

Enzimkinetika

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



A sztöchiometriához mindegyiket mól-ban vagy grammal kell kifejezni. De: az enzimpreparátum sohasem tiszta.

Ezért az enzimek mennyiségét a hatásuk alapján adjuk meg:



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



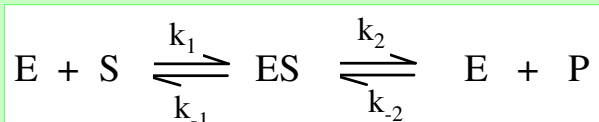
Enzimkinetika

Kérem, hogy jegyezzétek fel azoknak a diáknak a sorszá-
mát, amit már tanultatok máshol! (Pl. fizikéből, reakciókine-
tikaként.) Kíváncsi vagyok a határra, amitől kezdve újat mon-
dok.

Később Slidoval elkérem a számokat.



Michaelis-Menten kinetika



Kiindulási feltételezések:

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

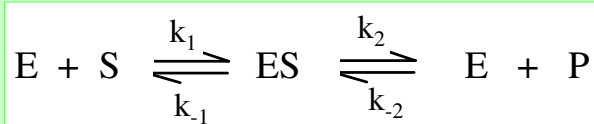
RAPID EKVILIBRIUM: $k_1SE = k_{-1}(ES)$

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

- az ES komplex stabil, az EP komplex elhanyagolható



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:

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

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 \frac{S}{K_s} E}{E + \frac{S}{K_s} E}$$

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:

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

avagy

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



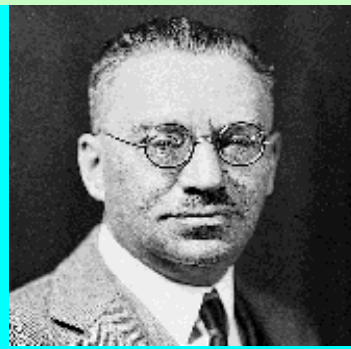
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

M és M



Maud Menten
1879-1960



Leonor Michaelis
1875-1949

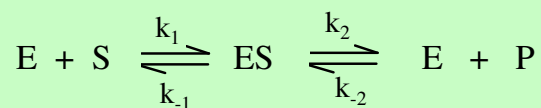
Michaelis, L., Menten, M. (1913) Die kinetik der invertinwirkung,
Biochemische Zeitung 49, 333-369



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Briggs-Haldane kinetika



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

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

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

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

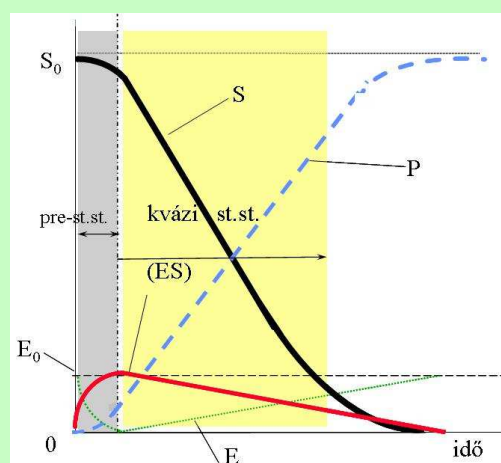
$$d(ES)/dt = 0$$

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



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.



