

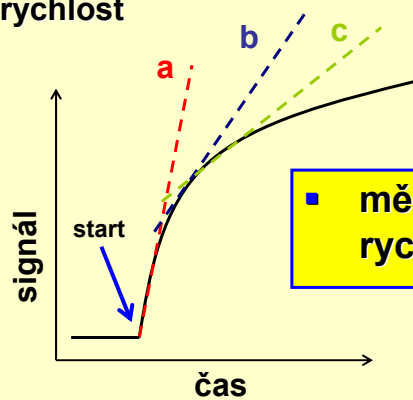
## 5. Kinetika reakce enzymu se substrátem

- parametry  $v_{\text{lim}}$  ( $v_{\text{max}}$ ) 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

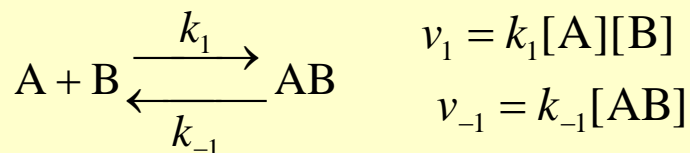


- jednotky rychlosti:  $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$
- $k$  ... kinetická rychlostní konstanta, jednotky různé ( $\text{s}^{-1}$ ,  $\text{mol}^{-1} \text{l s}^{-1}$ ) - tak, aby vždy vyšly správné jednotky pro rychlost



- 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:

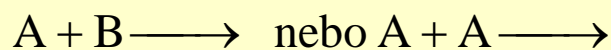
$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_A^{-1}$$

## Řád reakce a molekulárta

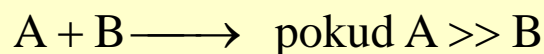
- 0. řádu  $v = kc^0 = k$
- 1. řádu  $v = kc$
- 2. řádu  $v = kc^2$  nebo  $v = kc_Ac_B$

- monomolekulární  $A \longrightarrow$

- bimolekulární



- pseudomonomolekulární

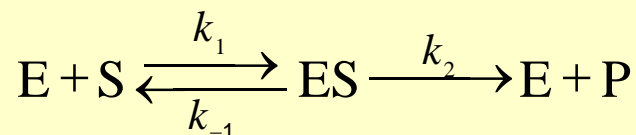


např. A je voda

## Enzymová reakce

- rychlost závisí na koncentraci substrátu
- pokud se za obvyklých podmínek ( $[E] \sim 1 \text{ nM}$ ,  $[S] \sim 0.1$  až  $1 \text{ mM}$ ) 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

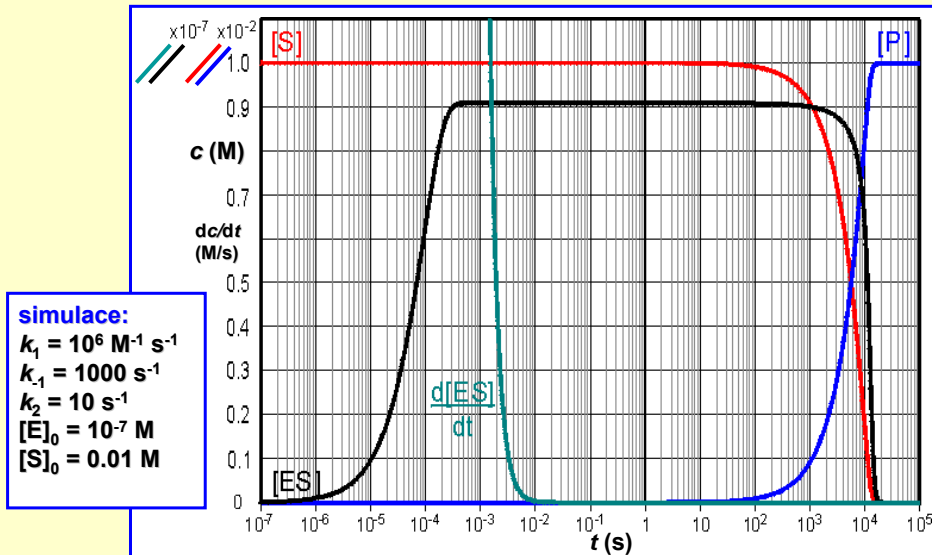
- předpoklad: vznik **ustáleného stavu** (steady-state), kdy se koncentrace ES v čase nemění (ale nevíme, jaká je...); zavedli 1925 Briggs a Haldane

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

- 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 dosažení:  $k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

