



УДК 577.15.023 + 024

КИНЕТИКА ПРОЦЕССОВ ДИССОЦИИИ-АССОЦИИИ
АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВI. ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ТИПА $2p \rightleftharpoons P$ *Курганов В. И.**Всероссийский научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

Проведен теоретический анализ кинетики установления равновесия в диссоциирующей ферментной системе $2p \xrightleftharpoons[k_{-0}]{k_{+0}} P$ (P — ферментный олигомер, обратимо диссоциирующий на две идентичные половинки p) при изменении условий или добавлении аллостерических лигандов. Получены выражения, описывающие изменения долей форм p или P во времени, и выражения для зависимости начальной скорости процессов диссоциации-ассоциации или времени полупревращения от концентраций фермента и аллостерического лиганда. Показано, что при определенных значениях кинетических параметров зависимость начальной скорости процессов диссоциации-ассоциации от концентрации аллостерического лиганда обнаруживает кооперативный характер. Предложены графические методы определения констант скорости диссоциации (k_{-0}) и ассоциации (k_{+0}). Для иллюстрации применимости предложенных методов использованы литературные данные по кинетике диссоциации треоиндегидратазы, гликогенфосфорилазы А, дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты и ряда других ферментов.

Одной из важных регуляторных характеристик аллостерических ферментов является скорость изменений конформации белковой молекулы при взаимодействии с аллостерическими лигандами. Аллостерические ферменты, активность которых относительно медленно изменяется при изменении концентрации метаболита-регулятора, служат буфером, препятствуя немедленным изменениям концентраций других метаболитов в определенном метаболическом пути и обеспечивая постоянство скорости взаимодействующих метаболических путей, использующих общий исходный метаболит. Подобная точка зрения была высказана Фридепом [1, 2].

Для аллостерических ферментов, обнаруживающих способность к диссоциации на отдельные субъединицы или к ассоциации с образованием ассоциатов большего размера, стадиями, лимитирующими скорость индуцируемых аллостерическими лигандами конформационных изменений белковой молекулы, могут быть процессы диссоциации-ассоциации. Если изменение степени диссоциации или ассоциации аллостерического фермента сопровождается изменением удельной ферментативной активности и если скорости процессов диссоциации-ассоциации малы в сравнении с общей скоростью ферментативной реакции, то за кинетикой процессов диссоциации-ассоциации можно проследить по изменению ферментативной активности.

В настоящей работе проанализирована кинетика установления равновесия в диссоциирующих и ассоциирующих ферментных системах после

внесения аллостерического лиганда и предложены методы определения кинетических параметров, характеризующих скорости процессов диссоциации-ассоциации.

Ассоциация или диссоциация ферментов, вызываемая изменением условий

Обсудим установление равновесия в диссоциирующей ферментной системе типа



где P — ферментный олигомер, обратимо распадающийся на две идентичные половинки p (в общем случае форма p может быть построена из нескольких субъединиц), k_{+0} — константа скорости ассоциации и k_{-0} — константа скорости диссоциации. Пусть K_0 — константа равновесия (константа ассоциации), тогда

$$K_0 = \frac{k_{+0}}{k_{-0}} = \frac{[P]_f}{[p]_f^2} \quad (2)$$

($[p]_f$ и $[P]_f$ — равновесные концентрации форм p и P). Обозначим далее через γ и Γ соответственно доли форм p и P :

$$\gamma = \frac{[p]}{[E]_0} \quad \text{и} \quad \Gamma = \frac{2[P]}{[E]_0}, \quad (3)$$

где $[E]_0$ — общая молярная концентрация фермента в расчете на форму p ($[E]_0 = [p] + 2[P]$). Очевидно, что $(\gamma + \Gamma) = 1$. Равновесные доли форм p и P связаны с общей концентрацией фермента [3, 4] следующим образом:

$$\gamma_f = \frac{2}{z_f + 1} \quad \text{и} \quad \Gamma_f = \frac{z_f - 1}{z_f + 1}, \quad (4)$$

здесь $z_f = \sqrt{1 + 8(K_0[E]_0)_f}$; $(K_0[E]_0)_f$ — безразмерная концентрация фермента в условиях, при которых исследуется кинетика установления равновесия.

Рассмотрим прежде всего кинетику установления равновесия $2p \rightleftharpoons P$ при изменении условий хранения фермента (разбавление, изменение pH или температуры раствора и т. д.). Для скорости изменения доли формы p справедливо выражение

$$\frac{d\gamma}{dt} = k_{-0}(1 - \gamma - 2K_0[E]_0\gamma^2). \quad (5)$$

Интегрируя, получаем выражение для изменения во времени (t) доли формы p :

$$\gamma = \frac{2[(z_0 + z_f) - (z_0 - z_f)e^{-kt}]}{(z_f + 1)(z_0 + z_f) + (z_f - 1)(z_0 - z_f)e^{-kt}}, \quad (6)$$

где $k = z_fk_{-0}$, $z_0 = \sqrt{1 + 8(K_0[E]_0)_0}$ и $(K_0[E]_0)_0$ — безразмерная концентрация фермента в начальный момент времени ($t = 0$). Выражение (6) примет следующий вид, если от z_0 и z_f перейти к γ_0 и γ_f :

$$\gamma = \gamma_f \frac{\gamma_0 + \gamma_f - \gamma_0\gamma_f + (\gamma_0 - \gamma_f)e^{-kt}}{\gamma_0 + \gamma_f - \gamma_0\gamma_f - (1 - \gamma_f)(\gamma_0 - \gamma_f)e^{-kt}}, \quad (7)$$

где $k = k_{-0}(2 - \gamma_f)/\gamma_f$ и γ_0 — доля формы p в начальный момент времени, равная $2/(z_0 + 1)$. Учитывая равенство $\Gamma = (1 - \gamma)$, получаем далее выражения для изменения во времени доли формы P :

$$\Gamma = \frac{(z_f - 1)(z_0 + z_f) + (z_f + 1)(z_0 - z_f)e^{-kt}}{(z_f + 1)(z_0 + z_f) + (z_f - 1)(z_0 - z_f)e^{-kt}}, \quad (8)$$

($k = z_t k_{-0}$) или

$$\Gamma = \frac{\Gamma_f(1 - \Gamma_0\Gamma_f) - (\Gamma_f - \Gamma_0)e^{-kt}}{(1 - \Gamma_0\Gamma_f) - \Gamma_f(\Gamma_f - \Gamma_0)e^{-kt}}, \quad (9)$$

$k = k_{-0}(1 + \Gamma_f)/(1 - \Gamma_f)$; Γ_0 — доля формы Р в начальный момент времени, равная $(z_0 - 1)/(z_0 + 1)$.

Важными кинетическими характеристиками кривых зависимости γ или Γ от t являются начальная скорость процесса:

$$\left(\frac{d\gamma}{dt}\right)_0 = k_{-0} \frac{(\gamma_f - \gamma_0)(\gamma_0 + \gamma_f - \gamma_0\gamma_f)}{\gamma_f^2} \quad (10)$$

или

$$\left(\frac{d\Gamma}{dt}\right)_0 = k_{-0} \frac{(\Gamma_f - \Gamma_0)(1 - \Gamma_0\Gamma_f)}{(1 - \Gamma_f)^2} \quad (11)$$

и время полупревращения, $t_{1/2}$ (время, при котором изменение доли формы р или формы Р составляет половину от максимального):

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_{-0}z_f} \ln \left\{ \frac{z_f^2 + 3z_f + 3z_0z_f + z_0}{(z_0 + z_f)(z_f + 1)} \right\}. \quad (12)$$

Если олигомерные формы р и Р характеризуются различными каталитическими свойствами, то удельная ферментативная активность a (т. е. скорость ферментативной реакции, деленная на концентрацию фермента) меняется при изменении соотношения между концентрациями форм р и Р [3, 4]:

$$a = a_1\gamma + a_2\Gamma = a_2 + (a_1 - a_2)\gamma = a_1 + (a_2 - a_1)\Gamma \quad (13)$$

(a_1 и a_2 — удельные ферментативные активности олигомерных форм р и Р соответственно). В этом случае за кинетикой установления равновесия в ферментной системе $2p \rightleftharpoons P$ можно проследить по изменению удельной ферментативной активности.

