

УДК 577.17

Кинетика реакций, катализируемых ферментом с медленными конформационными изменениями

Л. В. Яковенко, В. В. Пешехонов

ЛЕОНИД ВЛАДИМИРОВИЧ ЯКОВЕНКО — доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник кафедры биофизики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область интересов: физика ферментативного катализа, биофизика мембран, самоорганизация в природных системах, биофизическая экология.

ВАДИМ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ ПЕШЕХОНОВ — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник кафедры биофизики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область интересов: физика ферментативного катализа, самоорганизация в природных и социальных системах, математическое моделирование.

119992 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет,
E-mail tverd07@mail.ru

Ферментативные реакции во многих случаях отличаются от обычных каталитических реакций тем, что включают в себя стадию конформационных изменений макромолекулы фермента, которая может быть наиболее медленной в механизме данной ферментативной реакции и, следовательно, определяющей ее скорость. Одним из примеров таких реакций могут служить реакции с участием гистерезисных ферментов (т.е. ферментов, для которых характерны большие времена установления стационарной скорости реакции — лаг-периоды). Чтобы получить кинетические уравнения для подобных реакций, обычно используется традиционный подход, приводящий к точечной системе уравнений. Явный учет конформационных изменений макромолекулы фермента предполагает переход к описанию кинетики реакции в распределенной системе. Такой подход впервые был использован В.И. Дешеревским и Н.П. Сидоренко (1970 г.) для случая, когда лимитирующей стадией реакции является медленная релаксация фермент-субстратного комплекса. Развитие этого подхода позволило получить уравнение для скорости ферментативной реакции с одним субстратом и одним продуктом в предположении, что и фермент-субстратный комплекс, и свободный фермент, образующийся при разрушении комплекса, медленно релаксируют к своим равновесным состояниям, и их кинетические характеристики непрерывно зависят от степени прохождения процесса релаксации.

Уравнение скорости реакции в общем виде допускает различные типы решений в зависимости от выбора начальных, граничных условий и характеристических функций модели. В предельном случае бесконечно быстрой релаксации оно переходит в уравнение Михаэлиса—Ментен. Для некоторых частных случаев получены численные решения.

В кинетике ферментативных реакций часто наблюдаются отклонения от классической зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, соответствующей модели Михаэлиса—Ментен. Это вызвало

развитие различных подходов к интерпретации экспериментальных данных, которые можно грубо разделить на две группы. К первой группе относятся подходы, основанные на использовании модельных представлений о конформационных изменениях макромолекулы фермента. Ко второй группе можно отнести имитационные подходы, использующие различные более или менее сложные формальные зависимости скорости реакции от концентрации субстрата и не привязанные к какой-либо конкретной модели конформационных изменений макромолекулярного ферментного комплекса. Типичным примером реализации такого подхода является эмпирическое кинетическое уравнение Каменского—Подрабиника [1]:

$$q = \frac{v}{k_{\text{cat}} E_0} = \frac{\lambda S e^{\alpha S}}{1 + \lambda S e^{\alpha S}} \quad (1)$$

где v — скорость реакции; k_{cat} — константа скорости распада фермент-субстратного комплекса с образованием продукта реакции; S — концентрация субстрата; E_0 — полная концентрация фермента; α и λ — параметры модели.

Уравнение (1) описывает широкий круг зависимостей $q(S)$, не связывая их с какой-либо конкретной кинетической моделью. Неудовлетворительность такого подхода очевидна: параметры уравнения никак не связаны с кинетическим механизмом реакции.

В [2] подробно рассмотрены случаи появления лаг-периодов (гистерезисные ферменты) и других отклонений от кинетики Михаэлиса—Ментен для нескольких десятков ферментов, а также хорошо изученные модели, предложенные для описания кинетики таких реакций: Моно, Уаймена и Шанже; Кошланда, Немети и Филмера; Фридена; Эйнсли, Шилла и Нита; модели медленно диссоциирующих ферментных систем и др. Эти модели, основанные на конкретных предположениях о строении макромолекул ферментов (ферментных комплексов) или о наличии у них определенных изомерных состояний, позволяют описывать

определенные типы реакций. Для других типов реакций эти модели приходится видоизменять, вводить дополнительные предположения, что ограничивает общность таких подходов. Во всех этих случаях стационарная скорость реакции представляет собой дробно-рациональную функцию от концентрации субстрата.

