

# Enzymová kinetika

## Enzymové jednotky - vyjádření koncentrace enzymu

obsah enzymů nelze obvykle určit přímo (přebytek balastních bílkovin)

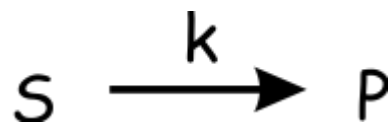
nepřímo - **aktivita** - odvozena od rychlosti enzymové reakce - množství přeměněného substrátu či vzniklého produktu za časovou jednotku. Tato rychlost ( $dc/dt$ ) se stanovuje vhodnými metodami, s výhodou fotometricky.

### 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  $\mu\text{mol}$  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)

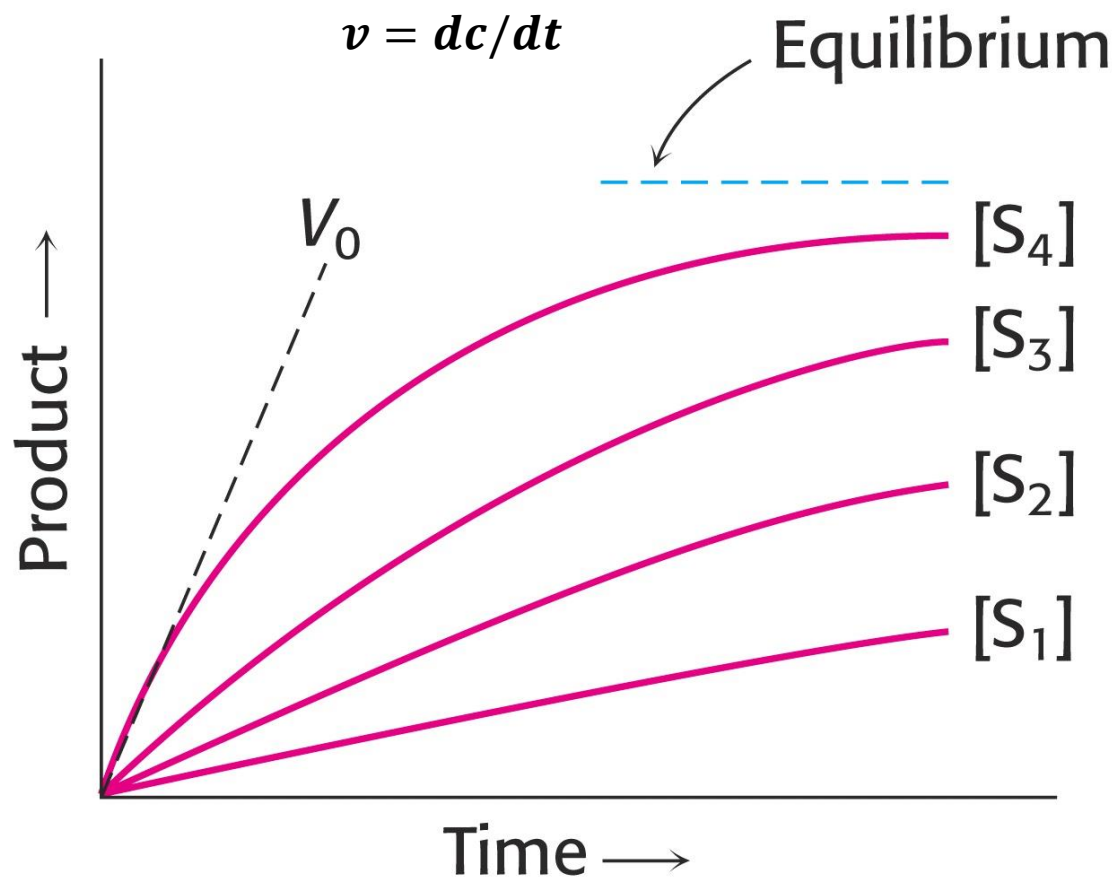
$$1 \text{ IU} = 16,67 \text{ nKat}$$

## Rychlost (enzymové) reakce



$$v = k \cdot [S]$$

$k$  - rychlostní konstanta  
 $[S]$  - koncentrace substrátu



### Metody stanovení

Stanovení  $[P]$  nebo  $[S]$  - pak  $-dc/dt$

Výhodnější  $[P]$ , ale záleží na možnostech metody

Spektrální - absorpční, fluorescenční aj., chemické, elektrochemické (amperometrie), enzymové (spřažené reakce)

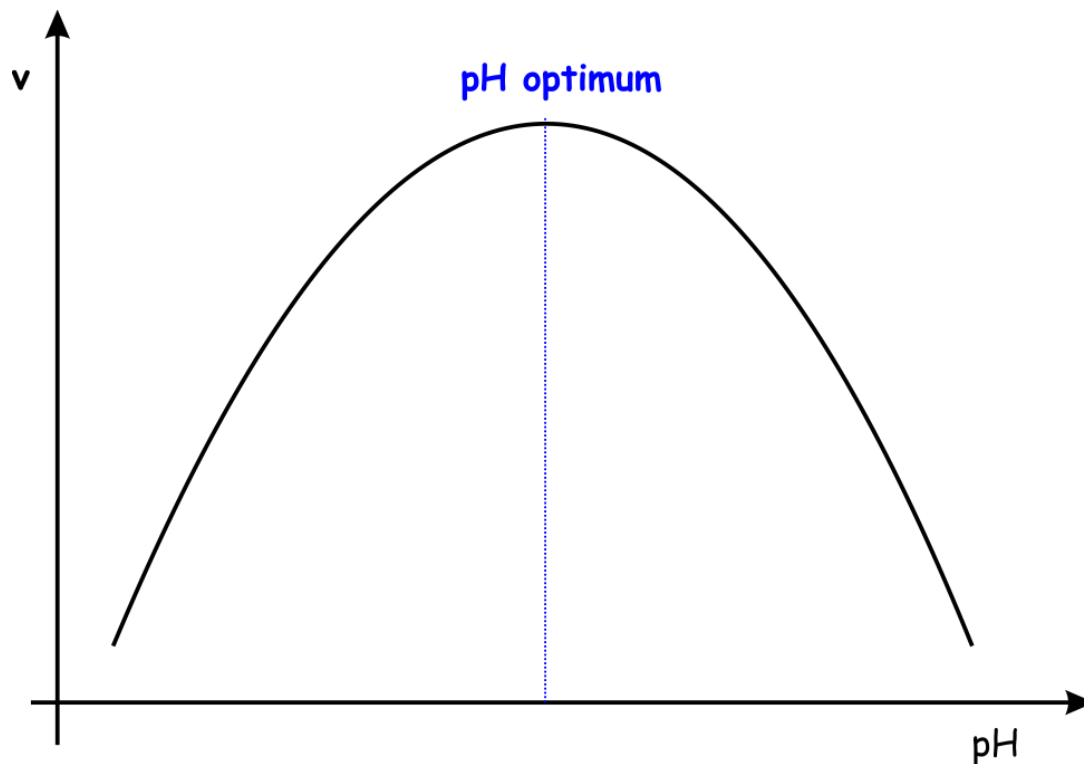
## Rychlost (enzymové) reakce - vliv prostředí

- pH - obvykle neutrální (pH 6-8 *neutrofilní*)  
*alkalofilní, acidofilní*
- teplota konvenční hodnota 30°C  
teplokrevní x studenokrevní, *mikroorganismy* aj.  
*psychrofilní do 20 °C, mezofilní 20 °C - 40 °C, termofilní, hypertermofilní (až 80 °C)*
- iontová síla - obvykle odpovídá 0,9% NaCl (fyziologický roztok)  
*halofilní (min. 0.2 M NaCl)*
- regulátory - inhibitory, aktivátory

### Optimální podmínky

- *In vivo* - fyziologické prostředí
- *In vitro* - snaha o napodobení optimálních (fyziologických) podmínek

## Vliv pH



Tvar závislosti určuje několik vlivů

- vliv ionizace substrátu(ů)
- vliv pH na disociaci vazebných skupin enzymu (aktivní centrum)
- irreverzibilní změny struktury enzymu při extrémních hodnotách pH

**pH optimum** daného enzymu navíc závisí na reakčních podmínkách (druh pufru, druh substrátu, koncentrace substrátu, přítomnost aktivátorů a inhibitorů, doba inkubace enzymu se substrátem atd.)

