

Основы ферментативной кинетики.

I.

Рассмотрим реакцию первого порядка (порядок = число концентрационных членов, перемножаемых в выражении для скорости реакции) $A \rightarrow P$ (концентрации равны: $[A] = a; [P] = p$).

Скорость реакции равна $v = \frac{dp}{dt} = ka$, где k — константа скорости реакции первого порядка.

Пусть $a + p = a_0$, где $a_0 = const$, t — время.

Итак, имеем уравнение:

$$\frac{dp}{dt} = ka = k(a_0 - p).$$

Решаем дифференциальное уравнение методом разделения переменных (= «в одной части собираем все члены с p , в другой — все с t , интегрируем правую и левую части, не забываем добавлять константу!»)

$$\frac{dp}{a_0 - p} = kdt,$$

$$\int \frac{dp}{a_0 - p} = \int kdt,$$

$$-\ln(a_0 - p) = kt + const.$$

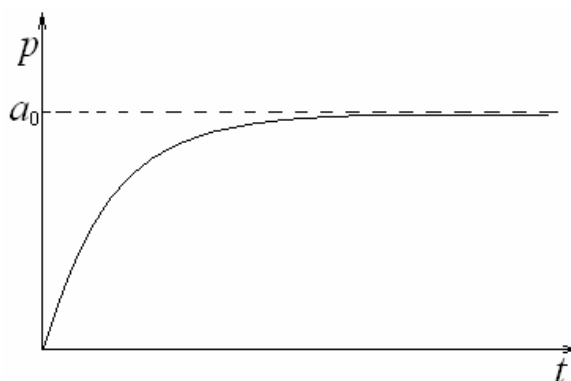
Константа определяется, исходя из начальных условий. В нашем случае это: при $t = 0$ $p = 0$ и $a_0 = a$. Таким образом, $-\ln(a_0 - 0) = const = -\ln a_0$.

$$-\ln(a_0 - p) = kt - \ln a_0,$$

$$kt = \ln a_0 - \ln(a_0 - p) = \ln \frac{a_0}{a_0 - p},$$

$$\frac{a_0}{a_0 - p} = e^{kt}, \quad a_0 = e^{kt} a_0 - e^{kt} p, \quad e^{kt} p = a_0(e^{kt} - 1),$$

$$p = \frac{a_0(e^{kt} - 1)}{e^{kt}} = a_0(1 - e^{-kt}).$$



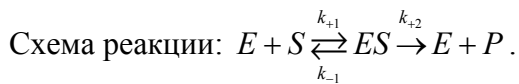
Строим график зависимости $p(t)$.

Вспоминаем графики экспоненты в зависимости от знака показателя.

Вопрос или задание: построить график зависимости концентрации субстрата от времени в координатах (a, t) и в логарифмических для различных значений параметров k, a_0 .

II.

Рассмотрим базовую модель ферментативной реакции, предложенной Михаэлисом и Ментеном. Цель исследования — определить скорость реакции, катализируемой ферментом.



Субстрат S образует с ферментом E фермент-субстратный комплекс ES (эта реакция обратимая); затем этот комплекс распадается на фермент и продукт P (реакция необратимая).

k_{+1}, k_{-1}, k_{+2} — константы скоростей реакций.

Искомая скорость — скорость реакции $ES \rightarrow EP$:
 $v = k_{+2} \cdot [\text{концентрация фермент-субстратного комплекса}]$.

Итак, пусть x — концентрация комплекса ES ; e_0 — суммарное количество фермента, участвующего в реакции; s — концентрация субстрата. Тогда

$$\frac{dx}{dt} = k_{+1}(e_0 - x)s - k_{-1}x - k_{+2}x = k_{+1}e_0s - x(k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}).$$

Пусть концентрация субстрата значительно превышает концентрацию фермента. Это значит, что в системе будет достигаться стационарное состояние, в котором концентрация фермент-субстратного комплекса постоянна, или $\frac{dx}{dt} = 0$. (можно привести аналогии со ступенькой для завязывания шнурков; ограниченное число касс в супермаркете с большим количеством покупателей и т.п.).

$$\frac{dx}{dt} = 0 \Rightarrow x = \frac{k_{+1}e_0s}{k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}}.$$

$$v = x \cdot k_{+2} = \frac{k_{+1}k_{+2}e_0s}{k_{+1}s + k_{-1} + k_{+2}} = \frac{k_{+2}e_0s}{s + \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}}.$$

