



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.152.27.02

### МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕНОСА ФОСФОРИЛЬНОЙ ГРУППЫ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

*Кочетков С. И., Габитов А. Г., Северин Е. С.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

В обзоре рассмотрены основные достижения в области катализа переноса фосфорильной группы в ферментативных и модельных системах, отмечены перспективы развития этого направления.

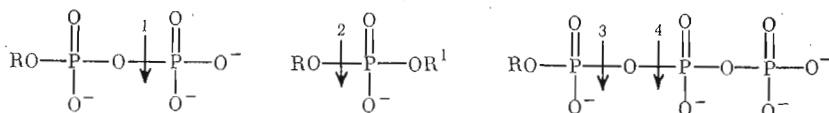
На примере ряда фосфотрансфераз продемонстрированы возможности стереохимического, кинетического, структурно-функционального исследования для установления молекулярного механизма действия фермента.

Обсуждается роль ковалентного, кислотно-основного, электрофильного катализа в процессе переноса фосфорильной группы.

#### Введение

Отщепление фосфорильной группы, происходящее в результате разрыва сложноэфирной или ангидридной связи, важно в регуляции клеточного метаболизма на всех уровнях. Это во многом обусловило то пристальное внимание, которое уделяется изучению различных аспектов механизма переноса фосфорильного остатка в модельных ферментативных системах.

Эти процессы катализируются ферментами различных классов:



1 – фосфокиназы, фосфатазы, пирофосфатазы, фосфомутазы, 2 – нуклеазы, фосфодиэстеразы, фосфолипазы; 3 – нуклеотидилтрансферазы, нуклеотидилциклазы; 4 – пирофосфокиназы, фосфокиназы, АТФ-азы.

Механизмы реакций, катализируемых ферментами столь различных классов, безусловно имеют ряд принципиальных отличий. Более того, часто даже внутри одного класса ферментов наблюдаются весьма значительные различия в механизмах. В то же время ряд общих черт таких реакций, обусловленных в первую очередь характером переносимой группировки, делает целесообразным обобщенное рассмотрение литературных данных, касающихся изучения их механизма.

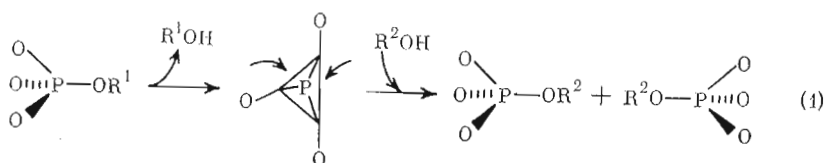
Такое обсуждение стало возможным вследствие широкого развития в последние годы исследований физико-органических аспектов реакций переноса фосфорильной группы как в модельных системах, так и в конкретных ферментативных процессах. В настоящее время имеются обзоры, суммирующие данные по органической химии этих процессов [1], стереохимии реакций [2, 3], роли металлов в катализе [4–6], а также по структурно-функциональным и физико-химическим исследованиям соответствующих ферментов [2, 7–9]. Такой многоплановый подход позволяет обобщить закономерности ферментативного переноса фосфорильной группы, изучить вклад в этот процесс нуклеофильного, электрофильного, кислотно-основного катализа, роль конкретных аминокислотных остатков активных центров ферментов, участвующих в связывании и трансформации субстрата, а также кинетических механизмов фосфотрансферазных реакций.

В обзоре мы сделали попытку проанализировать различные направления исследований механизмов переноса фосфорильных групп в основном на примере ферментов, катализирующих разрыв  $\beta$ - $\gamma$ -пирофосфатной связи АТФ, и в первую очередь на примере фосфокиназ, катализирующих перенос  $\gamma$ -фосфорильной группы на различные соединения: гуанидиновую группу (креатинкиназа, аргининкиназа), гидроксильную группу гексоз (гексокиназа), гидроксильную группу серина, треонина или тирозина белковых субстратов (протеинкиназа), кетогруппу (пируваткиназа), карбоксильную группу (3-фосфоглицераткиназа) и т. д. Это вызвано тем, что многие классические исследования механизмов переноса фосфора проведены именно на фосфокиназах.

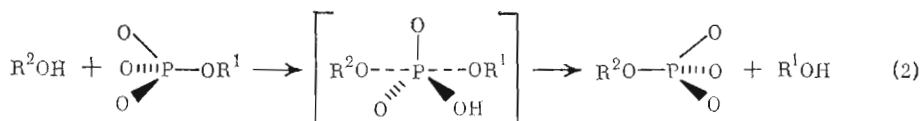
## 1. Химия реакций переноса фосфорильной группы

Реакции нуклеофильного замещения у атома фосфора могут протекать по моно- и бимолекулярным механизмам. К ним приложима теория  $S_N1$  —  $S_N2$ -механизмов, развитая для нуклеофильного замещения у атома углерода в работах Ингольда [10]. На основе анализа модельных неферментативных систем предложены четыре крайних случая механизма сольволиза фосфорилсодержащих соединений [1, 11, 12]:

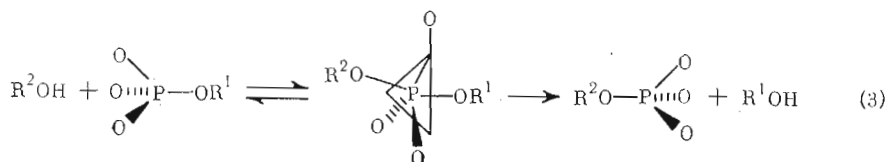
1) диссоциативный



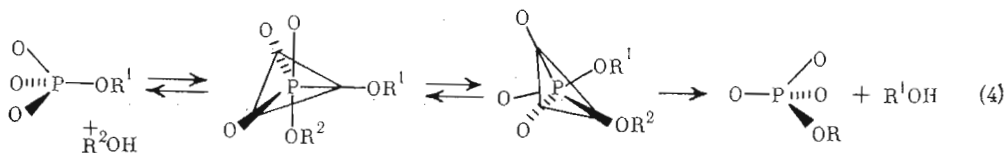
2) ассоциативный, с образованием переходного состояния



3) ассоциативный, с образованием пентаковалентного интермедиата



4) ассоциативный, с образованием пентаковалентного интермедиата с псевдотворщением

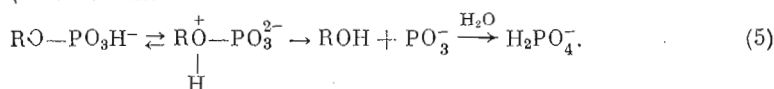


В случае диссоциативного механизма реакция мономолекулярна, и в ходе ее образуется мономерный интермедиат — планарный метафосфат-анион, являющийся сильным электрофилом с крайне высокой реакционной способностью. По аналогии с замещением у атома углерода равномерно сольватированный метафосфат-анион соответствует карбаниону в механизме  $S_N1$ . Скоростьлимитирующей стадией реакции в данном случае

является отщепление уходящей группы R'OH. На последующей быстрой стадии метафосфат реагирует с нуклеофилом. Эта стадия протекает неизбирательно, и, если реакция проводится с асимметрическим фосфором, в общем случае наблюдается рацемизация.

Следующие три механизма аналогичны  $S_N2$  и отличаются образованием и разложением постулированного пентавалентного тригонального интермедиата. Согласно второму механизму, получившему название линейного («in-line») согласованного, атакующий нуклеофил реагирует с фосфором со стороны, противоположной уходящей группе. Естественно, что в этом случае конфигурация хиральной фосфорильной группы претерпевает инверсию. Реакция бимолекулярна и проходит в одну стадию. Механизмы (3) и (4) отличаются количеством стадий и стереохимией. Если в третьем случае пентавалентный интермедиат — тригональная бипирамида — имеет уходящую группу R'OH и вытесняющий нуклеофил R<sup>2</sup>OH в апикальном положении, а кислородные заместители — в экваториальном, то в механизме (4) уходящая группа находится в экваториальном положении, а атакующий нуклеофил — в апикальном. Таким образом, в механизме (3) интермедиат переходит в продукты путем отщепления уходящей группы из апикального положения, тогда как в механизме (4) R'OH не может высвободиться из первого интермедиата, так как R'O-группа находится в экваториальном положении. Следовательно, образованию продуктов реакции в случае (4) предшествует перестройка посредством псевдовращения с образованием второго интермедиата, где OR' занимает апикальное положение. Подробное рассмотрение деталей приведенных ассоциативных механизмов дано в работах Уэстхаймера [11, 13]. Обосновано, что в случае (3) хиральный центр — фосфор претерпевает инверсию конфигурации (как в случае (2)), а при выполнимости механизма (4) конфигурация сохраняется.

В литературе по физико-органической химии фосфора накоплен большой экспериментальный материал по сольволизу различных фосфорсодержащих соединений [12–20]. Сделаны попытки описать исследуемые реакции в рамках механизмов (1)–(4), теоретически предсказать смену формального механизма в зависимости от структуры исследуемых соединений. Так, еще в 1955 г. Уэстхаймером [14] и Бантоном с сотр. [15] для гидролиза моноэфиров фосфорной кислоты при pH < 4 был обоснован предложен следующий механизм:

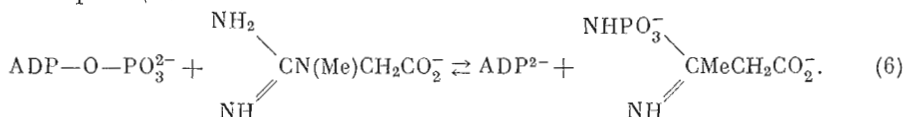


Принципиально он соответствует диссоциативной схеме и предполагает образование метафосфат-аниона. Начиная с этих работ была признана возможность экспериментального доказательства диссоциативного механизма и был собран ряд косвенных данных, свидетельствующих об образовании реакционноспособного интермедиата — метафосфат-аниона. Так, для рассматриваемых процессов типа (5): а) энтропия активации близка к 0, в то время как для бимолекулярного процесса она должна составить ~20 э.е. [17, 21]; б) отмечена корреляция между молярным отношением акцентирующих нуклеофилов в водно-спиртовом растворе и молярным отношением образованных продуктов, что свидетельствует в пользу образования в ходе реакции реакционноспособного и малоизбирательного интермедиата [22]; в) коэффициент Бренстеда β уходящей группы фениловых эфиров равен 1,2 для дианионов и 0,3 для моноанионов. Это указывает на то, что разрыв связи превалирует в скоростьлимитирующем образовании переходного состояния [12]; г) реакционная способность моноанионов чаще превышает таковую нейтральных соединений, что указывает на малую вероятность скоростьлимитирующей нуклеофильной атаки [14, 15]; д) в реакции аминов с *n*-нитрофенилфосфатом величина β невелика — 0,13 [12]; е) кинетический изотопный эффект <sup>18</sup>O показывает наличие скоростьлимитирующего разрыва C — <sup>18</sup>O — P-связи [23]; ж) перенос фосфорильной группы между двумя фазами в диоксане позволяет идентифи-

цировать метафосфат-анион как интермеднат [24]; 3) мономерный метафосфат образуется в аполярных и полярных растворителях и соответствует предсказанным свойствам высокоэлектрофильной частицы [25].

Вероятность образования метафосфат-аниона и, следовательно, возможность описания реакции диссоциативной схемой во многом зависит от основности уходящей группы. Если уходящая группа имеет слабоосновные свойства, время жизни метафосфат-аниона значительно и диссоциативный механизм может иметь место. При увеличении основности уходящей группы последняя активно вступает в обратную реакцию с метафосфатом, что исключает возможность рассмотрения диссоциативного механизма. Так, увеличение степени этерификации или протонирования дианиона эфира вызывало возрастание коэффициента  $\beta$  нуклеофила (для 2,4-динитрофенилфосфата моноаниона до 0,3–0,4), что позволило сделать вывод об «ассоциативном» в этом случае характере переноса фосфорила [2]. Для триэфиров скорость реакции значительно зависит от величины  $pK$  атакующего нуклеофила и уходящей группы. В этом случае реакция подчиняется ассоциативному механизму и проходит с образованием пентаковалентного интермедната — тригональной бипирамиды (механизм 3) [2].

