

## ENZIMKINETIKA

Az enzimek biokatalizátorok, melyek az aktivációs energia csökkentése révén képesek a kémiai reakciók sebességét specifikusan gyorsítani. Az enzimek a termodinamikai egyensúlyt nem változtatják meg, mivel a reverzibilis reakciók sebességét mindkét irányban, azonos mértékben növelik meg.

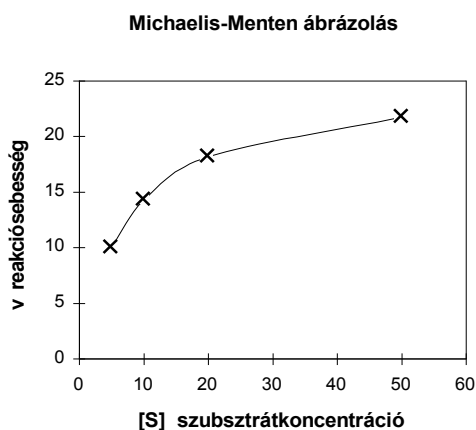
Az enzimreakciók sebességét számos tényező befolyásolja: hőmérséklet, pH, ionerősség, szubsztrátkoncentráció, aktivátorok, inhibitorok, stb.

a./ **Hőmérséklet**növekedés hatására, mint a kémiai reakciók esetében általában, a reakciósebesség nő, amíg a maximális sebességet eléri (hőmérsékleti maximum). A hőmérséklet további növelése fokozza a polipeptidlánc mozgékonyágát, így a molekula szerkezete részben vagy teljesen felbomolhat (hődenaturálás).

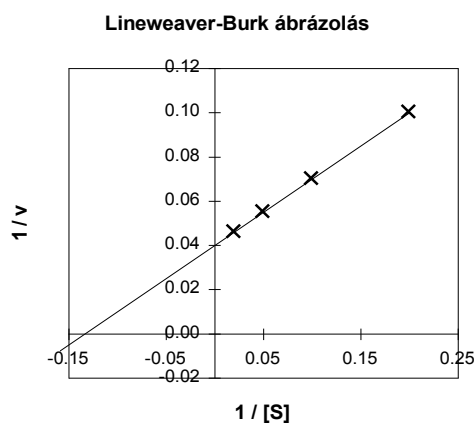
b./ A reakciók **pH**-függése szintén maximumgörbét követ. Az optimális pH-tól való eltérés befolyásolja az oldalláncok disszociációs állapotát, hatással van az enzim funkcióképes konformációjának fenntartására. A pH befolyásolja a szubsztrátok és koenzimek disszociábilis csoportjait is.

A különböző enzimek hőmérséklet és pH optimuma igen tág határok között változik.

c./ A reakciósebesség **szubsztrátkoncentrációtól** való függése derékszögű hiperbolát ír le (1. ábra).



1. ábra. Michaelis-Menten ábrázolás



2. ábra. Lineweaver-Burk ábrázolás

Alacsony szubsztrátkoncentrációk esetén a mért enzimaktivitás lineárisan függ a szubsztrátkoncentrációjától (első rendű reakció). Ezen a szakaszon a  $V_{\max} / K_M$  hányados a reakció sebességi állandója. A hányados a hiperbola érintője nulla szubsztrátkoncentrációnál. Bizonyos szubsztrátkoncentrációk felett az enzim molekulák telítődnek a szubsztráttal, az enzimreakció (nullarendűvé válik) sebessége nem növelhető tovább ( $V_{\max}$ ).

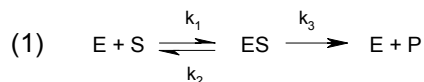
Biológiai minták enzimaktivitásának meghatározása esetén mindig szubsztrátfelesleget alkalmazunk, hogy az összes enzim molekula működését biztosítsuk.

Az enzimek nagy részének működése a klasszikus Michaelis-Menten elmélettel írható le. Ezt **steady-state kinetikának** is nevezik.

Alapfeltételek. A reakció során az [ES] komplex koncentrációja ne változzon. Az [ES] komplex képződése egyensúlyra vezető reakció legyen és az egyensúly gyorsan álljon be. A teljes enzimreakció sebességmeghatározó reakciója az  $ES \rightarrow E + P$  átalakulás legyen. A reakció ne legyen megfordítható. Gyakorlatban, kompromisszummal, elfogadható az erős egyensúlyeltolódás E + P irányába. Csak egy szubsztrát vegyen részt a reakcióban. Több szubsztrátos reakciónál csak egy szubsztrát koncentrációja szabja meg a reakciósebességet, a többi szubsztrát koncentrációjának a reakciósebességre kifejtett hatása elhanyagolhatóan kicsi legyen. Valódi kezdősebességeket mérjünk. Az enzim koncentrációja minden mérésnél azonos legyen és a reakció során ne változzon. Az összes, az enzimreakciókat befolyásoló

tényező, mint puffer összetétele, pH, ionerősség, hőmérséklet a méréssorozaton belül állandó legyen. Mérés során az [S] koncentrációja 4 - 6 százaléknál nagyobb mértékben ne csökkenjen.

