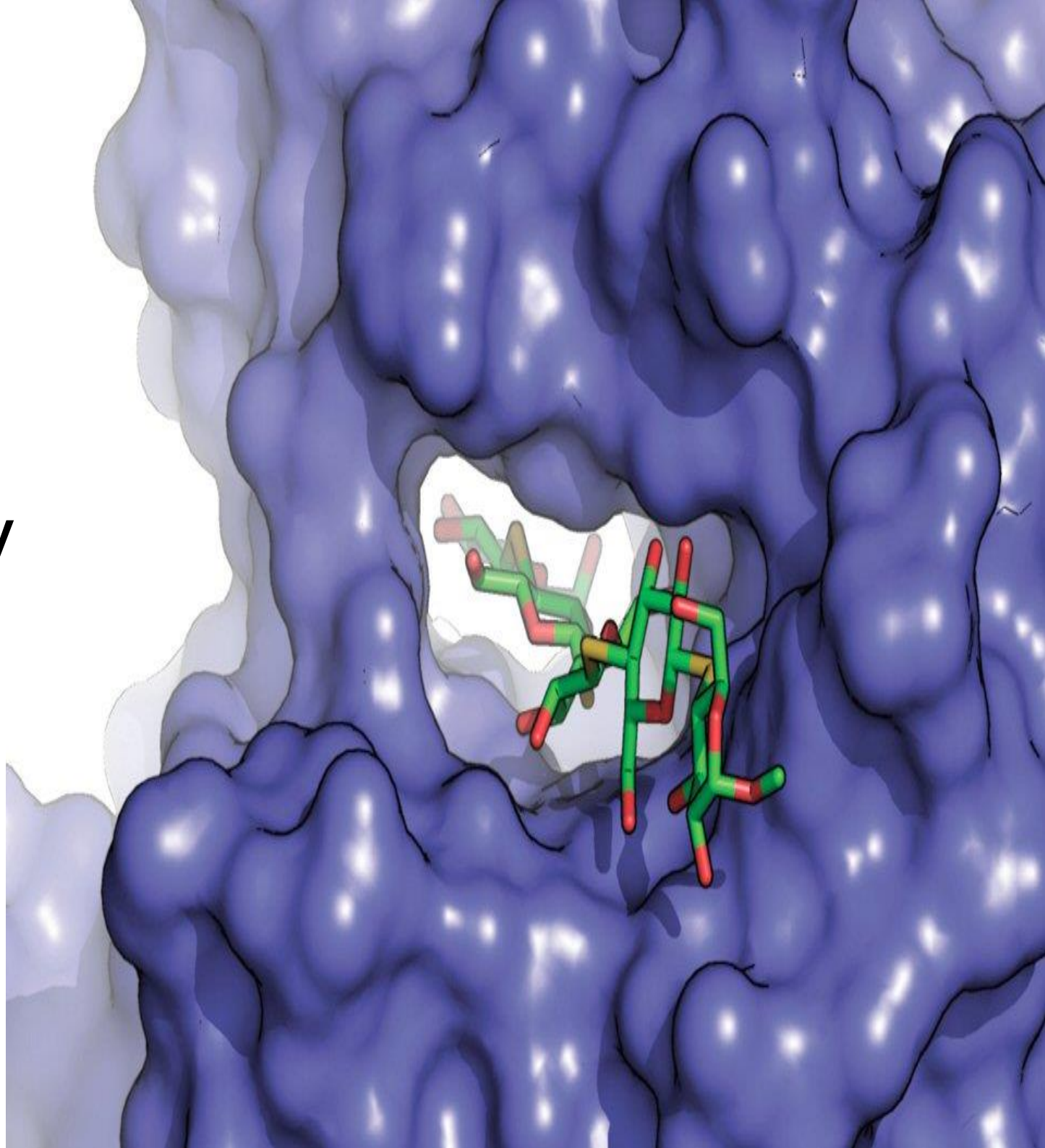


Enzymy



Co jsou to enzymy? – pozoruhodné chemické katalyzátory

- Vyšší reakční rychlost (6- 12 řádů)
- Mírnější podmínky reakce (nižší teplota, atmosférický tlak, neutrální pH)
- Vyšší specifita reakce (specifické produkty, „nejsou“ vedlejší produkty)
- Schopnost regulace (allosterická regulace, kovalentní modifikace, variabilita)

Chemické

- Homogenní – reaktanty a katalyzátor jsou v systému přítomny ve stejné fázi.
- Heterogenní – nejčastěji je katalyzátor pevný a reaktanty jsou plynné. Tento typ katalýzy se často používá v průmyslu (odpadá problém oddělování katalyzátoru z reakční směsi).

Enzymy

Proteiny (mohou být také RNA molekuly – např. Ribosom), které slouží jako biologické katalyzátory. V popisu chemické reakce s katalyzátorem používáme pojmy:

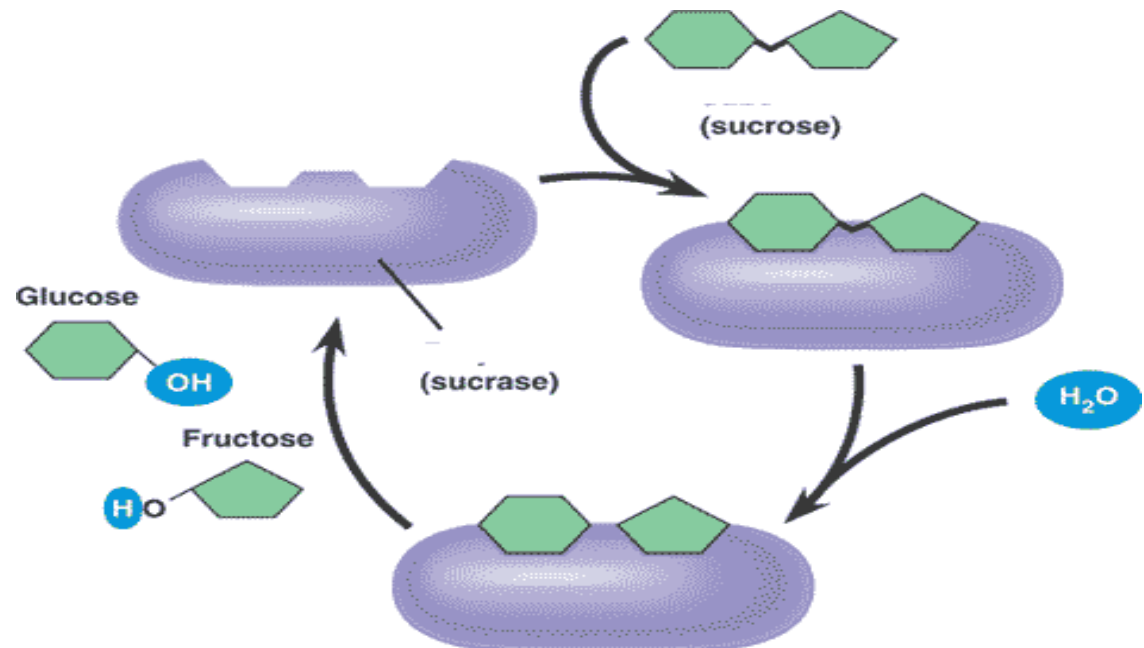


Substrát (**S**): Jde o molekuly, které do reakce vstupují

Produkt (**P**): Jde o molekuly, které vznikají katalyzovanou reakcí

Enzym (**E**)

Komplex enzymu se substrátem (**SE**)



Enzym jako katalyzátor

Katalyzátor je látka, která zvyšuje efektivitu chemické reakce. Katalyzátor z reakce vystupuje nezměněn. Ale v jejím průběhu vytváří energeticky méně stabilní molekuly - meziproducty. Díky meziproductům je energie potřebná pro vznik produktů rozdělena do více částí (s menší energetickou náročností).

Energie potřebná k průběhu reakce se nazývá **aktivační energie**. Snížení aktivační energie umožňuje reakci za mírnějších podmínek (tzn. za nižší teploty, tlaku).

Enzymy snižují aktivační bariéru. To je umožněno díky vzniku meziproductů, ve kterých jsou rozrušeny staré vazby a naopak vznikají nové. Meziproduct je značen jako komplex enzym-substrát (ES).

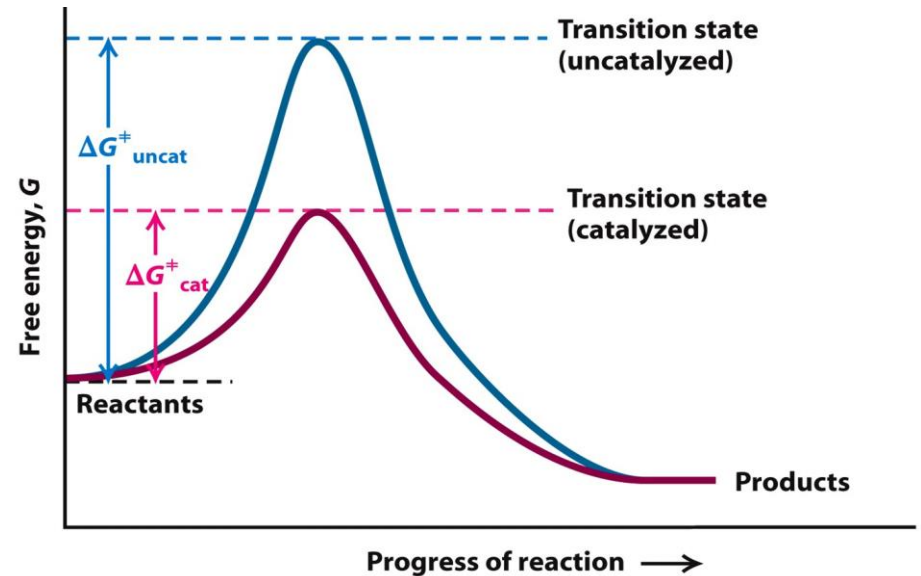
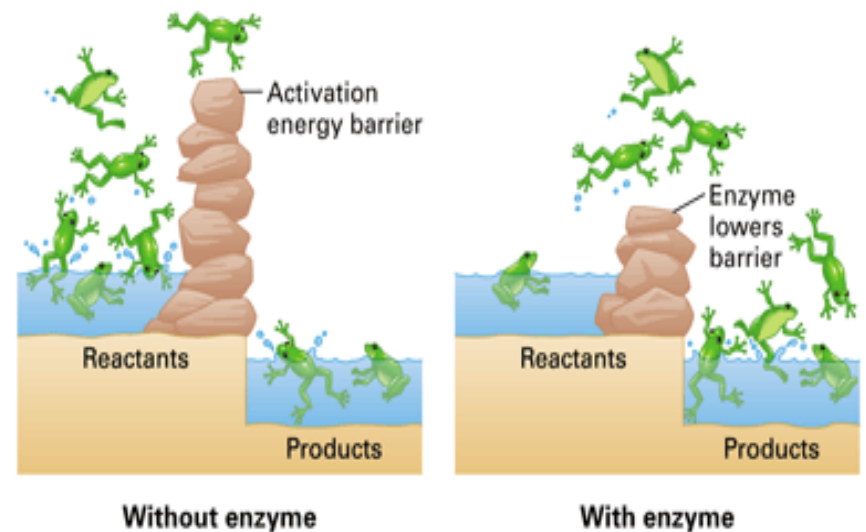


Figure 3-20
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

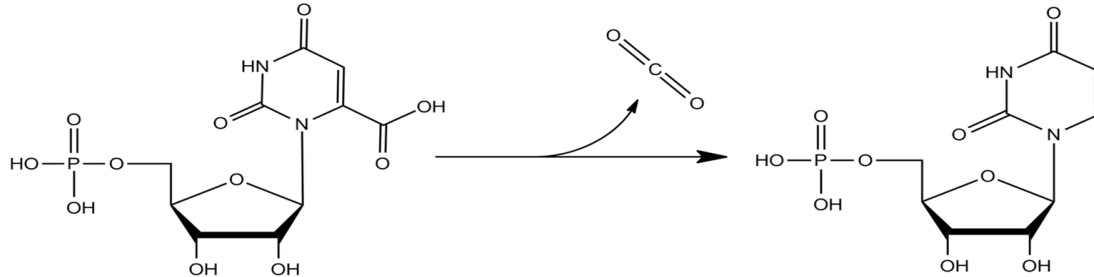


Enzym jako katalyzátor

Enzymy se od chemických katalyzátorů liší:

.Efektivitou (enzymatické reakce bývají mnohem účinnější než chemické)

.Např. je enzym Orotinmonofosfát-dekarboxyláza (enzym odbourávající CO₂ z molekul, důležitý pro syntézu nukleových kyselin. Reakce samotná by zabrala miliony let, s enzymem je to otázkou milisekund). (*OMP – prekurzor pyrimidinových nukleotidů. Dekarboxylací orotidinmonofosfátu*)



.Podmínkami (podmínky enzymatické reakce jsou dány okolním prostředím v organismu)

.Aktivita enzymu je silně **závislá na pH a teplotě prostředí**.

.Vysoká specifita (enzymy často rozeznávají pouze jednu specifickou molekulu)

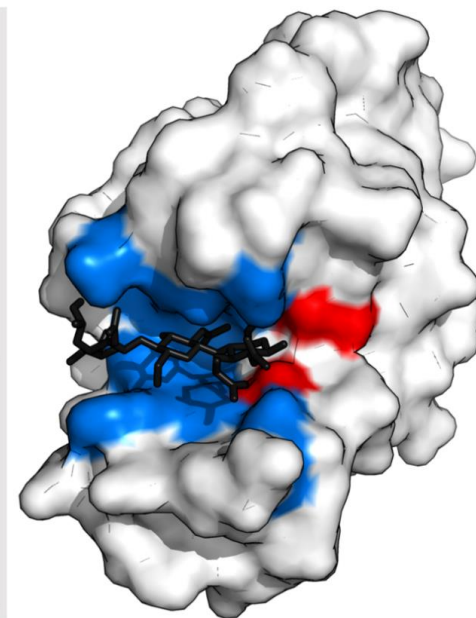
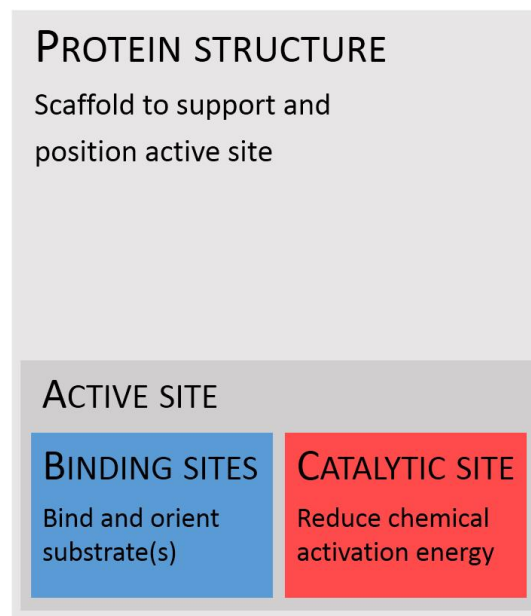
.Nezávislost na množství produktu (Chemická katalýza je přímo závislá na množství substrátu, tzn. kolik substrátu do reakce dáme, tolik bude produktu. Enzymy jsou často regulovány a tak může dojít k situaci, že i za přítomnosti substrátu nedojde k reakci).

Enzymy - struktura

Enzymy jsou **většinou proteiny**, které se mohou nacházet samostatně nebo fungují pouze v **proteinových komplexech**. Pro specifitu enzymové reakce je klíčová jeho 3D struktura.

Správné uspořádání aminokyselin je důležité pro funkčnost tzv. **aktivního místa**. To lze rozdělit na **katalytické a vazebné** místo. **Katalytické místo** je oblast skládající se z několika aminokyselin, ve které dochází ke katalytické reakci.

Katalytické místo je v proteinu obklopené vazebným místem. **Vazebné místo** funguje jako přistávací dráha pro substrát. Navíc prostorově substrát polohuje do správné pozice nutné pro katalýzu. Substrát a enzym musí být k sobě geometricky komplementární (jako zámek a klíč). Vazebné místo reguluje enzymovou aktivitu změnami afinity a polohování substrátu do katalytického místa.



Enzymy – vazba substrátu

Před enzymatickou reakcí je potřeba aby se do aktivního místa navázal substrát. Tomu napomáhá vazebné místo. Vazebné místo navíc zajišťuje specifitu enzymu - vazbu konkrétní molekuly, proteinu nebo skupiny proteinů.

Specifita je zachována díky:

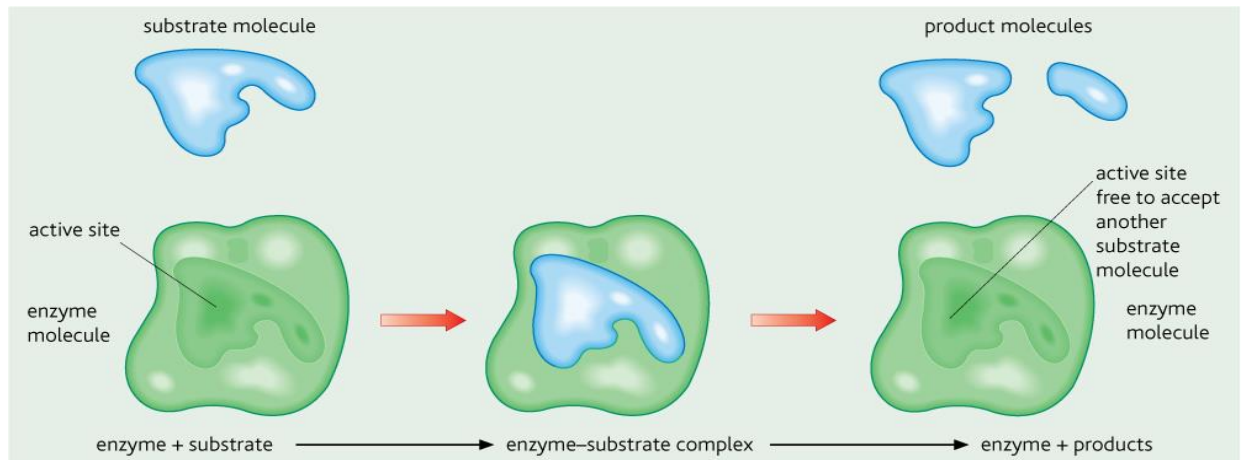
Komplementárnímu tvaru vazebného místa a substrátu

Rozložení elektrochemického náboje

Hydrofobním nebo hydrofilním interakcím

Model zámku a klíče

Aktivní místo není strukturně rigidní a může se strukturně měnit po přijetí substrátu. V některých případech dochází navíc ke změně tvaru substrátu napomáhající katalytické reakci.



Enzymy – aktivní místo

Katalytická reakce může probíhat

a) Stabilizací meziprojektu

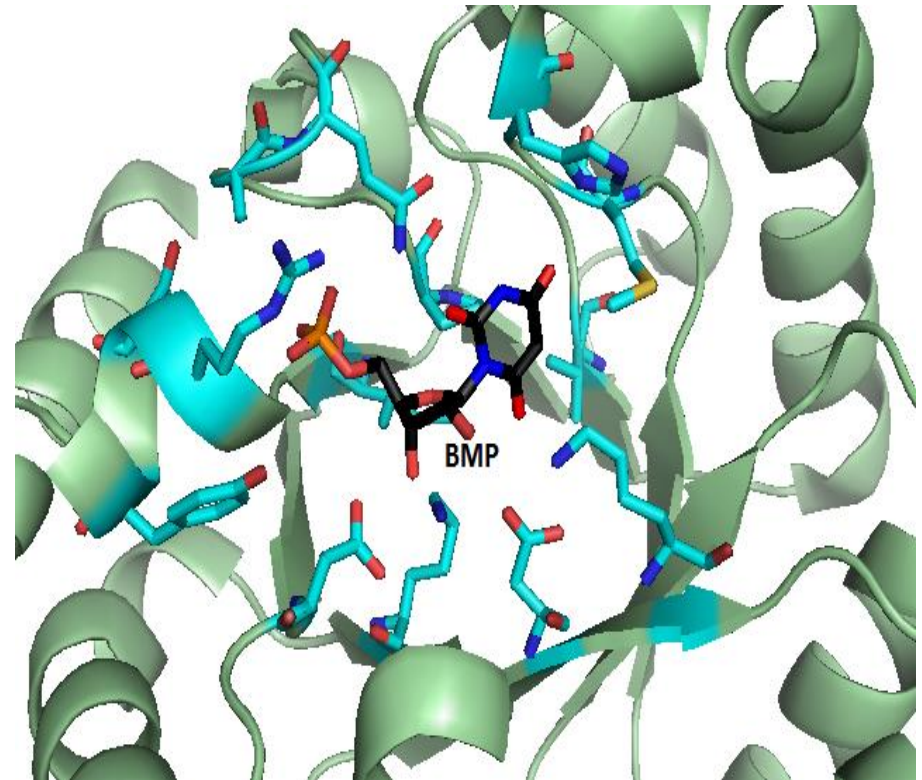
V místě proteinu díky blízkým AMK zbytkům dochází k výměně náboje s meziprojektu (který by byl velice nestabilní ve volném prostředí).

b) Dočasnou interakcí se substrátem

Enzym se stane příjemcem aktivní skupiny, umožňující snadnější přesun na jiné místo substrátu nebo jiný substrát

c) Změna konformace molekuly

Změnou struktury molekuly dochází také ke snížení energie potřebné pro vznik produktu.



