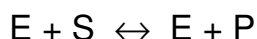


Enzimkinetika

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:



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.

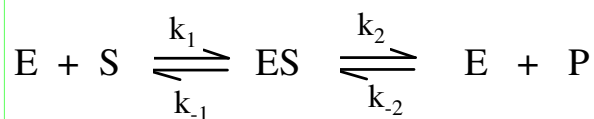
Ez hatalmas egység, praktikusabb a nanoKatal = 10^{-9} Kat

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

Fajlagos aktivitás: U/mg, U/ml



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

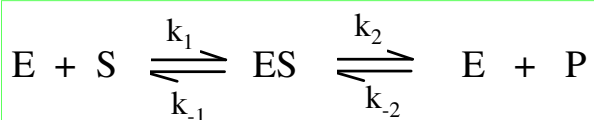
- az ES komplex stabil, az EP komplex elhanyagolható



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: $E_0 = E + (ES)$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

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




5

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Michaelis-Menten kinetika

Ebből a sebességi egyenlet:

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


6

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

M és M



Maud Menten
 1879-1960

Leonor Michaelis
 1875-1949

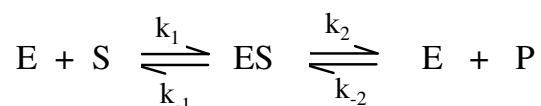
Michaelis, L., Menten, M. (1913) Die kinetik der invertinwirkung,
Biochemische Zeitung 49, 333-369



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Briggs-Haldane kinetika



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

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

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

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

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

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

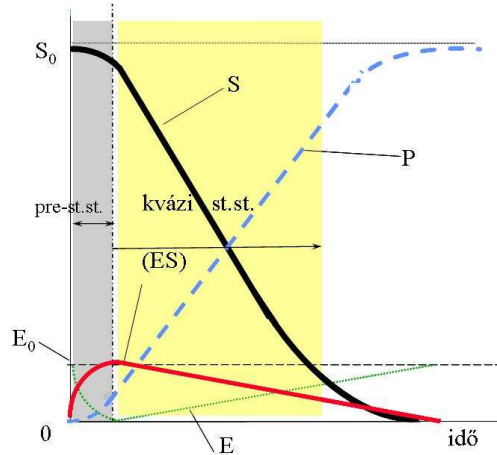


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Briggs-Haldane kinetika

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



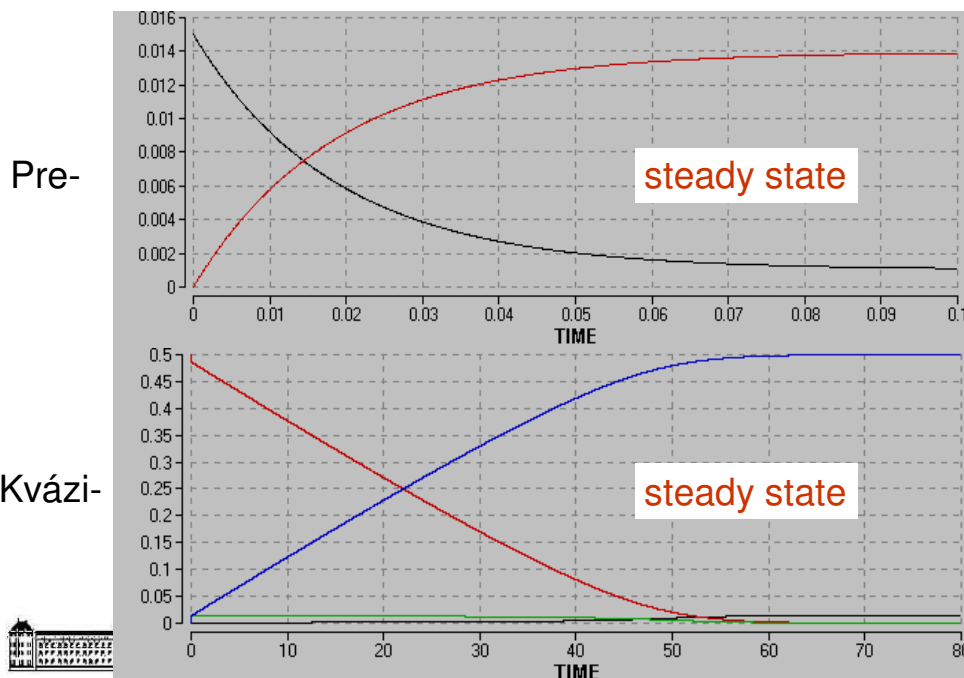
Briggs, G. E., and Haldane, J. B. (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action, *Biochem J* 19, 338-339.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

