



УДК 577.15.02

**КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ
ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА****Курганов Б. И., Венцель К.-В., Циммерманн Г.,
Яковлев В. А., Гофманн Э.***Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва;**Институт физиологической химии
при Университете им. Карла Маркса, Лейпциг, ГДР*

Изучены кинетические свойства фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) из эритроцитов человека. Показано, что кинетическая кооперативность по субстрату — фруктозо-6-фосфату — уменьшается с ростом концентрации фермента с одновременным уменьшением величины концентрации полунасыщения. Максимальная скорость ферментативной реакции проходит через максимум при увеличении концентрации фермента. Получены кривые зависимости удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы от концентрации фермента при различных фиксированных концентрациях фруктозо-6-фосфата и АТФ. Форма этих кривых объяснена с точки зрения модели кооперативно ассоциирующей ферментной системы, включающей неактивный димер (M 190 000) и активные мультимеры димерной формы. Сделан вывод, что кинетическая кооперативность по фруктозо-6-фосфату частично связана со смещением равновесия между олигомерными формами фосфофруктокиназы в сторону образования активных ассоциированных состояний фермента под действием фруктозо-6-фосфата. Предполагается, что ингибирование фосфофруктокиназы высокими концентрациями АТФ частично связано с усилением диссоциации фермента на неактивные димеры под действием АТФ.

Многочисленные исследования различных аллостерических ферментов показали, что одним из важнейших факторов, определяющих положение равновесия между олигомерными формами фермента, является присутствие субстратов, коферментов и аллостерических эффекторов. Смещение равновесия между олигомерными формами фермента, обладающими различной ферментативной активностью, под действием метаболитов-регуляторов является одним из механизмов регуляции аллостерических ферментов в клетке [1—7].

Смещение равновесия между олигомерными формами аллостерического фермента под действием субстрата или аллостерического эффектора должно приводить к отклонениям от простых кинетических законов (типа закона Михаэлиса — Ментен) и, в частности, к появлению S-образных кривых зависимости скорости ферментативной реакции v от концентрации субстрата S или аллостерического эффектора. Идея о том, что смещение равновесия между олигомерными формами аллостерического фермента может быть причиной появления кинетической кооперативности по субстрату или эффектору, была высказана независимо тремя группами исследователей [8—11]. Кинетическая кооперативность по субстрату в диссоциирующих и ассоциирующих аллостерических ферментных системах является функцией концентрации фермента. Например, гиперболическая

зависимость скорости ферментативной реакции, катализируемой *D*-лактатдегидрогеназой из *Aerobacter aerogenes*, от концентрации пирувата превращается в S-образную при достаточно больших концентрациях фермента [12]. Для фосфофруктокиназы из печени кролика переход от гиперболической зависимости v от $[S]_0$ к S-образной наблюдается, напротив, при повышении концентрации фермента [13].

Принципы анализа диссоциирующих и ассоциирующих аллостерических ферментных систем были разработаны в работах [11, 14—19]. Основное внимание уделяется при этом зависимости скорости ферментативной реакции, или удельной ферментативной активности, от концентрации фермента. Анализ этой зависимости, полученной при различных фиксированных концентрациях субстрата и аллостерических эффикторов, позволит изучить два типа аллостерических взаимодействий: аллостерические взаимодействия, опосредуемые смещением равновесия между олигомерными формами фермента, и аллостерические взаимодействия в индивидуальных олигомерных формах.

Ранее было показано, что фосфофруктокиназа из эритроцитов человека относится к классу ассоциирующих аллостерических ферментов и при достаточно больших концентрациях фермента представлена набором олигомерных форм, являющихся мультимерами димерной формы с M 190 000 [20]. Характер гель-хроматограммы при пропускании фермента через сефарозу 4В указывает на относительно низкую скорость взаимного превращения олигомерных форм. Именно это обстоятельство позволило сделать заключение об отсутствии каталитической активности у свободной димерной формы. Ранее было показано также, что удельная ферментативная активность фосфофруктокиназы зависит от концентрации фермента [20].

В настоящей работе изучены кинетические свойства фосфофруктокиназы из эритроцитов человека и предложена модель образования активных ассоциированных форм фермента.

Кинетические свойства фосфофруктокиназы из эритроцитов человека изучали в интервале концентраций фермента 0,02—1,68 мкг/мл. Зависимости удельной ферментативной активности a фосфофруктокиназы от концентрации субстрата — фруктозо-6-фосфата, $[S]_0$ — были получены при 1—5 мМ концентрациях АТФ. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что форма кривых зависимости удельной ферментативной активности от концентрации фруктозо-6-фосфата (2 и 5 мМ АТФ) меняется при варьировании концентрации фермента; это означает, что фосфофруктокиназа из эритроцитов человека относится к классу ассоциирующих аллостерических ферментов, регуляторные характеристики которых зависят от концентрации фермента.

В случае 2 мМ концентрации АТФ зависимость a от $[S]_0$ при достаточно малых концентрациях фермента имеет отчетливо выраженный S-образный характер (рис. 1, а). Однако с увеличением концентрации фосфофруктокиназы степень S-образности уменьшается, и при концентрации фермента 1,68 мкг/мл S-образность отсутствует. Аналогичная картина наблюдается и при 1 мМ концентрации АТФ.