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



Diszkusszió

Michaelis-Menten

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

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

Briggs-Haldane

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

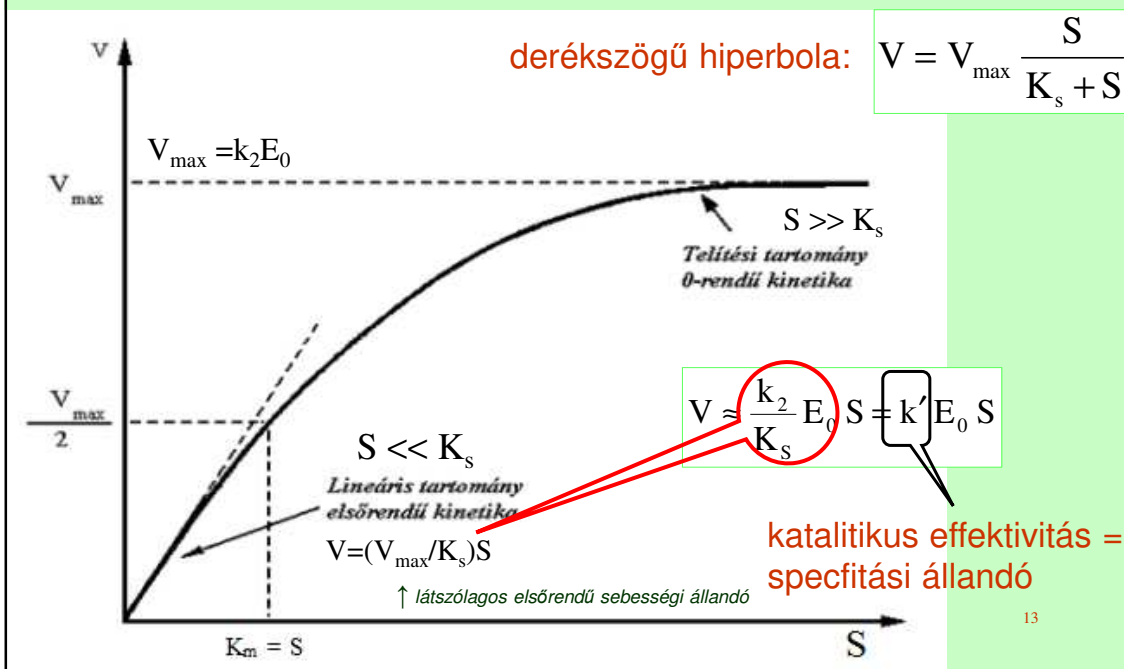
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

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

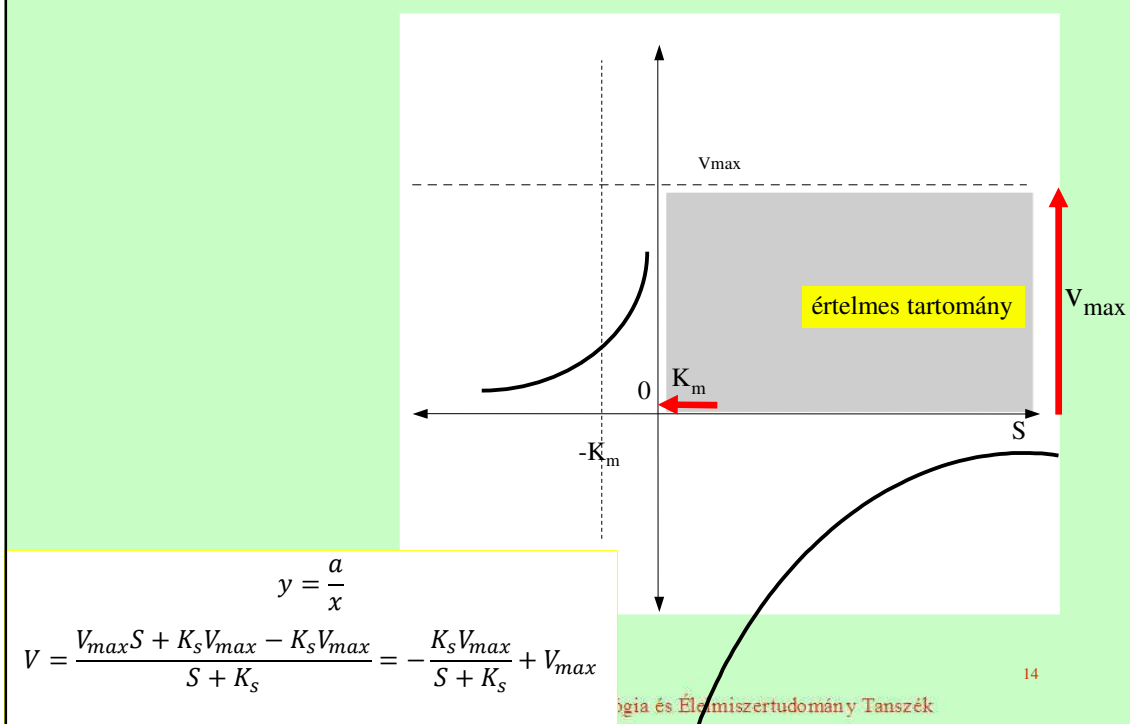
ha $(k_1) \gg (k_2)$ akkor a két konstans azonos!



