

МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 577.151.4:577.31

ОБ ИСТИННЫХ И КАЖУЩИХСЯ КОНСТАНТАХ МИХАЭЛИСА В ЭНЗИМОЛОГИИ. III. СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЛИНЕЙНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ КАЖУЩЕЙСЯ КОНСТАНТОЙ МИХАЭЛИСА И ПРЕДЕЛЬНОЙ СКОРОСТЬЮ И МОЖНО ЛИ С ЕЕ ПОМОЩЬЮ ОПРЕДЕЛЯТЬ ВЕЛИЧИНУ СУБСТРАТНОЙ КОНСТАНТЫ?

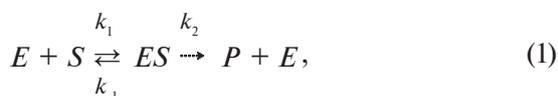
С. А. КАРАХИМ

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

В статье дан критический анализ метода Слейтера–Боннера, применяющегося для графического определения субстратной константы (K_s) по линейной зависимости кажущейся константы Михаэлиса (K_m^{app}) от предельной скорости (V^{app}) энзиматических реакций, протекающих с участием активаторов. Показано, что, хотя формально можно записать механизмы таких реакций в виде схемы, аналогичной модели Михаэлиса–Ментен, и найти взаимосвязь K_m^{app} и V^{app} в виде уравнения $K_m^{app} = K_s + V^{app}/k_1[E]_0$ (где $[E]_0$ – общая концентрация энзима, а k_1 – константа скорости образования энзим-субстратного комплекса из свободных энзима и субстрата), с помощью которого рассчитывать K_s и индивидуальные константы скорости, но это неправильно и применять 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 статье [1] было показано, что для модели Михаэлиса–Ментен, где энзиматическая реакция протекает через образование энзим-субстратного комплекса (ES) из свободных энзима E и субстрата S , а P – продукт реакции:



истинная константа Михаэлиса (K_m) определяется через константы скорости элементарных стадий k_1 , k_{-1} и k_2 [2–4]:

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

и 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 других, более сложных механизмов, подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен, зависимость начальной скорости v 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} .

В отличие от K_m в большинстве случаев K_m^{app} является функцией различных параметров энзиматической системы (констант скорости различных стадий, концентрации ин-

гибиторов, активаторов, кофакторов, рН) [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 K_m можно рассматривать как константу диссоциации (K_s) комплекса ES (см. схему (1)) [6, 7, 9–15]:

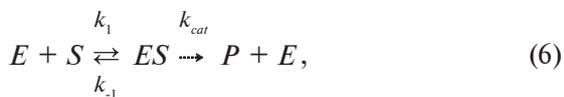
$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}. \quad (4)$$

Принимая во внимание уравнение (4), K_m может быть выражена как это представлено, например, в работах [6, 7, 14], в виде:

$$K_m = K_s + \frac{k_2}{k_1} = K_s + \frac{V}{k_1[E]_0}, \quad (5)$$

где V – предельная скорость ($V = k_2[E]_0$). Уравнение (5) справедливо только для модели Михаэлиса–Ментен. Однако часто его применяют и для более сложных энзиматических реакций.

Мне кажется, что представления о взаимосвязи K_m^{app} с K_s возникли из следующих соображений: часто механизмы сложных энзиматических реакций формально описывают схемой [8], похожей на схему (1):



из которой, аналогично подходу Бриггса–Холдейна [11], можно получить уравнение (3), где K_m^{app} выражается следующим образом [8]:

$$K_m^{app} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} = K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}. \quad (7)$$

Мы видим, что уравнение (7) подобно уравнениям (2) и (5), за исключением того, что вместо истинной константы k_2 оно включает кажущуюся константу скорости k_{cat} распада комплекса ES . Похоже на то, что в этой кажущейся константе скорости и заключены все отличия реального механизма изучаемой реакции от модельного механизма Михаэлиса–Ментен (1). В результате складывается впечатление, что для всех реакций, подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен, по уравнению (7) можно рассчитать K_m^{app} , а уравнение (2) является частным случаем более общего уравнения (7). Однако это не так.

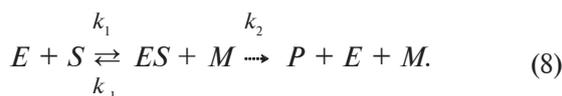
В предыдущей статье [16] на примере работы Ченса [17] было показано, что в общем случае уравнение (7) не выполняется, т.е.,

суммируя величины K_s и k_{cat}/k_1 , мы не получаем значение K_m^{app} . А поэтому утверждать, как, например, Келети [15], что K_m^{app} можно записывать в виде (7) или в виде $K_k = k_{cat}/k_1$ нет никаких оснований. А в этой статье проверим, справедливо ли последнее утверждение Келети, что при очень низких уровнях донора протонов K_m^{app} превращается в K_s . А начнем мы с исследования зависимости K_m^{app} и k_{cat} от концентрации активатора, поскольку Ченс в своей статье утверждает [17], что при увеличении концентрации малахитового зеленого в 10 раз, K_m^{app} также должна увеличиваться в 10 раз, и это дает ему возможность сравнивать рассчитанное им значение «константы Михаэлиса» (тут и далее кавычки используются для обозначения рассчитываемой Ченсом константы, которая не является ни K_m , ни K_m^{app}) равное приблизительно 0,5 мкМ при концентрации активатора $1,5 \cdot 10^{-5}$ М со значением K_m^{app} из работы Манна (5 мкМ при концентрации активатора $1,8 \cdot 10^{-4}$ М) [18]. При этом ни у Ченса, ни у Манна не приводятся зависимости K_m^{app} от концентрации активатора; Ченс представляет только линейную зависимость k_{cat} от концентрации активатора. Более того, у Ченса не упоминается о проведении экспериментов с концентрациями малахитового зеленого большими, чем 15 мМ, а у Манна – с концентрациями активатора, меньшими, чем 180 мМ; т.е. мы не видим результатов, позволяющих нам сделать вывод о возможности экстраполяции значений K_m^{app} на другую концентрацию активатора. Создается впечатление, что Ченс делает вывод о линейной зависимости K_m^{app} от концентрации активатора на основании рассчитанных по уравнению (7) значений «константы Михаэлиса»; учитывая линейную зависимость k_{cat} от концентрации активатора и то, что в его исследовании $k_{cat} \gg k_{-1}$ ($k_{cat}/k_{-1} = 25$) значение «константы Михаэлиса» действительно должно быть пропорциональным концентрации активатора.

Зависимость K_m^{app} и k_{cat} от концентрации активатора исследуем на примере реакций, протекающих по тем же механизмам, рассмотренными нами в предыдущей статье [16]. При этом для ряда реакций, протекающих по механизмам (12), (16) и (18), будут представлены результаты кинетических расчетов. Константы скорости, концентрация энзима и диапазоны концентраций субстрата и активатора, использованные для расчета кинетики накопления продукта P в этих реакциях, представлены в таблице. Система дифференциальных уравнений, описывающих кинетику, приведена в статье [19]. Значения V^{app} и K_m^{app} рассчитаны

с помощью линеаризации соответствующих уравнений, связывающих начальную скорость с концентрацией субстрата, в координатах Хейнса ($S_0/v - S_0$). $k_{cat} = V_m^{app}/[E]_0$, а время инкубации – 5 мин.

1. Реакция протекает по механизму (8). Это тот механизм, который, по мнению Ченса [17], реализуется при окислении лейкоформы малахитового зеленого пероксидом водорода в присутствии пероксидазы:



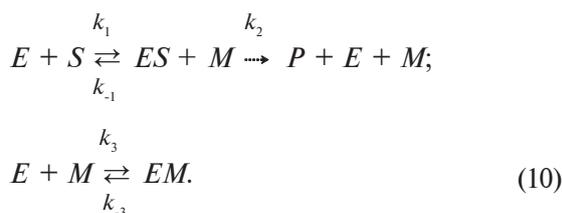
В стационарном приближении такая реакция описывается уравнением:

$$v_0 = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2 [M]_0} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{[S]_0 + (K_s + \frac{k_2 [M]_0}{k_1})} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (9)$$

где $K_s = k_{-1}/k_1$.

В рамках этой реакции k_{cat} действительно увеличивается пропорционально концентрации активатора, а K_m^{app} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора при условии $k_{cat} \gg k_{-1}$, которое, как показывает Ченс, соблюдается в присутствии использованной автором концентрации малахитового зеленого. Если же $k_{cat} \ll k_{-1}$, то K_m^{app} не будет зависеть от концентрации активатора и по величине будет сопоставима с K_s .

2. Реакция протекает по механизму:



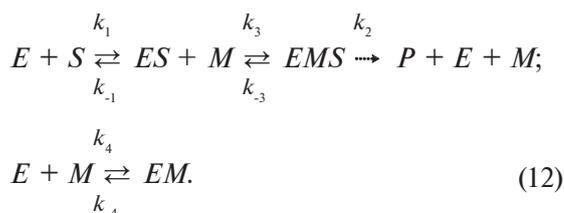
В стационарном приближении такая реакция описывается уравнением:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{[S]_0 + (K_s + \frac{k_2 [M]_0}{k_1})(1 + \frac{[M]_0}{K_s^M})} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (11)$$

где $K_s^M = k_{-3}/k_3$.

