

# Model Kinetyki Reakcji Enzymatycznych

wraz z doświadczalnym wyznaczeniem typu inhibicji aktywności kwaśnej  
fosfatazy przez fosforany(V)

*Aleksandra Gomółka*

## Spis treści:

Wstęp: .....	2
Kinetyka Michaelisa-Menten: .....	2
Kinetyka Michaelisa-Menten według mechanizmu Lineweavera-Burka: .....	7
Inhibicja aktywności kwaśnej fosfatazy: .....	9
Podsumowanie: .....	13
Bibliografia: .....	14

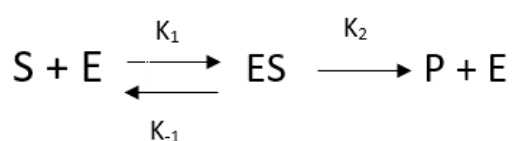
## Wstęp:

W układach biologicznych, w tym w szeregu reakcji chemicznych rolę katalizatorów pełnią enzymy. Szybkość przejścia od substratów do produktów w reakcjach katalizowanych przez enzymy jest wielokrotnie większa niż w nieobecności katalizatora. Według modelu „lock and key model” po raz pierwszy zasugerowanego przez H. Fischera, aktywność enzymów (E) wynika z występowania w nich miejsc aktywnych, w których struktura łańcuchów polipeptydowych odpowiada strukturze substratu. Centra aktywne są zdolne do wiązania substratu (S) w ściśle określonej orientacji przestrzennej. W niektórych przypadkach miejsca aktywne enzymu, które oddziałują z substratami ulegają przestrzennym aranżacjom, dopasowując się do wiązanego substratu. Niekiedy także struktura cząsteczek substratu może podlegać pewnym zmianom, ułatwiającym związanie z enzymem.

Kinetyka reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy opiera się na oddziaływaniu enzymu z cząsteczkami substratów. Wiązania w substratach ulegają osłabieniu oraz następuje stabilizacji stanu przejściowego między substratem i produktem. Entalpia swobodna aktywacji reakcji chemicznych obniża się w stosunku do wartości tego parametru przy braku enzymu. W miarę zwiększania stężenia substratu, w warunkach jego nadmiaru w stosunku do określonego stężenia enzymu, następuje początkowo liniowy wzrost szybkości katalizowanej reakcji, po czym szybkość reakcji dąży do wartości maksymalnej. Takiej charakterystyce kinetycznej odpowiada modelowy mechanizm Michaelisa-Menten, który jest tematem dalszej części pracy.

## Kinetyka Michaelisa-Menten:

Mechanizm kinetyki Michaelisa-Menten przedstawia reakcje enzymatyczne w formie sekwencji reakcji odwracalnej i następującej po niej reakcji nieodwracalnej. Poniższy schemat ilustruje wyżej wspomniany mechanizm, uwzględniając występowanie jednego substratu.



W pierwszym etapie substrat (S) wiąże się odwracalnie z enzymem (E) w miejscu aktywnym, tworząc ze stałą szybkości  $k_1$  kompleks enzym-substrat (ES). Kompleks enzym-substrat dysocjuje częściowo do substratu i enzymu ze stałą szybkości  $k_{-1}$  i jednocześnie ulega nieodwracalnemu przekształceniu w produkt (P) ze stałą szybkości  $k_2$ . Uwolnione miejsce aktywne enzymu może ponownie wiązać i aktywować następne cząsteczki substratu.

Według mechanizmu Michaelisa-Menten szybkość tworzenia (przyrostu stężenia) produktu reakcji ( $[P]$ ), stanowiąca miarę szybkości reakcji enzymatycznej ( $V$ ) jest wprost proporcjonalna do chwilowego stężenia kompleksu substratu z enzymem ( $[ES]$ )

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

Związek między stężeniem wolnego enzymu ( $[E]$ ) i wolnego substratu ( $[S]$ ) a stężeniem kompleksu enzym–substrat ( $[ES]$ ) można określić stosując przybliżenie stanu stacjonarnego, to jest przyjmując założenie o jednakowej szybkości tworzenia kompleksu ( $k_1[E][S]$ ) i jego rozpadu do produktu ( $k_2[ES]$ ) oraz dysocjacji do enzymu i substratu ( $k_{-1}[ES]$ ). Oznacza to bliską zeru szybkość zmiany stężenia kompleksu enzym–substrat, a więc stałe (stacjonarne) stężenie takiego kompleksu w czasie reakcji.

