

Enzymy (1. LF VL, Lékařská chemie a biochemie 1. paralelka)

Enzymy jsou bílkoviny s **biokatalytickou funkcí**. Jsou nástrojem exprese genů. Výsledkem jejich působení v organismu je látková přeměna (*intermediární metabolismus*), která je projevem rovnováhy dějů anabolických a katabolických.

V **katabolických** získává organismus energii pro mechanickou či osmotickou práci, ale také pro děje **anabolické** (např. syntéza dalších prekurzorů, makromolekulárních látek, mediátorů a hormonů, nezbytných pro životní funkce a jejich regulace). Spřaženými enzymovými reakcemi jsou překonávány nevýhodné metabolické kroky (spojení reakcí endergonických s exergonickými).

- Látky, které se působením enzymů mění, se nazývají **substráty**.
- Hlavními rysy biokatalýzy jsou zejména značná **katalytická účinnost** a větší či menší **specifičnost vůči typu substrátu** i vzhledem k typu katalyzované reakce.
- Z bílkovinné povahy enzymu a jeho specifické interakce se substrátem za tvorby enzym-substrátového komplexu plynou i další vlastnosti enzymových systémů, jako je **ovlivnění faktory fyzikální a chemické povahy**. Vliv zde mají:
 - teplota
 - pH prostředí
 - ionty jako aktivátory apod.
 - inhibitory (*kompetitivní* nebo *nekompetitivní*)
 - efekty allosterické povahy

Rozdělení enzymů

Enzymy se dělí na sedm hlavních tříd podle typu reakce, kterou katalyzují.

1. Oxidoreduktázy – dehydrogenázy, oxidázy, peroxidázy, oxygenázy
2. Transferasy – aminotransferasy, kinázy
3. Hydrolasy – peptidasy, glykosidasy, fosfatasy
4. Lyasy – synthasy, dekarboxylasy
5. Isomerasy
6. Ligasy – synthetasy
7. Translokasy

Využití afinitní chromatografie

Specifické interakce enzymu se substrátem, substrátovým analogem či inhibitorem lze využít i při **izolaci enzymu**. Enzym jako bílkovinu lze ovšem izolovat postupy běžnými v biochemii bílkovin. V poslední době se s výhodou využívá **afinitní chromatografie**.

- Tato metoda **využívá specifických biologických interakcí** typu: *enzym-substrát*, *enzym-substrátové analogy* nebo *enzym-inhibitor*.
- Existují i jiné možnosti specifických interakcí, např. typu antigen-protilátka, hormon-nosič (receptor) apod.

Afinitní chromatografie je zvláštním případem **adsorpční chromatografie**, při níž má adsorbent specifickou afinitu k látkám, které mají být izolovány.

- Při izolaci enzymu *se naváže inhibitor nebo substrátový analog* na vhodný nosič (např. Sepharosa[®], což je agarosový gel připravený ve formě kulovitých částic). Taková navázaná skupina se specifickou afinitou se nazývá **ligand (afinant)**.
- Často je nutné oddálit afinant od vlastního nosiče prostřednictvím tzv. raménka (*spacer*), aby nedocházelo ke sterickým zábranám při přístupu velké molekuly enzymu (bílkoviny) k malé molekule navázaného ligandu.
- **Vazba enzymu na ligand je vratné povahy** a tuto vratnou vazbu lze rozrušit změnou *fyzikálně-chemických vlastností* promývací tekutiny, např. změnou pH, iontové síly nebo také *nadbytkem volného substrátu* či substrátového analogu, který vytěsňuje ligand z vazby na enzym.

Mechanismus účinku enzymů

Enzymy pracují na principu snížení aktivační energie. Dochází k tvorbě komplexu **enzym-substrát** (E-S), pak ku komplexu **enzym-produkt** (E-P), který se rozpadá za uvolnění produktu.

