

Быстропротекающие ферментативные реакции: кинетика и механизмы

Н. А. Кузнецов¹, О. С. Федорова²

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Выяснение детального кинетического механизма действия ферментов с одновременным анализом конформационной подвижности структуры фермента и субстрата представляет собой тяжелую и нетривиальную задачу, требующую применения широкого спектра методов исследования и использования различных подходов.

Безусловно, знание структуры фермента, а также комплекса фермента с субстратом или продуктом реакции значительно облегчает анализ и интерпретацию данных о конформационной динамике фермента и субстрата в процессе их взаимодействия. Однако структурные данные представляют собой лишь «мгновенные» снимки и могут дать информацию об определенном, фиксированном состоянии фермента и субстрата. Получить кристалл комплекса активного фермента с субстратом в «определенном месте» ферментативного процесса, например, в момент каталитической стадии реакции практически невозможно. Фактически, без использования современных молекулярно-биологических методов, кристаллографы способны получить только кристалл свободного фермента и кристалл комплекса фермента с продуктом реакции. Направленная замена каталитически активных аминокислотных остатков фермента позволяет значительно углубить исследование и закристаллизовать «каталитически-активный» комплекс, то есть момент реакции, когда структуры фермента и субстрата полностью подготовлены для каталитического акта, однако катализ не может свершиться, поскольку функционально важный аминокислотный остаток отсутствует или заменен. Существует еще ряд способов получить кристаллы «промежуточных» комплексов фермента и субстрата, например, внести модификацию в субстрат, которая не повлияет на связывание с ферментом, но остановит катализ. Так или иначе, кристаллографы могут получить ограниченное число состояний фермента и субстрата в процессе ферментативного акта. В последнее время также большое развитие получили «бескристальные» методы определения структуры, например, ЯМР, но использование таких методов, как правило, ограничивается пептидами в силу сложной интерпретации данных.

¹ Научный сотрудник, кандидат химических наук.

² Зав. лабораторией, доктор химических наук, профессор.

Несмотря на трудности получения структурных данных, полученные результаты очень важны для понимания механизма ферментативного процесса и дают представление о конкретных структурных перестройках в молекулах фермента и субстрата. Но современный уровень научных исследований требует продолжения и получения вместо мгновенного структурного «фото» полнометражный «фильм».

Можно ли регистрировать изменение структуры фермента и ДНК непосредственно в процессе их взаимодействия?

Зарегистрировать структурные изменения в ходе ферментативного процесса можно оптическими методами.

Хорошо известно, что триптофан (Trp) является наиболее интенсивно флуоресцирующей аминокислотой, и примерно 90 % всей флуоресценции белков обычно обусловлено его присутствием. Свойства Trp позволяют использовать его как высокочувствительный флуоресцентный маркер конформационных изменений в молекулах белков. Необходимо отметить, что природные флуоресцентные свойства макромолекул часто не позволяют получать из эксперимента желаемую информацию. В таком случае используют флуорофоры, которые хотя и являются посторонними по отношению к исследуемой системе, но имеют лучшие спектральные свойства.

Историческая справка

В 1920-х гг. был разработан так называемый “струевой метод”, позволяющий следить за протеканием реакций, идущих за сотые доли секунды. Сущность струевых методов заключается в том, что реакция инициируется быстрым смешиванием реагентов в проточных условиях (Рис. 1). Различают три струевых метода: метод непрерывной струи, ускоренной и остановленной струи [1].

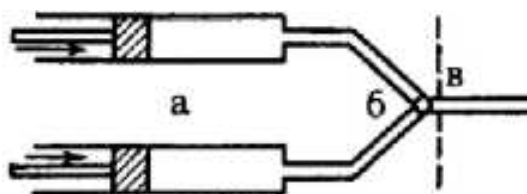


Рис. 1. В основе струевых методов лежит быстрое, в течение ≤ 1 мс, смешивание взаимодействующих веществ: а) шприцы с реагентами, б) смеситель, в) капилляр с реакционной смесью

Метод «непрерывной (continuous) струи» впервые был предложен Хартриджем и Роутоном в 1923 г. для исследования быстрых реакций взаимодействия гемоглобина красных кровяных телец крови с кислородом и окисью углерода [2]. В данном методе два раствора реагирующих веществ поступают под давлением в смесительную камеру, после

чего смешанный раствор поступает в трубку, где проводится наблюдение (Рис. 2). Смешивание происходит примерно за 1-2 мс, затем смесь вытекает по узкой трубке диаметром 1-2 мм с высокой линейной скоростью (несколько м/с). Время в этом методе при постоянной скорости потока определяется расстоянием от смесительной камеры. Например, если скорость струи равна 2 м/с, то на расстоянии 1 см от смесителя "возраст" раствора будет равен 5 мс, на расстоянии 10 см - 50 мс и т.д. Концентрацию вдоль трубки измеряют чаще оптическими методами, определяя с большой точностью практически мгновенные скорости.

