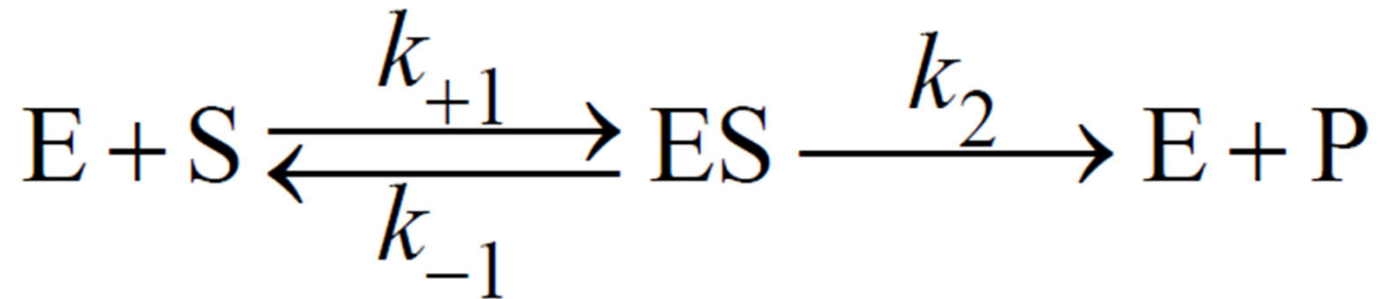


8. Kinetika enzymových reakcí

rovnice Michaelis-Mentenové a inhibice

- 1913 – Michaelis a Mentenová získali základní poznatky o enzymových reakcích
- Při měření rychlosti hydrolytického štěpení sacharosy na fruktosu a glukosu účinkem β -fruktofuranosidasy zjistili:
 - 1. Byla-li počáteční koncentrace sacharosy udržována konstantní a měnila se koncentrace enzymu, byla závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci enzymu lineární
 - 2. Byla-li koncentrace enzymu konstantní a měnila se koncentrace substrátu, byla závislost počáteční rychlosti na koncentraci sacharosy hyperbolická





○ Pokud se mění koncentrace substrátu:

- A) Při nízkých koncentracích substrátu jsou molekuly enzymu většinou volné a jen malá část jich je v komplexu: $[E] \gg [ES]$
- Rychlost reakce je malá a je úměrná koncentraci substrátu podle kinetické rovnice prvního řádu
- B) Při vysoké koncentraci substrátu je veškerý enzym vázaný v komplexu ES: $[E] \ll [ES]$
- Nasycením enzymu substrátem je dosaženo mezní rychlosti $v = V$, která už dále nestoupá, jelikož další substrát už nemá k dispozici volný enzym. Došlo k nasycení enzymu a reakce je vzhledem k substrátu nultého řádu → saturační křivka



- 1925 - Briggs a Haldane provedli matematické zpracování saturační křivky na základě teorie ustáleného stavu
- Podmínka ustáleného stavu: $[ES]_n = \text{konst.}$
- Dostatek substrátu: $k_{+1}[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$
- Aktuální koncentraci enzymu vyjádříme pomocí konstantní počáteční koncentrace $[E]_0$ a množství enzymu vázaného v komplexu ES: $[E] = [E]_0 - [ES]$
- Dostaneme: $k_{+1}([E]_0 - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

$$[ES]_n = \frac{k_{+1}[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_{+1}[S]}$$



ROVNICE MICHAELIS-MENTENOVÉ

- Po dalších úpravách dostáváme finální vztah:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

- v ...rychlost reakce
- V ...mezná rychlost reakce
- $[S]$...aktuální koncentrace substrátu
- K_M ...konstanta Michaelis-Mentenové, je rovna koncentraci substrátu, při níž je dosaženo poloviny mezní rychlosti



- Hodnota K_M rozděluje křivku závislosti počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu na dvě oblasti
- Při nízkých koncentracích substrátu bude proto časový průběh enzymové reakce probíhat podle kinetické reakce I. řádu, při vysokých koncentracích substrátu je reakční rychlost konstantní, nezávislá na $[S]$
- Množství vznikajících produktů se proto při dostatečně vysoké koncentraci substrátu mění s časem lineárně a směrnice této přímky je ekvivalentní koncentraci enzymu, resp. jeho aktivitě
- Této skutečnosti využíváme ke (kinetickému) určování množství enzymu



- Hodnota K_M závisí na prostředí (pH, teplota, přítomnost efektorů,...), proto je nutné její údaj vždy doplnit udáním podmínek stanovení
- Dosahuje hodnot $10^{-1} - 10^{-6}$ mol/l
- Je úměrná disociační konstantě komplexu ES
- Čím je hodnota K_M nižší, tím vyšší je afinita enzymu k danému substrátu
- Ze znalosti V můžeme vypočítat rychlostní konstantu k_2 , která udává molekulovou aktivitu enzymu, dříve zvanou číslo proměny – počet molů substrátu přeměněných za optimálních podmínek za jednu sekundu jedním molem enzymu
- K určení kinetických parametrů K_M a V se používá nejčastěji tzv. metody počátečních rychlostí



