

МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 577.151.4:577.31

ОБ ИСТИННЫХ И КАЖУЩИХСЯ КОНСТАНТАХ МИХАЭЛИСА В ЭНЗИМОЛОГИИ. II. ВЫПОЛНЯЕТСЯ ЛИ УРАВНЕНИЕ $K_m^{app} = K_s + K_{cat}/k_1$ ДЛЯ ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ АКТИВАТОРОВ?

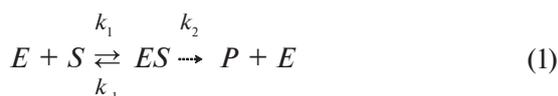
© С. А. КАРАХИМ

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua

Статья посвящена анализу уравнения для кажущейся константы Михаэлиса K_m^{app} энзиматических реакций, протекающих с участием активаторов, выраженного через субстратную константу K_s и константу скорости распада энзим-субстратного комплекса k_{cat} . Показано, что, хотя формально механизмы таких реакций можно записать в виде схемы, аналогичной модели Михаэлиса-Ментен, и получить выражение для кажущейся константы Михаэлиса в виде уравнения $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$, но использовать такой подход для исследования всех реакций с участием активаторов нельзя. Указанное уравнение в общем случае не соблюдается, оно может выполняться только для некоторых механизмов или при определенных соотношениях кинетических параметров энзиматических реакций.

Ключевые слова: кинетика энзиматических реакций, уравнение Михаэлиса-Ментен, константа Михаэлиса, предельная скорость, субстратная константа, активатор.

В предыдущей статье [1] было показано, что для модели, предложенной Михаэлисом и Ментен:



истинная константа Михаэлиса K_m определяется через константы скорости элементарных стадий k_1 , k_{-1} и k_2 [2–4], как это было впервые показано Бриггсом и Холдейном

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (2)$$

Истинная константа Михаэлиса K_m не зависит от концентраций реагирующих веществ (т.е. не изменяется на протяжении реакции) и других соединений, в том числе и тех, которые могут взаимодействовать с реагирующими веществами (например, ингибиторов, активаторов, ионов металлов и водорода) [5], а также от того, протекают ли в данной системе одновременно и другие элементарные реакции [6, 7].

Для более сложных механизмов, подчиняющихся кинетике Михаэлиса-Ментен, за-

висимость начальной скорости от общей концентрации субстрата $[S]_0$ может быть выражена уравнением [8, 9]:

$$v = \frac{V^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (3)$$

в которое входят кажущиеся константа Михаэлиса K_m^{app} и предельная скорость V^{app} ($V^{app} = k_{cat}[E]_0$, где $[E]_0$ – общая концентрация энзима).

В отличие от истинной константы кажущаяся константа Михаэлиса K_m^{app} в большинстве случаев является функцией различных параметров энзиматической системы (констант скорости различных стадий, концентрации ингибиторов, активаторов, кофакторов, pH) [10] и, как следует из метода ее определения, соответствует концентрации субстрата, при которой предельная скорость уменьшается вдвое [3, 4, 7].

Как следует из уравнения (2), если $k_{-1} \gg k_2$, то истинную константу Михаэлиса K_m можно рассматривать как константу диссоциации энзим-субстратного комплекса (ES) K_s – см. схему (1) [2, 6, 7, 9–15]:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}. \quad (4)$$

Принимая во внимание уравнение (4), истинная константа Михаэлиса K_m может быть выражена в виде:

$$K_m = K_s + \frac{k_2}{k_1} \quad (5)$$

или

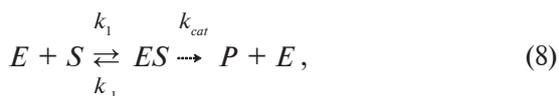
$$K_m = K_s + \frac{V}{k_1[E]_0}, \quad (6)$$

где V – предельная скорость –

$$V = k_2[E]_0. \quad (7)$$

В этой статье мы постараемся выяснить можно ли использовать уравнения (5) и (6) для кажущейся константы Михаэлиса K_m^{app} . Основной трудностью при этом является то, что в литературе нет четкого определения истинной и кажущейся константы Михаэлиса, в подавляющем большинстве случаев невозможно понять о какой константе Михаэлиса идет речь (об истинной или кажущейся), а недостаточно четкое понимание разницы между истинной и кажущейся константами Михаэлиса может привести к принятию неверных решений в планировании эксперимента, к неправильной интерпретации полученных результатов и ошибочным выводам.

Похоже, что путаница возникает из-за того, что часто механизм исследуемой реакции формально описывают схемой [8]:



из которой, аналогично подходу Бриггса–Холдейна [11], можно получить уравнение (3), где кажущаяся константа Михаэлиса выражается следующим образом [8]:

$$K_m^{app} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} = K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}. \quad (9)$$

Мы видим, что уравнение (9) аналогично уравнениям (2) и (5), за исключением того, что вместо истинной константы k_2 оно включает кажущуюся константу скорости k_{cat} распада комплекса ES . Создается впечатление, что в этой кажущейся константе скорости и заключены все отличия реального механизма изучаемой реакции от механизма Михаэлиса–Ментен (1). Т.е. все стадии, по которым комплекс ES распадается до продуктов, фор-

мально показываются одной стадией, которая характеризуется константой скорости k_{cat} , которая, в свою очередь, является функцией констант скоростей пропущенных стадий и, часто, концентраций промежуточных комплексов и других участников реакции. И, таким образом, складывается впечатление, что для всех реакций, подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен, по уравнению (9) можно рассчитать константу Михаэлиса, а уравнение (2) есть частным случаем более общего уравнения (9).

Хотя логика таких рассуждений кажется правильной, однако, зная природу кажущихся констант, можно подвергнуть сомнению справедливость уравнения (9). Первое сомнение возникает при взгляде на уравнение (3), а еще лучше, на уравнение, в общем виде описывающее равнобочную гиперболу: $y = cx/(d + x)$ [1] – оно не дает никаких указаний на то, что константы c и d могут быть связаны какой-либо функциональной зависимостью. Более того, уравнение, выражающее закон Рауля [1, 16], дает нам все основания утверждать, что такой зависимости нет, поскольку трудно найти взаимосвязь между количеством молей растворенного вещества и давлением растворителя над чистым растворителем.