Для нахождения констант скорости ассоциации (k_{+0}) и диссоциации (k_{-0}) необходимо иметь серию кривых зависимости удельной ферментативной активности от времени, полученных при различных концентрациях фермента. Прежде всего из зависимости равновесных значений ($t \rightarrow \infty$) удельной ферментативной активности (a_f) от концентрации фермента рассчитываем значения удельной ферментативной активности олигомерных форм р и Р (a_1 и a_2 соответственно) и константу ассоциации K_0 . Для этой цели могут быть использованы методы расчета, предложенные нами в работах [4—6]. Анализ зависимости a_f от $[E]_0$ существенно упрощается в тех случаях, когда одна из олигомерных форм не проявляет каталитической активности: при $a_1 = 0$ (форма р неактивна) удельная ферментативная активность пропорциональна доле формы Р ($a = a_2\Gamma$), а при $a_2 = 0$ (форма Р неактивна) ферментативная активность пропорциональна доле формы р ($a = a_1\gamma$). После нахождения параметров a_1 , a_2 и K_0 становится возможным пересчитать кривые зависимости a от t в кривые зависимости γ от t или Γ от t (например, при $a_1 = 0$ $\Gamma = a/a_2$, а при $a_2 = 0$ $\gamma = a/a_1$). Константа скорости диссоциации k_{-0} может быть определена далее при помощи следующих линейных соотношений:

$$\frac{\gamma_f}{(2 - \gamma_f)} \ln \left\{ \frac{(\gamma_f - \gamma_0)(\gamma_0 + \gamma_f - \gamma_0\gamma_f)}{(\gamma_f - \gamma)(\gamma_0 + \gamma_f - \gamma_0\gamma_f)} \right\} = k_{-0}t \quad (14)$$

или

$$\left(\frac{1 - \Gamma_f}{1 + \Gamma_f}\right) \ln \left\{ \frac{(\Gamma_f - \Gamma_0)(1 - \Gamma_f\Gamma_f)}{(\Gamma_f - \Gamma)(1 - \Gamma_0\Gamma_f)} \right\} = k_{-0}t. \quad (15)$$

После определения констант K_0 и k_{-0} не представляет труда рассчитать константу скорости ассоциации: $k_{+0} = k_{-0}K_0$.

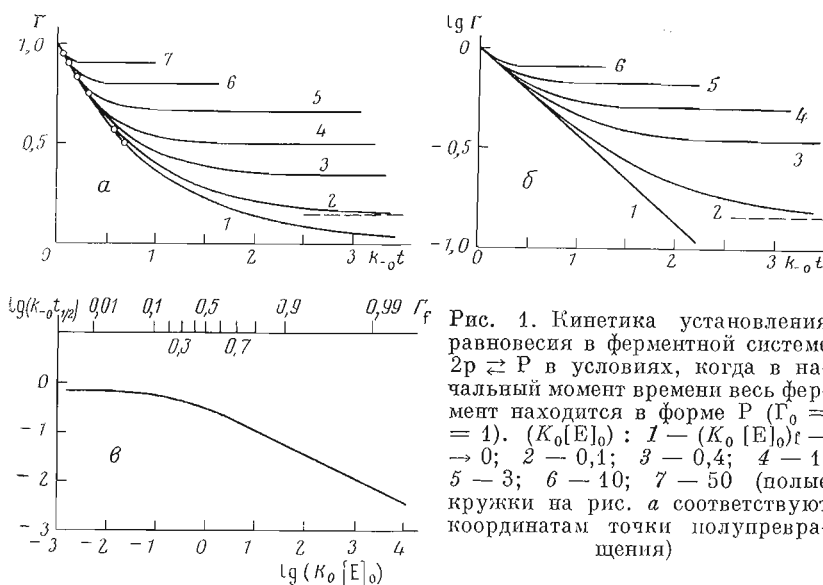


Рис. 1. Кинетика установления равновесия в ферментной системе $2P \rightleftharpoons P$ в условиях, когда в начальный момент времени весь фермент находится в форме Р ($\Gamma_0 = 1$). ($K_0[E]_0$): 1 — $(K_0[E]_0)t \rightarrow 0$; 2 — 0,1; 3 — 0,4; 4 — 1; 5 — 3; 6 — 10; 7 — 50 (полные кружки на рис. а соответствуют координатам точки полупревращения)

Частный случай: весь фермент в начальный момент времени находится в форме Р ($\Gamma_0 = 1$). Изменение степени диссоциации ферментного олигомера Р может быть достигнуто путем разбавления раствора фермента или изменения условий (рН, температура, ионная сила и т. д.). При $\Gamma_0 = 1$ изменение доли формы Р во времени следует закону

$$\Gamma = \frac{\Gamma_f + e^{-z_f k_0 t}}{1 + \Gamma_f e^{-z_f k_0 t}}, \quad (16)$$

где

$$z_f = \sqrt{1 + 8(K_0[E]_0)_f}.$$

Рассчитанные при помощи этого уравнения теоретические зависимости доли формы Р от безразмерного времени $k_0 t$ при различных фиксированных значениях безразмерной концентрации фермента $(K_0[E]_0)_f$ представлены на рис. 1, а. При достаточно малых концентрациях фермента уменьшение доли формы Р во времени следует экспоненциальному закону:

$$\lim_{(K_0[E]_0)_f \rightarrow 0} \Gamma = e^{-k_0 t}. \quad (17)$$

Это означает, что в координатах $\{\lg \Gamma; t\}$ по мере увеличения степени разбавления раствора фермента кинетические кривые приближаются к предельной прямой, тангенс угла наклона которой равен $-2,303 k_0$ (рис. 1, б).

Для кривых зависимости доли формы Р от времени, полученных при различных концентрациях фермента, начальная скорость процесса диссоциации одинакова:

$$\left(\frac{d\Gamma}{dt} \right)_0 = -k_0, \quad (18)$$

а зависимость времени полупревращения ($t_{1/2}$) от концентрации фермента подчиняется выражению

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_0 z_f} \ln \left\{ \frac{3z_f + 1}{z_f + 1} \right\}. \quad (19)$$

Рассчитанная при помощи этого уравнения зависимость безразмерного времени полупревращения ($k_0 t_{1/2}$) от безразмерной концентрации фермента $(K_0[E]_0)_f$ представлена на рис. 1, в в логарифмических координатах

