

Jure Stojan

2. predavanje

termodinamične osnove,

encimske katalize

encimska kataliza

časovni potek encimske

reakcije

začetna hitrost

Matjaž Zorko

3. predavanje

vplivi na hitrost encimske

reakcije

vpliv substrata (Michaelisova

kinetika)

ravnotežno - stacionarno

stanje

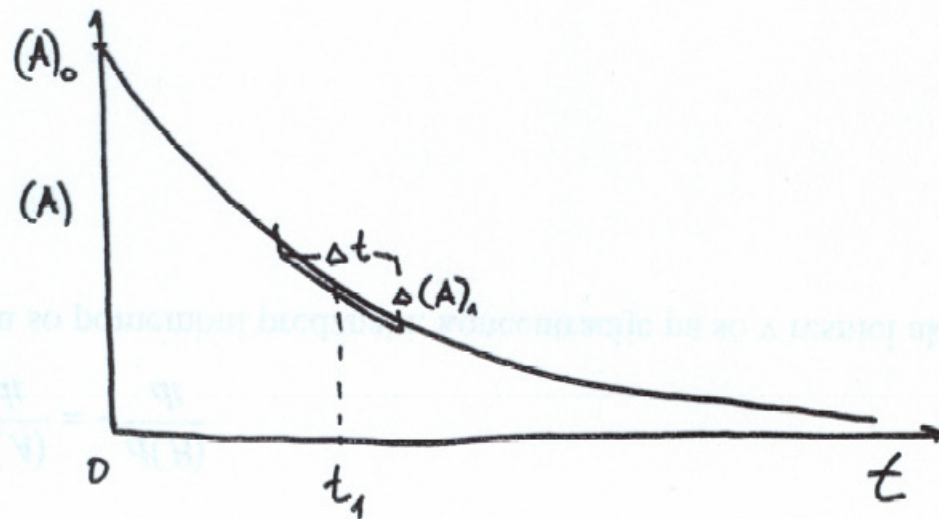
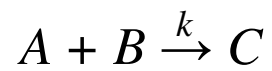
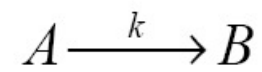
VPLIV:

- koncentracije substrata

- koncentracije encima

- pH

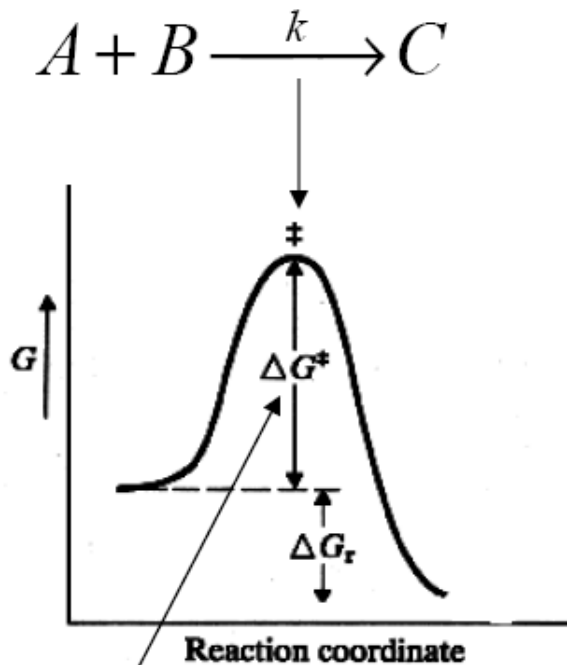
- temperature



V točki t_1 je hitrost $v = - \Delta(A)/\Delta t$. Oblika krivulje in s tem ODVOD, ki je hitrost, je odvisna od konkretne reakcije.

Potek spreminjanja koncentracije produkta (B) je obraten, odvod pa je številčno enak, a z nasprotnim predznakom.

$$v = -\frac{d(A)}{dt} = -\frac{d(B)}{dt} = \frac{d(C)}{dt} = k(A)(B)$$

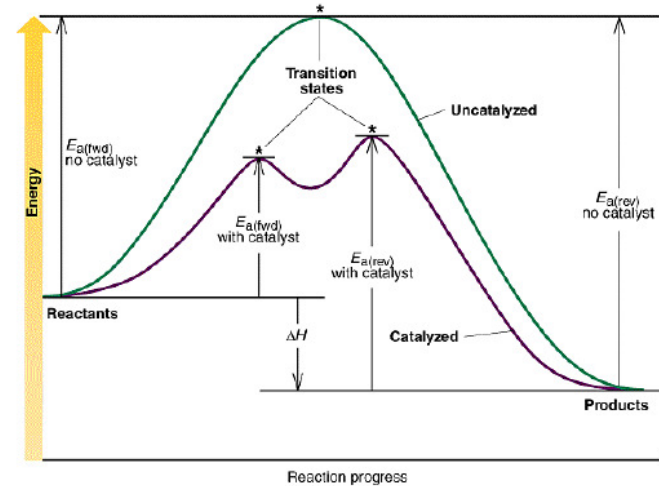


Encimska kataliza

Pri najpreprostejši encimski reakciji predpostavimo le en vmesni produkt (intermediat)



Encim se pojavi na obeh straneh enačbe, zato je neencimska reakcija preprosta; dokaz, da encim ne spremeni ravnotežja

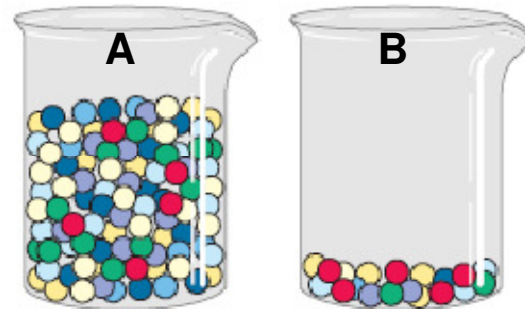


Encim zniža aktivacijsko energijo - dovaja energijo za znižanje; **KAKO ? OD KJE ?**

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT^2}} \quad k = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT^2}}$$

Encimska kinetika

- Obravnava hitrost, s katero se spreminjajo reaktanti (substrati S) v produkte (P):
 $S \rightarrow P$
- Hitrost podaja spremenbo koncentracije substrata/produkta v časovni enoti (mol/s) $V = -d(S)/dt = d(P)/dt$
- Hitrost encimske reakcije je merilo za aktivnost encima; enote za encimsko aktivnost: U = 1 μ mol/min ali katal (SI sistem) = 1mol/s
- Specifična aktivnost encimskega pripravka: aktivnost/mg proteina; enote za specifično aktivnost: μ mol/min/mg ali katal/min/mg



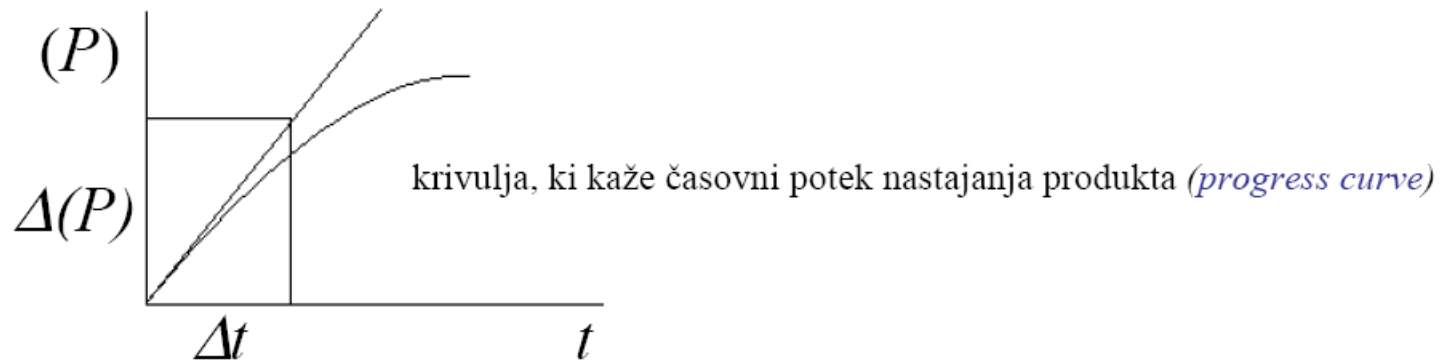
- Masa proteinov (vse kroglice) je večja v čaši A kot v čaši B
- Št. molekul encima (rdeče kroglice) je enako v obeh čašah – encimska aktivnost enaka v obeh čašah
- Encimska aktivnost, izražena na mg proteinov (specifična aktivnost) je večja v čaši B kot v čaši A

Kako določimo - merimo hitrost encimske reakcije ?

Zasledujemo

časovni potek zginetja substrata ali nastajanja produkta

a krivulja, ki jo dobimo, je zelo komplicirana



$$v = \frac{d(P)}{dt} = k[(S)_0 - (P)]$$

$$v = \frac{V_m (S)_0}{K_s + (S)_0}$$

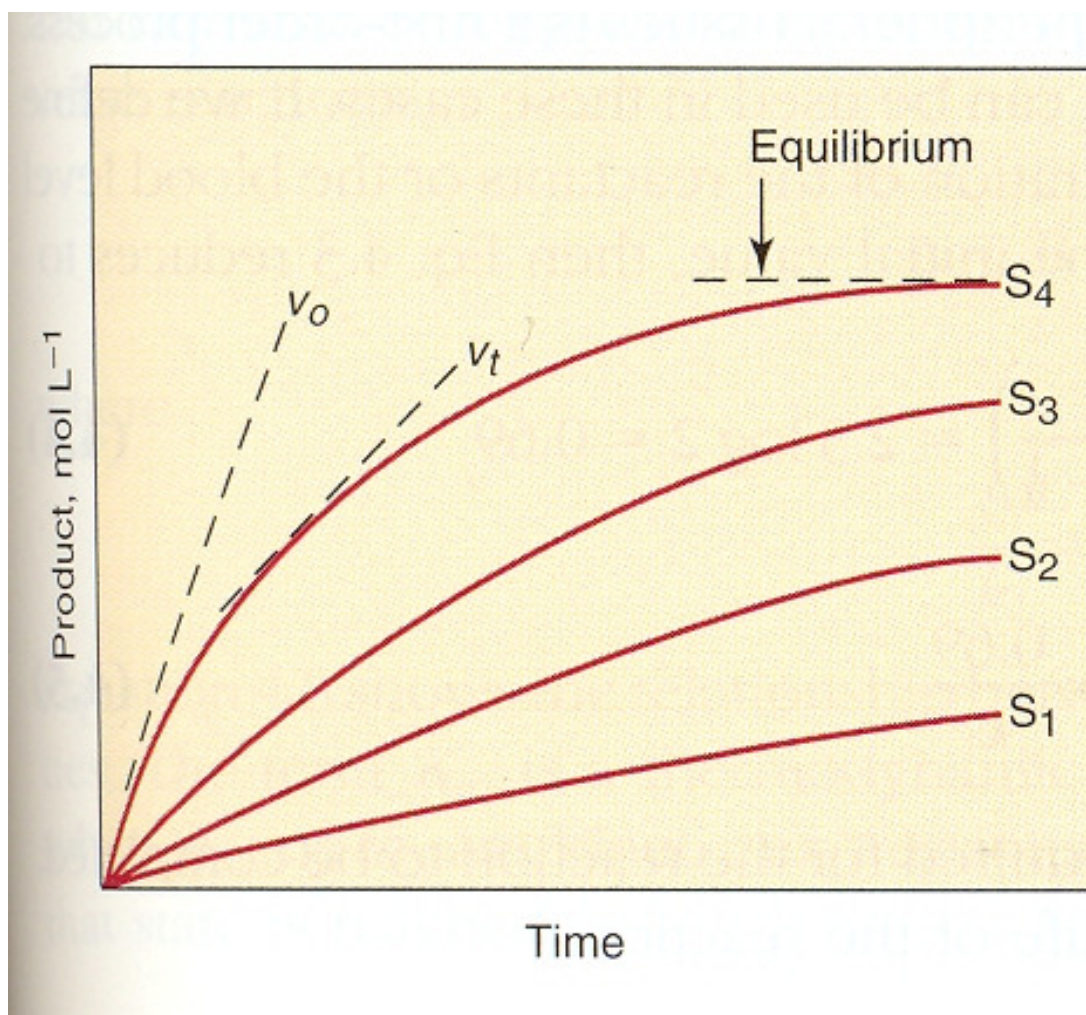
$$V_m t = [(A)_0 - (A)_t] - K_s \ln \left[\frac{(S)_t}{(S)_0} \right]$$

Začetna hitrost

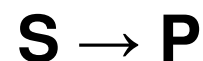
je hitrost, ko še ni nastalo nič produkta, torej se še ni porabilo nič reaktanta.