Второе сомнение возникает при анализе схемы (8). Во-первых, как было показано ранее [1, 17], могут существовать механизмы, в рамках которых комплекс ES не образуется, а кинетика описывается уравнением (3): в таком случае непонятен смысл всех констант, входящих в уравнение (9). Во-вторых, если комплекс ES образуется, какие стадии, ведущие к его распаду до продуктов, могут быть объединены кажущейся константой k_{cat} ? Формально – любые. Но тогда можно применять схему (8) для описания большинства реакций, в том числе таких, которые не подчиняются кинетике Михаэлиса–Ментен (как, например, сделал Ченс [18]). Очевидно, что это неправильно. Даже если мы будем применять схему (8) для описания реакций, подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен, например, требующих для своего протекания активатора, то возникает вопрос: будет ли скорость реакции определяться концентрацией комплекса ES , если реакция протекает с образованием тройного энзим-активатор-сустратного комплекса?

Как мы видим, трудно дать однозначные ответы, исходя только из логики, а поэтому проверим математически справедливость уравнения (9) для разных механизмов. Но, чтобы эта проверка не выглядела оторванным

от жизни исследованием, сделаем ее в рамках анализа реальной экспериментальной работы, которая имеет непосредственное отношение к рассматриваемой нами проблеме.

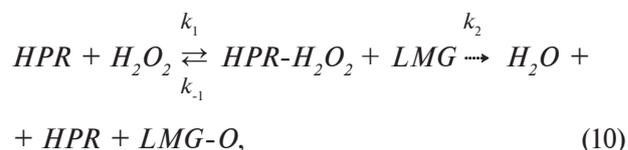
В книге Келети [15] в разделе, посвященном природе константы Михаэлиса в уравнении Михаэлиса–Ментен, написано следующее: «При изменении условий реакции значение K также может измениться. Так, например, в случае пероксидазы при высокой концентрации донора протонов эта константа является кинетической константой K_k , при уменьшении концентрации донора протонов константа превращается в константу Михаэлиса K_m , а при очень низких уровнях донора протонов получаем константу диссоциации K_s ». Аналогичный пример приведен также и в других учебниках [6, 7]. Эта информация заинтересовала меня, поскольку она противоречит моему представлению об истинной константе Михаэлиса, выраженной уравнением (2), а в данном разделе речь шла, как мне показалось, об истинной константе Михаэлиса. Обращение к первоисточнику [18] позволило разобраться в этом вопросе и привести этот пример в качестве образца, чтобы на конкретном примере показать разницу между истинными и кажущимися константами и как недостаточно четкое понимание различия между ними может сказаться на результатах работы.

Целью исследования, проведенного Ченсом, было: определить константы скорости, составляющие константу Михаэлиса, по отдельности; используя их, по уравнению (9) рассчитать величину константы Михаэлиса; показать, что теория Михаэлиса адекватно объясняет механизм энзиматической реакции.

Для исследования была выбрана реакция пероксидазы (HPR) с пероксидом водорода (H_2O_2) в присутствии лейкоформы малахитового зеленого (LMG) как акцептора кислорода (или донора водорода). Эта реакция позволяет с помощью оптической спектроскопии одновременно регистрировать концентрацию энзим-субстратного комплекса ($HPR-H_2O_2$) и продукта реакции (малахитового зеленого). С этой точки зрения она была удобной, но с другой — ее выбор трудно назвать удачным: эта энзиматическая реакция не подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен, а потому не может быть описана с помощью уравнения (3). В рекомендациях Номенклатурного комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии [19] четко определено, что только реакция, кинетика которой описывается уравнением (3) (т.е. реакция, начальная

скорость которой стремится к предельному максимальному значению при бесконечном увеличении концентрации субстрата), может называться реакцией, подчиняющейся кинетике Михаэлиса–Ментен. Более того, рекомендуется не использовать термин «константа Михаэлиса» и символ K_m для реакций, не подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен. Предлагается использовать символ $[S]_{0,5}$ для концентрации субстрата, при которой $v = 0,5V$. Поэтому сегодня константу Михаэлиса, значение которой рассчитывал Ченс для этой реакции, константой Михаэлиса называть нельзя: теперь это $[S]_{0,5}$ или $[H_2O_2]_{0,5}$. С моей точки зрения это правильно, потому что, встречая символы K_m и V , сразу представляешь себе кинетику, как говорят, «с насыщением», а зачастую это совсем не так. В реакциях, не подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен, часто начальный участок зависимости скорости от концентрации субстрата (до концентрации субстрата, после которой наступает снижение скорости) хорошо описывается уравнением (3) и линеаризуется в координатах Лайнуивера–Берка, Эдди–Хофсти и Хейнеса. Поэтому для описания такой «восходящей» части графика используют модель Михаэлиса–Ментен и рассчитывают для нее константы K_m и V , которые (в соответствии с моделью) называют константой Михаэлиса и предельной скоростью. Теперь эти параметры рекомендуют обозначать символами $[S]_{0,5}$ и v_{max} [19] и называть концентрацией субстрата, при которой начальная скорость уменьшается вдвое, и максимальной скоростью соответственно.

В статье [18] автор не приводит зависимости начальной скорости от концентрации H_2O_2 в присутствии лейкоформы малахитового зеленого, не приводит также полной схемы механизма исследуемой реакции, поэтому из самой статьи трудно понять, подчиняется ли изучаемая реакция кинетике Михаэлиса–Ментен или нет. Упрощенная схема механизма, которую, как полагает автор, следует реакция:



похожая на схемы (19) и (11). Такая реакция должна подчиняться кинетике Михаэлиса–Ментен [17], т.е. описываться уравнением (3). В приложении же, где представлены уравнения, использованные для анализа изучаемой реакции, речь идет исключительно о меха-

низме Михаэлиса–Ментен в интерпретации Бриггса–Холдейна (константа скорости второй необратимой стадии обозначена автором k_2 , но по смыслу статьи можно понять, что это кажущаяся константа k_{cat}) и о константе Михаэлиса в виде, представленном уравнением (9). Рассчитанные значения «константы Михаэлиса» (я буду использовать кавычки для обозначения той константы, которую рассчитывал автор, чтобы не путать ее с истинной константой Михаэлиса K_m и с кажущейся константой Михаэлиса K_m^{app} , определяемой по половине предельной скорости) автор сравнивает со значением константы Михаэлиса, приводимым в статье Манна [20]. Так вот, Манн приводит график зависимости начальной скорости от концентрации H_2O_2 . Из графика следует, что с увеличением концентрации H_2O_2 начальная скорость сначала увеличивается, при концентрации порядка 10^{-4} М она достигает максимального значения, а при дальнейшем увеличении концентрации H_2O_2 – резко снижается практически до нуля. Объяснению этой обратимой инактивации пероксидазы и посвящена большая часть работы Манна. Из приведенного графика зависимости начальной скорости от концентрации H_2O_2 Манн определил значение константы Михаэлиса (кажущейся) по концентрации субстрата, при которой максимальная скорость уменьшилась вдвое (т.е. в современной терминологии это $[H_2O_2]_{0,5}$).

