



УДК 577.15.024

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В АДсорбЦИОННЫХ
ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМАХ

I. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ *

*Курганов В. И., Лобода Н. И.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

Показано, что в адсорбционных ферментных системах, включающих находящиеся в подвижном равновесии свободную и адсорбированные формы фермента, зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата или «адсорбционного» эффектора обнаруживают отклонения от простых кинетических закономерностей типа уравнения Михаэлиса — Ментен (в простейших случаях положительная или отрицательная кинетическая кооперативность). Подобные кинетические аномалии наблюдаются в тех случаях, когда адсорбция фермента приводит к изменению каталитических свойств и когда положение равновесия между свободной и адсорбированными формами фермента зависит от присутствия низкомолекулярных лигандов (субстратов, коферментов и различных клеточных метаболитов). Обсуждается важность процессов адсорбции — десорбции ферментов для регуляции их активности.

В последнее время широко обсуждаются вопросы, связанные с локализацией отдельных ферментов и ферментных систем в клетке. Становится очевидным, что особенности субклеточной архитектуры должны определенным образом влиять на регуляцию клеточного метаболизма и что изучение ферментов без учета их взаимодействия с различными субклеточными структурами не может дать полного представления о возможных механизмах регуляции [1, 2]. Установлено, что некоторые ферменты могут быть локализованы в цитоплазме или матриксе митохондрий, т. е. находятся в относительно свободном состоянии, другие же связаны с мембранами. Выделение мембранно-связанных ферментов невозможно без нарушения целостности всей субклеточной структуры (в качестве примера укажем на ацетилхолинэстеразу, АТФ-азу, ферменты дефосфорилирования).

Следует, однако, учитывать наличие в клетке ферментов, находящихся в адсорбированном состоянии на мембране и других субклеточных структурах. В таких случаях устанавливается, по-видимому, равновесие типа свободный фермент \rightleftharpoons связанный фермент. Предполагается, например, что митохондрия содержит широкий набор ферментов с разной степенью сроства к мембране [3].

Целесообразно обсудить локализацию гликолитических ферментов в клетке. В течение многих лет процессы гликолиза, происходящие в клетке, описывали как реакции, протекающие в гомогенном растворе, так как

* Работа доложена на Всесоюзной конференции «Математическая теория биологических процессов» (27 июня — 4 июля 1976 г., Калининград).

было установлено, что ферменты гликолиза после разрушения клеток обнаруживаются в клеточной цитоплазме. В последнее время появились, однако, работы, в которых было показано, что в нативной клетке гликолитические ферменты могут быть ассоциированы с субклеточными структурами [4—16] (см. таблицу).

В работах Арнольда и Петте [17, 18], Кларка и Мастерса [11] было установлено, что многие ферменты гликолиза (альдолаза, пируваткиназа, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, фосфофруктокиназа, лактатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, гексокиназа, фосфоглицераткиназа, триозофосфатизомераза, енолаза, фосфоглицератмутаза) обратимо связываются со структурными белками мышц, причем свободная и адсорбированная формы различаются по сродству к низкомолекулярным лигандам. Например, субстрат (фруктозо-1,6-дифосфат), ингибиторы (неорганический фосфат, АТФ, АДФ) и продукт реакции (диоксиацетонфосфат) вызывают десорбцию альдолазы с F-актина, причем действие этих метаболитов специфично.

Относительно гексокиназы известно, что она связывается на особых, по-видимому специфических, участках наружной мембраны митохондрий, причем этот процесс определяется физиологическим состоянием клетки и концентрациями определенных метаболитов [14, 15]. Регуляция активности гексокиназы *in vivo* может быть связана со смещением равновесия между растворимой и более активной адсорбированной формами фермента. Это равновесие и в конечном счете внутриклеточная активность гексокиназы изменяются в зависимости от уровня содержания АТФ, глюкозо-6-фосфата, неорганического фосфата (и, возможно, других метаболитов), которые в свою очередь меняются с изменением скорости гликолиза в клетке [19].

Кант и Штек [20] изучили влияние различных метаболитов на адсорбцию глицеральдегидфосфатдегидрогеназы на мембранах эритроцитов. Было показано, что субстрат (глицеральдегид-3-фосфат) не влияет на адсорбцию фермента; АТФ и 2,3-дифосфоглицерат десорбируют в заметной степени фермент с мембран эритроцитов. NAD и NADH также вызывают десорбцию фермента, причем зависимость степени десорбции от концентрации метаболитов имеет гиперболический характер. В случае десорбции глицеральдегидфосфатдегидрогеназы под действием NADP или NADPH эта зависимость становится S-образной.

Особенности кинетического поведения систем, включающих две формы фермента (свободную и связанную), находящиеся в равновесии, практически не изучены. Однако совершенно ясно, что смещение равновесия между различающимися по активности свободной и связанной формами фермента является одним из факторов, ответственных за регуляцию активности фермента в клетке. Поэтому такие системы («адсорбционные ферментные системы»), на наш взгляд, представляют большой интерес с точки зрения участия их в регуляции процессов метаболизма.

