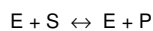


Enzimkinetika

Az enzim reakció sebességének leírása, jellemző paraméterek azonosítása. Ha:



A sztöchiometriához mindegyiket mól-ban vagy grammal kellene kifejezni. De: az enzimpredarátum sohasem tiszta.

Ezért az enzimek mennyiségét a hatásuk alapján adjuk meg:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Enzimkinetika

Egy egység (Unit) az az enzim mennyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át vagy 1 μmol terméket képez 1 perc alatt adott reakció körülmények között.

SI rendszerben: 1 Katal: 1 mol szubsztrátot alakít át 1 s alatt.

Ez hatalmas egység, praktikusabb a nanoKatal = 10⁻⁹ Kat

$$1 \text{ U} = 16,67 \text{ nanoKatal}$$

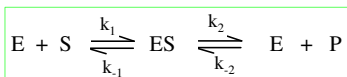
Fajlagos aktivitás: U/mg, U/ml



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Michaelis-Menten kinetika



Kiindulási feltételezések:

- $k_{-2} = 0$ (a második lépés irreverzibilis)
- az első lépés gyorsan egyensúlyra jut =

RAPID EKVILIBRIUM: $k_1SE = k_{-1}(ES)$

Egyensúlyi állandója:
$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$$

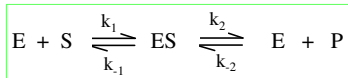
- az ES komplex stabil, az EP komplex elhanyagolható



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Michaelis-Menten kinetika



- egy aktív centrum, egy szubsztrát
- aktivitás helyett koncentráció használható
- $(S) \gg (E_0)$ vagyis $E_0 / S \ll 1$

a „minket érdeklő” reakciósebesség: $V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$

anyagmérleg az enzimre: $E_0 = E + (ES)$



Michaelis-Menten kinetika

Osszuk el a két egyenletet: $\frac{V}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES)}$

Helyettesítsük be: $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$ $\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 \frac{S \cdot E}{K_s}}{E + \frac{S \cdot E}{K_s}}$

Rendezzük át: $\frac{V}{k_2 E_0} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}} = \frac{S}{K_s + S}$

$V_{max} = k_2 E_0$ mert $V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$ volt



Michaelis-Menten kinetika

Ebből a sebességi egyenlet:

$$V = V_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{avagy} \quad \frac{V}{V_{max}} = \frac{S}{K_s + S}$$



M és M



Maud Menten
1879-1960

Leonor Michaelis
1875-1949

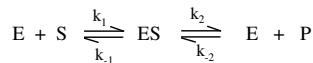
Michaelis, L., Menten, M. (1913) Die kinetik der invertinwirkung, *Biochemische Zeitung* 49, 333-369



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Briggs-Haldane kinetika



Ugyanazok a difegyenletek, de a feltételezés: (kvázi) állandó-sult állapot = steady state ↓

$$\frac{dS}{dt} = -k_1ES + k_{-1}(ES)$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1ES - k_{-1}(ES) - k_2(ES)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2(ES)$$

$$d(ES)/dt = 0$$

(S) >> (E₀) vagyis E₀/S << 1
 k₁ES > k₋₁(ES) ill. k₁ES > k₂(ES)

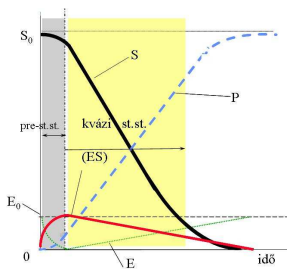


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Briggs-Haldane kinetika

Egy rövid átmeneti szakasz (pre-steady state) után csak nagyon lassú a változás (kvázi-steady state).



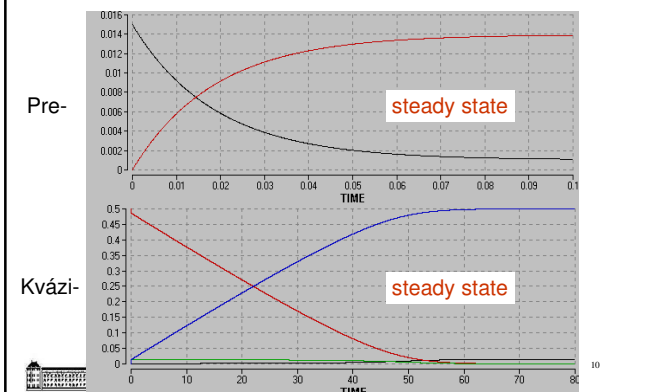
Briggs, G. E., and Haldane, J. B. (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action, *Biochem J* 19, 338-339.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

