

Кинетика ферментативного катализа

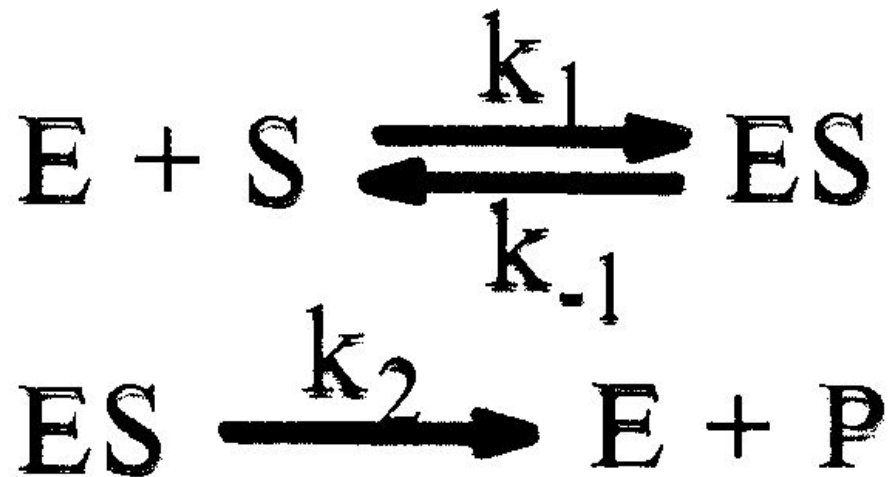
Кинетика ферментативного катализа

- *«Кинетика – дисциплина таинственная и могущественная ...»*
– Д.Кошланд мл.
- *«Хорошо разбираясь в основах ферментативной кинетики можно с лёгкостью ориентироваться во всех вопросах этой науки.»*
– Э.Корниш - Боуден



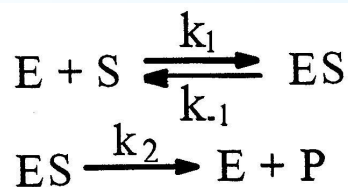
Кинетика ферментативного катализа

- Схема Михаэлиса



Кинетика ферментативного катализа

- Схема Михаэлиса



$$v_0 = \frac{k_2 E_0}{1 + \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \left(\frac{1}{S_0} \right)}$$

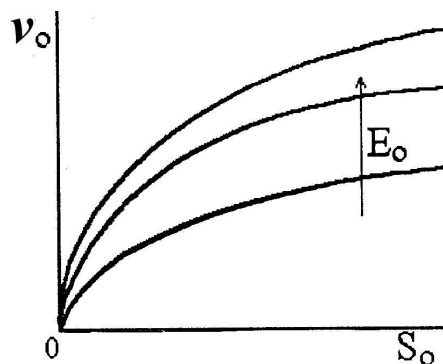
$$v = \frac{k_2 E_0 \cdot S_0}{K_m + S_0}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

константа Михаэлиса.

Если $k_{-1} \gg k_2$ $K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$

константа диссоциации фермент-субстратного комплекса



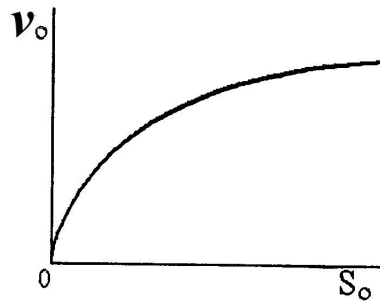
$$V_m \equiv k_2 \cdot E_0$$

$$k_2 = k_{\text{кат}}$$

Кинетика ферментативного катализа

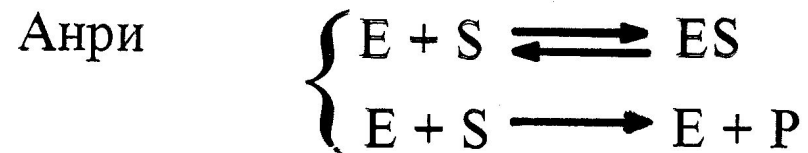
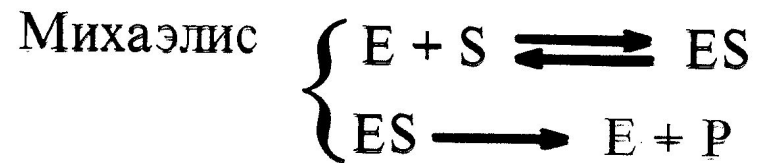
- Схема и уравнение Анри