Адсорбционный тип регуляции активности ферментов

В основе нового типа регуляции активности ферментов, который мы называем адсорбционным типом регуляции, лежит смещение равновесия между свободной и адсорбированной формами фермента под действием клеточных метаболитов. Адсорбционный тип регуляции активности ферментов выполняется в том случае, когда реализуются следующие три условия:

- 1) фермент обратимо адсорбируется на подложке (это могут быть клеточные структуры или искусственные подложки, если речь идет о модельных системах);

- 2) адсорбция фермента сопровождается изменением каталитических свойств фермента;

Влияние метаболитов на адсорбцию ферментов структурными белками мышц, клеточными мембранами и митохондриями

Фермент, источник	Адсорбент	Изменение каталитических свойств фермента при адсорбции	Влияние метаболитов на адсорбцию			Литература
			Метаболит	Роль метаболита в ферментативном процессе	Роль метаболита в процессе адсорбции	
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 4.2.1.12) из мышц кролика	Мембраны эритроцитов человека		Глицеральдегид-3-фосфат 2,3-Дифосфоглицерат NAD, NADH 2,3-Дифосфоглицерат	Субстрат	Вызывает десорбцию фермента То же	[6]
	То же	Уменьшение активности То же	NAD, NADH	»	Коферменты	» »
из мембран эритроцитов человека из ретикулоцитов кролика	Мембраны ретикулоцитов кролика		NADP, NADPH AMP, ADP, ATP	Субстрат	» » »	[9]
	из мышц кролика	»	Глицеральдегид-3-фосфат 2,3-Дифосфоглицерат	»	»	[10]
Альдолаза (КФ 4.1.2.13) изофермент А, из мышц кролика	Микросомальные мембраны мозга крыс	»	Фруктозо-1,6-дифосфат Неорг. фосфат, AMP, ATP, ADP	» Ингибиторы	» »	[11]
	из мышц овцы	»	Фруктозо-1,6-дифосфат	Субстрат	Способствует адсорбции фермента Вызывает десорбцию	[12]
из скелетных мышц кролика	F-Актин, комлекс	Увеличение активности	ATP	Ингибитор	»	[13, 15, 16]
	F-актин — тропомиозин — тропонин F-Актин из скелетных мышц кролика	То же	Фруктозо-1,6-дифосфат Дноксацетонфосфат Неорг. фосфат ATP, ADP	Субстрат Продукт Ингибитор Ингибиторы	» » » »	[14]
Гексокиназа (КФ 2.7.1.1) из мозга крысы	Митохондрии мозга крысы	То же	Глюкозо-6-фосфат	Продукт (ингибитор) Субстрат	» »	[13, 15, 16]
	из асцитной опухолы Саркома 37	»	ATP ATP Глюкозо-6-фосфат	» Продукт (ингибитор)	» »	[15, 16]

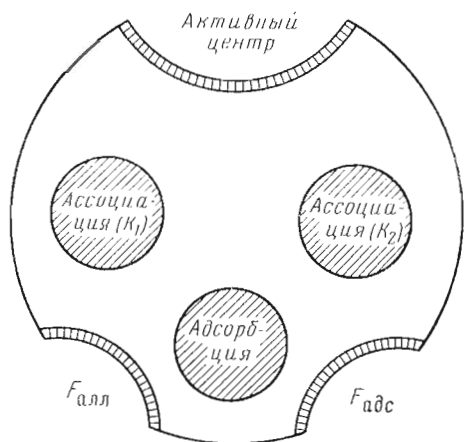


Рис. 1. Возможный набор связывающих центров в молекуле фермента. $F_{алл}$ — аллостерический эффектор, $F_{адс}$ — «адсорбционный эффектор»

Как можно представить себе влияние низкомолекулярных лигандов на положение равновесия между свободной и адсорбированной формами фермента? Допустим, что связывание фермента с подложкой обеспечивается наличием в молекуле фермента особого адсорбционного центра, пространственно удаленного от активного центра (рис. 1) (здесь уместно упомянуть о гипотезе Брокергоффа [21], согласно которой адсорбция фосфолипазы на «суперсубстрате» происходит по особому, пространственно обособленному центру в молекуле фермента). В определенных случаях можно допустить, что адсорбция фермента на подложке происходит только после присоединения к «адсорбционному» центру низкомолекулярного лиганда — «адсорбционного кофактора» (возможно, подобная ситуация реализуется в случае гексокиназы [22]).

Наряду с активным и адсорбционным центрами и центрами связывания аллостерических эффекторов молекула фермента может содержать центры ассоциации, насыщение которых происходит с участием идентичных молекул фермента в растворе с константой ассоциации K_1 и в адсорбционном слое с константой K_2 (причем $K_1 \gg K_2$). Ассоциация по центрам с низким значением константы ассоциации K_2 происходит благодаря концентрированию фермента в адсорбционном слое. Возможность подобной ассоциации белковых молекул в адсорбционном слое следует из данных, полученных в работах О. М. Полторака с сотр. [23—25].

Вещества, блокирующие адсорбционный центр, будут, очевидно, вызывать десорбцию фермента с подложки. Будем называть подобные вещества адсорбционными эффекторами. В общем случае центр связывания «адсорбционного эффектора» не совпадает с адсорбционным центром, однако, как и в случае явления аллостерической регуляции, возможно не прямое взаимодействие адсорбционного центра и центра связывания «адсорбционного эффектора», опосредованное конформационными изменениями молекулы фермента. Важно подчеркнуть, что, по определению, «адсорбционный эффектор» не влияет непосредственно на каталитическую эффективность активного центра в молекуле фермента. Однако, вызывая смещение равновесия между свободной и адсорбированной формами фермента, «адсорбционный эффектор» приводит к изменению активности фермента в полной адсорбционной системе (если эти формы фермента различаются по активности). На рис. 1 схематически показан возможный набор связывающих центров в молекуле фермента (или, точнее, в субъединице, если фермент обладает субъединичной структурой).

3) свободная и адсорбированная формы фермента различаются по сродству к низкомолекулярным лигандам (субстратам, коферментам, аллостерическим эффекторам и т. д.).

