

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.040>

УДК 539.199+577.151.45

Л.М. Христофоров

Інститут теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України, Київ

E-mail: lechrist@bitp.kiev.ua

Вплив від'єднання субстрату на кінетику ферментативного каталізу

Представлено академіком НАН України А.Г. Загороднім

В мінімальній кінетичній схемі з двома конформаційними станами фермент-субстратного комплексу з різною каталітичною активністю показано, що зворотний процес від'єднання субстрату від комплексу не завжди відіграє інгібіторну роль. Навпаки, збільшення константи швидкості від'єднання в певних межах може лише прискорювати оберт ферменту. Визначені концентрації субстрату необхідні для уможливлення такого ефекту. Висновки однаково придатні для аналізу даних експериментів в ансамблі чи на поодиноких ферментах.

Ключові слова: поодинокі макромолекули; фермент-субстратна взаємодія; конформаційні стани; швидкість ферментативної реакції.

1. Схема Міхаеліса—Ментен лежить в основі теорії і практики ферментативного каталізу вже понад сто років [1–4]. У своєму найвідомішому вигляді вона описує реакцію перетворення ферментом E субстрата S на продукт P за посередництва утворення фермент-субстратного комплексу ES відповідно до рівняння



де k_s — константа швидкості реакції зв'язування субстрату псевдопершого порядку, пропорційна концентрації субстрату $[S]$, так що $k_s = k_1[S]$, а k_b — така для зворотної реакції від'єднання субстрату, тоді як k_c — для власне каталітичного акту перетворення субстрату на продукт.

Предметом першочергового інтересу зазвичай є швидкість ферментативної реакції $v = k_c[ES]$. Стосовно схеми (1) стандартна хімічна кінетика диктує, зокрема, таке рівняння:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_b + k_c)[ES], \quad (2)$$

© Л.М. Христофоров, 2019

звідси для стаціонарної швидкості (за підтримки сталої концентрації субстрату $[S]$) одразу випливає

$$v = \frac{k_c [E_t][S]}{[S] + K_M},$$

де $[E_t] = [E] + [ES]$ – повна концентрація ферменту, а $K_M = (k_b + k_c) / k_1$ – константа Міхаеліса. Гіперболічна залежність (3) швидкості реакції від концентрації субстрату є головним результатом застосування схеми (1) і первинним тестом в дослідженнях кінетики ферментів. Що ж до залежності v від константи швидкості від'єднання k_b , то вона вважалася очевидною. Дійсно, зі збільшенням ймовірності непродуктивної дисоціації комплексу $ES \rightarrow E + S$ загальна швидкість реакції має погіршитися, що й підтверджує наведений вище вираз. Тому за всю столітню історію схеми Міхаеліса–Ментен перевіряти цю залежність не спадало на думку. Проте виявляється, що вона може бути не такою тривіальною і відбивати доволі цікавий аспект функціонування ферментів.

2. Ефект, про який піде мова, є певною мірою “стороннім продуктом” намагань пояснити спостережені відхилення залежності швидкостей реакцій деяких ферментів від гіперболічної по $[S]$ – обставини першорядного фізіологічного значення. Так звані сигмоїдні залежності $v([S])$ (тобто криві з перегином, які дозволяють значну зміну швидкості у відносно вузькому діапазоні концентрацій) зрештою пов'язали з необхідністю існування принаймні двох різних конформацій для реакційних станів схем типу (1), а також з наявністю кількох центрів зв'язування субстрату (олігомерії або алостерії ферменту), як це було зроблено, наприклад, в класичній роботі [5]. Остання вимога й зумовила назву “кооперативність” для цієї регуляторної властивості. Пізніше виявилось, що її можуть мати й *мономерні* ферменти з одним центром зв'язування – достатньо було припустити існування хоча б двох конформацій вільного ферменту з різною спорідненістю до субстрату та повільними флуктуаціями між ними [6, 7]. Тоді зі збільшенням $[S]$ фермент затримувався здебільшого в “активному” стані. Кооперативність, що виникає таким чином, назвали кінетичною, або мнемонічною, а такі ферменти – гістерезисними [8, 9]. Введення ж кількох конформацій комплексу ES з розкидом швидкості каталізу k_c враховує так званий динамічний безлад [10].

