

# C5720 Biochemie

## 12-Enzymová kinetika

# Obsah

- 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  $\mu$ 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) –  $k$  [ $s^{-1}$ ]

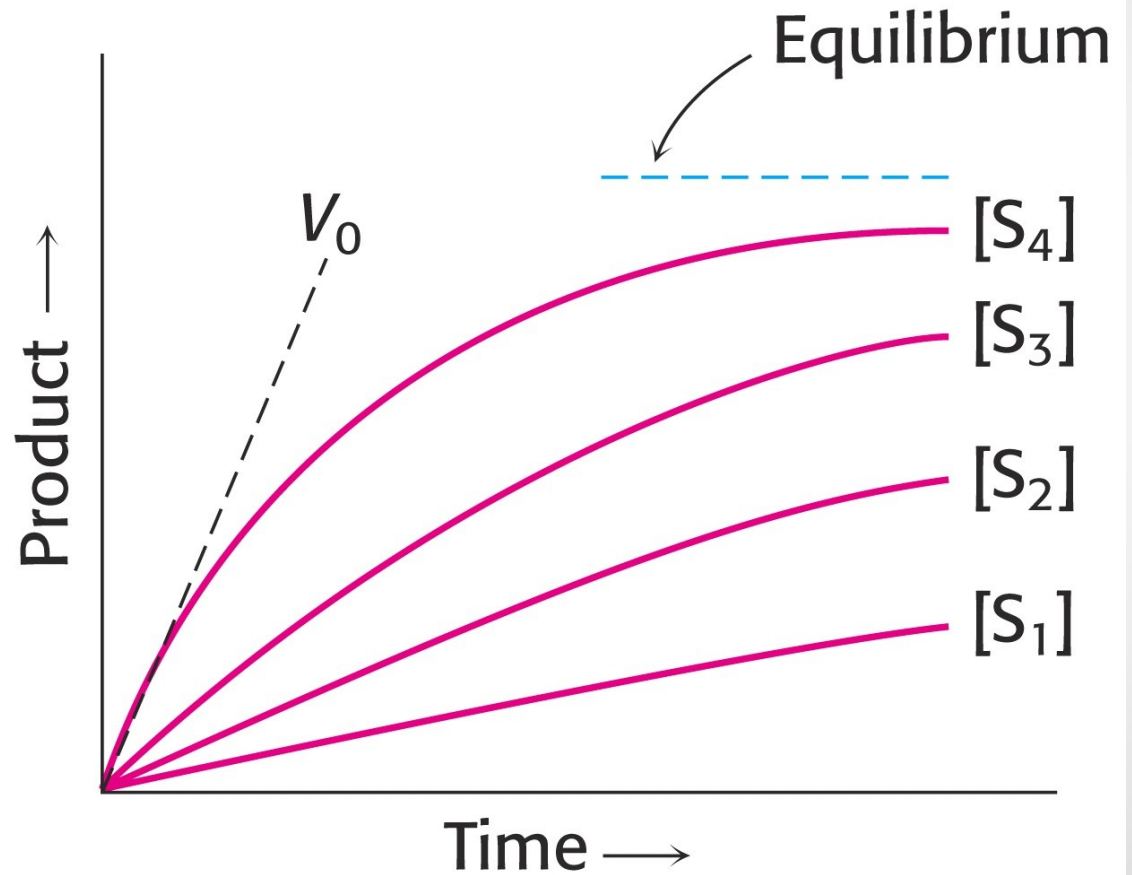
# Rychlost reakce

- 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
  - Optimalizace podmínek – aktivita

# Rychlost reakce

- Pokles  $dc/dt$
- $dc/dt$  pro  $t = 0$
- Rovnováha – lim.