Določimo tangens naklonskega kota na krivuljo nastajanja produkta (zginetja reaktanta), in sicer skozi točko v času $t=0$

Začetna hitrost in vpliv koncentracije substrata



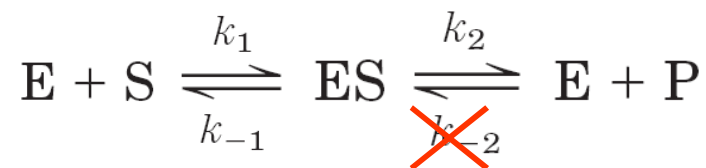
$$S_4 > S_3 > S_2 > S_1$$



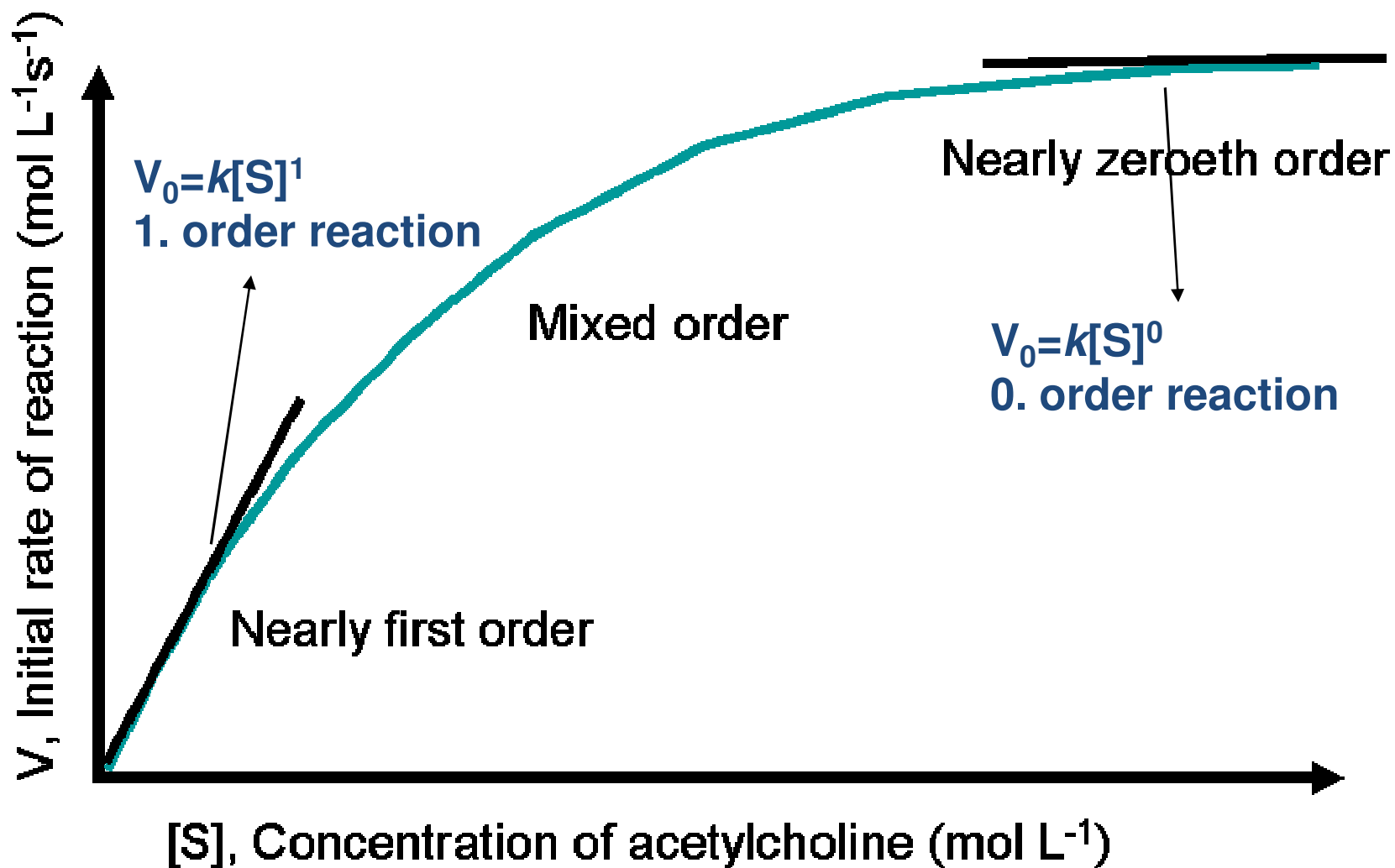
$$v = \Delta(P)/\Delta t$$

Koncentracija substrata se s časom zmanjšuje, zato se zmanjšuje tudi hitrost!

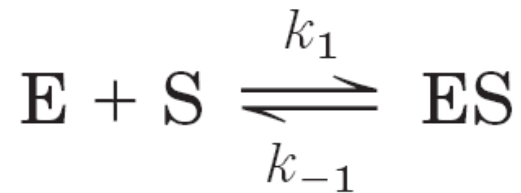
→ **začetna hitrost (v₀)**...
...je hitrost pri t = 0



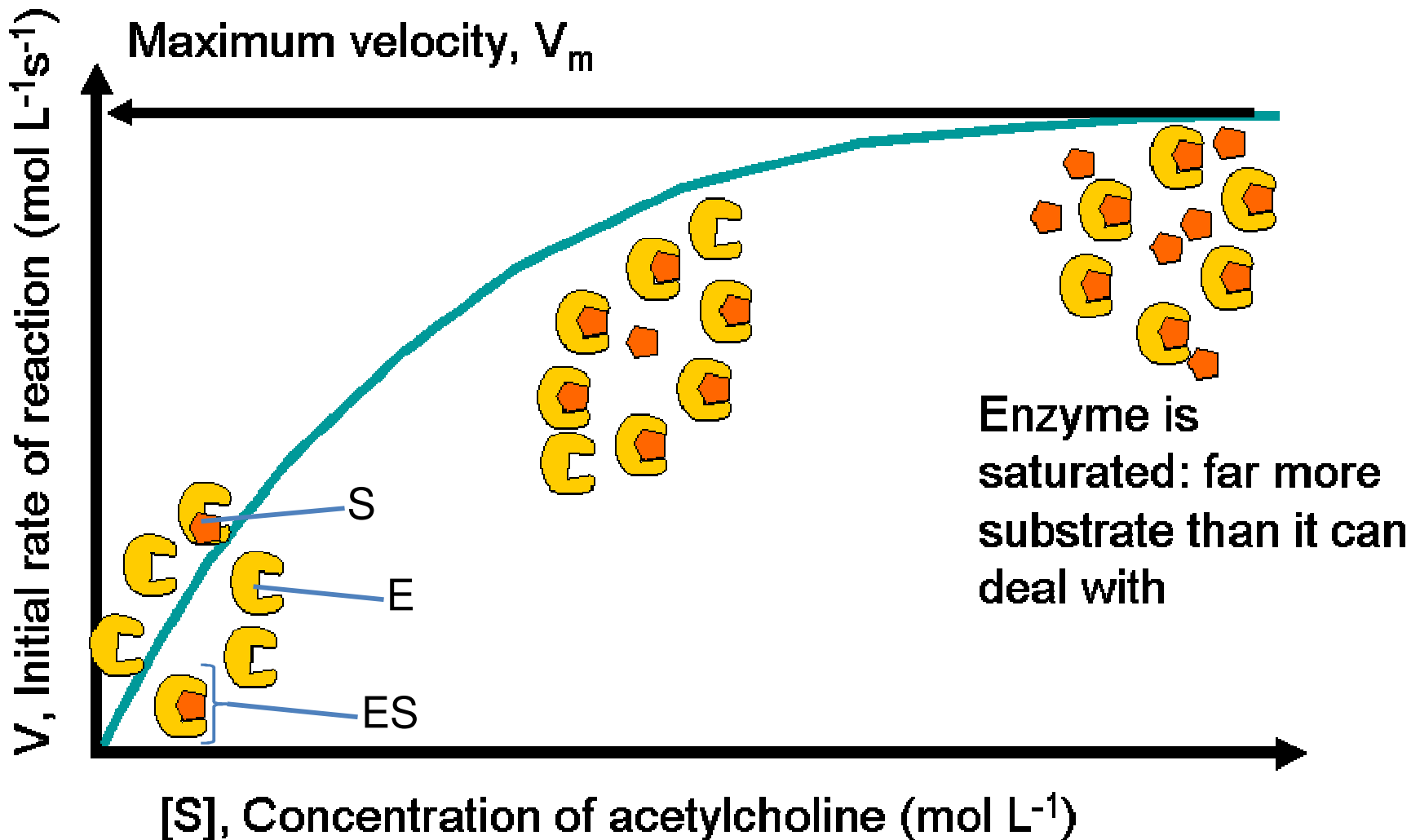
Če so nanašali v_0 v diagram v odvisnosti od $[S]$,
so dobili krivuljo nasičenja



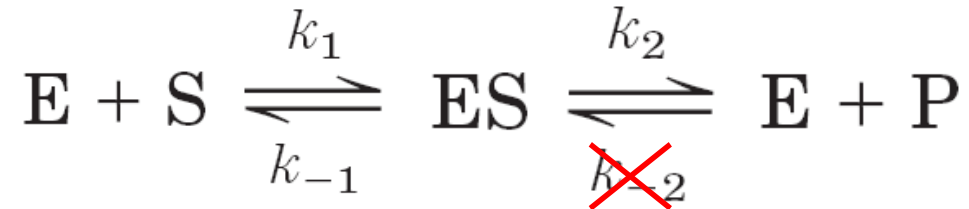
Krivulja nasičenja → nasičenje E s S



$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_s \rightarrow \frac{[E]}{[ES]} = \frac{K_s}{[S]}$$



Henry (1903) in kasneje Michaelis in Mentenova (1913) so skušali na osnovi ravnotežja najti enačbo za popis eksperimentalno dobljene krivulje.



Pogoj: k_2 mora biti zelo majhna ($k_2 \ll k_{-1}$)!

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] \quad \rightarrow \quad \boxed{\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s}$$

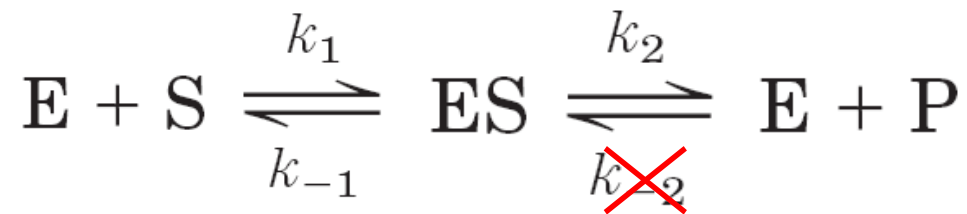
K_s je disociacijska konstanta kompleksa ES – substratna konstanta!

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_s$$

KAJ SKUŠAMO NAREEDITI:

1. IZRAZITI [ES], ker $v_o = k_2[ES]$

2. VPELJATI $[E_o]$, ker je to merljiva količina!



$$[E] = [E_o] - [ES]$$

$$\frac{([E_o] - [ES])[S]}{[ES]} = K_s$$

→

$$[ES] = \frac{[E_o][S]}{[S] + K_s}$$

$$[ES] = \frac{[E_o][S]}{[S] + K_s}$$

pomnožimo s k_2

$$k_2[ES] = \frac{k_2[E_o][S]}{[S] + K_s}$$

upoštevamo: $v_o = k_2[ES]$

$$v_o = \frac{k_2[E_o][S]}{[S] + K_s}$$

upoštevamo: $V_{\max} = k_2[E_o]$

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_s}$$

upoštevamo: $[S_o] \gg [E_o]$,

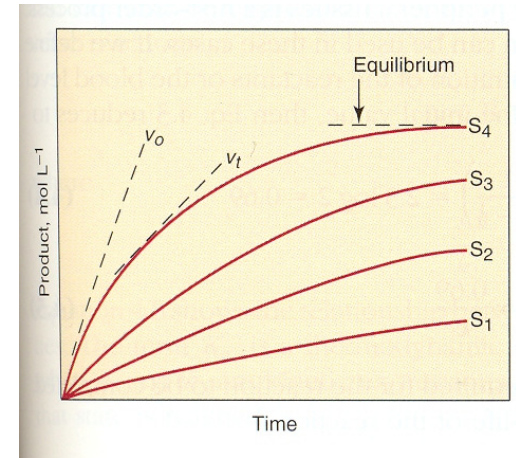
zato je $[S] = [S_o]$

in

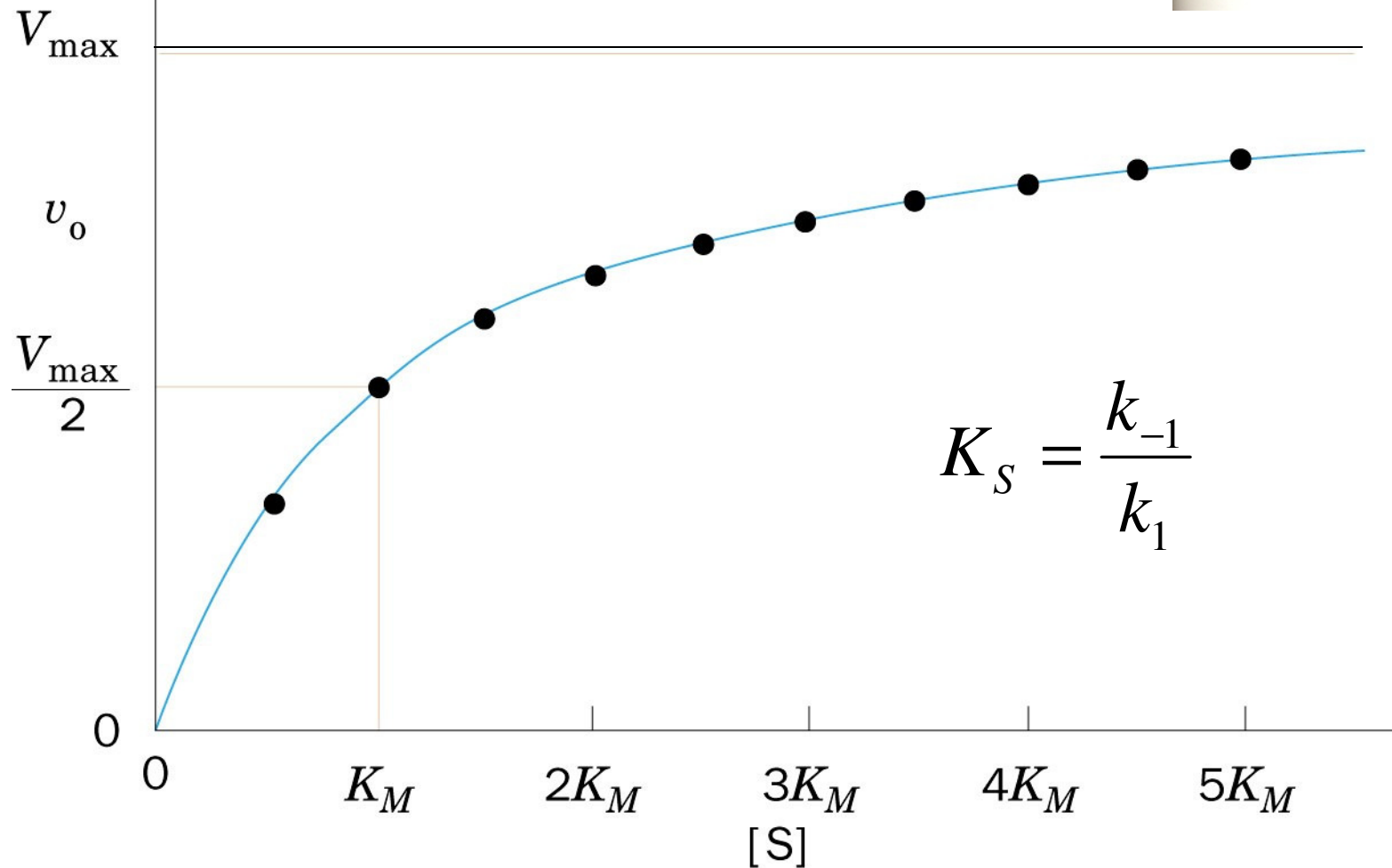
$$v_o = \frac{V_{\max}[S_o]}{[S_o] + K_s}$$