- zvážení látkové bilance enzymu:  $[E] = [E]_0 - [ES]$

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

- osamostatnění  $[ES]$ :  $k_1[E]_0[S] + k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$

$$k_1[E]_0[S] = [ES](k_{-1} + k_2 + k_1[S])$$

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

- a dosažení 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     | $\text{HCO}_3^-$      | 26         |
| Chymotrypsin           | Glycyltyrosylglycine  | 108        |
|                        | N-Benzoyltyrosinamide | 2.5        |
| $\beta$ -Galactosidase | D-Lactose             | 4.0        |
| Threonine dehydratase  | L-Threonine           | 5.0        |

## Rovnice Michaelise a Mentenové

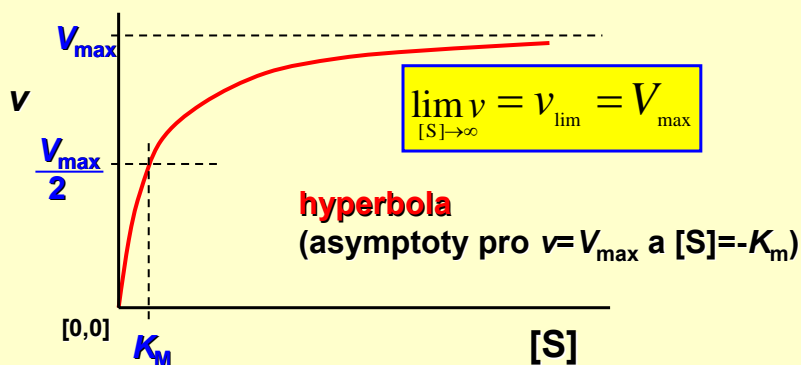
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

- 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  $k_{\text{cat}}$
- poměr  $k_{\text{cat}}/K_m$  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



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

## Enzymy a difuze

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

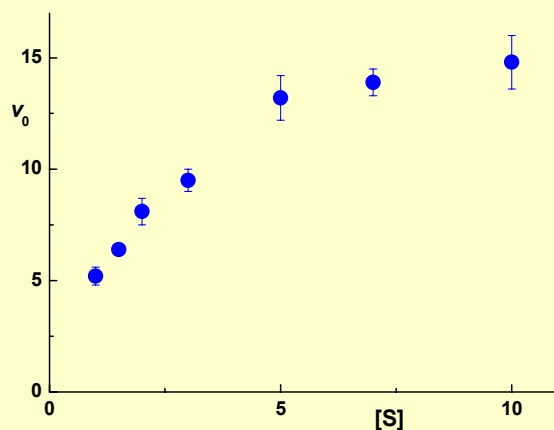
- pro výraz  $k_2/K_m$  je limitující rychlost vzniku komplexu ES, tj. konstanta  $k_1$
- ta je zase limitována četností srážek mezi molekulami enzymu a substrátu, danou konstantou  $k_{\text{dif}}$
- některé enzymy dosahují katalytického maxima...

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

| Enzyme               | Substrate              | $k_{\text{cat}}$<br>( $\text{s}^{-1}$ ) | $K_m$<br>(M)         | $k_{\text{cat}}/K_m$<br>( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) |
|----------------------|------------------------|---|----------------------|--|
| Acetylcholinesterase | Acetylcholine          | $1.4 \times 10^4$                       | $9 \times 10^{-5}$   | $1.6 \times 10^8$  |
| Carbonic anhydrase   | $\text{CO}_2$          | $1 \times 10^6$                         | $1.2 \times 10^{-2}$ | $8.3 \times 10^7$  |
|                      | $\text{HCO}_3^-$       | $4 \times 10^5$                         | $2.6 \times 10^{-2}$ | $1.5 \times 10^7$  |
| Catalase             | $\text{H}_2\text{O}_2$ | $4 \times 10^7$                         | $1.1 \times 10^0$    | $4 \times 10^7$  |
| Crotonase            | Crotonyl-CoA           | $5.7 \times 10^3$                       | $2 \times 10^{-5}$   | $2.8 \times 10^8$  |
| Fumarase             | Fumarate               | $8 \times 10^2$                         | $5 \times 10^{-6}$   | $1.6 \times 10^8$  |
|                      | Malate                 | $9 \times 10^2$                         | $2.5 \times 10^{-5}$ | $3.6 \times 10^7$  |
| $\beta$ -Lactamase   | Benzylpenicillin       | $2.0 \times 10^3$                       | $2 \times 10^{-5}$   | $1 \times 10^8$  |