Пентакоординатные оксифосфораны (особенно циклические эфиры) могут явиться примером применимости механизма (4) с псевдобрращением [13]. Для того чтобы придать теории нуклеофильного замещения у атома фосфора количественный характер, Кирби [26] по аналогии с диаграммами Дженкса [27] для карбонильных соединений составил граничные условия ассоциативного и диссоциативного механизмов, взяв за основу величину  $pK$  уходящих групп. Для «хороших» уходящих групп ( $RON$ ,  $ArON$  с  $pK$  сопряженной кислоты менее 4) метафосфат образуется быстро, и механизм имеет диссоциативный характер. Для неферментативных систем с переносом фосфорила на азот значение  $pK$  4 определено Кирби как граничное. Эти представления были распространены Кирби также на ферментативный катализ. Им были определены граничные условия для креатинкиназной реакции:



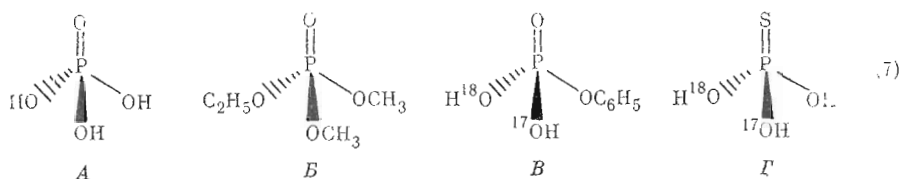
Учитывая, что ADP в физиологических условиях имеет  $pK$  6, автор делает вывод, что эта реакция нуклеофильного замещения протекает исключительно по ассоциативному механизму. Это подтвердилось и данными ЯМР-спектроскопии, позволившими составить модель активного центра рассматриваемого фермента [28]. Для ферментативных реакций переноса фосфорильных групп значение граничной величины  $pK$  ( $pK$  4), несомненно, сдвигается в сторону более низких значений из-за большей реакционной способности групп активного центра фермента по сравнению с модельными неферментативными превращениями [26]. По утверждению Кирби [26], все ферментативные реакции переноса фосфорильной группы, донором которой является АТР, а акцептором как азот, так и кислород, должны проходить по ассоциативному механизму. Преимущественное прохождение ферментативных реакций по ассоциативному механизму признает и Миллван [4], отводя тем не менее диссоциативному механизму определенную роль в катализе переноса фосфорильной группы отдельными ферментами.

Дискриминирование реальных химических процессов в рамках представленных схем (1) — (4), несомненно, важно для понимания механизмов протекания реакций замещения у атома фосфора и, как будет видно из дальнейшего описания, имеет принципиальное значение для химической энзимологии. В то же время необходимо учитывать, что механизмы (1) — (4) являются, по точному выражению Ноулса [1], «экстремальными» и зачастую не могут адекватно описать реальное протекание процесса даже в модельных системах, не говоря уже о ферментативном переносе фосфорила. Определенную ясность в этот вопрос могут внести стереохимические исследования. Действительно, как нами подчеркивалось, диссоциативный

механизм и варианты ассоциативного механизма в своей классической формулировке различаются изменением конфигурации асимметрического центра у атома фосфора в ходе реакции.

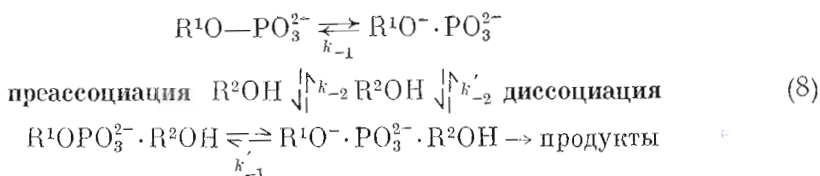
Молекула фосфорной кислоты (7А) имеет тетраэдрическую структуру с несколько неравными гранями из-за неэквивалентности заместителей (кислород с двойной связью и гидроксильные группы). Атомы водорода гидроксильных групп легко подвержены протонному обмену, в то время как скорость обмена кислородов пренебрежимо мала и не учитывается в большинстве исследований. Легко видеть, что немодифицированный фосфорил не является асимметрическим. Это мешает применить подходы стереохимии для анализа механизмов ферментативных и некаталитических реакций фосфорорганических соединений — природных субстратов.

Синтетически были получены три основных класса хиральных фосфориллов (7В, В, Г), причем в двух последних случаях хиральность тетраэдрического фосфора достигнута замещением атома  $^{16}\text{O}$  на его изотопы.



Соединения В—Г существуют в виде анионов. Наибольший интерес в исследовании механизма модельных и ферментативных реакций, несомненно, вызывают соединения типов В и Г. Синтез этих соединений, а также методы масс-спектрометрического и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-анализа реакций с их участием разработаны в основном благодаря исследованиям Ноулса и Экштейна [1, 29—33].

Применение хиральных аналогов фосфорных эфиров и нуклеотидов позволило детализировать многие механизмы, отказаться от ошибочных представлений, а в ряде случаев поставить и новые вопросы. Основная масса работ в этой области приходится на последние 3—4 года, причем исследования ведутся с различными фосфорорганическими соединениями и направлены в этом случае на дальнейшее развитие теории нуклеофильного замещения у атома фосфора, а также с ферментативными системами и в этих случаях имеют своей целью получить дополнительные данные об интермедиатах, образующихся в ходе каталитического акта. Значимость нового направления для дальнейшего развития химии фосфора и химической энзимологии трудно переоценить. Так, недавно Бочвалд и Ноулс [18] при помощи хиральных ( $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ) аналогов фосфорных моноэфиров проанализировали стереохимию хорошо изученных ранее реакций их сольволиза [14, 15, 21, 34]. Выше мы отмечали, что большинство этих реакций при невысоких значениях рН (т. е. когда равновесие системы смещено в сторону образования моноаниона, см. (6)) идут достаточно быстро и подчиняются диссоциативной схеме (1). Исходные эфиры, использованные в работе [18] — фенил- [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ] фосфат-моноанион и 2,4-динитрофенил- [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ] фосфат-дианион, — имели S-конфигурацию фосфора ( $86 \pm 7$  и  $87 \pm 3\%$  соответственно). Продукты метанолиза имели R-конфигурацию ( $80 \pm 1$  и  $86 \pm 5\%$ ), т. е. фосфотрансферная реакция прошла с полной инверсией. Таким образом, новые данные не свидетельствуют в пользу образования в ходе реакции симметрично сольватированного интермедиата — метафосфат-аниона (диссоциативный механизм). Если такая частица действительно образовывалась, то она подвергалась нуклеофильной атаке со стороны противоположно уходящей группы. Анализ результатов предыдущих исследований в совокупности с новыми данными позволил Ноулсу [18] и Дженксу [35] сформулировать концепцию «преассоциативного механизма», не имеющую аналогов в классических «экстремальных» схемах (1)—(4), приведенных в начале раздела. На схеме (8) показана диссоциативная и преассоциативная части механизма переноса фосфорилла от донора  $\text{R}^1\text{OPO}_3^{2-}$  к акцептору  $\text{R}^2\text{OH}$ .



Когда комплекс  $\text{R}^1\text{O}^- \cdot \text{PO}_3^{2-} \cdot \text{R}^2\text{OH}$  распадается до исходных реагентов (с константой скорости  $k_{-1} \cdot k_2$ ) быстрее, чем нуклеофил-акцептор может диффундировать из комплекса с константой  $k_{-2}$ , обратная реакция идет по преассоциативному пути.

Преассоциативный механизм может быть согласованным или постадийным. В случае согласованного механизма (когда в ходе реакции не образуется интермедиата с временем жизни, большим, чем одно колебание) на основании полученных данных по стереохимии и данных по кинетике сольволиза необходимо постулировать образование переходного состояния, в котором разрыв связи «уже почти прошел, а образование новой еще не завершено» [18]. Если же реакция постадийна, то на основе стереохимических данных она пойдет по преассоциативному пути. Таким образом, по мнению Ноулса, «если термин «метафосфат» используется для описания состояния фосфора и связанных с ним лигандов, образующих интермедиат в реакции сольволиза подобных моноэфиров, то необходимо признать, что «метафосфат» может расформироваться только двумя путями: разложиться на исходные компоненты без изменения конфигурации у фосфора или прореагировать до продуктов с инверсией у фосфорного центра» [18]. Использование аналогов с асимметрическим фосфором, 2-фосфопропан-1,2-диола и 1-фосфопропан-1,2-диола, позволило детально доказать для реакций миграции 1,2-фосфогруппы циклических фосфорных эфиров ассоциативный механизм с псевдоротацией [19].

Использование соединений с асимметрическим атомом фосфора в качестве субстратов ферментов показало, что большинство из рассмотренных реакций (24 из 32, по данным [1]) проходят с обращением конфигурации. Киназные реакции, в которых в качестве субстрата-донора были взяты аналоги АТФ —  $[\gamma\text{-}^{16}\text{O}, \text{}^{17}\text{O}, \text{}^{18}\text{O}]\text{АТФ}$ ,  $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}, \text{S}]\text{АТФ}$  и др., — для гексокиназы, пируваткиназы, глицераткиназы, ацетаткиназы проходили с обращением конфигурации [3]. Нуклеозиддифосфаткиназа катализировала фосфотрансферазную реакцию с сохранением конфигурации. Следовательно, указанные данные исключали возможность «классического диссоциативного» механизма для исследованных реакций, так как ни в одном случае не наблюдалась рацемизация. Полученные результаты согласуются с ассоциативным механизмом, а сохранение конфигурации в случае нуклеозиддифосфаткиназы легко объясняется двойным замещением при образовании и разложении кинетически компетентного интермедиата — фосфорилфермента (механизм пинг-понг би-би, см. раздел 2). На основании данных стереохимии был сделан вывод об отсутствии двойного замещения у других исследованных киназ и, следовательно, об отсутствии «кинетиически компетентных» ковалентных интермедиатов у этих ферментов. Это совпадает, в частности, с известными кинетическими данными для глицераткиназы, пируваткиназы и гексокиназы [4].

Таким образом, стереохимические исследования изменения конфигурации фосфорильной группы в ферментативных реакциях могут ответить на принципиальный для химической энзимологии вопрос — проходит ли реакция через образование ковалентного интермедиата. Следует, однако, учитывать, что для однозначного решения столь важного вопроса данные стереохимических исследований необходимо рассматривать в совокупности с результатами кинетического анализа ферментативной реакции. Последнее утверждение подкрепляется анализом литературных данных по ацетаткиназе. Результаты кинетического исследования для этого фермента носят противоречивый характер, а отвергать «кинетиическую компетентность» фосфорилпроизводного лишь на основании стереохимии (инверсия) оказалось необоснованным. Действительно, в одной из недавних работ

[36] Спектор предложил для этого фермента механизм тройного замещения с участием двух ковалентных интермедиатов. Этот механизм находится в полном согласии с данными по обращению конфигурации.

В настоящем разделе мы не ставили своей задачей рассмотреть стереохимические механизмы всех исследованных фосфорилпереносящих ферментов (см., например, подробный обзор Фрея [8]), а стремились продемонстрировать лишь тенденции развития этого направления исследований. Исследования неферментативных реакций фосфорорганических соединений характеризуются стремлением к максимально адекватному описанию результатов эксперимента в рамках формальных механизмов. При этом детализируются «экстремальные» схемы (1) — (4). С другой стороны, в энзимологии в настоящее время наблюдается накопление фактического материала для ответа на вопрос: «инверсия или сохранение конфигурации, двойное замещение или нет». В самое последнее время, однако, появился ряд работ [8, 37, 38], авторы которых стремятся связать результаты, полученные современными кинетическими методами, прежде всего изотопными, с результатами стереохимических исследований ферментативных реакций и с их помощью представить поэтапный молекулярный механизм переноса фосфорильной группы.