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \approx 0$$

Stąd wynika poniższa zależność:

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

Należy jednak zwrócić uwagę na to, że większość reakcji enzymatycznych przebiega w warunkach znacznie większego całkowitego stężenia substratu ( $[S]_c$ ) w stosunku do całkowitego stężenia użytego enzymu ( $[E]_0$ ), to jest  $[E]_0 \ll [S]_c$ . Zatem stężenie substratu związanego z enzymem jest znacznie mniejsze od stężenia wolnego substratu,  $[ES] \ll [S]$ . W rezultacie stężenie wolnego substratu ( $[S]$ ) w trakcie reakcji praktycznie nie różni się od całkowitego stężenia substratu:

$$[S]_c = [S] + [ES] \approx [S]$$

Natomiast stężenie wolnego enzymu  $[E]$  jest równe różnicy między całkowitym stężeniem enzymu  $[E]_0$  i stężeniem kompleksu enzym-substrat:

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

Po przekształceniu powyższych danych otrzymujemy:

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

Stała Michaelisa-Menten ( $K_M$ ) zdefiniowana jest wyrażeniem:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Zatem zależność między  $[ES]$  a  $[E]_0$  i  $[S]$  przyjmuje postać:

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

Ponownie dokonując uproszczeń, otrzymujemy ostatecznie równanie Michaelisa-Menten na szybkość reakcji enzymatycznej:

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

Na podstawie wzoru podającego związek między  $[ES]$  i  $[E]_0$  oraz  $[S]$  zauważamy, że jeżeli całkowite stężenie substratu jest znacznie większe od wartości stałej Michaelisa,  $[S] \gg K_M$  i tym samym  $[S]/([S] + K_M) \approx 1$ , to stężenie kompleksu aktywnego jest równe całkowitemu stężeniu enzymu ( $[ES] = [E]_0$ ). Możemy stwierdzić więc, że wszystkie miejsca aktywne enzymu są zajęte przez substrat. W takich warunkach szybkość reakcji enzymatycznej osiąga wartość maksymalną niezależną od stężenia substratu:

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

Oznacza to, że o maksymalnej szybkości reakcji enzymatycznej przy dostatecznie dużym stężeniu substratu decyduje całkowite stężenie enzymu i stała szybkości przemiany kompleksu enzym-substrat w produkty.

Zauważmy, że kinetyczne równanie Michaelisa-Menten można zapisać jako:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

