

Osnove biokemije Enzimska kinetika

Boris Mildner

Kinetika proučava brzine reakcija

Za reakciju:



Brzina reakcije v je:

$$v = -d[A]/dt = d[P]/dt \quad (1)$$

pri čemu d označava smanjenje koncentracije supstrata, odnosno povećanje koncentracije produkta u jedinici vremena.

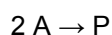
Brzina reakcije jednaka je umnošku koncentracije A i konstante proporcionalnosti k , koju nazivamo **konstantom brzine**.

$$v = k[A] \quad (2)$$

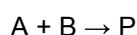
Reakcije kod kojih je brzina direktno proporcionalna koncentraciji reaktanta nazivaju se **reakcije prvog reda**. Konstantama brzina reakcija prvog reda jedinica je s^{-1} .

Kinetika proučava brzine reakcija

Mnoge biokemijske reakcije uključuju dva reaktanta i ove reakcije nazivamo reakcijama drugog reda. Primjeri ovih reakcija su:



ili



Ove reakcije nazivamo bimolekularnim reakcijama, a brzine reakcija izražavaju se kao:

$$v = k[A]^2 \quad (3)$$

odnosno

$$v = k[A][B] \quad (4)$$

Konstante brzina, koje se nazivaju konstantama brzina drugog reda, imaju jedinice $M^{-1} s^{-1}$ odnosno $dm^3 mol^{-1} s^{-1}$.

Kinetika proučava brzine reakcija

Ponekad reakcije drugog reda izgledaju prividno kao reakcije prvog reda. Ako je na primjer za reakciju:

$A + B \rightarrow P$ (pri čemu je $v = k[A][B]$), koncentracija B daleko veća od koncentracije A, reakcija će biti prvog reda u odnosu na A i neće ovisiti o koncentraciji B. Ovakve reakcije nazivamo reakcijama **pseudo-prvog reda**.

U određenim uvjetima reakcija može biti **nultog reda**. U tom slučaju brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji reaktanta (supstrata).

Reakcije katalizirane enzimima u određenim uvjetima mogu biti reakcije nultog reda.

Kinetika enzima

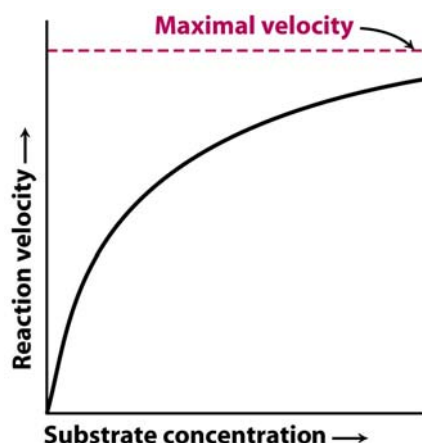


Figure 8-4
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Dijagram prikazuje brzinu reakcije v_0 , koja je definirana kao broj molova produkta koji nastaju u sekundi, u odnosu na koncentraciju supstrata. Reakciju katalizira konstantna koncentracija enzima.

Može se uočiti da je enzimom katalizirana reakcija na početku gotovo linearna a povećanjem koncentracije supstrata gotovo dostiže maksimalnu brzinu reakcije – kada reakcija gotovo dostigne maksimalnu brzinu reakcija je onda pseudo nultog reda, tj. ne ovisi o koncentraciji supstrata.

Kinetika enzimskih reakcija



Pri čemu:

k_1 je konstanta brzine nastajanja enzim supstrat kompleksa (ES)

k_2 je konstanta brzine nastajanja produkta (P)

k_{-1} i k_2 su konstante reverzibilnih reakcija

3 faze enzimske reakcije:

