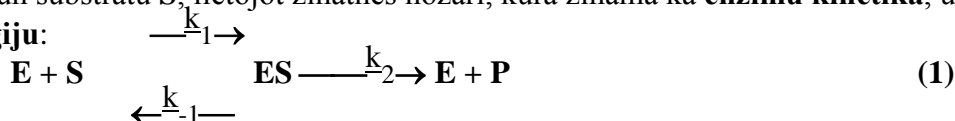


Enzīmu vadīto reakciju kinētikas mehānisms

Enzīmu katalīzes mehānisma studijas ir centrētas uz *reakcijas ātruma* (*velocity* - latīniski) noteikšanu starp enzīmu **E** un substrātu **S**, lietojot zinātnes nozari, kura zināma kā **enzīmu kinētika**, un, kuru medicīnā pazīst kā **enzimoloģiju**:



Michaelisa un Mentenas vienādojuma izvešana sākas no pamata hipotēzes, ka ātrumu limitējošā stadijā enzīma vadītajā reakcijā ir substrāta kompleksa **ES** sadalīšanās **produktos** (**P**) un atbrīvotā enzīmā **E**.

Reakcijas ātruma (*velocity* – latīniski) vienādojuma izteiksme ir
$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Michaelisa konstantes izteiksme no divām virknē sekojošo reakciju ātruma konstantēm k_1, k_{-1}, k_2 (1) ir

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (3)$$

Gadījumos, kad enzīma-substrāta pārejas komplekss **ES** ir piesātinājumā, tad **maksimālais ātrums** ir aprēķināms ar izteiksmi $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]$. Tad substrāta koncentrācija ir liela $[S] \gg K_m$.

Vienādojums (2) pārvēršas par nultās kārtas $[S]^0$ reakcijas ātruma izteiksmi $V_o = V_{\max}$.

Pirmās kārtas reakcijas konstantei k_{cat} ir apgrieztā laika mērvienība 1/s vai s^{-1} .

saukts arī par **pārvēršanās skaitli**. Vienādojums (2) iegūst sekojošu izskatu

$$V_o = \frac{k_{\text{cat}} [E_t] [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

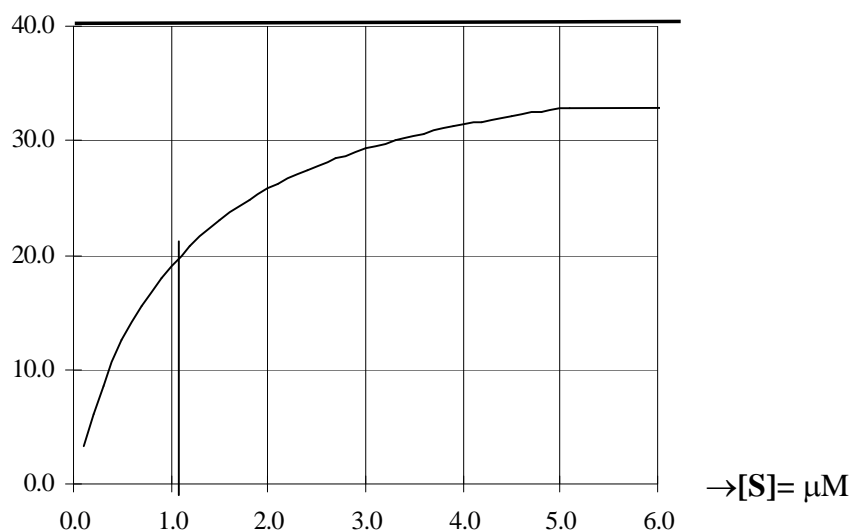
Dažādu enzīmu E_i katalītisko pietiekamību vai dažādu substrātu S_i pārvēršanos produktos P_i salīdzina pēc attiecības k_{cat}/K_m divām reakcijām. Šo attiecību dažkārt sauc par **specifisko konstanti**, kura ir reakcijas ātruma konstante pārvērtībai no $E_i + S_i$ līdz $E_i + P_i$. Kad substrāta koncentrācijas ir mazas $[S_i] \ll K_m$.