Для описания S-образных кривых зависимости a от $[S]_0$ широко используется уравнение Хилла:

$$a = a_{\text{макс}} \frac{[S]_0^{n_H}}{[S]_{0,5}^{n_H} + [S]_0^{n_H}}, \quad (1)$$

где $a_{\text{макс}}$ — предельное значение a при $[S]_0 \rightarrow \infty$, $[S]_{0,5}$ — концентрация полунасыщения (концентрация субстрата, при которой $a = a_{\text{макс}}/2$) и n_H — коэффициент Хилла, который является мерой кинетической кооперативности по субстрату и для S-образных кривых превышает единицу. Коэффициент Хилла находят по экспериментальным данным в координатах

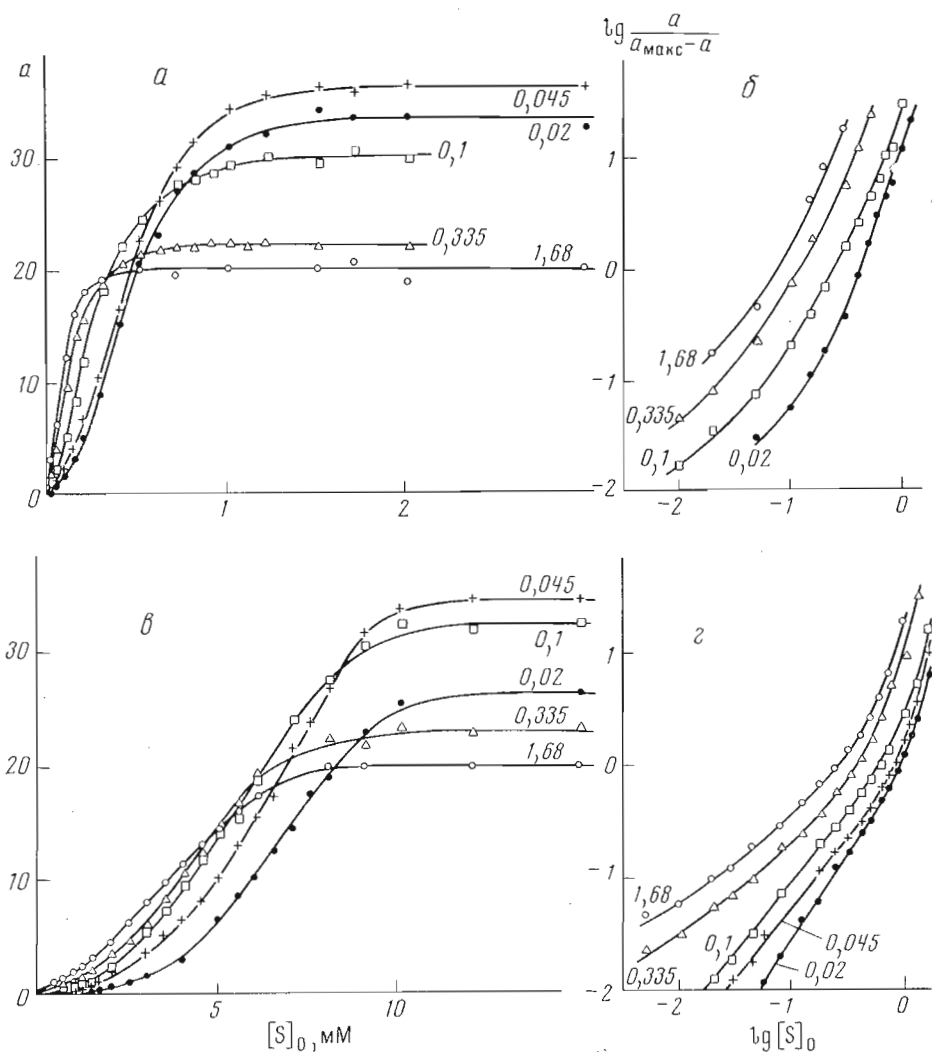


Рис. 1. Зависимость удельной ферментативной активности a фосфофруктокиназы из эритроцитов человека от концентрации фруктозо-6-фосфата $[S]_0$ при различных фиксированных концентрациях фермента $[E]_0$. 0,1 М трис-НСI буфер, рН 7,4; 25°. a и b — 2 мМ; $в$ и $г$ — 5 мМ АТФ. $a_{\text{макс}}$ — предельное значение a при $[S]_0 \rightarrow \infty$. a — мкмоль субстрата/мин·мг фермента. Цифры у кривых — использованные концентрации фермента $[E]_0$ в мг/мл

натах $\{\lg [a/(a_{\text{макс}} - a)]; \lg [S]_0\}$ в соответствии со следующим линейным соотношением:

$$\lg \left(\frac{a}{a_{\text{макс}} - a} \right) = n_H \lg [S]_0 - n_H \lg [S]_{0,5}. \quad (2)$$

На рис. 1, b экспериментальные данные (2 мМ АТФ) представлены в координатах Хилла. Нелинейность кривых зависимости $\lg [a/(a_{\text{макс}} - a)]$ от $\lg [S]_0$ указывает на невыполнимость уравнения Хилла. Поэтому в дальнейшем для характеристики формы кривых зависимости a от $[S]_0$ использовали значение переменного коэффициента Хилла в точке полунасыщения, т. е. при $[S]_0 = [S]_{0,5}$. Значение n_H в точке полунасыщения (\bar{n}_H) уменьшается с увеличением концентрации фермента (рис. 2, a). На рис. 2 представлена также зависимость величин $a_{\text{макс}}$ и $[S]_{0,5}$ от concentra-

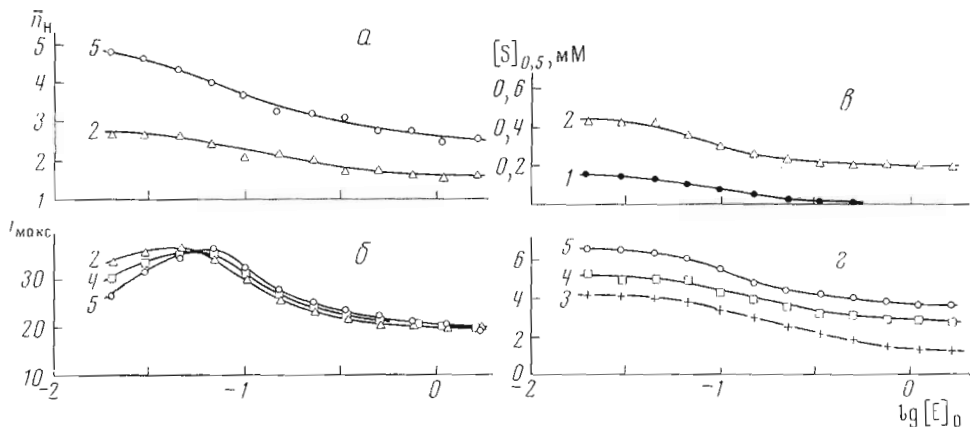


Рис. 2. Зависимости величин \bar{n}_H (а), a_{\max} (б) и $[S]_{0,5}$ (в и г) от концентрации фосфофруктокиназы $[E]_0$ при различных фиксированных концентрациях АТФ. $[E]_0$ — мкг/мл; цифры у кривых — концентрация АТФ, мМ

ции фермента: зависимость a_{\max} от $[E]_0$ проходит через максимум, а величина $[S]_{0,5}$ снижается с повышением концентрации фермента.