A Briggs-Haldane kinetika numerikus szimulációja



10

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

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

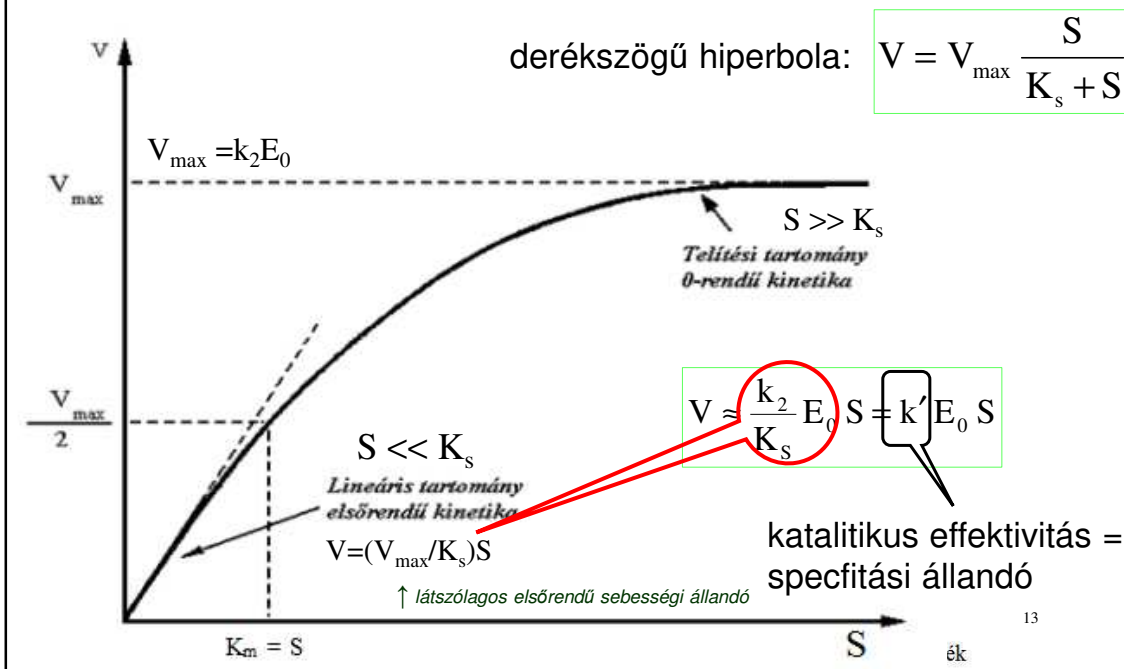
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