 *Podrobnější informace naleznete na stránce Mechanismus účinku enzymů.*

Fyzikálně-chemické vlivy působící na činnost enzymů

Vliv teploty

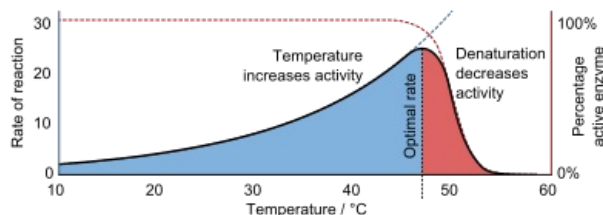
Většina chemických reakcí závisí na **teplotě** a reakce katalyzované enzymy v tom nejsou výjimkou.

- Podle kinetické teorie vykládáme vzrůst rychlosti reakce s teplotou až do dosažení optimální teploty zvýšenou kinetickou energií reagujících molekul, což přispívá také ke tvorbě enzym-substrátového komplexu.
- Teplotní koeficient Q_{10}** je poměr, kolikrát se rychlost chemické reakce změní se vzrůstem teploty o 10 °C. U většiny chemických reakcí činí tento poměr asi 2, ale pro některé fyziologické pochody, katalyzované enzymy, je vyšší.
- Pro většinu enzymů je **optimální teplota** zhruba shodná s teplotou, která existuje v prostředí buňky, a pro teplokrevné (homoiotermní) organismy, k nimž patří **člověk**, činí **37 °C**.
- Pro některé bakterie, žijící v extrémních podmínkách, může optimální teplota (ale i optimální pH a optimální iontové složení) dosahovat značné extrémních hodnot. Např. některé mikroorganismy žijící v horkých přírodních pramenech mají optimální teplotu pro své enzymy blízkou bodu varu vody. U savčích enzymů však takové teploty leží již za optimální teplotou. V takových podmínkách je kinetická energie enzymových molekul tak velká, že překročí energetickou bariéru pro rozrušení sekundárních vazeb a interakcí, udržujících enzymovou molekulu v té konformaci (sekundární a terciární struktuře), která je pro enzymovou katalýzu nezbytná. Tím nastává denaturace provázená úbytkem až i ztrátou enzymové aktivity.

Test tepelné lability

(ale i lability vůči pH) patří k jednoduchým kritériím, zda daná reakce je enzymy katalyzována.

- U většiny savčích enzymů se tepelně denaturují enzymy již při **60 až 80 °C**. Považením se enzymy denaturují většinou velmi rychle.
- Závislost enzymové aktivity na vzrůstající teplotě lze vyjádřit graficky zvonovitou křivkou, která má vrchol u optimální teploty.



Aktivita enzymu se zpočátku zvyšuje s teplotou až do svého optima. Následně začne denarovat a rychle ztrácí svoji katalytickou schopnost.

Závislost enzymové aktivity na pH

Závislost enzymové aktivity na pH je jiným významným

činitelem, ovlivňujícím aktivitu enzymů. Také tuto závislost lze vyjádřit graficky zvonovitou křivkou s vrcholem u **optimálního pH**, které u většiny enzymů leží v rozmezí **5,0 až 9,0**.

- Některé enzymy jsou však výjimkou, např. pepsin, působící v silně kyselém prostředí žaludeční šťávy, má optimální pH mezi **1,5 až 2,0**.
- Vliv pH na vzrůst enzymové aktivity až do dosažení optimálního pH lze vyložit ovlivněním disociace ionizovatelných funkčních skupin substrátu i enzymu, které odpovídají za interakci enzymu se substrátem při tvorbě *enzym-substrátového komplexu*, ale i za *udržování konformace enzymu*. Krom toho se některé ionizovatelné funkční skupiny v *aktivním centru* podílejí na acidobazické katalýze. Protože enzymy jsou bílkovinné povahy, jsou stále jako amfolyty jen v určitém rozmezí hodnot pH blízkém neutralitě.
- Extrémně kyselé nebo alkalické roztoky** enzymy *denaturují* opět změnou konformace. To je podmíněné rozrušením sekundárních vazeb a interakcí, někdy i rozpadem kvartérní struktury na podjednotky nebo disociací nebílkovinné složky enzymu.