Важно отметить, что зависимость удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы от концентрации фруктозо-6-фосфата при концентрации фермента 1,68 мкг/мл, не будучи S-образной, обнаруживает тем не менее явное отклонение от гиперболы. Коэффициент Хилла близок к единице в этом случае только при достаточно малых концентрациях фруктозо-6-фосфата и заметно увеличивается после прохождения точки полунасыщения. Таким образом, можно считать, что в данном случае взаимодействия активных центров проявляются в росте переменного коэффициента Хилла при отсутствии S-образности кривой зависимости a от $[S]_0$. На существование подобного типа кинетических проявлений взаимодействия активных центров впервые было указано в работах [18, 21, 22].

При 5 мМ концентрации АТФ величины a_{\max} , $[S]_{0,5}$ и n_H в точке полунасыщения меняются аналогичным образом с повышением концентрации фермента, однако S-образный характер кривой зависимости удельной ферментативной активности от концентрации фруктозо-6-фосфата сохраняется при максимальной из использованных концентраций фермента — 1,68 мкг/мл.

На рис. 3 представлены кривые зависимости удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы от концентрации фермента в логарифмических координатах при различных фиксированных концентрациях фруктозо-6-фосфата. Во-первых, логарифмические координаты позволяют наглядно представить экспериментальные данные, полученные при изменении концентрации фермента на несколько порядков. Во-вторых, предельные значения тангенса угла наклона в логарифмических координатах позволяют в определенных случаях сделать заключения о числе субъединиц фермента, вовлекаемых в ассоциацию, а экстремальные значения тангенса угла наклона — о соотношении удельных ферментативных активностей олигомерных форм фермента [14]. В-третьих, использование логарифмических координат позволяет решить вопрос о правомочности оценки значений удельной ферментативной активности отдельных олигомерных форм фермента путем экстраполяции значений удельной ферментативной активности к бесконечно малым или бесконечно большим концентрациям фермента [16]. Наконец, представление экспериментальных данных в логарифмических координатах облегчает выбор модели ассоциации фермента, нахождение констант ассоциации и значений удельной ферментативной ак-

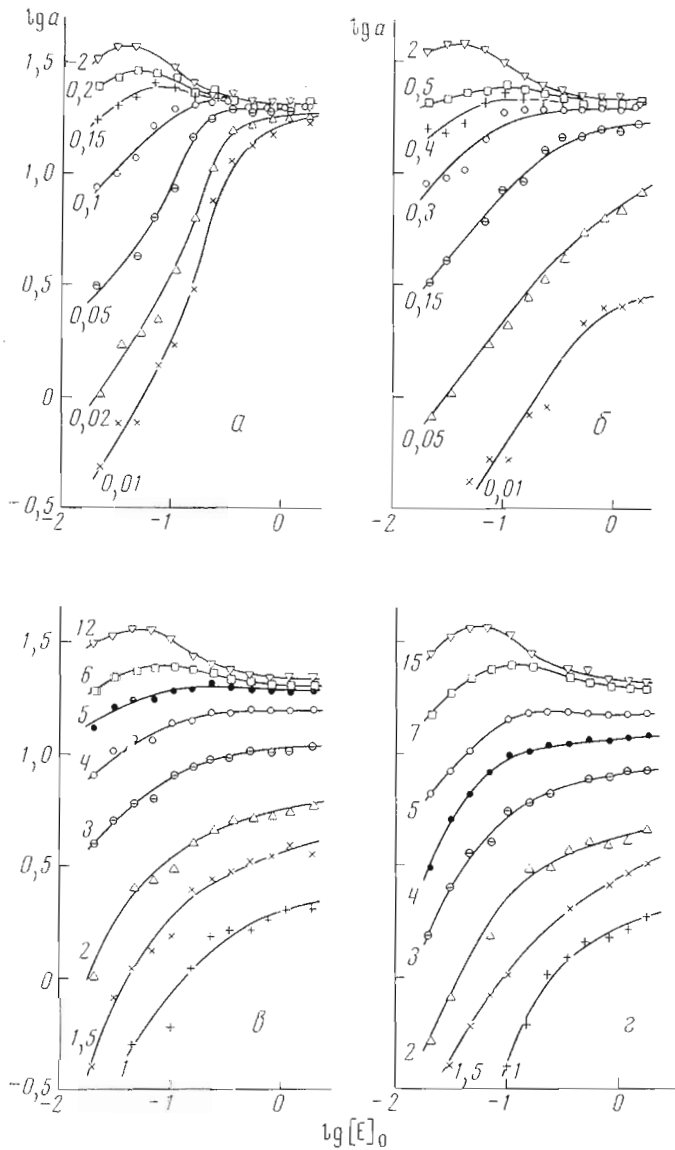


Рис. 3. Зависимость удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы от концентрации фермента в логарифмических координатах, полученные при различных фиксированных концентрациях фруктозо-6-фосфата. [АТФ], мМ: а — 1; б — 2; в — 4 и г — 5; цифры у кривых — концентрации фруктозо-6-фосфата, мМ

тивности олигомерных форм фермента путем сопоставления со стандартными графиками.