Одна из первых моделей, учитывающих возможность изомеризации макромолекулы фермента в ходе реакции, была предложена Рэбином (Rabin) [3]. Сходную, но несколько более общую модель, граф которой приведен на рис. 1, примерно тогда же предложили Дешеревский и Сидоренко [1].

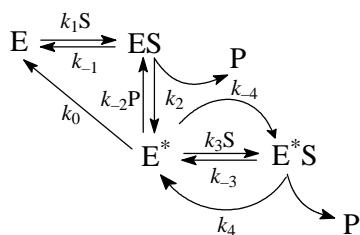


Рис. 1. Граф ферментативной реакции при образовании конформационно неравновесного состояния фермента E^* в результате взаимодействия субстрата с ферментом.

E — фермент; S — субстрат; P — продукт реакции (для концентраций фермента, субстрата и продукта использованы те же обозначения). Предполагается, что неравновесное состояние фермента отличается от равновесного по кинетическим свойствам.

Стационарное решение в рамках стандартных предположений (концентрация продукта реакции много меньше концентрации субстрата $P \ll S$) для этой модели имеет вид:

$$v = \frac{E_0 S \left(k_0 \frac{k_{-3} + k_4}{k_3} + k_4 S \right)}{\frac{k_0}{k_2} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{k_{-3} + k_4}{k_3} + \frac{k_{-3} + k_4}{k_3} \cdot \frac{k_0 + k_2}{k_2} \cdot S + S^2} \quad (2)$$

На кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата

$$\text{при } \frac{k_0 + k_2}{k_4} \ll \frac{K_m}{K_m^*}, \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad K_m^* = \frac{k_{-3} + k_4}{k_3}$$

наблюдается перегиб,

$$\text{а при } k_0 > \frac{k_2 k_4}{k_2 - k_4}, \quad k_4 < k_2 \text{ появляется максимум.}$$

Обобщение этой модели, предложенное в той же работе [1], состояло в предположении, что высвобождающийся в результате диссоциации продукта фермент находится в конформационно «возбужденном» состоянии (E^*) и медленно релаксирует к равновесному состоянию по некой обобщенной конформационной координате (рис. 2). В ходе релаксации фермент может присоединить субстрат и образовать равновесный фермент-субстратный комплекс, при этом константа скорости реакции зависит от значения обобщенной конформационной координаты.

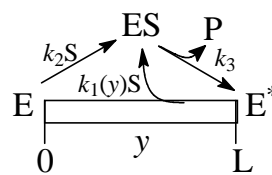


Рис. 2. Общая схема реакции, катализируемой ферментом, имеющим непрерывное распределение конформаций по обобщенной конформационной координате y :

$y = 0$ соответствует равновесной конформации (E), $y = L$ соответствует предельно неравновесной конформации фермента (E^*) в данной реакции. Константа скорости реакции неравновесного фермента с субстратом $k_1(y)$ зависит от обобщенной конформационной координаты y

Формальное описание этой модели привело к следующему уравнению для удельной скорости реакции:

$$\frac{v}{E_0} = \left(\frac{1}{k_3} + I + \frac{e^{-\alpha_L S}}{k_2 S} \right) \quad (3)$$

$$\text{где } I = e^{-\alpha_L S} \int_0^L \frac{e^{\alpha(y)S}}{w(y)} dy, \quad \alpha_L = \alpha(L), \quad \alpha(y) = \int_0^y \frac{k_1(y)}{w(y)} dy,$$

$w(y)$ — скорость релаксации фермента к равновесному состоянию.

Очевидно, что уравнение (3) сводится к эмпирическому уравнению (1).

Дальнейшее обобщение модели Рэбина—Дешеревского, предложенное нами [4], состояло в предположении, что конформационно неравновесные состояния макромолекулы фермента могут возникать не только при диссоциации продукта, но и при образовании фермент-субстратного комплекса. Для учета такой возможности необходимо ввести дополнительную конформационную координату, соответствующую релаксации комплекса к равновесному состоянию. Схема такой ферментативной реакции для общего случая приведена на рис. 3а.