Vliv iontů na enzymy

Vliv iontů na enzymy je nejlépe patrný u některých **dvojmocných kationtů** (např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) jako **aktivátorů**. Tyto ionty mohou vytvářet komplex se substrátem za tvorby *metalosubstrátového komplexu*, nebo komplex s enzymem, který pak váže substrát ve formě *enzym-metalo-substrátového komplexu*.

- Kovové ionty** mohou měnit také **rovnovážné stavy**, ať už *odstraňováním produktů* ve formě komplexu s produktem reakce, nebo *zvýšenou nabídkou substrátu*, je-li účinnou formou metalo-substrátový komplex.
 - Jindy mohou kovy **ovlivnit konformaci enzymového proteinu**, udržovat kvartérní strukturu enzymu nebo mohou působit jako inhibitory vazbou na účinné skupiny aktivního centra (např. -SH skupiny jsou blokovány ionty Hg^{2+}).
 - Některé kovové ionty se mohou podílet na mechanismu **enzymově katalytické reakce** interakcí se substrátem jako tzv. Lewisovy kyseliny (akceptory elektronových párů).
- Fluoridové ionty** mohou zase působit inhibičně vazbou kationtů jako *aktivátorů*, např. vazbou Ca^{2+} nebo Mg^{2+} .
- Přítomnost solí** může také nespecificky ovlivňovat **aktivitu enzymu** změnou iontové síly (např. ionty Cl^-), a tím působit na hydrataci enzymového proteinu nebo na elektrokinetický potenciál, který mění pevnost iontových (elektrostatických) vazeb v molekule enzymu.

Stanovení enzymové aktivity

Enzymy jsou v biologickém materiálu obsaženy ve velmi nízkých koncentracích. Pro popis biochemických dějů je navíc užitečnější znát jejich účinnost spíše než samotné množství enzymu. Namísto měření koncentrace enzymu se proto většinou s výhodou využívá substrátové specifčnosti enzymů a jejich značné katalytické účinnosti při **měření aktivity enzymu**. Množství enzymu tedy kvantifikujeme nepřímou na základě **rychlosti**, jakou enzym katalyzuje přeměnu **substrátu na produkt** ve zvoleném **časovém** intervalu. Tato metoda je dostatečně specifická za

předpokladu, že na substrát působí v daném materiálu jen jeden enzym. Je i dostatečně citlivá a přesná, je-li zvolena vhodná koncentrace substrátu vzhledem k enzymu a vhodná **metoda stanovení úbytku substrátu nebo přírůstku produktu v čase**, neboli vhodná metoda **stanovení rychlosti přeměny** substrátu na produkt.

Enzymová aktivita

Abychom mohli snadno porovnávat rychlost úbytku substrátu nebo přírůstku produktu v různých časových intervalech, je účelné, aby tyto rychlosti byly v čase konstantní, tj. aby reakce probíhala podle **kinetiky nultého řádu**. Toho lze dosáhnout, přísně vzato, jen tehdy, je-li veškerý enzym substrátem nasycen, tj. když je veškerý enzym o **celkové koncentraci** $[E]_t$ vázán v formě **enzym-substrátového komplexu ES**. Taková situace nastává jen při velkém nadbytku substrátu. Pak probíhá enzymová reakce s **maximální rychlostí** V_{max} . Za této situace můžeme snadno definovat i jednotky enzymové aktivity, protože zdvojnásobíme-li koncentraci enzymu, vzroste dvojnásobně i maximální rychlost V_{max} apod.