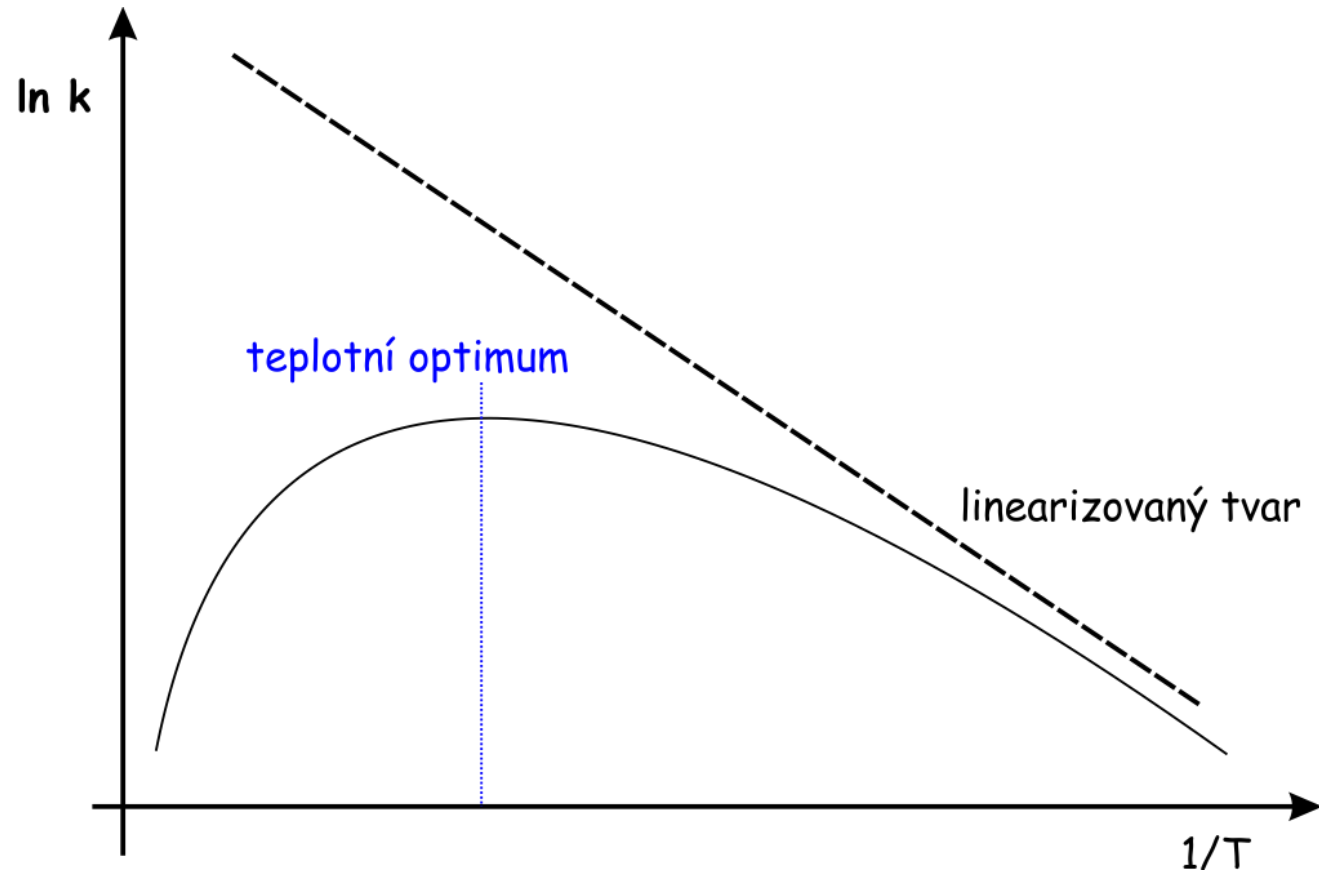
# Vliv teploty

## Arrheniova rovnice

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

A - „frekvenční faktor“



dva protichůdné procesy:

- zvýšování teploty - zvýšení kinetické energie molekul - zvýšení počtu jejich srážek -
  - zvýšení rychlosti reakce (Arrheniova rovnice)
- zvýšení rychlosti denaturace enzymu - pokles rychlosti reakce

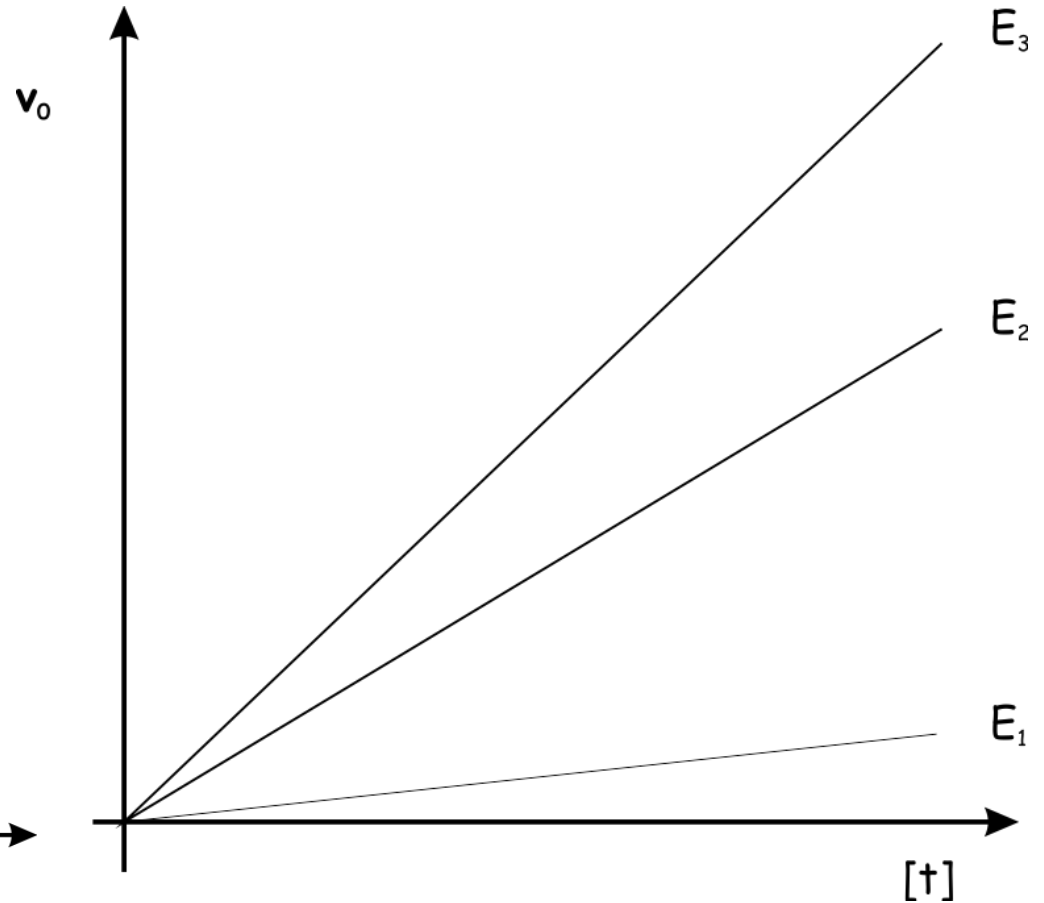
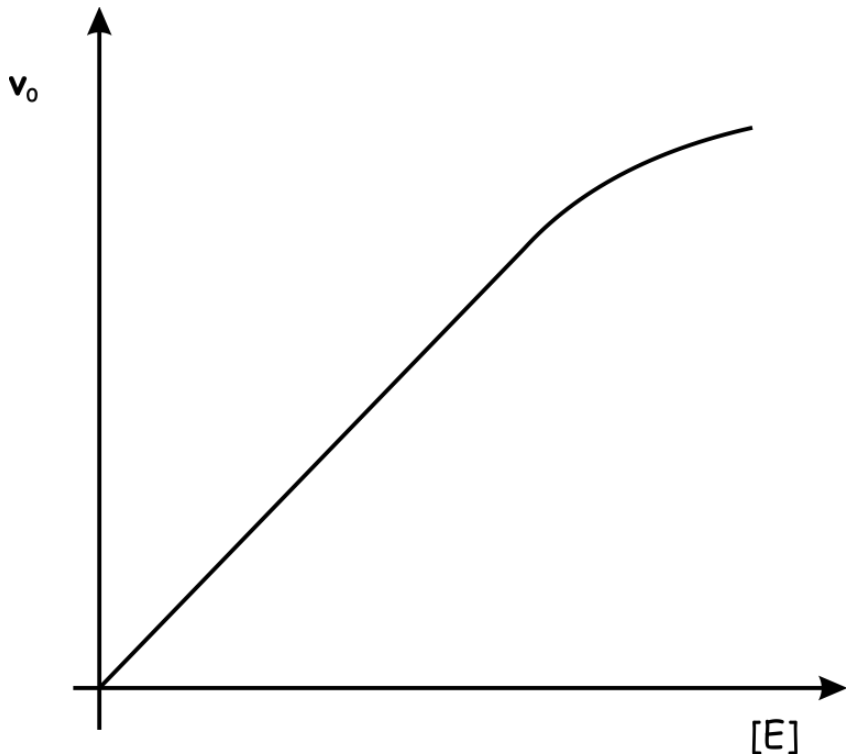
„teplotní optimum“ - závisí na dalších podmínkách, doba měření aj.