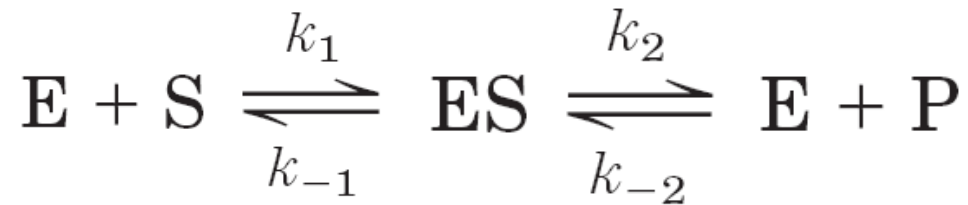
$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{[S_o] + K_s}$$

POZOR: (E) = konst.!



je Michaelis-Mentenova enačba



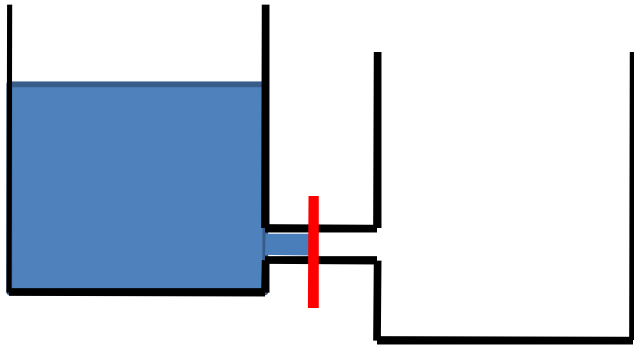


Ker pogoj ravnotežja ni bil v celoti izpolnjen, enačba ni imela splošne veljave – veljala je le za omejeno količino encimov!

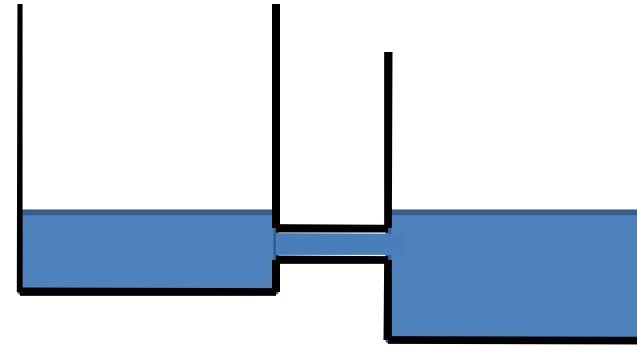
Zato so iskali splošno rešitev. Briggs-Haldanov pristop:

STACIONARNO STANJE!

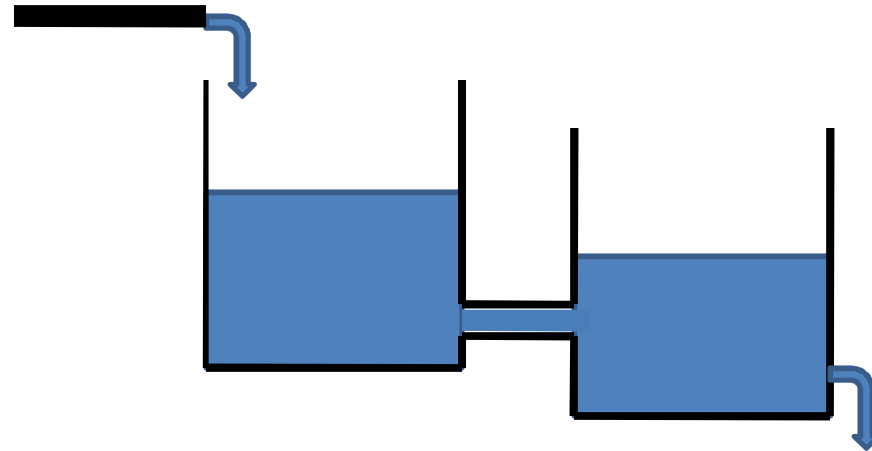
OPIŠI RAZLIKO MED RAVNOTEŽNIM IN STACIONARNIM STANJEM!



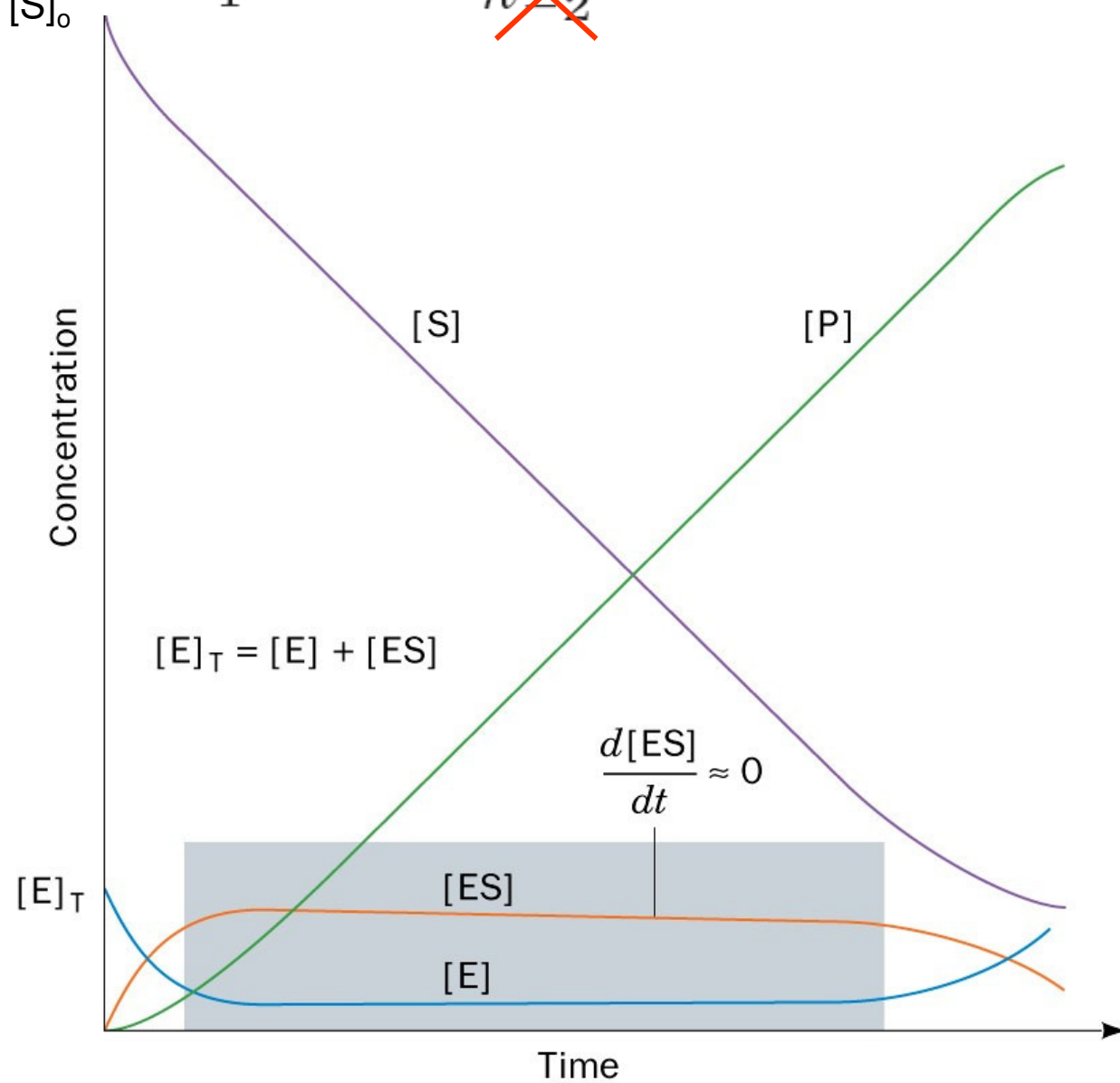
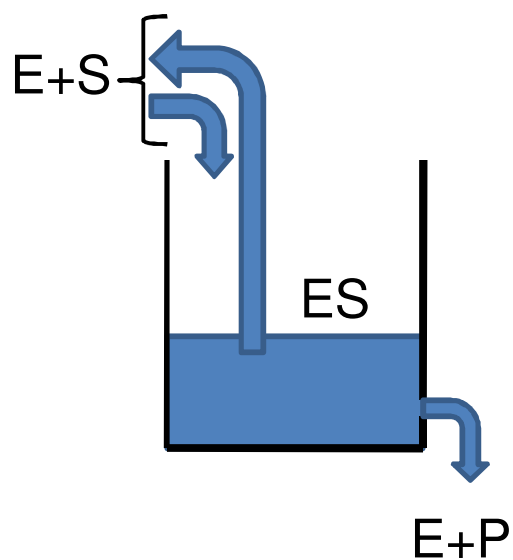
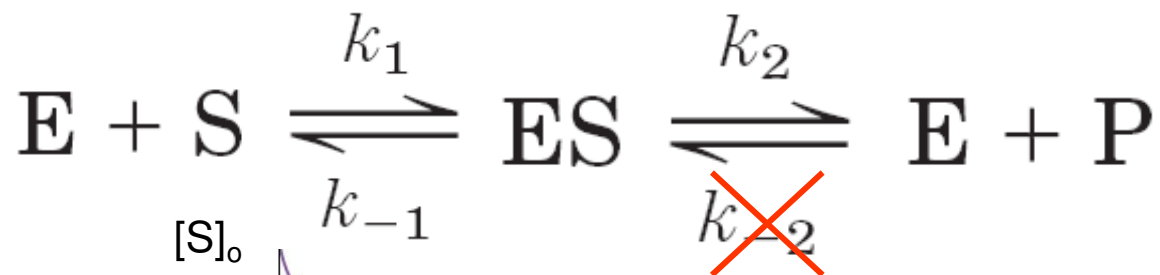
ZAČETNO STANJE



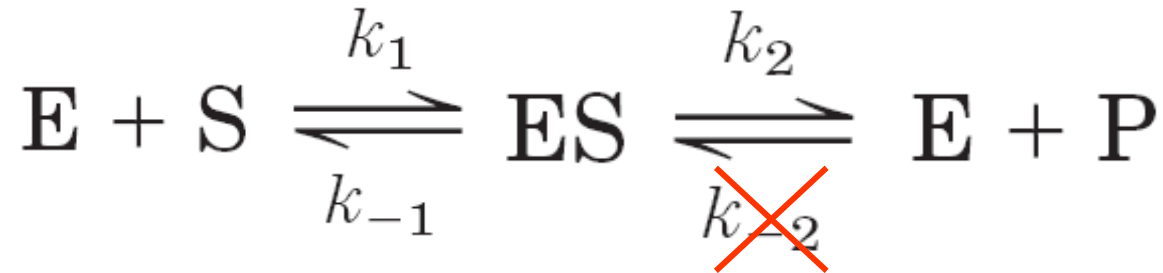
RAVNOTEŽNO STANJE



Višini vode v 'sodih' sta odvisni od dotoka in iztoka ter debeline prehodne cevi; pri konstantnem dotoku in iztoku se višini ne spreminjata: STACIONARNO STANJE



Če je koncentracija ES stalna, mora [ES] enako hitro nastajati kot razpadati!



$$\underbrace{k_1[E][S]}_{\text{nastajanje ES}} = \underbrace{k_{-1}[ES] + k_2[ES]}_{\text{razpadanje ES}} = \underbrace{[ES](k_{-1} + k_2)}_{\text{razpadanje ES}}$$

$$\underbrace{k_1[E][S]}_{\text{nastajanje ES}} = \underbrace{[ES](k_{-1} + k_2)}_{\text{razpadanje ES}}$$