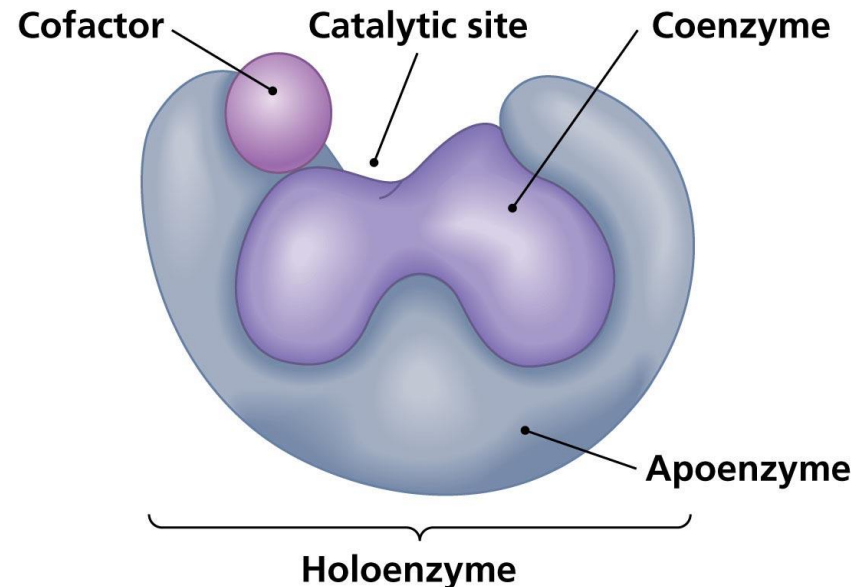
Enzymy - kofaktory

U některých enzymů se katalytické reakce neúčastí jenom zbytky aminokyselin, ale i jiné, pomocné molekuly - těmto molekulám říkáme **kofaktory**.

Pokud je takový kofaktor vázán kovalentní vazbou k enzymu - nazýváme jej **prostetickou skupinou**. Pokud je vazba v katalytickém místě méně pevná jako v případě iontů kovů nebo organických molekul jedná se o **koenzym**.

Mezi kofaktory patří například vitamíny rozpustné ve vodě (např. B1, B2, B6, B12, C atd.)

Katalyticky aktivní dvojice kofaktoru a enzymu se nazývá **holoenzym**. Naopak enzym bez kofaktoru je **apoenzym**.



Enzymy - názvosloví

Jak se v enzymech orientovat?

Enzymy mají svoje specifické názvosloví.

Název enzymu se skládá buďto z označení substrátu nebo z označení substrátu + typ dané katalytické reakce. Příponou názvu je - **asa**.

Př. proteinasa, alkoholdehydrogenasa.

V názvu tedy máme jak vstupní substrát, tak i typ reakce a můžeme usuzovat jaký produkt vznikne.

Pro podrobnější klasifikaci se využívá **IUBMB** (**INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY**) enzymová nomenklatura. V ní jsou enzymy rozděleny do 6 hlavních tříd podle typu reakce, kterou katalyzují.

- oxidoreduktasy (katalyzují intermolekulární oxidačně-redukční reakce, např. ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH + H⁺);
- transferasy (přenos chemických skupin z molekuly donoru na akceptor, např. ATP + glukosa → glukosa-6-fosfát + ADP);
- hydrolasy (štěpení vazeb vodou, např. sacharosa + H₂O → glukosa + fruktosa);
- lyasy (nejčastěji adice na dvojnou vazbu nebo eliminace za vzniku dvojně vazby, např. hydratace fumarátu v citrátovém cyklu -OOC-CH=CH-COO- + H₂O → -OOC-CH(OH)-CH₂-COO-);
- isomerasy (isomerace, např. D-glukosa → D-fruktosa nebo L-alanin → D-alanin);
- ligasy (spojení dvou molekul, k němuž se dodává energii štěpením ATP nebo GTP, např. karboxylace pyruvátu na oxalacetát CH₃-CO-COO- + CO₂ + ATP + H₂O → -OOC-CH₂-CO-COO- + ADP + Pi).

např. **EC 1.1.1.1** znamená
(EC) - Enzyme commission

(1, hlavní třída) - oxidoreduktázy (v reakci dochází k výměně elektronů)

(1, podtřída) - reakce probíhá na C-OH skupině

(1, podskupina) - kofaktor - zde NAD nebo NADP

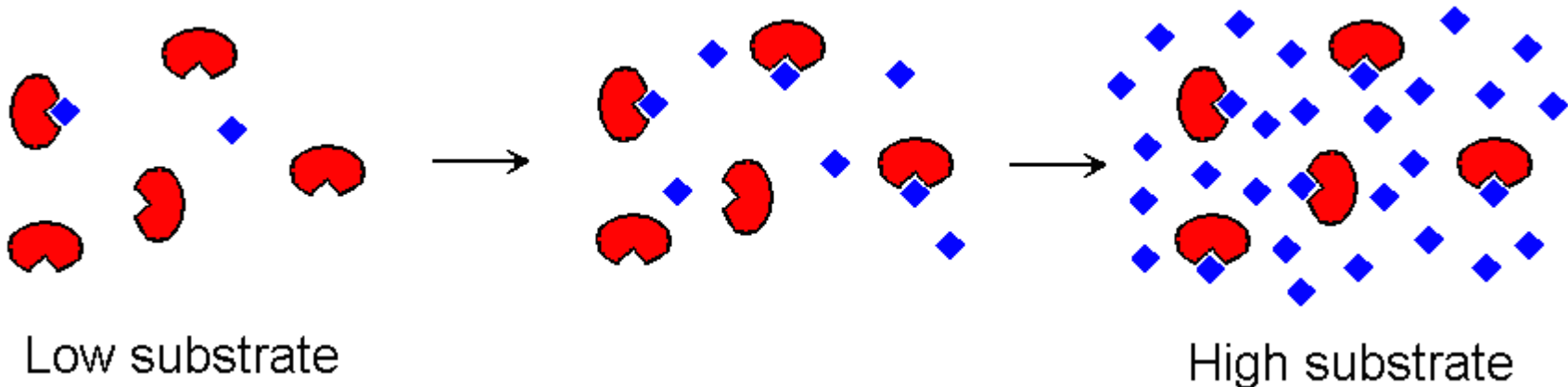
(1, pořadové číslo) - určuje již konkrétní enzym - alkoholdehydrogenazu

Enzymová kinetika

Enzymová kinetika je studium enzymatických reakcí. Studuje efektivitu a nejvhodnější podmínky pro enzymatickou reakci.

Jaká je kinetika enzymatické reakce?

Pro jeden substrát je rychlost enzymatické reakce definována **rychlostí jakou se substrát váže na enzym a rychlostí jakou dochází k tvorbě produktu.**



Při **nízké koncentraci substrátu vůči enzymu** je reakce téměř přímo úměrná jeho koncentraci, protože nic nebrání katalýze.

Druhým extrémem je **vysoká koncentrace substrátu vůči enzymu**. V takovém případě jsou aktivní místa enzymu zaplněna a nedochází k vazbě s přebytečným substrátem. V tomto případě je už celková rychlost reakce závislá na tom, jak rychle dokáže enzym zpracovat substrát na produkt - tím uvolní aktivní místo pro další substrát.

Dříve se podle pravidel Mezinárodní biochemické unie (IUB) z r. 1961 užívalo pojmu **enzymová jednotka (U)** *pro takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 μmol substrátu za minutu za standardních podmínek* (tj. nasycení enzymu substrátem, udaná teplota a pH).

Podle doporučení IUB z r. 1972 se však od pojmu množství enzymu upouští, protože tato definice se nehodí pro enzymy, které dosud nebyly izolovány. ☒

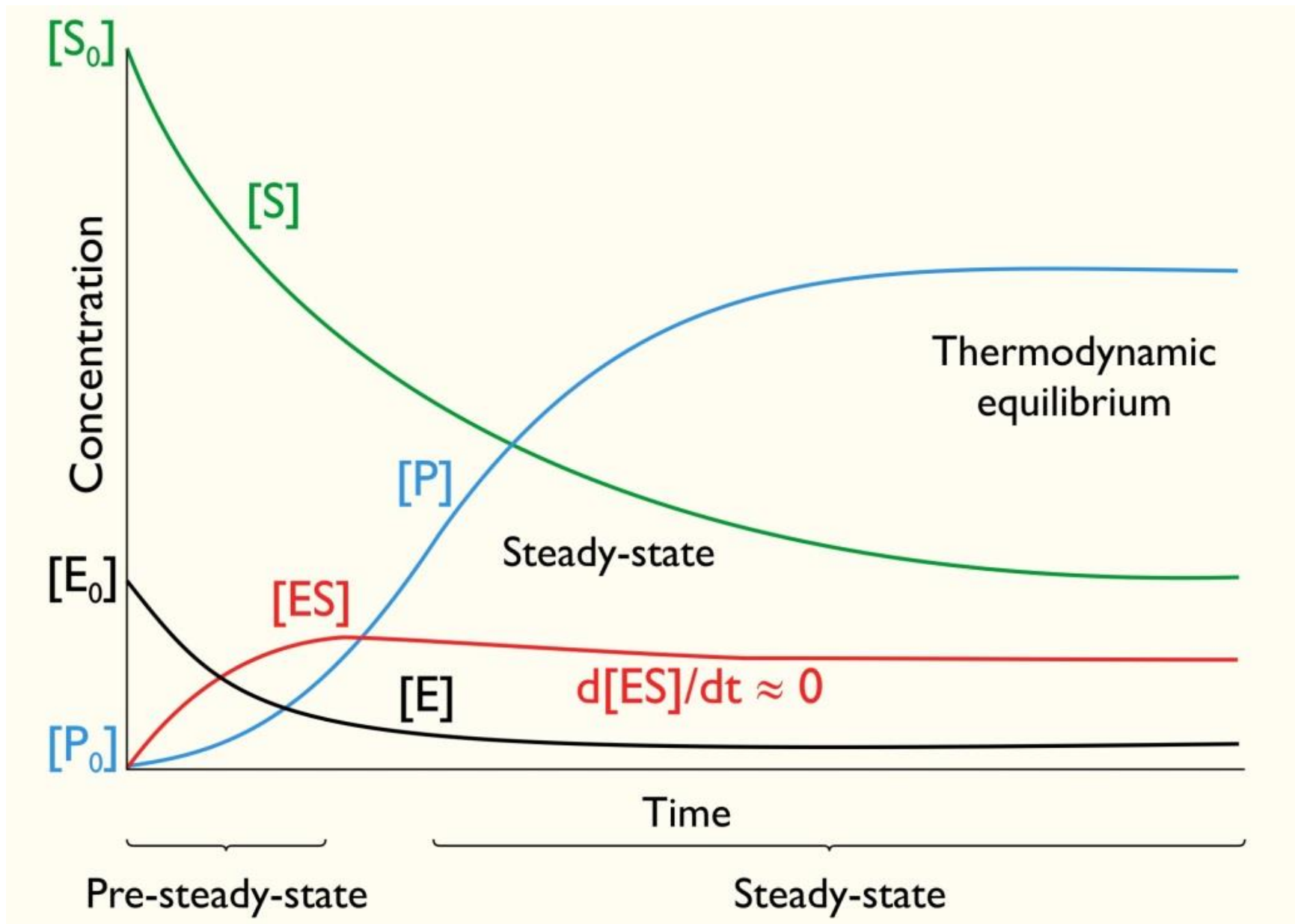
Namísto toho byly zavedeny pojmy: **enzymová aktivita** *jako rychlost přeměny substrátu, která se dá přičíst na vrub enzymové katalýze;*

specifická aktivita *jako enzymová aktivita vztažená za specifických podmínek ke hmotnosti* (např. k určitému množství tkáně, séra, enzymového preparátu);

molová aktivita *jako enzymová aktivita vztažená za specifických podmínek k množství enzymové substance* (byl-li enzym již izolován), které je zpravidla vyjádřeno v molech. Převod dosavadních enzymových jednotek (U) na kataly (kat) se řídí vztahem:

$$1 \text{ U} = 1 \text{ μmol/min} = 1/60 \text{ μmol/s} = 1/60 \text{ μkat} = 16,67 \text{ nkat}$$

Avšak ve starší literatuře se ještě s pojmem enzymové jednotky (U) setkáváme. U nás byly zavedeny kataly do klinicko-biochemické laboratorní praxe povinně a výsledky laboratorních vyšetření jsou takto vyjadřovány v séru nejčastěji jako **μkat/l.**

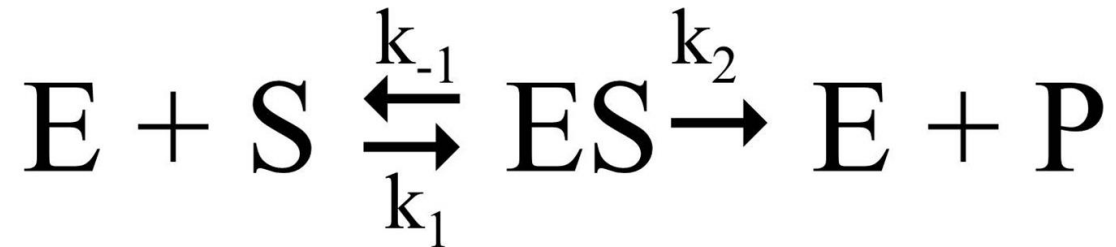


Graf ukazuje, že na začátku je rychlost reakce závislá na vazbě E se S, poté se enzym nasytí a poté přebírá důležitost krok přeměny ES na P.

Enzymová kinetika

Enzymová kinetika je studium enzymatických reakcí. Studuje efektivitu a nevhodnější podmínky pro enzymatickou reakci.

Základní enzymatická reakce probíhá touto rovnicí:

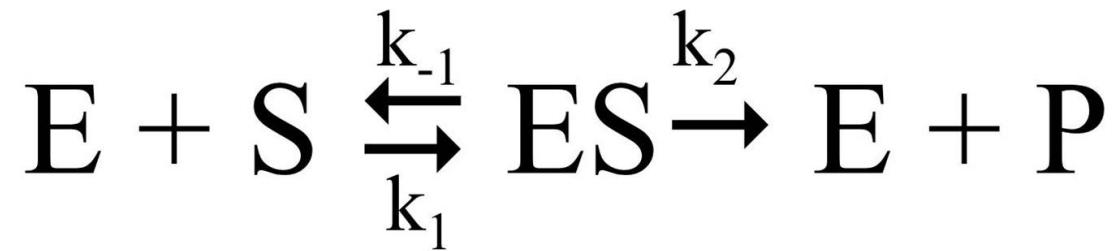


kde (**E**) je enzym, (**S**) substrát, (**ES**) komplex enzym-substrát, (**P**) produkt

k_1 , k_2 jsou rychlostní konstanty, ty popisují rychlost dané reakce. k_{-1} je rychlostní konstanta rozpadu komplexu ES. Rychlostní konstanta je rovna rychlosti reakce při jednotkových koncentracích výchozích látek.

Za předpokladu, že žádný produkt neinteraguje zpětně s enzymem za vzniku ES, lze rychlost enzymatické reakce **v (mol.s⁻¹)** definovat jako:

$$V = k_2 [ES]$$



Problém je, že ES je neměřitelný. Rychlost reakce se proto definuje podle koncentraci látek o kterých víme jejich koncentraci. Rozdělíme si vznik ES do dvou rovnic:

a) vzniku produktu: $[ES] = k_1 [E] [S]$

b) rozpadu komplexu ES směrem k S nebo P: $[ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$

Za předpokladu, že je v reakci enzym plně nasycen – tzn. Koncentrace ES je stále stejná:

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] \quad \text{a dále} \quad [ES] = \frac{[E][S]k_1}{k_{-1} + k_2}$$

Koncentrace substrátu mezi nesaturovaným a saturovaným stavem enzymu je definována pomocí Michaelisovy konstanty K_M -konstanta poloviční saturace - ta se rovná koncentraci substrátu, při které došlo k polovičnímu nasycení enzymu substrátem a reakční rychlost a je rovna polovině maximální rychlosti.

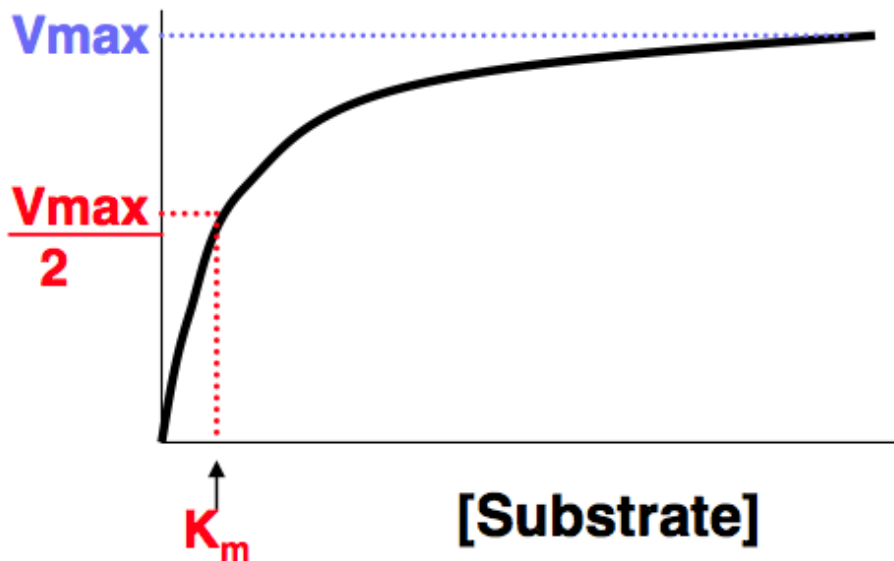
Z rovnice enzymatické katalýzy lze K_M vyjádřit jako:



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

Po dosazení do předchozí rovnice dostáváme:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$



Za předpokladu, že koncentrace E v reakci je mnohonásobně menší než S ($[E] \ll [S]$), je $[ES] + [S] \approx [S]$.

Koncentrace volného enzymu lze definovat jako rozdíl celkového enzymu a ES:

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

Po dosazení do rovnice dostáváme:

$$[ES] = \frac{([E_0] - [ES])[S]}{K_M}$$

Po vyjádření [ES] dostáváme:

$$[ES] = [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Víme už, že rychlost je definovaná jako: $V = k_2 [ES]$

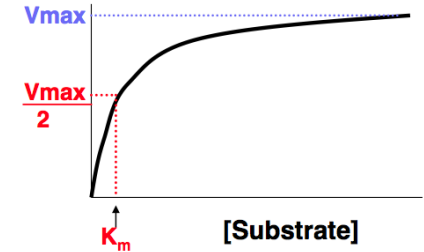
Po dosazení dostaneme:

$$V = k_2 [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Je těžké experimentálně sledovat momentální rychlost enzymatické reakce. Proto se sleduje rychlost maximální V_{max} . V_{max} je definována rychlostí enzymatické reakce při plné saturaci enzymu (po ní je rychlost stabilní, lze ji pozorovat). Této rychlosti dosáhneme při $[S] \gg K_M$. Pak $[S]/([S]+K_M) \approx 1$

V_{max} následně definujeme z předchozí rovnice:

$$V = k_2 [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad V_{max} = k_2 [E_0]$$



Následně dostáváme finální rovnici, ve které lze rychlost enzymatické reakce získat měřením pozorovatelných veličin.

Tato rovnice je známá jako **Rovnice Michaelis-Mentenové**:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Rovnice Michaelis-Mentenové

Pro kinetiku enzymatické reakce s jedním substrátem. Tzn. Že do katalytického místa vstupuje pouze jedna molekula, která interaguje s enzymem.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

v_0 je počáteční rychlost enzymatické reakce, V_{\max} je limitní hodnota rychlosti při plném nasycení enzymu substrátem, $[S]$ koncentrace substrátu, K_M je Michaelisova konstanta.

Pokud má enzym nízké K_M , znamená to, že může dosahovat maximální rychlosti při nízké koncentraci substrátu. Enzymy s K_M při $10^{-8} - 10^{-10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ – prakticky každý kontakt se substrátem vede k přeměně na produkt.

Rovnice Michaelis-Mentenové

Je třeba brát tuto rovnici pouze jako zjednodušenou. Nezohledňuje další faktory, které v reakci mohou nastat jako:

- inhibici reakce produktem
- zvratná reakce v meziproduktu
- nepopisuje allosterické chování proteinů (tedy že konformační změna proteinu může ovlivnit enzymatickou aktivitu)
- kooperativní interakce

Navíc je platná za předpokladu, kdy:

Koncentrace ES se mění mnohem pomaleji než koncentrace P a S.

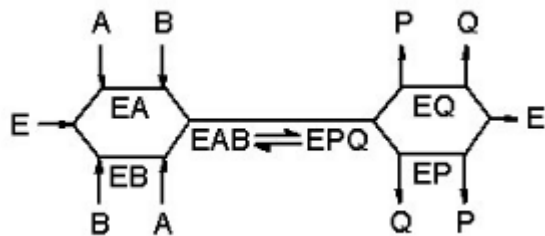
Koncentrace enzymu se v čase nemění.



Multisubstrátové enzymatické reakce

Kinetika v takových reakcích navíc sleduje v jakém pořadí dochází k vazbě S na E.

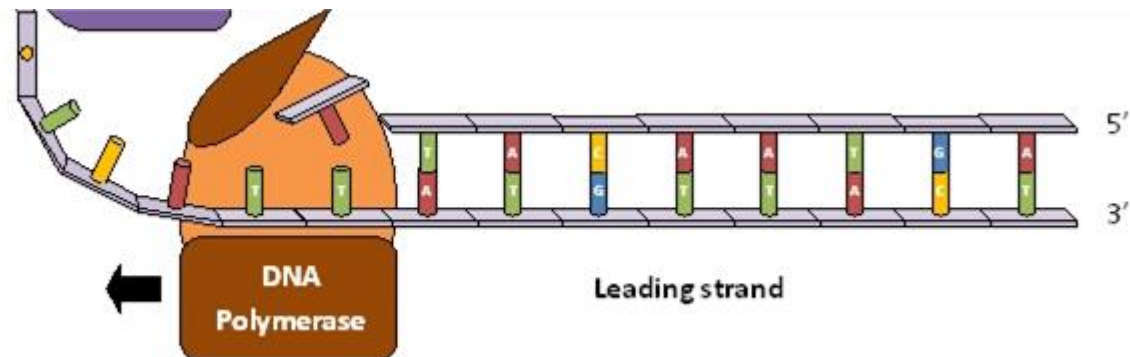
Bi-Bi reakce



Oba substráty se vážou na enzym v jednom okamžiku a vytváří ternární EAB komplex.

