



УДК 577.150.3

О ДИССОЦИАТИВНОМ МЕХАНИЗМЕ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ  
ГЕКСОКИНАЗЫ В РАСТВОРЕ

Чухрай Е. С., Подторак О. М., Никулина В. С.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Низкотемпературная термоинактивация гексокиназы, как и многих других ферментов с четвертичной структурой, протекает по двухстадийному механизму, включающему в себя обратимую диссоциацию активных форм фермента на неактивные мономеры и собственно денатурацию — необратимую инактивацию мономеров. Кинетический анализ процесса позволяет найти элементарные константы отдельных стадий (константу скорости диссоциации димеров на мономеры и константу скорости денатурации мономеров гексокиназы), а также константу равновесия диссоциации димеров на мономеры.

В настоящее время имеется ряд экспериментальных данных, показывающих, что низкотемпературная термоинактивация ферментов с четвертичной структурой протекает по двухстадийному механизму, включающему в себя обратимую стадию диссоциации четвертичной структуры на субъединицы с их последующей термодегградацией. В применении к активному димеру гексокиназы эта схема приобретает вид



Помимо гексокиназы такой тип деградации был установлен для аминоксиллазы [1], глюкозооксидазы [3] и деградации глутаматсинтетазы под действием денатурирующих агентов [4]. Схема (1) подтверждается также многими другими наблюдениями относительно преимущественной стабильности «работающей» формы сложных субъединичных комплексов по сравнению с функционально неактивными мономерами. Подобные закономерности, имеющие эволюционное происхождение, отмечались в литературе неоднократно (см., например, [5]). Все это делает весьма целесообразным проведение детального кинетического анализа схемы (1), приобретающей достаточно общее значение для описания деградации активных форм ферментов с четвертичной структурой.

Очевидно, область применимости схемы (1) четко ограничена только интервалом низкотемпературной инактивации, поскольку более высокая стабильность «работающей» формы обычно связана только с более высокой энергией активации ее термоинактивации. Условие применимости схемы (1) задается неравенством

$$k_d \ll k_1 \quad (2)$$

Действительно, если форма  $E_2$  обладает более высокой энергией активации необратимого изменения комплекса  $E_2$  (по сравнению с  $E_1$ ), то при доста-

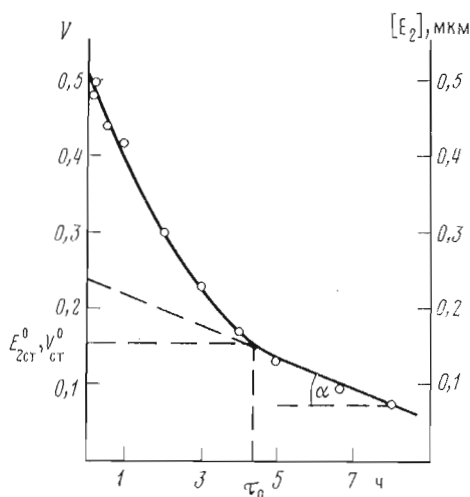


Рис. 1

Рис. 1. Термоинактивация гексокиназы (0,5 мкМ) в трис-НСI-буфере, рН 7,6, при 30° С, где  $V - \Delta D_{340}/\text{мин}$ ,  $E_2$  — концентрация активной формы белка

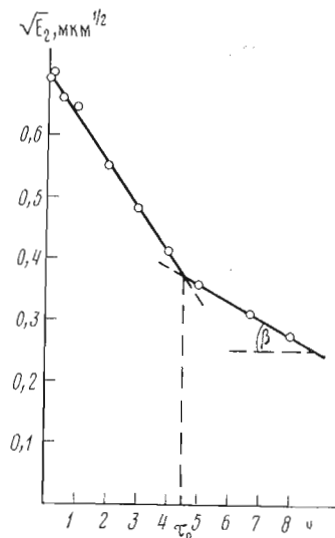
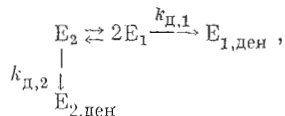


