

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

УСПЕХИ ХИМИИ

ВЫПУСК 11

НОЯБРЬ — 1979 г.

ТОМ XLVIII

МОСКВА

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В 1932 ГОДУ
ВЫХОДИТ 12 РАЗ В ГОД

УДК 577.15.035+541.14+535.247+77.01

ИСКУССТВЕННЫЕ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ КАК ХИМИЧЕСКИЕ УСИЛИТЕЛИ СЛАБЫХ СВЕТОВЫХ СИГНАЛОВ *

I. V. Березин, Карел Мартинек

Рассмотрены химические принципы усиления слабых световых сигналов, основанные на фотохимических и сопряженных с ними химических реакциях. Наиболее подробно описаны системы, где темновой процесс усиления — это каталитическая реакция с участием ферментов. Проведен критический анализ искусственных ферментативных систем, в которых под действием света можно менять уровень каталитической активности.

Библиография — 130 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1921
II. Идея создания химического усилителя слабых световых сигналов с использованием ферментов	1923
III. Общие принципы построения искусственных светочувствительных ферментативных систем	1924
IV. Использование искусственных светочувствительных ферментативных систем в прикладных целях и в фундаментальных биохимических исследованиях	1938

I. ВВЕДЕНИЕ

Восприятие световых сигналов лежит в основе целого ряда важнейших практических процессов (начиная с фотографии и кончая фотоэлектронными умножителями), а также уникальных природных явлений, таких как зрение, фотосинтез, фототаксис и т. д. Обычно (как в человеческой практике, так и в живой природе) первичный воспринимаемый световой сигнал является довольно слабым, и для его эффективного детектирования и утилизации он должен быть в воспринимающей системе предварительно усилен.

Усилители — это устройства, увеличивающие передаваемую мощность (в данном случае воспринимаемый световой сигнал) за счет энергии постороннего источника. В зависимости от природы этого посторон-

* Некоторые общие аспекты этой проблемы были нами обсуждены недавно: K. Martinek, I. V. Berezin, Photochem. Photobiol., 29, 637 (1979).

него источника все усилители световых сигналов можно разделить на физические (использующие физические принципы усиления, реализуемые, например, в электронных устройствах)¹ и химические (использующие химические принципы усиления, т. е. основанные на фотохимических и сопряженных с ними химических реакциях). В данном обзоре будут рассматриваться только химические усилители, поскольку в литературе общему рассмотрению этой проблемы уделено незаслуженно мало внимания.

Действие любой светочувствительной химической системы должно включать в себя два этапа: поглощение света и вызываемую этим химическую реакцию. Под коэффициентом усиления светового сигнала в такой системе естественно понимать отношение количества молекул, вступивших под действием света в химическую реакцию (или количества образовавшихся молекул продуктов реакции), к количеству поглощенных квантов света: чем выше эта величина, тем выше светочувствительность системы, т. е. тем меньшее количество квантов она может в принципе детектировать. Однако в соответствии с законом фотохимической эквивалентности Штарка — Эйнштейна, квантовый выход первичной фотохимической реакции не может быть больше единицы. В таком случае поглощенный квант света не может «породить» более одной молекулы химического вещества, и, следовательно, проблема детектирования малого количества световых квантов трансформируется в столь же трудную проблему детекции малого количества молекул. Поэтому высоким коэффициентом усиления (т. е. эффективным квантовым выходом, превышающим единицу) может обладать лишь система, где первичный собственно фотохимический процесс сопряжен с последующим «темновым» процессом. В итоге эффективность усиления будет зависеть в основном от природы именно этого вторичного (темнового) процесса. Рассмотрим некоторые примеры.

Классическими химическими усилителями световых сигналов являются галогениды серебра, суспендированные в гелях желатины, которые находят широчайшее применение для получения фотографических изображений^{2, 3}. При поглощении кванта света галогенид серебра разлагается, образуя атомы серебра, которые выполняют роль катализаторов последующего темнового процесса проявления. Другим примером химического усиления световых сигналов могут служить хорошо известные цепные реакции, индуцируемые светом⁴. Поглощенный квант света зарождает в системе свободные радикалы, которые затем ведут химические стадии продолжения цепи (темновой процесс).

В принципе природа темнового процесса, следующего за первичной фотохимической реакцией, может быть и нехимической^{2, 3, 5} (например, «пузырьковый» метод, основанный на фотохимическом распаде азосоединений с последующим термическим расширением азотных пузырьков в полимерной пленке). Однако чувствительность (иногда и разрешающая способность) последних систем невелика. Тем же недостатком страдают и системы с индуцируемой светом цепной реакцией, где стадии обрыва цепи неизбежно приводят к уменьшению коэффициента усиления. В целом, анализируя эти и другие примеры^{2, 3, 5}, мы пришли к выводу, что с точки зрения чувствительности оптимальными следует считать системы именно с *катализитическим* темновым процессом, функционирующие по следующему общему механизму: под действием света зарождаются молекулы катализатора, которые затем (в темновой реакции) катализируют химическое превращение присутствующего в системе (нечувствительного к свету) вещества; в принципе, «число оборотов» одной молекулы катализатора неограничено (если удается избежать

«отравления» катализатора), и, следовательно, коэффициент усиления может быть сколь угодно большим.

Главным и, к сожалению, очевидно, непреодолимым недостатком галогеносеребряных каталитических систем является то, что мировые запасы серебра к настоящему времени исчерпываются⁵. Это заставляет вести поиск других, бессеребряных светочувствительных каталитических систем. В литературе отсутствует обзор, в котором была бы освещена возможность применить для этой цели биологические катализаторы, хотя именно ферменты открывают, по нашему мнению, весьма широкие перспективы в этой области. Такая уверенность основана на том, что, во-первых, ферменты по своей каталитической активности на много порядков превосходят обычные химические катализаторы⁶ и, во-вторых, благодаря своей уникальной макромолекулярной структуре обладают тончайшей регулируемостью, т. е. способностью резко и адекватно менять каталитическую активность (и другие свойства) под действием даже слабых изменений внешней среды⁷. Исходя из этого, мы выдвинули, обосновали и экспериментально реализовали принцип усиления световых сигналов с помощью светочувствительных ферментативных систем⁸⁻¹⁰.

II. ИДЕЯ ХИМИЧЕСКОГО УСИЛИТЕЛЯ СЛАБЫХ СВЕТОВЫХ СИГНАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТОВ

Чтобы раскрыть сущность предложенного подхода, рассмотрим систему, которая содержит каталитически неактивное производное фермента $E_{\text{неакт}}$ (способное, однако, под действием света превращаться в активный катализатор E) и субстрат (S) данного фермента. При освещении такой системы светом соответствующей длины волны в ней начнут протекать фотохимическая (1) и темновая (2) реакции:



Если ферментативная реакция (2) подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен и концентрация субстрата достаточно велика, чтобы «насытить» фермент (см.⁶), то эффективный квантовый выход Φ продукта определяется следующим выражением¹⁰:

$$\Phi = \varphi k_{\text{кат}} t, \quad (3)$$

где $k_{\text{кат}}$ — каталитическая константа скорости ферментативной реакции (2), определяемая из максимальной скорости реакции и равная числу «оборотов» фермента в единицу времени; φ — квантовый выход первичной реакции (1) и t — время протекания темновой ферментативной реакции. При заданном значении $k_{\text{кат}}$ и при неисчерпаемой концентрации субстрата эффективный квантовый выход Φ в такой системе, очевидно, может быть сколь угодно высок, поскольку он определяется исключительно временем протекания темновой реакции.

На практике усиление светового сигнала может выглядеть следующим образом: если в результате реакции (2) образуется окрашенный продукт P , то в качестве «ответа» на один (реально не воспринимаемый глазом) квант света образуется столь большое количество молекул окрашенного вещества, что его легко воспринять даже невооруженным глазом.

Уравнение (3) теоретически описывает функционирование светочувствительных ферментативных систем. Для их экспериментальной реализации, однако, нужно создать конкретные производные ферментов, спо-

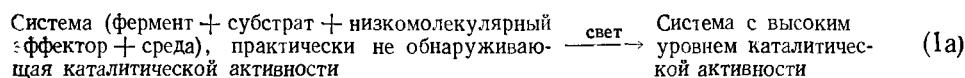
собные изменять свою активность под действием света. В принципе можно, конечно, для этой цели воспользоваться уже существующими в живой природе светочувствительными белками, такими, например, как зрительный фермент родопсин¹¹. Однако с практической точки зрения такой способ совершенно неприемлем, поскольку природные светочувствительные системы исключительно тонко и сложно организованы и весьма нестабильны, если их выделить из естественного окружения¹². Следовательно, возникает проблема создания искусственных светочувствительных ферментативных систем. Именно этой проблеме и посвящен настоящий обзор.

III. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ПОСТРОЕНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ

Логично использовать для создания искусственных светочувствительных ферментативных систем химико-бионический подход¹³. Анализируя фоторегуляторные процессы, протекающие *in vivo*, Эрланджер¹⁴ пришел к выводу, что в основе подавляющего большинства из них лежит один и тот же принцип: малые светочувствительные молекулы выступают в роли эффекторов (ингибиторов, активаторов) по отношению к биологически активным макромолекулам, например ферментам (которые сами по себе, как правило, нечувствительны к свету). При освещении происходит фотохимическая модификация молекулы эффектора; в результате меняется характер и (или) степень ее взаимодействия с биомакромолекулой и в итоге изменяется биологическая активность системы. Если положить этот принцип в основу создания искусственных светочувствительных систем, то можно воспользоваться для этой цели всем богатым арсеналом современной фотохимии^{15, 16}. Иными словами, в этом случае нужно рассмотреть подходящие светочувствительные низкомолекулярные вещества и подбирать взаимодействующие с ними ферменты. Это весьма плодотворный, но трудоемкий путь, поскольку он связан с подбором специфической пары светочувствительный эффектор — фермент, а правил для такого подбора не существует.

Можно пойти по другому пути, а именно, индуцировать светом изменение реакционной способности непосредственно либо субстрата, либо фермента. Действием света можно изменять также и среду ферментативной реакции (или микроокружение фермента).

Ниже будет проведен критический анализ описанных в литературе искусственных ферментативных систем, в которых под действием света, используя указанные принципы, можно изменить уровень катализитической активности. Разумеется, в случае прикладных аспектов проблемы в основу химического усилителя слабых сигналов можно положить лишь такие системы, где свет *инициирует* (зарождает) катализитическую активность. Практически система может считаться таковой, если ее активность после освещения увеличивается на 3—4 и более порядков. Иными словами, на практике могут найти применение лишь те системы, в которых первичный фотохимический процесс (типа (1)) можно представить в следующем общем виде:



В таких системах свет действует либо непосредственно на компоненты ферментативной реакции (изменяя химические или сорбционные свойства самого фермента или субстрата или, наконец, низкомолекулярного

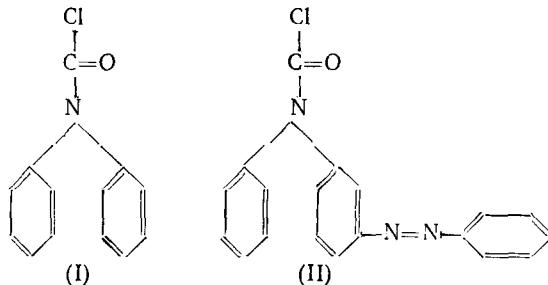
эффектора), либо на компоненты среды (изменяя, например, pH раствора или микроокружение молекулы фермента).

Если же под действием освещения ферментативная активность системы изменяется лишь в пределах 1—2 порядков, то такое действие света правильнее будет называть регулирующим. Несмотря на то, что между этими двумя типами ферментативных систем различие лишь количественное, мы тем не менее будем рассматривать их порознь, учитывая практическую важность первых. Необходимо, однако, учитывать, что в будущих исследованиях лишь небольшая модификация известного ранее метода (например, замена одного фермента другим) может в принципе резко изменить количественные характеристики той или другой системы. Следовательно, система, которая сегодня обнаруживает лишь небольшие регуляторные эффекты, завтра (если чуть видоизменить ее) может «зара�отать в полную силу».

Принципиально новые возможности для регулирования катализитической активности открывает использование иммобилизованных ферментов (ферментов, связанных с носителем), см.¹⁷. В этом случае чувствительность к внешнему воздействию можно «привить» системе через носитель. Эта идея уже оказалась плодотворной при создании звуко-(механо-)чувствительных материалов¹⁸.

1. Системы со светочувствительным эффеектором

Регулирование светом скоростей инактивации (или реактивации) ферментов при взаимодействии их с необратимыми фотохромными ингибиторами. Дифенилкарбамилхлорид (I) — известный необратимый ингибитор α -химотрипсина¹⁹⁻²¹ и ацетилхолинэстеразы²². Его фотохромное азопроизводное N-*n*-фенилазофенил-N-фенилкарбамилхлорид (II) — может существовать в *цис*- и *транс*-конфигурациях.



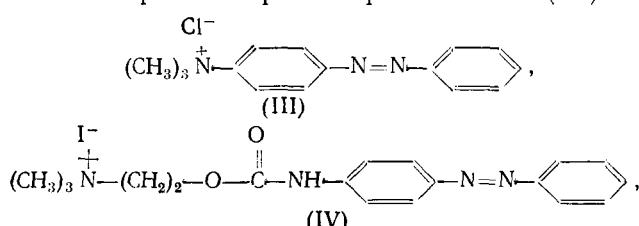
Равновесие между этими двумя формами можно сдвигать, освещая (II) светом той или иной длины волн¹³:



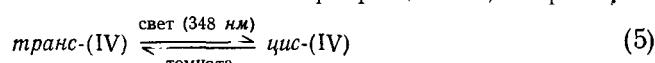
Оказалось¹³, что цис-(II) инактивирует химотрипсин в пять раз быстрее, чем транс-(II). Примерно такие же различия в скорости инактивации под действием стереоизомеров (II) (а также двух других родственных азосоединений) были отмечены и для ацетилхолинэстеразы^{23, 24}. Таким образом, освещая систему «фермент + (II)» светом с большей или меньшей длиной волны, можно изменять соотношение стереоизомеров ингибитора и, таким образом, регулировать скорость инактивации фермента (а, следовательно, и катализитическую активность системы).

Инактивация химотрипсина и ацетилхолинэстеразы под действием соединений типа (I) происходит фактически в результате карбамилирования активного центра. Карбамилипроизводное ацетилхолинэстеразы удается реактивировать в результате длительной инкубации при щелочных значениях pH, причем для *цис*- и *транс*-стереоизомеров ингибитора типа (II) были найдены несколько отличные скорости реактивации «занигированного» фермента²³. Это позволило регулировать с помощью света скорость также и этой стадии фермент-ингибиторного взаимодействия.

Регулирование светом ферментативной активности с помощью светочувствительных обратимых ингибиторов. Цис-транс-стереофотоизомеризация азосоединений использована в^{23, 25} также и для обратимого регулирования каталитической активности ацетилхолинэстеразы. Хлористый N-n-фенилазофенилтриметиламмоний (III) и иодистый N-n-фенилазофенилкарбамилхолин (IV)

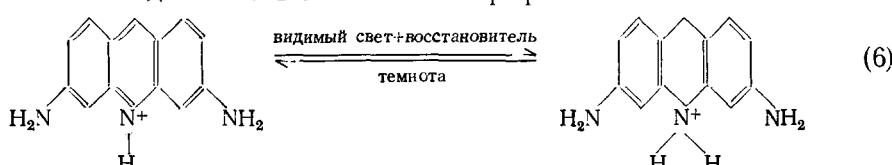


конкурентные ингибиторы этого фермента, существуют в *цис*- и *транс*-формах, способных к фотохимическим взаимопревращениям, например²⁵:



Значения констант ингибирования для *транс*- и *цик*-изомеров (IV) составляют 1,6 и 3,6 мкмоль/л соответственно²⁵; различие обусловлено²⁶ спецификой структуры активного центра ацетилхолинэстеразы. Используя различия в связывающей способности стереоизомеров по отношению к активному центру, можно (включая и выключая свет) обратимо менять степень ингибирования фермента, а следовательно, и уровень катализитической активности системы.

Иная фотохимическая реакция была использована нами для обратимой регуляции каталитической активности α -химотрипсина. Профлавин (3,6-диаминоакридин), конкурентный ингибитор этого фермента^{27, 28}, под действием видимого света в присутствии органического восстановителя способен фотовосстанавливаться с образованием 3,6-диаминоакридана²⁹; в темноте последний вновь окисляется в профлавин²⁹.



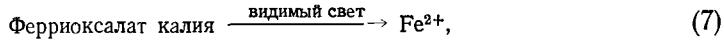
Нами³⁰ показано, что при фотовосстановлении профлавина исчезает его ингибирующая способность по отношению к α -химотрипсину (вероятно, вследствие нарушения плоской структуры молекулы, поскольку атом С(9) становится тетраэдрическим). Следовательно, при освещении системы « α -химотрипсин + профлавин + восстановитель (аскорбиновая кислота)» уровень ее каталитической активности возрастает (поскольку инактивируются ингибитор), а в темноте вновь уменьшается.

Регулирование светом разности потенциалов на биологической мембране с помощью фотохромных эффекторов. Разность потенциалов на некоторых биомембранных, в состав которых входит ацетилхолинэстераза, уменьшается (мембрана деполяризуется) в присутствии агентов, специфически взаимодействующих с ферментом (таких как ацетилхолин или карбамилхолин)³¹⁻³³. Этот факт был использован^{34, 35} для создания системы фоторегуляции мембранныго потенциала с применением как необратимых^{13, 23, 24}, так и обратимых^{23, 25} фотохромных ингибиторов ацетилхолинэстеразы: под действием света можно изменять соотношение *цис*- и *транс*-изомеров в ингибиторе, и, следовательно (учитывая их различную реакционную способность по отношению к ферменту), степень ингибирования ацетилхолинэстеразы. Как оказалось^{34, 35}, таким способом можно регулировать и потенциал на мемbrane электрического органа ската.