Může probíhat náhodným mechanismem - nezáleží na pořadí ve kterém se substráty navážou. V uspořádaném mechanismu je definováno a záleží na tom který substrát do aktivního místa přistupuje jako první, druhý atd.

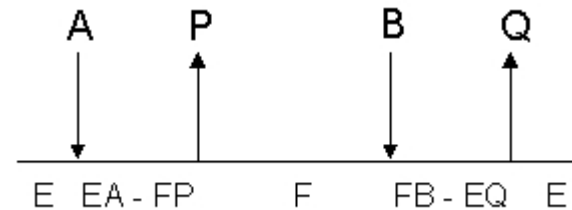
Bi-Bi mechanismus využívá například DNA Polymeráza.



Multisubstrátové enzymatické reakce

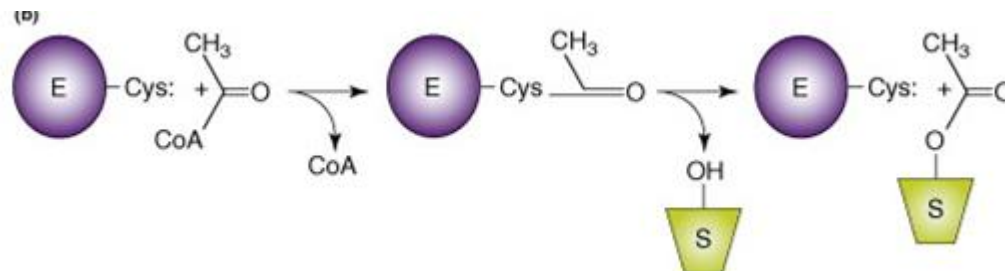
Ping-Pong mechanismus enzymové reakce

Enzym má dva stavy - základní a intermediární. V intermediárním stavu je enzym chemicky modifikován prvním substrátem.



A - substrát umožňující přenos chemické skupiny na enzym a po jejím vypuštění dochází k vazbě **B**, na který je chemická skupina z enzymu přenesena.

Př. mohou být enzymy využívající kofaktory.

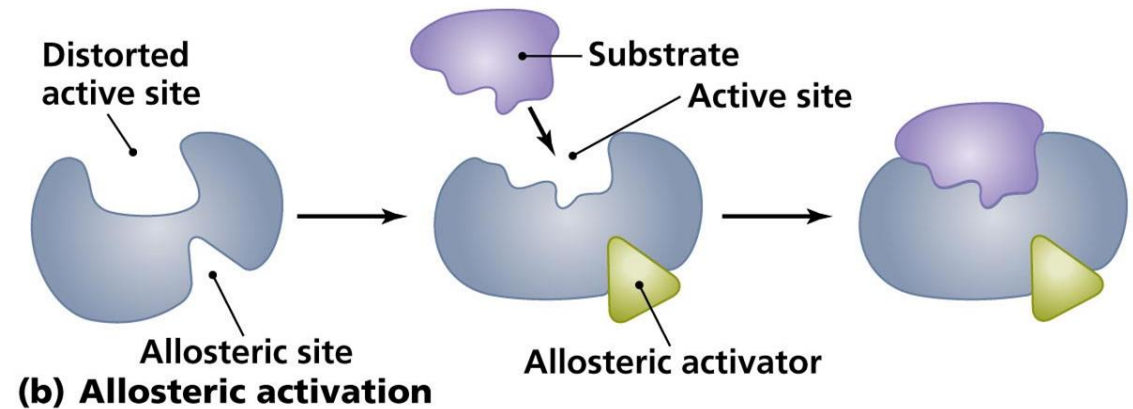
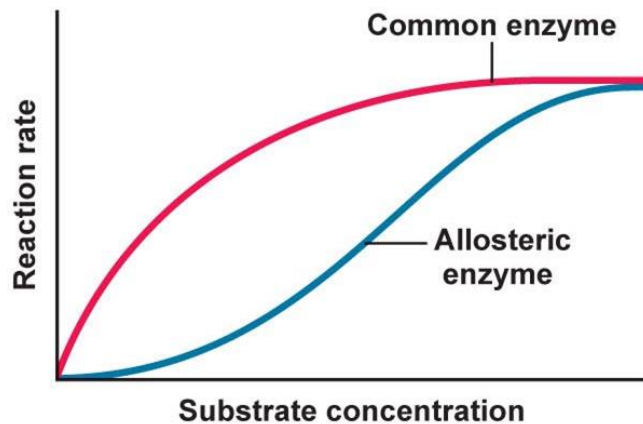


Kinetika alosterických enzymů

alosterický – charakterizovaný odlišným prostorovým sterickým uspořádáním

Dochází ke kooperativní vazbě substrátu.

Kinetika rozdílná oproti Michaelis-Mentenové. Struktura alosterických enzymů může být pozměněna vazbou alosterických efektorů do alosterického místa. Alosterické místo se nachází mimo aktivního místa. Efektory mohou změnit konformaci vazebného nebo aktivního místa enzymu vedoucí jak k aktivaci tak inhibici enzymatických procesů.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Křivka závislosti koncentrace substrátu na rychlosti reakce je sigmoidní (jak známe např. z hemoglobinu). Kooperativní interakce jsou u enzymů běžné. Umožňují regulovat jejich funkci na základě koncentrace substrátu nebo produktů.

Například při pozitivní regulaci mohou být více citlivé na nízkou koncentraci S, v negativní naopak necitlivé.

Enzymová inhibice

Inhibitory jsou molekuly, které redukují nebo blokují enzymatickou aktivitu. Inhibitor může bránit vazbě k aktivnímu místu enzymu nebo zabránit katalytické reakci. Naopak aktivátory enzymatickou aktivitu zvyšují.

Inhibice může být vratný nebo nevratný proces.

Irreverzibilní inhibitory - vytváří kovalentní (pevnou) vazbu na inhibitor. Dochází k chemické modifikaci zbytků AMK potřebné pro enzymatickou aktivitu.

Reverzibilní - vazba je nekovalentní (vodíkový můstek, hydrofobní interakce, iontová vazba).

V kinetice inhibiční reakce sledujeme primárně specifitu inhibitoru a také jeho účinnost.

Inhibice enzymů

působení mnoha léků je založeno na inhibici specifických enzymů metabolických drah tyto léky jsou **analoga** substrátů - mají podobnou strukturu jako substráty, ale nejsou enzymem přeměňovány (např. methotrexát, strukturní analog folátu \neq koenzym/, soutěží s tímto koenzymem o vazbu do aktivního centra enzymu podílejícího se na syntéze thymidin monofosfátu \Rightarrow pokles syntézy DNA vede k poklesu buněčného dělení nádorových buněk)

Existují tři hlavní skupiny inhibitorů:

1) kompetitivní inhibitory

- strukturou podobné substrátu
- enzym nekatalyzuje přeměnu inhibitoru, inhibitor se pouze na enzym naváže
- váží se do vazebného místa substrátu (soutěží se substrátem o vazebné místo)
- zvýšením koncentrace substrátu lze inhibici potlačit
- K_m se v přítomnosti inhibitoru zdánlivě zvyšuje
- V_{max} se nemění

2) nekompetitivní inhibitory

- nebrání vazbě substrátu na enzym
- váží se mimo vazebné místo substrátu
- inhibici nelze potlačit zvýšením koncentrace substrátu, lze ji snížit pouze odstraněním inhibitoru dialýzou (inhibitor se neváže kovalentně)
- žádný z komplexů enzym-inhibitor (E-I ani E-I-S) není katalyticky aktivní \Rightarrow snížení koncentrace aktivního enzymu \rightarrow pokles V_{max}
- K_m se nemění

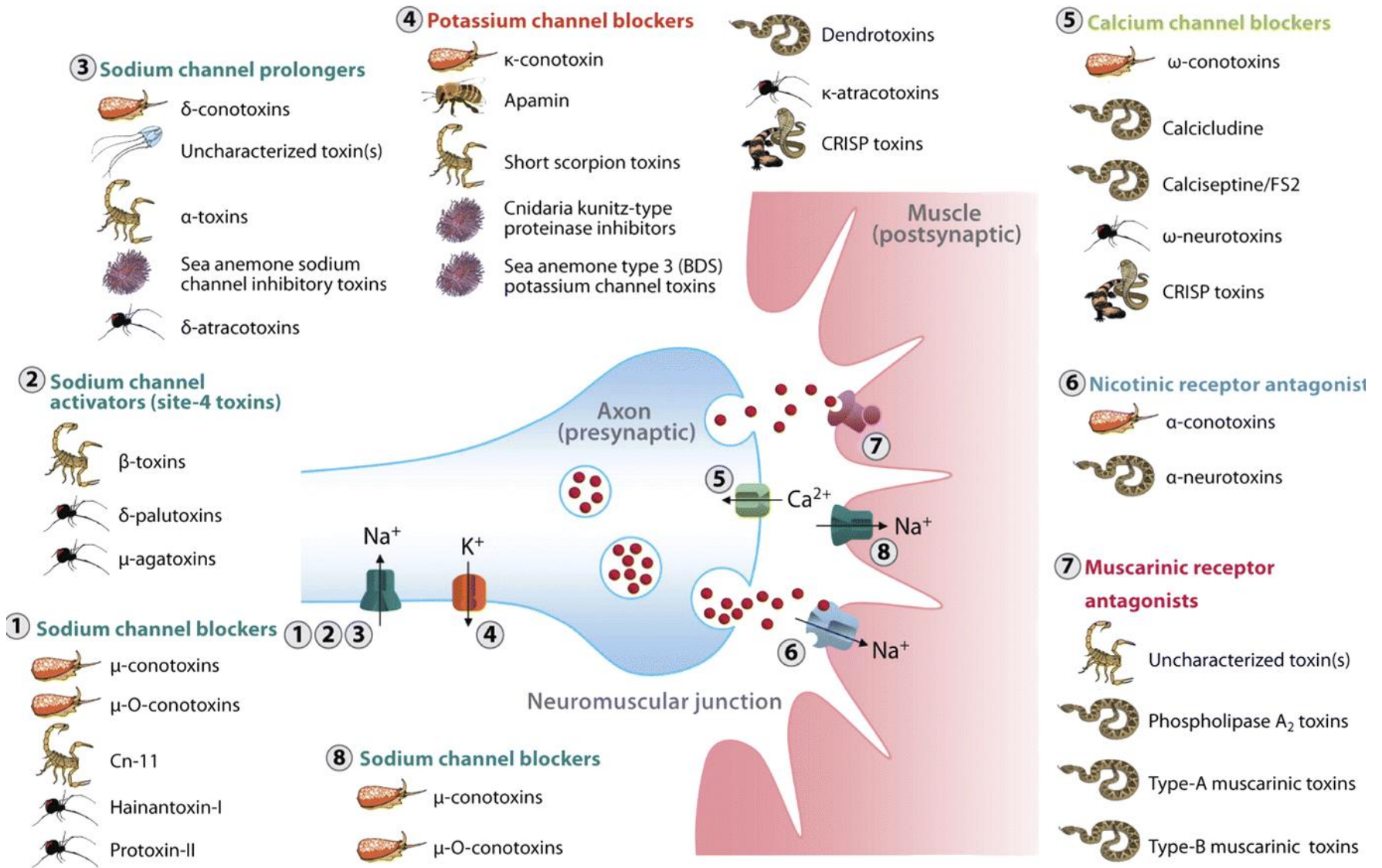
3) akompetitivní inhibitory

- váží se pouze na komplex enzym-substrát
- dochází ke zdánlivé změně K_m i V_{max}

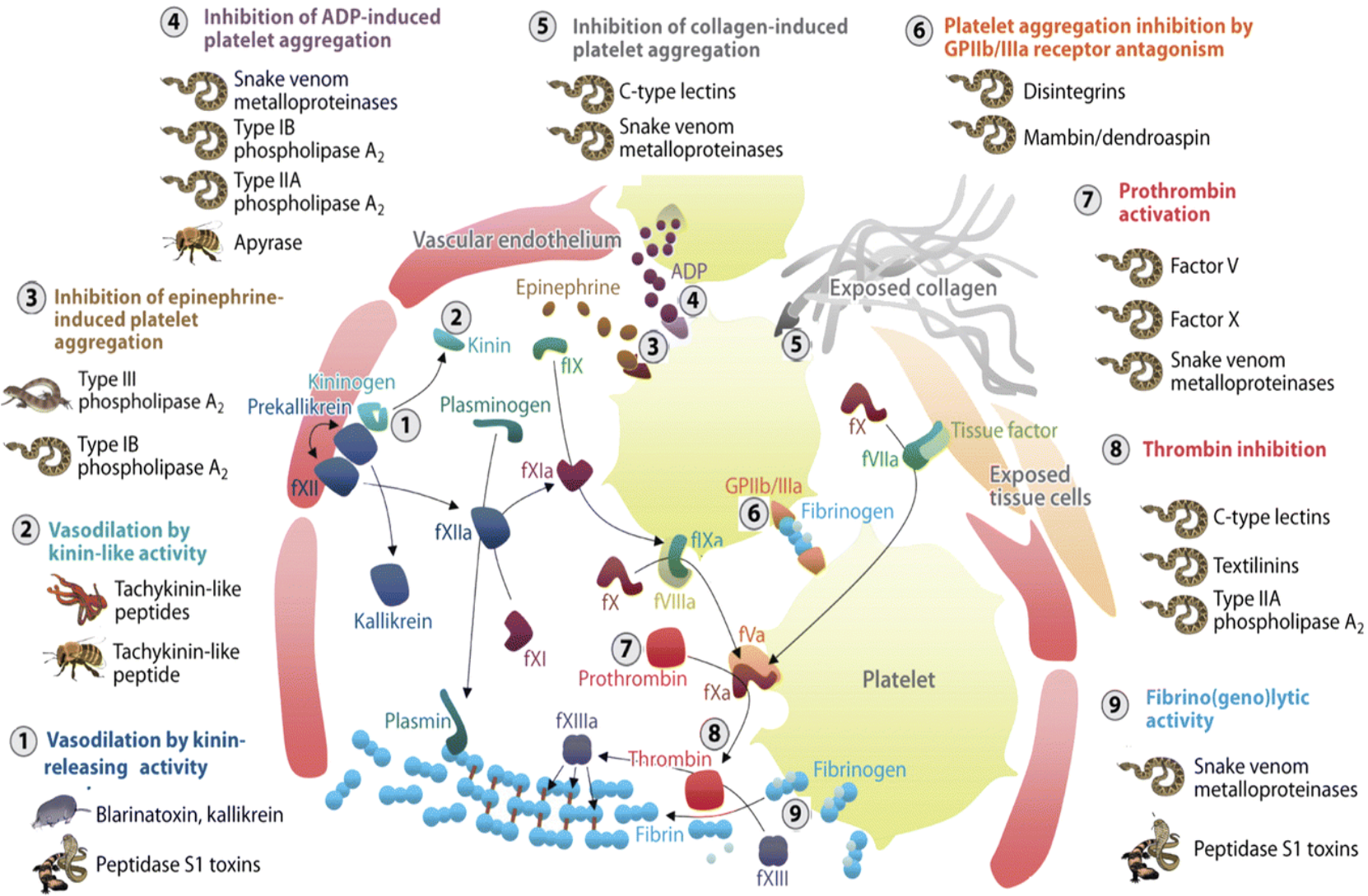
Neurotoxin je druh jedu, který působí na nervovou soustavu. Produkují ho jedové žlázy většiny korálovcovitých hadů žijících na souši (kobry, korálovci, mamby,...).

Myotoxin je jed působící na svalovinu. V jedových žlázách ho mají všechny mořské druhy korálovcovitých hadů (vodnáři, vlnožilové) a některé suchozemské druhy korálovcovitých hadů žijících v Austrálii.

- Většina živočišných buněk má **vysokou koncentraci K^+ uvnitř buněk a nízkou Na^+ ve vztahu k vnějšímu prostředí.**
- Takový iontový gradient je generován specifickým transportním systémem, enzymem s názvem Na^+ - K^+ pumpa nebo také
- Na^+ - K^+ ATPasa.
- Hydrolýza ATP pumpou poskytuje energii potřebnou k aktivnímu transportu Na^+ ven z buňky a K^+ dovnitř, za účelem tvorby gradientu. Název Na^+ - K^+ ATPasa je používán proto, že k hydrolýze ATP dochází pouze za situace, kdy jsou oba ionty na pumpu vázány.
- Enzym vyžaduje přítomnost Mg^{2+} iontů. Aktivní transport je má velmi významný fyziologický efekt. Na tvorbu gradientu se spotřebuje více než třetina vytvořeného ATP při odpočinku organismu.
- Gradient obou iontů kontroluje objem buňky, udržuje neurony a svalové buňky v elektricky excitovaném stavu a pohání aktivní transport sacharidů a aminokyselin.

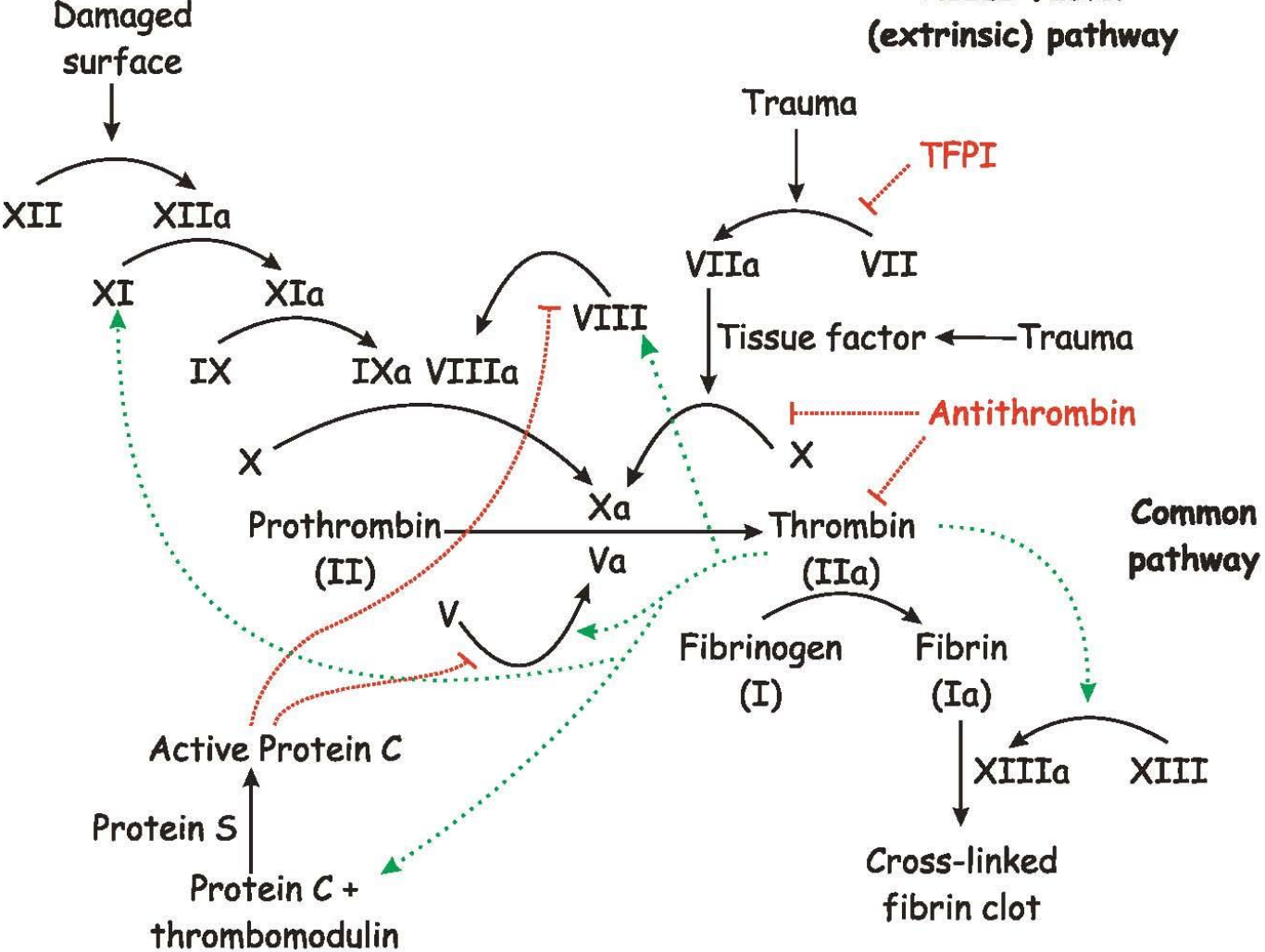


Hemotoxin je druh jedu, který rozkládá krevní buňky uštknuté kořisti. Produkují ho jedové žlázy druhů hadů z čeledi zmijovitých (zmije, chřestýši, ploskolebci apod.).



Contact activation (intrinsic) pathway

Tissue factor (extrinsic) pathway



Složky jedů ovlivňující hemokoagulaci

Toxiny a enzymy ovlivňující funkci hemokoagulačního systému mají vliv na funkci krevních destiček i endotelu. Hemokoagulační aktivní toxiny mají na svědomí nejvíce fatálních případů intoxikace hadími jedy na světě. Klinicky se účinek projeví krvácením, avšak může dojít až k neztišenému krvácení z traumat, sliznic a do orgánů, smrt tedy končí poruchami typu diseminované intravaskulární koagulopatie. Tyto toxiny jsou charakteristické pro bojgy, zmije, korálovcovité a mořské hady. Hemostáza je ovlivněna zásahem toxinů do různých struktur hemokoagulačního systému.

Toxiny mohou působit na tyto systémy:

Krevní destičky

Zásah toxinu je většinou do povrchních aktivačních struktur destiček. Enzymy typu fibrinogenáza, nukleotidáza, PLA2 mohou způsobit inhibici agregace krevních destiček. (Valenta 2008)

Kontaktní cesta aktivace hemokoagulace

Aktivace protrombinu

Zvýšení trombinové aktivity je způsobena aktivací koagulačních faktorů, nebo přímým zásahem do molekuly protrombinu. Dochází ke krvácení typu diseminované intravaskulární koagulopatie. Další z typů enzymů, je enzym serinové protézy, účinkující se spoluúčastí fosfolipidů a Ca^{2+} .

