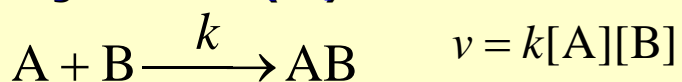


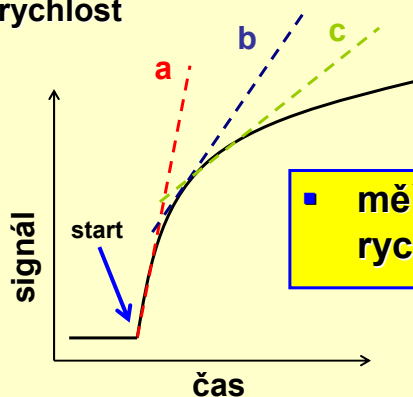
5. Kinetika reakce enzymu se substrátem

- parametry v_{lim} (v_{max}) a K_M , jejich význam
- odvození rovnice Michaelise a Mentenové
- metody stanovení parametrů MM rovnice
- software pro enzymovou kinetiku
- integrovaná forma MM rovnice

Rychlost (v) chemické reakce

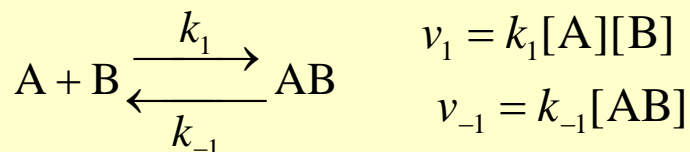


- jednotky rychlosti: $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$
- k ... kinetická rychlostní konstanta, jednotky různé (s^{-1} , $\text{mol}^{-1} \text{l s}^{-1}$) - tak, aby vždy vyšly správné jednotky pro rychlost



- měří se **počáteční** rychlost (a) je správně

Chemická rovnováha



- rovnováha: $v_1 = v_{-1} = k_1[A][B] = k_{-1}[AB]$

- kinetická rovnovážná asociační konstanta:

$$K_A = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

- kinetická rovnovážná disociační konstanta:

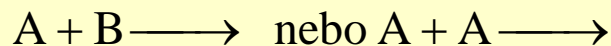
$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_A^{-1}$$

Řád reakce a molekularita

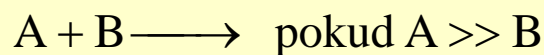
- 0. řádu $v = kc^0 = k$
- 1. řádu $v = kc$
- 2. řádu $v = kc^2$ nebo $v = kc_Ac_B$

- monomolekulární $A \longrightarrow$

- bimolekulární



- pseudomonomolekulární

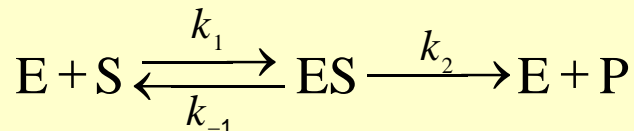


např. A je voda

Enzymová reakce

- rychlost závisí na koncentraci substrátu
- pokud se za obvyklých podmínek ($[E] \sim 1 \text{ nM}$, $[S] \sim 0.1$ až 1 mM) měří kolem 60 s, tak spotřeba substrátu dosáhne pouze několik procent - **počáteční rychlost** enzymové reakce

Reakce enzymu s jedním substrátem



- nejprve vzniká komplex enzym-substrát ES, který se následně rozpadá - buď za vzniku produktu, nebo zpět do výchozího stavu

- zajímá nás rychlost vzniku produktu:

$$v \equiv v_2 = k_2[ES]$$

- známe ale pouze výchozí koncentrace $[E]$ a $[S]$, koncentraci $[ES]$ neznáme

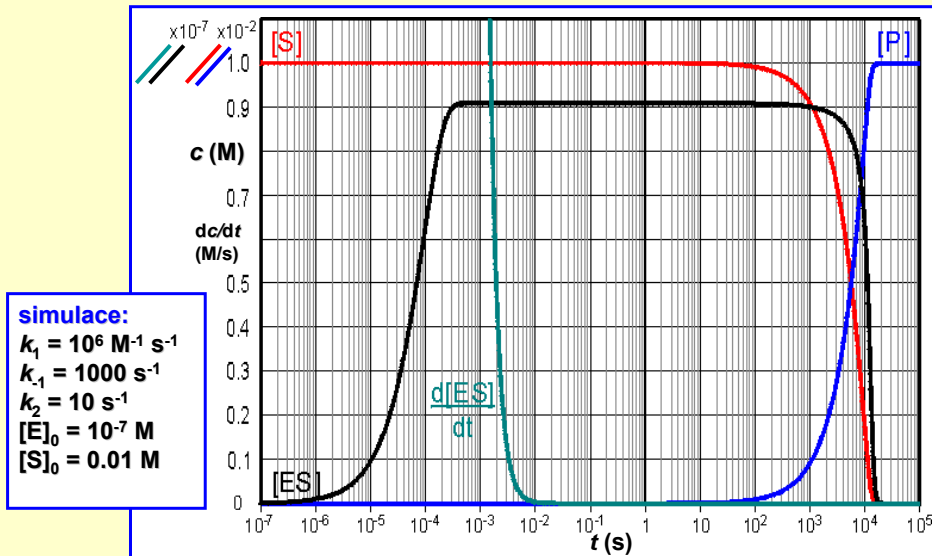
- předpoklad: vznik **ustáleného stavu** (steady-state), kdy se koncentrace ES v čase nemění (ale nevíme, jaká je...); zavedli 1925 Briggs a Haldane

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

- platí, že rychlost vzniku ES je stejná jako rychlosti rozpadu:

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$

Je ustálený stav oprávněný?



- po krátké přechodové době (1 ms) ano

- ... takže po dosazení: $k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$
- zvážení látkové bilance enzymu: $[E] = [E]_0 - [ES]$
- osamostatnění $[ES]$: $k_1([E]_0 - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$
 $k_1[E]_0[S] + k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$
 $k_1[E]_0[S] = [ES](k_{-1} + k_2 + k_1[S])$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$
- a dosazení do rovnice pro rychlost vzniku produktu: **maximální rychlost V_{\max}**

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Michaelisova konstanta K_m

K_m

- pokud je rozpad ES na produkt limitujícím krokem, tj. platí $k_2 \ll k_{-1}$, tak se K_m blíží výrazu k_{-1}/k_1 , což je vlastně disociační konstanta K_D pro komplex ES
- (neplatí to ale příliš obecně...)

TABLE 6-6 K_m for Some Enzymes and Substrates

Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

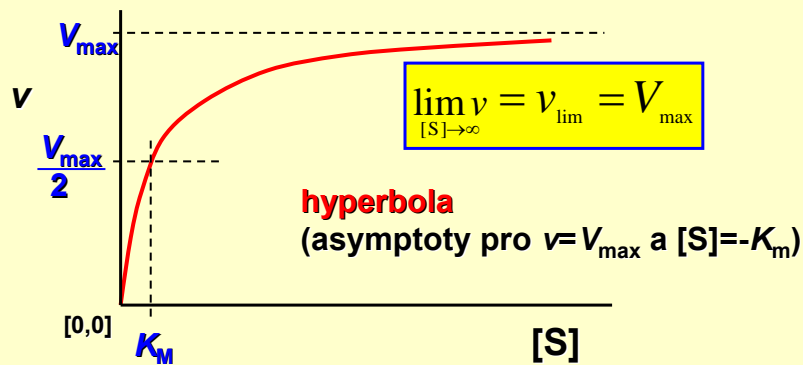
Rovnice Michaelise a Mentenové

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

- 1913 Leonor Michaelis a Maud Mentenová položili základy teorie reakce enzymu se substrátem
- pro $[S]=K_m$ dostáváme úpravou $v=V_{\max}/2$
- pro $[S]\ll K_m$ platí lineární závislost $v=(V_{\max}/K_m)[S]$
- pro $[S]\gg K_m$ je rychlost konstantní $v=V_{\max}$ (saturace enzymu substrátem)
- k_2 se často nazývá k_{cat}
- poměr k_{cat}/K_m reprezentuje specifitu daného enzymu, vlastně má význam rychlostní konstanty:

$$v = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E]_0 [S]$$

Závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu



- V_{lim} ... limitní rychlost (občas alternativně)
- V_{max} ... maximální rychlost
- $(V_{\text{max}} - v)(K_m + [S]) = V_{\text{max}} K_m$... rovnice hyperboly