1. Predustaljeno stanje:

raste koncentracija ES

2. Ustaljeno stanje:

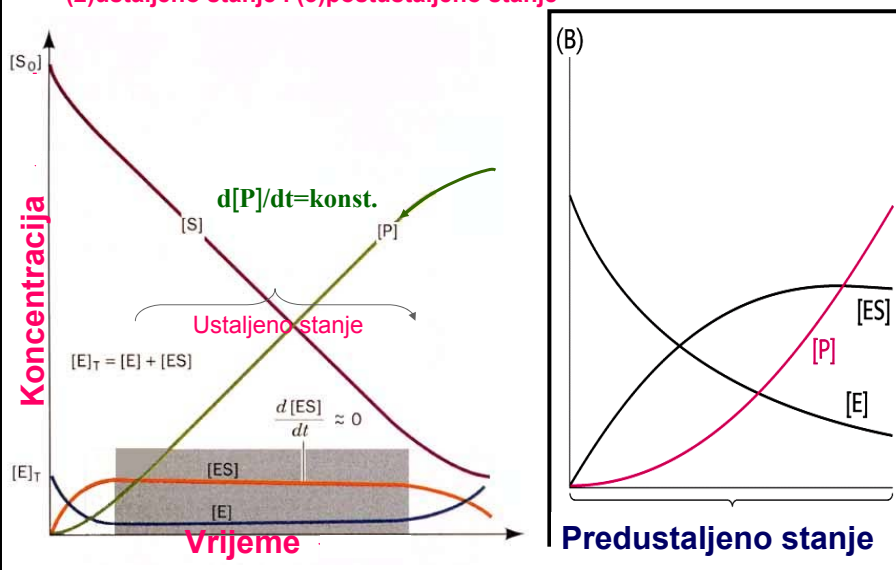
konstantna koncentracija ES

3. Post-ustaljeno stanje:

opada koncentracija ES

Vremenski tijek enzimske reakcije

Reakcija teče u tri faze do uspostavljanja ravnoteže: (1) predustaljeno, (2) ustaljeno stanje i (3) postustaljeno stanje

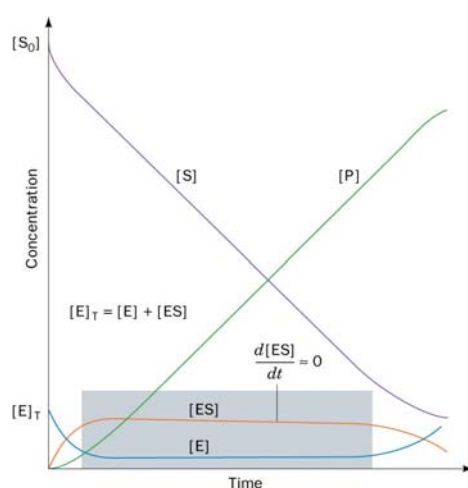


Supstrat (S) se može prevesti u produkt (P) samo ako dođe u funkcionalni dodir s enzimom (E), stvorivši kompleks enzim-supstrat (ES):



Reakcija ubrzo dostiže ustaljeno stanje gdje je koncentracija [ES] kompleksa gotovo konstantna. Početna brzina reakcije uglavnom odražava ustaljeno stanje i analizu početnih brzina reakcija nazivamo kinetikom ustaljenog stanja. U ovom pojednostavljenom modelu (Michalis-Menten) brzina razgradnje produkta je zanemariva, odnosno $v = k_2[P] = 0$.

Ustaljeno stanje



Za reakciju $S \rightleftharpoons P$
početne brzine enzimom katalizirane reakcije, v_0 , su tangente krivulja u vrijeme $t = 0$. Brzina reakcije, kod jednake koncentracije supstrata, se smanjuje tijekom vremena, kako se što više supstrata pretvara u produkt.

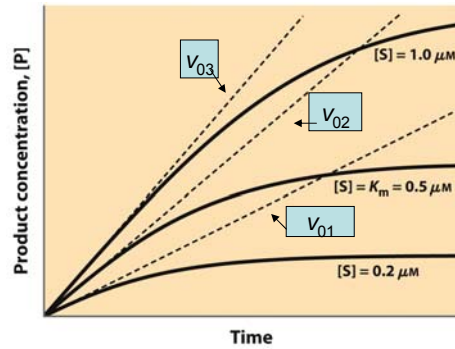


Figure 6-10
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Dijagram prikazuje da je količina nastalog produkta funkcija vremena. Početna brzina reakcije, v_0 , za svaku koncentraciju supstrata određena je nagibom krivulje na početku reakcije kada je reverzibilna reakcija beznačajna. Prikazane v_0 su brzine koje se postižu kod prikazanih koncentracija supstrata ($0,2 - 1,0 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

Utjecaj supstrata na početnu brzinu, v_0 , enzimom katalizirane reakcije. Ovdje se pretpostavlja da je koncentracija enzima konstantna tijekom cijelog toka reakcije.

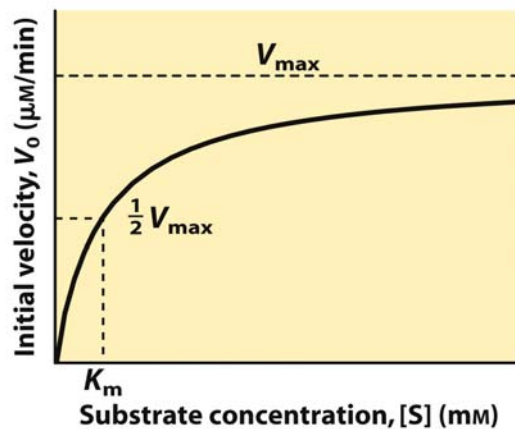


Figure 6-11
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

V_m se približava asimptoti. Michaelisova konstanta K_M jednaka je koncentraciji supstrata pri kojoj se postiže $V_m/2$.