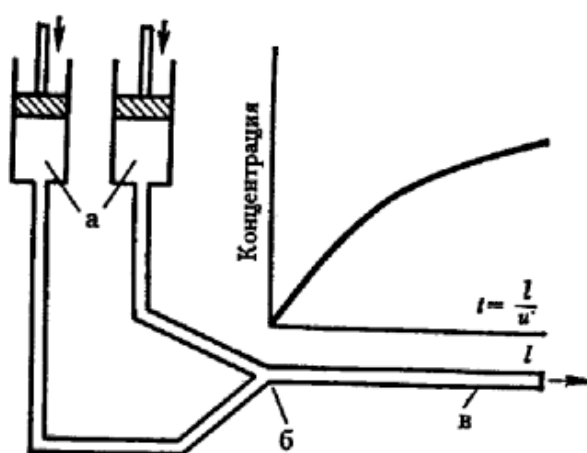


Рис. 2. Принципиальная схема метода непрерывной струи: а) шприцы с реагентами, б) смеситель, в) капилляр с реакционной смесью.

К сожалению, использование этого метода в работе с труднодоступными биологическими объектами невозможно из-за огромных количеств исходных реагентов. Так на один эксперимент необходимо несколько литров раствора.

Другие струевые методы получили дальнейшее развитие благодаря работам Роутона, Милликена, Чанса и Джибсона, предложившим в 1940-1950-х годах методы «ускоренной» (accelerated) и «остановленной» (stopped) струи. В методе ускоренной струи растворы реагирующих веществ помещают в шприцы, поршни которых приводят в движение резким толчком. Наблюдение проводят в фиксированной точке вблизи смесительной камеры. Скорость течения жидкости меняется с ускорением, поэтому изменяется и время от начала реакции в точке наблюдения. Методика ускоренной струи позволяет использовать весьма малые объемы реагирующих веществ (до 0,1 мл), что является важным преимуществом при исследовании ферментативных реакций. [3, 4, 5, 6, 7].

В методе «остановленной» струи два раствора с реагентами подаются под давлением в смесительную камеру (Рис. 3). Полученный после смешивания раствор поступает в трубку, которая заканчивается поршнем. Раствор давит на поршень и перемещает его до момента, пока поршень не упрется в ограничитель, в результате чего поток

останавливается, и в какой-либо фиксированной точке проводится регистрация. При этом временная развертка регистрируемого параметра дает кинетическую кривую в интервале от миллисекунд до нескольких минут. Этот метод впервые был предложен Роутоном (1934 год) для реакций с временами около 10 секунд. В работах Чанса он был усовершенствован для измерения времен порядка нескольких миллисекунд (1940 год). Джибсоном в 1952 году [8] предложен усовершенствованный вариант этого метода, позволяющий регистрировать реакции при существенно меньших временах.

Метод «остановленной» струи нашел широкое распространение в биохимических исследованиях. Работы Брайтона Чанса внесли большой вклад в развитие методов исследования не только быстрых реакций, но и других методов изучения биообъектов.

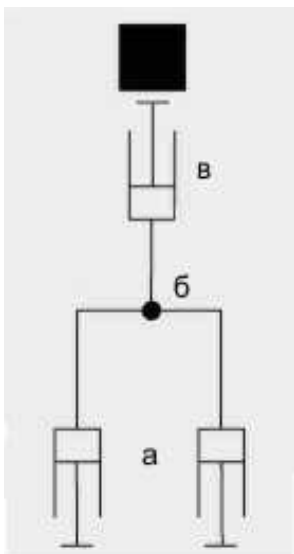


Рис. 3. Принципиальная схема метода остановленной струи: а) шприцы с реагентами, б) смеситель, в) стоп-шприц

Брайтон Чанс (Britton Chance, July 24, 1913 – November 16, 2010) прожил 97 лет и заслуженно является «отцом» современной биофизики. Кроме того, Чанс был страстным яхтсменом, в 1952 году он вошел в состав экипажа, выигравшего золотую медаль на летних олимпийских играх в Хельсинки (Рис. 4а). Любовь к этому виду спорта сохранялась у него всю жизнь. На заре своей научной карьеры доктор Чанс исследовал биологические процессы, протекающие с участием кислорода и обеспечивающие живые организмы энергией, а также пытался понять механизмы возникновения болезней, вызванных недостатком энергии. Он изобрел двух-волновой спектрофотометр и разработал принципы функционирования современных глюкометров. В течение 70 лет своей научной карьеры у него всегда были гранты, полученные под какие-либо разработки. Интересен факт, что у него имеется 6 публикаций с цитированием более 1000 раз.