Diszkusszió

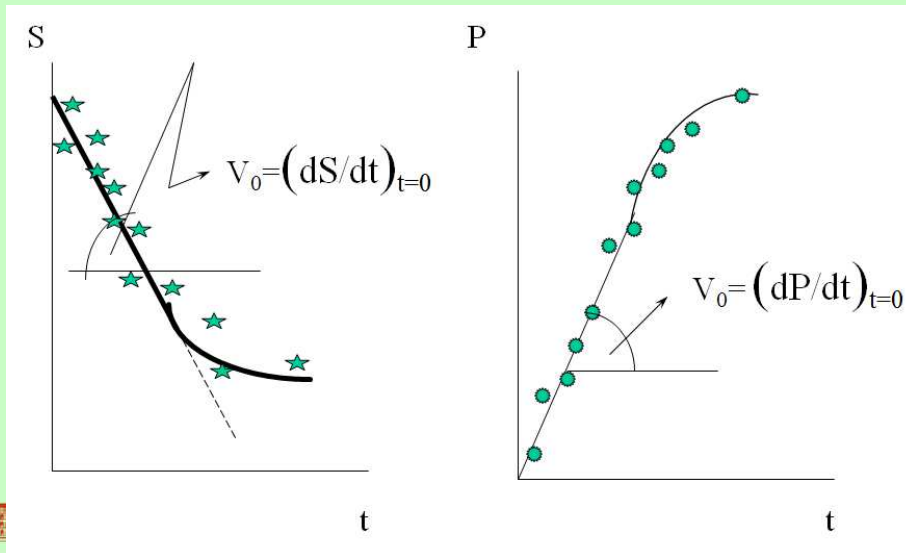


Hiperbola



Reakciósebesség

A M-M és B-H egyenletekben a V mindig a kezdeti reakciósebességet ($V_0 \rightarrow t=0$ -ra extrapolált sebesség) jelenti.



Paraméterbecslés 1

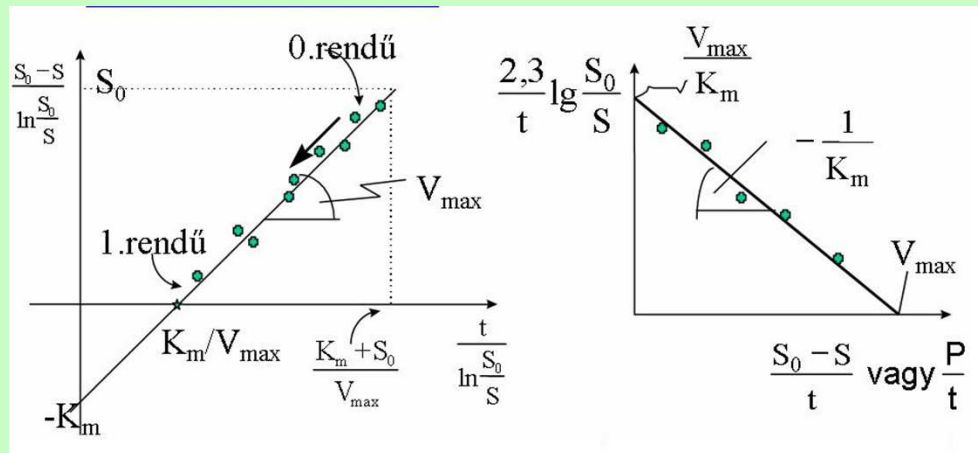
$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{\max} S}{K_m + S} \xrightarrow{\text{integrálás}} V_{\max} t = S_0 - S + K_m \ln \frac{S_0}{S}$$

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

$$\frac{2.3}{t} \lg \frac{S_0}{S} = -\frac{1}{K_m} \frac{S_0 - S}{t} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$