Регуляторні властивості ферментів, зумовлені їхньою конформаційною підсистемою, та відповідні відхилення від стандартних режимів схем типу (1) зараз інтенсивно досліджуються, особливо завдяки розвитку техніки експериментів на поодиноких молекулах (single-molecule (SM) enzymology) [10–12]. В недавній роботі [13] в цьому напрямі було зауважено, що процес дисоціації комплексу $ES \rightarrow E + S$ не завжди відіграє негативну роль. На жаль, автори дуже ускладнили розгляд занадто загальним стохастичним аналізом безладу. Між тим, головний ефект можна проілюструвати на елементарній схемі, придатній для аналізу як в межах стандартної ферментативної кінетики, так і на основі даних SM-експериментів.

3. Отже, розглянемо наявність безладу, пов'язуючи його, як це зазвичай роблять найпростішим шляхом, з існуванням двох конформацій комплексу – ES_1 та ES_2 , з різними константами швидкості каталітичної стадії k_{c1} та k_{c2} відповідно (рис. 1). Стадії ж приєднання та від'єднання субстрату для простоти вважаються ідентичними.

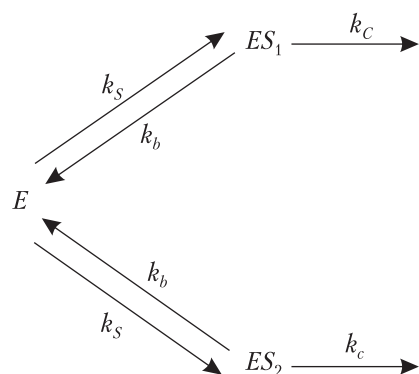


Рис. 1. Роздвоєна схема Міхаеліса–Ментен

Спершу розглянемо кінетику такої схеми стандартним чином. Розгалуження на два конформаційні канали вочевидь замінює рівняння (2) системою

$$\begin{cases} \frac{d[ES_1]}{dt} = k_S [E] - (k_b + k_c)[ES_1], \\ \frac{d[ES_2]}{dt} = k_S [E] - (k_b + k_c)[ES_2], \\ [E] + [ES_1] + [ES_2] = [E_t], \end{cases} \quad (3)$$

відповідно, швидкість реакції тепер $v = k_c [ES_1] + k_c [ES_2]$. В стаціонарному випадку система (3) розв'язується елементарно, що зумовлює наступний вираз:

$$v = \frac{k_S [E_t] [k_b (k_c + k_c) + 2k_c k_c]}{k_S (2k_b + k_c + k_c) + (k_b + k_c)(k_b + k_c)}. \quad (4)$$

Одразу зауважимо, що, оскільки $k_S = k_1 [S]$, міхаелісівська гіперболічна залежність від $[S]$ зберігається і тут (хоча константа Міхаеліса є складнішою комбінацією констант швидкостей). Вона взагалі збережеться для будь-яких ускладнень схеми (1) окрім тих, що вводять набір конформацій стану E вільного ферменту.

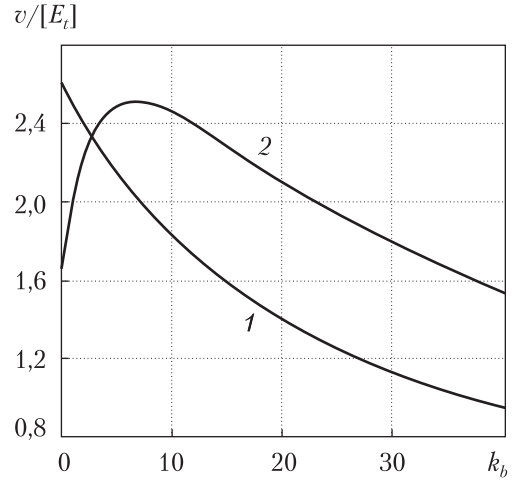
Перед подальшим аналізом формули (4) розглянемо ту ж саму схему рис. 1, якщо реакція досліджується на поодинокому ферменті – у спосіб, що набуває зараз домінуючого характеру. В цьому випадку одна й та сама макромолекула ферменту працює в серіальному режимі перетворення субстрату на продукт послідовно один за одним, і отримані експериментально масиви часів оборту ферменту (до десятків тисяч обортів) піддаються статистичній обробці. Головною характеристикою тут виступає функція розподілу $f(t)$ часу “першого проходження” процесу перетворення. Середнє значення цього часу $\langle t \rangle = \int_0^\infty t f(t) dt$, а обернена величина $1/\langle t \rangle$ слугує аналогом швидкості реакції [10,11]. Відповідні схемі рис. 1 рівняння тепер формулюються вже не для концентрацій, а для ймовірностей $P_i(t)$ перебування у станах $i \in \{E, ES_1, ES_2\}$ з початковою умовою $P_E(0) = 1$. Тоді, як неважко зрозуміти,