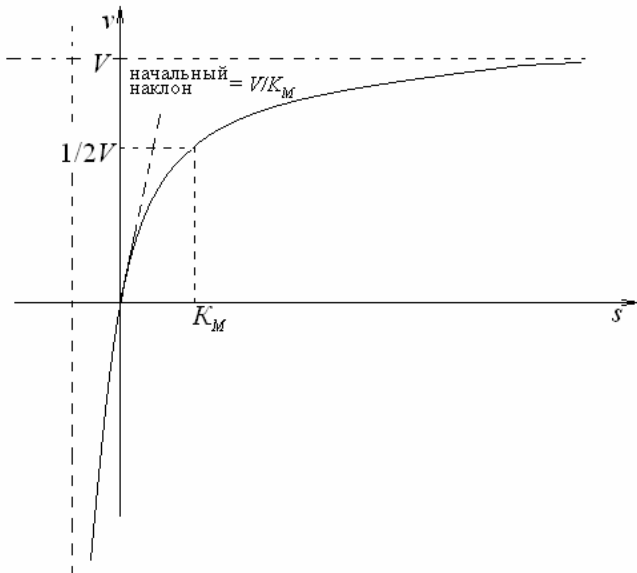
$$k_{+2}e_0 = V; \quad \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_M.$$

$$v = \frac{Vs}{K_M + s} \text{ — уравнение Михаэлиса-Ментен.}$$

V — максимальная скорость (весь фермент связан в комплекс) — зависит от концентрации фермента, поэтому не является характеристикой фермента.

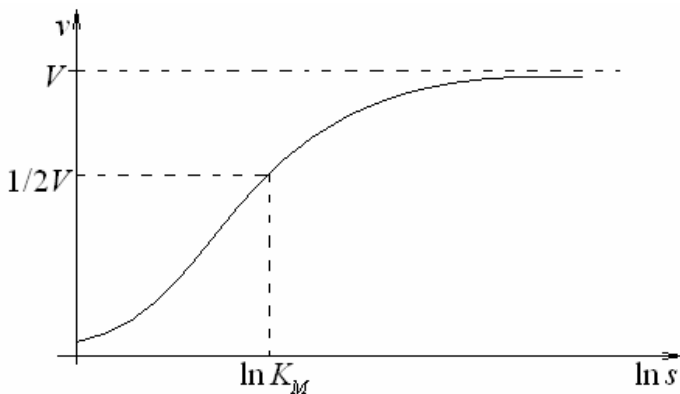
При малых концентрациях субстрата скорость пропорциональна концентрации: $v \approx \frac{V}{K_M} \cdot s$, реакция имеет первый порядок по отношению к s .

При $s = K_M$ скорость роста равна половине максимальной.



При больших концентрациях субстрата скорость образования продукта приближается к максимальной, реакция имеет нулевой порядок по отношению к s , фермент насыщен субстратом.

Скорость реакции v приближается к своему максимально возможному значению V медленно (даже когда концентрация субстрата s равна $10K_M$ величина v составляет всего $0.91V$). Поэтому по результатам экспериментов трудно провести асимптоту (и, соответственно, определить значение V). Для избежания этих трудностей строят графики в других координатах.



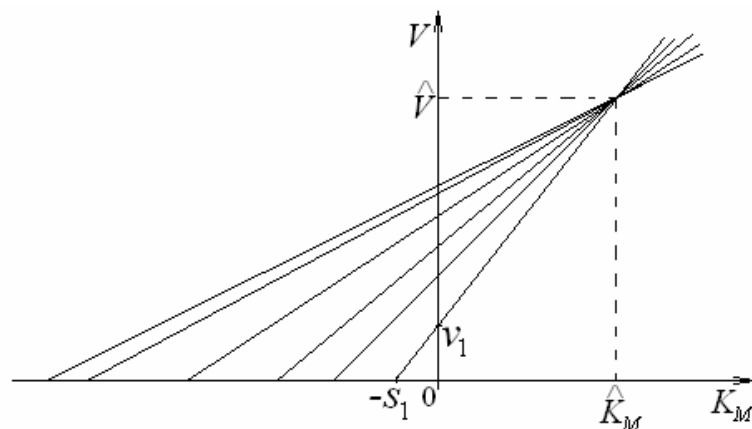
Михаэлис и Ментен строили график в координатах $(v, \ln s)$. Этот график представляет собой симметричную S-образную кривую, которая имеет максимальный наклон при $s = K_M$.