Анализ кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ (1 мМ АТФ) показывает (рис. 3, а), что при достаточно малых концентрациях фруктозо-6-фосфата удельная ферментативная активность фосфофруктокиназы монотонно снижается при уменьшении концентрации фермента. Кривая зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ в присутствии 0,01 мМ фруктозо-6-фосфата особенно интересна. Тангенс угла наклона кривой при достаточно малых концентрациях фермента близок к единице; с повышением концентрации фермента величина наклона возрастает, достигает максимального значения и затем снижается. Таким образом, экстремальное значение тангенса угла наклона

превышает единицу. В менее отчетливой форме подобная картина наблюдается и при 0,02 и 0,05 мМ концентрациях фруктозо-6-фосфата. Экстремальное значение тангенса угла наклона, превышающее единицу, означает, что зависимость a от $[E]_0$ является S-образной (рис. 4). С увеличением концентрации фруктозо-6-фосфата на кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ в выбранном интервале значений концентраций фермента появляется максимум (рис. 3, а).

При 2, 4 и 5 мМ концентрациях АТФ характер кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ с увеличением концентрации фруктозо-6-фосфата меняется аналогичным образом за исключением того, что тангенс угла наклона кривой зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ не превышает единицу ни при каких значениях концентраций фермента и фруктозо-6-фосфата.

Представляет интерес проанализировать форму кривых зависимости предельного значения a при $[E]_0 \rightarrow \infty$ от концентрации фруктозо-6-фосфата при 4 и 5 мМ концентрации АТФ. Предельные значения удельной ферментативной активности были получены путем экстраполяции к бесконечно большим концентрациям фосфофруктокиназы и представлены на рис. 5 как функции концентрации фруктозо-6-фосфата. Зависимости предельного значения удельной ферментативной активности от концентрации фруктозо-6-фосфата имеют S-образный характер и, следовательно, в отличие от низких концентраций АТФ (1 и 2 мМ) увеличение концентрации фермента при 4 и 5 мМ АТФ не приводит к исчезновению S-образного характера кривых зависимости удельной ферментативной активности от концентрации фруктозо-6-фосфата.

На рис. 6 представлены кривые зависимости удельной ферментативной активности от концентрации фермента в логарифмических координатах при различных фиксированных концентрациях АТФ, при которых удельная ферментативная активность увеличивается (0,01; 0,02 и 0,05 мМ АТФ) или уменьшается (1; 1,5; 2 и 2,5 мМ АТФ). Из данных, представленных на рис. 6, видно, что при переходе от области активации к области ингибирования фермента под действием АТФ удельная активность фосфофруктокиназы быстрее снижается при уменьшении концентрации фермента. Для ингибирующих концентраций АТФ наклон кривой зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ приближается к единице при достаточно малых значениях $[E]_0$. При 0,4 мМ концентрации фруктозо-6-фосфата переход к ингибирующим концентрациям АТФ сопровождается исчезновением максимума на кривой зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ в изученном интервале концентраций фермента.

Рис. 2, б показывает влияние АТФ на характер зависимости от концентрации фермента величины максимальной удельной ферментативной активности, достигаемой при бесконечно больших концентрациях фруктозо-6-фосфата. Видно, что увеличение концентрации АТФ от 2 до 5 мМ приводит к смещению максимума на кривой зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ в область больших значений концентраций фермента. Можно отметить также, что увеличение концентрации АТФ от 1 до 5 мМ приводит к увеличению концентрации полунасыщения $[S]_{0,5}$ для фруктозо-6-фосфата в изученном интервале концентраций фермента (0,02—1,68 мкг/мл; рис. 2, в и г).

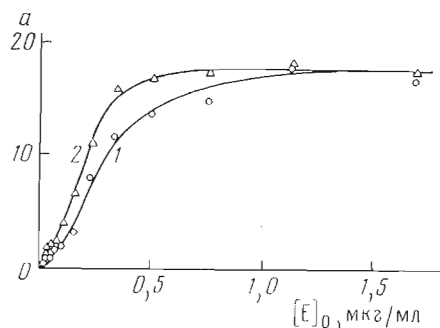


Рис. 4. S-образные кривые зависимости удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы от концентрации фермента при 0,01 мМ (1) и 0,02 мМ (2) концентрациях фруктозо-6-фосфата (1 мМ АТФ)

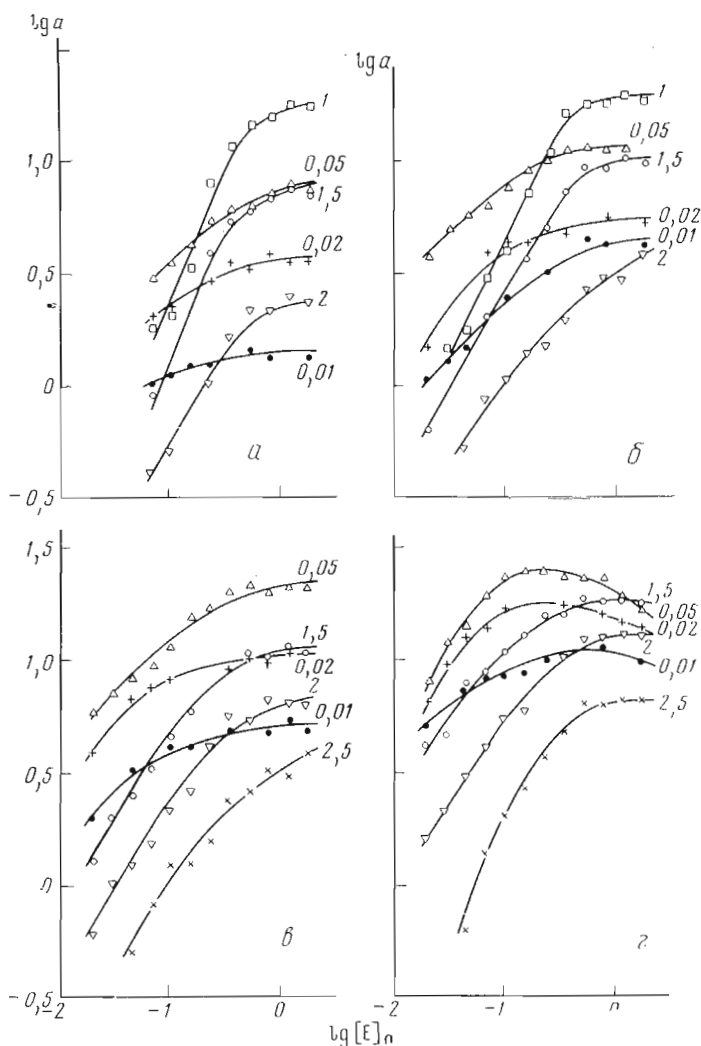


Рис. 6. Зависимости удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы от концентрации фермента в логарифмических координатах при различных фиксированных концентрациях АТР. Концентрация фруктозо-6-фосфата, мМ: *a* — 0,01; *б* — 0,02; *в* — 0,05 и *г* — 0,1. Цифры у кривых — концентрация АТР, мМ