## 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   |

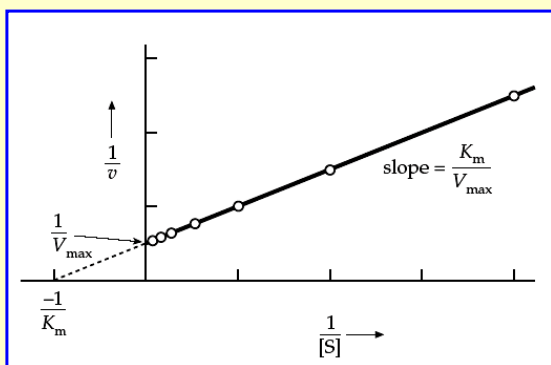


- naměřená a znázorněná data

## Klasické "grafické" metody

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

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



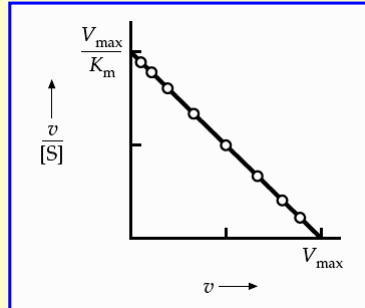
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

↑ y    ↑ úsek    ↑ směrnice    ↑ 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])

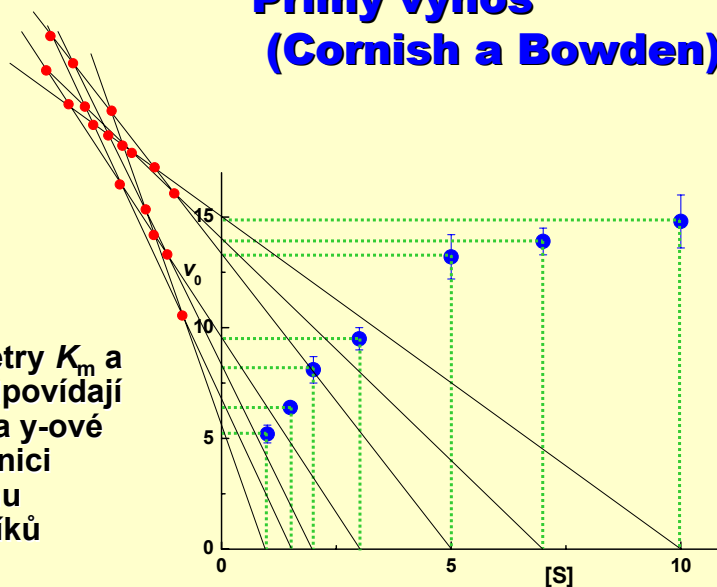
$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} [S]$$

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

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

## Přímý výnos (Cornish a Bowden)

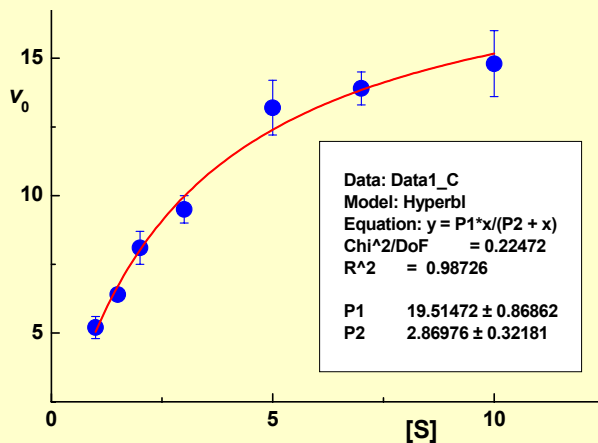
- parametry  $K_m$  a  $V_{\max}$  odpovídají  $-x$ -ové a  $y$ -ové souřadnici mediánu průsečíků