Изменение активности фермента при адсорбции может быть вызвано: а) стерическим экранированием активных центров при адсорбции; б) изменением конформации белковой молекулы при адсорбции (или преимущественной адсорбцией одной из конформаций растворимой формы фермента); в) изменением микроокружения фермента при адсорбции (концентрации водородных ионов и субстратов могут различаться в поверхностном слое и растворе вследствие взаимодействия их с подложкой).

Конформационная подвижность белковой молекулы определяет возможность взаимодействия и других пространственно обособленных центров. Это означает, что связывание субстрата в активном центре может привести к изменению прочности связывания фермента и к изменению сродства фермента к адсорбционному эффектору. С другой стороны, связывание адсорбционного эффектора может повлиять на каталитические характеристики активного центра фермента, на способность фермента к самоассоциации и на связывание аллостерического эффектора. Наконец, положение равновесия между свободной и связанной формами может зависеть от присутствия аллостерического эффектора.

В адсорбционных ферментных системах можно ожидать появления таких же кинетических аномалий, какие наблюдаются для аллостерических ферментных систем и которые важны для выполнения ими регуляторных функций: положительная или отрицательная кинетическая кооперативность, обнаруживаемая при варьировании концентрации субстрата или аллостерического эффектора; активация малыми концентрациями аналога субстрата; нарушения стационарного протекания ферментативного процесса (отклонения от линейного характера накопления продукта ферментативной реакции во времени — лаг-период или начальный всплеск на кинетических кривых); эффекты синергизма или антагонизма в совместном действии эффекторов.

Однако в адсорбционных ферментных системах возможны новые эффекты, которые не могут возникать в простых аллостерических системах и которые также могут приводить к аномальной кинетике. К таким эффектам относятся: кооперативная адсорбция фермента в результате взаимодействия связывающих центров подложки; специфическое воздействие метаболитов на подложку, сопровождающееся в конечном счете изменением степени адсорбции фермента и/или его каталитических свойств в адсорбированном состоянии; эффекты, связанные с диффузией субстрата к активным центрам адсорбированного фермента; воздействие адсорбента на субстрат ферментативной реакции (отталкивание или притяжение) и т. д.

Важно подчеркнуть, что адсорбционный тип регуляции активности ферментов может наблюдаться и для аллостерических ферментов и поэтому в определенных случаях возможно «наложение» адсорбционного и аллостерического типов регуляции.

Для демонстрации возможности появления регуляторных эффектов в системах, содержащих свободную и связанную формы фермента, обсудим ряд моделей адсорбционных ферментных систем.

Модели адсорбционных ферментных систем

Модель I: обратимая адсорбция фермента, содержащего один активный центр в молекуле. Рассмотрим стационарно протекающий ферментативный процесс в адсорбционной ферментной системе, включающей фермент E с одним активным центром в молекуле (модель I на рис. 2). Обозначим через \bar{K}_0 константу равновесия между свободной и связанной формами фермента:

$$\bar{K}_0 = \frac{[ЦЕ]}{[Ц][E]}, \quad (1)$$

[E] — концентрация свободного фермента, [Ц] — концентрация свободных связывающих центров на подложке, [ЦЕ] — концентрация адсорбированных молекул фермента.

Допустим, что адсорбированный фермент не способен связывать субстрат S (например, вследствие стерических ограничений) и что адсорбционное равновесие и равновесие $E + S \rightleftharpoons ES$ устанавливаются мгновенно. В таком случае выражение для зависимости стационарной скорости фер-

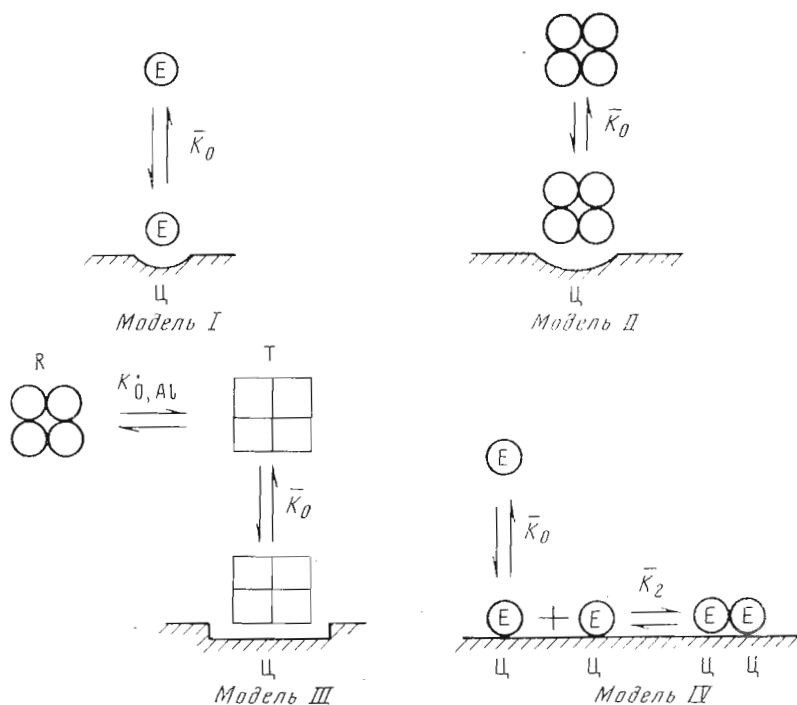


Рис. 2. Модели адсорбционных ферментных систем

ментативной реакции v от концентрации субстрата примет следующий вид:

$$v = k_2 [E]_0 \frac{[S]_0 / K_s}{1 + [S]_0 / K_s} \cdot \left\{ \frac{(\bar{K} [E]_0 - \bar{K} [\zeta]_0 - 1) + \sqrt{(\bar{K} [E]_0 - \bar{K} [\zeta]_0 - 1)^2 + 4\bar{K} [E]_0}}{2\bar{K} [E]_0} \right\}, \quad (2)$$