A Briggs-Haldane kinetika numerikus szimulációja



Briggs-Haldane kinetika

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 \cdot E \cdot S - k_{-1}(ES) - k_2(ES) = 0$$

$$k_1 \cdot E \cdot S = (k_{-1} + k_2)(ES)$$

$$(ES) = \frac{k_1 \cdot E \cdot S}{(k_{-1} + k_2)}$$

$$E + (ES) = E_0$$

$$V = \frac{k_2 E_0 S}{K_m + S} = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

Michaelis állandó



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Diszkusszió

Michaelis-Menten

$$V = V_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Briggs-Haldane

$$V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$$

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

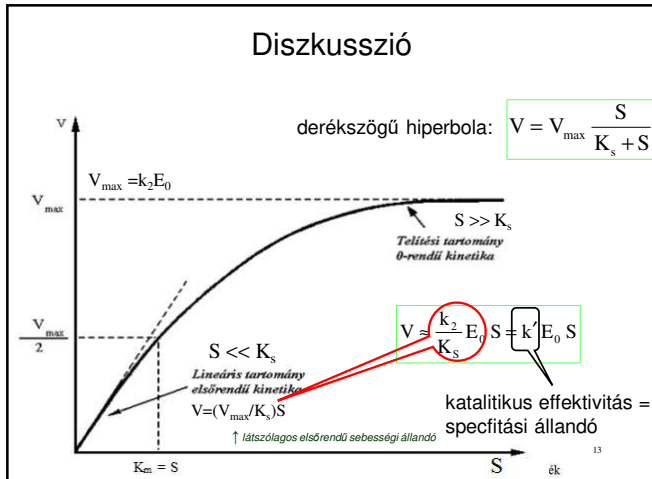
$$K_m = K_s + \frac{k_2}{k_1}$$

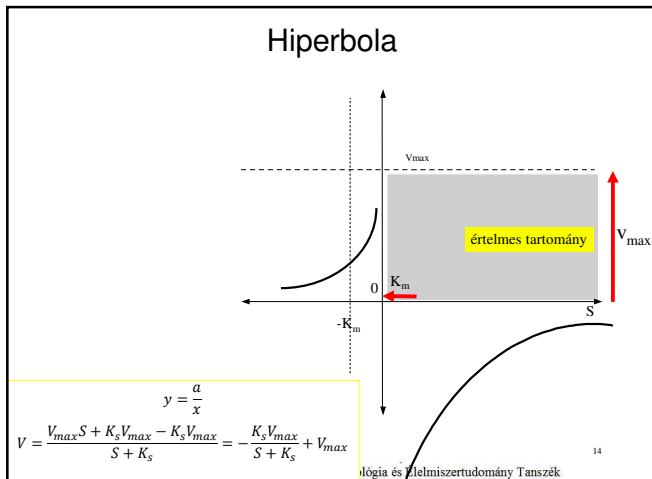
ha $(k_1) \gg (k_2)$ akkor a két konstans azonos!

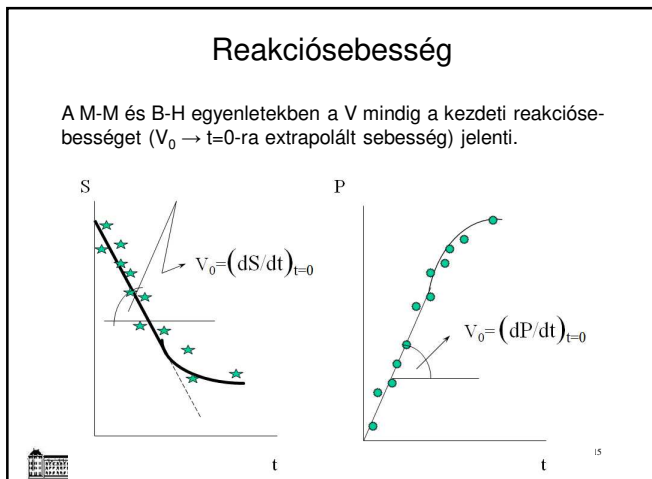


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12







Paraméterbecslés 1

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{\max}S}{K_m + S} \xrightarrow{\text{integrálás}} V_{\max}t = S_0 - S + K_m \ln \frac{S_0}{S}$$

$$\frac{S_0 - S}{\ln \frac{S_0}{S}} = V_{\max} \frac{t}{\ln \frac{S_0}{S}} - K_m$$

$$\frac{2,3}{t} \lg \frac{S_0}{S} = -\frac{1}{K_m} \frac{S_0 - S}{t} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$