В реакциях, протекающих по данному механизму, k_{cat} также увеличивается пропорционально концентрации активатора, а K_m^{app} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора при условиях, что $[M]_0 \ll K_s^M$ и $k_{cat} \gg k_{-1}$. В случае, когда $k_{cat} \gg k_{-1}$, но $[M]_0 \gg K_s^M$, K_m^{app} будет увеличиваться пропорционально квадрату концентрации активатора.

3. Реакция протекает по механизму:



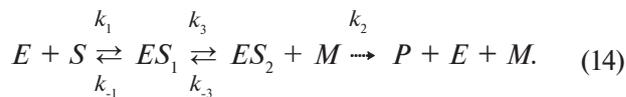
В стационарном приближении такая реакция описывается уравнением:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 (1 + \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}) + (K_m^{EMS} K_s^S + \frac{k_2 [M]_0}{k_1}) (\frac{1}{[M]_0} + \frac{1}{K_m^{EM}})} = \frac{\frac{k_2 [E]_0 [M]_0 [S]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}} [S]_0}{[S]_0 + \frac{([M]_0 + K_s^{EM})(k_{-1} K_m^{EMS} + k_2 [M]_0)}{k_1 K_s^{EM} ([M]_0 + K_m^{EMS})}} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (13)$$

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 реакций, протекающих по этому механизму, наблюдается похожая на предыдущий механизм картина: k_{cat} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора при условии $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$, а K_m^{app} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора при дополнительных условиях $[M]_0 \ll K_s^{EM}$ и $k_{cat} \gg k_{-1}$; в случае же, когда $k_{cat} \gg k_{-1}$, $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$, но $[M]_0 \gg K_s^{EM}$, K_m^{app} будет увеличиваться пропорционально квадрату концентрации активатора. Такой пример показан на рис. 1 для реакции 17 (см. табл.). Однако для этого механизма, в отличие от двух предыдущих, при больших концентрациях активатора ($[M]_0 \gg K_m^{EMS}$) величина k_{cat} перестает зависеть от концентрации активатора.

4. Реакция протекает по механизму:



В стационарном приближении такая реакция описывается уравнением:

Константи 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 девяти реакциях (№ 1–9), протекающих по механизму (16), семи реакциях (№ 10–16), протекающих по механизму (18) и одной реакции № 17 ($k_4 = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$, $k_{-4} = 1 \text{ мин}^{-1}$), протекающей по механизму (12). Система дифференциальных уравнений, описывающих кинетику, приведена в работе [19]

№	$k_1, \text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$	$k_{-1}, \text{мин}^{-1}$	$k_3, \text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$	$k_{-3}, \text{мин}^{-1}$	$k_2, \text{мин}^{-1}$	E_0, M	S_0, M	M_0, M
<i>Кинетические параметры реакций, протекающих по механизму (16)</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	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^9$	1	1	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
4	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^6$	1	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
5	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
6	$1 \cdot 10^4$	1	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
7	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^1$	5	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
8	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
9	$1 \cdot 10^6$	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 (18)</i>								
10	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^1$	5	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
11	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^4$	5	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^0$	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^0$
12	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$
13	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$
14	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^5$	5	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$
15	$1 \cdot 10^7$	1	$1 \cdot 10^5$	1	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
16	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
<i>Кинетические параметры реакций, протекающих по механизму (12)</i>								
17	$1 \cdot 10^6$	2	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-3}$

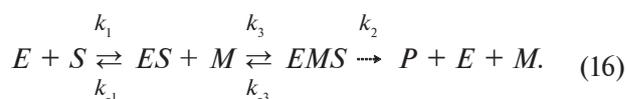
$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0[M]_0}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}} = \frac{K_s^S(1 + \frac{k_2[M]_0}{k_3}) + \frac{k_2[M]_0}{k_1}}{[S]_0 + \frac{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}}{k_1}} = \frac{V_m^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (15)$$

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

И для реакций, протекающих по такому механизму, k_{cat} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора при условии $k_2[M]_0/k_3 \ll 1 + K_s^{ES}$, а при $k_2[M]_0/k_3 \gg 1 + K_s^{ES}$ (хотя это условие и маловероятно) – не зависит от концентрации активатора. K_m^{app} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора только

при соблюдении условий $k_2[M]_0/k_3 \ll 1 + K_s^{ES}$ и $(k_{-1} + k_3)k_2[M]_0/k_1k_3 \gg K_s^S$.

5. Реакция протекает по механизму:



В стационарном приближении такая реакция описывается уравнением:

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

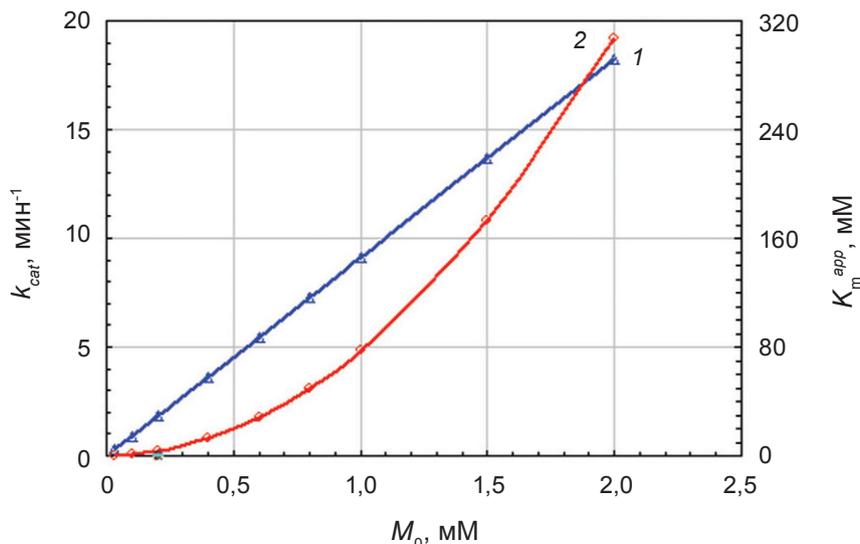


Рис. 1. Пропорциональное увеличение k_{cat} (кривая 1) и квадратичный рост K_m^{app} (кривая 2) с повышением концентрации активатора M_0 для реакции 17, протекающей по механизму (12). Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $K_m^{EMS} = 0,11 \text{ M}$, $K_s^{EM} = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$; линейность k_{cat} и квадратичный рост K_m^{app} от M_0 наблюдается при условиях $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (при этом $k_{cat} = k_2[M]_0/K_m^{EMS}$), $k_{cat} \gg k_{-1}$ и $[M]_0 \gg K_s^{EM}$

$$= \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (17)$$

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

Для реакций, протекающих по механизму (16) k_{cat} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора при условии, что $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$, а при $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$ — не зависит от концентрации активатора. K_m^{app} может увеличиваться пропорционально концентрации активатора только при соблюдении условий $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ и $K_s^S \ll k_2[M]_0/k_1 K_m^{EMS}$ или, что то же самое, $k_{cat} \gg k_{-1}$ (поскольку при $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ кажущаяся константа $k_{cat} = k_2[M]_0/K_m^{EMS}$). На рис. 2 мы можем видеть, что для реакции 2 (табл.), для которой соблюдаются указанные соотношения, действительно, k_{cat} и K_m^{app} увеличиваются пропорционально концентрации активатора. Если же $k_{cat} \ll k_{-1}$ (при соблюдении условия $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$), то хотя k_{cat} и увеличивается пропорционально концентрации активатора, величина K_m^{app} при этом остается практически неизменной и в данном случае она численно равна K_s^S . В этом можно убедиться, посмотрев соответствующие данные для реакции 1 в табл. 2 в предыдущей статье [16], а также рис. 3 в данной статье, на котором представлены результаты расчетов k_{cat} и K_m^{app} для реакции 5 (см. табл.).

В случаях, когда k_{cat} остается практически неизменной при разных концентрациях активатора

(при соблюдении условия $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$), K_m^{app} может также не зависеть от концентрации активатора (когда $k_2/k_1 \gg K_s K_m^{EMS}/[M]_0$, или, что то же самое, $k_{cat} \gg k_{-1} K_m^{EMS}/[M]_0$), поскольку в данных условиях $k_{cat} = k_2$, либо уменьшаться с увеличением его концентрации (когда $k_2/k_1 \ll K_s K_m^{EMS}/[M]_0$, или, что то же самое, $k_{cat} \ll k_{-1} K_m^{EMS}/[M]_0$). Первый случай представлен на рис. 4 на примере реакции 9 (K_m^{app} в данном случае по величине сравнима с соотношением k_2/k_1 , это можно также проверить на примерах реакций 3 и 4 из табл. 2 в предыдущей статье [16] — параметры этих реакций в настоящей статье представлены в табл. под номерами 6 и 7), а второй — на рис. 5 на примере реакции 3.