Az elmélet lényegét a következő egyenlet írja le (1):



Ebből levezethető a következő (2) összefüggés (lásd bővebben a Sillabuszt):

$$(2) \quad v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (3) \quad \frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

A (2) egyenlet egy hiperbola  $\underline{x}$  (független változó) és  $\underline{y}$  (függő változó) összefüggését írja le ( $x = [S]$ , és  $y = v$ ). Enzimkinetikai vizsgálatoknál cél az egyenlet két állandójának,  $V_{\max}$ -nak és  $K_M$ -nek meghatározása. Háromnál több, különböző szubsztrátkoncentrációt alkalmazva, mérjük a reakciósebességet. Célszerűen akkor járunk el, ha a mérőpontok a hiperbola középső szakaszára esnek. Ezt előkísérletekkel lehet megállapítani. Kis szubsztrátkoncentrációknál, mivel a reakcióban a szubsztrátnak csak kis részét használhatjuk el, és mérési módszerünk érzékenységtől függően, a hiperbola elején nincsenek mérőpontok. A szubsztráttelítés tartományában szintén hiányoznak a mérőpontok, mert az alkalmazható szubsztrátkoncentrációnak határt szab annak oldhatósága, a szubsztrátgátlás, stb. A  $K_M$  és  $V_{\max}$  értékét tehát a hiperbola középső, csonka szakaszából kell meghatározni. A Michaelis-Menten egyenlet felállításának idejében (1913) a hiperbola állandóinak közvetlen meghatározása nem volt lehetséges. A probléma megoldására a hiperbola egyenletének transzformálását alkalmazták. Ezzel az összefüggés lineáris lett, melyből a két konstans grafikusan vagy egyszerű számítással megállapítható. Ilyen transzformálások pl.: az Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf, Scatchard megoldások. Legismertebb transzformált forma a Lineweaver-Burk kettős reciprok egyenlet (3), illetve ábrázolás (2. ábra). Ebben a szubsztrátkoncentráció reciprokának függvényében ( $1/[S]$  az x-tengelyen) a reakciósebesség reciprokát ( $1/v$  az y-tengelyen) ábrázoljuk. A mérőpontok közé egyenest illesztve és az y-tengely felé meghosszabbítva (grafikus extrapolálás) az metszi az y-tengelyt majd az x-tengelyt. Az y-tengely metszete  $1/V_{\max}$  értékét adja, az x-tengely metszete pedig  $-1/K_M$  értékét. A (3) egyenlet egy  $y = ax + b$  egyenes egyenlete, melyben:  $y = 1/v$ ,  $a = K_M / V_{\max}$ ,  $x = 1/[S]$  és  $b = 1/V_{\max}$ .

Ma már, a mérési adatokból  $V_{\max}$  és  $K_M$  számítását, a számítógépek birtokában, alkalmas algoritmusok (Levenberg és Marquardt, simplex-módszer) felhasználásával, iterációs programmal végezzük. Ezzel a mérési hibák megfelelő statisztikai kezelésének is eleget teszünk.

Számítási példához szolgáljanak a következő adatok:

[S] mmol / ℓ	v μmol/ℓ/min	1 / [S] 1/(mmol/ℓ)	1 / v 1/(mmol/ℓ/min)
5	10.0	0.20	0.100
10	14.3	0.10	0.070
20	18.2	0.05	0.055
50	21.7	0.02	0.046

A 2. ábra szerint vagy számítógéppel megoldva a feladatot  $V_{\max}$  értékének  $25 \mu\text{mol} / \ell / \text{min}$ -ot,  $K_M$ -nek  $7.5 \text{ mmol} / \ell$ -t kaptunk. A paraméterek a mérésnél használt egységeket veszik fel.

Az egyenletekben szereplő  $K_M$  és  $V_{\max}$  a következőképpen definiálható:

A  $K_M$  a maximális reakciósebesség feléhez tartozó szubsztrátkoncentráció; jellemzi az enzim szubsztrát iránti affinitását. Másként fogalmazva, bizonyos megkötésekkel: az a szubsztrátkoncentráció melynél az enzim kötőhelyeinek fele szubsztráttal van telítve. Kis  $K_M$  érték nagy enzim – szubsztrát affinitást jelent.  $K_M$  értéke független az enzim koncentrációjától. Egysége:  $\text{mol} \times \ell^{-1}$ .

