

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 11

6 maja, 2025

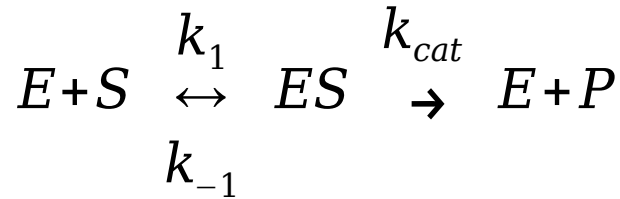
fizyka enzymów – część 1

<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

jantosi@fuw.edu.pl

Równanie Michaelisa-Menten

Powszechnie głosi się, że Michaelis i Menten wykonali pomiary prędkości początkowej w funkcji zmiennego stężenia sacharozy i dopasowali swoje dane w oparciu o założenie, że wiązanie sacharozy jest w równowadze z enzymem oraz postulat, że szybkość reakcji jest proporcjonalna do stężenia sacharozy kompleks enzym-substrat. Badali oni jednak i opisali kinetykę enzymatyczną w całym zakresie przebiegu reakcji.



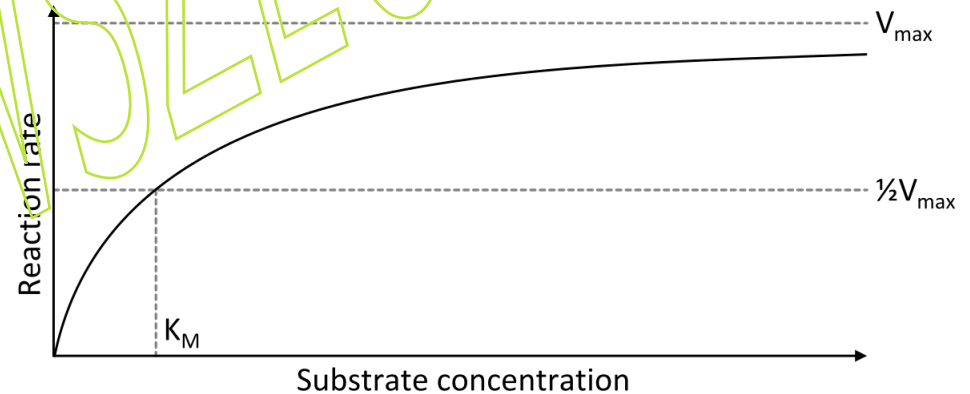
$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES]$$

Dla warunków ustalonych, tj. dla $[ES] = \text{const.}$, mamy:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] = 0$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_{cat}} \Rightarrow$$

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} [E][S]$$



$$[ES] = \frac{k_1([E]_o - [ES])[S]}{k_{-1} + k_{cat}}$$

$$\Rightarrow v = k_{cat} \cdot \frac{[E]_o [S]}{K_m + [S]}$$

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

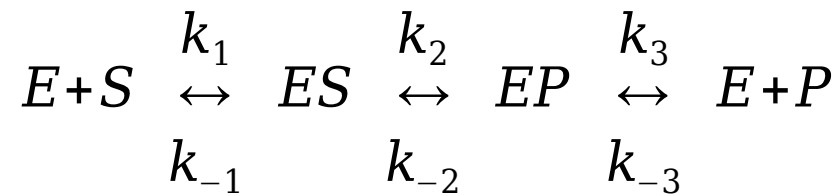
stała Michaelisa

$$v_{max} = k_{cat}[E]_o$$

szybkość maksymalna

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES]$$

Równanie to pojawia się w
Molecular Biology of the Cell
Sixth Edition, 2015



$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E(t) c_S(t) - (k_{-1} + k_2) c_{ES}(t) + k_{-2} c_{EP}(t) \approx 0$$

$$c_S(t) \approx c_S(0)$$

$$c_P(t) = 0$$

$$c_E(t) = c_E(0) - c_{ES}(t) - c_{EP}(t)$$

$$\frac{dc_{EP}}{dt} = k_2 c_{ES}(t) - (k_{-2} + k_3) c_{EP}(t) \approx 0$$

$$c_{EP} = \frac{k_1 k_2 c_S(0) c_E(0)}{k_1 c_S(0) (k_{-2} + k_2 + k_3) + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}$$

$$\frac{dc_P}{dt} \stackrel{\text{def}}{=} v = k_3 c_{EP}(t)$$

$$\frac{v}{c_E(0)} = \frac{k_1 k_2 k_3 c_S(0)}{k_1 c_S(0) (k_{-2} + k_2 + k_3) + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}$$

$$\frac{v}{c_E(0)} = \frac{k_1 k_2 k_3 c_S(0)}{k_1 c_S(0) (k_{-2} + k_2 + k_3) + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}$$

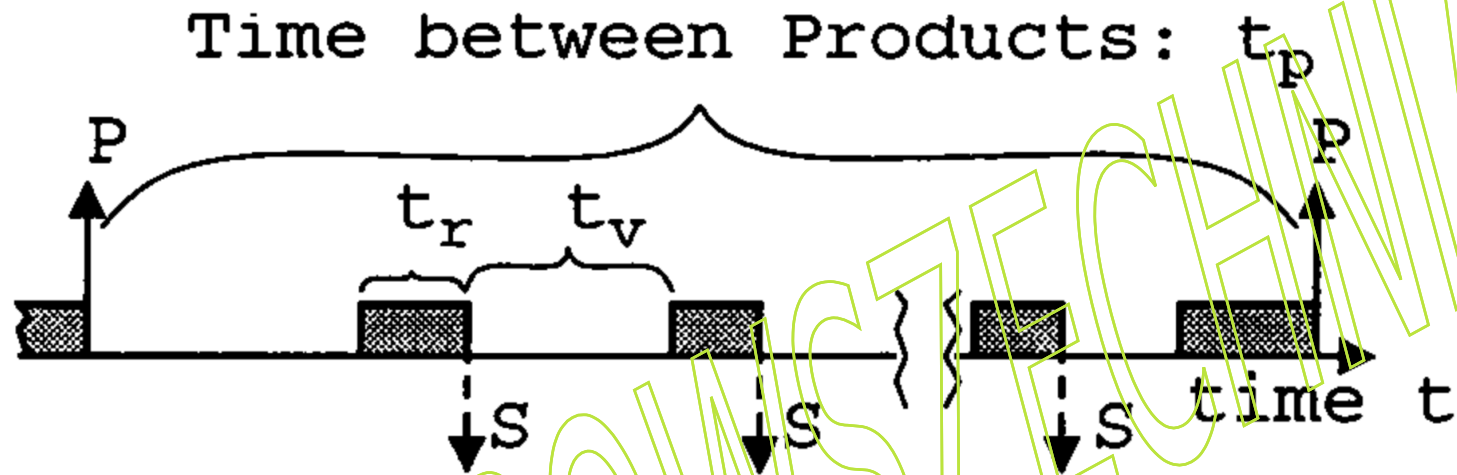
$$\frac{v}{c_E(0)} = \frac{\frac{k_2 k_3}{(k_{-2} + k_2 + k_3)} c_S(0)}{\frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_1 (k_{-2} + k_2 + k_3)} + c_S(0)} \equiv \frac{k_{cat} c_S(0)}{K_m + c_S(0)}$$

Jeśli chemiczna transformacja, $ES \rightarrow EP$, jest krokiem limitującym szybkość całej reakcji i jest zasadniczo nieodwracalna, czyli gdy $k_3 \gg k_2$ i $k_{-2} \rightarrow 0$, to powyższe równanie upraszcza się do postaci podanej przez Michaelisa i Menten

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

$$\frac{v_{max}}{c_E(0)} = k_2 \quad (\equiv k_{cat})$$

Mikroskopowy model kinetyki enzymatycznej,



Sekwencja czasowa zdarzeń pomiędzy kolejnymi formacjami produktu w miejscu enzymu; zacienione obszary reprezentują kompleksy enzymatyczne, a strzałki wskazują dysocjację substratu uwalniającego kompleks, S lub produktu, P .

$$t_p = \sum_{i=1}^n (t_v + t_r)$$

n , t_v , t_r i t_p są zmiennymi stochastycznymi i zakłada się, że są niezależne w długim przedziale czasu, zmienne te można przedstawić za pomocą ich wartości oczekiwanych

Definicje:

T_v - średni czas gdy miejsce aktywne enzymu jest puste (vacancy time);

T_r - średni czas trwania kompleksu ES (residence time);

N - średnia liczba aktów wiązania substratu pomiędzy aktami powstania produktu;

T_p - średni czas pomiędzy utworzeniem kolejnych produktów;

$$T_p = N(T_v + T_r)$$

Szybkość reakcji v wynosi:

$$v = \frac{1}{T_p} = \frac{1}{N(T_v + T_r)} = \frac{P_a}{T_v + T_r}; \quad P_a \equiv \frac{1}{N} \quad \text{prawdopodobieństwo, że kompleks ES jest produktywny}$$

$$v_{max} = \frac{1}{N T_r} = \frac{P_a}{T_r}; \quad K_{m-app} = [S] \quad \text{gdy } T_v = T_r$$