Konvertující fibrinogen na fibrin

Enzymy hadích jedů způsobují odštěpování fibrinopeptidů (fibrinopeptid A) z molekul fibrinogenu, a tak způsobují konverzi fibrinogenu na fibrin

Degradující fibrinogen na fibrin

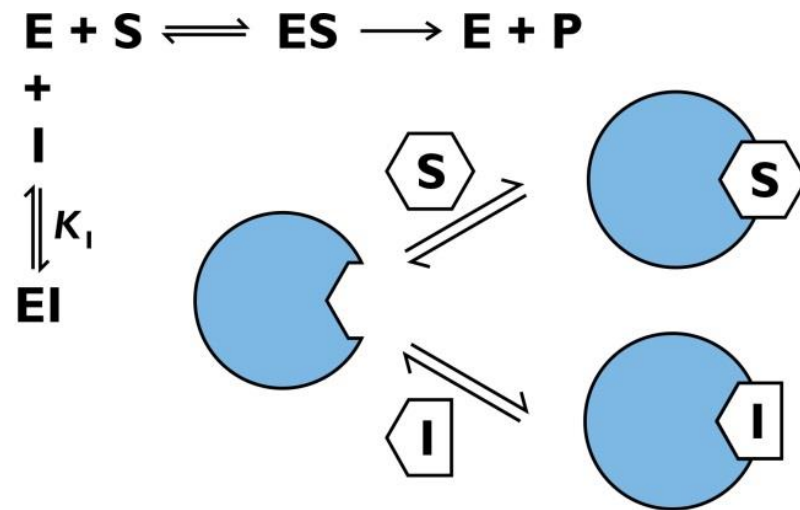
Jedná se o enzymatické působení proteináz na fibrinogen nebo fibrin. Mohli bychom je také nazvat Fibrino(geno)lytické aktivity hadích jedů. Působením těchto látek vzniká zvýšené krvácení z ran a obraz hypofibrinogémie nebo afibrinogémie.

Inaktivace antitrombinu

Aktivace C proteinu

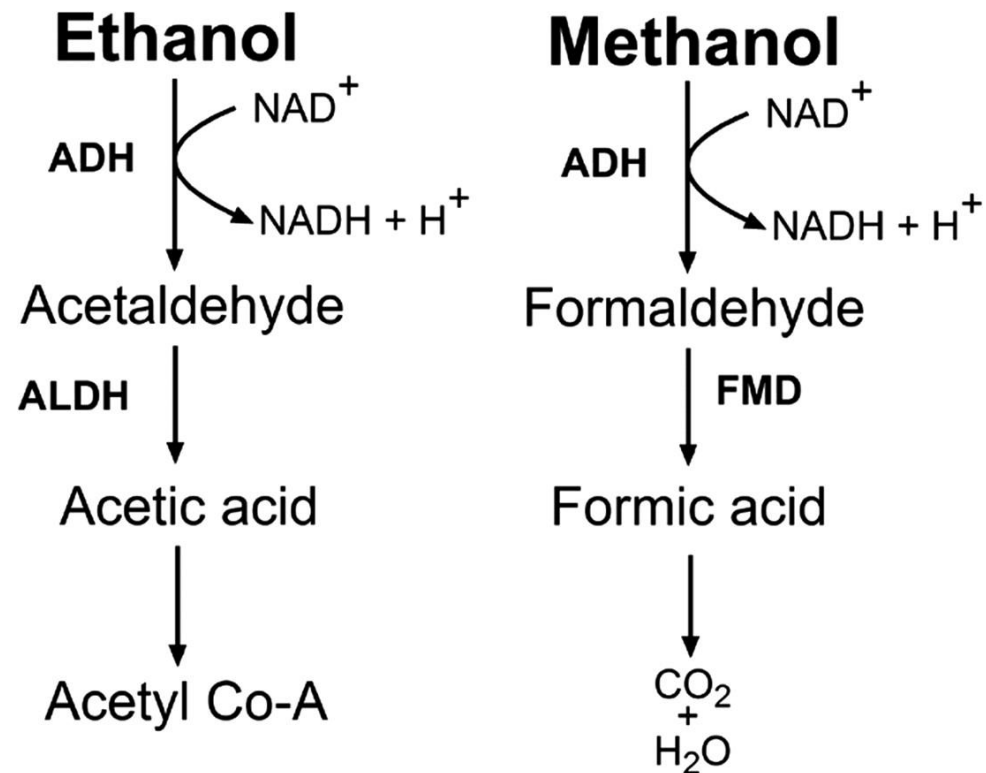
Reverzibilní Enzymové inhibice

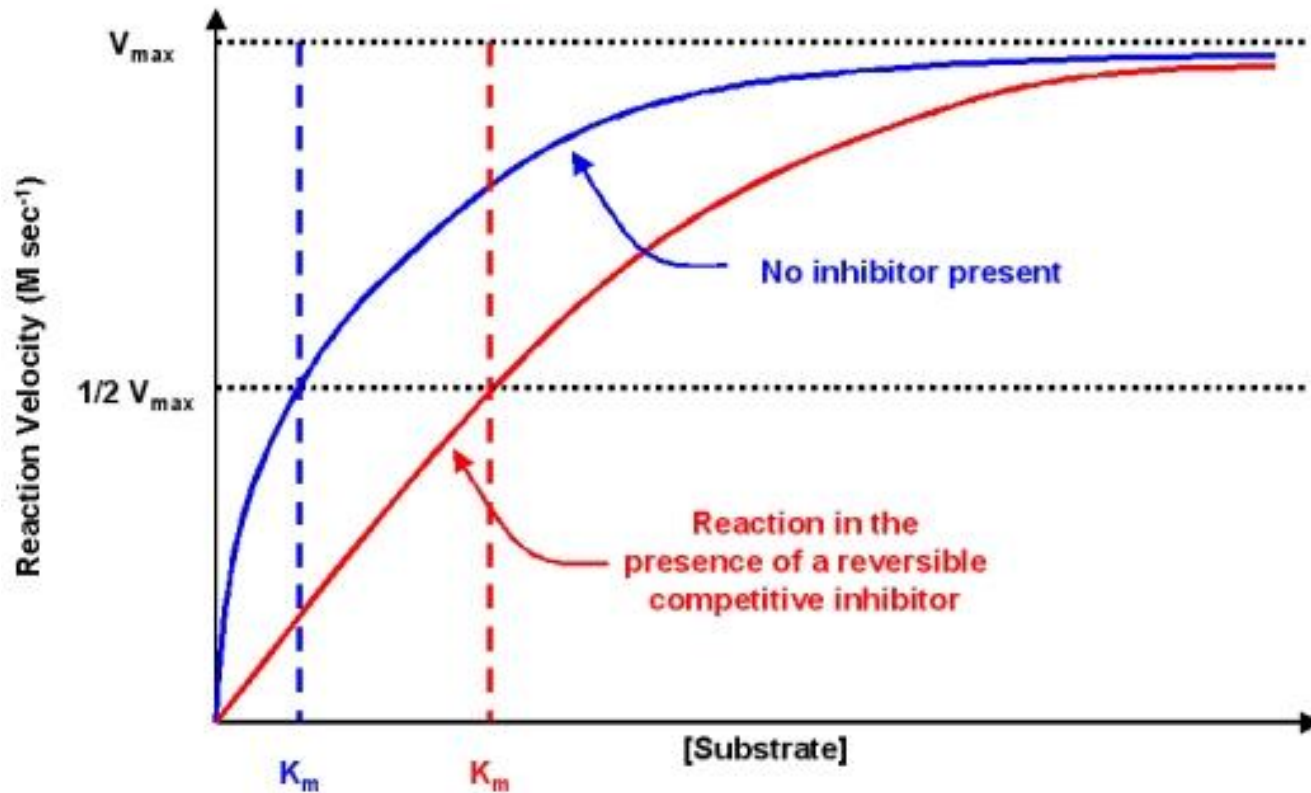
Kompetitivní reverzibilní inhibice



Kde **I** je inhibitor.

S a **I** se mohou vázat na enzym ve stejném čase. Inhibitor je často strukturálně velmi podobný substrátu, ale nedochází u něj k enzymatické reakci. **I** se tedy váže na vazebné (i aktivní) místo enzymu. O tyto místo tedy **S** a **I** soupeří.





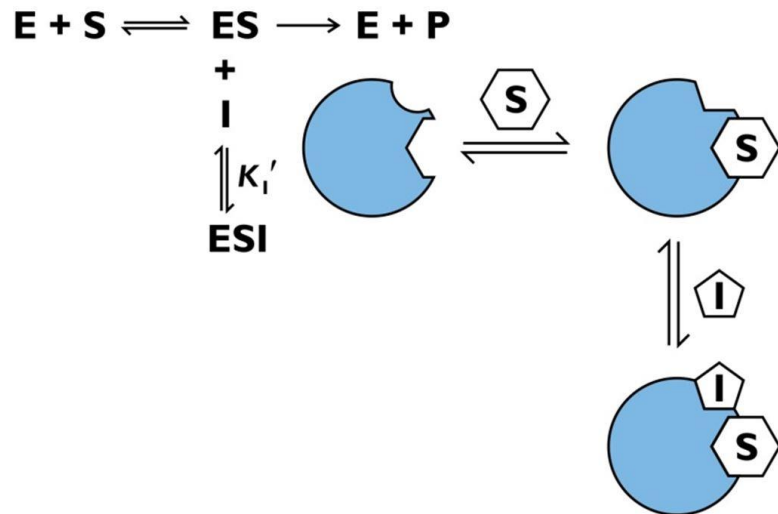
Pokud zvýšíme koncentraci S, bude docházet k častějším interakcím mezi E a S a inhibiční účinek bude potlačen.

Po inhibici kompetitivním inhibitorem dochází k zvýšení K_M (Protože inhibitor obsazuje část molekul enzymu, pro vytvoření komplexu enzym-substrát je tedy k dispozici jen málo molekul volného enzymu. Z tohoto důvodu je reakce pomalá). V_{max} se nemění.

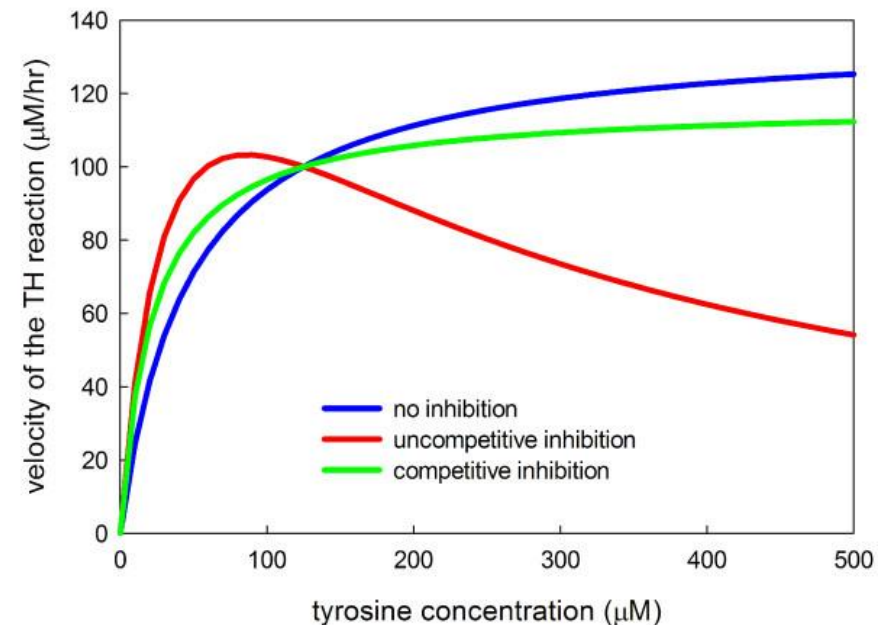
Reverzibilní Enzymové inhibice

Akompetivní reverzibilní inhibice

Inhibitor se může vázat na jiné místo enzymu (a to pouze v případě, kdy je substrát vázaný na enzym). Po vazbě dochází k změně struktury enzymu vedoucí ke znemožnění enzymatické reakce.



Zde se inhibitor váže pouze na ES. Pro inhibici tedy potřebuje přítomnost substrátu. S rostoucí koncentrací substrátu vede k zvýšené inhibici enzymu. Proto dochází ke snížení V_{max} . Tím se snižuje se také i K_M .



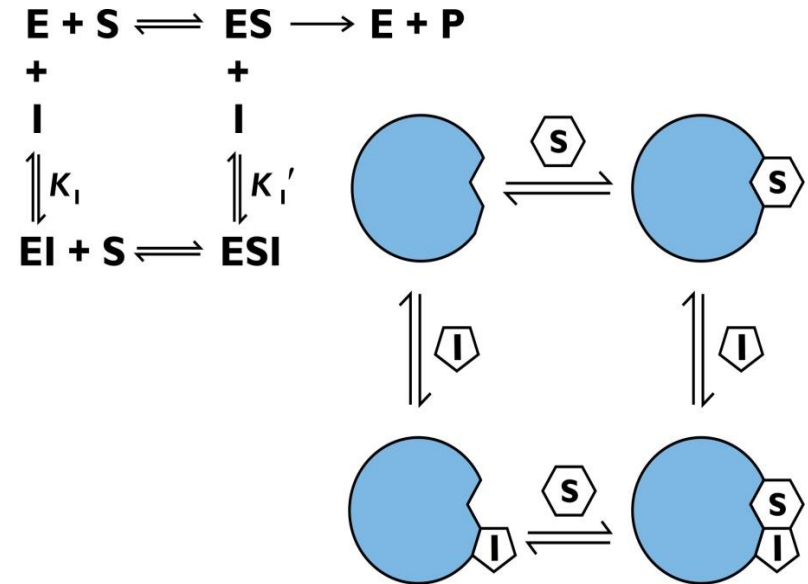
Reverzibilní Enzymové inhibice

Smíšená reverzibilní inhibice

Inhibitor se váže na aktivní místo enzymu nezávisle na tom, zdali je aktivní místo prázdné nebo je S v komplexu s enzymem. Nicméně má větší afinitu k jednomu nebo druhému stavu. Jedná se o mix kompetitivní a akompetitivní inhibice.

Vazba inhibitoru ovlivňuje vazbu S (zvyšuje se K_M) a zároveň snižuje počet aktivních molekul enzymu (snížení V_{max}).

Inhibiční efekt může být redukován, ale ne potlačen zvýšenou koncentrací S.

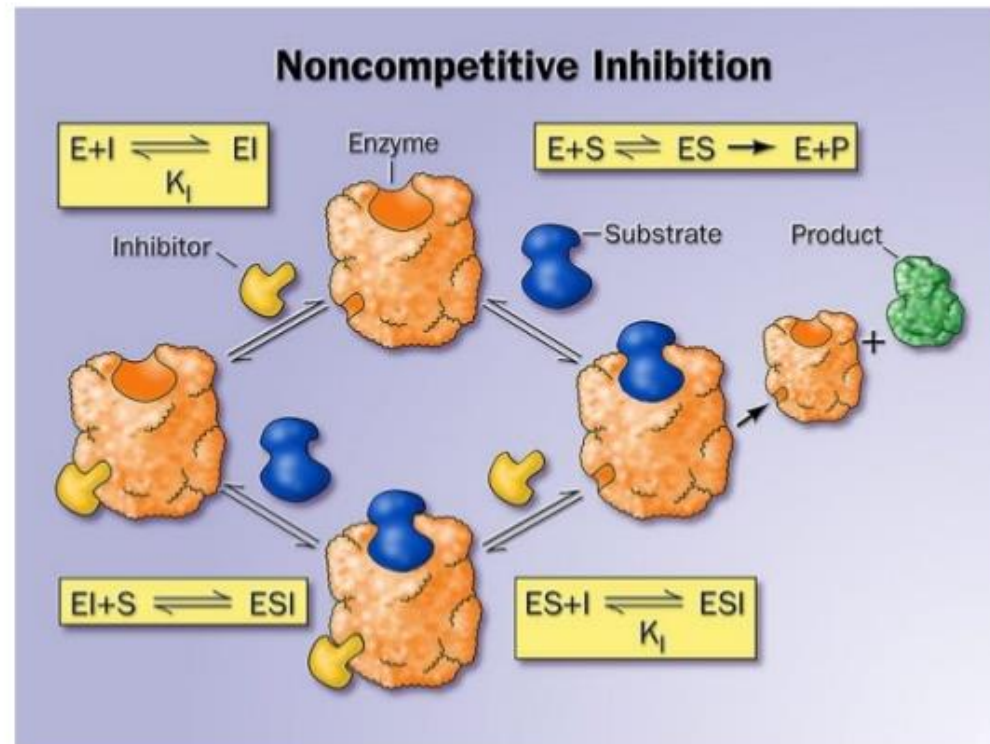


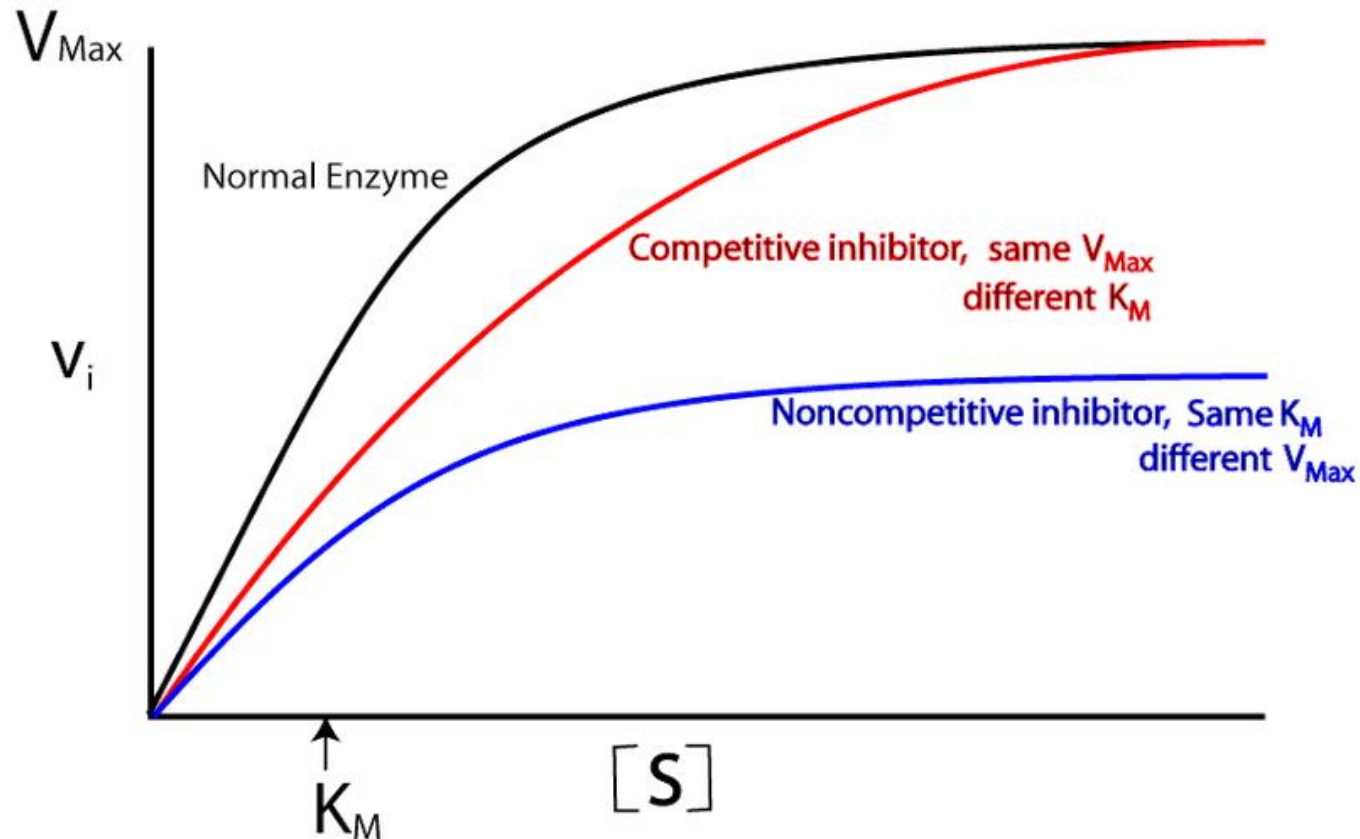
Reverzibilní Enzymové inhibice

Nekompetivní reverzibilní inhibice

Specifický případ smíšené enzymové inhibice.

Inhibitor redukuje afinitu enzymu k substrátu, ale neovlivňuje jeho vazbu (S se tedy na enzym neváže). Inhibitor se podobně jako u akompetitivní inhibice váže na jiné místo proteinu a vyvolává strukturální změny v aktivním místě enzymu.