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

A  $k_1$  sebességi állandó másodrendű reakció sebességi állandója, egysége:  $\text{mol}^{-1} \times \ell \times \text{min}^{-1}$ . A  $k_2$  sebességi állandó egy elsőrendű reakció sebességi állandója, egysége:  $\text{min}^{-1}$ . A  $k_3$  sebességi állandó a fent

vázolt feltételek (egyensúlyeltolódás E + P irányába) esetében pszeudo-elsőrendű reakció sebességi állandója, egysége:  $\text{min}^{-1}$ .

A  $V_{\text{max}}$  az adott enzimkoncentráció mellett, az enzim telítése esetén, elérhető maximális reakciósebesség.  $V_{\text{max}}$  értékét a hiperbola aszimptotikusan közelíti meg.  $K_M$ -mel azonos szubsztrátkoncentrációnál az enzimreakció sebessége  $V_{\text{max}}$ -nak 50 %-a,  $2K_M$  koncentrációnál 66.6 %,  $3K_M$ -nél 75 %,  $10K_M$ -nél 90.91 %,  $100K_M$ -nél 99.009 %. A telítés annyit jelent, hogy az enzim teljes mennyisége ES komplex-szé alakult. Tehát a maximális sebesség csak a jelenlevő enzim mennyiségétől függ. A reakciósebesség egysége lehet bármely érték időegységnyi változása vagy általában:  $\text{mol} \times \ell^{-1} \times \text{min}^{-1}$ .

Az enzimműködés fontos jellemzője továbbá a **kcat**, mely a legtöbb enzimreakcióban megegyezik a  $k_3$ -mal. Ez a szubsztráttelítés esetén tapasztalható maximális sebességi állandó, más néven átviteli szám.

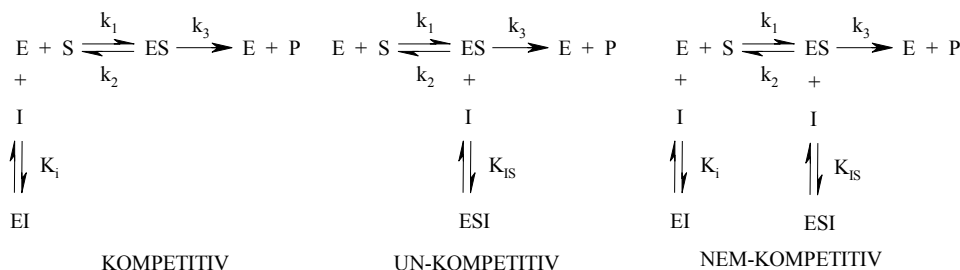
## ENZIMGÁTLÁSOK

### 1. Irreverzibilis gátlás

Az enzim egy vagy több funkciós csoportjának kovalens módosítása. Az inhibitor dialízissel vagy szubsztrát adásával nem távolítható el. (pl. SH- csoport jód-acetáttal történő karboximetilálása, szeril oldallánc OH-csoportjának reakciója diizopropil-fluoro-foszfáttal).

### 2. Reverzibilis gátlás

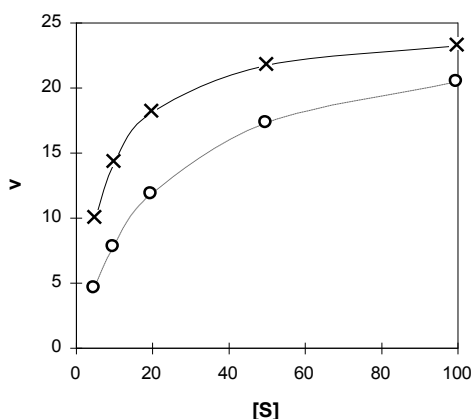
Az inhibitor reverzibilisen kötődik az enzimhez vagy a működéséhez szükséges kofaktorhoz (pl. a fémjéhez kötött fémionhoz). Az enzim és inhibitor között kialakuló kapcsolat nem kovalens. Típusai: kompetitív, nem kompetitív, un-kompetitív, kevert típusú gátlás.