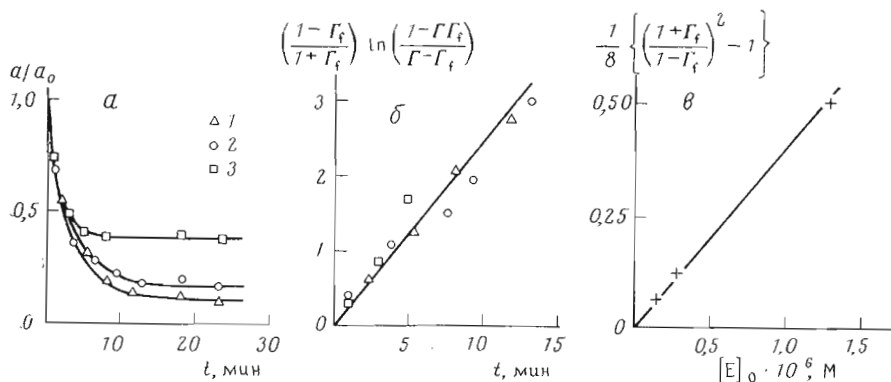


Рис. 2. Кинетика обратимой диссоциации треониндегидратазы из *Rhodospirillum rubrum*. Конечная концентрация фермента (мкг/мл): 1 — 12; 2 — 24; 3 — 120 [7]. $[E]_0$ — молярная концентрация фермента в расчете на димер р (M 90 000)

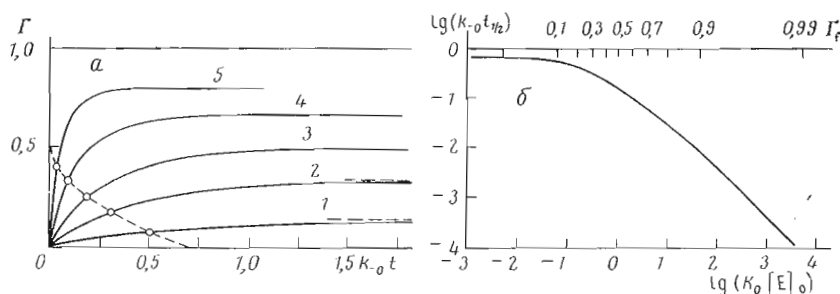


Рис. 3. Кинетика установления равновесия в ферментной системе $2p \rightleftharpoons P$ в условиях, когда в начальный момент времени весь фермент находится в форме р ($\Gamma_0 = 0$). $(K_0 [E]_0)_f$: 1 — 0,1; 2 — 0,4; 3 — 1; 4 — 3; 5 — 10 (пунктирная линия — геометрическое место точек полупревращения)

(приведена также ось значений Γ_f). Величина $t_{1/2}$ уменьшается с ростом концентрации фермента и при достаточно высоких значениях $[E]_0$ становится пропорциональной $1/\sqrt{[E]_0}$:

$$\lim_{(K_0 [E]_0)_f \rightarrow \infty} t_{1/2} = \frac{\ln 3}{k_{-0} \sqrt{8(K_0 [E]_0)_f}}. \quad (20)$$

Предельное значение $t_{1/2}$ при $(K_0 [E]_0)_f \rightarrow 0$ составляет $\ln 2/k_{-0}$.

Порядок нахождения констант K_0 , k_{-0} и k_{+0} может быть следующим: сначала рассчитываем константу ассоциации K_0 , используя линейное соотношение

$$\frac{1}{8} \left\{ \left(\frac{1 + \Gamma_f}{1 - \Gamma_f} \right)^2 - 1 \right\} = K_0 [E]_0, \quad (21)$$

затем находим константу скорости диссоциации (k_{-0}) при помощи линейного соотношения

$$\left(\frac{1 - \Gamma_f}{1 + \Gamma_f} \right) \ln \left(\frac{1 - \Gamma_f \Gamma_f}{\Gamma - \Gamma_f} \right) = k_{-0} t, \quad (22)$$

наконец, рассчитываем константу скорости ассоциации: $k_{+0} = k_{-0} K_0$.

Обсудим в качестве примера кинетику диссоциации треониндегидратазы (КФ 4.2.1.16) из *Rhodospirillum rubrum*. На рис. 2, а представлены кривые уменьшения относительной удельной ферментативной активности (a/a_0) треониндегидратазы во времени после разбавления фермента (0° ,

0,05 М фосфатный буфер, рН 8,0) [7]. Падение удельной ферментативной активности треониндегидратазы при разбавлении связано с обратимой диссоциацией активного тетрамера фермента (M 180 000) на неактивные димеры, причем в начальный момент времени весь фермент находится в тетрамерной форме ($\Gamma_0 = 1$). Поскольку ферментный олигомер (Р) треониндегидратазы распадается на две неактивные половинки, относительная удельная ферментативная активность (a/a_0) соответствует доле формы Р (Γ), а предельные значения a/a_0 при $t \rightarrow \infty$ — доле формы Р в равновесных условиях (Γ_f). В соответствии с линейным соотношением (22) строим зависимость величины $(1 - \Gamma_f) \ln [(1 - \Gamma_f)/(\Gamma - \Gamma_f)]/(1 + \Gamma_f)$ от t (рис. 2, б). Из наклона полученной прямой находим константу скорости диссоциации треониндегидратазы: $k_{-0} = 4,2 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. На основании равновесных значений доли формы Р (Γ_f) при помощи линейного соотношения (21) рассчитываем константу ассоциации: $K_0 = 3,9 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$ (рис. 2, в). Определив константы K_0 и k_{-0} , находим константу скорости ассоциации: $k_{+0} = 1,6 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Частный случай: весь фермент в начальный момент времени находится в форме р ($\Gamma_0 = 0$). Реассоциация половинок р может быть достигнута изменением условий. При $\Gamma_0 = 0$ изменение доли формы Р во времени следует закону

$$\Gamma = \frac{\Gamma_f(1 - e^{-2\Gamma_f k_{-0}t})}{1 - \Gamma_f^2 e^{-2\Gamma_f k_{-0}t}}. \quad (23)$$

Рассчитанные при помощи этого уравнения теоретические зависимости доли формы Р от безразмерного времени ($k_{-0}t$) при различных фиксированных значениях безразмерной концентрации фермента ($K_0 [E]_0$)_f представлены на рис. 3, а. Начальная скорость процесса реассоциации линейно растет с увеличением концентрации фермента:

$$\left(\frac{d\Gamma}{dt} \right)_0 = 2k_{+0} [E]_0. \quad (24)$$

Подобный характер зависимости начальной скорости процесса ассоциации от концентрации фермента наблюдался, например, при реассоциации лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27; источник — сердце свиньи), переведенной в инактивированное состояние обработкой кислотой, рН 2,3 [8], и при реассоциации фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11; источник — *Bacillus licheniformis*), переведенной в диссоциированное состояние инкубацией при 0° [9].

Зависимость времени полупревращения для процесса реассоциации (при $\Gamma_0 = 0$) от концентрации фермента определяется выражением

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_{-0} z_f} \ln \left\{ 2 - \left(\frac{z_f - 1}{z_f + 1} \right)^2 \right\}, \quad (25)$$

где

$$z_f = \sqrt{1 + 8(K_0 [E]_0)_f}.$$

Величина $t_{1/2}$ уменьшается с ростом концентрации фермента и при достаточно высоких значениях $[E]_0$ становится пропорциональной $1/[E]_0$ (рис. 3, б):

$$\lim_{(K_0 [E]_0)_f \rightarrow \infty} t_{1/2} = \frac{1}{2k_{+0} [E]_0}. \quad (26)$$

Подобный характер зависимости времени полупревращения процесса от концентрации фермента наблюдался, например, при реассоциации дрожжевой енолазы (КФ 4.2.1.11), переведенной в неактивное диссоциированное состояние действием ионов Br^- (система $2p \rightleftharpoons P$ с $a_1 = 0$) [10], и для ассоциации активных димеров гликогенфосфорилазы А (КФ 2.4.1.1) из

скелетных мышц кролика в неактивные тетрамеры [11]. Предельное значение величины при $(K_0 [E]_0)_t \rightarrow 0$ равно $\ln 2/k_{-0}$.