Свою первую научную степень, степень бакалавра наук, Чанс получил в 1935 году в Университете Пенсильвании, где он продолжил обучение в аспирантуре. Чанс в своем

исследовании процесса окисления в присутствии пероксидазы обнаружил образование окрашенного интермедиата при взаимодействии H_2O_2 с пероксидазой, которое участвовало в окислении различных фенолов. В это время британский ученый Гленн Милликен разработал в Кембридже новую струевую установку для изучения процесса образования оксимيوглобина из кислорода и миоглобина [9]. Поэтому в 1937-году Чанс создал собственную микроструевую версию установки «остановленной струи» для изучения интермедиатов пероксидазной реакции в миллисекундном диапазоне времени [6, 10].

В 1938, оставаясь аспирантом, он получил контракт от British General Electric Company для тестирования своего автоуправляемого рулевого устройства на судне, плывущем из Лондона в Новую Зеландию и Австралию.

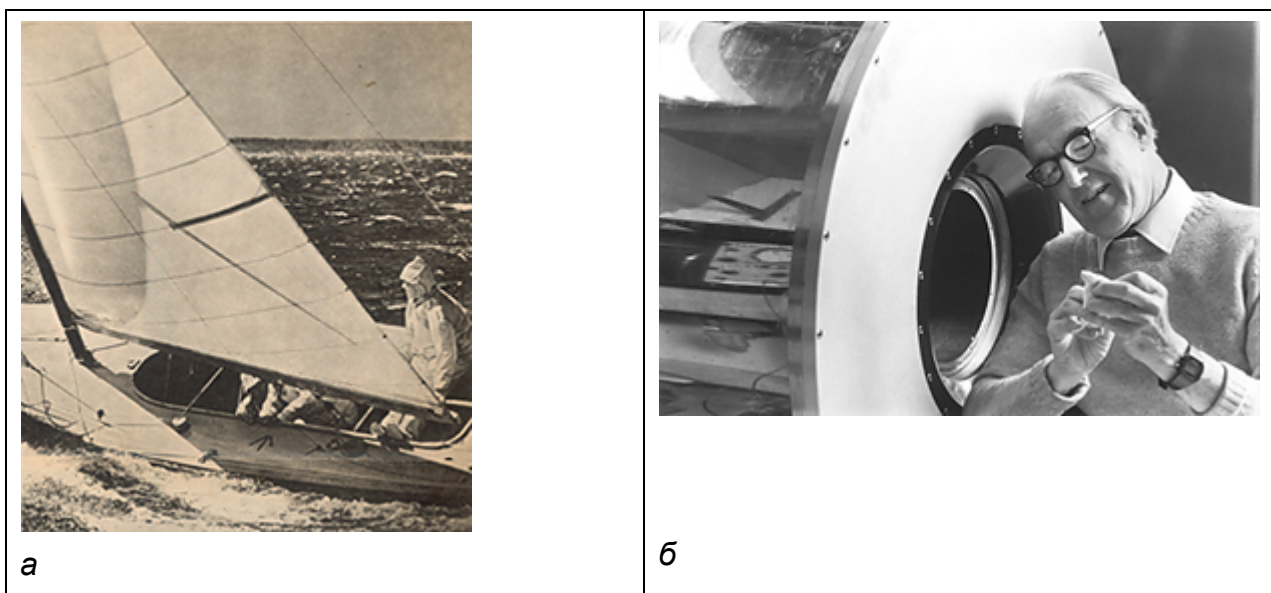


Рис. 4. Б. Чанс а) на яхте, б) в лаборатории.

Во время краткосрочного пребывания в Лондоне он встретил одного из первых разработчиков установки «остановленной струи» Гленна Милликена, работавшего в Кембридже, и договорился о поступлении к нему в аспирантуру после окончания плавания на судне. После своего возвращения в Кембридж Чанс сконструировал свою вторую установку «остановленной струи», которую закончил в 1939 году. На этой установке он провел исследование реакции люциферазы с кислородом. С началом Второй мировой войны Чанс вернулся в университет Пенсильвании, чтобы продолжить свои исследования. Здесь он создал третью струевую установку.

