

## Enzimkinetika

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

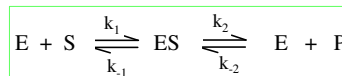


A sztöchiometriához mindegyiket mól-ban vagy grammal kellene kifejezni. De: az enzimpreparátum sohasem tiszta.

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

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



## Enzimkinetika

Egy egység (Unit) az az enzim mennyiség, amely 1  $\mu\text{mol}$  szubsztrátot alakít át vagy 1  $\mu\text{mol}$  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:  $\frac{V}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES)}$

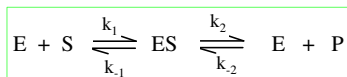
Helyettesítsük be:  $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$   $\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 \frac{S}{K_s} E}{E + \frac{S}{K_s} E}$

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

### Briggs-Haldane kinetika

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

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

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

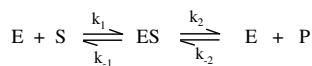
$$E + (ES) = E_0$$

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

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

Michaelis állandó

### Briggs-Haldane kinetika



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

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

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

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

(S) >> (E<sub>0</sub>) vagyis E<sub>0</sub>/S << 1  
k<sub>1</sub>E S > k<sub>-1</sub>(ES) ill. k<sub>1</sub>E S > k<sub>2</sub>(ES)

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

### Diszkusszió

Michaelis -Menten

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

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

Briggs-Haldane

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

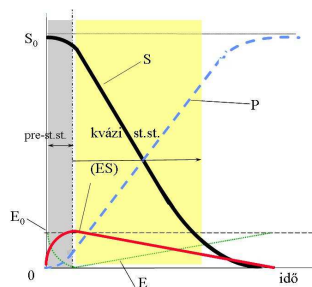
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

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

ha (k<sub>1</sub>) >> (k<sub>2</sub>) akkor a két konstans azonos!

### Briggs-Haldane kinetika

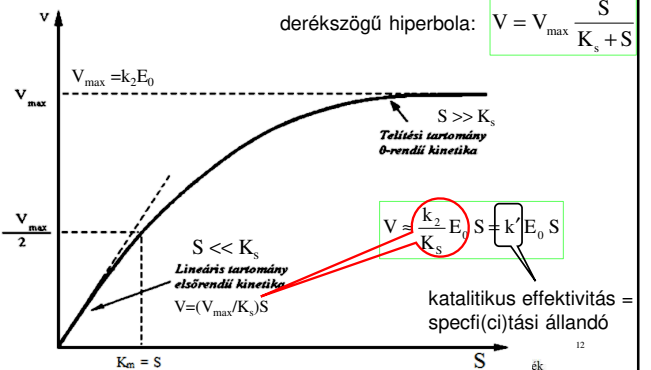
Egy rövid átmeneti szakasz (pre-steady state) után csak nagyon lassú a változás (kvázi steady state).



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

### Diszkusszió

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



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

katalitikus effektívitas = specfi(c)i állandó

### Reakciósebesség

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

### Az enzimm koncentráció 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

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

### 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

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

3. Eady-Hofstee linearizálás

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

### A kinetikai paraméterek: $K_S$ , $K_m$

- az enzim affinitása a szubsztráthoz
- az élő sejtben 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

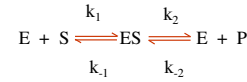
- $k_1$   $10^7$ - $10^{10}$   $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$  [max. érték ( $10^{11}$ ) a kis molekulák diffúziósebessége]
- $k_{-1}$   $10^2$ - $10^6$   $\text{min}^{-1}$
- $k_2$   $50$ - $10^7$   $\text{min}^{-1}$
- $K_m$   $10^{-6}$  -  $10^{-2}$   $\text{mol/dm}^3$

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)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	$9.5 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^6$
Carbonic anhydrase	$\text{CO}_2$	$1.2 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$
	$\text{HCO}_3^-$	$2.6 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2$	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^8$
Chymotrypsin	<i>N</i> -Acetylglycine ethyl ester	$4.4 \times 10^{-1}$	$5.1 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
	<i>N</i> -Acetylvaline ethyl ester	$8.8 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-1}$	1.9
	<i>N</i> -Acetyltyrosine ethyl ester	$6.6 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^2$	$2.9 \times 10^5$
Fumarase	Fumarate	$5.0 \times 10^{-4}$	$8.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^6$
	Malate	$2.5 \times 10^{-3}$	$9.0 \times 10^2$	$3.6 \times 10^7$
Urease	Urea	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5$



### Reverzibilis reakciók



A két ellentétes irányú reakció egyensúlyi állandóit fölrírva:

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

A közös elemet kiemelve:

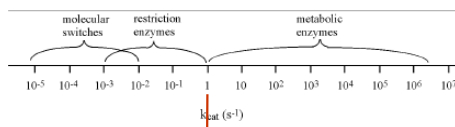
$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} S = \frac{(ES)}{E} = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} P$$

Az eredő egyensúlyi állandót kifejezhetjük:

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



### $k_{cat}$ 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

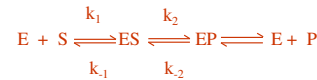
Természetes enzimeknél:  $>10^5$   
Mesterséges E-nél (DNA-zyme, abzyme):  $<10^3$



### 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, 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

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

$$\text{osztjuk el: } E_0 = E + (ES) + (EP)$$

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

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

Reverzibilis M-M egyenlet<sub>25</sub>



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Reverzibilis reakciók

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

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

26