různé vlivy  
přiblížení  $K$   
inaktivace

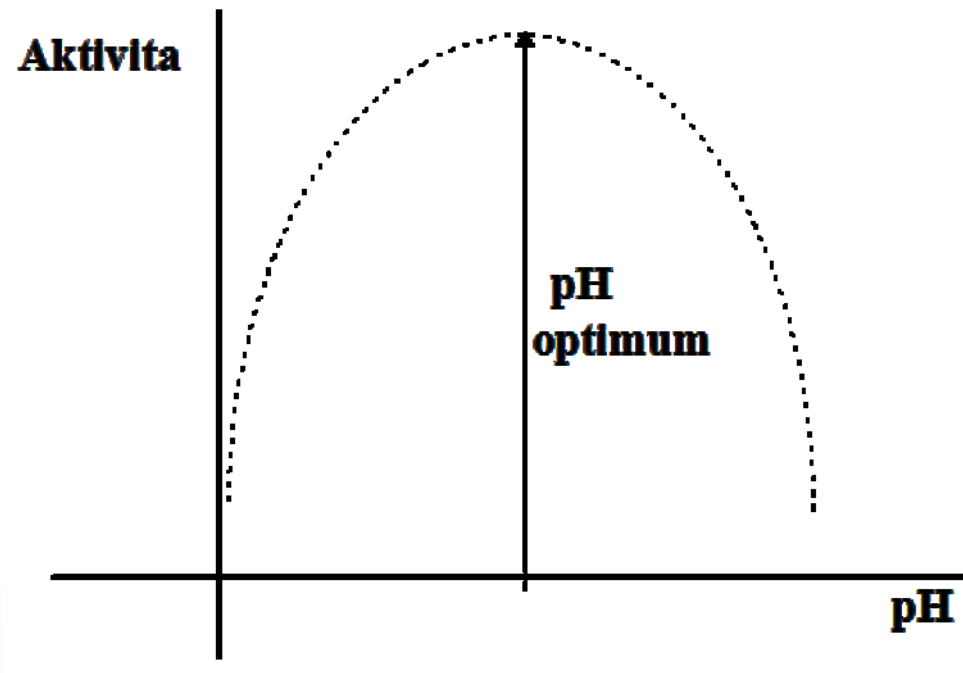


# Vliv prostředí na rychlost enzymové reakce

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

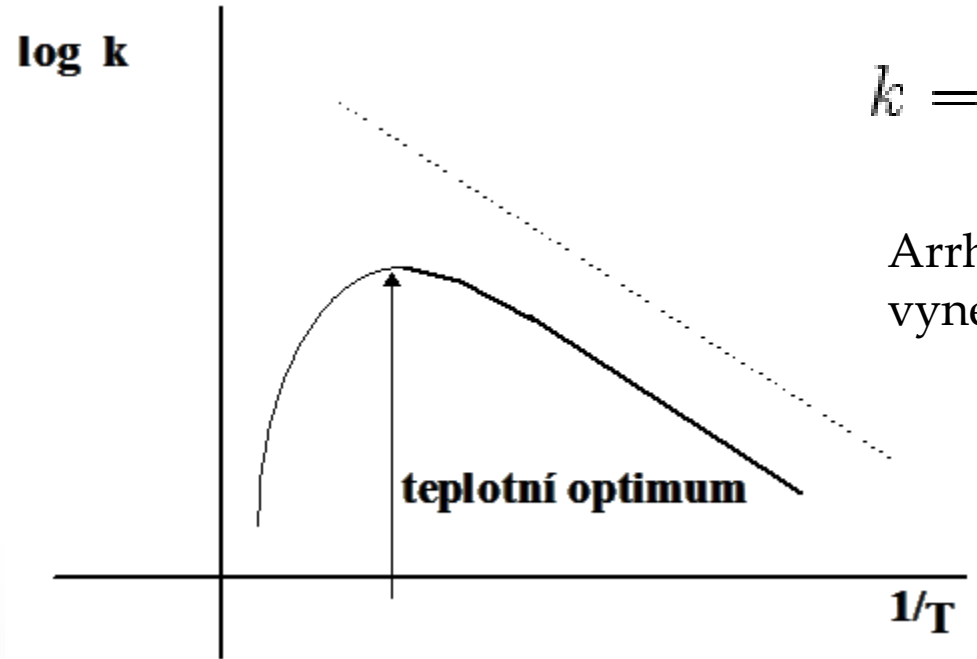
# Vliv pH

Aktivita x rychlost, Gaussovská závislost



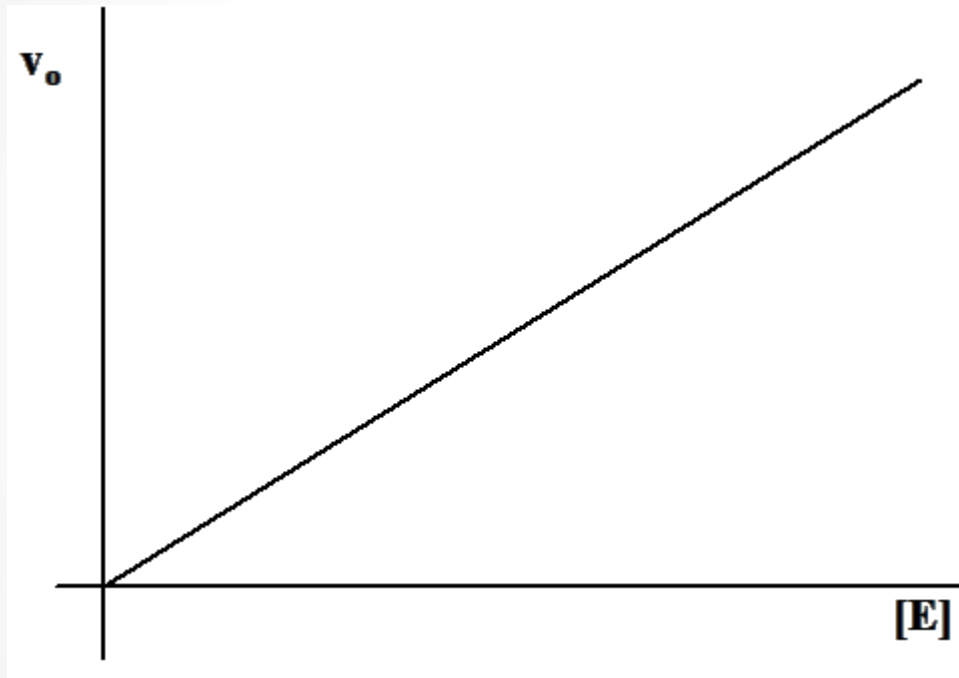
# Vliv teploty

„Optimum“ – závisí na dalších podmínkách, doba měření aj.



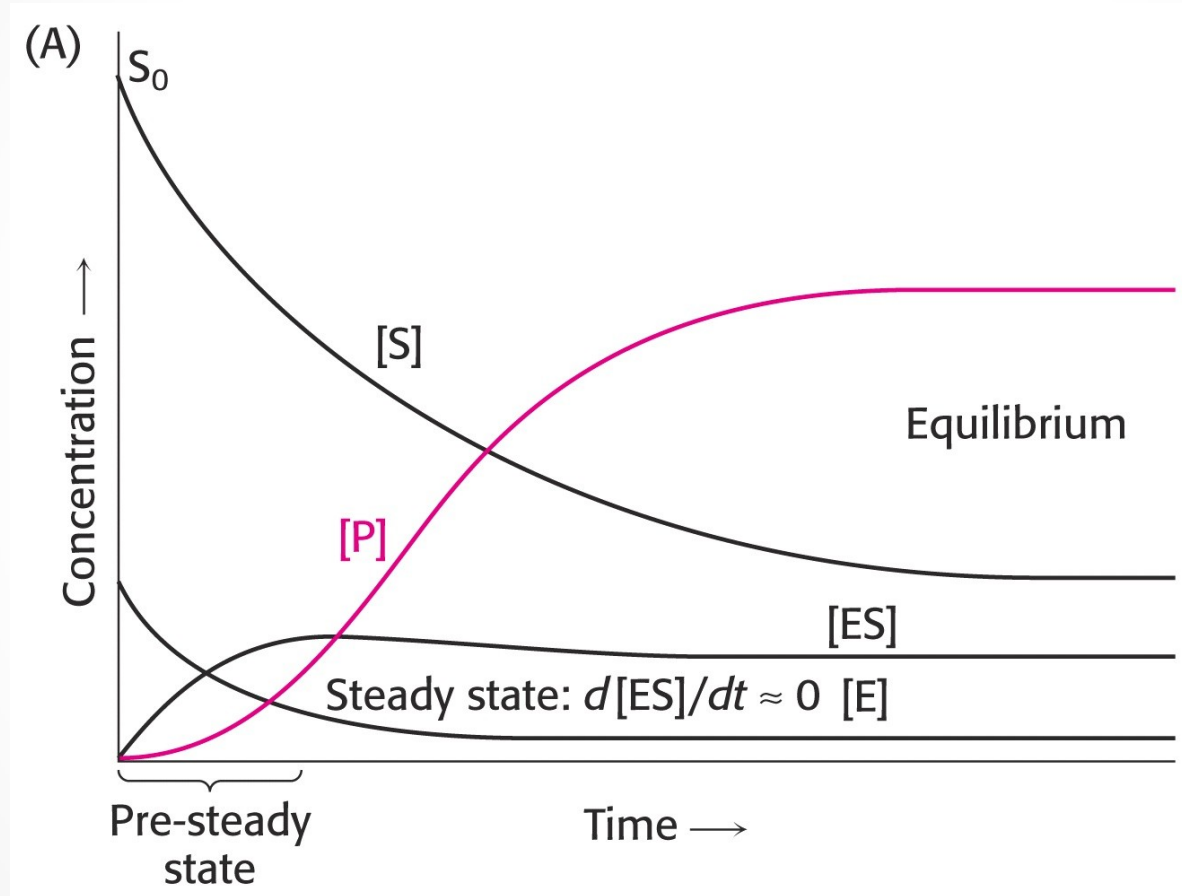


# Linearita



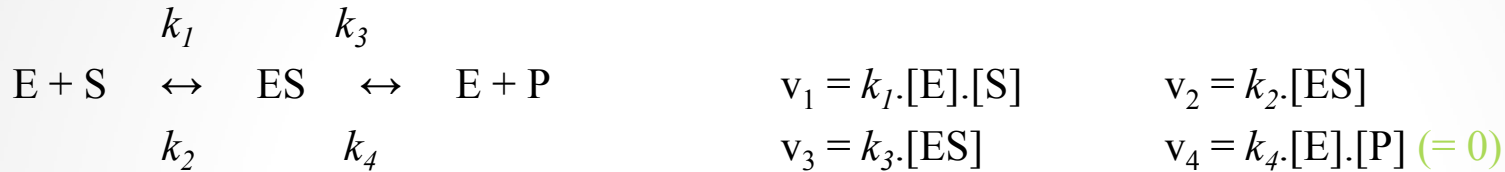
Oblast kde lze měřit  
 $v_0$  pro  $t = 0!$

