

C3181

Biochemie I

05-Enzymová kinetika

FRVŠ **1647/2012**

Temata

- Rychlost a aktivita
- Kinetika
- Organizace a regulace
- Praktické aspekty

Vyjádřování katalytické účinnosti enzymů

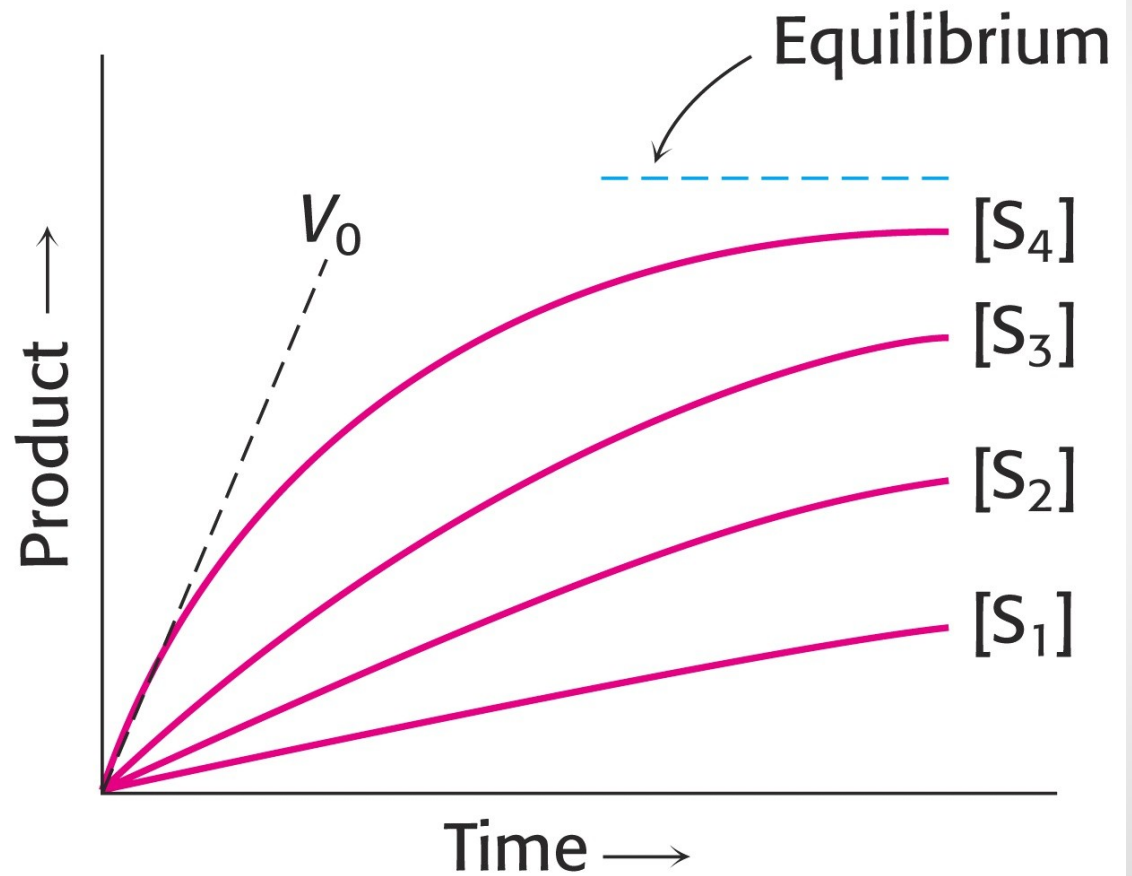
- Vyjádření množství (koncentrace) enzymů
 - jak čistých tak v komplexní proteinové směsi
 - hmotností, látkovým a katalytickým množstvím (koncentrací)
 - účinnost enzymu - **aktivity** - odvozena od rychlosti enzymové reakce – jako množství přeměněného substrátu či vzniklého produktu za časovou jednotku. Tato rychlost (dc/dt) se stanovuje vhodnými metodami, s výhodou fotometricky.
- Jednotky aktivity
 - Smluvní jednotky – např. u amylasy - množství enzymu, které rozštěpilo za 30 min při 40 °C dané množství škrobu aby ten nedával reakci s jodem
 - **IU** - mezinárodní jednotky 1961 – množství enzymu, jež přemění 1 μ mol substrátu za 1 minutu za standardních podmínek (pH, T, přebytek substrátu, přítomnost aktivátorů)
 - **Katal** (podle soustavy SI) 1971 - množství enzymu, jež přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu za standardních podmínek (pH, T, přebytek substrátu, přítomnost aktivátorů)
- Specifická aktivita
 - aktivita vztažená na celkové množství (koncentraci) vztažného parametru(bílkoviny) – katal/g
- Číslo přeměny
 - látkové množství substrátu (mol) přeměněné molem enzymu za časovou jednotku (s) – k [s^{-1}]

Rychlost reakce

- Určující charakteristika
 - dc/dt , z toho pak aktivita
- Metody stanovení
 - Stanovení [P] nebo [S] – pak $-dc/dt$
 - Výhodnější [P], ale záleží na možnostech metody
 - Spektrální – absorpční, fluoresceční aj., chemické, elektrochemické (amperometrie), enzymové (spřažené reakce)
- Vliv prostředí
- C