где K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, k_2 — каталитическая константа для свободного фермента, $[E]_0$ — общая молярная концентрация фермента, $[\zeta]_0$ — общая молярная концентрация связывающих центров на подложке. Величина \bar{K} в выражении (2) представляет собой кажущуюся константу равновесия между свободной и связанной формами фермента в присутствии субстрата:

$$\bar{K} = \frac{([\zeta E] + [\zeta ES])}{[\zeta]([E] + [ES])} = \bar{K}_0 \frac{1}{(1 + [S]_0 / K_s)}, \quad (3)$$

а величина, заключенная в фигурные скобки, — долю фермента в свободном состоянии в условиях стационарного протекания ферментативной реакции.

Проведенный нами анализ показал, что зависимость v от $[S]_0$ в обсуждаемой модельной системе обнаруживает отклонения от гиперболического уравнения Михаэлиса — Ментен. Выход на предельное значение при относительно больших концентрациях субстрата более пологий, чем для обычной гиперболической кривой. Подобный тип отклонения обычно называют отрицательной кинетической кооперативностью (коэффициент Хилла меньше 1). В качестве примера на рис. 3, а представлена рассчитанная при помощи уравнений (2) и (3) зависимость относительной скорости ферментативной реакции v/V ($V = k_2 [E]_0$) от безразмерной концентрации субстрата $[S]_0 / K_s$ при $\bar{K}_0 [E]_0 = \bar{K}_0 [\zeta]_0 = 100$. Оказалось, что эта зависимость может быть удовлетворительно описана уравнением

Хилла:

$$v = V \frac{([S]_0/[S]_{0,5})^{n_H}}{1 + ([S]_0/[S]_{0,5})^{n_H}} \quad (4)$$

(n_H — коэффициент Хилла, $[S]_{0,5}$ — концентрация полунасыщения, т. е. концентрация субстрата, при которой $v = V/2$) со значением $n_H = 0,7$. Это видно из рис. 3, б, на котором дана линейная анаморфоза теоретической кривой зависимости v от $[S]_0$ в координатах $\{V/v; (K_s/[S]_0)^{n_H}\}$. Появление отрицательной кинетической кооперативности вызывает десорбция фермента с подложки под действием субстрата (рис. 3, в). В отсутствие субстрата доля свободного фермента составляет $9,512 \cdot 10^{-2}$. С увеличением концентрации субстрата доля свободного фермента растет, приближаясь к единице при $[S]_0/K_s \rightarrow \infty$. Оптимальные условия появления отрицательной кинетической кооперативности таковы: $\bar{K}_0 [E]_0 \gg 1$, $\bar{K}_0 [Ц]_0 \gg 1$, $\bar{K}_0 [E]_0/\bar{K}_0 [Ц]_0 \approx 1$, а также отсутствие сродства к субстрату у адсорбированной формы фермента.

В рассматриваемой адсорбционной ферментной системе «адсорбционные эффекторы», вызывающие смещение равновесия между свободной и связанной формами фермента, регулируют ферментативную активность, даже если они не оказывают прямого воздействия на активность свободной или связанной формы фермента. Например, адсорбционный эффектор F, связывающийся только свободной формой фермента, является активатором. Кажущаяся константа равновесия между свободной и связанной формами фермента приобретает в этом случае следующий вид:

$$\bar{K} = \bar{K}_0 \frac{1}{(1 + [S]_0/K_s)(1 + [F]_0/K_f)} \quad (5)$$

где K_f — константа диссоциации комплекса свободной формы фермента с эффектором. Проведенный нами анализ показал, что десорбция фермента под действием эффектора может вызвать отрицательную кинетическую кооперативность по эффектору. Этому благоприятствует малая концентрация субстрата, а также следующие условия: $\bar{K}_0 [E]_0 \gg 1$, $\bar{K}_0 [Ц]_0 \gg 1$ и $\bar{K}_0 [E]_0/\bar{K}_0 [Ц]_0 \approx 1$. В качестве иллюстрации на рис. 4, а представлены рассчитанные при помощи уравнений (2) и (5) теоретические зависимости относительной скорости ферментативной реакции v/v_0 (v_0 — скорость ферментативной реакции в отсутствие эффектора) от безразмерной концентрации эффектора $[F]_0/K_f$ при $\bar{K}_0 [E]_0 = 10^4$, $\bar{K}_0 [Ц]_0 = 10^4$ и различных значениях безразмерной концентрации субстрата. Для анализа формы этих кривых может быть использовано уравнение Хилла в виде

$$(v - v_0) = (v_{np} - v_0) \frac{([F]_0/[F]_{0,5})^{n_H}}{1 + ([F]_0/[F]_{0,5})^{n_H}} \quad (6)$$

где v_{np} — предельное значение v при $[F]_0 \rightarrow \infty$; $[F]_{0,5}$ — концентрация полунасыщения, т. е. концентрации эффектора, при которой $(v - v_0) = (v_{np} - v_0)/2$. На рис. 4, б дана линейная анаморфоза кривой зависимости v от $[F]_0$ при $[S]_0/K_s = 10$ в координатах $\{(v_{np} - v_0)/(v - v_0); (K_f/[F]_0)^{n_H}\}$ с $n_H = 0,65$.

