УДК 577.152.121: 612.111.

КЛАСТЕРО-КИНЕТИЧЕСКАЯ ГИПОТЕЗА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Зимин Ю.В., Уланова А.А., Соловьева А.Г.

ФГБУ «ННИИТО» Минздравсоцразвития России, Нижний Новгород, e-mail: yuzimin@mail.ru

Энзимология XXI века вплотную подошла к изучению свойств ферментов в составе сложных мультиэнзимных комплексов клетки с помощью кинетических методов исследования. В работе предлагается новая кластеро-кинетическая гипотеза ферментативного катализа, в которой кинетический энзимокла́стер рассматривается как динамическое объединение нескольких гомо- (гетеро-) конформеров фермента, образующееся в процессе катализа, которое может рассматриваться как самостоятельная единица, обладающая определёнными свойствами. В процессе кинетики ферментативной реакции происходят постоянные динамические кластеро-кинетические переходы белка-фермента из одной формы в другую. Исследования проводили на очищенных препаратах алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы, определяли каталитическую активность ферментов и рассчитывали интегративные кинетические показатели. Установлено, что изменения микроокружения ферментов приводят к трансформации их конформеров, что в свою очередь сказывается на образовании энзимокластеров, которые проявляют различные кинетические свойства.

Ключевые слова: ферменты, кинетика, кластер

KINETIC CLUSTER HYPOTHESIS OF ENZYME CATALYSIS

Zimin Y.V., Ulanova A.A., Solovyeva A.G.

FSBI «NNIITO» of Ministry of Health and Social Development of Russian Federation, Nizhny Novgorod, e-mail: yuzimin@mail.ru

Enzymology of XXI century has come closely to studying enzyme properties which are presented in multienzyme complexes of a cell using kinetic methods of research. A new kinetic cluster hypothesis of enzyme catalysis is suggested in this work and kinetic enzyme cluster is considered to be a dynamic integration of some homo (hetero-) conformers of enzymes appearing during the process of catalysis which can be considered as an independent union having definite properties. Permanent dynamic kinetic cluster transformation of protein-enzyme from one form to another take place during the process of enzyme reaction. The research was performed on purified chemicals of alcohol dehydrogenase and lactatdehydrogenase, enzyme catalytic activity was defined and integrated kinetic indexes were estimated. The changes of enzyme micro surround are revealed to lead to transformation of their conformers and it in turn has an impact on formation of enzyme clusters which show different kinetic properties.

Keywords: enzymes, kinetics, cluster

Основной задачей энзимологии с момента ее возникновения является построение единой теории ферментативного катализа [1, 5, 6].

Нами предлагается кинетический подход к кластерной организации ферментативного катализа. Основным положением данной гипотезы является то, что в процессе ферментативного катализа изменяется кластерно-кинетическая организация фермента в среде.

Кинетический энзимокла́стер (англ. cluster – скопление) – динамическое объединение нескольких гомо- (гетеро-) конформеров фермента в процессе катализа, которое может рассматриваться как самостоятельная единица, обладающая определёнными свойствами.

Предполагается, что для любых ферментов как минимум существуют два основных ферментативных конформера: каталитический и агрегационный (рис. 1). Каталитический конформер характеризуется тем, что при объединении субъединиц в единое целое все активные центры фермента остаются активными. В противоположность ему агрегационный конформер характеризуется такой пространственной организацией, при которой часть активных центров фермента экранируются (см. рисунок). В целом, каждый энзимокластер представлен взаимодействием различного отношения каталитических и агрегационных конформеров между собой. В результате получаются три кинетических варианта энзимокластера:

1. При равном количестве каталитических и агрегационных конформеров у фермента практически не проявляются кооперативные свойства его субъединиц (коэффициент кооперативности (Kn) = 1).

2. Когда количество каталитических конформеров больше, чем агрегационных, у фермента имеет место положительная кооперативность взаимодействия субъединиц (Kn > 1).

3. Если больше агрегационных конформеров, чем каталитических, то фермент обладает отрицательной кооперативностью (Kn < 1).

В процессе кинетики ферментативной реакции происходят постоянные динамические кластеро-кинетические переходы белка-фермента из одной формы в другую, которые можно экспериментально выявить.