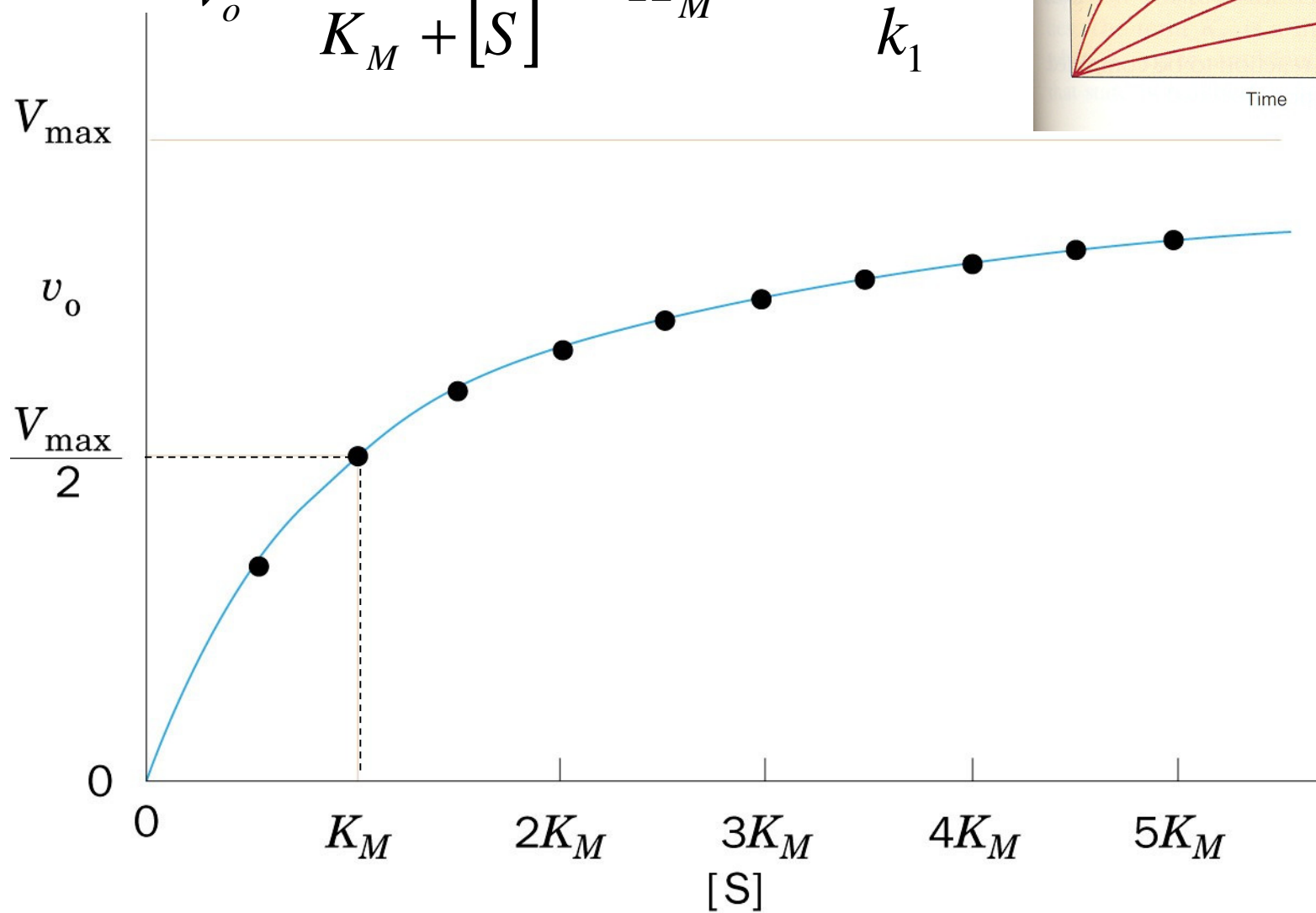
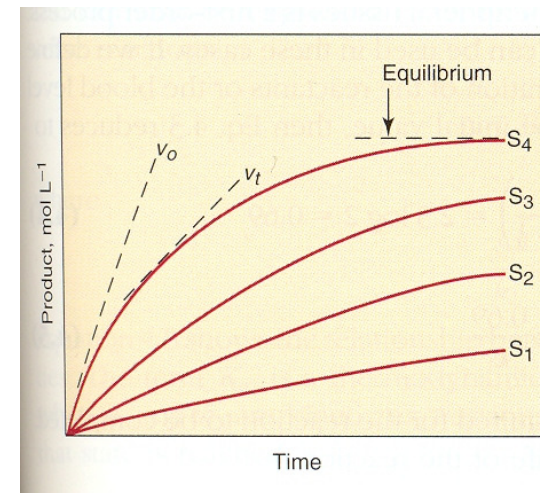
Podobno kot M.- M. dobimo analogno enačbo, ki pa velja za STACIONARNO STANJE, takorekoč splošno:

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

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{[S_o] + K_M}$$

Michaelis–Mentenova enačba in krivulja

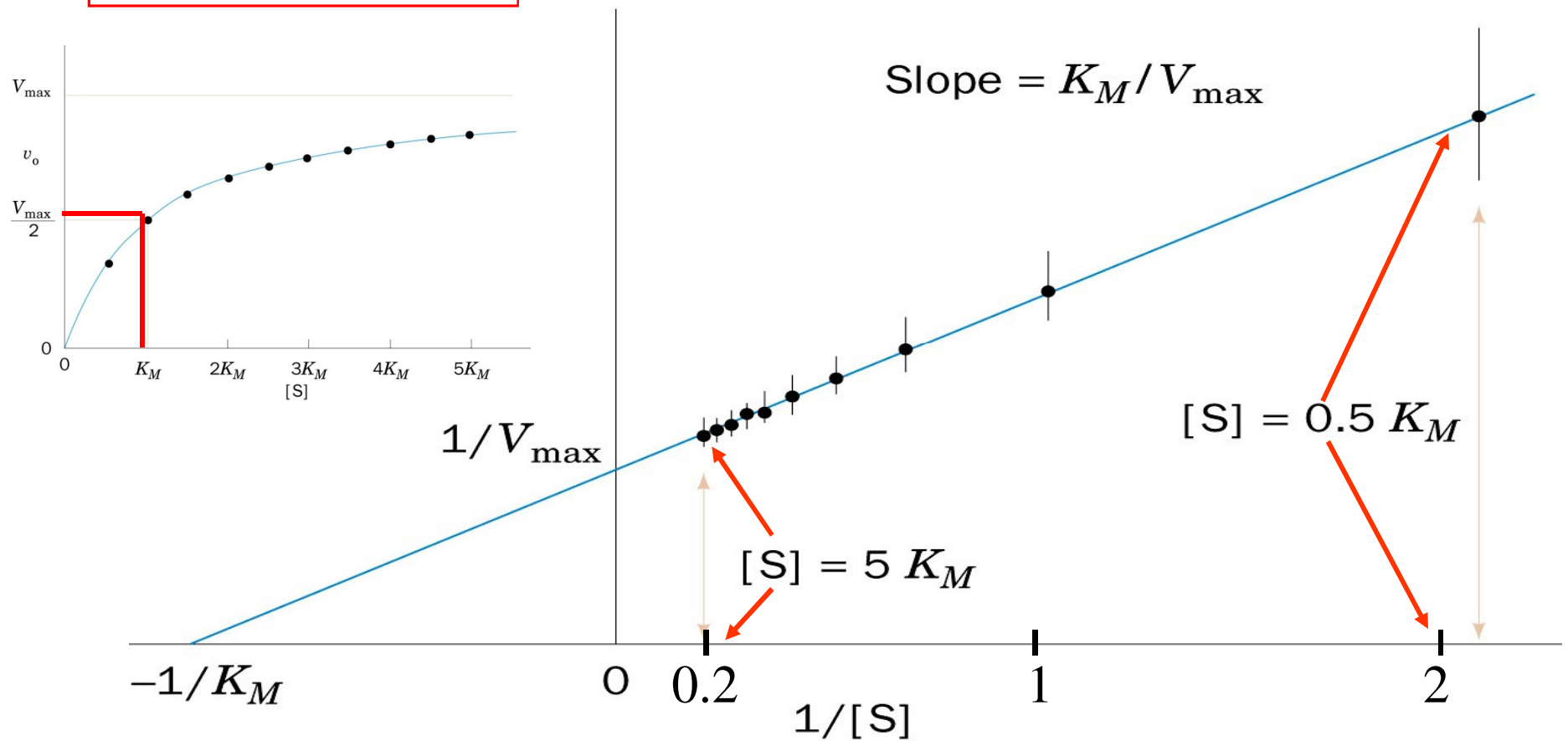
$$v_o = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$



Dvojno recipročni (Lineweaver–Burkov) diagram

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{[S_o] + K_M}$$

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



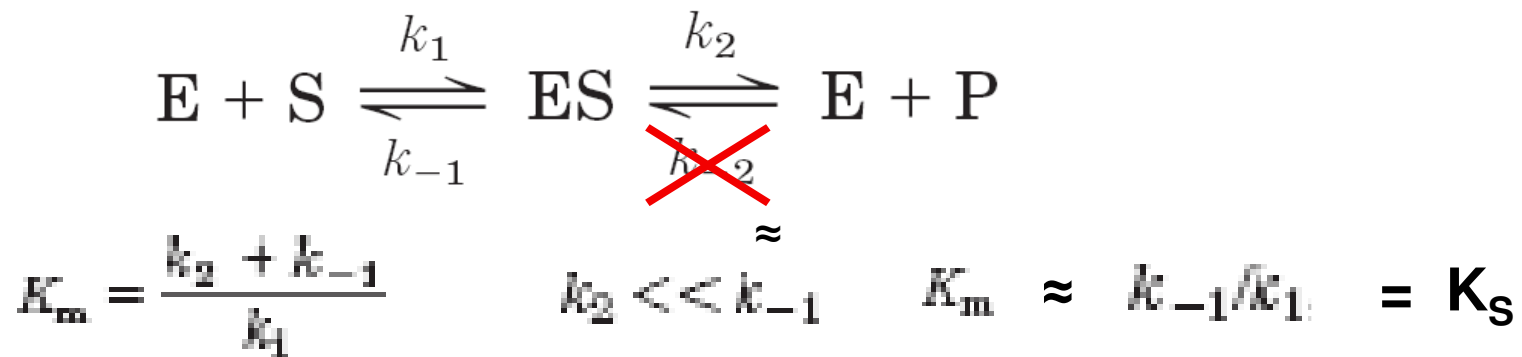
KDAJ Michaelis-Mentenova ENAČBA VELJA:

1. KADAR SMO V RAZMERAH ZAČETNE HITROSTI
2. KADAR JE $[S] \gg [E]$
3. KADAR IMAMO LE EN AKTIVNI CENTER ali
4. KADAR JE AKTIVNIH CENTROV VEČ, A SO NEODVISNI

**PRI KONSTRUKCIJI M.-M. KRIVULJE ALI NJENIH DERIVATOV
(L.-B. KRIVULJA) MORAMO DRŽATI $[E]$ KONSTANTNO!**

Pomen K_m

- V_{\max} , K_m določimo eksperimentalno



POMNI: - velika $K_m \rightarrow$ majhna afiniteta encima do substrata
- majhna $K_m \rightarrow$ velika afiniteta encima do substrata

- K_m - odraža afiniteto encima do substrata
- in tudi fiziološke razmere:
 $K_m \approx [S]_{\text{physiol.}}$

TABLE 6-6 K_m for Some Enzymes and Substrates

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

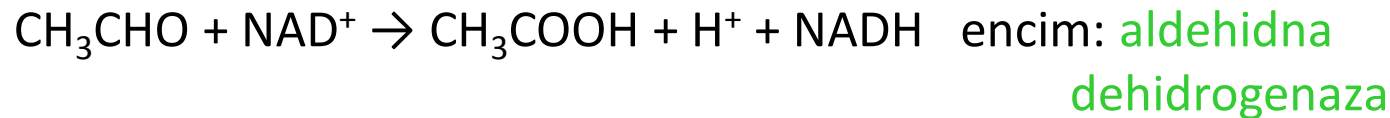
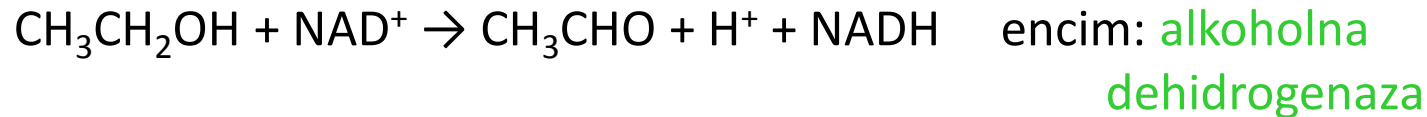
K_M - odraža afiniteto encima do substrata in nam pove pri katerih koncentracijah substrata bo encim učinkovit!