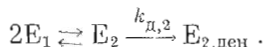
Рис. 2

Рис. 2. Термоинактивация гексокиназы в координатах  $\sqrt{E_2}$  — время

точно высоких температурах за счет возрастания  $k_{д, 2}$  необходимо будет принять во внимание инактивацию по схеме



а при еще более высоких температурах ( $k_{д, 2} \gg k_{д, 1}$ ) можно ожидать даже инверсии схемы (1), когда преобладающий путь высокотемпературного распада приобретает вид



Однако только изучение низкотемпературной термоинактивации позволяет более надежно определить константы скоростей элементарных процессов, дающих количественную оценку стабильности фермента.

За термоинактивацией гексокиназы можно следить по изменению ее каталитической активности. Активной формой гексокиназы является димерная структура с молекулярным весом 98000, которая в различных условиях обратимо диссоциирует на идентичные неактивные мономеры [6—8].

Кинетическая кривая термоинактивации дрожжевой гексокиназы (рис. 1) показывает, что процесс термоинактивации четко разделяется на два кинетических режима: предстационарный, когда сравнительно быстро устанавливается стационарная концентрация  $E_{1, \text{ст}}$ , и стационарный, которому отвечает стационарная скорость термоинактивации

$$W_{\text{ст}} = k_{д,1} E_{1, \text{ст}},$$

согласно схеме (1) и условию (2).

При работе с малыми концентрациями ферментов наиболее удобной мерой количества фермента в активной форме является скорость ( $V$ ) катализируемой им реакции в условиях субстратного насыщения, которая определяется по кинетической кривой накопления продукта реакции как

тангенс угла наклона начального прямолинейного участка кривой. Если активна только димерная форма, то в любой момент времени

$$V = \text{const}[E_2] \quad (3)$$

и величина  $V$  является мерой количества  $E_2$ . Процесс термоинактивации состоит в уменьшении величины  $V$  или  $E_2$  со временем при отсутствии ограничений по субстрату.

Как следует из дальнейшего изложения, корректный кинетический анализ схемы (1) связан с анализом зависимости  $\sqrt{E_2}$  от  $t$  (рис. 2). Для определения элементарных констант ( $k_1$  и  $k_{\text{д}}$ ) полезными оказываются следующие величины:  $V_0$  или  $E_{2,0}$  — активность или концентрация фермента в димерной форме в начальный момент времени:  $V_{\text{ст}}^0$  или  $E_{2\text{ст}}^0$  — скорость катализа или концентрация димерной формы белка в момент времени  $\tau_0$ , отвечающий излому на графике зависимости  $\sqrt{E_2}(t)$ .

Координаты точки излома на рис. 2 можно использовать также для приблизительной оценки константы диссоциации  $K_{\text{дис}}$ , поскольку стационарное состояние системы при  $t = \tau_0$  не сильно отличается от равновесного благодаря условию (2).

Если использовать определение константы равновесия диссоциации  $K_{\text{дис}}$  и выразить концентрацию  $E_2$  через измеряемую на опыте скорость катализа  $V$ , то для этой величины легко получить соотношение

$$K_{\text{дис}} = \frac{[E_1]^2}{[E_2]} = \frac{[2x]^2}{E_0 - x} \approx 4 E_0 \frac{(1 - V_{\text{ст}}^0/V_0)^2}{V_{\text{ст}}^0/V_0} = 4 E_0 \frac{(V_0 - V_{\text{ст}}^0)^2}{V_0 V_{\text{ст}}^0} \quad (4)$$

Здесь  $E_0$  — начальное количество белка (присутствующее при  $t=0$  в форме  $E_2$ ),  $x$  — мольное количество продиссоциировавшего димера при достижении равновесия диссоциации, равное

$$x = E_0 - E_2 = E_0 \left(1 - \frac{E_2}{E_0}\right) = E_0 \left(1 - \frac{V_{\text{ст}}^1}{V_0}\right).$$