I jeszcze trzy definicje:

R_c - szybkość dostarczania substratu do enzymu (czyli częstość ich dyfuzyjnych zetknięć);

P_{on} - prawdopodobieństwo, że dyfuzyjne spotkanie substrat-enzym spowoduje utworzenie kompleksu (zwykle $P_{on} < 1$);

T_c - średni czas pomiędzy kolejnymi zderzeniami enzym-substrat (collision time);

$$T_v = \frac{T_c}{P_{on}}$$

Jednokierunkowe stałe szybkości modelu reakcji można odwrotnie wyrazić w postaci parametru modelu mikroskopowego jako:

$$k_1 = R_c \cdot P_{on}$$

$$k_{-1} = (1 - P_a) \cdot T_r^{-1}$$

$$k_{cat} = P_a \cdot T_r^{-1}$$

Zatem współczynnik „efektywności katalitycznej”, k_{cat}/K_M jest w rzeczywistości iloczynem wydajności enzymu po skompleksowaniu z substratem, P_a , łatwości, z jaką enzym wiąże substrat, P_{on} , oraz szybkości dostarczania substratu, R_c , co z kolei odzwierciedla szybkość dyfuzji substratu i jego stężenie:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{P_a \cdot T_r^{-1}}{T_r^{-1} / (R_c \cdot P_{on})} = P_a \cdot P_{on} \cdot R_c$$



X. Sunney Xie

Aktywność katalityczną enzymów od dawna rozumiano w kategoriach mechanizmu Michaelisa-Menten: substrat S wiąże się odwracalnie z enzymem E , tworząc kompleks enzym-substrat ES , który ulega jednocząsteczkowemu rozkładowi, tworząc produkt P , regenerując pierwotny enzym E . Postęp w spektroskopii i manipulacji pojedynczych cząsteczek umożliwił badanie reakcji enzymatycznych na poziomie pojedynczych cząsteczek, rodząc tym samym między innymi pytanie, czy równanie Michaelisa-Menten pozostaje adekwatnym opisem kinetyki pojedynczych cząsteczek.

Single-Molecule Enzymatic Dynamics

H. Peter Lu, Luying Xun, and **X. Sunney Xie**

SCIENCE, 282:1877-1882 (1998)

Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited

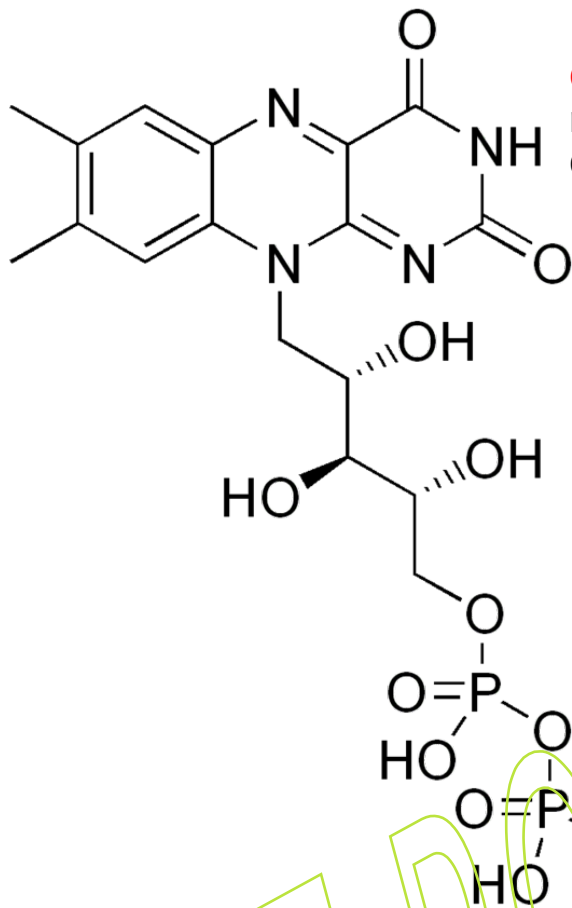
Brian P. English, Wei Min, Antoine M van Oijen, Kang Taek Lee, Guobin Luo, Hongye Sun, Binny J Cherayil, S C Kou, and **X Sunney Xie**

Nature Chem. Biol., 2:87-94 (2006)

Single-Molecule Michaelis-Menten Equations

S. C. Kou, Binny J. Cherayil, Wei Min, Brian P. English, and **X. Sunney Xie**

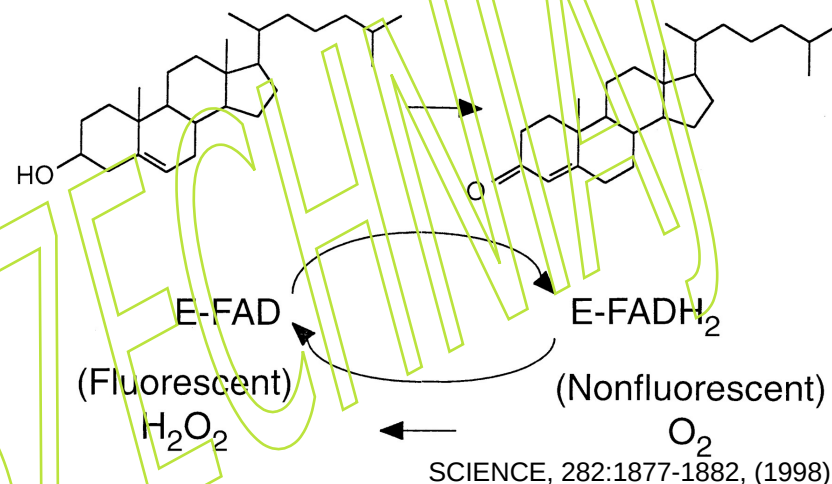
J. Phys. Chem. B 109:19068-19081 (2005)



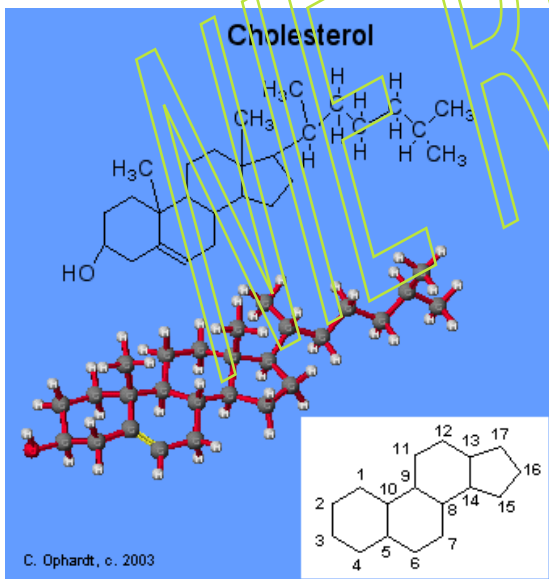
Oksydazy cholesterolowe to enzymy bakteryjne, które katalizują pierwszy etap rozkładu cholesterolu. Są to flawoenzymy zawierające kofaktor redoks, dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD).

Oksydaza cholesterolowa (COx)*

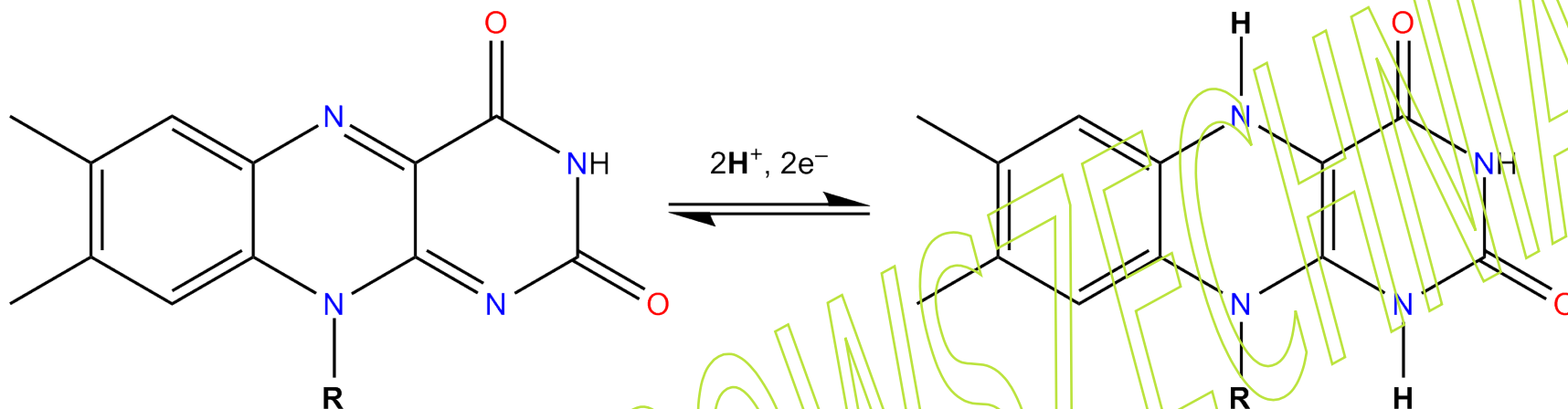
Oksydaza cholesterolowa jest enzymem dwusubstratowym (cholesterol i tlen cząsteczkowy) i działa zgodnie z mechanizmem ping-ponga, a każdą reakcję półkową dobrze opisuje mechanizm Michaelisa-Menten.