# Kinetika enzymové reakce



Časový průběh enzymové reakce – prestacionární a stacionární stav

# Stacionární kinetika



Za stacionárních podmínek

$$v_1 + v_4 = v_2 + v_3$$

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

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

$$K_m = K_s$$

$$v_0 = k \cdot [\text{ES}]$$

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

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

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

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

Rovnice

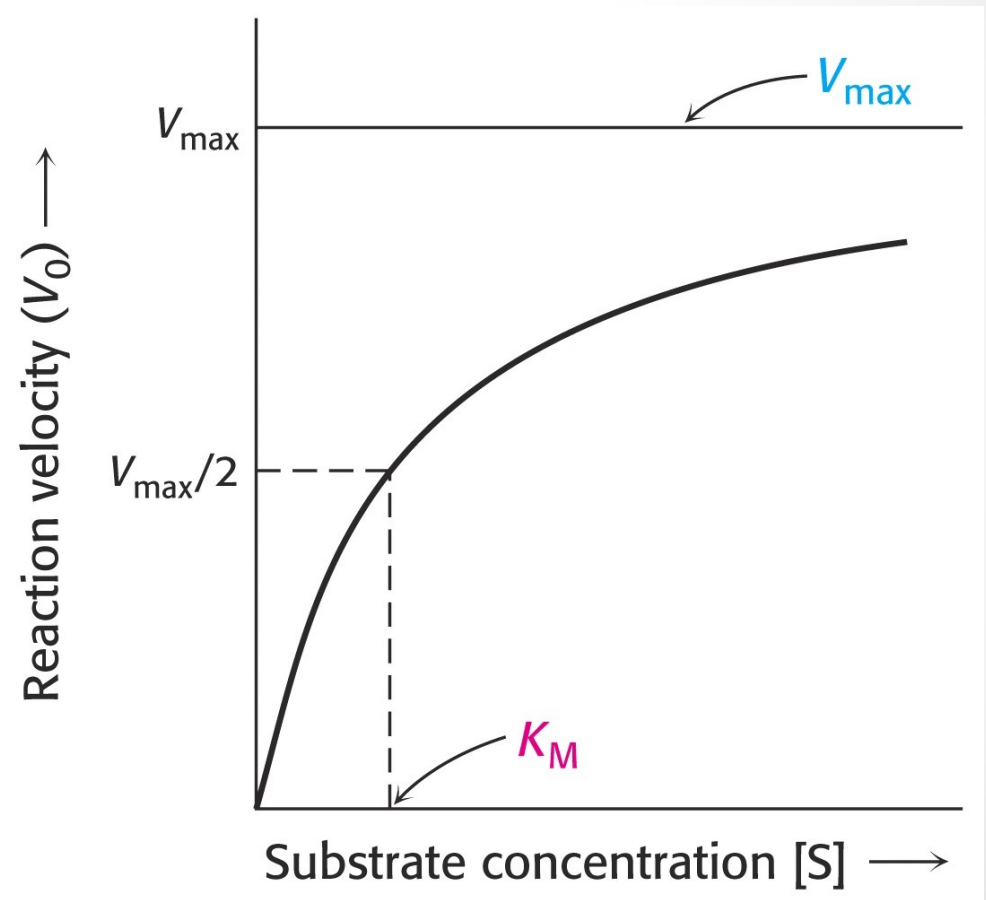
Michaelise-Mentenové  
- hyperbolický průběh

Speciální případy

$$[S] \ll K_m$$

$$[S] \gg K_m$$

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



# Stanovení kinetických parametrů

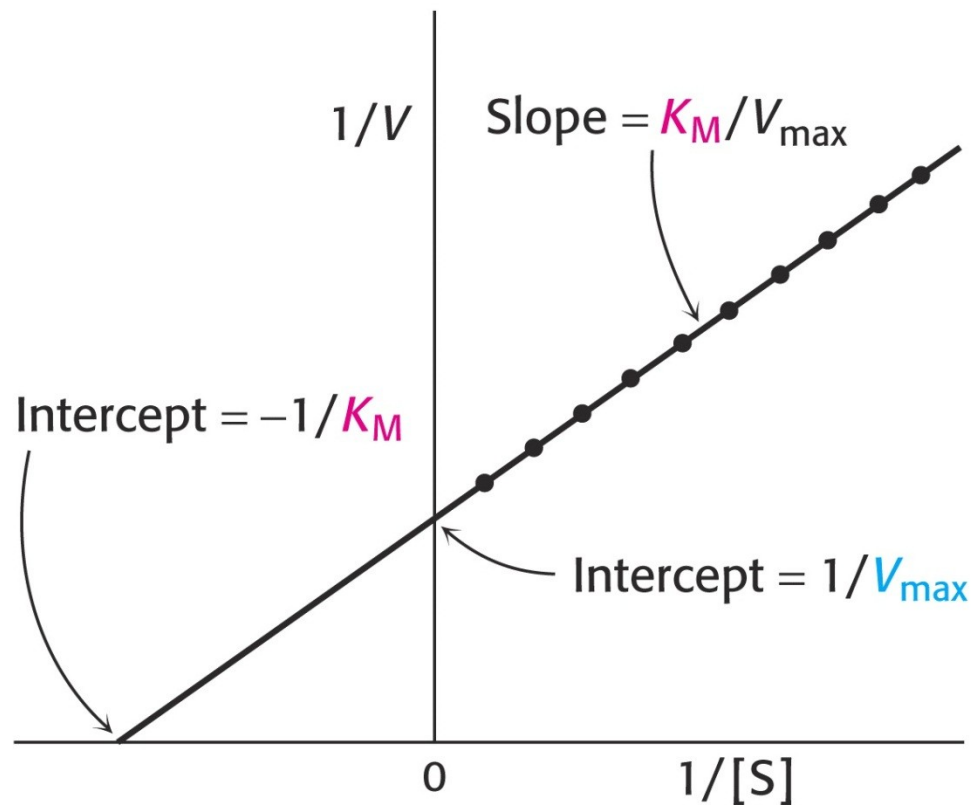
- Rektifikace vztahu
  - Různé úpravy – vynesení (Hanes, Hofstee aj.)
  - Vynesení dle Lineweavera a Burka
  - $1/v_0 = f(1/[S])$
- Rovnice přímky  $y = ax + b$

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

# 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“



# Význam nalezených konstant

- $V_{lim}$  je ukazatelem aktivity enzymu
  - Závisí na katalytickém množství enzymu v experimentu, není konstantou obecnějšího rázu, lze nahradit  $v_0$  při nadbytku S
  - 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 vztaženou 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
$\beta$ -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	$\text{CO}_2$	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	$\text{HCO}_3^-$	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	$1.3 \times 10^{-1}$
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{—CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3.6 \times 10^2$
Norleucine	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3.0 \times 10^3$
Phenylalanine	—CH <sub>2</sub> — 	$1.0 \times 10^5$

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.

