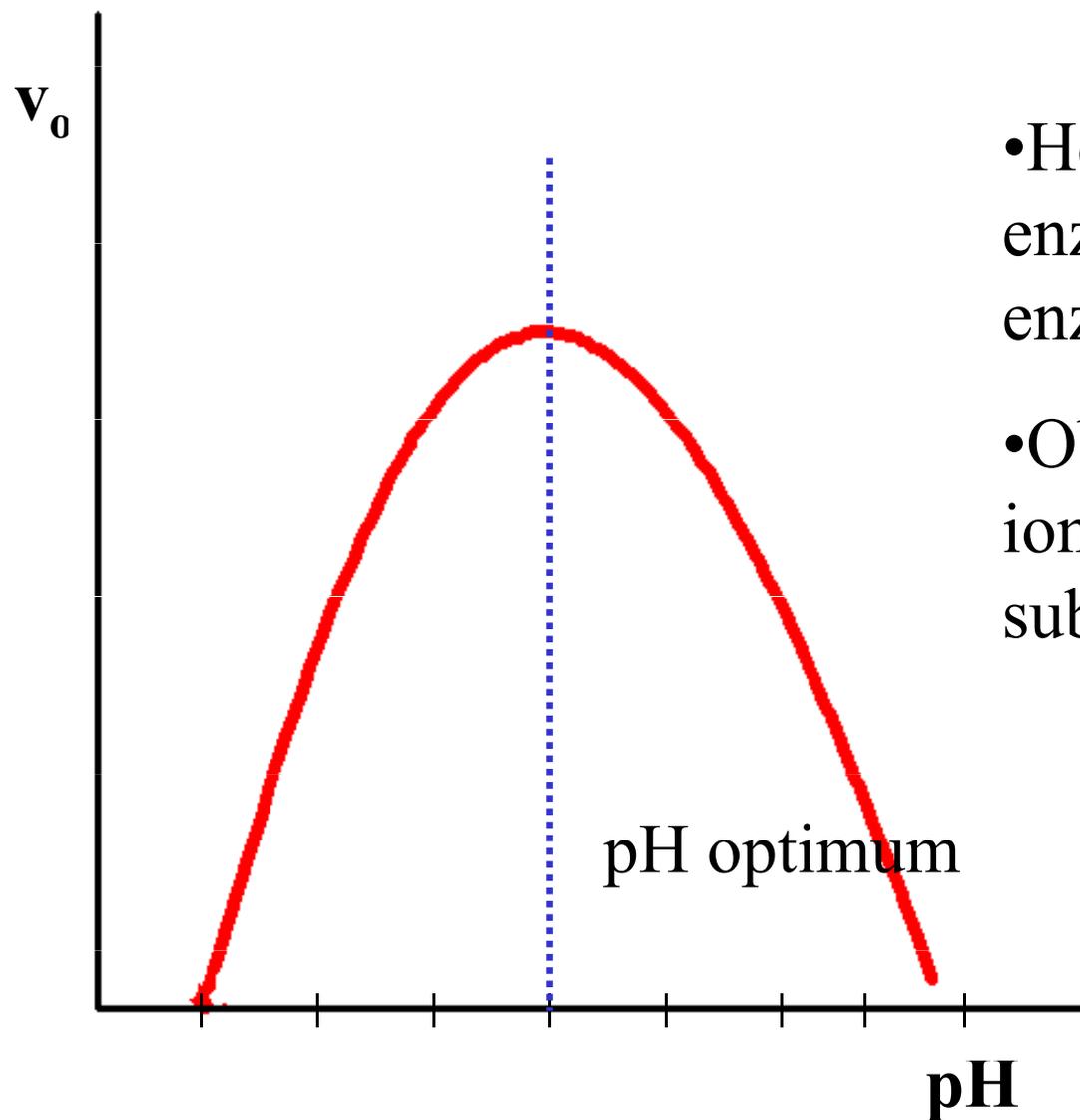


Ovlivnění katalytické aktivity enzymů

Kvantifikace enzymů

© Biochemický ústav LF MU 2012 (J.D., E.T.)

Vliv pH na aktivitu enzymů



- Hodnota pH ovlivňuje ionizaci enzymu, substrátu a komplexu enzym-substrát.
- Obvykle reagují pouze ionizované formy enzymu a substrátu

pH nastavujeme pomocí pufřů

Požadavky na dobrý pufr

Faktory chemické a biochemické.

Chemické faktory:

- dobrá rozpustnost ve vodě, špatná rozpustnost v org. rozpouštědlech
- nekomplexace nebo srážení iontů Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ad.
- ne reakce se složkami studovaného systému (vazba bílkovin na boritany)
- ne náchylnost k bakteriální kontaminaci (glycin, citráty, fosfáty)
- ne silná ionizace
- spektrální charakteristika

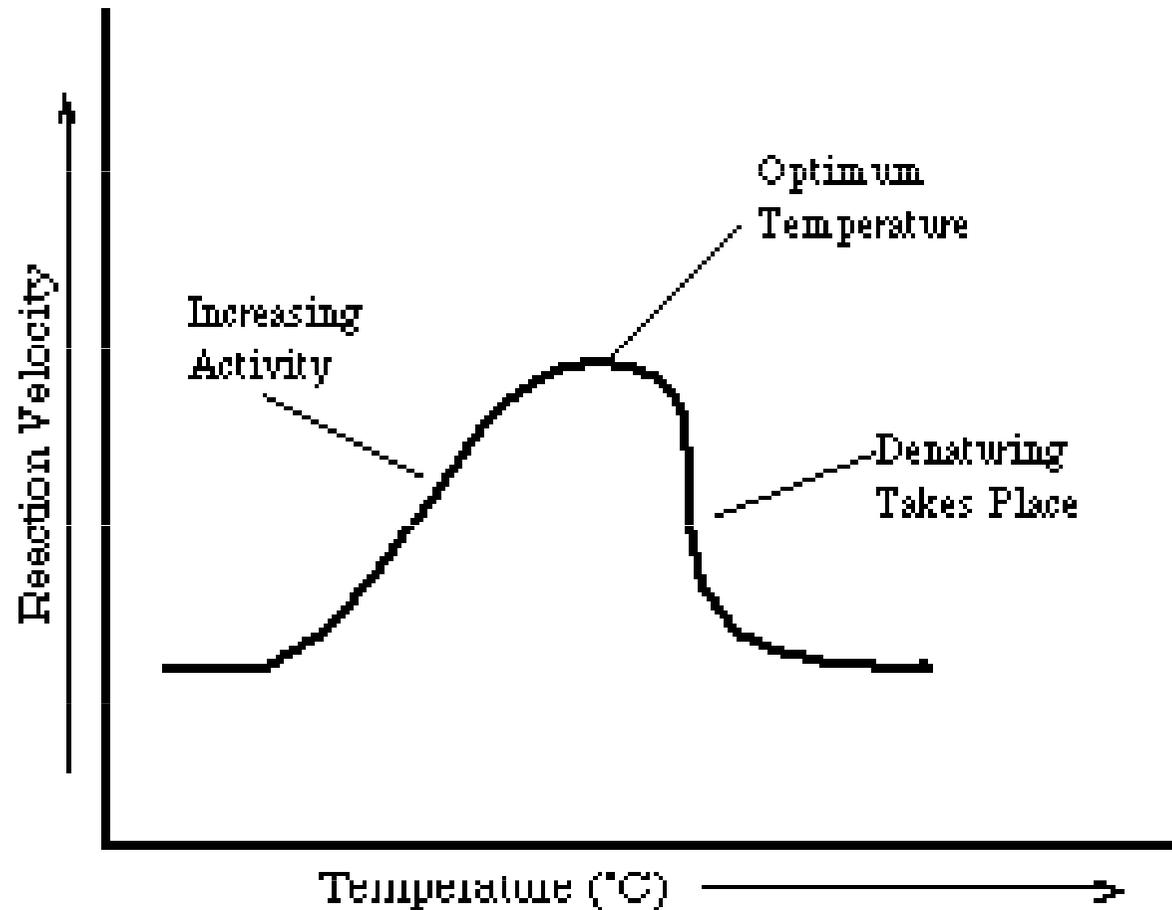
Biochemické faktory:

