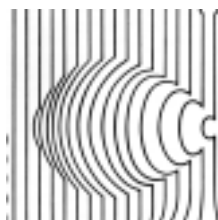


Глава XIV

Механизмы ферментативного катализа



Общая схема ферментативного катализа, предложенного Л. Михаэлисом, состоит, как известно, из следующих стадий: образование фермент-субстратного комплекса ES , превращение субстрата в продукт P , наконец, десорбция продукта с фермента и восстановление последнего в первоначальное состояние E . В гл. I–IV были рассмотрены вопросы кинетики и регуляции ферментативных реакций, протекающих по уравнению



Специфика действия фермента заключается, очевидно, в реакции распада комплекса $(ES) \xrightarrow{k_{+2}} P + E$, т. е. в механизмах процессов, протекающих в активном центре фермента, где происходит трансформация субстрата в продукты реакции. Теория ферментативного катализа в современной биофизике еще не сформирована в окончательном виде. Тем не менее изложенные в предыдущих главах представления о динамической организации белков и электронно-конформационных взаимодействиях находят широкое применение в этой области.

§ 1. Физико-химическое описание и биофизические модели ферментативных процессов

Термодинамика ферментативного катализа. Известно, что ферменты ускоряют реакции, увеличивая их константы скорости. Обычно рассмотрение этого эффекта проводят в рамках теории переходного состояния, или активированного комплекса (рис. XIV.1). Считают, что реагенты, находящиеся исходно в основном состоянии, образуют комплекс, который активируется с образованием переходного состояния. Этому состоянию соответствует максимум на кривой изменения энергии реагентов вдоль координаты реакции. Продукты реакции возникают при движении вдоль координаты реакции из переходного состояния. В теории активированного комплекса предполагают, что существует термодинамическое равновесие между переходным и основным состояниями, которому соответствует константа равновесия, равная отношению концентраций активных комплексов и исходных реагентов. Тогда по разности свободных энергий этих состояний можно найти концентрацию переходного комплекса, а затем скорость реакции путем умножения этой концентрации на константу скорости его распада.

Пусть разность значений полного термодинамического потенциала G (см. гл. V) для переходного и основного состояний равна ΔG^* . Тогда константа скорости

распада переходного комплекса, или константа реакции будет равна

$$k_1 = \kappa \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta G^*/RT), \quad (\text{XIV.1.1})$$

где κ — трансмиссионный коэффициент (~ 1); $k_B T/h = \omega$ определяет частоту тепловых флуктуаций. При $k_B T \simeq 0,025$ эВ ω равна 10^{13} с $^{-1}$, а соответственно время сохранения переходного состояния составляет $\simeq 10^{-13}$ с.

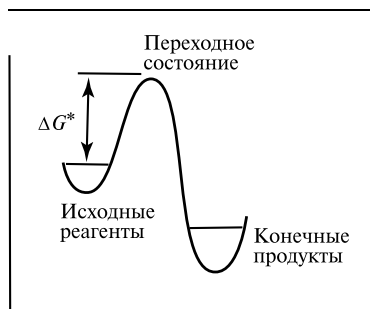


Рис. XIV.1

Изменение энергии реагентов
вдоль координаты реакции

Представляя изменение ΔG^* для образования активного комплекса в виде

$$\Delta G^* = \Delta H^\# - T\Delta S^\#, \quad (\text{XIV.1.2})$$

где $\Delta H^\#$ — энтальпия активации, а $\Delta S^\#$ — энтропия активации, вместо (XIV.1.1) имеем при $\kappa \sim 1$

$$k_1 = \frac{k_B T}{h} \exp(\Delta S/R) \exp(-\Delta H/RT). \quad (\text{XIV.1.3})$$

При образовании активного комплекса происходит снижение энтропии ($\Delta S^\# < 0$) вследствие формирования вполне определенной взаимной ориентации молекулярных групп реагентов по сравнению с их хаотическим расположением в исходном состоянии. Таким образом, энтропийный ($\Delta S^\# < 0$) и энергетический ($\Delta H^\# > 0$) факторы действуют в направлении снижения скорости реакции ($\exp(\Delta S^\#/R) \ll 1$, $\exp(-\Delta H^\#/R) \ll 1$).

Ускорение ферментативных реакций по сравнению с соответствующими неферментативными означает на языке формальной кинетики, что величина активационного барьера $\Delta G_e^\#$ в ферментативных реакциях снижается ($\Delta G_e^\# < \Delta G_0^\#$). Это может происходить за счет снижения абсолютной величины $|S_e^\#| < |S_0^\#|$, а также за счет уменьшения энтальпии активации $|\Delta H_e^\#| < |\Delta H_0^\#|$ (индексы e и 0 относятся соответственно к ферментативным и неферментативным реакциям).

Понижение энтропийной части происходит в результате фиксации субстрата на ферменте в конфигурации активных групп, обладающей и более низкой энтропией по сравнению со свободным сочетанием реагентов. Следовательно, в таком комплексе, исходно близком к переходному состоянию, уменьшение энтропии при образовании самого переходного состояния не должно быть уже столь большим по абсолютной величине, как в случае свободных реагентов. Значит, роль энтропийного фактора ($e^{\Delta S/R} \ll 1$) в (XIV.1.1), (XIV.1.2), снижающего скорость реакции, уменьшается в ферментативном процессе по сравнению с обычной реакцией. Избыток энергии, выделяющейся при связывании субстрата, должен хотя бы частично переходить в теплоту, чтобы скомпенсировать уменьшение энтропии при образовании комплекса. С энергетической точки зрения, происходящая стабилизация и уменьшение собственной энергии комплекса должны были бы замедлять катализ, где требуется преодоление активационного барьера. Однако в схемах энергетического катализа предполагают, что осуществляется не только фиксация конфигурации субстрата, но и создание напряжения фермент-субстратного комплекса, способствующего реакции. При этом происходит и снижение энергии активации химической реакции за счет концентрации энергии напряжения на атакуемой связи.

Энергия, необходимая для создания такого напряженного состояния связи, черпается из энергии сорбции, которая, как предполагают, не расходуется полностью в теплоту, а может быть запасена в белковой части фермента и сконцентрирована в области образовавшихся фермент-субстратных контактов.

Модели ферментативного катализа. В известных в биохимии моделях ключ-замок Фишера и рука-перчатка Кошланда учитываются энтропийные факторы в

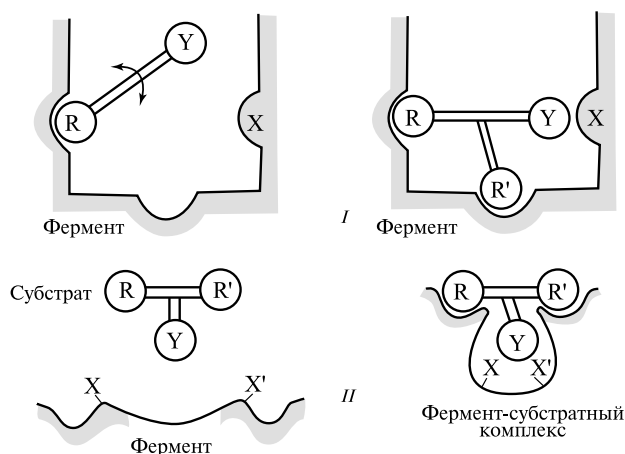


Рис. XIV.2

Эффекты сближения и ориентация (I) и механизм индуцированного соответствия (II) (по И. В. Березину, К. Маргинеку, 1977)

катализе введением условия комплементарности фермента субстрату, точнее, переходному состоянию субстрата. В модели рука-перчатка, или индуцированного соответствия, в отличие от модели ключ-замок, не предполагают необходимости исходной жесткой комплементарности, а считают, что каталитически активная конформация активного центра образуется в процессе взаимодействия ферментов и субстрата в фермент-субстратном комплексе. Эта напряженная конформация энергетически менее выгодна (более высокая собственная энергия), и поэтому на ее образование тратится часть свободной энергии сорбции. Таким образом, большая часть энергии сорбции идет на термодинамически невыгодное сближение и ориентацию реагирующих групп (рис. XIV.2).