В общем случае, когда при малых концентрациях активатора $[M]_0 < K_m^{EMS}$, а при больших — $[M]_0 > K_m^{EMS}$, зависимость k_{cat} от концентрации активатора представляет собой равнобочную гиперболу (рис. 6) с пропорциональным увеличением k_{cat} при малых концентрациях активатора (в логарифмических координатах тангенс угла наклона близок к 1, а экстраполируя линейный участок на пересечение с осью ординат в точке $\lg M_0 = 0$ (т.е. $M_0 = 1 \text{ M}$), можно определить величину отрезка, отсекаемого на оси Y, который приблизительно равен $\lg(k_2/K_m^{EMS})$) и достижением предельных значений k_{cat} при высоких (пределом является значение k_2). K_m^{app} при этом может увеличиваться с ростом концентрации активатора, как в реакции 4 (рис. 7), а может и

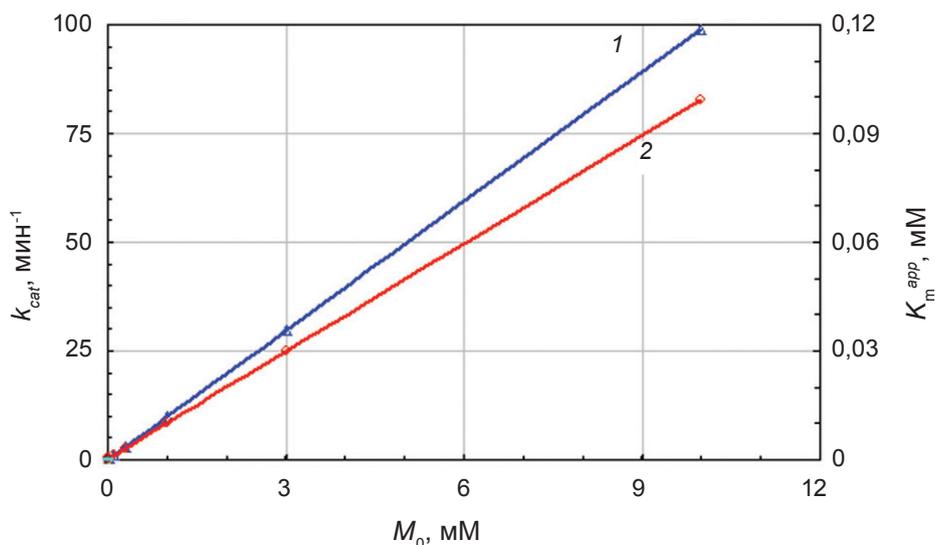


Рис. 2. Пропорциональное увеличение k_{cat} (кривая 1) и K_m^{app} (кривая 2) с ростом концентрации активатора M_0 для реакции 2, протекающей по механизму (16). Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-9}$ М, $K_m^{EMS} = 1$ М; линейность k_{cat} и K_m^{app} от M_0 наблюдается при условиях $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (при этом $k_{cat} = k_2[M]_0/K_m^{EMS}$) и $k_{cat} \gg k_{-1}$

уменьшаться, как в реакции 8 (рис. 8). Анализ уравнения (17) показывает, что при $[M]_0 \rightarrow \infty$ K_m^{app} стремится к пределу, равному k_2/k_1 . С другой стороны, при $[M]_0 \rightarrow 0$ K_m^{app} стремится к пределу, равному K_s^S . Точнее говоря, экстраполяция зависимости $K_m^{app}-[M]_0$, полученной в условиях $[M]_0 \gg [E]_0$ (с учетом которого было выведено уравнение (17)) к нулевому зна-

чению концентрации активатора дает величину K_s^S ; какая величина K_m^{app} (и ее зависимость от концентрации активатора) будет в условиях $[M]_0 \ll [E]_0$ мы не можем определить исходя из уравнения (17), поскольку оно получено для условий $[M]_0 \gg [E]_0$. Мы можем заключить, что K_m^{app} для реакций, протекающих по механизму (16), с увеличением концентрации

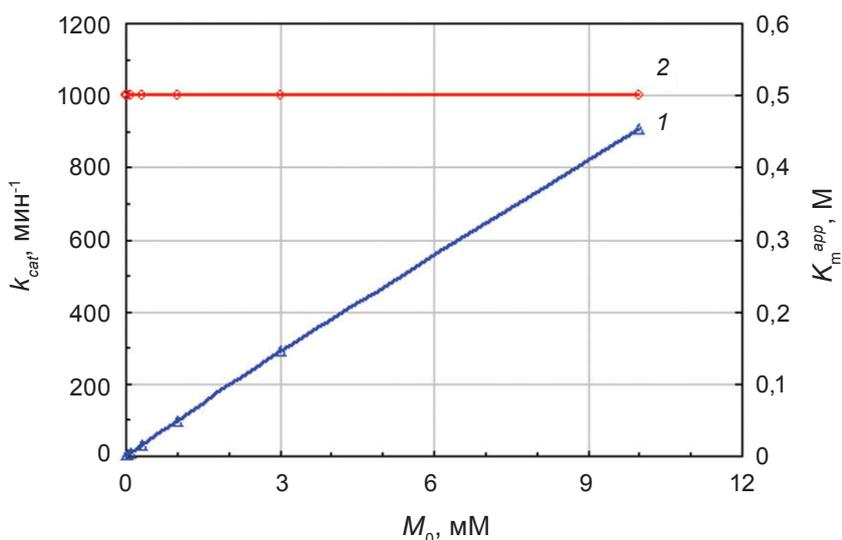


Рис. 3. Пропорциональное увеличение k_{cat} (кривая 1) и неизменность K_m^{app} (кривая 2) с ростом концентрации активатора M_0 для реакции 5, протекающей по механизму (16). Для данной реакции $K_s^S = 0,5$ М, $K_m^{EMS} = 0,1$ М, $k_2/k_1 = 0,5$ М; линейность k_{cat} и независимость K_m^{app} от M_0 наблюдается при условиях $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (при этом $k_{cat} = k_2[M]_0/K_m^{EMS}$) и $k_{cat} \ll k_{-1}$

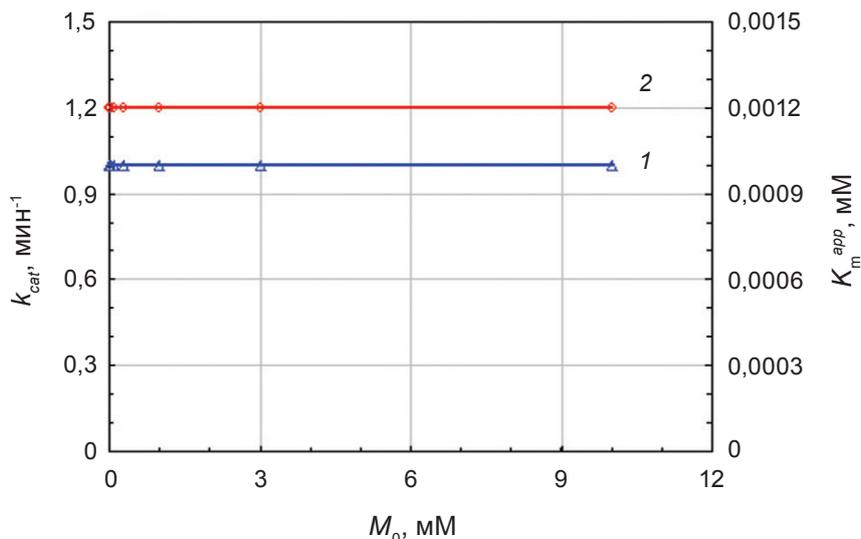


Рис. 4. Независимость k_{cat} (кривая 1) и K_m^{app} (кривая 2) с увеличением концентрации активатора M_0 для реакции 9, протекающей по механизму (16). Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-6}$ М, $K_m^{EMS} = 1,1 \cdot 10^{-8}$ М; независимость k_{cat} и K_m^{app} от M_0 наблюдается при условиях $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$ (при этом $k_{cat} = k_2$) и $k_{cat} \gg k_{-1} K_m^{EMS} / [M]_0$

активатора изменяется в пределах от величин, близких к K_s^S , до значений, определяемых соотношением k_2/k_1 . Если $K_s^S < k_2/k_1$ (т.е. $k_{-1} < k_2$), то K_m^{app} будет возрастать, а если $K_s^S > k_2/k_1$ (т.е. $k_{-1} > k_2$), то K_m^{app} с увеличением концентрации активатора будет уменьшаться. Расчеты показывают, что такое заключение близко к действительности, а форма зависимости K_m^{app} от $[M]_0$ представляет собой S-образную кривую.