- ne ovlivňování aktivity enzymu
- rezistence vůči enzymové aktivitě
- ne schopnost přecházet přes membrány
- ne interference s oxidační fosforylací
- ne reakce s kofaktory reakcí

Goodovy pufry:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/14572938>

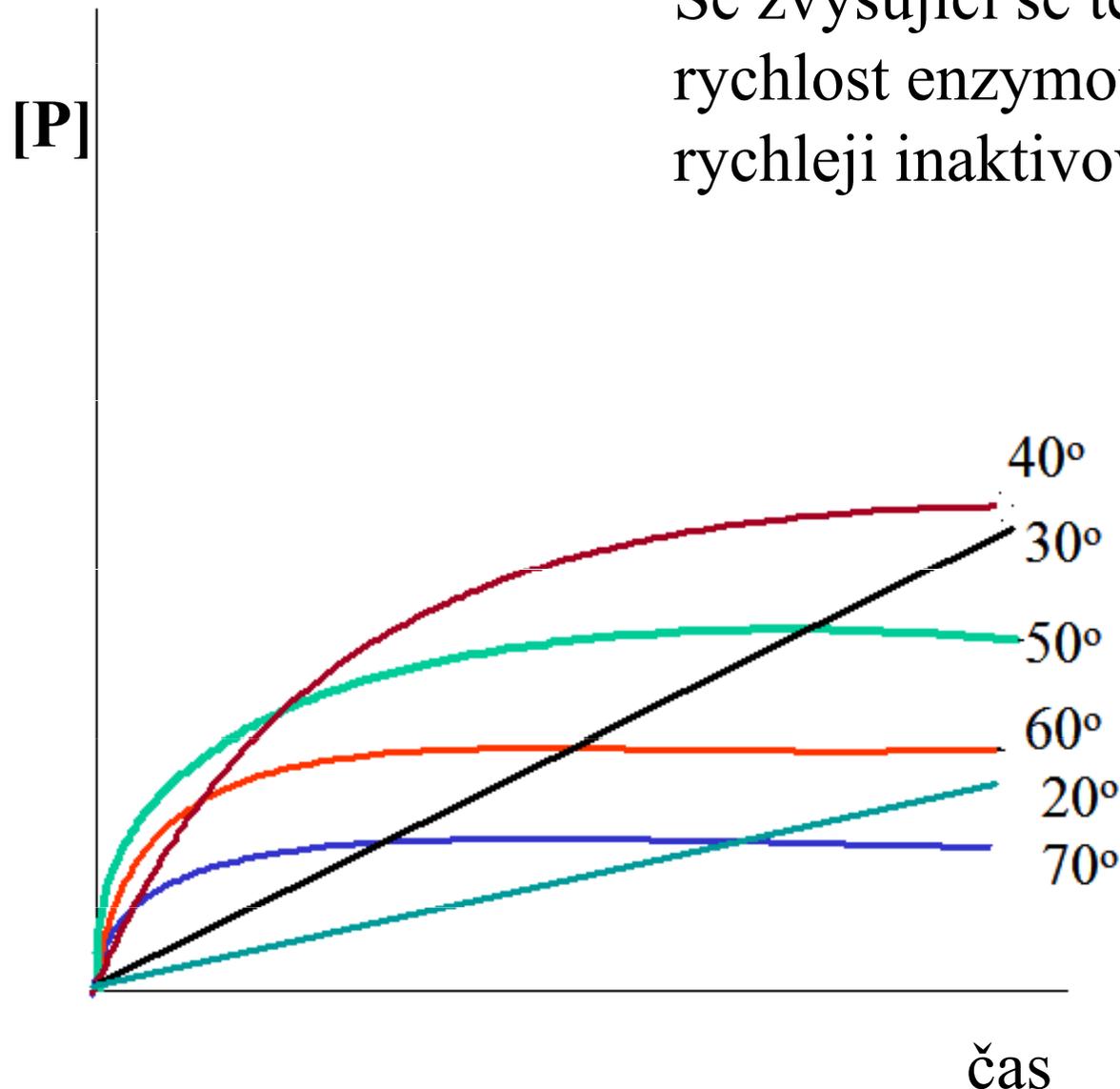
Vliv teploty na aktivitu enzymů



Se zvyšováním teploty se rychlost enzymové reakce zvyšuje až k hodnotě maxima, pak se začíná projevovat tepelná denaturace enzymu

Vliv teploty na aktivitu enzymů

Se zvyšující se teplotou vzrůstá počáteční rychlost enzymové reakce, enzym je však rychleji inaktivován.



Q_{10} - faktor
udávající kolikrát se
zvýší rychlost
enzymové reakce,
při změně teploty o
 10°C (obvykle
hodnota 2)

Enzymy z termofilních organismů - odlišné optimální teploty.