Kinetika enzimskih reakcija u ustaljenom stanju

Model Michaelis-Menten



$$[E]_{\text{ukupni}} = [ES] + [E]_{\text{slobodni}}$$

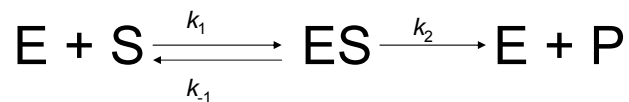
Na početku reakcije: $k_2 [P] = 0$

Uvjeti ustaljenog stanja

$$[ES] = \text{const.}$$

$$[S] \cong \text{const.} \gg [E]$$

$$[P] \cong 0$$



U uvjetima kad se može zanemariti povratna reakcija, početna brzina nastajanja produkta proporcionalna je koncentraciji kompleksa ES:

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2 [ES]$$

Početna brzina katalitičke reakcije $v_0 = k_2 [ES]$
ujedno je i brzina katalizirane reakcije



Ukupna brzina nastanka ES kompleksa jednaka je razlici brzina reakcija u kojima ES kompleks nastaje (asocira) i brzina reakcija u kojima nestaje (disocira):

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

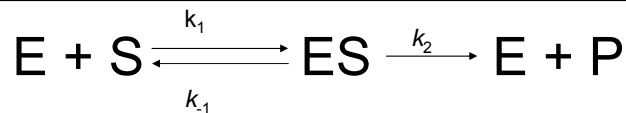
Briggs-Haldane pretpostavka:

koncentracija enzim-supstrat kompleksa (Michaelisov kompleks) u ustaljenom stanju je konstantna, odnosno

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

stoga je:

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



Ukupna koncentracija enzima:

$$[E_T] = [E] + [ES] \text{ ili } [E] = [E_T] - [ES]$$

ako se izraz za $[E]$ uvrsti u jednadžbu

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

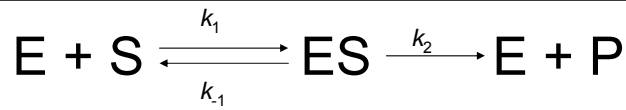
dobivamo:

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

$$\text{Michaelisova konstanta je: } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Ako u gornju jednadžbu uvrstimo Michaelisovu konstantu, K_M , i izrazimo $[ES]$, dobivamo:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]}$$



Ako izraz za [ES], tj. $[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]}$ uvrstimo u jednadžbu:

$v_o = k_2 [ES]$, dobivamo:

$$v_o = k_2 [E_T] \times \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Budući da je maksimalna brzina V_m : $V_m = k_2 [E_T]$, dobivamo:

$$v_o = V_m \frac{[S]}{K_M + [S]}$$



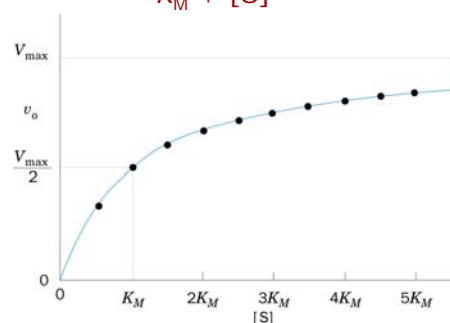
$$v_o = \frac{V_m[S]}{K_M + [S]}$$

K_M označava koncentraciju supstrata pri kojoj brzina reakcije iznosi polovinu maksimalne brzine reakcije

Za $v_o = V_m/2$, $[S] = K_M$

K_M je važna karakteristika enzimske reakcije i značajna je za biološke funkcije.

Određivanje V_m i K_M je često jedna od prvih određenih karakteristika nekog enzima.



Jednadžba opisuje pravokutnu hiperbolu s asimptotama u $[S] = -K_M$ i $v_o = V_m$

Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata

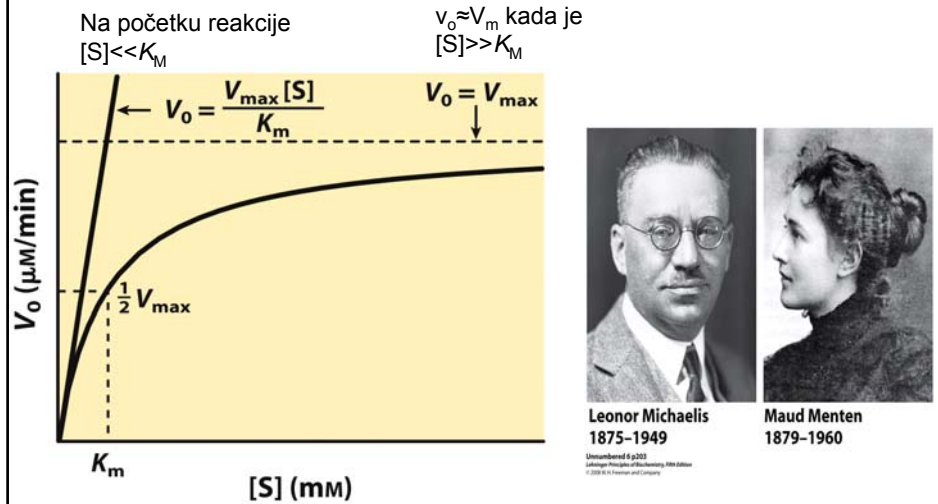


Figure 6-12
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

K_M , Michaelisova konstanta jedinstvena je vrijednost za svaki enzim i ne ovisi o koncentraciji enzima.