16 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Paraméterbecslés 1

0. rendű

1. rendű

$\frac{2,3}{t} \lg \frac{S_0}{S}$

$\frac{S_0 - S}{t}$ vagy $\frac{P}{t}$

Foster-Niemann módszer

17 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Paraméterbecslés 2

Linearizált ábrázolást használunk, mert:

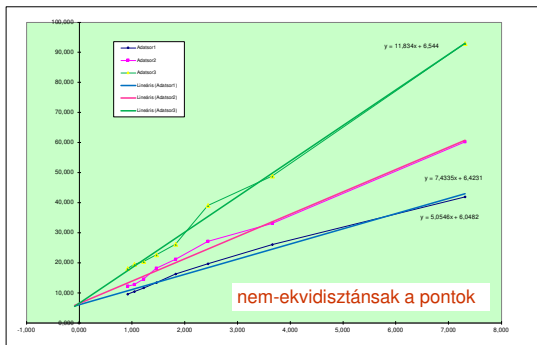
- Hiperbolikus regressziót számolni gép nélkül munkáigényes
- Az enziminhibíciónál +információt ad.

1. Lineweaver-Burk linearizálás

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S}$$

18 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Az L-B linearizálás gyengéje:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Linearizálások

2. Hanes-Langmuir linearizálás

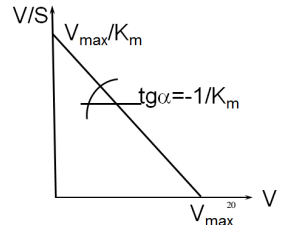
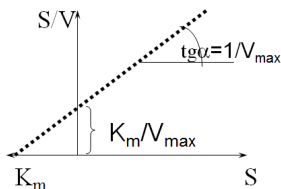
$$S/v - S$$

$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot S$$

3. Eady-Hofstee linearizálás

$$v/S - v$$

$$V = V_{max} - K_m \frac{V}{S}$$

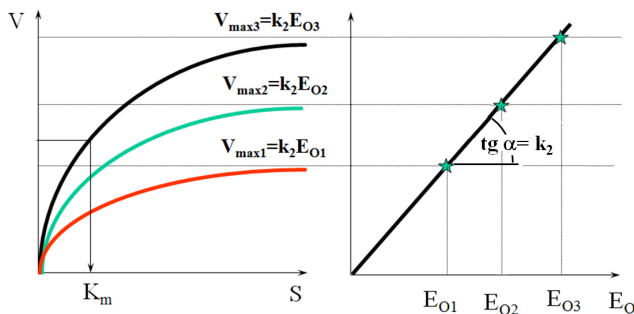


BME Alkalmazott Biotechnol

Az enzimkoncentráció hatása

Ha $v_{max} = k_2 \cdot E_0$, akkor:

k_2 meghatározása:



Így mérünk enzim aktivitást, nagy S koncentrációnál!

21

A kinetikai paraméterek

V_{max} : nem maximum, hanem limit \rightarrow határsebesség

Nem enzimtulajdonság, mert függ E_0 -tól: $V_{max} = k_2 \cdot E_0 \rightarrow$
 = **AKTIVITÁS**

A k_2 enzimtulajdonság = turnover number, váltásszám [s^{-1}] \rightarrow
 az enzim molekula átalakítási frekvenciája

Kiterjesztés minden enzimre és minden kinetikára:

$V_{max} = k_{cat} \cdot E_0$ k_{cat} [s^{-1}]: egy enzim molekula átalakítási frekvenciája S-telítés esetén: egy enzim molekula időegység alatt hány molekula szubsztrátot alakít át.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