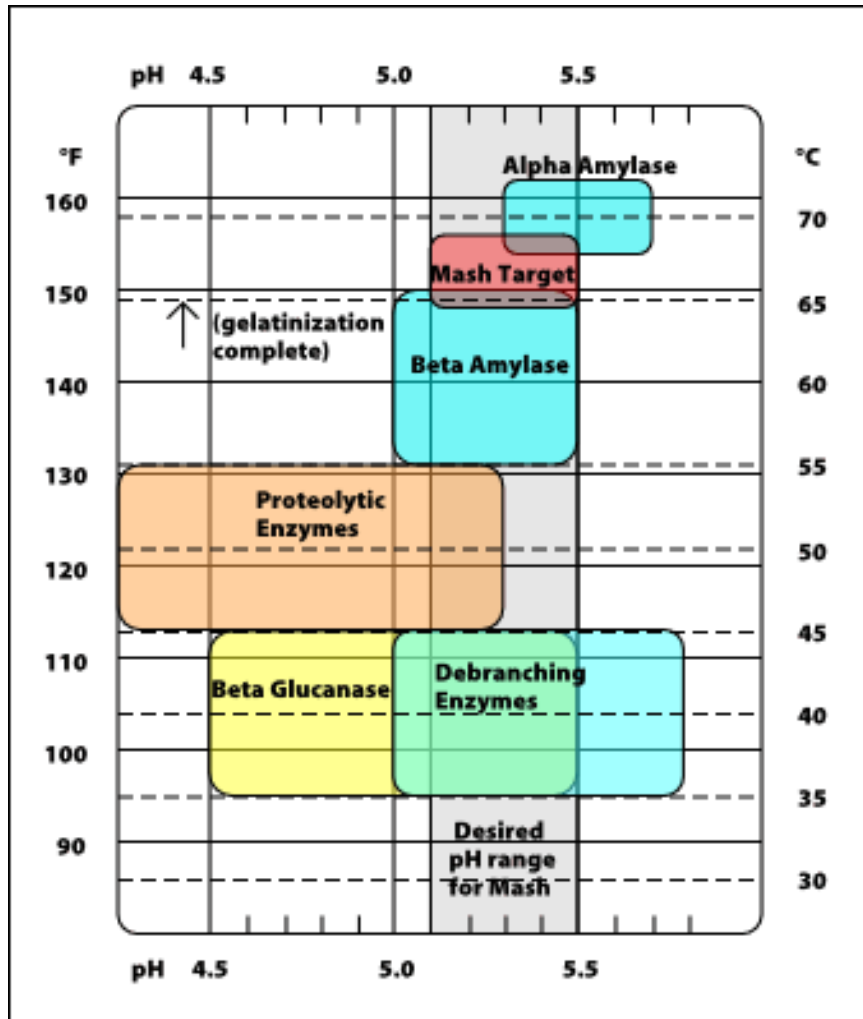


Tento typ inhibice je přímo závislý na koncentraci **I**, ne na koncentraci **S** (protože se Inhibitor váže na jiné místo enzymu a nesoupeří se substrátem). Takže když dojde k inhibici 50% enzymu, tak jak při nízké i vysoké koncentraci substrátu.

Klesá V_{max} , protože aktivita enzymu už je redukována a vysoká koncentrace **S** na ni nemá efekt.

Ale K_M zůstává stejná (mechanismus enzymatické reakce je stejný, ale s omezeným množstvím aktivních enzymů).

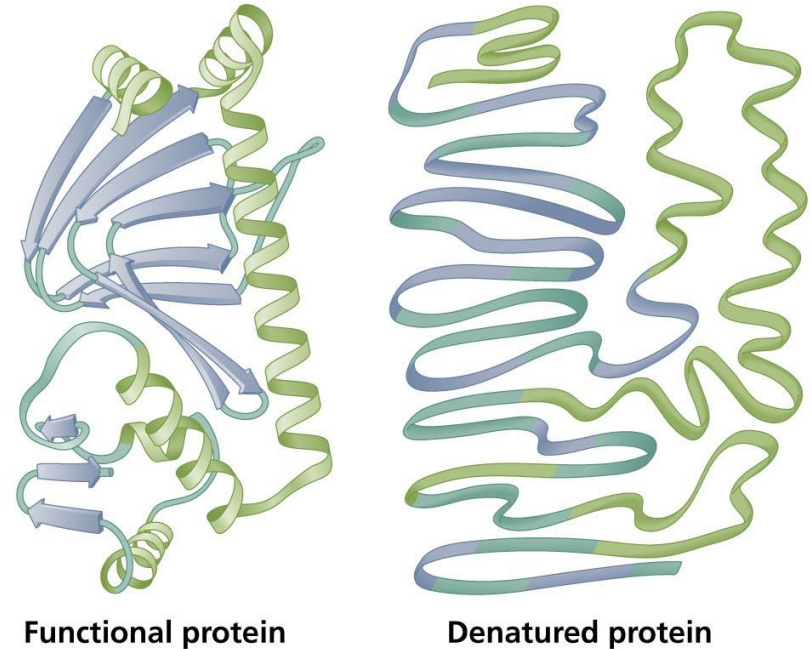
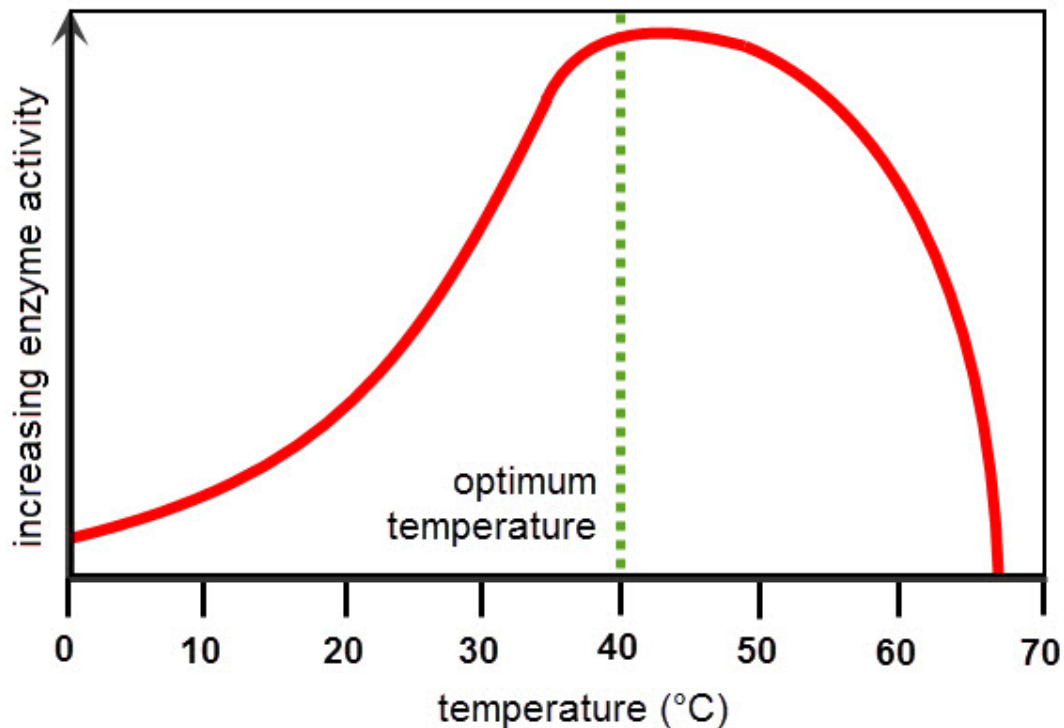
Vliv teploty na enzymatickou reakci



Enzymy mohou být stabilní mezi teplotou 0 až 100°C (termofilní bakterie mají např. velmi stabilní enzymy, které jsou aktivní i při 110°C). V lidském těle jsou enzymy konstruovány na teplotu okolo 37°C.

Enzymy jsou aktivní pouze v malém teplotním intervalu. Teplota, při které je enzym nejvíce aktivní - Teplotní optimim. To je umožněno ideální stabilitou proteinu a správnému uspořádání AMK v aktivním místě.

Vliv teploty na enzymatickou reakci



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Závislost reakce na teplotě je v oblasti teplotního optima definována **Arheniovou rovnicí**, která definuje závislost jakékoliv chemické reakce na teplotě. S rostoucí teplotou získávají molekuly (S i E) větší kinetickou energii a narůstá pravděpodobnost ideální srážky mezi S a E. Při nízkých teplotách je sice enzym stabilní a není ovlivněna struktura proteinu, ale počet srážek je omezený.

Při vyšších teplotách pak dochází k částečné nebo úplné denaturaci (rozpadu 3D struktury a tvorbě neuspořádaných proteinových klubek) a degradaci proteinu.

Vliv pH na enzymatickou reakci

pH optimum závisí na funkci a prostředí ve kterém se protein vyskytuje.

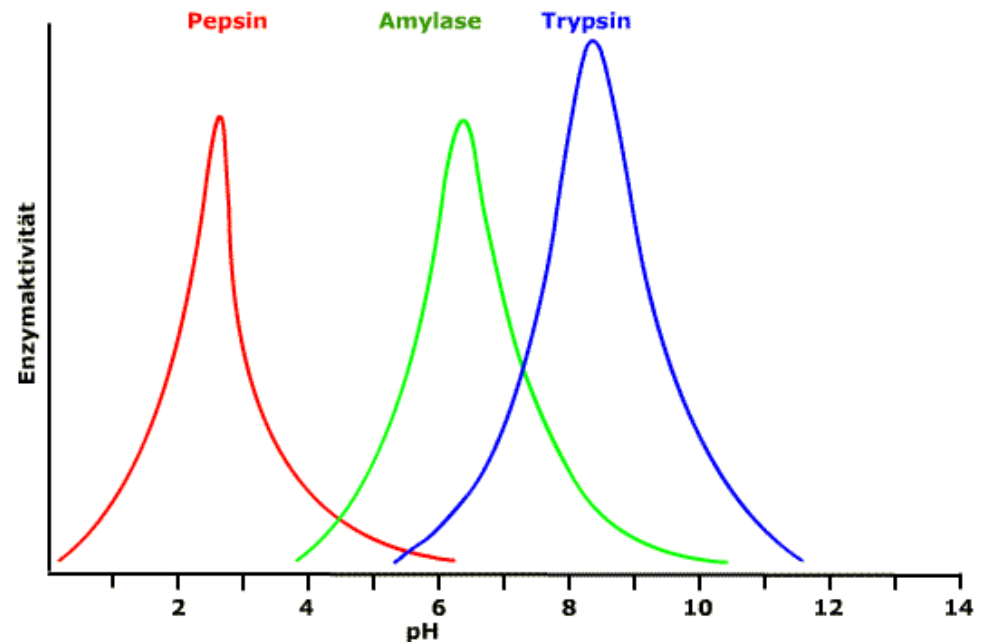
pH 7 - trypsin, enzymy v krvi

pH 2 - pepsin

pH 10 – Arginasa

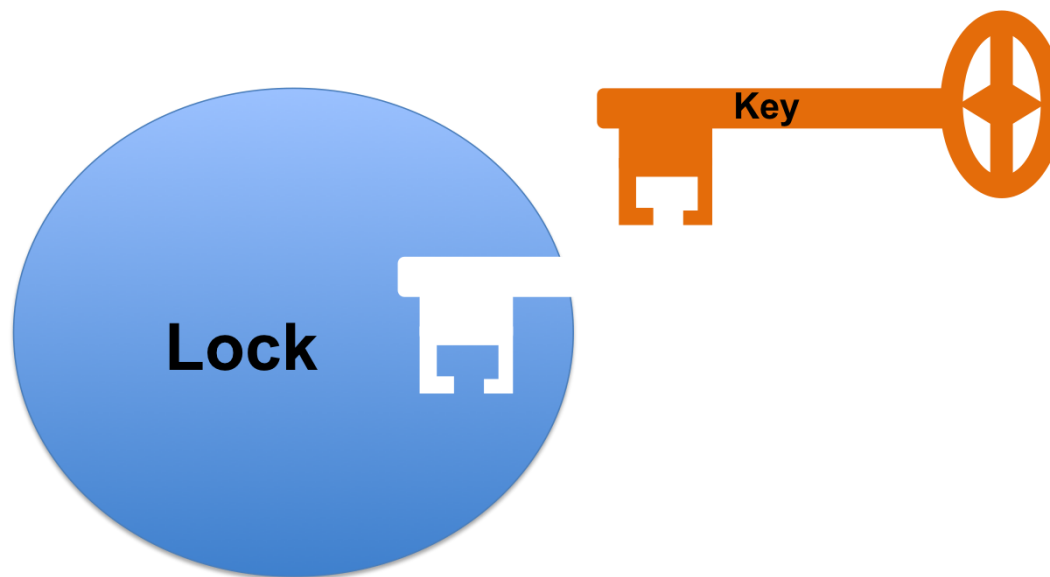
Záleží na AMK zbytcích v aktivním místě, protože katalytická aktivita enzymů se odvíjí od toho zda jsou AMK ionizované. Také dochází k narušení elektrochemické interakce mezi vazebným místem a substrátem.

Vysoké a nízké pH denaturuje proteinovou strukturu.



Enzymy

Ing. Livia Eiselleová, PhD.



Enzymy

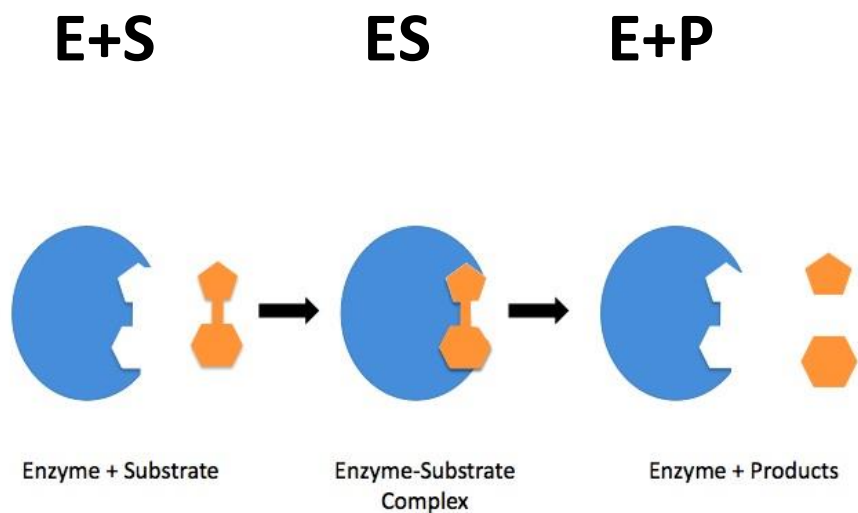
Proteiny (mohou být také RNA molekuly – např. ribosom), které slouží jako **biologické katalyzátory**

Substrát (**S**) - molekuly, které do reakce vstupují

Produkt (**P**) - molekuly, které vznikají katalyzovanou reakcí

Enzym (**E**)

Komplex enzymu se substrátem (**ES**)



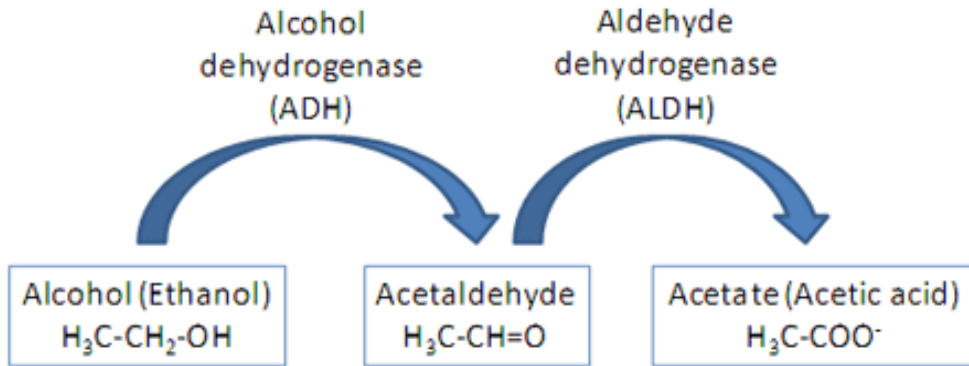
Na co slouží enzymy

- vyšší reakční rychlost (6- 12 řádů)
- mírnější podmínky reakce (nižší teplota, atmosférický tlak, neutrální pH)
- vyšší specifita reakce (specifické produkty, „nejsou“ vedlejší produkty)
- schopnost regulace (allosterická regulace, kovalentní modifikace, variabilita)

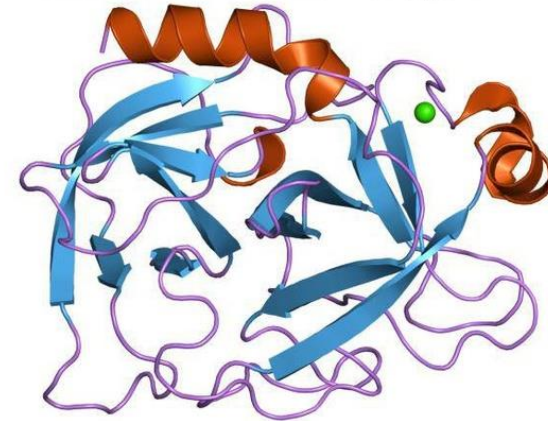
Mohou být:

- **homogenní** – reaktanty a katalyzátor jsou v systému přítomny ve stejné fázi
- **heterogenní** – nejčastěji je katalyzátor pevný a reaktanty jsou plynné

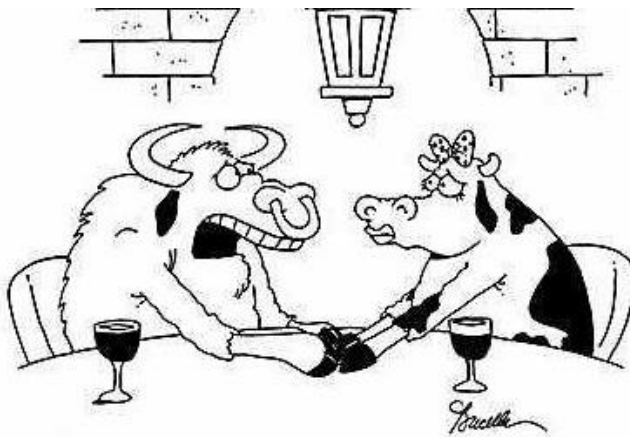
Jaké známe enzymy



Motherfucker must be trypsin

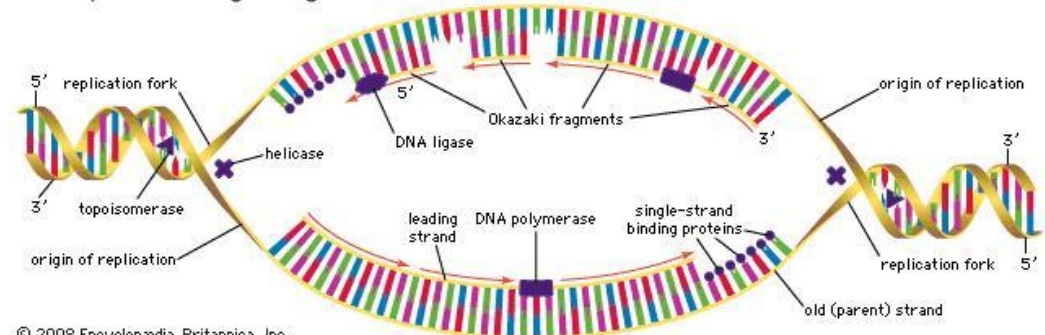


if it thinks it can hydrolyse that protein.



"It has nothing to do with you, Bessie. It's just that I'm lactose intolerant."