Ни у Ченса, ни у Манна не приведены зависимости начальной скорости от концентрации LMG, но Манн приводит график зависимости скорости от концентрации другого субстрата-восстановителя – гваякола. На этом графике мы также видим снижение начальной скорости при больших концентрациях гваякола. Можно предположить, что и малахитовый зеленый будет вести себя подобным образом.

Из этих данных можно сделать вывод, что кинетика исследуемой Ченсом реакции не может быть описана моделью Михаэлиса–Ментен, а, соответственно, и уравнением (3), поскольку ее начальная скорость с увеличением концентрации субстрата (а, возможно, и активатора) сначала увеличивается, а затем снижается практически до нуля.

Несмотря на это, Ченс применяет для описания этой реакции модель Михаэлиса–Ментен. Возможность образования тройного комплекса Ченс также не рассматривает, а потому считает, что скорость реакции пропорциональна концентрации комплекса ES . В настоящее время считается, что двухсубстратные реакции протекают через образование тройных комплексов [9, 15], а поэтому скорость

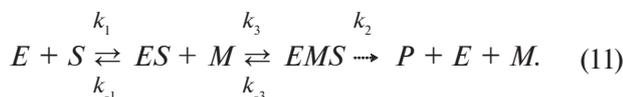
реакции пропорциональна концентрации этого комплекса, а не комплекса ES . Насколько это может сказаться на результатах расчета константы Михаэлиса, мы увидим ниже, а здесь хотелось бы отметить, что при исследовании реакций с неизвестным механизмом для получения объективной картины процесса необходимо анализировать несколько возможных механизмов.

Реакции с участием активаторов, показывающих кинетику с торможением по субстрату и по активатору, должны иметь более сложный механизм, чем рассматривается Ченсом (как, например, показано в статье [17]), и уравнения, приведенные в приложении должны быть другими. В частности, если реакция протекает с образованием тройного комплекса энзим-активатор-субстрат, распад которого сопровождается образованием продуктов, то для описания такой реакции недостаточно двух дифференциальных уравнений, и скорость такой реакции будет определяться концентрацией тройного комплекса, а не комплекса ES .

Несмотря на это, Ченс рассчитывает «константу распада энзим-субстратного комплекса ES », исходя из уравнений, описывающих модель Михаэлиса–Ментен. Полученная константа является кажущейся, которую сегодня обозначают как k_{cat} (доказательством того, что она кажущаяся, служит ее зависимость от концентрации малахитового зеленого). Затем он использует ее значение для того, чтобы рассчитать «константу Михаэлиса», рассчитывая ее по уравнению (9) для одного конкретного значения концентрации малахитового зеленого. Полученное значение «константы Михаэлиса» получается в 10 раз меньше, чем значение кажущейся константы Михаэлиса у Манна ($[H_2O_2]_{0,5}$), но при концентрации малахитового зеленого в 10 раз ниже, чем у Манна. А поскольку величина константы Михаэлиса, по утверждению Ченса, пропорциональна концентрации малахитового зеленого, автор считает, что его результаты совпадают с результатами Манна.

Проанализируем справедливость подхода Ченса к изучению энзиматических реакций с участием активаторов и, в первую очередь, применимость уравнения (9) для расчета кажущихся констант Михаэлиса. При этом будем рассматривать только те механизмы, кинетика которых подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен (3) и для которых в стационарном приближении можно вывести уравнение, связывающее начальную скорость реакции с концентрациями субстрата и активатора.

Начнем анализ с реакции, в ходе которой энзим и субстрат образуют комплекс ES , который сам не способен непосредственно распадаться с образованием продуктов, но в присутствии активатора образует с ним тройной энзим-активатор-субстратный комплекс EMS , который уже может распадаться до продуктов:



В стационарном приближении для такого механизма получается следующее уравнение начальной скорости (если $[S]_0 \gg [E]_0$ и $[M]_0 \gg [E]_0$):

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0(1 + \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}) + K_m^{EMS} \frac{K_s^S}{[M]_0} + \frac{k_2}{k_1}} = \frac{\frac{k_2[E]_0[M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}} [S]_0}{\frac{k_2}{k_1} [M]_0 + K_s^S K_m^{EMS}} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + \frac{K_m^{app}}{[M]_0 + K_m^{EMS}}}, \quad (12)$$

где $K_m^{EMS} = (k_{-3} + k_2)/k_3$; $K_s^S = k_{-1}/k_1$.

Поступим аналогично Ченсу, т.е. просуммируем K_s (для данной реакции $K_s = K_s^S = k_{-1}/k_1$) и k_{cat}/k_1 (в соответствии с уравнением (9)) и проверим, получится ли при этом значение кажущейся константы Михаэлиса K_m^{app} :

$$K_m^{sum} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{cat}}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2[M]_0}{k_1([M]_0 + K_m^{EMS})} = \frac{k_{-1}([M]_0 + K_m^{EMS}) + k_2[M]_0}{k_1([M]_0 + K_m^{EMS})} = \frac{\frac{k_{-1}}{k_1} K_m^{EMS} + \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1} [M]_0}{([M]_0 + K_m^{EMS})}. \quad (13)$$

Сравнивая результат расчета K_m^{sum} с выражением для K_m^{app} , видим, что в результате сложения K_s и k_{cat}/k_1 , мы не получаем величину кажущейся константы Михаэлиса:

$$K_m^{sum} = K_m^{app} + \frac{K_s[M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}} = K_m^{app} + K^o. \quad (14)$$

Совпадение может наблюдаться в случае, если $k_{-1} \ll k_2$. Другой возможный вариант совпадения: если $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$; тогда $k_{cat} = k_2[M]_0/K_m^{EMS}$, а $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$.