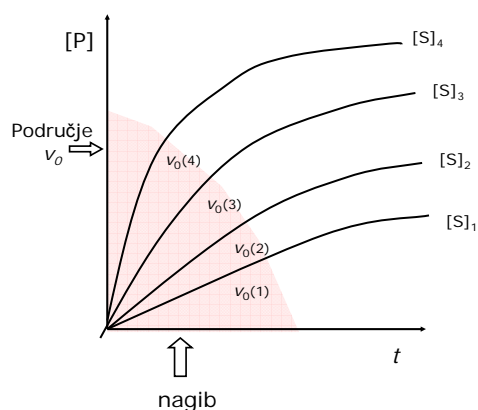
Model pretpostavlja mjerenje početne brzine enzimske reakcije (v_0) pod uvjetima kada se povratna reakcija može zanemariti zbog toga što je: $[P] = 0$ (početak reakcije) i/ili $k_{-1} \ll k_2$

$$V_0 = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]}$$

$[S]$ je nezavisna varijabla, koju mijenjamo po volji
 v_0 je zavisna varijabla, koju mjerimo
 V_m i K_M su parametri modela

Praćenje reakcije

- Određivanje vremenskog raspona u kojem je prirast koncentracije produkta [P] linearan; u tom su rasponu ispunjeni uvjeti modela Michaelis-Menten.
- Početne brzine se za svaku reakcijsku smjesu očitavaju kao nagib u linearnom dijelu krivulje.
- Svakoj koncentraciji [S] pridružena je njoj pripadajuća početna brzina reakcije v_0 .



Matematičke transformacije Michaelis-Mentenove jednadžbe omogućavaju nam određivanje K_M i V_m

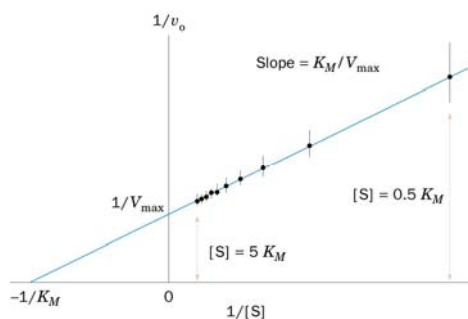
Lineweaver-Burk:

najpoznatija, ali ne i najbolja:

$$v_0 = \frac{V_m[S]}{K_M + [S]} \quad / \quad -1$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Ova jednadžba nam omogućava eksperimentalno određivanje V_m i K_M .



Vrijednosti K_M važne su karakteristike enzima

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

Table 6-6
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Vrijednosti K_M važne su karakteristike enzima

- Enzimi imaju vrlo različite K_M vrijednosti
- K_M nekog enzima ovisi o supstratu, uvjetima okoliša (pH, temperatura, ionska jakost)
- K_M je mjera koncentracije supstrata koja je potrebna da se provede pretvorba znatne količine supstrata.
- Za mnoge enzime postoje dokazi da vrijednosti K_M ukazuju na fiziološke koncentracije supstrata.
- Kod koncentracija supstrata koje su manje od K_M , enzimi su vrlo osjetljivi na promjene u koncentracijama supstrata ali imaju malu aktivnost.
- Kod koncentracija supstrata koje su veće od K_M enzimi imaju veliku katalitičku aktivnost ali su neosjetljivi na promjene u koncentraciji supstrata.

Vrijednosti K_M i V_m važne su karakteristike enzima

- V_m nam omogućava određivanje obrtnog broja (prometni broj) enzima.
- **Obrtni broj, k_{cat} , je broj molekula supstrata koje enzim može pretvoriti u produkt u jedinici vremena kada je enzim u potpunosti zasićen supstratom. Obrtni broj, $k_{cat} = k_2$.**

Kada je ukupna koncentracija aktivnih mjesta $[E_T]$, tada je:

$$V_m = k_2 [E_T]$$

$$k_{cat} = k_2 = V_m/[E_T]$$

Primjeri vrijednosti k_{cat} (obrotni broj)

Enzim	k_{cat} (sec^{-1})
Katalaza	40,000,000
Karbonska anhidraza	1,000,000
Acetilkolinesteraza	14,000
Penicilinaza	2,000
Laktat-dehidrogenaza	1,000
Kimotripsin	100
DNA-polimeraza	15
Lisozim	0.5

k_{cat}/K_M je mjera efikasnosti katalize

U stanicama, većina enzima nije zasićena supstratima, te u fiziološkim koncentracijama supstrata brzina enzimске reakcije iznosi 10 – 50% V_m .