Enzymy a difuze

$$\frac{k_2}{K_m} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \leq k_1 \leq k_{\text{dif}} = 4000\pi N_A (D_E + D_S)(r_E + r_S)$$

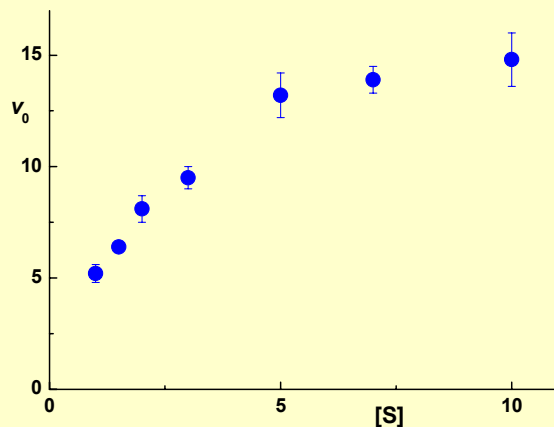
- pro výraz k_2/K_m je limitující rychlost vzniku komplexu ES, tj. konstanta k_1
- ta je zase limitována četností srážek mezi molekulami enzymu a substrátu, danou konstantou k_{dif}
- některé enzymy dosahují katalytického maxima...

TABLE 6-8 Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

Jak určit parametry MM rovnice ze závislosti počáteční rychlosti v_0 na (počáteční) koncentraci $[S]$

[S]	v_0	chyba
1.0	5.2	0.4
1.5	6.4	0.2
2.0	8.1	0.6
3.0	9.5	0.5
5.0	13.2	1
7.0	13.9	0.6
10.0	14.8	1.2

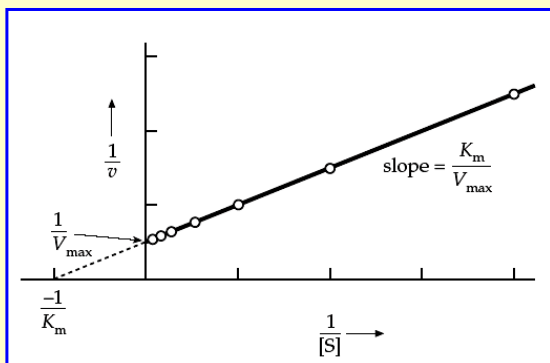


- naměřená a znázorněná data

Klasické "grafické" metody

- transformace MM rovnice na rovnici přímky $y=a+bx$
- metoda dle Lineweavera a Burka - dvojnásobný reciprokový výnos
 - převrácená MM rovnice

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



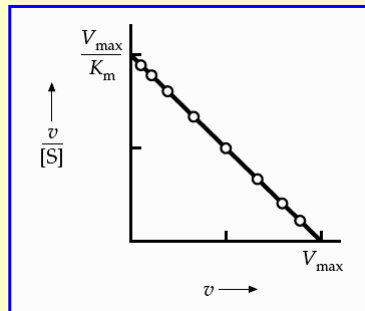
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

\uparrow y \uparrow úsek \uparrow směrnice \uparrow x

Další transformace

- Eadie a Hofstee (Scatchard)

$$\frac{v}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_m} - \frac{1}{K_m} v$$



- Hanes a Woolf (reciproká MM rovnice x [S])