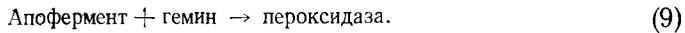
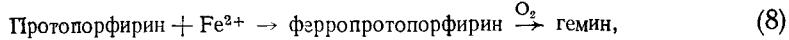
Таким образом, в системах со светочувствительными эффекторами, рассмотренными выше, действительно можно регулировать уровень каталитической активности в довольно широких пределах. Однако для создания химических усилителей слабых сигналов этого явно недостаточно. Необходимо как уже указывалось (см. уравнение (1а), именно инициировать под действием света каталитическую активность; этого можно достичь, если в результате фотохимической реакции в системе возникает такой эффектор (например, активатор или кофактор), без которого фермент в принципе не способен вести катализ.

Инициирование светом каталитической активности тем содержащих ферментов. В активный центр большинства темсодержащих окислительных ферментов входит ион двухвалентного железа. Например, пероксидаза представляет собой фермент, глобула которого кроме белковой части содержит простетическую группу — гемин, состоящую из комплекса иона железа с протопорфирином. Ни апопероксидаза, ни содержащая гемина, ни гемин, ни комплекс апопероксидазы с протопорфирином ферментативной активностью практически не обладают.

Принцип инициирования светом активности в таких системах разработан в нашей лаборатории³⁶. Берется смесь апопероксидазы, протопорфирина и комплексной соли железа (например, ферриоксалат калия), не взаимодействующей с протопорфирином; такая система очевидно не должна обладать каталитической активностью. При освещении комплексной соли ион железа выделяется в свободном виде^{37, 38}:



а затем уже идут процессы комплексообразования:

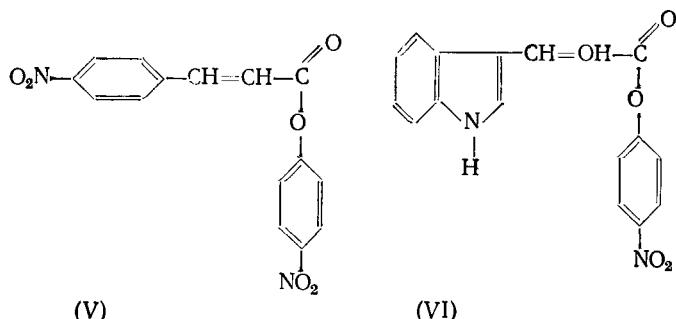


Таким образом, в результате первичного фотохимического процесса (7) и последующих темновых реакций (8) и (9) можно «сконструировать» активный фермент.

2. Системы со светочувствительным субстратом (или квазисубстратом)

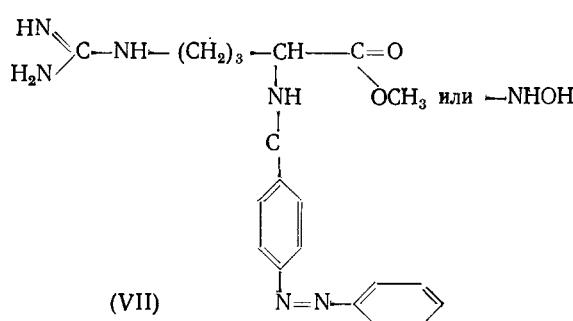
Регулирование светом скоростей реакций ферментов с синтетическими субстратами, способными фотоизомеризоваться. а) Сложные эфиры β -арилакриловых кислот

можно рассматривать как структурные аналоги специфических субстратов α -химотрипсина³⁹. Константы скорости второго порядка их гидролиза α -химотрипсином значительно выше для *транс*-стереоизомеров, чем для *цикло*-: в 5·10³ раз для *n*-нитрофениловых эфиров *n*-нитрокоричной кислоты (V)⁴⁰ и в 10³ раз для *n*-нитрофениловых эфиров индолилакриловой кислоты (VI)⁴¹.



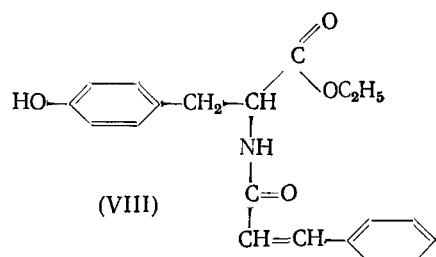
Следовательно, освещая смесь фермента с *цис*-изомером субстрата, можно значительно ускорить ферментативный процесс⁴⁰.

б) Амиды и сложные эфиры N- α -бензоил-L-аргинина — классические низкомолекулярные субстраты трипсина⁴²⁻⁴⁴. Стереоизомеры их азопроизводных VII



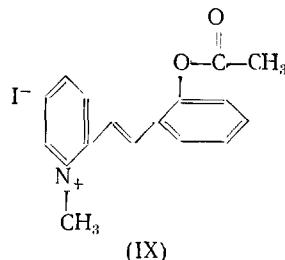
метиловый эфир и гидроксамид N- α -n-фенилазофенил-L-аргинина, в несколько раз различаются по реакционной способности по отношению к трипсину⁴⁵. Под действием света различной длины волны *цис*- и *транс*-стереоизомеры (VII) переходят друг в друга. Следовательно, с помощью света можно как бы «переключать» скорости ферментативной реакции с одного значения на другое⁴⁵.

в) При использовании реакции фотостереоизомеризации вокруг $C=C$ -связи удалось⁴⁶ регулировать с помощью света скорость химотрипсинового гидролиза этилового эфира N - α -циннамоил-L-тиrosина:



Соединение (VIII) можно рассматривать как аналог классического специфического субстрата α -химотрипсина, этилового эфира N-ацетил-L-тироцина³⁹.

г) Скорости гидролиза соединений типа (IX)



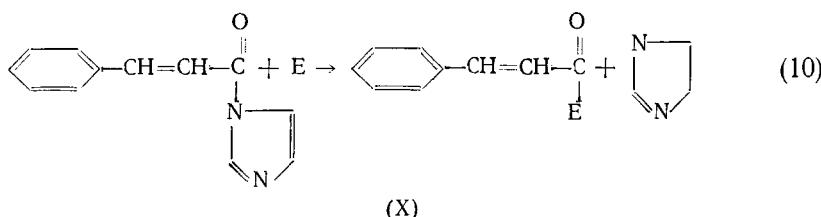
катализируемого бутирилхолинэстеразой, в несколько раз различаются для *цис*- и *транс*-стереоизомеров⁴⁷. Следовательно, используя фотостереоизомеризацию субстрата типа (IX), можно регулировать скорость ферментативной реакции. Авторы⁴⁷ полагают, что скорость-лимитирующая стадия ферментативного гидролиза — это десорбция молекулы продукта (соответствующего спирта) с активного центра. Такое предположение весьма вероятно, поскольку известно, что молекулы продуктов могут десорбировать с макромолекул ферментов довольно медленно^{48, 49}.

Реакции ферментов с фотовозбужденными субстратами. Молекулы в фотовозбужденных состояниях по своим химическим свойствам резко отличаются от находящихся в основном состоянии (поэтому удается изучать их реакции, даже несмотря на весьма низкую стационарную концентрацию возбужденных молекул)⁵⁰. Следовательно, в принципе можно ожидать, что реакция фермента с фотовозбужденным субстратом будет иметь иную скорость, чем с невозбужденным. Сказанное, возможно, имеет отношение к удивительным результатам, полученным Коморосаном с сотр.^{51–54}. В их работах показано, что при облучении низкомолекулярных субстратов различных ферментов малыми дозами УФ-света образуются долгоживущие возбужденные состояния, скорости реакций которых с ферментами могут быть в несколько раз выше по сравнению с наблюдаемыми для невозбужденных субстратов. Этот эффект сильно зависит от условий облучения. Механизм описанного явления остается неясным.

Таким образом, с помощью светочувствительных субстратов также можно (как и в случае светочувствительных эффекторов) не только регулировать скорость, но даже инициировать ферментативную реакцию (как это показано в⁴⁰ на примере соединений типа (V)). Однако для создания химического усилителя слабых сигналов указанного мало — нужно инициировать не реакцию (активируя субстрат), а зарождать именно катализическую активность в системе. Этого можно достичь, используя «квазисубстраты», химическое превращение которых на активном центре идет через мало реакционноспособные (стабильные) промежуточные соединения. В результате такой «химической модификации активного центра» квазисубстратом происходит как бы «отравление» катализатора. Используя такое стабильное и катализически неактивное «производное фермента» (модифицированное квазисубстратом по активному центру), можно попытаться изменить (повысить) под действием

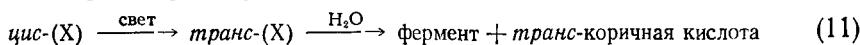
света его реакционную способность и тем самым регенерировать свободный активный центр.