сыщенными центрами ассоциации (т. е. имеющих соседа и слева и справа) обозначим через a_3 . Для рассматриваемой модели удельная ферментативная активность следующим образом связана с концентрацией свободного мономера:

$$a = a_2 \frac{2 \sum_{i=2}^{\infty} [M_i]}{[E]_0} + a_3 \frac{\sum_{i=3}^{\infty} (i-2) [M_i]}{[E]_0} = a_2 \frac{2K [M]^2}{[E]_0 (1 - K [M])} + a_3 \left\{ 1 - \frac{[M] (1 + 2K [M])}{[E]_0} - \frac{2K^2 [M]^3}{[E]_0 (1 - K [M])} \right\}. \quad (5)$$

Из уравнения материального баланса по ферменту получаем выражение, связывающее общую молярную концентрацию фермента (в расчете на

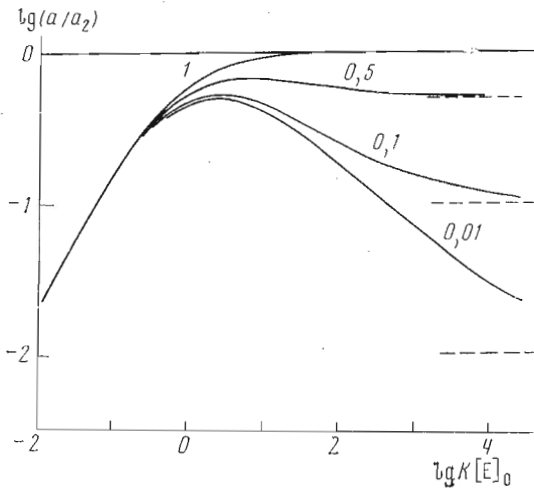


Рис. 7. Рассчитанные зависимости безразмерной удельной ферментативной активности a/a_2 от безразмерной концентрации фермента $K [E]_0$ в логарифмических координатах при различных значениях отношения a_3/a_2 (цифры у кривых)

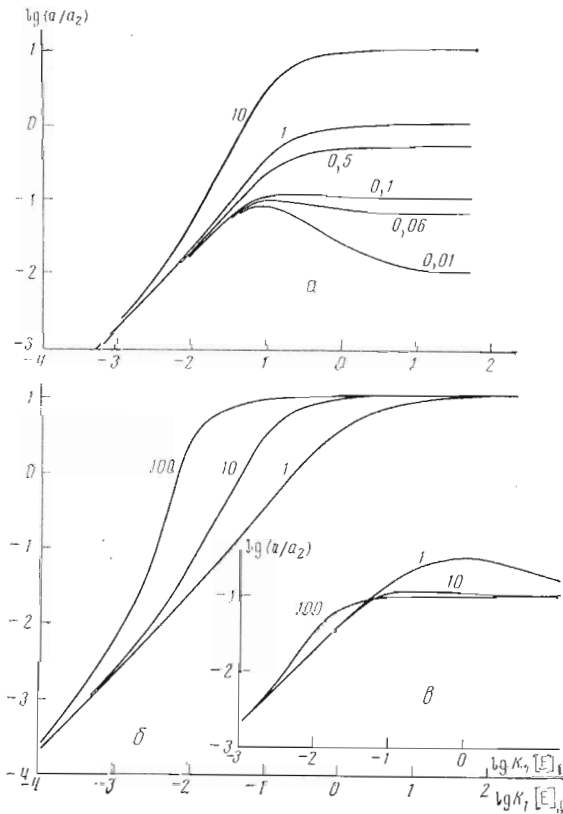


Рис. 8. Зависимости безразмерной удельной ферментативной активности a/a_2 от безразмерной концентрации фермента $K_1 [E]_0$ в логарифмических координатах при различных значениях отношений $\alpha = K/K_1$ и $\beta = a_3/a_2$: *a* — влияние величины параметра β (цифры у кривых) на форму кривых зависимости a/a_2 от $K_1 [E]_0$ при $\alpha = 10$; *b* и *c* — влияние величины параметра α (цифры у кривых) на форму кривых зависимости a/a_2 от $K_1 [E]_0$ при $\beta = 10$ (*b*) и $\beta = 0,1$ (*c*)

мономер) и концентрацию свободного мономера:

$$[E]_0 = \sum_{i=1}^{\infty} i [M_i] = \frac{[M]}{(1 - K [M])^2}. \quad (6)$$

Исключая $[M]$ из выражений (5) и (6), получаем

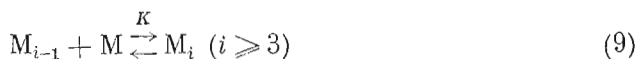
$$a = a_2 \frac{4(\sqrt{1 + 4K[E]_0} - 1)}{(\sqrt{1 + 4K[E]_0} + 1)^2} + a_3 \left(\frac{\sqrt{1 + 4K[E]_0} - 1}{\sqrt{1 + 4K[E]_0} + 1} \right)^2. \quad (7)$$

Форма кривой зависимости a от $[E]_0$ определяется величиной отношения a_3/a_2 . При $a_3/a_2 < 1$ зависимость a от $[E]_0$ проходит через максимум. На рис. 7 представлены рассчитанные при помощи уравнения (7) зависимости безразмерной удельной ферментативной активности a/a_2 от безразмерной концентрации фермента $K[E]_0$ в логарифмических координатах при различных значениях отношения a_3/a_2 . Из сопоставления этих теоретических зависимостей с зависимостями $\lg a$ от $\lg [E]_0$, полученными для фосфофруктокиназы из эритроцитов человека в эксперименте (рис. 3), следует, что обсуждаемая модель линейно ассоциирующего фермента приводит к слишком широкому максимуму на кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ и, следовательно, не пригодна для описания ассоциации фосфофруктокиназы из эритроцитов человека. Кроме того, модель (4) не позволяет объяснить значения экстремального наклона для кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$, превышающие единицу.