# Linearita - vliv koncentrace enzymu

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

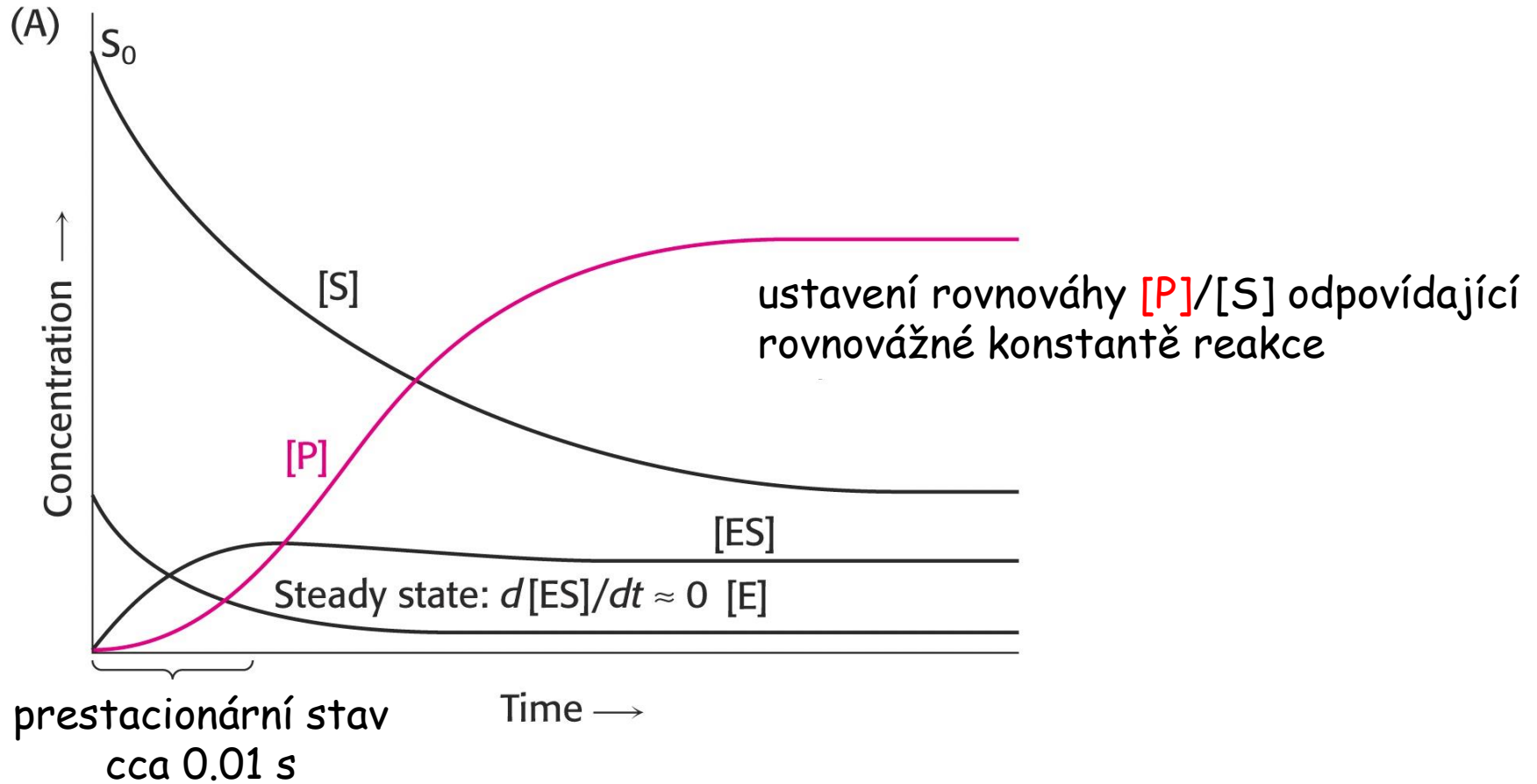
využití při stanovení koncentrace enzymu

[E] koncentrace enzymu



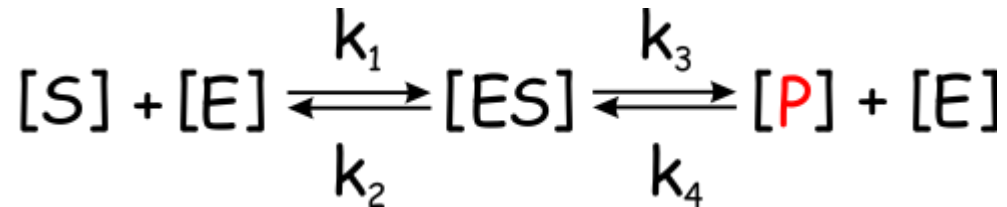
oblast linearity je důležitá pro určení množství enzymu pro jakékoliv měření rychlosti  $v_0$  počáteční reakční rychlost (odstranění vlivu snižující se koncentrace substrátu nebo vlivu vznikajících produktů)

# Kinetika enzymové reakce





# Stacionární kinetika



$$v_1 = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$$

$$v_2 = k_2 \cdot [ES]$$

$$v_3 = k_3 \cdot [ES]$$

$$v_4 = k_4 \cdot [E] \cdot [P] (= 0) \text{ platí pro podmínky } v_0 \text{ (počátek reakce)}$$