В это время уже существовало несколько теорий ферментативного катализа. Среди этих теорий первыми, кто предположил возможность существования фермент-

субстратных комплексов, были Леонор Михаэлис и Мауд Ментен [11]. Однако экспериментально такие комплексы не были зарегистрированы. Методом «остановленной струи» Чансу впервые удалось зарегистрировать фермент-субстратные комплексы для пероксидазы, и каталазы, что имело большое фундаментальное и прикладное значение [7, 12]. На основании проведенных исследований Чанс защитил две степени Ph.D., одну по физической химии в университете Пенсильвании в 1940 году и другую по биологии и физиологии в университете Кембриджа.

Брайтон Чанс в течение своей научной карьеры внес решающий вклад в различные области науки, такие как изучение биоэнергетики клетки, использование магнито-резонансной спектроскопии для получения изображений живых объектов (см. Рис. 4б), решение обратных математических задач, передача света в сильно-рассеивающих средах, диагностика рака груди, изучение динамики мышц. Его пионерские работы трансформировали область биомедицинской оптики, послужив базой для развития методов неинвазивной клинической диагностики.

До конца своей жизни Чанс продолжал работать в науке, возглавлял в 90-е годы Институт биофизических и биомедицинских исследований Университета Пенсильвании, а в 2000-е – Фонд исследований по молекулярной диагностике. Он был трижды женат и имел 16 своих и приемных детей, 28 внуков и 5 правнуков. У него было множество друзей и учеников.

Хотя Б. Чанс был ученым нобелевского уровня, к сожалению, он не получил Нобелевской премии за свои исследования. За изучение сверхбыстрых химических реакций, в которых происходит сдвиг равновесия за счет подачи очень короткого импульса энергии, в 1967 году Нобелевскую премию по химии получили другие ученые: Манфред Эйген, Рональд Норриш и Джордж Портер.

В Новосибирском научном центре установки для изучения химических радикальных реакций струевыми методами создавались в конце 60-х – начале 70-х годах в Институте химической кинетики и горения СО АН СССР в Лаборатории химии и физики свободных радикалов (зав. лаб. д.х.н. Ю. Н. Цветков, ныне академик) в группе, руководимой к.х.н. В.М. Бердниковым. В установках остановленной или непрерывной струи реагирующие растворы подавались под давлением в смеситель и протекали затем через 1мм-тефлоновый капилляр через резонатор ЭПР-спектрометра, где регистрировался спектр радикалов, образующихся в реакциях в качестве интермедиата. Однако эти установки требовали больших расходов реагентов и не могли быть использованы для исследования труднодоступных биологических молекул, таких как ферменты и нуклеиновые кислоты.

В настоящее время зарубежные компании, выпускающие научное оборудование, производят приборы, потребляющие небольшие количества веществ. Приборы, основанные на методе остановленной струи, выпускают, по крайней мере, пять компаний: KinTek Corporation (USA), Bio-Logic (France), Applied Photophysics Limited (UK), TgK Scientific Limited (UK), Olis, Inc (USA). Новый спектрометр SX20 Applied Photophysics Limited (UK) (Рис. 5) разработан для проведения высококачественных исследований и имеет мертвое время 0,5 мс, при этом минимальный объем реагентов – 40 мкл.



Рис. 5. Общий вид спектрометра остановленной струи SX20 Applied Photophysics Limited (UK).

Достижения Новосибирских биохимиков в области изучения быстрой ферментативной кинетики

Лаборатория исследования модификации биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, возглавляемая профессором, д.х.н. Федоровой Ольгой Семеновной, которая начинала свою научную деятельность в ИХКиГ под руководством В.М. Бердникова, проводит комплексное кинетическое исследование закономерностей функционирования защитно-репарационных систем живых организмов, в том числе человека.

Общая информация

Известно, что в процессе функционирования клеточная ДНК подвергается воздействию различных факторов, приводящих к ее повреждениям. Одними из наиболее агрессивных факторов окружающей среды являются активные формы кислорода, которые индуцируют окислительные повреждения ДНК.

Подобные повреждения генетического аппарата обладают цитотоксическим и мутагенным эффектом и способны приводить к развитию сердечнососудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Однако на постоянной страже в

живых клетках находятся десятки ферментов, специализированных на защите генетической информации от повреждения – эти ферменты образуют систему репарации ДНК. Их цель состоит в том, чтобы быстро и точно определить местоположение повреждения среди огромного количества неповрежденных азотистых оснований и инициировать процесс репарации. Поиск поврежденных нуклеотидов протекает по механизму, сочетающему «перепрыгивание» молекул ферментов между разными участками длинной ДНК в составе хроматина ядра и одномерную диффузию ферментов репарации по цепи ДНК, каждый из которых опознает «свое» повреждение.

Изучение этих ферментов в последнее время вызывает особый интерес. Знания о механизмах и особенностях действия ферментов репарации могут приблизить человечество к решению проблем раннего старения и лечения болезней, связанных с высоким уровнем генерации мутаций в геноме.