Paraméterbecslés 1



Foster-Niemann módszer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Paraméterbecslés 2

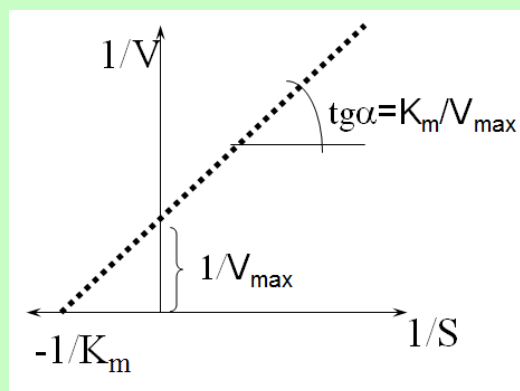
Linearizált ábrázolást használunk, mert:

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

1. Lineweaver-Burk linearizálás

$$1/v - 1/S$$

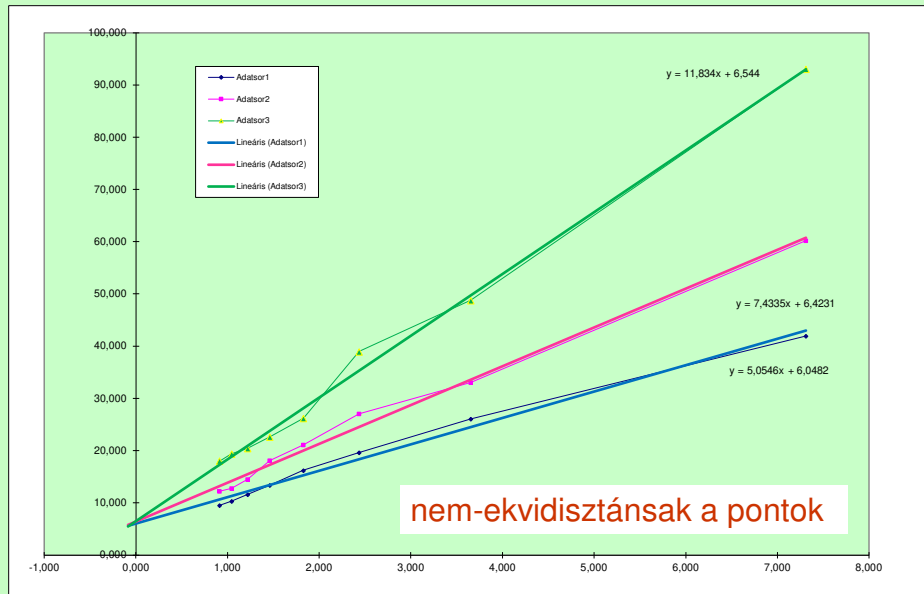
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Az L-B linearizálás gyengéje:

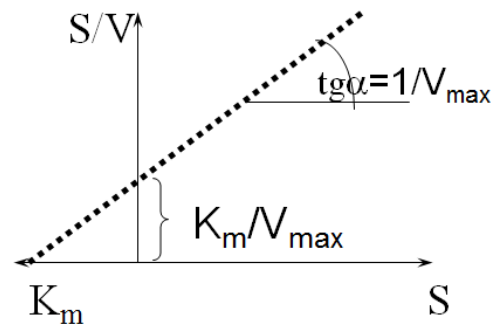


Linearizálások

2. Hanes-Langmuir linearizálás

$$S/v - S$$

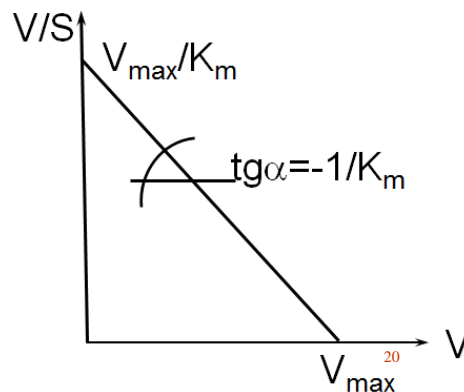
$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot S$$