Инициирование светом катализической активности ферментов с помощью фотохромных квазисубстратов. а) Впервые возможность инициировать светом катализическую активность искусственных ферментативных систем показана в Московском университете⁸⁻¹⁰. Принцип эффекта состоит в следующем. Известно³⁹, что ацилирование гидроксила остатка серина в активном центре протеолитического фермента α -химотрипсина приводит к полной инактивации этого биокатализатора. В свою очередь деацетилирование образовавшегося ацилфермента приводит к полной регенерации катализической активности. С учетом этих обстоятельств в^{8, 9} проведено ацилирование активного центра α -химотрипсина *цис*-циннамоилимидазолом (*транс*-стереоизомер этого реагента — известный титрант α -химотрипсина⁵⁵):



Образовавшийся при этом *цис*-циннамоил- α -химотрипсин (X) является весьма стабильным ацилферментом: даже в pH-оптимуме константа скорости деацетилирования составляет $4 \cdot 10^{-4}$ мин⁻¹, т. е. время полудеацетилирования больше суток. (Изменяя pH в сторону от pH-оптимума, можно это время увеличить еще больше). При освещении УФ-светом из *цис*-ацилфермента образуется *транс*-стереоизомер, который деацетилирует весьма быстро (время полупревращения ~ 1 мин). Наблюдаемое различие в реакционной способности *цис*- и *транс*-стереоизомеров ацилферментов (2000 раз) можно еще увеличить, если в *пара*-положение ароматического кольца циннамоильного радикала ввести нитрогруппу. В этом случае *транс*-ацилфермент деацетилирует в $2,5 \cdot 10^4$ раз быстрее, чем соответствующий *цис*-ацилфермент¹⁰. Причины *транс*-специфичности α -химотрипсина обсуждены в^{41, 56}. *Цис*- и *транс*-циннамоильные производные другого протеолитического фермента — трипсина различаются по реакционной способности значительно меньше^{57, 58}.

Химический усилитель слабых световых сигналов с использованием описанных систем можно реализовать в следующем виде. Возьмем, например, *цис*-циннамоилхимотрипсин, который сам по себе катализически не активен (см. рис. 1а) и в условиях опыта^{8, 9} практически не деацетилирует. Если такую систему осветить УФ-светом, то произойдет *цис*-*транс*-фотостереоизомеризация ацилфермента, а образующийся *транс*-ацилфермент быстро гидролизуется:



За кинетикой этих процессов можно проследить по осциллограмме, полученной при флеш-индущемой реакции гидролиза *цис*-нитроциннамоилхимотрипсина⁵⁹ (рис. 2). Как видно из уравнения (11), в результате освещения происходит регенерация катализической активности (см. рис. 1б), и, следовательно, в присутствии субстрата начнет образовываться, например, окрашенный продукт (уравнение (2)). Эффективный квантовый выход Ф продукта Р (коэффициент усиления светового сигнала) для системы можно оценить на основании уравнения (3), полагая

квантовый выход *cis-trans*-стереоизомеризации $\phi = 0,3$ (при 313 нм)⁵⁶ и катализитическую константу для специфического субстрата в рН-оптимуме действия химотрипсина $k_{\text{кат}} \sim 100 \text{ сек}^{-1}$ (см.³⁹). Если время протекания темновой реакции t равно, например, 1 час, то согласно (3), $\Phi = 0,3 \cdot 200 \cdot 3600 \approx 2 \cdot 10^5$, т. е. на один поглощенный квант света в системе выделится за это время более 10^5 молекул продукта.

Таким образом, видно, что описанные системы — весьма чувствительные детекторы света, см. обзор⁶⁰.

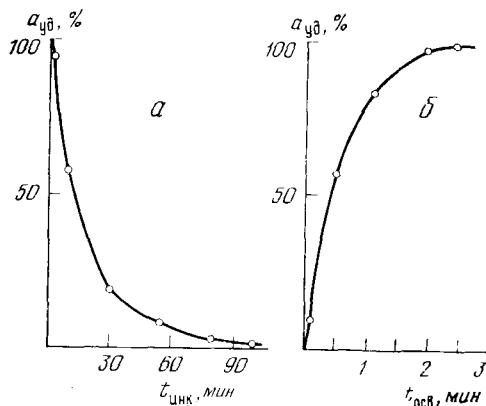


Рис. 1. Изменение удельной катализитической активности (a_y0) фермента химотрипсина при инкубировании его с *n*-нитрофениловым эфиром *cis*-4-нитрокоричной кислоты (кривая a , $t_{\text{инк}}$ — время инкубации) и при последующем освещении образовавшегося ацилфермента *cis*-4-нитроцианинаомиляхимотрипсина (кривая b , $t_{\text{осв}}$ — время освещения)^{8, 10}

б) Другой принцип заложен в работах^{61, 62}, где предложен фотохимический метод изучения аминокислотного окружения активного центра фермента. При реакции α -химотрипсина с *n*-нитрофениловым эфиром диазоуксусной кислоты — аналогом классического неспецифического субстрата протеаз, *n*-нитрофенилацетата⁶³ — образуется диазоацетилфермент, весьма стабильный ацилфермент, не обладающий каталитической активностью. Так, например, диазоацетил- α -химотрипсин практи-

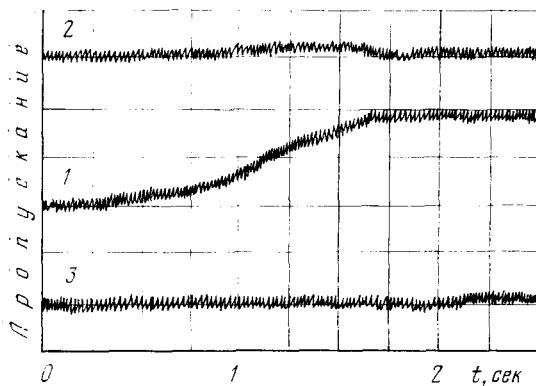
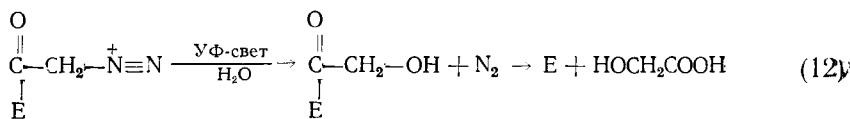


Рис. 2. Осциллограмма (кривая 1) изменения пропускания (320—360 нм) раствора *cis*-4-нитроцианинаомиляхимотрипсина в результате импульсного (10^{-4} сек) облучения в момент $t=0$. Кривые 2, 3 соответствуют 0 и 100% пропускания⁵⁹

чески не деацетилирует в течение 48 час (при рН 6,5)⁴⁴; в то же время ацетил- α -химотрипсин быстро деацетилирует в этих условиях. Такое различие связано с понижением за счет сопряжения с диазогруппой электрофильтности карбонильного атома углерода в субстратном остатке. При освещении диазоацетил- α -химотрипсина УФ-светом происходит⁶¹ отщепление азота от диазоацетильного остатка с образованием карбено-вого радикала. Этот радикал гидролизуется, и получающийся при этом оксиацетил- α -химотрипсин быстро деацетилирует с регенерацией активно-

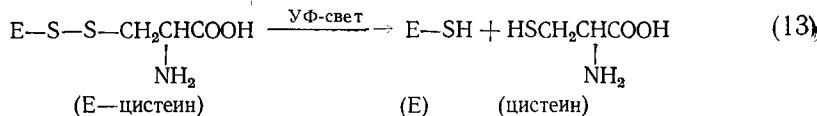
го фермента:



3. Воздействие света на фермент (в том числе и на модифицированный)

Активация светом каталитически неактивных производных ферментов (модифицированных по активному центру). Принцип подхода заключается в том, что сначала модифицируют фермент с образованием каталитически неактивного производного $E_{\text{неакт}}$, см. уравнение (1), затем с помощью света «снимают» модифицирующий агент (или его влияние). Весьма удобным объектом для такого рода работ является сульфидрильный протеолитический фермент папаин. В каталитической функции папаина важнейшую роль играет сульфидрильная группа цистеина, входящая в активный центр фермента⁶⁴. Однако обычно фермент находится в неактивной форме, в которой указанная сульфидрильная группа активного центра образует смешанный дисульфид с дополнительным остатком цистеина (папаин — $S-S-$ цистеин)^{65, 66}; для проявления папаином каталитической активности он должен быть проактивирован, например, химически (при такой активации происходит расщепление $S-S$ -связи дисульфида).

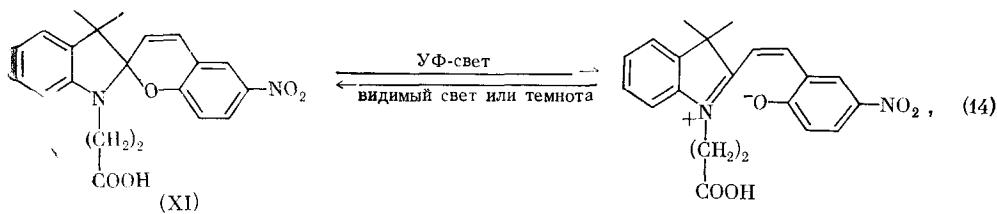
В принципе дисульфидные связи как в пептидах, так и в белках можно расщеплять не только химически, но и фотохимически⁶⁷⁻⁶⁹. Данный подход был использован⁷⁰ для фотохимической активации папаина: при освещении УФ-светом раствора, содержащего папаин — S—S — цистеин, образуется катализически активный фермент:



Дальнейшее развитие этого принципа дано в нашей лаборатории^{7г}. В результате катализируемого ионами меди окисления активного папаина получен дисульфидный димер фермента, папаин—S—S—папаин. При освещении такого димера УФ-светом происходит расщепление дисульфидной связи с образованием двух молекул каталитически активного фермента. Квантовые выходы процесса фотоактивации в обоих случаях лежат в диапазоне 0,1—1,0.