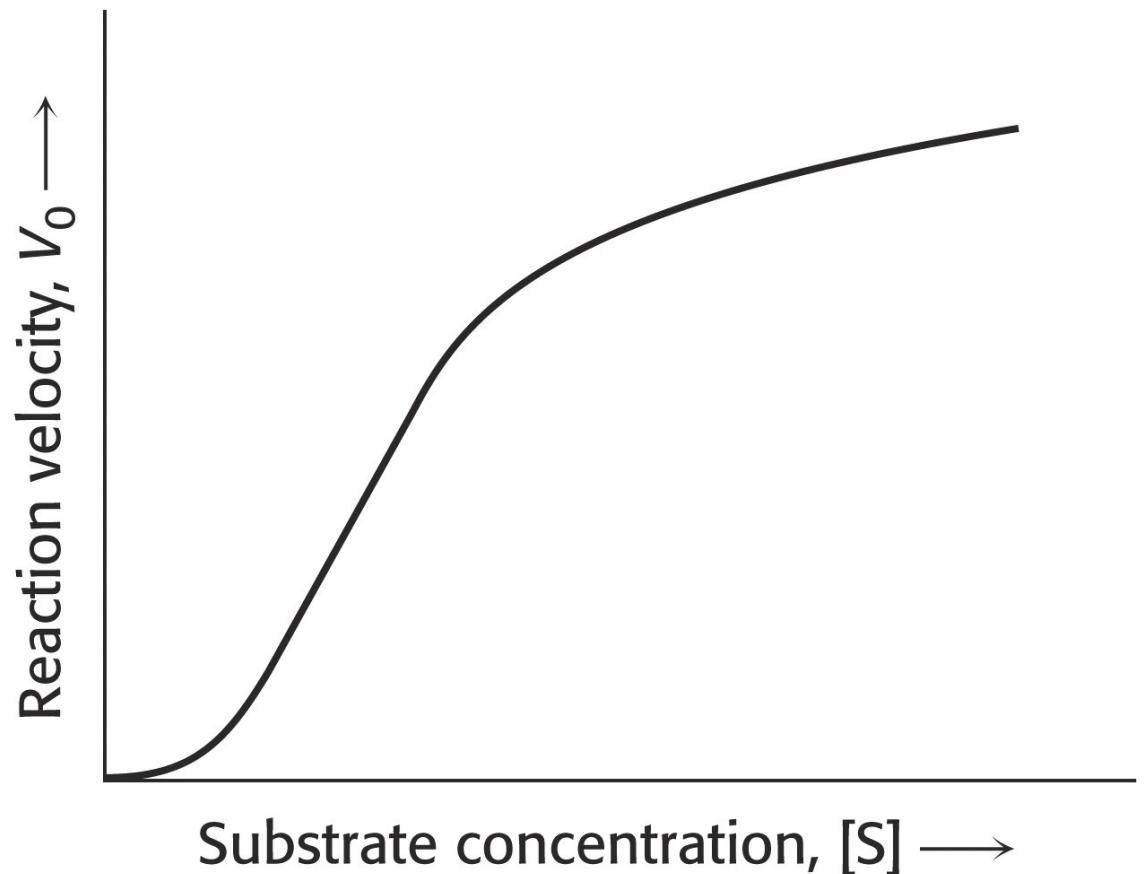
# Regulační aspekty

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

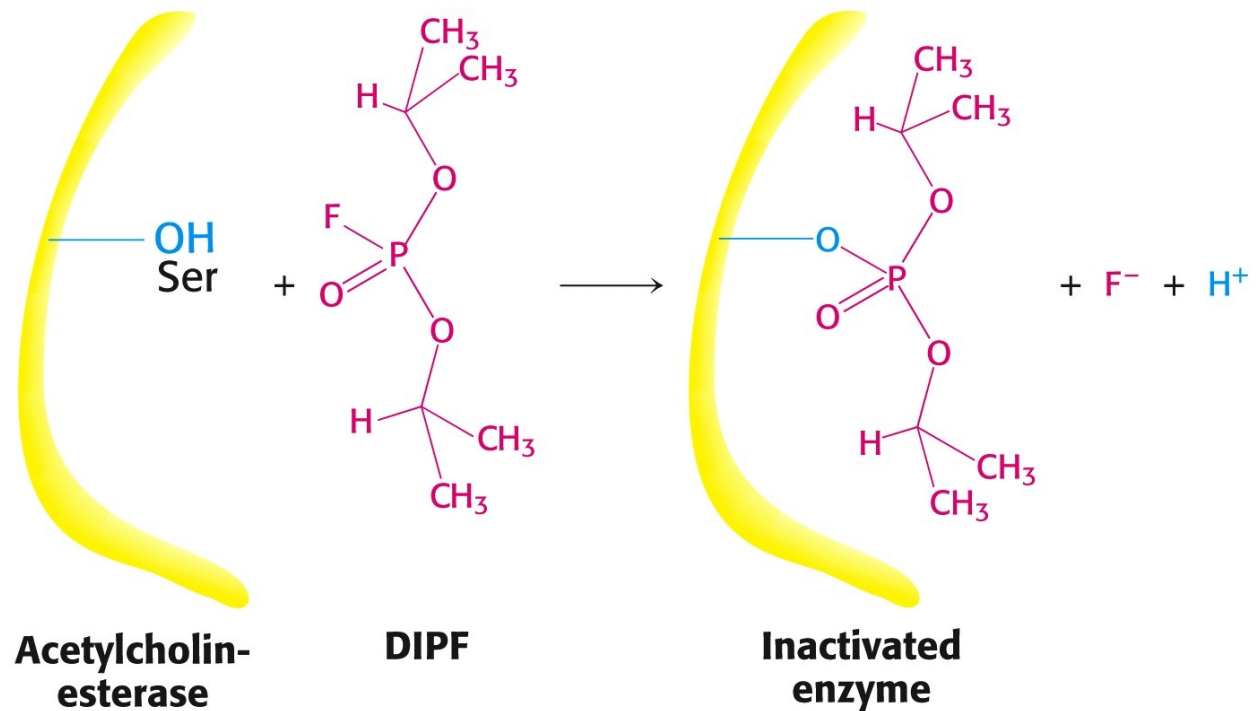
# Inhibice enzymové aktivity

- 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

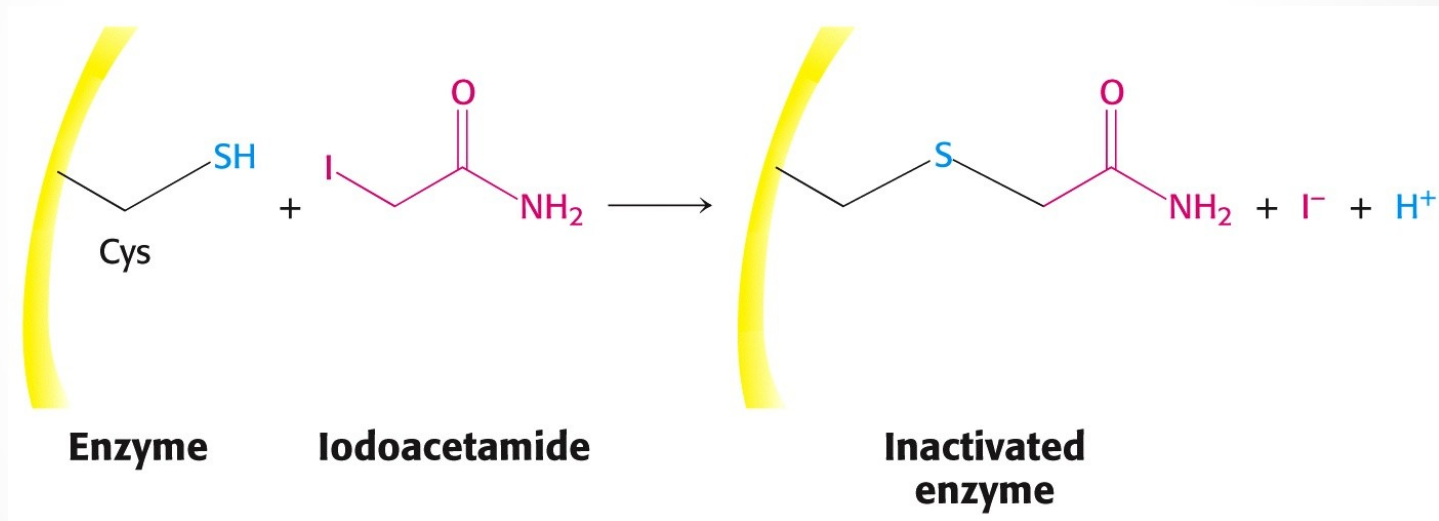


- Organofosfáty



# Ireverzibilní inhibice

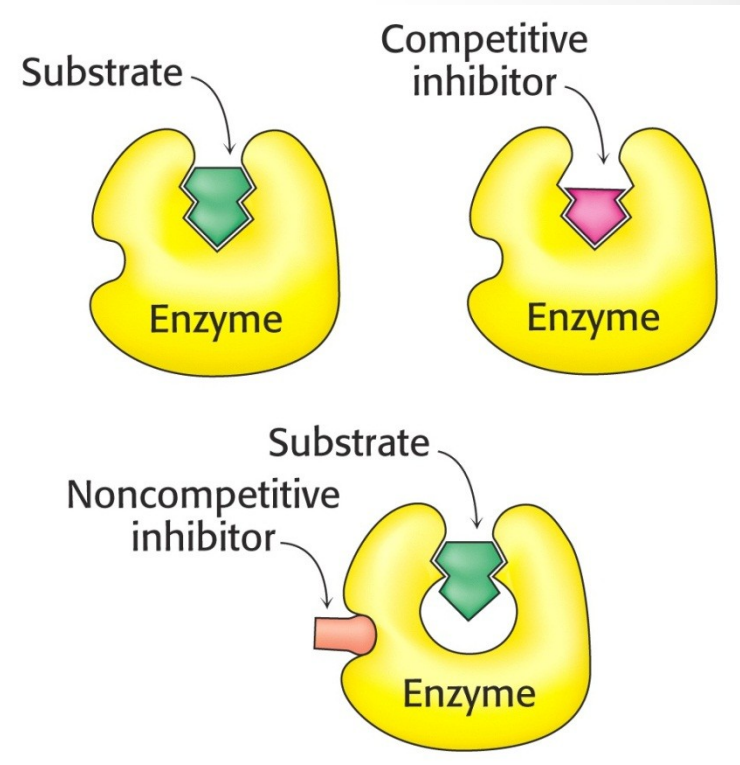
- SH-inhibitory



- Alkylační činidla, rtuťnaté sloučeniny (PCMB)