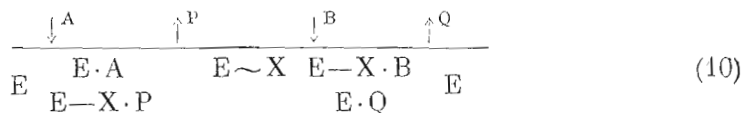
## 2. Кинетические механизмы ферментативного переноса фосфорильной группы

Большинство известных ферментов катализируют превращение мульти-субстратных систем. Многие из них, в частности катализирующие реакции переноса фосфила, в том числе обширный класс киназ, катализируют двухсубстратные реакции типа

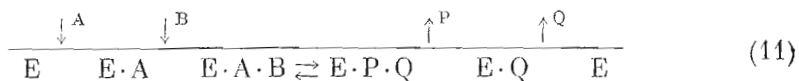


где A, B — субстраты, P, Q — продукты. Стационарная кинетика этих реакций в условиях постоянства концентрации одного из субстратов и при переменной концентрации другого обычно подчиняется зависимости Михаэлиса — Ментен. Формально-кинетический анализ мультисубстратных ферментативных систем в настоящее время разработан в основном исследованиями Кинга и Альтмана (см. [39]), предложившими выводить уравнения стационарной скорости сложных ферментативных реакций на основе теории графов, и Келланда [40], выдвинувшего доступную и весьма строгую классификацию сложных мультисубстратных реакций. Согласно этой классификации, для рассматриваемой двухсубстратной ферментативной реакции возможны следующие варианты механизмов:

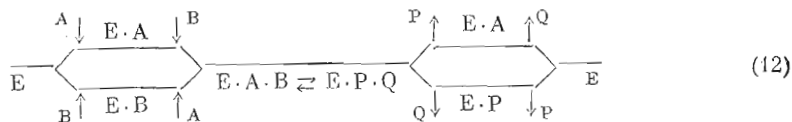
*механизм двойного замещения, пинг-понг би-би:*



*последовательный механизм с упорядоченным присоединением субстратов:*



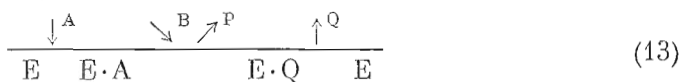
*последовательный механизм с неупорядоченным присоединением субстратов:*



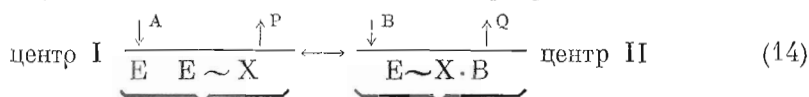
(обозначения: A и B — субстраты; P, Q — продукты; E ~ X — фосфорилфермент).

Легко видеть, что представленные схемы принципиально различаются с точки зрения химической кинетики — порядком присоединения реагентов, высвобождения продуктов, характером интермедиатов катализа. Особенностью механизма пинг-понг является то, что первый продукт высвобождается до присоединения второго субстрата и в ходе реакции образуется ковалентное фосфорилпроизводное.

В литературе описаны также различные модификации представленных механизмов, например частный случай упорядоченного механизма — механизм Теорелла-Чанса (см. [41]):



или модификация классической схемы пинг-понг [41]:



Исследование стационарной кинетики, отражающей лимитирующие стадии процесса, имеет лишь ограниченное применение для установления детального механизма действия фермента. Однако дискриминация механизмов ферментативных реакций в рамках схем Клеянда на основании только данных стационарной кинетики является необходимым предварительным этапом для дальнейшей детализации при помощи других методов.

Представленные в настоящем разделе схемы (10) — (12), как и схемы (1) — (4) (раздел 1), можно рассматривать как «экстремальные». В реальных фосфорилпереносящих системах ситуация зачастую более сложная, а механизм реакции можно описать как пограничный для приведенных формальных схем. Большинство авторов, однако, все же пытаются описывать свои экспериментальные результаты в рамках приведенных выше механизмов.

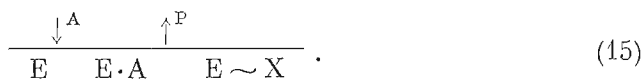
Для указанных механизмов реакции графики зависимости начальных скоростей от концентрации субстратов в двойных обратных координатах различаются. Так, механизму пинг-понг в общем случае соответствует серия параллельных прямых, а последовательному механизму — серия пересекающихся прямых. Однако это не позволяет однозначно доказать тот или иной механизм, поскольку серия полученных прямых может быть «псевдопараллельной», если «величина взаимодействия» в уравнении начальной скорости для последовательного механизма будет мала [42]. Это было показано, в частности, для механизма действия гексокиназы [42].

Чтобы подтвердить предварительный вывод о применимости механизма пинг-понг или разграничить случаи последовательного механизма с упорядоченным или неупорядоченным присоединением субстратов, крайне эффективным оказался метод ингибирования реакции «тупиковыми ингибиторами» и продуктами реакции. Этот метод был предложен Фроммом (см. [42]) для установления механизма гексокиназной реакции и затем с успехом применен для анализа механизма нуклеозиддифосфаткиназы [43, 44], фосфофруктокиназы [45], сАМР-независимой протеинкиназы [46], а также различных ферментов других классов. Действительно, согласно кинетической схеме пинг-понг (10), фермент в реакции находится в двух осциллирующих формах: нативной  $E$  и фосфорилированной  $E \sim X$ . Следовательно, первый продукт  $P$  должен быть конкурентным ингибитором по отношению ко второму субстрату  $B$  и неконкурентным по отношению к первому ( $A$ ), поскольку  $P$  и  $B$  связываются с одной и той же формой фермента ( $E \sim X$ ), а  $P$  и  $A$  — с разными ( $E \sim X$  и  $E$ ). Исходя из аналогичных соображений, ингибирование реакции вторым продуктом  $Q$  должно быть конкурентным по отношению к  $B$  и неконкурентным по отношению к  $A$ . Приведенные закономерности позволили доказать применимость классической схемы пинг-понг для нуклеозиддифосфаткиназы и отвергнуть ее для гексокиназы. Согласно аналогичным рассуждениям, в случае последовательного механизма обоих типов конкурентный ингибитор для первого



субстрата будет неконкурентным для второго. Основные различия заключаются во взаимоотношении конкурентного ингибитора и второго субстрата. При неупорядоченном механизме конкурентный ингибитор ко второму субстрату будет неконкурентен к первому, а в случае упорядоченного механизма будет наблюдаться бесконкурентное ингибирование. Этот подход позволил доказать упорядоченный последовательный механизм для гексокиназы [47], неупорядоченный — для аргининкиназы [48] и креатинкиназы [49] и сАМР-независимой протеинкиназы [46]. Отклонение от приведенных закономерностей по ингибированию может быть вызвано наличием модификаций в классической схеме (см. схему (14)), загрязнением субстрата продуктом реакции [50], лабильностью фосфопродукта [50]. Описанный подход с привлечением данных по ингибированию реакции «тупиковыми ингибиторами» и субстратом позволяет в большинстве случаев описать экспериментальные данные в рамках одной из классических схем (10) — (12) [51], однако во избежание ошибочных выводов, а также для дальнейшей детализации механизмов исследователи начали активно применять различные изотопные методы. Многие из них были разработаны и впервые применены для фосфорилпереносящих ферментов.

В экспериментах по изотопному обмену наблюдают за переходом меченого изотопа субстрата в продукт или наоборот, измеряя при этом скорости обмена. В случае механизма пинг-понг изотопный обмен может наблюдаться по полуреакциям, например:



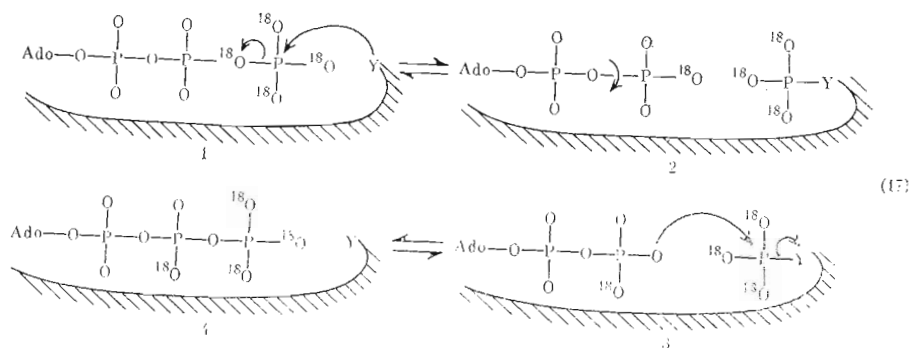
В условиях химического равновесия отношения стабильных форм фермента E и E~X изменяются при изменении концентрации реагентов A и P. Для этого случая справедливы все графические построения, описанные выше при рассмотрении зависимостей начальных скоростей реакции, однако все кинетические параметры изменяются на равновесные. Если реакция действительно описывается механизмом пинг-понг, наблюдается также В—Q-обмен и выполняется соотношение

$$1/V_{AP}^* + 1/V_{BQ}^* = 1/v_1 + 1/v_2, \quad (16)$$

где V и V\* — максимальные скорости обмена и ферментативной реакции соответственно. Невыполнение этого соотношения позволило Джансону и Клеланду [52] сделать вывод, что ацетаткиназная реакция протекает по последовательному механизму (скорость обмена АТР — АДФ значительно больше, чем скорость обмена ацетат — ацетилфосфат). Однако Спектор в работе, посвященной доказательству механизма пинг-понг с тройным замещением (см. раздел 2, [36]), объяснил указанную разницу в скоростях изотопного обмена «важностью нуклеотида для поддержания оптимальной конформации фермента, а также в отсутствие данных по содержанию эндогенного нуклеотида на ферменте возможностью влияния ко-субстрата на обмен ацетат — ацетилфосфат». Следовательно, базируясь лишь на данных описанного экспериментального подхода, нельзя с полной уверенностью принимать тот или иной механизм. Возможные отклонения в скоростях изотопного обмена, по мнению Боера [53], могут быть вызваны субстратным синергизмом, или, согласно выражению Уаймера и Роуза [7], «высвобождение продуктов требует присутствия полной субстратной системы».

В этих случаях для проверки выдвинутого механизма однозначные данные могут быть получены при помощи изучения стереоспецифического изотопного обмена. Этот метод был предложен Мидельфордом и Роузом [54] и с успехом применялся для изучения ряда фосфорилпереносящих ферментов [55]. Если донором фосфорила в ферментативной системе будет молекула АТР, в которой все  $^{16}\text{O}$  при  $\gamma$ -фосфоре замещены на  $^{18}\text{O}$ , с помощью этого метода можно зарегистрировать обратимое превращение связанной с ферментом молекулы АТР в  $\text{ADP} \cdot \text{Y} - \text{PO}_3^*$  (где Y — атакующая группа). В случае выполнимости механизма пинг-понг в активном

центре фермента происходят события, представленные на схеме (17):



После разрыва связи  $P^{\beta}-^{18}O-P^{\gamma}$  с образованием фосфорилферментного соединения в молекуле ADP возможны вращения вокруг связи  $P^{\alpha}-O-P^{\beta}$  (структура 2, схема (17)). В результате этого при обмене  $Y-PO^* - ADP$  может образоваться молекула ATP уже со связью  $P^{\beta}-^{16}O-P^{\gamma}$  (структура 4, схема (17)). Если  $\beta-PO_3$ -группа связанного ADP симметрична во время обратимого разрыва, скорость обмена будет равна скорости обратимого разрыва связи. Так, метод Мидельфорда и Роуза позволяет доказать, что  $[ADP \cdot Y-PO_3]$  является истинным интермедиатом в ферментативном катализе и механизм пинг-понг выполняется. Метод используется в комплексе со стереохимическими исследованиями для доказательства того или иного молекулярного механизма переноса фосфорила. Например, в недавней работе Ноулс [37], измерив скорость стереоспецифического изотопного обмена ATP, катализируемого пируваткиназой в отсутствие пирувата, нашел, что она в  $10^4$  раз медленнее, чем в присутствии ко субстрата. Определив, что скорость рацемизации  $[\gamma-S, ^{16}O, ^{17}O, ^{18}O]ATP$  также очень низка, он исключил возможность образования комплекса  $E \cdot ADP \cdot PO_3^{2-}$ , таким образом отвергнув протекание реакции по диссоциативному механизму.