Кинетика в помощь

Лаборатория исследования модификации биополимеров ИХБФМ обладает микрообъемным спектрометром остановленной струи фирмы Applied Photophysics (UK) последней модели SX.20, а также прибором более ранней модели SX.18MV, позволяющими регистрировать оптическое поглощение, флуоресценцию, поляризацию флуоресценции и круговой дихроизм. С помощью спектрометра остановленной струи SX18.MV зарегистрированы изменения спектров флуоресценции от времени в экспериментах по смешиванию нескольких ферментов репарации с ДНК-субстратами.

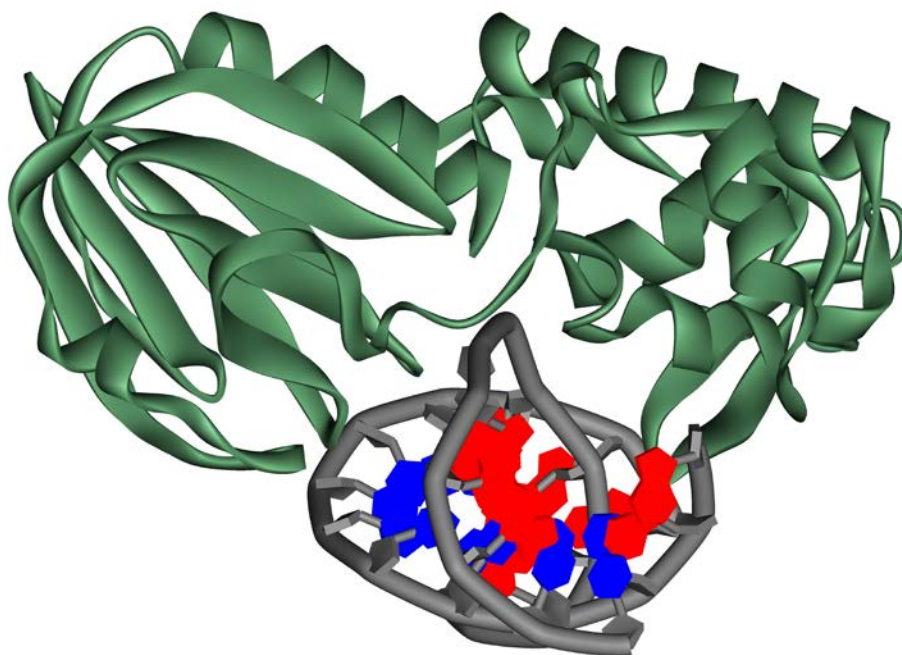
Конформационная динамика во всей красе или ферментативный процесс как полнометражный фильм

«Съемки» такого фильма производятся путем регистрации интенсивности флуоресценции остатков триптофана в ферментах или каких-либо флуоресцирующих групп, специально вводимых в субстраты, с помощью ФЭУ спектрометра остановленной струи.

Для одного из ферментов репарации ДНК, формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы Frg из *E.coli*, в структуре которого имеется 5 остатков Trp (Рис. 6), проводилась регистрация конформационных изменений фермента при его взаимодействии с несколькими видами ДНК-субстратов, содержащих поврежденные нуклеотиды: 7,8-дигидро-8-оксогуанозин (охоG), остаток рибозы (AP-сайт), аналог AP-сайта - остаток 2-оксиметил-3-окси-тетрагидрофурана (F), а также неповрежденный гуанозин (G) (см. Рис. 7) (см. обзор [13]). Эти данные позволили сделать заключение о различном по типу изменении конформации фермента при неспецифическом связывании субстрата, при специфическом связывании субстрата, при специфическом связывании субстрата и

осуществлении одной химической реакции, при специфическом связывании субстрата и осуществлении двух последовательных химических реакций. Таким образом, стало понятно, что фермент претерпевает, как минимум, пять конформационных перестроек, которые приводят к изменению структуры фермента и образованию специфических контактов с субстратом, результатом которых является высокоэффективное узнавание и связывание поврежденных участков ДНК.