Сорбционное взаимодействие между реагентами, которое вызывает ускорение ферментативной реакции, может быть гидрофобным, электростатическим или зависеть от образования водородных связей. Так, «погружение» бензильной группы субстрата из воды в гидрофобную среду активного центра приводит к снижению энергии активации до $-29,4$ кДж/моль и ускорению реакции до 10^5 раз. Боковые группы субстратной молекулы могут взаимодействовать с белком при наличии противоположно заряженных групп в реагирующих частицах, что приводит к электростатической стабилизации переходного состояния (гидролиз трипсином метиловых эфиров).

Различные варианты самой простой модели понижения энергии активации в ферментативном катализе получили название модели «дыбы» (Г. Эйринг, Р. Ламри, Дж. Д. Спайке). Здесь силы сорбции также идут на создание напряжений (деформаций), способствующих протеканию реакций (рис. XIV.3). Согласно модели «дыбы», для установления связей с ферментом субстрат претерпевает деформацию и

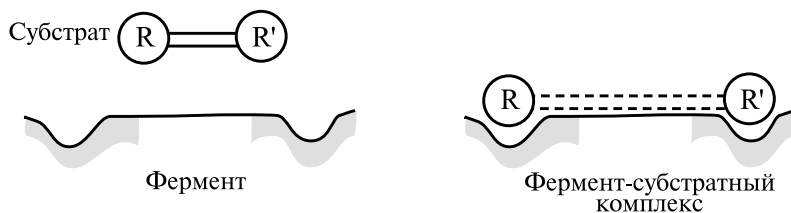


Рис. XIV.3

Механизм «напряжения» (по И. В. Березину, К. Мартинеку, 1977)

активизируется. В реальных системах как молекулы субстрата, так и молекулы фермента могут претерпевать конформационные изменения, что свидетельствует об общности различных моделей ферментативного катализа.

Термодинамическая сущность рассмотренных выше моделей состоит в том, что потенциальная свободная энергия связывания (сорбции) субстрата на ферменте должна тратиться на понижение барьера свободной энергии активации последующей химической реакции. Однако остается неясным, в какой конкретной форме и по каким механизмам энергия сорбции может запасаться в белковой глобуле и концентрироваться на атакуемой связи. □

Проблема снижения энергетического барьера. С термодинамической точки зрения, конформационной энергии связывания может быть достаточно для деформации субстрата, однако, чтобы использовать эту энергию в разрыве сильных ковалентных связей в субстрате, необходимо, в свою очередь, образование других сильных связей. Возникает вопрос: какова природа предполагаемых напряженных конформационных состояний, которые должны вызывать столь существенные изменения энергии напряжения, и каковы вообще непосредственные доказательства их существования в фермент-субстратном комплексе? Именно в решении этого вопроса физико-химическое описание катализа встречается с серьезными трудностями.

Наиболее обширную информацию о фермент-субстратных взаимодействиях получают при исследовании кристаллических ферментов и их комплексов с ингибиторами и субстратами методом рентгеноструктурного анализа. Найденные этим способом координаты атомов фермента и субстрата затем оптимизируются путем минимизации энергетических потенциалов, задаваемых суммой атом-атомных взаимодействий (см. гл. VIII–IX). Построенные в результате энергетические карты (см. §1, гл. IX) фермент-субстратных комплексов позволяют сравнивать конформации отдельных фрагментов белка и аминокислотных остатков в связанном и свободном состояниях. В настоящее время насчитывается сравнительно небольшое число таких исследований.

Метод теоретического конформационного анализа был использован для изучения невалентных взаимодействий α -химотрипсина с рядом простейших субстратов, лизоцима с триацетилглюкозамином, рибонуклеазы с уридин-2, 3'-циклофосфатом, карбоксипептидазы А с пептидными и эфирными субстратами. К сожалению, в силу ограниченной точности этот метод не всегда дает однозначный ответ о наличии напряжений в комплексе. Тем не менее общий вывод из проведенных теоретических исследований состоит в следующем. Хотя образование комплекса Михаэлиса сопровождается конформационными изменениями, однако посадка субстрата не вызывает в молекулах субстрата и фермента ни избыточного конформационного напряжения, ни образования какой-либо принудительной конформации. На α -химотрипсине было показано, что в предкаталитической стадии структурные элементы его активного центра находятся в ненапряженном состоянии.

В частности, потенциальная кривая боковой цепи *ser*-195 в активном центре α -химотрипсина (см. рис. XIV.10) содержит три неглубоких минимума (8–12 кДж/моль). Это показывает, что вращение вокруг связи $C^\alpha - C^\beta$ может происходить в широком интервале значений угла χ , без серьезных стерических затруднений. При удалении воды (см. рис. XIV.10), что происходит при связывании субстрата, боковая цепь серина приобретает практически полную свободу вращения в интервале χ от -120 до 120° . Ее новое положение уже определяется стабилизирующим взаимодействием с расщепляемой группой субстрата. Кроме того, распределение по значению конформационной энергии остатков, непосредственно участвующих в фермент-субстратном связывании в α -химотрипсине, лизоциме или во взаимодействии с гемом в миоглобине, аналогично энергетическому распределению других остатков.

Было показано, что продуктивная конформация субстрата является, с одной стороны, самой предпочтительной по энергии невалентных взаимодействий с активным центром, а с другой — отвечает одной из наиболее низкоэнергетических форм свободной молекулы субстрата. Этот вывод подтверждается и в исследованиях конформации субстрата при взаимодействии с активным центром лизоцима, а также в случае образования комплекса карбокси-пептидазы А с пептидными и эфирными субстратами. Нужная для катализа взаимная ориентация и сближение расщепляемой связи субстрата и активных групп фермента происходят спонтанно и не требуют образования каких-либо энергетически неблагоприятных контактов.

В данном случае речь идет о конформационных напряжениях при невалентных взаимодействиях, которые должны были бы приводить к изменению значений двугранных углов и расстоянии между валентно несвязанными атомными группами. Изменения валентных углов в основной цепи, которые сопровождают разрыв и образование валентных связей в активном центре, относятся собственно к химическому акту катализа и будут рассмотрены ниже.

▽ Таким образом, сама по себе напряженность конформации не является необходимым этапом, источником энергии и движущей силой катализа. Очевидно, в комплексе Михаэлиса сближение функциональных групп фермента и субстрата в конфигурации, необходимой для дальнейших электронных и химических взаимодействий, может достигаться за счет обычных внутримолекулярных движений различных структурных элементов с широким набором характерных времен (см. гл. X).

Образование такой активной конфигурации, близкой к переходному состоянию, с формальной кинетической точки зрения, действительно снижает энтропийную часть барьера реакции, но это является спонтанным результатом внутримолекулярного динамического поведения разных, в том числе и функционально активных, молекулярных групп фермента и субстрата. □

Согласно описанным моделям, катализ должен быть сопряжен также и со снижением самой высоты барьера активации. Рассмотрим существующие гипотезы о возможных механизмах непосредственного снижения барьера ее активации за счет запасаения энергии в белковой глобуле и концентрации на атакуемой связи в субстрате. В модели упругой деформации (Д. С. Чернавский, Ю. И. Хургин, С. Э. Шноль) выдвигаются представления о молекуле белка как об упругой конструкции. Были рассчитаны размеры белкового резервуара для запасаения необходимой в катализе энергии в виде энергии упругой деформации. Оказалось, что, если принять пределы упругости белкового тела примерно равными таковым для большинства материалов, то для запасаения энергии $\Delta E \sim 0,5$ эВ необходимо распространение области упругой деформации на всю глобулу 2,0–5,0 нм.

Энергия деформации может возникать и при перемещении электрических зарядов в белковой глобуле вследствие изменения зарядового состояния активного центра в самом акте катализа. Предполагают, что она может храниться в глобуле до начала следующего акта. Расчеты показывают, что при размерах порядка $\leq 1,0$ нм электрическая энергия легко переходит в механическую и обратно, а плотности этих энергий уравниваются. Однако и здесь также необходимо констатировать отсутствие в настоящее время прямых доказательств запасаения энергии упругих деформаций.

