МОДУЛЬ 4

ОГРАНИЧЕНИЯ КИНЕТИКИ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

Существование обратной реакции.

Пятое ограничение кинетики Михаэлиса-Ментен заключается в необратимости ферментативных реакций. В этом пункте мы снимем это ограничение, показав, что проблема принципиально не меняется.

Если обратная реакция между ферментом и продуктом возможна, то в общем виде схема Михаэлиса-Ментен принимает следующий вид:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} E + P \qquad (5.1)$$

По обычной методике, с использованием предположения о стационарности и уравнения материального баланса, получим зависимость скорости реакции от концентрации субстрата и продукта:

$$v = \frac{(k_1 k_2 [S] - k_{-1} k_{-2} [P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S] + k_{-2} [P]} \qquad (5.2)$$

В отсутствие продукта ([P]=0) уравнение (5.2) принимает вид обычного уравнения Михаэлиса-Ментен. Аналогично, если концентрация субстрата падает до нуля ([S]=0), вновь получается уравнение Михаэлиса-Ментен, но на этот раз относительно продукта реакции. В этих уравнениях максимальная скорость и константа Михаэлиса имеют свой обычный смысл. Эти предельные случаи очень важны. Во-первых, если ферментативная реакция действительно обратима, то обратная реакция также является каталитической, и если в начале реакции в системе находятся фермент и продукт, для обратной реакции максимальная *скорость и константа Михаэлиса определяются также просто, как если бы измерялась скорость прямой реакции.* Во-вторых, осложнения, обусловленные наличием обратной реакции, как правило, можно обойти, просто ограничивая измерения экспериментами, в которых концентрация продукта близка к нулевой.

Анализ уравнения (5.2) свидетельствует, что скорость обратимой ферментативной реакции уменьшается по двум причинам. Во-первых, *некоторое количество продукта всегда удаляется в результате обратной реакции* (слагаемое $-k_{-1}k_{-2}[P]$ в числителе). Во-вторых, *увеличивается доля фермента, связанного в комплексе EP*, следовательно, этот связанный фермент не может теперь взаимодействовать с субстратом (слагаемое $k_{-2}[P]$ в знаменателе).

Обратимая ферментативная реакция, описываемая уравнением (5.2), следовательно, служит примером простой *биологической регуляции на молекулярном уровне*: продукт образуется быстро, только если его мало, и он образуется медленнее, если концентрация продукта велика.

Связывание нескольких молекул субстрата с активным центром фермента

Первоначальная форма уравнения Михаэлиса-Ментен справедлива только в том случае, если с каждым активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата. Если это условие не выполнено, следует рассмотреть несколько возможных вариантов.

2.1. Молекулы субстрата не влияют на связывание друг друга

Связывание всех молекул субстрата с ферментом происходит одинаково эффективно, и связывание одной молекулы не влияет на связывание другой. Здесь можно выделить еще два варианта.

А) Одновременное связывание (уравнение Хилла)

$$nS + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\Longleftrightarrow}} ES_n \xrightarrow{k_2} E + nP \qquad (5.3)$$

Субстраты одновременно связываются с активным центром фермента. Тогда и скорость реакции подчиняется так называемому уравнению Хилла

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]^n}{K_M + [S]^n} \qquad (5.4)$$

При скорости, равной половине максимальной, $K_m = [S]^n$. Если построить зависимость 1/v от 1/[S], мы не получим прямой линии как в случае уравнения Михаэлиса-Ментен. До сих пор экспериментально не обнаружено ферментативной реакции с n>2. Если n=2, то построив график в координатах (1/v; $1/[S]^2$) , получим прямую. Если n не целое число, а дробное, это означает либо то, что молекулы субстрата одновременно не связываются с молекулой фермента, либо то, что связывание одной молекулы субстрата влияет на эффективность связывания другой.

Чтобы получить значение n, уравнение 4 обычно преобразуют к виду:

$$\lg \frac{v_0}{V_{max} - v_0} = n \lg[S] - \lg K_M \qquad (5.5)$$

Построив зависимость $\lg[v_0/(V_{max}-v_0)]$ от lg[S], получают прямую линию с наклоном, равным n. Размерность константы K_m есть M^n, т. к. k_1 - константа скорости реакции (n+1)-го порядка.