Для объяснения относительно узких максимумов на кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$, полученной при использовании фосфофруктокиназы из эритроцитов человека, следует предположить, что величина константы ассоциации растет по мере увеличения размера олигомера M_i (иначе говоря, процесс ассоциации носит кооперативный характер). Простейшей кооперативно ассоциирующей системой является система, которая включает стадию зародышеобразования



(с константой ассоциации $K_1 = [M_2]/[M]^2$) и стадию роста ассоциата



(с константой ассоциации $K = [M_i]/[M_{i-1}][M]$, причем $K > K_1$). Первая стадия менее вероятна, чем все последующие, поскольку в ядре M_2 мономер находится в контакте с одним соседом, а при последующих стадиях продолжения ассоциации присоединяющийся мономер может образовывать большее число контактов (см. схему).



Подобная модель ассоциации белковых молекул была предложена Оосава и Касаи [28] и теоретически проанализирована в работах [29, 30].

В модели кооперативно ассоциирующей ферментной системы, в которой мономер неактивен, удельную ферментативную активность димера M_2 обозначим через a_2 (в расчете на мономер). Далее обозначим через a_3 среднее значение удельной ферментативной активности мономера в олигомере M_i ($i \geq 3$) и примем, что оно одинаково для всех олигомеров M_i с $i \geq 3$. Для этой модели удельная ферментативная активность связана сле-

дующим соотношением с долей мономера $\gamma = [M]/[E]_0$:

$$a = a_2 \frac{2[M_2]}{[E]_0} + a_3 \frac{\sum_{i=3}^{\infty} i[M_i]}{[E]_0} = 2a_2 K_1 [E]_0 \gamma^2 + a_3 (1 - \gamma - 2K_1 [E]_0 \gamma^2) \quad (10)$$

Из уравнения материального баланса по ферменту получаем следующее соотношение, связывающее общую молярную концентрацию фермента (в расчете на мономер) и долю мономера γ :

$$\left(1 - \frac{K_1}{K}\right) \gamma + \frac{K_1}{K(1 - K[E]_0 \gamma^2)} - 1 = 0. \quad (11)$$

На рис. 8 представлены рассчитанные при помощи выражений (10) и (11) зависимости безразмерной удельной ферментативной активности a/a_2 от безразмерной концентрации фермента $K_1 [E]_0$ в логарифмических координатах при различных значениях отношений $K/K_1 = \alpha$ и $a_3/a_2 = \beta$. Рис. 8, а показывает влияние величины параметра β на форму кривых зависимости a/a_2 от $K_1 [E]_0$ при постоянном значении параметра α , равном 10. Все кривые имеют одну и ту же линейную асимптоту при $[E]_0 \rightarrow 0$: $a/a_2 = 2K_1 [E]_0$. В логарифмических координатах кривые асимптотически приближаются к прямой, тангенс угла наклона которой равен единице. При снижении параметра β на кривых зависимости a/a_2 от $K_1 [E]_0$ появляется максимум (кривые с $\beta = 0,1; 0,06$ и $0,01$). При выбранном значении параметра α (характеризующего степень кооперативности процесса ассоциации белковых молекул) максимумы на кривых зависимости $\lg(a/a_2)$ от $\lg K_1 [E]_0$ являются достаточно узкими, и, следовательно, кооперативно ассоциирующая ферментная система позволяет объяснить форму максимума на экспериментальных кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$.

При $\beta > 1$ максимум на кривых зависимости $\lg(a/a_2)$ от $\lg K_1 [E]_0$ невозможен. Интересно, что при достаточно больших значениях параметра β экстремальное значение тангенса угла наклона кривой зависимости $\lg(a/a_2)$ от $\lg K_1 [E]_0$ превышает единицу (при $\beta = 10$ и $\alpha = 10$ оно равно $\sim 1,8$; рис. 8, б). При увеличении параметра α до 100 экстремальное значение тангенса угла наклона кривой зависимости $\lg(a/a_2)$ от $\lg K_1 [E]_0$ возрастает до 3,6, а при уменьшении параметра α до 1 — снижается до 1,3 (рис. 8, б). Рис. 8, в показывает влияние величины параметра α на форму максимума на кривой зависимости $\lg(a/a_2)$ от $\lg K_1 [E]_0$ при постоянном значении параметра β , равном 0,1. При $\alpha = 10$ зависимость a/a_2 от $K_1 [E]_0$ имеет отчетливо выраженный максимум. С увеличением параметра α максимум исчезает (кривая с $\alpha = 100$). Интересно отметить, что при достаточно больших значениях параметра α экстремальное значение тангенса угла наклона кривой зависимости $\lg(a/a_2)$ от $\lg K_1 [E]_0$ превышает единицу. При уменьшении параметра α максимум на кривых зависимости $\lg(a/a_2)$ от $\lg K_1 [E]_0$ становится более отчетливым, однако при этом наблюдается его уширение (кривая с $\alpha = 1$).

Таким образом, модель кооперативно ассоциирующей ферментной системы позволяет объяснить форму кривых зависимости удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы из эритроцитов человека от концентрации фермента. Следует отметить, что форма кривой зависимости a от $[E]_0$ для модельной системы определяется четырьмя параметрами: a_2 , a_3 , K_1 и K . Надежная оценка этих параметров для каждой экспериментальной кривой зависимости a от $[E]_0$ и, следовательно, количественная проверка выполнимости предложенной нами модели кооперативно ассоциирующего фермента, на наш взгляд, невозможна. Для выполнения этой задачи зависимости удельной ферментативной активности от концентрации фермента должны быть получены в большем интервале концентраций фермента. Кроме того, необходимо провести независимое изучение ассоциации фосфофруктокиназы, а также структуры образующихся ассоциатов физическими методами.