# Reverzibilní inhibice

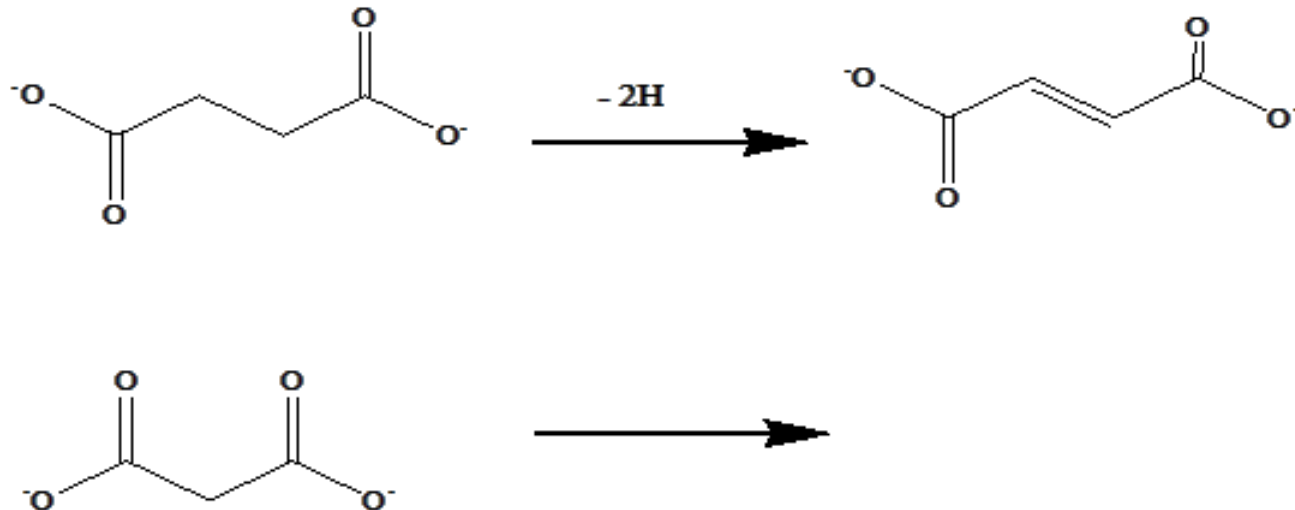
- Kompetitivní
  - Inhibitor se váže do aktivního místa
  - Strukturní podobnost se substrátem
  - Soutěžení inhibitoru se substrátem
- Nekompetitivní
  - Inhibitor se váže jinak
  - Substrát neovlivní vazbu inhibitoru
- Akompetitivní
  - Inhibitor se váže na komplex ES
- Alosterická
  - Vazba na jinou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