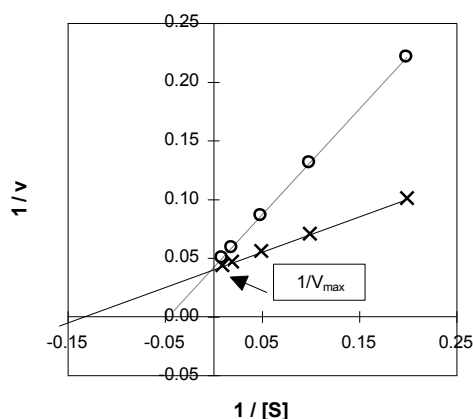
- Az enzim - szubsztrát, illetve enzim - inhibitor komplexek kialakulásának lehetőségei kompetitív, nem kompetitív és a gyakorlatokon nem tárgyalt un-kompetitív enzimgátlások esetében. Kompetitív gátlásnál a gátlószer csak az enzimmel kapcsolódik reverzibilisen (a szubsztráthoz hasonlóan). Un-kompetitív gátlásnál a gátlószer reverzibilis kapcsolódása az enzim-szubsztrát komplex-szel jön létre. Nem kompetitív gátlásnál a gátlószer az enzimhez és az ES-komplexhez is kapcsolódhat, eltérő affinitással. A nem kompetitív gátlástípus tárgyalásánál, a számítások egyszerűsítése céljából, a két affinitást azonosnak vesszük ( $K_i = K_{IS}$ ).

#### a./ Kompetitív gátlás

Az inhibitor rendszerint a szubsztráthoz hasonló szerkezetű, verseng azzal az enzim aktív centrumához való kötődésben. Megfelelően magas szubsztrátkoncentráció alkalmazásával az inhibitor teljesen leszorítható az enzimről, így a maximális reakciósebesség elérhető;  $K_M$  nő,  $V_{\text{max}}$  változatlan (3. és 4. ábra).



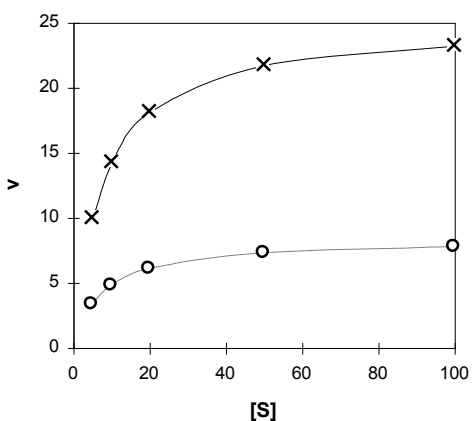
3. ábra. Kompetitív gátlás  
Michaelis-Menten ábrázolása



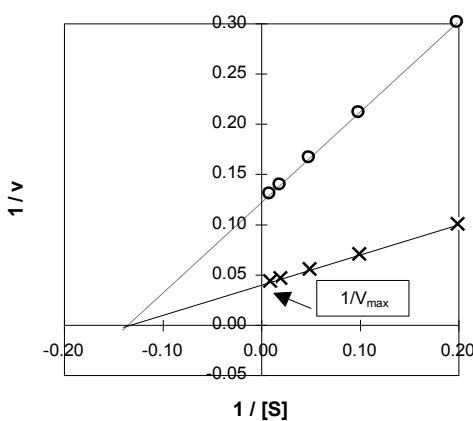
4. ábra. Kompetitív gátlás  
Lineweaver-Burk ábrázolása

A 3. - 8. ábráig a görbék paramétereit:  $K_M = 7.5 \text{ mmol} / \ell$ ,  $V_{\max} = 25 \mu\text{mol} / \ell / \text{min}$ ,  $[I] = 5 \text{ mmol} / \ell$  és  $K_i = 2.5 \text{ mmol} / \ell$ .

## b./ Nem kompetitív gátlás



5. ábra. Nem kompetitív gátlás  
Michaelis-Menten ábrázolása



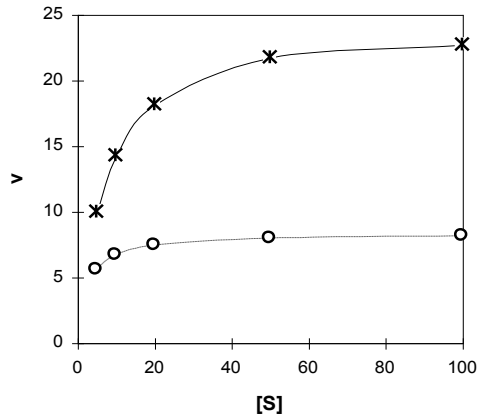
6. ábra. Nem kompetitív gátlás  
Lineweaver-Burk ábrázolása

A nem kompetitív inhibitorok feltehetően nem az aktív centrumhoz kötődnek, így a szubsztrát kapcsolódását nem közvetlenül akadályozzák, az enzim szubsztráthoz való affinitása nem változik meg;  $K_M$  változatlan. Az enzim katalitikus működése azonban más mechanizmusok szerint gátlódik;  $V_{\max}$  csökken (5. és 6. ábra) [pl. az enzim működéséhez szükséges fémionok (pl.  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) megkötése komplex-képzőkkel (EDTA, EGTA, NaF)].