$$v_0 = \frac{k_A \cdot K_A \cdot E_0 \cdot S_0}{K_A + S_0}$$



Экспериментально та же зависимость начальной скорости от концентрации субстрата, что и в случае схемы Михаэлиса

Механизмы различны



Стационарное приближение не дает возможности дискриминировать эти механизмы

Кинетика ферментативного катализа

- Дискриминация схем Анри и Михаэлиса из предстационарной кинетики.

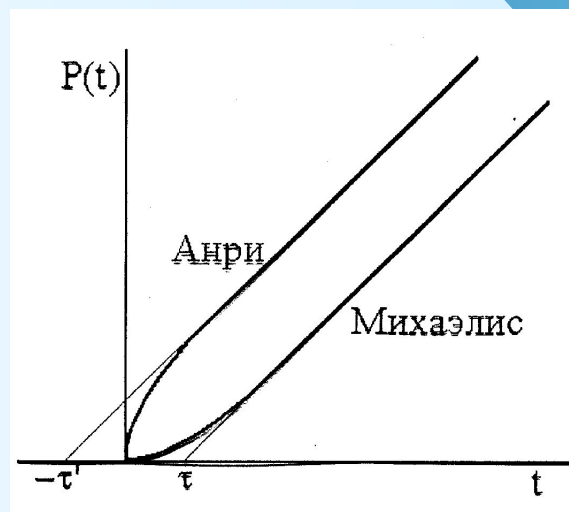
Механизмы Михаэлиса и Анри могут быть дискриминированы при исследовании кинетики ферментативной реакции в нестационарном режиме

Схема Михаэлиса

$$P(t) = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m + S_0} t + \frac{k_2 E_0 S_0}{(S_0 + K_m)(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)} \left\{ e^{-k_1(S_0 + K_m)t} - 1 \right\}$$

Схема Анри

$$P(t) = \frac{K_A k_A E_0 S_0}{K_A + S_0} t - \frac{k_A E_0 S_0^2}{(K_A + S_0) k_1} \left\{ e^{-k_1(S_0 + K_A)t} - 1 \right\}$$