Использование уравнения (4) по данным, представленным на рис. 1, позволило оценить  $K_{\text{дис}}$ . Здесь  $E_0 = 0,5$  мкМ,  $\tau_0 = 4,4$  ч,  $V_0 = 0,5$  ОЕ<sub>310</sub>/мин, а  $V_{\text{ст}}^1 = 0,155$  ОЕ<sub>310</sub>/мин. Подставляя эти значения в формулу (4), получим  $K_{\text{дис}} = 3,07$  мкМ. Кинетический анализ позволяет независимо определить величину  $K_{\text{дис}}$  по значениям кинетических параметров инактивации по схеме (1). В условиях стационарности

$$\frac{dE_1}{dt} = 2k_1 E_2 - 2k_{-1} E_1^2 - k_{\text{д}} E_1 = 0$$

на начальном этапе денатурации гексокиназа присутствует главным образом в виде  $E_2$  и  $E_1$ . Если в начальный момент времени денатурированная форма отсутствует, уравнение материального баланса по белку имеет вид

$$E_0 = E_2 + \frac{1}{2} E_1.$$

Здесь  $E_1$  и  $E_2$  — мольные концентрации соответствующих форм фермента в любой момент времени  $t < \tau_0$ , а  $E_0$  — начальная концентрация димерной формы. Это дает для стационарной концентрации  $E_1$  квадратное уравнение

$$2k_1 (E_0 - 1/2 E_1) - 2k_{-1} E_1^2 - k_{\text{д}} E_1 = 0$$

или

$$E_1^2 + \frac{k_1 + k_{\text{д}}}{2k_{-1}} E_1 - \frac{k_1}{k_{-1}} E_0 = 0,$$

откуда для стационарной начальной концентрации  $E_1 > 0$  получаем

$$E_{1\text{ст}} = -\frac{1}{4} \left( \frac{k_1 + k_D}{k_{-1}} \right) + \sqrt{\frac{1}{16} \left( \frac{k_1 + k_D}{k_{-1}} \right)^2 + K_{\text{дис}} E_0}$$

(второй корень всегда отрицателен).

Для стационарной скорости денатурации в зависимости от  $E_0$  получаем выражение

$$-\frac{1}{2} \left( \frac{dE_2}{dt} \right)_{\text{ст}} = W_{\text{ст}} = k_D E_{1\text{ст}} = -\frac{k_D}{4} \left\{ \sqrt{\left( \frac{k_1 + k_D}{k_{-1}} \right)^2 + 16K_{\text{дис}} E_0} - \frac{k_1 + k_D}{k_{-1}} \right\}. \quad (5)$$

Стационарная скорость температурной инактивации гексокиназы определяется как тангенс угла наклона прямолинейного участка кинетической кривой при  $t > \tau_0$ . На рис. 1 это  $\text{tg } \alpha$ .

График функции  $W_{\text{ст}}(E_0)$ , построенный по трем кинетическим кривым, соответствующим различным начальным концентрациям белка (рис. 3), позволяет определить  $K_{\text{дис}}$  и  $k_D$ . Согласно уравнению (5), график функции  $W_{\text{ст}}(\sqrt{E_0})$  представляет собой возрастающую кривую, параметры которой могут быть использованы для кинетического анализа. Уравнение асимптоты к этой кривой имеет вид

$$W_{\text{ст}} = k_D \sqrt{K_{\text{дис}} E_0} - \frac{1}{4} \left( \frac{k_1 + k_D}{k_{-1}} \right) k_D.$$

Характеристические параметры асимптоты — отрезок  $R_1$  и  $\text{tg } \gamma$  — связаны с интересующими нас кинетико-термодинамическими постоянными рассматриваемого процесса следующим образом:

$$\text{tg } \gamma = k_D \sqrt{K_{\text{дис}}} = k_D \sqrt{\frac{k_1}{k_{-1}}}, \quad (6)$$

$$R_1 = \frac{1}{4 \sqrt{K_{\text{дис}}}} \left( \frac{k_1 + k_D}{k_{-1}} \right).$$