Обсуждают и другую возможность использования конформационной энергии в акте катализа за счет тепловых флуктуаций в структуре белка. В этих моделях речь идет не о статических напряжениях, а о передаче энергии тепловых колебаний по определенным степеням свободы с концентрацией ее на атакуемой связи в субстрате. Эти взгляды созвучны представлениям Р. Ламри (1959) о белке-ферменте как о «резервуаре избыточной тепловой энергии», в котором процессы, проходящие на поверхности белковой глобулы, служат источником свободной энергии, которая необходима для акта катализа.

В электромеханической модели предполагают, что под влиянием тепловых флуктуаций в белке возникают колебания, сопровождающиеся сдвигом электрических зарядов в активном центре и поляризацией атакуемых связей субстрата. В модели постулируют, что внутримолекулярные взаимодействия в белке стабилизируют на определенное время ($\geq 10^{-3}$ с) возникшую каталитически активную конформацию с поляризованными связями.

В других моделях также подчеркивают необходимость координации во времени возникающих в белке тепловых конформационных флуктуаций и концентрации их энергии в активном центре белка. Вероятность возникновения тепловых флуктуаций в белке пропорциональна

$$W \sim \exp[-(\Delta G)_{\Phi}/k_{\text{B}}T], \quad (\text{XIV.1.4})$$

где $(\Delta G)_{\Phi}$ — изменение свободной энергии Гиббса в белке при флуктуации. Для

акта катализа величина $(\Delta G)_ф$ должна хотя бы на порядок превышать среднюю энергию тепловых колебаний $k_B T \sim 0,025$ эВ. Отсюда можно найти, что вероятность возникновения такой флуктуации (см. (XIV.1.4)) составит 10^{-5} в единицу времени, а за время оборота фермента 10^{-3} с такие флуктуации могут возникать с вероятностью $\sim 10^{-8}$.

Действительно, большое количество различных типов стохастических движений, проходящих вблизи поверхности раздела белок–растворитель (релаксация молекул связанной воды, локальные изменения конформации, флуктуации плотности зарядов в окружающем растворе ионов и др.), имеют времена корреляции в диапазоне $10^{-9}–10^{-7}$ с. Для объяснения самого механизма катализа выдвигают предположение: фермент «устроен» так, что его структура обеспечивает когерентный характер распространения флуктуационных изменений конформации от поверхности белка к его активному центру. Тем самым обеспечивается и обмен свободной энергией между макромолекулой и ее окружением. В модели Сомоги и Дамьяновича (Somogyi, Damjanovich, 1975) молекулу фермента представляют в виде сопряженных осцилляторов, так что происходит направленный перенос энергии соударений с молекулами растворителя на поверхности белка в активный центр.

Основой всех рассмотренных «динамических» моделей является предположение о возникновении когерентного состояния с одной колебательной модой и бездиссипативном переносе энергии по белковой глобуле к активному центру по определенным степеням свободы. В результате энергия, как считают, концентрируется на атакуемой связи, что и приводит к уменьшению активационного барьера. В этом якобы и состоит «секрет» фермента. Однако экспериментальных доказательств этого предположения в настоящее время не существует. Более того, существенная для всех этих моделей идея о направленной передаче и коммуляции энергии обычных тепловых флуктуаций тем или иным способом в активном центре противоречит второму началу термодинамики.

§ 2. Электронно-конформационные взаимодействия в ферментативном катализе

Как было показано, конформационные изменения в белковой глобуле носят релаксационный характер и характеризуются целым набором различных времен. Они происходят, как правило, намного медленнее, чем чисто электронные переходы. Быстрые изменения электронного состояния молекулы белка (например, восстановление атома Fe активного центра цитохрома) нарушают исходное равновесное конформационное состояние и приводят каскаду последовательных конформационно-релаксационных актов, носящих направленный характер (см. § 1, гл. X). Именно это обстоятельство составляет физическую основу конформационно-релаксационной концепции ферментативного катализа (Л. А. Блюменфельд). Появление продукта реакции рассматривается здесь как закономерный результат электронно-конформационных взаимодействии в комплексе фермент–субстрат. Предполагают, что конформационные изменения фермент-субстратного комплекса, следующие за изменением электронного состояния субстрата в активном центре фермента, носят характер направленной релаксации и включают процессы превращения молекул субстрата в молекулы продукта. Элементарный акт ферментативной реакции

заключается в конформационном изменении фермент-субстратного комплекса, а скорость превращения субстрат — продукт определяется скоростью этого конформационного изменения.

Последовательность событий представляется следующим образом. Изменение электронного состояния и локальные изменения геометрии активного центра и субстрата происходят за времена колебательной релаксации (10^{-12} – 10^{-13} с). Они затрагивают только часть молекулы — выделенные химические связи субстрата и функциональных групп активного центра, но не остальную большую часть белковой глобулы. Следовательно, в целом на этом этапе макромолекулярный комплекс находится в конформационно-неравновесном состоянии. Затем происходит медленная релаксация фермент-субстратного комплекса к новому равновесию и превращение субстрата в продукт:



где E^* — неравновесное, а \tilde{E} — новое равновесное конформационное состояние белковой глобулы фермента. Химическое изменение субстрата, включающее перегруппировку атомов вслед за разрывом химических связей, реализуется здесь как часть конформационного изменения макромолекулярного комплекса.

На следующей стадии происходит распад комплекса фермент — продукт: $E\tilde{P} \rightarrow \tilde{E} + P$. Эта стадия также сопровождается быстрыми локальными изменениями в активном центре и сольватационными изменениями продуктов реакции, переходящих в объем. Фермент остается в конформационном состоянии \tilde{E} , которое после отрыва продукта становится неравновесным и напряженным. Наконец, на заключительном этапе происходит медленная конформационная релаксация свободной молекулы фермента к исходному равновесному состоянию: $\tilde{E} \rightarrow E$.

Таким образом, конформационное изменение происходит в условиях существенной конформационной неравновесности. Координата реакции совпадает с координатой конформационной релаксации, которая протекает по определенным степеням и носит направленный характер: $E \rightarrow E^* \rightarrow \tilde{E} \rightarrow E$. □

Именно наличие выделенных механических степеней свободы позволяет рассматривать смещения, происходящие в разных областях макромолекулы, как изменения, совершающиеся в один акт. Энергия, сосредоточенная на этих медленно релаксирующих степенях свободы, не диссипирует быстро в теплоту за счет размена по другим обычным степеням свободы, что используется фактически для обеспечения направленного характера релаксационных процессов в ферментативном катализе. С такой нетрадиционной точки зрения, теряет непосредственный смысл использование понятий энергии и энтропии активации, как это делают в теории активированного комплекса. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры определяется не числом активных молекул с энергией, достаточной для преодоления барьера, а влиянием температуры на конформацию макромолекулы и, следовательно, на путь и скорость ее последующей релаксации (см. § 2, гл. VII). Все молекулы субстрата, образовавшие «правильный» комплекс с ферментом, претерпевают химическое превращение в результате самопроизвольной релаксации фермента к новому конформационному состоянию. Конечно, с термодинамической точки зрения, общей движущей силой процесса является разность химических потенциалов субстрата и продукта. Однако она определяет лишь число встреч молекул фермента и суб-

страта, но не сам активационный механизм превращения фермент-субстратного комплекса.

Таковы в основном современные представления об общих механизмах ферментативного катализа. Для дальнейшего изложения необходимо сделать существенное замечание. Строго говоря, до сих пор здесь не использовали количественный анализ механизмов катализа, для чего необходимо, очевидно, построение конкретных физических моделей этого процесса. Ясно, что понимание механизмов требует детального изучения электронных взаимодействий в активном центре между функциональными группами. Эти взаимодействия осуществляются в целом на гораздо более коротких расстояниях по сравнению с невалентными атом-атомными взаимодействиями, определяющими характер внутримолекулярной динамики белковой глобулы фермента.

Кроме того, невалентные фермент-субстратные взаимодействия реализуются в системах, состоящих из многих сотен атомов, в то время как электронные, чисто химические взаимодействия происходят в активном центре между ограниченным числом атомов, принадлежащих функциональным группам. Невалентные взаимодействия приводят к конформационным изменениям, характерные времена которых намного больше, чем времена колебательной релаксации, сопровождающие чисто электронные переходы. На первом этапе катализа определяющее значение приобретает характер структурно-динамического взаимодействия фермент – субстрат. На втором этапе, после образования активного комплекса, основную роль уже играют квантово-механические электронные процессы взаимодействия между ограниченным числом атомных групп в активном центре. Следовательно, конформационно-динамические аспекты ферментативного катализа, связанные с формированием химически активной конфигурации, можно рассматривать независимо от квантово-механической природы элементарного акта разрыва связей субстрата в активном центре. Это обстоятельство отражает природу ферментативного акта как следствие электронно-конформационных взаимодействий в молекуле белка-фермента.