Приведенные кинетические методы в основном позволяют сформулировать качественно общую схему катализа, но не дают возможности определить константы скоростей элементарных стадий процесса. Последний из рассматриваемых в настоящем разделе методов стационарной кинетики реакций, приводящих к переносу фосфорильной группы, — метод изотопного слежения — позволяет количественно оценить соотношения констант элементарных стадий и установить скоростьлимитирующую стадию. Метод был введен в энзимологическую практику Майстером [56] и затем развит в работах Роуза по механизму действия гексокиназы [57, 58]. Сущность метода заключается в определении доли фермент-субстратного комплекса, перешедшего в продукты, по отношению к доле комплекса, подвергшегося диссоциации. Для этого небольшое количество фермента инкубируют с меченым субстратом в таком отношении, чтобы перевести весь фермент в бинарный комплекс. Затем инкубационную смесь переводят в большой объем раствора, содержащего избыток немеченого субстрата. После нескольких секунд реакцию останавливают и в реакционной смеси анализируют содержание меченых продуктов. На основе выведенных Роузом соотношений [58] оказалось возможным определить ряд констант элементарных стадий гексокиназной реакции, основываясь лишь на данных описанного экспериментального подхода. Этот же метод был с успехом применен Клееландом для анализа фосфофруктокиназной реакции [51].

Для детального анализа ферментативного процесса по элементарным стадиям с получением количественных оценок их констант скоростей наиболее эффективны предстационарные и релаксационные методы. В сочетании с обработкой кинетических данных на ЭВМ они позволяют определить число стадий процесса, значения констант, внести коррективы, а иногда и опровергнуть выдвинутый кинетический механизм [59—62].

Методы исследования быстрых реакций в растворах наиболее широко

применялись для исследования механизма действия фосфатаз [63–65] и АТФ-аз [66] — ферментов, катализирующих перенос фосфорила. В первом случае это объясняется удачным выбором модельных субстратов — нитрофениловых эфиров фосфорной кислоты и их производных, изменяющих свои спектры поглощения в ходе реакции дезацилирования. Во втором случае регистрацию кинетических кривых проводили по изменению спектральных свойств рН-индикатора, триптофановой флуоресценции белка, изменения светорассеяния системы. Комплекс методов быстрой кинетики позволял установить детальный механизм указанных ферментативных реакций [67]. Однако для большинства фосфорилпереносящих ферментов, в частности фосфокиназ, подобные исследования малочисленны, поскольку течение ферментативных реакций, катализируемых ими, не сопровождается изменением какого-либо оптического свойства системы, а это, несомненно, затрудняет применение методов быстрой кинетики, требующих оптической регистрации.

Введение репортерных меток в молекулу белка в ряде случаев оказывается малоэффективным ввиду малой их чувствительности к изменениям, происходящим в активном центре фермента или из-за значительных перестроек активного центра в результате аффинной модификации. Применение зондов, конкурирующих с субстратами, часто вызывает затруднения в интерпретации кинетических данных. Большинство реакций, как мы говорили, двухсубстратны, и их кинетический анализ требует применения машинных методов обработки экспериментальных данных, что стало возможным лишь недавно.

В настоящее время в энзимологическую практику вновь вошел метод потушенного потока (quenched flow), принцип которого — химическая остановка реакции в миллисекундном интервале времени — был предложен еще Роутоном [68]. Список работ, в которых эта техника используется для анализа предстационарной кинетики фосфорилпереносящих ферментов, продолжает увеличиваться [69–71]. Недавно этим методом были оценены значения констант элементарных стадий полных процессов фосфорилирования аргинина и креатина соответствующими киназами [72, 73]. В последующих работах цитируемой серии [74, 75] авторы ввиду достаточно быстрых времен релаксации соответствующих процессов в переходной фазе для детализации механизма воспользовались методами криобиохимии, развитыми Дузу [76]. В работах [70, 71] проанализирован поэтапный механизм катализа фосфорилирования гистона H1 с участием сАМР-зависимой протеинкиназы из мозга свиньи. Использование специфически спин- и флуоресцентно-меченого гистона H1 позволило при помощи метода потушенного потока вскрыть закономерности белок-белкового взаимодействия протеинкиназы с белковым субстратом [77]. Из немногочисленных примеров по использованию методов исследования быстрых реакций в растворах в приложении к фосфокиназным системам следует упомянуть работы Бенковича с соавт. [78] и Вюрстера [79], в которых рассмотрена аномальная субстратная специфичность фосфофруктокиназы методами остановленного и потушенного потока. Было показано, что фермент специфичен к  $\beta$ -аномеру субстрата, фруктозо-6-фосфата.

Из работ по релаксационной кинетике заслуживает внимания исследование Хаммеса и Херста [80]. Авторы установили, что константа скорости связывания субстратов с креатинкиназой значительно больше, чем каталитическая константа реакции. Следует также отметить работу Хогетта и Келетта [81]. Из анализа релаксационной кинетики связывания глюкозы дрожжевой гексокиназы авторами был сделан вывод о двухстадийном механизме связывания субстрата на ферменте.

### 3. Ковалентный катализ в ферментативных реакциях с переносом фосфорильной группы

Наряду с кинетическими методами, помогающими сформулировать общий механизм катализа, и стереохимическими, позволяющими предложить молекулярную схему переноса фосфорила, для установления детального механизма действия фермента большое значение имеют структурно-

функциональные исследования. Во многих случаях их цель заключается в обнаружении ковалентных фермент-субстратных комплексов и доказательстве вклада ковалентного катализа в общий механизм действия данного фермента. По мнению Дженкса [82], обнаружение фермент-субстратных интермедиатов оказало решающее значение для развития исследования ферментативных систем. Несомненно, в аспекте изучения ковалентного катализа основополагающими являются работы по механизму действия протейназы и пиридоксалевого ферментов [82–86]. Ковалентные производные были обнаружены также для ряда ферментов, катализирующих перенос фосфорилла [1, 4, 7, 82–89]. Однако выделение фосфопродукта при помощи препаративных биохимических методов, характеристика фосфориллацептирующей аминокислоты, а также установление структуры пептида активного центра методами белковой химии еще далеко не достаточные доказательства реального участия фосфопродукта в катализе.

После перечисленных обязательных этапов необходимо доказать принципиальную возможность переноса фосфорилла с фосфорилированного фермента на субстрат-акцептор; а затем решить вопрос о кинетической компетентности выделенного фосфопродукта, т. е. показать, что скорость его образования и переноса с него фосфорилла на субстрат-акцептор укладывается во временные параметры итоговой реакции. Приведенным условиям удовлетворяли далеко не все выделенные фосфопродукты ферментов. В некоторых случаях, как, например, для фосфоглицераткиназы [90], удалось установить, что выделенный «фосфофермент» — прочный ковалентный комплекс фермента с субстратом. Для гексокиназы различными методами (см. выше разделы 2, 3) было однозначно доказано, что выделенный фосфофермент не является истинным кинетическим интермедиатом основного реакционного пути, поскольку при его участии реакция проходила бы значительно медленнее [4]. Это хорошо согласуется и с данными стационарной кинетики и стереохимическими данными, которые, как указано в предыдущих разделах, свидетельствовали в пользу последовательного механизма и инверсии хирального центра у аналога АТФ.

Классический пример, демонстрирующий роль ковалентного катализа в механизме действия фермента, — нуклеозиддифосфаткиназа. В тщательном исследовании этого фермента, проведенном в лаборатории Клееланда [43], выделен и охарактеризован фосфофермент, показана его способность переносить фосфорил на субстраты. Комплексом методов стационарной кинетики доказан механизм пинг-понг би-би; на основе равновесных и кинетических параметров проведены расчеты, показывающие, что фосфофермент может являться одной из стабильных форм в процессе катализа. В работе Валиндера с соавт. [87] методом потушенного потока для этого фермента доказана кинетическая компетентность выделенного фосфопродукта. Стереохимический анализ [1, 8] подтвердил этот вывод.

Акцепторами фосфорилла в молекуле фермента могут быть остатки гистидина, как, например, в случае нуклеозиддифосфаткиназы [88] и  $\epsilon$ -АМР-зависимой протейнакиназы [83], фосфоенолпируватзависимых фосфотрансферазных систем [89], сукцинилтиокиназы [91], фосфоглюкомутазы [92]; карбоксильная группа аспарагиновой и глутаминовой кислот, как в случае  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [93, 94],  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы саркоплазматического ретикулума [95] и ацетаткиназы [96], а также остаток «активированного» серина в случае щелочной фосфатазы [97–99]. Образующиеся фосфопродукты весьма реакционноспособны. В модельных опытах было установлено, что фосфоимидазол сам является фосфорилирующим агентом [98], а присутствие этого соединения в активном центре фермента несомненно ускоряет фосфотрансферную реакцию. Это обстоятельство мешает выделить и охарактеризовать фосфопродукты в случае ряда конкретных ферментов. Так, в отличие от фосфоглицератмутазы дрожжевого и животного происхождения выделить фосфорилированный фермент из проростков пшеницы не удалось. На основании косвенных данных было показано, что фосфофермент все же образуется [100]. При препа-

ративном выделении фосфопродукта в процессе его очистки может измениться конформация фермента, что вызовет изменение кинетических свойств фосфопродукта как интермедиата (на эту возможность указал Фершт [99]).

Приведенные факты могут значительно осложнить доказательство вклада ковалентного катализа в общую схему действия фермента. Поэтому, не отступая от принципа строгости доказательства, для установления наличия ковалентного катализа приходится обратиться к косвенным данным, и прежде всего к кинетическим. Так, исследование предстационарной кинетики позволяет по «всплеску» или «лаг-периоду» на кинетической кривой зависимости накопления продукта реакции от ее длительности сделать вывод об образовании интермедиатов в процессе катализа, как, например, в случае щелочной фосфатазы [97]. Полезные сведения об образовании фосфорилированного фермента могут быть получены также из данных стационарной кинетики, например по исследованию отношения продуктов реакции в присутствии конкурирующего нуклеофила. Так, Баррет с соавт. [101] исследовал разложение девяти фосфорных эфиров, катализируемое щелочной фосфатазой в присутствии триса. Если предположить, что в реакции в качестве интермедиата образуется фосфопродукт, то на последующих стадиях должны наблюдаться две конкурирующие реакции: гидролиз фосфофермента и акцепция фосфорила более сильным нуклеофилом (трисом с образованием O-фосфорил-триса). В этих условиях уходящая спиртовая группа не может влиять на соотношение продуктов ( $P_i/O$ -фосфорил-трис), что будет наблюдаться, однако, при иных механизмах. Эксперименты с щелочной фосфатазой показали, что независимо от природы фосфорного эфира указанное соотношение равно 1,39; следовательно, реакция проходит через образование фосфорилированной формы фермента. Этот же подход, основанный на использовании конкурирующего нуклеофила, позволяет из данных стационарной кинетики определить константы элементарных стадий образования и разложения фосфопродукта в ходе катализа [102–104]. Подобные исследования, проведенные для сАМР-зависимой протеинкиназы из мозга свиньи [70], вместе с данными предстационарной кинетики [71] однозначно доказали кинетическую компетентность выделенного ранее фосфопродукта.

Участие фосфофермента в реакциях, катализируемых АТФ-азами, подтверждается также быстрым обменом, который был зарегистрирован Боером с соавт. [104, 105]:  $P_i \rightleftharpoons H^{18}OH$ , т. е. тем самым:  $E \sim X \rightleftharpoons H^{18}OH$ ;  $E \sim X^* \rightleftharpoons P_i$ .

Аналогичные результаты были получены для других фосфорилпереносящих ферментов [1].

В заключение настоящего раздела целесообразно привести ряд данных, необходимых для строгого доказательства участия ковалентного катализа в механизме действия фосфорилпереносящих ферментов:

1) выделение фосфопродукта, идентификация аминокислоты-акцептора фосфорила, по возможности фосфопептида;

2) регистрация переноса фосфорила от фосфоформы на субстрат-акцептор;

3) доказательство механизма пинг-понг или его модификаций методами стационарной кинетики с применением ряда изотопных методов;

4) обнаружение «всплеска» или «лаг-периода» на кинетической временной кривой накопления продукта реакции методами предстационарной кинетики;

5) доказательство кинетической компетентности фосфопродукта;

6) анализ стереохимии реакции;

7) анализ распределения продуктов реакции в присутствии конкурирующего нуклеофила;

8) регистрация изотопного обмена  $P_i \rightleftharpoons H^{18}OH$ .