*http://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol_oxidase

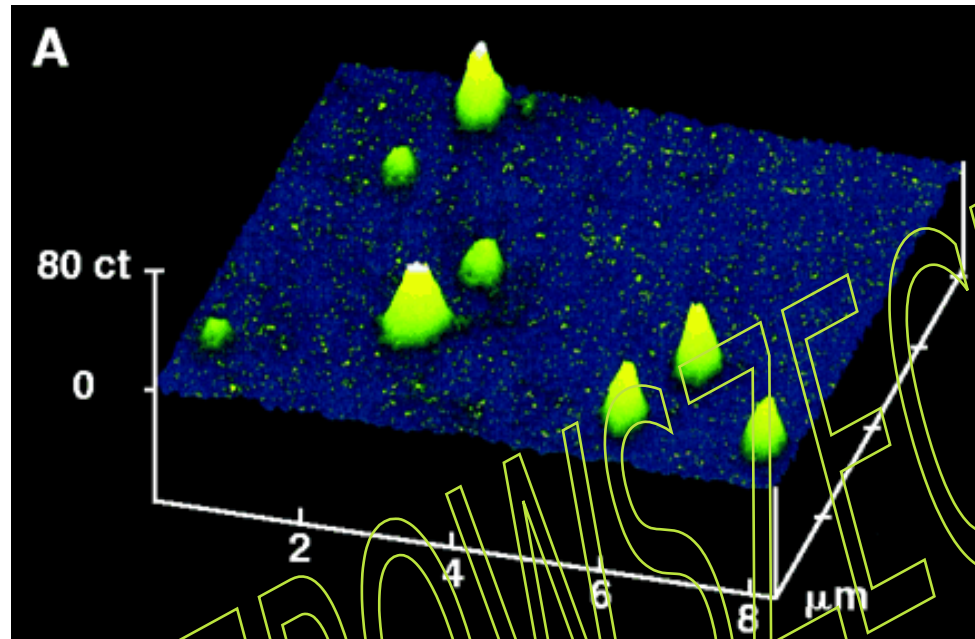


Miejsce aktywne oksydazy cholesterolowej (COx) z *Brevibacterium sp.* (E) obejmuje dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD). Struktura krystaliczna COx pokazuje, że FAD jest niekowalencyjnie i ściśle związany ze środkiem białka i otoczony hydrofobową kieszenią wiążącą cholesterol, która w przeciwnym razie jest wypełniona 14 cząsteczkami wody. FAD jest naturalnie fluorescencyjny w swojej utlenionej formie, ale nie w postaci zredukowanej. Umożliwia to obserwację obrotów enzymów poprzez monitorowanie fluorescencji ich miejsc aktywnych.



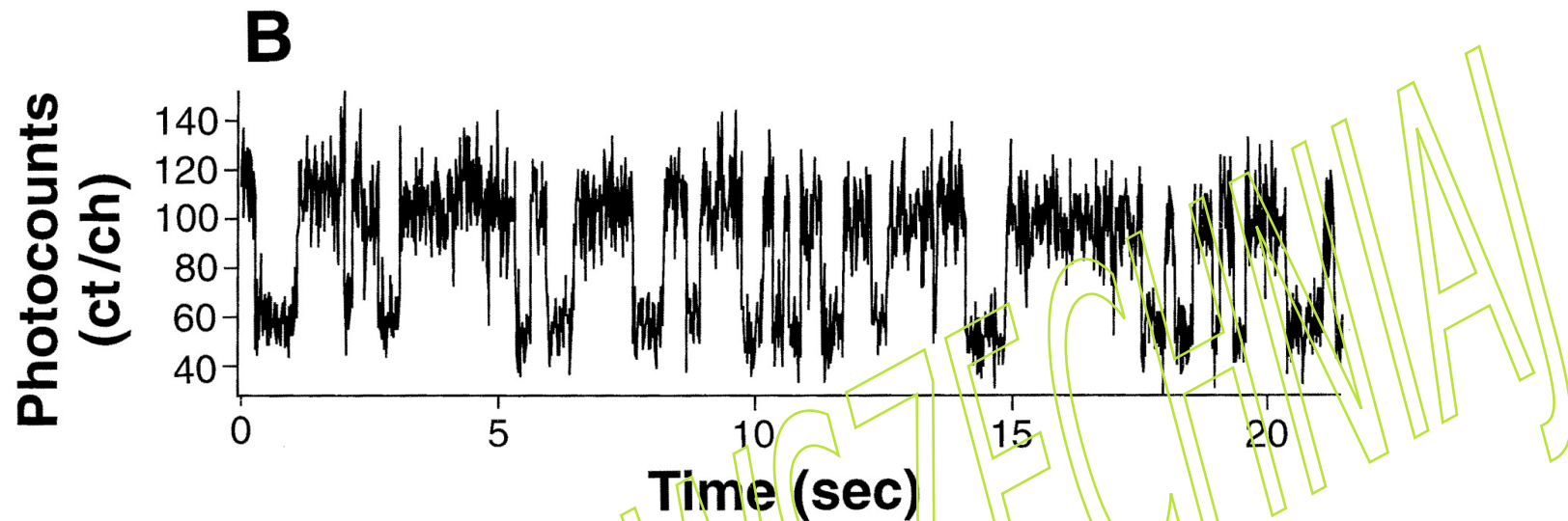
Równowaga redoks pomiędzy FAD i FADH₂.

FAD (forma całkowicie utleniona lub forma chinonu) przyjmuje dwa elektrony i dwa protony (zysk netto dwóch atomów wodoru), aby stać się FADH₂ (forma hydrochinonu). FADH₂ można następnie utlenić do częściowo zredukowanej formy (półchinonu) FADH, przekazując jeden elektron i jeden proton. Semichinon jest następnie ponownie utleniany poprzez utratę elektronu i protonu i powraca do początkowej formy chinonu (FAD).

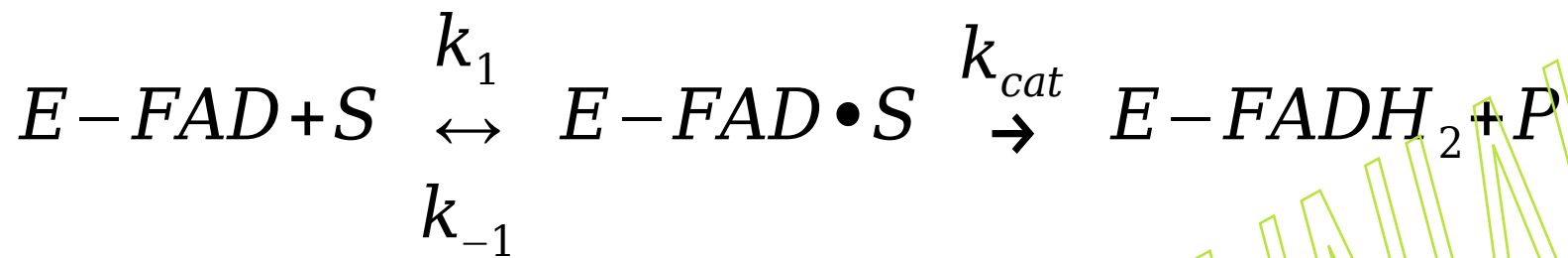


(A) Obraz fluorescencyjny (8 μm na 8 μm) pojedynczych cząsteczek COx unieruchomionych w warstwie żelu agarozowego o grubości 10 μm z 99% roztworem buforowym (pH 7,4). Emisja pochodzi z aktywnego miejsca fluorescencyjnego FAD, które jest ściśle związane ze środkiem COx. Zdjęcie to wykonano w ciągu 4 minut za pomocą odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego, skanując rastrowo próbkę skupioną wiązką lasera o mocy 500 nW przy 442 nm. Każdy indywidualny pik jest przypisany pojedynczej cząsteczce COx. Powstaje wskutek emisji FAD (przy 520 nm). Różnice w intensywności pomiędzy cząsteczkami wynikają z różnych głębokości położenia w preparacie i odstępstw od położenia ogniska padającej wiązki światła.

Pojedyncze cząsteczki COx zamknięto w żelu agarozowym zawierającym 99% wody, bez zauważalnej dyfuzji translacyjnej, ale swobodnie obracały się w żelu. W przeciwieństwie do cząsteczek enzymów, małe cząsteczki substratu (cholesterolu i tlenu) podlegają zasadniczo swobodnej dyfuzji translacyjnej w żelu. Przy stosunkowo dużej ilości cholesterolu (0,2 mM) i tlenu (roztwór nasycony, 0,25 mM) w żelu, pojedyncza emisja FAD wykazuje zachowanie typu on-off (następny slajd).