Такая зависимость приведена на рис. 6 (реакция 4) в логарифмических координатах и в более широком диапазоне концентраций активатора, чем указано в табл. (от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-1}$ М). Из рис. 6 видно, что при уменьшении концентрации активатора K_m^{app} стремится к значению $1 \cdot 10^{-3}$, соответствующему величине K_s^S ($K_s^S = 1 \cdot 10^{-3}$), а с увеличением концентрации активатора — возрастает (поскольку $k_2 > k_{-1}$),

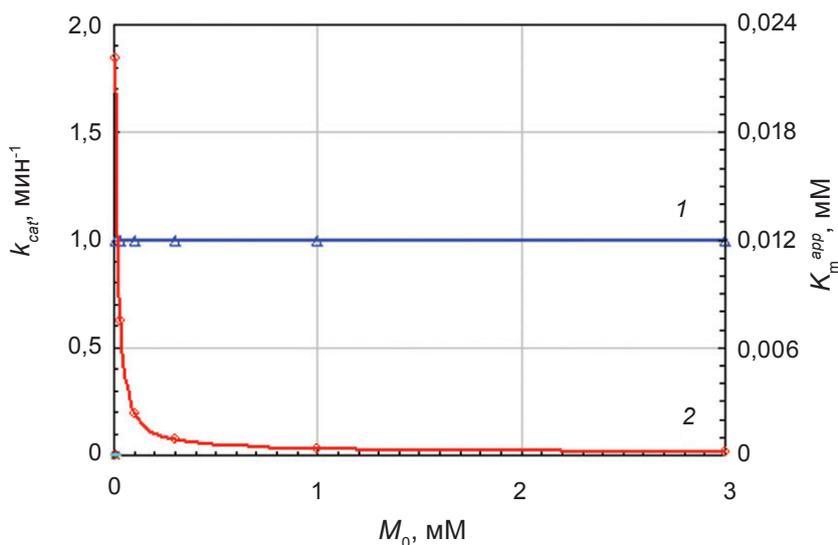
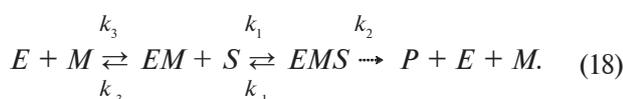


Рис. 5. Независимость k_{cat} (кривая 1) и снижение K_m^{app} (кривая 2) с увеличением концентрации активатора M_0 для реакции 3, протекающей по механизму (16). Для данной реакции $K_s^S = 0,1$ М, $K_m^{EMS} = 2 \cdot 10^{-9}$ М; независимость k_{cat} и уменьшение K_m^{app} с ростом M_0 наблюдается при условиях $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$ (при этом $k_{cat} = k_2$) и $k_{cat} \ll k_{-1} K_m^{EMS} / [M]_0$

достигая предела $1 \cdot 10^{-1}$, по величине соответствующего соотношению k_2/k_1 ($k_2/k_1 = 1 \cdot 10^{-1}$).

б. Реакция протекает по механизму:



В стационарном приближении такая реакция описывается уравнением:

$$\begin{aligned} v &= \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0\left(1 + \frac{k_2}{k_3[M]_0}\right) + K_m^{EMS}\left(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0}\right)} = \\ &= \frac{k_2 k_3 [E]_0 [M]_0 [S]_0}{k_3 [M]_0 + k_2 [S]_0} = \\ &= \frac{K_m^{EMS} K_s^M}{[S]_0 + \frac{k_3([M]_0 + K_s^M)}{k_3[M]_0 + k_2} K_m^{EMS}} = \\ &= \frac{V^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (19) \end{aligned}$$

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

Для механизма (18) также в общем случае зависимость k_{cat} от концентрации активатора представляет собой равнобочную гиперболу, с пропорциональным увеличением k_{cat} при малых концентрациях активатора и достижением предельных значений k_{cat} при высоких (пределом является значение k_2), а форма зависимости K_m^{app} от $[M]_0$ представляет собой S-образную кривую. На рис. 9 приведены результаты расчета реакции 11 (см. табл.), протекающей по механизму (18), с концентрацией энзима 1 мкМ (как в исследованиях Ченса) и в широком диапазоне концентраций активатора ($1 \cdot 10^{-9}$ –1 М); концентрацию субстрата варьировали в пределах от $1 \cdot 10^{-5}$ до 1 М. K_m^{app} , и V^{app} рассчитывали по графику Хейнса (в координатах $S_0/v - S_0$) в диапазоне концентраций субстрата 1–100 мМ (в условиях, когда $[S]_0$ превышает $[E]_0$ более чем в 1000 раз). Несмотря на то, что соотношение $[M]_0 \gg [E]_0$ в нескольких случаях не соблюдалось, все изученные зависимости в координатах Хейнса прекрасно спрямлялись.

Анализ уравнения (19) показывает, что при $[M]_0 \rightarrow \infty$ K_m^{app} стремится к пределу, равному K_m^{EMS} , а при $[M]_0 \rightarrow 0$ – к пределу, равному $k_{-3} K_m^{EMS}/k_2$. Точнее говоря, экстраполяция зависимости $K_m^{app} - [M]_0$, полученной в условиях $[M]_0 \gg [E]_0$, с учетом которого было выведено уравнение (19), к нулевому значению концентрации активатора дает величину $k_{-3} K_m^{EMS}/k_2$.

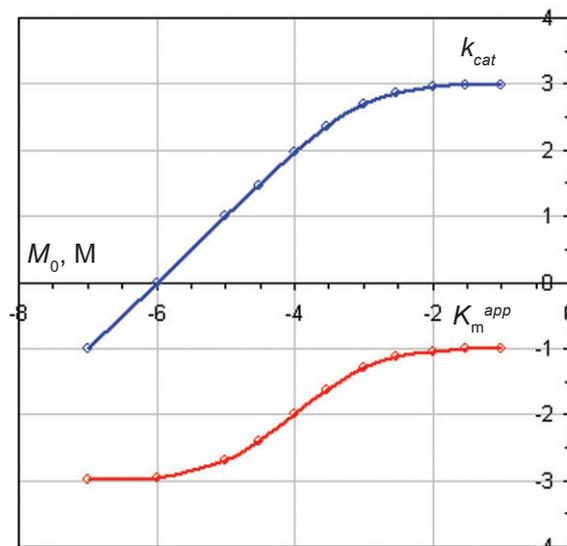


Рис. 6. Общий вид зависимостей k_{cat} и K_m^{app} от концентрации активатора M_0 (в логарифмических координатах) для реакций, протекающих по механизму (16), на примере реакции 4. Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-3}$ М, $K_m^{EMS} = 1,001 \cdot 10^{-3}$ М, $k_2/k_1 = 0,1$ М; поскольку $k_{-1} < k_2$, то K_m^{app} увеличивается с ростом M_0 от значений, близких к K_s^S до значений, близких к k_2/k_1 ; k_{cat} с ростом M_0 сначала увеличивается линейно, а затем при больших концентрациях активатора достигает предельного значения, близкого к k_2

В отличие от механизма (16), для исследуемого механизма (18) мы можем получить уравнение скорости реакции в условиях, когда $[S]_0 \gg [E]_0$ и $[M]_0 \ll [E]_0$, и посмотреть, какова будет зависимость V^{app} и K_m^{app} от концентрации активатора при ее уменьшении до уровней, значительно меньших, чем концентрация энзима:

$$\begin{aligned} v &= \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0\left(\frac{[E]_0}{[M]_0} + \frac{k_2}{k_3[M]_0}\right) + K_m^{EMS}\left(\frac{[E]_0}{[M]_0} + \frac{K_s^M}{[M]_0}\right)} = \\ &= \frac{k_2 k_3 [E]_0 [M]_0 [S]_0}{k_3 [E]_0 + k_2 [S]_0} = \\ &= \frac{K_m^{EMS} K_s^M}{[S]_0 + \frac{k_3([E]_0 + K_s^M)}{k_3[E]_0 + k_2} K_m^{EMS}}. \quad (20) \end{aligned}$$

Анализируя числитель уравнения (20), убеждаемся, что k_{cat} при малых концентрациях активатора растет пропорционально $[M]_0$ (см. рис. 9) с коэффициентом пропорциональности $k_2 k_3 [E]_0 / (k_3 [E]_0 + k_2)$, хотя, исходя из уравнения (19), кажется, что при очень малых концентрациях активатора (когда $k_3 [M]_0 \ll k_2$) k_{cat}

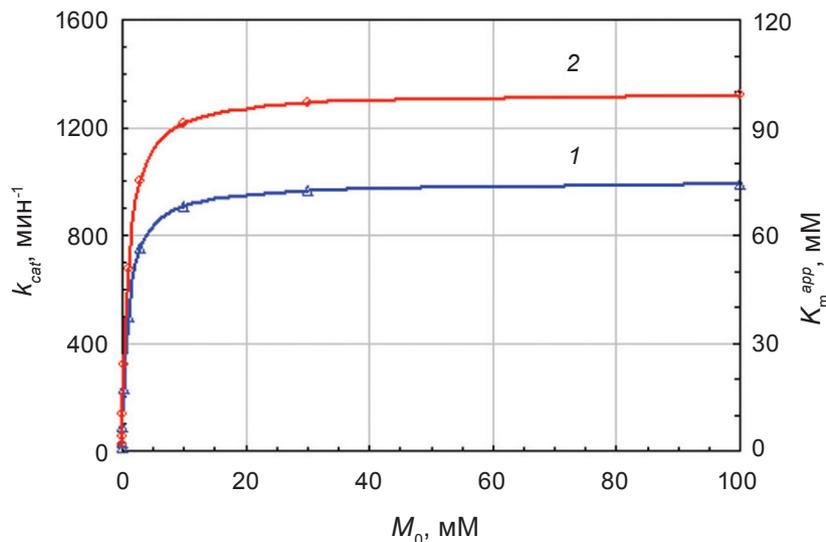


Рис. 7. Увеличение k_{cat} (кривая 1) и K_m^{app} (кривая 2) с ростом концентрации активатора M_0 для реакции 4, протекающей по механизму (16). Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-3}$ М, $K_m^{EMS} = 1,001 \cdot 10^{-3}$ М, $k_2/k_1 = 0,1$ М; увеличение K_m^{app} с ростом M_0 наблюдается при $k_{-1} < k_2$, а предельное значение K_m^{app} стремится к k_2/k_1