Rychlost reakce

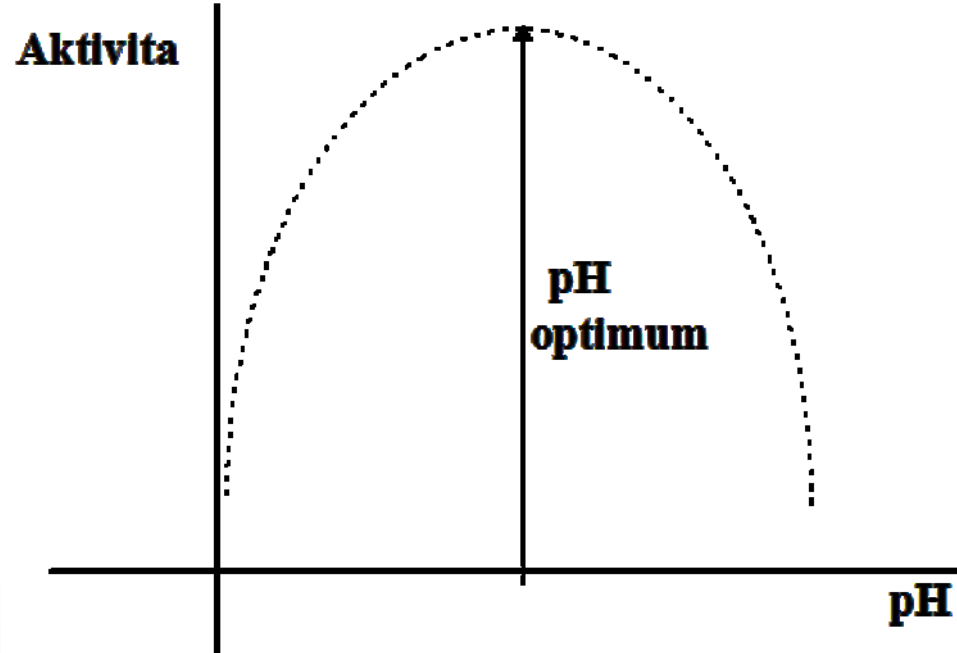
- Pokles dc/dt
- dc/dt pro $t = 0$



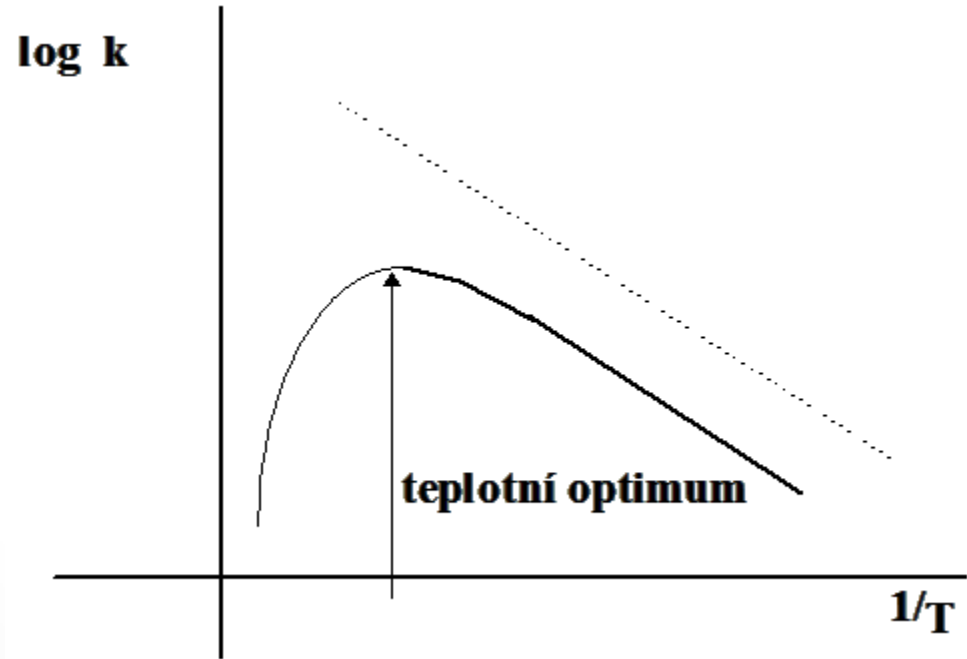
Vliv prostředí na rychlost enzymové reakce

- Optimální podmínky
 - *In vivo* – fyziologické prostředí
 - *In vitro* – napodobení – snaha
- I – obvykle odpovídá 0,9% NaCl, výjimky, extrémy
- pH – obvykle neutrální, výjimky, extrémy
- T – teplokrevní x studenokrevní, mikroorganismy aj.
 - Denaturace x syntéza *in vivo*
 - Konvenční hodnoty *in vitro* – 30°C
- Další - regulátory