Za stacionárních podmínek koncentrace [ES] konstantní

$$v_1 + v_4 = v_2 + v_3$$

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

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

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

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

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

# Rovnice Michaelise-Mentenové $v_0 = f([S])$

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

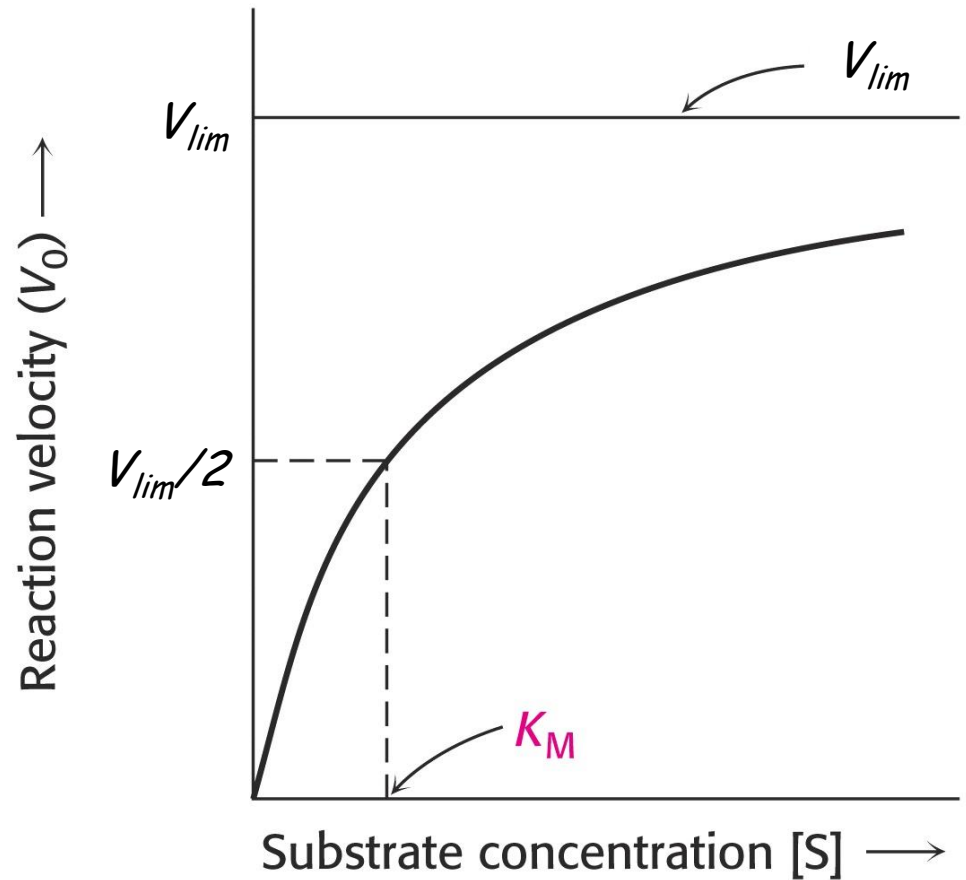
hyperbolický průběh

Speciální případy

$$[S] \ll K_m$$

$$[S] \gg K_m$$

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



## Stanovení kinetických parametrů $K_M$ a $V_{lim}$

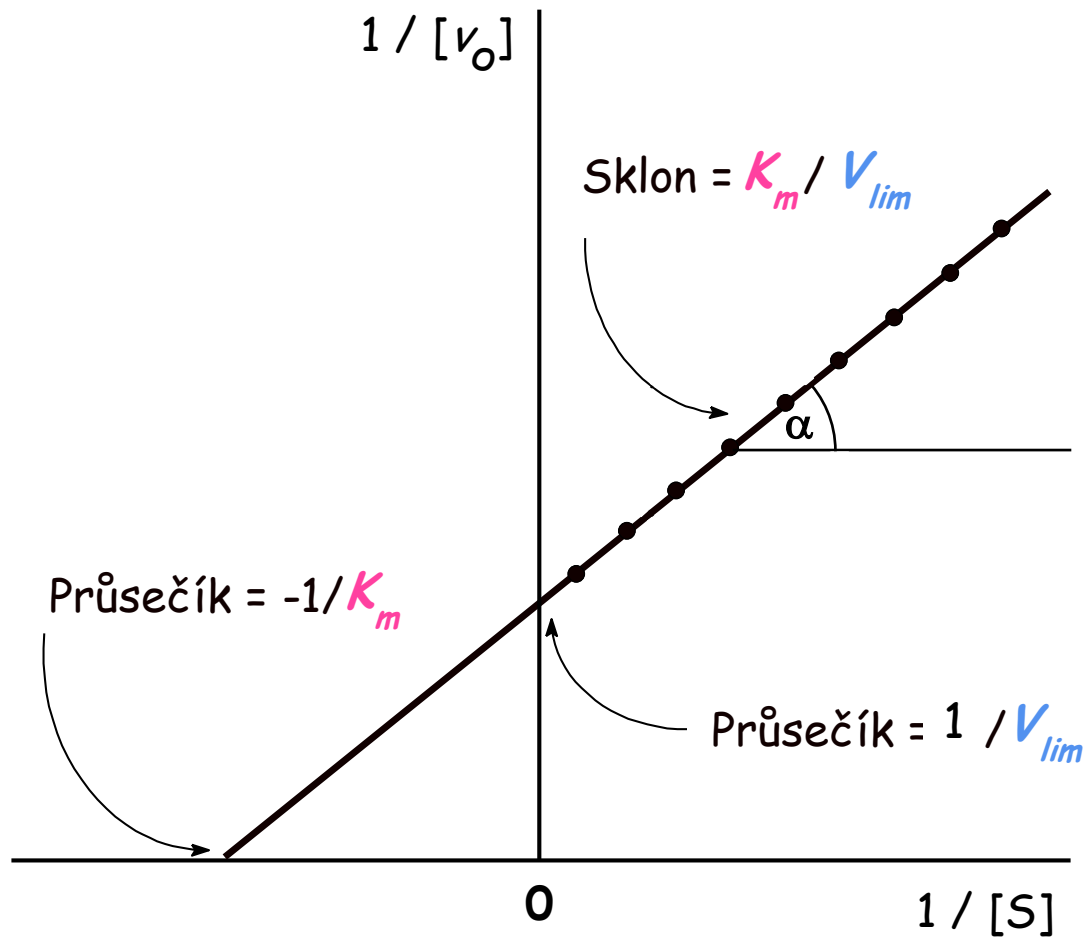
Lineární transformace rovnice Michaelise a Mentenové, tvar  $y = ax + b$

Vynesení dle Lineweavera a Burka  $1/v_0 = f(1/[S])$

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

Vynesení dle Hanese a Wolfa  $[S] / v_0 = f([S])$

Vynesení dle Eadie a a Scatcharda  $v_0 / [S] = f(v_0)$



Dvojnásobně reciproké vynesení  $1 / v_0$  proti  $1 / [S]$   
dle Lineweaver a Burka

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

## Michaelisova konstanta $K_m$

$K_m$  je mírou afinity substrátu k enzymu

- formálně disociační konstantou komplexu [ES]
- Není závislá na katalytickém množství (aktivitě enzymu), pokud pracujeme v oblasti lineární závislosti  $v$  na [E]
- 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, 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.)

### Specifická aktivita

- aktivita vztažená na celkové množství (koncentraci) vztažného parametru( bílkoviny) - katal/g
- udává stupeň přečištění enzymu

## Purifikační tabulka

	Celková bílkovina [mg]	Celková aktivita [nKat]	Specifická aktivita [nKat/mg]	Výtěžek [%]	Přečištění
Surový cytosol	2224	941.5	0.42	100	-
Frakcionace síranem amonným	540.4	667.5	1.23	70.8	2.9
IEC Sepharon Q HR10/10	97.1	561.3	5.78	59.0	13.7
GPC UltroPac TSK-G 3000	21.5	522.0	24.28	55.4	57.8

purifikace alkoholdehydrogenasy bakterie *Paracoccus denitrificans*

## Číslo přeměny (TN)

látkové množství substrátu (mol) přeměněné molem enzymu za časovou jednotku (s) -  $k [s^{-1}]$   
udává limitní rychlost enzymové reakce

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

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


$$k_{cat} = k_3 = k$$



## 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.

# Inhibice enzymové aktivity

## **Ireversibilní**

Váží se pevně a nevratně

Lze reaktivovat chemickou reakcí

## **Reversibilní**

interagují s enzymem vratně

dají se odstranit např. dialýzou, gelovou chromatografií

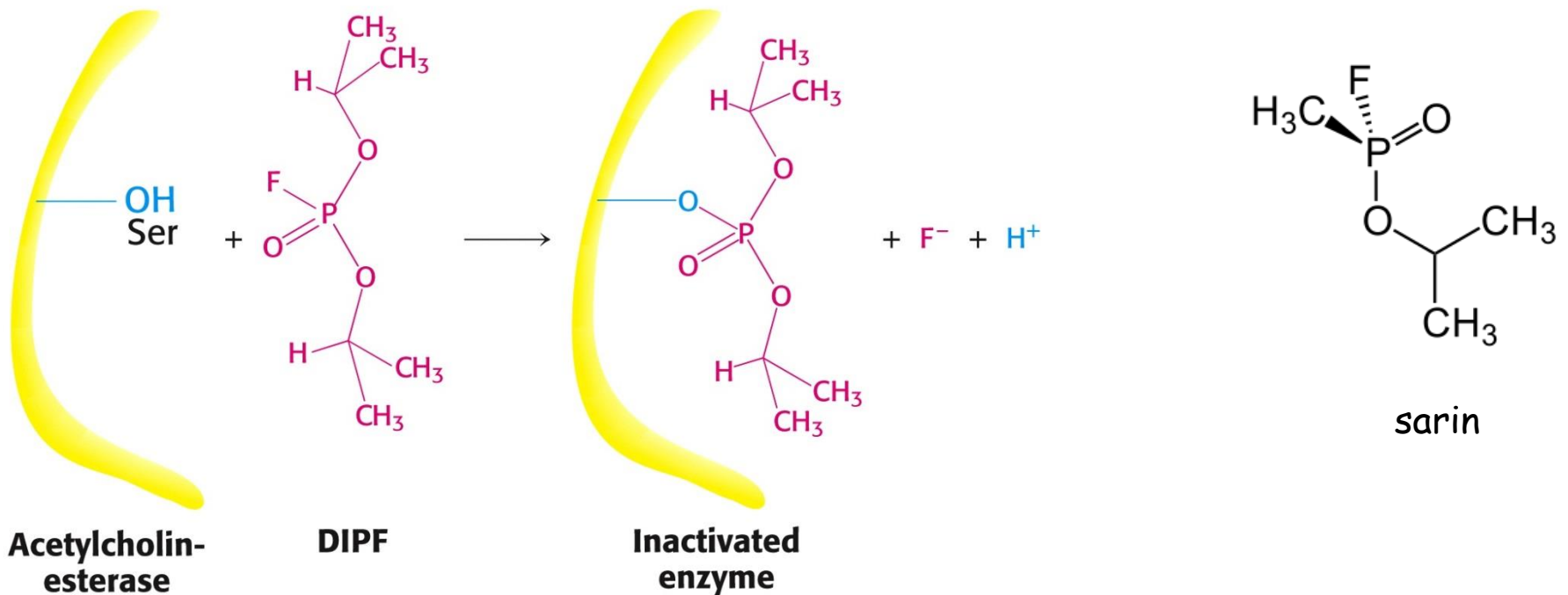
- **Kompetitivní**
- **Nekompetitivní**
- **Akompetitivní**