а)



б)

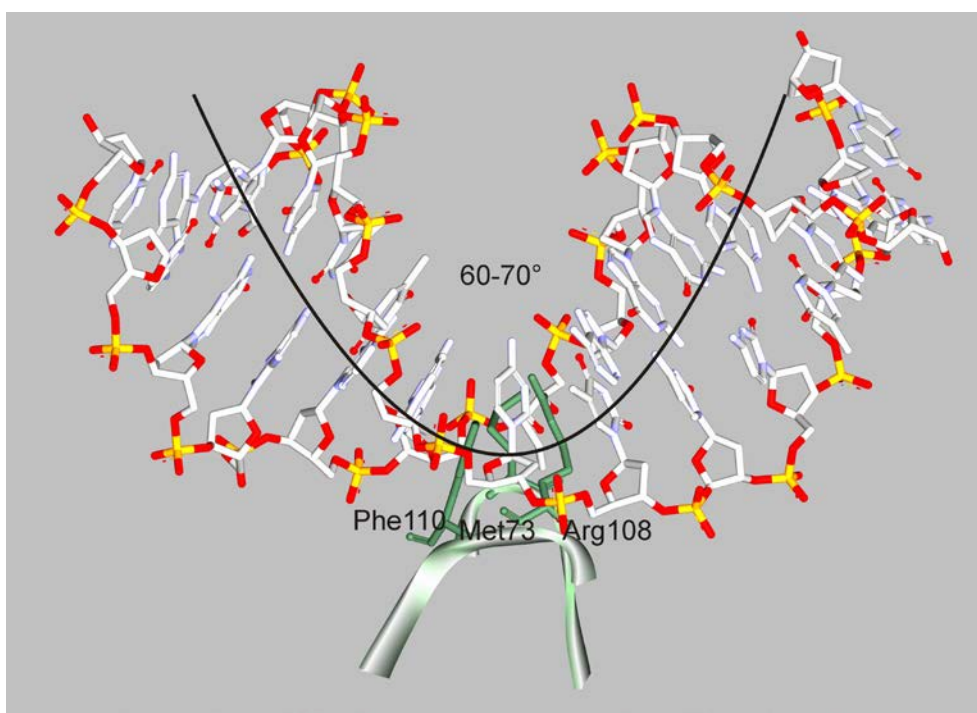
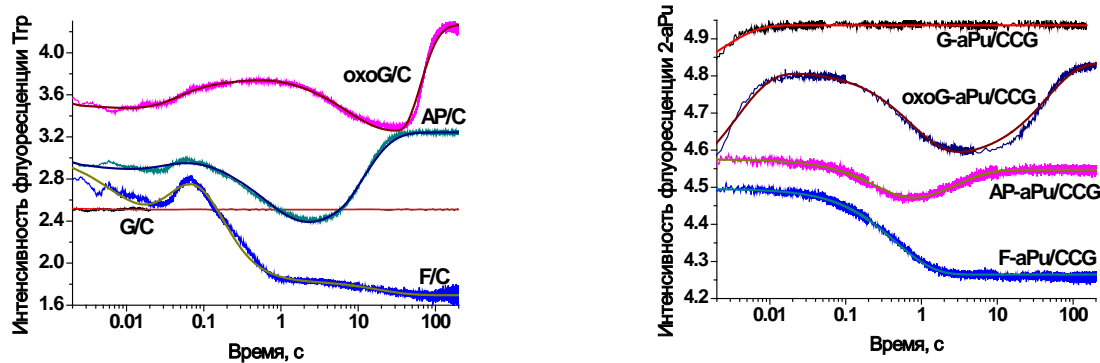


Рис. 6. Кристаллическая структура комплекса Frg с дуплексом ДНК (PDB ID 1K82).



а)

б)

Рис. 7. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента Frg (а) и ДНК-субстратов (б).

Рентгеноструктурные данные для этого фермента в свободном состоянии и в комплексе с ДНК [14, 15] (Рис. 6а). Установлено, что взаимодействие Frg с ДНК-субстратами приводит к конформационным изменениям как в молекуле белка (например, встраивание в двойную спираль ДНК аминокислотных остатков Met-73, Arg-108 и Phe-110), так и в молекуле субстрата (изгибание рибозо-фосфатного остова, выворачивание поврежденного основания в активный центр фермента) (Рис. 6б). Эти данные значительно облегчили интерпретацию конформационных изменений фермента, зарегистрированных по изменению флуоресценции триптофана. Каждой из пяти стадий были приписаны определенные «движения» в структуре фермента.

А что же происходит с субстратом? Для регистрации конформационных изменений субстрата встраиваем в его структуру флуоресцентную «метку» – 2-аминопурин. Фактически переходим к «съемкам» той же сцены, что и в предыдущем случае, но новой камерой, фиксирующей только изменения конформации субстрата при неспецифическом связывании ферментом, при специфическом связывании ферментом, при специфическом связывании ферментом и осуществлении одной химической реакции, при специфическом связывании ферментом и осуществлении двух последовательных химических реакций (Рис. 7б). Для полной картины в структуру ДНК-субстрата были также введены дополнительно две «метки», флуорофор и тушитель, позволяющие зарегистрировать изгибание субстрата методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET).