При $\Gamma_0 = 0$ линейное соотношение (15), используемое для определения константы скорости диссоциации (k_{-0}), принимает вид

$$\left(\frac{1 - \Gamma_t}{1 + \Gamma_t} \right) \ln \left\{ \frac{\Gamma_t(1 - \Gamma_t)}{\Gamma_t - \Gamma} \right\} = k_{-0}t. \quad (27)$$

Ассоциация и диссоциация аллостерических ферментов, вызываемая аллостерическими лигандами

Внесение в ферментную систему $2p \rightleftharpoons P$ лиганда, обнаруживающего различное сродство к олигомерным формам p и P , вызывает смещение равновесия $2p \rightleftharpoons P$ в сторону образования олигомерной формы, обладающей большим сродством к лиганду. Изменения долей форм p и P во времени описываются в этом случае уравнениями (6) — (9), однако константа ассоциации (K_0) и константа скорости диссоциации (k_{-0}) должны быть заменены на кажущиеся константы (соответственно K и k_{-}), которые зависят от концентрации лиганда (L). Под кажущейся константой ассоциации (K) подразумевается величина

$$K = \frac{\sum_i [PL_i]}{\left\{ \sum_i [pL] \right\}^2}, \quad (28)$$

где pL_i и PL_i — комплексы олигомерных форм с лигандом.

Допустим, что центры, связывающие лиганд, являются эквивалентными и не взаимодействующими в каждой из олигомерных форм и что формы p и P содержат соответственно $n/2$ и n связывающих центров. В таком случае [5]

$$K = K_0 \left(\frac{1 + [L]_0/K_L''}{1 + [L]_0/K_L'} \right)^n, \quad (29)$$

где K_L' и K_L'' — микроскопические константы диссоциации комплексов лиганда с формами p и P . При этих же допущениях нами было ранее получено выражение для кажущейся константы диссоциации (k_{-}) [12, 13] (в этих работах кажущаяся константа диссоциации обозначалась через G):

$$k_{-} = \frac{\sum_{i=0}^{i=n} \frac{n!}{i!(n-i)!} k_{-i} \left(\frac{[L]_0}{K_L''} \right)^i}{(1 + [L]_0/K_L'')^n}, \quad (30)$$

где k_{-i} — «эффективная» константа скорости диссоциации формы PL_i на две белковые половинки (без отщепления лиганда) *. Допустим далее, что последовательность констант k_{-i} образует геометрическую прогрессию (как это предполагается, например, для констант скорости трансформации комплексов $TL_i \rightarrow RL_i$ при использовании модели аллостерического фермента, предложенной Моно, Уайменом и Шанже [14—16]):

$$\frac{k_{-i}}{k_{-(i-1)}} = \alpha \quad \text{и} \quad \frac{k_{-i}}{k_{-0}} = \alpha^i. \quad (31)$$

Параметр α характеризует, очевидно, влияние лиганда на скорость диссоциации олигомера P на две половинки.

* Например, для формы PL_2 (где P или, в другом обозначении, $p \cdot p$ — тетрамер; $n = 4$) «эффективная» константа скорости диссоциации k_{-2} связана следующим соотношением с константами скорости стадий: $p \cdot pL_2 \xrightarrow{k_{-02}} p + pL_2$ и $pL \cdot pL \xrightarrow{k_{-11}} pL + pL$: $6k_{-2} = 2k_{-02} + 4k_{-11}$.

При полном насыщении олигомерных форм p и P лигандом устанавливается равновесие



Константа ассоциации (K_{np}) для этого равновесия равна

$$K_{np} = \frac{[PL_n]}{[pL_{n/2}]^2} = \frac{k_{+n}}{k_{-n}} = \varphi^n \frac{k_{+0}}{k_{-0}} \quad (33)$$

($\varphi \equiv K_L'/K_L''$). Поскольку $k_{-n} = k_{-0}\alpha^n$, получаем

$$k_{+n} = k_{+0}(\alpha\varphi)^n. \quad (34)$$

Следовательно, влияние лиганда на скорость ассоциации половинок p в олигомер P может быть охарактеризовано произведением параметров $\alpha\varphi$.

При выполнении условия (31) выражение для зависимости кажущейся константы диссоциации (k_-) от концентрации лиганда упрощается:

$$k_- = k_{-0} \left(\frac{1 + \alpha [L]_0 / K_L''}{1 + [L]_0 / K_L'} \right)^n. \quad (35)$$

Заметим, что если форма P не связывает лиганд ($\varphi = 0$), то $k_- = k_{-0}$. Величина k , входящая в уравнения (6) и (8), принимает при сделанных допущениях вид

$$k = k_{-0} \left(\frac{1 + \alpha [L]_0 / K_L''}{1 + [L]_0 / K_L'} \right)^n \left/ 1 + 8 \left(\frac{1 + [L]_0 / K_L''}{1 + [L]_0 / K_L'} \right)^n K_0 [E]_0 \right. \quad (36)$$

Уравнения (10) и (11) в случае смещения равновесия $2p \rightleftharpoons P$ путем добавления лиганда, преобразуются:

$$\left(\frac{d\gamma}{dt} \right)_0 = k_{-0} \left(\frac{1 + \alpha [L]_0 / K_L''}{1 + [L]_0 / K_L'} \right)^n \frac{(\gamma_f - \gamma_0)(\gamma_0 + \gamma_f - \gamma_0\gamma_f)}{\gamma_f^2}, \quad (37)$$

$$\left(\frac{d\Gamma}{dt} \right)_0 = k_{-0} \left(\frac{1 + \alpha [L]_0 / K_L''}{1 + [L]_0 / K_L'} \right)^n \frac{(\Gamma_f - \Gamma_0)(1 - \Gamma_0\Gamma_f)}{(1 - \Gamma_f)^2}. \quad (38)$$

Время полупревращения зависит от концентрации фермента и концентрации лиганда следующим образом:

$$t_{0.5} = \frac{1}{k_{-0}z_f} \left(\frac{1 + [L]_0 / K_L''}{1 + \alpha [L]_0 / K_L'} \right)^n \ln \left\{ \frac{z_f^2 + 3z_f + 3z_0z_f + z_0}{(z_f + 1)(z_0 + z_f)} \right\}, \quad (39)$$

где

$$z_f = \sqrt{1 + 8K[E]_0}.$$

Изложим принципы анализа кинетики установления равновесия в ферментной системе $2p \rightleftharpoons P$ в том случае, когда смещение равновесия осуществляется добавлением лиганда. Прежде всего необходимо при некоторой фиксированной концентрации лиганда получить серию кривых зависимости удельной ферментативной активности от времени, соответствующих различным концентрациям фермента. Используя приведенные выше приемы, находим константу ассоциации (K) и константу скорости диссоциации (k_-), которые являются теперь кажущимися константами и зависят от концентрации лиганда. Если подобный анализ проводится при различных фиксированных концентрациях лиганда, то в конечном счете становится возможным построить зависимость кажущейся константы ассоциации (K) и кажущейся константы скорости диссоциации (k_-) от концентрации лиганда. Если выполняются допущения, использованные нами при выводе уравнений (29)–(31) и (35), то из зависимостей K от $[L]_0$ и k_- от $[L]_0$ можно рассчитать параметры: K_0 , K_L' , K_L'' (см., например, [17]), k_{-0} и α (вели-