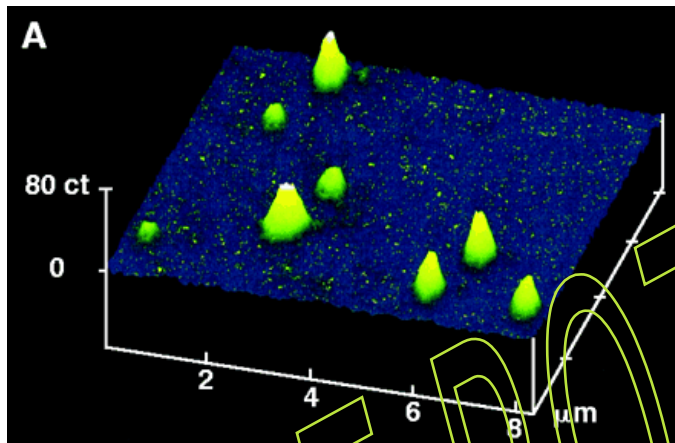
Obserwacja w czasie rzeczywistym przemian enzymatycznych pojedynczej cząsteczki COx katalizującej utlenianie cząsteczek cholesterolu. Panel ten pokazuje część trajektorii intensywności emisji zarejestrowaną w czasie 13,1 ms na kanał. Poziom tła wynosi ~50 zliczeń na kanał (nie jest odejmowany). Trajektorię rejestrowano przy stężeniu cholesterolu wynoszącym 0,2 mM i stężeniu nasyconego tlenu wynoszącym 0,25 mM (stężenia substratów są o sześć rzędów wielkości wyższe niż stężenia enzymu). Emisja wykazuje stochastyczne zachowanie polegające na miganiu, gdy FAD przełącza się między stanami utlenionymi (fluorescencyjnymi) i zredukowanymi (niefluorescencyjnymi), przy czym każdy cykl włączenia i wyłączenia odpowiada obrotowi enzymatycznemu. Czas włączenia i wyłączenia emisji odpowiada „czasowi oczekiwania” odpowiednio na reakcje redukcji i utleniania FAD. W przypadku pojedynczej cząsteczki reakcja chemiczna zachodzi w skali czasu subpikosekundowej i nie można jej tu określić w czasie. Jednak czas potrzebny na dyfuzję, aktywację termiczną lub jedno i drugie, zanim nastąpi takie zdarzenie, jest zwykle znacznie dłuższy. Długość trajektorii jest ograniczona przez fotowysbielanie poprzez fotoutlenianie z udziałem tlenu singletowego lub absorpcję w stanie wzbudzonym. Na tej trajektorii zarejestrowanych jest ponad 500 cykli włączenia i wyłączenia.



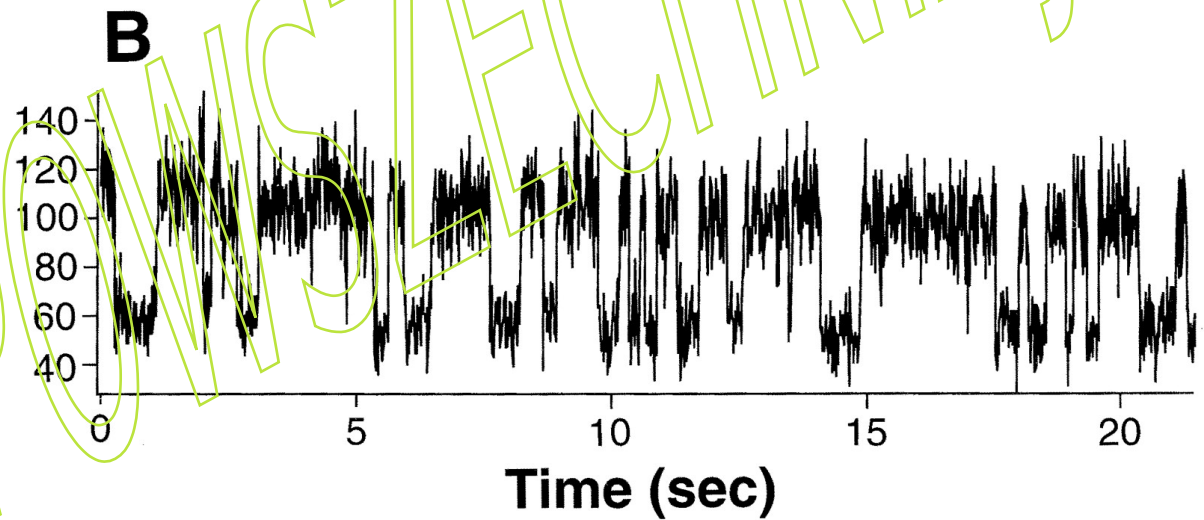
on

on

off



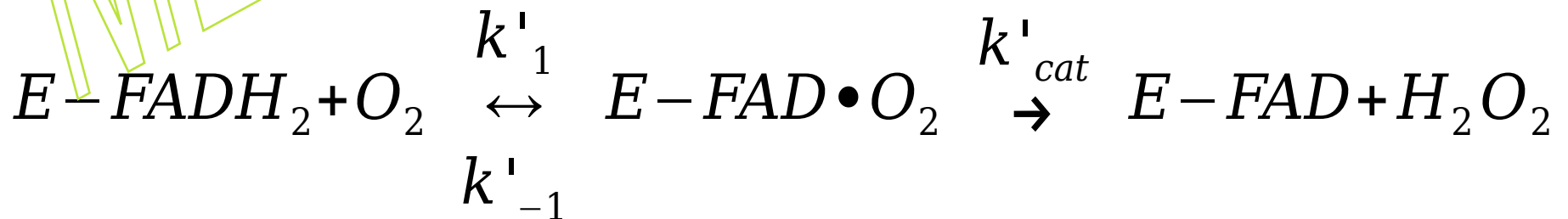
Photocounts
(ct/ch)



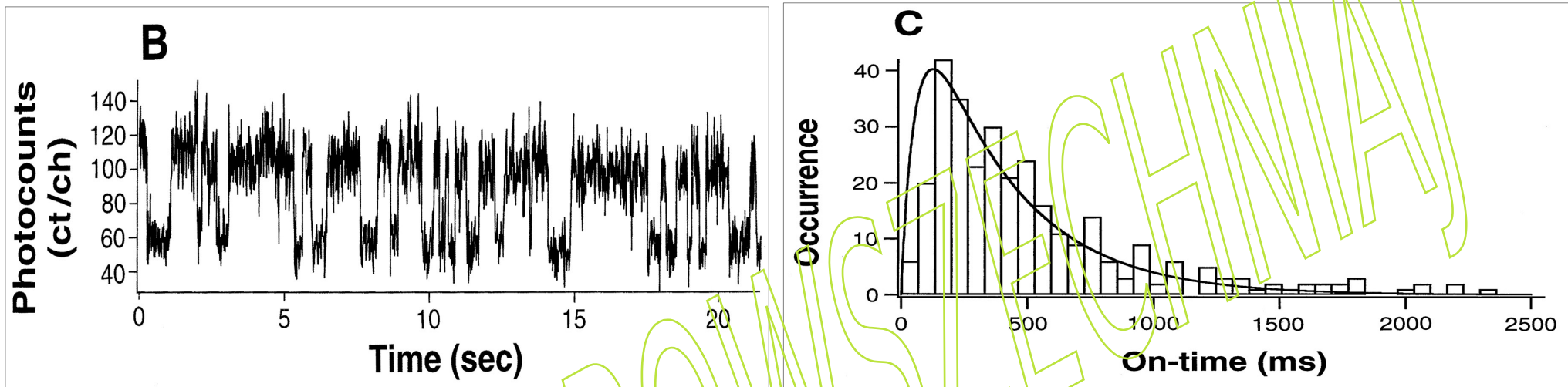
off

off

on



Budowanie diagramów



Po lewej: Zarejestrowana trajektoria włączania i wyłączania fluorescencji FAD w trakcie działania jednej z molekuł oksydazy.

Po prawej: Najprostszą metodą analizy rejestrowanych trajektorii jest sporządzenie rozkładów częstości występowania odpowiednich wartości czasów "on" (pokazane na rysunku) i czasów "off". Rozkłady sporządza się z rejestrowanych trajektorii po usunięciu szumów.