В итоге получили два «видео-ролика» описывающие процесс взаимодействия фермента с ДНК-субстратом, но с разных сторон. Это дает возможность установить взаимные конформационные переходы в процессе взаимодействия и выяснить, в какой последовательности, и с какой скоростью протекают различные стадии связывания и катализа (см. Рис. 8).

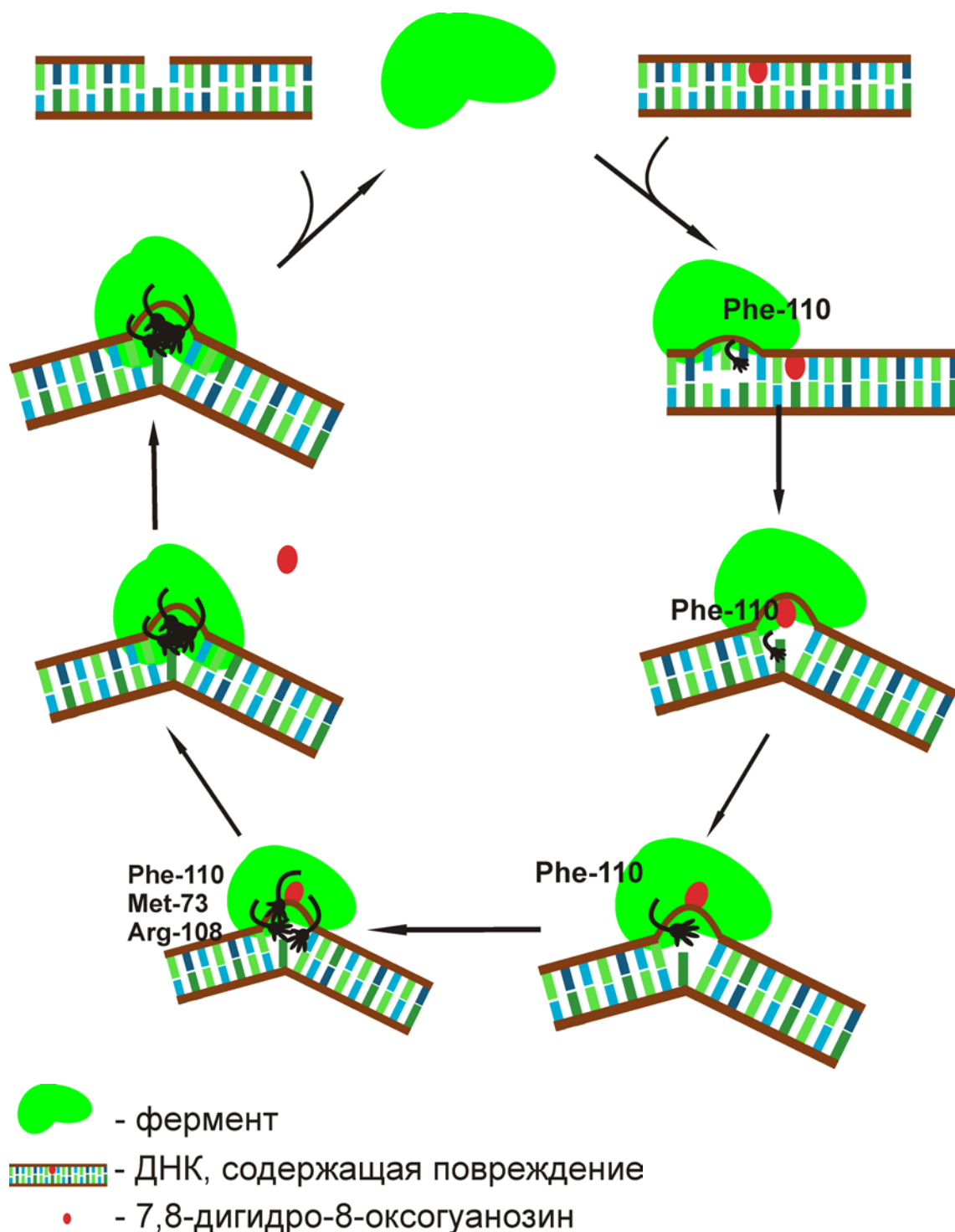


Рис. 8. Схематическое представление кинетического механизма процесса взаимодействия фермента Frg с охoG-субстратом.

Для подтверждения сделанных выводов о детальном механизме ферментативного процесса с участием Frg проводилась регистрация кинетики накопления продуктов реакции в миллисекундном диапазоне времени методом «быстрого прерывания реакции» (quench flow), что позволило определить, в какой момент времени, и с какой скоростью начинает происходить образование продуктов реакции. Затем методом масс-

спектрометрии MS/ES было подтверждено образование ключевых интермедиатов ферментативного процесса.