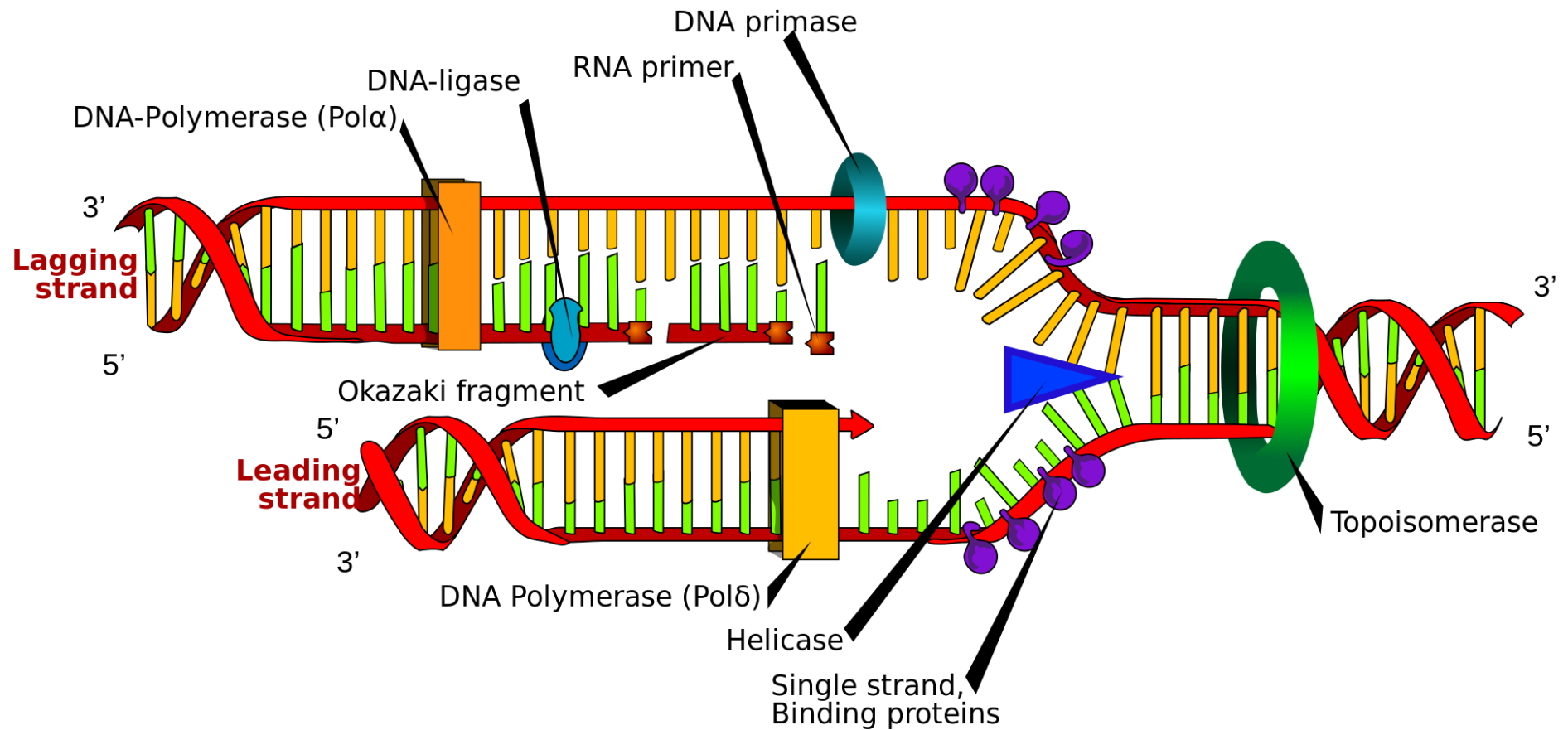
DNA replication in higher organisms



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

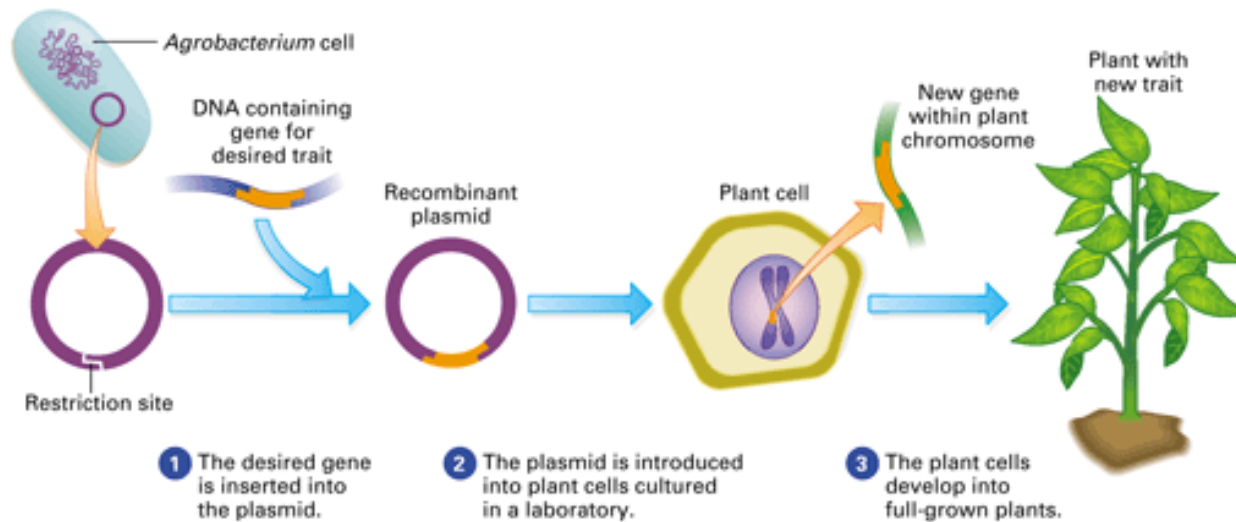
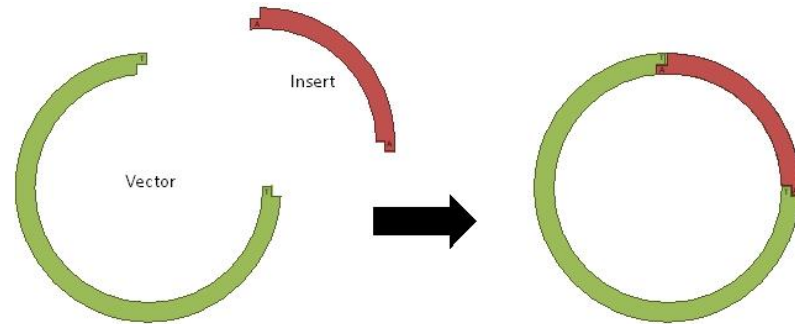
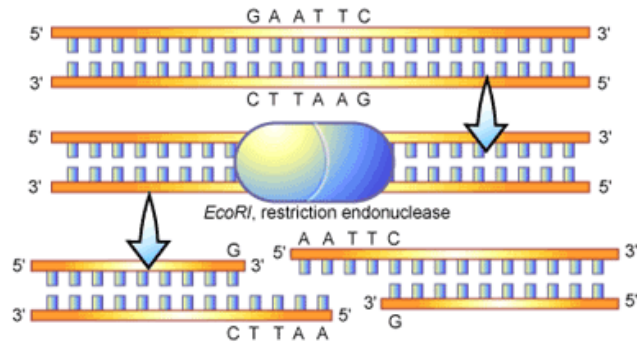
Replikační enzymy

- podílejí sa na replikaci DNA



Restrikční enzymy

- sekvenčně specifické endonukleázy



Enzym jako katalyzátor

Katalyzátor

- zvyšuje efektivitu chemické reakce
- z reakce vystupuje nezměněn
- v průběhu reakce vytváří energeticky méně stabilní molekuly – meziprodukty

Aktivační energie

- energie potřebná k průběhu reakce
- snížení aktivační energie umožňuje reakci za mírnějších podmínek (tzn. za nižší teploty, tlaku).

Enzymy snižují aktivační bariéru - díky vzniku meziproduktů

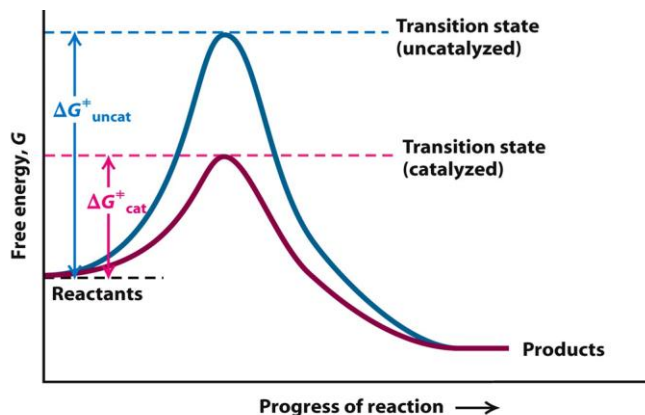
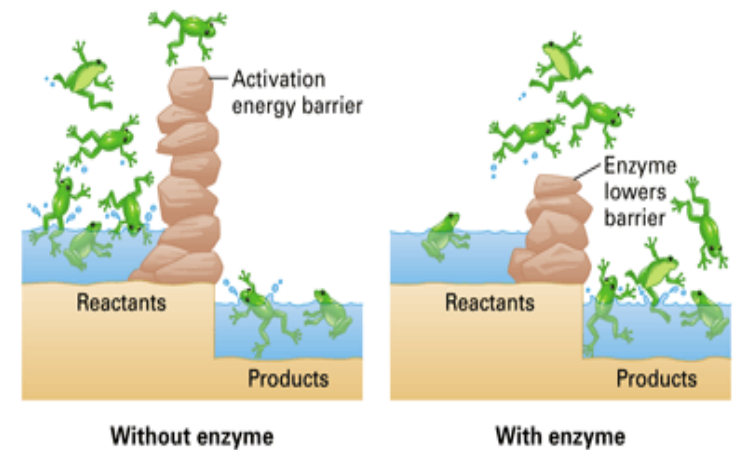
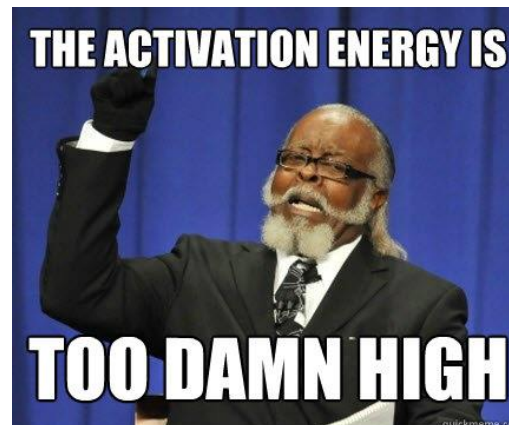
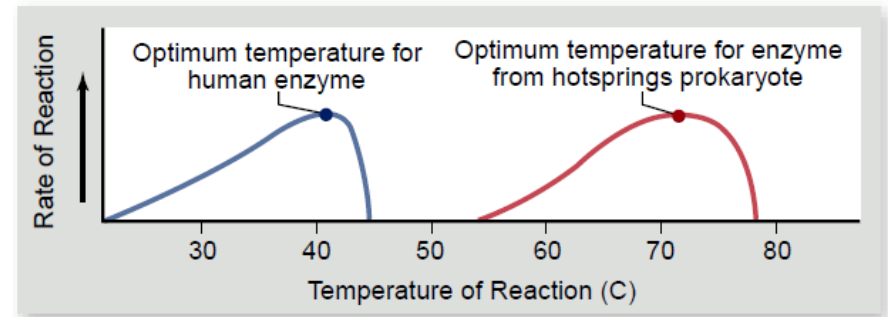


Figure 3-20
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

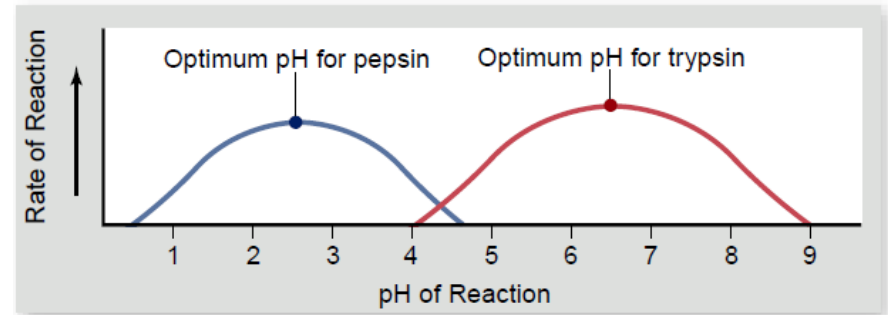


Enzymy se od chemických katalyzátorů liší

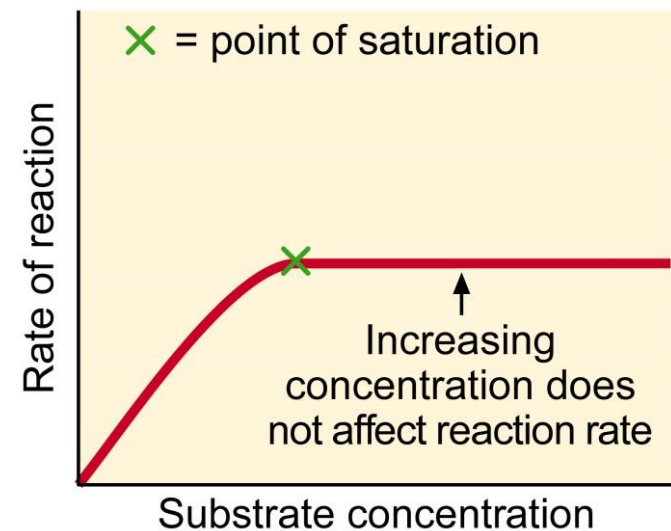
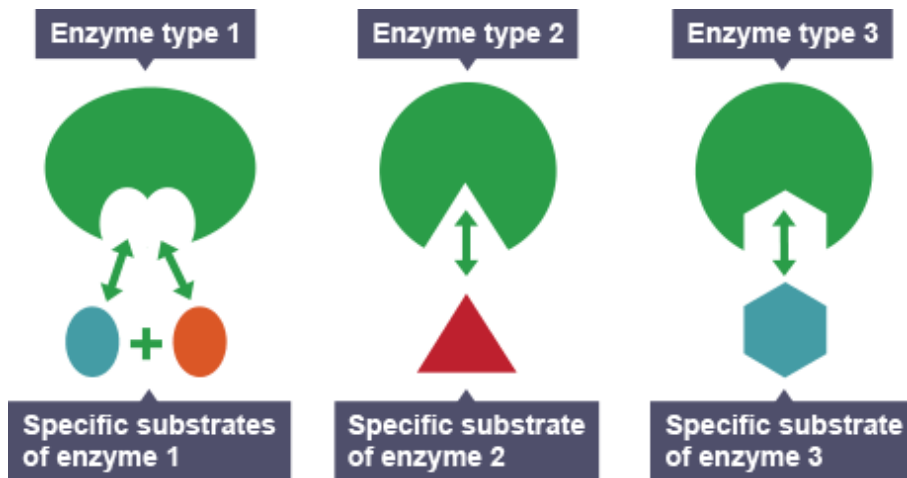
- **efektivita** (enzymatické reakce bývají mnohem účinnější než chemické)
- **podmínky** (pH, teplota)
- **vysoká specifita** (enzymy často rozeznávají pouze jednu specifickou molekulu)
- **nezávislost na množství produktu** (chemická katalýza je přímo závislá na množství substrátu)



a.



b.



Struktura enzymů

- **proteiny**, které se mohou nacházet samostatně nebo v **proteinových komplexech**
- pro specifitu enzymové reakce je klíčová jeho 3D struktura
- správné uspořádání aminokyselin je důležité pro funkčnost tzv. **aktivního místa**

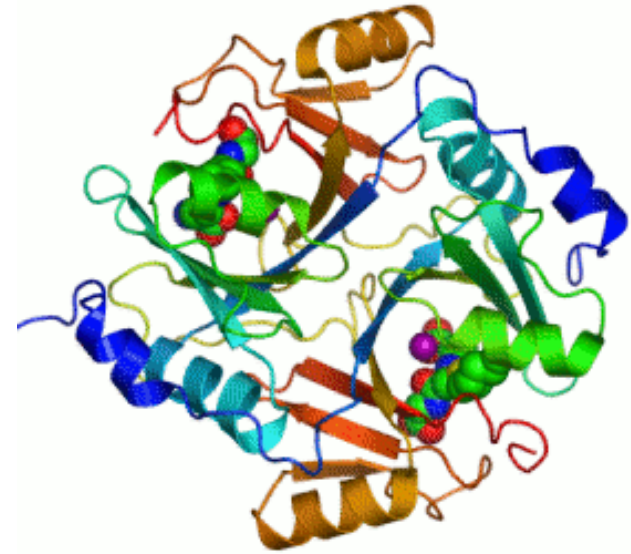
Aktivní místo:

Katalytické místo

- oblast skládající se z několika aminokyselin, ve které dochází ke katalytické reakci

Vazebné místo

- funguje jako přistávací dráha pro substrát
- prostorově substrát polohuje do správné pozice nutné pro katalýzu
- reguluje enzymovou aktivitu změnami afinity a polohování substrátu do katalytického místa



PROTEIN STRUCTURE

Scaffold to support and position active site

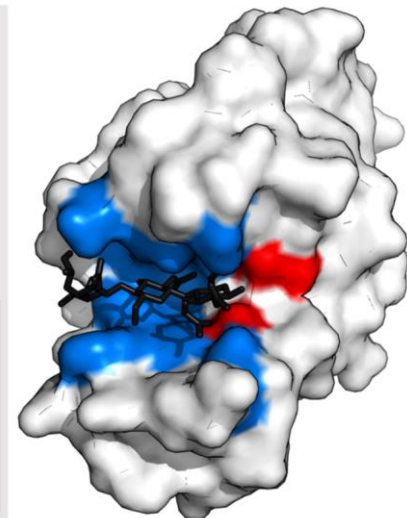
ACTIVE SITE

BINDING SITES

Bind and orient substrate(s)

CATALYTIC SITE

Reduce chemical activation energy



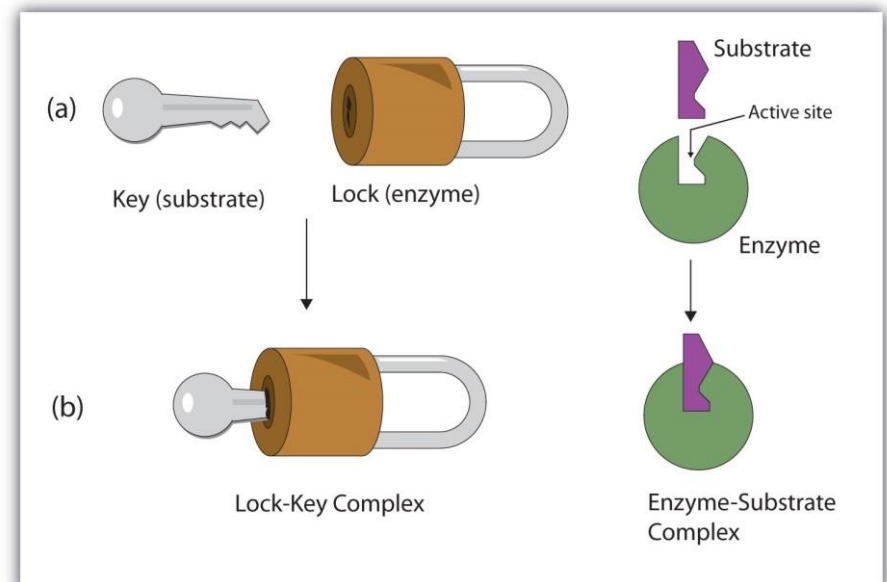
Vazba substrátu

- do aktivního místa (zajišťuje vazebné místo)
- vazebné místo navíc zajišťuje **specifitu enzymu**

Specifita je zachována díky:

- komplementárnímu tvaru vazebného místa a substrátu
- rozložení elektrochemického náboje
- hydrofobním nebo hydrofilním interakcím

Substrát a enzym musí být k sobě geometricky komplementární (**model zámku a klíče**)



Aktivní místo enzymu

Katalytická reakce může probíhat

a) stabilizací meziprojektu

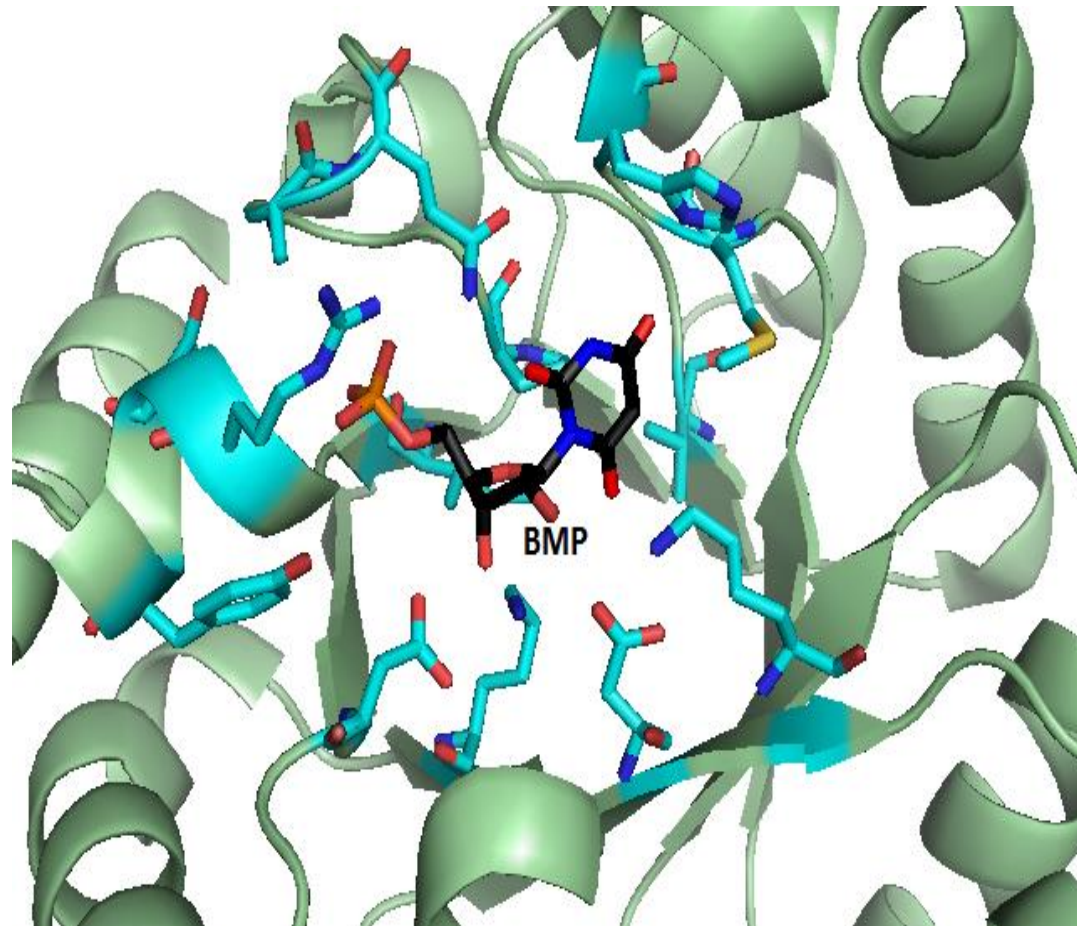
- v místě proteinu díky blízkým AMK zbytkům dochází k výměně náboje s meziprojektu (ve stejném prostředí by byl nestabilní)

b) dočasnou interakcí se substrátem

- enzym se stane příjemcem aktivní skupiny, umožňující snadnější přesun na jiné místo substrátu nebo jiný substrát

c) změna konformace molekuly

- změnou struktury molekuly dochází také ke snížení energie potřebné pro vznik produktu

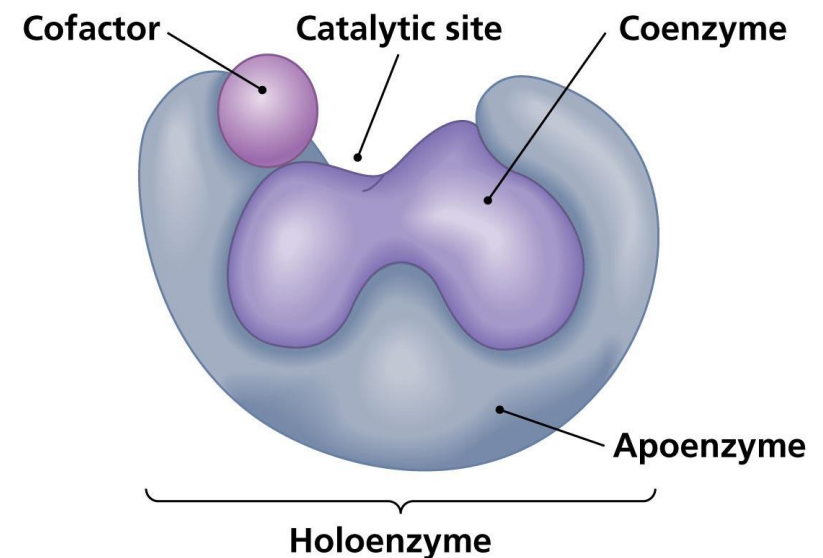
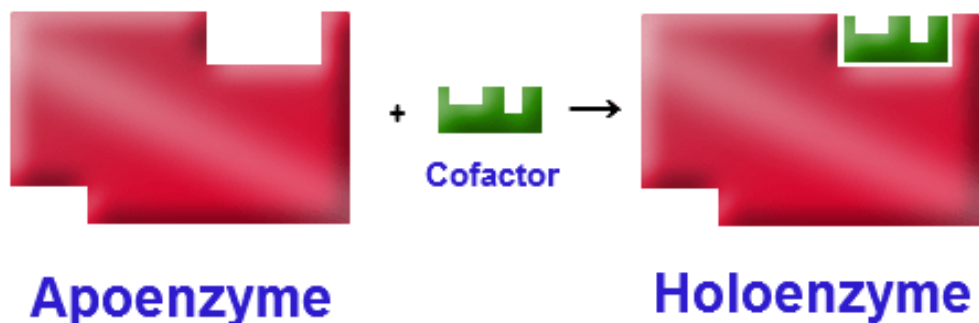