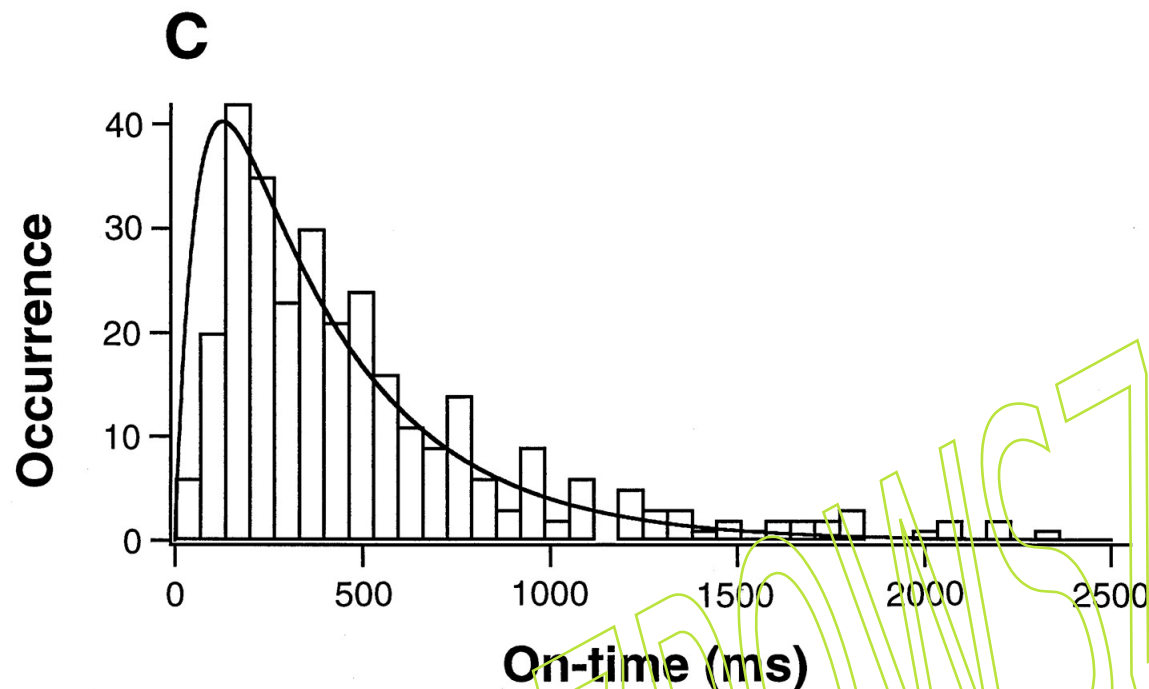
Dane rejestrowane:

t_{on} czas włączenia fluorescencji, zdefiniowany jako czas pomiędzy wejściem w stan świecenia, a wyjściem do stanu nieświecącego (on-time).

t_{off} czas wyłączenia fluorescencji, zdefiniowany jako czas pomiędzy wejściem w stan nieświecący, a wyjściem do stanu świecącego (off-time).

Pomiar czasów t_{on} i t_{off} odseparowuje od siebie obie połówki reakcji i jednoznacznie określa statystykę pojedynczych zdarzeń reakcji.

Chcemy powiązać rozkład czasów włączenia fluorescencji z parametrami charakteryzującymi kinetykę reakcji.

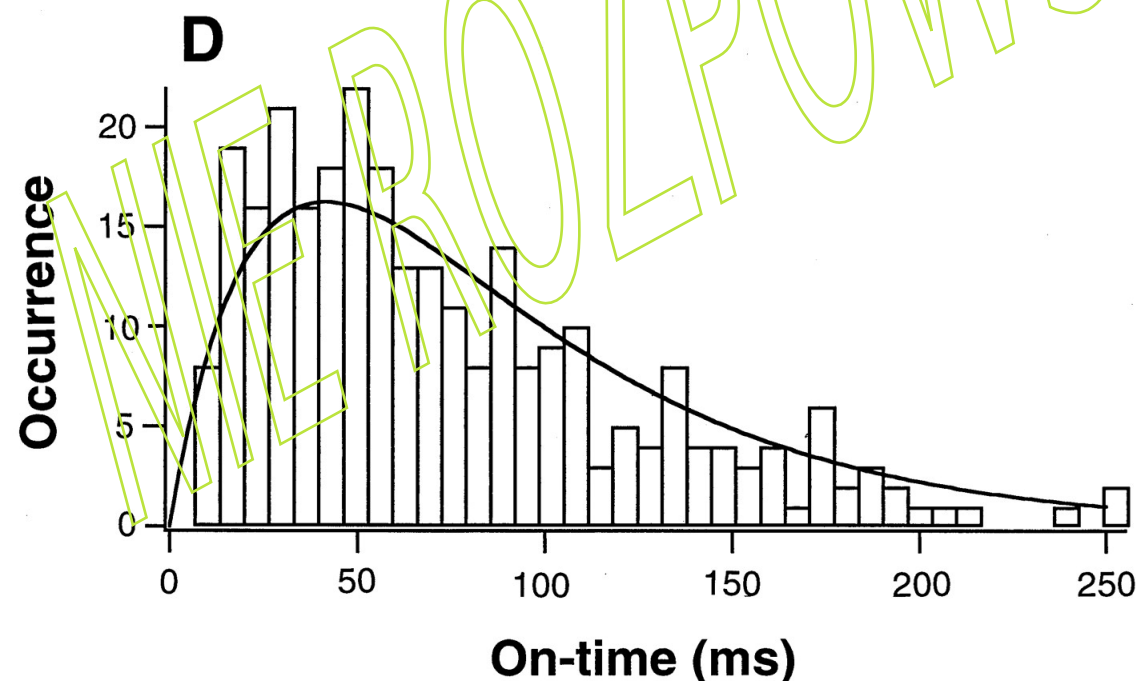


C) Rozkład czasów włączenia (słupki) wyprowadzony z trajektorii w B). Przy założeniu, że symulowana krzywa jest dwuwykładnicza $k_1^0=2.9\pm0.3 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}=17\pm2 \text{ s}^{-1}$ i $k_{-1}=0$.

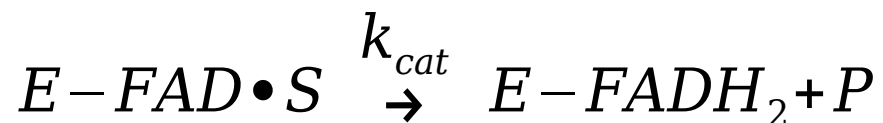
D) Rozkład czasów włączenia (słupki) uzyskany z trajektorii emisji innej zarejestrowanej pojedynczej cząsteczki COx przy 2 mM cholesterolu. Przy założeniu, że symulowana krzywa jest dwuwykładnicza $k_1^0=33\pm6 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}=17\pm4 \text{ s}^{-1}$ i $k_{-1}=0$.

10-krotny wzrost stężenia substratu skutkuje 11 ± 3 szybszym współczynnikiem pseudo pierwszego rzędu, k_1^0 , co jest zgodne z mechanizmem Michaelisa-Menten.

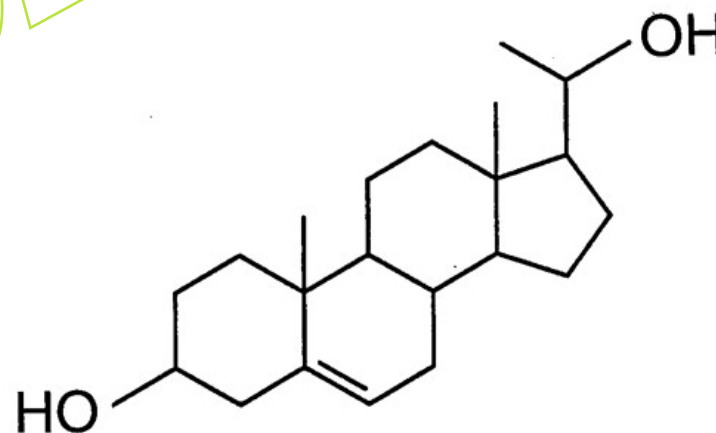
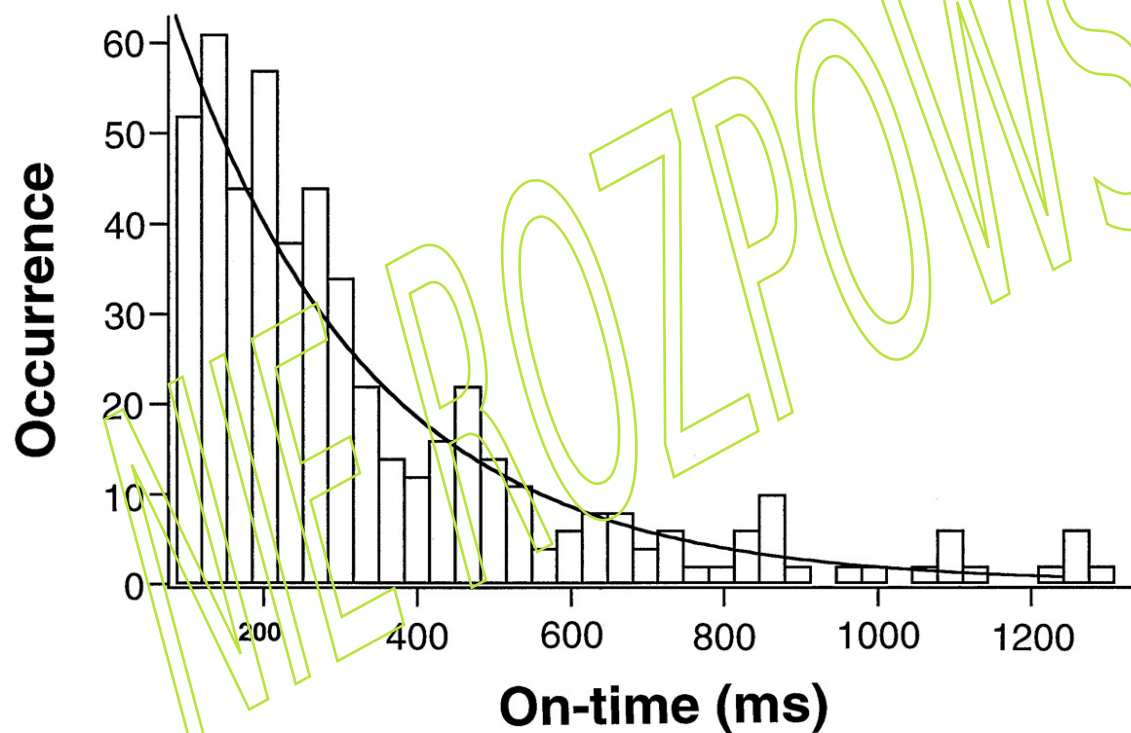
$$k_1^0 = k_1 \cdot [S]$$



