

## Лекція 6 - Методи визначення константи Міхаеліса та максимальної швидкості реакції. Мультисубстратні реакції

Питання для розгляду

Типові залежності початкової стаціонарної швидкості реакції від концентрації субстрату

Інгібування й активація надлишком субстрат

Основні кінетичні константи ферментів та методи їхнього визначення:

- ✓ Лайнуївера-Берка
- ✓ Вульфа-Хейнса
- ✓ Іді-Хофсті

Обмеження кінетики Міхаеліса-Ментен

Мультисубстратні ферментативні реакції

В основі кінетичного аналізу ферментативних процесів лежить припущення про те, що між ферментом E і субстратом B оборотно утвориться проміжний продукт - фермент-субстратний комплекс ES, який необоротно перетворюється на продукт P з константою швидкості першого порядку:



Рівняння початкової швидкості реакції отримали Бріггс і Холдейн, але назвали його рівнянням Міхаеліса-Ментен на честь класичних досліджень цих вчених, які запропонували можливу схему ферментативної реакції і заклали основи сучасної ензимології.

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$K_m$  - кінетична константа з розмірністю концентрації, яка дорівнює такої концентрації субстрату, при якій швидкість ферментативної реакції складає половину від максимального значення і половина вихідної кількості ферменту виявляється пов'язаною в фермент-субстратний комплекс. Чисельне значення  $K_m$  залежить від багатьох чинників - рН, температури, присутності інгібіторів або активаторів - і змінюється в досить широких межах - приблизно від 1 до  $10^{-8}$  моль / л.

Проаналізуємо рівняння

$$V_0 = (V_{max} [S]) / (K_m + [S])$$

для початкової швидкості реакції при різних початкових концентраціях субстрату.

У разі, коли початкова концентрація субстрату мала в порівняно з константою Міхаеліса,  $[S]_0 \ll K_m$ , то ферментативна реакція має перший порядок як за ферментом, так і за субстратом (лінійна залежність).



Рис.1 – Реакція 1 порядку за концентрацією ферменту

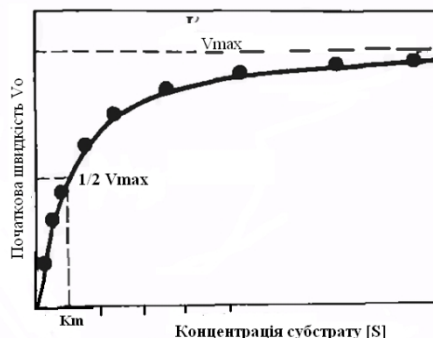


Рис. 2 – Лінійна частина кривої - реакція 1 порядку за концентрацією субстрата

При великих концентраціях субстрату  $[S]_0 \gg [E]_0$  початкова швидкість реакції не залежить від концентрації субстрату (реакція має нульовий порядок по субстрату) і називається максимальною швидкістю ферментативної реакції -  $V_{max}$ . Цей ефект зветься субстратне насичення і обумовлений практично повним зв'язуванням всього наявного в системі ферменту в фермент-субстратний комплекс, тому його концентрація, а, отже, і спостерігається швидкість реакції, перестає залежати від концентрації субстрату (рис.3). Початкова стадія реакції (коли кількість продукту можна знехтувати), проводиться в умовах надлишку субстрату порівняно з ферментом  $[S]_0 \gg [E]_0$  то зменшенням концентрації субстрату можна знехтувати.

Про тривалість початкової стадії, тобто про те, що в інкубаційній суміші має місце переважання субстрату, свідчить лінійна залежність в координатах час-приріст оптичної щільності (фотометричне визначення активності ферменту)

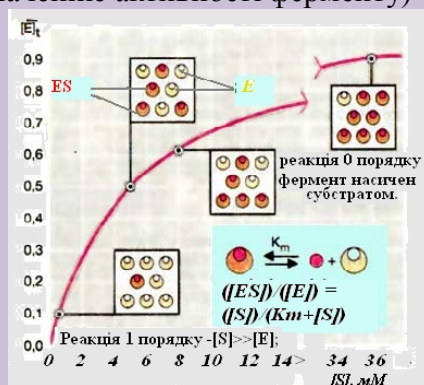


Рис.3 – Вплив концентрації субстрату на швидкість ферментативної реакції. Надлишок субстрату може інгібувати швидкість реакції (рис.4):