§ 3. Динамика фермент-субстратных взаимодействий

В теории активированного комплекса (XIV.1.1) – (XIV.1.3) рассматривается собственно химическая стадия реакции. Применение этих представлений для объяснения ферментативного катализа ограничено превращениями в уже «готовом» фермент-субстратном комплексе. Под величинами $\Delta S^\#$ и $\Delta H^\#$ здесь нужно понимать энтропию и энергию активации в уже образованной благоприятной конфигурации фермент – субстрат. Непосредственно динамика белка и ее роль в формировании благоприятной конфигурации здесь не учитываются.

Роль вязкости среды. Экспериментальные попытки исследовать этот аспект проблемы были предприняты в работах по изучению влияния вязкости среды на скорость ферментативной реакции. Так, например, изучали реакцию связывания CO и O₂ с миоглобином в различных растворителях (Г. Фрауенfelder и др., 1980). Как оказалось, в широком диапазоне изменения вязкости растворителя константа скорости внутримолекулярной реакции связывания O₂ и CO в белке обратно пропорциональна значению вязкости системы белок – растворитель. Проникновение и диффузия низкомолекулярных лигандов (O₂, CO) в молекуле белка связаны с

преодолением внутримолекулярных барьеров (см. гл. XI). В самом деле, увеличение вязкости растворителя уменьшает динамическую подвижность поверхностных групп белка, что, в свою очередь, передается внутренним слоям и ограничивает также подвижность глубоко расположенных структурных элементов. Ограничения динамической подвижности препятствуют диффузии лигандов в белке и снижают общую скорость реакции.

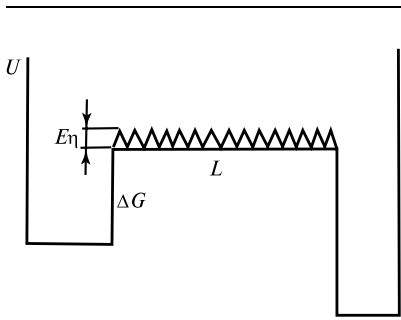


Рис. XIV.4

Эффективный профиль потенциального барьера высотой ΔG (кДж/моль) и длиной L , включающий несколько промежуточных максимумов, характеризующих барьеры при диффузии

E_η — энергия активации микроконформационных движений

Роль внутримолекулярной диффузии эквивалентна в данном случае фактору, влияющему на формирование фермент-субстратного комплекса (гем-СО). Модификация обычного уравнения активированного комплекса (XIV.1.1) — (XIV.1.3) для учета влияния диффузии реагентов в химических процессах была предложена Крамерсом (1940). Его представления основаны на анализе процесса перехода броуновской частицы через потенциальный барьер в вязкой среде, описываемой уравнением Фоккера — Планка (см. § 1, гл. XI). Значение константы скорости реакции зависит от вязкости растворителя как

$$k \simeq \frac{A}{\eta} \exp(-\Delta G/RT), \quad (\text{XIV.3.1})$$

где A — константа, зависящая от структурных параметров системы. Эффективный профиль потенциального барьера реакции включает теперь несколько промежуточных максимумов, характеризующих барьеры при диффузии реагентов к месту химической реакции (рис. XIV.4). Анализ взаимодействия гем-СО

дал выражение для зависимости константы скорости от вязкости и температуры:

$$k(T, \eta) \left(\frac{A}{\eta^r} + A_0 \right) \exp(-\Delta G/RT), \quad (\text{XIV.3.2})$$

где член A_0 соответствует вкладу процесса, не зависящего от вязкости, показатель r варьирует в пределах $0 \leq r \leq 1$ в зависимости от вида белка; η соответствует вязкости растворителя и уменьшается экспоненциально с температурой как

$$\eta = \eta_0 \exp(E_\eta/k_B T), \quad (\text{XIV.3.3})$$

причем E_η — энергия активации вязкого течения — составляет ~ 20 кДж/моль для обычных водных растворов. Таким образом, динамика среды оказывает влияние на динамику белка и, тем самым, на формирование активированного комплекса.

Теоретические модели. В них учитывают стохастический характер формирования активной конфигурации фермент-субстрат при диффузии субстрата через белковую глобулу фермента.

В § 1, гл. XI была приведена модель ограниченной диффузии белковых фрагментов, совершавших микроконформационные движения с амплитудами $0,03 - 0,1$ нм и временами корреляции $\tau_c \sim 10^{-7} \div 10^{-9}$ с. Эти движения соответствуют локальным движениям различных белковых групп типа заторможенного вращения, мягких деформаций и т. д. Однако описание более крупномасштабных изменений потребовало более конкретного учета реальной структуры белка. В связи с этим в модели учитываются движения жестких α -спиральных участков и боковых групп, образующих «жидкоподобную опушку», демпфирующую изгибные движения α -спиралей (К. В. Шайтан). Иными словами, молекула белка здесь моделируется в виде жидкой капли, армированной упругими стержнями α -спирального каркаса. Аналогичный подход использовали ранее в теории флуктуаций ДНК (см. § 3, гл. IX).

Образование фермент-субстратного комплекса связано на первом этапе с проникновением или диффузией молекулы субстрата в щель на поверхности фермента, образованную относительно жесткими элементами структуры. После проникновения субстрата в щель на втором этапе происходит уже образование активной конфигурации за счет конформационных движений в комплексе. И лишь на третьем этапе после достижения определенной химически активной конфигурации происходит химическая реакция в системе субстрат – группы активного центра. В рамках одномодового приближения можно определить амплитуду прогиба α -спиралей вследствие тепловых флуктуаций под действием стохастической силы. Оказалось, что при длине участка α -спирали $L \sim 0,5$ нм амплитуда флуктуаций щели составляет $A \sim 0,5$ нм ($T = 300$ К). При $\eta \sim 10$ Па · с время релаксации изгибных флуктуаций лежит в микросекундном диапазоне, что намного короче времени оборота фермента ($10^{-2} - 10^{-3}$ с).

Диффузия молекул субстрата в флуктуирующую щель на первом этапе фермент-субстратного взаимодействия возможна лишь при условии достаточного раскрытия ее на некоторую величину r^* (рис. XIV.5). При длине щели $L \sim 0,7 \div 2,5$ нм и значениях модуля Юнга $10^3 - 10^4$ Дж/см³ время релаксации щели $\tau \sim 10^{-6} \div 10^{-8}$ с. В модели оценивается характерное время диффузии субстрата в такую флуктуирующую щель. При значениях микровязкости $\eta \sim 10$ Па · с, радиусе молекулы субстрата $\sim 0,2$ нм и глубине щели $l \sim 0,5$ нм это время составляет величину порядка 10^{-6} с.

Проникновение субстрата с «неподходящей» геометрией требует существенно большего раскрытия щели, чем в случае геометрического соответствия щели и молекулы субстрата. Следовательно, на стадиях образования комплекса фермент – субстрат структурное соответствие может задаваться размером и формой флуктуирующей щели. Однако в кинетическом отношении этапы проникновения субстрата в фермент не лимитируют общую скорость катализа.

Конформационная динамика белка. Особенности динамики непосредственно связаны с механизмом ферментативного катализа. Акт катализа происходит лишь при строго определенной ориентации нескольких групп, достигаемой за счет кон-

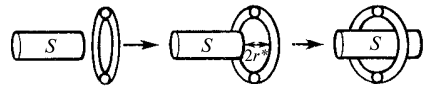


Рис. XIV.5

Диффузия субстрата S во флуктуирующую щель (объяснение см. в тексте)

формационных движений. Формально это соответствует одновременному соударению нескольких молекул, что в растворе крайне маловероятно. Однако в белке область конформационных движений отдельных групп снижается до нескольких кубических нанометров и реакции, практически не реализуемые в растворах, становятся здесь преобладающими и высокоселективными (рис. XIV.6).