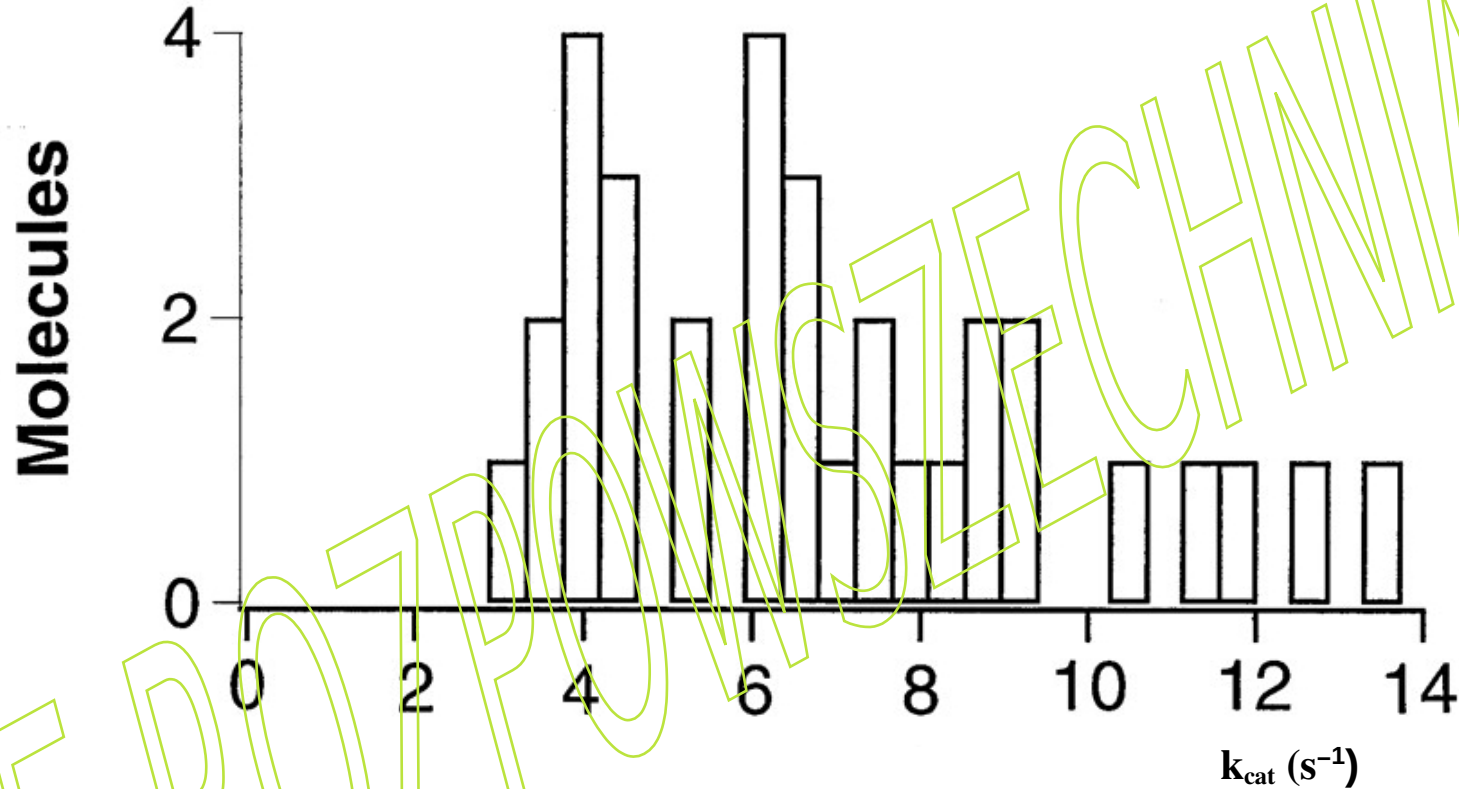
Kiedy etap chemiczny jest etapem ograniczającym szybkość, możemy napisać:



Stan ten nie jest całkiem osiągalny przy wysokim stężeniu cholesterolu, ale jest osiągalny przy wysokim stężeniu substratu 5-pregenu-3 β -20 α -diolu, pochodnej cholesterolu. Analiza diagramu poniżej daje z zaniku monoeksponencjalnego, $k_{cat}=3.9 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$.



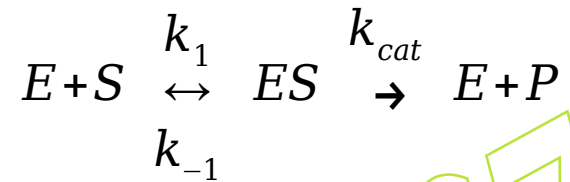
Rozkład w czasie czasów oczekiwania na reakcję cząsteczki COx ze zmodyfikowanym substratem cholesterolowym.



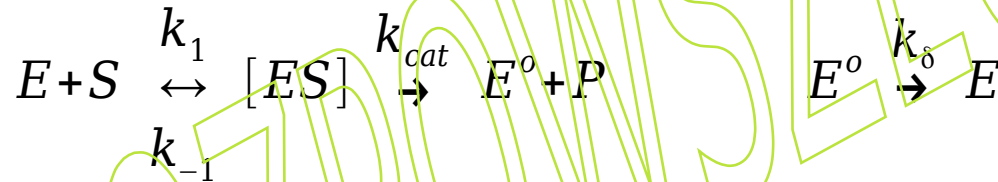
Rozkład k_{cat} uzyskany z rozkładów czasu oczekiwania na reakcję 33 cząsteczek COx w tej samej próbce. Obserwacja wielu wartości k_{cat} o pewnym rozkładzie prawdopodobieństwa nazywamy **statycznym nieporządkiem**. Należy zauważyć, że k_{cat} to czas uśredniony dla całych trajektorii (10 do 20 minut). Wyniku tego nie można uzyskać w tradycyjnych eksperymentach z reakcją enzymatyczną w probówce – one dają jedną wartość k_{ca} .

Analiza eksperymentów z pojedynczą cząsteczką enzymu.

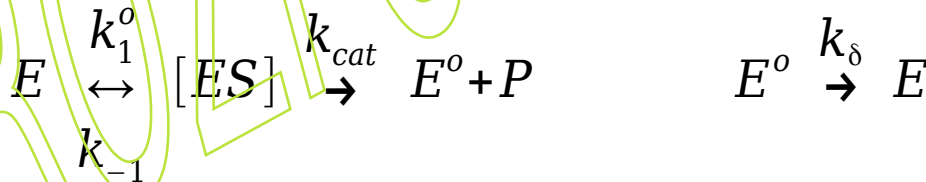
Równanie Michaelisa-Menten dla prostej reakcji enzymatycznej:



Bardziej dokładna forma, biorąc pod uwagę ping-pongowy charakter reakcji oksydazy:



I wreszcie forma odpowiednia do obserwacji pojedynczej cząsteczki oksydazy w doświadczeniu Xie:



$$k_1^o \equiv k_1 \cdot [S]$$

J Phys Chem B 2005 109:19068-19081:

Aby wyprowadzić równania szybkości opisujące odpowiednią kinetykę Michaelisa-Mentena dla pojedynczej cząsteczki, stężenia w równaniach na poprzednim slajdzie zastępuje się prawdopodobieństwami P znalezienia danej pojedynczej cząsteczki enzymu w stanach E , ES i E° , co prowadzi do równania (równanie mistrzowskie reakcji enzymatycznej):

$$\frac{dP_E(t)}{dt} = -k_1^o P_E(t) + k_{-1} P_{ES}(t)$$

$$\frac{dP_{ES}(t)}{dt} = k_1^o P_E(t) - (k_{-1} + k_{cat}) P_{ES}(t)$$

$$\frac{dP_{E^\circ}(t)}{dt} = k_{cat} P_{ES}(t)$$

Rozwiązanie musi spełniać warunki początkowe $P_E(0)=1$, $P_{ES}(0)=0$ i $P_{E^\circ}(0)=0$ dla $t=0$, oraz ogólne ograniczenie:

$$P_E(t) + P_{ES}(t) + P_{E^\circ}(t) = 1$$

$P_X(t)$ jest prawdopodobieństwem, że enzym jest w formie X w chwili t .