Регулирование светом каталитической активности ферментов с помощью фотохромных эффекторов, присоединенных к белковой глобуле вне активного центра. При освещении фотохромных полимеров^{72, 73} можно ожидать изменения их структуры. Такой эффект был обнаружен экспериментально⁷⁴⁻⁷⁹. В указанных работах к синтетическим полимерам или к белкам ковалентно либо нековалентно присоединяли азокрасители (например, соединения типа (II)–(IV)). Термодинамически более стабильной является транс-конфигурация красителя, однако при освещении происходит транс–циклоизомеризация. Показано⁷⁴⁻⁷⁶, что такая фотохимическая реакция действительно вызывает значительное изменение структуры полимера (прослеживаемое, например, по изменению вязкости его растворов).

Макромолекулы ферментов обладают биологической активностью, которая весьма чувствительна к конформации белковой глобулы⁷. С этой точки зрения представляется интересным модифицировать фотохромными реагентами фермент (но не по активному центру — чтобы сохранить катализическую активность) и исследовать зависимость активности биокатализатора от регулируемой светом структуры модификатора. Эта идея была экспериментально реализована в⁸⁰. В качестве модификатора α -амилазы использовали соединение спиропиранового ряда (XI), широко используемое для создания фотохромных полимеров^{72, 73}. При освещении УФ-светом соединения (XI) происходит его изомеризация



которую можно обратить при освещении видимым светом или в темноте^{15, 81}.

В работе⁸⁰ получен ангидрид соединения (XI), которым затем модифицировали аминогруппы молекул α -амилазы. При освещении модифицированного таким образом фермента УФ-светом происходит уменьшение его катализической активности; в темноте фермент реактивируется.

Механизм регуляции систем, описанных в этом разделе, основан на том, что под действием света меняется молекулярная структура модификатора. В принципе механизм регуляции каталитической активности фермента, модифицированного вне активного центра, может быть и другим.

Индукционное светом изменение конформационно-сольватационного состояния фермента. Белковые молекулы ферментов содержат ряд собственных хромофоров (например, остатки ароматических аминокислот), способных эффективно поглощать свет. В некоторых случаях такое поглощение света может вызвать активацию биокатализатора. Так, освещение раствора альдолазы УФ-светом приводит к обратимому долговременному увеличению ее ферментативной активности^{82, 83}. Аналогичный эффект, но при освещении альдолазы в присутствии субстрата, наблюдали Волотовский и др.⁸⁴, которые предложили интересное объяснение этого эффекта: при поглощении света остатками триптофана в фермент-субстратном комплексе может происходить, в частности, безызлучательная диссипация энергии возбуждения в тепло, что может привести к нарушению структуры воды в сольватной оболочке макромолекулы. Это в свою очередь облегчает аллостерический конформационный переход в субъединицах фермента, что и приводит к образованию конформации альдолазы с повышенной каталитической активностью.

С описанной гипотезой согласуются данные^{85, 86}. Их отличие от работ^{82–84} состояло в том, что в качестве первичных акцепторов света служили не собственные хромофоры белка, а ковалентно присоединенные к сульфидрильным группам альдолазы остатки диазотированной *n*-ами nobензойной кислоты (в этом случае белок поглощает видимый свет). Очевидно, что такая модификация не должна существенно отразиться на изменении свойств фермента, согласно механизму⁸⁴. И действительно,

при освещении модифицированной альдолазы происходит изменение ее конформации (прослеживаемое по изменению спектров поглощения и электрофоретической подвижности)⁸⁶, а также меняется кинетика катализируемого ею расщепления фруктозо-1,6-дифосфата⁸⁵. По-видимому, предложенный в⁸⁴ механизм может быть достаточно общим для различных ферментов.

Другой (не исключено, что частично схожий с описанным) механизм повышения активности ферментов под действием света можно предложить, исходя из гипотезы Фрелиха^{87, 88}, согласно которой биологические объекты, в частности, белки, могут существовать в долгоживущих возбужденных состояниях. В случае ферментов каталитическая активность этих состояний может быть иной, чем основных состояний; переход из основного состояния в возбужденное может индуцироваться, например, светом. Имеется экспериментальная работа⁸⁹ такого рода, в которой показано, что при освещении раствора химотрипсина лучом лазера (457,9 нм) происходит значительное повышение активности фермента. По мнению авторов⁸⁹, в этом случае как раз и реализуется обрисованная Фрелихом картина.

Фотоинактивация ферментов. В принципе, для создания светочувствительных ферментативных систем можно использовать хорошо известное явление фотоинактивации ферментов. Первая работа⁹⁰, посвященная этому вопросу, появилась еще в 1879 г., а к настоящему времени количество таких работ исчисляется сотнями. Поэтому мы ограничимся лишь ссылкой на наиболее исчерпывающие обзоры⁹¹⁻⁹⁷.

Инактивация под действием УФ-света обусловлена фотодеструкцией аминокислотных остатков белковой глобулы (прежде всего остатков триптофана и цистеина). Квантовый выход фотоинактивации составляет в этом случае 0,001—0,1 и зависит от природы фермента, его конформации, условий среды. Некоторые флавиновые ферменты инактивируются под действием видимого (синего) света. Здесь кофактор (флавин-мононуклеотид) выступает в роли сенсибилизатора процесса деструкции апопфермента⁹⁸.

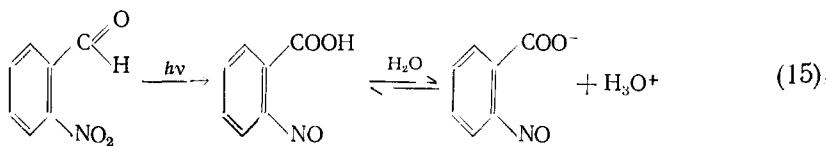
Хорошо известен также так называемый фотодинамический эффект, т. е. фотоокисление белковых молекул, сенсибилизированное красителями⁹⁹. Механизм фотодинамического эффекта заключается в переносе растворенного в воде молекулярного кислорода на белок через образование промежуточного соединения — аддукта триплетно-возбужденной молекулы красителя с кислородом. Фотодинамическое действие осуществляется при освещении растворов белков в присутствии различных красителей (эозин, метиленовый голубой и т. д.) видимым светом; квантовые выходы фотоинактивации ферментов составляют обычно 0,001—0,1⁹⁹.

4. Изменение среды ферментативной реакции под действием света

Индукционный светом pH- скачок. Почти все ферментативные реакции весьма чувствительны к значению pH раствора: их скорости резко уменьшаются при изменении pH в сторону от pH-оптимума⁶. Это обстоятельство привело к идеи регулировать светом скорости ферментативных реакций за счет фотоиндуцированного изменения pH среды¹⁰⁰. В литературе описаны фотохимические реакции, в результате которых образуются сильные кислоты или основания. Приведем некоторые примеры таких реакций.

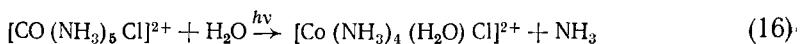
а) При освещении раствора *o*-нитробензальдегида (436 нм) происходит реакция фототаутомеризации: *o*-нитробензальдегид превращается с

квантовым выходом $\phi = 0,5$ в *o*-нитробензойную кислоту (см.¹⁵, стр. 211):



При проведении реакции (15) в водном растворе образующаяся кислота диссоциирует с образованием иона гидроксония, т. е. освещение в этом случае приводит к понижению рН среды.

б) При освещении комплексных аммиакатов переходных металлов Co^{3+} , Cr^{3+} и др.) видимым светом происходит (с квантовыми выходами 0,01—1,0) реакция фотоаквтации^{101, 102}, например:

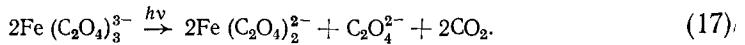


Образующийся в результате реакции (16) аммиак будет реагировать с водой (т. е. со средой реакции)

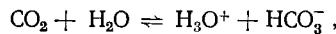


что приведет к защелачиванию раствора.

в) Оксалаты переходных металлов (Fe^{3+} , Co^{3+}) при освещении видимым светом подвергаются фотохимической окислительно-восстановительной реакции с квантовым выходом ~ 1 (этот процесс лежит в основе действия ферриоксалатного актинометра^{37, 38}), например:



Образующийся при этом углекислый газ вступает в реакцию с водой



что приводит к закислению среды.

Разумеется, перечисленные системы (а)—(в) не исчерпывают фотохимических реакций, сопровождающихся изменением рН среды.

Возьмем фермент и субстрат при таком значении рН, когда скорость ферментативной реакции пренебрежимо мала. Добавим затем один из отмеченных выше реагентов, например, *o*-нитробензальдегид (уравнение (15)) или хлорпентааммиакат кобальта (уравнение (16)). Если такую систему теперь осветить, то произойдет изменение рН раствора и, если оно направлено к рН-оптимуму действия фермента, то скорость ферментативной реакции возрастает.