Цикл работы фермента по этой схеме осуществляется следующим образом. Свободный фермент в равновесном ($y = 1$) или неравновесном ($0 < y < 1$) конформационном состоянии связывает субстрат с константой скорости реакции k_2 , зависящей от координаты y , и образует фермент-субстратный комплекс в одном из конформационных состояний (равновесном или неравновесном), что зависит от конкретных условий протекания реакции. Если образовавшийся комплекс имеет неравновесную конформацию, он релаксирует к равновесию вдоль обобщенной конформационной координаты x ($0 < x < 1$). В каждом неравновесном состоянии с координатой x комплекс имеет конечную скорость движения по координате $w_1(x)$, а свободный фермент в состоянии y — конечную скорость релаксации $w_2(y)$ к равновесному состоянию ($y = 1$). В каждый момент времени в ходе релаксации (или в равновесном состоянии) фермент-субстратный комплекс с некоторой вероятностью может распасться с образованием продукта и свободного фермента в одном из допустимых конформационных состояний. Диссоциацию субстрата, входящего в состав комплекса, с образованием свободного фермента мы намерен-

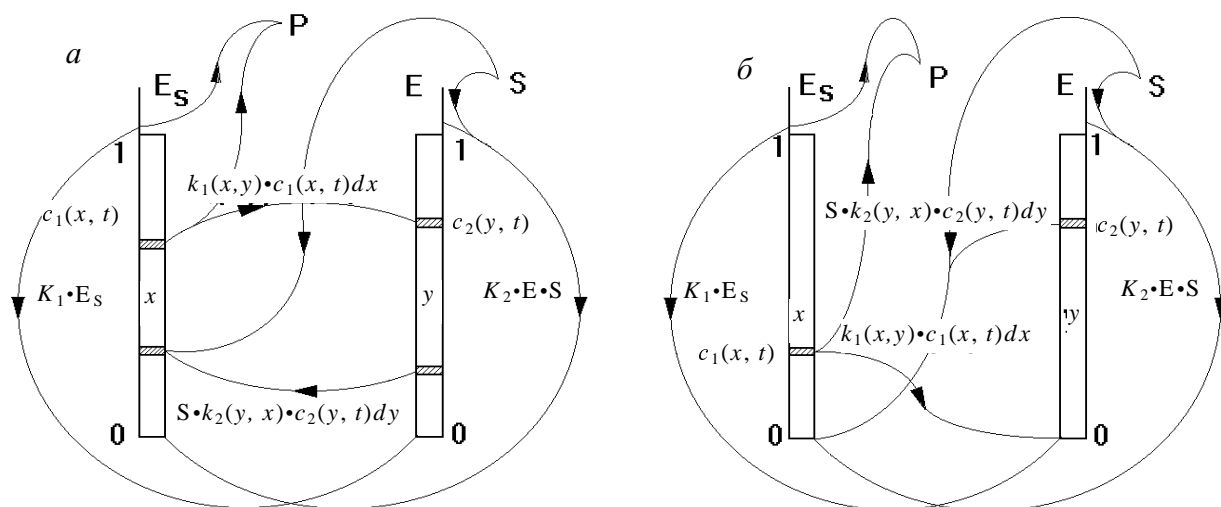


Рис. 3. Обобщенная схема реакции с учетом распределений молекул фермента и его комплекса с субстратом по различным конформационным состояниям:

a — общий случай; *б* — один из частных случаев. *E* — свободный равновесный фермент; *E_s* — равновесный фермент-субстратный комплекс; *x* и *y* — обобщенные конформационные координаты, характеризующие степени отклонения конформаций комплекса и фермента, соответственно, от равновесных (*x* = 1, *y* = 1); *c₁(x, t)*, *c₂(y, t)* — линейные плотности концентраций неравновесного ферментного комплекса и свободного фермента соответственно; *k₁(x, y)* и *k₂(y, x)* — константы скоростей распада неравновесного комплекса и связывания субстрата неравновесным свободным ферментом; *K₁*, *K₂* — константы скоростей распада равновесного комплекса и связывания субстрата равновесным свободным ферментом

но не учитываем, так как она приводит лишь к изменению формы распределения фермента по возможным конформационным состояниям, что соответствует некоторым изменениям функций *k₁(x, y)* и *k₂(y, x)* и зависимости скорости релаксации фермента от координаты *y*.