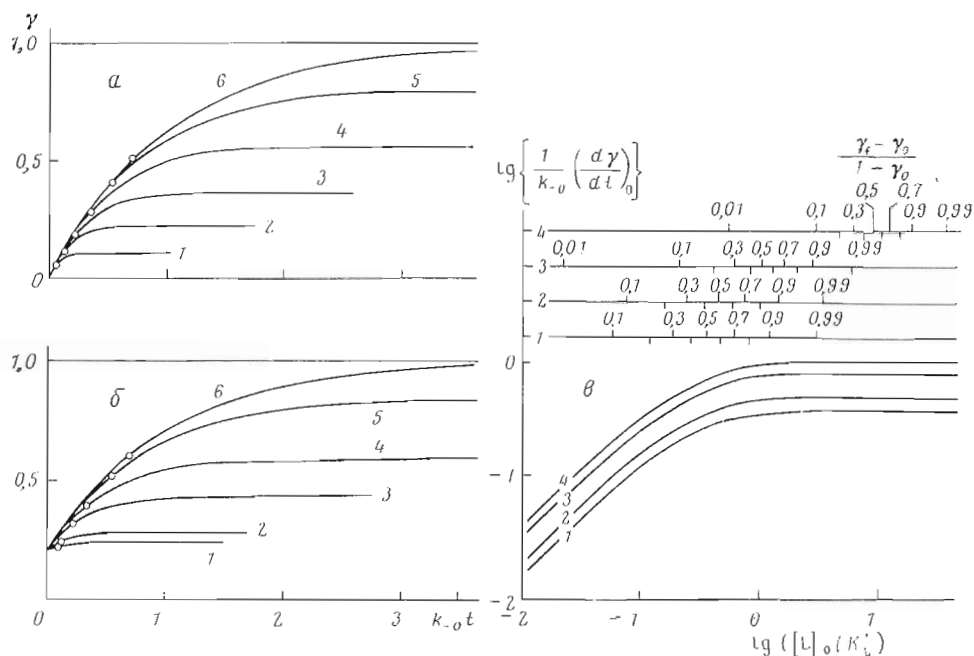


Рис. 4. Кинетика установления равновесия в ферментной системе $2p \rightleftharpoons P$ после вне-
сения лиганда, связывающегося только с формой p ($\phi = K_L'/K_L'' = 0$). $a - n = 4$,
 $K_0 [E]_0 = 10^4$, $[L]_0/K_L'$: 1 — 3; 2 — 5; 3 — 7; 4 — 10; 5 — 15; 6 — $[L]_0/K_L' \rightarrow \infty$. $b -$
 $n = 4$, $K_0 [E]_0 = 10$, $[L]_0/K_L'$: 1 — 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,6; 4 — 1; 5 — 2; 6 — $[L]_0/K_L' \rightarrow$
 $\rightarrow \infty$. $c - K_0 [E]_0$: 1 — 0,5; 2 — 1; 3 — 10; 4 — 10^4

чина n предполагается известной; она может быть определена из независи-
мых опытов по связыванию лиганда белком). Эти принципы анализа ки-
нетики установления равновесия в ферментной системе $2p \rightleftharpoons P$ после
добавления лиганда дополняют принципы анализа кинетики действия
диссоциирующих и ассоциирующих аллостерических ферментных систем,
разработанные нами в работах [4, 5, 18].

Частный случай: лиганд вызывает диссоциацию олигомера P. а) $\phi = 0$.
Обсудим случай, когда лиганд связывается только формой p и, следова-
тельно, вызывает диссоциацию олигомера P . Насыщающие концентрации
лиганда вызывают полную диссоциацию олигомера P на половинки.

На рис. 4, a представлены рассчитанные при помощи уравнения (6)
зависимости доли формы p от безразмерного времени ($k_0 t$) при $n = 4$,
 $K_0 [E]_0 = 10^4$ и различных значениях безразмерной концентрации лиган-
да ($[L]_0/K_L'$). Для расчета величины k использовали выражение (36),
а для расчета величины z_f — выражение (29), определяющее зависимость
кажущейся константы ассоциации от концентрации лиганда ($z_f =$
 $= \sqrt{1 + 8K [E]_0}$, а $z_0 = \sqrt{1 + 8K_0 [E]_0}$). При использованной concentra-
ции фермента ($K_0 [E]_0 = 10^4$) практически весь фермент в начальный мо-
мент времени находится в ассоциированном состоянии: $\gamma_0 = 0,0070$.
Видно, что начальная скорость процесса диссоциации не зависит от кон-
центрации лиганда. Этот вывод подтверждается более тщательным ана-
лизом теоретической зависимости начальной скорости диссоциации
($d\gamma/dt)_0/k_{-0}$) от безразмерной концентрации лиганда, представленной на
рис. 4, c в логарифмических координатах (кривая 4). На этом рисунке
дана также ось значений функции $(\gamma_f - \gamma_0)/(1 - \gamma_0)$, показывающей,
какую часть от предельного изменения доли формы p , достигаемого при
насыщающих концентрациях лиганда, составляет изменение доли формы p
под действием определенной концентрации лиганда. В экспериментально

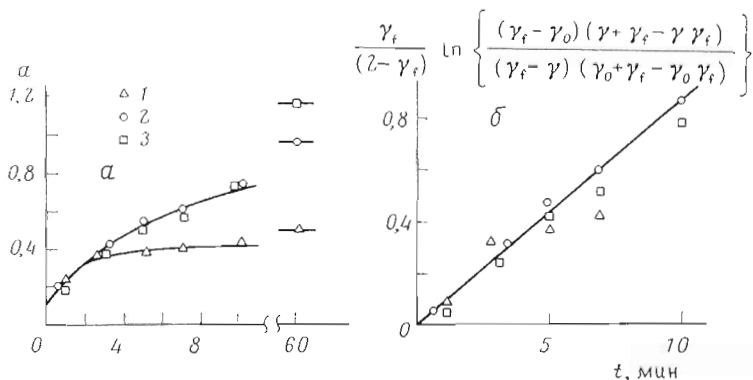


Рис. 5. Кинетика обратимой диссоциации тетрамера гликогенфосфо-
риказы А из скелетных мышц кролика, вызываемой гликогеном.
Концентрация гликогена (мг/мл): 1 — 1; 2 — 3; 3 — 8

доступной области значений величины $(\gamma_t - \gamma_0)/(1 - \gamma_0)$ порядок начальной скорости процесса диссоциации по концентрации лиганда * равен практически нулю.

Однако при уменьшении концентрации фермента, сопровождающемся увеличением начальной доли формы p (γ_0), в экспериментально доступной области значений величины $(\gamma_t - \gamma_0)/(1 - \gamma_0)$ порядок начальной скорости от концентрации лиганда (n_L) растет, причем n_L может принимать значения от 0 до 1. Это видно при рассмотрении кривых зависимости $(d\gamma/dt)_0/k_{-0}$ от $[L]_0/K_{-1}'$, представленных на рис. 4, в ($K_0 [E]_0 = 10$; 1 и 0,5). Кинетические кривые изменения доли формы p при $n = 4$, $K_0 [E]_0 = 10$ (рис. 4, б) иллюстрируют случай, когда при заметной начальной доле формы p (для представленных кривых $\gamma_0 = 0,20$) начальная скорость процесса диссоциации зависит от концентрации лиганда: $(d\gamma/dt)_0$ растет с ростом $[L]_0$.