$$\tau = \frac{1}{k_1(S_0 + K_m)}$$

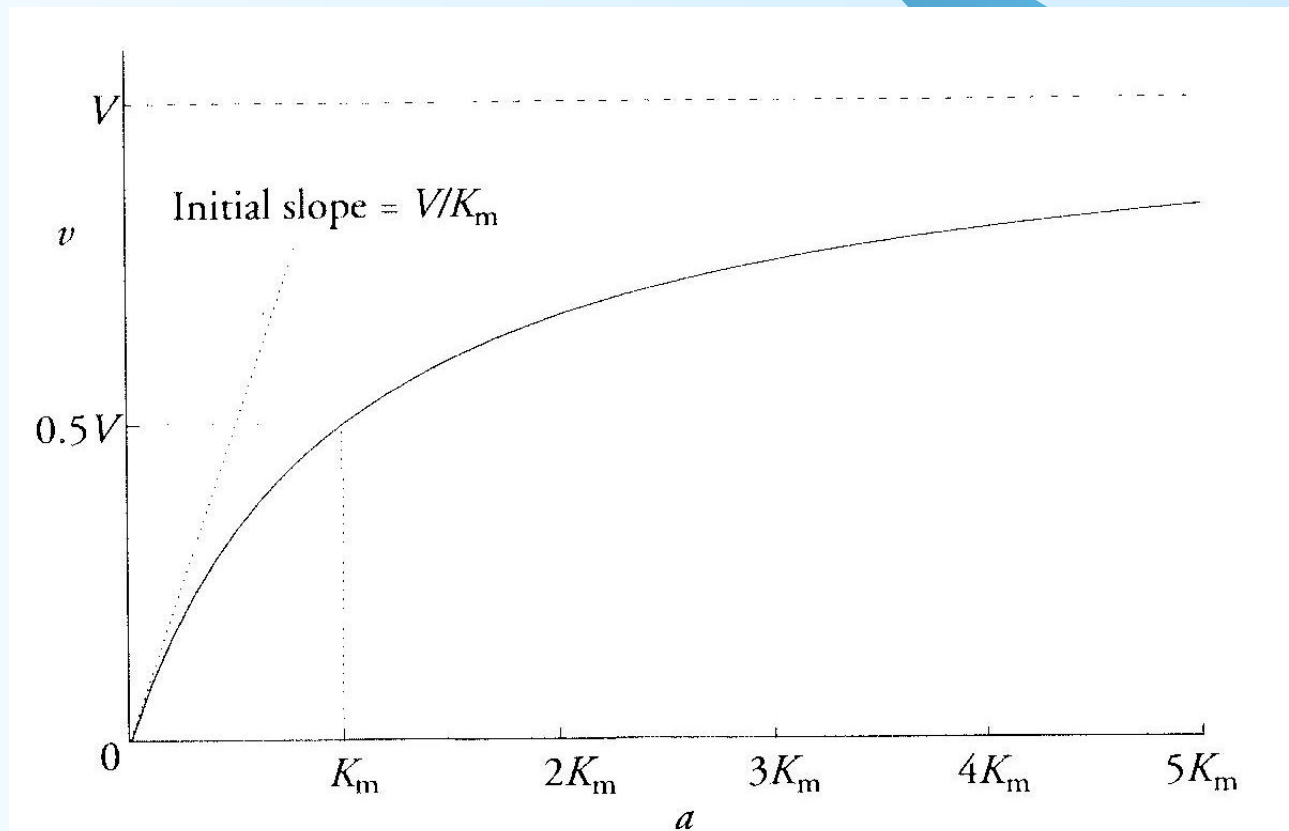
$$\tau' = -\frac{S_0}{k_1 K_A (K_A + S_0)}$$