По графику определяют значение максимального наклона (для достаточно большого интервала значений скорости зависимость v от $\ln s$ является почти линейной, что позволяет без труда найти максимальный наклон). Величина

максимального наклона равна $V/4$ (таким образом, чтобы получить значение максимальной скорости реакции надо значение максимального наклона, определенного по графику экспериментальных данных, умножить на 4). Константа K_M затем определяется как значение s , при котором скорость составляет половину от максимальной V .

Одним из наиболее удобных методов графического представления результатов исследования кинетики ферментативных реакций является применение так называемого *прямого линейного графика*. Уравнение Михаэлиса-Ментен записывается в форме зависимости V от K_M

$$V = v + \frac{v}{s} K_M. \quad \text{Зависимость}$$



представляет собой прямую с наклоном, равным v/s , и отрезками, отсекаемыми на осях K_M и V , соответственно равными s и v . Эта прямая связывает все значения K_M и V , которые точно удовлетворяют выбранной паре значений s и v . Если подобным образом провести прямые для нескольких значений s и v , то эти прямые пересекутся в одной точке, координаты которой дадут единственные значения K_M и V , удовлетворяющие всем парам значений s и v . В

реальном эксперименте из-за экспериментальной ошибки точка Пересечения определяется не точно, однако не представляет особого труда найти оптимальную точку пересечения, где прямые располагаются наиболее плотно. Подобным методом очень просто выявить ошибочные данные, поскольку соответствующие прямые будут выпадать из основной совокупности прямых.

Задание. Построить график, задаваемый уравнением Михаэлиса-Ментен, в координатах $\left(s, \frac{s}{v}\right), \left(\frac{v}{s}, v\right), \left(\frac{1}{s}, \frac{1}{v}\right)$.

Вернемся к схеме базовой модели ферментативной реакции: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$.

Пусть s — концентрация субстрата, e — концентрация фермента, c — концентрация фермент-субстратного комплекса, p — концентрация продукта. Изменение во времени каждой из компоненты схемы реакции описывается следующими уравнениями:

$$\begin{cases} \frac{ds}{dt} = -k_{+1}es + k_{-1}c, \\ \frac{de}{dt} = -k_{+1}es + k_{-1}c + k_{+2}c, \\ \frac{dc}{dt} = k_{+1}es - (k_{-1} + k_{+2})c, \\ \frac{dp}{dt} = k_{+2}c. \end{cases} \quad \text{Начальные условия: } \begin{cases} s(0) = s_0, \\ e(0) = e_0, \\ c(0) = 0, \\ p(0) = 0. \end{cases}$$

Строим кинетики переменных в программе TRAX.

Заметим, что последнее уравнение отделяется от всех остальных: если система трех первых уравнений решена, то концентрация продукта рассчитывается по формуле: $p(t) = k_{+2} \int_0^t c(\tau) d\tau$.

В соответствии со схемой реакции в любой момент времени общее количество фермента (свободного и связанного в комплексе) сохраняется: $e(t) + c(t) = e_0$. Тогда наша система уравнений приводится к следующему виду:

$$\begin{cases} \frac{ds}{dt} = -k_{+1}(e_0 - c)s + k_{-1}c, \\ \frac{dc}{dt} = k_{+1}(e_0 - c)s - (k_{-1} + k_{+2})c, \\ s(0) = s_0, \quad c(0) = 0 \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} \frac{ds}{dt} = -k_{+1}e_0s + (k_{-1} + k_{+1}s)c, \\ \frac{dc}{dt} = k_{+1}e_0s - (k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}s)c, \\ s(0) = s_0, \quad c(0) = 0 \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} \frac{ds}{k_{+1}e_0 dt} = -s + \frac{(k_{-1} + k_{+1}s)}{k_{+1}e_0}c, \\ \frac{dc}{k_{+1}e_0 dt} = s - \frac{(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}s)}{k_{+1}e_0}c, \\ s(0) = s_0, \quad c(0) = 0 \end{cases}$$

Введем новые переменные: $\tau = k_{+1}e_0t$, $x = \frac{s}{s_0}$, $y = \frac{c}{e_0}$. Тогда $d\tau = k_{+1}e_0 dt$, $dx = \frac{ds}{s_0}$, $dy = \frac{dc}{e_0}$,

а начальные условия записываются как: $x(0) = 1$, $y(0) = 0$.