Изложенный принцип¹⁰⁰ был апробирован на примере фотоинициируемых реакций, катализируемых α -химотрипсином (с использованием системы (а)⁴⁶ и трипсином (система (б))¹⁰³.

Фоторегулирование скоростей ферментативных реакций в результате изменения под действием света микроокружения фермента. Новые возможности для регулирования каталитической активности светом открываются при включении фермента в полимерную пленку (мембрну), содержащую фотохромный эффектор. Такой эффектор можно вносить в полимерный носитель либо механически, либо присоединить к нему ковалентно.

а) Химотрипсин и азобензол механически включали в мембрну октанол/вода, стабилизированную стеаратом натрия¹⁰⁴. Азобензол не взаимодействует с ферментом, однако изменение его структуры в результате *cis*—*транс*-фотостереоизомеризации индуцирует структурные изменения

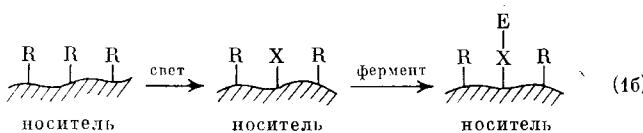
также и в мембране, что оказывает влияние на каталитическую активность химотрипсина (по-видимому, за счет эффекта микроокружения).

б) Интересная идея фотоконтроля ферментативных процессов содержится в работах^{105, 106}, где фотохромным соединением (ангидридом соединения (XI)) модифицировали аминогруппы коллагена. Затем из такого коллагена получали пленки, содержащие нековалентно включенные ферменты — уреазу¹⁰⁵ или лактатдегидрогеназу¹⁰⁶. При освещении таких иммобилизованных ферментативных систем происходит изменение структуры модифицированного полимера и, следовательно, изменение микроокружения фермента. Это приводит к уменьшению каталитической активности системы. После выдерживания в темноте происходит обращение фотохимической реакции (согласно уравнению (14)), и активность ферментов поднимается до исходного уровня.

5. Системы с носителем, в котором свет зарождает центры иммобилизации фермента

Практически во всех рассмотренных выше примерах (разделы 1—4) наличие светочувствительности неразрывно связано со спецификой ферментативной системы. Другими словами, каждый из механизмов, с помощью которого удалось искусственно «привить» системе светочувствительность, сильно зависит или от структуры активного центра или от характера его взаимодействия с низкомолекулярными лигандами или от степени «отзывчивости» его как на изменения структуры весьма удаленных участков белковой глобулы, так и на изменение реакционной среды и т. п. Следовательно, метод, разработанный для одного фермента, не может быть автоматически использован в другой системе.

Чтобы преодолеть этот недостаток, мы предлагаем принципиально новый, универсальный подход, основанный на применении носителя для иммобилизации фермента. Основную идею метода отражает следующая схема:

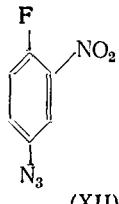


Функциональные группы R исходного носителя не взаимодействуют с ферментом. Под действием света они претерпевают химическое превращение ($R \rightarrow X$) с образованием функциональных групп X, способных взаимодействовать с ферментом химически или сорбционно. Таким образом, на том участке поверхности носителя, куда попал свет, окажется присоединенным фермент, а в неосвещенных участках его не будет. Принесенный фермент можно визуализировать, обработав систему субстратом, дающим в результате ферментативной реакции окрашенные продукты.

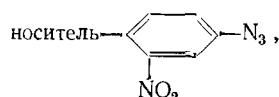
Очевидным достоинством описанного подхода является то, что он применим практически для любого фермента (поскольку молекулы всех ферментов состоят из одних и тех же аминокислотных остатков). Более того, методы иммобилизации ферментов на носителях разработаны в настоящее время весьма детально^{107—109}. Поэтому здесь укажем лишь на фотохимические методы, с помощью которых можно «привить» носителю способность связывать фермент.

Фотохимическая модификация функциональных групп носителя. а) В работах^{110, 111} описана иммобилизация аспаргиназы с помощью фотохимического реагента Ноулса¹¹² (1-фтор-2-

нитро-4-азидобензола (XII)). Этот реагент добавляли для иммобилизации ферментов к носителю, а именно к алкиламиностеклу. В результате замещения фтора нуклеофильными NH₂-группами носителя образовалось соединение (XIII)



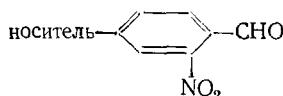
(XII)



(XIII)

способное под действием света отщеплять азот с образованием весьма реакционноспособного нитренового радикала. Если вести освещение в присутствии фермента, то в местах попадания света фермент ковалентно присоединяется к модифицированному носителю (XIII), взаимодействуя с нитреном. Перспективы этого подхода для фотоиммобилизации ферментов весьма полно освещены Гуайром в ¹¹¹.

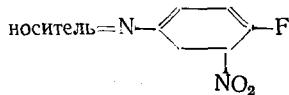
б) Другой метод предложен нами ¹²⁸. В оптически прозрачном полимерном носителе, содержащем о-нитробензальдегидные группы (XIV), должна идти фотохимическая реакция (15) с образованием карбоксильных групп.



(XIV)

Оставшиеся альдегидные группы (в неосвещенных участках) необходимо заблокировать каким-либо амином, а затем имеющиеся (в освещенных местах) карбоксильные группы активировать, например, карбодиимидом, и пришить к ним фермент (по методикам ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹).

Фотохимическое присоединение к носителю функциональных групп, способных к взаимодействию с ферментами. Фотохимическую иммобилизацию ферментов с использованием реагента Ноулса (XII) можно проводить двояко (см. обсуждение этого вопроса Гуайром в ¹¹¹): либо присоединив (XII) к носителю с помощью реакции нуклеофильного замещения в ароматическом ядре (см. выше), либо освещая смесь (XII) с носителем, не содержащим нуклеофильных групп. В последнем случае в местах освещения образовавшийся реакционноспособный нитреновый радикал ковалентно присоединится к носителю с образованием соединения (XV):



(XV)

Если затем добавить раствор фермента, то аминогруппы белка будут вступать в реакцию с нитрофторфенильным остатком (нуклеофильное замещение фтора) в XV, что приведет к ковалентной иммобилизации биокатализатора. Чтобы увеличить скорость последней реакции, вместо реагента Ноулса можно использовать его более реакционноспособные производные ¹¹³, целый ряд которых синтезирован Гуайром ¹¹⁴.

Образование носителя фотохимическим путем. Для фотоиммобилизации ферментов нами был использован процесс фотоге-

леобразования¹¹⁵. Например, классический гель для иммобилизации ферментов — полиакриламидный¹¹⁶ — и другие поликарлатные гели могут быть получены при освещении растворов соответствующих мономеров видимым светом в присутствии красителя рибофлавина¹¹⁷ или УФ-светом¹¹⁸. Таким образом, если нанести на пластинку тонкий слой раствора мономеров и осветить его, то в местах освещения образуется удерживающийся на пластинке гель, а в неосвещенных местах раствор мономера легко смоется водой. Фермент удерживается в носителе механически (если добавить его заранее к полимеризационной смеси)¹¹⁸ или же его можно после полимеризации «пришить» химически к уже образовавшемуся гелю¹¹⁵.

Важная особенность предложенного нами¹¹⁵ метода заключается в том, что инициируемые светом радикальные процессы полимеризации характеризуются (в силу цепного механизма) высокими квантовыми выходами, значительно превосходящими единицу. Это означает, что один квант света способен в принципе обеспечить иммобилизацию более чем одной молекулы фермента. Тем самым открываются дополнительные возможности (помимо сопряженной ферментативной реакции; см. уравнение (2)) для усиления светового сигнала.

IV. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ В ПРИКЛАДНЫХ ЦЕЛЯХ И В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Анализ литературных данных в сочетании с предложенными нами новыми подходами показывает, что действительно можно искусственным путем (по механизмам (1а) или (1б)) «зародить» каталитическую активность в ферментативной системе. В заключение отметим следующие три общих момента.

1) Нет сомнений, что в ближайшем будущем будут созданы на основе искусственных светочувствительных ферментативных систем весьма эффективные усилители слабых световых сигналов, в том числе, новые бессеребряные фотографические процессы, см. обзор^{60, 129, 130}. Успех будущих исследований зависит от следующих двух характеристик используемой ферментативной системы: коэффициент усиления и спектральная чувствительность.

а) Как было отмечено выше (см. обсуждение уравнения (3)), эффективный квантовый выход светочувствительных ферментативных систем весьма высок. Более того, существуют, по крайней мере, два пути для его дополнительного повышения.