$$f(t) = k_c P_{ES_1}(t) + k_c P_{ES_2}(t). \quad (5)$$

Отже, система рівнянь (3) у випадку функціонування поодинокого ферменту трансформується в таку:

$$\begin{cases} \frac{dP_E}{dt} = -2k_S P_E + k_b P_{ES_1} + k_b P_{ES_2}, \\ \frac{dP_{ES_1}}{dt} = k_S P_E - (k_b + k_c) P_{ES_1}, \\ \frac{dP_{ES_2}}{dt} = k_S P_E - (k_b + k_c) P_{ES_2}, \end{cases} \quad (6)$$

Рис. 2. Залежність швидкості реакції від інтенсивності від'єднання субстрату згідно з формулами (4) та (8), $k_S = 10$: 1 – $k_C = k_c = 3$; 2 – $k_C = 10, k_c = 1$



оскільки в цій постановці відсутня умова нормування, і всі $P_i(t) \rightarrow 0$ при $t \rightarrow \infty$. Початковими умовами є $P_E(0) = 1, P_{ES_1}(0) = P_{ES_2}(0) = 0$.

Система (6) легко розв'язується застосуванням лаплас-перетворення $\tilde{\phi}(s) = \int_0^\infty e^{-st} \phi(t) dt$, однак його обернення пов'язано з розв'язком кубічного рівняння. Проте для нашої мети в цьому нема потреби, оскільки шукана величина $\langle t \rangle$ зумовлюється саме лаплас-образом $\tilde{f}(s): \langle t \rangle = -d\tilde{f}(s)/ds|_{s=0}$, або

$$\langle t \rangle = -[k_C d\tilde{P}_{ES_1}(s)/ds + k_c \tilde{P}_{ES_2}(s)/ds]_{s=0}. \quad (7)$$

Отже, після лаплас-перетворення системи (6) і застосування формули (7) рутинні алгебраїчні процедури зрештою приводять до виразу:

$$\frac{1}{\langle t \rangle} = \frac{k_S [k_b(k_C + k_c) + 2k_C k_c]}{k_S (2k_b + k_C + k_c) + (k_b + k_C)(k_b + k_C)}. \quad (8)$$

Порівнюючи його з виразом (4) для стаціонарної швидкості реакції в ансамблі, бачимо їхню повну тотожність, якщо вважати, що $v/[E_t] = 1/\langle t \rangle$. Подібна еквівалентність для випадку класичної схеми (1) дістала назву “одномолекулярного рівняння Міхаеліса–Ментен” [10] (single-molecule Michaelis–Menten equation) і була перевірена експериментально [11]. Розглянемо тепер деякі наслідки формул (4) та (8).

4. А саме, поцікавимося залежністю $v(k_b)$ швидкості реакції від інтенсивності процесу від'єднання субстрату при різних співвідношеннях між константами швидкостей k_C і k_c . На рис. 2 наведені графіки залежності $v(k_b)$ для випадків $k_C = k_c$ та $k_C \gg k_c$. У випадку однакових каналів (рис. 2, крива 1) маємо звичний інгібіторний ефект: зі збільшенням k_b реакція уповільнюється. Проте для суттєво різних каталітичних констант маємо, всупереч інтуїції, дещо несподіваний результат (рис. 2, крива 2): інгібування починається тільки після перевищення певного значення k_b ; зменшення ж k_b до нуля тільки погіршить швидкість реакції (аж до повної її зупинки при $k_c \rightarrow 0$). Таку залежність можна назвати збуджуючою.

Звісно, можливість її прояву залежить також від константи $k_S = k_1[S]$. Відповідну умову нескладно знайти з аналізу похідної $dV(k_b)/dk_b$, яка може мати додатний нуль за умови

$$k_S > \frac{k_C k_c (k_C + k_c)}{(k_C - k_c)^2}, \quad (9)$$

звідси очевидно, що чим більше розкид каталітичних констант (“безлад”), тим при меншій концентрації $[S]$ уможливується ефект збудження. Враховуючи, що величина $|k_C - k_c|/(k_C + k_c)$ є нічим іншим, як коефіцієнтом варіації каталітичної константи $Q = \sigma / \langle \tau_{cat} \rangle$ (тут σ – стан-

дартне відхилення, а $\langle \tau_{cat} \rangle = (k_c + k_c) / 2k_c k_c$ — середній час стадії каталізу), зауважимо, що умова (9) еквівалентна лінії розділу на “фазовій діаграмі” у змінних $[S]-Q$. Рівняння цієї лінії, очевидно, є таким:

$$[S] = \frac{1}{2k_1 \langle \tau_{cat} \rangle Q^2}; \quad (10)$$

область квадранту $[S]-Q$, що нижче від неї, відповідає звичній інгібіторній ролі від’єднання, а вище — ефекту збудження.