Např. Taq-polymeráza $T_{\text{opt.}}=75^{\circ}\text{C}$

Kvantifikace enzymů

Množství enzymu v biologickém materiálu lze vyjádřit dvojím způsobem

Nepřímé stanovení

- katalytická koncentrace
- **$\mu\text{kat/l}$** 
- stanoví se produkt enzymové reakce
- většina klinicky významných enzymů

Přímé stanovení

- hmotnostní koncentrace
- **$\mu\text{g/l}$** 
- stanoví se molekula enzymu jako antigen (imunochemicky)
- jen některé enzymy v extrémně nízkých koncentracích
- např. tumorové markery

Katalytická aktivita enzymu

- zavedena jednotka **katal**, $1 \text{ kat} = \text{mol/s}$
- jeden katal je katalytická aktivita enzymu, při které se v reakci přemění jeden mol substrátu za sekundu

mezinárodní jednotka **IU** (international unit)

$1 \text{ IU} = \mu\text{mol/min}$

Převodní vztahy:

$1 \mu\text{kat} = 60 \text{ IU}$

$1 \text{ IU} = 16,6 \text{ nkat}$

Katalytická koncentrace enzymu

- aktivita je vztažena na objem biologické tekutiny (krevní sérum)
- jednotky mkat/l, μ kat/l

Stanovení katalytické aktivity

- optimální podmínky (teplota, pH, pufr, kofaktory)
- měří se počáteční rychlost reakce
- měří se $\Delta[S]$ nebo $\Delta[P]$ v určitém časovém intervalu
- kinetika 0. řádu, $[S] \gg K_m \Rightarrow$ nasycený enzym, rychlost je konstantní, blíží se V_{\max}

Dvě metody stanovení katalytické koncentrace enzymu

Kinetická

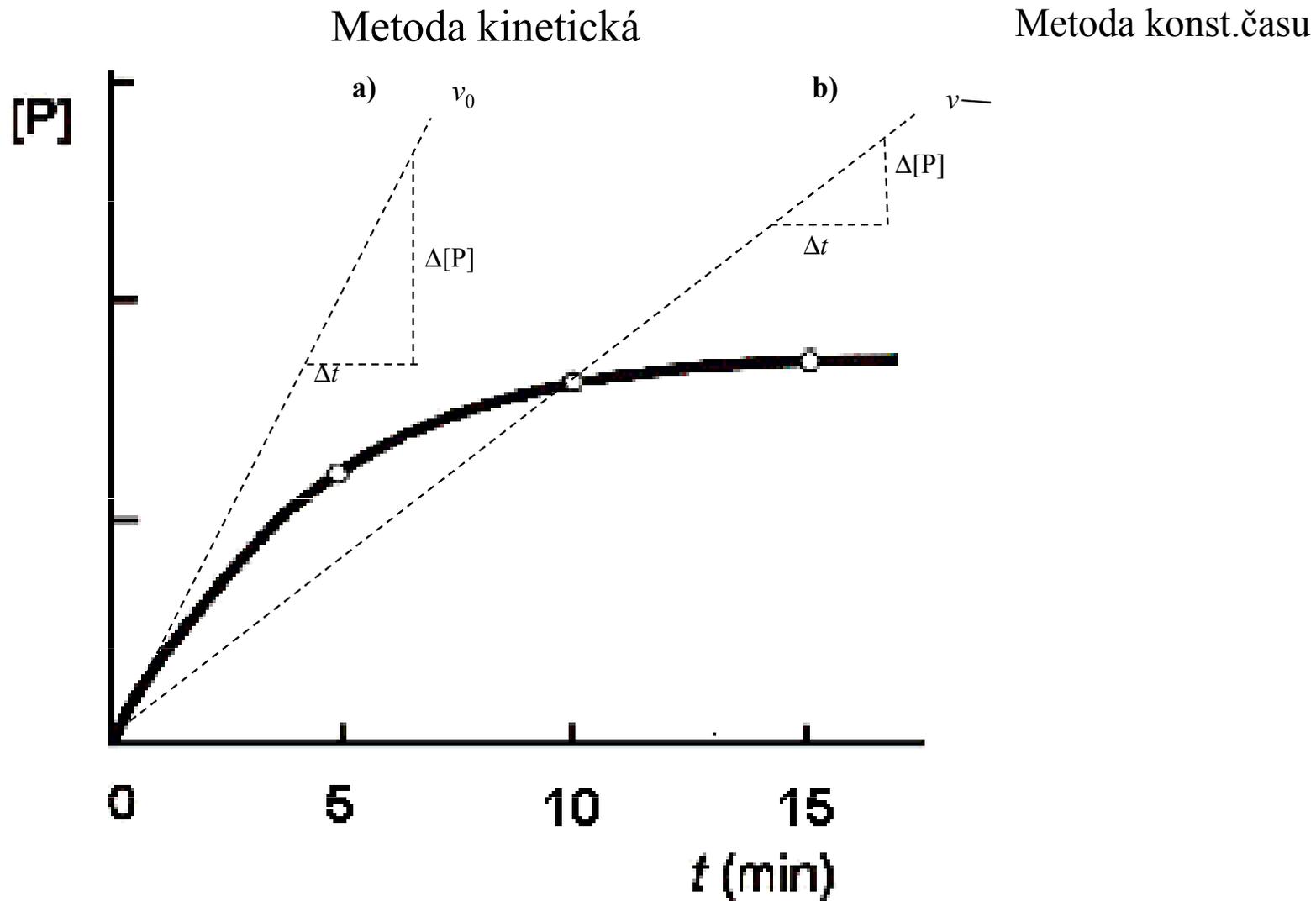
- průběžně se měří [S] nebo [P]
- řada měření (nebo kontinuálně)
- zjistí se v_0 z kinetické křivky
- přesná metoda