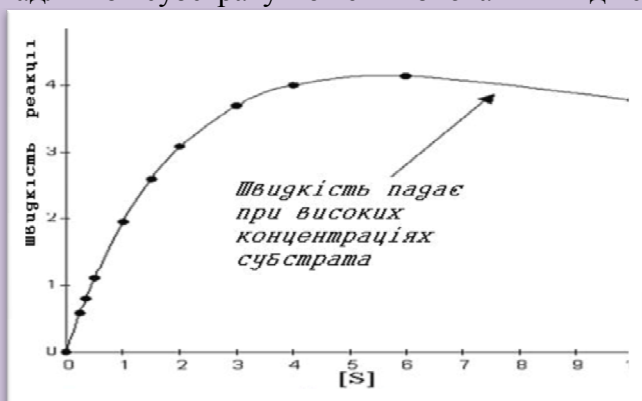


Рис.4 – Інгібуюча дія надлишку субстрату на швидкість реакції

### Визначення $V_{max}$ і $K_m$

На рис. 2 представлена залежність початкової швидкості ферментативної реакції від початкової концентрації субстрату і графічне визначення  $V_{max}$  і  $K_m$ .

Однак побудова такого графіка не використовується для експериментального визначення максимальної швидкості реакції і константи Міхаеліса, т. я. в експерименті нерідко складно досягти субстратного насичення (і навіть якщо воно досягнуто, то визначити параметри з кривої з насиченням буває досить важко). Величини  $V_{max}$  і  $K_m$  зазвичай знаходять одним з трьох способів, заснованих на перетворенні рівняння Міхаеліса-Ментен до лінійного вигляду, зручному для обробки експериментальних даних.

1) Координати Лайнуївера-Берка, або подвійні зворотні координати. Лінійне рівняння виходить з рівняння  $(ES) / [E] = ([S]) / (K_m + [S])$  при заміні розглянутих величин на зворотні:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Графічно ця форма залежності наведена на рис.4а. Максимальну швидкість можна визначити по відрізьку, який відсікається на осі ординат -  $\frac{1}{v_{max}}$ , а константу Міхаеліса можна обчислити або по тангенсу кута нахилу прямої, рівному  $\frac{K_m}{v_{max}}$ , або за негативному відрізьку, який відсікається на осі абсцис(рис.5а). Ці координати найбільш часто використовуються на практиці, незважаючи на те, що це найменш точний метод визначення параметрів рівняння Міхаеліса-Ментен: якщо початкову концентрацію субстрату [S] варьють з постійним кроком, то координати Лайнуївера-Берка призводять до дуже нерівномірного розподілу експериментальних точок на прямій, що знижує точність визначення параметрів.

2) *Координати Вульфа-Хейнса.* Друга форма лінійного рівняння впливає з попередньої при множенні обох частин рівняння на [S]<sub>0</sub>:

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{[S]_0}{v_{max}}$$

Графічна інтерпретація цього рівняння наведена на рис. 5b.

Відрізьку, що відсікається на осі абсцис, дорівнює - K<sub>m</sub>, на осі ординат

-  $\frac{K_m}{v_{max}}$ , тангенс кута нахилу прямої дорівнює-  $\frac{1}{v_{max}}$ . ( рис. 5b).

3) *Координати Іді—Хофсті.* Після множення обох частин рівняння  $\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{[S]_0}{v_{max}}$

на ( $v_{max} \cdot v_0$ ) отримуємо рівняння  $v_0 = v_{max} - K_m \cdot \frac{v_0}{[S]_0}$

Побудова графіка в координатах  $v_0$  проти  $\frac{v_0}{[S]_0}$  дає пряму лінію, тангенс кута нахилу якої дорівнює-K<sub>m</sub>, відрізьку, що відсікається на осі ординат, відповідає  $v_{max}$ (рис 5c).