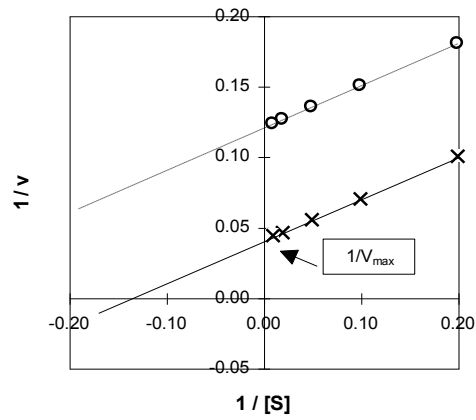
## c./ Un-kompetitív gátlás

A nem kompetitív gátláshoz hasonlóan az un-kompetitív gátlás is ritka az egyszubsztrátos enzimreakciók között, de többszubsztrátos reakciónál gyakran észlelhető. Un-kompetitív gátlásnál a  $K_M$  nő, a  $V_{\max}$  értéke csökken (7. és 8. ábra). A gátlást leíró modell feltételezi, hogy a gátlószer csak az ES komplex-szel lép kapcsolatba és átmenetileg az ESI hármas komplex keletkezik. Un-kompetitív gátlásra iskolapélda az arilszulfatáz vagy néhány dehidrogenáz gátlása cianiddal vagy hidrazinnal. Közös jellemzői ezeknek a gátlószereknek, hogy jó nukleofil jellegű molekulák. A nukleofil reaktáns

elektronokban gazdag atomcsoport és elektronpár leadására hajlamos: a reakciókban Brønsted bázisként viselkedik.



7. ábra. Un-kompetitív gátlás  
Michaelis-Menten ábrázolása



8. ábra. Un-kompetitív gátlás  
Lineweaver-Burk ábrázolása

Az enzim és inhibitor kapcsolódásakor kialakuló EI komplex stabilitását, az inhibitor hatékonyságát a  $K_i$  inhibitor állandóval jellemezhetjük. Ennek meghatározása történhet grafikus úton, pl. Dixon szerint, ahol a reakció sebességének reciprokát ábrázoljuk az inhibitor koncentráció függvényében, különböző szubsztrátkoncentrációk mellett. A gyakorlatokon általában nincs lehetőség a grafikon megrajzolásához szükséges számos mérési pont felvételére, ezért egyetlen mérési pont alapján a megfelelő egyenlet segítségével számítjuk az inhibíciós állandót:

Kompetitív gátlás:

$$K_i = \frac{[I] \cdot v' \cdot K_M}{(v - v')(K_M + [S])}$$

Nem kompetitív gátlás:

$$K_I = K_{IS} = \frac{[I] \cdot v'}{(v - v')}$$

A gátlószer jelenlétében mért reakciósebesség mindig kisebb a gátlószer nélkül mért reakció sebességénél. A Lineweaver-Burk ábrázolásnál ez a szerkesztett egyeneseknek az alapegyenestől való eltéréseben jelenik meg. Az eltérés jellegét a gátlás típusa határozza meg (lásd 4., 6. és 8. ábra). Mértékét az inhibitor koncentráció ( $[I]$ ) és az inhibitorállandó ( $K_i$ ) a következő egyenlet szerint változtatja:

$$\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Ezzel a kifejezéssel a Lineweaver-Burk egyenlet különböző tagjai kiegészülnek. Kompetitív gátlásnál az iránytangens változik,  $1/V_{\max}$  értéke változatlan (4. ábra). A Lineweaver-Burk egyenletben a  $K_M/V_{\max}$  tagot kell  $1 + [I]/K_i$  értékével megszorozni:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

A nem kompetitív gátlásnál, ahol a gátolt reakció egyenesének meredeksége és  $1/V_{\max}$  nő,  $K_M$  változatlan (6. ábra), a Lineweaver-Burk egyenlet mindkét tagja bővül:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Un-kompetitív gátlásnál az egyenes meredeksége változatlan,  $1/V_{\max}$  és  $-1/K_M$  értéke nő (8. ábra). A Lineweaver-Burk egyenletben az  $1/V_{\max}$  tagot kell szorozni  $1 + [I]/K_i$  értékével.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$