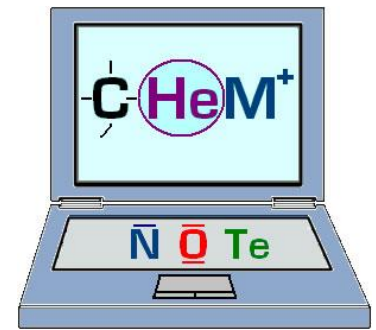




Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



ENZYMY II

kinetika, inhibice

Enzymová kinetika

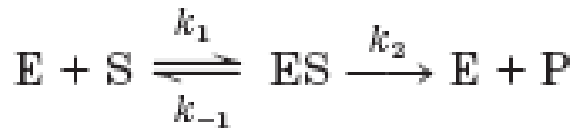
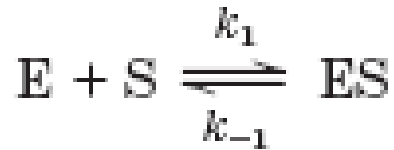
- obor enzymologie, zabývající se studiem rychlosti reakcí katalysovaných enzymy, případně tím, jak se změní rychlost reakcí se změnou experimentálních podmínek
- $[S]$ – koncentrace substrátu
- $[E]$ – koncentrace enzymu
- v_o – počáteční reakční rychlost
- V_{lim} – limitní rychlost
- K_m – Michaelisova konstanta

Počáteční reakční rychlost

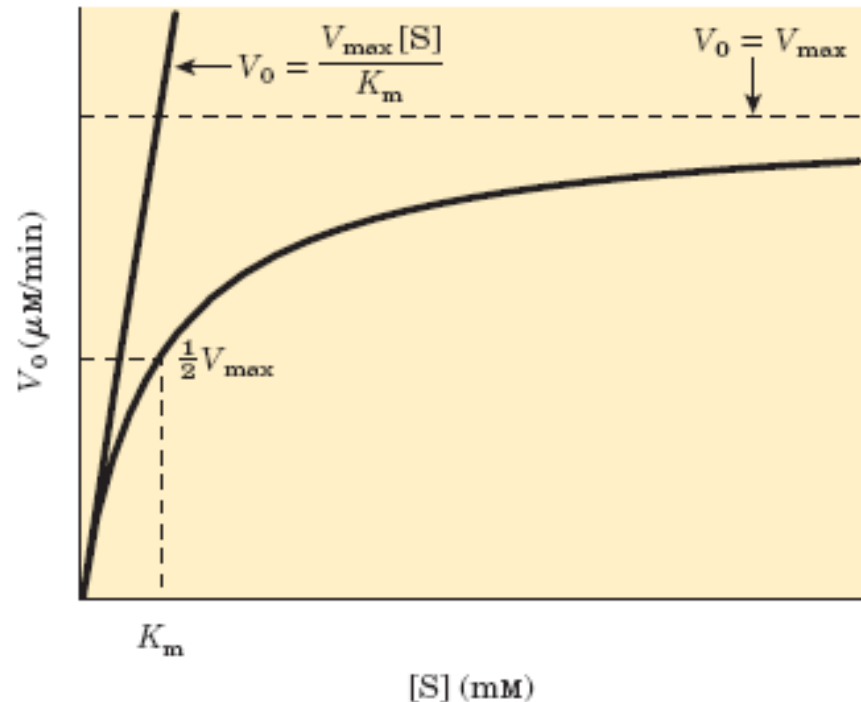
- jedním z největších vlivů na rychlost enzymové reakce má koncentrace substrátu $[S]$
- studium tohoto vlivu ale není jednoduché, protože $[S]$ se v průběhu reakce mění, jak je S přeměňován na P
- proto se zavádí termín počáteční reakční rychlost (definováno pouze pro pokusy *in vitro*, kde lze zajistit podmínku nulové koncentrace produktu) – pro podmínku, že $[S]$ je mnohem vyšší než $[E]$ (což je v běžné reakci splněno, $[S]$ bývá 10^6 větší)
- měříme-li v prvních max. 60s reakce, jsou změny v $[S]$ tak malé, že je můžeme zanedbat a můžeme považovat $[S]$ za konstantu
- navíc reakce běží jen jedním směrem, protože $[P]$ je v počátcích zanedbatelná