Система принимает вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{s_0 dx}{d\tau} = -xs_0 + \frac{k_{-1} + k_{+1}xs_0}{k_{+1}e_0} ye_0, \\ \frac{e_0 dy}{d\tau} = xs_0 - \frac{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}xs_0}{k_{+1}e_0} ye_0, \\ x(0) = 1, \quad y(0) = 0. \end{array} \right. \Leftrightarrow \left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{d\tau} = -x + \frac{k_{-1}}{k_{+1}s_0} y + xy, \\ \frac{e_0}{s_0} \frac{dy}{d\tau} = x - \frac{k_{-1}}{k_{+1}s_0} y - \frac{k_{+2}}{k_{+1}e_0} y - xy, \\ x(0) = 1, \quad y(0) = 0. \end{array} \right. \quad \left| \begin{array}{l} + \frac{k_2}{k_1 s_0} y - \frac{k_2}{k_1 s_0} y \end{array} \right.$$

(в первом уравнении добавили и вычли дробь)

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{d\tau} = -x + \left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}s_0} - \frac{k_{+2}}{k_{+1}s_0} + x \right) y, \\ \frac{e_0}{s_0} \frac{dy}{d\tau} = x - \left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}s_0} + x \right) y, \\ x(0) = 1, \quad y(0) = 0. \end{array} \right. \Leftrightarrow \left[\begin{array}{l} \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}s_0} = K \\ \frac{k_{+2}}{k_{+1}s_0} = \lambda, \\ \frac{e_0}{s_0} = \varepsilon \end{array} \right] \Leftrightarrow \left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{d\tau} = -x + (K + x - \lambda)y, \\ \varepsilon \frac{dy}{d\tau} = x - (K + x)y, \\ x(0) = 1, \quad y(0) = 0. \end{array} \right.$$

(Эта система аналитически не решается. Решение получили на компьютере в программе TRAX.)

Отметим, что во втором уравнении полученной системы в левой части присутствует параметр ε . Предположим, что концентрация субстрата значительно превышает концентрацию фермента: $s_0 \gg e_0$. Тогда получаем, что $\varepsilon \ll 1$. В этом случае мы оказываемся в условиях теоремы Тихонова (можно строго показать, что выполнены все необходимые математические условия). Согласно этой теореме, если мы имеем дело с *полной* системой уравнений, состоящей из

присоединенной $\varepsilon \frac{dx_p}{dt} = F_p(x_1, \dots, x_N)$ и

вырожденной $\frac{dx_q}{dt} = F_q(x_1, \dots, x_N)$,

то при выполнении ряда условий решение *полной* системы стремится к решению *вырожденной* системы при $\varepsilon \rightarrow 0$. Основной смысл состоит в следующем. В уравнениях

присоединенной системы величины скоростей $\frac{dx_p}{dt}$ очень велики (разделив обе части на близкое к нулю ε , получим, что правая часть стремится к бесконечности), а это значит, что переменные x_p «мгновенно» приходят к своим стационарным значениям. Поэтому дифференциальные уравнения присоединенной системы можно заменить на алгебраические: $F_p(x_1, \dots, x_N) = 0$.

Итак, возвращаясь к схеме ферментативной реакции, воспользовавшись теоремой Тихонова, находим «квазистационарную концентрацию» фермент-субстратного комплекса: $\bar{y}^* = \frac{x^*}{x^* + K}$.

Вырожденная система в нашем случае имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dx}{d\tau} = -x + (x + K - \lambda)y, \\ y = \frac{x}{x + K}, \\ x(0) = 1 \end{cases}$$

Подставляем выражение для y в дифференциальное уравнение для x и получаем:

$$\frac{dx}{d\tau} = -x + (x + K - \lambda) \frac{x}{x + K} \quad \text{или} \quad \frac{dx}{d\tau} = \frac{-\lambda x}{x + K}, \quad x(0) = 1.$$

В размерном виде это классическая формула Михаэлиса–Ментен для кинетики изменения субстрата в ферментативной реакции: $\frac{ds}{dt} = -\frac{V_s}{K_M + s}$.