Vienādojums (4) kļūst par pirmās kārtas $[S_i]^1$ reakcijas ātruma izteiksmi, ja $[E_i]$ ir konstants lielums:

$$V_o = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E_i][S_i]; \quad E_i + S_i \rightarrow E_i + P_i \quad (5)$$

V_o ir atkarīgais mainīgais no divām vielu koncentrācijām $[E_t]$ un $[S]$; tāpēc ir otrās kārtas reakcijas vienādojums un konstantei k_{cat}/K_m ir atbilstošas mērvienības $M^{-1}s^{-1}$. Kā augšējā robeža 10^8 to $10^9 M^{-1}s^{-1}$ lielumam k_{cat}/K_m ir sasniedzams ātrums, ar kuru **E** un **S** var difundējot satīties ūdens šķīdumā. Par šādiem enzīmiem saka, ka sasnieguši **katalītisko perfektumu**. Viens no ātrākajiem enzīmiem katalāze CATALASE :

↑ $V, M/s$ CATALASE $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E] = 40 M/s$ ja $[E] = 1 \cdot 10^{-6} M$ & $k_{\text{cat}} = 4 \cdot 10^7 M/s$



$K_m = 1.1 \mu M$

Tabula 1. Enzīmi, kuru k_{cat}/K_m ir sasniegusi difūzijas kontrolēto robežu (10^8 to 10^9 $M^{-1}s^{-1}$)

Enzīms	Substrāts	k_{cat} , s^{-1}	K_m , M	k_{cat}/K_m , $M^{-1}s^{-1}$
Acetilholinesterāze	Acetilholīns	$1.4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^8$
Heksokināze (smadzenes)	ATF		$4 \cdot 10^{-4}$	
RecA olbaltums (ATPāze)	ATF	$4 \cdot 10^{-1}$		
	D-Glikoze		$5 \cdot 10^{-5}$	
	D-Fruktoze		$1.5 \cdot 10^{-3}$	
Karboanhidrāze	CO ₂	$1 \cdot 10^6$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$8.3 \cdot 10^7$
	HCO ₃ ⁻	$4 \cdot 10^5$	$2.6 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^7$
Katalāze (Catalase)	H ₂ O ₂	$4 \cdot 10^7$	1.1	$4 \cdot 10^7$
Himotripsīns	Glicil-tirozinil-glicīns		$1.08 \cdot 10^{-1}$	
	N-Benzil-tirozīn-amīds		$2.5 \cdot 10^{-3}$	
Krotonāze	Krotonil-CoA	$5.7 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2.8 \cdot 10^8$
Fumarāze	Fumarāts	$8 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1.6 \cdot 10^8$
	Malāts	$9 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$3.6 \cdot 10^7$
β-Laktamāze	D-Laktoze		$4 \cdot 10^{-3}$	
β-Galaktozidāze	Benzil-penicilīns	$2.0 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^8$
Treonīn dehidratāze	L-Treonīns		$5 \cdot 10^{-3}$	
Trioze fosfāta izomerāze	Glicerāldehīda 3-fosfāts	$4.3 \cdot 10^3$	$4.7 \cdot 10^{-4}$	$2.4 \cdot 10^8$

Avots: Fersht Alan (1999) Structure and Mechanism in Protein Science, p. 166, W. H. Freeman and Company, New York

Difūzija

Difūzija ir patvaļīga molekulu sajaukšanās siltuma kustības dēļ, kā rezultātā molekulas vienmērīgi izvietojas kādas fāzes vidē. Pirmais **Fika** likums **molekulu difūzijas ātrums** v_{dif} : ir vielas masa $dm = dn \cdot MW$, kura laika intervālā dt difundē cauri šķērsriezuma laukumam S mērvienībās cm^2 , kurš ir proporcionāls koncentrācijas gradientam dC/dx distancē dx vienībai 1 cm:

$$v_{dif} = dm/dt = dn \cdot MW/dt = D \cdot S \cdot -dC/dx$$

mīnusa – zīme parāda pozitīvu **difūziju** koncentrācijas gradienta samazināšanās $-dC/dx$ virzienā, kurā $\Delta C = C_2 - C_1 < 0$; $C_2 < C_1$ ir negatīvs un $\Delta x = x_1 - x_2 > 0$; $x_2 > x_1$ ir pozitīvs distances mērījums.

MW - molekulas molmasa,

g/mol ;

D - **difūzijas** koeficients,

cm^2/s ;

dn - vielas daudzums – molu skaits dn , kurš pārvietojies gradienta virzienā, mol .

Ja pieņem, ka $S = 1$ cm^2 un uz distances dx 1 cm ir $-dC/dx = 1$ M/cm , tad difūzijas ātrums:

$$v_{dif} = dm/dt = dn \cdot MW/dt = D \cdot 1 cm^2 \cdot 1 M/cm;$$

molārais difūzijas ātrums $v_{dif}/mol = dn/dt = D / MW$ { $cm^2/s \cdot mol/g \cdot mol/dm^3 \cdot cm^2 \cdot g/mol/cm = mol/s \cdot 10^{-3}$ } cauri $S = 1$ cm^2 un uz 1 cm distances. MW / D { $mol^{-1} \cdot s^{-1}$ } maksimāli iespējama reakcijas ātrums, kuru ierobežo molekulu kustības difūzijas ātrums, lai molekulas E un S savienotos ES aktīvajā pārejas kompleksā ūdens šķīdumā.