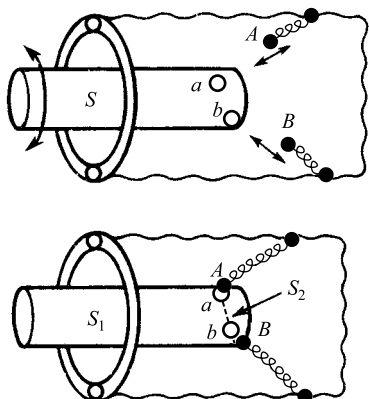


Рис. XIV.6

Подстройка групп активного центра *A* и *B* и субстрата *S* в реакцию способную конфигурацию

Необходимым условием расщепления субстрата *S* на *S*₁ и *S*₂ является одновременный контакт групп *A* и *a*, *B* и *b* соответственно

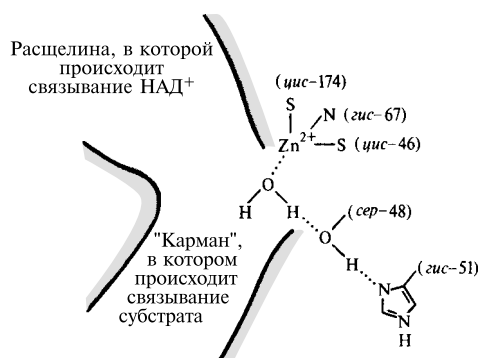


Рис. XIV.7

Модель активного центра алкогольдегидрогеназы (по Ф. Фершту, 1980)

На рис. XIV.7 приведено в качестве примера строение активного центра алкогольдегидрогеназы, цинкосодежащего металлофермента, использующего в качестве кофермента НАД⁺. Ион Zn находится на дне гидрофобного «кармана», образованного в месте каталитического и связывающего нуклеотид доменов. Лигандами атома Zn являются атомы S аминокислотных остатков *cys*-46 и *cys*-174 и атом N остатка *his*-67. Четвертый лиганд — молекула воды — связан с гидроксильным остатком *ser*-48, который, в свою очередь, образует водородную связь с *his*-51.

В активном центре происходит окисление молекулы спирта до альдегида с переносом водорода на НАД⁺. Для осуществления этой реакции должен образоваться продуктивный тройной комплекс, включающий молекулы НАД⁺, спирта и атом Zn (рис. XIV.8). Предполагают, что ионизированный спирт замещает связанную с Zn молекулу H₂O, причем атом O₂ спирта непосредственно присоединяется к иону Zn, а гидрофобная боковая цепь связывается с гидрофобной полостью «кармана».

В случае сериновых протеаз-функциональные участки, осуществляющие сорбцию и нуклеофильный катализ (гидролиз) пептидной связи, пространственно разделены. По данным рентгеноструктурного анализа, в активном центре α-химотрипсина находится довольно вместительный гидрофобный «карман», где связывается

ароматическая боковая группа гидролизуемого пептида и происходит фиксация субстрата (рис. XIV.9). Строение активного центра α -химотрипсина до взаимодействия с субстратом приведено на рис. XIV.10, где обозначены расстояния и углы вращения для остатков *asp*-102, *guc*-57, *ser*-195, участвующих в образовании активной конфигурации с субстратом.

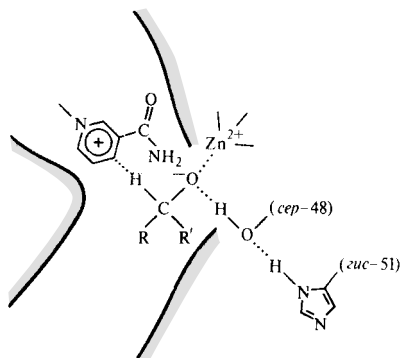


Рис. XIV.8

Модель продуктивного тройного комплекса алкогольдегидрогеназы (по Ф. Фершту, 1980)

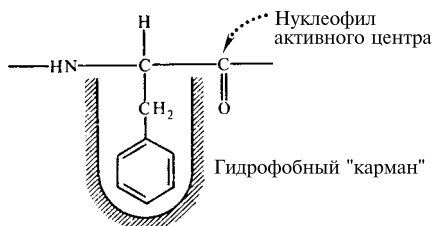


Рис. XIV.9

Взаимодействие пептидного субстрата с сериновой протеазой (α -химотрипсин), активный центр которой состоит из пространственно разделенных сорбционного и каталитического участков (по И. В. Березину, К. Маргинеку, 1977)

На рис. XIV.11 показано взаимное расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей *ser*-195, *guc*-57. Атом $O\gamma$ остатка *ser*-195 находится на расстоянии 0,28 нм против карбонильного углерода С, а протон ОН-группы, не нарушая водородной связи с атомом $N^{\epsilon 2}$ *guc*-57, располагается на расстоянии 0,2 нм над атомом азота расщепляемой группы. Таким образом, продуктивная конформация включает все необходимые функциональные группы, собранные в едином строго ориентированном ансамбле. Электронный характер их взаимодействия будет освещен в следующем параграфе, здесь необходимо отметить, что из всех возможных способов невалентного связывания субстрата в активном центре указанная взаимная ориентация расщепляемой связи и каталитически активных групп белка возникает лишь в одном случае. Именно тогда и только тогда происходит каталитический акт.

Модель формирования активной конфигурации. Пусть группы активного центра и субстрата характеризуются независимыми обобщенными конформационными координатами (x_1, x_2, \dots, x_N) . Акт катализа будет совершаться со скоростью W , зависящей от оптимальных расстояний и ориентации соответствующих групп $W(x_1, x_2, \dots, x_N)$. Исходя из общих представлений и принципа Франка-Кондона

можно заключить, что реакционноспособное состояние в активном центре должно иметь конфигурацию, соответствующую пересечению электронных термов исходных реагентов продуктов реакции (см. рис. XIII.8). Реакция происходит, когда координаты x_i приобретают «реакционные» значения x_i^0 . При отклонении i -й конформационной координаты x_i некоторой активной группы от оптимального

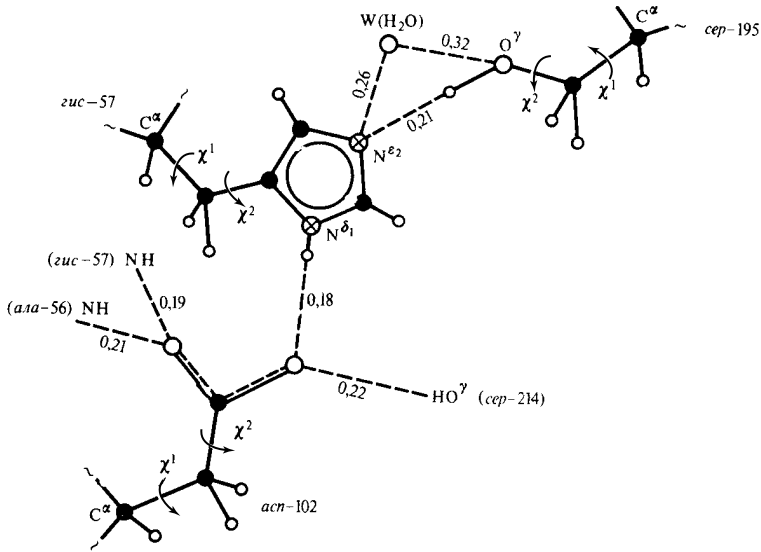


Рис. XIV.10

Строение активного центра α -химотрипсина (цифрами показаны межатомные расстояния, нм)

«реакционного» значения x_i^0 скорость реакции убывает как $\exp[-(x_i - x_i^0)^2/a^2]$, где a ($\sim 0,005 \div 0,01$ нм) — амплитуда валентных колебаний вдоль соответствующей связи.

Будем упрощенно считать, что акт катализа идет с определенной скоростью W_0 , когда система, «блуждая» в N -мерном конфигурационном пространстве, попадает в «реакционную» a -окрестность оптимальной точки $(x_1^0, x_2^0, \dots, x_N^0)$, т. е.

$$W(\rho) = \begin{cases} W_0, & \rho < a, \\ 0, & \rho \geq a, \end{cases} \quad (\text{XIV.3.4})$$

где $\rho^2 = \sum_{i=1}^N (x_i - x_i^0)^2$ задает отклонение системы от оптимальной точки.