Pomen K_M v fiziologiji

primer: občutljivost Azijcev na alkohol

- Japonci in Kitajci dosežejo isti učinek alkohola (vazodilatacija, pospešen ritem srca...) že pri nižji koncentraciji zaužitega alkohola kot Evropejci

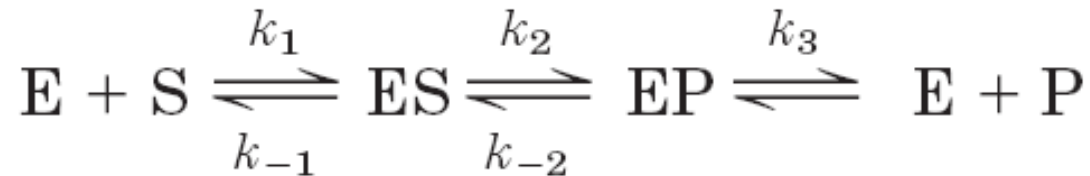
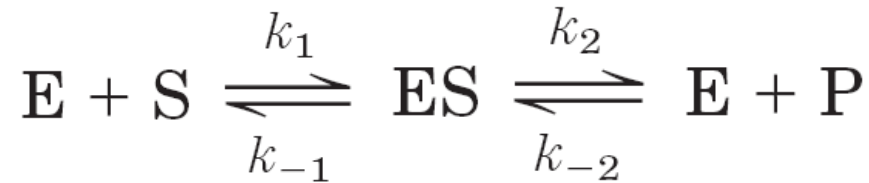
- Reakcije razgradnje alkohola



- Azijci nimajo izoencimske oblike encima **aldehydne dehidrogenaze** z nizko K_M ; posledica: aldehyd v krvi dolgo kroži po telesu

Izoencimi: katalizirajo isto reakcijo (isti substrat), različne pa so molekulske lastnosti encimov: različna molekulska masa (M_r), različna encimska aktivnost (V_0), različna MM konstanta (K_m); izoencime kodirajo različni geni!

k_{kat}

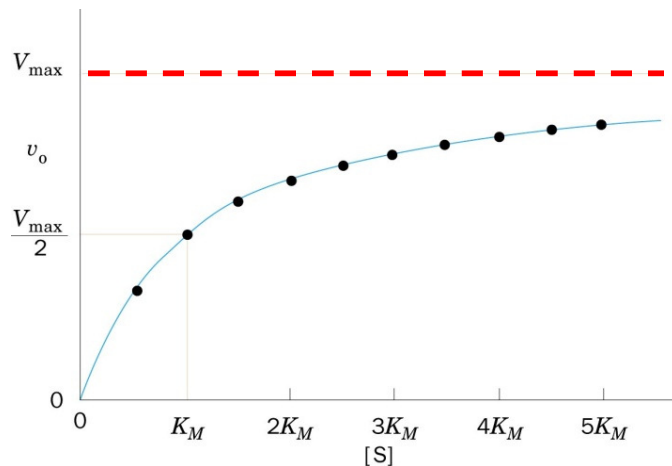


- $k_{\text{kat}} = k$ najpočasnejše stopnje v desno!
- k_{kat} - pretvorbena število (turnover number): število molekul (molov) substrata, ki se pretvori v produkt na eni molekuli (molu) encima v časovni enoti (navadno sekundi).

Kinetična učinkovitost encimov: pretvorbena število (turnover number), k_{kat}

TABLE 6-7 Turnover Numbers, k_{cat} , of Some Enzymes

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4



Zakaj za mero učinkovitosti encima ne uporabljamo V_{max} ? Ker je odvisna od koncentracije encima, saj velja enačba:

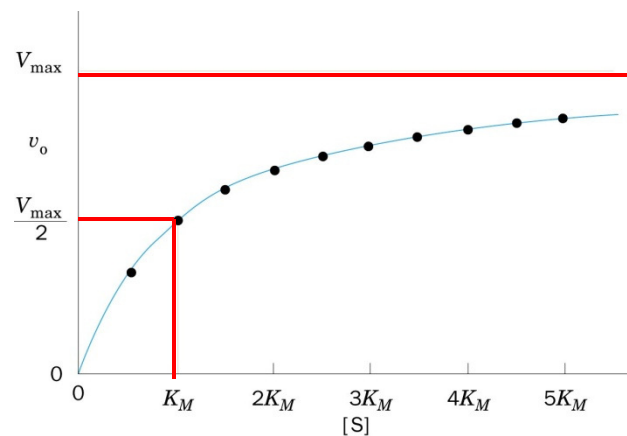
$$V_{\text{max}} = k_2[E]_0$$

k_{kat}/K_m

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	1.1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	1.4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	1.4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	1.8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	1.9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{[S_o] + K_M}$$



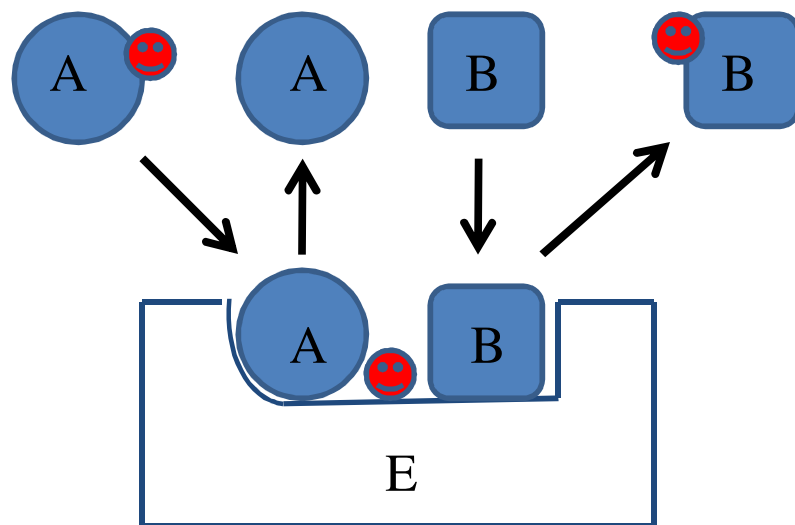
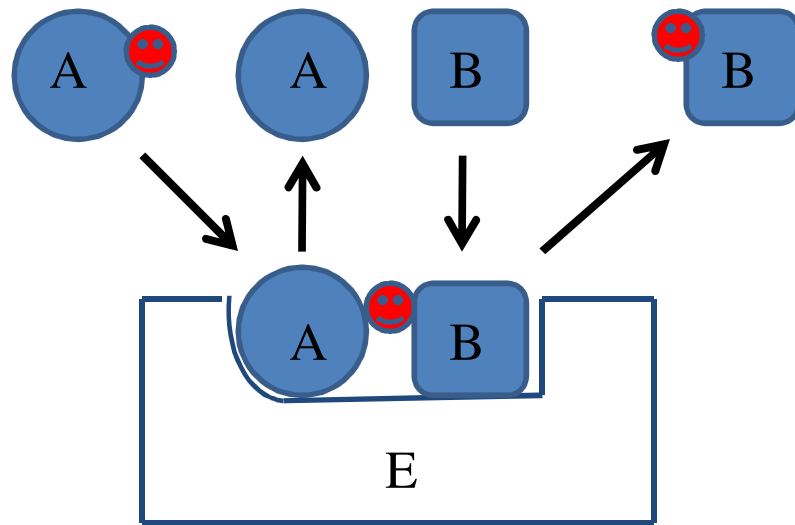
$$v_o = k_{kat} [ES]$$

$$V_{\max} = k_{kat} [E]_o$$

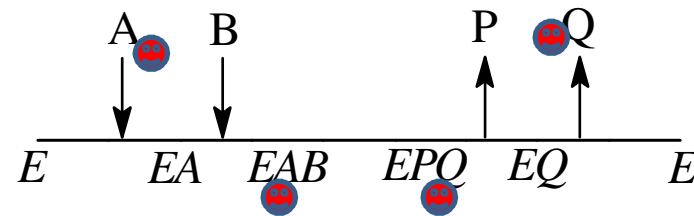
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{kat}}{k_1}$$

Kadar je $k_2 = k_{kat}$!

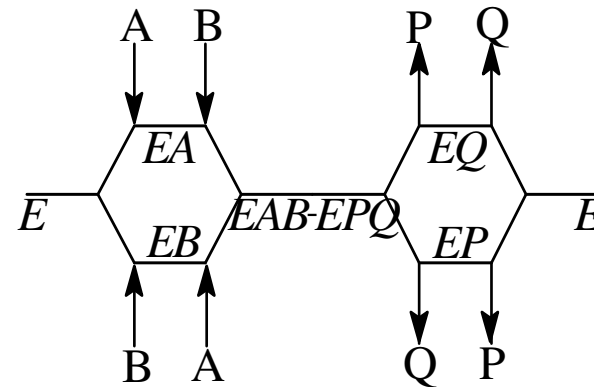
Bisubstratne reakcije:
Zelo različni mehanizmi!



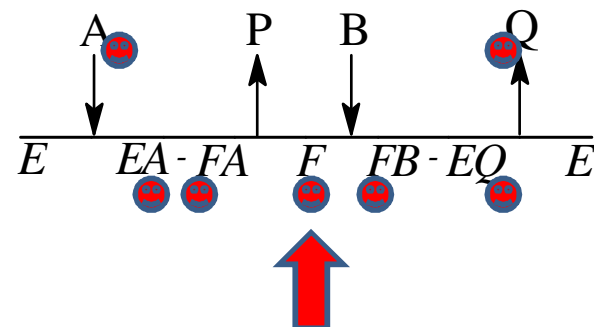
urejen sekvenčni mehanizem:



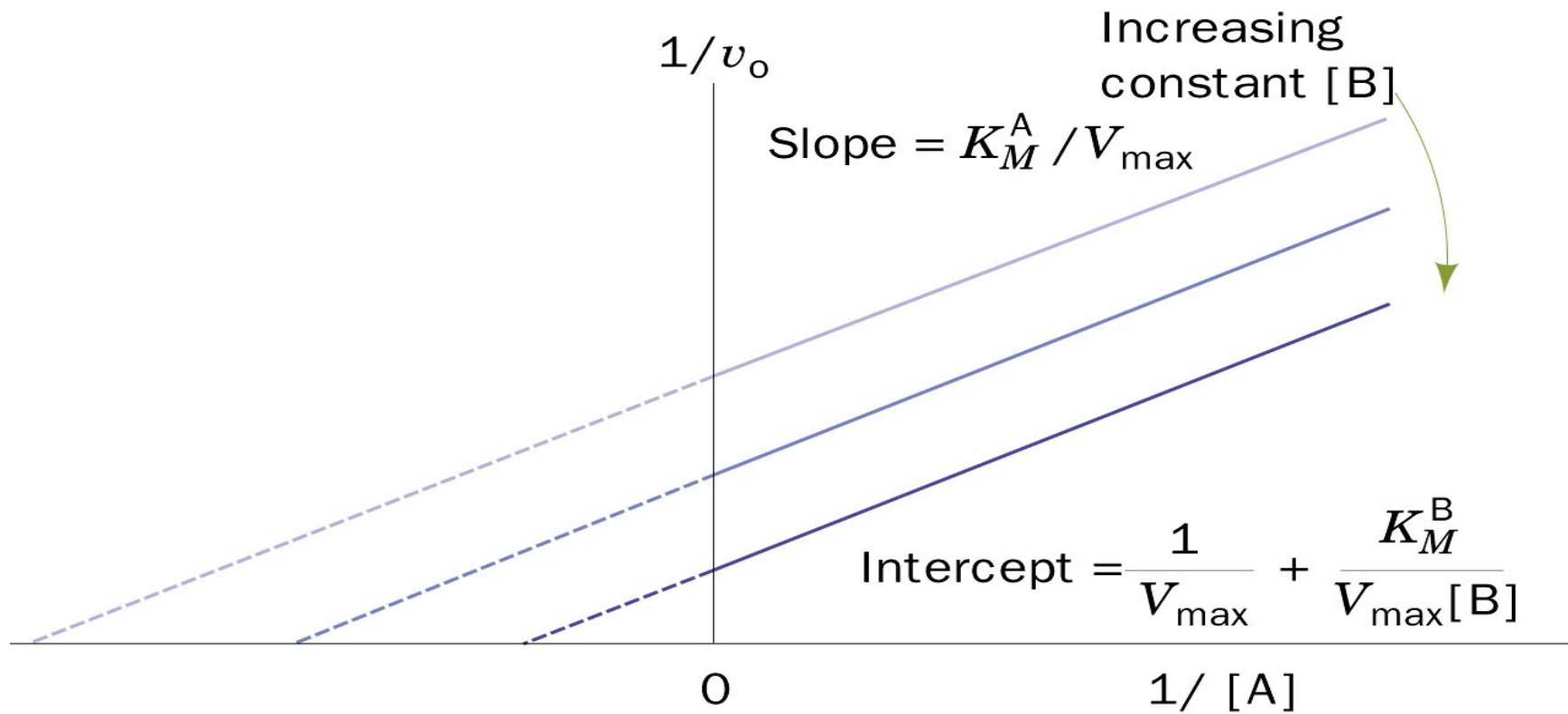
naključni sekvenčni mehanizem:



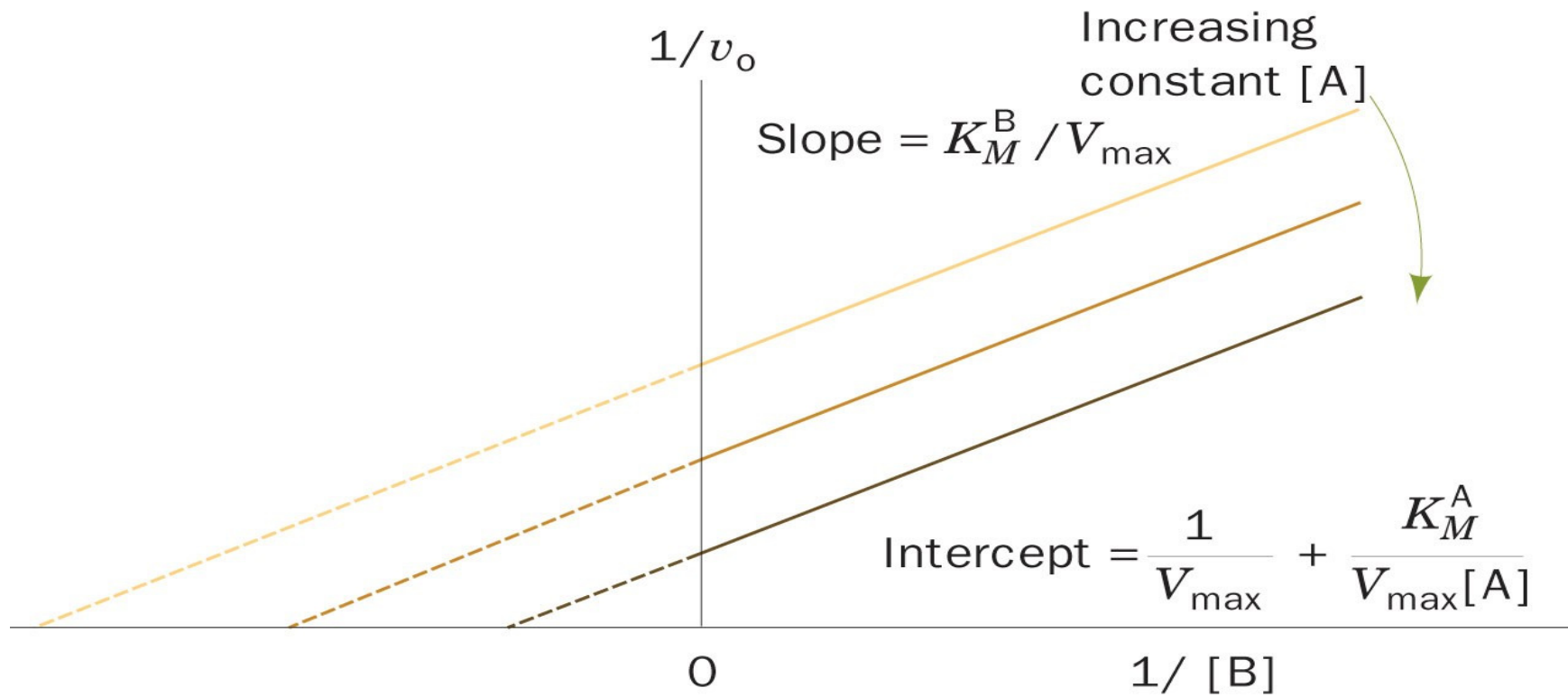
ping-pong mehanizem:



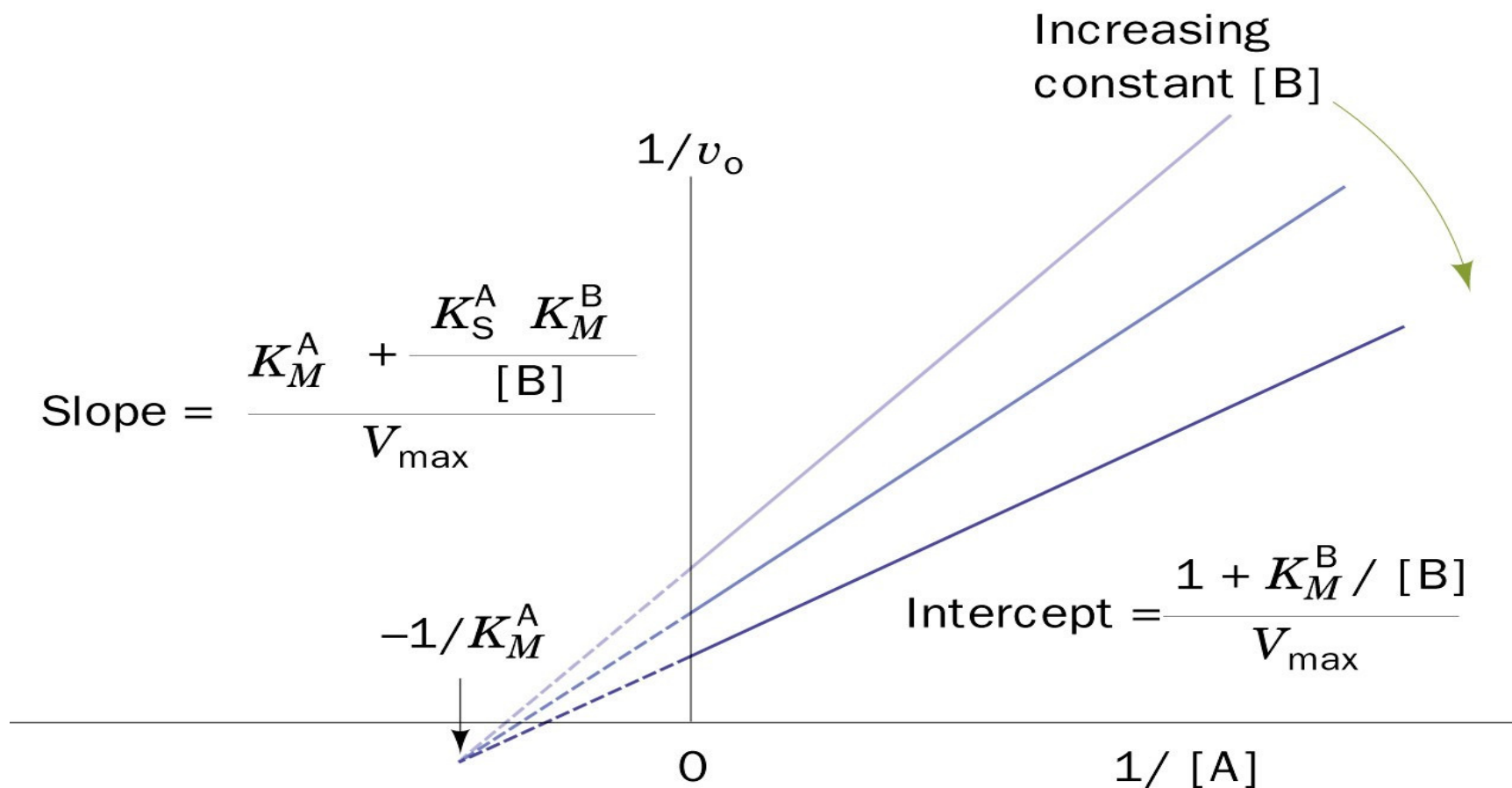
Ping Pong mehanizem [B] = konstanten.



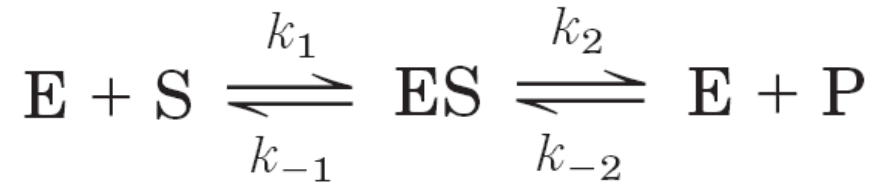
Ping Pong mehanizem [A] = konstanten.



Vsi sekvenčni mehanizmi imajo dvojne recipročne diagrame, kjer se premice sekajo.

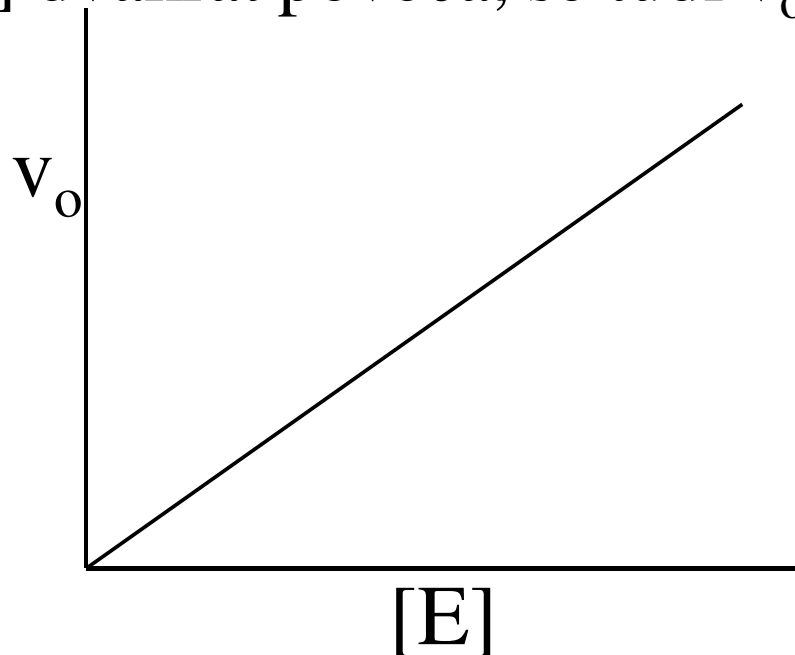


Vpliv koncentracije encima na aktivnost.

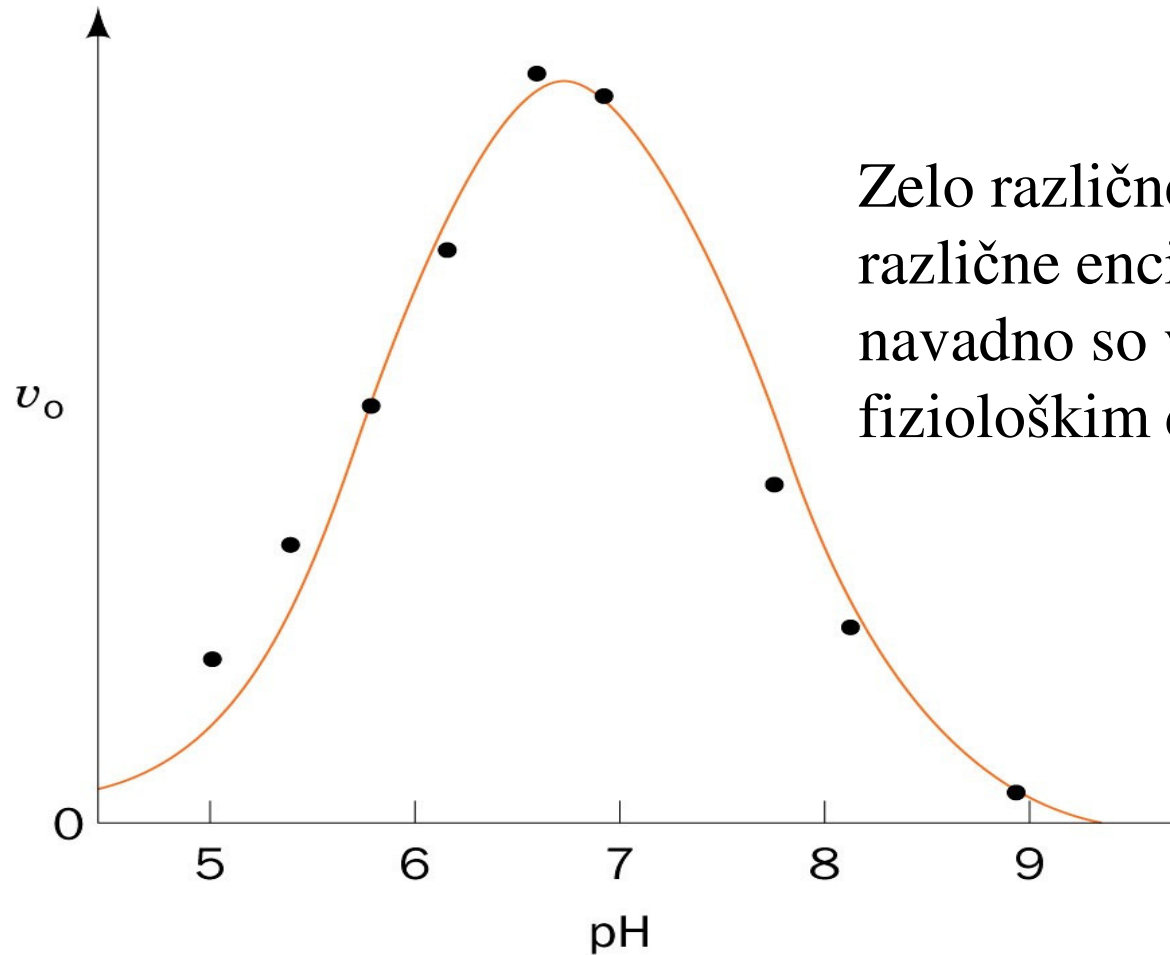


Dokler velja $[\text{S}] \gg [\text{E}]$ se s povečanjem $[\text{E}]$ proporcionalno poveča $[\text{ES}]$.

Ker velja enačba $v_o = k_{kat}[\text{ES}]$, velja linearna zveza med v_o in $[\text{E}]$: če se $[\text{E}]$ dvakrat poveča, se tudi v_o dvakrat poveča.