Несомненно, что эти требования в настоящее время выполнены лишь для наиболее изученных ферментов — фосфатаз, АТФ-аз, нуклеозиддифосфаткиназы [1].

#### 4. Строение субстратсвязывающих площадок фосфотрансфераз

В связи с механизмами переноса фосфорильного остатка в ферментативных реакциях стоит вопрос о функциональной топографии активных центров соответствующих ферментов. Именно уникальное пространственное расположение определенных аминокислотных остатков в активном центре делает процессы связывания и дальнейшего превращения субстрата столь эффективными. Во многих случаях донором фосфорильной группы в ферментативных реакциях является комплекс MgATP, а в качестве акцепторов фосфорильного остатка могут выступать сильно различающиеся по своей структуре соединения. В связи с этим можно предположить, что в строении АТР-связывающих площадок по крайней мере части киназ должно наблюдаться существенное сходство, а структура акцепторсвязывающих участков может сильно варьировать. Это предположение непосредственно подтверждается кристаллографическими данными.

В настоящее время с помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения установлены пространственные структуры ряда киназ: гексокиназы [106, 107], пируваткиназы [108, 109], 3-фосфоглицераткиназы [110], фосфофруктокиназы [111] и аденилаткиназы [112, 113]. Молекулы этих ферментов образуют, как правило, двухдоменные структуры, причем участки связывания АТР и второго субстрата располагаются на различных доменах, а собственно каталитический акт происходит в «кармане» между последними. Нуклеотидсвязывающим доменам этих ферментов отвечает определенный тип третичной структуры (последняя характерна и для NAD<sup>+</sup>/NADH-связывающих участков дегидрогеназ). Этот домен состоит обычно из 5—6 тяжей параллельной β-структуры, с каждой стороны которого располагаются параллельные α-спирали. На основании консерватизма третичной структуры нуклеотидсвязывающих доменов киназ и дегидрогеназ было сделано предположение, что синтез обоих типов ферментов контролируется одним геном-предшественником [114].

Двухдоменная третичная структура позволяет, по-видимому, способствовать наиболее эффективному протеканию ферментативной реакции. В ряде случаев, однако, расстояние между доменами слишком велико для осуществления непосредственного контакта между субстратами. Так, для фосфоглицераткиназы из мыши лошади расстояние между β-фосфатом связанного АТР и центром связывания 3-фосфоглицерата составляет около 20 Å. Связывание последнего, однако, вызывает столь сильные конформационные изменения в ферменте, что это расстояние сокращается почти до 8 Å [110]. Близкие данные имеются для гексокиназы, где соответствующее смещение при связывании глюкозы равно 12 Å [106, 107, 115]. Исходя из этого, можно предположить, что упорядоченный механизм связывания субстратов, отмечаемый для ряда фосфотрансферазных реакций, является отражением таких конформационных изменений.

В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал, касающийся участия тех или иных аминокислотных остатков в формировании активных центров фосфотрансфераз. Ограниченный объем нашего обзора не дает возможности привести его полностью. Попытаемся, однако, систематизировать эти данные, тем более что, как указывалось выше, строение АТР-связывающих участков многих киназ близко. Большая часть данных была получена благодаря химической модификации соответствующих ферментов аффинными или группоспецифическими реагентами. Метод химической модификации, несмотря на очевидные достоинства, в большинстве случаев не позволяет с абсолютной достоверностью установить функциональную роль того или иного аминокислотного остатка активного центра. Только в сочетании с другими методами, в первую очередь с физико-химическими, это становится возможным.

Для всех АТР-связывающих ферментов характерно наличие в активном центре положительно заряженных остатков лизина и аргинина. По ряду данных, эти остатки принимают участие во взаимодействии с

полифосфатной цепочкой субстрата. Так, результаты химической модификации [116] и ЯМР-спектроскопии [117] свидетельствуют в пользу пространственной сближенности  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группы лизина с  $\gamma$ -фосфорильной группой, переносимой в процессе реакции, катализируемой креатинкиназой. Остатки лизина, важные для ферментативной активности, обнаружены в пируваткиназе [118, 119], 3-фосфоглицераткиназе [120], аргининкиназе [121], сАМР-зависимой протеинкиназе [122] и ряде других ферментов. Остатки аргинина содержатся в активных центрах креатинкиназы [123], аденилаткиназы [124] и других ферментов.

Данные по химической модификации ряда ферментов тетранитрометаном, водорастворимым карбодимидом, а также исследование спектров кругового дихроизма и дифференциальных спектров поглощения свидетельствуют о наличии функциональных остатков тирозина в активных центрах креатинкиназы [125], аргининкиназы [126], 3-фосфоглицераткиназы [120, 127], гексокиназы [128, 129], пируваткиназы [130, 131] и аденилаткиназы [132]. В последнем случае эти результаты подтверждаются рентгеноструктурными данными [112]. Наиболее принятая трактовка — отнесение одного или нескольких остатков тирозина к участку связывания гетероциклического основания. Структура этого участка определяет специфичность фермента в отношении нуклеотидного субстрата. Так, согласно рентгеноструктурным данным, для 3-фосфоглицераткиназы, проявляющей весьма строгую специфичность в отношении нуклеозидтрифосфата, субстратом может быть только АТР; адениновое ядро связывается в глубокой щели, причем экзоаминогруппа субстрата образует водородную связь [110]. В гексокиназе аденин располагается лишь в небольшом углублении, а экзоаминогруппа направлена в растворитель и водородной связи не образует [133]. Следствием этого является гораздо более широкая субстратная специфичность фермента. Авторы работы [134] предполагают нечто подобное и для циклонуклеотиднезависимых протеинкиназ типа I, обладающих строгой специфичностью в отношении АТР, и типа II, использующих в качестве субстрата как АТР, так и ГТР.

Строение акцепторсвязывающих участков активных центров киназ, как и следовало ожидать, зависит от характера субстрата и поэтому отличается большим разнообразием. Так, в случае 3-фосфоглицераткиназы для участка связывания 3-фосфоглицерата характерно высокое содержание заряженных аминокислотных остатков (His-62, Arg-122, Glu-128, His-172) [110].

Особый интерес среди аминокислотных остатков, формирующих активный центр, представляют те из них, которые непосредственно участвуют в катализе. Идентификация таких остатков наиболее сложная задача. Самые убедительные результаты получаются, когда остаток атакует концевую фосфорильную группу субстрата, образуя ковалентный фосфорилированный интермедиат. В качестве такой атакующей группы в активном центре могут выступать остатки гистидина, как это имеет место для нуклеозиддифосфаткиназы [88], сукцинилтиокиназы [91], сАМР-зависимой протеинкиназы [83], сАМР-независимой протеинкиназы [135], а также остатки глутаминовой или аспарагиновой кислот (ацетаткиназа [96], Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-зависимая АТР-аза и Ca<sup>2+</sup>-зависимая АТР-аза [95]). В обоих случаях эти остатки осуществляют нуклеофильную атаку парой электронов атома азота (гистидин) или кислорода (ионизированная карбоксильная группа).

Если же ферментативная реакция проходит без образования фосфорилированного интермедиата, идентифицировать каталитические группы гораздо сложнее. Наиболее ярким примером возникающих при этом ошибок является исследование «каталитической» SH-группы креатинкиназы. Модификация этой группы различными реагентами приводила практически к полной потере ферментативной активности. Отсюда был сделан вывод о каталитической роли SH-группы, заключающейся в акцепции протона от гуанидиновой группы креатина, что должно приводить к облегчению нуклеофильной атаки азотом последнего  $\gamma$ -фосфорильной группы АТР [116]. Впоследствии, однако, были получены производные креатин-

киназы, содержащие у этой группы заместители небольшого объема ( $-\text{SCH}_3$  или  $-\text{CN}$ ). Эти производные обладали значительной ферментативной активностью (цианопроизводное  $\sim 70\%$  [136]). В результате тиоловая группа лишилась «каталитической» роли, хотя она, по-видимому, все же имеет значение для нормального функционирования фермента, способствуя стабилизации третичной структуры. Функционально важные остатки цистеина были обнаружены также в активных центрах аргининкиназы [137], аденилаткиназы [138] и 3-фосфоглицераткиназы [139], однако, в свете изложенного выше, для того, чтобы приписать им ту или иную функциональную роль, требуются дальнейшие экспериментальные обоснования.

В активных центрах большей части киназ обнаруживаются остатки гистидина. Предполагается, что они играют ключевую роль в кислотно-основном катализе, происходящем в активном центре соответствующего фермента. Подробнее вопрос о каталитических механизмах обсуждается в следующем разделе.

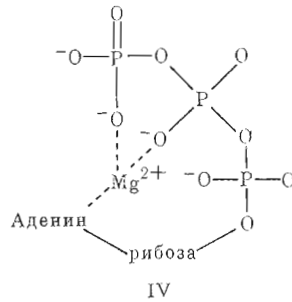
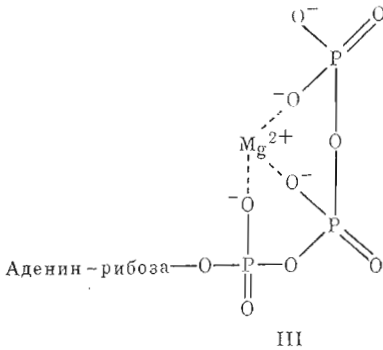
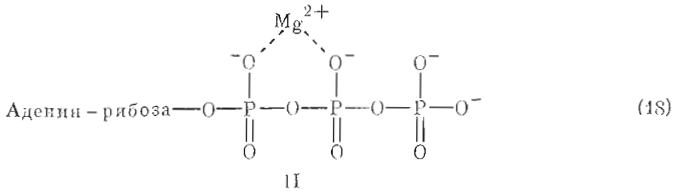
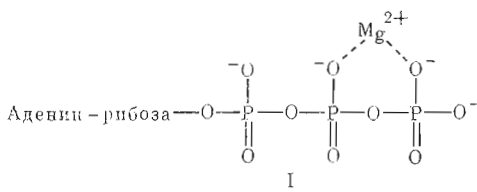
## 5. Молекулярные механизмы катализа фосфотрансферазами

Несмотря на кажущееся разнообразие механизмов действия киназ (протекание реакции через образование фосфорилированного интермедиата или тройного комплекса, характер и порядок связывания субстратов и т. д.), молекулярный механизм собственно каталитического акта во всех случаях практически одинаков. Он представляет собой нуклеофильную атаку  $\gamma$ -фосфорильной группы  $\text{MgATP}$ . В зависимости от природы атакующей группы результатом такой атаки является образование наряду с  $\text{MgADP}$  фосфорилированного продукта, ортофосфата (в случае гидролиза) или промежуточного фосфопроизводного. В последнем случае в дальнейшем имеет место вторая нуклеофильная атака соответствующего атома фосфора в активном центре промежуточного фосфорилированного фермента субстратом-акцептором. В связи с этим выяснение молекулярного механизма ферментативной фосфотрансферазной реакции означает, по нашему мнению, прежде всего ответ на следующие вопросы: а) какая конформация субстрата реализуется в активном центре фермента на разных стадиях реакции; б) какие факторы повышают реакционную способность субстратов, что, в свою очередь, приводит к повышению итоговой скорости реакции, т. е. к катализу. В настоящее время ни для одного из ферментов рассматриваемого класса не существует полного ответа на эти вопросы. Однако прогресс в исследовании ферментов, достигнутый в последние годы, позволяет надеяться по крайней мере на частичное выяснение механизма действия некоторых из фосфотрансфераз.

Ключом к установлению пространственного расположения субстратов в активном центре является измерение расстояний между теми или иными атомами субстратов, в первую очередь между нуклеотидом и координированным с ним атомом двухвалентного металла. Обычно металл в фосфотрансферазных реакциях координирован с молекулой  $\text{ATP}$ . В ряде случаев, однако, имеет место также дополнительное связывание одного или нескольких ионов металла белковой молекулой. Известны, наконец, случаи, когда ион металла образует «мостиковые» структуры, осуществляя связь между белком и полифосфатной цепочкой субстрата [4]. Ионы металла играют, по-видимому, исключительно важную роль в катализе фосфотрансферазных реакций. Одним из обоснованных предположений является приписывание иону металла роли электрофильного катализатора в активном центре фермента [140]. В то же время неоднократно предпринимались попытки перенести результаты изучения характера связывания субстрата нуклеотидами в модельных системах на ферментативные реакции в целом оказались не очень продуктивными [2, 4, 5, 141].