Za $[S] \ll K_M$


$$v_0 = \frac{k_{cat} [E_T] [S]}{K_M + [S]} \approx \frac{k_{cat} [E_T] [S]}{K_M}$$

Kada je $[S] \ll K_M$ brzina enzimске reakcije ovisi o vrijednostima k_{cat}/K_M [S] i $[E_T]$. **U ovim uvjetima k_{cat}/K_M je konstanta brzine interakcije između S i E.**

Konstanta brzine k_{cat}/K_M je mjera katalitičke efikasnosti jer uzima u obzir i brzinu katalize s određenim supstratom (k_{cat}) kao i mjeru (snagu) interakcije enzima sa supstratom (K_M).

k_{cat}/K_M je mjera efikasnosti katalize

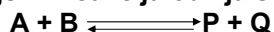
TABLE 8.6 Substrate preferences of chymotrypsin

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Glycine	—H	1.3×10^{-1}
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	—CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.6×10^2
Norleucine	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.0×10^3
Phenylalanine	—CH ₂ — 	1.0×10^5

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 7.3.

Table 8-6
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

Većina se biokemijskih reakcija odvija s nekoliko supstrata



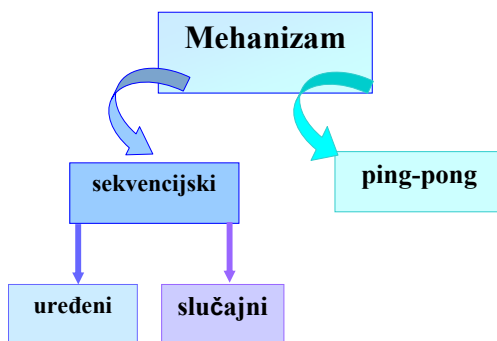
NAZIVLJE VIŠESUPSTRATNIH REAKCIJA

Uni, bi, ter, kvad,

označava broj kinetički važnih molekula (supstrata i produkata).

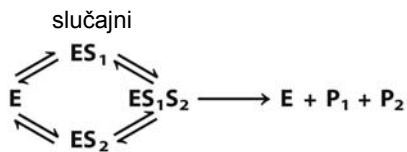
Naziv ističe red polazne i povratne reakcije:

bibi	2S i 2P
unibi	1S i 2P
terbi	3S i 2P



Za provođenje većine biokemijskih reakcija potrebno je nekoliko supstrata

(a) Sekvencijski mehanizmi nastajanja ternarnog kompleksa



(b) Ping-pong mehanizam (produkt odlazi iz kompleksa prije nego što se vezao drugi supstrat) te ne nastaje ternarni kompleks

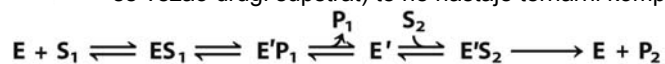
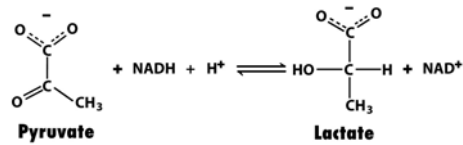
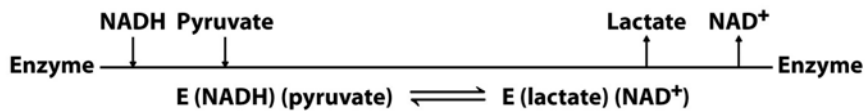


Figure 6-13
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Sekvencijska reakcija



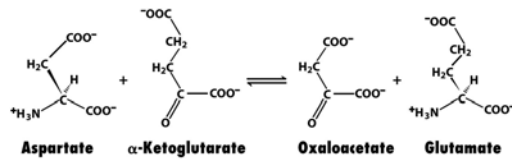
Unnumbered figure pg 223a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company



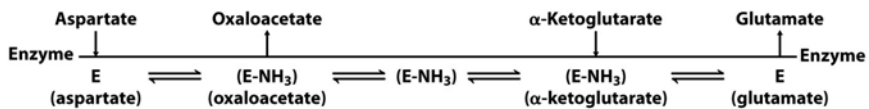
Unnumbered figure pg 223b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Clelandov prikaz bisupstratne sekvencijske reakcije. Prvi supstrat (NADH) veže se na enzim, a nakon toga se veže drugi supstrat (piruvat) te nastaje ternarni kompleks između dva supstrata i enzima. Nakon što je nastao ternarni kompleks dolazi do katalize pri čemu nastaje ternarni kompleks između dva produkta (laktata i NAD⁺) i enzima. S enzima, produkti obično disociraju u slijedu.

