



УДК 577.150.2

НЕОБЫЧНЫЙ ХАРАКТЕР СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Клэсов А. А., Ланг Л. Г., Ситковски А. Дж.,
Вэлли Б. Л.*

*Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова;*

*Лаборатория биофизических исследований Гарвардской медицинской школы,
Бостон, Массачусетс, США*

Алкогольдегидрогеназы различного происхождения (КФ 1.1.1.1) катализируют реакции окисления спиртов и восстановления альдегидов в присутствии коферментов NAD и NADH. Недавние структурные исследования [1—3] показали, что алкогольдегидрогеназы печени человека и лошади состоят из двух идентичных субъединиц с M 40 000 каждая и имеют в своем составе по два атома цинка на субъединицу.

Сопоставление первичной структуры алкогольдегидрогеназы печени человека с первичной и пространственной структурой фермента печени лошади привело шведских исследователей [4] к выводу, что эти два фермента идентичны по меньшей мере на 90%, причем ни одно из различий не затрагивает структурно или функционально важные остатки ферментов. В связи с этим результаты, полученные нами при сопоставлении субстратной специфичности алкогольдегидрогеназ печени человека и лошади, представляются неожиданными (рис. 1). Как видно из рис. 1а, фермент печени человека проявляет резкую зависимость скорости реакции от гидрофобности аполярного радикала субстрата (бимолекулярные константы скоростей ферментативного окисления метанола и бензилового спирта различаются почти на четыре порядка). С другой стороны, алкогольдегидрогеназа печени лошади имеет практически одинаковую реакционную способность по отношению к различным спиртам (от этанола до n -гексанола, рис. 1б). Эти же закономерности сохраняются и для обратной реакции (восстановление альдегидов), катализируемой данными ферментами. Так, при переходе от формальдегида к n -бутиральдегиду бимолекулярные константы скорости реакции под действием фермента печени человека изменяются на четыре порядка, в то время как реакционная способность фермента печени лошади почти не изменяется.

Так как структура активного центра и природа функциональных групп обеих алкогольдегидрогеназ практически идентичны [4], можно полагать, что различия в субстратной специфичности этих ферментов лишь кажущиеся и обусловлены различным кинетическим проявлением алкогольде-

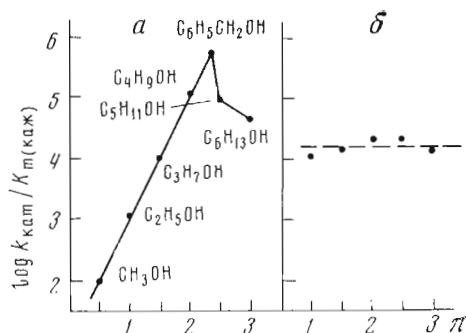
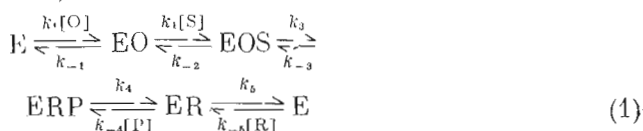


Рис. 1. Зависимость константы скорости окисления спиртов под действием алкогольдегидрогеназы печени человека (а) и алкогольдегидрогеназы печени лошади (б) от констант гидрофобности Ганша для аполярных фрагментов субстратов. Условия опыта: рН 8,8; 25°, 1,9 мМ NAD

гидрогеназ на отдельных стадиях ферментативной реакции. Анализ реакционного механизма (см. [2])



(O и R — окисленная и восстановленная формы кофермента (NAD и NADH); S — спирт; P — соответствующий альдегид) позволяет заключить, что в условиях насыщения алкогольдегидрогеназы коферментом (что имело место в условиях эксперимента) эффективная величина константы скорости второго порядка окисления спирта определяется соотношением

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_{\text{м(каж)}}} = \frac{k_2 k_3 k_4}{k_3 k_4 + k_{-2}(k_{-3} + k_4)}.$$

Если каталитический перенос гидрид-иона происходит медленно по сравнению со скоростями десорбции субстрата и продукта ($k_{-2} \gg k_3$, $k_4 \gg k_{-3}$), то константа $k_{\text{кат}}/K_{\text{м(каж)}}$ определяется соотношением k_3/K_s (K_s — субстратная константа) и может проявлять резкую зависимость от гидрофобности субстрата подобно той, что приведена на рис. 1а. По-видимому, именно такое соотношение индивидуальных констант характерно для катализа ферментом печени человека. Если же каталитический перенос гидрид-иона происходит быстро по сравнению с десорбцией субстрата и продукта ($k_3 \gg k_{-2}$, $k_{-3} \gg k_4$), то константа $k_{\text{кат}}/K_{\text{м(каж)}}$ должна оставаться почти постоянной при вариации структуры субстрата, как и при катализе алкогольдегидрогеназой печени лошади (рис. 1б).

Итак, структурное сходство алкогольдегидрогеназ печени человека и лошади и результаты кинетических исследований этих ферментов, проведенных в настоящей работе, позволяют предположить, что реакционные механизмы двух данных типов алкогольдегидрогеназ подобны. Различия в субстратной специфичности этих ферментов также лишь кажущиеся и обусловлены различием в относительных скоростях индивидуальных стадий ферментативной реакции (численные значения каталитических констант и констант Михаэлиса для окисления спиртов и восстановления альдегидов обоими ферментами будут приведены в отдельном сообщении). Полученные данные позволяют построить энергетические диаграммы реакций окислительно-восстановительного взаимопревращения спиртов и альдегидов, катализируемых алкогольдегидрогеназами (рис. 2).