Konstantního času

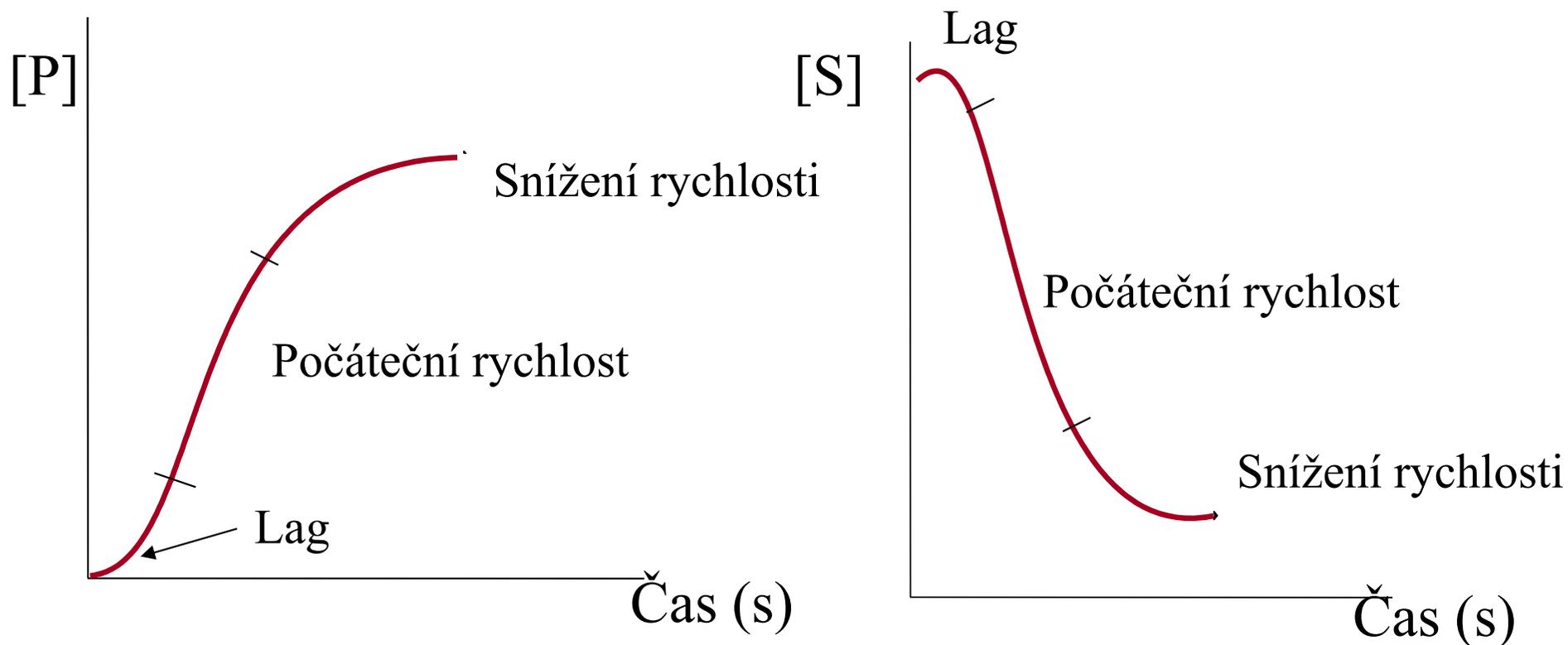
Starší metoda

- měří se [P] po proběhnutí reakce
- jedno měření
- zjistí se průměrná rychlost $\Delta[P]/\Delta t$
- méně přesná, založena na předpokladu, že reakční rychlost je konstantní

Možnosti stanovení kvantity enzymu



Závislost koncentrace na čase v enzymové reakci



Bezprostředně po přidání vzorku obsahujícího enzym do reakční směsi probíhá perioda ekvibrace, během které se enzym a substrát mísí. Tato doba se nazývá lag-fáze (s- min). Během lag fáze nelze měřit aktivitu enzymu.

Příklad 1

Při enzymové reakci byl do roztoku substrátu v pufru přidán vzorek obsahující enzym (0,1 ml).

Po 5 min bylo stanoveno 0,2 mmol produktu.

Jaká je katalytická koncentrace enzymu ve vzorku?

Příklad 1 - Řešení

$$t = 5 \text{ min} = 5 \cdot 60 \text{ s} = 300 \text{ s}$$

za 300 s ... vzniklo 0,2 mmol produktu

za 1 s ... $x = 0,2/300 = 6,7 \cdot 10^{-4}$ mmol / na 0,1 ml vzorku

na 1 litr vzorku = $6,7 \cdot 10^{-4} \cdot 10^4 = 6,7$ mmol/l.s = **6,7 mkat/l**

Příklad 2

Reakční směs obsahovala:

2,5 ml pufru

0,2 ml roztoku koenzymu NADH (optický test)

0,1 ml krevního séra

0,2 ml roztoku substrátu

Po 60 s byl pokles absorbance koenzymu $\Delta A = 0,03$. $\epsilon = 6220$ l/mol.cm, šířka kyvety $l = 1$ cm. Jaká je katalytická koncentrace enzymu?

Příklad 2 - Řešení

Vzorek séra byl zředěn: $V_{\text{kon}}/V_{\text{puv}} = 3,0 / 0,1 = 30$

Lambertův-Beerův zákon: $\Delta A = \varepsilon \Delta c l$ / za urč. čas $\Delta t \Rightarrow$

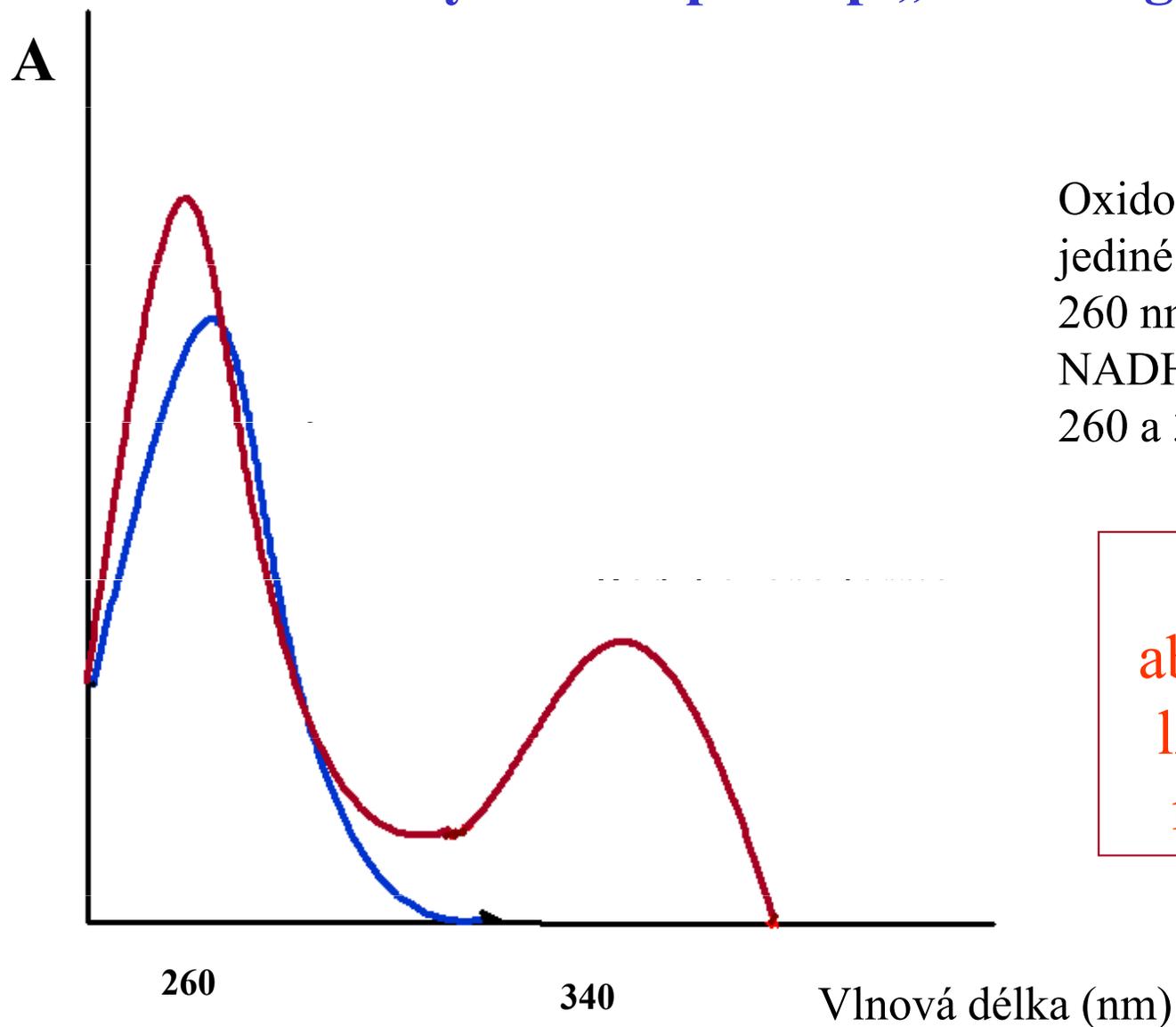
z toho odvodíme změnu koncentrace za 60 s:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l \cdot \Delta t} = \frac{0,03}{6220 \cdot 1 \cdot 60} = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l.s}$$