Enzymy - kofaktory

- katalytické reakce se neúčastí jenom zbytky aminokyselin, ale i jiné molekuly – **kofaktory** (např. vitamíny rozpustné v tucích, např. B1, B2, B6, B12, C atd.)
- pokud je kofaktor vázán kovalentní vazbou k enzymu - **prostetická skupina**
- pokud je vazba v katalytickém místě méně pevná jako v případě iontů kovů nebo organických molekul jedná se o **koenzym**

Holoenzym - katalyticky aktivní dvojice kofaktoru a enzymu

Apoenzym - enzym bez kofaktoru



Nazvosloví enzymů

- enzymy mají svoje specifické názvosloví
- název enzymu se skládá buďto z označení substrátu nebo z označení substrátu + typ dané katalytické reakce
- příponou názvu je – **asa**
- např. proteinasa, alkoholdehydrogenasa, laktátdehydrogenasa



Klasifikace enzymů

- podrobnější klasifikaci **IUBMB (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY)**
- **oxidoreduktasy** (katalysují intermolekulární oxidačně-redukční reakce, např. ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH + H⁺)
- **transferasy** (přenos chemických skupin z molekuly donoru na akceptor, např. ATP + glukosa → glukosa-6-fosfát + ADP)
- **hydrolasy** (štěpení vazeb vodou, např. sacharosa + H₂O → glukosa + fruktosa);
- **lyasy** (nejčastěji adice na dvojnou vazbu nebo eliminace za vzniku dvojné vazby, např. hydratace fumarátu v citrátovém cyklu -OOC-CH=CH-COO⁻ + H₂O → -OOC-CH(OH)-CH₂-COO⁻)
- **isomerasy** (isomerace, např. D-glukosa → D-fruktosa nebo L-alanin → D-alanin);
- **ligasy** (spojení dvou molekul, k němuž se dodává energii štěpením ATP nebo GTP, např. karboxylace pyruvátu na oxalacetát CH₃-CO-COO⁻ + CO₂ + ATP + H₂O → -OOC-CH₂-CO-COO⁻ + ADP + Pi)

např. **EC 1.1.1.1** znamená

(EC) - Enzyme commission

(1, hlavní třída) - oxidoreduktázy (v reakci dochází k výměně elektronů)

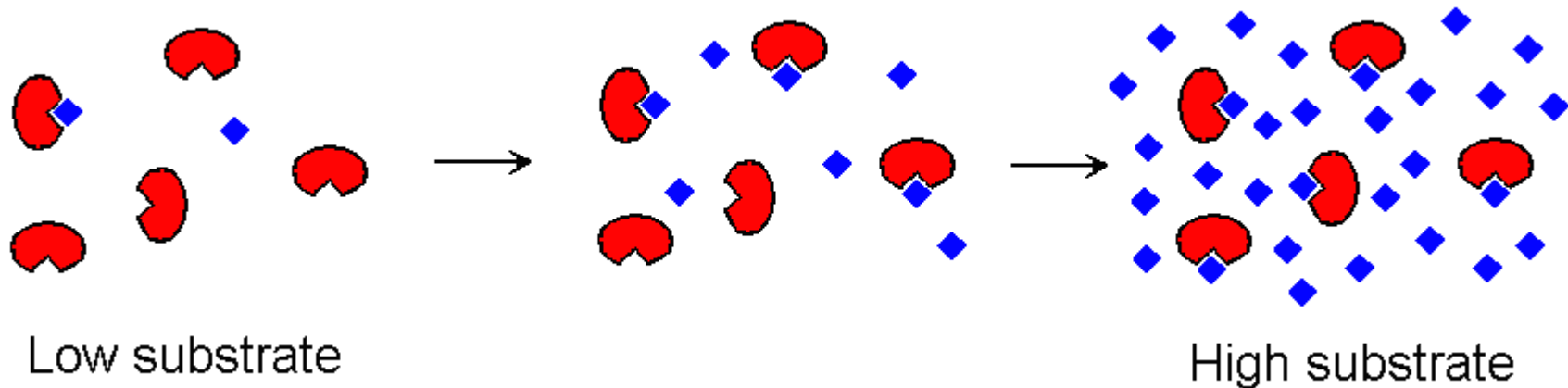
(1, podtřída) - reakce probíhá na C-OH skupině

(1, podskupina) - kofaktor - zde NAD nebo NADP

(1, pořadové číslo) - určuje již konkrétní enzym - alkoholdehydrogenazu

Kinetika enzymů

- studuje efektivitu a nejvhodnější podmínky pro enzymatickou reakci
- rychlost enzymatické reakce definována **rychlostí jakou se substrát váže na enzym a rychlostí jakou dochází k tvorbě produktu**



nízká koncentraci substrátu vůči enzymu

- reakce téměř přímo úměrná jeho koncentraci

vysoká koncentrace substrátu vůči enzymu

- aktivní místa enzymu jsou zaplněna a nedochází k vazbě s přebytečným substrátem
- celková rychlost reakce závislá na tom, jak rychle dokáže enzym zpracovat substrát na produkt

Kinetika enzymů - jednotky

Dříve se podle pravidel Mezinárodní biochemické unie (IUB) z r. 1961 užívalo pojmu **enzymová jednotka (U)** pro takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu **1 μmol substrátu za minutu za standardních podmínek**

Namísto toho byly zavedeny pojmy:

enzymová aktivita - rychlost přeměny substrátu

specifická aktivita - enzymová aktivita vztažená za specifických podmínek ke hmotnosti

molová aktivita - enzymová aktivita vztažená za specifických podmínek k množství enzymu vyjádřeno v molech

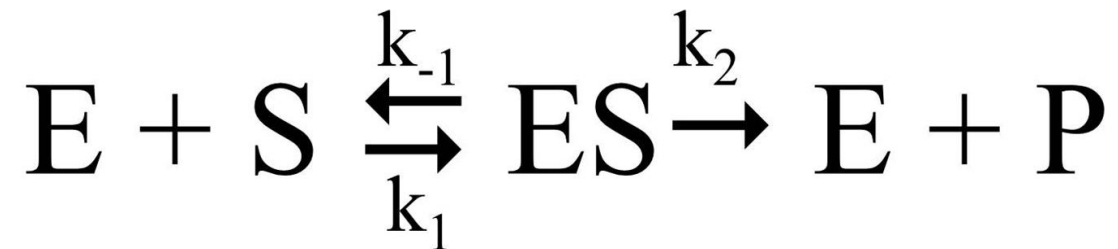
Převod dosavadních enzymových jednotek (U) na **kataly (kat)** se řídí vztahem:

$$1 \text{ U} = 1 \text{ μmol/min} = 1/60 \text{ μmol/s} = 1/60 \text{ μkat} = 16,67 \text{ nkat}$$

U nás byly zavedeny **kataly** do klinicko-biochemické laboratorní praxe povinně a výsledky laboratorních vyšetření jsou takto vyjadřovány v séru nejčastěji jako **μkat/l**.

Enzymová kinetika

- studium enzymatických reakcí: efektivita a nejvhodnější podmínky
- základní enzymatická reakce se dá vyjádřit touto rovnicí:



k_1, k_2 – rychlostní konstanty, popisují rychlost dané reakce

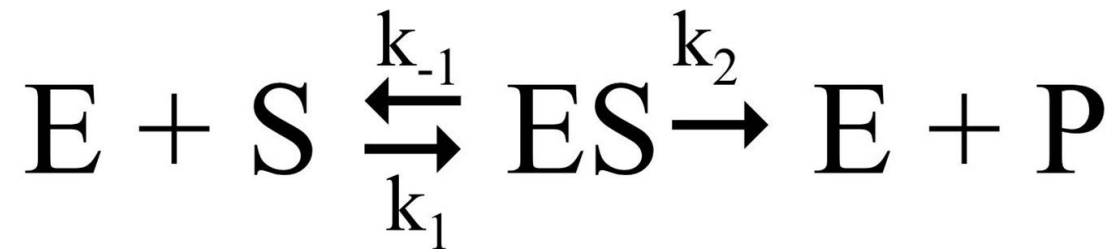
k_{-1} – rychlostní konstanta rozpadu komplexu ES

Rychlostní konstanta je rovna rychlosti reakce při jednotkových koncentracích látek

Za předpokladu, že žádný produkt neinteraguje zpětně s enzymem za vzniku ES, lze rychlost enzymatické reakce V ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) definovat jako:

$$V = k_2 [ES]$$

Enzymová kinetika



Problém je, že ES je neměřitelný.

Rychlost reakce se proto definuje podle koncentraci látek o kterých víme jejich koncentraci.

Rozdělíme si vznik ES do dvou rovnic:

a) vzniku produktu: **$[ES] = k_1 [E] [S]$**

b) rozpadu komplexu ES směrem k S nebo P: **$[ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$**

Za předpokladu, že je v reakci enzym plně nasycen – tzn. koncentrace ES je stále stejná:

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] \quad \text{a dále} \quad [ES] = \frac{[E][S]k_1}{k_{-1} + k_2}$$

Kinetika enzymů – Michaelisova konstanta

Koncentrace substrátu mezi nesaturovaným a saturovaným stavem enzymu je definována pomocí **Michaelisovy konstanty** K_M - **konstanta poloviční saturace**

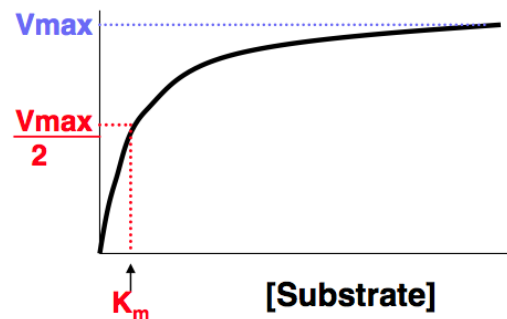
- rovná se koncentraci substrátu, při které došlo k polovičnímu nasycení enzymu substrátem
- reakční rychlost a je rovna polovině maximální rychlosti

Z rovnice enzymatické katalýzy lze K_M vyjádřit jako:



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

Po dosazení do předchozí rovnice dostáváme:



$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

Kinetika enzymů – odvození rovnic

Za předpokladu, že koncentrace E v reakci je mnohonásobně menší než S ($[E] \ll [S]$), je $[ES] + [S] \approx [S]$.

Koncentrace volného enzymu lze definovat jako rozdíl celkového enzymu a ES:

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

$$[ES] = \frac{([E_0] - [ES])[S]}{K_M}$$

Po dosazení do rovnice dostáváme:

$$[ES] = [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Po vyjádření [ES] dostáváme:

Víme už, že rychlost je definovaná jako: $V = k_2 [ES]$

$$V = k_2 [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

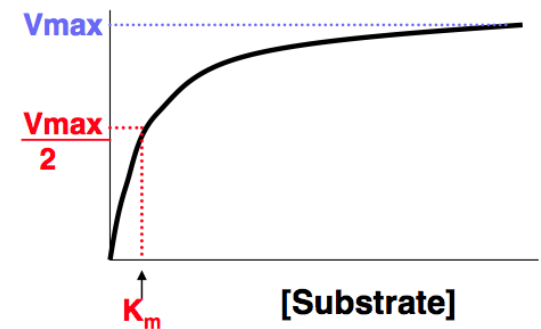
Po dosazení dostaneme:

Kinetika enzymů – odvození rovnic

- experimentálně sledovat momentální rychlost enzymatické reakce je těžké
- proto se sleduje rychlost maximální **V_{max}**
- **V_{max}** je definována rychlostí enzymatické reakce při plné saturaci enzymu (po ní je rychlost stabilní, lze ji pozorovat). Této rychlosti dosáhneme při **[S] >> K_M**. Pak **[S]/([S]+K_M) ≈ 1**

$$V = k_2 [E_0] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{předchozí rovnice:}$$

$$V_{\max} = k_2 [E_0]$$



Následně dostáváme finální rovnici, ve které lze rychlost enzymatické rovnice získat měřením pozorovatelných veličin: **rovnice Michaelis-Mentenové:**

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Rovnice Michaelis-Mentenové

- platí pro kinetiku enzymatické reakce s jedním substrátem (do katalytického místa vstupuje pouze jedna molekula, která interaguje s enzymem)

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

v_0 je počáteční rychlost enzymatické reakce

V_{\max} je limitní hodnota rychlosti při plném nasycení enzymu substrátem

$[S]$ koncentrace substrátu

K_M je Michaelisova konstanta

Pokud má enzym nízké K_M , znamená to, že může dosahovat maximální rychlosti při nízké koncentraci substrátu

Enzymy s K_M při $10^{-8} - 10^{-10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ – prakticky každý kontakt se substrátem vede k přeměně na produkt.

Rovnice Michaelis-Mentenové

Nezohledňuje další faktory, které v reakci mohou nastat:

- inhibice reakce produktem
- zvratná reakce v meziproduktu
- nepopisuje allosterické chování proteinů (tedy že konformační změna proteinu může ovlivnit enzymatickou aktivitu)
- kooperativní interakce

Navíc je platná za předpokladu, kdy:

- koncentrace ES se mění mnohem pomaleji než koncentrace P a S
- koncentrace enzymu se v čase nemění.

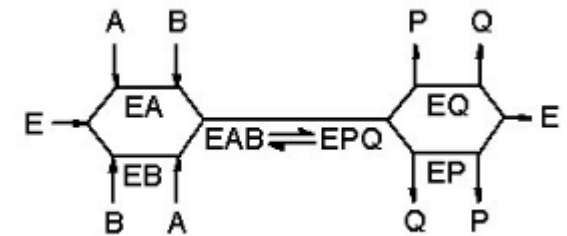


Multisubstrátové enzymatické reakce

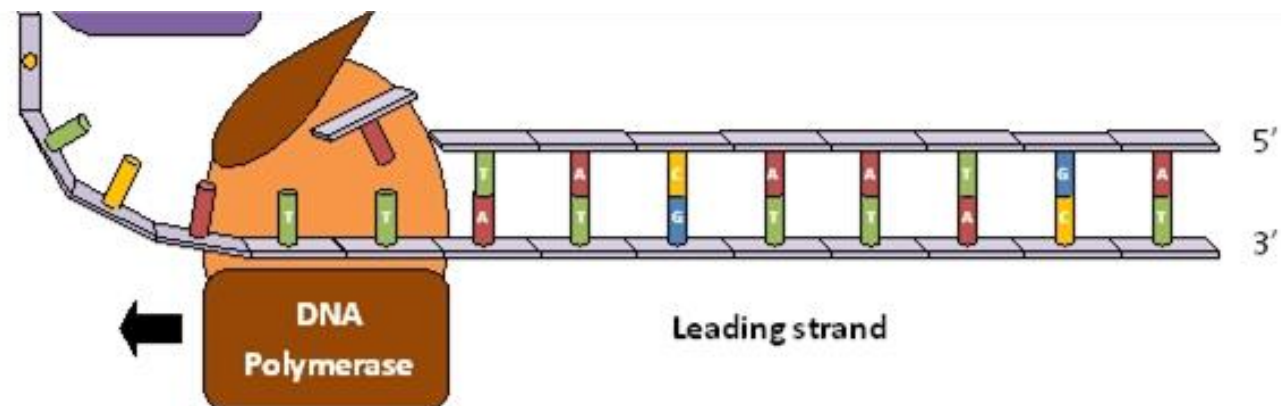
Kinetika v takových reakcích navíc sleduje v jakém pořadí dochází k vazbě S na E

Bi-Bi reakce

- oba substráty se vážou na enzym v jednom okamžiku a vytváří ternární EAB komplex
- může probíhat náhodným mechanismem - nezáleží na pořadí ve kterém se substráty navážou



Bi-Bi mechanismus využívá například DNA Polymeráza

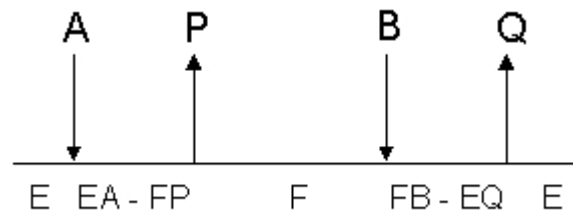


Multisubstrátové enzymatické reakce

Ping-Pong mechanismus enzymové reakce:

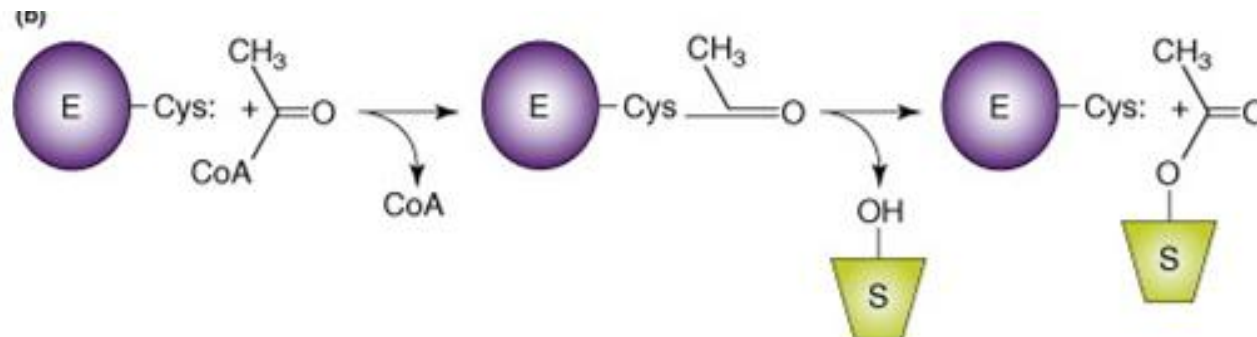
Enzym má dva stavy:

základní a intermediární (chemicky modifikován prvním substrátem)



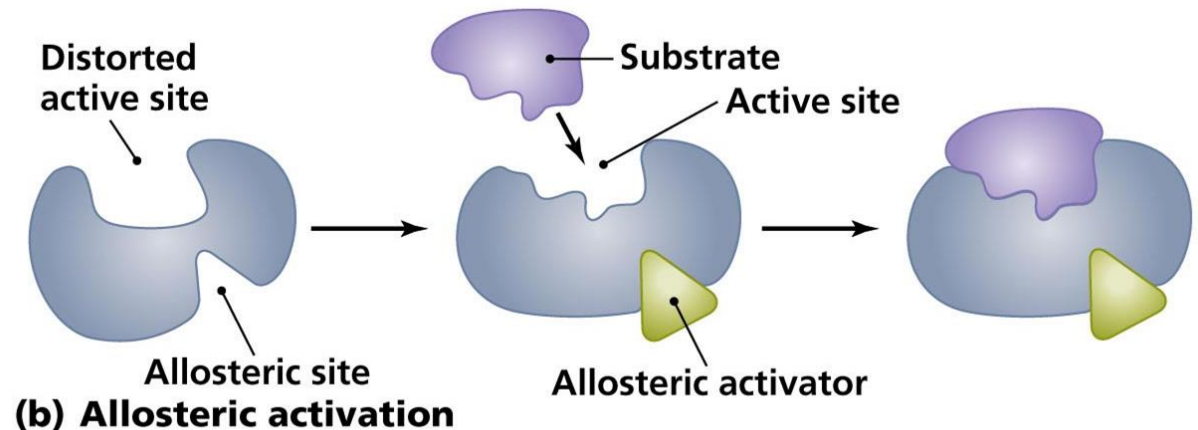
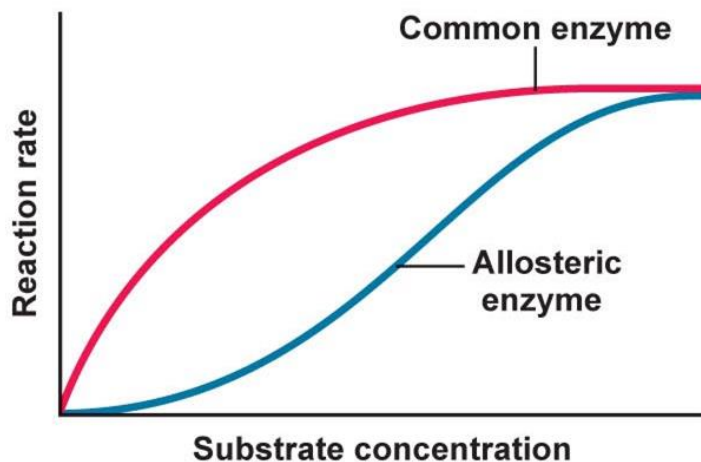
A - substrát umožňující přenos chemické skupina na enzym a po jejím vypuštění dochází k vazbě **B**, na který je chemické skupina z enzymu přenesena

Př. mohou být enzymy využívající kofaktory



Kinetika allosterických enzymů

- allosterický – charakterizovaný odlišným prostorovým sterickým uspořádáním
- dochází ke kooperativní vazbě substrátu
- kinetika rozdílná oproti Michaelis-Mentenové
- struktura allosterických enzymů může být pozměněna vazbou allosterických efektorů do allosterického místa (allosterické místo se nachází mimo aktivního místa)
- efektory mohou změnit konformaci vazebného nebo aktivního místa enzymu vedoucí jak k aktivaci tak inhibici enzymatických procesů



Inhibitory enzymů

Inhibitory - molekuly, které redukují nebo blokují enzymatickou aktivitu

Aktivátory - enzymatickou aktivitu zvyšují

Irreverzibilní inhibitory

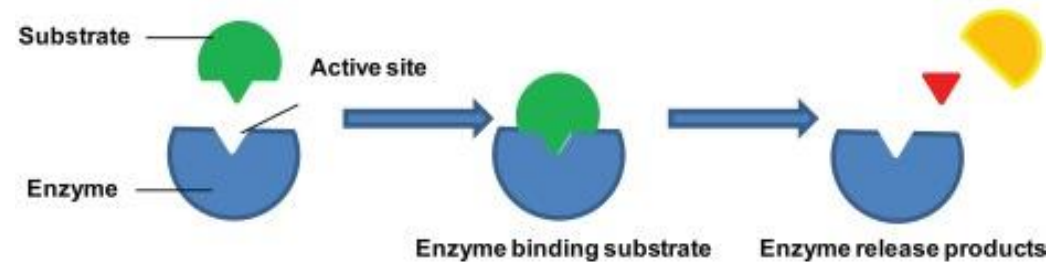
- vytváří kovalentní (pevnou) vazbu na inhibitor
- dochází k chemické modifikaci zbytků AMK potřebné pro enzymatickou aktivitu

Reverzibilní inhibitory

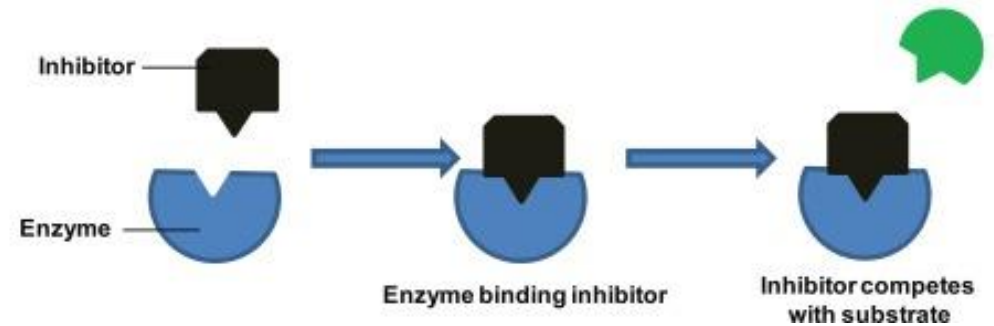
- vazba je nekovalentní (vodíkový můstek, hydrofobní interakce, iontová vazba)

V kinetice inhibiční reakce sledujeme primárně specificitu inhibitoru a také jeho účinnost.