# Ireversibilní inhibice

Modifikační činidla

Studium aktivního centra

Organofosfáty (sarin), ionty těžkých kovů, alkylační činidla (cystein) ...



Ireverzibilní inhibice acetylcholinesterasy diisopropylfluorofosfátem

# Reversibilní inhibice

## Kompetitivní

- Inhibitor se váže do aktivního místa
- Strukturní podobnost se substrátem
- **Soutěžení inhibitoru se substrátem**

## Nekompetitivní

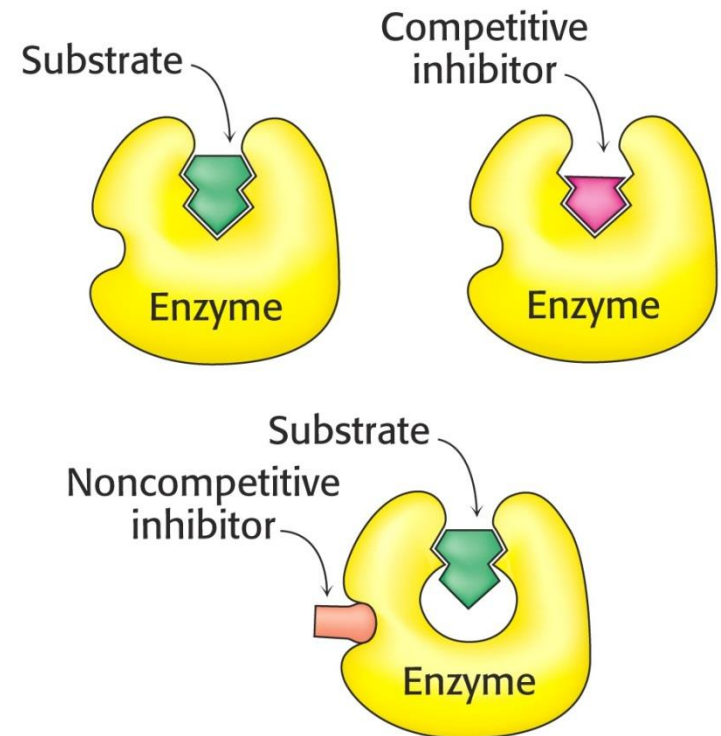
- Inhibitor se váže mimo vazebné místo
- Substrát neovlivní vazbu inhibitoru

## Akompetitivní

- Inhibitor se váže na komplex ES

## Alosterická

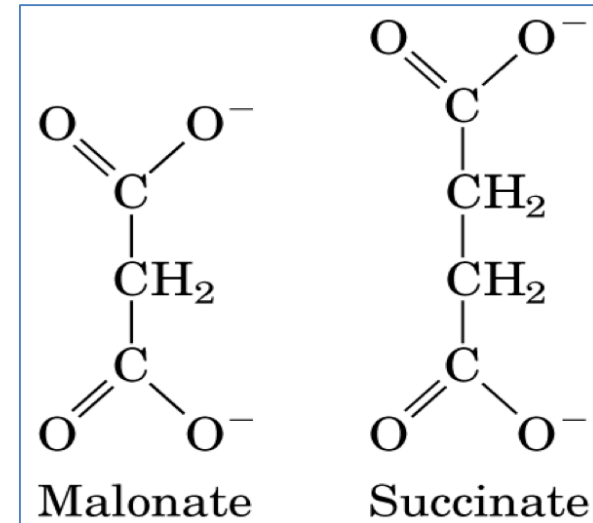
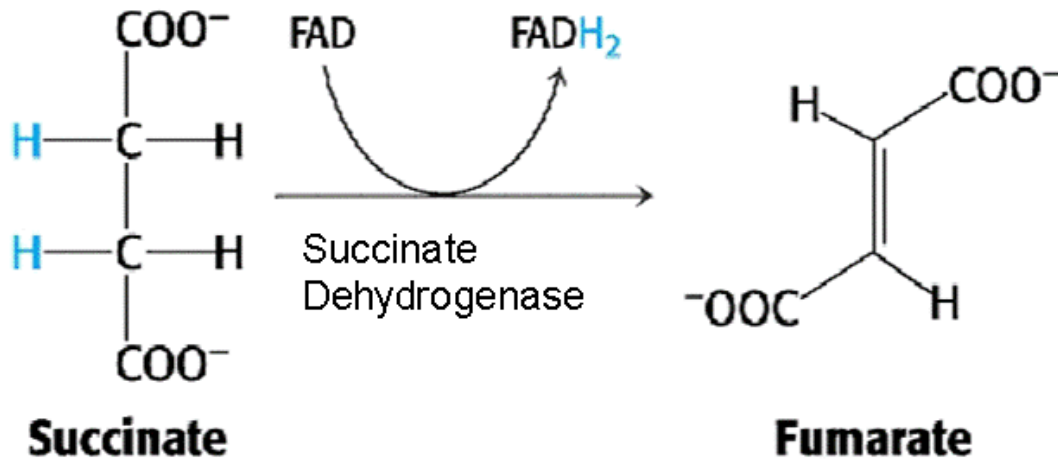
- Vazba na jinou podjednotku



# Kompetitivní inhibice

## Inhibice SDH malonátem

- Jantaran (sukcinát) je substrátem enzymu sukcinátdehydrogenasy (vzniká fumarát)
- Malonát je kompetitivním inhibitorem SDH (nelze ho dehydrogenovat)
- Strukturní podobnost, někdy bývá méně názorná (el. hustoty)
- Určení typu inhibice kineticky

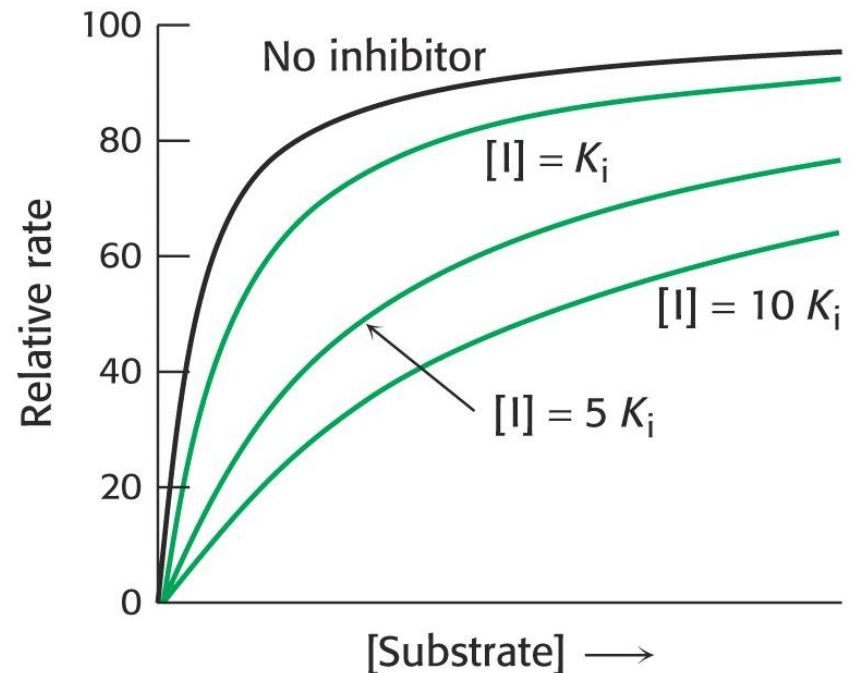
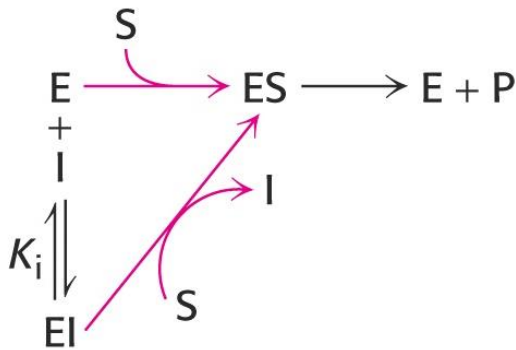