Nutno násobit zředěním: $30 \cdot 8 \cdot 10^{-8} = 2,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l.s} =$

$2,4 \cdot 10^{-6} \text{ kat/l} = \mathbf{2,4 \mu\text{kat/l}}$

Absorpční spektrum oxidované a redukované formy NAD^+ - princip „Warburgova optického



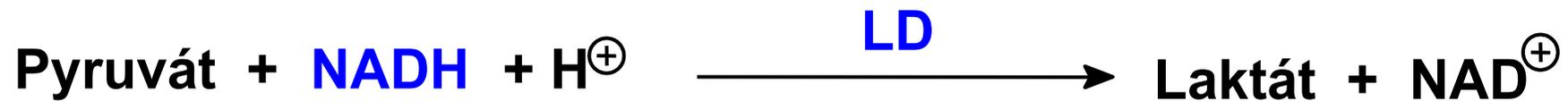
Oxidovaná forma NAD^+ má jediné absorpční maximum při 260 nm, redukovaná forma NADH má absorpční maxima při 260 a 340 nm

Měřením změn absorbance při 340 nm lze sledovat přírůstek nebo úbytek NADH

Lze též měřit fluorescenci při 450 nm (pouze redukovaná forma).

Princip měření aktivity laktátdehydrogenasy

LD



optický test

při reakci klesá absorbance
 $\Delta A / \Delta t$

Volba substrátů při stanovení enzymové aktivity

Přírodní nebo syntetické substráty.

Syntetické – často vyšší rychlost enzymové reakce.

Syntetický substrát (obvykle levnější, stabilnější, dobře rozpustný, lépe definovaný...)

Inhibitory a aktivátory enzymů

Aktivátory enzymů

Pro svou aktivitu enzymy často vyžadují přítomnost dalších látek – **aktivátorů**.

Jsou to např. nízkomolekulární látky (meziprodukty, produkty).

Řada enzymů vyžaduje přítomnost iontů – často Mg^{2+}

Inhibice enzymů (snížení aktivity)

Ireverzibilní

- inhibitor pevně vázán na enzym (akt. místo)
- organofosfáty
- ionty těžkých kovů
- kyanidy

Reverzibilní

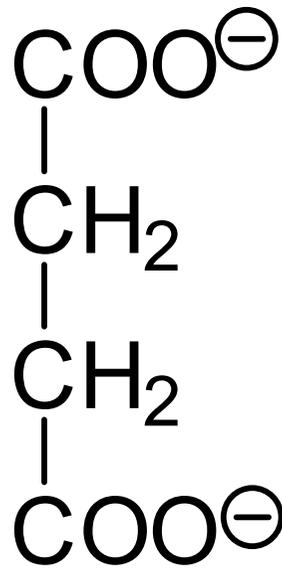
- inhibitor volně vázán
- rovnováha $E+I \rightleftharpoons E-I$
- inhibitor lze odstranit (dialýza, gel. filtrace)
- dva základní typy:
kompetitivní, nekompetitivní

Kompetitivní inhibice

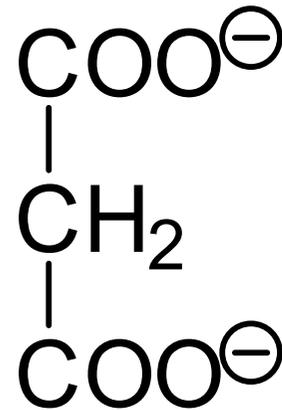
- inhibitor je strukturně podobný substrátu
- váže se do aktivního místa
- soutěží s fyziologickým substrátem
vazebné místo