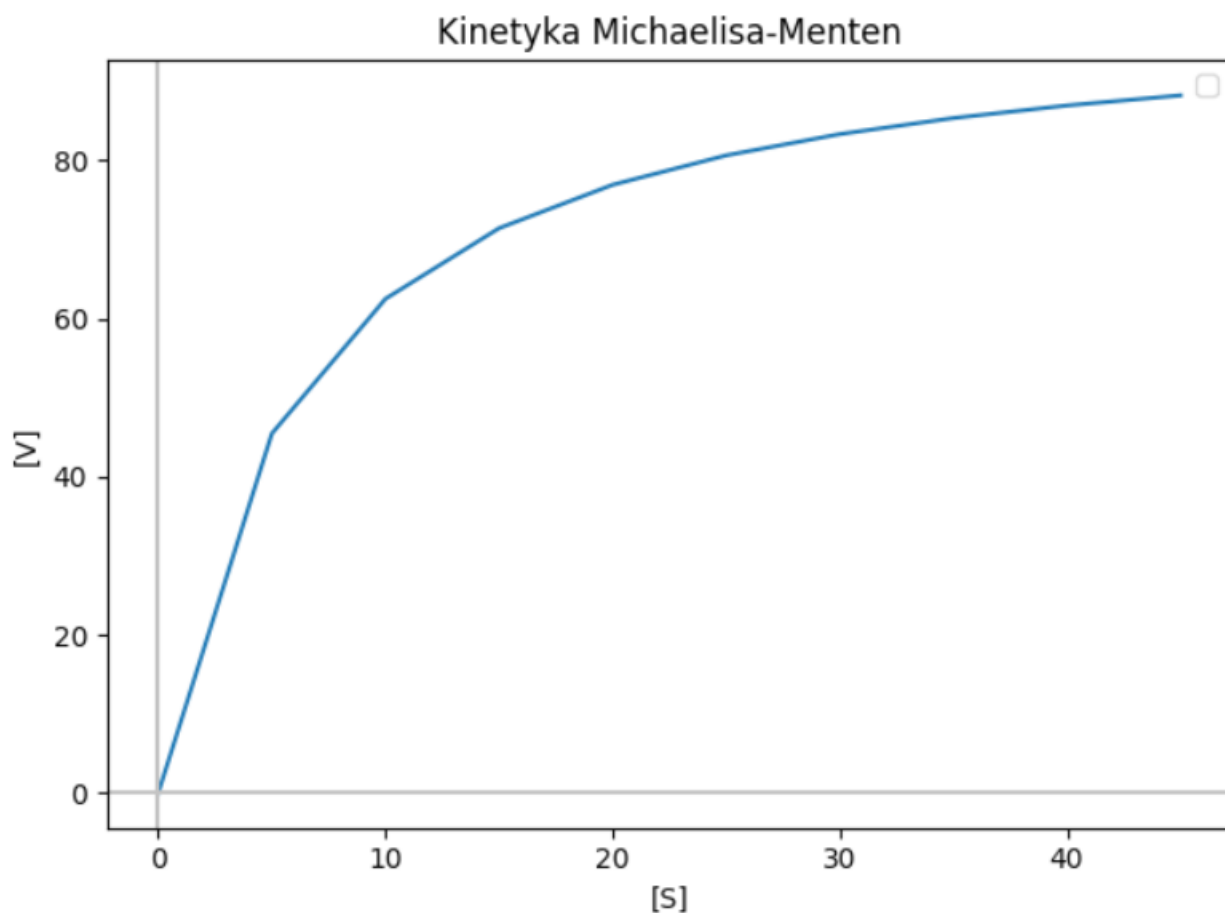
Zakładając, że  $[S] = K_M$  otrzymujemy:

$$V = \frac{k_2[E]_0}{2} = \frac{V_{max}}{2}$$

Zatem stała  $K_M$  jest liczbowo równa takiemu stężeniu substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej osiąga połowę wartości maksymalnej ( $V = V_{max}/2$ ) charakterystycznej dla danej wartości stężenia  $[E]_0$ . Podsumowując stała  $K_M$  odpowiada takiemu stężeniu substratu, przy którym obsadza on połowę miejsc aktywnych enzymu.

Poniżej przedstawiono otrzymany w sposób doświadczalny wykres Kinetyki Michaelia-Menten.

Założono następujące parametry modelu:  $V_{max} = 100 \text{ [mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}]$  oraz  $K_M = 6 \text{ [mol dm}^{-3}]$ , gdzie  $K_M$  – stała Michaelisa,  $V_{max}$  – maksymalna szybkość reakcji.



(Szybkość reakcji katalizowanej przez enzym  $[V]$  [ $\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$ ] w funkcji stężenia substratu  $[S]$  [ $\text{mol dm}^{-3}$ ] przy stałym stężeniu enzymu,  $[E]_0 \ll [S]$  ).

Przy wyższym stężeniu substratu enzym może osiągnąć maksymalną szybkość reakcji. Całkowite wysycenie enzymu substratem powoduje, że dalsze zwiększenie stężenia substratu nie może już wpłynąć na zwiększenie szybkości reakcji, co oznacza, że reakcja przebiega ze stałą, maksymalną szybkością.