С точки зрения модели кооперативно ассоциирующей ферментной системы можно объяснить изменения формы кривых зависимости удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы из эритроцитов человека от концентрации фермента при варьировании концентрации фруктозо-6-фосфата или АТФ. Важно прежде всего подчеркнуть, что константы ассоциации K_1 и K в выражениях (10) и (11) являются в общем случае кажущимися константами и зависят от концентраций фруктозо-6-фосфата и АТФ. Это означает, что при варьировании концентрации фруктозо-6-фосфата или АТФ происходит изменение каждого из четырех параметров (a_2 , a_3 , K_1 и K), определяющих форму кривой зависимости a от $[E]_0$. При увеличении концентрации фруктозо-6-фосфата общий характер изменений формы кривых зависимости a от $[E]_0$ таков, что фруктозо-6-фосфат препятствует снижению удельной ферментативной активности при уменьшении концентрации фермента (рис. 3). С точки зрения предложенной модели это означает, что фруктозо-6-фосфат препятствует диссоциации фосфофруктокиназы на неактивные димеры ($i = 1$; M 190 000) и стабилизирует активные ассоциаты фермента. Смещение равновесия между олигомерными формами фосфофруктокиназы в сторону образования активных ассоциатов фермента под действием фруктозо-6-фосфата должно приводить к появлению кинетической кооперативности по субстрату или усилению ее в тех случаях, когда обнаруживаются кооперативные взаимодействия активных центров в индивидуальных олигомерных формах фермента; при этом вклад в кинетическую кооперативность по субстрату, определяемый изменением олигомерного состояния фермента, должен уменьшаться с повышением концентрации фермента [14, 15]. Поэтому можно утверждать, что кинетическая кооперативность по фруктозо-6-фосфату для фосфофруктокиназы из эритроцитов человека частично связана со смещением равновесия между олигомерными формами фермента, причем вклад этого типа кинетической кооперативности в общую кинетическую кооперативность по субстрату уменьшается с увеличением концентрации фермента.

Переход от S-образных кривых зависимости $\lg a$ от $\lg [E]_0$ (т. е. кривых с точкой перегиба) к кривым с максимумом при увеличении концентрации фруктозо-6-фосфата для 1 мМ АТФ (рис. 3, а) связан в основном с уменьшением отношения a_3/a_2 от значений, превышающих 1, до значений, меньших 1, поскольку аналогичный переход за счет уменьшения величины отношения K_1/K привел бы к уширению максимума (рис. 8, е). Это означает, что ниже определенной концентрации фруктозо-6-фосфата удельная ферментативная активность мультимеров димерной формы D_i с $i \geq 3$ (a_3) превышает удельную ферментативную активность тетрамера D_2 (a_2), а выше этой концентрации фруктозо-6-фосфата наблюдается обратная картина. Объяснить подобный характер изменения соотношения между a_2 и a_3 с увеличением концентрации фруктозо-6-фосфата можно, если предположить, что мультимеры D_i с $i \geq 3$ характеризуются большим сродством к фруктозо-6-фосфату, но меньшей максимальной скоростью по сравнению с тетрамером D_2 .

Важно отметить, что зависимость максимальной удельной ферментативной активности (достигаемой при концентрации фруктозо-6-фосфата, стремящейся к бесконечности) от концентрации фермента включает как восходящую, так и нисходящую ветви. Этот факт означает, что при ассоциации димеров фосфофруктокиназы из эритроцитов человека не происходит исчезновения центров, связывающих фруктозо-6-фосфат (число центров в любом мультимере D_i в расчете на димер такое же, как и в свободном димере D). Действительно, если бы свободный димер не связывал субстрат, то при насыщающих концентрациях фруктозо-6-фосфата отсутствовала бы восходящая ветвь. С другой стороны, если бы образование мультимеров димерной формы D_i с $i \geq 3$ приводило бы к стерическому экранированию активных центров, то при насыщающих концентрациях фруктозо-6-фосфата отсутствовала бы нисходящая ветвь.

При переходе от активирующих концентраций АТР к ингибирующим наблюдается более быстрое снижение удельной ферментативной активности фосфофруктокиназы с уменьшением концентрации фермента (рис. 6). В соответствии с предложенной нами моделью это должно означать, что большие концентрации АТР усиливают диссоциацию фермента на неактивные димеры. Следовательно, ингибирование фосфофруктокиназы из эритроцитов человека высокими концентрациями АТР частично связано с диссоциацией активных ассоциатов фермента и образованием неактивных димеров.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты показывают, что фосфофруктокиназа из эритроцитов человека относится к классу ассоциирующих аллостерических ферментов. Раздельное изучение аллостерических взаимодействий, опосредуемых смещением равновесия между олигомерными формами фермента, и аллостерических взаимодействий в индивидуальных олигомерных формах в соответствии с разработанными ранее принципами [11, 14—19] оказалось, к сожалению, невыполнимой задачей на настоящем этапе ввиду относительной сложности процесса ассоциации фермента. Кинетические свойства фосфофруктокиназы из эритроцитов человека при различных концентрациях фермента могут быть описаны моделью кооперативно ассоциирующего фермента, включающей не менее четырех параметров. Тем не менее качественный анализ экспериментальных данных позволил сделать определенные заключения о характере влияния фруктозо-6-фосфата и АТР на положение равновесия между олигомерными формами фосфофруктокиназы из эритроцитов человека и о кинетических проявлениях этих эффектов.

Экспериментальная часть

Гомогенные препараты фосфофруктокиназы из эритроцитов человека получали по методу, описанному ранее [31].