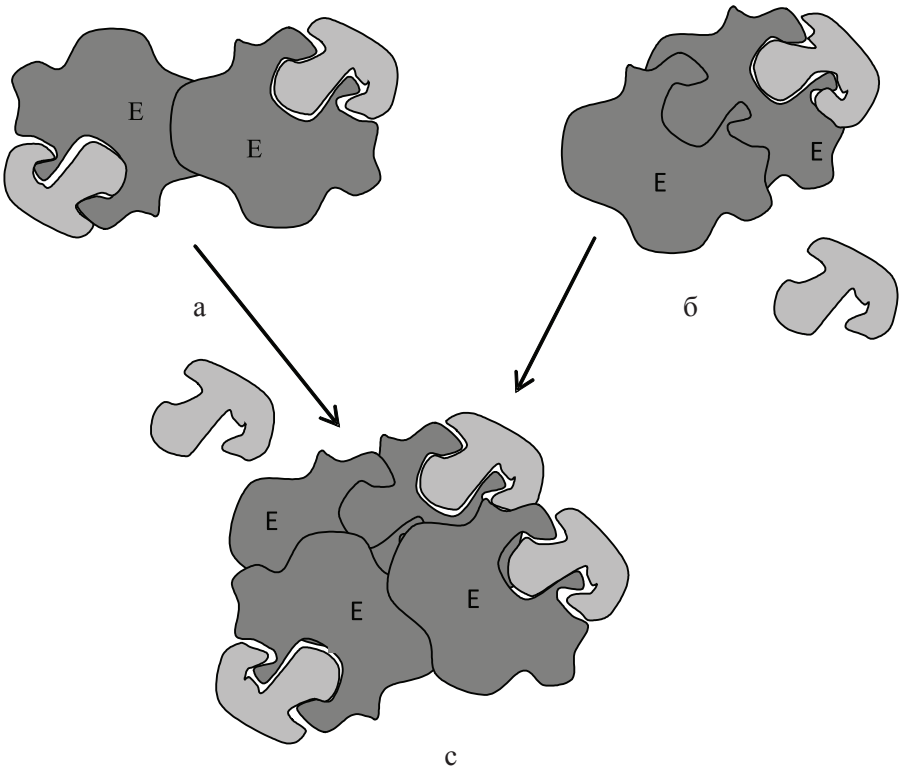

Схема образования энзимокластера:
а – каталитический конформер; б – агрегационный конформер; в – энзимокластер

Целью исследования явилось применение кластеро-кинетической гипотезы ферментативного катализа для объяснения особенностей кинетических свойств некоторых оксидоредуктаз (алкогольдегидрогеназы (АДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ)).

Материал и методы исследования

Исследования проводили на очищенном препарате АДГ из печени лошади («Sigma», США) и очищенном препарате ЛДГ из мышцы свиньи (фирмы Reanal). Определяли каталитическую активность алкогольдегидрогеназы в прямой ($АДГ_{пр}$) и обратной реакциях ($АДГ_{обр}$), активность лактатдегидрогеназы в прямой ($ЛДГ_{пр}$) и обратной реакции ($ЛДГ_{обр}$). Рассчитывали интегративные кинетические характеристики: Kt (показатель сродства фермента к субстрату), Vmax (максимальная скорость реакции фермента), Kn (коэффициент кооперативности) [2, 3, 4]. Статистический анализ результатов исследований выполнен с использованием программы Statistica 6.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований кинетических свойств очищенных ферментов установлено, что сродство энзимокластера ЛДГ к субстратам реакции, максимальная скорость и каталитическая эффективность в целом выше, чем у энзимокластера АДГ (табл. 1).

Таблица 1

Кинетические показатели ферментов

	Лактатдегидрогеназа		Алкогольдегидрогеназа	
Кинетические показатели	$ЛДГ_{пр}$	$ЛДГ_{обр}$	$АДГ_{пр}$	$АДГ_{обр}$
Kt[1]	1,62 ± 0,02	2,23 ± 0,04 p = 0,0021	5,33 ± 0,06	7,04 ± 0,07 p = 0,0035
Vmax[1]	10,33 ± 0,23	22,41 ± 0,24 p = 0,0008	3,64 ± 0,12	98,13 ± 0,26 p = 0,0002
Kn[1]	0,81 ± 0,03	0,85 ± 0,02	1,12 ± 0,03	0,94 ± 0,02

Примечание: p – различия статистически значимы между показателями прямой и обратной реакций.

Из табл. 1 видно, что сродство к субстратам реакции выше для $ЛДГ_{пр}$ по сравнению с $ЛДГ_{обр}$. Максимальная скорость реакции в 2 раза больше для обратной лактатдегидрогеназной реакции по сравнению с прямой. Таким образом, Kt^1 $ЛДГ_{пр}$ < Kt^1 $ЛДГ_{обр}$, а $Vmax^1$ $ЛДГ_{обр}$ > $Vmax^1$ $ЛДГ_{пр}$. В данном случае имеет место кластеро-кинетический механизм ферментативной реакции по типу псевдоактивации ЛДГ. Следует отметить, что у ЛДГ проявляется отрицательная кооперативность ее субъединиц, которая указывает на образование агрегационных конформеров данного фермента.

Для $АДГ_{пр}$ и $АДГ_{обр}$ наблюдается схожая кинетическая зависимость, только с другими значениями сродства к субстратам реакции и Vmax. Для алкогольдегидрогеназы кластеро-кинетический механизм ферментативной реакции представлен по типу псевдоактивации. При этом $АДГ_{пр}$ имеет положительную кооперативность взаимодействующих субъединиц фермента, а $АДГ_{обр}$ – отрицательную. Можно предположить, что прямая алкогольдегидрогеназная реакция связана с каталитическими конформерами фермента, а обратная – преимущественно с агрегационными конформерами.

Несомненно, что определяющим фактором изменения кинетических характеристик оксидоредуктаз является физико-химическое состояние среды, в которой происходит ферментативная реакция.