## Kinetyka Michaelisa-Menten według mechanizmu Lineweavera-Burka:

W dalszej części przedstawiono analizę danych doświadczalnych zgodnie z propozycją Lineweavera-Burka.

Równanie Michaelisa-Menten przedstawiono w postaci odwrotności, skąd wynika liniowa zależność ( $y = ax + b$ ) między odwrotnością szybkości tworzenia produktu ( $y = 1/V$ ) a odwrotnością stężenia substratu ( $x = 1/[S]$ ):

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

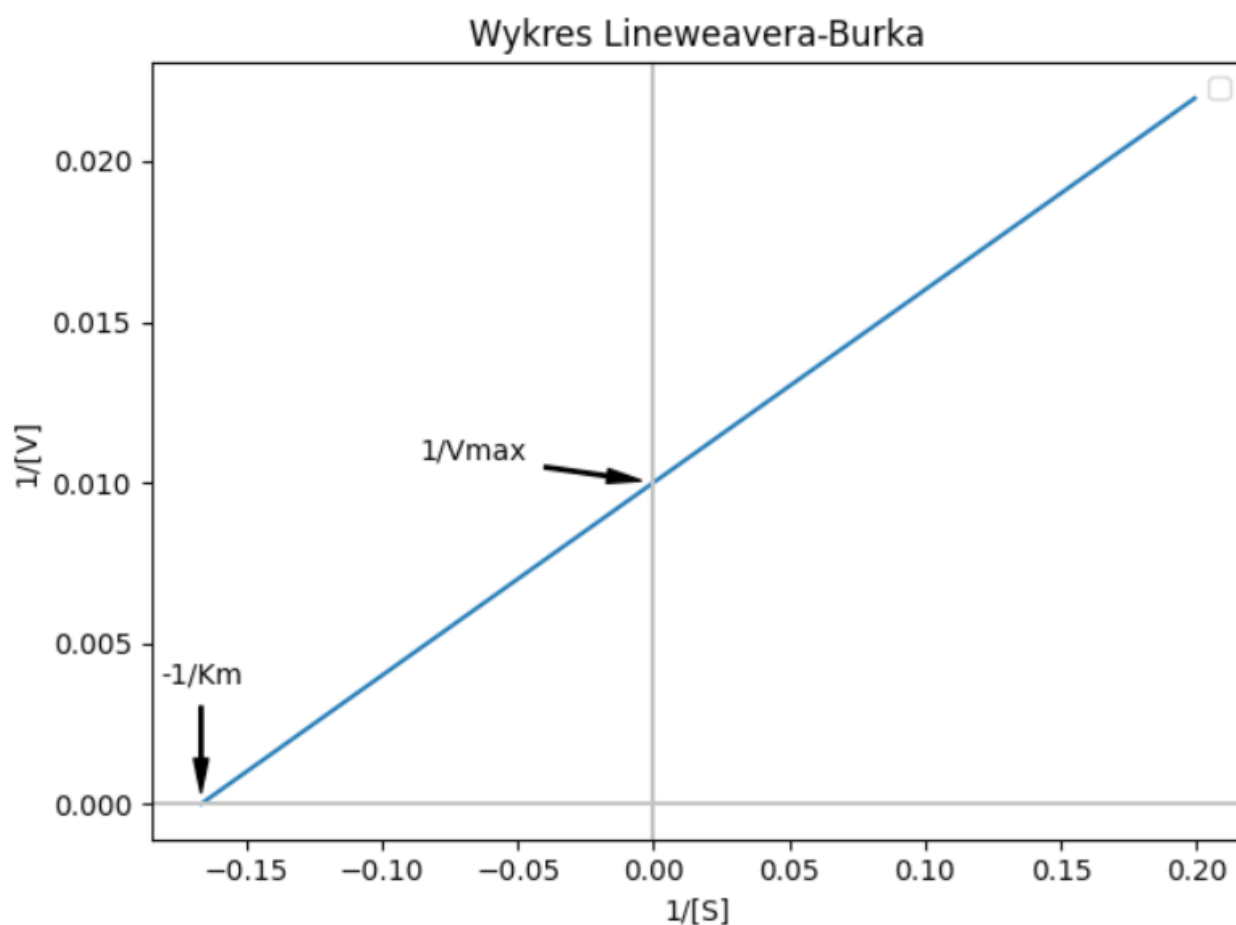
Otrzymujemy postać liniową ( $y = ax + b$ ) zależności między odwrotnością szybkości tworzenia produktu ( $1/V$ ) a odwrotnością stężenia substratu  $1/[S]$ :