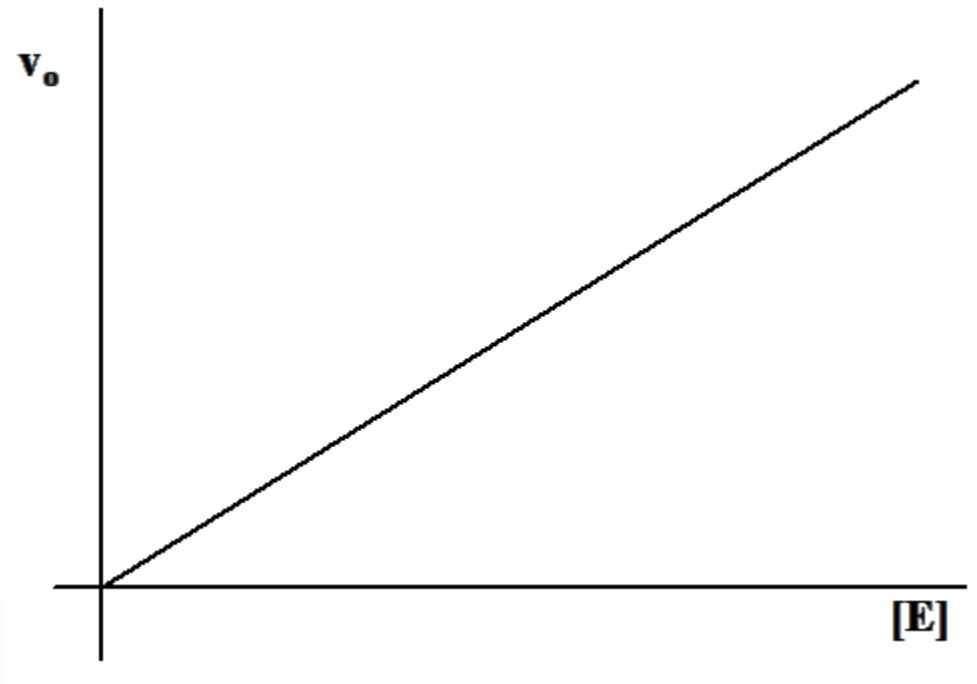
Vliv pH



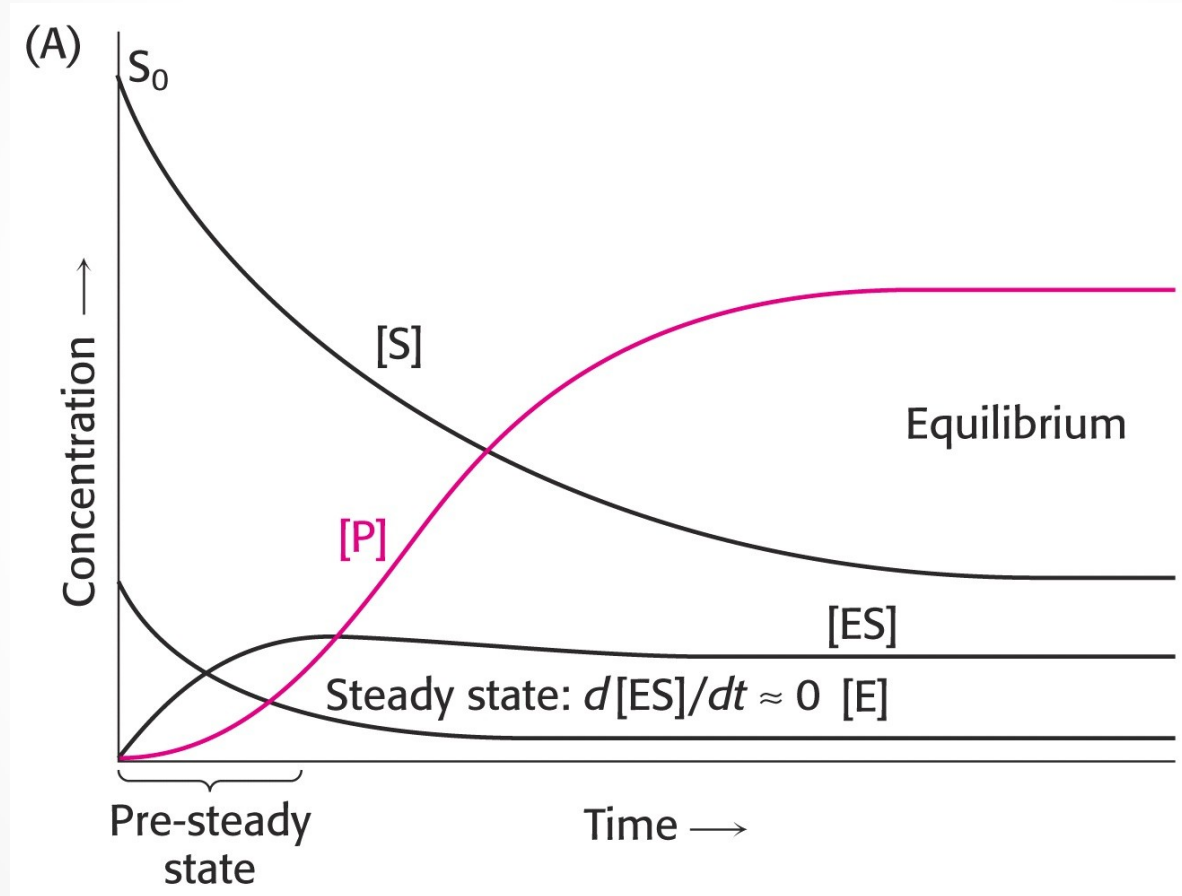
Vliv teploty



Linearita

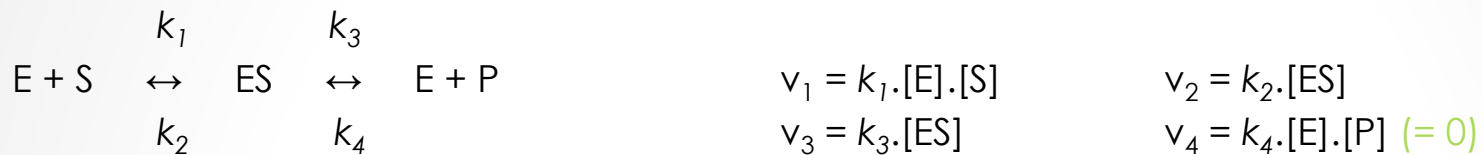


Kinetika enzymové reakce



Časový průběh enzymové reakce – prestacionární a stacionární stav

Stacionární kinetika



Za stacionárních podmínek

$$v_1 + v_4 = v_2 + v_3$$

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] + 0 = k_2 \cdot [ES] + k_3 \cdot [ES] = (k_2 + k_3) \cdot [ES]$$

$$[E] \cdot [S] / [ES] = (k_2 + k_3) / k_1 = \mathbf{K_m}, \text{ pro } k_2 \gg k_3 \quad \mathbf{K_m} = \mathbf{K_s}$$

$$v_0 = k \cdot [ES]$$

$$V_{lim} = k \cdot [E]_t = k \cdot ([E] + [ES])$$

$$v_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$v_0 = f([S])$$

$$v_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Rovnice

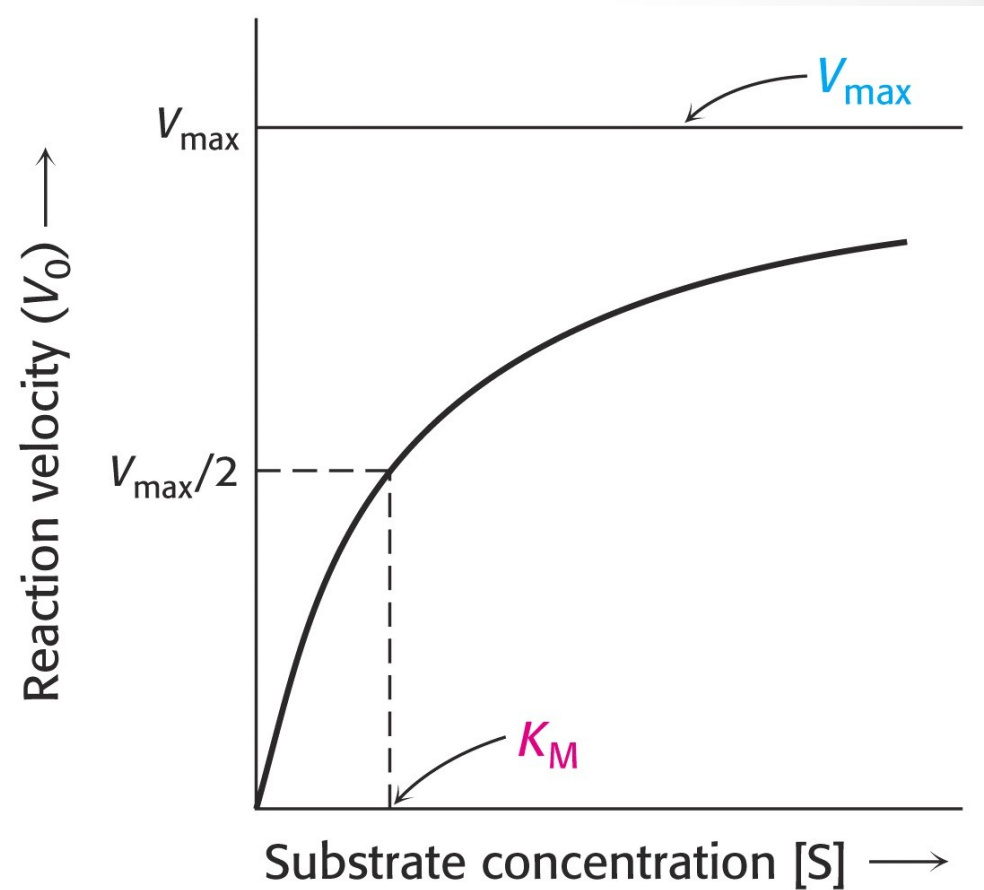
Michaelise-Mentenové
- hyperbolický průběh

Speciální případy

$$[S] \ll K_m$$

$$[S] \gg K_m$$

$$[S] = K_m \quad v_0 = V_{lim} / 2$$



Stanovení kinetických parametrů

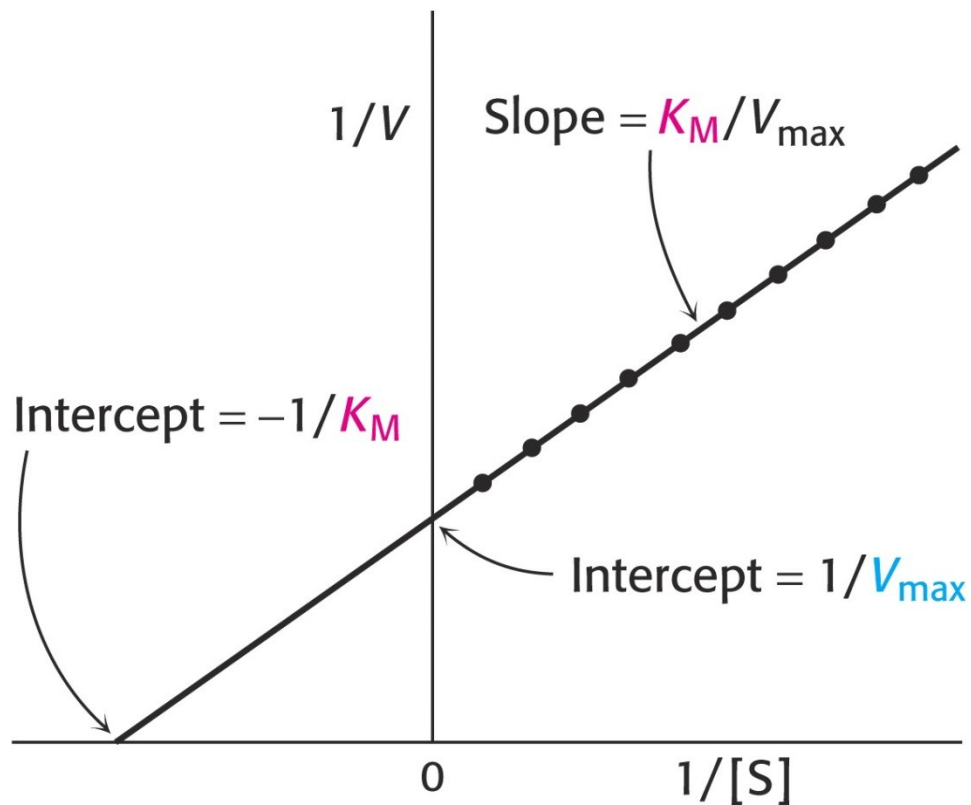
- Rektifikace vztahu
 - Různé úpravy – vynesení (Hanes, Hofstee aj.)
 - Vynesení dle Lineweavera a Burka
 - $1/v_0 = 1/f([S])$
- Rovnice přímky $y = ax + b$

$$1/v_0 = \frac{K_M + [S]}{V_{lim} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{lim}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}}$$