Если использовать уравнение (2), можно провести отдельное определение  $K_{\text{дис}}$  и  $k_D$  из кинетических данных. Пренебрегая в соотношениях (6) величиной  $k_D$  по сравнению с  $k_1$ , получим

$$\left. \begin{aligned} K_{\text{дис}} &\approx 16R_1^2, \\ k_{D_2} &\approx \frac{\text{tg } \gamma}{4R_1}. \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

Положение асимптоты на рис. 3, отсекающей на оси  $\sqrt{E_0}$  положительный отрезок  $R_1$ , служит одновременно характеристическим отличием денатурации по схеме (1) от денатурации по реакции первого порядка, когда  $W_{\text{ст}}$  линейно растет с  $E_0$ . Закон изменения  $W_{\text{ст}}$  во времени легко найти при выполнении условия (2). Если в любой момент времени концентрация  $E_1$  является квазиравновесной

$$E_1 = \sqrt{K_{\text{дис}} E_2},$$

то стационарная скорость денатурации по схеме (1) при  $t > \tau_0$  описывается уравнением

$$-\frac{dE_2}{dt} = 2W_{\text{ст}} = 2k_D E_1 = 2k_D \sqrt{K_{\text{дис}} E_2}$$

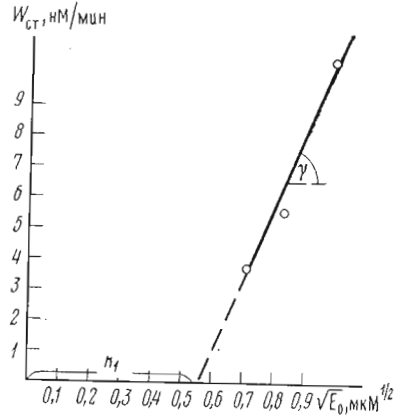


Рис. 3. Графический способ определения константы равновесия диссоциации и константы скорости денатурации по уравнениям (5)–(7)

или

$$\frac{dE_2}{\sqrt{E_2}} = -2k_d \sqrt{K_{\text{дис}}} dt.$$

После интегрирования получаем

$$\sqrt{E_2} = \sqrt{E_2^0} - k_d \sqrt{K_{\text{дис}}} t.$$

Здесь  $\sqrt{E_2^0}$  — равновесное количество  $E_2$  при данной температуре, зависящее от  $E_0$  величины  $K_{\text{дис}}$  по уравнению (4). Из этого уравнения ясно, почему величину начальной стационарной концентрации  $E_{\text{ст}}^0$  (и отвечающую ей величину  $V_{\text{ст}}^0$  на рис. 1) целесообразно определять по координатам точки излома графика зависимости  $\sqrt{E_2}$  от  $t$ . Если величина  $K_{\text{дис}}$  определена по уравнению (4), то отсюда также можно найти  $k_d$

$$\begin{aligned} \operatorname{tg} \beta &= k_d \sqrt{K_{\text{дис}}}, \\ k_d &= \frac{\operatorname{tg} \beta}{\sqrt{K_{\text{дис}}}}. \end{aligned} \quad (8)$$

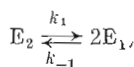
При повышении температуры условие (2) перестает выполняться и стационарная концентрация мономерной формы  $E_{1\text{ст}}$  может заметно отличаться от равновесной. В этом случае вместо приближенных соотношений (7)–(8) вначале следует использовать более общие соотношения (6) для стационарной (не обязательно равновесной) системы, но величину  $k_d$  определить уже не удастся. Если при этом  $\operatorname{tg} \gamma$  имеет сравнительно простой смысл  $k_d \sqrt{K_{\text{дис}}}$ , то отрезки  $R_1$  и  $R_2$  определяют указанные совокупности кинетических постоянных, но не отдельно  $k_d$  или  $K_{\text{дис}}$ . При более высоких температурах схема (1) неприменима, и здесь необходимо новое рассмотрение.