Проверим полученные выводы с помощью модельных расчетов кинетики нескольких реакций, протекающих по механизму (11), параметры которых приведены в табл. 1. Расчеты были проведены путем численного решения системы дифференциальных уравнений [17] с соблюдением условий вывода уравнения (12) ($[S]_0 \gg [E]_0$ и $[M]_0 \gg [E]_0$, при этом соотношения $[S]_0/[E]_0$ и $[M]_0/[E]_0$ были, как правило, больше 10^4) и их результаты представлены в табл. 2. Из таблицы видно, что когда $k_{-1} \ll k_2$ (реакция 3) значения K_m^{app} и K_m^{sum} практически совпадают. Это происходит потому, что величина K^o значительно меньше, чем K_m^{app} , а поэтому, согласно уравнению (14), $K_m^{sum} = K_m^{app}$. Следует обратить внимание на результаты расчета реакции 2 (для которой также соблюдается условие $k_{-1} \ll k_2$): мы видим, что значения K_m^{app} и K_m^{sum} не совпадают, особенно при малых концентрациях активатора. Они не совпадают не из-за влияния K^o , величина которого, как и в предыдущем случае, пренебрежимо мала по сравнению с K_m^{app} , а потому, что соотношения концентраций $[M]_0/[E]_0$ около 10^4 видимо недостаточно для точного соответствия результатов, полученных расчетом по уравнению (12) и решением системы дифференциальных уравнений. Это соотношение должно быть еще на 1–2 порядка выше. Например, при соотношении 10^5 K_m^{app} превышает K_m^{sum} на 20%, а при соотношении 10^6 – на 3%, в то время как при соотношении 10^4 – в 3 раза, а при соотношении 10^3 – в 20 раз. Расчет K_m^{app} по уравнению (12), подставляя в соответствующее выражение для K_m^{app} необходимые параметры, приводит к значениям K_m^{app} полностью соответствующим K_m^{sum} , как и должно быть при условии $k_{-1} \ll k_2$. Нужно всегда помнить о такой особенности сложных энзиматических реакций, когда значение рассчитанной из экспериментальных данных по уравнению (3), т.е. по половине предельной скорости, кажущейся константы Михаэлиса не совпадает по величине со значением кажущейся константы Михаэлиса, рассчитанной по уравнению, выведенному для данного механизма [(в данном случае уравнение (12)) при тех же условиях. Еще более яркий пример такого несовпадения наблюдается для реакции 6. Параметры данной реакции подобраны так, что в заданном интервале концентраций активатора V^{app} остается неизменной (поскольку $[M]_0 \gg [E]_0$) и K_m^{app} также не зависит от концентрации активатора (поскольку $k_{-1} = k_2$). При этом значения K_m^{app} в соответствии с уравнением (12) должны быть численно равны K_s^S , однако во всем интервале

Таблиця 1. Константы скорости ($k_1, k_{-1}, k_3, k_{-3}, k_2$), концентрация энзима (E_0) и диапазоны концентраций субстрата (S_0) и активатора (M_0), использованные для расчета кинетики накопления продукта в шести реакциях (№ 1–6), протекающих по механизму (11) и в двух реакциях (№ 7–8), протекающих по механизму (17). Система дифференциальных уравнений, описывающих кинетику, приведена в [17]

№	$k_1, \text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$	$k_{-1}, \text{мин}^{-1}$	$k_3, \text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$	$k_{-3}, \text{мин}^{-1}$	$k_2, \text{мин}^{-1}$	E_0, M	S_0, M	M_0, M
<i>Кинетические параметры реакций, протекающих по механизму (11)</i>								
1	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
2	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
3	$1 \cdot 10^4$	1	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
4	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^1$	5	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
5	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
6	$1 \cdot 10^6$	1	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^{-1}$	1	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
<i>Кинетические параметры реакций, протекающих по механизму (17)</i>								
7	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^1$	5	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
8	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$

концентраций активатора K_m^{app} оказывается на 20% больше, чем K_s^S . Расчет K_m^{app} по уравнению (12) в тех же условиях дает значение, полностью совпадающее с K_s^S . Величины же V^{app} , полученные расчетом по уравнению (12) и по половине предельной скорости, практически совпадают. Объяснить такой эффект трудно, видимо он обусловлен сложностью ферментативной системы.

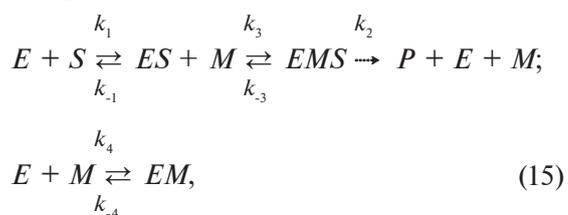
Совпадение K_m^{app} и K_m^{sum} показано на примере реакции 1, в условиях, когда $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$. В этом случае K^o также значительно меньше, чем K_m^{app} . Однако могут встречаться ситуации, когда K^o значительно превышает K_m^{app} (реакция 4). В таких случаях особенно четко видно, насколько могут различаться значения K_m^{app} и K_m^{sum} . В данном случае значения кажущихся констант Михаэлиса, рассчитанных методом линеаризации из экспериментальных данных и по уравнению (9), различаются в 200 раз.

Приведем еще один пример, где значения K_m^{app} и K^o изменяются примерно в одинаковых пределах (реакция 5). При этом в области малых концентраций активатора K_m^{app} превосходит K^o приблизительно на два порядка, а в области высоких концентраций активатора, наоборот, K^o превосходит K_m^{app} приблизительно на два порядка. Сумма же этих величин во всем диапазоне концентраций активатора остается неизменной величиной, равной K_m^{sum} .

Таким образом, мы видим, что в общем случае уравнение (9) не может быть применимо для расчета кажущихся констант Михаэлиса в

случае реакций, протекающих по механизму (11). Как следует из уравнения (14), рассчитываемое значение K_m^{sum} получается больше (иногда, как для реакций 4 и 5, значительно), чем K_m^{app} . Но при определенных соотношениях кинетических параметров может наблюдаться совпадение этих величин.

Если наряду с реакцией (11) протекает реакция образования неактивного комплекса активатора с энзимом:



то в стационарном приближении такой механизм описывается следующим уравнением начальной скорости (если $[S]_0 \gg [E]_0$ и $[M]_0 \gg [E]_0$):

$$\begin{aligned}
 v_0 &= \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 \left(1 + \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}\right) + (K_m^{EMS}K_s^S + \frac{k_2}{k_1}[M]_0) \left(\frac{1}{[M]_0} + \frac{1}{K_m^{EM}}\right)} = \\
 &= \frac{\frac{k_2[E]_0[M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}}[S]_0}{[S]_0 + \frac{([M]_0 + K_s^{EM})(k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0)}{k_1K_s^{EM}([M]_0 + K_m^{EMS})}} = \\
 &= \frac{V_m^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}},
 \end{aligned}
 \tag{16}$$

Таблица 2. Значения V^{app} и K_m^{app} , рассчитанные с помощью линеаризации уравнения (12) в координатах Хейнса ($S_0/v - S_0$), K_m^{sum} , рассчитанные в соответствии с уравнением (13) как сумма K_s и $V^{app}/(k_1[E]_0)$, K^o и $K_m^{app} + K^o$, рассчитанные в соответствии с уравнением (14), для реакций № 1–6 параметры которых представлены в табл. 1