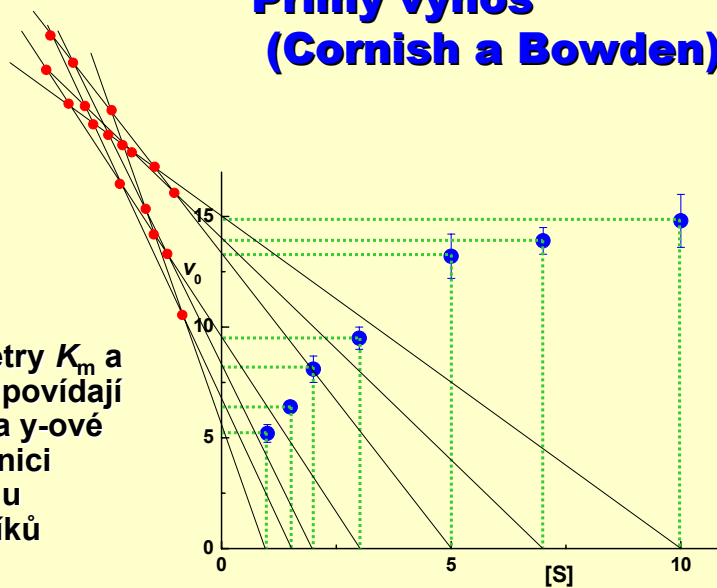
$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} [S]$$

- Woolf, Augustinsson a Hofstee (reciproká MM x vV_{\max})

$$v = V_{\max} - K_m \frac{v}{[S]}$$

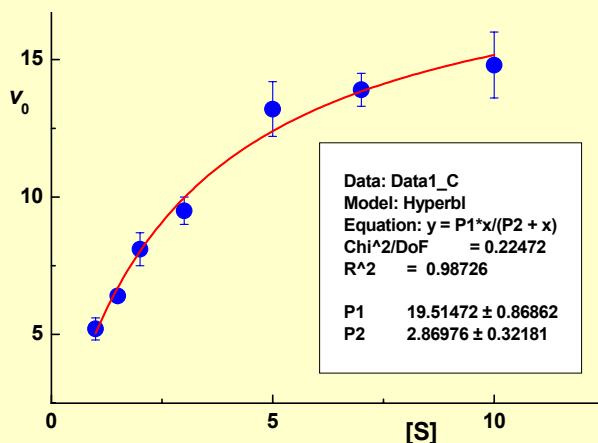
Přímý výnos (Cornish a Bowden)

- parametry K_m a V_{\max} odpovídají -x-ové a y-ové souřadnici mediánu průsečíků



Nelineární regrese

- programy pro zpracování vědeckých dat
- zadájí se naměřená data, zadá se vhodný model
- program určí parametry tak, aby vypočtená závislost byla co nejbližší naměřeným datům (metoda nejmenších čtverců)
- přímo implementováno v enzymologických programech



$$V_{\max} = 19.51 \pm 0.87$$

$$K_m = 2.87 \pm 0.32$$

Software pro enzym. kinetiku

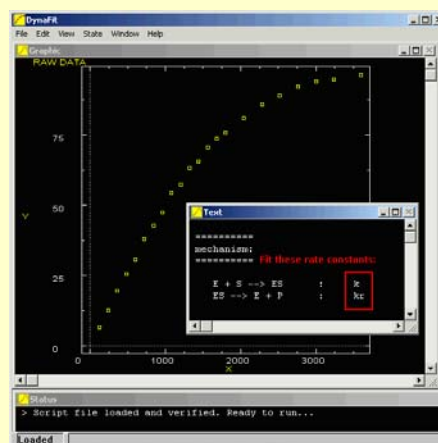
- Dynafit
 - NLLS analýza kinetiky (enzym, chem., ligand-receptor)
 - vstupní data ($[S]$, v_0), nebo přímo časové záznamy

zadá se přímo model procesu včetně rychlostních konstant:

Monomer + Monomer \rightleftharpoons Enzyme : k1 k2
Enzyme + Inhibitor \rightleftharpoons Complex : k3 k4
Enzyme + Substrate \rightleftharpoons ReactiveX : k5 k6
ReactiveX \rightarrow Product + Enzyme : k7 k8