Первый путь: в качестве первой из темновых реакций (2) используют активацию соответствующего зимогена. (Зимогены — это каталитически неактивные природные предшественники ферментов, способные к ферментативной активации.) Например, трипсиноген не обладает ферментативной активностью, но превращается в активный фермент под действием трипсина¹¹⁹. Этот процесс является автокатализическим: в принципе даже одна молекула трипсина может вызвать активацию всего имеющегося «запаса» зимогена. Следовательно, трипсиноген весьма чувствителен даже к очень малым концентрациям трипсина. Отсюда, естественно, возникает идея создать следующую светочувствительную ферментативную систему: каталитически неактивное, но активируемое светом, производное трипсина + трипсиноген + субстрат трипсина. При освещении такой системы из неактивного производного трипсина образуется активный фермент, который будет активировать зимоген, а продукт

активационного процесса будет гидролизовать субстрат. Видно, что в таком случае образованный под действием света трипсин за счет активации зимогена как бы «размножается». Это приводит к переходу от линейной зависимости эффективного квантового выхода от времени темновой реакции (уравнение (3)) к экспоненциальной¹²⁰, что обеспечивает повышенные коэффициенты усиления первичного светового сигнала; см. также^{57, 58, 103} и обзор⁶⁰.

Второй путь: фотохимический процесс создания носителя обеспечивает возможность иммобилизовать с помощью одного кванта света более, чем одну молекулу фермента¹¹⁵, см. раздел III.5.

б) Что касается второй важной характеристики светочувствительной ферментативной системы, а именно спектральной чувствительности, то ее можно менять, варьируя молекулярную структуру светочувствительных низкомолекулярных компонентов, т. е. субстрата (см., например,^{10, 56}), или эфектора ферментативной реакции, или, наконец, модификатора фермента.

Новые возможности открывает использование сенсибилизованных фотохимических реакций, поскольку в этом случае достаточно варьировать молекулярную структуру (и тем самым спектральную чувствительность) сенсибилизатора. Пока не удалось найти сенсибилизатор фотохимических превращений, идущих непосредственно в активном центре фермента¹²¹; это связано, по-видимому, с весьма сложной организацией активного центра, т. е. с различного рода стерическими затруднениями. Поэтому особенно перспективным представляется фотополимеризационный процесс, в результате которого образуется носитель для последующей иммобилизации ферментов¹¹⁵. Важно, что фотополимеризационные процессы не накладывают слишком больших ограничений на структуру молекулы сенсибилизатора¹²².

2) Рассмотренные в настоящем обзоре подходы к регулированию под действием света скоростей ферментативных реакций должны найти применение также и в фундаментальных исследованиях в энзимологии. Особенно широкие перспективы открывают фотохимические подходы, если использовать их для изучения кинетики и механизма реакций, протекающих в замороженном или кристаллическом состояниях (где, в частности, диффузионные затруднения¹²³ мешают ввести в систему нужные эфекторы или субстрат достаточно быстро другим путем).

Укажем на два примера. Так, флеш-индукцируемое изменение реакционной способности субстрата (или эфектора) можно положить в основу метода изучения кинетики быстрых стадий ферментативного процесса^{40, 124}; особого внимания в этой связи заслуживает использование флеш-индукцируемого pH-скачка, см. раздел III.4.

Другой пример — использование реакции (11) для изучения механизма ферментативного катализа. Из рис. 2 видно, что фотостереоизомеризация субстратного остатка в активном центре ацилфермента проходит практически мгновенно (быстрое возрастание оптической плотности раствора), однако последующая химическая стадия, а именно гидролиз ацилфермента (медленное возрастание оптической плотности), идет с заметным периодом индукции. Возможно, что наблюдаемый период индукции обусловлен конформационно-сольватационными перестройками в активном центре, обеспечивающими комплементарность катализатора по отношению к возникшему под действием света (в результате фотостереоизомеризации) специальному субстрату. Такое объяснение соответствует представлениям^{125—127} о важных для катализа конформационных (сольватационных) изменениях в активном центре, индуцируемых субстратом.

3) Многие рассмотренные в обзоре ферментативные системы — это весьма реалистичные модели более сложных светочувствительных систем, функционирующих *in vivo*. Поэтому анализ простых моделей может помочь более глубоко понять принципы, которые для регулирования биологической активности использует Природа¹⁴.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Роуз, Зрение человека и электронное зрение, «Мир», М., 1977.
2. К. С. Ляликов, Теория фотографических процессов, М., 1960.
3. К. Миз, Т. Джеймс, Теория фотографического процесса, Л., 1973.
4. Н. Н. Семенов, Цепные реакции, ОНТИ, Госхимтехиздат, Л., 1934.
5. Non-Silver Photographic Processes, ed. R. J. Cox, Acad. Press, London — N. Y.—San-Francisco, 1975.
6. И. В. Березин, К. Мартинек, Основы физической химии ферментативного катализа, «Высшая школа», М., 1977.
7. Р. Ламри, Р. Билтонен, в кн. Структура и стабильность биологических макромолекул, ред. С. Н. Тимашефф, Г. Д. Фасман, «Мир», М., 1973, стр. 7—173.
8. И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, ДАН СССР, 193, 932 (1970).
9. K. Martinek, S. D. Varfolomeyev, I. V. Berezin, Europ. J. Biochem., 19, 242 (1971).
10. S. D. Varfolomeyev, A. M. Klibanov, K. Martinek, I. V. Berezin, FEBS Letters, 15, 118 (1971).
11. G. Wald, Nature, 219, 800 (1968).
12. M. A. Ostrovska, in Ion-Transport Across Membranes, ed. D. C. Tosteson, Yu. A. Ovchinnikov, Raven Press, N. Y., 1977.
13. H. Kaufman, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, Science, 162, 1487 (1968).
14. B. F. Erlanger, Ann. Rev. Biochem., 45, 267 (1976).
15. А. Н. Теренин, Фотоника молекул красителей, «Наука», Л., 1967.
16. Дж. Калверт, Дж. Питтс, Фотохимия, «Мир», М., 1968.
17. I. V. Berezin, A. M. Klibanov, V. S. Goldmacher, G. P. Samokhin, K. Martinek, in Methods in Enzymology, 44 (Immobilized Enzymes, ed. K. Mosbach, Acad. Press, N. Y.—San-Francisco—London, 1976, ch. 39, 40).
18. I. V. Berezin, A. M. Klibanov, V. S. Goldmacher, G. P. Samokhin, K. Martinek, in Biomedical Applications of Immobilized Enzymes, ed. T. Chang, Plenum Press, N. Y., 1977.
19. B. F. Erlanger, W. Cohen, J. Am. Chem. Soc., 85, 348 (1963).
20. B. F. Erlanger, H. Castleman, A. G. Cooper, Там же, 85, 1872 (1963).
21. B. F. Erlanger, A. G. Cooper, W. Cohen, Biochemistry, 5, 190 (1966).
22. H. P. Metzger, I. B. Wilson, Там же, 3, 926 (1964).
23. J. Bieth, S. M. Vratsanos, N. Wassermann, B. F. Erlanger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 1103 (1969).
24. J. Bieth, S. M. Vratsanos, N. Wassermann, A. G. Coopers, B. E. Erlanger, Biochemistry, 12, 3023 (1973).
25. J. Bieth, N. Wassermann, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66, 850 (1970).
26. K. T. Galley, M. de Sorgo, W. Prins, Biochem. Biophys. Res. Communs, 50, 300 (1973).
27. A. N. Glazer, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 171 (1965).
28. S. A. Bernhard, B. F. Lee, Z. H. Tasjian, J. Mol. Biol., 18, 405 (1966).
29. F. Millich, G. Oster, J. Am. Chem. Soc., 81, 1357 (1959).
30. I. V. Berezin, S. D. Varfolomeyev, A. M. Klibanov, K. Martinek, FEBS Letters, 39, 329 (1974).
31. E. Schoffeniels, D. Nachmansohn, Biochim. Biophys. Acta, 26, 1 (1957).
32. E. Schoffeniels, Там же, 26, 585 (1957).
33. H. B. Higman, T. R. Rodleski, E. Bartels, Там же, 79, 138 (1964).
34. W. J. Deal, B. F. Erlanger, D. Nachmansohn, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 1230 (1969).
35. E. Bartels, N. Wassermann, B. F. Erlanger, Там же, 68, 1820 (1971).
36. И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, А. П. Савицкий, Н. Н. Угарова, ДАН СССР, 222, 380 (1975).
37. C. A. Parker, Proc. Roy. Soc., A220, 104 (1953).
38. C. G. Hatchard, C. A. Parker, Там же, A235, 518 (1956).
39. L. Cunningham, Comprehensive Biochem., 16, 85 (1965).
40. I. V. Berezin, S. D. Varfolomeyev, K. Martinek, FEBS Letters, 8, 173 (1970).
41. К. Мартинек, С. Д. Варфоломеев, М. Н. Преображенская, Л. А. Савельева, И. В. Березин, Биохимия, 37, 614 (1972).
42. M. Bergmann, J. S. Fruton, H. Pollock, J. Biol. Chem., 127, 643 (1939).