Reakcija dvostruke zamjene, ping-pong



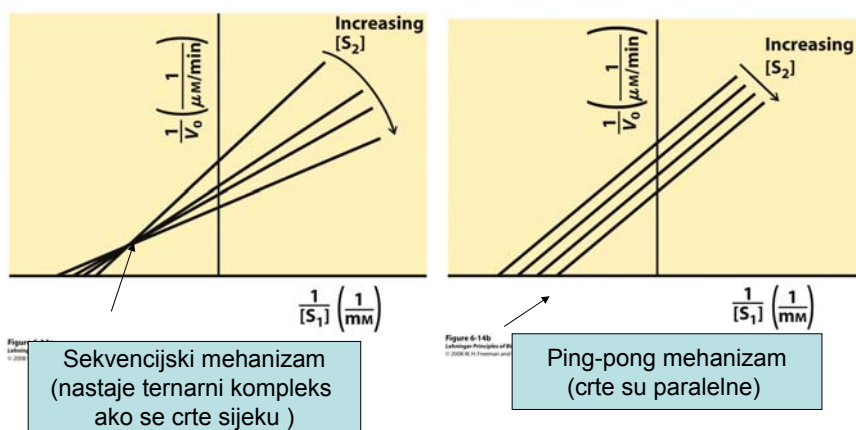
Unnumbered figure pg 224c
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company



Unnumbered figure pg 224d
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Clelandov prikaz ping-pong odnosno reakcije dvostruke zamjene. Prvi supstrat (aspartat) veže se na enzim te dolazi do prve katalitičke reakcije te nastaje na enzim vezana amino skupina (E-NH₃), a prvi produkt (oksaloacetat) disocira s enzima. Na aktivirani enzim se nakon toga veže drugi supstrat (α-ketoglutarat) na kojeg se, u drugoj enzimskoj reakciji, prenosi amino skupina te nastaje glutamat koji disocira s enzima.

Linewear-Burkov prikaz bisupstratnih reakcija u ustaljenom stanju.

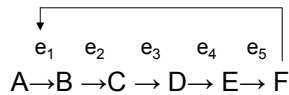


Alosterički enzimi su katalizatori a ujedno i regulacijski enzimi (“senzori metabolizma”)

- Alosterički enzimi važna su skupina enzima čija se katalitička aktivnost može regulirati. Oni reguliraju protok metabolita u metaboličkim putovima.
- Ovi enzimi **ne** podliježu Michaelis-Menteninoj kinetici i imaju višestruka aktivna mjesta.
- Aktivna mjesta alosteričkih enzima djeluju kooperativno što se može uočiti iz sigmoidnog oblika krivulje brzine reakcije u ovisnosti o koncentraciji supstrata.
- Regulacijski alosterički modulatori mogu ili stimulirati ili inhibirati enzimsku aktivnost.

Regulatorni alosterički enzimi – reguliraju svoju aktivnost pomoću produkata koji nastaju tim putem

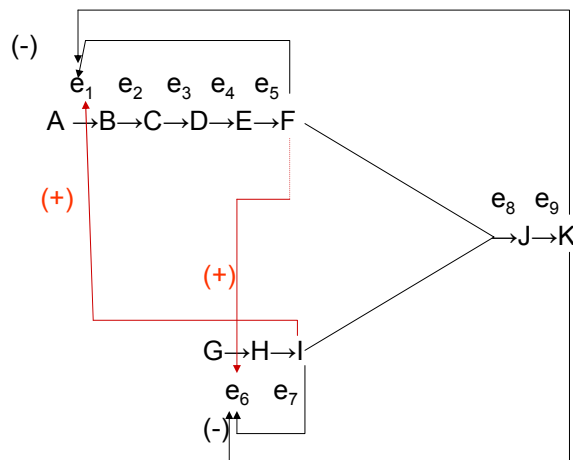
Enzimi u metaboličkom putu ubrzavaju ili inhibiraju svoju katalitičku aktivnost ovisno o specifičnom podražaju, odnosno vezanjem pojedinog produkta metaboličkog puta.



Inhibicija povratnom spregom. Krajnji produkt se veže za prvi enzim puta te inhibira početak (odlučujući korak) metaboličkog puta kojeg katalizira alosterički enzim.

Alosterički enzimi uobičajeno kataliziraju odlučujuće korake nekog metaboličkog puta.

Regulatorni alosterički enzimi – reguliraju svoju aktivnost pomoću produkata koji nastaju tim putem



Suradnja dva metabolička puta kako bi nastao jedan produkt.

Produkt **K**, povratnom spregom inhibira enzime e₁ i e₆, a te enzime povratnom spregom inhibiraju i krajnji produkti, **F** i **I**. Kako bi se reguliralo nastajanje **K**, produkt **F** stimulira enzim e₆, a produkt **I**, stimulira enzim e₁.