Для изменения физико-химических условий проведения ферментативной реакции оксидоредуктаз в среду буфера добавлялись сразу два фермента (ЛДГ, АДГ) и определялась каталитическая активность каждого в отдельности (табл. 2).

Таблица 2

Кинетические показатели ферментов (в среде одновременно присутствуют два фермента в равных количествах)

	ЛДГ и АДГ (1:1)		АДГ и ЛДГ (1:1)	
Кинетические показатели	$ЛДГ_{пр}$	$ЛДГ_{обр}$	$АДГ_{пр}$	$АДГ_{обр}$
Kt^2	1,29 ± 0,04	8,83 ± 0,06* p = 0,0034	4,67 ± 0,03	4,5 ± 0,02*
$Vmax^2$	4,88 ± 0,05*	31,9 ± 0,24* p = 0,0004	2,54 ± 0,26	31,83 ± 0,18* p = 0,0001
Kn^2	0,78 ± 0,01	0,95 ± 0,02 p = 0,0078	0,91 ± 0,01	0,91 ± 0,02

Примечание: p – различия статистически значимы между показателями прямой и обратной реакций; * – различия статистически значимы по сравнению с показателями очищенного фермента при наличии в растворе одного фермента ($p \leq 0,05$).

Из табл. 2 следует, что присутствие в растворе одновременно двух ферментов в равном количестве оказывает влияние на кинетические свойства как ЛДГ, так и АДГ. Для $ЛДГ_{пр}$ кинетика ферментативной реакции изменяется по типу неконкурентного ингибирования, когда Kt^1 $ЛДГ_{пр}$ = Kt^2 $ЛДГ_{пр}$, а $Vmax^2$ $ЛДГ_{пр}$ < $Vmax^1$ $ЛДГ_{пр}$. Кинетика лактатдегидрогеназы в обратной реакции представлена по типу двухпараметрической рассогласованной активации, Kt^2 $ЛДГ_{обр}$ > $Kt^1$$ЛДГ_{обр}$, а $Vmax^2$ $ЛДГ_{обр}$ > $Vmax^1$$ЛДГ_{обр}$. Кинетические показатели прямой алкогольдегидрогеназной реакции практически не изменяются при наличии в растворе одновременно двух ферментов. Для $АДГ_{обр}$ кинетика ферментативной реакции представлена по типу бесконкурентного ингибирования, где $Kt^2$$АДГ_{обр}$ < Kt^1 $АДГ_{обр}$, а $Vmax^2$ $АДГ_{обр}$ < $Vmax^1$ $АДГ_{обр}$ (см. табл. 1, 2). При этом присутствие в среде одновременно двух ферментов существенно сказывается на их отрицательной кооперативности в процессе образования энзимокластеров.

В итоге можно сделать заключение, что изменение микроокружения фермента, в частности оксидоредуктаз (алкогольдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы), приводит к трансформации их конформеров (каталитических и агрегационных), что в свою очередь сказывается на образовании энзимокластера, проявляющего различные кинетические свойства. Данный кинетический подход, несомненно, важен для дальнейшего развития исследований в области современной энзимологии, особенно при изучении свойств ферментов, входящих в состав сложной гетерогенной системы клетки.

Список литературы

1. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1990. – 350 с.

2. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: ВШ, 1980. – 272 с.

3. Keung W.M., Ho Y.W., Fong W.P. Isolation and characterization of shrew liver alcohol dehydrogenase // Comp. Biochem. and Physiol. B. – 1989. – Vol. 93, № 1. – P. 169–173.

4. Koivusalo M., Baumann M., Votila L. Evidence for the identity of glutathione – derendent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase // FEBS Lett. – 1989. – Vol. 257, № 1. – P. 105–109.

5. Roos G., Geerlings P., Messens J. Enzymatic catalysis: the emerging role of conceptual density functional theory // J. Phys. Chem. B. – 2009. – № 113. – P. 13465–13475.

6. Urushadze Z. About a Real Conceptual Framework for Enzyme Catalysis // Bull. Georg. Natl. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 173, № 2. – P. 421–424.

References

1. Keleti T. Osnovy fermentativnoy kinetiki [Foundations of enzyme kinetics]. Moscow: Peace, 1990, 350 p.

2. Kochetov G.A. Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii [Practical handbook in enzimologiya]. Moscow: Higher school, 1980, 272 p.

3. Keung W.M., Ho Y.W., Fong W.P. Comp. Biochem. and Physiol. B., 1989, Vol. 93, no. 1, pp. 169–173

4. Koivusalo M., Baumann M., Votila L. FEBS Lett, 1989, Vol. 257, no. 1, pp. 105–109.

5. Roos G, Geerlings P, Messens J. J. Phys. Chem. B., 2009, no. 113, pp.13465–13475.

6. Urushadze Z. Bull. Georg. Natl. Acad. Sci., 2006, Vol. 173, no. 2, pp. 421–424.

Рецензенты:

Корягин А.С., д.б.н., профессор кафедры физиологии и биохимии человека и животных ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород;

Веселов А.П., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии растений, декан биологического факультета ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 05.07.2012.