Таким образом, скорость ферментативного катализа определяется внутримолекулярной динамикой фермент-субстратного комплекса. В качестве уравнения для описания этих стохастических движений можно воспользоваться либо уравнением Ланжевена (см. (XI.1.8)), либо эквивалентным ему уравнением Фоккера – Планка (см. (XIII.8.1)). \square

Химическая специфика процесса описывается членом $W(x_1, \dots, x_N)$, отражающим зависимость скорости превращения комплекса фермент – субстрат в продукт от конформационных координат. Будем полагать, что скорость W_0 много больше скорости конформационной релаксации отдельных групп, т. е. среднее время химического акта $1/W_0$ в достигнутой активной конфигурации много меньше времени

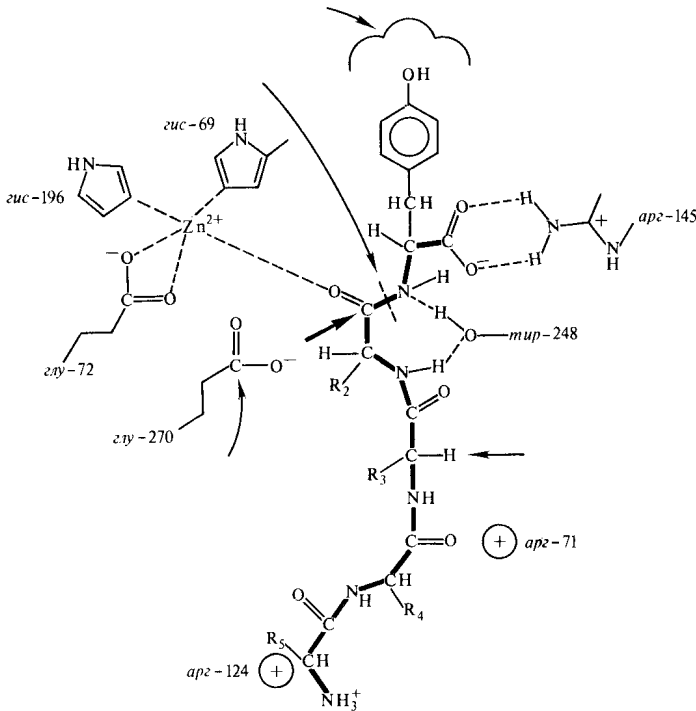


Рис. XIV.11

Пример образования активной конфигурации или цепи перераспределения связей в случае гидролиза пептидной связи карбоксидазой А

нахождения системы в «реакционной» области оптимальной точки ($\rho \leq a$). Тогда время распада комплекса фермент – субстрат и образования продукта не лимитируется химическим актом, а будет определяться именно средним временем образования активной конфигурации.

В этой модели (К. В. Шайтан, А. Б. Рубин) константа скорости ферментативной реакции определяется выражением

$$k_E \approx \frac{D}{\rho_0^2} N(N-2) \left(\frac{a}{\rho_0} \right)^{N-2} \quad \text{при} \quad \frac{W_0 a^2}{D} \ll 1, \quad (\text{XIV.3.5})$$

где $N \geq 3$ — общее число степеней свободы активных групп, которое может быть определено из химического механизма реакции. Так, например, при гидролизе пептидной связи необходима благоприятная ориентация для двух групп активного

центра относительно определенных участков субстрата. Вклад каждой группы в N равен трем, а с учетом вибраций молекулы субстрата общее число степеней свободы $N \sim 6 \div 7$. Формула (XIV.3.5) является обобщением теории Крамерса на многомерный случай диффузии в структурированных средах (§5, гл. XI). Согласно данным мёсбауэровской спектроскопии (§2, гл. X), амплитуда локальных конформационных движений белковых групп при комнатной температуре $\rho_0 \sim 0,1$ нм, а значение коэффициента диффузии $D \sim 10^{-9}$ см² · с⁻¹. Следовательно, $D/\rho_0^2 \sim 10^7$ с⁻¹ и

$$k_E \simeq 10^7 N(N-2) \left(\frac{a}{\rho_0} \right)^{N-2},$$

или $k_E \sim 10^2 \div 10^4$ с⁻¹, что совпадает с обратными временами оборота фермента в условиях субстратного насыщения.

В растворе для аналогичной реакции эффективная величина ρ_0 намного больше и составляет не менее $\rho_0 \sim 10$ нм. Отсюда видно, что даже при больших коэффициентах диффузии $D \sim 10^{-5} \div 10^{-6}$ см² · с⁻¹ скорость ферментативной реакции за счет определенной и достаточно жесткой структурно-динамической организации активного центра как минимум на пять порядков превосходит скорость аналогичной реакции в растворе. В формуле (XIV.3.5) температурная зависимость k_E определяется зависимостью $D(T) \sim \exp(-\varepsilon/k_B T)$, где ε — энергия активации диффузии по конформационным подстояниям. Согласно данным мёсбауэровской спектроскопии, $\varepsilon \sim 20$ кДж/моль для разных белков. Если в активной области существует локальный барьер высоты ΔE , предшествующий движениям групп, то эффективная энергия активации для k_E будет большей и составит $\varepsilon + \Delta E$.

∇ Формула (XIV.3.5) показывает, что скорость ферментативной реакции зависит от коэффициента конформационной диффузии D (или микровязкости белка) и амплитуды ρ_0 конформационных движений групп активного центра. □

§ 4. Электронные взаимодействия в активном центре фермента

Условием успешного совершения каталитического акта является образование активной конфигурации, где функциональные группы нужным образом сближены и взаимно ориентированы. Конечно, механизм и результат их взаимодействия зависят от деталей их молекулярной структуры и должны рассматриваться специально в каждом конкретном случае с позиций квантовой химии. Пока существует сравнительно мало примеров такого рода, однако можно уже сейчас указать на ряд специфических особенностей фрагментов, облегчающих превращения субстрата в активном центре.

Микросвязи активного центра. Сорбция субстрата приводит к переводу его молекулы из водной среды в окружение аминокислотных остатков в активном центре. Как правило, микросреда активного центра обладает более низкой диэлектрической проницаемостью по сравнению с водой. Так, значение диэлектрической проницаемости в сорбционном участке активного центра химотрипсина $\varepsilon < 10$ (для белка обычно принимают $\varepsilon \sim 3$, для воды $\varepsilon = 80$). Причина этого связана с фиксированной ориентацией диполей белка по отношению к заряженным группам субстрата. В этом состоит отличие их от «свободных» диполей воды, которые ослабляют кулоновские

взаимодействия зарядов при переориентации. В результате происходит усиление электростатических взаимодействий (см. (VIII.2.1)) в гидрофобной среде между реагентами и полярными группами фермента. Кроме того, микросреда активного центра обладает сильно пониженной полярностью по сравнению с водой, особенно в тех местах глобулы, где происходят гидрофобные взаимодействия аполярных аминокислотных остатков полипептидной цепи. В случае реакций, сопровождающихся переносом заряда в активном центре, а таких, как правило, большинство, малополярная белковая среда подвергается сравнительно небольшой реорганизации и частично экранирует переносимый заряд от действия полярного растворителя.

Рассмотрим более подробно роль этого фактора в ферментативных реакциях с переносом заряда (Л. И. Кришталик). Согласно формуле (XIII.5.19), энергия активации реакции, сопровождающейся переносом заряда и реорганизацией окружающей среды, выражается как

$$E_a = (E_r - \Delta E)^2 / (4E_r), \quad (\text{XIV.4.1})$$

где ΔE — тепловой эффект реакции; E_r — энергия реорганизации среды (см. (XIII.5.16)). В данном случае E_r — энергия переориентации диполей из начальной в конечную конфигурацию, которая определяется при условии, что система остается на начальном электронном терме, т. е. заряд не переносится. Малая подвижность диполей белка означает, что они вносят небольшой вклад в энергию реорганизации по сравнению с дипольным окружением в растворе, тем самым снижая значение E_r в ферменте. При этом снижается и энергия активации в (XIV.4.1). Фактически в белковой глобуле исключается часть объема растворителя, обладающего большой энергией реорганизации из сферы взаимодействия с зарядом реагирующих частиц. Очевидно, этот эффект проявляется в большей степени при увеличении объема глобулы, но до определенного предела, зависящего от расстояний между взаимодействующими зарядами. Расчеты были проведены для случая переноса заряда между двумя точками, расположенными на радиусе сферы, обладающей диэлектрической проницаемостью много меньшей, чем у окружающего растворителя. Оказалось, что при радиусе сферы до 1,5 нм включение в нее реагентов приводит к снижению энергии реорганизации среды на 42–84 кДж и к соответствующему ускорению реакции.