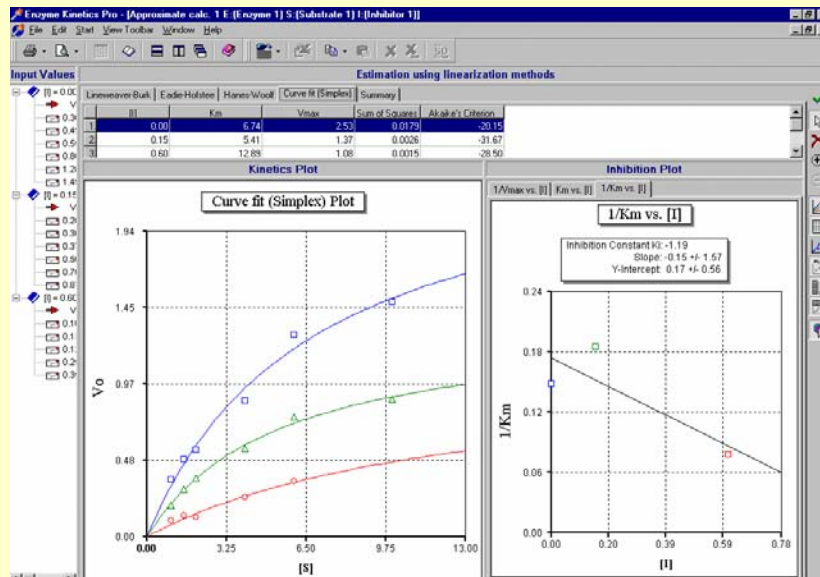
program konstanty určí, pod Windows, na bázi skriptů
akademická licence zdarma

<http://biokin.com/dynafit/index.html>



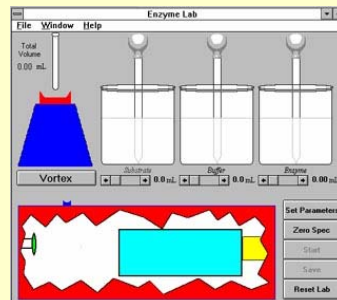
Enzyme Kinetics!Pro

- <http://www.chemsw.com/16029.htm> (300 USD, lze demo)



další...

- **EZ-Fit**
<http://www.jlc.net/~fperrell/webps04.htm> 250 USD
- **Systan** - enzym. modul pro SigmaPlot
<http://www.systat.com/downloads/?sec=d0012>
- **VisualEnzymics (SoftZymics)**
<http://softzymics.com/index.htm> 100 - 350 USD
- **Enzyme Lab** - virtuální enzymová laboratoř, J. Chem. Educ.
http://jchemed.chem.wisc.edu/JCESoft/Issues/Series_D/5D1/prog1-5D1.html
"kádinka" s puřrem, enzymem a substrátem, míchadlo a fotometr
- **KINSIM (simulace) a FITSIM (hledání parametrů)**
<http://www.biochem.wustl.edu/cflab/message.html>



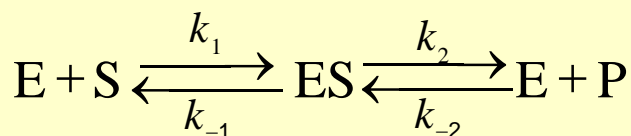
Srovnání metod

- jeden soubor naměřených hodnot ($[S], v$) byl vyhodnocen různými metodami, nalezené parametry:

Metoda	V_{\max} ($\mu\text{mol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	K_m (mM)
Lineweaver-Burk $1/v - 1/[S]$	29 ± 15 (52)	$2,9 \pm 1,6$ (55)
Wolf, Augustinson, Hofstee, $v - v/[S]$	$20,3 \pm 4,9$ (24)	$1,7 \pm 0,6$ (35)
Hanes a Wolf $[S]/v - [S]$	$27,3 \pm 5,4$ (20)	$2,6 \pm 0,7$ (27)
Nelineární regrese	$25,4 \pm 4,0$ (16)	$2,33 \pm 0,55$ (24)

- zpracování má vliv na přesnost i správnost

Když probíhá zpětná reakce...



$$v = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] = \frac{k_1 k_2 [S] - k_{-1} k_{-2} [P]}{k_1 [S] + k_2 [P] + k_{-1} + k_{-2}} [E]_0$$

- za rovnováhy $v=0$:

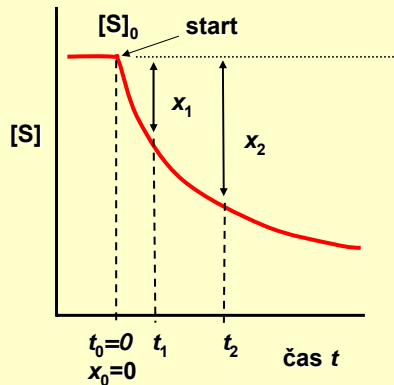
$$K = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = \frac{\bar{V}_{\max} / K_{m,S}}{\bar{V}_{\max} / K_{m,P}} = \frac{k_2 / K_{m,S}}{k_{-2} / K_{m,P}}$$

$$v = \frac{\frac{\bar{V}_{\max}}{K_{m,S}} [S] - \frac{\bar{V}_{\max}}{K_{m,P}} [P]}{\frac{[S]}{K_{m,S}} + \frac{[P]}{K_{m,P}} + 1}$$

- Haldanův vztah - souvislost mezi termodynamikou a kinetikou enzymové katalysy

Když není [S] konstantní...

- úbytek substrátu v průběhu měření nelze zanedbat (> cca 5%) - neměří se počáteční rychlost
- když reakce běží ireverzibilně (neprobíhá zpětná reakce), lze sledovat úbytek koncentrace substrátu - označí se x (platí vlastně $x = [P]$ při stechiometrii 1:1)



- sleduje se kontinuálně koncentrace substrátu (např. barevný fotometricky) v reakční směsi s enzymem
- v určitých intervalech se zaznamená jeho úbytek
- výsledek měření - soubor hodnot (t_i, x_i)

Integrovaná MM rovnice

- do MM vztahu se dosadí aktuální koncentrace substrátu pro daný okamžik:

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{V_{\max} ([S]_0 - x)}{K_m + ([S]_0 - x)}$$

- diferenciální rovnice, řeší se integrací (separace proměnných, meze počátek $[0,0]$ až po obecně $[t,x]$)

$$\int_0^x \left(\frac{K_m}{[S]_0 - x} + 1 \right) dx = V_{\max} \int_0^t dt$$

$$[-K_m \ln([S]_0 - x) + 1]_0^x = V_{\max} [t]_0^t$$

$$K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - x} + x = V_{\max} t$$

$$K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} + [P] = V_{\max} t$$

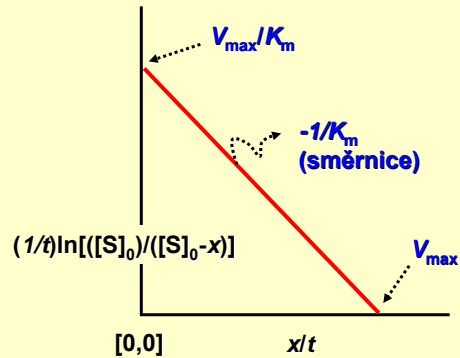
alternativní forma, záměna $x \approx [P]$

Integ. MM pro určení parametrů

- provede se linearizace:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - x} = \frac{V_{\max}}{K_m} - \frac{1}{K_m} \frac{x}{t}$$

- dostatek bodů se získá v průběhu jediného měření



Další aplikace Integ. MM

- "plánování" enzymové reakce
- řešení otázek typu za jak dlouho zreaguje požadovaná část substrátu, kolik enzymu se musí přidat, aby za daný čas s danou aktivitou zreagovalo žádané množství S
- vztah aktivita a max. rychlost:

$$V_{\max} = \frac{a}{V}$$

Prestacionární kinetika

- užitečná při řešení složitějších mechanismů

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E]_0[S] - (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$\frac{d^2[P]}{dt^2} = k_2 \frac{d[ES]}{dt} = k_2 k_1 [E]_0 [S] - (k_1[S] + k_{-1} + k_2) k_2 [ES]$$

$$\frac{d^2[P]}{dt^2} + (k_1[S] + k_{-1} + k_2) \frac{d[P]}{dt} - k_1 k_2 [E]_0 [S] = 0$$

- pokud $[S] \approx [S]_0 = \text{konst.}$, tak lze integrovat

$$t_{\text{lag}} = \frac{1}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