Stanovení kinetických parametrů

$$\begin{array}{c} y \\ \\ 1/v_0 \end{array} = \frac{K_M + [S]}{V_{lim} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{lim}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}}$$

Stanovení kinetických parametrů



Význam nalezených konstant

- **K_m** je mírou afinity substrátu k enzymu
 - formálně disociační konstantou komplexu [ES]
 - Není závislá na katalytickém množství (aktivitě enzymu) v pokusu, pokud pracujeme v oblasti lineární závislosti v na [E] – viz výše.
 - Lze ji tabelovat a užít jako srovnávací parametr
 - Mění se s externími parametry
- Liší se pro různé substráty téhož enzymu
 - Alternativní
 - Kosubstráty – NAD apod. (LDH)
 - Vztah k metabolickým hotovostem – „pool“
- **V_{lim}** je ukazatelem aktivity enzymu,
 - závisí na katalytickém množství enzymu v experimentu
 - Dá se užít k vyjádření katalytické účinnosti a čistoty enzymu. V těchto případech se vypočítá tzv. specifická aktivita jako poměr V_{lim} a množství enzymu (typicky v mg bílkoviny neznáme-li jeho M_r nebo pracujeme se směsí – homogenát, krevní sérum apod.)
 - Známe-li látkové množství enzymu, pak specifickou aktivitu vztahenou na látkové množství enzymu nazýváme číslem přeměny (TN):

$$V_{lim} / [E] [\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mol}] = \text{TN} [\text{s}^{-1}] = k_{cat}$$

Význam nalezených konstant

TABLE 8.5 K_M values of some enzymes

Enzyme	Substrate	$K_M(\mu\text{M})$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa- <i>N</i> -acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	CO_2	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3
	tRNA	0.4
	ATP	300

Význam nalezených konstant

- Čísla přeměny

TABLE 8.6 Maximum turnover numbers of some enzymes


Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

Význam nalezených konstant

- Konstanta specificity

- poměr k_{cat} (vyšší – účinnější katalýza) a K_m (nižší – větší afinita enzymu k substrátu)
- spolehlivější ukazatel substrátové specificity – preference substrátů
- modelově estery, specificita k aromatickým acylům

TABLE 8.7 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.

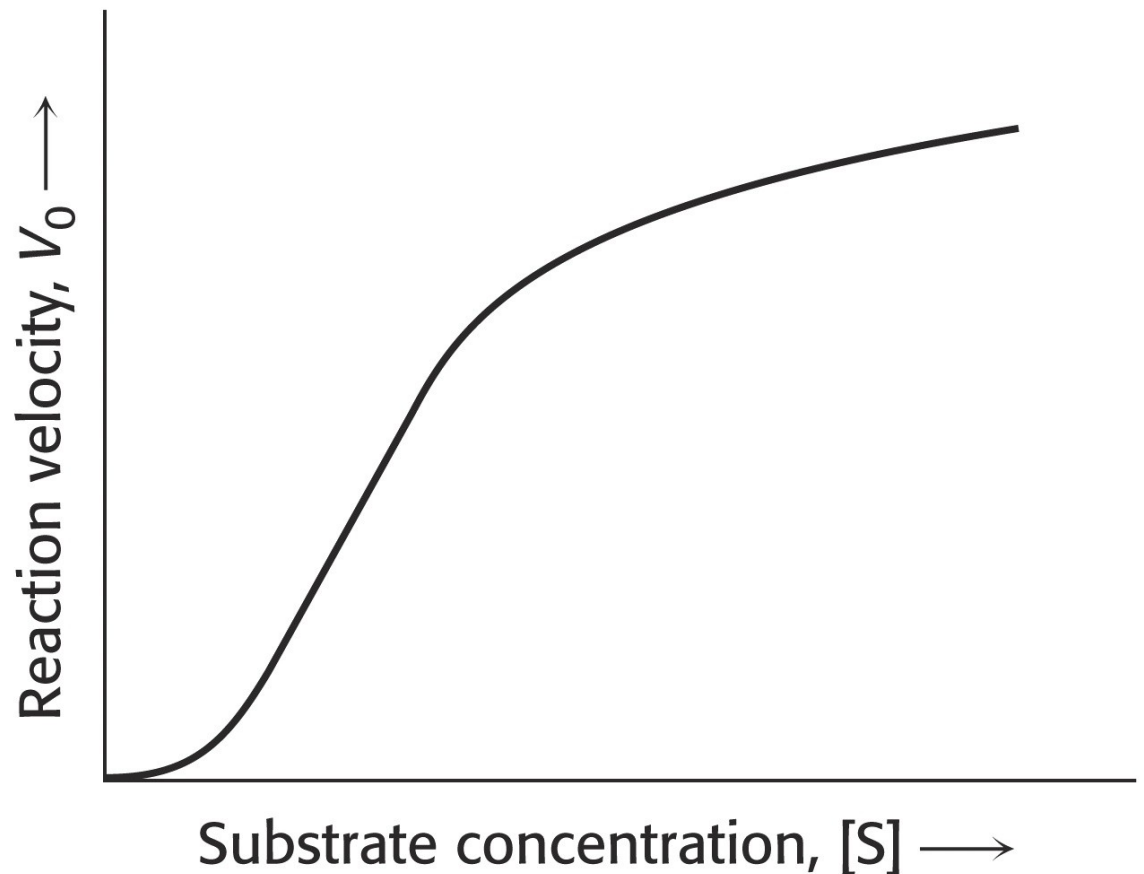
Regulační aspekty

Vliv [S] na rychlost

Michaelisovská
kinetika

Alosterické enzymy

Oligomerní
Kooperativita
Efektivní regulace
Neřídí se
Michaelisovskou
kinetikou



Modulace rychlosti enzymové reakce

- Metabolický význam – *in situ*
 - Regulace metabolismu
- Studium metabolismu – *in vitro*
 - Objasnění mechanismu působení enzymů
 - Součást regulací jako celku
- Způsoby – účinek metabolitů, modifikace apoenzymu
 - Modulátory, efektory
 - Positivní – aktivátory
 - Negativní - inhibitory