Михаэлис: увеличение скорости по мере накопления ES

Анри: уменьшение скорости по мере накопления ES и расхода E

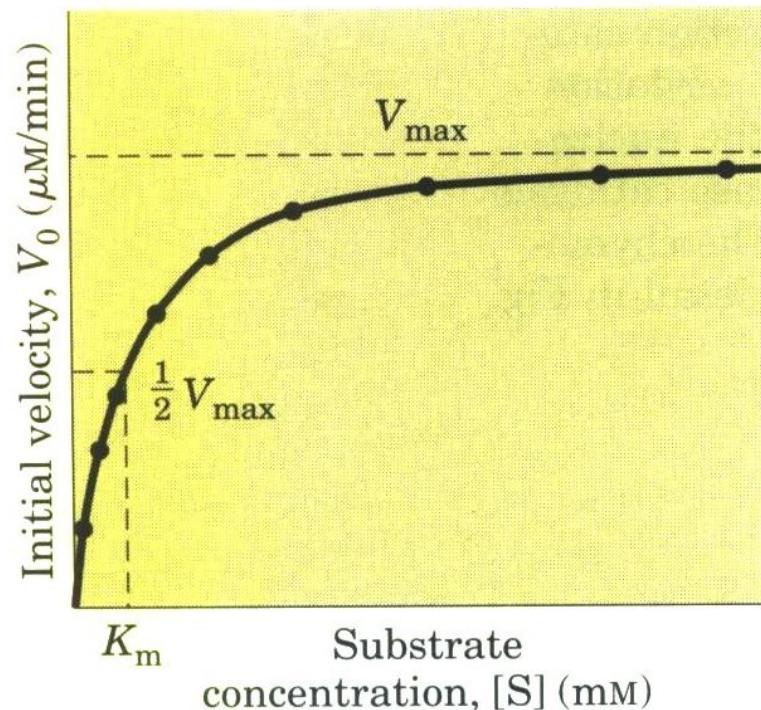
Кинетика ферментативного катализа

- Экспериментальное определение K_m и V_m в стационарном режиме



Кинетика ферментативного катализа

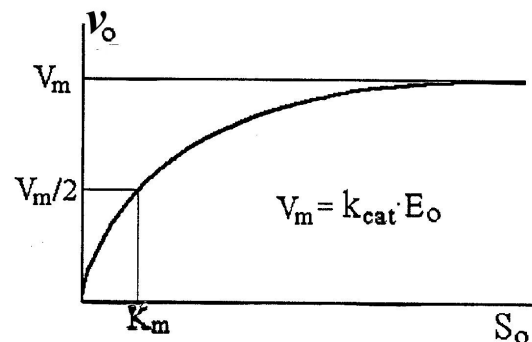
- Экспериментальное определение K_m и V_m в стационарном режиме



Кинетика ферментативного катализа

- Экспериментальное определение K_m и V_m в стационарном режиме

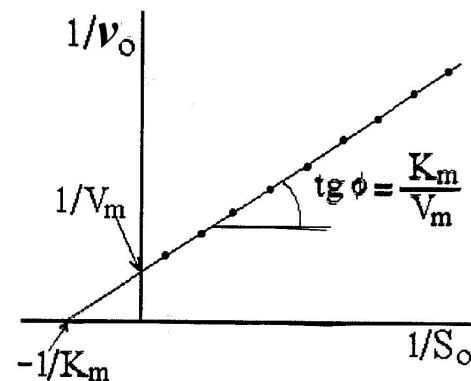
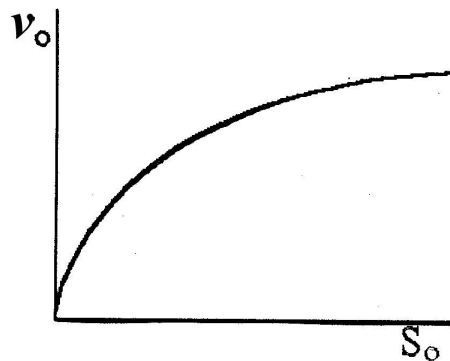
$$v_o = \frac{k_{cat} E_o \cdot S_o}{K_m + S_o} \quad \text{уравнение Михаэлиса}$$



Определение V_m и K_m

Метод Лайнуивера-Берка

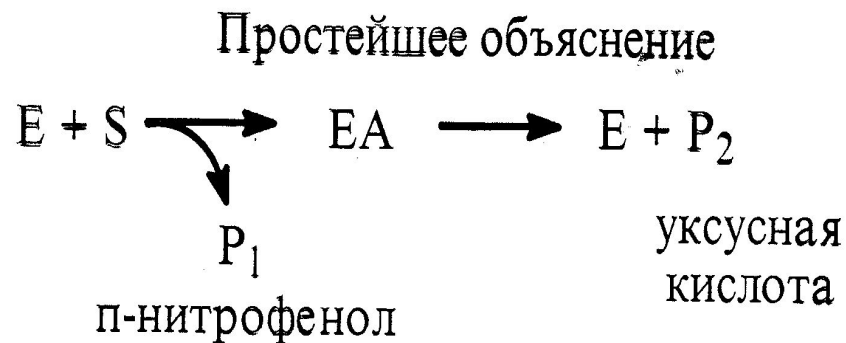
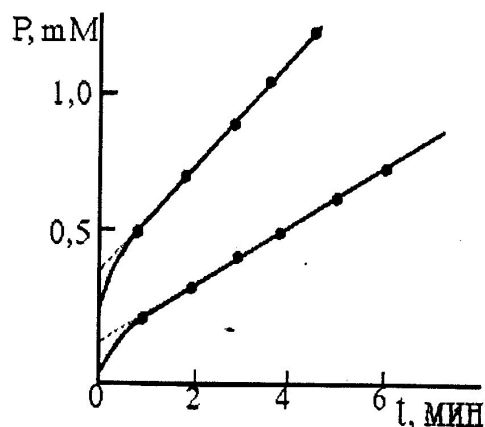
$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{S_o} \quad \text{двойные обратные координаты.}$$



Кинетика ферментативного катализа

- Трехстадийная схема реакции с образованием ацилфермента - механизм действия сериновых протеаз

Хартли и Килби (Hartley, Kilbi, 1951), исследуя кинетику гидролиза п-нитрофенилового эфира уксусной кислоты, обнаружили две стадии.