Модель II: обратимая адсорбция фермента, содержащего n активных центров в молекуле ($n \geq 2$). Допустим теперь, что молекула фермента содержит n эквивалентных и не взаимодействующих центров, связывающих субстрат (модель II на рис. 2; молекула фермента изображена как тетрамер, $n = 4$). Если адсорбированная форма фермента не способна связывать субстрат, то зависимость кажущейся константы равновесия между свободной и связанной формами фермента выразится уравнением

$$\bar{K} = \bar{K}_0 \frac{1}{(1 + [S]_0/K_s)^n} \quad (7)$$

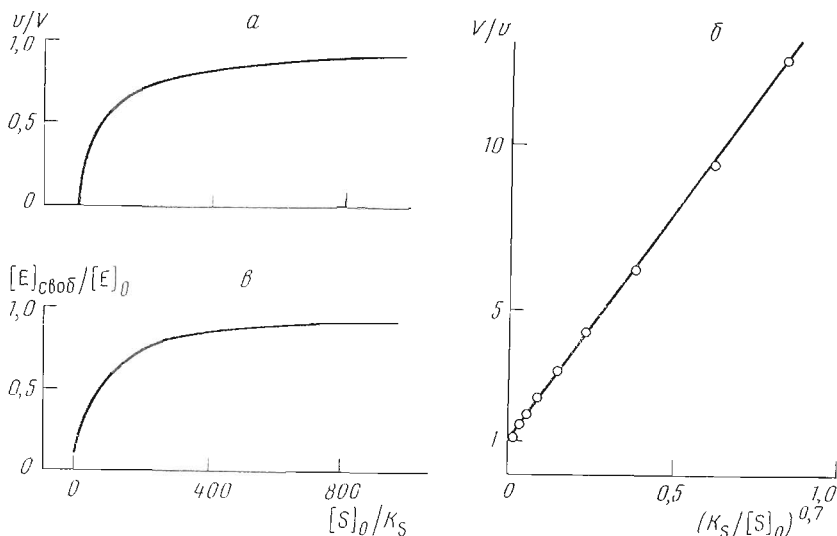


Рис. 3. Отрицательная кинетическая кооперативность по субстрату в адсорбционной модельной системе I (см. текст)

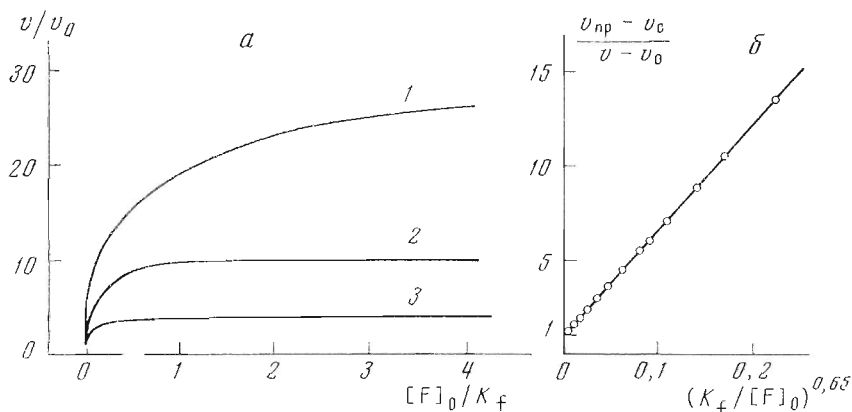


Рис. 4. Отрицательная кинетическая кооперативность по эффектору (активатору) в адсорбционной модельной системе I (см. текст). Значения безразмерной концентрации субстрата $[S]_0/K_s$: 1 — 10, 2 — 100, 3 — 1000

(K_s — микроскопическая константа диссоциации фермент-субстратного комплекса). Зависимость v от $[S]_0$ может быть рассчитана при помощи уравнения (2) с использованием для величины \bar{K} выражения (7). Проведенный нами анализ показал, что в обсуждаемой модельной системе возможно появление S -образных кривых зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата («положительная кинетическая кооперативность», $n_H > 1$). В качестве примера на рис. 5, а представлена S -образная кривая зависимости относительной скорости ферментативной реакции v/V от безразмерной концентрации субстрата $[S]_0/K_s$ при $n = 4$, $\bar{K}_0 [E]_0 = 10$ и $\bar{K}_0 [Ц]_0 = 100$. Коэффициент Хилла для этой кривой превышает 1 и составляет 2,4 (рис. 5, б). Появление положительной кинетической кооперативности по субстрату обусловлено десорбцией фермента под действием субстрата (рис. 5, в). Оптимальные условия появления положительной кинетической кооперативности: $\bar{K}_0 [Ц]_0 \gg 1$, $\bar{K}_0 [E]_0 \ll \bar{K}_0 [Ц]_0$, а также отсутствие средства к субстрату у связанной формы фермента.

Модель III: подложка действует как аллостерический «макроэффектор», избирательно взаимодействующий с одной из конформаций молекулы сво-