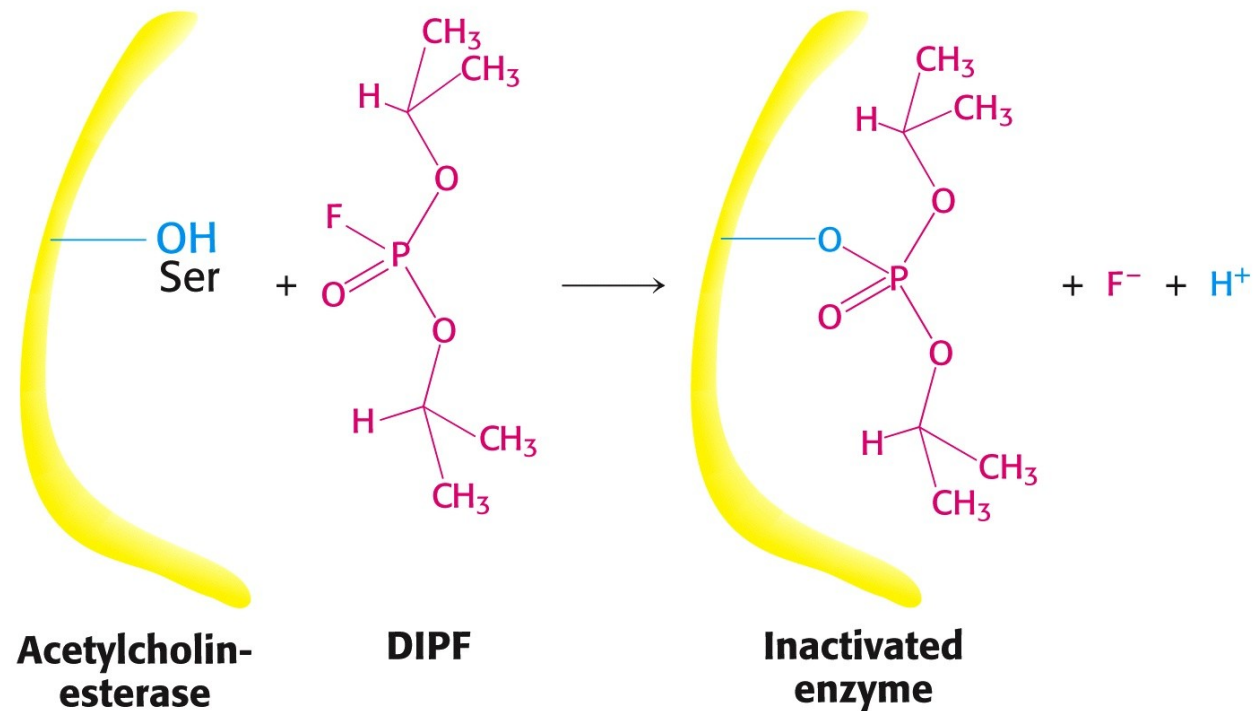
Inhibice enzymové aktivity

- Typy inhibitorů
- Ireversibilní
 - Vážou se pevně a nevratně
 - Lze reaktivovat chemickou reakcí
- Reversibilní
 - interagují s enzymem vratně
 - dají se odstranit např. dialýzou, gelovou chromatografií
 - Kompetitivní
 - Nekompetitivní
 - Akompetitivní.
 -

Ireverzibilní inhibice

Modifikační činidla

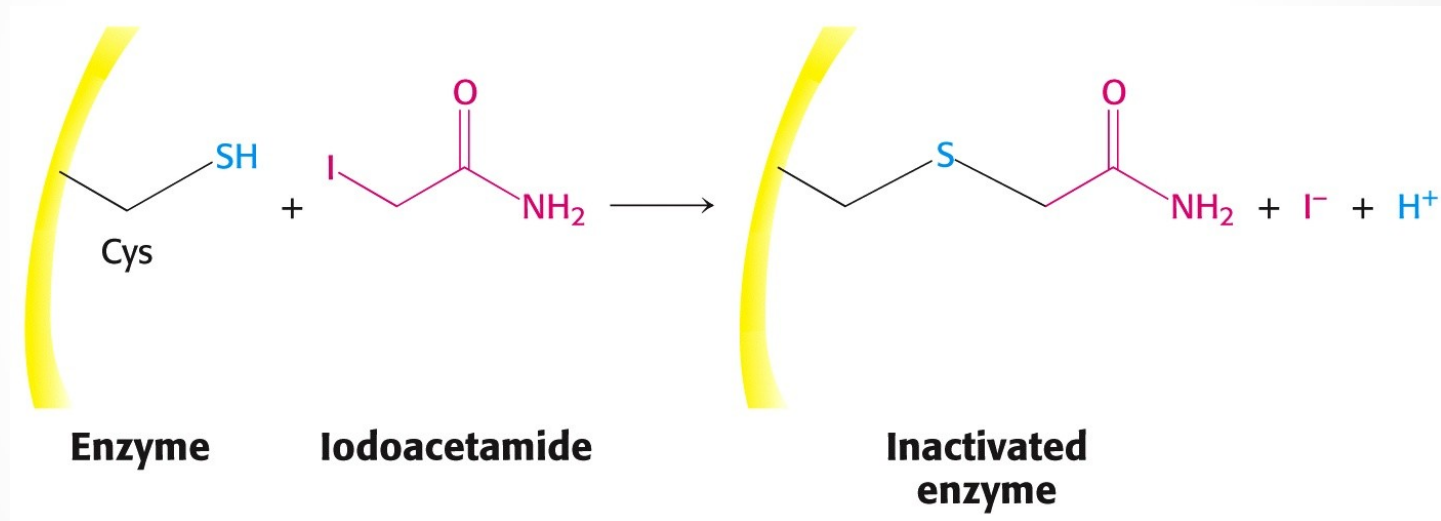
Studium aktivního centra



- Organofosfáty

Ireverzibilní inhibice

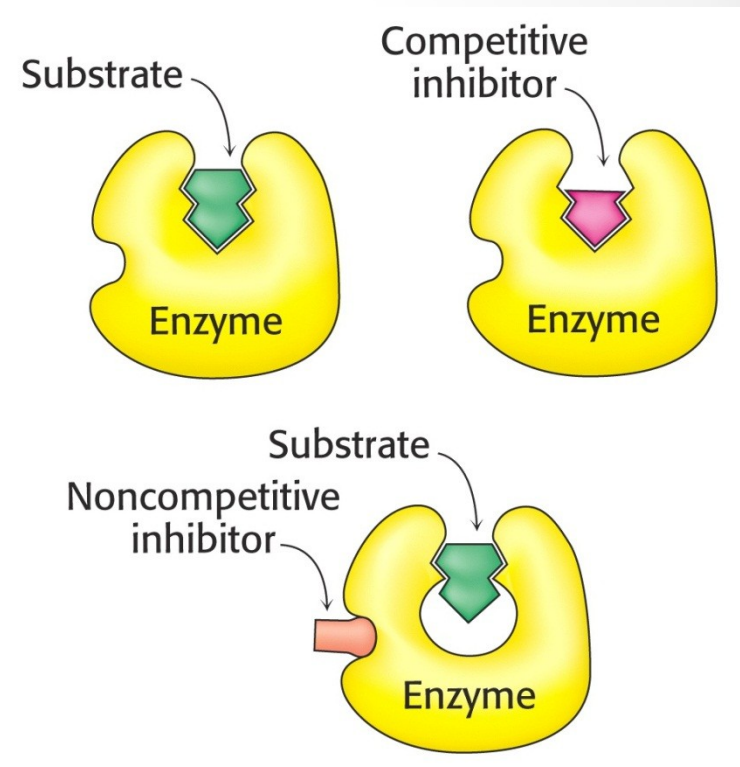
- SH-inhibitory



- Alkylační činidla, rtuťnaté sloučeniny (PCMB)

Reverzibilní inhibice

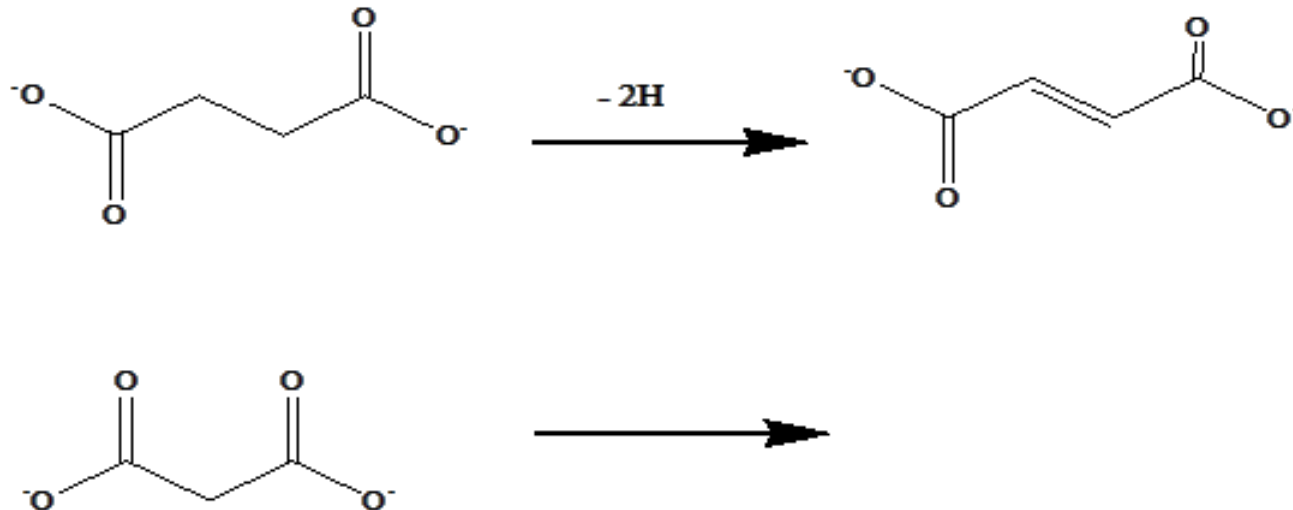
- Kompetitivní
 - Inhibitor se váže do aktivního místa
 - Strukturní podobnost se substrátem
 - Soutěžení inhibitoru se substrátem
- Nekompetitivní
 - Inhibitor se váže jinak
 - Substrát neovlivní vazbu inhibitoru
- Akompetitivní
 - Inhibitor se váže na komplex ES
- Alosterická
 - Vazba na jinou podjednotku