Б) Последовательное связывание

Молекулы субстрата последовательно связываются с активным центром. В этом случае кинетика реакции такая же, как в случае двухсубстратной реакции, т. к. характер кинетических уравнений не зависит от того, одинаковы ли два последовательно связывающихся субстрата или нет. Рассмотрим следующий механизм:

$$E + S \overset{K_S}{\Leftrightarrow} ES \overset{K_S'}{\Leftrightarrow} ES_2 \xrightarrow{k_3} E + 2P \qquad (5.6)$$

где $K_S = [E][S]/[ES]$, $K_S` = [ES][S]/[ES_2]$, $v_0 = k_3[ES_2]$. Решая обычным способом, получаем

$$v_0 = \frac{V[S]^2}{K_S K_S' + K_S'[S] + [S]^2} \qquad (5.7)$$

Так как молекулы субстрата не влияют на связывание друг друга с ферментом, то $K_S = K_S`$ и уравнение (5.7) упрощается:

$$v_0 = \frac{V[S]^2}{K_S^2 + K_S[S] + [S]^2} \qquad (5.8)$$

2. 2. Связывание одной молекулы субстрата влияет на связывание другой.

Возможен вариант, когда молекулы субстрата взаимно влияют на связывание их с ферментом ($K_S <> K_S$`). Тогда снова возникают два случая:

А) Кажущееся ингибирование избытком субстрата.

Б) Кажущаяся активация избытком субстрата. Связывание первой молекулы субстрата улучшает связывание второй. В этом случае наблюдается активация избытком субстрата (лекция 7).

2.3 Аллостерическое взаимодействие.

С активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата, но эффективность связывания субстрата на одном активном центре зависит от связывания субстрата на другом активном центре фермента. При наличии нескольких активных центров число n в уравнении Хилла (5.5) является дробным (оно называется коэффициентом Хилла n_H); при наличии взаимодействия между активными центрами $n_H <> n$, т. е. коэффициент Хилла отличается от стехиометрического). Это характерно для ферментов, построенных из субъединиц (подробнее см в разд 3.8.3). Определение констант в случае активации или ингибирования реакций субстратом - на практике.

Использование концентраций реагирующих веществ вместо их активностей.

В уравнении Михаэлиса-Ментен, как и в большинстве других кинетических исследований, правильнее было бы использовать активности реагирующих веществ, а не их концентрации. Но точное их определение представляет определенные трудности, кроме того, ошибка при использовании концентраций вместо активностей обычно незначительна. Коэффициентом активности γ называют коэффициент, на который надо умножить концентрацию, чтобы получить *активность или термодинамическую концентрацию*, которая должна применяться в уравнении скорости или равновесия. Активность эквивалентна концентрации лишь в идеальных условиях или в очень разбавленных растворах. Растворы, в которых изучают ферментативные реакции, так же как внутриклеточная среда, не являются идеальными. Коэффициент активности ионов снижается с увеличением заряда иона и с повышением ионной силы раствора. Ионная сила среды, в которой протекает ферментативная реакция, может изменяться в ходе реакции, а точная ионная сила внутриклеточной среды неизвестна. Для растворов с известными концентрациями ионов ионная сила может быть рассчитана по формуле:

$$\mu = \frac{1}{2}\sum z_i^2 c_i \quad (5.9)$$

где z_i, c_i - заряд и концентрация i-го иона. Например, ионная сила 20 мМ фосфатного буфера при pH 7,4 равна 0,039, а физиологического раствора 0,154. Расчет величины коэффициента активности для ионной силы, соответствующей клеточной протоплазме дает для 1-валентного иона - 0,76, для 2-валентного - 0,31. Эти величины достаточно близки к величинам, определенным экспериментально.

Если равновесие описывается константой

$$K_S' = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (5.10)$$

то *истинная, или термодинамическая* константа равновесия K_s связана с эффективной или классической константой равновесия следующим соотношением:

$$K_S = \frac{a_E a_S}{a_{ES}} = \frac{\gamma_E \gamma_S}{\gamma_{ES}} K_S^{'} \quad (5.11)$$

Для определения величины свободной энергии следует пользоваться субстратной константой K_s. Если величина эффективной константы $K`_s$ существенно отличается от K_s, то величина свободной энергии может быть определена неправильно. Обычно активность ионного участка АЦ ниже его концентрации, и множитель γ может существенно отличаться от 1.