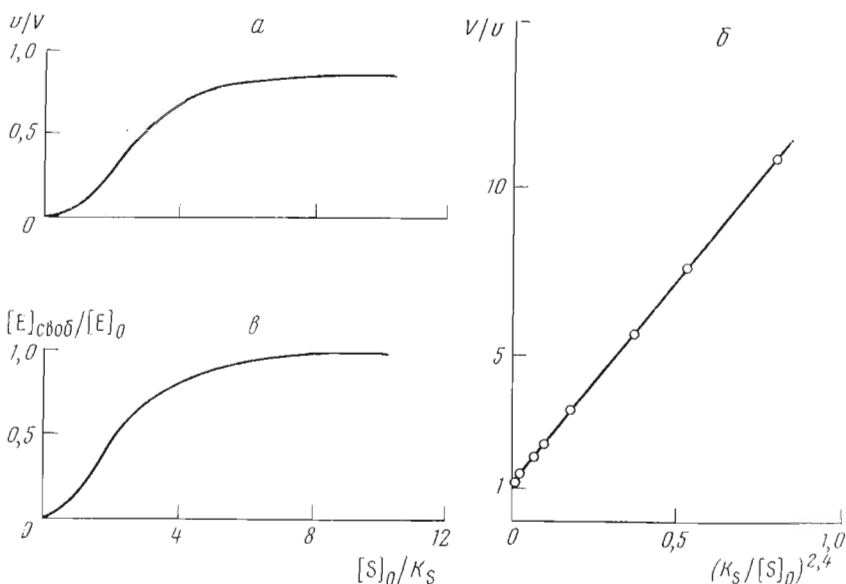


Рис. 5. Положительная кинетическая кооперативность по субстрату в адсорбционной модельной системе II. *a* — рассчитано по уравнениям (2) и (7) (см. текст); *b* — линейная анаморфоза с $n_H = 2,4$; δ — изменение доли свободного фермента с ростом концентрации субстрата

бодного фермента. При анализе кинетического поведения адсорбционных ферментных систем следует учитывать, что подложка может избирательно связывать одну из конформаций аллостерического фермента. Допустим, что аллостерические взаимодействия в молекуле аллостерического фермента опосредуются смещением равновесия между структурно-симметричными состояниями белковой молекулы, R и T (модель Моно, Уаймена и Шанже [26]). Предположим далее, что фермент в состоянии T не связывает субстрат и избирательно адсорбируется на подложке (модель III на рис. 2). Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в этом случае будет иметь следующий вид:

$$v = k_2 [E]_0 \frac{[S]_0/K_{SR}}{1 + [S]_0/K_{SR}} \times \left\{ \frac{K_{AL}(\bar{K}_0[E]_0 - \bar{K}_0[C]_0 - 1) - 1 + \sqrt{[K_{AL}(\bar{K}_0[E]_0 - \bar{K}_0[C]_0 - 1) - 1]^2 + 4\bar{K}_0[E]_0 K_{AL}(1 + K_{AL})}}{2\bar{K}_0[E]_0 K_{AL}(1 + K_{AL})} \right\}, \quad (8)$$

где K_{SR} — микроскопическая константа диссоциации фермент-субстратного комплекса для формы R. Величина K_{AL} в выражении (8) представляет собой кажущуюся аллостерическую константу в присутствии субстрата:

$$K_{AL} = K_{0,AL} \frac{1}{(1 + [S]_0/K_{SR})^n}, \quad (9)$$

где $K_{0,AL}$ — аллостерическая константа ($K_{0,AL} = [T]/[R]$); n — число центров, связывающих субстрат, в молекуле фермента.

В рассмотренной модели подложка, очевидно, выступает в роли аллостерического ингибитора, присутствие которого в системе должно приводить к усилению положительной кинетической кооперативности по субстрату. В качестве примера на рис. 6 представлены рассчитанные при помощи уравнений (8) и (9) зависимости относительной скорости ферментативной реакции v/V от безразмерной концентрации субстрата $[S]_0/K_{SR}$

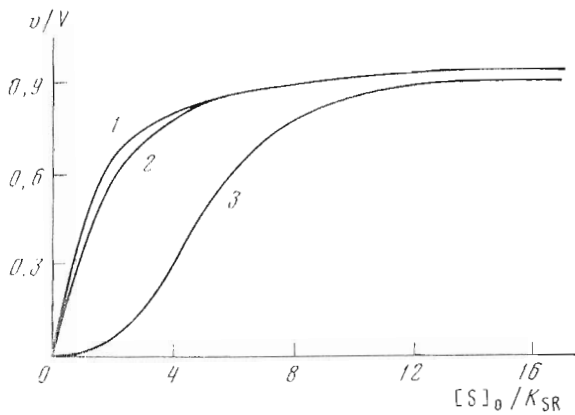


Рис. 6. Положительная кинетическая кооперативность по субстрату в адсорбционной модельной системе III (см. текст). Значения безразмерной концентрации связывающих центров $\bar{K}_0 [\text{Ц}]_0$: 1 — 0, 2 — 10^2 и 3 — 10^4

$/K_{SR}$ при $n = 4$, $\bar{K}_0 [E]_0 = 100$, $K_{0,AL} = 0,1$ и различных значениях безразмерной концентрации связывающих центров на подложке $\bar{K}_0 [\text{Ц}]_0$. При выбранном значении параметра $K_{0,AL}$ зависимость v от $[\text{S}]_0$ не имеет точек перегиба [27, 28]. В то же время при достаточно высоких концентрациях связывающих центров ($\bar{K}_0 [\text{Ц}]_0 = 10^4$) на подложке зависимость v от $[\text{S}]_0$ приобретает отчетливо выраженный S-образный характер (кривая 3 на рис. 6).