# Kompetitivní inhibice

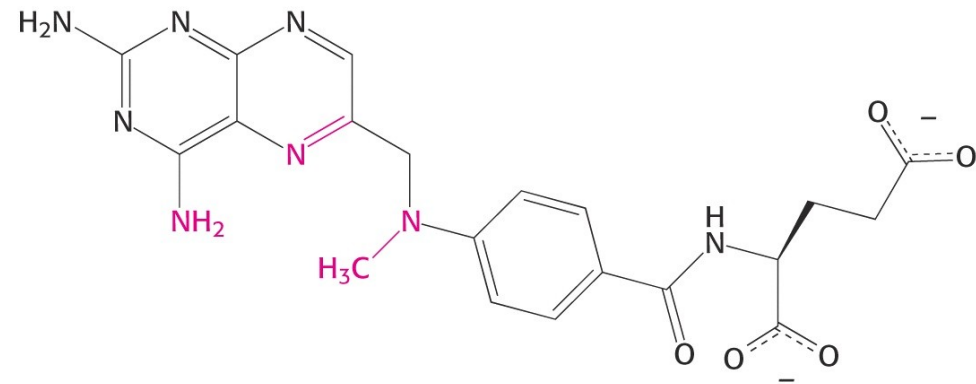
- Inhibice SDH malonátem

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

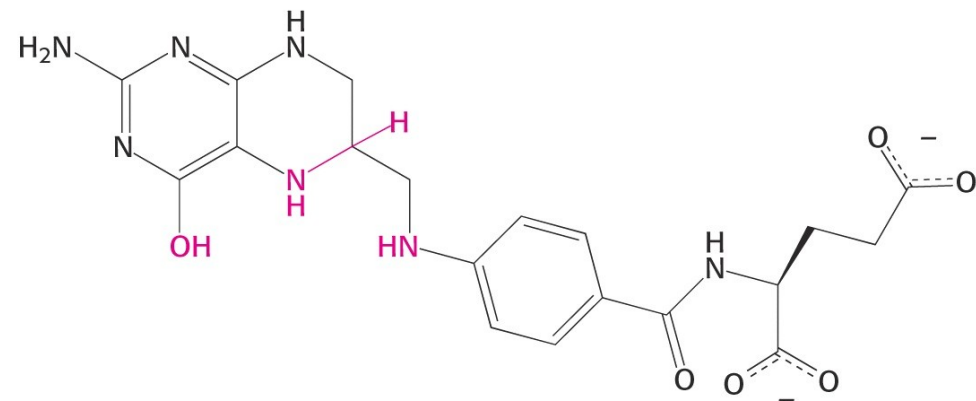


# Kompetitivní inhibice

- Inhibice DHF reductázy
  - Antimetabolit, cytostatikum
  - Syntéza tyminu aj. – BcII
  - Další analoga



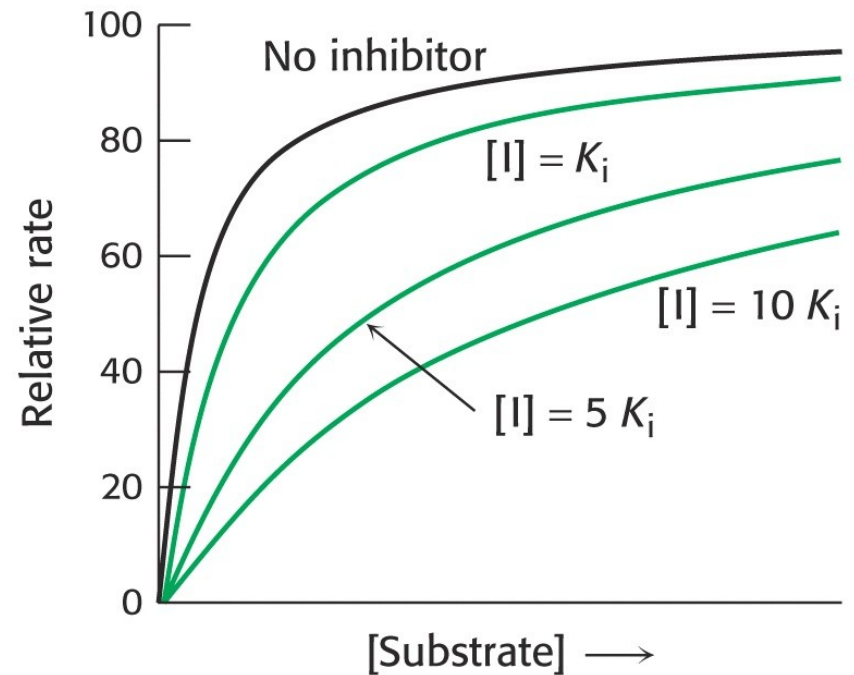
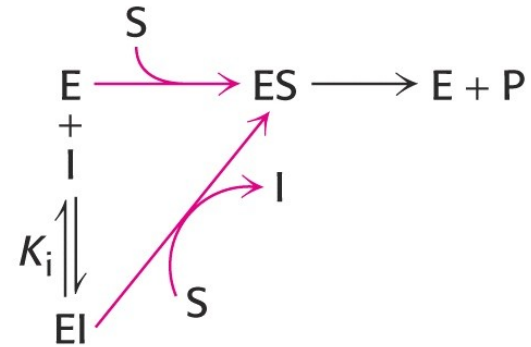
**Methotrexate**



**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

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

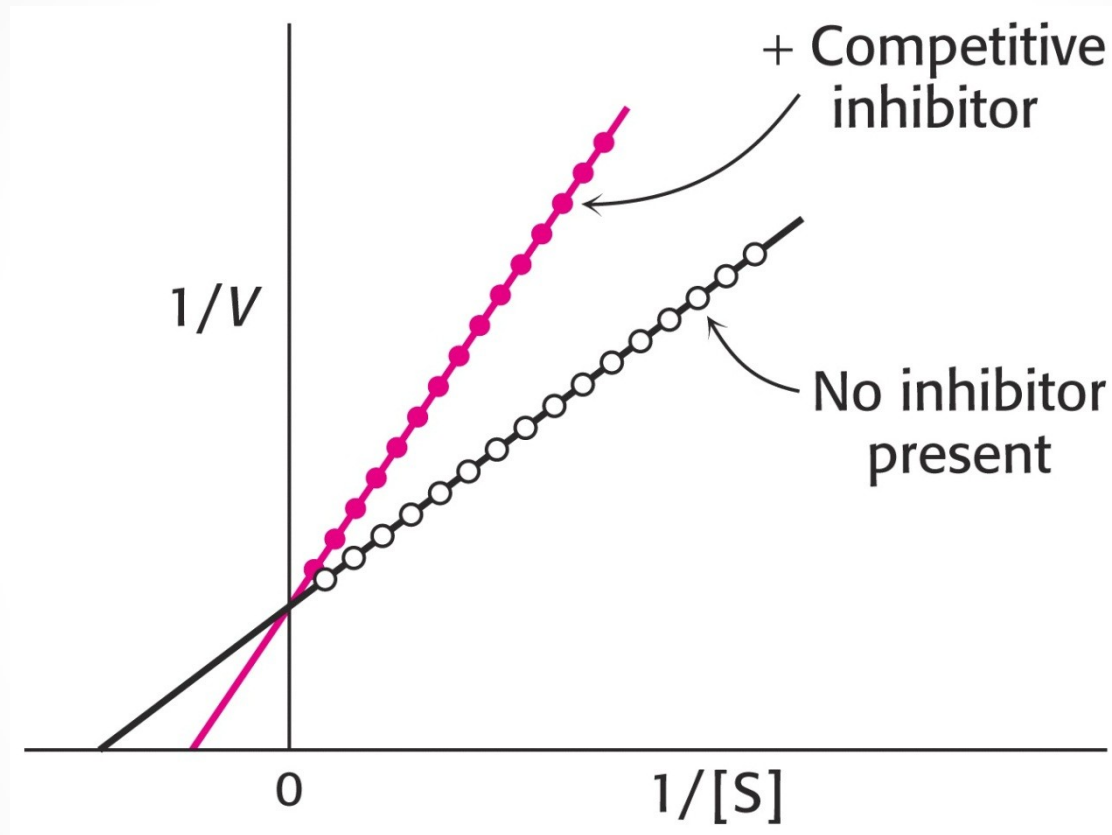
Výraz  $K_{app}$  nazýváme zdánlivou Michaelisovou konstantou