Рассмотрим способ расчета интересующих нас констант с использованием полученных уравнений. Итак, по данным кинетической кривой рис. 1 определена  $K_{\text{дис}}$  с использованием уравнения (4). Согласно уравнению (8), мы сможем определить  $k_d$ , если известен  $\operatorname{tg} \beta$ , который легко определить по кинетической кривой рис. 2 как тангенс угла наклона прямой при  $t > \tau_0$ . Он оказался равным  $0,5 \cdot 10^{-6}$  М/мин. Тогда, используя уравнение (8), получаем  $k_d = 0,23 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ .

Те же данные можно получить, используя для расчета рис. 3 и соответствующие ему уравнения (7). Как показано на рис. 3, величина положительного отрезка на абсциссе равна  $R_1 = 0,55 \cdot 10^{-3}$  М $^{1/2}$ , а тангенс угла наклона асимптоты  $-\operatorname{tg} \gamma = 2,75 \cdot 10^{-7}$  М $^{1/2}$ /мин. Используя уравнения (7), определяем  $K_{\text{дис}} = 4,84 \cdot 10^{-6}$  М и  $k_d = 0,11 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ . Таким образом, использование различных кинетических приемов для расчета констант скоростей процесса термоинактивации гексокиназы дает удовлетворительно совпадающие результаты. Первый прием расчета, использующий уравнения (4) и (8), основан на представлении о существовании равновесной стадии диссоциации в момент установления стационарного состояния. Он позволяет использовать для расчета  $K_{\text{дис}}$  и  $k_d$  данные одной кинетической кривой термоинактивации. Вторым приемом расчета является более общим, но в уравнениях (7) используется обязательное условие (2). Применение этого способа расчета позволяет надежнее отличить механизм термоинактивации, как протекающей по схеме (1), от денатурации по реакции первого порядка. Использование второго приема расчета требует обязательно знания кинетики термоинактивации при различных начальных концентрациях белка, т. е. проведения нескольких кинетических измерений.

Наличие на кинетических кривых термоинактивации гексокиназы предстационарного участка (рис. 1) позволяет определить константу скорости диссоциации димеров гексокиназы —  $k_1$ . Для этого используется прием, предложенный в работе [2]. Согласно теории обратимой диссоциа-

ции по схеме



константа скорости диссоциации  $k_1$  определяется довольно сложным выражением

$$tk_1 = \frac{K_{\text{дис}}}{4(x_1 - x_2)} \ln \frac{x_1(x_2 - x)}{x_2(x_1 - x)} = \frac{(x_1 + x_2)}{(x_1 - x_2)} \ln \frac{1 - x/x_2}{1 - x/x_1},$$

где  $x$  — количество фермента, продиссоциировавшего к моменту времени  $t$ . Эта величина определяется из опытных данных (рис. 1) в виде

$$x = E_0 \left(1 - \frac{V}{V_0}\right).$$

Величины  $x_1$  и  $x_2$  — корни характеристического квадратного уравнения

$$x, x_2 = -\frac{K_{\text{дис}}}{8} \pm \sqrt{\frac{K_{\text{дис}}^2}{64} + \frac{K_{\text{дис}}E_0}{4}}.$$

Поскольку  $\left|\frac{x}{x_{1,2}}\right| \ll 1$  (так как  $x \rightarrow 0$  при  $t \rightarrow 0$ ), выражение под логарифмом удобно разложить в ряд. Взяв первые два члена разложения, получаем

$$k_1 t \frac{x_1 - x_2}{x_1 + x_2} = -\frac{x}{x_2} + \frac{x}{x_1} - \frac{x^2}{2x_2^2} + \frac{x^2}{2x_1^2} = \frac{x(x_2 - x_1)}{x_1 x_2} + \frac{x_2}{2x_1^2 x_2^2} (x_2^2 - x_1^2).$$