Модель IV: обратимая адсорбция фермента, способного ассоциировать на подложке. Обсудим ситуацию, когда фермент в поверхностном слое обнаруживает способность к ассоциации. Для простоты будем полагать, что ассоциация в поверхностном слое описывается равновесием типа мономер \rightleftharpoons димер с константой ассоциации \bar{K}_2 (модель IV на рис. 2):

$$\bar{K}_2 = \frac{[(\text{CE})_2]}{[\text{CE}]^2}. \quad (10)$$

Допустим, что молекула фермента содержит один активный центр и что в адсорбированном состоянии фермент не способен связывать субстрат. Для расчета стационарной скорости реакции может быть использовано выражение

$$v = k_2 [E]_0 \frac{[\text{S}]_0 / K_s}{1 + [\text{S}]_0 / K_s} \gamma, \quad (11)$$

где через γ обозначена доля свободного фермента при стационарном протекании ферментативного процесса. Величина γ может быть рассчитана при помощи соотношения

$$4\alpha\bar{K} [E]_0 \{ \bar{K} [\text{Ц}]_0 - \bar{K} [E]_0 (1 - \gamma) \} \gamma - \sqrt{1 + 8\alpha\bar{K} [E]_0 (1 - \gamma) + 1} = 0, \quad (12)$$

где \bar{K} — кажущаяся константа равновесия между свободной и связанной формами фермента в присутствии субстрата, определяемая по формуле (3), и $\alpha \equiv \bar{K}_2 / \bar{K}_0$.

На рис. 7, а представлены рассчитанные при помощи уравнений (11) и (12) зависимости относительной скорости ферментативной реакции v/V от безразмерной концентрации субстрата $[\text{S}]_0 / K_s$ при $\alpha = 100$, $\bar{K}_0 [\text{Ц}]_0 = 100$ и различных значениях безразмерной концентрации фермента $\bar{K}_0 [E]_0$ (10 и 100). Анализ модельной системы IV показал, что при $\alpha \gg 1$ и $\bar{K}_0 [\text{Ц}]_0 \gg 1$ зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата S-образны ($n_H > 1$), причем степень S-образности растет с увеличением концентрации фермента. При $\alpha = 100$ и $\bar{K}_0 [\text{Ц}]_0 = 100$

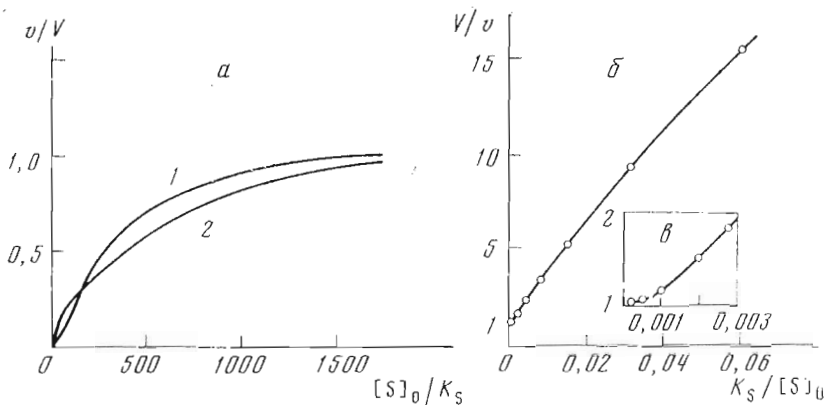


Рис. 7. Форма кривых зависимости v от $[S]_0$ в адсорбционной модельной системе IV; а — рассчитано по уравнениям (11) и (12) для двух значений безразмерной концентрации фермента $\bar{K}_0 [E]_0$: 1 — 10; 2 — 100 (см. текст); б и в — зависимости V/v от $K_S/[S]_0$ при $\alpha = 100$, $\bar{K}_0 [C]_0 = 100$ и $\bar{K}_0 [E]_0 = 100$

S -образность выражена наиболее отчетливо при $\bar{K}_0 [E]_0 = 10$ (кривая 1 на рис. 7, а). При дальнейшем увеличении концентрации фермента степень S -образности кривых зависимости v от $[S]_0$ уменьшается и при достаточно больших значениях $\bar{K}_0 [E]_0$ точка перегиба исчезает (кривая 2 на рис. 7, а; $\bar{K}_0 [E]_0 = 100$). Зависимость v от $[S]_0$ обнаруживает при этом довольно сложный характер отклонения от гиперболической. На рис. 7, б представлена в обратных координатах зависимость v от $[S]_0$, соответствующая выпуклой кривой 2 на рис. 7, а ($\bar{K}_0 [E]_0 = 100$), что позволяет говорить об отрицательной кинетической кооперативности по субстрату. В то же время, как видно из рис. 7, в, в области больших концентраций субстрата кривая зависимости $1/v$ от $1/[S]_0$ вогнута. Эта область концентраций субстрата соответствует положительной кинетической кооперативности*.

Причиной кинетических аномалий в модели IV является десорбция фермента с подложки под действием субстрата. При выбранных значениях параметров ($\alpha = 100$, $\bar{K}_0 [C]_0 = 100$ и $\bar{K}_0 [E]_0 = 10$ и 100) большая часть фермента при отсутствии субстрата в системе находится в адсорбированном состоянии: $\gamma = 2,46 \cdot 10^{-4}$ и $8,38 \cdot 10^{-3}$ при $\bar{K}_0 [E]_0 = 10$ и 100 соответственно, причем преобладает димерная форма (99,90 и 99,29% от всего количества адсорбированного фермента). Увеличение концентрации субстрата в системе вызывает не только десорбцию фермента с поверхности, но и диссоциацию димеров в адсорбционном слое.

Важно подчеркнуть, что, как отмечалось выше (см. модель I), десорбция мономерного фермента с подложки не может привести к появлению положительной кинетической кооперативности. В результате распада димеров на мономеры, который происходит в поверхностном слое при увеличении концентрации субстрата, также не образуется точек перегиба на кривой зависимости v от $[S]_0$ (см. [28]). Однако «наложение» процессов ассоциации-диссоциации и адсорбции-десорбции фермента дает при определенных значениях кинетических параметров отчетливо выраженный

* Заключение о существовании отрицательной и положительной кинетической кооперативности в различных областях концентрации субстрата подтверждается также проведенными нами расчетами переменного показателя степени при концентрации субстрата в уравнении Хилла, q , по методу, предложенному в работах [27, 29]. С ростом величины v/V коэффициент q проходит через минимум ($q_{\text{мин}} = 0,76$ при $v/V = 0,18$), а затем растет и достигает максимального значения ($q_{\text{макс}} = 1,71$ при $v/V = 0,94$).