№	$[M]_0$, М	K_s^S , М	V^{app} , М/МИН	K_m^{app} , М	K_m^{sum} , М	K^o , М	$K_m^{app} + K^o$, М
1	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,988 \cdot 10^{-11}$	$9,988 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$9,988 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,990 \cdot 10^{-9}$	$9,991 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,990 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,901 \cdot 10^{-8}$	$9,911 \cdot 10^{-2}$	$1,001 \cdot 10^{-1}$	$9,901 \cdot 10^{-4}$	$1,001 \cdot 10^{-1}$
2	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$1,000 \cdot 10^{-10}$	$3,020 \cdot 10^{-7}$	$1,010 \cdot 10^{-7}$	$1,000 \cdot 10^{-14}$	$3,020 \cdot 10^{-7}$
	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$3,000 \cdot 10^{-10}$	$5,019 \cdot 10^{-7}$	$3,010 \cdot 10^{-7}$	$3,000 \cdot 10^{-14}$	$5,019 \cdot 10^{-7}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$9,999 \cdot 10^{-10}$	$1,202 \cdot 10^{-6}$	$1,001 \cdot 10^{-6}$	$9,999 \cdot 10^{-14}$	$1,202 \cdot 10^{-6}$
	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$2,999 \cdot 10^{-9}$	$3,201 \cdot 10^{-6}$	$3,000 \cdot 10^{-6}$	$2,999 \cdot 10^{-13}$	$3,201 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$9,990 \cdot 10^{-9}$	$1,020 \cdot 10^{-5}$	$9,991 \cdot 10^{-6}$	$9,990 \cdot 10^{-13}$	$1,020 \cdot 10^{-5}$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$2,991 \cdot 10^{-8}$	$3,013 \cdot 10^{-5}$	$2,991 \cdot 10^{-5}$	$2,991 \cdot 10^{-12}$	$3,013 \cdot 10^{-5}$
3	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$4,975 \cdot 10^{-6}$	$4,976 \cdot 10^{-1}$	$4,976 \cdot 10^{-1}$	$4,975 \cdot 10^{-5}$	$4,977 \cdot 10^{-1}$
	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$7,481 \cdot 10^{-6}$	$7,482 \cdot 10^{-1}$	$7,482 \cdot 10^{-1}$	$7,481 \cdot 10^{-5}$	$7,483 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$9,083 \cdot 10^{-6}$	$9,083 \cdot 10^{-1}$	$9,084 \cdot 10^{-1}$	$9,083 \cdot 10^{-5}$	$9,084 \cdot 10^{-1}$
	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$9,675 \cdot 10^{-6}$	$9,675 \cdot 10^{-1}$	$9,676 \cdot 10^{-1}$	$9,674 \cdot 10^{-5}$	$9,676 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$9,900 \cdot 10^{-6}$	$9,900 \cdot 10^{-1}$	$9,901 \cdot 10^{-1}$	$9,900 \cdot 10^{-5}$	$9,902 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$9,990 \cdot 10^{-6}$	$9,991 \cdot 10^{-1}$	$9,991 \cdot 10^{-1}$	$9,990 \cdot 10^{-5}$	$9,992 \cdot 10^{-1}$
4	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$4,992 \cdot 10^{-8}$	$6,714 \cdot 10^{-6}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	$9,985 \cdot 10^{-4}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$4,997 \cdot 10^{-8}$	$5,706 \cdot 10^{-6}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	$9,995 \cdot 10^{-4}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$4,999 \cdot 10^{-8}$	$5,353 \cdot 10^{-6}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	$9,999 \cdot 10^{-4}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$5,000 \cdot 10^{-8}$	$5,217 \cdot 10^{-6}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$5,000 \cdot 10^{-8}$	$5,203 \cdot 10^{-6}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
5	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$8,991 \cdot 10^{-11}$	$9,908 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,009 \cdot 10^{-4}$	$9,998 \cdot 10^{-2}$
	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$2,650 \cdot 10^{-10}$	$9,735 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$2,655 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$8,319 \cdot 10^{-10}$	$9,168 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$8,333 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$2,140 \cdot 10^{-9}$	$7,860 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$2,143 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$4,757 \cdot 10^{-9}$	$5,243 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$4,762 \cdot 10^{-2}$	$1,001 \cdot 10^{-1}$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$7,314 \cdot 10^{-9}$	$2,687 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$7,317 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,007 \cdot 10^{-9}$	$9,935 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,009 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,891 \cdot 10^{-9}$	$1,100 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,891 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
6	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$9,987 \cdot 10^{-10}$	$1,201 \cdot 10^{-6}$	$1,999 \cdot 10^{-6}$	$9,989 \cdot 10^{-7}$	$2,200 \cdot 10^{-6}$
	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$9,996 \cdot 10^{-10}$	$1,201 \cdot 10^{-6}$	$2,000 \cdot 10^{-6}$	$9,996 \cdot 10^{-7}$	$2,201 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$9,999 \cdot 10^{-10}$	$1,201 \cdot 10^{-6}$	$2,000 \cdot 10^{-6}$	$9,999 \cdot 10^{-7}$	$2,201 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$1,201 \cdot 10^{-6}$	$2,000 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$2,201 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$1,201 \cdot 10^{-6}$	$2,000 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$2,201 \cdot 10^{-6}$

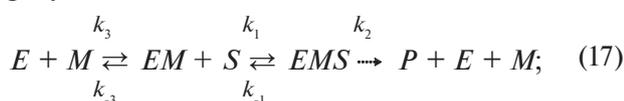
Таблиця 3. Значення V^{app} і K_m^{app} , розраховані з допомогою лінеаризації рівняння (18) в координатах Хейнса ($S_0/v - S_0$), K_{mS}^{sum} , розраховані як сума K_s^S і $V^{app}/(k_3[E]_0)$, K_{mM}^{sum} , розраховані як сума K_s^M і $V^{app}/(k_3[E]_0)$, для реакцій № 7 і 8, параметри яких представлені в табл. 1