3. Eady-Hofstee linearizálás

$$v/S - v$$

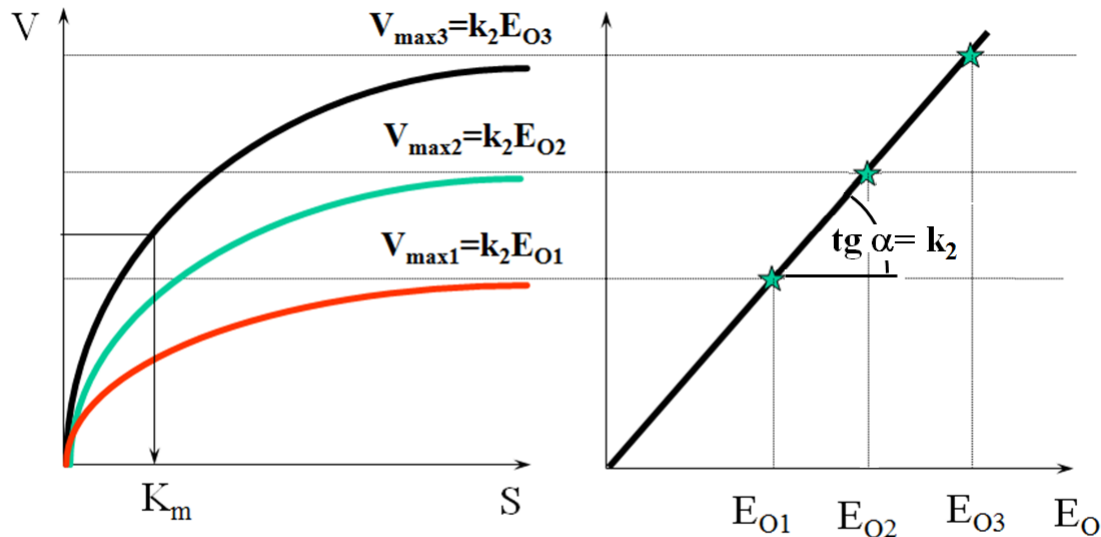
$$V = V_{max} - K_m \frac{V}{S}$$



Az enzimkoncentráció hatása

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

k_2 meghatározása:



Így mérünk enzim aktivitást, nagy S koncentrációnál!

21

slido



Kérem, írjátok be azon diák sorszámaikat (vesszőkkel elválasztva), amiknek az anyagát más tárgyból már tanultátok!

① Start presenting to display the poll results on this slide.

22

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.



A kinetikai paraméterek: K_S , K_m

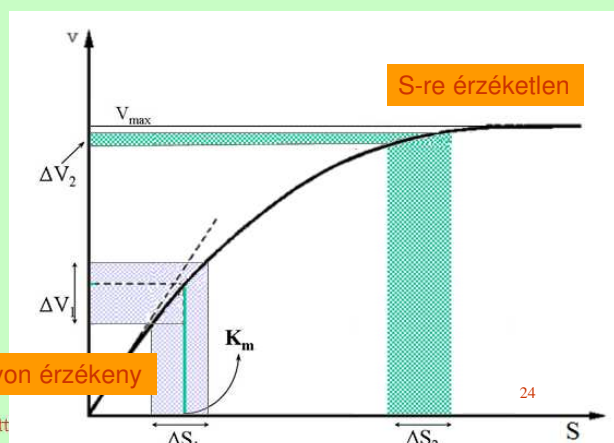
- az enzim affinitása a szubsztráthoz
- az élő sejtben közelítőleg ennyi az S koncentráció, mert így önszabályozó, és van tartalék kapacitás is.
- Változott a $K_S \rightarrow$ Inhibitor? Aktivátor?
- Enzimanalitika:

Ha aktivitást mérek:

$$S \gg K_S \quad v = v_{max}$$

ha szubsztrátkoncentrációt mérek:

$$S \approx K_S \quad \text{lineáris tartomány}$$



A kinetikai paraméterek

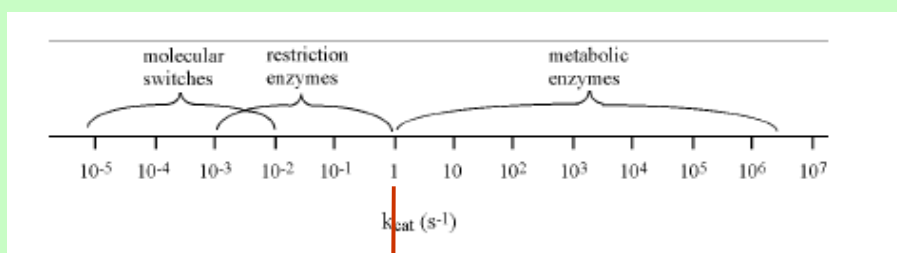
- k_1 10^7 - 10^{10} $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$ [max. érték (10^{11}) a kis molekulák diffúziósebessége]
- k_{-1} 10^2 - 10^6 min^{-1}
- k_2 50 - 10^7 min^{-1}
- K_m 10^{-6} - 10^{-2} mol/dm^3

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 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	9.5×10^{-5}	1.4×10^4	1.5×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	<i>N</i> -Acetylglycine ethyl ester	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	<i>N</i> -Acetylvaline ethyl ester	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	<i>N</i> -Acetyltyrosine ethyl ester	6.6×10^{-4}	1.9×10^2	2.9×10^5
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-6}	8.0×10^2	1.6×10^8
	Malate	2.5×10^{-5}	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



k_{cat} alsó határa metabolikus enzimeknél

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

Legtöbb enzim e két szélső eset között

Természetes enzimeknél: $>10^5$
 Mesterséges E-nél (DNA-zyme, abzyme): $<10^3$



Fajlagos aktivitás és váltásszám

Ez a kettő hasonlít egymásra, mert:

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

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

Ha az enzimpreparátum tiszta, nincs benne ballaszt anyag, akkor a kettő kb. egyenlő.



Fajlagos aktivitás és váltásszám

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

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

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

mivel

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

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



Reverzibilis reakciók

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

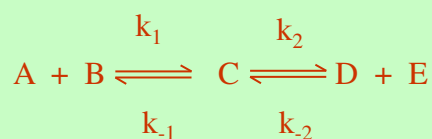


Mindkét kinetikai leírásban feltételeztük, hogy a $k_{-2} = 0$, ezért a
 reverzibilis reakciót két ellentétes egyirányú folyamat leírásá-
 ból állítjuk össze.



Reverzibilis reakciók

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

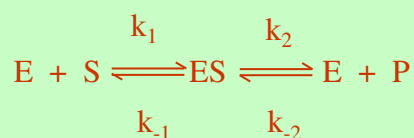


$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

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



Reverzibilis reakciók



A két ellentétes irányú reakció egyensúlyi állandóit fölírva:

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

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

A közös elemet kiemelve:

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

Az eredő egyensúlyi állandót kifejezhetjük:

$$K_{eq(uilibrium)} = \frac{P_{eq}}{S_{eq}} = \frac{k_{+1}k_{+2}}{k_{-1}k_{-2}}$$

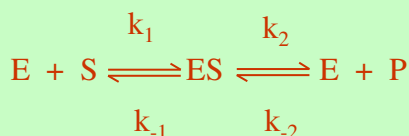


Reverzibilis reakciók

HALDANE leírásához:

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

$$K_{mp} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}}$$



$$V_{maxs} = k_2 E_o$$

$$V_{maxp} = k_{-1} E_o$$

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

$1/K_s$

K_p



Reverzibilis reakciók

Végezzük el a következő osztásokat:

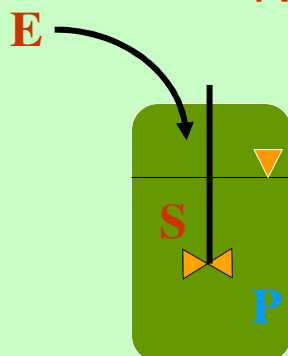
$$\frac{V_{\max s}}{K_{ms}} = \frac{k_1 k_2 E_o}{k_2 + k_{-1}} \quad \text{és} \quad \frac{V_{\max p}}{K_{mp}} = \frac{k_{-2} k_{-1} E_o}{k_2 + k_{-1}}$$

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

Egyensúlyi állandóra ugyanazt kaptuk - HALDANE összefüggés



Reverzibilis reakciók



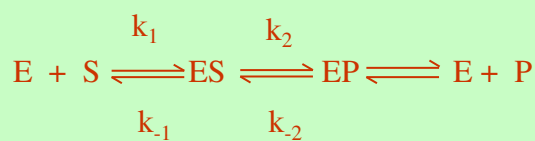
MI TÖRTÉNIK?

$S \rightarrow P$ vagy $P \rightarrow S$



MITŐL FÜGG? K_{eq} , S , P értéke

Itt feltételezzük az EP komplex létezését:



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

$$E_0 = E + (ES) + (EP)$$

osztjuk el:

$$\frac{v_{\text{előre}}}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES) + (EP)} \quad \frac{v_{\text{vissza}}}{E_0} = \frac{k_{-2}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$

ebből:

$$\Delta v = \frac{E_0 k_2(ES) - E_0 k_{-2}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$



Reverzibilis reakciók

Behelyettesítve :

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

figyelembe véve, hogy:

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

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} \frac{S}{K_s} E - v_{\max P} \frac{P}{K_p} E}{E + \frac{S}{K_s} E + \frac{P}{K_p} E}$$

azaz

$$\Delta V = \frac{V_{\max S} \left(S - \frac{P}{K_{eq}} \right)}{K_{ms} \left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right) + S}$$

Reverzibilis M-M egyenlet₃₆



Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} \frac{S}{K_S} \cancel{E} - v_{\max P} \frac{P}{K_P} \cancel{E}}{\cancel{E} + \frac{S}{K_S} \cancel{E} + \frac{P}{K_P} \cancel{E}}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} S - v_{\max P} \frac{K_S}{K_P} P}{K_S + S + \frac{K_S}{K_P} P}$$

$$\frac{v_{\max S}}{v_{\max P}} = \frac{k_2 \cancel{E_0}}{k_{-1} \cancel{E_0}}$$

$$v_{\max P} = v_{\max S} \frac{k_{-1}}{k_2}$$

$$\frac{K_S}{K_P} = \frac{(k_2 + k_{-1})k_{-2}}{k_1(k_2 + k_{-1})} = \frac{k_{-2}}{k_1}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} S - v_{\max S} \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_2k_1} P}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} S - v_{\max S} \frac{P}{K_{eq}}}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$

$$K_{eq} = \frac{P_{eq}}{S_{eq}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}}$$



Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} S - v_{\max S} \frac{P}{K_{eq}}}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$

$$\frac{P}{K_{eq}} = \frac{P \cdot S_{eq}}{P_{eq}}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} \left(S - S_{eq} \frac{P}{P_{eq}}\right)}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$

$$(S - S_{eq}) = P_{eq} - P = K_{eq} \cdot S_{eq} - P$$

$$P = K_{eq} \cdot S_{eq} - S + S_{eq} = S_{eq}(K_{eq} + 1) - S$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} \left(S - \frac{S_{eq}(K_{eq} + 1) - S}{K_{eq}}\right)}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max S} \left(\frac{SK_{eq} - S_{eq}K_{eq} - S_{eq} + S}{K_{eq}}\right)}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$



Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} \left(S - S_{eq} - \frac{S_{eq}}{K_{eq}} + \frac{S}{K_{eq}} \right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p} \right) + S}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} (S - S_{eq}) \left(1 + \frac{1}{K_{eq}} \right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p} \right) + S}$$



Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} (S - S_{eq}) \left(1 + \frac{1}{K_{eq}} \right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p} \right) + S}$$

A reakció sebessége nem állandó, az egyensúlyt közelítve lassul.

A hajtóerő az a szubsztrát koncentráció eltérése $(S - S_{eq})$ az egyensúlytól.

A nevezőben pedig az $\left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right)$ tag az jelenti, hogy a termék kompetitív inhibitorként viselkedik (ld. a következő fejezetben).



slido



**Melyik levezetés melyik szakasza
volt a legkevésbé érthető/követhető?**

① Start presenting to display the poll results on this slide.

41