Stała szybkości dla zajścia kroku reakcji “do przodu”, k_1^o , jest traktowana jako stała szybkości pseudopierwszego rzędu, którą można zapisać jako $k_1^o = k_1[S]$, ze stężeniem $[S]$ przyjętym jako niezależne od czasu (stałe). Założenie to jest rozsądne, gdyż zasadniczo nie następuje wyczerpanie substratu przez pojedynczą cząsteczkę enzymu, a $[S]$ można uznać za stałą. Innymi słowy: w przypadku reakcji pojedynczego enzymu dowolne praktyczne $[S]$ jest perfekcyjnie stałe!

W konsekwencji, równania z poprzedniego slajdu stają się układem liniowych równań różniczkowych pierwszego rzędu i jako takie mogą być **rozwiązane dokładnie** dając $P_E(t)$, $P_{ES}(t)$, i $P_{E^o}(t)$. Znając $P_{E^o}(t)$, **rozkład prawdopodobieństwa czasów oczekiwania $f(t)$** , który jest znormalizowany zgodnie ze standardowym równaniem

$$\int_0^{\infty} f(t) dt = 1$$

otrzymuje się następująco:

1. Prawdopodobieństwo, że przemiana enzymatyczna $E-FAD \cdot S$ w formę $E-FADH_2 + P$ zajdzie między chwilą t i $t + \Delta t$ jest równe $f(t)\Delta t$;
2. $f(t)\Delta t$ jest tym samym co prawdopodobieństwo, że enzym **wejdzie** w stan E^o między czasem t and $t + \Delta t$, a to prawdopodobieństwo jest równe $\Delta P_{E^o}(t)$. Z trzeciego równania na poprzednim slajdzie mamy: $\Delta P_{E^o}(t) = k_{cat} P_{ES}(t)\Delta t$. Zatem, w granicy infinitezymalnych Δt :

$$f(t) = dP_{E^o}(t)/dt = k_{cat} P_{ES}(t)$$

Zastosujemy metodę Eulera do naszego układu równań różniczkowych:

$$\frac{dP_E(t)}{dt} = -k_1^o P_E(t) + k_{-1} P_{ES}(t)$$

$$\frac{dP_{ES}(t)}{dt} = -(k_{-1} + k_{cat}) P_{ES}(t) + k_1^o P_E(t)$$

$$\frac{dP_{E^o}(t)}{dt} = k_{cat} P_{ES}(t)$$

Rozwiązań poszukujemy w formie:

$$P_E(t) = \gamma_E e^{\lambda t}; \quad P_{ES}(t) = \gamma_{ES} e^{\lambda t}; \quad P_{E^o}(t) = \gamma_{E^o} e^{\lambda t};$$

Wstawiamy proponowane rozwiązania to układu równań i postępujemy dalej zgodnie ze standardową metodą rozwiązywania układu liniowych równań różniczkowych pierwszego rzędu o stałych współczynnikach. Szczegóły postępowania pokazaliśmy na Wykładzie 2.

Jako rozwiązanie dla:

otrzymamy:

$$P_{ES}(t)$$

$$P_{ES}(t) = \frac{k_1[S]}{2A} (e^{(A+B)t} - e^{(B-A)t})$$

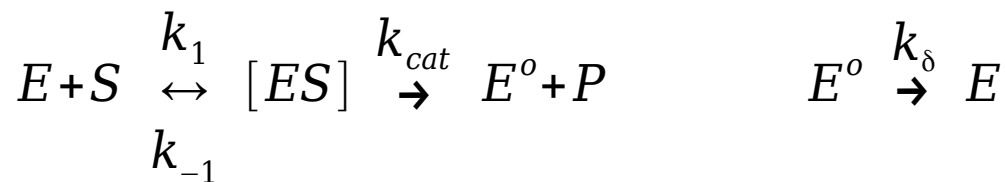
z:

$$A \equiv \sqrt{(k_1[S] + k_{-1} + k_{cat})^2 / 4 - k_1[S]k_{cat}}; \quad B \equiv -(k_1[S] + k_{-1} + k_{cat}) / 2;$$

tak więc nasz wynik końcowy ma postać:

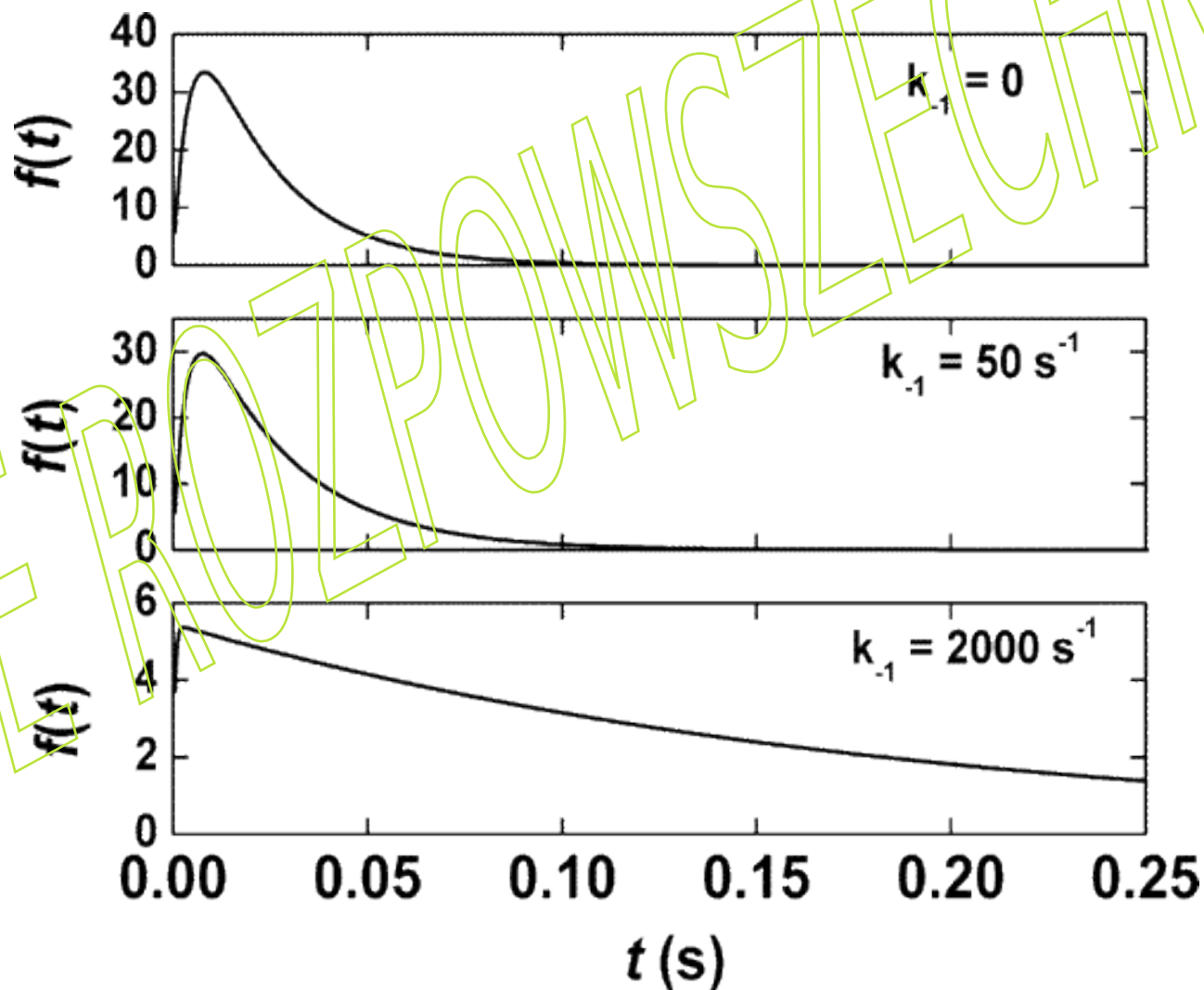
$$f(t) = \frac{k_1 k_{cat} [S]}{2A} (e^{(A+B)t} - e^{(B-A)t})$$

znaczenia użytych symboli powinny być jasne ze schematu reakcji:



J Phys Chem B 2005 109:19068-19081, cd.