должна увеличиваться с ростом $[M]_0$ с коэффициентом k_3 . Величину коэффициента пропорциональности можно рассчитать по кривой $k_{cat} - [M]_0$, построенной в логарифмических координатах по отрезку (рис. 9), отсекаемому на оси ординат прямой, проходящей через точки, соответствующие минимальной концентрации активатора. Прямая, проходящая

через точки с концентрациями активатора $1 \cdot 10^{-9}$ и $1 \cdot 10^{-8}$ М, дает логарифмическое значение 6,4955, что соответствует численному значению коэффициента, равному $3,1297 \cdot 10^6$. Сравним эту величину с $k_3 = 1 \cdot 10^7$ и с $k_2 k_3 [E]_0 / (k_3 [E]_0 + k_2) = 3,3333 \cdot 10^6$: видно, что рассчитанный коэффициент значительно ближе по величине к $k_2 k_3 [E]_0 / (k_3 [E]_0 + k_2)$, чем к k_3 . Та-

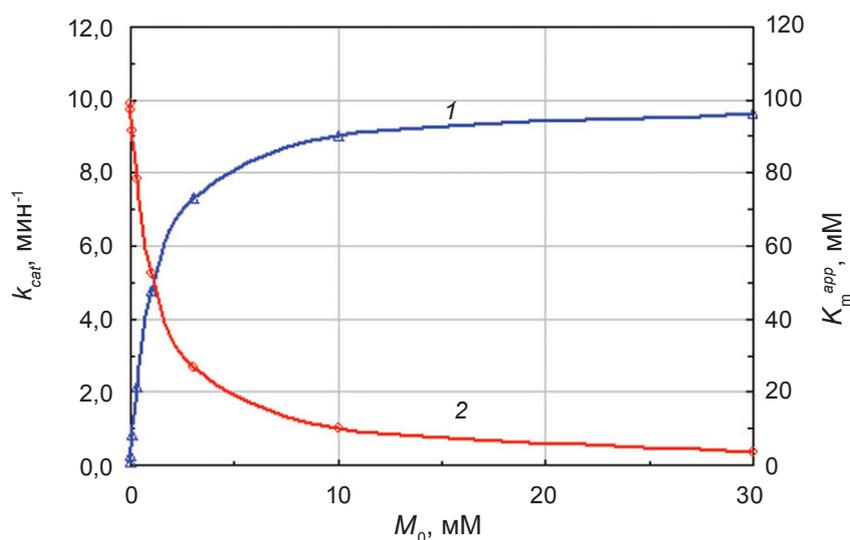


Рис. 8. Увеличение k_{cat} (кривая 1) и уменьшение K_m^{app} (кривая 2) с ростом концентрации активатора M_0 для реакции 8, протекающей по механизму (16). Для данной реакции $K_s^S = 0,1$ М, $K_m^{EMS} = 1,1 \cdot 10^{-3}$ М, $k_2/k_1 = 1 \cdot 10^{-5}$ М; уменьшение K_m^{app} с ростом M_0 наблюдается при $k_{-1} > k_2$, а предельное значение K_m^{app} при малых концентрациях активатора стремится к K_s^S (что видно из графика, построенного в двойных логарифмических координатах, но не видно из данного рисунка, представленного в обычных координатах)

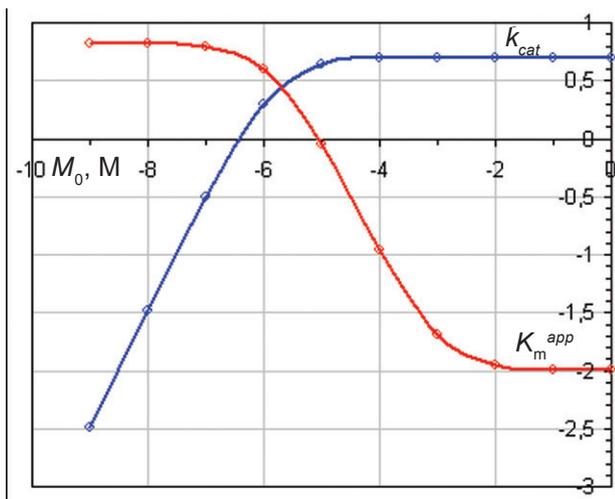


Рис. 9. Общій вид залежностей k_{cat} і K_m^{app} від концентрації активатора M_0 (в логарифмічних координатах) для реакцій (18), протекаючих по механізму (18), на прикладі реакції 11. Для даної реакції $K_s^M = 1 \cdot 10^{-3}$ М, $K_m^{EMS} = 1,005 \cdot 10^{-2}$ М, $(k_3[E]_0 + k_{-3})K_m^{EMS} / (k_3[E]_0 + k_2) = 6,7067$; K_m^{app} зменшується з ростом M_0 (оскільки $k_3 < k_{-3}$) від значень, близьких до $(k_3[E]_0 + k_{-3})K_m^{EMS} / (k_3[E]_0 + k_2)$ до значень, близьких до K_m^{EMS} ; k_{cat} з ростом M_0 спочатку збільшується лінійно, а потім при більших концентраціях активатора досягає граничного значення, близького до k_2

ким образом, екстраполяція за межі умов, прийнятих при виведенні рівняння, може призводити до великих або малих похибок.

Ще більш явно ця похибка проявляється для K_m^{app} . Раніше було відзначено, що, виходячи з рівняння (19), при $[M]_0 \rightarrow 0$ K_m^{app} наближається до граничного значення, рівного $k_{-3}K_m^{EMS}/k_2$. Ця величина становить 20,1. Як випливає з рис. 9, при малих концентраціях активатора K_m^{app} практично досягає свого граничного значення і при $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-9}$ М вона становить всього 6,61 М, т.е. в 3 рази менше теоретично передбачуваного рівнянням (19). А рівняння (20), отримане для умов $[M]_0 \ll [E]_0$, показує нам, що при малих концентраціях активатора K_m^{app} дійсно не залежить від $[M]_0$, але при цьому її величина становить 6,7067. Як бачимо, і в цьому випадку застосування рівняння (19) для розрахунку K_m^{app} в умовах, лежачих за межами допущень, призводить до неправильних результатів.

K_m^{app} може не тільки зменшуватися з ростом концентрації активатора (як на рис. 9), але і

збільшуватися (подібно тому, як це показано на рис. 6): все визначається співвідношенням констант k_2 і k_{-3} . Якщо $k_2 > k_{-3}$, то K_m^{app} збільшиться, якщо $k_2 < k_{-3}$ – зменшиться, при рівності k_2 і k_{-3} K_m^{app} не залежить від концентрації активатора.

В межах механізму (18) k_{cat} може збільшуватися пропорційно концентрації активатора за умови $k_3[M]_0 \ll k_2$. При цьому K_m^{app} може збільшуватися пропорційно концентрації активатора за додаткового умови $[M]_0 \gg K_s^M$ (реакція 13, графік не наведено: він аналогічний рис. 2), а при $[M]_0 \ll K_s^M$ не залежить від концентрації активатора (реакція 12, графік аналогічний рис. 3). При $k_3[M]_0 \gg k_2$ константа швидкості k_{cat} не залежить від концентрації активатора. При цьому K_m^{app} може також не залежит від концентрації активатора, якщо виконується додаткове умови $[M]_0 \gg K_s^M$ (реакція 10, графік аналогічний рис. 4), а при $[M]_0 < K_s^M$ – зменшуватися з зростанням $[M]_0$ (реакція 14, графік аналогічний рис. 5). В загальному ж випадку, як випливає з рис. 9, можуть зустрічатися випадки, коли k_{cat} збільшується, а K_m^{app} зменшується з ростом концентрації активатора (наприклад, в інтервалі концентрацій активатора $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ М, графік аналогічний рис. 8).

Таким чином, ми бачимо, що тільки для одного механізму (8) залежність k_{cat} і K_m^{app} від концентрації активатора (в широкому діапазоні) є пропорційною (при умові $k_{cat} \gg k_{-1}$). Для інших можливих механізмів пропорційність також можлива, але вона спостерігається тільки при певних сприятливих співвідношеннях параметрів процесу. В загальному ж випадку робити висновок про те, що якщо k_{cat} пропорційна концентрації активатора, то і K_m^{app} повинна змінюватися пропорційно концентрації активатора, неправильно, хоча, виходячи з рівняння (8) здається саме так (звичайно при умові, що $k_{cat} \gg k_{-1}$). Не слід зневажати рахунок і той факт, що Ченс проводив дослідження при концентрації пероксидази 1 мкМ, а Манн – при 0,016 мкМ, а, як було показано в статті [19], для складних реакцій з участю активатора швидкість реакції часто непропорційна концентрації ферменту, а з ростом концентрації ферменту спочатку збільшується, досягаючи максимуму, а потім зменшується.