В качестве примера обсудим диссоциацию неактивных тетрамеров гликогенфосфоорилазы А из скелетных мышц кролика на активные димеры (M 200 000) под действием высокомолекулярного субстрата гликогена, связывающегося только с димерной формой фермента. На рис. 5, а представлены кинетические кривые увеличения удельной активности гликогенфосфоорилазы А после добавления гликогена к ферменту (3 мг/мл), находящемуся преимущественно в тетрамерной форме (22°) [19]. Доля димерной формы (γ) может быть рассчитана в данном случае как отношение a/a_1 , где a_1 — удельная ферментативная активность димера (мкмоль присоединенных глюкозильных остатков в 1 мин на 1 мг белка). Поскольку насыщающие концентрации гликогена вызывают полный распад тетрамера на димеры, величина a_1 может быть найдена экстраполяцией предельных значений удельной ферментативной активности для кинетических кривых ($t \rightarrow \infty$) к бесконечно большой концентрации гликогена: $a_1 = 1,28$ мкмоль присоединенных глюкозильных остатков в 1 мин на 1 мг белка. Рассчитанная на основании этого значения величины a_1 доля димерной формы в начальный момент времени (γ_0) составляет 0,10. Для расчета константы скорости диссоциации тетрамера (k_{-0}) мы использовали линейное соотношение (14) (см. рис. 5, б). Как и следовало ожидать, кинетические кривые, полученные для трех фиксированных концентраций гликогена, дают одну и ту же линейную анаморфозу. Тангенс угла наклона прямой соответствует константе скорости диссоциации: $k_{-0} = 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

* Порядок начальной скорости процесса диссоциации по концентрации лиганда равен тангенсу угла наклона касательной к кривой зависимости $\lg (d\gamma/dt)_0$ от $\lg [L]_0$ при выбранном значении $[L]_0$.

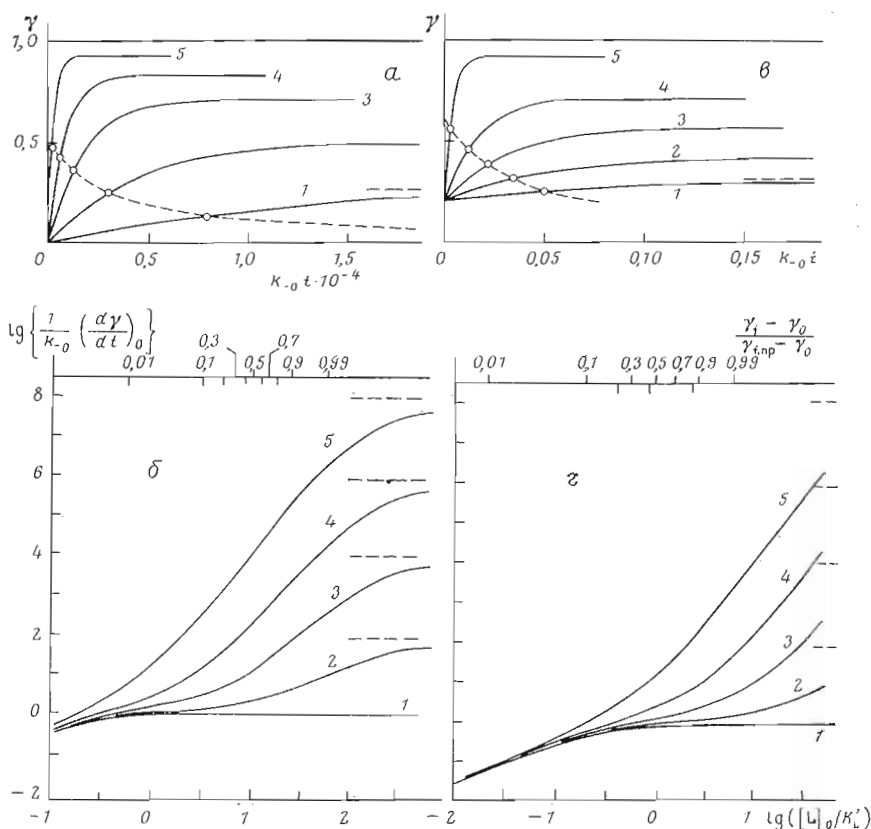


Рис. 6. Кинетика установления равновесия в ферментной системе $2p \rightleftharpoons P$ после внесения лиганда, преимущественно связывающегося с формой p ($\varphi = K_L'/K_L'' < 1$). а — $n = 4$, $K_0 [E]_0 = 10^4$, $\alpha = 100$, $\varphi = 0,01$, $[L]_0/K_L'$: 1 — 6; 2 — 10; 3 — 15; 4 — 20; 5 — 30. б — $K_0 [E]_0 = 10^4$, $\varphi = 0,01$; значения параметра α : 1 — 1; 2 — 3; 3 — 10; 4 — 30; 5 — 100. в — $n = 4$, $K_0 [E]_0 = 10$, $\alpha = 100$, $\varphi = 0,01$, $[L]_0/K_L'$: 1 — 0,3; 2 — 0,6; 3 — 1; 4 — 1,5; 5 — 3. г — $K_0 [E]_0 = 10$, $\varphi = 0,01$, значения параметра α : 1 — 1; 2 — 3; 3 — 10; 4 — 30; 5 — 100

б) $\varphi \neq 0$ ($\varphi < 1$). Обсудим случай, когда лиганд преимущественно связывается формой p , смещая равновесие $2p \rightleftharpoons P$ в сторону образования формы p . Проведенный нами анализ кинетики установления равновесия в подобной системе показал, что если диссоциирующее действие лиганда связано исключительно с ускорением стадии диссоциации олигомера P (т. е. скорость стадии ассоциации половинок p остается неизменной в присутствии лиганда; $\alpha\varphi = 1$), то при $K_0 [E]_0 \gg 1$ (т. е. при $t = 0$ практически весь фермент находится в ассоциированном состоянии) и $\varphi \ll 1$ максимальное значение порядка начальной скорости процесса диссоциации по концентрации лиганда в экспериментально доступной области значений величины $(\gamma_t - \gamma_0)/(\gamma_{t, \text{пр}} - \gamma_0)$ * приближается к n (число связывающих центров в олигомере P). Об этом свидетельствуют кинетические кривые изменения доли формы p при $n = 4$, $K_0 [E]_0 = 10^4$, $\alpha = 100$ и $\varphi = 0,01$ ($\alpha\varphi = 1$) (рис. 6, а) и зависимости начальной скорости процесса диссоциации от концентрации лиганда при различных значениях параметра α (рис. 6, б).

* Величина $(\gamma_t - \gamma_0)/(\gamma_{t, \text{пр}} - \gamma_0)$, где $\gamma_{t, \text{пр}}$ — предельное значение величины γ_t при $[L]_0/K_L' \rightarrow \infty$, показывает, какую часть от предельного изменения доли формы p , достигаемого при насыщающих концентрациях лиганда, составляет изменение доли формы p под действием определенной концентрации лиганда.