№	$[M]_0$, М	K_s^S , М	V^{app} , М/МИН	K_m^{app} , М	K_{mS}^{sum} , М
7	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$5,000 \cdot 10^{-5}$	$4,974 \cdot 10^{-8}$	$5,549 \cdot 10^{-5}$	$5,497 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$5,000 \cdot 10^{-5}$	$4,997 \cdot 10^{-8}$	$5,524 \cdot 10^{-5}$	$5,500 \cdot 10^{-5}$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$5,000 \cdot 10^{-5}$	$4,999 \cdot 10^{-8}$	$5,522 \cdot 10^{-5}$	$5,500 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$5,000 \cdot 10^{-5}$	$5,000 \cdot 10^{-8}$	$5,522 \cdot 10^{-5}$	$5,500 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$5,000 \cdot 10^{-5}$	$5,000 \cdot 10^{-8}$	$5,521 \cdot 10^{-5}$	$5,500 \cdot 10^{-5}$
8	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-10}$	$1,010 \cdot 10^{-3}$	$1,001 \cdot 10^{-4}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$9,999 \cdot 10^{-10}$	$1,011 \cdot 10^{-3}$	$1,010 \cdot 10^{-4}$
	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$2,999 \cdot 10^{-9}$	$1,013 \cdot 10^{-3}$	$1,030 \cdot 10^{-4}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$9,990 \cdot 10^{-9}$	$1,019 \cdot 10^{-3}$	$1,100 \cdot 10^{-4}$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$2,991 \cdot 10^{-8}$	$1,037 \cdot 10^{-3}$	$1,299 \cdot 10^{-4}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-4}$	$9,901 \cdot 10^{-8}$	$1,100 \cdot 10^{-3}$	$1,990 \cdot 10^{-4}$
№	$[M]_0$, М	K_s^M , М	V^{app} , М/МИН	K_m^{app} , М	K_{mM}^{sum} , М
8	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-10}$	$1,010 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,999 \cdot 10^{-10}$	$1,011 \cdot 10^{-3}$	$1,001 \cdot 10^{-1}$
	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$2,999 \cdot 10^{-9}$	$1,013 \cdot 10^{-3}$	$1,003 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,990 \cdot 10^{-9}$	$1,019 \cdot 10^{-3}$	$1,010 \cdot 10^{-1}$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$2,991 \cdot 10^{-8}$	$1,037 \cdot 10^{-3}$	$1,030 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,901 \cdot 10^{-8}$	$1,100 \cdot 10^{-3}$	$1,099 \cdot 10^{-1}$

где $K_m^{EMS} = (k_{-3} + k_2)/k_3$; $K_s^S = k_{-1}/k_1$; $K_s^{EM} = k_{-4}/k_4$.

Для этой реакции также в результате сложения K_s и k_{cat}/k_1 , мы не получаем величину кажущейся константы Михаэлиса K_m^{app} . Совпадение может наблюдаться в случае, если $k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0 = k_{-1}K_s^{EM}$. Другой возможный вариант: $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$; тогда $k_{cat} = k_2[M]_0/K_m^{EMS}$, а $K_m^{app} = (K_s + k_{cat}/k_1)(1 + [M]_0/K_s^{EM})$, если при этом $[M]_0$ будет значительно меньше, чем K_s^{EM} , то уравнение (9) будет соблюдаться.

Реакцию, в которой комплекс ES не об-
разуется:



в стационарном приближении можно описать следующим уравнением начальной скорости (если $[S]_0 \gg [E]_0$ и $[M]_0 \gg [E]_0$):

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0(1 + \frac{k_2}{k_3[M]_0}) + K_m^{EMS}(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0})} =$$

$$\begin{aligned} & \frac{k_2 k_3 [E]_0 [M]_0 [S]_0}{k_3 [M]_0 + k_2} = \\ & \frac{V^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \end{aligned} \quad (18)$$

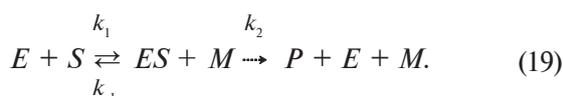
где $K_m^{EMS} = (k_{-1} + k_2)/k_1$; $K_s^M = k_{-3}/k_3$; $K_s^S = k_{-1}/k_1$.

В этом случае также в результате сложения K_s^M и k_{cat}/k_3 или K_s^S и k_{cat}/k_1 , мы не получаем величину кажущейся константы Михаэлиса K_m^{app} . Совпадение может наблюдаться при определенных соотношениях констант скорости.

Посмотрим на результаты модельных расчетов кинетики нескольких реакций, протекающих по механизму (17), параметры которых приведены в табл. 1. Как и в случае механизма (11) расчеты кинетики накопления продукта были проведены путем численного решения системы дифференциальных уравнений [17] с соблюдением условий вывода уравнения (18) ($[S]_0 \gg [E]_0$ и $[M]_0 \gg [E]_0$, при этом

соотношения $[S]_0/[E]_0$ и $[M]_0/[E]_0$ были, как правило, больше 10^4). Результаты представлены в табл. 3. Мы снова видим, что в некоторых случаях значения K_m^{app} и K_{mS}^{sum} практически совпадают (реакция 7), но в общем случае значения K_m^{app} значительно отличаются как от K_{mS}^{sum} , так и от K_{mM}^{sum} (реакция 8), поэтому для реакций, протекающих по механизму (17), уравнение (9) также не может быть применимо для расчета кажущихся констант Михаэлиса.

Проанализируем также схему механизма реакции, изучавшейся Ченсом, в том виде как она приведена в его статье [18]:



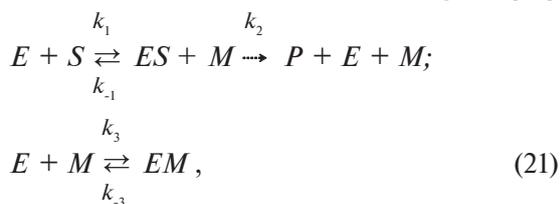
В стационарном приближении такой механизм описывается следующим уравнением начальной скорости (если $[S]_0 \gg [E]_0$):

$$v_0 = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2 [M]_0} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{[S]_0 + (K_s + \frac{k_2 [M]_0}{k_1})} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (20)$$

где $K_s = k_{-1}/k_1$.

Из уравнения (20) видно, что $k_{cat} = k_2 [M]_0$, а $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$, т.е. для реакции, протекающей по механизму (19), уравнение (9) выполняется.

Если же параллельно с реакцией (19) энзим образует комплекс с активатором EM [(что вполне вероятно для реакции (10)), характеризующийся константой диссоциации $K_s^M = k_{-3}/k_3$,

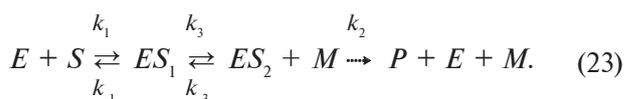


то кинетика такого процесса описывается уравнением (в стационарном приближении при условии $[S]_0 \gg [E]_0$):

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{[S]_0 + (K_s + \frac{k_2 [M]_0}{k_1})(1 + \frac{[M]_0}{K_s^M})} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}. \quad (22)$$

Для такой реакции (21) уравнение (9) не выполняется: оно может выполняться только при условии, когда $K_s^M \gg [M]_0$.