Можно предположить как минимум четыре возможные структуры координационного комплекса  $\text{MgATP}$  [140].





Структуры отражают различную реакционную способность в различных системах. По утверждению Дженкса [140], металл в электрофильном катализе выполняет следующие задачи:

- 1) экранирование отрицательных зарядов на фосфатной группе и тем самым облегчение нуклеофильной атаки по атому фосфора — иными словами, увеличение реакционной способности атакуемого атома за счет оттягивания электронов;
- 2) «улучшение» свойств уходящей группы;
- 3) образование связующего звена между нуклеофилом и субстратом;
- 4) изменение величины  $pK$  и реакционной способности атакующего нуклеофила;
- 5) такое изменение геометрии субстрата, которое облегчает протекание катализа.

В ферментативных системах к перечисленным факторам дополнительно добавляется еще фактор «правильного связывания субстрата на ферменте», направляемого металлом [142]. В этом случае ион металла образует упомянутую выше «мостиковую» структуру. Наибольшее внимание привлекают структуры I и II (схема (18)). В первом случае благодаря уменьшению электроотрицательности кислорода переносимой фосфорильной группы облегчается его нуклеофильная атака. При этом в ходе катализа металл должен связываться с изменением своей координации. Для структуры II  $\alpha$ - $\beta$ -координация металла улучшает свойства ADP как уходящей группы. В первом случае теоретически более вероятен ассоциативный механизм, а во втором возможен как ассоциативный, так и диссоциативный [4].

Из приведенного выше вытекает, что измерение расстояний в активном центре фермента и, как следствие этого, отнесение тех или иных лигандов к той или иной координационной сфере металла в ряде случаев способствует определению типа молекулярного механизма. Основной экспериментальный прием для определения этих расстояний — изучение ядерной релаксации, индуцированной парамагнитными ионами типа  $Mn^{2+}$ , позволяющее измерить расстояние между последним и соответствующим

ядром ( $^{19}\text{F}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) в составе субстрата. Подобные измерения, отличающиеся большой точностью ( $\pm 0,1 \text{ \AA}$ ) [6], в сочетании с молекулярными моделями позволяют представить полную конформацию соответствующих комплексов металла с нуклеотидами в растворе и в активном центре фермента.

По данным Милдвана [6], в растворе расстояния от иона  $\text{Mn}^{2+}$  до атома фосфора составляют  $2,9 \pm 0,1 \text{ \AA}$  в случае моноденатного комплекса с тетраэдрическим фосфатом,  $3,6 \pm 0,2 \text{ \AA}$  в случае искаженного внешнесферного комплекса (например, пятикоординационного фосфорана с аксиальным кислородом),  $4,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$  в случае  $\text{Mn}^{2+}$ , хелатированного близко расположенным пирофосфатом той же трифосфатной цепочки, и  $6,1 \pm 0,5 \text{ \AA}$  для комплекса, в который между  $\text{Mn}^{2+}$  и фосфором включается внешнесферная вода или сравнимый по размерам лиганд. Для  $\text{Mg}^{2+}$  соответствующие расстояния будут приблизительно на  $0,1 \text{ \AA}$  меньше [6].

С помощью указанного выше метода были построены модели активных центров некоторых ферментов, в первую очередь пируваткиназы, креатинкиназы и аденилаткиназы. На основании этих данных были вычислены расстояния между концевым фосфатом и атакующей нуклеофильной группой второго субстрата. Такие расчеты позволяют с большой долей вероятности предсказать, пойдет ли реакция по ассоциативному или диссоциативному механизму. Для протекания по первому механизму расстояние не должно превышать  $3,3 \text{ \AA}$ , второму удовлетворяет условие  $\geq 4,9 \text{ \AA}$  [6].

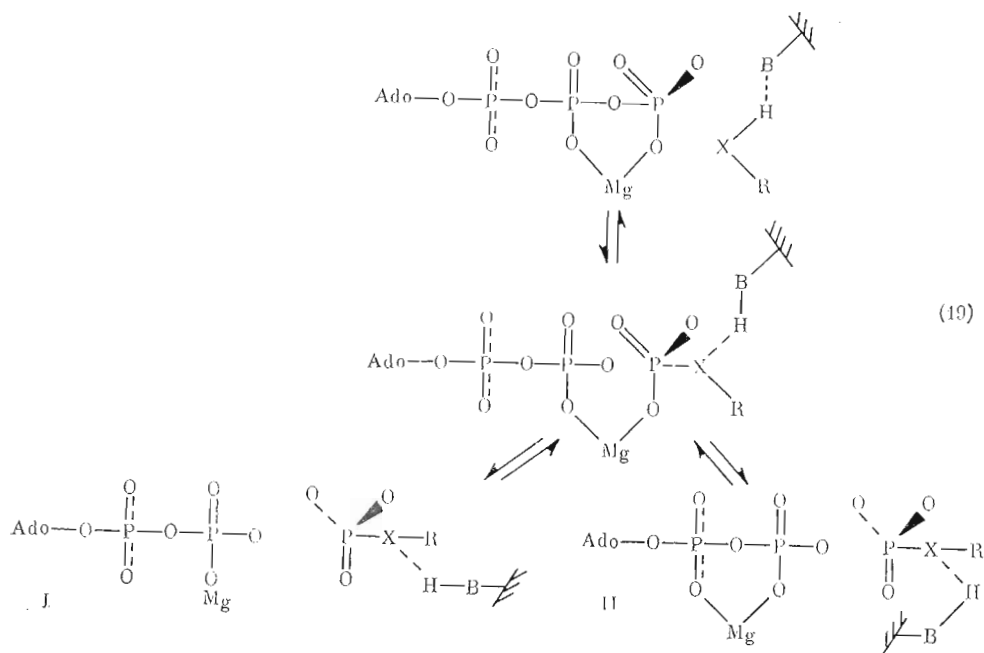
Для пируваткиназы характерно наличие в активном центре двух ионов двухвалентных металлов: 1) в комплексе с АТР, 2) непосредственно связанного с ферментом. При одновременном связывании обоих субстратов в активном центре расстояние между карбонильным кислородом пирувата и терминальным фосфором АТР составляет  $3,0 \pm 0,5 \text{ \AA}$  [143], что указывает на протекание реакции по ассоциативному механизму. Это согласуется с полученными ранее кинетическими данными. Такое расстояние способствует также поляризации карбонильной группы и енолизации пирувата [144]. При обсуждении этих результатов следует, однако, учитывать, что одного лишь измерения расстояний все же недостаточно для отнесения данной реакции к тому или иному механизму, поскольку эти расстояния отражают статическое состояние фермента и субстрата. Так, если реакция протекает через ряд промежуточных соединений (например, образуется фосфорилированный фермент), ассоциативный механизм может иметь место и при большем, чем  $3,3 \text{ \AA}$ , расстоянии между соответствующими группами субстратов. Подобная ситуация, возможно, имеет место в случае сАМР-зависимой протеинкиназы [122, 145, 146].

По мнению Ноулса и Дженкса [1], для ферментативного процесса понятия ассоциативного и диссоциативного механизмов вообще не вполне применимы, поскольку нуклеофил-акцептор всегда присутствует в активном центре (либо в виде связанного субстрата, либо как группа в ферменте).

Диссоциативный механизм в этом случае включает в себя участие нуклеофильной группы, предназначенной для акцепции метафосфата, а иногда выполняющей и дополнительные функции. Переходное состояние реакции, протекающей по ассоциативному механизму, будет значительно разрыхлено, что означает, что разрываемая связь уже почти отсутствует, а новая еще не образовалась (такая структура переходного состояния характерна для замещения у атома фосфора). Ясно, что с точки зрения стерических и электронных представлений разница между обоими механизмами будет весьма невелика.

Полезную информацию о строении комплекса металл—донор фосфорильной группы в активном центре фермента можно получить при исследовании взаимодействия фермента с такими комплексами, в которых ион двухвалентного металла заменен на  $\text{Co}^{3+}$  или  $\text{Cr}^{3+}$ . Поскольку скорость перехода координационных изомеров  $\text{NTP} \cdot \text{Me}^{2+}$  существенно превышает разрешение во времени ЯМР-спектрометра, при помощи ЯМР-спектроскопии не удастся установить, какой именно изомер выступает в виде субстрата для конкретного фермента [147]. В ряде случаев эта задача

решается при помощи ингибиторного анализа с использованием незаменимых комплексов металла с нуклеотидом. В работе [148] предлагаются две возможные схемы действия фосфотрансфераз (19):



B — общесловная группа, принадлежащая ферменту, X — нуклеофильная атакующая группа субстрата.

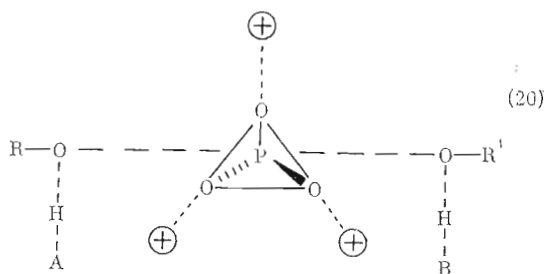
Основное различие между схемами заключается в характере продукта. В первом случае ADP образует монодентатный комплекс, во втором — бидентатный. С первым случаем согласуется механизм гексокиназной и глицераткиназной реакций, со вторым — пируваткиназной, креатинкиназной, аргининкиназной, ацетаткиназной, фосфофруктокиназной, аденилаткиназной реакций [149].

В работах [150–152] развит другой подход к установлению структуры комплекса металл — нуклеотид в активном центре фермента — с использованием диастереомеров субстрата. Было показано, что  $R_p$ -диастереомер комплекса  $MgATP\beta S$  более подходящий, чем  $S_p$ -изомер, субстрат гексокиназы (отношение скоростей для изомеров  $v_R/v_S \approx 600$ ). При использовании  $Cd^{2+}$  это отношение резко изменяется ( $v_R/v_S = 0,03$ ). Эта стереоспецифичность объясняется различным характером связи металла с нуклеотидом. В комплексе  $MgATP\beta S$  с металлом связан  $\beta$ -кислород, в  $CdATP\beta S$  — сера. В комплексе с кобальтом имеет место равновесное хелатирование по обоим положениям, в связи с этим фермент использует оба диастереомера. Обнаруженная стереоспецифичность показывает, что  $\beta$ -фосфорил участвует в хелатировании металла в ходе каталитического акта. Тот факт, что гексокиназа использует  $S_p$ -диастереомер  $MgATP$ , свидетельствует в пользу выдвинутого ранее предположения Клееланда [142] о том, что  $\alpha$ -фосфат АТФ не участвует в хелатировании.

Представление о роли металлов, как мы видим, позволяет объяснить многие закономерности фосфотрансферазных реакций. Было бы ошибкой, однако, считать, что каталитический эффект фосфорилпереносящих ферментов объясняется только электрофильным катализом металлом. Имеется ряд убедительных данных в пользу того, что распределенный вклад в скорость реакции вносит и общий кислотно-основной катализ.