Изменение линейной плотности концентрации фермент-субстратного комплекса в состоянии *x* описывается кинетическим уравнением:

$$\frac{\partial}{\partial t} c_1(x, t) = -\frac{\partial}{\partial x} (c_1(x, t) \cdot w_1(x)) - c_1(x, t) \int_0^1 k_1(x, y) dy + S \int_0^1 k_2(y, x) \cdot c_2(y, t) dy$$

В этом уравнении первый член в правой части равен изменению плотности концентрации ферментного комплекса за счет потока релаксирующих комплексов, второй и третий члены — скорости распада и образования неравновесного ферментного комплекса в состоянии *x*, соответственно.

Изменение во времени концентрации равновесного ферментного комплекса (*E_s*) равно разности потока релаксирующего комплекса из состояния *x* = 1 и скорости распада:

$$\frac{dE_s(t)}{dt} = w_1(1) \cdot c_1(1, t) - K_1 E_s$$

где *K₁* — константа скорости распада равновесного комплекса.

Уравнения для концентрации равновесного свободного фермента и линейной плотности концентрации релаксирующего фермента выводятся аналогично.

Таким образом, система кинетических уравнений, соответствующая данной модели, имеет вид:

$$\frac{\partial}{\partial t} c_1(x, t) = -\frac{\partial}{\partial x} (c_1(x, t) \cdot w_1(x)) - c_1(x, t) \int_0^1 k_1(x, y) dy + S \int_0^1 k_2(y, x) \cdot c_2(y, t) dy \quad (4)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} c_2(y, t) = -\frac{\partial}{\partial y} (c_2(y, t) \cdot w_2(y)) + \int_0^1 k_1(x, y) \cdot c_1(x, t) dx - S \cdot c_2(y, t) \int_0^1 k_2(y, x) dx \quad (5)$$

$$\frac{dE(t)}{dt} = w_2(1) \cdot c_2(1, t) - K_2 \cdot E(t) \cdot S \quad (6)$$

$$\frac{dE_s(t)}{dt} = w_1(1) \cdot c_1(1, t) - K_1 \cdot E_s(t) \quad (7)$$

Полная концентрация фермента в течение всей реакции остается постоянной:

$$E_o = E(t) + E_s(t) + \int_0^1 c_1(x, t) dx + \int_0^1 c_2(y, t) dy \quad (8)$$

Выбор конкретного вида функций скорости релаксации фермента *w₁(x)*, *w₂(y)* и констант скоростей реакции *k₁(x, y)*, *k₂(y, x)* определяется свойствами фермента и реакционной среды. Как известно, активность многих ферментов зависит от pH среды, темпе-

ратуры, давления, внешнего электрического или магнитного поля и т.д., поэтому в общем случае соответствующие функции должны содержать ряд параметров, учитывающих различные внешние воздействия на систему. Кроме того, функции скорости релаксации фермента могут явно зависеть от времени, если старение фермента оказывает влияние на его каталитические характеристики.

При выбранных характеристических функциях $k_1(x, y)$, $k_2(y, x)$, $w_1(x)$, $w_2(y)$ решение системы уравнений позволяет описывать изменение ферментативной активности во времени с учетом внешних воздействий. Для экспериментально измеренных макроскопических величин, например, зависимости стационарной скорости реакции от концентрации субстрата можно подобрать константы скоростей реакций и скорости релаксации, наилучшим образом аппроксимирующие данные эксперимента, т.е. решить обратную задачу.