Za podmínky, že enzym pracuje v prostředí se značným nadbytkem substrátu, můžeme tedy kineticky vyjádřit množství enzymu $[E]_t$ jako rychlost V_{max} . Jako jednotka množství enzymu, správněji množství enzymové aktivity, slouží **katal** (1 kat). Je to takové množství enzymové aktivity, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za sekundu. Pro praxi je tato jednotka hodně velká, proto většinou pracujeme s jejími zlomky – mikrokataly (1 μ kat = 10^{-6} kat), nanokataly (1 nkat = 10^{-9} kat) a pikokataly (1 pkat = 10^{-12} kat)

Dříve se podle pravidel Mezinárodní biochemické unie (IUB) z r. 1961 množství enzymové aktivity vyjadřovalo v **enzymových jednotkách (U)**. Enzymová jednotka byla definována jako takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 μ mol substrátu za minutu za standardních podmínek (tj. nasycení enzymu substrátem, udaná teplota a pH).

Převod enzymových jednotek (U) na kataly (kat) se řídí vztahem:

$$1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol/min} = 1/60 \mu\text{mol/s} = 1/60 \mu\text{kat} = 16,67 \text{ nkat}.$$

V předchozím textu jsme předpokládali, že rychlost enzymové reakce sledujeme při maximálním nasycení enzymu substrátem (kinetika nultého řádu), tedy při dosažení maximální rychlosti V_{max} . Za těchto podmínek je V_{max} úměrná koncentraci enzymu. Kinetiku nultého řádu lze však aproximativně využít i tehdy, jestliže enzym substrátem nasycen není, tj. i při menších koncentracích substrátu. Je to však možné jen tehdy, pokud se v průběhu měření koncentrace substrátu $[S]$ příliš nemění – tj. příliš se nesnižuje oproti počáteční koncentraci substrátu $[S]_0$. Tato podmínka je naplněna, sledujeme-li průběh reakce jen v prvních minutách, kdy je úbytek koncentrace substrátu menší než zhruba jedna desetina původní hodnoty. Rychlost reakce v této fázi označujeme jako *počáteční rychlost* v_0 . Rovněž koncentraci enzym-substrátového komplexu $[ES]$ můžeme v této fázi pokládat za stálou (*steady-state*). Při větším úbytku substrátu (poklesu koncentrace $[S]$) ovšem koncentrace $[ES]$ klesá, takže kinetika nultého řádu přechází do kinetiky prvního, druhého i vyššího řádu.

Michaelisova konstanta

Pomocí iniciální rychlosti v_0 lze sledovat pro určité předpokládané množství enzymové aktivity vztah této rychlosti v_0 k určité výchozí koncentraci substrátu $[S]_0$. Můžeme se tedy zabývat chováním enzymové reakce v situacích, kdy není dosaženo maximální rychlosti V_{max} pro celkovou koncentraci enzymu $[E]_t$. U téhož enzymu může být ovšem pojem vysoké a nízké koncentrace substrátu relativní – může totiž záviset na konkrétním typu substrátu a na tom, jakou má enzym k tomuto substrátu afinitu. Využíváme proto veličinu, která je pro danou dvojici enzym-substrát charakteristickou konstantou. Je to tzv. **Michaelisova konstanta** (K_m), která označuje takovou látkovou koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce (v) polovinou rychlosti maximální (V_{max}).

Michaelis a Mentenová odvodili vztah mezi K_m , $[S]$, v a V_{max} :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

Nízká hodnota K_m značí velkou afinitu enzymu k substrátu. Vedle toho, že K_m charakterizuje danou dvojici enzym-substrát, je sledování K_m nezbytné též k odlišení mechanismu inhibice (nejčastěji typu kompetitivního nebo nekompetitivního).

Stanovení Michaelisovy konstanty

Počáteční rychlost enzymové reakce se snáze měří pro nízké počáteční koncentrace substrátu $[S]_0$; při vysokých koncentracích substrátu je reakční rychlost vysoká, substrát se rychle spotřebovává a reakční rychlost se tak podstatně mění během krátké doby od zahájení reakce. Ovšem vyneseme-li do grafu reakční rychlosti v proti počátečním koncentracím substrátu $[S]_0$, je obtížné přímo z tohoto grafu určit parametry V_{max} a K_m , máme-li k dispozici jen měření při nízkých koncentracích substrátu. Vzniklo proto několik postupů, jak tyto parametry určit.