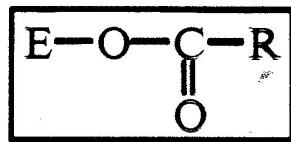
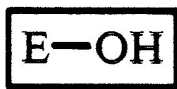
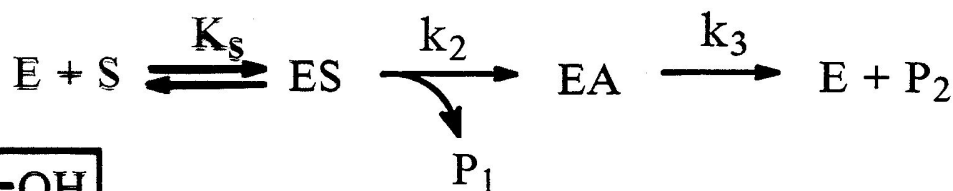


Кинетика ферментативного катализа

- Трехстадийная схема реакции с образованием ацилфермента - механизм действия сериновых протеаз

Сериновые протеазы (химотрипсин, трипсин, плазмин, тромбин и др.)

Промежуточный ацилфермент



ацилфермент

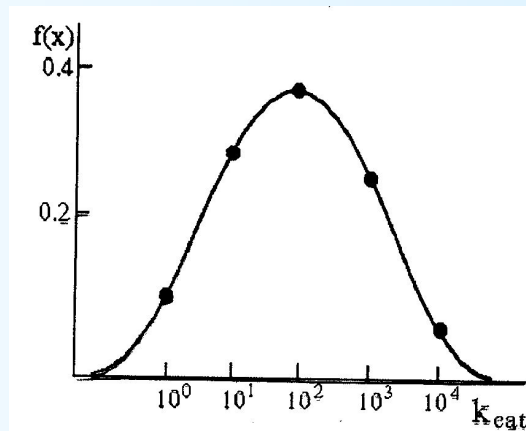
$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}; \quad K_m = \frac{K_s \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

$k_2 \gg k_3$, $k_{cat} = k_3$
лимитирует
деацилирование

$k_3 \gg k_2$, $k_{cat} = k_2$
лимитирует
ацилирование

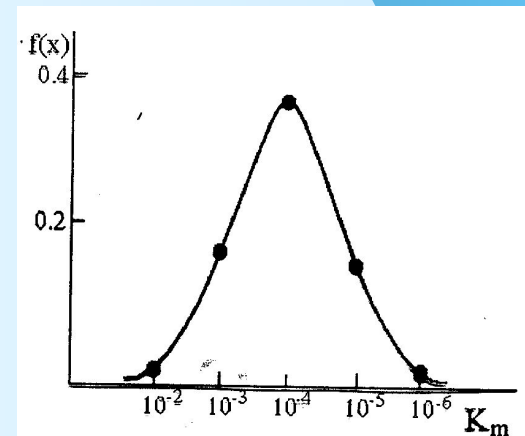
Кинетика ферментативного катализа

- Скорости элементарных стадий в ферментативном катализе. Характерные значения k_{cat} и K_m .
 - выборка около 500 ферментов. Значения констант разбиты на группы с приблизительно одинаковыми значениями k_{cat} и K_m в пределах одного порядка, подсчитано число ферментов в каждой группе. Это число отнесено на общее число ферментов в выборке. Таким образом найдена функция распределения ферментов относительно параметров k_{cat} и K_m .



Типичное значение

$$k_{cat} = 10^2 \text{ с}^{-1}$$



Типичное значение

$$K_m = 10^{-4} \text{ М}$$