- stanovení v_0 :
 - k definovanému objemu roztoku, obsahujícímu substrát o koncentraci $[S_0]$, přidáme určité množství enzymu a vhodnou analytickou metodou sledujeme množství vznikajícího produktu (nebo ubývajícího substrátu)
 - počáteční rychlost určíme jako směrnici časové závislosti koncentrace produktu (substrátu) v čase nula
 - reakční rychlost s časem klesá – nutno ošetřit, zda je pokles koncentrace substrátu ještě přijatelný – obvykle se připouští pokles 5 %

Rovnice Michaelis-Mentenové



$$V_0 = \frac{V_{\max} [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$



Leonor Michaelis,
1875–1949



Maud Menten,
1879–1960



$$[E_0] = [E] + [ES]$$

$$[S_0] = [S] + [ES]$$

$$[S_0] \gg [E_0] \quad (\text{vázaný substrát zanedbáváme})$$

$$v_0 = k_2 \cdot [ES] \quad (\text{limitující krok reakce - vznik produktu})$$

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

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E_0] \cdot [S] - [ES] \cdot (k_{-1} \cdot [S] + k_{-1} + k_2) \quad (\text{dosazením za } [E] = [E_0] - [ES])$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (\text{teorie stac. stavu})$$

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E_0] \cdot [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]}$$

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot [E_0] \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (\text{dosazením } v_0 = k_2 \cdot [ES])$$

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

$$V_{lim} = \lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{k_2 \cdot [E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]} = k_2 \cdot [E_0] \quad (\text{nasycení substrátem})$$

$$v_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{rovnice Michaelise a Mentenové})$$

Jaké závěry lze vyvodit z rovnice Michaelise a Mentenové?

- závislost v_0 na $[S]$ limituje pro vysoké koncentrace $[S]$ k tzv. *limitní rychlosti* – nasycení substrátem
- konstanta K_M má rozměr koncentrace substrátu
- konstanta K_M má hodnotu koncentrace substrátu, která je zapotřebí k dosažení poloviny limitní rychlosti
- konstanta K_M nezávisí na koncentraci enzymu
- hodnota V_{lim} je přímo úměrná koncentraci enzymu $[E_0]$
- vydělením V_{lim} hodnotou $[E_0]$ získáme konstantu k_2 – *molekulární (molární) aktivita, katalytická konstanta, číslo přeměny (turnover number)* – počet molekul (molů) substrátu přeměněný jednou molekulou enzymu za časovou jednotku

Katalytická aktivita enzymového preparátu

≈ množství aktivního enzymu

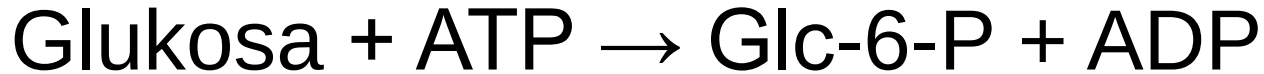
Katalytickou aktivitu 1 katal (1 U) vykazuje enzymový preparát, který za definovaných podmínek (pH, pufr, teplota) při **nasycení substrátem** přemění 1 mol (1 μ mol) substrátu za 1 sec (1 min).