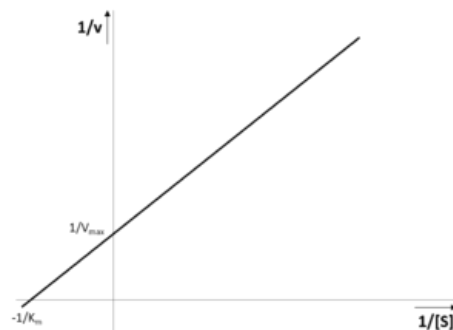
Mezi nejčastěji zmiňované grafické metody patří transformace dat podle Lineweavera a Burka. Hyperbolickou závislost rychlosti **v** na koncentraci substrátu **[S]**

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

můžeme snadno transformovat na lineární funkci – převrácená hodnota rychlosti **1/v** totiž lineárně závisí na převrácené hodnotě koncentrace substrátu **1/[S]**:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



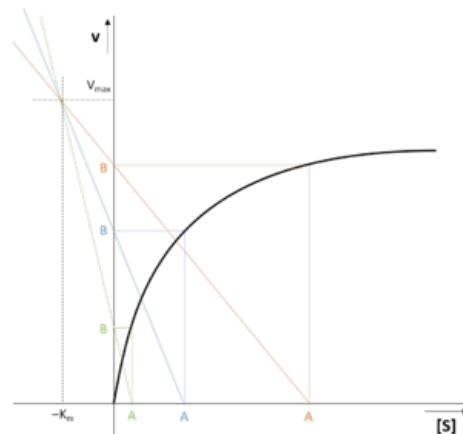
Závislost **1/v** na **1/[S]** podle **Lineweavera a Burka**

Vynášíme-li **1/v** na na svislou osu a **1/[S]** na vodorovnou osu, budou za podmínek kinetiky 2. řádu naměřená data ležet v přímce. Tato přímka protíná svislou osu v hodnotě **1/V_{max}** a vodorovnou osu v hodnotě **-1/K_m**.

Metoda podle Lineweavera a Burka je bohužel citlivá i na relativně malé chyby měření při nízkých koncentracích substrátu. Přesnější grafickou metodou pro stanovení parametrů **V_{max}** a **K_m** je metoda podle **Eisenthala a Cornishe-Bowdena**. Postupuje se při ní takto:

1. Pro několik koncentrací substrátu **[S]** naměříme experimentálně reakční rychlosti **v**. Tyto hodnoty vyneseme do grafu jako závislost **v** na **[S]**.
2. Pro každý vynesení bod vyznačíme hodnotu **[S]** na vodorovné ose (bod A) a hodnotu **v** na svislé ose (bod B). Sestrojíme přímku, která prochází body A a B.
3. Z polohy průsečíku takto sestavených přímek lze odečíst hodnoty **K_m** a **V_{max}** (průsečík má souřadnice **[-K_m, V_{max}]**).

Jinou grafickou metodou je vynesení podle **Eadie-Hofsteeho**. Vynáší se **v** na svislé ose proti **v/[S]** na vodorovné ose a body se proloží přímkou. **V_{max}** se vyhledá jako průsečík této přímky se svislou osou, **V_{max}/K_m** je průsečík s vodorovnou osou a směrnice přímky je **-K_m**.



Vynesení podle **Eisenthala a Cornishe-Bowdena**

Grafické metody jsou sice ilustrativní, v současnosti se ovšem kinetické parametry počítají metodami nelineární regrese.

Odkazy

Použitá literatura

MATOUŠ, Bohuslav, et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha : Galén, 2010. 540 s. ISBN 978-80-7262-702-8.