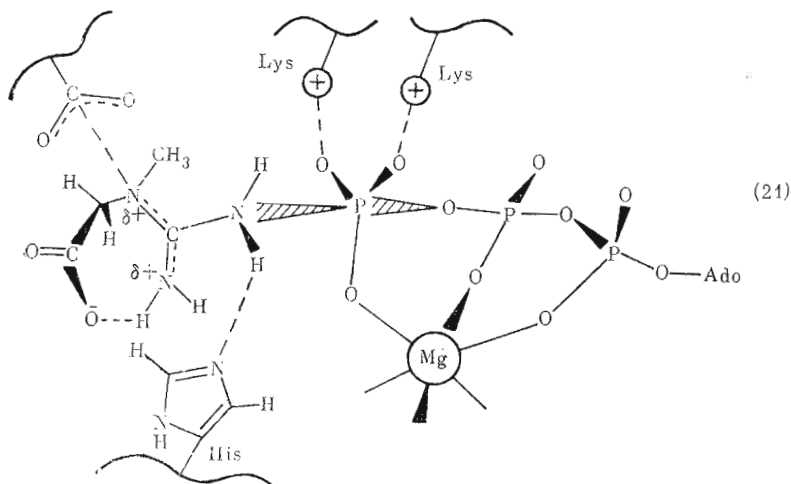
Как указывалось выше, присутствие в активном центре фермента группы-акцептора фосфорила сводит к минимуму разницу между ассоциативным и диссоциативным механизмами. Роль катализа, таким обра-

зом, заключается в ускорении реакции, проходящей через переходное состояние типа (20):



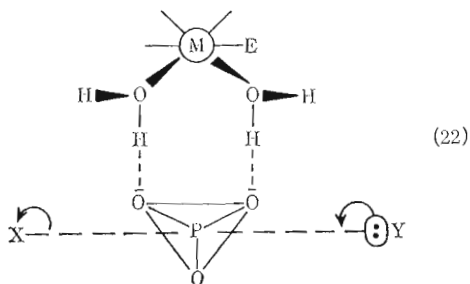
Структура переходного состояния, как следует из схемы, должна стабилизироваться как электрофильным центром (обозначены плюсом), так и обобщенными кислотой (НА) и основанием ( $B^-$ ). В пользу предложенной структуры переходного состояния свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные. Так, для креатинкиназы показано, что небольшие плоские анионы (типа нитрата или формиата) способны связаться с ферментом с высокой константой сродства, давая комплексы типа  $E \cdot MgATP \cdot NO_3 \cdot \text{креатин}$ . На основании кинетических данных, а также данных ЯМР-спектроскопии было показано, что анион занимает место  $\gamma$ -фосфорильной группы  $MgATP$  и образующийся в результате комплекс напоминает переходное состояние (20) [153, 154], причем  $Mg^{2+}$  координирован с  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфорильными группами АТФ. Роль электрофильных центров в таком переходном состоянии могут играть ионы металла, а также положительно заряженные аминокислотные остатки, в частности, в случае креатинкиназы, остатки лизина [117]. В активном центре креатинкиназы в качестве общесосновного катализатора выступает, по-видимому, остаток гистидина. Это предположение подтверждается кинетическими [155] и ЯМР-спектроскопическими данными [156]. Роль этого остатка сводится к депротонированию атакующей группы креатина. Акцепция протона имидазолом гистидина позволяет избежать образования термодинамически невыгодного гидроксоний-иона. Этим достигается стабилизация переходного состояния (19) и значительное снижение порога активации реакции. В случае фруктокиназы [157] и гексокиназы [158] (эти данные подтверждаются рентгеноструктурным анализом [115]), роль общесосновного катализатора принадлежит ионизованной карбоксильной группе. По мнению Клееланда [158], можно привести по крайней мере два объяснения разницы в характере катализатора. Во-первых, функции фруктокиназы и гексокиназы заключаются только в фосфорилировании соответствующих углеводов. В этом случае ионизованная карбоксильная группа с низким значением  $pK$ , несомненно, более эффективный акцептор протона, чем нейтральный гистидин. Креатинкиназа, с другой стороны, должна осуществлять как фосфорилирование креатина в момент расслабления мышцы, так и быстрое фосфорилирование ADP в период ее активной работы. Вследствие этого кислотно-основный катализатор должен иметь величину  $pK$ , максимально близкую к  $pH$  среды (клетки), и, естественно, гистидин удовлетворяет этому наилучшим образом. Вторым возможным объяснением наблюдаемого явления может быть следующее. Фосфорилирование положительно заряженной гуанидиновой группы весьма проблематично, поскольку один из ее азотов должен при этом действовать в качестве нуклеофила, атакующего  $\gamma$ -фосфор АТФ, несущий частичный положительный заряд вследствие координации одного из кислородов  $Mg^{2+}$  и связывания двух других положительно заряженными остатками лизина и аргинина. Упомянутый выше атом азота, образуя водородную связь с ионизованной карбоксильной группой, вызывает «перекатку» на себя положительного заряда гуанидиновой группы, в результате происходит ухудшение его нуклеофильных свойств. Нейтральный гистидин не должен оказывать подобный эффект. Все вышесказанное

суммировано на схеме (21), показывающей возможное взаимоотношение субстратов в активном центре креатинкиназы.



Аналогичное переходное состояние и идентичный механизм предполагается для ацетаткиназы [159]. В этом случае наряду с координацией  $Mg^{2+}$  с  $\gamma$ - и  $\beta$ -фосфатными группами и выполнением металлом роли электрофильного катализатора постулируется действие общесосновного катализатора, повышающего нуклеофильность субстрата-акцептора, и общекислотного, способствующего уходу первого продукта  $MgADP$ . Ионизованная карбоксильная группа предполагается также в случае cAMP-зависимой протенинкиназы на стадии дефосфорилирования фосфорилированного интермедиата [160].

В цитированной выше работе Милдвана и др. [143] в активном центре пируваткиназы в качестве электрофильного участка помимо координированного с АТФ иона предполагается второй, непосредственно связанный с ферментом ион двухвалентного металла. Согласно этой работе, фосфатные группы АТФ локализованы во второй координационной сфере этого иона. Посредством соединения двух молекул воды, образующих водородные связи с кислородами  $\gamma$ -фосфатной группы, ион металла ориентирует и поляризует последнюю (схема (22)), а также, возможно, участвует в принятии белком активной конформации:



Данные, касающиеся роли металла в реакции, катализируемой аденилаткиназой, также свидетельствуют в пользу образования в активном центре бидентатного  $\beta$ - $\gamma$ -комплекса  $MgATP$  [149]. Однако последние результаты [161] говорят, скорее, о формировании монодентатного комплекса  $Mg^{2+}$  с одним из кислородов  $\beta$ -фосфорилата АТФ. Второй кислород  $\beta$ -фосфорилата, а также один из кислородов  $\alpha$ -фосфорилата непосредственно связываются положительно заряженными остатками активного центра, а  $\gamma$ -фосфорильная группа сохраняет конформационную подвижность. Роль общесосновного катализатора при этом может играть остаток

гистидина-36, важный, как известно [112], для каталитической активности фермента. Следует отметить, однако, что эти данные требуют подтверждения.

Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о близости механизмов переноса фосфорильного остатка, катализируемого большей частью известными фосфокиназ. В ближайшие годы, по нашему мнению, будет сформулирована единая теория этого процесса и создан общий механизм действия фосфорилпереносящих ферментов, как это было сделано для сериновых протеиназ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Knowles J. R. Ann. Rev. Biochem., 1980, v. 49, p. 877—919.
2. Bencovic S. J., Schray K. J. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 8, p. 201—238.
3. Blatter W. A., Knowles J. R. Biochemistry, 1979, v. 18, № 18, p. 3927—3933.
4. Mildvan A. S. Ann. Rev. Biochem., 1974, v. 43, p. 357—393.
5. Mildvan A. S. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. 2, p. 446—536.
6. Mildvan A. S. Adv. Enzymol., 1979, v. 49, p. 103—126.
7. Wimmer M. J., Rose I. A. Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 1031—1078.
8. Frey P. A. Tetrahedron, 1982, v. 38, № 11, p. 1541—1567.
9. Kochetkov S. N., Bulargina T. V., Sashchenko L. P., Severin E. S. Eur. J. Biochem., 1977, v. 81, № 1, p. 111—118.
10. Ингольд К. Теоретические основы органической химии. М.: Мир, 1973, с. 351—506.
11. Westheimer F. H. In: Rearrangements in ground an excited states / Ed. de Mayo P. N. Y.: Acad. Press, 1981, v. 2, p. 229—271.
12. Kirby A. J., Warren S. G. The Organic Chemistry of Phosphorus. Amsterdam: Elsevier, 1967.
13. Westheimer F. H. Accounts Chem. Res., 1968, № 1, p. 70—78.
14. Butcher W. W., Westheimer F. H. J. Amer. Chem. Soc., 1955, v. 77, № 9, p. 2420—2424.
15. Bernard P. W. C., Bunton C. A., Liewellyn D. R., Oldham K. G., Silver B. L., Vernon C. A. Chem. Ind. (London), 1955, p. 760—763.
16. Kirby A. J., Jencks W. P. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 14, p. 3209—3216.
17. Kirby A. J., Vargolis A. G. J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, № 2, p. 415—423.
18. Buchwald S. L., Knowles J. R. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 5, p. 1438—1440.
19. Buchwald S. L., Pliura D. H., Knowles J. R. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 3, p. 845—847.
20. Bruzik K., Tsai M.-D. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 3, p. 863—867.
21. Di Sabato G., Jencks W. P. J. Amer. Chem. Soc., 1961, v. 83, № 2, p. 4400—4405.
22. Haake P., Allen G. W. Bioorg. Chem., 1980, v. 9, № 2, p. 325—341.
23. Gorenstein D. G. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 7, p. 2523—2525.
24. Rebek J., Gavina F., Navarro C. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 26, p. 8113—8117.
25. Satterwait A. C., Westheimer F. H. In: Phosphorus chemistry directed toward biology / Ed. Stec W. J. N. Y.: Pergamon Press, 1980.
26. Kirby A. J. The phosphate transfer process — in the Proc. Sympos. Development in phosphorus chemistry directed toward biology, 1981, p. 7983—7985.
27. Дженкс В. П. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 349.
28. McLaughlin A. C., Leigh J. S., Cohn M. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 9, p. 2777—2783.
29. Eckstein F., Gindl H. Chem. Ber., 1968, B. 101, № 3, p. 1670—1683.
30. Saenger W., Eckstein F. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 15, p. 4712—4717.
31. Usher D. A., Richardson D. J., Eckstein F. Nature, 1970, v. 228, № 14, p. 663—665.
32. Blatter W. A., Knowles J. R. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 2, p. 510—511.
33. Buchwald S. L., Knowles J. R. J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 21, p. 6601—6602.
34. Chanley J. D., Feageson E. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 8, p. 1181—1190.
35. Jencks W. P. Accounts Chem. Res., 1980, v. 13, № 6, p. 161—169.
36. Spector L. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2626—2630.
37. Hassett A., Blutler W., Knowles J. R. Biochemistry, 1982, v. 21, № 25, p. 6335—6340.
38. Hansen D. E., Knowles J. R. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 24, p. 14795—14798.
39. Корниш-Бойден Е. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979, с. 61—64.
40. Cleland W. W. Biochim. et biophys. acta, 1963, v. 87, № 1, p. 104—137.
41. Segel I. H. Enzyme Kinetics. N. Y.: Wiley & Sons, 1975, p. 628.
42. Дженкс В. П. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 53—56.
43. Gurces E., Cleland W. W. Biochemistry, 1969, v. 8, № 2, p. 633—640.
44. Anderson E. P. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 9, p. 49—96.
45. Uyeda K. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 9, p. 2268—2275.
46. Gold M. H., Segel I. H. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 8, p. 2417—2423.
47. Colowick S. P. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 9, p. 1—48.
48. Morrison J. F. In: The Enzymes. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 8, p. 457—486.
49. Watts P. C. In: The Enzymes. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 8, p. 384—456.