Используя приведенное выше выражение  $x$  как функцию  $V/V_0$  и учитывая, что по определению  $x_1$  и  $x_2$  величина

$$\frac{x_1 + x_2}{x_1 x_2} = -\frac{1}{E_0},$$

получаем

$$K_1 t = -\frac{x_1 + x_2}{x_1 x_2} x - \frac{(x_1 + x_2)^2}{2x_1^2 x_2^2} x^2 = \frac{x}{E_0} + \frac{x^2}{2E_0^2}.$$

Это приводит к достаточно простому соотношению, с помощью которого легко найти величину  $k_1$  из опытных данных по предстационарной инактивации

$$k_1 t = \frac{3}{2} - 2\left(\frac{V}{V_0}\right) + \frac{1}{2}\left(\frac{V}{V_0}\right)^2.$$

В соответствии с полученным уравнением

$$F(V) \equiv 2\left(\frac{V}{V_0}\right) - \frac{1}{2}\left(\frac{V}{V_0}\right)^2 = \frac{3}{2} - k_1 t. \quad (9)$$

Преимущество описанного здесь метода графического расчета  $k_1$  перед использованным в работе [1] аналитическим методом расчета состоит в том, что для определения  $k_1$  не используются в явной форме не только величины  $K_{\text{дис}}$  или  $E_0$ , но и максимальная стационарная скорость инактивации  $V_{\text{ст}}^0$ , определение которой связано с некоторой дополнительной погрешностью. Найденное из рис. 4 значение  $k_1$  как тангенс угла наклона соответствующей прямой оказалось равным  $1,4 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ , что на порядок превышает соответствующее значение для  $k_d$ , а следовательно, соблюдается условие (2), обязательное для применения расчетов констант согласно кинетической схеме (1).

Уравнение для аналитического расчета  $k_1$  в предстационарной области выведено в работе [1] и имеет вид

$$k_1 = \frac{2,3}{tR} \lg \frac{(R+1) - \frac{V}{V_0}(R-1)}{\frac{V}{V_0}(R+1) - (R-1)}. \quad (10)$$

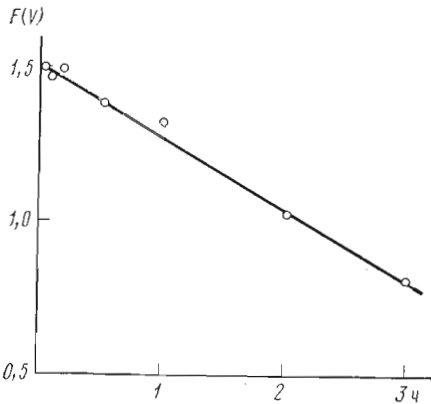


Рис. 4. Графический способ определения константы скорости диссоциации согласно уравнению (9)

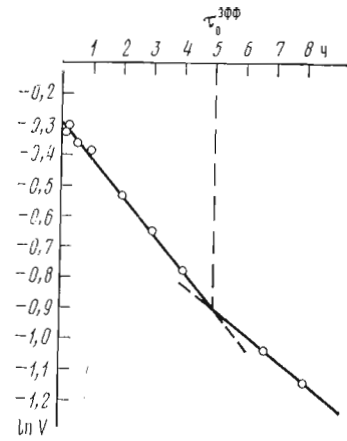


Рис. 5. Кинетическая кривая рис. 1 в координатах « $\ln V$  — время»

Здесь величина  $R^0$  представлена через измеряемые на опыте величины  $V_0$  и  $V_{ст}^0$  в виде

$$R \equiv \sqrt{1 + \frac{16 E_0}{K_{дис}}} = \sqrt{1 + 4 \frac{V_0^0 V_0}{(V_0 - V_{ст}^0)^2}} = \frac{V_0 + V_{ст}^0}{V_0 - V_{ст}^0}.$$

