МОДУЛЬ 5

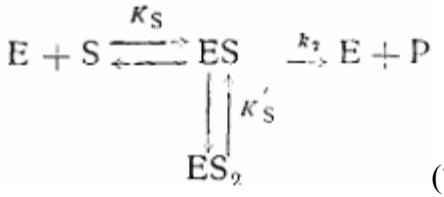
КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХСТАДИЙНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ, НЕ ПОДЧИНЯЮЩИХСЯ УРАВНЕНИЮ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

Ингибирование избытком субстрата

Для многих ферментов наблюдалось, что при добавлении субстрата выше определенной оптимальной концентрации скорость катализируемой реакции далее не увеличивается и не остается постоянной при концентрации выше насыщающей, а понижается, т. е. развивается ингибирование. Это явление было названо ингибированием избытком субстрата. Что касается его механизма, можно предложить пять различных типов ингибирования:

1. Субстрат связывается с ферментом двумя или более группами, и только субстрат, связанный таким образом, может принимать участие в реакции. Если присутствует много молекул субстрата, может возникнуть такая ситуация, что на одном связывающем центре фермента связывается одна молекула субстрата, в то время как на другом участке связывается другая молекула субстрата вместо того, чтобы взаимодействовать с другой группой первой молекулы субстрата. Так как в реакции может принимать участие только молекула, связанная с ферментом двумя точками, молекула фермента, удерживающая две молекулы субстрата, будет неактивна, т. е. будет развиваться ингибирование.
2. При высокой концентрации субстрат может связываться с другим участком, отличающимся от активного центра белка. В этом случае он может "неконкурентно" ингибировать скорость распада субстрата, связанного в активном центре.
3. Фермент требует для проявления активности присутствия необходимого активатора. Если субстрат способен образовывать комплекс с активатором, избыток субстрата удаляет активатор, таким образом уменьшая активность фермента.
4. Для реакции с двумя или несколькими субстратами избыток одного из субстратов способен связываться с участком связывания другого, ингибируя реакцию.
5. Увеличение концентрации субстрата выше определенного предела неспецифически ингибирует реакцию вследствие увеличения ионной силы.

Для многих ферментов зависимость v от $[S]_0$ можно количественно описать, исходя из предположения об образовании тройного комплекса ES_2, не обладающего ферментативной активностью:



(7.1)

Кинетическая обработка схемы (7.1) в режиме установившегося равновесия, при $[S]_0 >> [E]_0$ приводит к уравнению скорости ферментативной реакции:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0 + \frac{[S]_0^2}{K_S^{'}}} \quad (7.2)$$

Анализ уравнения разбивают на две части.

1. При низких концентрациях субстрата ($[S]_0^2 << K_S$`) уравнение (7.2) упрощается до классического уравнения Михаэлиса-Ментен (не наблюдается ингибирование субстратом). Построением графика в координатах Лайнуивера-Берка находим k_2 и K_S.
2. При высоких концентрациях субстрата ($[S]_0 >> K_S$) уравнение (7.2) примет вид

$$v = \frac{k_2[E]_0}{1 + \frac{[S]_0}{K_S^{'}}} \quad (7.3)$$

Уравнение (7.3) можно привести к виду

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_2[E]_0} + \frac{[S]_0}{k_2 K_S^{'}[E]_0} \quad (7.4)$$

и построив зависимость 1/v от $[S]_0$, найти значения k_2 и K_S`. Если в обеих областях найденные значения k_2 совпадают, значит схема (7.1) применима для формального описания кинетики изучаемой ферментативной реакции.

В другой модели тройной комплекс ES_2 обладает активностью, но меньшей по сравнению с фермент-субстратным комплексом ES (β<1).

$$\begin{array}{ccccc} E + S & \underset{}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} & ES & \xrightarrow{k_2} & E + P \\ & & K_S' \downarrow\uparrow & & \\ & & ES_2 & \xrightarrow{\beta k_2} & ES + P \end{array} \quad (7.5)$$

В этом случае скорость ферментативной реакции при установившемся равновесии и [S]0 >> $[E]_0$ будет описываться уравнением

$$v = \frac{\left(k_2 + \frac{\beta k_2[S]_0}{K_S^{'}}\right)[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0 + \frac{[S]_0^2}{K_S^{'}}} \quad (7.6)$$

Обработка схемы (7.5) также разбивается на две области. При низких концентрациях субстрата определяем k_2 и K_S. При высоких концентрациях уравнение (7.6) упрощается до зависимости

$$v = \frac{k_2\left(1+\frac{\beta[S]_0}{K_S^{'}}\right)[E]_0}{1+\frac{[S]_0}{K_S^{'}}} \qquad (7.7)$$

