МОДУЛЬ 3

КИНЕТИКА МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

История развития ферментативной кинетики.

Впервые упоминание о ферментах встречается в работе Пейена и Персоца (1830), которые наблюдали расщепление крахмала под действием вещества, выделенного из картофеля, названного ими диастазой. В 1835 году Берцелиус впервые предположил, что реакции живого организма осуществляются благодаря новой силе, которую он назвал `каталитической`. Берцелиус сформулировал принцип катализа, включив в число каталитических агентов и диастазу, которая гидролизовала крахмал быстрее, чем серная кислота. Сначала все ферменты называли диастазами. В 1878 году Куне назвал вещество, обладающее каталитической силой в живом огранизме, ферментом, тем самым отражая связь с процессами ферментации.

Предварительные эксперименты по изучению кинетики ферментативных реакций показали, что скорость реакции E + S ---> E + P, вопреки теоретическим ожиданиям, не зависит от концентрации фермента и субстрата так, как в случае обычной реакции второго порядка. Самая ранняя попытка математически описать ферментативные реакции была предпринята Дюкло в 1898 г. Браун (1902) и независимо от него Анри (1903) впервые выдвинули гипотезу об образовании в ходе реакции фермент-субстратного комплекса. Это предположение основывалось на трех экспериментальных фактах:

1. папаин образовывал нерастворимое соединение с фибрином (Вюртц, 1880);
2. субстрат инвертазы - сахароза могла защищать фермент от тепловой денатурации (О`Салливан и Томпсон, 1890);
3. было показано, что ферменты являются стереохимически специфическими катализаторами (Фишер, 1898-1899).

В 1913 году Михаэлис и Ментен опубликовали свою теорию общего механизма ферментативных реакций. Их уравнение стало фундаментальным принципом всех кинетических исследований ферментов вот уже почти целый век.

Уравнение Михаэлиса-Ментен.

Михаэлис и Ментен предположили, что механизм ферментативных реакций описывается моделью:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \quad (2.1)$$

в которой скорость реакции определяется распадом фермент-субстратного комплекса

$v_0 = k_2(ES)$ (2.2)

Модель предполагает, что равновесие между свободными ферментом, субстратом и фермент-субстратным комплексом устанавливается быстро по сравнению со скоростью реакции (быстро устанавливающееся равновесие, $k_2 << k_1$, k_{-1}). В этом случае вторая стадия реакции практически не влияет на первую, и для выражения концентрации фермента можно воспользоваться константой диссоциации.

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \Rightarrow [E] = \frac{K_S[ES]}{[S]} \quad (2.3)$$

Общая концентрация фермента в реакционной смеси выражается уравнением материального баланса

$[E]_0 = [E] + [ES] = [ES](K_S/[S] + 1)$(2.4)

Тогда концентрация фермент-субстратного комплекса равна:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_S + [S]} \quad (2.5)$$

Это уравнение соответствует изотерме адсорбции Ленгмюра, показывая, что фермент действует как гетерогенный катализатор. Реакция достигает максимальной скорости, когда весь фермент находится в комплексе с субстратом

$$V_{max} = k_2[ES]_{max} = k_2[E]_0 \quad (2.6)$$

Это условие выполняется, если реакция протекает при избыточной концентрации субстрата: $[S]_0 >> [E]_0$. Из уравнений (2.2), (2.5) и (2.6) получим:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S]} \quad (2.7)$$

Это и есть классическое уравнение Михаэлиса-Ментен, которым и сегодня пользуются для описания кинетики ферментативных процессов.

Ограничения кинетики Михаэлиса-Ментен

Михаэлис и Ментен вывели уравнение с учетом двух предположений (быстро устанавливающееся равновесие и избыток субстрата). Позднее было показано, что уравнение справедливо, то есть хорошо описывает реакцию, при выполнении всех следующих условий.

7 основных постулатов для выполнения уравнения Михаэлиса-Ментен.

1. В ходе реакции образуется кинетически устойчивый фермент-субстратный комплекс.
2. Определяемая с помощью уравнения константа Ks является константой диссоциации фермент-субстратного комплекса: это справедливо, только если $k_2 << k_1, k_{-1}$.
3. Концентрация субстрата не меняется в ходе реакции, то есть $[S] = [S]_0$.
4. Продукт реакции быстро отщепляется от фермента, то есть реакция двухстадийная.
5. Вторая стадия реакции необратима. Так как это практически не выполнимо, мы принимаем во внимание только начальные скорости.
6. С каждым активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата.
7. Для всех реагирующих веществ вместо активностей можно использовать их концентрации.