Specifická aktivita – aktivita vztažená na mg enzymu

Molekulová (molární) aktivita – aktivita vztažená na mol enzym (číslo přeměny)

$$k_{kat} = \frac{V_{lim}}{[E]}$$

K_m : Příklad hexokinasa



	<u>Glukosa</u>	<u>Allosa</u>	<u>Mannosa</u>	Substrát
číslo				
1	CHO	CHO	CHO	
2	H-C-OH	H-C-OH	HO-C-H	
3	HO-C-H	H-C-OH	HO-C-H	
4	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH	
5	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH	
6	H ₂ -C-OH	H ₂ -C-OH	H ₂ -C-OH	
K_m	8	8 000	5 μM	

Číslo přeměny

Enzymy	Substráty	k_{kat} (s ⁻¹)
katalasa	H ₂ O ₂	40 000 000
dekarboxylasa	HCO ₃ ⁻	400 000
acetylcholinesterasa	acetylcholin	140 000
β-laktamasa	benzylpenicillin	2 000
fumarasa	fumarát	800
RecA protein (ATPase)	ATP	0,4

Množství produktu, přeměněného ze substrátu jednou molekulou enzymu za 1 sekundu

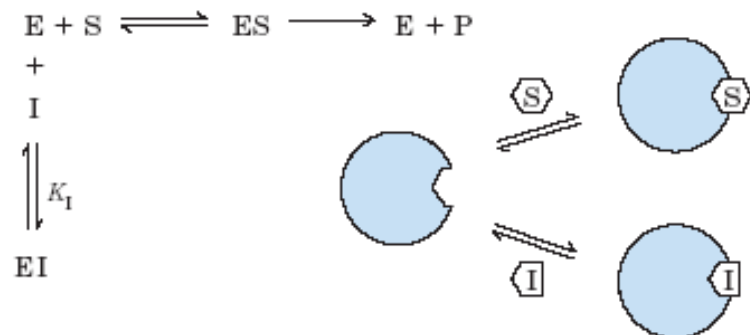
Inhibice

- Inhibitor – látka zpomalující nebo zastavující enzymovou reakci
- Inhibice vratná a nevratná
 - Nevratná inhibice - enzym nevratně modifikován chemickou reakcí s inhibitorem
 - Vratná inhibice se dále dělí
 - Kompetitivní ($V' = V$, $K_m' > K_m$)
 - Nekompetitivní ($V' < V$, $K_m' = K_m$)
 - Akompetitivní ($V'/V = K_m'/K_m$)