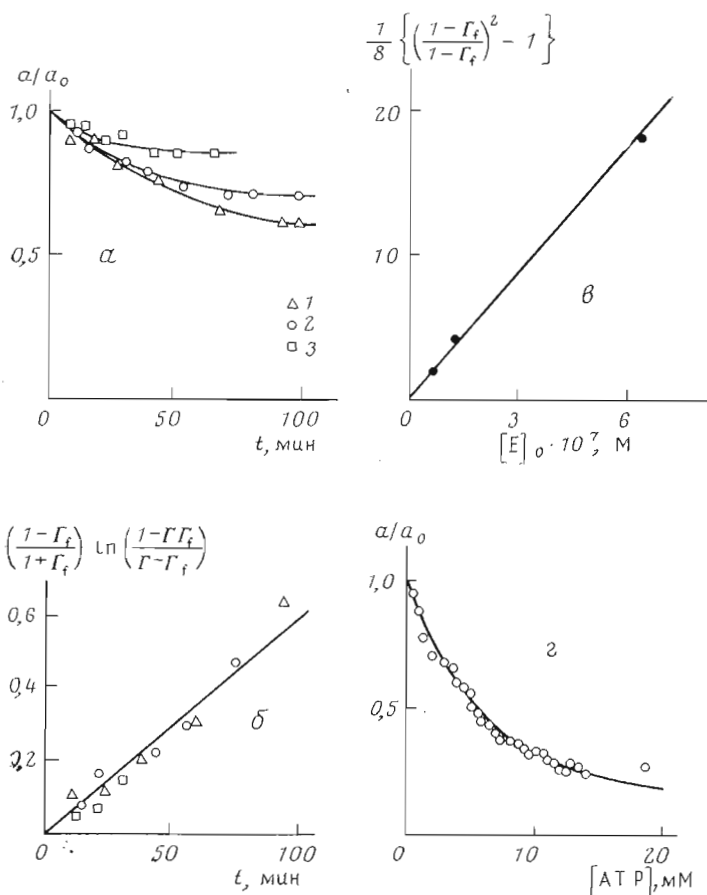


Рис. 7. Кинетика обратимой диссоциации дрожжевой дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты, вызываемой АТР. а, б — конечная концентрация фермента (мкг/мл): 1 — 5; 2 — 10; 3 — 50. в — зависимость величины снижения относительной активности фермента после 3-часовой инкубации с АТР от концентрации лиганда; точки — экспериментальные данные [20], сплошная кривая рассчитана при помощи уравнений (4) и (29) при следующих значениях параметров: $n = 4$, $K_L = 8 \cdot 10^{-4} M$, $\varphi = 0,1$ и $K_0 [E]_0 = 440$

Если же диссоциирующее действие лиганда связано исключительно с замедлением стадии ассоциации половинок p в олигомер P (т. е. скорость стадии диссоциации олигомера P остается неизменной в присутствии лиганда; $\alpha = 1$), то в экспериментально доступной области значений величины $(\gamma_f - \gamma_0)/(\gamma_{f,пр} - \gamma_0)$ порядок начальной скорости процесса диссоциации по концентрации лиганда (n_L) близок к нулю (кривая 1 на рис. 6, б). Уменьшение концентрации фермента $K_0 [E]_0$ (т. е. увеличение начальной доли формы p , γ_0) также приводит к уменьшению величины n_L в экспериментально доступной области значений величины $(\gamma_f - \gamma_0)/(\gamma_{f,пр} - \gamma_0)$ (см. рис. 6, в и г).

Обсудим кинетику диссоциации дрожжевой дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты (КФ 1.2.1.11) под действием АТР. На рис. 7, а даны кинетические кривые уменьшения относительной активности дегидрогеназы полуальдегида аспарагиновой кислоты при инкубации с 20 мМ АТР вследствие диссоциации активного тетрамера (M 156 000) на неактивные димеры (по данным работы [20], 0°). Представляя кинетические кривые в виде линейной анаморфозы в соответствии с уравнением (22), находим кажущуюся константу скорости диссоциации

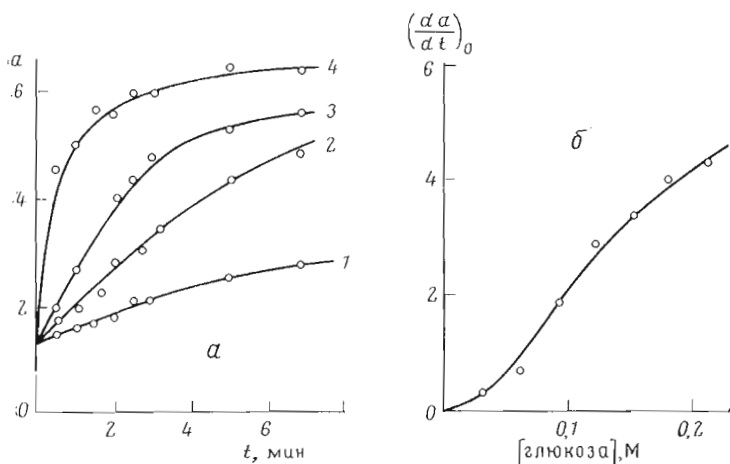


Рис. 8. Кинетика обратимой диссоциации гликогенфосфорилазы А из скелетных мышц кролика, вызываемой глюкозой. a — концентрация глюкозы (М): 1 — 0,005; 2 — 0,05; 3 — 0,07; 4 — 0,2. b — зависимость начальной скорости активации гликогенфосфорилазы А от концентрации глюкозы; точки — экспериментальные данные, сплошная кривая рассчитана при помощи уравнения (37) при следующих значениях параметров: $n = 4$, $K_L = 6 \cdot 10^{-3}$ М, $K_0 [E]_0 = 10$, $\alpha = 10$, $\varphi = 0,1$, $a_1 = 6,4$ мкмоль/мин · мг белка и $k_{-0} = 3,5 \cdot 10^{-5}$ с $^{-1}$

тетрамера: $k_- = 9,5 \cdot 10^{-5}$ с $^{-1}$ (рис. 7, б). Линейное соотношение (21) позволяет рассчитать кажущуюся константу ассоциации в присутствии 20 мМ АТР ($K = 2,9 \cdot 10^7$ М $^{-1}$; рис. 7, в). Анализ зависимости величины снижения активности фермента от концентрации АТР показывает, что диссоциирующее действие АТР обусловлено предпочтительным (но не «исключительным») связыванием лиганда с димерной формой: экспериментальные данные могут быть описаны расчетной кривой с $\varphi = 0,1$ (рис. 7, г). Поскольку в работе [20] не изучалась кинетика диссоциации фермента при различных концентрациях АТР, оценить величину параметра α не представляется возможным.

Примером диссоциирующей ферментной системы $2p \rightleftharpoons P$, в которой $\varphi \neq 0$ ($\varphi < 1$) и диссоциирующее действие лиганда связано исключительно с ускорением стадии диссоциации олигомера Р, может служить гликогенфосфорилаза А из скелетных мышц кролика (система типа активный димер $\rightleftharpoons$ неактивный тетрамер; лиганд — глюкоза). На рис. 8, а даны кинетические кривые активации гликогенфосфорилазы А глюкозой (по данным работы [21], концентрация фермента 0,45 мг/мл, рН 6,8; 20°). Активирующее действие глюкозы обусловлено обратимым распадом неактивных тетрамеров на активные димеры. В отличие от системы гликогенфосфорилаза А — гликоген (см. рис. 5) в этой системе начальная скорость активации сильно зависит от концентрации глюкозы. Интересно, что зависимость начальной скорости активации фермента (которая пропорциональна начальной скорости процесса диссоциации, поскольку $a_2 = 0$) от концентрации глюкозы имеет S-образный характер (т. е. порядок начальной скорости процесса диссоциации по концентрации лиганда превышает единицу при малых концентрациях глюкозы). Экспериментальные данные могут быть описаны теоретической кривой с $\varphi = 0,1$ (рис. 8, б; т. е. константа диссоциации K_L для комплекса глюкозы с димером на порядок меньше соответствующей величины для комплекса глюкозы с тетрамером) и $\alpha = 10$ (т. е. $\alpha\varphi = 1$; глюкоза ускоряет диссоциацию тетрамера, не влияя на скорость ассоциации димеров).