Kompetitivní inhibice

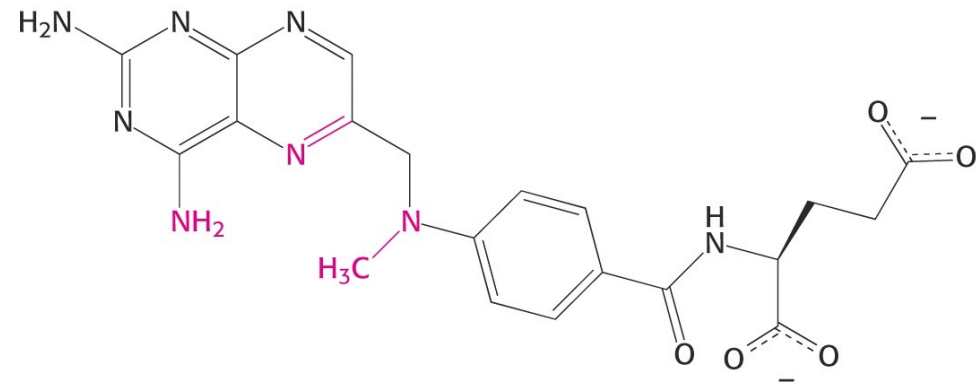
- Inhibice SDH malonátem

- Jantaran (sukcinát) je substrátem enzymu sukcinátdehydrogenasy (vzniká fumarát)
- Malonát je kompetitivním inhibítozem SDH (nelze ho dehydrogenovat)
- Strukturní podobnost, někdy bývá méně názorná (el. hustoty)
- Urče

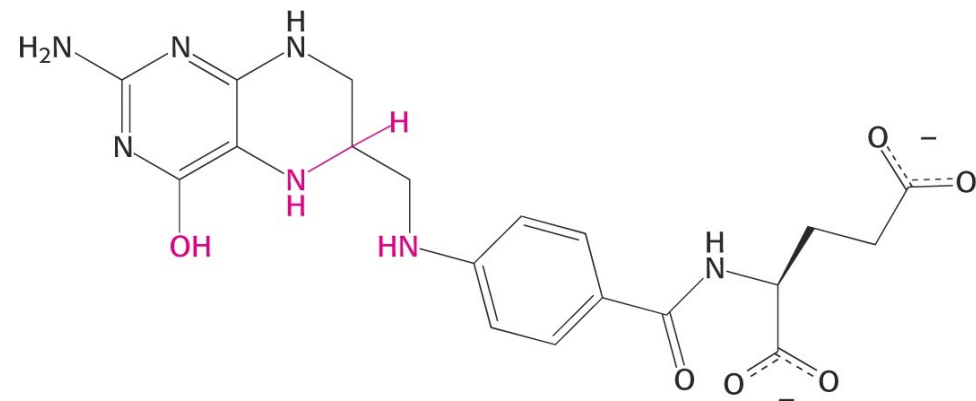


Kompetitivní inhibice

- Inhibice DHF reductázy
 - Antimetabolit, cytostatikum
 - Další analoga



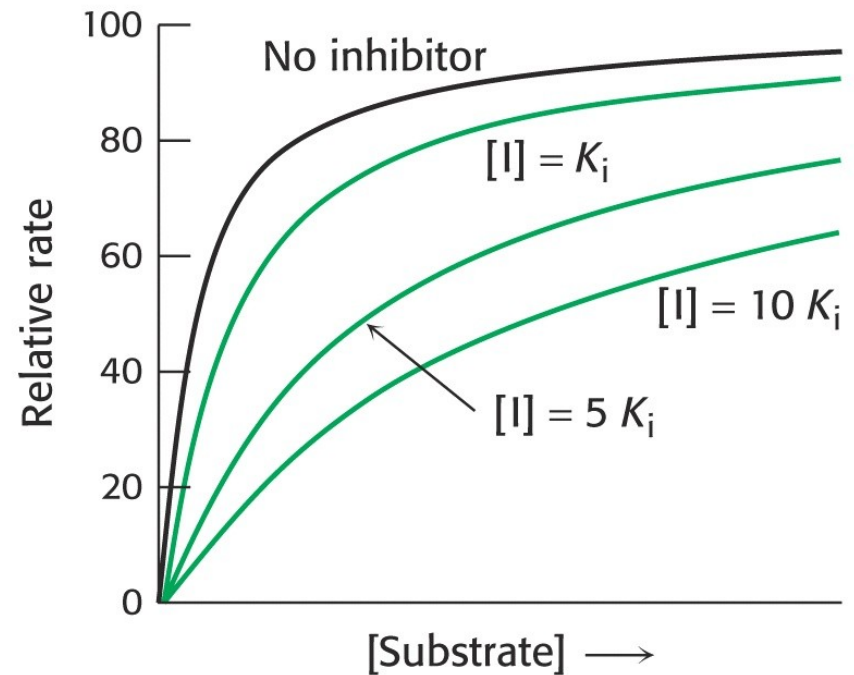
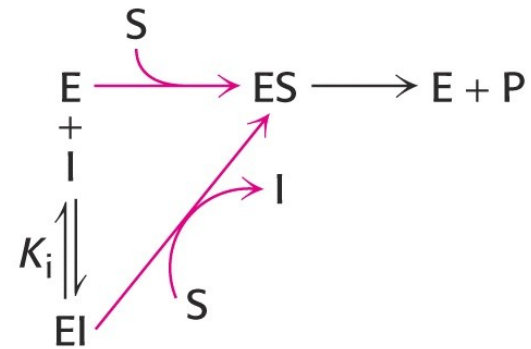
Methotrexate



Tetrahydrofolate

Kompetitivní inhibice

- Kompetitivní inhibitor
 - reaguje s volným enzymem a soutěží se substrátem vazné místo v aktivním centru.
 - Může se navázat pouze na volný enzym
 - V reakční směsi se pak vyskytuje mimo E, S a ES ještě EI (komplex enzym-inhibitor), který se tvoří vratně mezi volným enzymem a inhibitorem



Kompetitivní inhibice

Kinetická analýza

Oproti neinhibované reakci zahrnuje

$$K_i = [E] \cdot [I] / [EI] \text{ a pak } [E]_t = [E] + [EI] + [ES]$$

dále

$$v = V_{lim} \cdot [S] / [K_m (1 + [I] / K_i) + [S]], \text{ kde } K_m (1 + [I] / K_i) = K_{app}$$