Kompetitivní inhibice

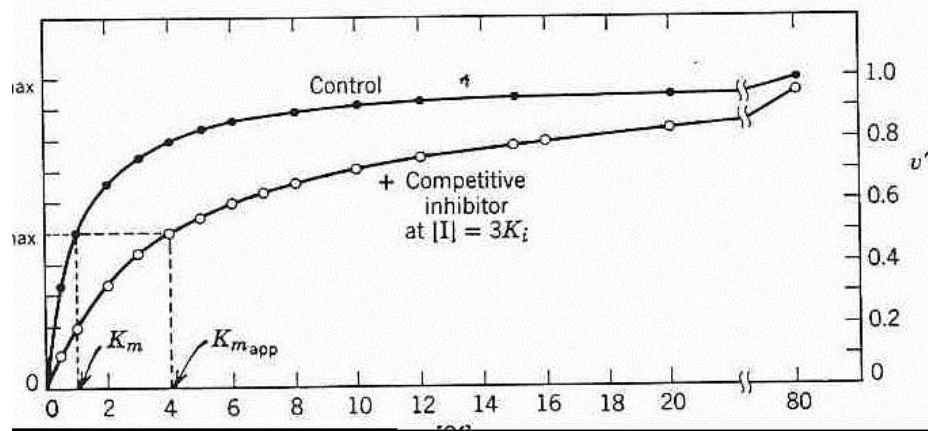
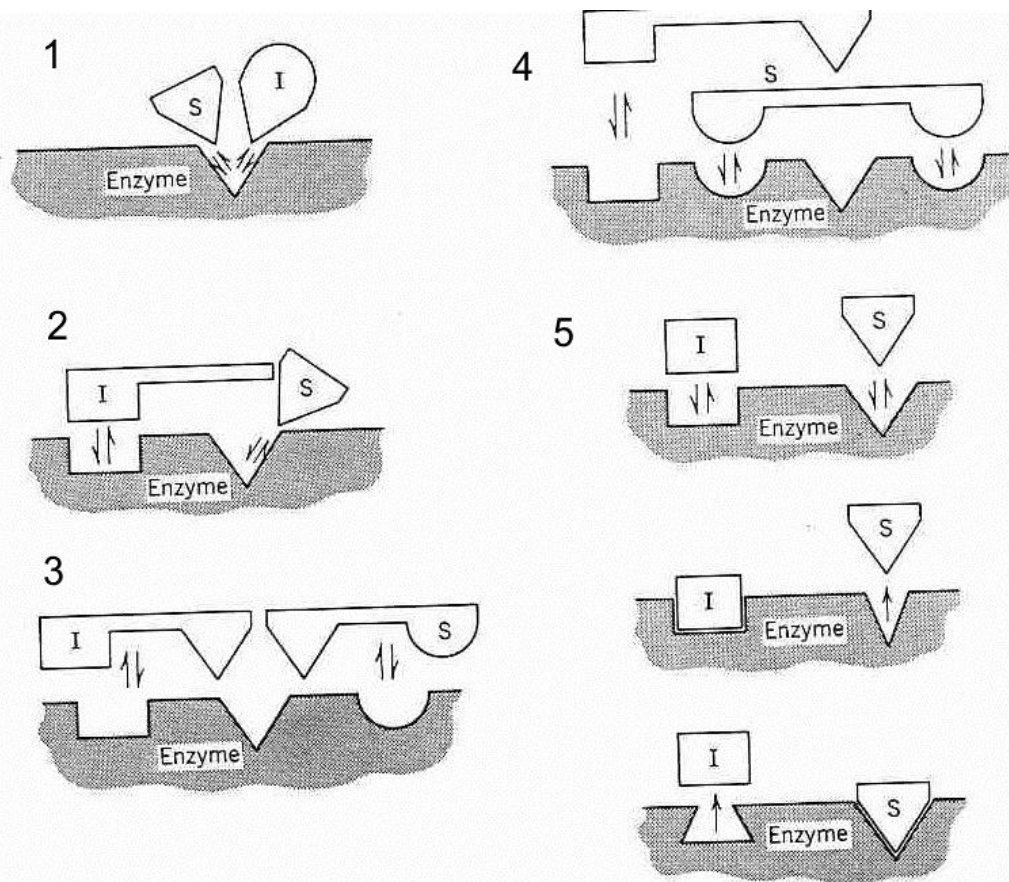
- čistá reversibilní inhibice, při níž inhibitor soutěží o vazbu na enzym se substrátem
- často inhibitor a substrát podobná struktura, váží se do stejného vazebného místa
- vysokou koncentrací substrátu lze inhibitor vytěsnit z vazby na enzym a tím zrušit jeho působení
- V_{lim} není ovlivněna
- K_M se zvyšuje

(a) Competitive inhibition



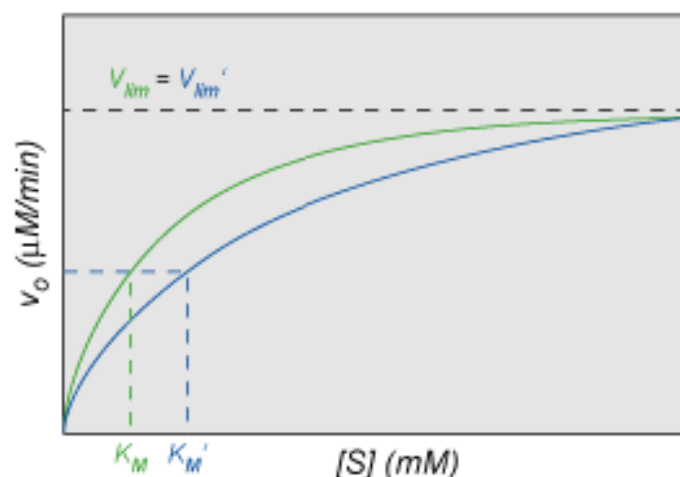
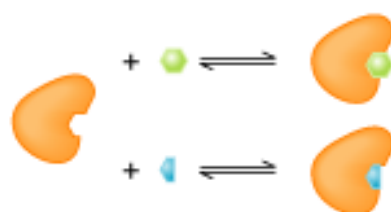
$$v_o = \frac{V_{\text{lim}}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

$$K_M' = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right), \quad V_{\text{lim}} = V_{\text{lim}}$$