Введя величину $k_{эфф}=v/[E]_0$, запишем

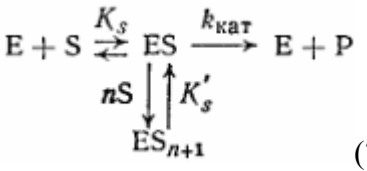
$$k_{эфф} = k_2\frac{\left(1+\frac{\beta[S]_0}{K_S^{'}}\right)}{1+\frac{[S]_0}{K_S^{'}}} \qquad (7.8)$$

Уравнение (7.8) преобразуем к виду

$$\frac{1}{1-\frac{k_{эфф}}{k_2}} = \frac{1}{1-\beta}+\frac{K_S^{'}}{1-\beta}\cdot\frac{1}{[S]_0} \qquad (7.9)$$

Построив график в координатах $(1/(1-k_{эфф}/k_2),\ 1/[S]_0)$ для высоких концентраций субстрата найдем значения β и K_s`.

Существуют виды субстратного ингибирования, когда к фермент-субстратному комплексу присоединяется несколько молекул субстрата, переводя его в неактивное состояние.



(7.10)

Для анализа подобных случаев разработан графический способ, позволяющий определить число молекул субстрата в неактивном фермент-субстратном комплексе. Предположим, что присоединение дополнительных молекул субстрата к фермент-субстратному комплексу происходит независимо друг от друга, и что связывание всех n дополнительных молекул субстрата характеризуется одинаковыми константами равновесия K_S`. Тогда уравнение для начальной скорости ферментативной реакции, протекающей в режиме установившегося равновесия, при $[S]_0 >> [E]_0$ имеет вид:

$$v = \frac{V[S]_0}{K_S+[S]_0+\frac{[S]_0^{n+1}}{K_S^{'}}} \qquad (7.11)$$

где $V = k_2[E]_0$ - теоретическая максимальная скорость, рассчитанная из данных, полученных при использовании низких концентраций субстрата. Для того чтобы найти при какой концентрации субстрата достигается экспериментальная максимальная скорость, продифференцируем уравнение (7.11) по начальной концентрации субстрата и, приравнивая полученное выражение нулю, получим соотношение, связывающее величину оптимальной концентрации субстрата с параметрами схемы:

$$[S]_{opt} = \sqrt[n+1]{\frac{K_S K_S^{'}}{n}} \quad (7.12)$$

Преобразуя уравнение (7.11) получим

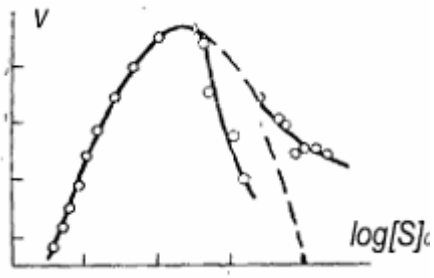
$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V[S]_0} + \frac{1}{V} + \frac{[S]_0^n}{VK_S^{'}}$$

$$\frac{1}{[S]_0} + \frac{[S]_0^n}{K_S K_S^{'}} = \frac{V}{K_S} \cdot \frac{1}{v} - \frac{1}{K_S} \quad (7.13)$$

Обработка экспериментальных данных проводится следующим образом:

3. По графику в координатах (v, $\lg[S]_0$) определяем . $[S]_{opt}$.
4. При различных n по формуле (7.12) находим произведение $K_S K_S$`.
5. Для каждого n строим график в координатах ($1/[S]_0 + [S]_0^n/K_S K_S$`, 1/v). Значение n, при котором график линеен, соответствует зависимости (7.13), и, следовательно, модели (7.10) с найденным значением n.

Мы рассмотрели 3 схемы возможного ингибирования ферментативной активности избытком субстрата. Чтобы выбрать механизм ингибирования, сначала надо построить зависимость экспериментально найденных значений скорости в координатах (v, $\lg[S]_0$). Симметричный вид полученной колоколообразной кривой указывает на отсутствие ферментативной активности комплекса SES (схема 7.1). Если же правая ветвь графика (при больших концентрациях субстрата) более пологая по сравнению с левой ветвью, это говорит о ферментативной активности тройного комплекса ($0<\beta<1$, схема 7.5). Если же субстрат ингибирует ферментативную активность по схеме (7.10), то правая часть графика будет более крутой.



Активация субстратом

В некоторых случаях при увеличении концентрации субстрата скорость ферментативной реакции превышает теоретическую максимальную скорость V, рассчитанную из данных, полученных при использовании небольших концентраций субстрата. Простейшая модель такой активации соответствует схеме (7.5), в которой β>1. Анализ экспериментальных данных проводится аналогично (уравнение 7.9). Единственное отличие заключается в том, что удобнее строить график в координатах ($1/(k_{эфф}/k_2-1)$, $1/[S]_0$) согласно зависимости

$$\frac{1}{\frac{k_{эфф}}{k_2}-1} = \frac{1}{\beta-1} + \frac{K_S'}{\beta-1}\cdot\frac{1}{[S]_0} \qquad (7.14)$$