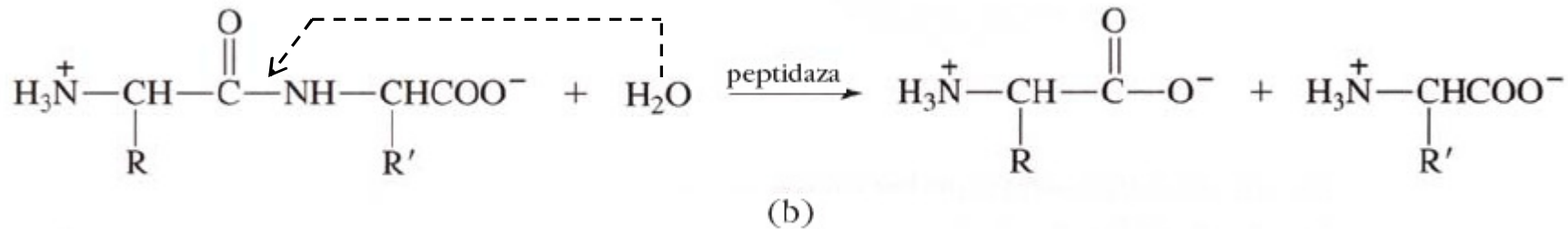
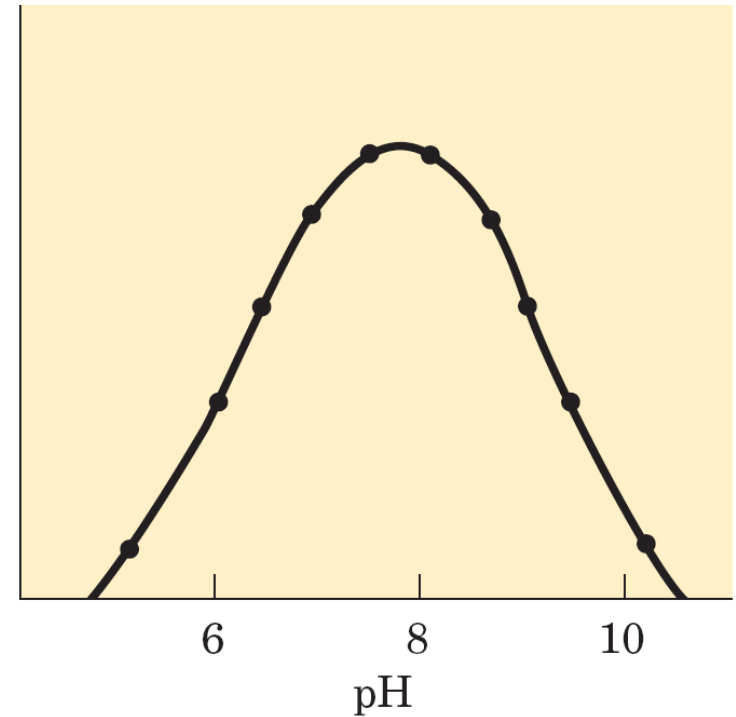
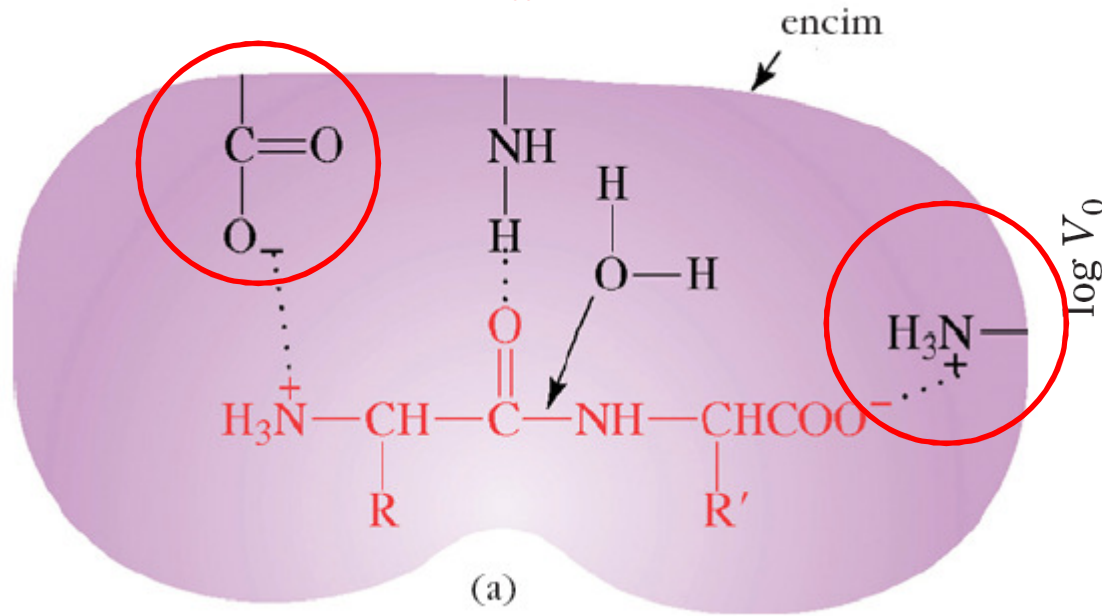
Vpliv pH na aktivnost encima (fumaraza).



Zelo različne krivulje za različne encime, navadno so v skladu s fiziološkim delovanjem

pH profil peptidaze – pomen skupin v aktivnem mestu encima in v substratu

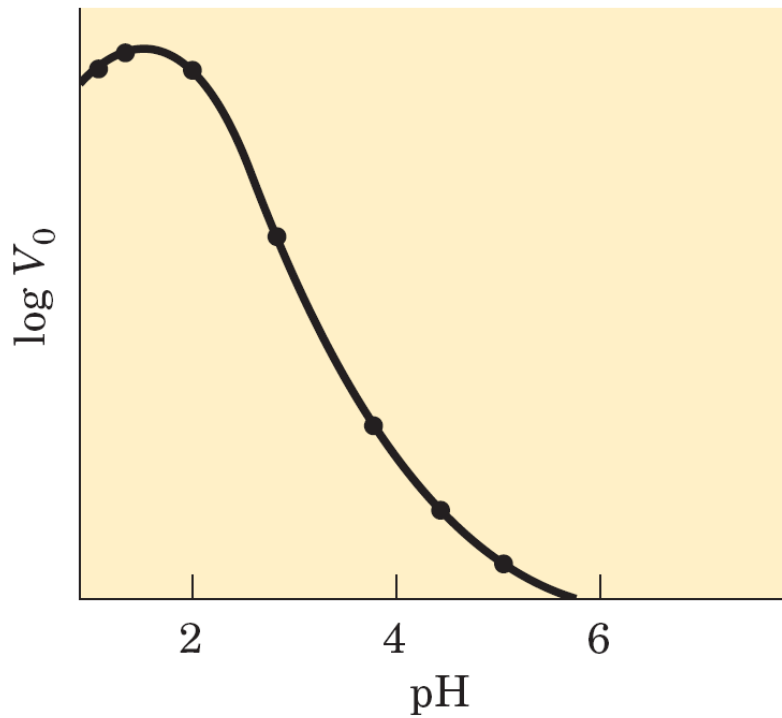
$pK_a!$



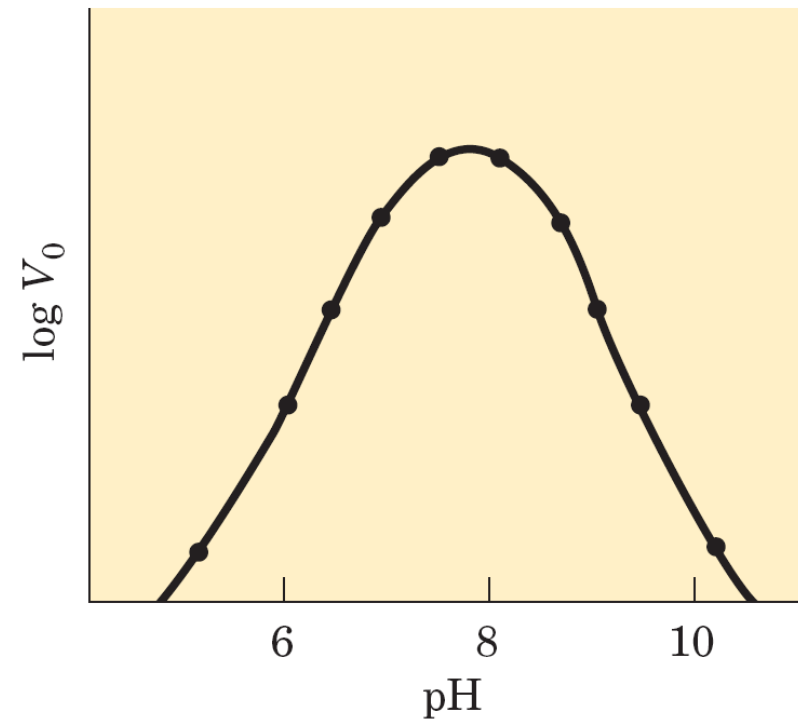
KAJ PA POMEN SKUPIN DRUGJE V STRUKTURI ENCI MA?

Različni encimi – različni pH profili

(zaradi različnih disociabilnih skupin v encimu in substratu)



pepsin

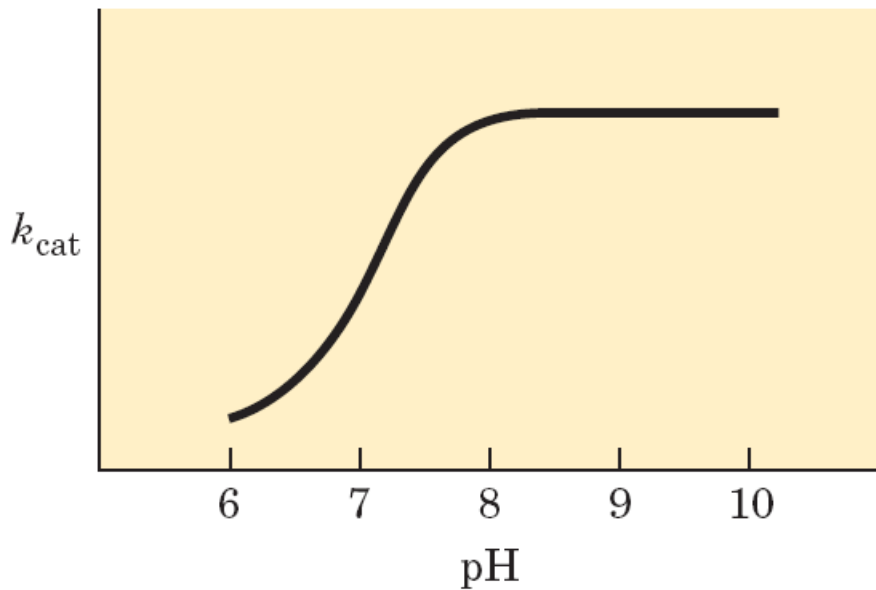


glukoza-6-fosfataza

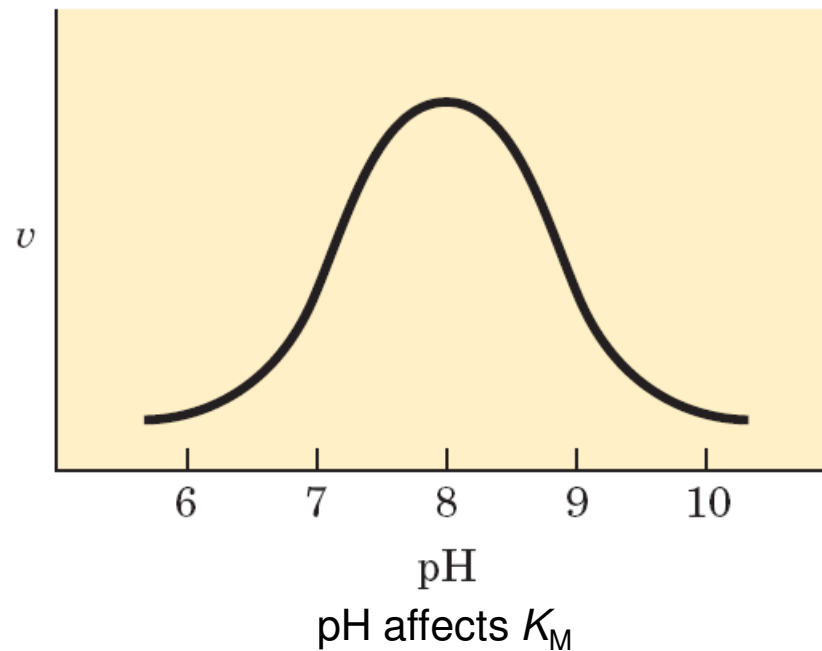
Učinek pH je lahko kompleksen –
npr. kimotripsin