В течение нескольких дальнейших лекций мы проанализируем все ограничения одно за другим и рассмотрим возможность использования уравнения Михаэлиса-Ментен в случаях, когда некоторые из этих ограничений не выполнены.

Образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса.

К настоящему времени имеются сотни экспериментально проверенных примеров, демонстрирующих образование кинетически устойчивых фермент-субстратных комплексов в ходе ферментативных реакций. Хотя выдвигались также теории, не включающие образование в реакции фермент-субстратного комплекса. Одна из них предполагает, что фермент увеличивает энергию молекулы субстрата с помощью каких-либо телекинетических взаимодействий (электростатическое притяжение или отталкивание, электромагнитное излучение и т. д.). Если молекула субстрата достигает энергии выше определенного уровня, она может вступать в реакцию или разрушаться с

образованием продуктов. Скорость реакции пропорциональна количеству таких высокоэнергетических молекул. Считается, что фермент передает энергию субстрату при упругих, а с точки зрения других авторов, при неупругих столкновениях. Эти телекинетические теории с научной точки зрения были убедительно опровергнуты многими исследователями. Несмотря на то, что были составлены кинетические уравнения для реакций, когда фермент отделен от субстрата растворителем (т. е. может происходить телекинез), такие теории построения до сих пор не нашли экспериментального подтверждения. Это означает, что образование устойчивого фермент-субстратного комплекса обязательно происходит во всех известных ферментативных реакциях. Поэтому первое условие, определяющее справедливость кинетики Михаэлиса-Ментен, можно считать обязательным для всех известных случаев. Механизмы образования фермент-субстратных комплексов будут рассмотрены нами в курсе `Энзимология`.

Природа константы К в уравнении Михаэлиса-Ментен

Второй постулат формулирует, что константа Ks в уравнении (2.7) является константой диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Бриггс и Холдейн в 1925 г. доказали, что исходное уравнение Михаэлиса-Ментен справедливо только при $k_2 << k_{-1}$, т. е. когда равновесие элементарной стадии E + S <=> ES устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью следующей стадии. Поэтому такие кинетические механизмы (подчиняющиеся начальному условию Михаэлиса-Ментен и имеющие одну медленную элементарную стадию, относительно которой равновесия во всех других элементарных стадиях устанавливаются быстро) называются удовлетворяющими предположению о "быстром равновесии". Если, однако, k_2 по порядку величины сравнима с k_{-1}, изменение концентрации фермент-субстратного комплекса во времени можно выразить следующим дифференциальным уравнением:

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (2.8)$$

Так как мы рассматриваем начальную скорость реакции, т. е. момент, когда обратная реакция еще не происходит, а предстационарная стадия уже прошла, то вследствие избытка субстрата количество образовавшегося фермент-субстратного комплекса равно количеству распавшегося (принцип стационарности, или кинетика Бриггса и Холдейна)

$$d[ES]/dt = 0 \quad (2.9)$$

С учетом этого из уравнения (2.8), выразим концентрацию свободного фермента через (ES):

$$[E] = (k_{-1} + k_2)[ES]/k_1[S] \quad (2.10)$$

Из уравнения материального баланса получим:

$$[E]_0 = [E] + [ES] = \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1[S]} + 1\right)[ES] = \left(\frac{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}{k_1[S]}\right)[ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} = \frac{[S][E]_0}{K_M + [S]} \quad (2.11)$$

где $K_M=(k_{-1}+ k_2)/ k_1$ - константа Михаэлиса. Подставив уравнение (2.11) в (2.2), с учетом (2.6) получим:

: $$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$ tab] (2.12)

Уравнение (2.12) аналогично уравнению (2.7), но оно расширяет область применимости исходного уравнения Михаэлиса-Ментен. Иными словами, если в какой-то реакции выполняется условие быстро устанавливающегося равновесия, то константа К, которая будет найдена при исследовании зависимости v (S), является константой

диссоциации фермент-субстратного комплекса. При выполнении условия стационарности (2.9), найденная тем же способом константа будет являться константой Михаэлиса. В некоторых реакциях наблюдается $k_{-1} << k_2$. В этом случае константа Михаэлиса равняется k_2/k_1 и называется, согласно Ван Слайку, кинетической константой Кк.

Природа компонентов реакции не определяет целиком смысла константы К в уравнении. При изменении условий реакции значение К также может изменяться. Так, например, в случае пероксидазы при высокой концентрации донора протонов эта константа является кинетической константой Кк. При уменьшении концентрации донора протонов константа превращается в константу Михаэлиса Км, а при очень низких уровнях донора протонов получаем константу диссоциации Ks.