## Kompetitivní inhibitor

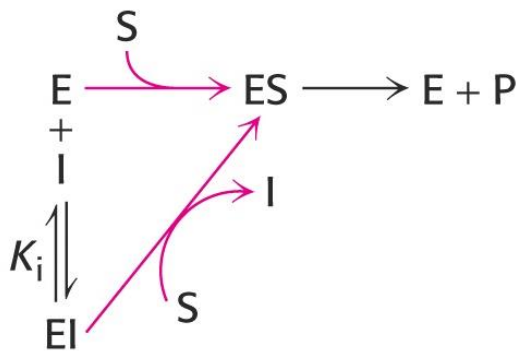
reaguje s volným enzymem a soutěží se substrátem vazné místo v aktivním centru.

může se navázat pouze na volný enzym

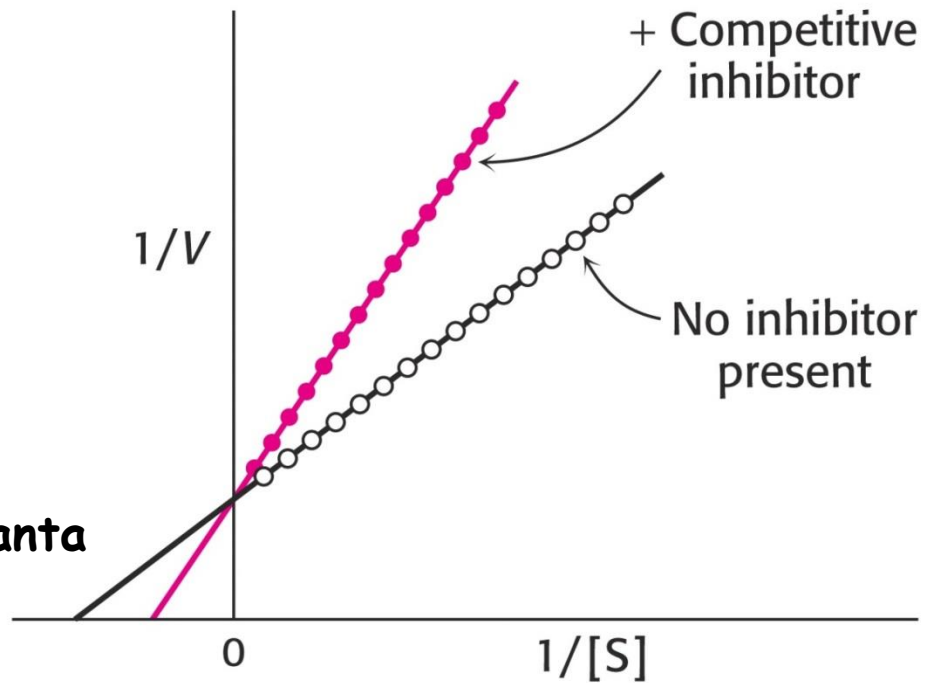
V reakční směsi se vyskytuje mimo E, S a ES ještě EI (komplex enzym-inhibitor), který se tvoří vratně mezi volným enzymem a inhibitorem



# Kompetitivní inhibitor - kinetická analýza



Výraz  $K_{app}$  zdánlivá Michaelisova konstanta  
 $V_{lim}$  se nemění



Oproti neinhibované reakci zahrnuje

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

dále

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

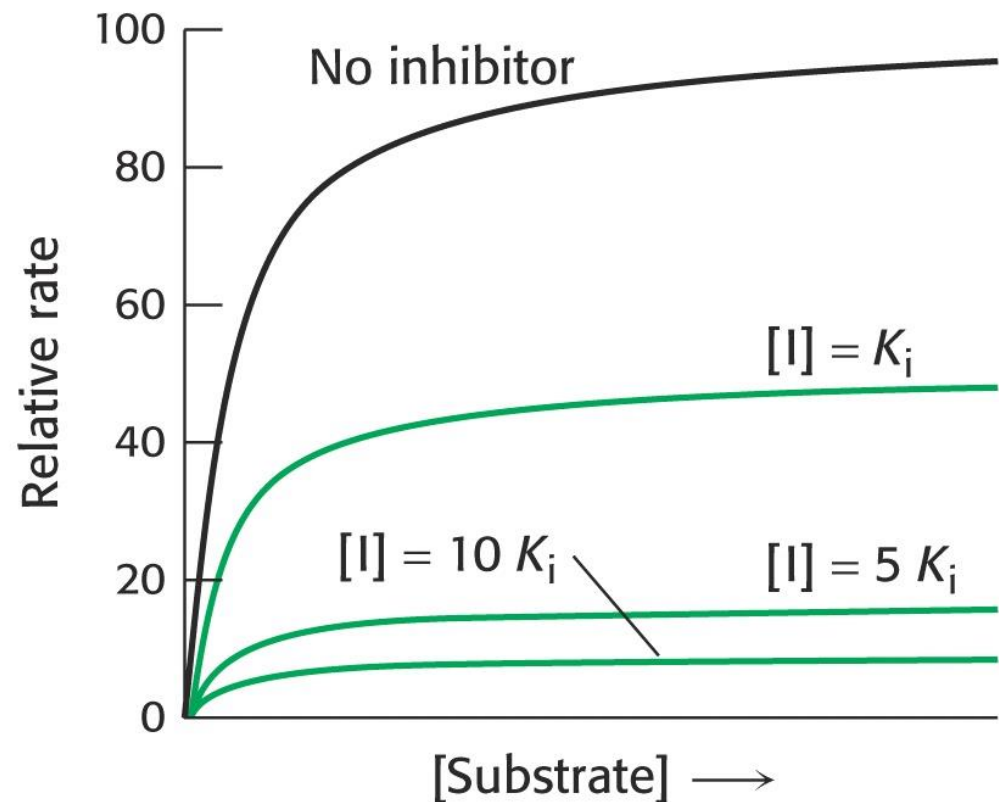
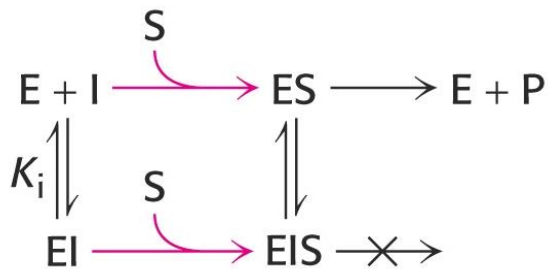
a po linearizaci

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

## Nekompetitivní inhibitor

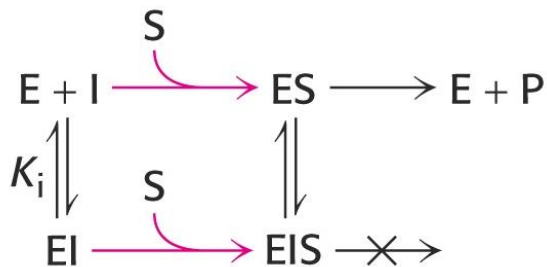
není podobný substrátu váže se jak na volný E tak na komplex ES

- Vytváří komplex EI
- $[EI]$  nezávisí na  $[S]$ , ale pouze  $[I]$   $E + I = EI$