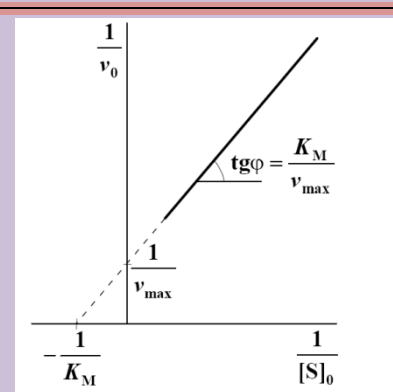


Рис.5а – Графічне визначення  $v_{max}$  і  $K_m$  у координатах Лайнуївера-Берка

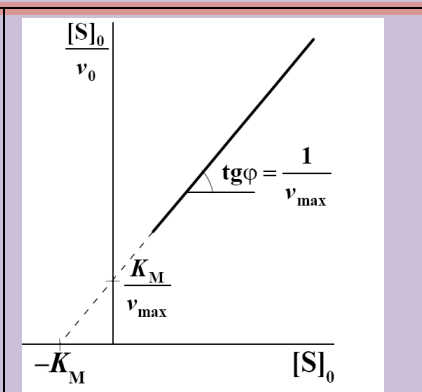


Рис.5b – Графічне визначення  $v_{max}$  і  $K_m$  у координатах Вульфа-Хейнса

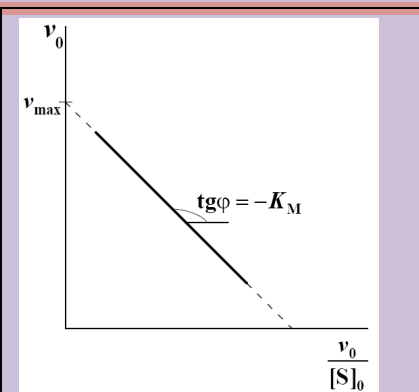


Рис.5c – Графічне визначення  $v_{max}$  і  $K_m$  у координатах Іді-Хофсті

Якщо при обробці дослідних даних яким-небудь з трьох запропонованих способів отримана лінійна залежність, це ще не означає, що реакція протікає по простому механізму, запропонованого Міхаелісом і Ментен, тобто з утворенням проміжних комплексів ферменту з субстратом.

### Обмеження кінетики Міхаеліса-Ментен

Міхаеліс і Ментен вивели рівняння з урахуванням двох припущень: рівновага, що швидко встановлюється, і надлишок субстрату. Пізніше було показано, що рівняння справедливе, тобто добре описує реакцію, при виконанні всіх наступних умов.

7 основних постулатів для виконання рівняння Міхаеліса-Ментен.

1. У ході реакції утворюється кінетично стійкий фермент-субстратний комплекс.
2. Визначувана за допомогою рівняння константа  $K_m$  є константою дисоціації фермент - субстратного комплексу: це справедливо, тільки якщо  $k_2 \ll k_1, k_{-1}$ .

3. Концентрація субстрату не змінюється в ході реакції, тобто  $[S] = [S]_0$ .
4. Продукт реакції швидко відщеплюється від ферменту, тобто реакція двохстадійна.
5. Друга стадія реакції необоротна. Оскільки це практично не здійснимо, ми беремо до уваги тільки початкові швидкості.
6. С кожним активним центром ферменту зв'язується тільки одна молекула субстрату.
7. Для всіх реагуючих речовин замість активностей можна використовувати їхні концентрації.

### Мультисубстратні ферментативні реакції

Більшість ферментів каталізують реакції, в яких бере участь не один, а більше число субстратів, наприклад  $A + B = C + D$ . У ході цих реакцій також відбувається утворення фермент-субстратних комплексів, подібно до того як це має місце в односубстратних реакціях, і при дослідженні кінетики двохсубстратних реакцій можуть бути визначені  $K_m$  для кожного із субстратів і  $V_{max}$  для реакцій, які вони каталізують. Константи  $K_m$  для кожного із субстратів визначають графічно. Визначають початкову швидкість реакції в умовах насичуючої концентрації одного субстрату й зміни концентрації іншого.

*Послідовний механізм.* Послідовний механізм представлений двома видами - упорядкованим і нерегульованим. При послідовному механізмі обидва субстрати повинні з'єднатися з ферментом і утворюють потрійний комплекс. *Послідовний упорядкований.* Субстрат А зв'язується з ферментом Е, утворюючи комплекс ЕА, який у свою чергу зв'язує субстрат В. Потрійний комплекс ЕАВ перетворюється на потрійний комплекс ЕСР з якого послідовно звільняються продукти.