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

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

$$-\frac{1}{[S]} = \frac{1}{K_M}$$

Poniżej przedstawiono otrzymany w sposób doświadczalny wykres Lineweavera-Burka, gdzie  $-1/K_M$  [ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ] wyznacza punkt przecięcia z osią X,  $1/V_{max}$  [ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}$ ] wyznacza punkt przecięcia z osią Y.



(Wykres wg. Lineweavera-Burka dla reakcji przebiegających według mechanizmu Michaelisa-Menten przedstawia zależność odwrotności szybkości reakcji enzymatycznej od odwrotności stężenia substratu przy stałym stężeniu enzymu)

Należy zwrócić uwagę, że powyższe modele zostały stworzone metodą doświadczalną w celu wizualizacji możliwie przebiegających wykresów dla reakcji wyznaczonych zgodnie z opisywaną kinetyką. Nie uwzględniono jednak przypadków granicznych takich jak bardzo niskie stężenie substratu (tylko część miejsc aktywnych enzymu uczestniczy w tworzeniu kompleksu z substratem), znacznie mniejsza stała szybkości tworzenia produktu od stałej szybkości dysocjacji kompleksu (stała Michaelisa-Menten równa stałej dysocjacji kompleksu enzym-substrat), znacznie większa stała szybkości tworzenia produktu od stałej szybkości dysocjacji kompleksu (w takim przypadku o szybkości reakcji enzymatycznej decyduje stała szybkości tworzenia kompleksu oraz całkowite stężenie enzymu i substratu). Nie zostały, także uwzględnione czynniki wpływające na aktywność enzymów takie jak: parametry fizykochemiczne środowiska reakcji, temperatura, natura rozpuszczalnika, pH i siła jonowa roztworu.



## Inhibicja aktywności kwaśnej fosfatazy:

Następnie rozważaniom poddano typ inhibicji kwaśnej fosfatazy przez fosforany (V), uwzględniając wcześniej otrzymane modele jako wzorzec.

Celem doświadczenia było wyznaczenie parametrów kinetycznych, tj. szybkości maksymalnej ( $V_{\max}$ ) i stałej Michaelisa ( $K_M$ ) reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym - kwaśną fosfatazę oraz określenie typu inhibicji aktywności tego enzymu przez fosforany (V).

Kwaśna fosfataza katalizuje rozkład substratu p-nitrofenylofosforanu na p-nitrofenol i fosforan (V). Miarą aktywności tego enzymu jest ilość wyzwolonego p-nitrofenolu, oznaczanego kolorymetrycznie przy długości fali  $\lambda = 415 \text{ nm}$ , po uprzednim zalkalizowaniu próbki. Aktywność enzymu jest hamowana w obecności fosforanów (V) o stężeniu powyżej 10 mM.

Na mikropłytkę przygotowano 12 próbek według poniższego schematu (szereg A):

Lp.	ilość 0.1 M buforu octanowego pH 4.0 ( $\mu\text{l}$ )	ilość ekstraktu (10 x rozc.) ( $\mu\text{l}$ )	ilość wody ( $\mu\text{l}$ )	ilość substratu (5 x rozc.) ( $\mu\text{l}$ )
1	80	10	60	0
2	80	10	55	5
3	80	10	50	10
4	80	10	45	15
5	80	10	40	20
6	80	10	35	25
7	80	10	30	30
8	80	10	25	35
9	80	10	20	40
10	80	10	15	45
11	80	10	10	50
12	80	0	20	50