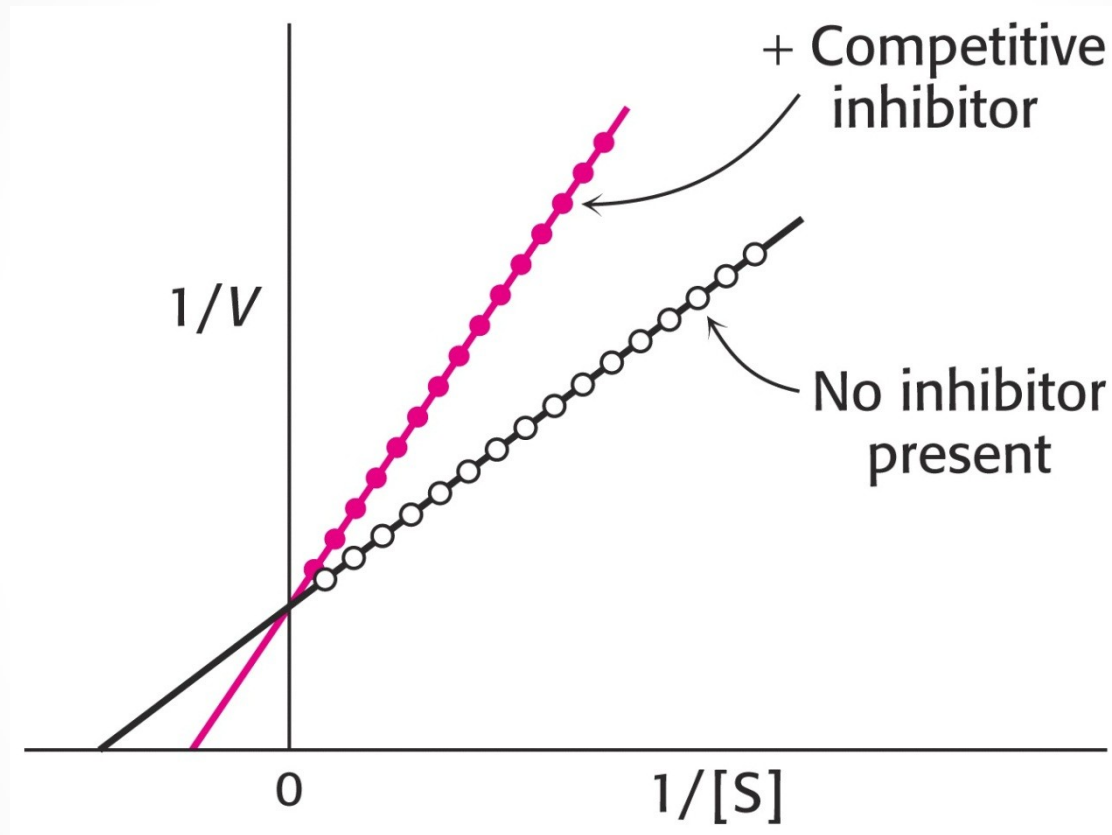
a po rektifikaci

$$1/v = 1/V_{lim} + K_{app}/V_{lim} \cdot 1/[S]$$

Výraz K_{app} nazýváme zdánlivou Michaelisovou konstantou
je vyšší než skutečná přímo úměrně $[I]$ a nepřímo K_i
vliv kompetice

V_{lim} se nemění

Kompetitivní inhibice



Grafické vyjádření této závislosti vidíme na vynesení dle Lineweavera a Burka

Nekompetitivní inhibice

Inhibitor není podobný substrátu

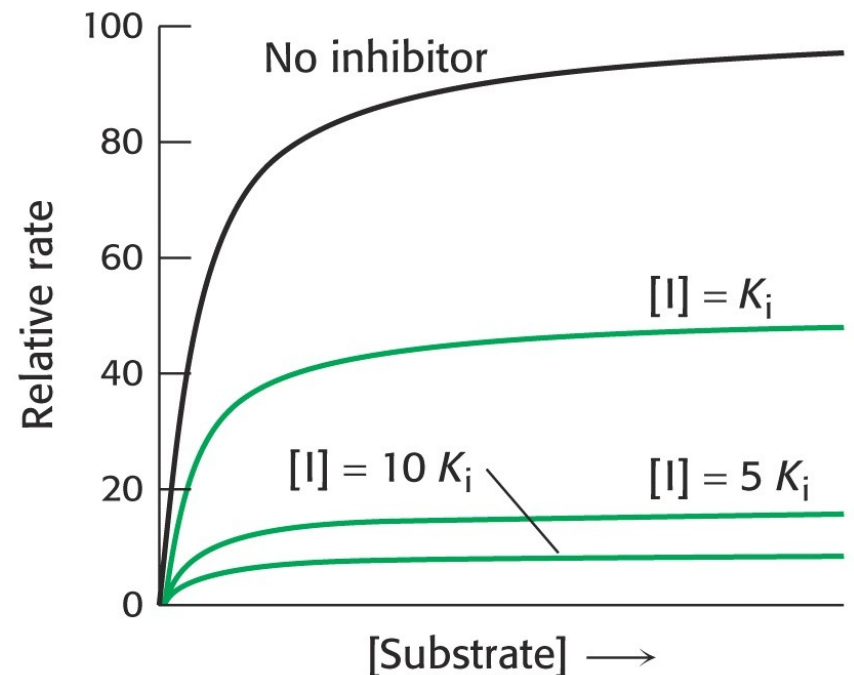
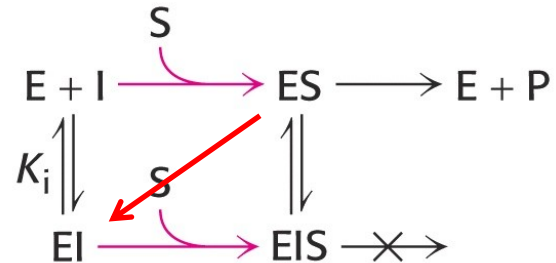
- váže se jak na volný E