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

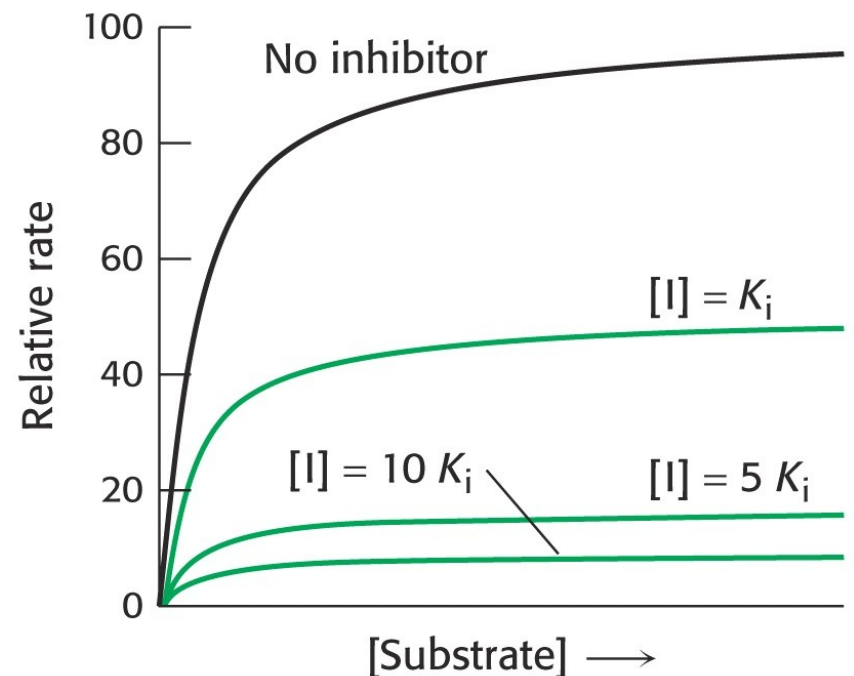
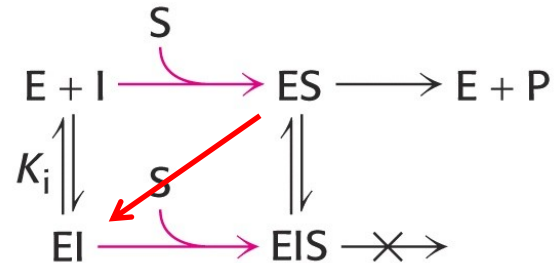
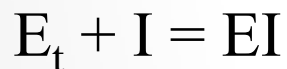
- váže se jak na volný E