o

Přirozený substrát vs. kompetitivní inhibitor



sukcinát



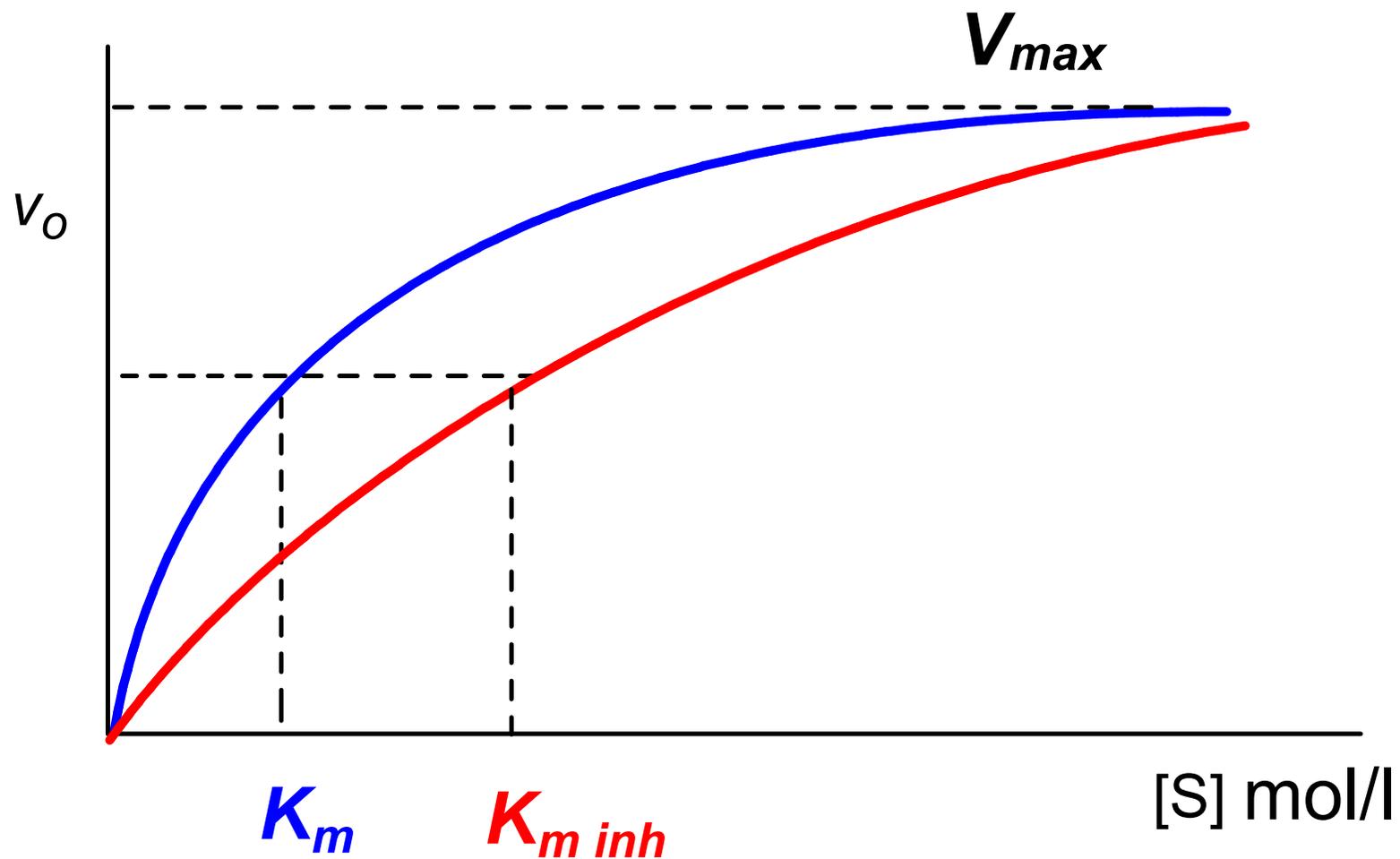
malonát

Malonát je inhibítozem sukcinátdehydrogenasy

Kompetitivní inhibice

- maximální rychlost je dosažena až za vyšších hodnot [S]
- V_{\max} se nemění
- K_m se zvyšuje

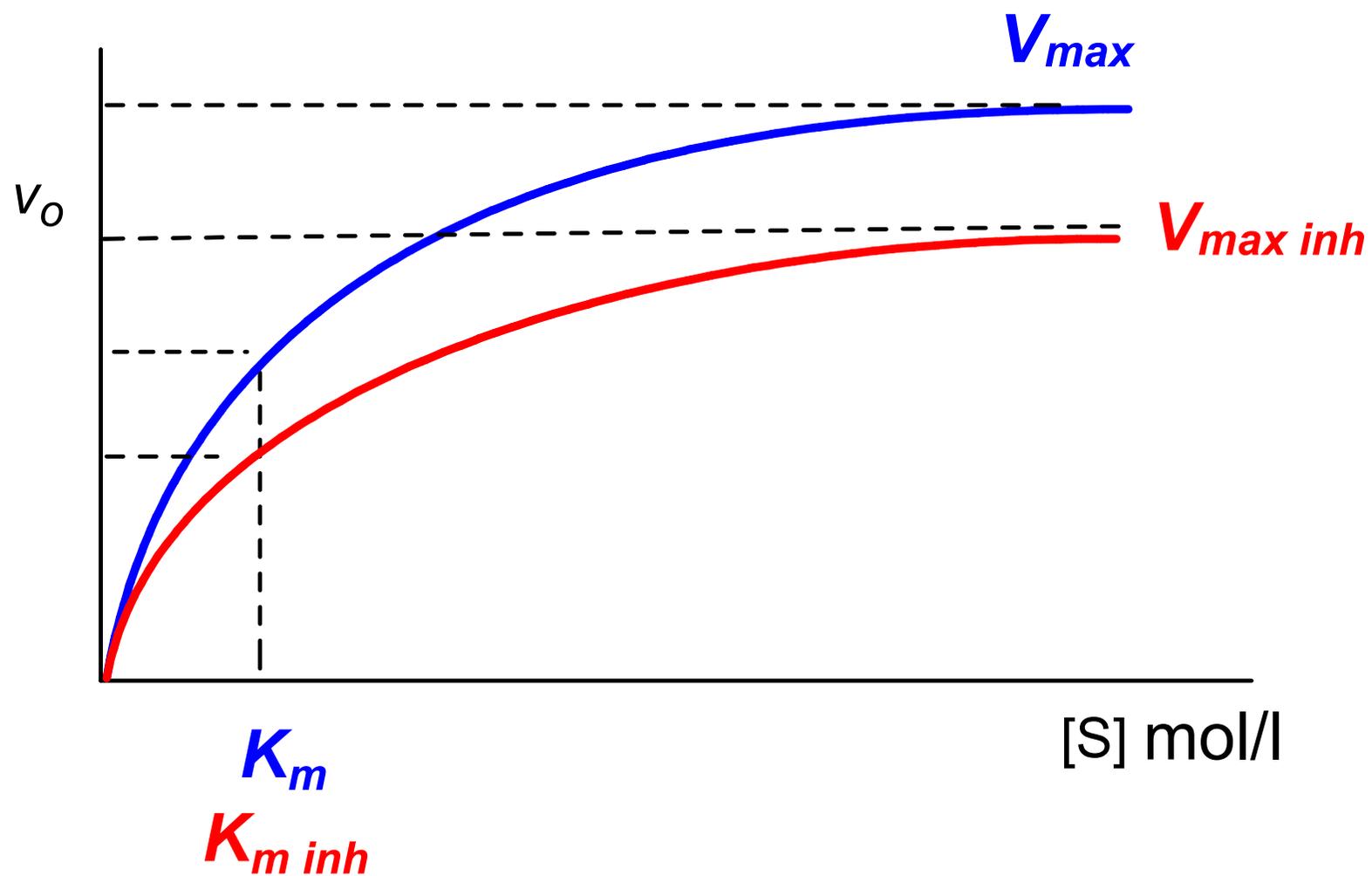
Kompetitivní inhibice



Nekompetitivní inhibice

- Inhibitor se váže mimo aktivní centrum na E i na komplex E-S
- K_m se nemění (aktivní místo je volné pro substrát)
- V_{max} se snižuje, protože klesá koncentrace funkčního komplexu E-S

Nekompetitivní inhibice



Inhibitory a aktivátory při enzymových stanoveních

Mohou být obsaženy ve vzorku, činidle, pufru, skle apod. Inhibovat může i produkt.

Např. EDTA inaktivuje ALP protože komplexuje Zn, který je v jeho aktivním centru.