5. Залишається пояснити причину виникнення такого контрінтуїтивного впливу від’єднання субстрату на швидкість ферментативної реакції. Насправді, в розглянутій моделі вона доволі прозора. Опинившись в стані ES_2 з дуже довгим часом очікування завершення реакції, фермент “має вибір”: чекати далі, або ж повернутися у початковий стан E з шансом виконати оберт через “активний” комплекс ES_1 . За певних умов (достатніх $[S]$ та не перевищуючих певного значення k_b) другий варіант стає вигіднішим. Більш того, при дуже малих $k_c \rightarrow 0$ у відсутності можливості повернення фермент “ризиковав” би зрештою повністю перейти в практично нефункціональний стан ES_2 . Це й пояснює необхідність наявності k_b і корисність її збільшення до певної величини для прискорення реакції. Подальше зростання k_b , звісно, вже почне гальмувати реакцію.

Такі регуляторні властивості ферментів (пов’язані з цікавим ефектом впливу розподілу швидкостей каталізу на характер функціональної залежності загальної швидкості реакції від інтенсивності від’єднання субстрату) є доволі нетрадиційними. Але враховуючи сучасні можливості модифікації ферментів, а також потужні методи досліджень функціонування поодиноких ферментів, вони можуть виявитися досить реальними і корисними для практичних застосувань.

Робота виконана в межах теми РК 0118U003535 “Динаміка формування просторово-неоднорідних структур в багаточастинкових системах” ВФА НАН України.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Henri V. Théorie générale de l'action de quelques diastases. *C. R. Acad. Sci.* 1902. **4**. P. 916–919. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.10.007>
2. Michaelis L., Menten M.L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Zeitschrift.* 1913. **49**. P. 333–369. doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.015>
3. A century of Michaelis-Menten kinetics: Cornish-Bowden A., Whitham C.P. (Eds.). *FEBS Lett.* (special issue). 2013. **587**. P. 2711–2894. doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.035>
4. Cornish-Bowden A. One hundred years of Michaelis-Menten kinetics. *Perspective in Science.* 2015. **4**. P. 3–9. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.12.002>
5. Monod J., Wyman J., Changeaux J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 1965. **12**. P. 88–118. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
6. Rabin B.R. Co-operative effects in enzyme catalysis: A possible kinetic model based on substrate-induced conformational isomerization. *Biochem. J.* 1967. **102**. P. 22c–23c. doi: <http://doi.org/10.1042/bj1020022C>
7. Cornish-Bowden A., Cárdenas M.L. Cooperativity in monomeric enzymes. *J. Theor. Biol.* 1987. **124**. P. 1–23. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(87\)80248-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(87)80248-5)
8. Frieden C. Kinetic aspects of regulation of metabolic processes: The hysteretic enzyme concept. *J. Biol. Chem.* 1970. **245**. P. 5788–5799.

9. Christophorov L.N. Proteins as nanomachines: Hysteretic enzymes revisited. *Springer Proceedings in Physics*. 2015. **156**. P. 222–232. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-06611-0_19
10. Kou S.C., Cherayil B.J., Min W., English B.P., Xie X.S. Single-molecule Michaelis-Menten equations. *J. Phys. Chem. B*. 2005. **109**. P. 19068–19081. doi: <https://doi.org/10.1021/jp051490q>
11. English B.P., Min W., van Oijen A.M., Lee K.T., Luo G., Sun H., Cherayil B.J., Kou S.C., Xie X.S. Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited. *Nat. Chem. Biol.* 2006. **2**. P. 87–94. doi: <https://doi.org/10.1038/nchembio759>
12. Christophorov L.N., Kharkyanen V.N., Berezetskaya N.M. Molecular self-organization: A single molecule aspect. *Chem. Phys. Lett.* 2013. **583**. P. 170–174. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.08.005>
13. Reuveni S., Urbakh M., Klafter J. Role of substrate unbinding in Michaelis-Menten enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. **111**. P. 4391–4396. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1318122111>