Tabula 2. Vielu molekulu difūzijas koeficienti.

molekula	Mol masa, g/mol	Difūzijas koeficients, $D \cdot 10^7$, cm^2/s	Attiecība, $D/MW \cdot 10^5$, $mol/s \cdot 10^{-3}$	MW/D , $mol^{-1} \cdot s^{-1} \cdot 10^8$	Molekula	Mol masa, g/mol	koeficients difūzijas, $D \cdot 10^7$, cm^2/s	Attiecība, $D/MW \cdot 10^5$, $mol/s \cdot 10^{-3}$	D/MW $mol^{-1} \cdot s^{-1} \cdot 10^{12}$
Ūdens H ₂ O	18.016	107.55	5.969827	0.167509	Saharoze	342.296	38.0	11101.5	0.000901
25°C Skābeklis	32.000	O ₂ 260.00	8.125000	0.123077	Tripsīns	23800	9.50	39.9200	0.250526
Ogl(IV)Oksīd	44.01	CO ₂ 160.00	3.635537	0.275062	Pepsīns	34500	9.00	26.0900	0.383333
25°C Bikarbonāts	84.008	HCO ₃ ⁻ 125.49	1.493809	0.669430	Ovalbumīns	43800	7.70	17.5800	0.568831
Urīnviela	60.062	110.00	1.831441	0.546018	Katalāze	232000	4.10	1.7670	0.565854
14.8°C Urīn	60.062	112.15	1.867283	0.535537	Ureāze	480000	3.50	0.7292	1.371429
Glicerīns	92.094	73.0	0.792668	1.261562	Hemoglobīn	64500	7.0	1.0853	0.921429

Reaction Rates The Journal of Biological Chemistry. Vol273.No.41.Issue of October 9.pp.26257-26260.1998 © 1998 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Inc. Printed in U.S.A.

Abas eksperimentālās un teorētiskās studijas rāda, ka reakcijas ir bieži bremzētas ar šķīdinātājiem, ja salīdzina ar līdzīgām reakcijām gāzes fāzē. Tabulā 3. salīdzina ātrumu S_{n2} aizvietošanas reakcijas, $\text{CH}_3\text{Br} + \text{Cl}^- \Rightarrow \text{CH}_3\text{Cl} + \text{Br}^-$, dažādas polaritātes un dielektriskās caurlaidības šķīdinātājos, ieskaitot «mulles» šķīdinātājus, kas atbilst gāzes fāzes videi. Šķīdinātāju efekts ir kavēt reakcijas ātrumu relatīvi attiecībā pret gāzu fāzi, kurā reakcija notiek tādos pašos apstākļos.

Tabula 3. Reakcijas ātrums S_{n2} reakcijai dažādos šķīdinātājos atšķirīgā dielektriskā caurlaidībā un polaritātē, ieskaitot gāzes fāzes reakciju.

(Tanaka, K., Mackay, G. I., Payzant, J.D. & Bohme, D. K. (1976) Can.J.Chem.54,1843-1659)

$\text{CH}_3\text{Br} + \text{Cl}^- \Rightarrow \text{CH}_3\text{Cl} + \text{Br}^-$	
šķīdinātāji	Relatīvais ātrums, $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Gāzes fāze	1
MeCO	10^{-10}
Dimetil-formamīds	10^{-11}
CH_3OH	10^{-15}
H_2O	10^{-16}

Enzīmi ir reakcijas pre-organizēti

Pretēji gāzveida reakcijai, šķīdumos enzīma vide ir pre-organizēta kļūstot komplimentāra reaģenta pārejas kompleksa konfigurācijai, un reorganizācijas zaudējums ir relatīvi nelieli. Kā piemēram apsverot iespējamus notikumus, kas var notikt kamēr reaģents ir saistījies pie enzīma aktīvās vietas. Olbaltums var mainīt konformāciju daudzos veidos un dažādās laika skalās, kā parādīts Tabulā 4.

Tabula 4. Olbaltumvielu dinamisku notikumu laika sprīži, kas var notikt enzīmu kompleksos

(McCammon, J.A., & Harvey, S.C. (1987) Dynamics of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, New York) .