tak komplex ES

- Vytváří komplex EI

-  $[EI]$  nezávisí na  $[S]$ ,

ale pouze  $[I]$





# Nekompetitivní inhibice

Zavedením do základní rovnice Michaelise a Mentenové pak dostáváme

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

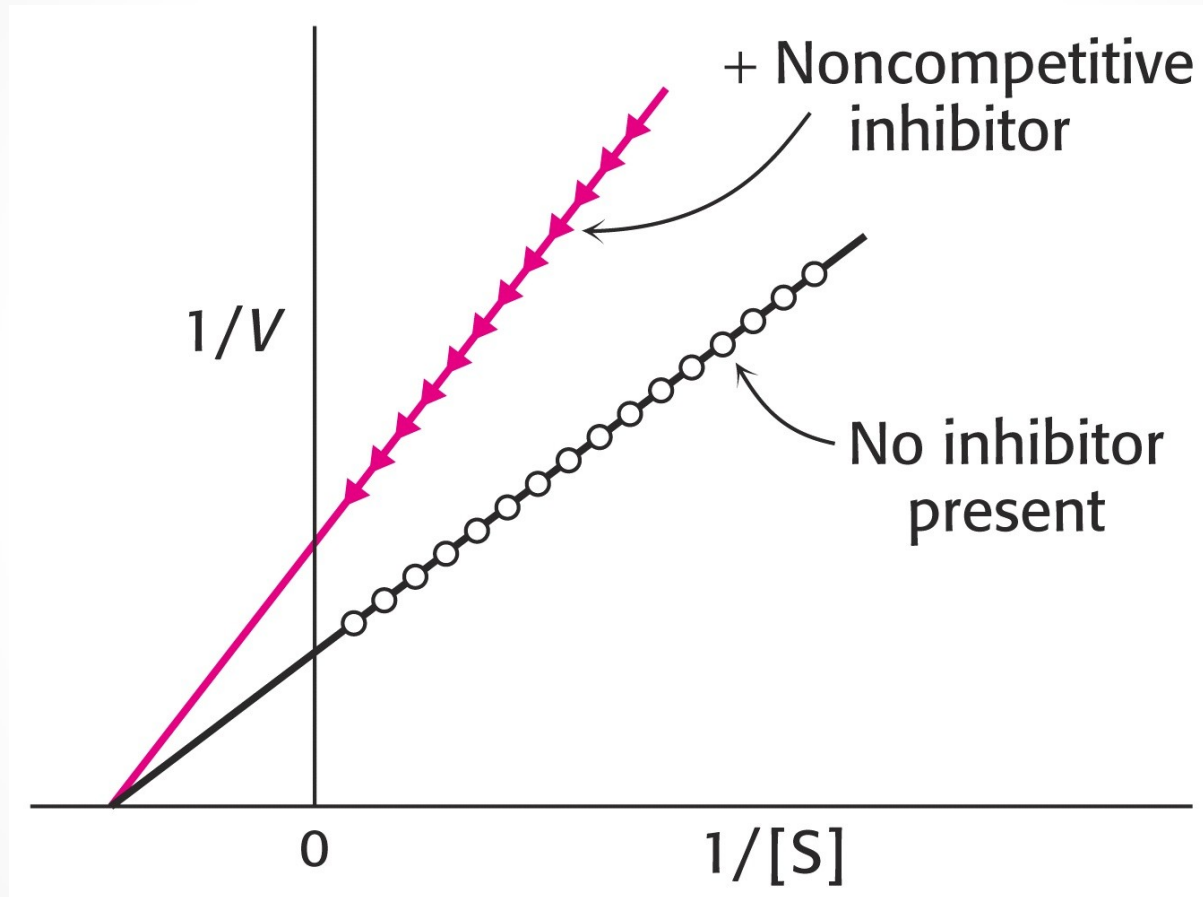
a po rektifikaci

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

$K_m$  se nemění

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

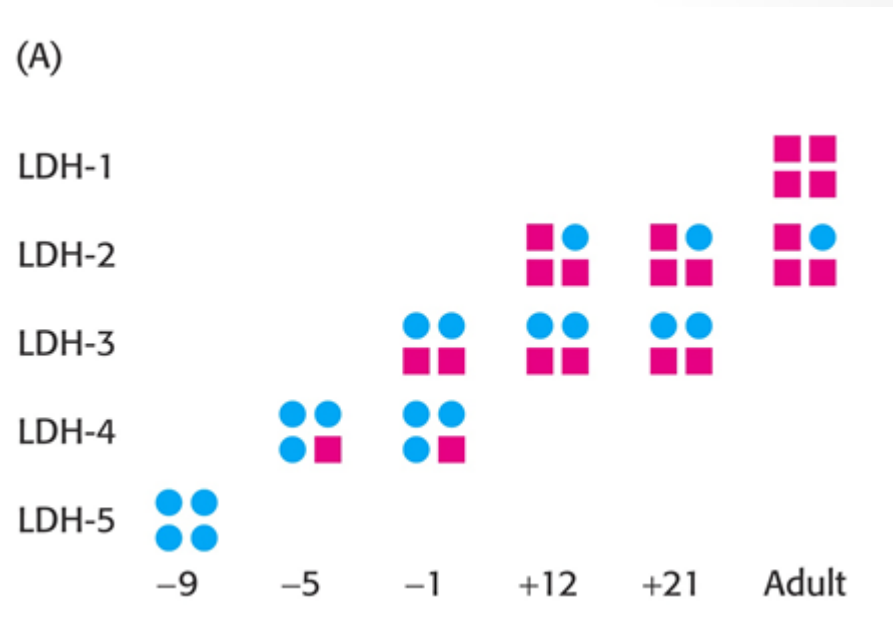
# Nekompetitivní inhibice



Grafická analýza dle Lineweavera a Burka

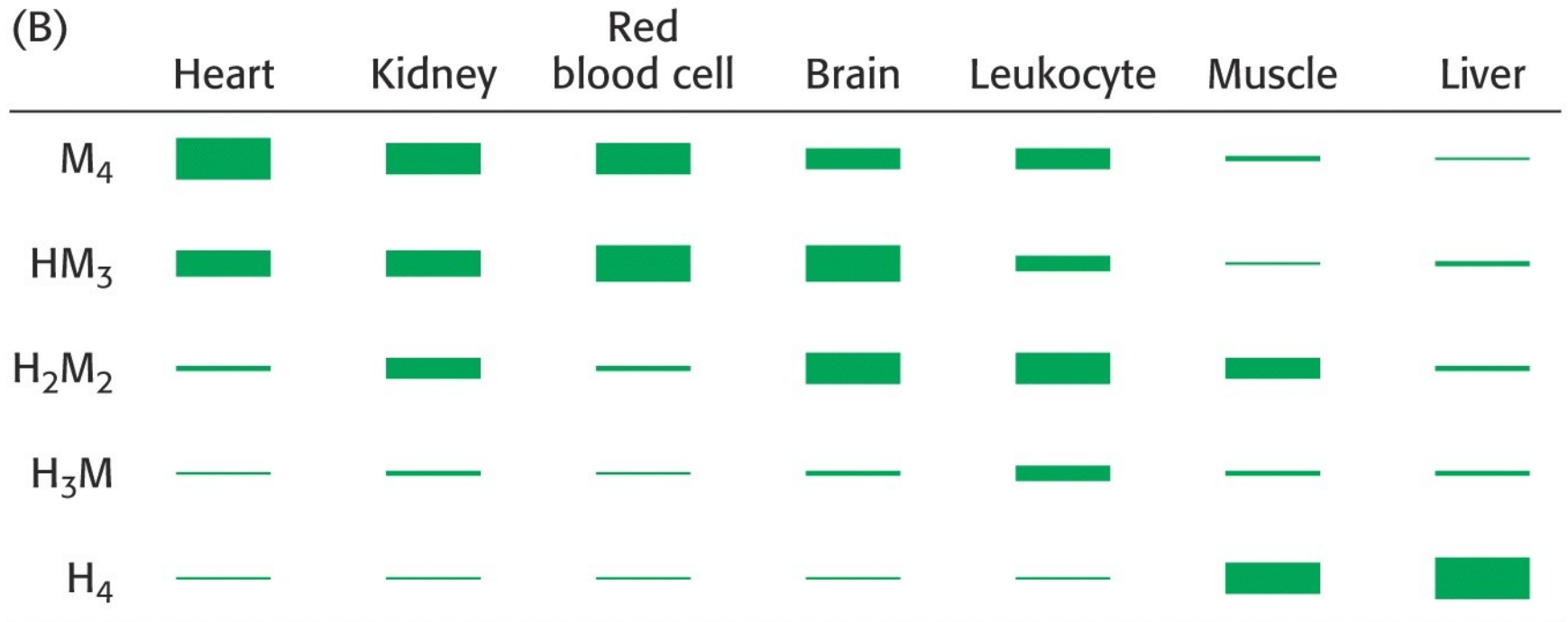
# Isoenzymy

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



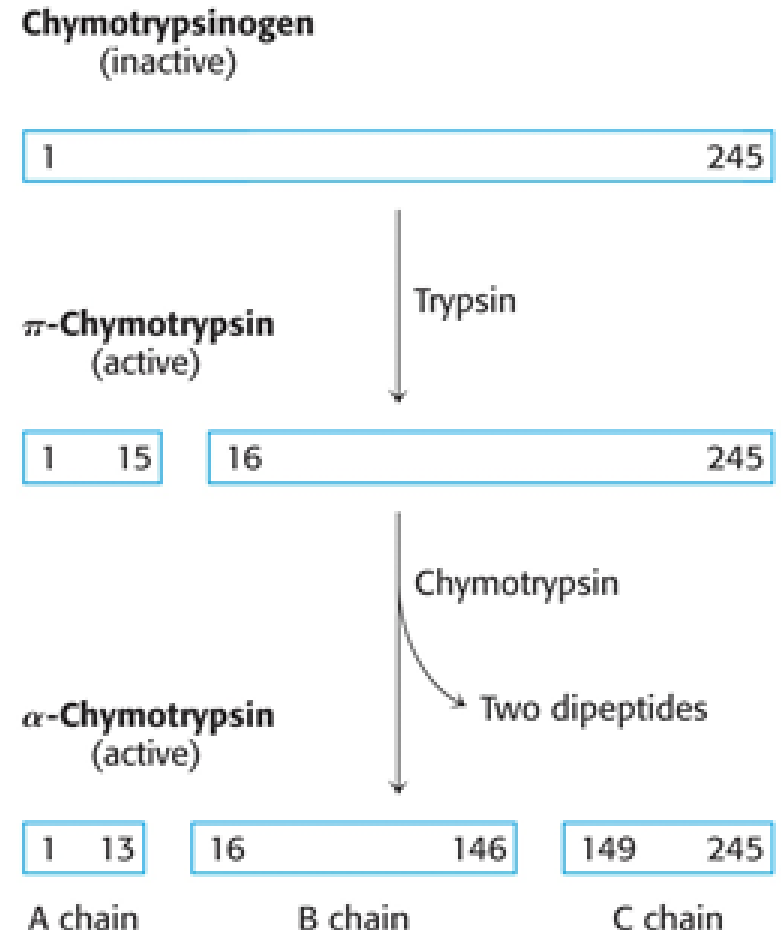
# Isoenzymy

- Orgánová specificita



# 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