Michaelis-Mentenovim modelom ne možemo opisati alosteričke enzime

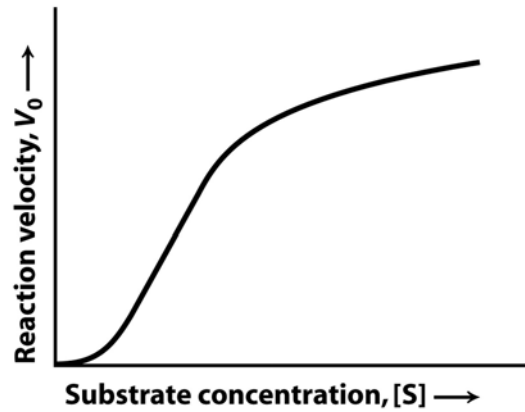


Figure 8-14
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Alosteričke enzime prepoznavamo prema sigmoidnom obliku krivulje.

Regulacijski enzimi podliježu alosteričkoj regulaciji. Alosterički enzimi često su multimeri i alosterički modulator se veže na regulacijsku jedinicu koja kontrolira aktivnost katalitičke podjedinice enzima.

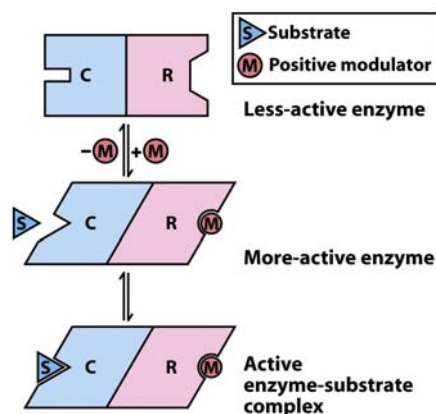


Figure 6-31
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Regulatorni enzimi izgrađeni od nekoliko podjedinica podliježu i kooperativnosti, (T ↔ R prijelazi), te to dodatno objašnjava sigmoidnost krivulja).

Supstrati i modulatori reguliraju ravnotežu između R i T stanja alosteričkih enzima (primjer kinetike aspartat transkarbamoilaze)

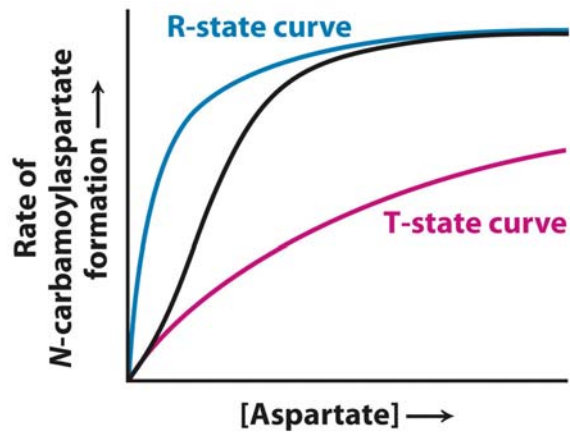


Figure 10-10
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Aspartat transkarbamoilaza je primjer alosteričkog regulacijskog enzima. Tri su regulacijske podjedinice prikazane žutom i crvenom bojom, dok su tri katalitičke podjedinice prikazane plavim i ljubičastim bojama.

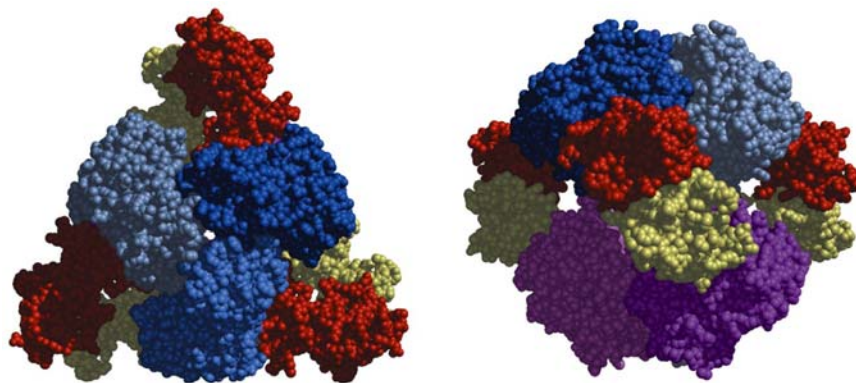


Figure 6-32
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Aspartat transkarbamoilaza katalizira odlučujući korak u biosintezi pirimidinskih baza

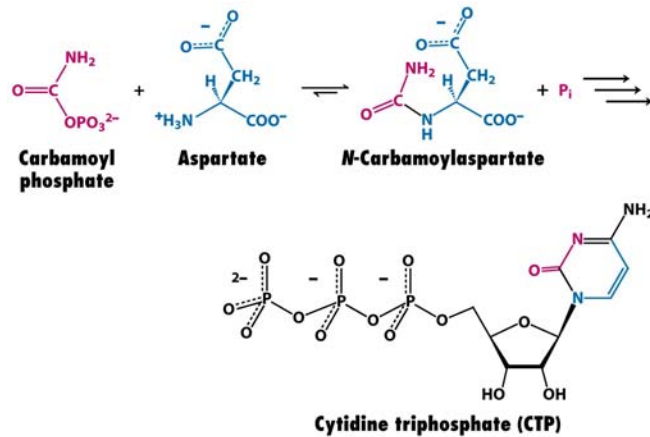


Figure 10-1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Aspartat transkarbamoilaza katalizira odlučujući korak u biosintezi pirimidinskih baza