$$v \propto \frac{k_{cat}}{K_M}$$

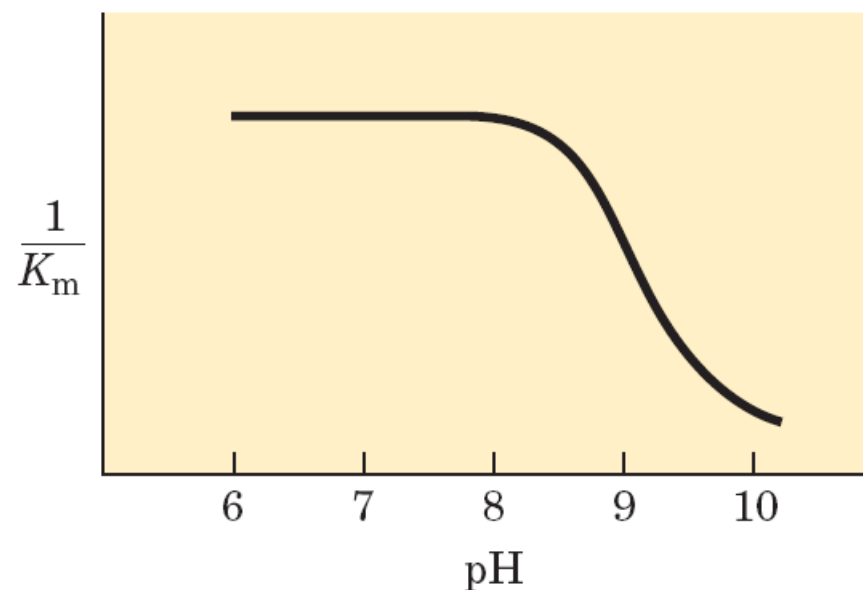
pH affects k_{cat}



Cumulative pH effect



pH affects K_M



pH optimum 17 β -HSD

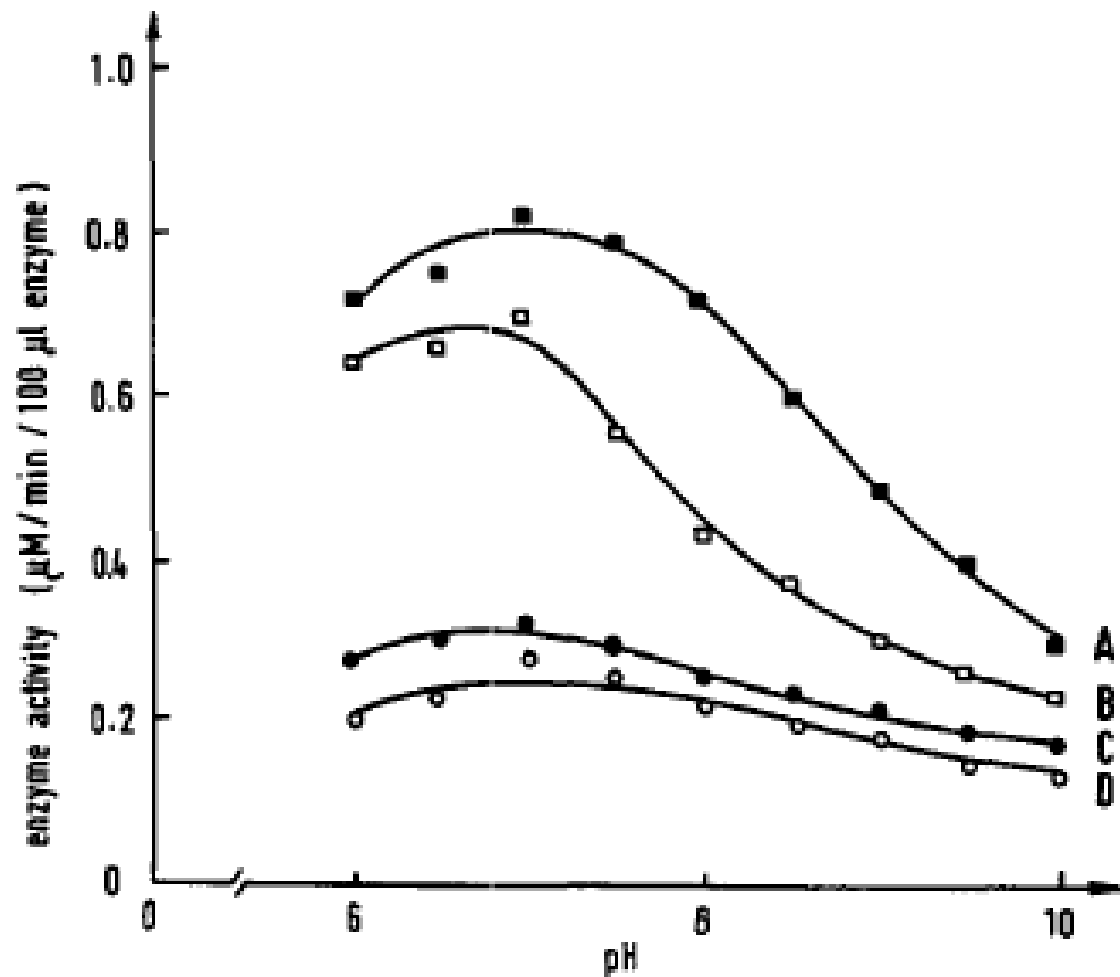
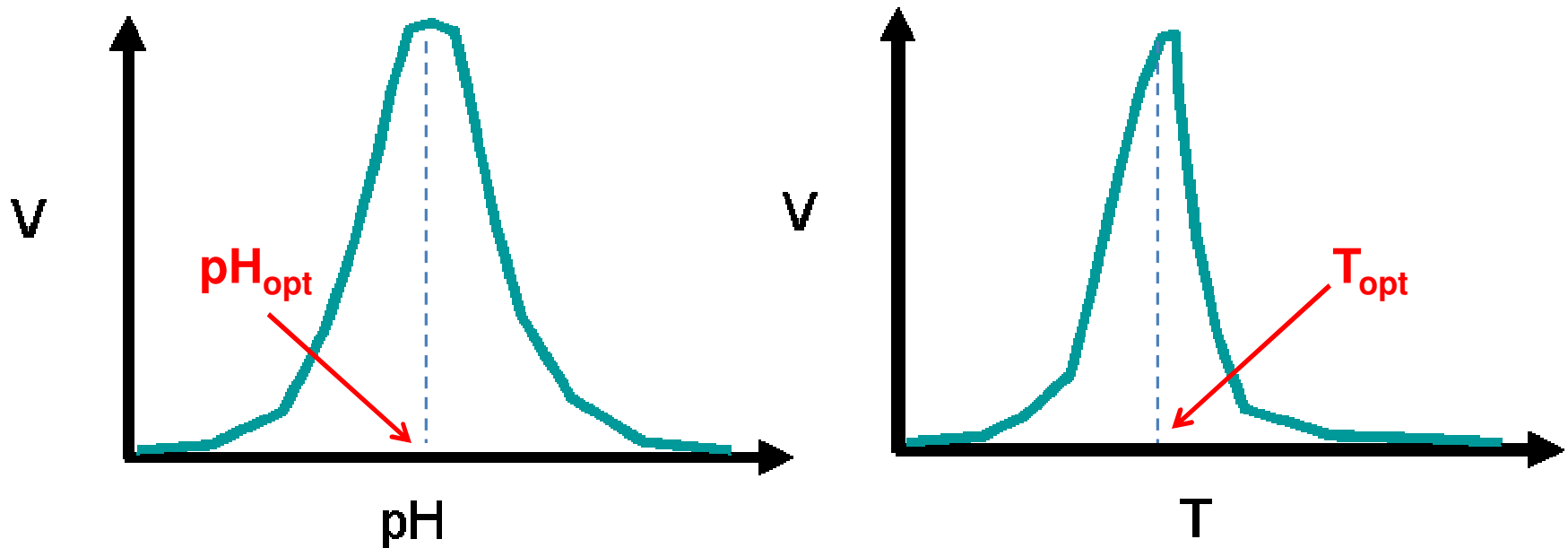


Fig. 5. pH optimum of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Substrate (S) is androstenedione, coenzyme (CoE) is NADPH, temperature is 25°C. (A): S = 20 μ M, CoE = 20 μ M, buffer D; (B): S = 20 μ M, CoE = 20 μ M, buffer E; (C): S = 100 μ M, CoE = 100 μ M, buffer D; (D): S = 100 μ M, CoE = 100 μ M, buffer E.

Krivulji temperaturne in pH odvisnosti sta si podobni



T narašča do T_{opt} :
več in močnejši
trki, zato hitrost
narašča!

$$v_o = k_2[ES]$$

$$k = \frac{RT}{Nh} \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$$

T narašča nad T_{opt} :
encim se denaturira,
zato hitrost pada!

Razpad IV., III. in II.
strukture encima,
zato encim ni več
aktiven!

Navidezni temperaturni optimum 17β -HSD

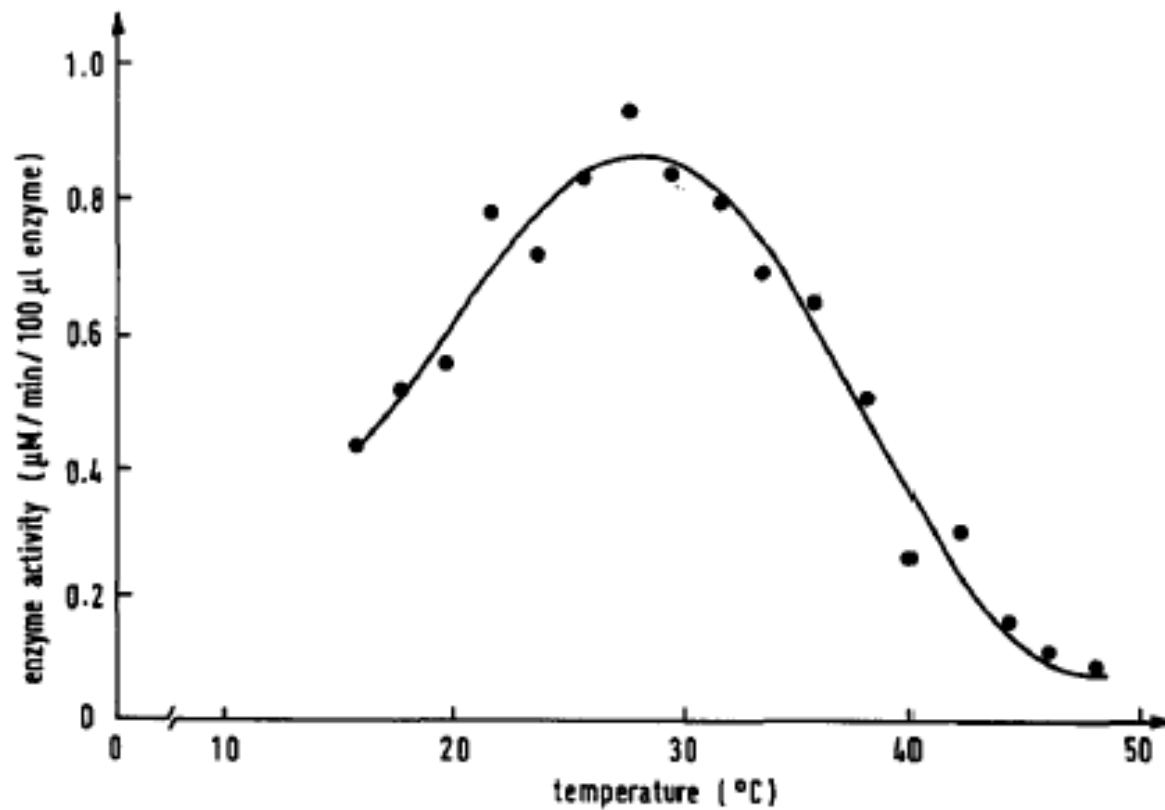


Fig. 6. Apparent temperature optimum of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase. Substrate is $100 \mu\text{M}$ androstenedione, coenzyme is $100 \mu\text{M}$ NADPH, pH is 7.0 (buffer D).

Temperaturna stabilnost 17 β -HSD

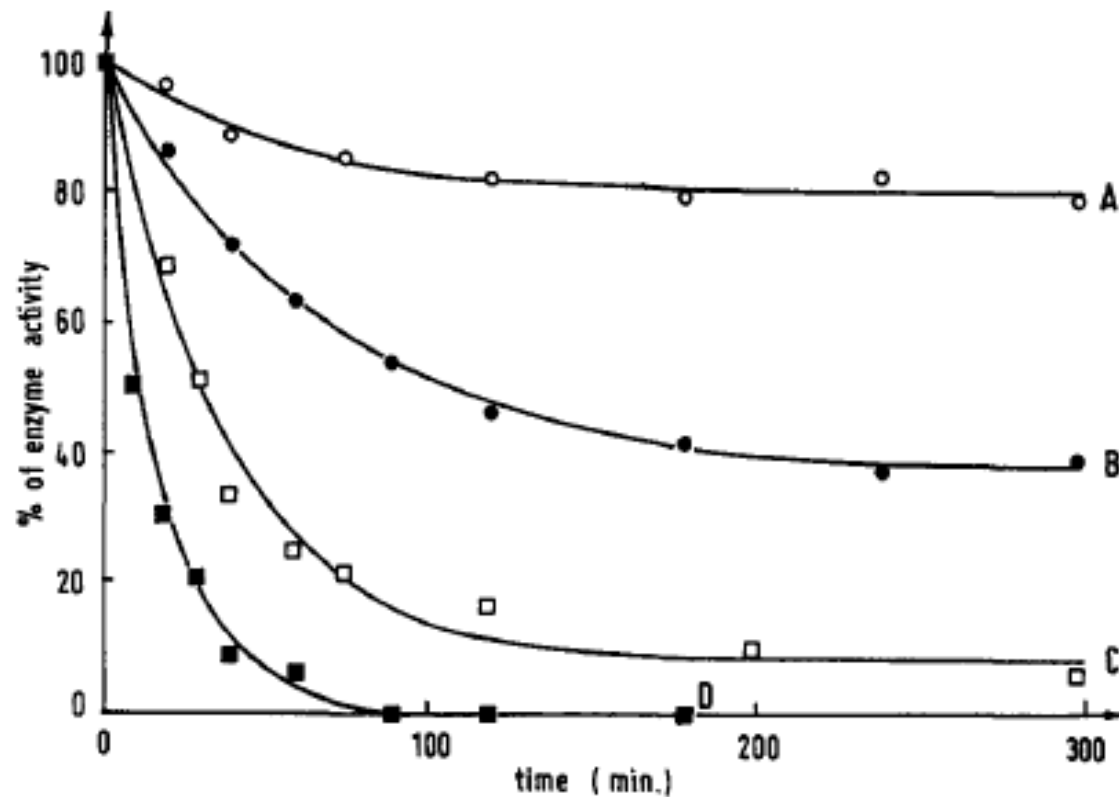


Fig. 7. Temperature stability of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Substrate is 100 μ M androstenedione, coenzyme is 100 μ M NADPH, pH is 7.0 (buffer D). Temperatures are 2°C (A), 10°C (B), 25°C (C), and 37°C (D).

Matjaž Zorko

3. predavanje

vplivi na hitrost encimske
reakcije

vpliv substrata (Michaelisova
kinetika)

ravnotežno - stacionarno stanje

VPLIV:

- koncentracije substrata
- koncentracije encima
- pH
- temperature

Jure Stojan

4. predavanje

Inhibicija - aktivacija -
modulacija encimske
katalize

hitre kinetične metode

matematično modeliranje -
analiza podatkov