tak komplex ES

- Vytváří komplex EI

- $[EI]$ nezávisí na $[S]$,

ale pouze $[I]$



Nekompetitivní inhibice

Zavedením do základní rovnice Michaelise a Mentenové pak dostáváme

$$v = (V_{lim} \cdot [S]) / (K_m + [S]) \cdot (1 + [I]/K_i)$$

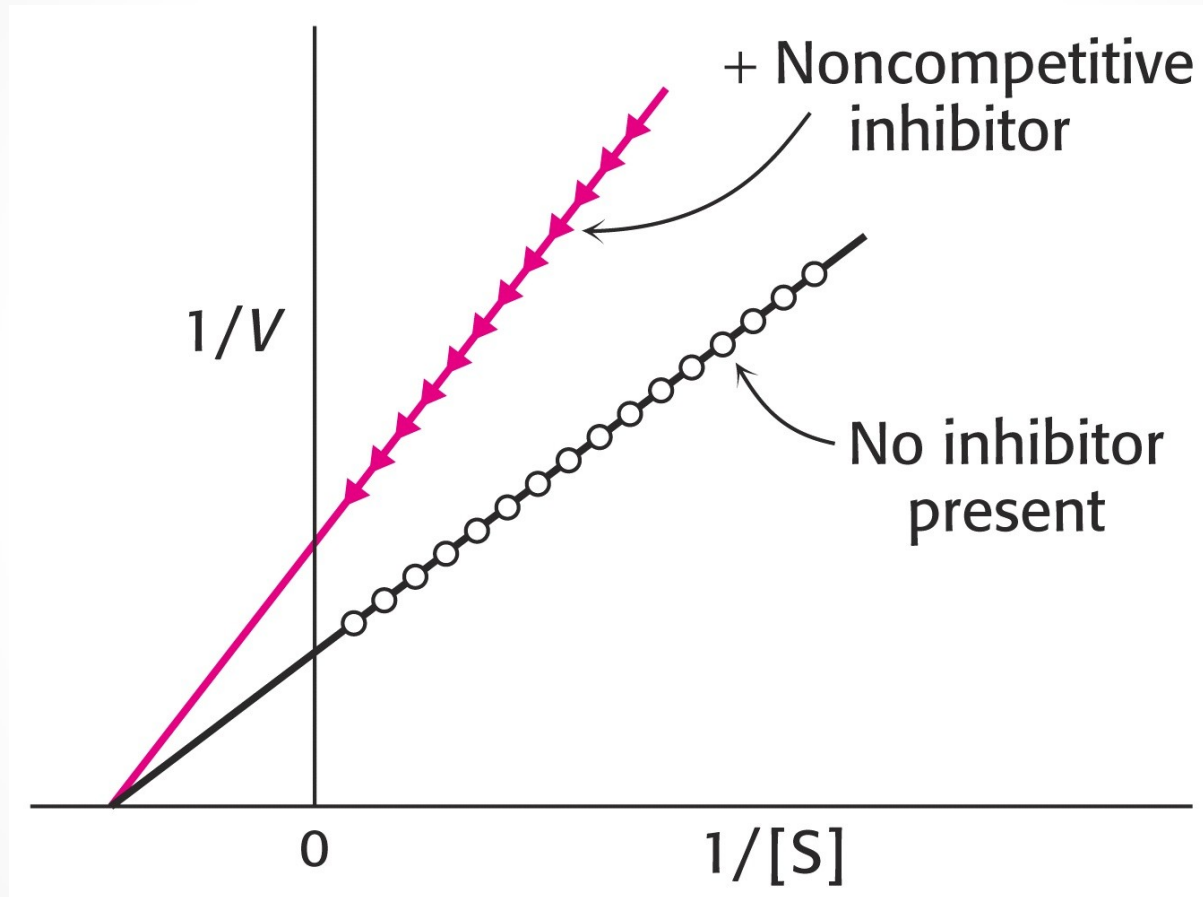
a po rektifikaci

$$1/v = (1/V_{lim} + K_m/V_{lim} \cdot 1/[S]) \cdot (1 + [I]/K_i)$$

K_m se nemění

V_{lim} se snižuje úměrně poměru $[I]/K_i$

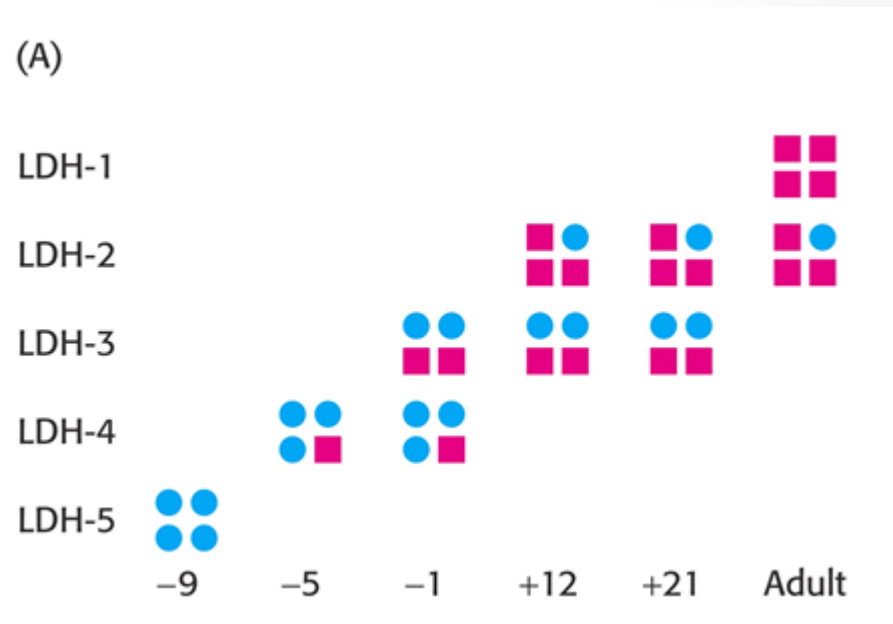
Nekompetitivní inhibice



Grafická analýza dle Lineweavera a Burka

Isoenzymy




































- Stejná aktivita
 - Liší se apoenzym
 - Podjednotkové složení
 - Kinetické odlišnosti
 - Příklad LDH



Isoenzymy

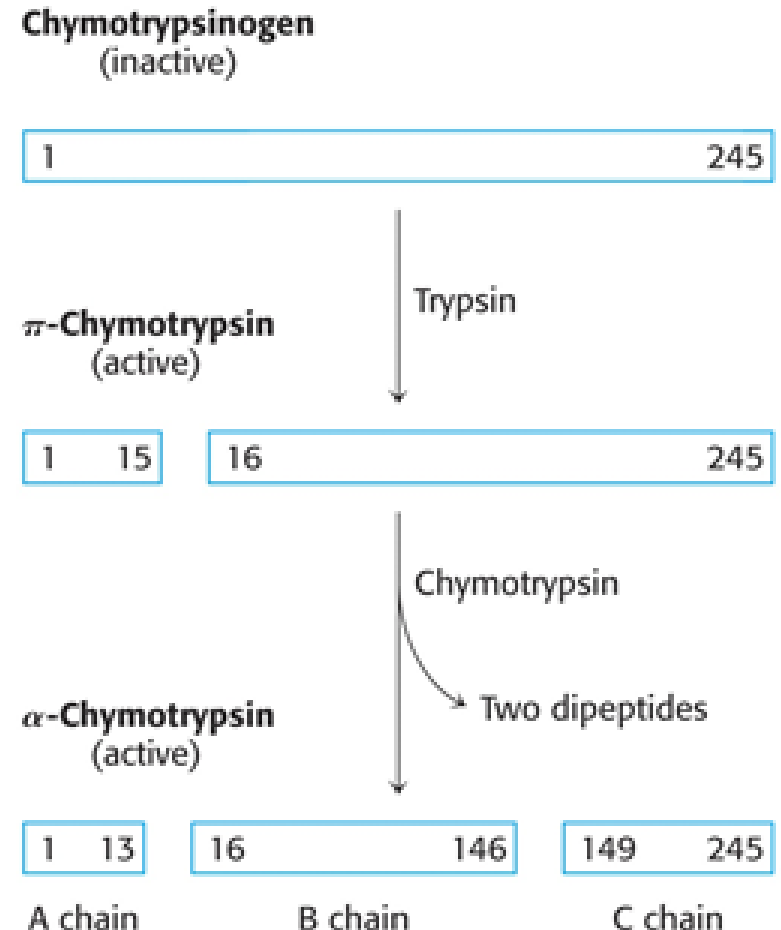
- Orgánová specificita

(B)

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
M_4							
HM_3							
H_2M_2							
H_3M							
H_4							

Zymogeny - proenzymy

- Neaktivní formy
- Posttranslační modifikace
- Význam – proteázy



Organizace enzymů

- Efektivita reakcí
 - Katabolické – jednodušší
 - Anabolické – význam organizovanosti
- Typy
 - enzymy volně rozpuštěné (cytoplasma – glykolýza)
 - multienzymové komplexy (zvl. pro anabolické pochody – syntéza MK, ale i katabolické pochody – využití energie)
 - membránově vázané enzymy (organizovanost, vektoriální průběh reakcí – využití energie – oxidační a fotosyntetická fosforylace)

Praktické využití enzymů

- Průmyslové využití
 - Prací prostředky
 - Krmivářství
 - Potravinářství
 - Farmacie
- Lékařství
 - Diagnostika
 - Analyt, nástroj
 - Terapie
 - Substituční, podpůrná, speciální
- Bioanalytická chemie
 - Stanovení substrátů
 - Stanovení inhibitorů
- Enzymová katalýza v organické chemii
 - Stereoselektivita, kombinace metod