## Nelineární regrese

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



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

$$K_m = 2.87 \pm 0.32$$

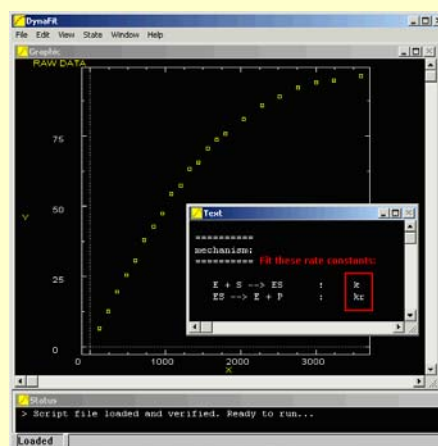
## Software pro enzym. kinetiku

- 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

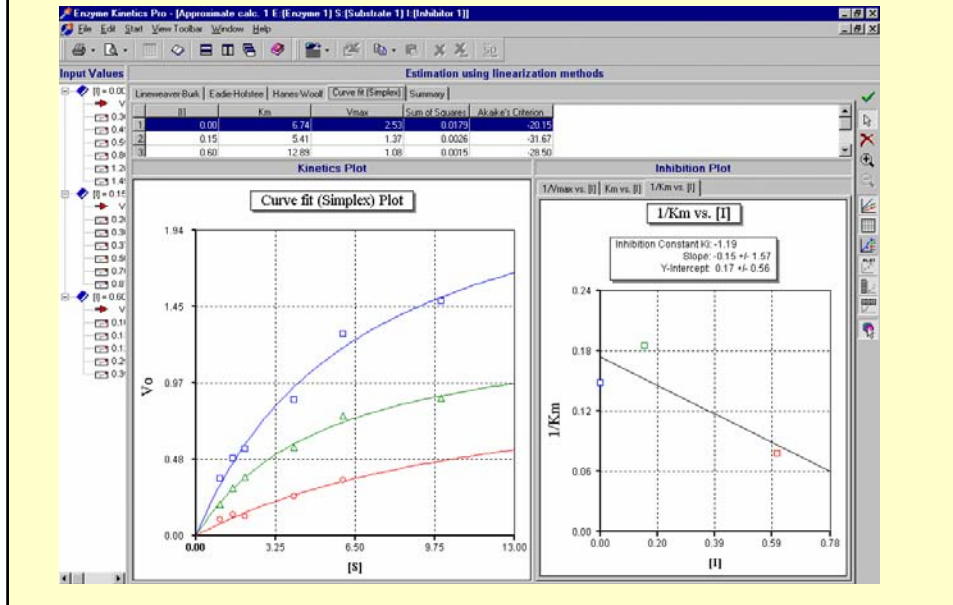
program konstanty určí, pod Windows, na bázi skriptů  
 akademická licence zdarma

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



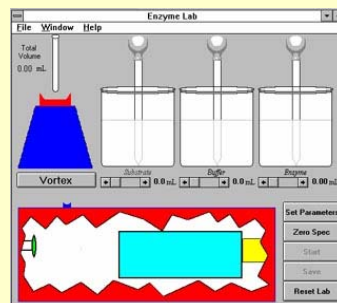
## Enzyme Kinetics!Pro

- <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](http://jchemed.chem.wisc.edu/JCESoft/Issues/Series_D/5D1/prog1-5D1.html)  
"kádinka" s pufrem, enzymem a substrátem, míchadlo a fotometr
- **KINSIM (simulace) a FITSIM (hledání parametrů)**  
<http://www.biochem.wustl.edu/cflab/message.html>



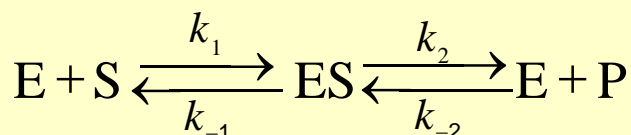
## Srovnání metod

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

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

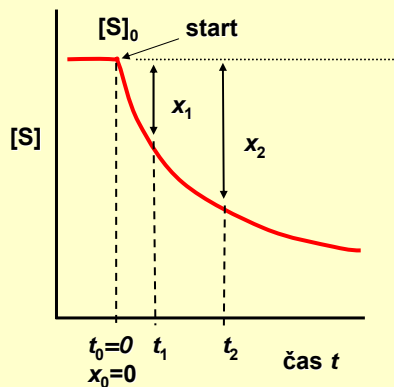
$$K = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = \frac{\bar{V}_{\max} / K_{m,S}}{\bar{V}_{\max} / K_{m,P}} = \frac{k_2 / K_{m,S}}{k_{-2} / K_{m,P}}$$

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

- 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])

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

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

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

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

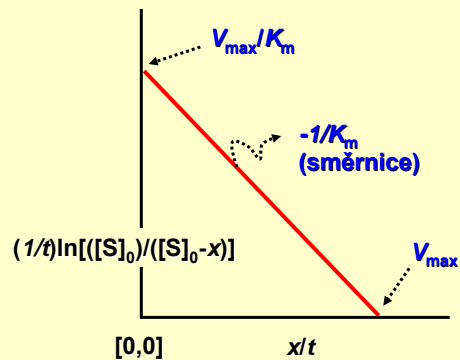
alternativní forma, záměna  $x \approx [P]$

## 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

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