Na⁺ slouží jako aktivátor ALP

Viz též:

<http://www.worthingtonbiochem.com/index/manual.html>

Mnohá léčiva jsou inhibitory enzymů

- Acetylsalicylová kyselina (cyklooxygenasa)
- Ibuprofen (cyklooxygenasa)
- Statiny (HMG-CoA reductasa) – hypolipidemika, snižují syntézu cholesterolu (lovastatin)
- Inhibitory ACE (angiotensin konvertující enzym) – léčba hypertenze (enalapril)
- Rev. inhibitory acetylcholinesterasy (neostigmin) – nervosvalové choroby, pooperační atonie střev
- Selektivní inhibitory mozkové acetylcholinesterasy (rivastigmin, galantamin) - Alzheimerova choroba

Antibiotika inhibují enzymy nutné pro určitý životní děj bakterií

- Peniciliny – inhibují transpeptidasy (výstavba buněčné stěny)
- Tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol – inhibice proteosyntézy
- Fluorované chinolony (ciprofloxacin) – inhibice bakteriální gyrasy (topoisomerasy II) (rozplétání DNA během replikace)
- Sulfonamidy – blokují syntézu folátu

Izoenzymy

- katalyzují stejnou reakci, ale liší se primární strukturou a tedy fyz.-chem. a kinetickými vlastnostmi
- mají často různou tkáňovou distribuci
- stanovují se elektroforézou
- **izoformy** – obecnější termín (zahrnují ještě pseudoizoenzymy, posttranslační varianty)

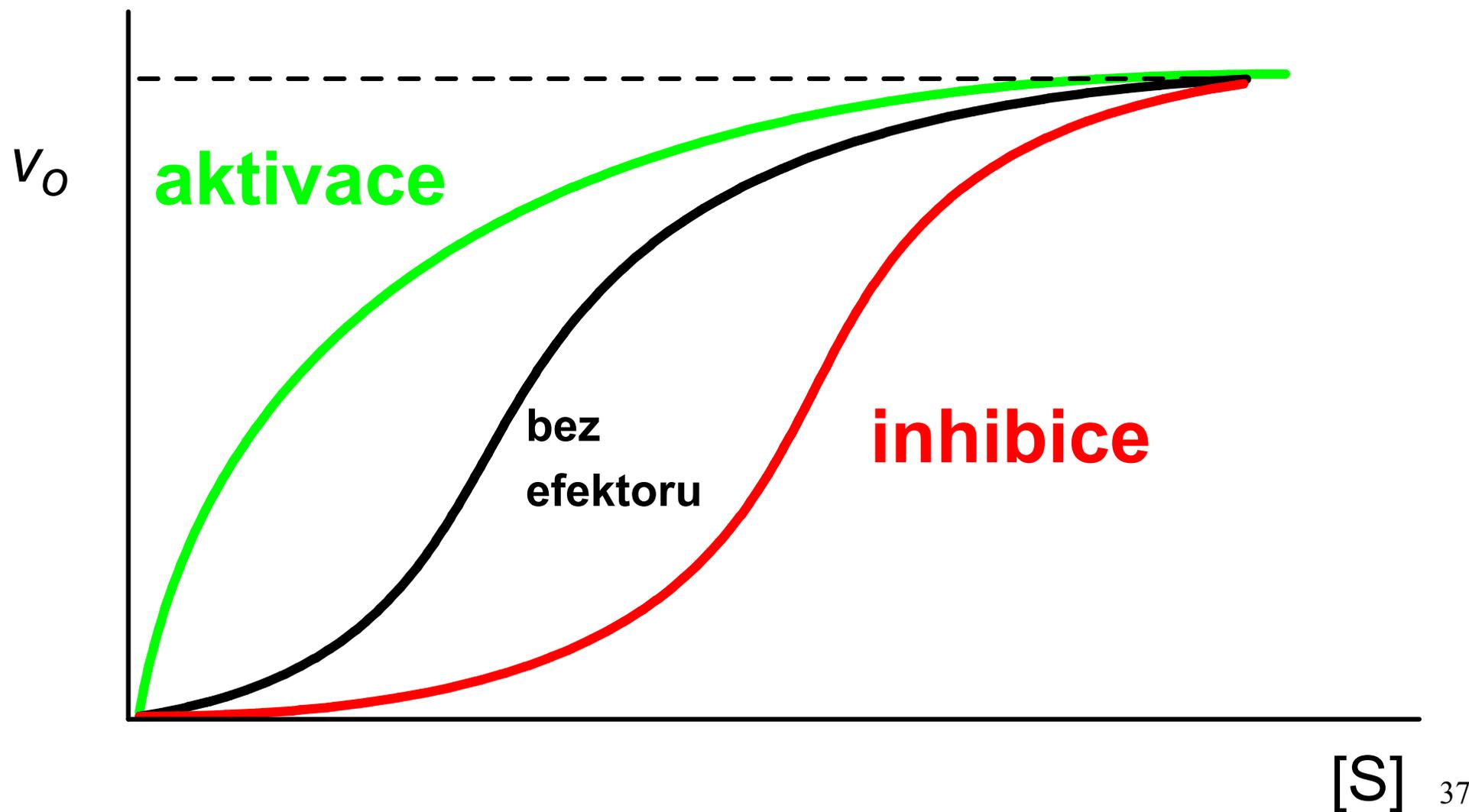
Kreatinkinasa (CK) je dimer a tvoří tři izoenzymy

Izoenzym	Výskyt	Procento celk. aktivity	Zvýšení
CK-MM	svaly	94-96 %	svalové trauma
CK-MB	srdce	do 6 %	infarkt
CK-BB	mozek	stopy	poranění mozku

Allosterické enzymy jsou oligomerní

- více podjednotek, často regulační a katalytická
- na enzym se váže efektor strukturně odlišný od substrátu, často produkt
- váže se do allosterického místa – **jiné než aktivní místo**
- vazba vyvolá změnu konformace enzymu \Rightarrow změna aktivity - allosterická aktivace nebo inhibice