Kompetitivní inhibice

- inhibitor soutěží se substrátem o vazbu na enzym
- inhibitor má často podobnou strukturu jako substrát – tvorba inaktivního komplexu enzym-inhibitor
- inhibice je vratná – vysokou koncentrací substrátu lze inhibitor z enzymy „vytěsnit“
- $(V' = V)$, $(K_M' > K_M)$



Kompetitivní inhibice.

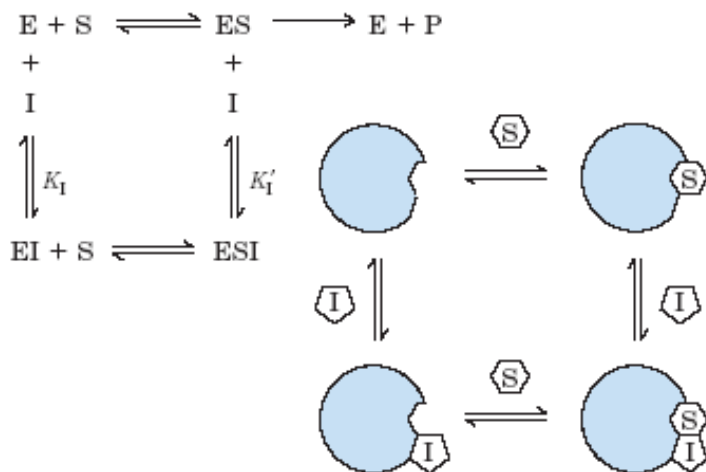
$$v_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

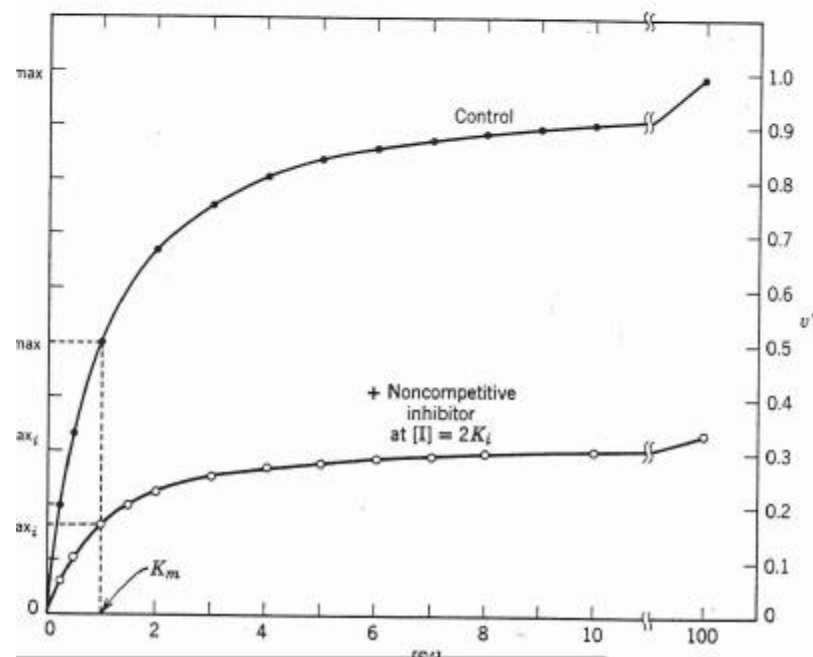
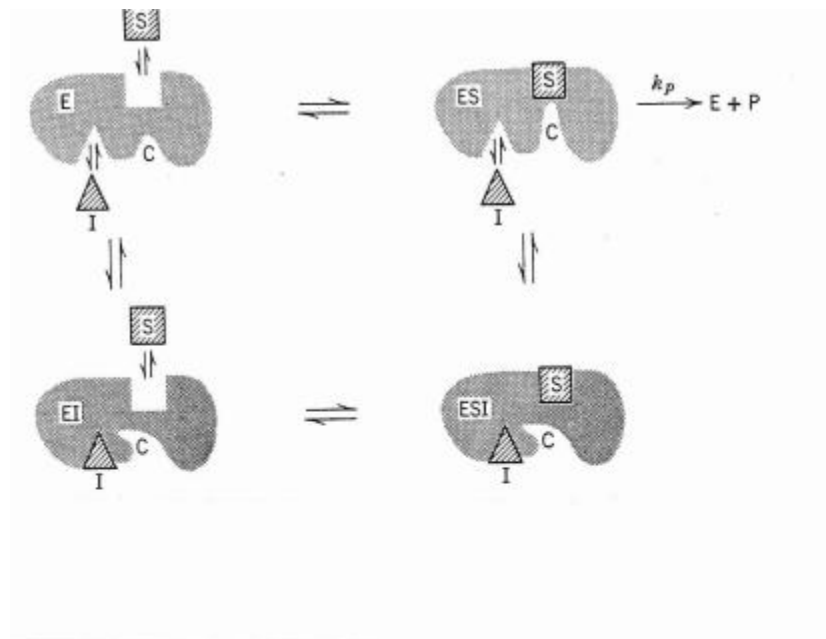
Nekompetitivní inhibice