Интересной особенностью уравнения (10), так же как и уравнения (9), является то, что с их помощью можно вычислить  $k_1$ , используя в явном виде только величину стационарной начальной скорости катализа ( $V_0$ ) и скорость ( $V$ ). Это удобно для ферментов с неопределенным молекулярным весом. Величина  $k_1$ , вычисленная с помощью уравнения (10) по данным рис. 1, оказалась равной  $1,5 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ . Это свидетельствует о том, что для гексокиназы в указанных условиях термоинактивации стационарная начальная концентрация фермента, отвечающая точке  $V_{ст}^0$  или  $E_{2ст}^0$  на рис. 1, действительно мало отличается от равновесной.

В связи с тем что большинство экспериментальных данных по термоинактивации в литературе обычно приводится в полулогарифмических координатах, в работе [2] проведена оценка взаимосвязи подобной эффективной константы скорости денатурации ( $k_{д,эфф}$ ) с истинными кинетическими постоянными  $K_{дис}$  и  $k_{д}$ , отвечающими схеме (1). Уравнение, связывающее эти величины, имеет вид

$$k_{д,эфф} = 2k_{д} \sqrt{\frac{K_{дис}}{E_0}} = 4k_{д} \left| \frac{V_0}{V_{ст}^0} - 1 \right|. \quad (11)$$

Величина  $k_{д,эфф}$ , определенная как тангенс угла наклона прямолинейного участка прямой при  $t > \tau_0$  (рис. 5), оказалась равной  $1,4 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ , что на порядок превышает значения  $k_{д}$ , полученные с помощью уравнений (7) и (8), —  $0,11 \cdot 10^{-3}$  и  $0,23 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$  соответственно. Если воспользоваться уравнением (11) и подставить в него параметры, отвечающие кинетической кривой на рис. 1, и значения истинных констант денатурации  $0,11 \cdot 10^{-3}$  и  $0,23 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ , то вычисленные таким образом величины эффективных констант ( $1,03 \cdot 10^{-3}$  и  $2,15 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ ) практически совпадают с величиной  $1,4 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ , вычисленной по данным полулогарифмической кривой. Полученные данные указывают на то, что уравнение (11) правильно отражает связь между эффективной и истинной константой денатурации гексокиназы, а это значит, что используемая кинетическая схема (1) правильно отражает кинетический механизм денатурации гексокиназы.

Тангенс угла наклона прямолинейного участка кривой (рис. 5) при  $t < \tau_0$  является эффективной константой скорости диссоциации димера гексокиназы на мономеры. Она оказалась равной  $2 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>. Уточненная величина этой константы вычислена по уравнению (9) —  $1,4 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>.

Здесь нужно обратить внимание на следующую особенность рассматриваемого процесса и вытекающих из него зависимостей для эффективных и истинных констант денатурации. Поскольку истинный порядок реакции стационарной инактивации по  $E_2$  для схемы (1) половинный, а не первый, соотношение между  $k_{д,эфф}$  и  $k_{д}$  зависит от глубины превращения, сама величина  $k_{д,эфф}$  не является адекватной кинетической постоянной. Однако уравнение (11) показывает, каким образом и в этом случае можно вычислить истинную кинетическую постоянную  $k_{д}$ , если использовать только наклон прямой правее излома на графике зависимости  $\ln V$  от  $t$ .

### Экспериментальная часть

В данном исследовании использовалась дрожжевая гексокиназа (АТР: *D*-гексозо-6-фосфат-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1.) производства фирмы Lowson (Англия). Активность гексокиназы определялась при добавлении избытка глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*D*-глюкозо-6-фосфат: NADP-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.49; Fluka and Co Ltd Швейцария), которая в присутствии NADP катализирует дегидрирование глюкозо-6-фосфата в  $\delta$ -лакто-6-фосфоглюкононой кислоты. При этом образуется восстановленная форма NADPH, концентрация которого определяется по поглощению при 340 нм. Увеличение поглощения при 340 нм ( $\Delta D_{340}$ ) на 1,0 соответствует появлению в системе 0,7 мкмоль NADPH, что эквивалентно гидролизу 0,7 мкмоль АТР и фосфорилированию того же количества глюкозы.