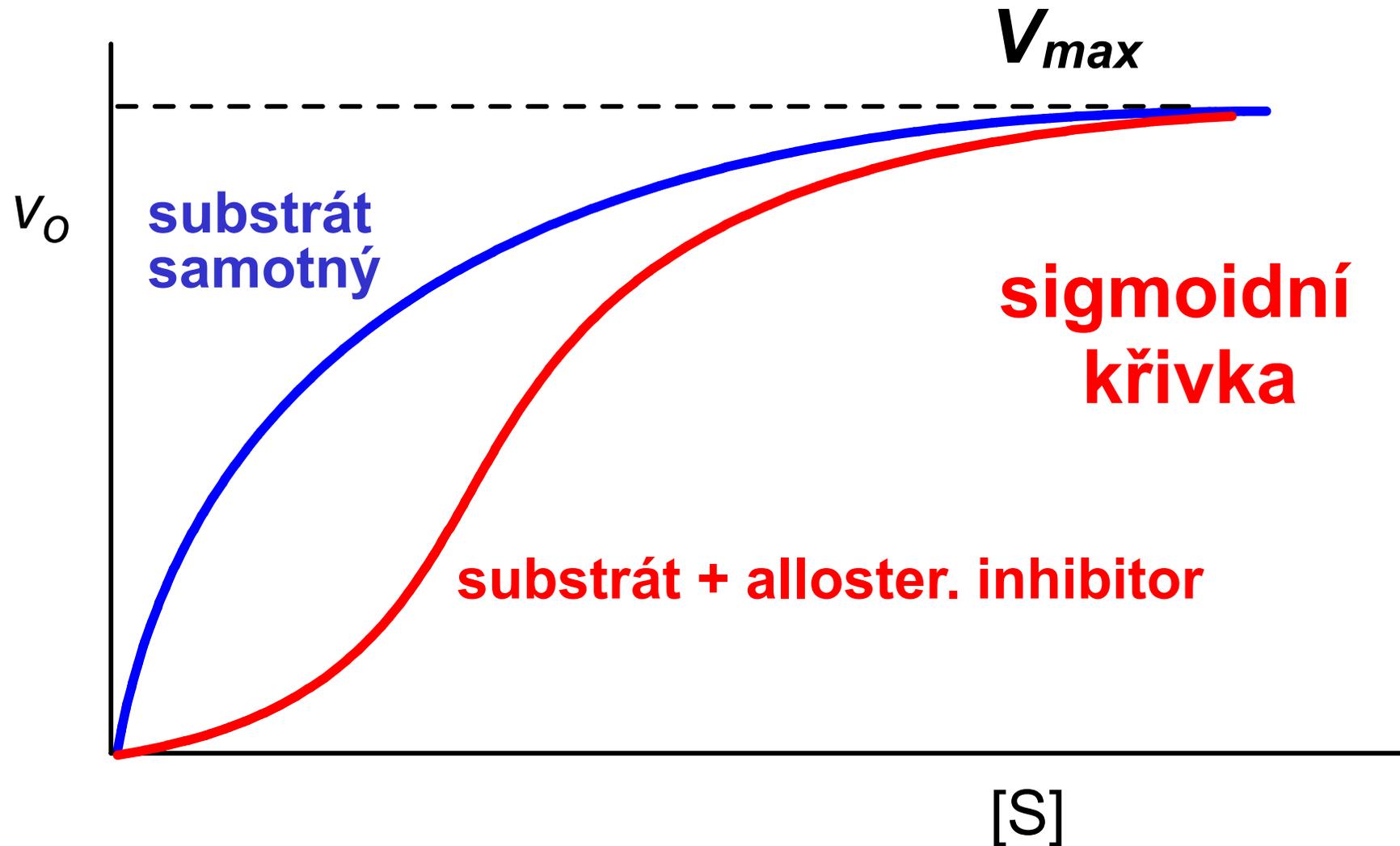
Allosterická aktivace a inhibice



Kooperativní efekt

- u oligomerních enzymů a proteinů
- více podjednotek \Rightarrow více vazebných míst
- odlišná kinetika
- saturační graf je sigmoidní
- navázání substrátu (nebo jiné látky) na jednu podjednotku indukuje změny konformace u ostatních, že se další molekuly vážou snadněji (obtížněji)

Sigmoidní saturační graf



(srov. saturační křivku hemoglobinu a myoglobinu)

Využití enzymů v lékařství

1. enzymy jako **indikátory** patologického stavu:
při poškození buněk se zvyšuje aktivita intracelulárních
enzymů v extracelulární tekutině
2. enzymy jako **analytická činidla** v klin. biochemii
3. enzymy jako **léčiva**

Příklady enzymů v klinické diagnostice

Enzym	Referenční hodnoty ^a	Interpretace zvýšení
ALT	do 0,9 μ kat/l	hepatopatie
CK	do 4 μ kat/l	myopatie, infarkt myokardu
PSA	do 5 μ g/l	karcinom prostaty
NSE	do 13 μ g/l	bronchogenní karcinom

^a V krevním séru, hodnoty pro muže nad 15 let

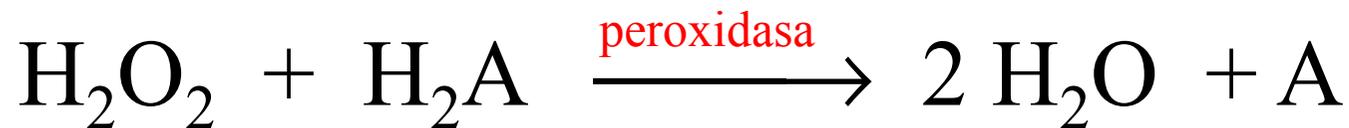
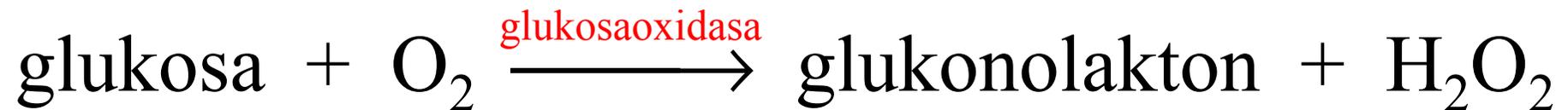
ALT alaninaminotransferasa, CK kreatinkinasa,

PSA prostatický specifický antigen, NSE neuron specifická enolasa

Enzymy jako analytická činidla

Enzym	Původ enzymu	Stanovení
Glukosaoxidasa	<i>Aspergillus niger</i>	glukosa
Peroxidasa	křen	glukosa
Lipasa	<i>Candida</i> sp.	triacylglyceroly
Cholesteroloxidasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	cholesterol
Urikasa	<i>Candida</i> sp.	kyselina močová
Bilirubinoxidasa	<i>Myrothecium</i> sp.	bilirubin
Ureasa	bob (<i>Canavalia</i> sp.)	močovina
Laktátdehydrogenasa	<i>Pediococcus</i> sp.	ALT, AST

Enzymové stanovení glukosy



bezbarvý
chromogen

barevný produkt
(měří se absorbance)

Princip stanovení glukosy v analyzátorech

Pankreatické enzymy v terapii

- směs enzymů (lipasy, amylasy, proteinasy) získaná z vepřových pankreatů
- indikace: sekreční nedostatečnost pankreatu různé etiologie, cystická fibróza
- užívání: 3 × denně při jídle
- řada přípravků volně prodejných

acidorezistentní
tobolky,
rozpadají se
až v duodenu

Asparaginasa v terapii leukémie

- Katalyzuje hydrolýzu amidové skupiny asparaginu
- $\text{Asn} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Asp} + \text{NH}_3$
- L-asparagin je nezbytný pro proteosyntézu některých nádorových buněk
- Hydrolýza Asp vede k omezení proliferace
- Indikace: akutní lymfoblastické leukemie

Enzymová fibrinolytika

- léčiva, která rozpouštějí krevní sraženiny v cévách
- streptokinasa (bakteriální), urokinasa (lidská)
- štěpí plazminogen na plazmin – ten vyvolá degradaci fibrinu a trombolýzu
- indikace: žilní trombóza, plicní embolie, akutní IM

Proteasy v lokální terapii

- fibrinolyzin, chymotrypsin, kolagenasa
- po lokální aplikaci vedou k lýze nekrotické tkáně, nepoškozují zdravé buňky
- hlavní indikace v chirurgii
- hnisavé rány, bércové vředy, diabetické gangrény, dekubity, pooperační rány apod.