- čistá reversibilní inhibice, při níž vazba inhibitoru na enzym neovlivňuje vazbu substrátu
- enzym má při tomto typu inhibice specifické vazebné místo pro inhibitor
- může tedy existovat komplex enzym–substrát–inhibitor
- vazbou inhibitoru je porušena schopnost enzymu přeměňovat substrát, a to buď vyvoláním konformační změny polypeptidového řetězce, v jejímž důsledku se katalytické skupiny dostávají do nevýhodného postavení, nebo omezením možnosti konformačních změn, které jsou pro průběh katalysované reakce nezbytné
- z kinetického hlediska se systém chová tak, jako by bylo přítomno menší množství enzymu, neboť část je ho inaktivována vazbou inhibitoru
- V_{lim} je snížena
- K_m není ovlivněna



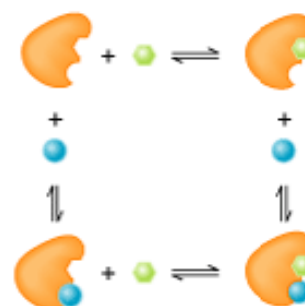
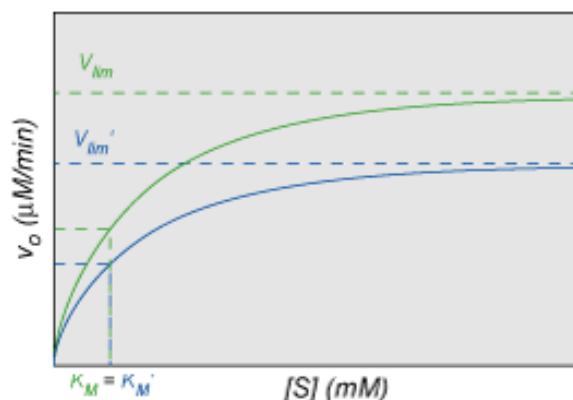
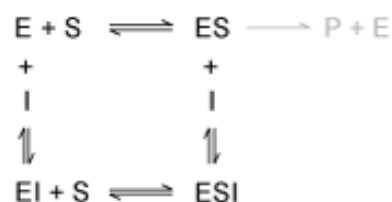
$$v_o = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot (K_S + [S])}$$

$$V'_{lim} = \frac{V_{lim}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad K'_M = K_M$$