Активность фосфофруктокиназы определяли спектрофотометрическим методом, регистрируя изменение оптической плотности при 334 нм в системе, содержащей наряду с фосфофруктокиназой и ее субстратами (фруктозо-6-фосфатом и АТР) 0,15 мМ NADH и «вспомогательные» ферменты — альдолазу, триозофосфатизомеразу и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу. Эти ферменты использовали в достаточно высоких концентрациях (10 мкг/мл), чтобы обеспечить независимость скорости исчезновения NADH от концентраций вспомогательных ферментов. Реакционная смесь содержала также 0,1 М трис-НСl (рН 7,1), 5 мМ 2-меркаптоэтанол и MgCl₂. Отношение концентраций ионов Mg²⁺ и АТР во всех опытах составляло 1 : 1. Ферментативную реакцию начинали добавлением фосфофруктокиназы к раствору, содержащему остальные компоненты. Для расчета скорости ферментативной реакции использовали стационарные участки кинетических кривых. Кинетические измерения проводили при 25°. Удельную ферментативную активность фосфофруктокиназы выражали в микромолях фруктозо-6-фосфата, превращенных в 1 мин 1 мг фермента.

Концентрацию белка определяли по ранее описанному методу [32], используя альбумин сыворотки человека в качестве стандарта.

Альдолаза, триозофосфатизомеразы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, фруктозо-6-фосфат, АТР и NADH — препараты фирмы «Boehringer» (ФРГ). Перед проведением опытов указанные ферменты диализовали против 0,1 М трис-НСl буфера, рН 7,1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Datta P., Gest H., Segal H. L. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 51, 125—130.
2. Frieden C. (1968) In: Regulation of enzyme activity and allosteric interactions (Kvamme E., Pihl A., eds.), Universitetsforlaget, Oslo, p. 59—71.
3. Bonsignore A., de Flora A., Mangiarotti M. A., Lorenzoni I., Cancedda R., Di-na D. (1968) Ital. J. Biochem., 17, 90—100.

4. Le John H. B., McCrea B. E., Suzuki I., Jackson S. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2484—2493.
5. Stancel G. M., Deal W. C., Jr. (1969) *Biochemistry*, **8**, 4005—4014.
6. Constantinides S. M., Deal W. C., Jr. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 5695—5702.
7. Frieden C. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 653—695.
8. Курганов Б. И. (1967) *Химия и технология полимеров*, **11**, 140—162.
9. Nichol L. W., Jackson W. J. H., Winzor D. J. (1967) *Biochemistry*, **6**, 2449—2456.
10. Frieden C. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 4045—4052.
11. Курганов Б. И. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 430—446.
12. Sawula R. V., Suzuki J. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1096—1101.
13. Ramaiah A., Tejwani G. A. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **39**, 1149—1156.
14. Курганов Б. И. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 17—27.
15. Курганов Б. И. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 166—179.
16. Силонова Г. В., Курганов Б. И. (1970) *Молекулярн. биология*, **4**, 445—458.
17. Курганов Б. И., Яковлев В. А. (1973) *Молекулярн. биология*, **7**, 429—447.
18. Kurganov B. I. (1973) *Acta biol. med. germ.*, **31**, 181—201.
19. Курганов Б. И. (1974) *Молекулярн. биология*, **8**, 525—535.
20. Zimmermann G., Wenzel K.-W., Gauer J., Hofmann E. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **40**, 501—505.
21. Кagan Z. S., Хашимов Д. А., Курганов Б. И. (1970) *Биохимия*, **35**, 937—952.
22. Kurganov B. I., Kagan Z. S., Dorozhko A. I., Yakovlev V. A. (1974) *J. Theor. Biol.*, **47**, 1—41.
23. Dessen P., Pantaloni D. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **8**, 292—302.
24. Chun P. W., Kim S. J., Stanley C. A., Ackers G. K. (1969) *Biochemistry*, **8**, 1625—1632.
25. Chun P. W., Kim S. J. (1969) *Biochemistry*, **8**, 1633—1643.
26. Reisler E., Pouyet J., Eisenberg H. (1970) *Biochemistry*, **9**, 3095—3102.
27. Markau K., Schneider J., Sund H. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **24**, 393—400.
28. Oosawa F., Kasai M. (1962) *J. Mol. Biol.*, **4**, 10—21.
29. Winklmair D. (1971) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **147**, 509—514.
30. Engel J., Winklmair D. (1972) In: *Protein-protein interactions. 23. Colloquium der Gesellschaft für biologische Chemie. 13—15 April 1972, Mosbach, Baden.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 159—181.
31. Wenzel K.-W., Gauer J., Zimmermann G., Hofmann E. (1972) *FEBS Lett.*, **19**, 281—284.
32. Janatova J., Fuller J. K., Hunter M. J. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3612—3622.

Поступила в редакцию
18.XI.1974

THE KINETIC PROPERTIES OF HUMAN-ERYTHROCYTE PHOSPHOFRUCTOKINASE

KURGANOV B. I., WENZEL K.-W., ZIMMERMANN G.,
YAKOVLEV V. A., HOFMANN E.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow
and Institute of Physiological Chemistry,
Karl-Marx-University, Leipzig*

The kinetic behaviour of human-erythrocyte phosphofructokinase has been analyzed over a wide range of enzyme concentration (0.02–1.68 $\mu\text{g/ml}$). The kinetic cooperativity becomes apparent when the enzymatic reaction rate is plotted versus fructose 6-phosphate concentration and decreases with raise in enzyme concentration. Simultaneously, a fall of the half-saturation for fructose 6-phosphate is observed. Maximal velocity passes through a maximum with increasing enzyme concentration. Sets of curves representing specific enzyme activity of phosphofructokinase versus the enzyme concentration, obtained at various fixed concentrations of fructose 6-phosphate and ATP, were analyzed. The shape of these curves is interpreted in terms of a model developed for a cooperatively associating enzyme system which involves the inactive dimer (mol. weight 190 000) and active multimers of the dimeric form. The conclusion is drawn, that the sigmoidal shape of the plots of the enzymatic reaction rate versus fructose 6-phosphate concentration is, at least partially, caused by the displacement of the equilibrium between oligomeric forms of phosphofructokinase towards active multimers under the influence of fructose 6-phosphate. The enzyme inhibition by high concentrations of ATP could result from a shift of this equilibrium in favor of inactive dimer.