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

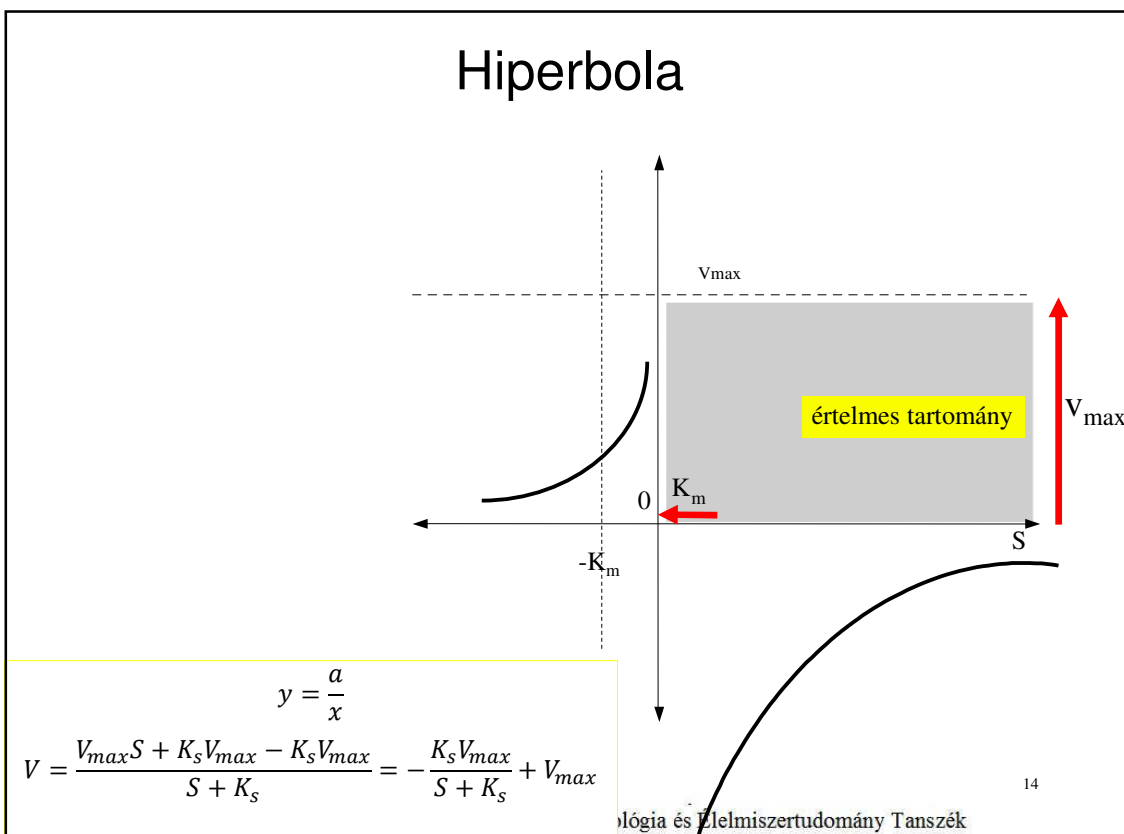
ha $(k_1) \gg (k_2)$ akkor a két konstans azonos!