Диксон и Уэбб отмечают, что пероксидаза образует четыре комплекса с пероксидом водорода [14]. При его добавлении сначала образуется первый комплекс зеленого цвета, быстро превращающийся во второй — красного цвета, который и исследовал Ченс в своей работе [18]. Поэтому проанализируем также реакцию со стадией превращения комплекса ES_1 в комплекс ES_2 :



Кинетика такого процесса описывается уравнением (в стационарном приближении при условии $[S]_0 \gg [E]_0$):

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2 [M]_0}{k_3}} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + \frac{K_s^S (1 + \frac{k_2 [M]_0}{k_3}) + \frac{k_2 [M]_0}{k_1}}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2 [M]_0}{k_3}}} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (24)$$

где $K_s^S = k_{-1}/k_1$; $K_s^{ES} = k_{-3}/k_3$.

Для такой реакции (23) уравнение (9) строго не выполняется: оно может выполняться только при условии, когда $K_s^{ES} \ll (1 + k_2 [M]_0 / k_3)$, которое, впрочем, в большинстве случаев должно соблюдаться.

Рассмотренные примеры показывают, что уравнение (9) может быть применимо для расчета кажущейся константы Михаэлиса только в случае реакции, протекающей по механизму (19). Добавление дополнительных последовательных стадий, образование дополнительных двойных комплексов, образование тройного комплекса приводят к тому, что уравнение (9) не выполняется. Проведенный анализ выборочных механизмов позволяет сделать вывод, что в общем случае уравнение (9) не может применяться для расчета кажущихся констант Михаэлиса K_m^{app} . Оно может быть справедливо только для некоторых механизмов или при определенных соотношениях кинетических параметров.

Таким образом, рассматривая схему (19) в качестве механизма реакции пероксидазы с пероксидом водорода в присутствии лейкоформы малахитового зеленого, Ченс имел все основания использовать уравнение (9) для расчета кажущейся константы Михаэлиса, но, поскольку он не доказал истинности выбранного механизма, а, как мы видим, вероятность того, что механизм исследуемой реакции отличается от рассматриваемого Ченсом довольно велика, то и вероятность того, что уравнение (9) не может быть использовано для расчета кажущейся константы Михаэлиса в такой же степени высока.

Ченс планировал эксперимент так, чтобы рассчитать отдельно константы K_s и k_{cat} и из них рассчитать константу Михаэлиса K_m^{app} по уравнению (9). Но если с помощью истинной константы k_2 по уравнению (2) можно рассчитать истинную константу Михаэлиса K_m , то, используя кажущуюся константу k_{cat} , по аналогичному по виду уравнению (9) в общем случае нельзя рассчитать кажущуюся константу Михаэлиса. Для того, чтобы применение уравнения (9) не вызывало возражений, необходимо либо доказать, что исследуемая реакция протекает по механизму (19), либо доказать, что уравнение (9) может использоваться для расчета кажущихся констант Михаэлиса для любых реакций, протекающих с участием активаторов, или, по крайней мере, для нескольких возможных механизмов исследуемой реакции.

Исследование Ченса [18] может быть примером того, как недостаточно четкое понимание разницы между истинными и кажущимися константами скорости и константами Михаэлиса в итоге может привести к тому, что весь план эксперимента, полученные результаты и сделанные выводы могут быть поставлены под вопрос.

Для анализа сложной реакции, которая не подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен по субстрату (а, возможно, и по активатору) Ченс применяет простое уравнение Михаэлиса–Ментен и приходит к выводу, что «кинетика энзим-субстратного соединения хорошо согласуется с математическим решением теории Михаэлиса–Ментен (Бриггса–Холдейна), полученным для экспериментальных значений концентраций и констант скорости реакции».

Хотя работа Ченса была опубликована в 1943 году, она оставила заметный след в истории, поэтому, как мы видим, ее результаты приводятся в учебниках и полстолетия спустя (а сама статья была переиздана в 1999 году в сборнике, посвященном механизмам действия

энзимов [21], как классический труд). Поэтому я и привожу статью Ченса в качестве примера, поскольку заложенные еще в те далекие годы представления о том, что сложные механизмы реакций, протекающие с участием активаторов, можно представить в виде схемы (8), аналогичной механизму Михаэлиса–Ментен (1), и по уравнению (9), аналогичному уравнению (2), рассчитать кажущуюся константу Михаэлиса, укоренились и продолжают существовать и сейчас. А это возможно, как мне кажется, только из-за недостаточно четкого понимания различий между истинными и кажущимися константами.

Возвращаясь к цитате Келети [15], хочу еще раз подчеркнуть, что ни при каких изменениях условий реакции (при данной температуре и давлении) значение истинной константы Михаэлиса, выраженной через константы скорости по уравнению (2), измениться не может. Никакие дополнительные вещества не могут изменить константы скорости k_1 и k_{-1} , а также константу скорости распада комплекса ES , скорость распада которого зависит только от величины константы скорости первого порядка и концентрации комплекса. Добавление вещества, способного повлиять на скорость распада при той же концентрации комплекса, означает, что оно также должно входить в уравнение для скорости распада. А это значит, что константа скорости будет уже второго порядка, и это уже совершенно другая величина, которую (вследствие разных размерностей) даже нельзя сравнивать с константой скорости первого порядка [22]. При неизменной концентрации этого второго вещества, скорость распада будет зависеть только от концентрации самого комплекса, т.е. формально описываться константой скорости псевдопервого порядка. Однако эта константа будет изменять свое значение в зависимости от той концентрации второго вещества, при которой она измерена, т.е. является кажущейся константой, которую обычно обозначают символом k_{cat} . Поэтому для конкретной реакции, в ходе которой образуется комплекс ES , способный к распаду непосредственно до продуктов, истинная константа Михаэлиса K_m может иметь только одно значение. Величина этой константы Михаэлиса будет определяться соотношением констант скорости k_1 , k_2 и k_{-1} , в соответствии с уравнением (2).