*(Przedstawiono doświadczenie wykonywane w ramach zajęć laboratoryjnych)*

Źródło enzymu stanowił ekstrakt roślinny (kiełki kukurydzy poddane wysalaniu siarczanem amonu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  w zakresie 30-50 %). Na potrzeby doświadczenia ekstrakt rozcieńczono 10 razy. Substrat - 20 mM roztwór p-nitrofenylofosforanu w wodzie. Na potrzeby doświadczenia roztwór substratu rozcieńczony 5 razy. Inhibitor - 0.2 M roztwór  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  w wodzie.

Próbki zawierające inhibitor (szereg B) przygotowano według powyższego schematu, z tą różnicą, że ilość wody w kolumnie drugiej pomniejszono o 10  $\mu\text{l}$  i w to miejsce dodano 10  $\mu\text{l}$  roztworu inhibitora tak, aby łączna objętość w każdej studzience wynosiła 150  $\mu\text{l}$ .

Następnie próbki inkubowano przez 30 min w temp 37°C, po czym do każdej studzienki dodano po 100  $\mu\text{l}$  1 M NaOH i oznaczono wartość absorbancji na czytniku mikropłytek PowerWave przy  $\lambda = 415 \text{ nm}$ .

W tabeli poniżej przedstawiono pomiary absorbancji p-nitrofenolu przy długości fali  $\lambda = 415 \text{ nm}$ .

Lp.	A	B
1	0,087	0,083
2	0,09	0,087
3	0,098	0,091
4	0,103	0,1
5	0,1	0,096
6	0,108	0,104
7	0,11	0,103
8	0,119	0,111
9	0,115	0,112
10	0,121	0,117
11	0,114	0,11
12	0,065	0,065

*(Przedstawione wyniki uzyskano na podstawie doświadczenia wykonywanego w ramach zajęć laboratoryjnych)*

Kolejnym etapem było wyznaczenie parametrów kinetycznych, tj. szybkości maksymalnej ( $V_{\text{max}}$ ) i stałej Michaelisa ( $K_M$ ) reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym – kwaśną fosfatazę dla obu zestawów danych: seria A i seria B.

Ze względu na ten sam czas inkubacji próbek za ( $V$ ) przyjęto wartość absorbancji p-nitrofenolu podzieloną przez molowy współczynnik absorpcji (stała proporcjonalności związana z pochłanianiem promieniowania przez częściowo absorbujący i rozpraszający ośrodek), wynoszący  $16595 \text{ dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (wynikiem operacji dzielenia jest liczba moli p-nitrofenolu, który powstał).

W celu wyznaczenia  $[S]$  dokonano obliczeń na podstawie wyżej wymienionych danych. Zakładając, że stężenie substratu wynosiło 20 mM oraz substrat rozcieńczany był 5x otrzymujemy, że miał stężenie 4 mM. Dodatkowo należało uwzględnić rozcieńczenie wynikające z dodawania różnych ilości substratu do całkowitej objętości wynoszącej 150  $\mu\text{l}$ .

Poniżej przedstawiono obliczone wartości [V] i [S] dla szeregu A i B.

Obliczone wartości dla szeregu A

[V]	1/[V]	[S]	1/[S]	ilość substratu
5,24254E-06	190747,1264	0		0
5,42332E-06	184388,8889	0,133333333	7,5	5
5,90539E-06	169336,7347	0,266666667	3,75	10
6,20669E-06	161116,5049	0,4	2,5	15
6,02591E-06	165950	0,533333333	1,875	20
6,50798E-06	153657,4074	0,666666667	1,5	25
6,6285E-06	150863,6364	0,8	1,25	30
7,17083E-06	139453,7815	0,933333333	1,071428571	35
6,9298E-06	144304,3478	1,066666667	0,9375	40
7,29135E-06	137148,7603	1,2	0,833333333	45
6,86954E-06	145570,1754	1,333333333	0,75	50
3,91684E-06	255307,6923	1,333333333	0,75	50