Из рассмотрения энергетических диаграмм ферментативной реакции становится ясной кинетическая роль гидрофобного взаимодействия суб-

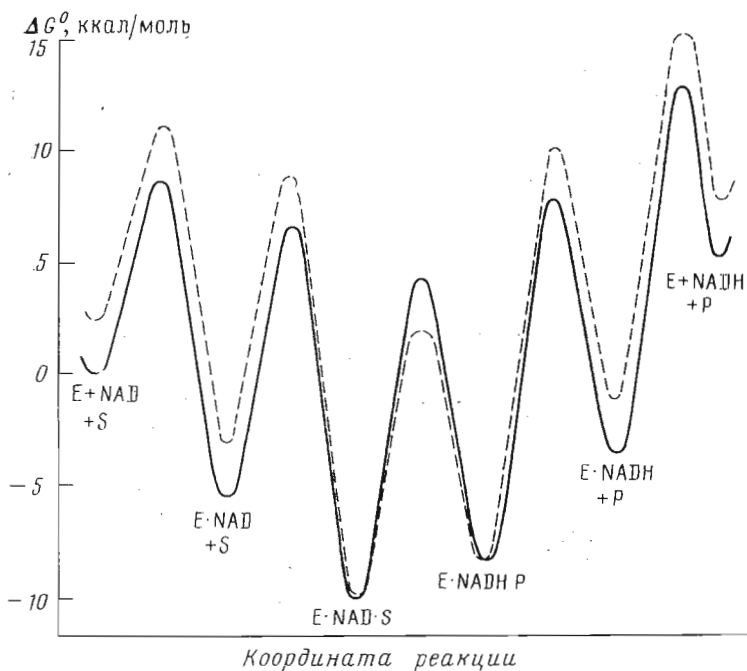


Рис. 2. Изменение стандартной свободной энергии по координате реакции при окислительно-восстановительном взаимопревращении спиртов и альдегидов, катализируемом алкогольдегидрогеназой печени лошади. Энергетические диаграммы приведены для двух производных, различающихся размерами аполярных радикалов (на примере систем этанол — ацетальдегид (сплошная линия) и бензиловый спирт — бензальдегид (пунктир)). Стандартные состояния соответствуют 1 М концентрациям, расчеты проведены для рН 7,0

страта с ферментом при образовании тройного комплекса фермент — кофермент — субстрат. При увеличении гидрофобности аполярного фрагмента субстрата происходит уменьшение свободной энергии переходного состояния реакции, составляющее ~ 700 кал/моль на каждую метиленовую группу субстрата. Это в свою очередь должно ускорять каталитический перенос гидрид-иона в 3—4 раза при удлинении аполярного радикала спирта или альдегида на одну группу CH_2 , что согласуется с данными предстационарной кинетики для ферментативного окисления этанола и *n*-пропанола [5, 6]. Данный механизм фермент-субстратного взаимодействия в оптимальном случае приводит к соотношению «во сколько раз эффективнее связывание — во столько раз эффективнее катализ», которое до последнего времени наблюдалось только для гидролитических ферментов: α -химотрипсина [7], пенициллинамидазы [8] и ацетилхолинэстеразы [9]. Результаты настоящей работы позволяют заключить, что это правило применимо также к реакциям алкогольдегидрогеназ, принадлежащих к классу оксидоредуктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eklund H., Nordström B., Zeppezauer E., Söderlund G., Ohlsson I., Boiwe T., Söderberg B.-O., Tapia O., Bränden C.-I. (1976) *J. Mol. Biol.*, **102**, 27—59.
2. Bränden C.-I., Jörnvall H., Eklund H., Firugren B. (1975) *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), 3rd edn, vol. XI, pp. 103—190, Academic Press, New York.
3. Veillon C., Sytkowski A. J. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1494—1502.
4. Eklund H., Bränden C.-I., Jörnvall H. (1976) *J. Mol. Biol.*, **102**, 61—73.
5. Brooks R. L., Shore J. D. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3855—3858.
6. Blackwell L. F., Hardman M. J. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **55**, 611—615.

7. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) *Int. J. Chem. Kinetics*, **6**, 801—811.
8. Клесов А. А., Швядас В. К., Галасв И. Ю. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 800—805.
9. Järv J., Kesvatera T., Aaviksaar A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**, 315—322.

Поступило в редакцию
3.III.1977

UNUSUAL CHARACTER OF SUBSTRATE SPECIFICITY IN ALCOHOL DEHYDROGENASES OF DIFFERENT ORIGIN

KLYOSOV A. A., LANGE L. G., SYTKOWSKI A. J.,
VALLEE B. L.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
Biophysics Research Laboratory, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA*

Human liver alcohol dehydrogenase shows a sharp dependence of the rate of both alcohol oxidation and aldehyde reduction on the hydrophobicity of non-polar fragments of substrates. On the other hand, horse liver alcohol dehydrogenase manifests low sensitivity to the substrate structure in the reactions of both types. The observed differences in substrate specificity of the two dehydrogenases may be explained by different rates of hydride transfer as compared to the rates of a substrate and product desorption from the binary complex. The «better binding: better catalysis» rule holds for the action of both enzymes.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20/V-1977 г. Т-12926 Подписано к печати 6/VII-1977 г. Тираж 850 экз.
Зак. 2403 Формат бумаги 70×108^{1/16} Усл. печ. л. 12,6 Бум. л. 4,5 Уч.-изд. л. 13,1