На рис. 3б приведена схема реакции для частного случая, когда вновь формируемый фермент-субстратный комплекс и свободный фермент всегда образуются в состояниях, максимально удаленных от равновесных. Тогда решение системы уравнений (4—8) упрощается [$k_1(x, y) = k_1(x)$, $k_2(y, x) = k_2(y)$], и уравнения (4, 5) системы утрачивают нелинейные члены:

$$\frac{\partial}{\partial t} c_1(x, t) = - \frac{\partial}{\partial x} (c_1(x, t) \cdot w_1(x)) - k_1(x) \cdot c_1(x, t) \quad (4')$$

$$\frac{\partial}{\partial t} c_2(y, t) = - \frac{\partial}{\partial y} (c_2(y, t) \cdot w_2(y)) - S \cdot k_2(y) \cdot c_2(y, t) \quad (5')$$

В стационарном состоянии скорость образования продукта равна:

$$\dot{P} = K_1 \cdot E_s + \int_0^1 k_1(x) \cdot c_1(x, t) dx \quad (9)$$

Из уравнений (4', 5') можно выразить плотности концентраций фермент-субстратного комплекса и фермента, подставив которые в уравнения (6, 7), получим стационарные концентрации комплекса и фермента. Суммарная по всем состояниям скорость распада комплекса равна количеству фермента, возвращающемуся в свободное состояние в единицу времени. Используя далее (8), получим выражение для стационарной скорости реакции:

$$\dot{P} = \frac{E_0}{\int_0^1 \frac{\exp(-S \cdot \beta(y))}{w_2(y)} dy + \frac{\exp(-S \cdot \beta(1))}{K_2 \cdot S} + \int_0^1 \frac{\exp(-S \cdot \alpha(x))}{w_1(x)} dx + \frac{\exp(-\alpha(1))}{K_1}} \quad (10)$$

где $\alpha(x) = \int_0^x \frac{k_1(z)}{w_1(z)} dz$, $\beta(y) = \int_0^y \frac{k_2(z)}{w_2(z)} dz$

Если скорости релаксации свободного фермента и его комплекса с субстратом много больше соответствующих постоянных скоростей реакции связывания субстрата и образования продукта, то выражение для скорости стационарной реакции принимает вид:

$$\dot{P} = \frac{K_1 \cdot E_0 \cdot S}{K_1 / K_2 + S} \quad (11)$$

Если пренебречь распадом ферментного комплекса без образования продукта ($k_{-1} = 0$), то получим урав-

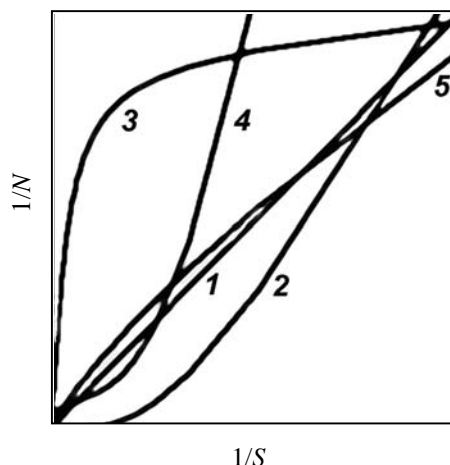
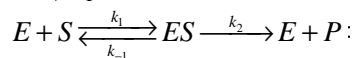


Рис. 4. Качественный вид зависимостей скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера—Берка для следующих случаев:

- 1 — кинетика Михаэлиса—Ментен; 2 — $w_2(y) = \text{const}$; $k_2 \propto \ln(x + a)$; 3 — $w_2(y) = \text{const}$; $k_2 \propto \exp(-\alpha x)$;
- 4 — $w_2(y) = \text{const}$; $k_2 \propto \exp(\alpha x)$; 5 — $w_2(y) \propto \exp(-\gamma x)$; $k_2 \propto \exp(\beta x)$

нение, которое совпадает с выражением для скорости стационарной двухстадийной ферментативной реакции, протекающей по механизму Михаэлиса—Ментен



$$v = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S}{(k_{-1} + k_2) / k_1 + S}$$

На рис. 4 приведены графики стационарной скорости реакции для некоторых конкретных наборов характеристических функций $k_1(x)$, $k_2(y)$, $w_1(x)$ и $w_2(y)$.

Скорость конформационной релаксации может быть очень чувствительна к присутствию в реакционной системе веществ, влияющих на конформационную устойчивость белка-фермента, в частности, модификаторов водородных связей, гидрофобных взаимодействий и т.п. Поэтому в рамках предложенной модели такие влияния легко учесть. Аллостерические эффекты лигандов можно, в принципе, учесть введением в кинетическую модель дополнительных конформационных степеней свободы, однако при этом модель значительно усложняется. Изменения электрического дипольного момента молекулы белка при релаксации могут служить основой для объяснения некоторых эффектов от воздействия электромагнитных полей на биологические объекты.