Diszkusszió

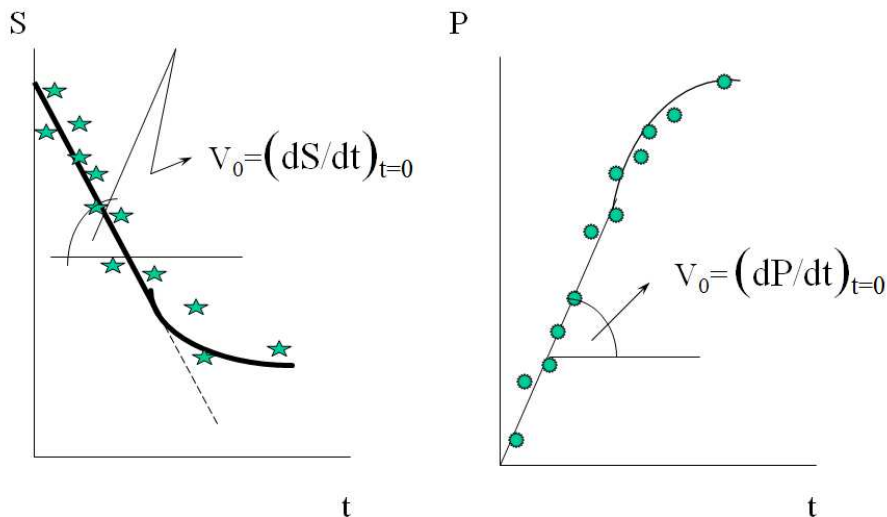


Hiperbola



Reakciósebesség

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



15

Paraméterbecslés 1

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

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

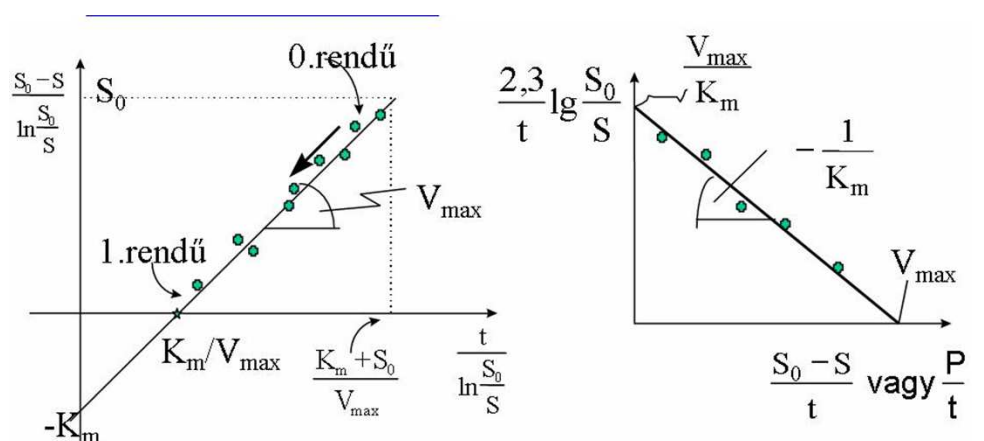
$$\frac{2.3}{t} \lg \frac{S_0}{S} = -\frac{1}{K_m} \frac{S_0 - S}{t} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Paraméterbecslés 1



Foster-Niemann módszer

17



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Paraméterbecslés 2

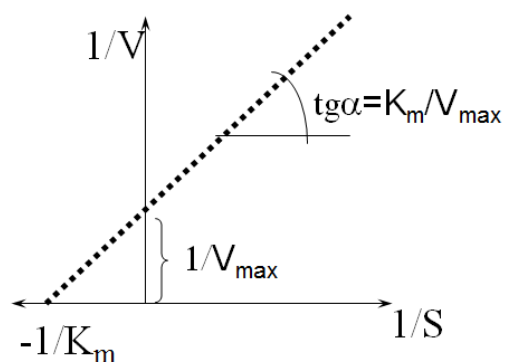
Linearizált ábrázolást használunk, mert:

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

1. Lineweaver-Burk linearizálás

$$1/v - 1/S$$

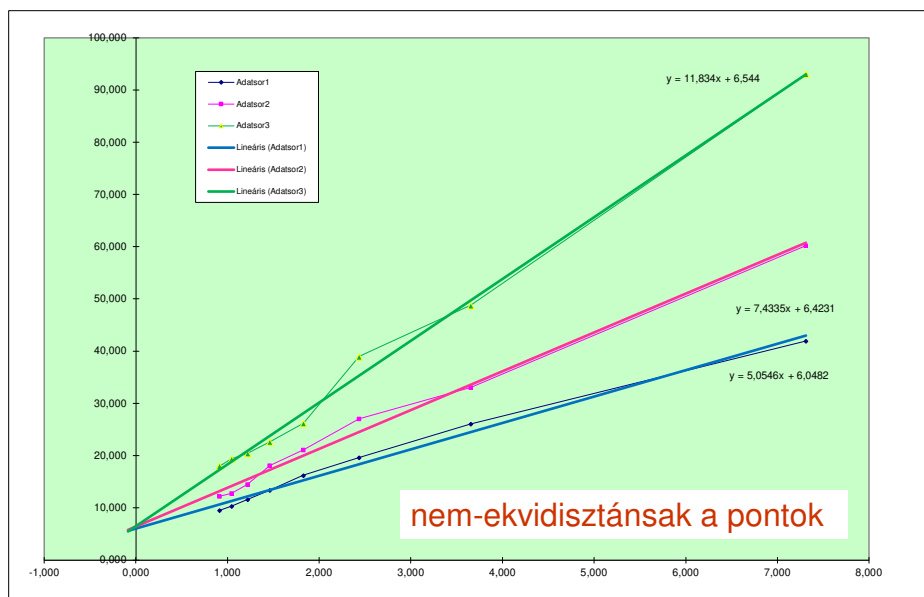
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Az L-B linearizálás gyengéje:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