43. K. Hofmann, M. Bergmann, Там же, 130, 81 (1939).
44. B. F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, Arch. Biochem. Biophys., 95, 271 (1961).
45. M. A. Wainberg, B. F. Erlanger, Biochemistry, 10, 3816 (1971).
46. С. Д. Варфоломеев, Канд. дисс., МГУ, М., 1971.
47. А. П. Бресткин, Ю. Г. Жуковский, С. К. Курашкина, В. А. Самокиши, Б. Х. Стрелец, Г. М. Трахнова, ДАН СССР, 232, 1438 (1977).
48. P. W. Taylor, R. W. King, A. S. V. Burgen, Biochemistry, 9, 2638 (1970).
49. P. J. Maguire, N. Hijazi, K. Laidler, Biochim. Biophys. Acta, 341, 1 (1974).
50. Э. А. Бурштейн, Люминесценция белковых хромофоров, сер. Биофизика, т. 6, Изд. ВИНТИ, М., 1976, гл. 5.
51. S. Comorosan, Enzymologia, 35, 117 (1968).
52. S. Comorosan, S. Vieru, D. Sandru, Int. J. Radiat. Biol., 17, 105 (1970).
53. S. Comorosan, Nature, 227, 64 (1970).
54. S. Comorosan, D. Sandru, A. Alexandrescu, Enzymologia, 38, 21 (1970).
55. G. B. Schonbaum, B. Zerner, M. L. Bender, J. Biol. Chem., 236, 2930 (1961).
56. С. Д. Варфоломеев, А. М. Клибанов, К. Мартинек, И. В. Березин, ДАН СССР, 203, 616 (1972).
57. Р. Б. Айсина, Т. Е. Васильева, Н. Ф. Казанская, А. С. Тиходеева, И. В. Березин, Биохимия, 38, 601 (1973).
58. И. В. Березин, Р. Б. Айсина, Г. Е. Бронников, Н. Ф. Казанская, Биоорг. химия, 1, 402 (1975).
59. И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, Успехи химии, 43, 835 (1974).
60. Н. Ф. Казанская, в кн. Иммобилизованные ферменты, ред. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек, т. 2. Изд. МГУ, М., 1976.
61. A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, J. Biol. Chem., 237, PC 3006 (1962).
62. R. J. Vanghan, F. H. Westheimer, J. Am. Chem. Soc., 91, 217 (1969).
63. T. Spencer, J. M. Sturtevant, Там же, 81, 1874 (1959).
64. Ю. М. Торчинский, Сульфидрильные и дисульфидные группы белков, «Наука», М., 1971, гл. 6.
65. I. B. Klein, J. F. Kirsch, Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 575 (1969).
66. I. B. Klein, J. F. Kirsch, J. Biol. Chem., 244, 5928 (1969).
67. J. F. Eager, W. E. Savige, Photochem. Photobiol., 2, 25 (1963).
68. S. Risi, K. Dose, T. Rathinasamy, L. Augenstein, Там же, 6, 423 (1967).
69. R. S. Asquith, L. Hirst, Biochim. Biophys. Acta, 184, 345 (1969).
70. K. Dose, S. Disi, Photochem. Photobiol., 15, 43 (1972).
71. Н. Ф. Казанская, И. Никольская, Вестник МГУ, сер. хим., 16, 49 (1975).
72. G. Smets, Pure Appl. Chem., 30, 1 (1972).
73. В. Д. Ермакова, В. Д. Арсенов, М. И. Черкашин, П. П. Кислица, Успехи химии, 46, 292 (1977).
74. R. Lovrien, J. C. B. Waddington, J. Am. Chem. Soc., 86, 2315 (1964).
75. R. Lovrien, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 236 (1967).
76. R. Lovrien, J. Am. Chem. Soc., 96, 244 (1974).
77. G. van der Veen, W. Prins, Nature, 230, 70 (1971).
78. G. van der Veen, W. Prins, Photochem. Photobiol., 19, 191 (1974).
79. G. van der Veen, W. Prins, Там же, 19, 197 (1974).
80. K. Namba, S. Suzuki, Chem. Letters, 9, 947 (1975).
81. E. Inoue, H. Kokado, I. Shimizu, H. Kobayashi, Bull. Chem. Soc. Japan., 45, 1951 (1972).
82. М. А. Коломийченко, Укр. биохим. ж., 28, 164 (1956).
83. М. А. Коломийченко, Там же, 29, 361 (1957).
84. И. Д. Волотовский, Л. Г. Воскресенская, С. В. Конев, Биофизика, 17, 971 (1972).
85. G. Montagnoli, Acta Vitamin. Enzymol. (Milano), 28, 268 (1974).
86. G. Montagnoli, S. Monti, L. Nannicini, R. Felicioli, Photochem. Photobiol., 23, 29 (1976).
87. H. Fröhlich, Int. J. Quant. Chem., 2, 641 (1968).
88. H. Fröhlich, Nature, 228, 1093 (1970).
89. N. Kollias, W. R. Melander, Phys. Letters, 57A, 102 (1976).
90. A. Downes, T. P. Blunt, Proc. Roy. Soc., 26, 199 (1879).
91. A. D. McLaren, Adv. Enzymol., 9, 75 (1949).
92. L. Augenstein, Там же, 24, 359 (1962).
93. Р. Сетлоу, Э. Поллард, Молекулярная биофизика, «Мир», М., 1964.
94. A. D. McLaren, D. Shugar, Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids, Oxford, 1964.
95. Ю. А. Владимиров, Фотохимия и люминесценция белков, «Наука», М., 1965.
96. A. D. McLaren, Enzymologia, 37, 18 (1969).
97. С. В. Конев, И. Д. Волотовский, Введение в молекулярную фотобиологию, «Наука и техника», Минск, 1971.
98. G. H. Schmid, Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., 351, 575 (1970).
99. J. D. Spikes, in Photophysiology, ed. A. G. Giese, v. 3, Acad. Press, N. Y., 1968, p. 33.

100. С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, И. В. Березин, Сборник трудов Межфакультетской лаборатории биоорганической химии МГУ, М., 1970, стр. 289.
101. A. W. Adamson, A. H. Sporer, J. Am. Chem. Soc., 80, 3865 (1958).
102. Ф. Басоло, Р. Присон, Механизмы неорганических реакций, «Мир», М., 1971, гл. 8.
103. И. В. Березин, Н. Ф. Казанская, Р. Б. Айсина, ДАН СССР, 207, 1383 (1972).
104. D. Balasubramania, S. Subramani, C. Kumar, Nature, 254, 252 (1975).
105. I. Karube, Y. Nakamoto, S. Suzuki, Biochim. Biophys. Acta, 429, 975 (1976).
106. Y. Nakamoto, I. Karube, S. Terawaki, S. Suzuki, J. Solid-Phase Biochem., 1, 143 (1976).
107. O. R. Zaborsky, Immobilized Enzymes, Chem. Rubber, Co. Press, Cleveland, Ohio, 1973.
108. Methods in Enzymology, ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, v. 44, (Immobilized Enzymes, ed. K. Mosbach), Section II, Acad. Press, N. Y.—San-Franciso—London, 1976.
109. Иммобилизованные ферменты, ред. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек, т. 1, Изд. МГУ, М., 1976.
110. M. Yagub, P. Guire, J. Biomed. Mater. Res., 8, 291 (1974).
111. P. Guire, см. ¹⁰⁸, p. 280.
112. G. W. J. Fleet, R. R. Porter, J. R. Knowles, Nature, 224, 511 (1969).
113. D. F. Wilson, Y. Miyata, M. Erecinska, J. M. Vanderkooi, Arch. Biochem. Biophys., 171, 104 (1975).
114. P. Guire, in Enzyme Engineering, eds. E. K. Pye, H. H. Weetall, v. 3. Plenum Press, N. Y., 1978.
115. Г. П. Самохин, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Вестник МГУ, сер. хим., 1978, 000.
116. P. Bernfeld, J. Wan, Science, 142, 678 (1963).
117. Г. Маичер, Диск-электрофорез, «Мир», М., 1971, гл. 1.
118. S. Fukui, A. Tanaka, FEBS Letters, 66, 179 (1976).
119. Д. Нортроп, М. Кунити, Р. Херштотт, Кристаллические ферменты, ИЛ, М., 1950.
120. И. В. Березин, Р. Б. Айсина, С. Д. Варфоломеев, Н. Ф. Казанская, ДАН СССР, 219, 1255 (1975).
121. К. Мартинек, Докт. дисс., МГУ, М., 1973.
122. G. Odian, Principles of Polymerization, McGraw-Hill, N. Y., 1970, ch. 3.
123. И. В. Березин, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Успехи химии, 44, 17 (1975).
124. I. V. Berezin, K. Martinek, Abstracts of International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Riga, June 1970; FEBS Letters, 10, 209 (1970).
125. D. E. Koshland, Adv. Enzymol., 22, 45 (1960).
126. D. E. Koshland, K. E. Neet, Ann. Rev. Biochem., 37, 359 (1968).
127. N. Citri, Adv. Enzymol., 37, 397 (1973).
128. K. Martinek, I. V. Berezin, Photochem. Photobiol., 29, 637 (1979).
129. И. И. Никольская, В. П. Петрова, М. С. Хлудова, Р. А. Мхитаров, М. М. Орешин, Н. Ф. Казанская, в кн. Успехи биоорганического катализа, ред. И. В. Березин, К. Мартинек, Изд-во МГУ, М., 1979.
130. I. V. Berezin, N. F. Kazanskaya, K. Martinek, in Future Directions of Enzyme Engineering, eds. L. B. Wingard, I. V. Berezin, Plenum Press, New York, 1979.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, химический факультет