Після аналізу можливих механізмів можна помітити, що реакції, що протікають з утворенням трійних комплексів фермент-активатор-субстрат [механізми (12), (16), (18)] показують гіперболічну залежність граничної швидкості від концентрації акти-

ватора (см. рис. 6–9), в то время как в реакциях, в которых тройной комплекс не образуется [механизмы (8), (10) и (14), поскольку для него, по-видимому, $k_2[M]_0/k_3$ должно быть значительно меньше, чем $1 + K_s^{ES}$], предельная скорость пропорциональна концентрации активатора. Ченс приводит только линейную зависимость k_{cat} от концентрации активатора (аскорбиновая кислота) в узких концентрационных пределах 0,2–3,0 мкМ (концентрация энзима была 1 мкМ, а субстрата – 4 мкМ) [17].

А вот Манн [18] приводит зависимости начальной скорости от концентрации субстрата при разных концентрациях активатора (концентрация энзима 16,6 нМ). В случае с малахитовым зеленым скорость в максимуме возрастает при увеличении концентрации активатора от 0,25 до 1 мМ (диапазон концентраций субстрата – приблизительно от 10 мкМ до 10 мМ). А в случае гваякола максимальное значение скорости постепенно увеличивается при повышении его концентрации от 0,5 мМ до 40 мМ (диапазон концентраций субстрата приблизительно от 200 мкМ до 1 М), но при 80 мМ максимальная скорость остается точно такой же, как при 40 мМ, что может быть расценено, как отсутствие пропорциональности между k_{cat} и концентрацией активатора. Если это так и другие активаторы ведут себя подобным образом, то с большой долей вероятности можно говорить о том, что механизм исследуемой реакции не соответствует механизмам (8), (10) и (14).

Учитывая все изложенное в предыдущей [16] и в этой статье, можно прийти к выводу, что все совпадения по величине рассчитанных Ченсом [17] разными способами «констант Михаэлиса» и корреляция этих значений с величинами K_m^{app} , полученными другими исследователями, являются простой случайностью. Этот вывод основан на следующих соображениях:

1. Если с помощью истинной константы k_2 по уравнению (2) можно рассчитать K_m , то, используя кажущуюся константу k_{cat} , по аналогичному по виду уравнению (7) в общем случае нельзя рассчитать K_m^{app} . Для того, чтобы применение уравнения (7) не вызывало возражений, необходимо либо доказать, что исследуемая реакция протекает по механизму (8), либо доказать, что уравнение (7) может использоваться для расчета K_m^{app} для любых реакций, протекающих с участием активаторов, или, по крайней мере, для нескольких возможных механизмов исследуемой реакции.

2. Рассчитанное значение «константы Михаэлиса» нельзя без веских оснований (а

Ченс не приводит никаких данных о зависимости экспериментально определенной K_m^{app} от концентрации активатора для исследуемой реакции) увеличивать пропорционально концентрации активатора. Поэтому совпадение по величине увеличенной таким образом «константы Михаэлиса» с K_m^{app} , определенной Манном, кажется практически невероятным, учитывая и тот факт, что, как было показано выше, в общем случае эти константы не могут быть равны, если исследуемая реакция не протекает по механизму (8).

3. Для анализа сложной реакции, которая не подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен по субстрату (а, возможно, и по активатору) Ченс применяет простое уравнение Михаэлиса–Ментен.

Поскольку уравнение (7) в общем случае не выполняется, то утверждать, что K_m^{app} можно записывать в виде уравнения (7) или в виде $K_k = k_{cat}/k_1$ нет никаких оснований. Такие соотношения могут выполняться только для отдельных механизмов или при благоприятных соотношениях параметров энзиматического процесса.

А вот утверждение, что при малых концентрациях активатора K_m^{app} равна K_s комплекса ES (для реакций, в которых субстрат практически не превращается при отсутствии активатора) проверим на другом примере, на зависимости, вытекающей из уравнения (7) и связывающей K_m^{app} с K_s и предельной скоростью. Эту зависимость рекомендуют применять (в виде графика зависимости K_m^{app} от V^{app}) для расчета всех констант скорости, входящих в уравнение Михаэлиса–Ментен [6, 7, 14]:

$$K_m^{app} = K_s + \frac{V^{app}}{k_1[E]_0}. \quad (21)$$

Считается, что это уравнение применимо в случае исследования реакций, протекающих с участием активаторов [7]. При этом логика такова: без активатора реакция не идет (т.е. образуется только комплекс ES , который без активатора не способен распасться до продуктов, по крайней мере, с заметной скоростью) и комплекс ES находится в равновесии с несвязанными формами энзима и субстрата, что позволяет описывать это равновесие с помощью константы диссоциации этого комплекса; использование активатора позволяет «увеличивать скорость распада энзим-субстратного комплекса» ($k_{cat} = k_2[M]_0$), причем эта скорость линейно увеличивается с увеличением концентрации активатора (а, соответственно, уве-

личивається і K_m^{app}); поэтому, уменьшая концентрацию активатора до нуля, можно прийти до точки, когда комплекс ES перестанет распадаться до продукта P и в этой точке K_m^{app} будет численно равна K_s^S , поскольку константа скорости распада комплекса ES в отсутствие активатора практически равна нулю. Графически это выглядит следующим образом: для различных концентраций активатора (и одной и той же концентрации энзима) строят график зависимости K_m^{app} от V^{app} и экстраполируют полученную линейную зависимость к нулевой предельной скорости; при этом на оси ординат прямая отсекает отрезок, величина которого, как считают, численно равна K_s^S комплекса ES (метод Слейтера–Боннера [7, 14, 20]).

С первого взгляда логика рассуждений кажется правильной, но мы проверим справедливость уравнения (21) на тех же примерах, что и ранее.

Из уравнения (17), описывающего реакции, протекающие по механизму (16), следует, что когда концентрация активатора стремится к нулю, предельная скорость также стремится к нулю, а K_m^{app} стремится к K_s^S . Однако, помня, что экстраполяция за пределы диапазона концентраций, для которого было выведено кинетическое уравнение, может привести к ошибочным результатам, проверим полученный вывод с помощью расчетов. На рис. 10 приведен результат расчетов реакции 4. Кажется, что график прекрасно согласуется с уравнением (21): точки хорошо укладываются на прямую, с увеличением V^{app} увеличивается и K_m^{app} , тангенс угла наклона прямой равен $1/k_1[E]_0$ и, действительно, на оси ординат прямая отсекает отрезок, численно равный K_s^S . Однако на самом деле все сложнее.

На рис. 11 представлен график зависимости K_m^{app} от V^{app} для реакции 8. Здесь также точки хорошо укладываются на прямую и отрезок, отсекаемый ею на оси ординат численно равен K_s^S , но прямая имеет отрицательный тангенс угла наклона, чего в соответствии с уравнением (21) не может быть, поскольку все параметры уравнения являются положительными числами. Кроме знака еще и числовое значение тангенса ($-9,998 \cdot 10^6$) значительно отличается от $1/k_1[E]_0$ (равного $1 \cdot 10^3$). В чем тут дело выясняется после анализа уравнения (17). Оказывается, что для реакций, протекающих по механизму (16) тангенс угла наклона зависимости K_m^{app} от V^{app} составляет не $1/k_1[E]_0$, а

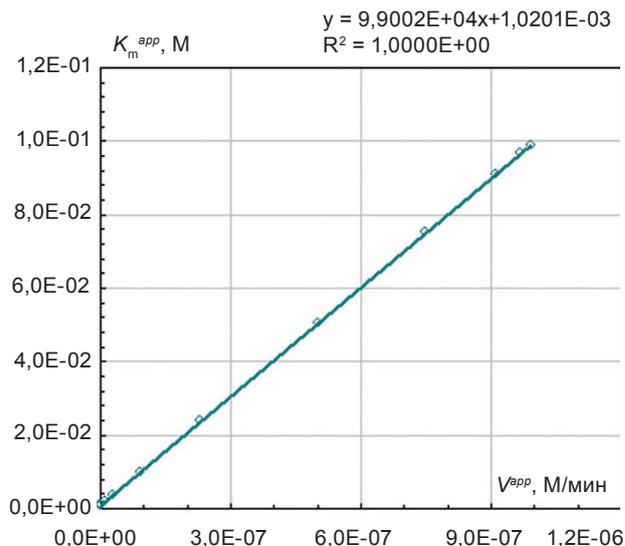


Рис. 10. Линейная зависимость K_m^{app} от V^{app} для реакций, протекающих по механизму (16), на примере реакции 4. Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-3}$ М, $K_m^{EMS} = 1,001 \cdot 10^{-3}$ М; когда M_0 стремится к нулю, V^{app} также стремится к нулю, а K_m^{app} стремится к K_s^S ; тангенс угла наклона прямой положительный, поскольку $k_2 > k_1$