Wykresy $f(t)$ w funkcji t dla ustalonych wartości $[S]$ (0.005 mM), k_1 ($10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) i k_{cat} (250 s^{-1}) przy trzech różnych wartościach k_{-1} (0, 50, and 2000 s^{-1} .) Te wartości k_{-1} są reprezentatywne dla reakcji w których (i) dysocjacja ES do E i S nie zachodzi (panel górny), (ii) szybkości katalizy i dysocjacji są porównywalne (panel środkowy) oraz (iii) stała szybkości dysocjacji ES do E i S jest znacząco większa niż stała szybkości katalityczna, co prowadzi do stanu ustalonego tworzenia ES (dolny panel).



Pierwszy moment rozkładu $f(t)$:

$$\langle t \rangle = \int_0^{\infty} t f(t) dt$$

daje średni czas oczekiwania na reakcję, dający powiązanie z wynikami eksperymentów na zespole cząsteczek w roztworze. Odwrotność $\langle t \rangle$ może być interpretowana jako średnia szybkość reakcji. W ogólności bierze się to z równoważności uśredniania po czasie i po zespole. Mamy

$$\langle t \rangle = \int_0^{\infty} t \frac{k_1 k_{cat} [S]}{2A} (e^{(A+B)t} - e^{(B-A)t}) dt$$

co prowadzi do:

$$\frac{1}{\langle t \rangle} = - \frac{(A^2 - B^2)^2}{2 B k_1 k_{cat} [S]} = \frac{k_1 [S] k_{cat}}{k_1 [S] + k_{-1} + k_{cat}} \equiv \frac{k_{cat} [S]}{[S] + K_M} \quad (*)$$

Porównanie z równaniem Michaelisa-Menten daje

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{1}{k_{cat} \langle t \rangle}; \quad \frac{V}{E_0} = \frac{1}{\langle t \rangle}$$

Jest to satysfakcjonujący wynik, wskazujący, że pierwszy moment $f(t)$ rzeczywiście odzwierciedla klasyczne równanie Michaelisa-Mentena, niezależnie od tego, czy w obliczeniu prawdopodobieństwa pojedynczej cząsteczki zastosowano przybliżenie stanu ustalonego. Równanie (*) traktujemy jako jednocząsteczkowe równanie Michaelisa-Menten.

(wyprowadzenie pokazują dwa kolejne slajdy, potrzebne są całki typu $\int t \cdot \exp(\lambda t) dt$; całkujemy przez części. Tę metodę pokazano na Wykładzie 2. Na następnym slajdzie stosujemy ją w praktyce. Drugi slajd pokazuje powrót od parametrów A i B do stałych szybkości.)

Wyprowadzenie:
$$\frac{1}{\langle t \rangle} = -\frac{(A^2 - B^2)^2}{2 B k_1 k_2 [S]} = \frac{k_2 [S]}{[S] + K_M}$$

$$\begin{aligned} \langle t \rangle &= \frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \int_0^{\infty} t \left(e^{(A+B)t} - e^{(B-A)t} \right) dt \\ &= \frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \left[t \left(\frac{1}{A+B} e^{(A+B)t} - \frac{1}{B-A} e^{(B-A)t} \right) \right]_0^{\infty} - \int_0^{\infty} dt \left(\frac{1}{A+B} e^{(A+B)t} - \frac{1}{B-A} e^{(B-A)t} \right) \\ &= -\frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \int_0^{\infty} dt \left(\frac{1}{A+B} e^{(A+B)t} - \frac{1}{B-A} e^{(B-A)t} \right) = -\frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \left(\frac{1}{(A+B)^2} e^{(A+B)t} - \frac{1}{(B-A)^2} e^{(B-A)t} \right) \Big|_0^{\infty} \\ &= -\frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \left(-\frac{1}{(A+B)^2} + \frac{1}{(B-A)^2} \right) = \frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \left(\frac{1}{(A+B)^2} - \frac{1}{(B-A)^2} \right) \\ &= \frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \frac{(B-A)^2 - (A+B)^2}{(A+B)^2 (B-A)^2} = \frac{k_1 k_{cat} [S]}{2 A} \frac{2 B (-2 A)}{(A^2 - B^2)^2} = -\frac{2 B k_1 k_{cat} [S]}{(A^2 - B^2)^2} \end{aligned}$$

Przepisujemy ostatni wynik z poprzedniego slajdu:

$$\langle t \rangle = -\frac{2 B k_1 k_{cat} [S]}{(A^2 - B^2)^2}$$

$$A \equiv \sqrt{(k_1[S] + k_{-1} + k_{cat})^2 / 4 - k_1[S] k_{cat}}; \quad B \equiv -(k_1[S] + k_{-1} + k_{cat}) / 2;$$

$$A^2 = (k_1[S] + k_{-1} + k_{cat})^2 / 4 - k_1[S] k_{cat}; \quad B^2 = (k_1[S] + k_{-1} + k_{cat})^2 / 4;$$

$$A^2 - B^2 = -k_1[S] k_{cat}$$

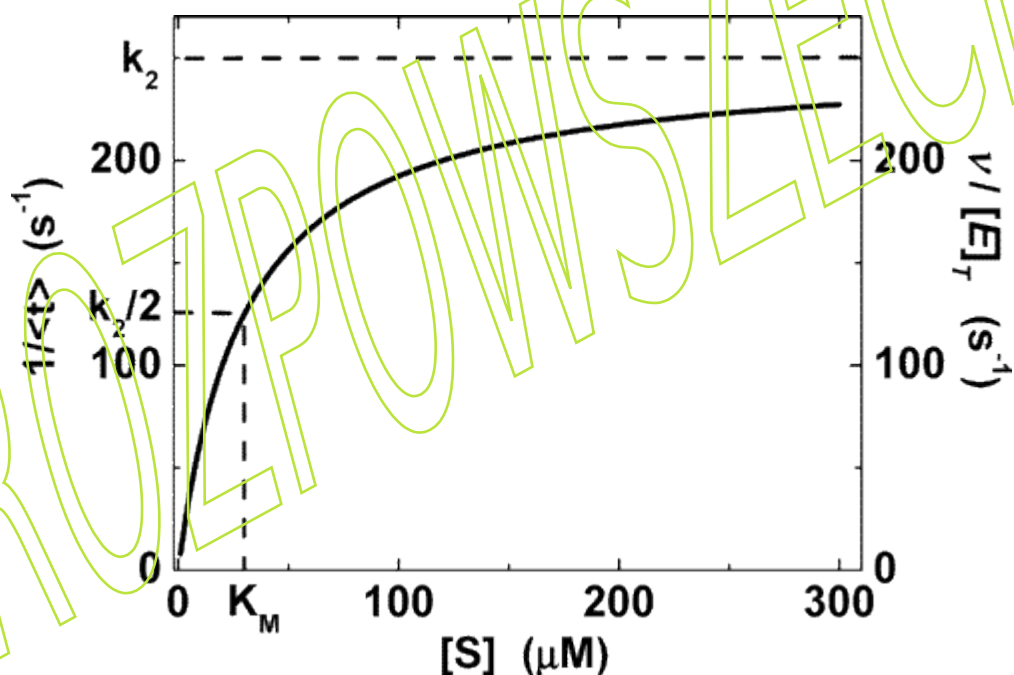
$$2 B k_1 [S] = -2 k_1 [S] (k_1[S] + k_{-1} + k_{cat}) / 2 = -k_1^2 [S]^2 - k_1 k_{-1} [S] - k_1 k_{cat} [S]$$

$$\langle t \rangle = -\frac{k_{cat} (-k_1^2 [S]^2 - k_1 k_{-1} [S] - k_1 k_{cat} [S])}{(-k_1 [S] k_{cat})^2} = \frac{k_{cat} (k_1^2 [S]^2 + k_1 k_{-1} [S] + k_1 k_{cat} [S])}{k_1^2 [S]^2 k_{cat}^2}$$

$$= \frac{k_1 [S] + k_{-1} + k_{cat}}{k_1 [S] k_{cat}}$$

$$\frac{1}{\langle t \rangle} = \frac{k_1 [S] k_{cat}}{k_1 [S] + k_{-1} + k_{cat}} = \frac{k_{cat} [S]}{[S] + K_M}$$

Wykres $1/\langle t \rangle$ (lub równoważny mu $v/[E]_T$) jako funkcja $[S]$ dla parametrów użytych do otrzymania wykresu pokazanego na środkowym panelu slajdu 23 jest przedstawiony poniżej. Wykazuje on charakterystyczny hiperboliczny przebieg klasycznej nasycającej się krzywej Michaelisa-Menten. Fakt, że $1/\langle t \rangle$ obliczone z równania (*) na slajdzie 24, zgadza się dokładnie z równaniem Michaelisa-Menten podkreśla spójność pomiędzy kinetyką pojedynczej cząsteczki i kinetyką uśrednioną dla zespołu.



Należy jednak podkreślić, że $f(t)$ dostarcza więcej informacji niż tylko pierwszy moment, takich jak momenty wyższe i istnienie półproduktów. Jest to szczególnie prawdziwe w przypadku istnienia dynamicznego nieporządku, którego dokładne omówienie wykracza poza zakres niniejszego Wykładu.

Uwaga: k_2 na powyższym Rysunku odpowiada k_{cat} na pozostałych slajdach.