50. Cleland W. W. In: The Enzymes. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. 2, p. 1-65.
51. Cleland W. W. Adv. Enzymol., 1977, v. 45, p. 273-387.
52. Janson C. A., Cleland W. W. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 8, p. 2567-2571.
53. Bridger W. A., Millev W. A., Boyer P. D. Biochemistry, 1968, v. 7, № 10, p. 3608-3615.
54. Midelfort O. F., Rose I. A. J. Biol. Chem., 1976, v. 25, № 49, p. 5881-5887.
55. Rose I. A. Adv. Enzymol., 1979, v. 50, p. 361-395.
56. Krishnanswamy P. R., Pamiljans V., Meister A. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 9, p. 2932-2940.
57. Rose I. A., O'Connell E. L., Litwin S. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 16, p. 5163-5168.
58. Wilkinson K. D., Rose I. A. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 24, p. 12567-12572.
59. Gutfreund H. Enzymes: Physical Principles. London: Wiley-Interscience, 1972, p. 176-228.
60. Hague D. N. Fast Reactions. London: Wiley-Interscience, 1971, p. 125-142.
61. Методы исследования быстрых реакций/Ред. Хаммес Г. М.: Мир, 1977.
62. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Вьюкнетика. М.: Наука, 1979.
63. Halford S. E., Bennett N. G., Trentham D. R., Gutfreund H. Biochem. J., 1969, v. 114, № 2, p. 243-251.
64. Bale J. R., Huang Ch. Y., Choch P. B. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 18, p. 8431-8436.
65. Bloch W., Gorby M. S. Biochemistry, 1980, v. 19, № 22, p. 5008-5018.
66. Trentham D. R., Eccleston J. F., Bagshaw C. R. Quart. Rev. Biophys., 1976, v. 9, № 2, p. 217-281.
67. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 251, 344-420.
68. Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry /Ed. Chance B. N. Y.-L.: Acad. Press, 1964.
69. Grubmeyer Ch., Cross R. L., Penefsky H. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 20, p. 12092-12100.
70. Gabibov A. G., Kochetkov S. N., Sashchenko L. P., Smirnov I. V., Severin E. S. Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 2, p. 297-301.
71. Gabibov A. G., Kochetkov S. N., Sashchenko L. P., Smirnov I. V., Severin E. S. Eur. J. Biochem., 1983, v. 135, № 3, p. 491-495.
72. Barman T. E., Travers F., Bertrand R., Roseau G. Eur. J. Biochem., 1978, v. 89, № 1, p. 243-249.
73. Travers F., Barman T. E., Bertrand R. Eur. J. Biochem., 1979, v. 100, № 1, p. 149-155.
74. Barman T. E., Brun A., Travers F. Eur. J. Biochem., 1980, v. 110, № 2, p. 397-403.
75. Travers F., Barman T. E. Eur. J. Biochem., 1980, v. 110, № 2, p. 405-412.
76. Дузу П. Кробиохимия. М.: Мир, 1980.
77. Gabibov A. G., Kochetkov S. N., Sashchenko L. P., Timofeev V. P., Smirnov I. V., Severin E. S. Eur. J. Biochem., 1983, v. 132, № 2, p. 339-344.
78. Fishbein R., Bencovic P. A., Seray K. J., Siwers I. J. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 19, p. 6047-6055.
79. Wurster B., Hess B. FEBS Lett., 1974, v. 38, № 3, p. 257-260.
80. Hammes G. G., Hurst J. K. Biochemistry, 1969, v. 8, № 3, p. 1083-1094.
81. Hoggett J. G., Kelett G. L. Eur. J. Biochem., 1976, v. 68, № 2, p. 347-353.
82. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 43.
83. Kochetkov S. N., Bulargina T. V., Sashchenko L. P., Severin E. S. FEBS Lett., 1976, v. 71, № 1, p. 212-214.
84. Antonov V. K., Ginodman L. M., Rumsh L. P., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Yavashev L. P., Gurova N. G., Volkova L. I. Eur. J. Biochem., 1981, v. 117, № 1, p. 195-200.
85. Braunstein A. E. In: The Enzymes /Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 9, p. 379-486.
86. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. Adv. Enzymol., 1969, v. 32, p. 22-53.
87. Walinder O., Zetterqvist O., Engstrom L. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 4, p. 1060-1064.
88. Walinder O. J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 14, p. 3947-3952.
89. Deutscher J., Beyreuther K., Sobek H. M., Stuber K., Hengstenberg W. Biochemistry, 1982, v. 21, № 20, p. 4867-4873.
90. Johnson P. E., Abott S. J., Orr B. A., Semeriva J. R., Knowles J. R. Biochemistry, 1976, v. 15, № 20, p. 2893-2901.
91. Kreil G., Boyer P. D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, v. 16, № 6, p. 551-555.
92. Ray W. J., Peek E. J. In: The Enzymes, 1973, v. 6, p. 408-477.
93. Post R. L., Kume S. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 20, p. 6993-7000.
94. Gustin M. C., Goodman D. B. P. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 16, p. 9629-9633.
95. DeMeis L. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 7, p. 2055-2062.
96. Todhunter J. A., Reichel K. B., Purisch D. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1976, v. 174, № 1, p. 120-128.
97. Reed T. W., Wilson I. B. In: The Enzymes /Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 378-415.
98. Дженкс В. П. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 61-64.
99. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 213.
100. Roze Z. B. Arch. Biochem. and Biophys., 1970, v. 140, № 2, p. 508-513.
101. Barrett H., Butler R., Wilson I. B. Biochemistry, 1969, v. 8, № 3, p. 1042-1047.

102. *Hinberg I., Laidler K. J.* Can. J. Chem., 1972, v. 50, № 2, p. 1334-1359.
103. *Березин И. В., Клесов А. А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, с. 144-165.
104. *Boyer P. D., De Meis L., Carvalho M. C., Hackney D. D.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 1, p. 136-140.
105. *Gresser M. J., Meyer J. A., Boyer P. D.* J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 20, p. 12030-12038.
106. *Bennet W. S., Steitz T. A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 10, p. 4848-4852.
107. *Steitz T. A., Fletterck R. J., Anderson W. F., Anderson C. M.* J. Mol. Biol., 1976, v. 104, № 1, p. 197-222.
108. *Levine M., Muirhead H., Stammers D. K., Stuart D. I.* Nature, 1978, v. 271, № 5646, p. 626-630.
109. *Stuart D. I., Levine M., Muirhead H., Stammers D. K.* J. Mol. Biol., 1979, v. 134, № 1, p. 109-142.
110. *Banks R. D., Blake C. C. F., Evans P. R., Haser R., Rice D. W., Hardy G. W., Merrett M., Phillips A. W.* Nature, 1979, v. 279, № 5716, p. 773-777.
111. *Evans P. R., Hundson P. J.* Nature, 1979, v. 279, № 5713, p. 500-504.
112. *Schulz G. E., Elzinga M., Marz F., Schirmer R. H.* Nature, 1974, v. 250, № 5462, p. 120-123.
113. *Sachsenheimer W., Schulz G. E.* J. Mol. Biol., 1977, v. 114, № 1, p. 23-36.
114. *Liljas A., Rossmann M. G.* Ann. Rev. Biochem., 1974, v. 43, p. 475-507.
115. *Anderson C. M., Stenkamp R. E., McDonald R. C., Steitz T. A.* J. Mol. Biol., 1978, v. 123, № 2, p. 207-219.
116. *James T. L., Cohn M. J.* J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 2599-2604.
117. *Watts D. S.* In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 8, p. 388-455.
118. *Hollenberg P. F., Flashner M., Cohn M. J.* J. Biol. Chem., 1971, v. 246, № 4, p. 946-953.
119. *Hinrichs M. V., Eyzaguirre J.* Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 704, № 1, p. 177-185.
120. *Markland F. S., Bacharach A. D. E., Weber B. H., O'Grady T. C., Sanders G., Umemura N. J.* J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 4, p. 1301-1308.
121. *Kassab R., Roustan C., Pradel L.-A.* Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 167, № 3, p. 308-316.
122. *Kochetkov S. N., Bulargina T. V., Sashchenko L. P., Severin E. S.* Eur. J. Biochem., 1977, v. 81, № 1, p. 111-118.
123. *Borders C. L., Riordan J. F.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 21, p. 4699-4704.
124. *Berghauser J.* Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 397, № 2, p. 370-376.
125. *Roustan C., Brevet A., Pradel L.-A., Thoai N.* Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 167, № 2, p. 326-338.
126. *Kassab R., Fattoum A., Pradel L.-A.* Eur. J. Biochem., 1970, v. 12, № 2, p. 264-269.
127. *Roustan C., Brevet A., Pradel L.-A., Thoai N.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 37, № 2, p. 248-255.
128. *Roustan C., Brevet A., Pradel L.-A., Thoai N.* Eur. J. Biochem., 1974, v. 44, № 2, p. 353-358.
129. *Grouselle M., Pudles J.* Eur. J. Biochem., 1977, v. 74, № 3, p. 471-480.
130. *Brevet A., Roustan C., Pradel L.-A., Thoai N.* Eur. J. Biochem., 1975, v. 52, № 2, p. 345-350.
131. *Annamalai A. E., Colman R. F.* J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 20, p. 10276-10283.
132. *Yasawa M., Noda L. J.* J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 10, p. 3021-3026.
133. *Shoham M., Steitz T. A.* J. Mol. Biol., 1980, v. 140, № 1, p. 1-14.
134. *Baydown H., Hoppe J., Freist W., Wagner K. G.* J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 2, p. 1032-1036.
135. *Kuroda Y., Sharma R. K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 112, № 3, p. 884-890.
136. *Der Terrossian E., Kassab R.* Eur. J. Biochem., 1976, v. 70, № 2, p. 623-628.
137. *Wirder R., Watts D. C.* Biochem. J., 1966, v. 99, № 1, p. 159-166.
138. *Mahowald T. A., Noltmann E. A., Kuby S. A.* J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 4, p. 1535-1548.
139. *Sharma H. K.* Biochemistry, 1981, v. 21, № 12, p. 6661-6668.
140. *Дженкс В. П.* Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 96.
141. *Steffens J. J., Siewers I. J., Bencovic S. J.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 2431-2440.
142. *Danenberg K. D., Cleland W. W.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 1, p. 28-38.
143. *Mildvan A. S., Sloan D. L., Fung Ch. H., Gupta R. K., Melamud E. J.* J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 8, p. 2431-2434.
144. *Rose I. A.* J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 4, p. 1170-1177.
145. *Granot J., Mildvan A. S., Kaiser E. F.* Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 205, № 1, p. 1-17.
146. *Whitehouse S., Feramisco J. R., Casnellis J. E., Krebs E. G., Walsh D. A.* J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 6, p. 3693-3701.
147. *Dunenberg K. D., Kleland W. W.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 1, p. 28-38.
148. *Dunaway-Mariano D., Kleland W. W.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 7, p. 1496-1505.
149. *Dunaway-Mariano D., Kleland W. W.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 7, p. 1506-1515.
150. *Jaffe E. K., Cohn M. J.* J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 12, p. 10839-10845.
151. *Jaffe E. K., Cohn M.* Fed. Proc., 1979, v. 38, p. 473.
152. *Jaffe E. K., Cohn M. J.* J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 14, p. 4823-4825.



153. *Mclanghlin A. C., Leigh J. S., Jr., Cohn M. J.* Biol. Chem., 1976, v. 251, № 9, p. 2777-2787.
154. *Bickerstaff G. F., Price N. C.* Internat. J. Biochem., 1978, v. 9, № 1, p. 1-18.
155. *Cook P. F., Kenion G. L., Cleland W. W.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 5, p. 1204-1210.
156. *Rosvear P. R., Desmeules P., Kenyon G. L., Mildvan A. S.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 21, p. 6165-6174.
157. *Rauskel F. M., Cleland W. W.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 10, p. 2176-2180.
158. *Viola R. E., Cleland W. W.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 20, p. 4111-4117.
159. *Romanink P. J., Eckstein F. J.* Biol. Chem., 1981, v. 256, № 14, p. 7322-7328.
160. *Кочетков С. Н., Багиров Э. М., Габиров А. Г., Северин Е. С.* Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 3, с. 704-711.
161. *Kablitzer H. R., Marquetant R., Connolly B. A., Goody R. C.* Eur. J. Biochem., 1983, v. 133, № 2, p. 221-227.

Поступила в редакцию

7.XII.1983

После доработки

27.II.1984

## MECHANISMS OF PHOSPHORYL TRANSFER IN ENZYMATIC REACTIONS

KOCHETKOV S. N., GABIBOV A. G., SEVERIN E. S.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

The review outlines main achievements in the phosphoryl transfer catalysis in enzymatic and model systems, as well as new trends and prospects in this field. The potencies of stereochemical, kinetic and structure-function approaches to elucidating the molecular mechanisms are demonstrated with a number of phosphotransferases. The role of covalent, acid-base and electrophilic catalysis in the enzymatic phosphoryl transfer is discussed.