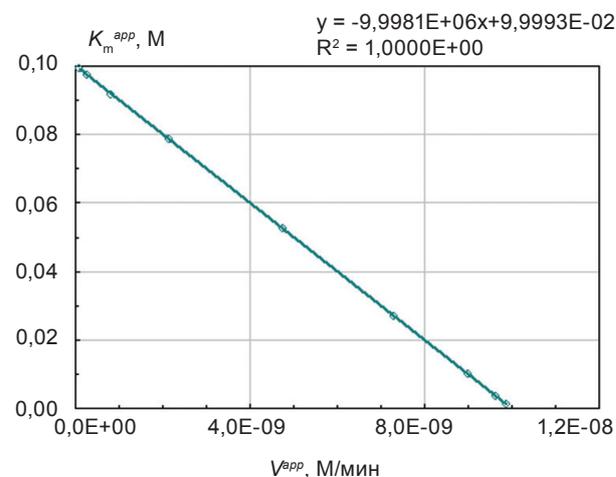


Рис. 11. Линейная зависимость K_m^{app} от V^{app} для реакций, протекающих по механизму (16), на примере реакции 8. Для данной реакции $K_s^S = 0,1$ М, $K_m^{EMS} = 1,1 \cdot 10^{-3}$ М; когда M_0 стремится к нулю, V^{app} также стремится к нулю, а K_m^{app} стремится к K_s^S ; тангенс угла наклона прямой отрицательный, поскольку $k_2 < k_1$

$$tg\alpha = \frac{1}{k_1[E]_0} - \frac{K_s^S}{k_2[E]_0} = \frac{1 - \frac{k_{-1}}{k_2}}{k_1[E]_0} = \frac{k_2 - k_{-1}}{k_1 k_2 [E]_0} \quad (22)$$

Таким образом, взаимосвязь между K_m^{app} и V^{app} для реакций, протекающих по механизму (16), выражается не уравнением (21), а следующим соотношением:

$$K_m^{app} = K_s + \frac{V^{app}}{k_1[E]_0} \left(1 - \frac{k_{-1}}{k_2}\right). \quad (23)$$

Из выражения для тангенса (22) вытекает, что в зависимости от соотношения констант k_2 и k_{-1} тангенс может быть либо положительным, либо отрицательным.

Бывают также случаи, когда на оси ординат прямая отсекает отрезок, величина которого значительно отличается от K_s^S . Такой случай показан на рис. 12 для реакции 2. Он похож на тот вариант, который представлял себе Ченс [17]: и V^{app} и K_m^{app} увеличиваются пропорционально концентрации активатора (рис. 2); однако расчетная величина K_s^S отличается (в большую сторону) от истинной в 200 раз. В нашей предыдущей статье [16] был приведен пример (табл. 2, реакция 6 – параметры этой реакции приведены в данной статье в табл. под № 9), когда величина K_m^{app} , которая должна быть численно равна K_s^S , превышает ее на 20%. Если для реакции 6 построить график зависимости K_m^{app} от V^{app} , хотя V^{app} изменяется незначительно (расчетные данные были приведены в табл. 2 (реакция № 3) предыдущей статьи [16]), то отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат также оказывается на 20% больше, чем соответствующее значение K_s^S .

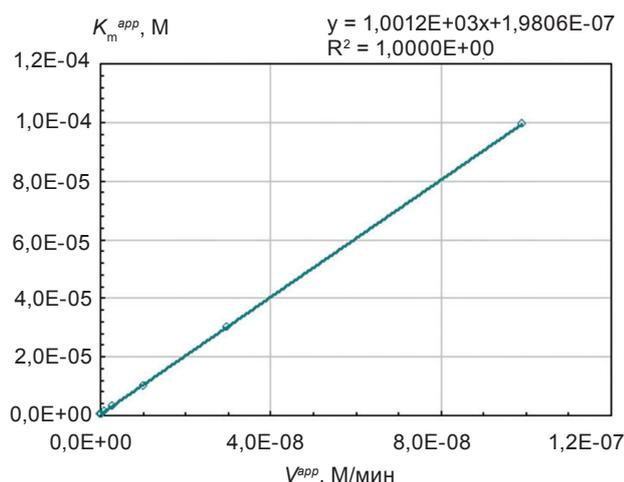


Рис. 12. Линейная зависимость K_m^{app} от V^{app} для реакций, протекающих по механизму (16), на примере реакции 2. Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-9}$ М, $K_m^{EMS} = 1$ М; прямая отсекает на оси ординат отрезок, величина которого в 200 раз больше, чем K_s^S

Таким образом, при исследовании реакций, протекающих по механизму (16), для расчета константы k_1 нельзя пользоваться уравнением (21) (поскольку тангенс угла наклона определяется уравнением (22); уравнение (21) может быть справедливо только при условии $k_{-1} \ll k_2$), его можно применять для графического расчета величины K_s^S , но при этом также нужно помнить, что возможны случаи, когда и этот параметр определяется с большой погрешностью.

Для реакций, протекающих по механизму (8), уравнение (21) применимо для построения графика и определения значения K_s и других констант – индивидуальных кинетических констант скорости.

Для реакций, протекающих по механизму (14), предельная скорость стремится к нулю при уменьшении концентрации активатора, однако K_m^{app} при этом стремится к $K_s^S/(1 + K_s^{ES})$. Поэтому отрезок, отсекаемый на оси ординат, может быть численно равен K_s^S только при условии $K_s^{ES} \ll 1$. Тангенс угла наклона зависимости K_m^{app} от V^{app} для данной реакции равен не $1/k_1[E]_0$, а

$$\begin{aligned} \operatorname{tg} \alpha &= \frac{1}{k_1[E]_0} + \frac{K_s^S K_s^{ES}}{k_3[E]_0(1 + K_s^{ES})} = \\ &= \frac{1}{k_1[E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1} K_s^{ES}}{k_3 + k_{-3}}\right) = \\ &= \frac{1}{k_1[E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1} k_{-3}}{k_3(k_3 + k_{-3})}\right). \end{aligned} \quad (24)$$

Таким образом, взаимосвязь между K_m^{app} и V^{app} для реакций, протекающих по механизму (14), выражается не уравнением (21), а следующим соотношением:

$$\begin{aligned} K_m^{app} &= \frac{K_s}{(1 + K_s^{ES})} + \\ &+ \frac{V^{app}}{k_1[E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1} k_{-3}}{k_3(k_3 + k_{-3})}\right). \end{aligned} \quad (25)$$

При проведении анализа по уравнению (13) реакций, протекающих в соответствии с механизмом (12), кажется, что когда концентрация активатора стремится к нулю, предельная скорость также стремится к нулю, а K_m^{app} стремится к K_s^S . Однако, это, по-видимому, может выполняться только при соблюдении условий строгой линейности K_m^{app} и V^{app} от

концентрации активатора, о которых упоминалось выше. В других условиях зависимость K_m^{app} от V^{app} нелинейна (в предельном случае – квадратична), поэтому трудно осуществить линейную экстраполяцию в область малых концентраций активатора с целью вычисления K_s^S . На рис. 13 показана такая нелинейная зависимость K_m^{app} от V^{app} для реакции (17). Можно сделать вывод, что для реакций, протекающих по механизму (12) уравнение (21) в общем случае неприменимо.

Для реакции (10) уравнение (21) также в общем случае неприменимо для построения графика и определения значения константы диссоциации комплекса ES , поскольку, как и в предыдущем случае, зависимость K_m^{app} от V^{app} нелинейна. Уравнение (21) может быть справедливым только при условии соблюдения соотношений $[M]_0 \ll K_s^M$ и $k_{cat} \gg k_{-1}$, когда зависимости K_m^{app} и V^{app} от концентрации активатора должны быть линейными.

Теперь проанализируем случай, когда энзим сам не катализирует превращение субстрата, но присутствие активатора способствует его расщеплению до продуктов. При этом мы можем считать, что превращение происходит через формирование комплекса ES , распаду которого помогает активатор, но непосредственно образование комплекса ES доказать не можем (или полагаем, что по-другому реакция протекать не может). Реальный же механизм изучаемой реакции выражается схемой (18).

Для рассматриваемой реакции K_m^{app} и V^{app} изменяются при изменении концентрации активатора, поэтому по уравнению (21) можно построить график зависимости K_m^{app} от V^{app} и рассчитать все кинетические константы, однако эти константы не будут иметь ничего общего с теми константами, которые мы хотели определить, поскольку в данном механизме нет ни одной стадии, аналогичной тем, которые составляют механизм (6), в том числе и стадии образования комплекса ES .

Как следует из уравнения (19), V^{app} стремится к нулю при уменьшении M_0 ; при этом K_m^{app} стремится к значению $k_3 K_s^M K_m^{EMS} / k_2$ или $k_3 K_m^{EMS} / k_2$. Отсюда следует, что численное значение отсекаемого на оси ординат отрезка в общем случае не соответствует ни константе диссоциации k_{-1} / k_1 , ни константе диссоциации k_{-3} / k_3 , ни, тем более, «константе диссоциации энзим-субстратного комплекса», который в рамках данной реакции не образуется. Только в случае, когда для механизма (18) соблюдаются соотношения констант $k_{-1} = k_{-3}$ и $k_{-1} \ll k_2$ (рис. 14, кривая 1) или $k_2 = k_{-3}$ и $k_{-1} \gg k_2$, величина отсекаемого отрезка на оси ординат