Для нестационарного случая кинетики решение системы кинетических уравнений ферментативных реакций может быть найдено для условия, когда субстрат содержится в системе в избыточной концентрации. Применяя преобразование Лапласа ко всей системе уравнений (4'), (5'), (6—8) с учетом начальных условий $E_s(0) = c_1(x, 0) = c_2(y, 0) = 0$, $E(0) = E_0$ и решая получившуюся систему для образов так же, как и

для стационарного варианта, получим для оригинала скорости накопления продукта $v(t)$ сумму постоянного слагаемого, равного скорости стационарной реакции (10), и ряда экспонент, показатели которых являются корнями характеристического уравнения, обращающимися в нуль знаменатель в выражении для образа скорости реакции.

Связь предложенной модели реакции с участием фермента, имеющего непрерывные распределения по конформационным состояниям, с моделями, учитывающими только конечное число дискретных состояний фермента, легко устанавливается, если принять

$$k_1(x, y) = \sum k_{1i}(y)\delta(x - x_i), \quad k_2(y, x) = \sum k_{2i}(x)\delta(y - y_j)$$

т.е. допустить возможность образования фермент-субстратного комплекса и его распада только для некоторых выделенных конформеров.

В общем случае обратная реакция сопровождается прохождением молекулой фермента конформационных состояний, отличных от тех, через которые она проходит в прямой реакции [5, 6]. Поэтому учет возможной обратной реакции сводится к введению еще двух конформационных степеней свободы — для свободного фермента (эти состояния и распределение по ним не обязательно должны совпадать с состояниями в прямой реакции) и для фермент-продуктного комплекса. При этом общая схема может быть получена из схемы, представленной на рис. 3а, взаимной заменой S и P и соответствующей перестановкой обозначений координат, констант скоростей реакции и скоростей релаксации.

В заключение несколько слов о термодинамической согласованности модели. Во-первых, ситуации, не имеющие термодинамического смысла, всегда могут быть устранены соответствующим выбором характеристических функций модели. Во-вторых, в ходе релаксации фермент-субстратного комплекса к равновесному состоянию энергия реакционной системы уменьшается, при этом часть ее расходуется на совершение полезной работы, а часть может диссипировать. Так, например, в равновесном состоянии комплекс обладает минимальной энергией по сравнению с другими состояниями. При диссоциации продукта из

равновесного фермент-субстратного комплекса образуется свободный фермент (другая система) с максимальным средним значением энергии. При этом, конечно, суммарная энергия системы не возрастает. Свободный фермент, приходящий в результате релаксации к равновесному состоянию, характеризуется распределением по допустимым конформациям, соответствующим температуре и другим факторам окружающей среды, а его средняя энергия будет минимальной. В ходе реакции неравновесного свободного фермента с субстратом образуется комплекс в неравновесном, но вполне в определенном состоянии, и накопления энергии при этом не происходит. В нашей модели мы считаем переходы от системы «свободный фермент + субстрат» к фермент-субстратному комплексу и в обратном направлении мгновенными, хотя на самом деле они также могут сопровождаться конформационной релаксацией. Такое приближение отчасти оправдано большой свободой выбора зависимостей констант скоростей реакции и скоростей релаксации от значений конформационных координат.

Физические проблемы, возникающие в связи с возможностью использования свободной энергии для совершения полезной работы, частично рассмотрены в работе [6].

* * *

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 05-05-64655-а и № 05-05-64974-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоренко Н.П., Дещеревский В.И. Биофизика, 1970, т. 15, № 5, с. 785—792.
2. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978, 248 с.
3. Rabin V.R. Biochem. J., 1967, v. 102, p. 22с—23с.
4. Яковенко Л.В., Пешехонов В.В. Физическая мысль России, 1995, № 1, с. 49—53.
5. Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, Гл. ред. физ.-мат. лит., 1977, 336 с.
6. Блюменфельд Л.А. Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики. М.: Едиториал УРСС, 2002, 160 с.