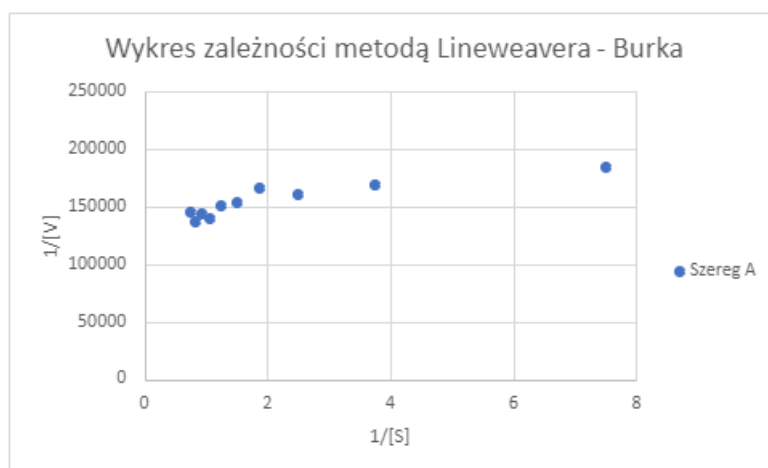
Obliczone wartości dla szeregu B

[V]	1/[V]	[S]	1/[S]	ilość substratu
5,00151E-06	199939,759	0		0
5,24254E-06	190747,1264	0,133333333	7,5	5
5,48358E-06	182362,6374	0,266666667	3,75	10
6,02591E-06	165950	0,4	2,5	15
5,78487E-06	172864,5833	0,533333333	1,875	20
6,26695E-06	159567,3077	0,666666667	1,5	25
6,20669E-06	161116,5049	0,8	1,25	30
6,68876E-06	149504,5045	0,933333333	1,071428571	35
6,74902E-06	148169,6429	1,066666667	0,9375	40
7,05032E-06	141837,6068	1,2	0,833333333	45
6,6285E-06	150863,6364	1,333333333	0,75	50
3,91684E-06	255307,6923	1,333333333	0,75	50

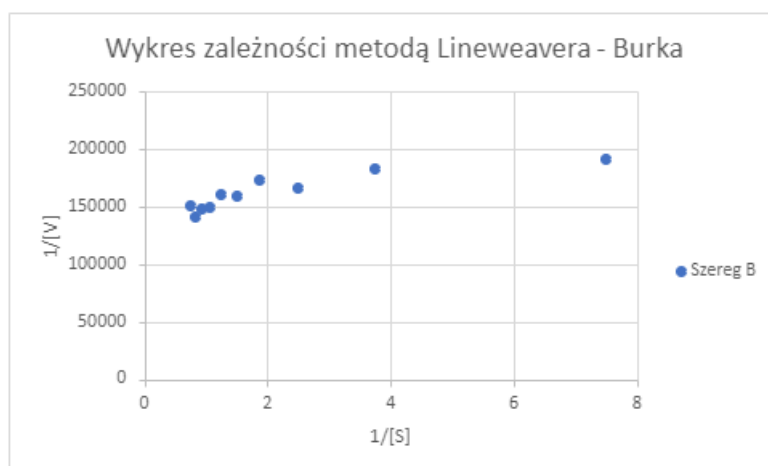
Na podstawie powyższych danych opracowano wykresy metodą Lineweavera-Burka.

Wykresy przedstawiają zależność odwrotności szybkości ( $1/V$ ) [ $\text{mmol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s} \times 10^{-6}$ ] od odwrotności stężenia substratu ( $1/S$ ) [ $\text{mmol}^{-1} \text{dm}^3 \times 10^{-6}$ ].