Исследования методом остановленной струи мутантного белка Fpg, содержащего вместо Phe-110 остаток Trp, дали возможность установить, что именно эта аминокислота принципиально важна для нахождения в цепи ДНК поврежденного гетероцикла 7,8-дигидро-8-оксогуанина и других окисленных гетероциклов.

На основании проведенного исследования была охарактеризована природа пяти конформационных переходов, происходящих на стадии образования фермент-субстратных комплексов Fpg со специфическим ДНК-субстратом, приводящих в конечном итоге формированию каталитически-активного состояния фермента. Первичное неспецифическое связывание приводит к формированию столкновительного комплекса с ДНК. Образование второго комплекса играет ключевую роль в процессе распознавания поврежденного участка ДНК и протекает путем тестирования цепи ДНК с помощью аминокислотного остатка Phe-110, который встраивается между уотсон-криковскими парами гетероциклических оснований, как плаг в борозду, и опознает окисленный гетероцикл. В том случае, когда фермента находит повреждение, происходит третья стадия процесса – выворачивание поврежденного основания. Эта стадия приводит к формированию полости в дуплексе ДНК. Четвертая стадия завершает процесс встраивания аминокислотных остатков фермента Met-73 и Arg-108 в образовавшуюся в ДНК полость. После этого происходит подстройка конформации активного центра фермента и осуществление каталитических стадий процесса. Стадией, лимитирующей скорость всего процесса, является распад аддукта между ферментом и остатком рибозы, получающимся при разрезании цепи рибозофосфатного остова с двух сторон (3'- и 5'-) поврежденного нуклеозида. Этот аддукт представляет собой основание Шиффа, образованное между остатком пролина-1 Fpg и атомом C1' рибозы после первой химической реакции, осуществляемой ферментом, гидролизом гликозидной связи.

Таким образом, использование методов быстрой кинетики в исследовании ферментативных реакций позволяет глубже проникнуть в суть их механизмов и понять, каким образом происходит высокоспецифическое узнавание в живой природе и селективное превращение одних молекул в другие, а также установить, каким образом достигается стабильность геномов и сохранение наследственной информации.

Работа поддержана соглашением 8092 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы».

1 Колдин Е., Быстрые реакции в растворе. М. Мир.1966.

-
- 2 Hartridge H., Roughton F. J. W. The kinetics of haemoglobin. II. The velocity with which oxygen dissociates from its combination with haemoglobin. Proc. Roy. Soc. A, 1923, 104, 395-430.
 - 3 Roughton F. J. W., Millikan G. A. Photoelectric Methods of Measuring the Velocity of Rapid Reactions. I. General Principles and Controls. Proc. R. Soc. Lond. A, 1936, 155, 258-269.
 - 4 Roughton F. J. W. Photoelectric Methods of Measuring the Velocity of Rapid Reactions. II. A Simple Apparatus for Rapid Kinetics and Other Changes Requiring 200 cc or More of Each Reagent, Proc. R. Soc. Lond. A, 1936, 155, 269-276.
 - 5 Millikan G. A. Photoelectric Methods of Measuring the Velocity of Rapid Reactions. III. A Portable Micro-Apparatus Applicable to an Extended Range of Reactions. Proc. R. Soc. Lond. A, 1936, 155, 277-292.
 - 6 Chance B. The accelerated flow method for rapid reactions. J. Franklin Inst., 1940, 229, 737-766.
 - 7 Chance B. The enzyme-substrate compounds of catalase and peroxides. Nature, 1948, 161(4102), 914-917.
 - 8 Gibson Q. H. Apparatus for the study of rapid reactions. J. Physiol., 1952, 117, 43P.
 - 9 Millikan G. A. Muscle hemoglobin. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 1936, 120, 366-388.
 - 10 Chance B. The stopped-flow method and chemical intermediates in enzyme reactions—a personal essay. Photosynth. Res., 2004, 80, 387-400.
 - 11 Michaelis L., Menten M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z., 1913, 49, 333-369.
 - 12 Chance B. The Reactions of Catalase in the Presence of the Notatin System. Biochem. J. 1950, 46, 387-402.
 - 13 Koval V. V., Kuznetsov N. A., Ishchenko A. A., Saparbaev M. K., Fedorova O. S. Real-time studies of conformational dynamics of the repair enzyme *E.coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase and its DNA complexes during catalytic cycle. Mutation Res./Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2010, 685, 3-10.
 - 14 Fromme J.C., Verdine G.L. Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM. Nature Struct. Biol., 2002, 9, 544-552.
 - 15 Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Matz E., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G., Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA. J. Biol. Chem. 2002, 277, 19811-19816.