Реакционная смесь объемом 3 мл содержала 0,14 мМ NADP, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (20 мкг/мл), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ глюкозу и 3 мМ АТР. Растворы всех реагентов готовились на 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,6. Кинетические измерения выполняли на регистрирующем спектрофотометре Hitachi-124 в кварцевых кюветах объемом 4 см<sup>3</sup>, толщиной 1 см.

Изучение термической инактивации проводили при 30° С и рН 7,6 в 0,05 М трис-НСl-буфере. Чтобы исключить возможность перераспределения молекулярных форм фермента при измерении его активности, определение производили при том же значении рН и температуре 30° С. Поскольку в кристаллическом образце гексокиназа представлена в виде димеров [8], измерения производили следующим образом: в нагретый буферный раствор (рН 7,6 и 30° С) вносили точную навеску кристаллического препарата фермента. В этот момент сразу после растворения измеряли активность растворенного фермента и определяли начальную скорость (на кинетической кривой инактивации фермента обозначена  $V$ ). Через определенные промежутки времени из раствора фермента отбирали пробы и определяли их активность. Начальную скорость определяли по кинетической кривой. Кинетические кривые термоинактивации снимали при различных начальных концентрациях фермента и измеряли до полной или почти полной потери активности фермента. Это очень важный момент исследования, поскольку первый этап процесса, отвечающего схеме (1), в зависимости от концентрации белка может протекать глубоко, вплоть до 80–90% диссоциации активной формы белка. До этой глубины превращения кинетическая кривая не будет иметь перелома, хотя при этом протекает только обратимая диссоциация белка на мономеры. Уменьшение каталитической активности можно ошибочно интерпретировать как процесс необратимой термоинактивации по первому порядку со значениями кинетических постоянных, не имеющими никакого отношения к реальному процессу термоинактивации мономерных единиц фермента.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Полторак О. М., Чухрай Е. С. (1979) Вестн. Моск. ун-та. Сер. «Химия», **20**, 195–204.
2. Полторак О. М., Чухрай Е. С., Ташлицкий В. Н. (1979) Вестн. Моск. ун-та. Сер. «Химия», **20**, 286–289.
3. Кулис Ю. Ю., Куртпнайтене Б. С. (1977) Тез. в сб. материалов II Всесоюзного симпозиума по получению и применению иммобилизованных ферментов, с. 19. Абовян.
4. Расулов А. С., Евстигнеева З. Г., Кретович В. Л. (1978) Биохимия, **43**, 912–917.
5. Лузиков В. Н., Рахимов М. М., Березин И. В. (1968) в сб. Митохондрии. Ферментативные процессы и их регуляция, с. 159, «Наука», М.
6. Lazarus N. R., Rerechin M., Bernard E. A. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2390–2400.
7. Schulze I. T., Colowick S. P. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2306–2316.
8. Steitz T. A. S., Fletterick R. J., Hwang K. J. (1973) *J. Mol. Biol.*, **78**, 551–561.

Поступила в редакцию:  
17.IV.1979

## ON THE DISSOCIATIVE MECHANISM OF THE HEXOKINASE THERMOINACTIVATION IN SOLUTION

CHUKHRAI E. S., POLTORAK O. M., NIKULINA V. S.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Low temperature thermoinactivation of hexokinase follows a two-stage mechanism involving the reversible dissociation of the active enzyme forms into inactive monomers followed, and by the denaturation itself, i.e. the irreversible inactivation of monomers. The kinetic analysis of the whole process allows to determine the elementary constants for separate stages — the rate and equilibrium constants for the dimers into monomers dissociation, and the rate constant of the monomer denaturation.

---