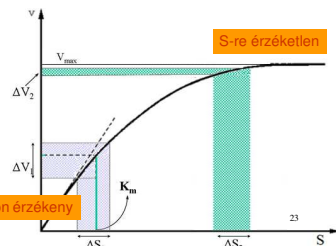
A kinetikai paraméterek: K_S , K_m

- az enzim affinitása a szubsztráthoz
- az élő sejtekben közelítőleg ennyi az S koncentráció, mert így önszabályozó, és van tartalék kapacitás is.
- Változott a $K_S \rightarrow$ Inhibitor? Aktivátor?
- Enzimanalítika:

Ha aktivitást mérek:
 $S \gg K_S \quad v = v_{max}$

ha szubsztrátkoncentrációt mérek:

$S \approx K_S$ lineáris tartomány



BME Alkalmazó

23

A kinetikai paraméterek

- k_1 10^7 - 10^{10} $dm^3 mol^{-1} min^{-1}$ [max. érték (10^{11}) a kis molekulák diffúziósebessége]
- k_{-1} 10^2 - 10^6 min^{-1}
- k_2 50 - 10^7 min^{-1}
- K_m 10^{-6} - 10^{-2} mol/dm^3

TABLE 13-1. THE VALUES OF K_M , k_{cat} , AND k_{cat}/K_M FOR SOME ENZYMES AND SUBSTRATES

Enzyme	Substrate	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	9.5×10^{-3}	1.4×10^4	1.5×10^6
Carbonic anhydrase	CO_2	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}	4.0×10^6	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	N-Acetyltyrosine ethyl ester	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	N-Acetylvaline ethyl ester	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	N-Acetyltyrosine ethyl ester	6.6×10^{-4}	1.9×10^2	2.9×10^5
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-4}	8.0×10^2	1.6×10^6
	Malate	2.5×10^{-3}	9.0×10^2	3.6×10^7
Urease	Urea	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

K_{cat} : α -amiláz: $500 s^{-1}$, glükóamiláz: $160 s^{-1}$, glükóz-izomeráz: $3 s^{-1}$

k_{cat} értékek

$\frac{k_{cat}}{K_m} = 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} = \frac{10^7 \text{ s}^{-1}}{1 \text{ M}} = \frac{1 \text{ s}^{-1}}{10^{-7} \text{ M}}$

k_{cat} alsó határa metabolikus enzimeknél
 Legtöbb enzim e két szélső eset között
 Természetes enzimeknél: $>10^5$
 Mesterséges E-nél (DNA-zyyme, abzyme): $<10^3$

25

Fajlagos aktivitás és váltásszám

Ez a kettő hasonlít egymásra, mert:

$$\text{fajlagos aktivitás} = \frac{\text{Unit}}{\text{mg E}} = \frac{\mu\text{mól S}}{\text{min} \cdot \text{mg E}}$$

$$\text{váltásszám} = \frac{\text{db S}}{\text{sec} \cdot \text{db E}} = \frac{\mu\text{mól S}}{\text{sec} \cdot \mu\text{mól E}}$$

Az enzimmennyiség átszámolásával összehozhatók.

26

Fajlagos aktivitás és váltásszám

Ha az enzim móltömege 60000 és fajlagos aktivitása 1 U/mg, mekkora a k_{cat} ?

Ms= 60000 Da 1 U/mg $k_{cat}=? \text{ s}^{-1}$

$$1 \text{ U} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{1 \text{ min}} \quad 1 \text{ U/mg} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{1 \text{ min} \cdot 1 \text{ mg E}}$$

mivel

$$1 \text{ mg E} = \frac{1}{60000} \text{ mmol E} = \frac{1}{60} \mu\text{mól E}$$

$$1 \text{ U/mg} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{60 \text{ s} \cdot \frac{1}{60} \mu\text{mól E}} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{1 \text{ s} \cdot 1 \mu\text{mól E}} = 1 \text{ s}^{-1} = k_{cat}$$

27

Reverzibilis reakciók

Alap: minden enzim reakció reverzibilis – egyensúlyra vezet.
 Sokszor ez az egyensúly erősen eltolódik az egyik oldalra – pl. a **biopolimerek hidrolízisénekél** (amilázok, proteinázok), más-
 hol viszont közel 50-50%-os (például a glükóz izomeráz reak-
 ció)

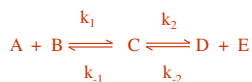


Mindkét kinetikai leírásban feltételeztük, hogy a $k_{-2} = 0$, ezért a
 reverzibilis reakciót két ellentétes egyirányú folyamat leírásá-
 ból állítjuk össze.