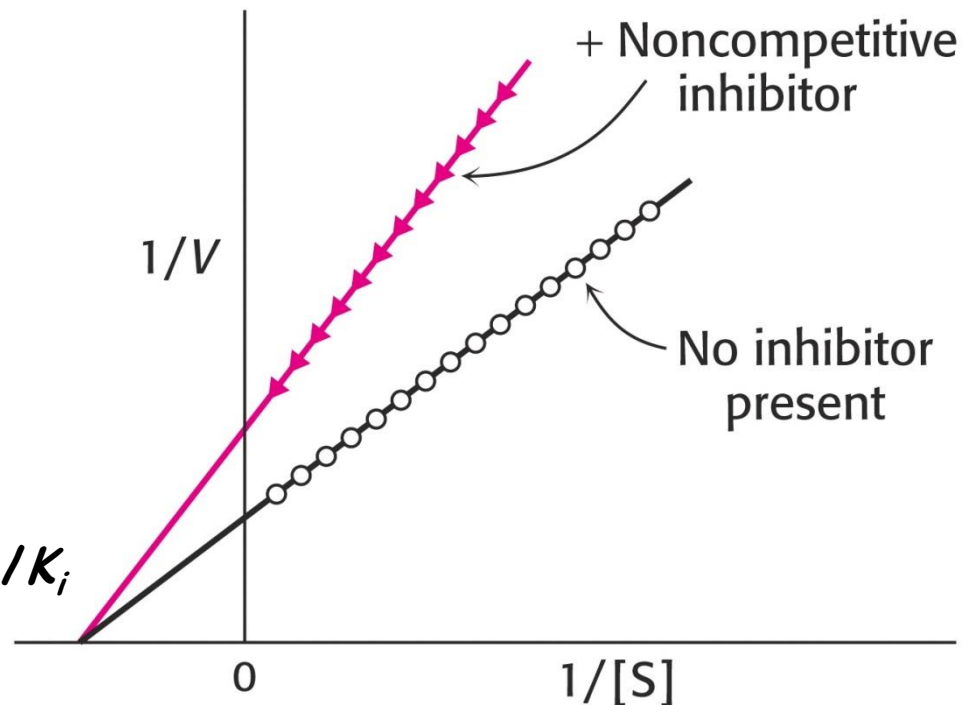




# Nekompetitivní inhibitor - kinetická analýza



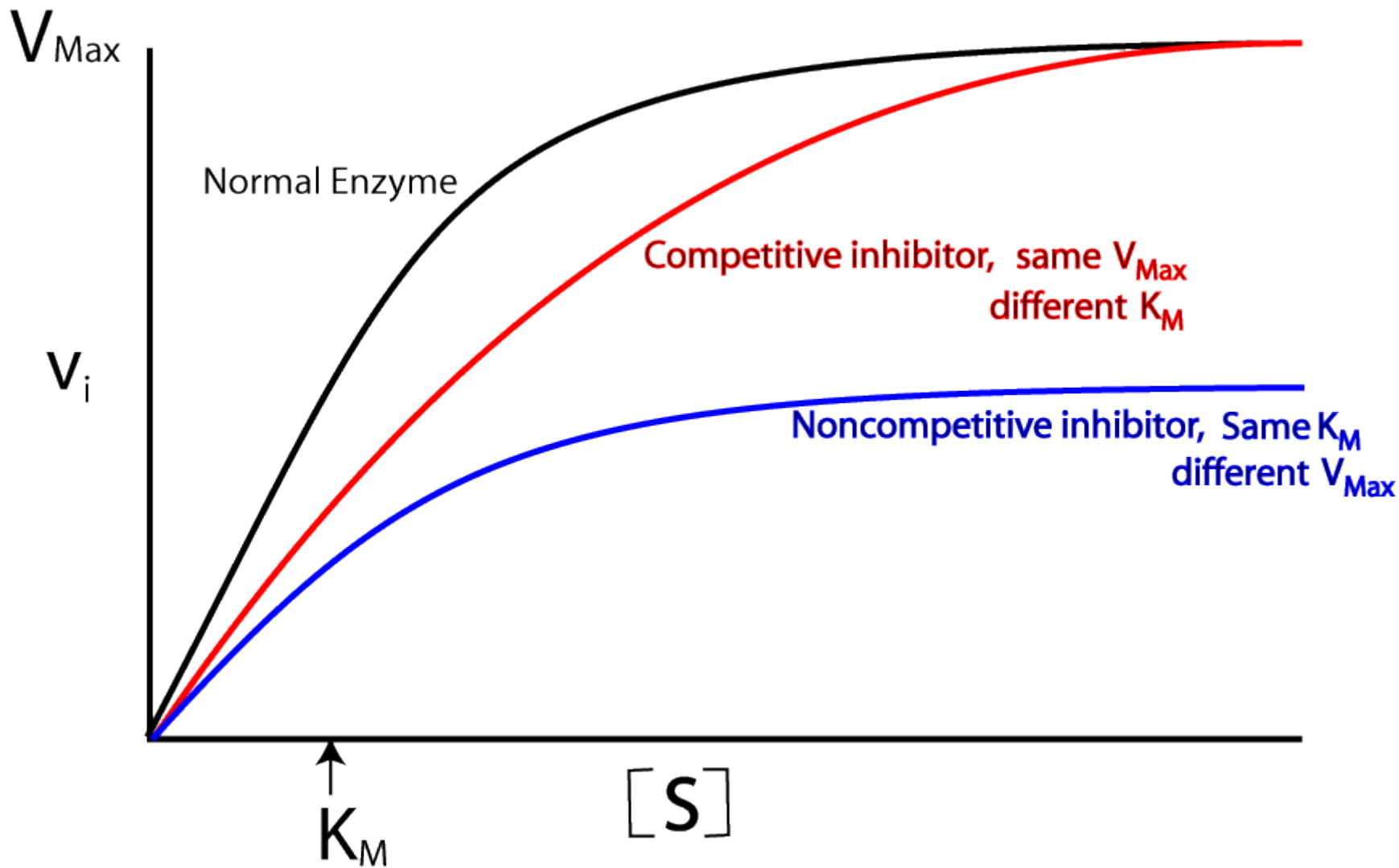
$K_m$  se nemění  
 $V_{lim}$  se snižuje úměrně poměru  $[I]/K_i$



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

a po linearizaci

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



## Akompetitivní inhibitor

neváže se na volný enzym (pouze na komplex [ES] )

Snižuje  $K_m$  i  $V_{lim}$

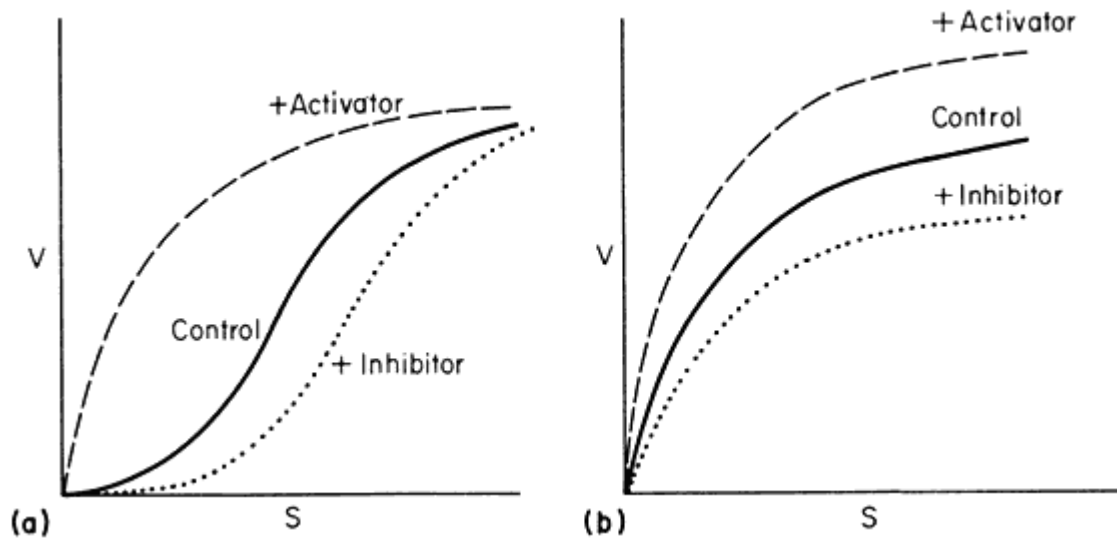
$$1/v = K_m/V_{lim} \cdot 1/[S] + 1/V_{lim} \cdot (1 + [I]/K_i)$$