Надійшло до редакції 16.10.2018

REFERENCES

1. Henri, V. (1902). Théorie générale de l'action de quelques diastases. *C. R. Acad. Sci.*, 4, pp. 916-919. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.10.007>
2. Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Zeitschrift*, 49, pp. 333-369. doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.015>
3. Cornish-Bowden, A. & Whitham, C. P. (Eds.). (2013). A century of Michaelis-Menten kinetics. *FEBS Lett.* (special issue), 587, pp. 2711-2894. doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.035>
4. Cornish-Bowden, A. (2015). One hundred years of Michaelis-Menten kinetics. *Perspective in Science*, 4, pp. 3-9. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.12.002>
5. Monod, J., Wyman, J. & Changeaux, J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12, pp. 88-118. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
6. Rabin, B. R. (1967). Co-operative effects in enzyme catalysis: A possible kinetic model based on substrate-induced conformational isomerization. *Biochem. J.*, 102, pp. 22c-23c. doi: <http://doi.org/10.1042/bj1020022C>
7. Cornish-Bowden A. & Cárdenas, M. L. (1987). Cooperativity in monomeric enzymes. *J. Theor. Biol.*, 124, pp. 1-23. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(87\)80248-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(87)80248-5)
8. Frieden, C. (1970). Kinetic aspects of regulation of metabolic processes: The hysteretic enzyme concept. *J. Biol. Chem.*, 245, pp. 5788-5799.
9. Christophorov, L. N. (2015). Proteins as nanomachines: Hysteretic enzymes revisited. *Springer Proceedings in Physics*, 156, pp. 222-232. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-06611-0_19
10. Kou, S. C., Cherayil, B. J., Min, W., English, B. P. & Xie X. S. (2005). Single-molecule Michaelis-Menten equations. *J. Phys. Chem. B*, 109, pp. 19068-19081. doi: <https://doi.org/10.1021/jp051490q>
11. English, B. P., Min, W., van Oijen, A. M., Lee, K. T., Luo, G., Sun, H., Cherayil, B. J., Kou, S. C. & Xie, X. S. (2006). Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited. *Nat. Chem. Biol.*, 2, pp. 87-94. doi: <https://doi.org/10.1038/nchembio759>
12. Christophorov, L. N., Kharkyanen, V. N. & Berezetskaya, N. M. (2013). Molecular self-organization: A single molecule aspect. *Chem. Phys. Lett.*, 583, pp. 170-174. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.08.005>
13. Reuveni, S., Urbakh, M. & Klafter, J. (2014). Role of substrate unbinding in Michaelis-Menten enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, pp. 4391-4396. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1318122111>

Received 16.10.2018

Л.Н. Христофоров

Институт теоретической физики им. Н.Н. Боголюбова НАН Украины, Киев
E-mail: lchrist@bitp.kiev.ua

ВЛИЯНИЕ ОТСОЕДИНЕНИЯ СУБСТРАТА НА КИНЕТИКУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

В минимальной кинетической схеме с двумя конформационными состояниями фермент-субстратного комплекса с разной каталитической активностью показано, что обратный процесс отсоединения субстрата от комплекса не всегда играет ингибиторную роль. Наоборот, увеличение константы скорости отсоединения в определенных пределах может лишь ускорять оборот фермента. Определены концентрации субстрата, необходимые для возможности такого эффекта. Выводы одинаково пригодны для анализа данных экспериментов в ансамбле или на одиночных ферментах.

Ключевые слова: *одиночные макромолекулы, фермент-субстратное взаимодействие, конформационные состояния, скорость ферментативной реакции.*

L.N. Christophorov

Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: lchrist@bitp.kiev.ua

INFLUENCE OF SUBSTRATE UNBINDING ON KINETICS OF ENZYMATIC CATALYSIS

In a minimal kinetic scheme with two conformational states of the enzyme-substrate complex, which differ in their catalytic activity, it is shown that the backward process of substrate unbinding does not always play an inhibitory role. On the contrary, increasing the unbinding rate constant up to certain values can only accelerate the enzyme turnover. Substrate concentration values necessary for making this effect possible are determined. The conclusions are equally applicable to the analysis of either ensemble or single-enzyme experimental data.

Keywords: *single macromolecules, enzyme-substrate interaction, conformational states, enzymatic reaction velocity.*