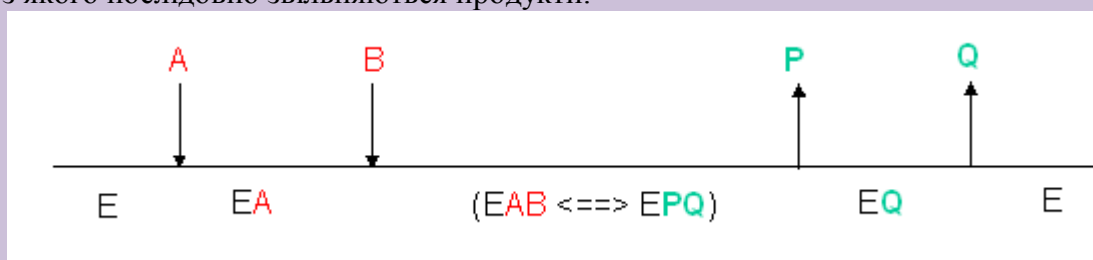


Рис. 6 – Упорядкований послідовний механізм у мультисубстратних ферментів

За впорядкованим механізмом функціонують, наприклад, фосфоглюкокіназа й гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа. В інших випадках на ферменті Е є незалежні ділянки скріплення для А і В, і швидкість реакції не залежить від того, який субстрат А або В зв'язується з ферментом першим. У таких випадках говорять, що механізм є нерегульованим.

*Послідовний нерегульований механізм.* При нерегульованому механізмі при розпаді потрійного комплексу ЕРQ жоден із продуктів не має перед іншим «переваги» звільнитися першим (рис. 7)

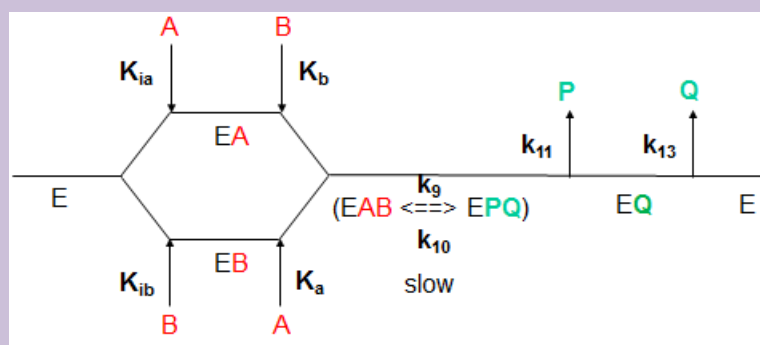


Рис. 7 – Нерегульований послідовний механізм.

Механізм подвійного заміщення або пінг-понг механізм. Якщо реакція  $A + B = C + D$  здійснюється по механізму подвійного заміщення, то спочатку субстрат А приєднується до ферменту, утворюючи комплекс EA, потім звільняється перший продукт С, при цьому утворюється стабільний інтермедіат E' що відрізняється від E. Далі інтермедіат E' взаємодіє із другим субстратом В, утворюючи фермент-субстратний комплекс E'В, з якого утворюється другий продукт Q і звільняється фермент E. Цей механізм називають також «пінг-понг»-механізмом(рис.7). По такому механізму здійснюється, наприклад, переамінування, що каталізує глутамат-аспартат амінотрансфераза

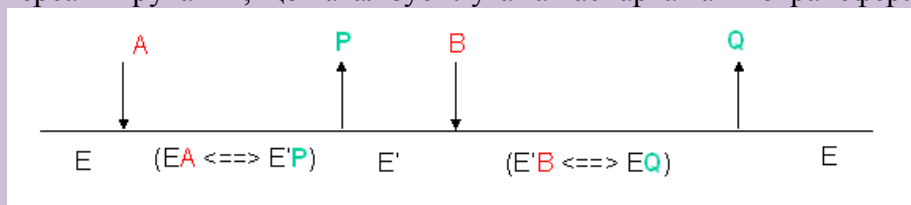


Рис. 7 Механізм пінг-понгу, або механізм подвійного заміщення

Відомі складніші кінетичні механізми для реакцій із трьома й навіть чотирма субстратами. Такі реакції можуть здійснюватися або по послідовному механізму, або по пінг-понг-механізму, або по змішаному механізму.