Nekompetitivní inhibice

- vazba inhibitoru na enzym neovlivňuje vazbu substrátu na enzym, ale snižuje rychlost přeměny substrátu na enzym
- enzym má při tomto typu inhibice specifické vazebné místo pro inhibitor; může tedy existovat komplex enzym-substrát-inhibitor
- vazbou inhibitoru je porušena schopnost enzymu přeměňovat substrát, a to buď vyvoláním konformační změny polypeptidového řetězce, v jejímž důsledku se katalytické skupiny dostávají do nevýhodného postavení, nebo omezením možnosti konformačních změn, které jsou pro průběh katalysované reakce nezbytné – *allosterický efekt*
- z kinetického hlediska se systém chová tak, jako by bylo přítomno menší množství enzymu, neboť část je ho inaktivována vazbou inhibitoru
- $(V' < V)$, $(K_M' = K_M)$



$$v_o = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$$

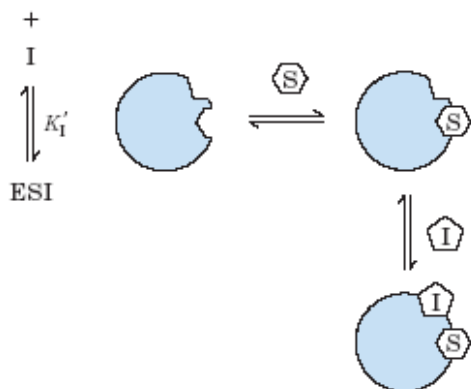
$$K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \quad K_I' = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]}$$

Nekompetitivní inhibice.

Akompetitivní inhibice

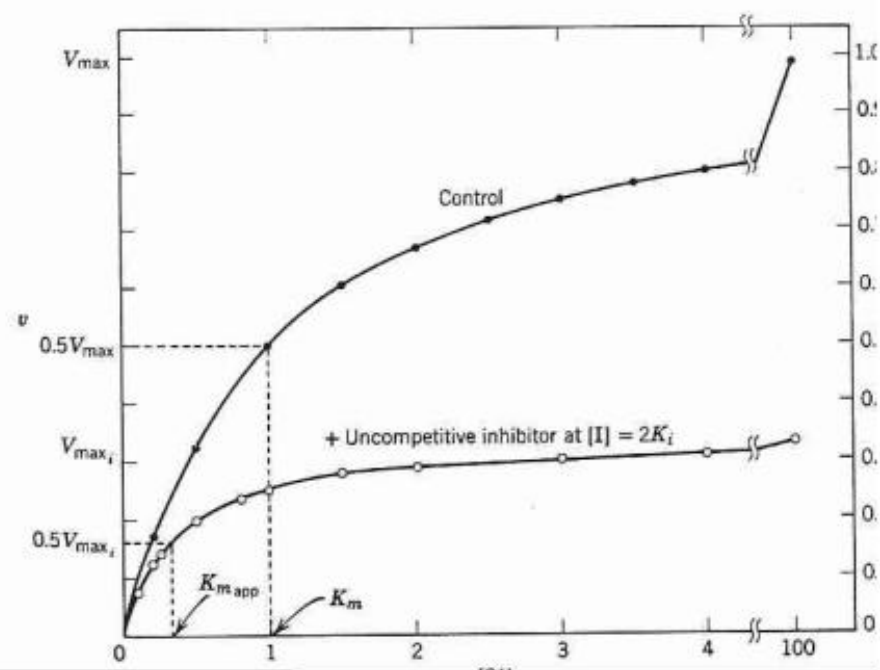
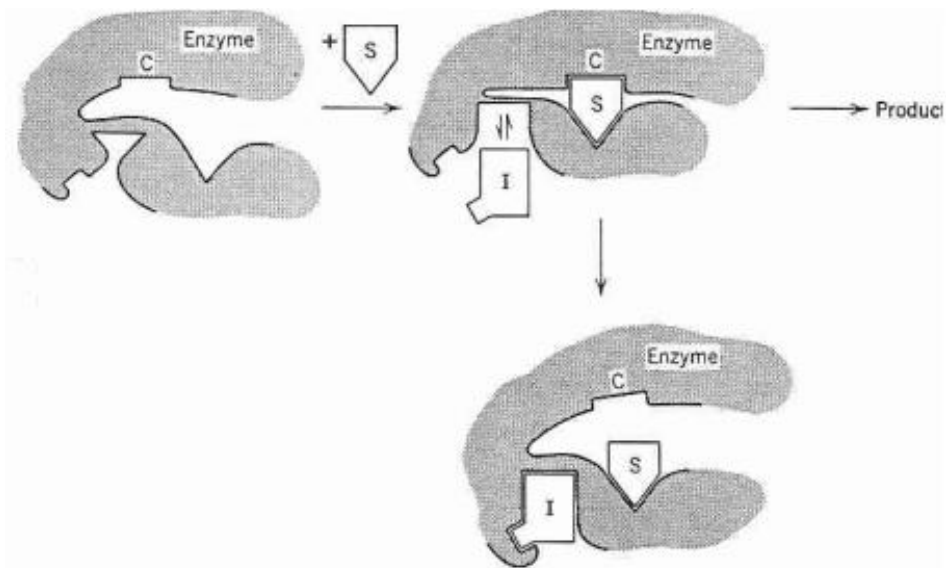
- čistá reversibilní inhibice, při níž se inhibitor může vázat pouze na komplex enzym – substrát, nikoli však na volný enzym
- vazbou inhibitoru je porušena schopnost enzymu přeměňovat substrát a nevzniká tedy produkt
- snížena K_M i V_{lim} , a to ve stejném poměru