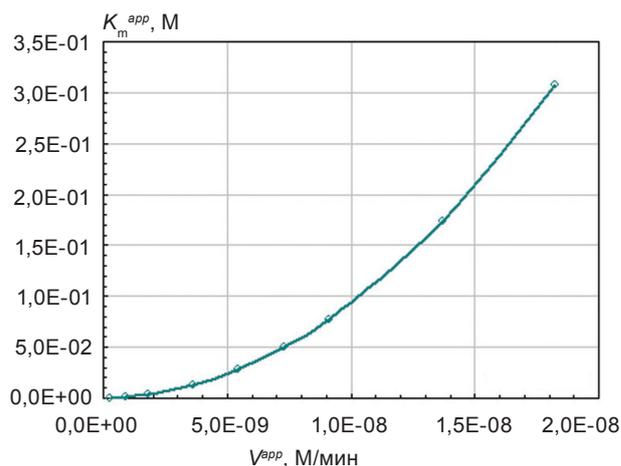


Рис. 13. Квадратичная зависимость K_m^{app} от V^{app} для реакции 17, протекающей по механизму (12). Для данной реакции $K_s^S = 1 \cdot 10^{-8}$ М, $K_m^{EMS} = 0,11$ М, $K_s^{EM} = 1 \cdot 10^{-7}$ М; квадратичная зависимость K_m^{app} от V^{app} наблюдается в условиях $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (при этом $k_{cat} = k_2[M]_0 / K_m^{EMS}$), $k_{cat} \gg k_{-1}$ и $[M]_0 \gg K_s^{EM}$

будет численно равна константе диссоциации k_{-1} / k_1 , а при соблюдении соотношений $k_1 = k_3$ и $k_{-1} \ll k_2$ – константе диссоциации k_{-3} / k_3 (рис. 4, кривая 2). Тангенс угла наклона зависимости K_m^{app} от V^{app} для реакций, протекающих по механизму (18) также равен не $1/k_1[E]_0$, а

$$\begin{aligned}
 \operatorname{tg} \alpha &= \frac{K_m^{EMS} (k_2 - k_{-3})}{k_2^2 [E]_0} = \frac{1}{k_1 [E]_0} + \frac{K_s^S}{k_2 [E]_0} - \\
 &- \frac{k_{-3}}{k_2 [E]_0} \left(\frac{1}{k_1} + \frac{K_s^S}{k_2} \right) = \\
 &= \frac{1}{k_1 [E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2} \right) \left(1 - \frac{k_{-3}}{k_2} \right). \quad (26)
 \end{aligned}$$

Таким образом, взаимосвязь между K_m^{app} и V^{app} для реакций, протекающих по механизму (18), выражается не уравнением (21), а, что более точно, следующим соотношением:

$$K_m^{app} = \frac{k_{-3} K_m^{EMS}}{k_2} + \frac{V^{app}}{k_1 [E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2} \right) \left(1 - \frac{k_{-3}}{k_2} \right). \quad (27)$$

Как видим, для реакций, протекающих по механизму (18) в общем случае уравнение (21) не может применяться для определения истинных констант диссоциации комплексов EM и EMS (комплекс ES в данной реакции не образуется).

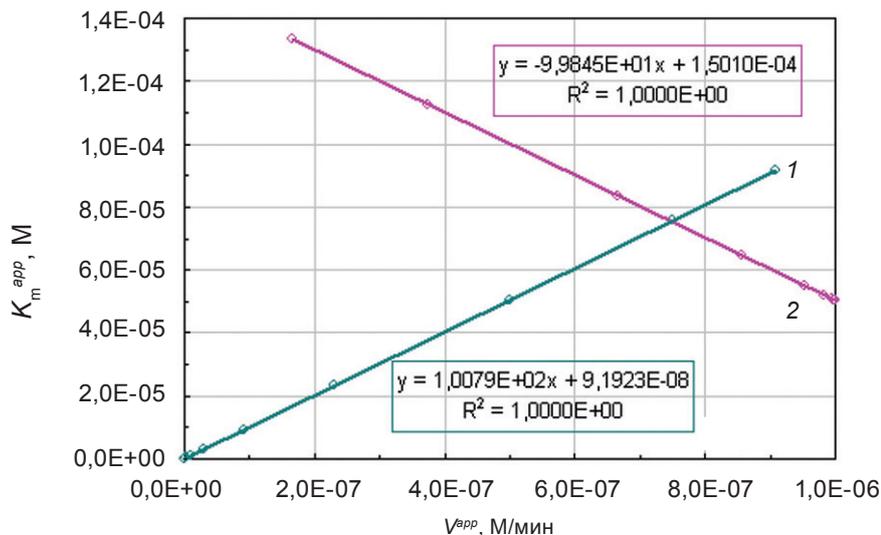


Рис. 14. Линейная зависимость K_m^{app} от V^{app} для реакций, протекающих по механизму (18), на примере реакций 15 (кривая 1) и 16 (кривая 2). Для реакции 15 $K_s^M = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $K_m^{EMS} = 1,001 \cdot 10^{-2}$ М, $K_s^S = 1 \cdot 10^{-7}$ М, а для реакции 16 $K_s^M = 1,5 \cdot 10^{-4}$ М, $K_m^{EMS} = 5 \cdot 10^{-5}$ М, $K_s^S = 5 \cdot 10^{-7}$ М; прямая 1 отсекает на оси ординат отрезок, численно равный K_s^S , а прямая 2 — численно равный K_s^M

Можно сделать вывод, что уравнение (21) применимо только для исследования некоторых реакций с участием активаторов: из проанализированных в данной статье механизмов только для реакций, протекающих по механизму (8) расчет K_s и индивидуальных констант скорости может быть проведен с помощью уравнения (21). Для реакций с участием активаторов, протекающих по другим механизмам, уравнение (21) может выполняться только при определенных благоприятных соотношениях констант скорости элементарных стадий. Для того чтобы его применять, необходимо убедиться в том, что комплекс ES действительно образуется, а также проанализировать реальный механизм исследуемой реакции с тем, чтобы установить, действительно ли зависимость K_m^{app} от V^{app} прямолинейна, действительно ли эта прямая отсекает на оси ординат отрезок, численно равный истинной K_s комплекса ES и действительно ли тангенс угла наклона данной прямой будет выражаться величиной $1/k_1[E]_0$. В противном случае, определяя графически истинную K_s комплекса ES и индивидуальные константы скорости, мы можем получить совершенно другие их численные значения и на основе этих данных сделать неправильные выводы.

ПРО ІСТИННІ ТА УЯВНІ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА В ЕНЗИМОЛОГІЇ. ІІІ. ЧИ ІСНУЄ ЛІНІЙНА ЗАЛЕЖНІСТЬ МІЖ УЯВНОЮ КОНСТАНТОЮ МІХАЕЛІСА ТА ГРАНИЧНОЮ ШВИДКІСТЮ ТА ЧИ МОЖНА З ЇЇ ДОПОМОГОЮ ВИЗНАЧАТИ ВЕЛИЧИНУ СУБСТРАТНОЇ КОНСТАНТИ?

С. О. Карахим

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

В статті наведено критичний аналіз методу Слейтера–Боннера, який застосовується для графічного визначення субстратної константи (K_s) за лінійною залежністю уявної константи Міхаеліса (K_m^{app}) від граничної швидкості (V^{app}) ензиматичних реакцій, що відбуваються за участю активаторів. Показано, що, хоча формально можна записати механізми таких реакцій у вигляді схеми, аналогічній моделі Міхаеліса–Ментен, і знайти взаємозв'язок K_m^{app} і V^{app} у вигляді рівняння $K_m^{app} = K_s + V^{app}/k_1[E]_0$ (де $[E]_0$ — загальна концентрація ензиму, а k_1 — константа швидкості утворення ензим-субстратного комплексу з вільних ензиму та суб-

страту), з допомогою якого розраховувати K_s та індивідуальні константи швидкості (k_1 , k_{-1}), проте це неправильно і застосовувати 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 у разі сприятливих співвідношень кінетичних параметрів ензиматичних реакцій.

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

ON TRUE AND APPARENT MICHAELIS CONSTANTS IN ENZYMOLOGY. III. IS IT LINEAR DEPENDENCE BETWEEN APPARENT MICHAELIS CONSTANT AND LIMITING RATE AND IS IT POSSIBLE TO DETERMINE THE SUBSTRATE CONSTANT VALUE USING THIS DEPENDENCE?

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 Slater-Bonner method which is used for graphic determination of substrate constant (K_s) by linear dependence of apparent Michaelis constant (K_m^{app}) on the limiting rate (V^{app}) of enzyme-catalysed reactions with activator participation has been critically analysed. It has been shown that although it is possible to record the mechanisms of such reactions as a scheme similar to Michaelis-Menten model which allow to find correlation K_m^{app} and V^{app} as equation $K_m^{app} = K_s + V^{app}/k_1[E]_0$ ($[E]_0$ is a total enzyme concentration, k_1 is a rate constant of enzyme-substrate complex formation from free enzyme and substrate) in order to calculate K_s and individual rate constants (k_1 , k_{-1}), but this approach for investigation of all reactions with activator participation ought not to be used. The above equation is not obeyed in general, it may be true for some mechanisms only or under certain ratios of kinetic parameters of enzyme-catalysed reactions.

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

1. *Karakhim S. A.* // 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. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 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. *Кнорре 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. – P. 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. – 350с.
16. *Karakhim S. A.* // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 2. – С. 93–104.
17. *Chance B.* // J. Biol. Chem. – 1943. – **151**. – P. 553–577.
18. *Mann P. J. G.* // Biochem. J. – 1931. – **25**(3). – P. 918–930.
19. *Karakhim S. A., Горчев В. Ф.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 149–162.
20. *Slater E. C., Bonner W. D.* // Biochem. J. – 1952. – **52**(2). – P. 185–196.

Отримано 30.06.2011