Частный случай: лиганд вызывает ассоциацию половинок р. Обсудим случай, когда лиганд преимущественно связывается формой Р, смещая равновесие $2p \rightleftharpoons P$ в сторону образования олигомера Р. Проведенный

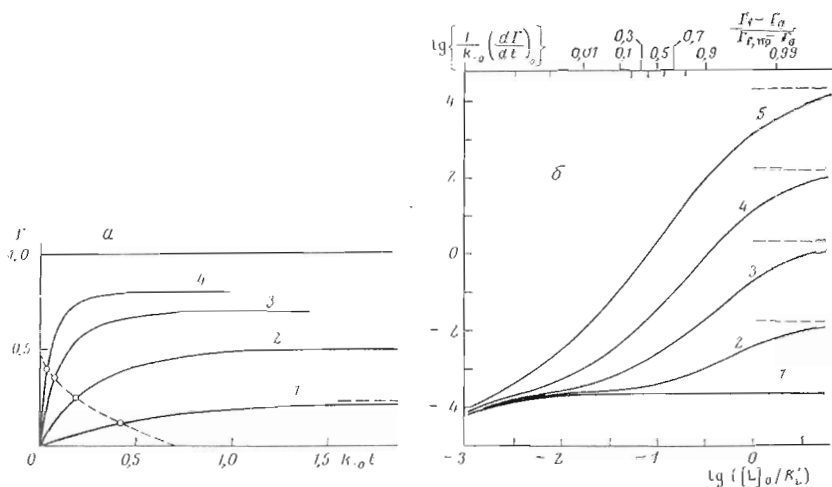


Рис. 9. Кинетика установления равновесия в ферментной системе $2P \rightleftharpoons P$ после внесения лиганда, преимущественно связывающегося с формой P ($\phi = K'_L/K''_L > 1$). $n = 4$, $K_0 [E]_0 = 10^{-4}$, $\phi = 100$. а — $\alpha = 1$, $[L]_0/K'_L$: 1 — 0,06; 2 — 0,1; 3 — 0,15; 4 — 20. б — α : 1 — 0,01; 2 — 0,03; 3 — 0,1; 4 — 0,3; 5 — 1

нами анализ кинетики установления равновесия в подобной системе показал, что если ассоциирующее действие лиганда связано исключительно с ускорением стадии ассоциации половинок p (т. е. скорость стадии диссоциации олигомера P остается неизменной в присутствии лиганда; $\alpha = 1$), то при $K_0 [E]_0 \ll 1$ (т. е. в начальный момент времени практически весь фермент находится в диссоциированном состоянии) и $\phi \gg 1$ максимальное значение порядка начальной скорости процесса ассоциации по концентрации лиганда в экспериментально доступной области значений величины $(\Gamma_f - \Gamma_0)/(\Gamma_{f, \text{пр}} - \Gamma_0)$ (где $\Gamma_{f, \text{пр}}$ — предельное значение Γ_f при $[L]_0/K'_L \rightarrow \infty$) приближается к n . Об этом свидетельствуют кинетические кривые изменения доли формы P при $n = 4$, $K_0 [E]_0 = 10^{-4}$, $\alpha = 1$ и $\phi = 100$ ($\alpha\phi = 100$) (рис. 9, а) и зависимости начальной скорости процесса ассоциации от концентрации лиганда при различных значениях параметра α ($\phi = 100$, рис. 9, б). Если же ассоциирующее действие лиганда связано исключительно с замедлением стадии диссоциации олигомера P (т. е. скорость стадии ассоциации половинок p остается неизменной в присутствии лиганда; $\alpha\phi = 1$), то в экспериментально доступной области значений $(\Gamma_f - \Gamma_0)/(\Gamma_{f, \text{пр}} - \Gamma_0)$ порядок начальной скорости процесса ассоциации по концентрации лиганда (n_L) близок к нулю (кривая 1 на рис. 9, б). Увеличение концентрации фермента $K_0 [E]_0$ (т. е. увеличение начальной доли формы P, Γ_0) также приводит к уменьшению величины n_L в экспериментально доступной области значений величины $(\Gamma_f - \Gamma_0)/(\Gamma_{f, \text{пр}} - \Gamma_0)$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frieden C. (1970) J. Biol. Chem., 245, 5788—5799.
2. Frieden C. (1971) Annu. Rev. Biochem., 40, 653—696.
3. Агатова А. И., Курганов Б. И. (1966) Докл. АН СССР, 169, 1452—1455.
4. Курганов Б. И. (1967) Молекулярн. биология, 1, 17—27.
5. Курганов Б. И. (1968) Молекулярн. биология, 2, 430—446.
6. Курганов Б. И., Яковлев В. А. (1973) Молекулярн. биология, 7, 429—447.
7. Feldberg R. S., Datta P. (1971) Eur. J. Biochem., 21, 447—454.
8. Jaenicke R. (1974) Eur. J. Biochem., 46, 149—155.
9. Marschke C. K., Bernlohr R. W. (1973) Arch. Biochem. and Biophys., 156, 1—16.

10. Gawronski T. H., Westhead E. W. (1969) *Biochemistry*, 8, 4261—4270.
11. Wang J. H., Graves D. J. (1964) *Biochemistry*, 3, 1437—1445.
12. Курганов Б. И., Дорожко А. И., Караи З. С., Яковлев В. А. (1975) *Молекулярн. биология*, 9, 533—542.
13. Kurganov B. I. (1975) in *Proceedings of the 9th FEBS Meeting, Budapest 1974*, vol. 32, Symposium on mechanism of action and regulation of enzymes (T. Keleti, ed.), Akadémiai Kiadó, Budapest and North-Holland, Amsterdam, pp. 29—42.
14. Kirschner K., Gallego E., Schuster I., Goodall D. (1971) *J. Mol. Biol.*, 58, 29—50.
15. Janin J. (1971) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 36, 193—198.
16. Курганов Б. И., Дорожко А. И., Караи З. С., Яковлев В. А. (1975) *Биохимия*, 40, 611—621.
17. Силюнова Г. В., Курганов Б. И. (1970) *Молекулярн. биология*, 4, 445—458.
18. Kurganov B. I. (1973) *Acta biol. med. Germ.*, 31, 181—201.
19. Metzger B., Helmreich E., Glaser L. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57, 994—1001.
20. Holland M. J., Westhead E. W. (1973) *Biochemistry*, 12, 2270—2275.
21. Wang J. H., Black W. J. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 4641—4649.

Поступила в редакцию
23.IX.1976

KINETICS OF DISSOCIATION-ASSOCIATION PROCESSES FOR ALLOSTERIC ENZYMES. I. THE ENZYME SYSTEMS OF THE $2p \rightleftharpoons P$ TYPE

KURGANOV B. I.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

The kinetics of reequilibration of dissociating enzyme system $2p \xrightleftharpoons[k_{-0}]{k_{+0}} P$ (P is enzyme oligomer which may dissociate reversibly forming two identical halves p) have been analyzed under variable conditions or on adding the allosteric ligands. The time-course expressions for changes in portions of p and P forms and the expressions for dependence of initial rate of dissociation-association processes and half-life time on enzyme or allosteric ligand concentrations have been deduced. It has been shown that the dependence of initial rate of dissociation-association processes on allosteric ligand concentration has cooperative character at definite values of kinetic parameters. The graphic methods for determination of dissociation and association rate constants (k_{-0} and k_{+0} , respectively) are suggested. The experimental kinetic data on dissociation of L-threonine dehydratase, glycogen phosphorylase a and aspartic β -semialdehyde dehydrogenase are used to illustrate the applicability of the deduced expressions.