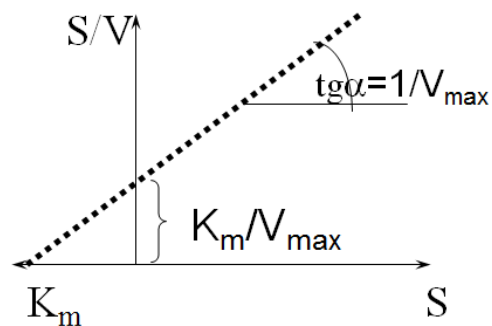
19

Linearizálások

2. Hanes-Langmuir linearizálás

$$S/v - S$$

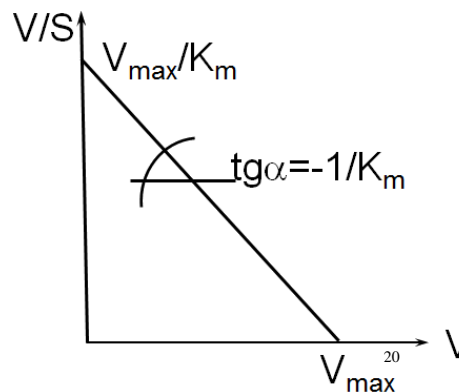
$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot S$$



3. Eady-Hofstee linearizálás

$$v/S - v$$

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



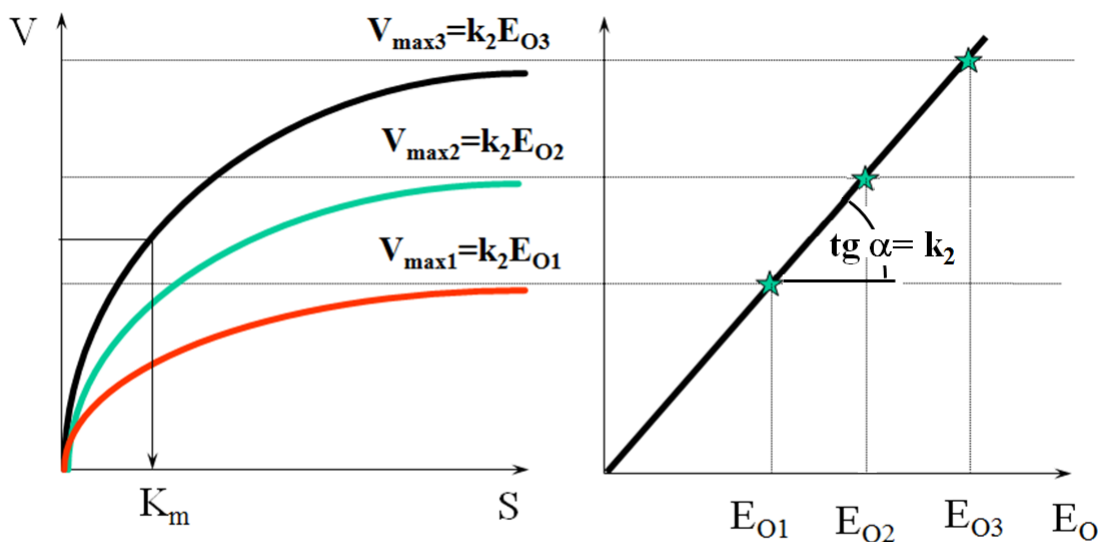
BME Alkalmazott Biotechnol

20

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:

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot E_0$$

k_{cat} [s^{-1}]: egy enzim molekula átalakítási frekvenciája S-telítés esetén: egy enzim molekula időegység alatt hány molekula szubsztátot 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:

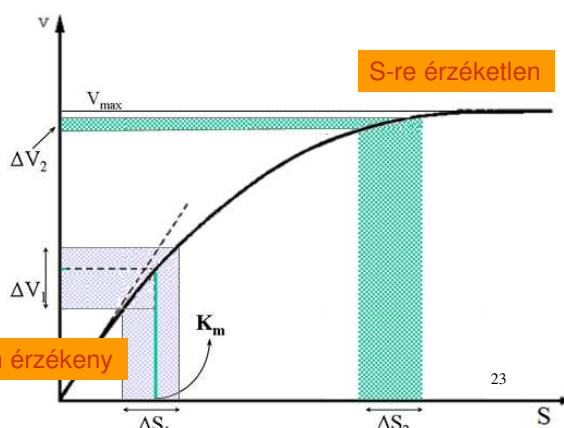
$$S \gg K_S \quad v = v_{\max}$$

ha szubsztrátkoncentrációt mérek:

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



BME Alkalmazott



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}

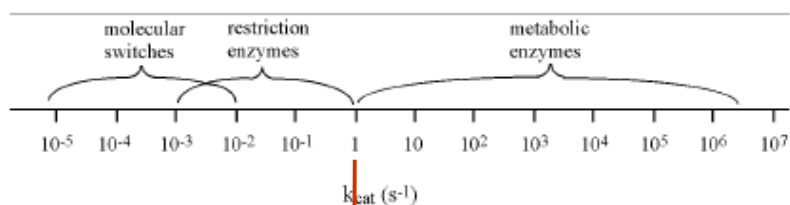
K_M 10^{-6} - 10^{-2} mol/dm^3

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



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

k_{cat} alsó határa metabolikus enzimeknél

Legtöbb enzim e két szélső eset között

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



Fajlagos aktivitás és váltásszám

Ez a kettő hasonlít egymásra, mert:

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

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

Az enzimmennyiség átszámolásával összehozhatók.



Fajlagos aktivitás és váltásszám

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

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

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

mivel

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

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



Reverzibilis reakciók

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

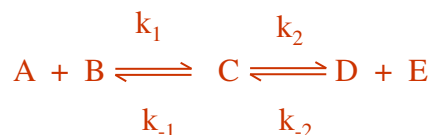


Mindkét kinetikai leírásban feltételeztük, hogy a $k_{-2} = 0$, ezért a reverzibilis reakciót két ellentétes egyirányú folyamat leírásából állítjuk össze.



Reverzibilis reakciók

Fizkém reakciókinetika egymást követő (konzekutív) egyensúlyi reakciók leírására:

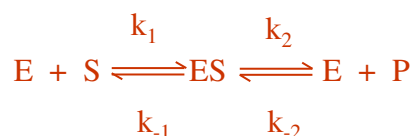


$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

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



Reverzibilis reakciók



A két ellentétes irányú reakció egyensúlyi állandóit fölírva:

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

A közös elemet kiemelve:

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

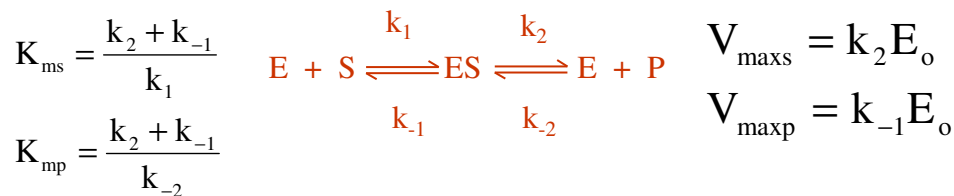
Az eredő egyensúlyi állandót kifejezhetjük:

$$K_{\text{eq(ulibrium)}} = \frac{P}{S} = \frac{k_{+1} k_{+2}}{k_{-1} k_{-2}}$$



Reverzibilis reakciók

HALDANE leírásához:



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

\swarrow $1/K_S$ \searrow K_P



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



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

33

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 anyagmérlegével

osztjuk el:

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

$$\frac{V_{\text{előre}}}{E_o} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES) + (EP)}$$

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

ebből:

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

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 egyenlet³⁵



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

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

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

inhibitorként viselkedik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36