Pokles hodnoty  $K_m$  je způsoben reakcí  $ES + I = ESI$ , která odčerpává část komplexu  $ES$  a tím posunuje rovnováhu reakce  $E + S = ES$  doprava

## Alosterická inhibice (aktivace)

### Alosterické enzymy

- vazba na jinou podjednotku (oligomerní enzymy)
- kooperativita podjednotek (viz. hemoglobin)
- efektivní regulace klíčových enzymů metabolických drah
- neřídí se Michaelisovskou kinetikou



# Izoenzymy

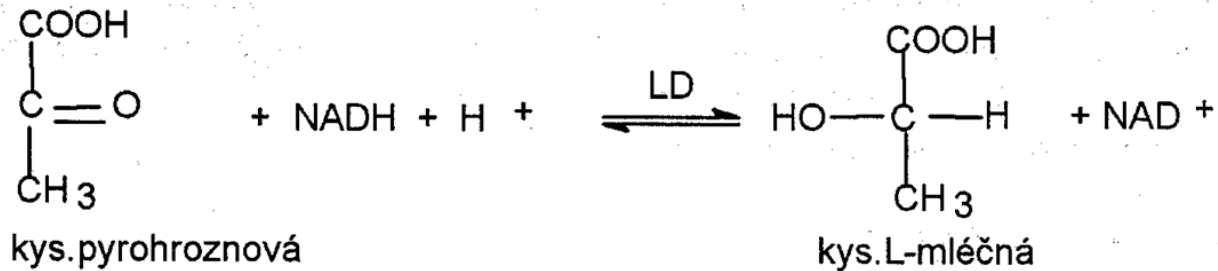
Enzymy, které katalyzují stejnou reakci, ale mají různou primární strukturu  
Jsou si velmi podobné, ale dají se oddělit (např. elektroforeticky)

Klinické aspekty

## 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

# Izoenzymy - laktátdehydrogenasa



Vyskytuje se ve všech tkáních (anaerobní glykolýza, cytoplasmatický enzym)

Tetramer - dva druhy podjednotek M a H

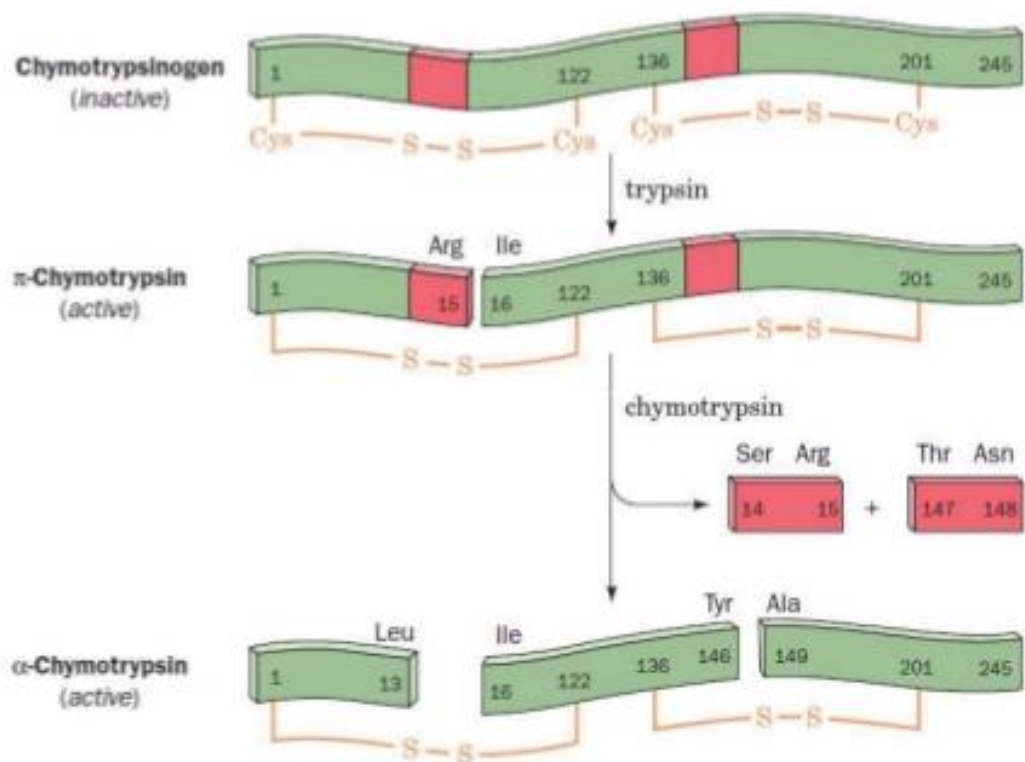
Kombinací vzniká pět izoenzymů H<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>M, H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>, HM<sub>3</sub> a M<sub>4</sub>

Marker poškození určité tkáně

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
H <sub>4</sub>	█	█	█	█	█	—	—
H <sub>3</sub> M	█	█	█	█	█	—	—
H <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	—	█	—	█	█	█	—
HM <sub>3</sub>	—	—	—	—	█	—	—
M <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	█	█

# Zymogeny - proenzymy

proteazy - aktivace až v místě účinku



# Praktické využití enzymů

## **Průmyslové využití**

Prací prostředky (proteolytické enzymy)

Krmivářství

Potravinářství

## **Lékařství**

Diagnostika (využití při stanovení mnoha složek klinického obrazu)

Terapie substituční (rozvoj spojený s přípravou rekombinantních proteinů)  
podpůrná (tlumení negativních účinků primární léčby)

## **Bioanalytická chemie**

Stanovení substrátů, inhibitorů

## **Enzymová katalýza v organické chemii**

Specifita reakcí, Stereoselektivita



# Extremofilní živočichové - „šampióni“

## Teplota

### **Strain 121**

hypertermofilní archebakterie z třídy Thermoprotei  
nalezena v roce 2003 v hydrotermálním průduchu v Puget Sound, USA  
růst při teplotách dosahujících 121 °C  
metabolismus je založen na redukci oxidů železa

### *Cryptoendolithotrophs*

mikroorganismus z Antarktidy aktivní do -15 °C  
pomáhá jim k tomu glycerol a další látky v těle

## pH

### *Thermoplasma acidophilus*

skládky hlušiny po těžbě uhlí pH 0

*Natronobacterium pharaonis* pH 10

## Iontová síla

### *Dunaliella salina*

jednobuněčná zelená řasa (30 % roztok soli), Mrtvé moře (Izrael)  
produkuje vysoký obsah beta-karotenu (průmyslové využití)  
a glycerolu (ochrana proti osmotickému tlaku)



## Radiace

### *Deinococcus radiodurans*

Vydrží bez problémů dávku 5000 Gy (40% jedinců zvládne dokonce i 15 000 Gy)  
žije i v blízkosti jaderných zařízení

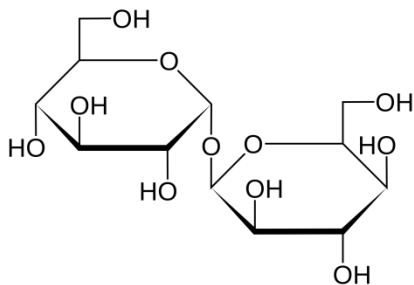
Pro srovnání, člověk onemocní již při 2 Gy a 6 - 10 Gy se považuje za letální dávku.  
Běžné bakterie nepřežijí více než 60 Gy.

# Nejodolnější živočich

**Želvuška** - drobný příbuzný členovců o velikosti 0,1 - 1,5 mm  
výskyt prakticky všude, včetně extrémně chladných či suchých oblastí,  
nejčastěji však ve vodě nebo alespoň vlhku, například v mechu nebo v porostech lišejníků

Přežijí (v anabióze, kdy zcela vyschnou a buňky stabilizují cukrem trehalosou):

- vysoké teploty do 150°C (po dobu několika minut)
- mráz -272,8°C,
- dlouhodobé zamrznutí
- obrovské tlaky až 600MPa
- odolají i vakuu
- ozáření rentgenovými paprsky do 5700 Gy
- jsou schopny žít i sto let
- Dsup protein + kopie důležitých genů



trehalosa

$\alpha$ -D-Glc-(1  $\rightarrow$  1)- $\beta$ -D-Glc

