7.9. Реакционная способность половины связывающих центров	194
7.10. Другие равновесные модели кооперативности	194
7.11. Кинетические модели кооперативности	196
Глава 8. Анализ кинетических кривых	198
8.1. Уравнение скорости в интегральной форме	198
8.2. Интегральная форма уравнения Михаэлиса—Ментен	199
8.3. Конкурентное ингибирование продуктом реакции	201
8.4. Ингибирование несколькими продуктами	204
8.5. Смешанное ингибирование продуктами	205
8.6. Более сложные случаи	207
8.7. Некоторые предостережения	209
Глава 9. Быстрые реакции	213
9.1. Ограничения метода измерения стационарных скоростей	213
9.2. Переходный период для механизма Михаэлиса—Ментен	216

9.3. «Начальный всплеск»	217
9.4. Последовательности обратимых реакций.	221
9.5. Кинетика при возмущении равновесия	224
9.6. Возмущения синусоидального типа	227
Глава 10. Расчет констант скорости	232
10.1. Достоинства статистического подхода и пределы его применения	232
10.2. Дисперсия	234
10.3. Простая линейная регрессия	239
10.4. Описание данных при помощи уравнения Михаэлиса—Ментен	244
10.5. Заключительные замечания об использовании графика двойных обратных координат	250
10.6. Стандартные ошибки величин \hat{V} и \hat{K}_M	251
10.7. Общая линейная модель и ее приложения к более сложным случаям	253
10.8. Некоторые трудности, возникающие при описании экспериментальных данных расчетными кривыми	256
10.9. Статистические аспекты использования прямого линейного графика	260
10.10. Заключительные замечания	266
Список литературы	267
Предметный указатель	272

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

СПИСОК ОПЕЧАТОК

Страница	Строка	Напечатано	Следует читать
99	24 св.	$E+I \overset{K_1}{\rightleftharpoons} EI$	$E+I \overset{K_2}{\rightleftharpoons} EI$
117	8 св.	brg	brq
251	7 св.	\hat{K}_M	\hat{K}_M
264	1 св.	K_M	\mathcal{K}_M
264	1 св.	V	\mathcal{V}
264	1 св.	K_M	\mathcal{K}_M
264	1 св.	V	\mathcal{V}
264	Подпись под рис. 10.4, 4 св.	K_M	\mathcal{K}
264	Подпись под рис. 10.4, 4 св.	V	\mathcal{V}
277	9 св.	Фосфотаза	Фосфатаза
277	21 св.	Фосфотаза	Фосфатаза

2 р. 10 к.

Э.КОРНИШ-БОУДЕН

ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ

