

Enzimkinetika

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

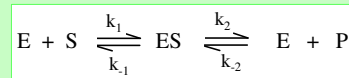


A sztöchiometriához mindegyiket mól-ban vagy grammal kellene kifejezni. De: az enzimpreparátum sohasem tiszta.

Ezért az enzimek mennyiségét a hatásuk alapján adjuk meg:



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

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



Enzimkinetika

Egy egység (Unit) az az enzim mennyiség, amely 1 μ mol szubsztrátot alakít át vagy 1 μ mol 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

Fajlagos aktivitás: E/mg, E/ml



Michaelis-Menten kinetika

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

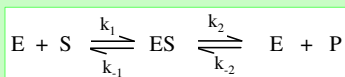
Helyettesítsük be: $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$ $\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 \frac{S}{K_s} E}{E + \frac{S}{K_s} E}$

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



Kiindulási feltételezések:

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

RAPID EKVILIBRIUM: $k_1 S \cdot E = k_{-1} (ES)$

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

Ebből az sebességi egyenlet:

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



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

Briggs-Haldane kinetika

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

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

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

$$E + (ES) = E_0$$

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

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

Michaelis állandó

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Briggs-Haldane kinetika

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

Ugyanazok a diffegyenletek, de a feltételezés: (kvázi) állandósult állapot = steady state ↓

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

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

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

$d(ES)/dt = 0$

(S) >> (E₀) vagyis E₀/S << 1
k₁E S > k₋₁(ES) ill. k₁E S > k₂(ES)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Diskusszió

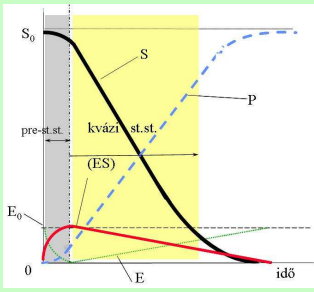
<p>Michaelis -Menten</p> $V = V_{max} \frac{S}{K_s + S}$ $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$	<p>Briggs-Haldane</p> $V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$ $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$
--	---

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

ha (k₁) >> (k₂) akkor a két konstans azonos!

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Briggs-Haldane kinetika

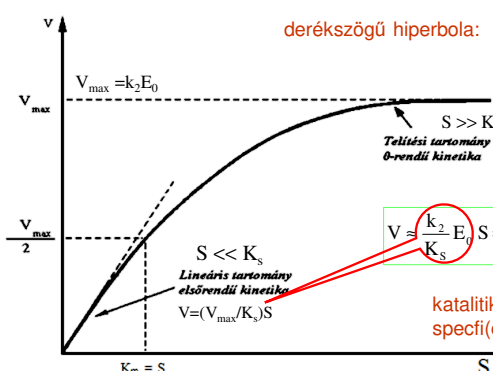


Egy rövid átmeneti szakasz (pre-steady state) után csak nagyon lassú a változás (kvázi steady state).

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

Diskusszió



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

$V_{max} = k_2 E_0$

$S \gg K_s$
Teljesítmény 0-rendű kinetika

$S \ll K_s$
Lineáris tartomány elsőrendű kinetika
 $V = (V_{max}/K_s) S$

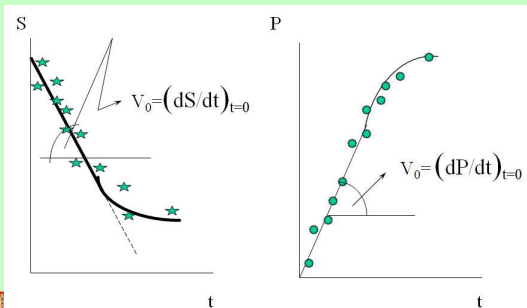
$V = \frac{k_2}{K_s} E_0 S = k' E_0 S$

katalitikus effektivitás = specifi(c)i állandó

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

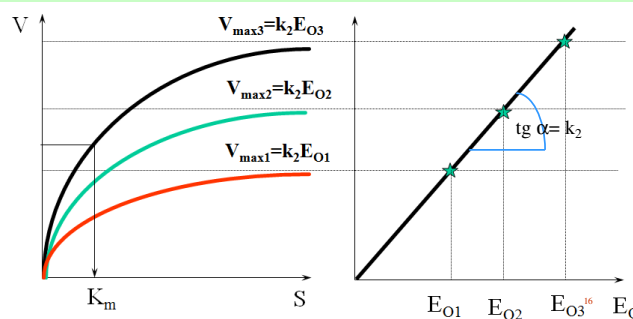
Reakciósebesség

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



Az enzimkoncentráció hatása

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



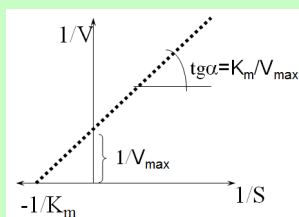
Linearizálások

Linearizált ábrázolást használunk, mert:

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

1. Lineweaver-Burk linearizálás
 $1/v - 1/S$

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



A kinetikai paraméterek

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

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

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

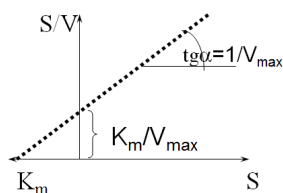
Kiterjesztés minden enzimre és minden kinetikára:

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

Linearizálások

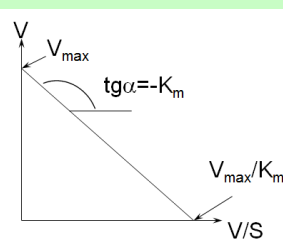
2. Hanes-Langmuir linearizálás
 $S/v - S$

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



3. Eady-Hofstee linearizálás
 $v/S - v$

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

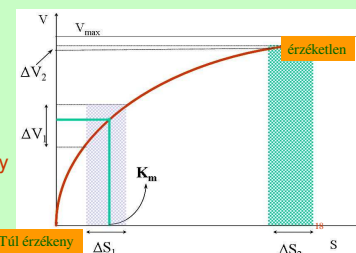


A kinetikai paraméterek: K_s , K_m

- az enzim affinitása a szubsztráthoz
- az élő sejten közelítőleg ennyi az S koncentráció, mert így jól szabályozza a sebességet
- Változott a $K_s \rightarrow$ Inhibitor? Aktivátor?
- Enzimanalítika:

ha aktivitást mérek:
 $S \gg K_s \quad v = v_{max}$

ha szubsztrátkoncentrációt mérek:
 $S \ll K_s$ lineáris tartomány



A kinetikai paraméterek

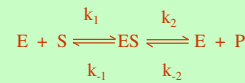
- k_1 10^7 - 10^{10} $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$ [max. érték (10^{11}) a kis molekulák diffúziósebessége]
- k_{-1} 10^2 - 10^6 min^{-1}
- k_2 50 - 10^7 min^{-1}
- K_m 10^{-6} - 10^{-2} mol/dm^3

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}	4.0×10^6	1.5×10^8
Catalase	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	<i>N</i> -Acetylglucine 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^{-4}	8.0×10^2	1.6×10^6
	Malate	2.5×10^{-3}	9.0×10^2	3.6×10^5
Urease	Urea	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5



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:

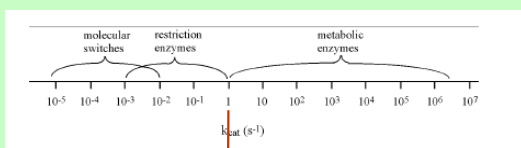
$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} S = \frac{(ES)}{E} = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} P$$

Az eredő egyensúlyi állandót kifejezhetjük:

$$K_{eq(\text{uilibrium})} = \frac{P}{S} = \frac{k_{+1}k_{+2}}{k_{-1}k_{-2}} \quad \text{ugyanaz!}$$



k_{cat} értékek



k_{cat} alsó határa metabolikus enzimeknél

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

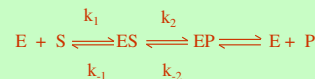
Legtöbb enzim e két szélső eset között
Természetes enzimeknél: $>10^5$
Mesterséges E-nél (DNA-zyyme, abzyme): $<10^3$



Reverzibilis reakciók

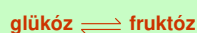


Itt feltételezzük az EP komplex létezését:



Reverzibilis reakciók

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



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



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

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

osztjuk el:

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

ebből:

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



Reverzibilis reakciók

Behelyettesítve:

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

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

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

Reverzibilis M-M egyenlet₂₅



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

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

ahol $\frac{P}{K_{eq}} = S_{eq}$ azaz $(S - S_{eq})$ a

szubsztrát koncentráció eltérése az egyensúlytól.

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

inhiborként viselkedik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26