Kustība	Laika sprīdis, $\log_{10}(\text{s})$	Novārtā pamesta elektronu dinamika,
Ķīmisko saišu vibrācija	-14 to -13	Visātrākā kustība ir ķīmisko saišu vibrācijai notiekošas ar kārtu no desmit līdz simts femto sekundes $10^{-14} \div 10^{-13}$ s.
Universālais frekvences faktors kT/h	-13	
Globulāra fragmenta elastīga vibrācija	-12 to -11	
Cukuru pārlocīšanās	-12 to -9	
Sāna virkņu rotācija pie virsmas	-11 to -10	
Apglabāto grupu vērpes atbrīvošanās	-11 to -9	
Sterna-Volmera enerģijas pārnese DHFR kofaktors	-9	
Enģu pagriešanās	-11 to -7	
Olbaltumvielas elpveida krūšu kustība		
Viduvēja izmēra sānu virkņu rotācija interjerā	-4 to 0	
Allostēriska pāreja	-5 to 0	Universālais frekvences faktors kT/h, kurš parasti ir lietots aktīvā pārejas kompleksa analizē, šķiet notiek subpiko sekunžu laika sprīdī.
Lokāla denaturācija	-5 to 1	
E. coli DHFR katalīze ($1/k_{\text{hydride}}$)	-3	
ATPāzē + kloķa stienā rotācija	70 ms 14.3 Hz	

Turpretī kontrastam tirozīna Tyr riņķis rotē olbaltumvielas interjerā laika intervālā no sekundes līdz submili sekunde. Šīs kustības reaktīvajā laikā notiek līdz pat 10^{13} reizēm asociētā ar $k_B T/h$ kustība, lai gan ne visas šādas kustības noslēdzas ar reakciju. Ja enzīma katalīze atkarīga no konformāciju izmaiņām, tāda kā riņķveida apmešanās, tad ātrumu ierobežojošs solis būtu riņķveida kustība; dinamiski efekts, kurš rodas no ķīmiskās saites vibrācijas būtu maskēts ar konformācijas izmaiņu.

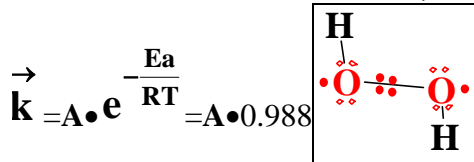
Ečeričia koli dihidro folāta reduktāzes ķīmiskā reakcija notiek milli sekunžu laika skalā, kas ir pietiekošs laiks daudzām konformāciju izmaiņu notikumiem, lai inducētu reakciju. Ja tas bija gadījums, kam vajadzētu maskēt katru efektu konformācijas pārslēgšanos uz straujākām brīvības pakāpēm tādām kā ķīmisko saišu vibrācijas. Tomēr reakcijas ātrums mērīts pirms miera stāvokļa apstākļiem 1000 s^{-1} , Tabula 4. parāda deiterija izotopa efektu no 3, kurš pamatojas uz izmaiņām saišu vibrācijas dabā. Var secināt, ka kinētiski nozīmīga reorganizācija enzīma-substrāta-kofaktors Michaelisa-Menten kompleksā ir nepieciešama katalīzes norisei.

Arēnusa ātruma (velocity) konstantes k izteiksme izskaidro KATALĀZES aktivitāti reakcijā, lietojot:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

aktivācijas enerģiju E_a ,
pirmseksponenciālo - ģeometrisko faktoru A un temperatūras T ietekmi.

Aktivācijas enerģija $E_{a\text{KATALĀZE}} = 29 \text{ J/mol}$ KATALĀZEI samazinās salīdzinot bez katalizatora $E_{a(\text{bez katalizatora})} = 79000 \text{ J/mol}$ kā $79000/29 = 2724$ reizes E_a . Ģeometriskais faktors $A_{\text{bez katalizatora}} = 0.01$ un KATALĀZEI $A_{\text{KATALĀZE}} = 0.13$ reizes $0.13/0.01 = 13$ palielina pirmseksponenciālo ģeometrisko faktoru $A_{\text{KATALĀZE}}$. Fizikālā jēga Bolcmaņa eksponencialajam faktora lielumam $0.988 = \exp(-E_a/(RT))$. No katrām 100 sadursmēm 98,8 sadursmes ir aktīvas, ar ko KATALĀZE palielina reakcijas ātrumu.



Reaģējošās molekulas ģeometriskā struktūra parāda peroksīda valences saišu leņķus, distanci, elektronu struktūru! KATALĀZE palielina reakcijas ātrumu 1 molam peroksīda H_2O_2 , piemērojot pareizu sadursmes ģeometriju, A , E_a , Bolcmaņa faktoru 0.988!

pārvēršot toksisko peroksīdu H_2O_2 bioloģiskajos labumos $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Q}$ par **skābekli+ūdeni+siltumu**.

$$\sqrt{\frac{v}{v}} = \frac{\text{CAT}}{k} \cdot [H_2O_2] = 0.36 \cdot [H_2O_2]; \quad \frac{\sqrt{\frac{\text{CAT}}{k}}}{\sqrt{k}} = \frac{0.36}{1,19 \cdot 10^{-8}} = 30 \cdot 10^6 \text{ reizes lielāka ātruma konstante.}$$

KATALĀZES enzīma aktīvajā centrā ir hēmu dzelzs(III) saturoša molekula – prostētiskā grupa.