(b) Uncompetitive inhibition



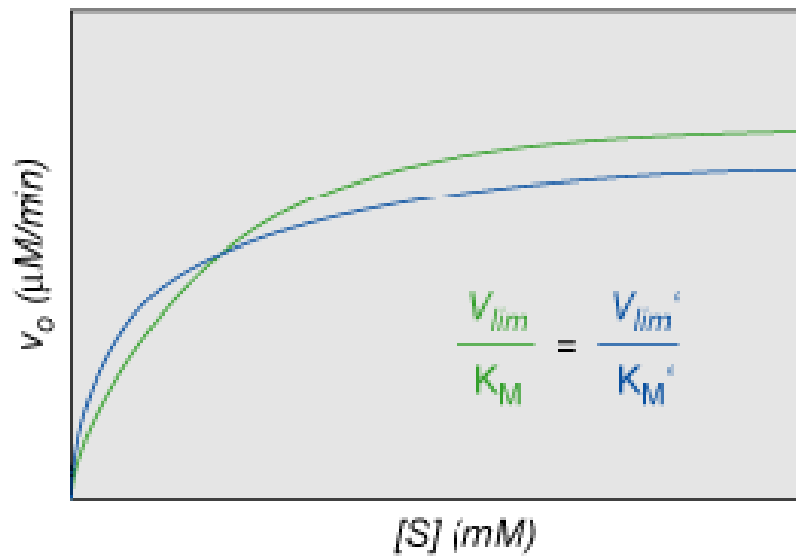
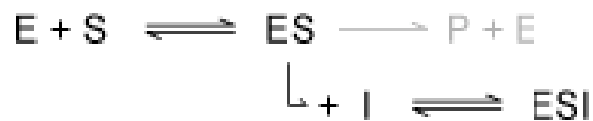
$$v_o = \frac{V_{lim}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \cdot \frac{[S]}{\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} + [S]}$$

$$\frac{V_{lim}}{K_M} = \frac{V'_{lim}}{K'_M}$$



Akompetitivní inhibice

- vazba inhibitoru je možná pouze na komplex enzym-substrát
- vazbou inhibitoru je porušena schopnost enzymu přeměňovat substrát a nevzniká tedy produkt
- $(V' / V = K_M' / K_M)$



Akompetitivní inhibice.

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

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$K_I' = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]}$$