Другим важным фактором, влияющим на величину E_a активационного барьера, является образование локальных электрических полей за счет высоких локальных концентраций диполей пептидных связей. В таких заряженных участках электростатический потенциал может достигать нескольких десятков милливольт, что при обычных размерах активного центра (0,5–1,0 нм) приводит к напряженности поля порядка тысяч и сотен тысяч единиц (В/см).

Таким образом, ориентированные полярные группы создают внутриглобулярное электрическое поле, в котором происходит перенос заряда. Наряду с сильным снижением диэлектрической проницаемости этот фактор также влияет на величину кулоновского взаимодействия зарядов, или на разность энергий начального и конечного состояний заряженных частиц, т. е. на величину теплового эффекта ΔE элементарного акта переноса заряда. Это, в свою очередь, сказывается на энергии активации всего процесса и может приводить к его ускорению для определенного

класса реакций. Это справедливо, в частности, для тех реакций, в ходе которых уменьшается абсолютная величина заряда каждой из реагирующих частиц или одной из них, расположенной дальше от границы раздела белковая глобула – водная среда. □

Электронные переходы. Индуцированные в результате взаимодействия молекулярных орбиталей реагентов, сближенных в активной конфигурации, электронные переходы играют триггерную роль в элементарном акте катализа. Для количественного решения этой проблемы требуется привлечение методов квантовой химии и, в частности, метода межмолекулярных орбиталей ММО. Идея метода ММО состоит в том, что молекулярная орбиталь комплекса может быть представлена линейной комбинацией МО, составляющих комплекс (ср. с методом ЛКАО; § 1, гл. XII). Под влиянием возмущения, обусловленного взаимодействием электронов и ядер, будут смешиваться МО основного и возбужденного состояний каждой молекулы. Главную роль будут играть взаимодействия МО, расположенных близко по энергии к граничным орбиталам: верхней (разрыхляющая) занятой и нижней (связывающая) свободной. Энергия взаимодействия граничных орбиталей зависит от степени перекрытия верхней занятой и нижней свободной, что определяется видом орбиталей при взаимной ориентации молекул. В результате такого перекрытия изменяется распределение электронной плотности в молекулах, а это, в свою очередь, меняет их характеристики и, главное, прочность связей. Если электронная плотность добавляется на разрыхляющие орбитали и уменьшается на связывающих орбиталях, то это приводит к ослаблению соответствующих связей.

Такого рода эффекты возможны при взаимодействии МО активных групп фермента с МО атомов атакуемой связи в субстрате. Появление дополнительной электронной плотности на разрыхляющей орбитали в какой-то степени равносильно образованию возбужденного состояния этой молекулы. Во многих случаях дипольные моменты молекул в возбужденном и основном состояниях сильно различаются, так же как и значения рК. Ясно, что эти факторы играют дополнительную роль, обеспечивая специфические условия в микросреде активного центра, благоприятной для акта катализа.

Рассмотрим характер взаимодействий продуктивной конфигурации в активном центре α -химотрипсина. Эти реакции проходят по механизму нуклеофильного замещения. Нуклеофильный агент (основание) *ser*-195 приближается к атому углерода с дефицитом электронов (электрофильный центр C' в пептидной связи) и образует с ним связь, замещая при этом атом N. Замещаемый атом N с неподеленной парой электронов уходит вместе с присоединенным к нему протоном. Таким образом, в основе реакции лежит разрыв пептидной связи субстрата, приводящий к ацилированию фермента. Этот процесс проходит через тетраэдрическое промежуточное состояние с образованием валентной связи $O\gamma - C'$ между ферментом и субстратом.

На рис. XIV.12 представлены два предельных случая, которые могут предшествовать реакции разрыва связи $N \equiv C$ и ацилирования фермента. В одном случае (рис. XIV.12, I) нейтральная боковая цепь *ser*-195 занимает положение, необходимое для нуклеофильной атаки на атом C' гидролизуемой связи. В другом случае (рис. XIV.12, II) предполагается, что протон уже перешел от гидроксила *ser*-195 к

азоту $N^{\epsilon 2}$ имидазольного кольца *guc-57*, так что атомы C' и N пептидной связи подвергаются атаке алкоголят-ионом $O_{(195)}^Y$ и группой $N^{\epsilon 2}H$. Стадия депротонирования $O_{(195)}^Y$ облегчает разрыв пептидной связи, так как ион кислорода — более сильный нуклеофильный агент, чем нейтральный атом.

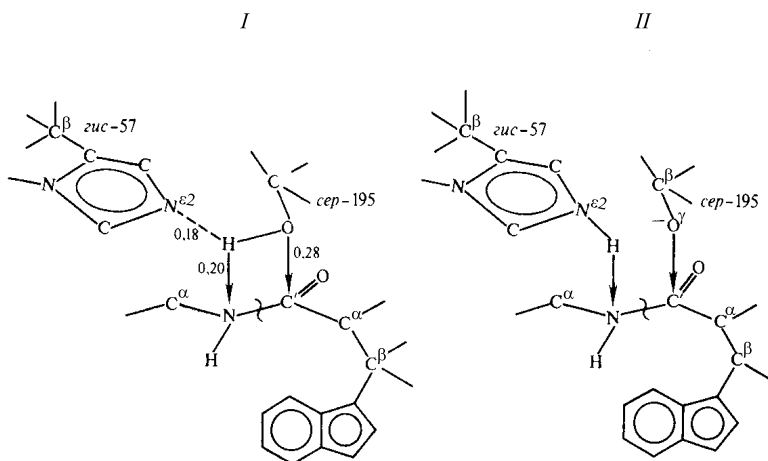


Рис. XIV.12

Расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей *serp-195* и *guc-57* в невалентном комплексе α -химотрипсина (по Е. М. Попову, 1977):

I — без перехода протона по *serp-195* к *guc-57*; *II* — с переходом протона от *serp-195* к атому $N^{\epsilon 2}$ имидазольной группы *guc-57*; цифрами обозначены равновесные межатомные расстояния (нм) в невалентном фермент-субстратном комплексе

Рассмотрим характер связи между отдельными этапами взаимодействия атомов в тетраэдрическом комплексе. Переход протона между *serp-195* и *guc-57* облегчается тем, что связь $O_{(195)}^Y-H$ ослабляется при взаимодействии между $O_{(195)}^Y$ и C' . Здесь происходит стекание электронной плотности на разрыхляющие орбитали в пептидной связи за счет взаимодействия неподеленной пары электронов O^Y с π -электронами атома C' , изменения гибридизации атомов C' и N ($sp^2 \rightarrow sp^3$) и, как следствие, ослабления связи $N=C'$ (см. § 1, гл IX; рис. IX.2).

Таким образом, одновременно с ослаблением связи O^Y-H облегчаются атака $O_{(195)}^Y$ на углерод C' , выталкивание неподеленной пары электронов азота аминной группы из пептидной связи $N=C'$ и ее разрыхление. Следствием этого является повышение основности аминной группы, что облегчает ее протонирование ферментом. Протон при этом переходит от $O_{(195)}^Y$ к *guc-57*, что также ослабляет связь $N=C'$. Это способствует повышению эффективности взаимодействия $O_{(195)}^Y$ и C' и т. д. Таким образом, в тетраэдрическом комплексе создается совершенно уникальная ситуация, когда несколько реакций протекают одновременно, взаимно ускоряя друг друга. Комплекс представляет собой зарядно-релейную систему переноса заряда, где происходит синхронное перемещение заряда и протона между тремя

атомными группами (*ser*-195, *guc*-57, пептидная связь), деацилирование фермента и протонирование атома $O_{(195)}^Y$, а роль гидроксильной группы *ser*-195 играет молекула воды.