Reverzibilis reakciók

Fizkém reakciókinetika egymást követő (konzekutív) egyen-
 súlyi reakciók leírására:

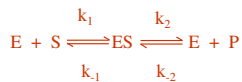


$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

$$K_{\text{eq(üilibrium)}} = K_1 K_2 = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}}$$



Reverzibilis reakciók



A két ellentétes irányú reakció egyensúlyi állandóit fölírva:

$$K_s = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{(ES)}{S \cdot E} \quad K_p = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} = \frac{(ES)}{P \cdot E}$$

A közös elemet kiemelve: $\frac{k_{+1}}{k_{-1}} S = \frac{(ES)}{E} = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} P$

Az eredő egyensúlyi állandót kifejezhetjük: $K_{\text{eq(üilibrium)}} = \frac{P}{S} = \frac{k_{+1} k_{+2}}{k_{-1} k_{-2}}$



Reverzibilis reakciók

HALDANE leírásához:


$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$$

$$K_{ms} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad V_{maxs} = k_2 E_o$$

$$K_{mp} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}} \quad V_{maxp} = k_{-1} E_o$$

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

$\frac{1}{K_S} \longleftarrow \quad \longrightarrow K_P$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

Végezzük el a következő osztásokat:

$$\frac{V_{maxs}}{K_{ms}} = \frac{k_1 k_2 E_o}{k_2 + k_{-1}} \quad \text{és} \quad \frac{V_{maxp}}{K_{mp}} = \frac{k_{-2} k_{-1} E_o}{k_2 + k_{-1}}$$


$$\frac{\frac{V_{maxs}}{K_{ms}}}{\frac{V_{maxp}}{K_{mp}}} = \frac{V_{maxs} K_{mp}}{V_{maxp} K_{ms}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = K_{eq} \quad \text{ugyanaz!}$$

Egyensúlyi állandóra ugyanazt kaptuk - HALDANE összefüggés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


Reverzibilis reakciók



MI TÖRTÉNIK?
 $S \rightarrow P$ vagy $P \rightarrow S$

MITŐL FÜGG? K_{eq} , S , P értéke

Itt feltételezzük az EP komplex létezését:

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} EP \rightleftharpoons E + P$$


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

Az eredő sebesség a két folyamat különbsége:

$$V_{\text{netto}} = V_{\text{előre}} - V_{\text{vissza}} = k_2(ES) - k_{-2}(EP)$$

Ezt az eddigiekhez hasonlóan az enzim anyagmértékével

osztjuk el: $E_o = E + (ES) + (EP)$

$$\frac{v_{\text{előre}}}{E_o} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES) + (EP)} \quad \frac{v_{\text{vissza}}}{E_o} = \frac{k_{-2}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$

ebből:

$$\Delta v = \frac{E_o k_2(ES) - E_o k_{-2}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$



Reverzibilis reakciók

Behelyettesítve :

$$\Delta v = \frac{v_{\text{max } S}(ES) - v_{\text{max } P}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$

figyelembe véve, hogy:

$$(ES) = E \frac{S}{K_s} \quad (EP) = E \frac{P}{K_p}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\text{max } S} \frac{S}{K_s} E - v_{\text{max } P} \frac{P}{K_p} E}{E + \frac{S}{K_s} E + \frac{P}{K_p} E} \quad \text{azaz} \quad \Delta v = \frac{V_{\text{max } S} \left(S - \frac{P}{K_{\text{eq}}} \right)}{K_{\text{ms}} \left(1 + \frac{P}{K_{\text{mp}}} \right) + S}$$

Reverzibilis M-M egyenlet



Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{V_{\text{max } S} \left(S - \frac{P}{K_{\text{eq}}} \right)}{K_{\text{ms}} \left(1 + \frac{P}{K_{\text{mp}}} \right) + S} \quad \text{ahol} \quad \frac{P}{K_{\text{eq}}} = S_{\text{eq}} \quad \text{azaz} \quad (S - S_{\text{eq}}) \quad \text{a}$$

szubsztrát koncentráció eltérése az egyensúlytól.

$$\left(1 + \frac{P}{K_{\text{mp}}} \right) \quad \text{pedig analóg} \quad \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \quad \text{-vel, azaz P kompetitív}$$

inhibítorként viselkedik.