LINEARIZACE ROVNICE MICHAELIS-MENTENOVÉ

- Změna křivky v přímku ($y = kx + q$):

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V \cdot [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V \cdot [S]} + \frac{1}{V}$$



LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ ČINNOST ENZYMŮ

- Nazýváme je efektory či modifikátory
- Pozitivní – zvyšují aktivitu enzymu (aktivátory)
- Negativní – snižují aktivitu enzymu (inhibitory)
- Přirozené – „normální“ složky buněk, podílí se na regulaci
- Nepřirozené – syntetické látky vnesené do organismu (léčiva, jedy, narkotika, exhaláty...)
- Aktivátory jsou pouze látky, jenž se na molekulu enzymu váží vratně



TYPY INHIBICE ENZYMŮ

- **1. Kompetitivní (soutěživá)**
 - Inhibitor neovlivňuje meznou rychlost ($V=V'$), ale zvyšuje Michaelisovu konstantu ($K'_M > K_M$)
 - Inhibitory (v tomto případě zvané antimetabolity) strukturně podobné substrátu, enzym s nimi vytváří komplex EI
 - Nadbytek substrátu ovšem inhibitor z komplexu EI vtěsňuje a je možné dosáhnout mezní rychlosti
- **2. Nekompetitivní (allosterická)**
 - Inhibitor nevyvolá změnu Michaelisovy konstanty ($K'_M = K_M$), nýbrž snižuje meznou rychlost ($V' < V$)
 - Neovlivňuje vazbu substrátu na enzym, ale zmenšuje jeho přeměnu na produkt
 - Nedají se vzájemným nadbytkem vytěsnit



- **3. Akompetitivní**

- Inhibitor snižuje meznou rychlost i Michaelisovu konstantu stejnou měrou, což znamená, že jejich poměr zůstává i po inhibici konstantní
- Inhibitor neatakuje volný enzym, ale až vznikající komplex ES za vzniku ESI

- **4. Smíšená**

- Inhibitor mění Michaelisovu konstantu, meznou rychlost i jejich poměr



AKTIVNÍ CENTRA A JEJICH TYPY

- Enzymová reakce probíhá v relativně malé oblasti molekuly, které říkáme aktivní centrum, nebo aktivní místo
- Aktivní centrum obsahuje katalyticky aktivní skupiny tvořící katalytické centrum a dále skupiny, které specificky vážou substrát (tzv. vazebné centrum), dále to jsou i skupiny, které vytvářejí vhodné chemické prostředí v centru a jeho vhodnou prostorovou strukturu
 - 1. Tvaru štěrbin (pukliny) do kterých se vsunou řetězce substrátu a na vhodném místě jsou přerušeny
 - 2. Tvaru mělké povrchové prohlubně – trávicí enzymy
 - 3. Tvaru jamky – enzymy odštěpující koncové struktury z řetězců



- Enzymy povahy složených bílkovin mají oblast k navázání koenzymu
- Tato oblast bývá většinou na povrchu molekuly enzymu a bývá prostorně lokalizována v bezprostřední blízkosti vazebného centra pro substrát
- Enzymová reakce probíhá mezi vázaným substrátem a vázaným koenzymem, kdy koenzym má úlohu druhého reaktantu a označuje se jako kosubstrát
- Další místa podmiňující, nebo usnadňující aktivitu enzymů označujeme jako stabilizační (aktivační) místa
- Allosterické efekторы:
 - Ovládají aktivitu oligomerních enzymů nacházejících se na klíčových metabolických místech
 - Vyvolávají jemné konformační změny, působí v allosterických centrech



SPECIFICKÉ PŮSOBENÍ ENZYMŮ

- Alegorie na téma zámku a klíče
- 1958 – Koshland formuloval teorii indukovaného přizpůsobení aktivního místa enzymu
- vazba substrátu na enzym vyvolává malé či velké konformační změny, jenž vedou k správnému nasměrování katalytických skupin
- Konformační změny pozorované při vzájemném působení enzymu a substrátu lze rozdělit tří skupin:
 - 1. Konformace se při interakci nemění
 - 2. Dochází k malým změnám konformace
 - 3. Nastávají rozsáhlé konformační změny



ZDROJE

- Mathews, Ch. K. – Halde, K. E. – Ahern, K. G., *Biochemistry*, 3. vydání, San Francisco, Benjamin Cummings, 1999, 1186 s., ISBN 99-043683
- Voet, D. – Voet, J. G. – Pratt, Ch. W., *Fundamentals of Biochemistry: life at the molecular level*, 2. vydání, USA, Willey, 2006, 1264 s., ISBN 0-471-21495-7