Аналогичным образом происходит гидролиз эфирных связей, CH_3-CO-O , где триггерным механизмом является стекание отрицательной электронной плотности неподеленной пары $O_{(195)}^Y$ на разрыхляющую p_z -орбиталь атома углерода эфирной связи. Эффективность электронных взаимодействий определяется электронной емкостью разрыхляющих орбиталей и, разумеется, степенью перекрывания орбиталей атомных групп в фермент-субстратном комплексе.

Принцип образования полифункциональной замкнутой системы атомных групп в активной конфигурации выполняется и в случаях других фермент-субстратных комплексов.

В качестве еще одного примера расчета электронных свойств фермент-субстратных комплексов рассмотрим схему взаимодействия между глутамат-декарбоксилазой и глутаминовой кислотой, приведенную на рис. XIV.13. В результате нуклеофильной атаки атома С аминогруппой глутаминовой кислоты исходный комплекс кофермента с лизином *I* преобразуется в нестабильный промежуточный тетраэдрический комплекс *II*. Затем происходит разрыв связи между атомом C^α и азотом аминогруппы лизина с образованием «внешнего» шиффога основания аминокислоты с коферментом *III*. Следующая стадия ферментативной реакции — отщепление карбоксильной группы с образованием карбаниона *IV*. Она одна из самых важных и существенных не только в декарбоксилировании, но вообще в реакциях пиридоксалевого катализа. На этом этапе разрывается связь между атомом C^α и соседним с ним атомом одного из заместителей (H, COO^- , R), что, собственно, и определяет специфичность дальнейших превращений аминокислот. Различие между этими превращениями заключается в том, с каким из заместителей при атоме C^α разрывается ковалентная связь. Взаимодействие сопряженной π -электронной системы с электронами связей, исходящих из атома C^α , ослабляет ту из этих связей, которая располагается в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового кольца.

Квантово-химические расчеты были выполнены в π -электронном приближении без учета в явном виде σ -электронов с помощью варьирования числовых значений специально выбранной системы параметров (Ф. Савин). Действительно, оказалось, что при повороте группы $C^\alpha HPCOOH$ относительно ординарной связи $C^\alpha-N$ шиффога основания *III* прочность связей $C'_\alpha-X$ (где X есть H, R, COO^-) меняется. Она зависит от угла поворота φ . Максимальная величина ослабления связи $C^\alpha-COO^-$ достигается тогда когда эта связь располагается в плоскости, перпендикулярной плоскости молекулы, причем в этой конформации полная энергия молекулы не намного превышает (13–34 кДж/моль) ее минимальное значение. После соответствующей ориентации связи $C^\alpha-COO^-$ относительно плоскости молекулы происходит ее разрыв, в результате которого выделяется CO_2 и образуется молекула карбаниона *IV*. Затем протон присоединяется к атому C^α или C8 с образованием соответственно шиффога основания с γ -аминомасляной кислотой либо кетимина (продукты *V*). На последующих стадиях реакции все преобразования или происходят в обратном порядке через тетраэдрический комплекс *VI* или осуществляется гидролиз связи $C=N$ продукта *V*.

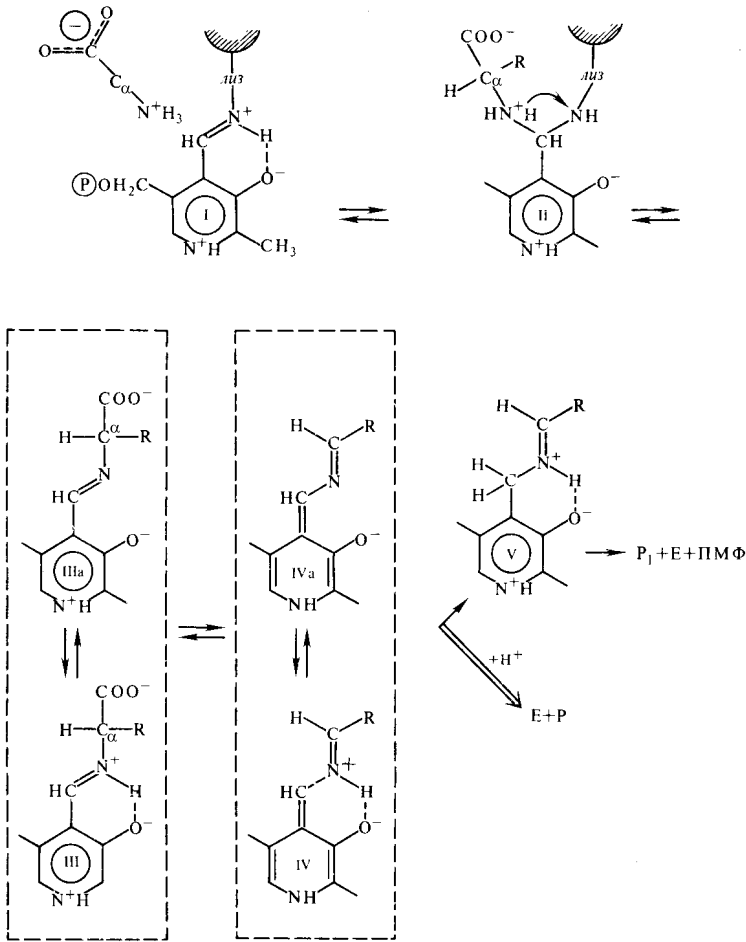


Рис. XIV.13

Модель механизма взаимодействия между глутаматдекарбоксилазой и глутаминовой кислотой (объяснение см. в тексте)

ПМФ — пиридоксальмонофосфат

Особенность общей картины стабилизации или ослабления различных связей молекулы IV при вращении группы C $^{\alpha}$ HRСOO $^-$ относительно связи C $^{\alpha}$ -N состоит в том, что при таком вращении происходит одновременно изменение прочности не одной, а многих связей этой молекулы. В частности, возможно дестабилизирующее влияние на связь C $^{\alpha}$ -СOO $^-$ других заряженных групп фермента, например отрицательно заряженной фосфатной группы кофермента. Как видно, в продуктивной конфигурации при пиридоксальном катализе достигается вполне определенное

взаимное расположение одновременно нескольких функциональных групп, способствующее лабильности именно тех связей, которые должны быть разорваны в ходе соответствующей ферментативной реакции.

▽ В ферментативном катализе многостадийный характер превращений субстрата обеспечивается за счет синхронного кооперативного их протекания в единой полифункциональной системе. Именно это и приводит к требуемому с формальной кинетической позиции снижению энергии активации всего процесса. Вместо малоэффективного осуществления последовательных активационных стадий здесь происходит скоординированное превращение субстрата в состоянии, фактически эквивалентном по своим свойствам переходному состоянию, уже готового активированного комплекса.

Понятно, что в растворе одновременная встреча трех свободных групп маловероятна, а их попарное «беспорядочное» взаимодействие будет малоэффективным. Каталитический акт сводит в единую кооперативную систему три отдельные биомолекулярные реакции, где осуществляются многоточечные взаимодействия между ее компонентами. Перекрытие электронных орбиталей этих реагентов приводит к взаимосвязанному перераспределению электронной плотности между ними и, как следствие, разрыву связи. Изменение зарядов ведет к естественным конформационным перестройкам и в итоге к выходу продуктов гидролиза и фермент-субстратного комплекса и регенерации фермента.

В рамках сделанных допущений приведенные модели описывают процесс конформационной релаксации в фермент-субстратном комплексе, ведущий к образованию продуктов реакции (см. § 2, гл. XIV). Структурные факторы определяют время образования продуктивной конфигурации. Увеличение размерности конфигурационного пространства N , зависящего от числа функциональных групп и необходимых одновременных контактов между ними, должно, конечно, приводить к замедлению этого процесса. Однако высокая скорость и направленный характер химических превращений в образованных многоцентровых активных конфигурациях не лимитирует общую скорость катализа. Таким образом, общая скорость ферментативного катализа определяется характерным временем образования нужной конформации в активном центре при естественном сближении соответствующих групп за счет внутримолекулярной динамики. Это время сравнимо по порядку величины с временами оборота фермента. □