Szereg A:

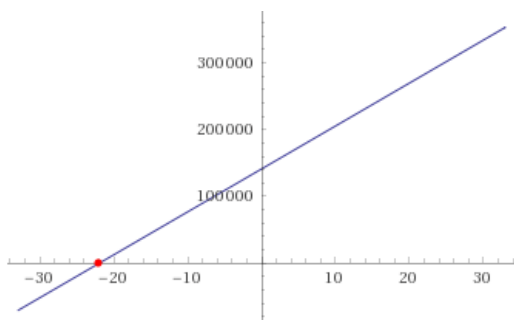


Szereg B:



Korzystając z wykresów zależności otrzymanych metodą Lineweavera-Burka obliczono  $K_M$ ,  $V_{\max}$  i określono rodzaj inhibicji szeregu B.

Szereg A:



$$f(x) = 6430,2x + 141054$$

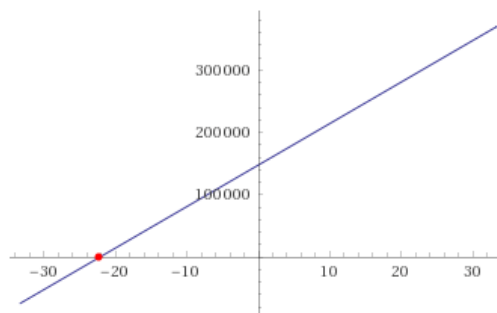
$$1/V_{\max} \text{ (przecięcie z osią y)} = 141054$$

$$-1/K_M \text{ (przecięcie z osią x)} = -21,936176169$$

$$V_{\max} = 0,000007089$$

$$K_M = 0,045586797$$

Szereg B:



$$f(x) = 6665,1x + 147657$$

$$1/V_{\max} \text{ (przecięcie z osią y)} = 147657$$

$$-1/K_M \text{ (przecięcie z osią x)} = -22,153756133$$

$$V_{\max} = 0,000006772$$

$$K_M = 0,045139072$$

Porównując wartości  $K_M$  i  $V_{\max}$  obu szeregów wywnioskowano, że inhibicja w szeregu B była inhibicją niekompetycyjną, ponieważ  $V_{\max}$  szeregu A i B różnią się od siebie, natomiast  $K_M$  są bardzo zbliżone.

Inhibitory niekompetycyjne nie zapobiegają wiązaniu substratu z enzymem, ale uniemożliwiają katalizę odpowiedniej reakcji i w konsekwencji wytworzenie produktu. Zasada działania inhibicji niekompetycyjnej polega na zmniejszeniu liczby funkcjonalnych cząsteczek enzymów, które mogą przeprowadzić reakcję. W przypadku tego rodzaju inhibicji reakcja nigdy nie osiągnie prędkości maksymalnej. Dlatego też zauważono zmiany w wartościach  $V_{\max}$  w szeregu B w stosunku do szeregu A. Stężenie enzymu (które determinuje prędkość maksymalną) będzie zmniejszone, przy niezmiennym  $K_M$ . Niezmienione  $K_M$  mówi o tym, że inhibitor nie wpływa na wiązanie enzymu z substratem, tylko obniża stężenie użytecznego enzymu.

## Podsumowanie:

Kinetyka reakcji chemicznych zajmuje się badaniem szybkości przebiegu reakcji w zależności od różnych czynników takich jak: stężenia reagentów, temperatury, obecności katalizatorów lub inhibitorów. Zadaniem kinetyki jest ustalenie charakteru reakcji i matematyczne ujęcie zależności pomiędzy szybkością reakcji a czasem jej trwania, co umożliwia podanie szybkości reakcji w dowolnym czasie i przy dowolnym stężeniu substratu.

**Bibliografia:**

- Berg J.M., Tymoczko J. L., Stryer L.: Biochemia. PWN, Warszawa, 2009
- <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/kinetyka-enzymow>
- <https://pl.khanacademy.org/science/biology/energy-and-enzymes/enzyme-regulation/a/basics-of-enzyme-kinetics-graphs>
- <https://www.polsl.pl/Wydzialy/RCh/RCh2/Documents/bioenzBkinetyka.pdf>
- <http://mst.mimuw.edu.pl/lecture.php?lecture=ona&part=Ch4>
- <https://pl.wikipedia.org/wiki/Enzymy>