Попытка использовать константу k_{cat} в уравнении (2) вместо k_2 приводит к тому, что рассчитанная «константа Михаэлиса» оказывается непонятной природы и она, как пра-

вило, не совпадает с кажущейся константой Михаэлиса, как должно быть согласно уравнению (9). А поскольку уравнение (9) в общем случае не выполняется, то и утверждать, что кажущуюся константу Михаэлиса можно записывать в виде (9) или в виде $K_k = k_{cat}/k_1$ [(можно проверить, полагая, что $K_s \rightarrow 0$, что, например, для механизма (15) $K_k = (k_{cat}/k_1) + (k_2[M]_0^2/k_1 K_s^{EM} (K_m^{EMS} + [M]_0))$], для механизма (17) $K_k = (k_{cat}/k_1) + (k_2 k_{-3}/k_1 (k_3 [M]_0 + k_2))$ и для механизма (21) $K_k = (k_{cat}/k_1) + (k_2 [M]_0^2/k_1 K_s^M)$], хотя для остальных рассмотренных механизмов соотношение $K_k = k_{cat}/k_1$ соблюдается) нет никаких оснований. Такие соотношения могут выполняться только для отдельных механизмов или при благоприятных соотношениях параметров ферментатического процесса.

Поэтому, как мне кажется, в разделе, посвященном природе константы Михаэлиса, необходимо рассматривать истинную и кажущуюся константы Михаэлиса по отдельности, поскольку эти параметры имеют разную природу.

А вот утверждение, что при малых концентрациях активатора кажущаяся константа Михаэлиса равна константе диссоциации комплекса ES (для реакций, в которых субстрат практически не претерпевает каталитического превращения в отсутствие активатора) мы подвергнем анализу в следующей статье.

В результате проведенного теоретического анализа показано, что, хотя чисто формально мы можем записать механизмы реакций, протекающих с участием активаторов (17), (11), (15), (19), (21), (23) в виде схемы (8) и получить выражение для кажущейся константы Михаэлиса в виде уравнения (9), но использовать такой подход для исследования всех реакций с участием активаторов нельзя. Уравнение (9) в общем случае не соблюдается [в отличие от

уравнения (2) для истинной константы Михаэлиса]; оно может выполняться только для некоторых механизмов или при определенных соотношениях кинетических параметров ферментатических реакций.

ПРО ІСТИННІ ТА УЯВНІ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА В ЕНЗИМОЛОГІЇ. ІІ. ЧИ ВИКОНУЄТЬСЯ РІВНЯННЯ $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$ ДЛЯ ЕНЗИМАТИЧНИХ РЕАКЦІЙ З УЧАСТЮ АКТИВАТОРІВ?

С. О. Карахим

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua

Стаття присвячена аналізу рівняння для уявної константи Міхаеліса K_m^{app} ферментатичних реакцій, що відбуваються за участю активаторів, вираженого через субстратну константу K_s і константу швидкості розпаду фермент-субстратного комплексу k_{cat} . Показано, що, хоча формально можна записати механізми таких реакцій у вигляді схеми, аналогічної моделі Міхаеліса–Ментен, та отримати вираз для уявної константи Міхаеліса у вигляді рівняння $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$, проте використовувати такий підхід для дослідження всіх реакцій з участю активаторів не можна. Наведене рівняння в загальному випадку не дотримується, воно може виконуватись лише для деяких механізмів або за певних співвідношень кінетичних параметрів ферментатичних реакцій.

Ключові слова: кінетика ферментатичних реакцій, рівняння Міхаеліса–Ментен, константа Міхаеліса, гранична швидкість, субстратна константа, активатор.

ON TRUE AND APPARENT MICHAELIS CONSTANTS IN ENZYMOLOGY. II. IS THE EQUATION $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$ TRUE FOR ENZYME-CATALYSED REACTIONS WITH ACTIVATOR PARTICIPATION?

S. O. Karakhim

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The article is dedicated to analysis of equation which expresses apparent Michaelis constant K_m^{app} of enzyme-catalysed reactions with activator participation by means of the substrate constant K_s and rate constant of enzyme-substrate complex decomposition k_{cat} . It has been shown that although it is possible to record the mechanisms of such reactions as a scheme similar to Michaelis-Menten model and to derive equation of apparent Michaelis constant as $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$, but this approach cannot be used for investigation of all reactions with activator participation. The equation mentioned above is not obeyed in the general case, it may be true for some mechanisms only or under certain ratio of kinetic parameters of enzyme-catalysed reactions.

Key words: enzyme kinetics, Michaelis-Menten equation, Michaelis constant, limiting rate, substrate constant, activator.

1. *Карахим С. А.* // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 5. – С. 94–109.
2. *Garrett R. H., Grisham C. M.* Biochemistry. Fourth edition. – Brooks / Cole Cengage Learning, 2010. – 1060 p.
3. *Биохимия: Учебник / Под ред. Е. С. Северина.* – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 784 с.
4. *Губський Ю. І.* Біологічна хімія: Підручник. – Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.

5. *Дикерсон Р., Грей Г., Хейт Дж.* Основные законы химии. – Т. 1. – М.: Мир, 1982. – 652 с.
6. *Уэбб Л.* Ингибиторы ферментов и метаболизма. – М.: Мир, 1966. – 864 с.
7. *Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К.* Биохимическая кинетика. – Киев: Вища школа, 1977. – 264 с.
8. *Кнопре Д. Г., Мызина С. Д.* Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. – 3-е изд. – М.: Высш. шк., 2000. – 479 с.
9. *Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised edition by Athel Cornish-Bowden.* Third reprint. – Portland Press – London, 2002. – 344 p.
10. *Березин И. В., Клесов А. А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 320 с.
11. *Briggs G. E., Haldane J. B. S.* // Biochem. J. – 1925. – **19**. – Р. 338–339.
12. *Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г.* Биокинетика. – М.: Фаир-Пресс, 1999. – 720 с.
13. *Березин И. В., Варфоломеев С. Д.* Биокинетика. – М.: Наука, 1979. – 312 с.
14. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. – М.: Изд-во Иностранной литературы, 1961. – 728 с.
15. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1990. – 350 с.
16. *Болдырев А. И.* Физическая и коллоидная химия. – М.: Высшая шк., 1974. – 504 с.
17. *Карахим С. А., Горчев В. Ф.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 149–162.
18. *Chance B.* // J. Biol. Chem. – 1943. – **151**. – Р. 553–577.
19. *Symbolism and Terminology in Enzyme Kinetics* // Eur. J. Biochem. – 1982. – **128**. – Р. 281–291.
20. *Mann P. J. G.* // Biochem. J. – 1931. – **25**(3). – Р. 918–930.
21. *Chance B.* // Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.: Mechanism of Enzyme Action. Part A. – 1999. – **73**. – Р. 3–23.
22. *Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю.* Кинетика биологических процессов: Учеб. пособие. – 2-е изд. – М.: Изд-во МГУ, 1987. – 304 с.

Получено 30.06.2011