Utjecaj regulatora na aktivnost alosteričkog enzima

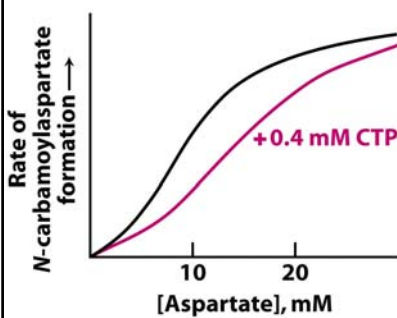


Figure 10-13
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

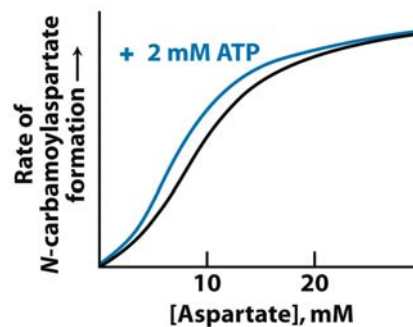
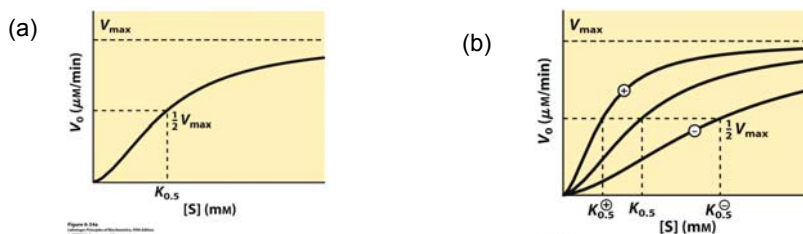


Figure 10-14
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Citidin trifosfat (CTP) stabilizira T stanje aspartat transkarbamoilaze, i u tom stanju enzim otežano veže supstrat a time je i otežan i njegov prijelaz u R stanje pa je krivulja pomaknuta udesno (crvena krivulja). ATP je alosterički aktivator aspartat transkarbamoilaze i on stabilizira R stanje enzima. U R stanju supstrat se lakše veže za enzim i kinetika je brža, a to se opaža pomakom krivulje u lijevo (plava krivulja).

Signalne molekule reguliraju ravnotežu između R i T stanja alosteričkih enzima



Kompleksni odnosi alosteričkih regulatora. U (a) je prikazan utjecaj supstrata, pozitivnog homotropnog modulatora, na odnos aktivnosti i koncentracije supstrata. (b) Utjecaj pozitivnog (+) i negativnog (-) modulatora. U ovom slučaju $K_{0,5}$ se mijenja, a V_m ostaje nepromijenjena. Središnja krivulja prikazuje odnos supstrata i enzimске aktivnosti bez heterotropnog modulatora. (c) Primjer koji se u prirodi ne javlja često gdje heterotropni modulatori mijenjaju V_m , a $K_{0,5}$ ostaje gotovo nepromijenjena.

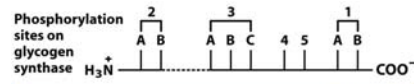
Uobičajeni heterotropni modulatori alosteričkih enzima

TABLE 10.1 Common covalent modifications of protein activity

Modification	Donor molecule	Example of modified protein	Protein function
Phosphorylation	ATP	Glycogen phosphorylase	Glucose homeostasis; energy transduction
Acetylation	Acetyl CoA	Histones	DNA packing; transcription
Myristoylation	Myristoyl CoA	Src	Signal transduction
ADP ribosylation	NAD ⁺	RNA polymerase	Transcription
Farnesylation	Farnesyl pyrophosphate	Ras	Signal transduction
γ -Carboxylation	HCO ₃ ⁻	Thrombin	Blood clotting
Sulfation	3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate	Fibrinogen	Blood-clot formation
Ubiquitination	Ubiquitin	Cyclin	Control of cell cycle

Table 10-1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Jedan regulacijski enzim može se fosforilirati na nekoliko različitih mjesta. Primjer višestrukih regulacijskih fosforilacija glikogen sintaze.



Kinase	Phosphorylation sites	Degree of synthase inactivation
Protein kinase A	1A, 1B, 2, 4	+
Protein kinase G	1A, 1B, 2	+
Protein kinase C	1A	+
Ca ²⁺ /calmodulin kinase	1B, 2	+
Phosphorylase b kinase	2	+
Casein kinase I	At least nine	+ + + +
Casein kinase II	5	0
Glycogen synthase kinase 3	3A, 3B, 3C	+ + +
Glycogen synthase kinase 4	2	+

Figure 6-37
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company