S-образный характер кривых зависимости v от $[S]_0$. Таким образом, одновременная реализация адсорбционного механизма регуляции ферментативной активности и обычных аллостерических механизмов регуляции (индуцируемые низкомолекулярными лигандами конформационные переходы молекулы фермента [26, 30] или изменение степени диссоциации-ассоциации фермента [28]) может сопровождаться усилением положительной кинетической кооперативности по субстрату. Это особенно важно для ферментов с небольшим числом активных центров в молекуле (например, для ферментов с $n = 2$).

С точки зрения современных представлений появление положительной или отрицательной кинетической кооперативности по субстрату в адсорбционных ферментных системах может иметь большое значение для регуляции скорости метаболических процессов. Отчетливо выраженная положительная кинетическая кооперативность по субстрату для ферментов, занимающих ключевые позиции в клеточном метаболизме и проявляющих относительно низкую ферментативную активность, обеспечивает триггерный механизм включения или выключения определенных биохимических процессов. Отрицательная кинетическая кооперативность, снижающая чувствительность ферментативной активности к изменению концентрации субстрата, важна для ферментов с относительно высокой каталитической активностью, участвующих в стабилизации на определенном уровне соотношения между альтернативными формами коферментов (например, между NAD и NADH).

Авторы благодарны д-рам биол. наук Л. С. Мильману и Э. С. Кагану за ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kun E. (1972) in *Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells* (Kun E., Grisolia S., eds.), pp. 271—303, Acad. Press, New York — London.
2. Green D., Murer E., Hultin H. O., Richardson S. H., Salmon B., Brierley G. P., Baum H. (1965) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **112**, 635—647.
3. Рудин Д. (1971) в сб. *Цитология ферментов* (Покровский А. А., ред.), с. 116—117, «Мир», М.
4. Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г. (1973) *Механизмы энзиматической регуляции углеводного обмена в раннем эмбриогенезе*, с. 73—82, «Наука», М.
5. McDaniel C. F., Kirtley M. E., Tanner M. J. A. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 6478—6485.
6. McDaniel C. F., Kirtley M. E. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **65**, 1196—1200.
7. Shin B. C., Carraway K. L. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1436—1444.
8. Letko G., Bohnensack R. (1975) *Acta biol. med. Germ.*, **34**, 1145—1151.
9. Dagher S. M., Hultin H. O. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **55**, 185—192.
10. Clarke F. M., Masters C. J. (1975) *Int. J. Biochem.*, **6**, 133—145.
11. Clarke F. M., Masters C. J. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **381**, 37—46.
12. Arnold H., Pette D. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **15**, 360—366.
13. Wilson J. E. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **159**, 543—549.
14. Rose J. A., Warms J. V. B. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1635—1645.
15. Wilson J. E. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3640—3647.
16. Hochman M. S., Sactor B. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1546—1553.
17. Arnold H., Henning R., Pette D. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **22**, 121—126.
18. Arnold H., Pette D. (1968) *Eur. J. Biochem.*, **6**, 163—168.
19. Алексахина Н. В., Ситвина М. Ю., Щербатых Л. Н. (1973) *Блехимия*, **38**, 915—921.
20. Kant J. A., Steck T. L. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 8457—8464.
21. Brockerhoff H. (1974) *Bioorg. Chem.*, **3**, 176—183.
22. Wilson J. E. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **154**, 332—340.
23. Полторак О. М. (1967) *Ж. физ. химии*, **41**, 2544—2561.
24. Полторак О. М., Чухрай Е. С., Николаев А. Л. (1974) *Ж. физ. химии*, **48**, 712 — 715.
25. Полторак О. М., Чухрай Е. С. (1970) *Вестник МГУ. Сер. хим.*, № 2, 133—146.
26. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. (1965) *J. Mol. Biol.*, **12**, 88—118.
27. Kurganow B. I. (1973) *Acta biol. med. Germ.*, **31**, 181—201.

28. Курганов Б. И. (1968) Молекулярн. биология, 2, 430—448.
29. Силонова Г. В., Ливанова Н. Б., Курганов Б. И. (1969) Молекулярн. биология, 3, 768—784.
30. Koshland D. E., Jr., Nemethy G., Filmer D. (1966) Biochemistry, 5, 365—385.

Поступила в редакцию
3.III.1977

REGULATION OF ENZYMATIC ACTIVITY IN ADSORPTIVE ENZYME SYSTEM. I. THEORETICAL MODELS

KURGANOV B. I., LOBODA N. I.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

The kinetic behavior of adsorptive enzyme systems in which free and bound enzyme forms are in rapid equilibrium has been analyzed. It is shown that the dependences of enzymic reaction rate on substrate concentration or «adsorptive» effector concentration manifest the deviations from simple kinetic regularities of the Michaelis — Menten type equation (positive or negative kinetic cooperativity). Such kinetic anomalies are observed when adsorption of the enzyme results in alteration of catalytic efficiency and the equilibrium state between free and bound enzyme forms depends on concentration of low molecular weight substances (substrates, coenzymes and various cell metabolites). Physiological significance of adsorption-desorption processes in regulation of enzymatic activity is discussed.