(a) Reaction



(b) Inhibition



Inhibice enzymů

1) kompetitivní inhibitory

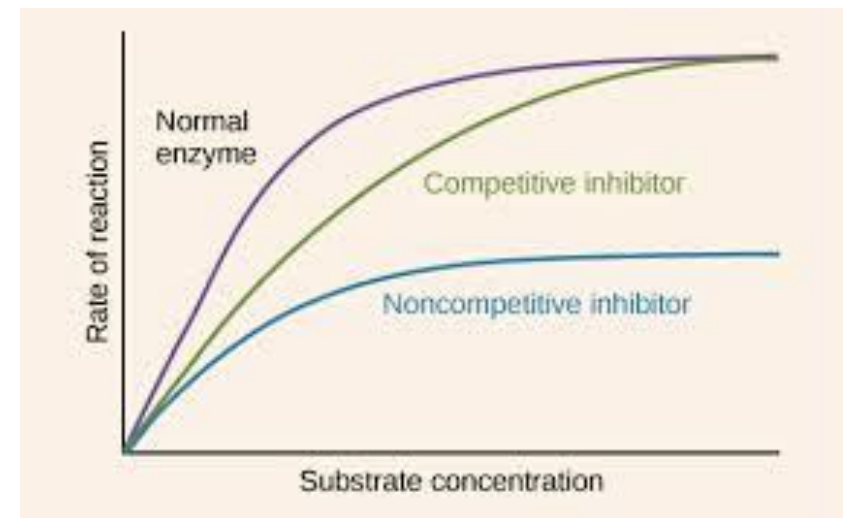
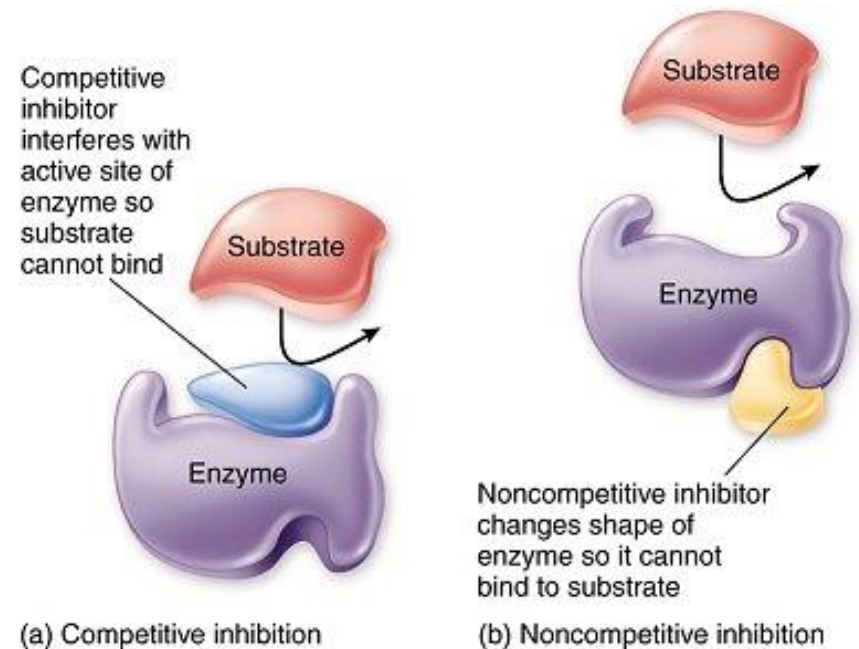
- strukturou podobné substrátu
- enzym nekatalyzuje přeměnu inhibitoru, inhibitor se pouze na enzym naváže
- váží se do vazebného místa substrátu
- zvýšením koncentrace substrátu lze inhibici potlačit
- K_m se v přítomnosti inhibitoru zdánlivě zvyšuje
- V_{max} se nemění

2) nekompetitivní inhibitory

- nebrání vazbě substrátu na enzym
- váží se mimo vazebné místo substrátu
- inhibici nelze potlačit zvýšením koncentrace substrátu, lze ji snížit pouze odstraněním inhibitoru dialýzou (inhibitor se neváže kovalentně)
- žádný z komplexů enzym-inhibitor (E-I ani E-I-S) není katalyticky aktivní @ snížení koncentrace aktivního enzymu → pokles V_{max}
- K_m se nemění

3) akompetitivní inhibitory

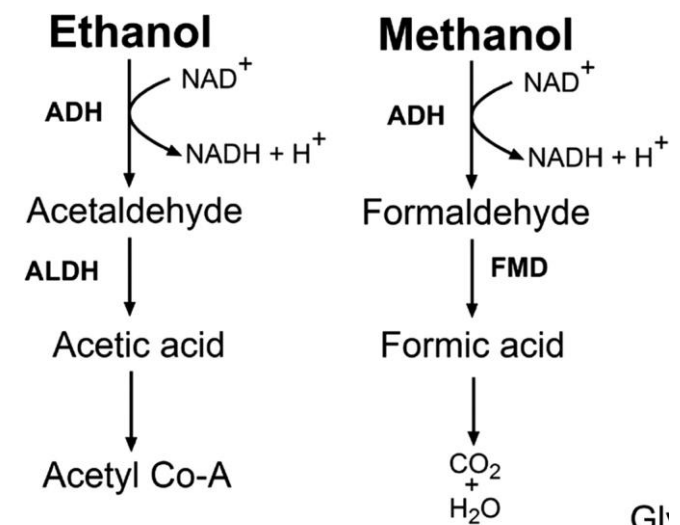
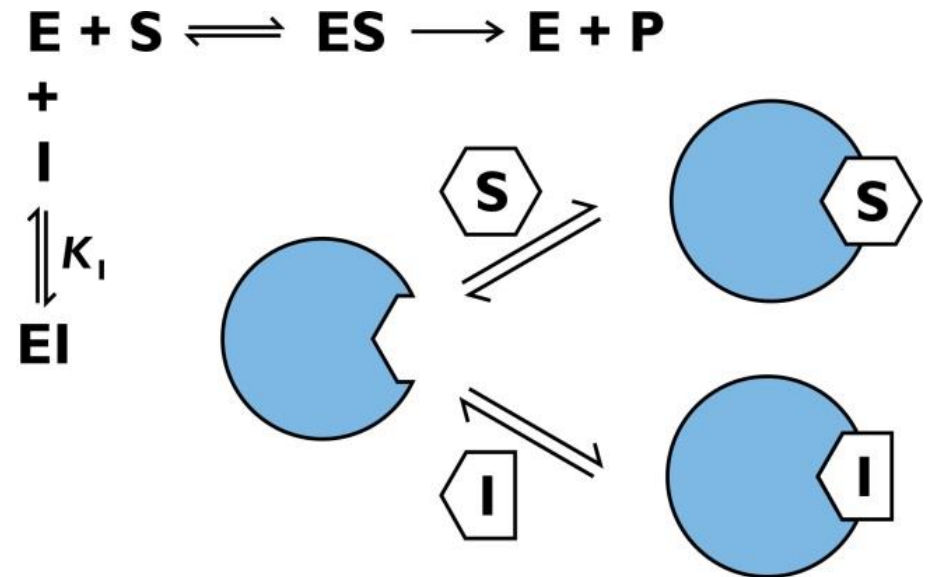
- váží se pouze na komplex enzym-substrát
- dochází ke zdánlivé změně K_m i V_{max}

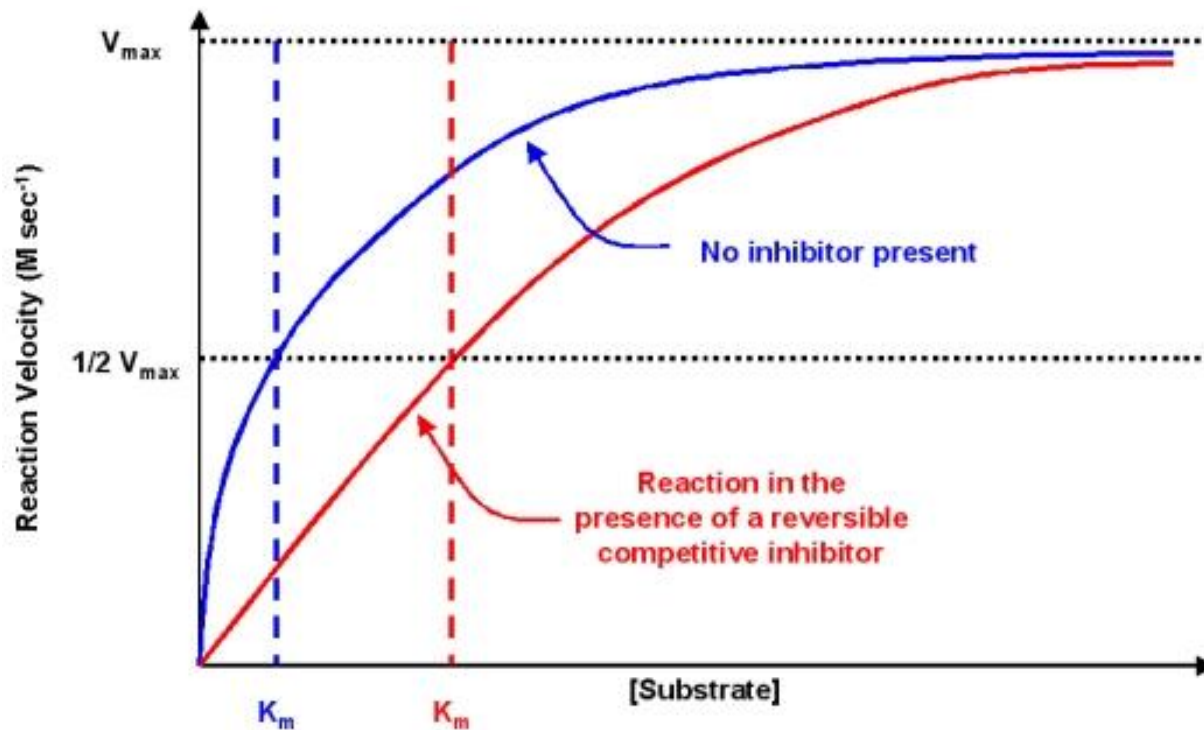


Reverzibilní enzymové inhibice

Kompetitivní reverzibilní inhibice

- **S** a **I** se mohou vázat na enzym ve stejném čase
- inhibitor je často strukturálně velmi podobný substrátu, ale nedochází u něj k enzymatické reakci
- **I** se tedy váže na vazebné (i aktivní) místo enzymu. O tyto místo **S** a **I** soupeří (kompetice)



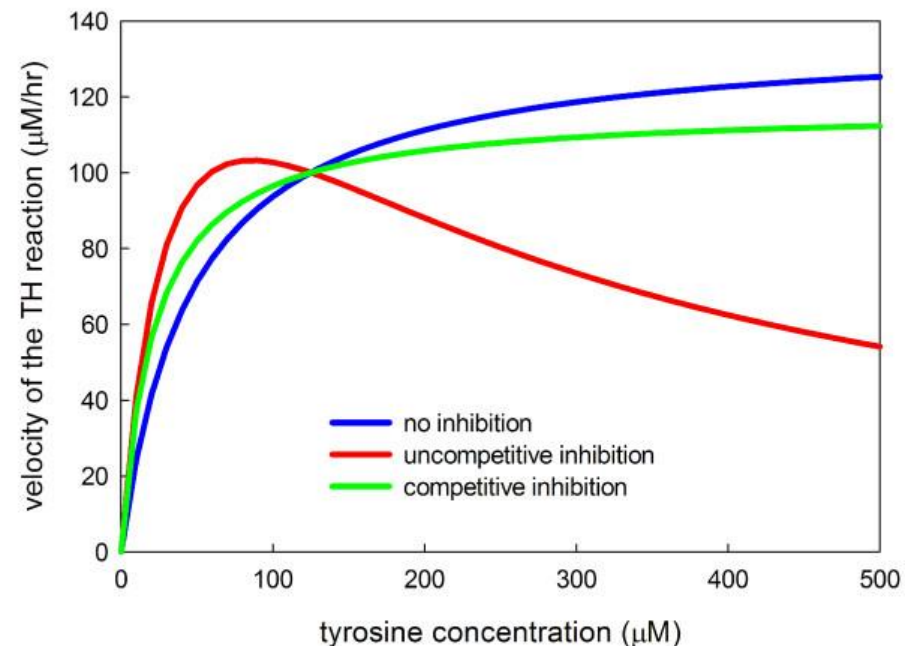
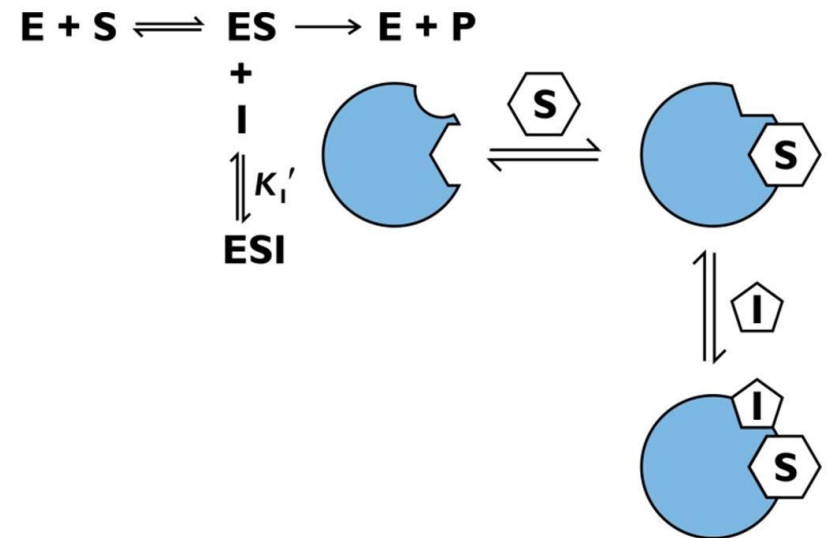


- pokud zvýšíme koncentraci S, bude docházet k častějším interakcím mezi E a S - inhibiční účinek bude potlačen
- dochází k zvýšení K_M (inhibitor obsazuje část molekul enzymu, pro vytvoření komplexu enzym-substrát je tedy k dispozici jen málo molekul volného enzymu – reakce je pomalá)
- V_{\max} se nemění

Reverzibilní enzymové inhibice

Akompetivní reverzibilní inhibice

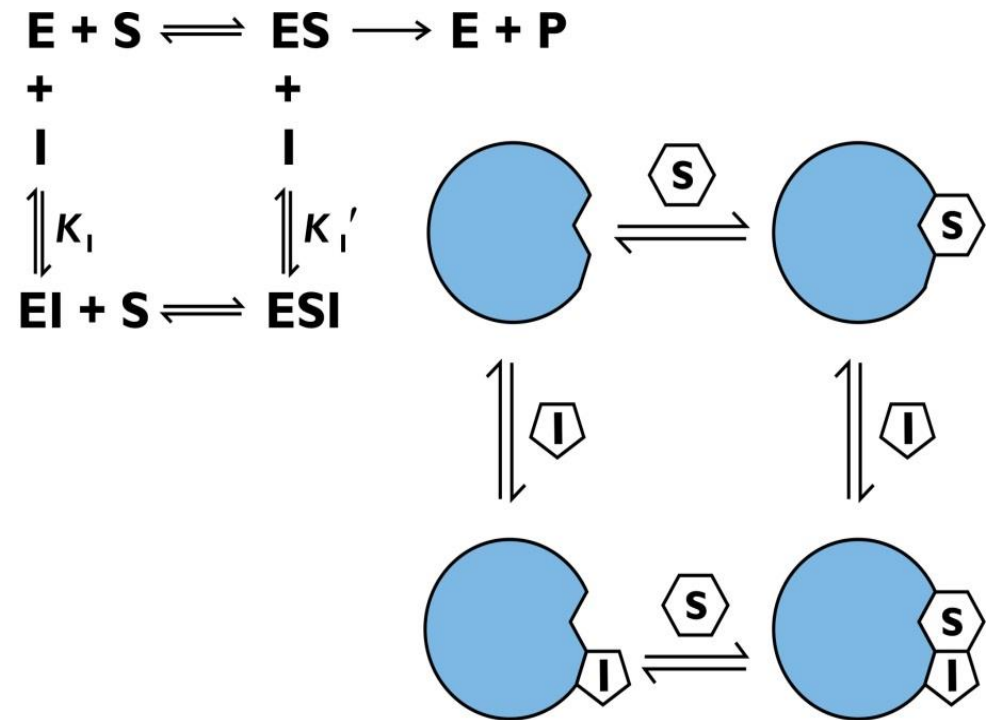
- inhibitor se může vázat na jiné místo enzymu (a to pouze v případě, kdy je substrát vázaný na enzym)
- po vazbě dochází k změně struktury enzymu vedoucí ke znemožnění enzymatické reakce
- inhibitor se váže pouze na ES
- pro inhibici tedy potřebuje přítomnost substrátu
- s rostoucí koncentrací substrátu vede k zvýšené inhibice enzymu
- dochází ke snížení V_{max} , tím se snižuje se také i K_M .



Reverzibilní enzymové inhibice

Smíšená reverzibilní inhibice

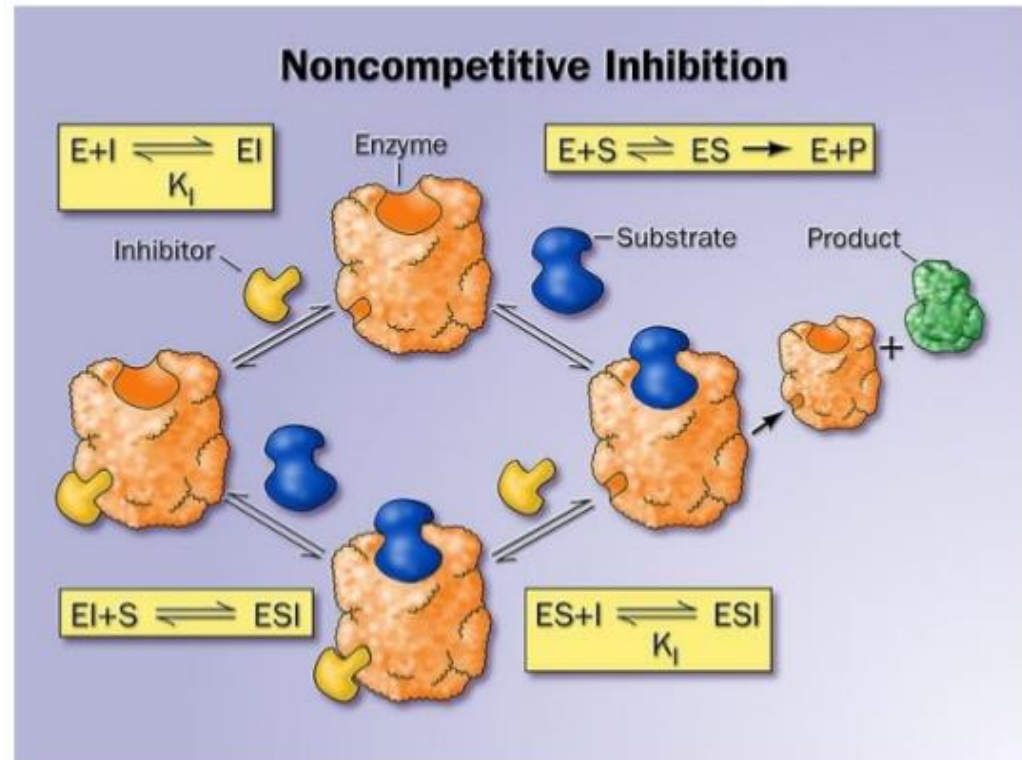
- inhibitor se váže na aktivní místo enzymu nezávisle na tom, zdali je aktivní místo prázdné nebo je S v komplexu s enzymem
- má větší afinitu k jednomu nebo druhému stav - mix kompetitivní a akompetitivní inhibice
- vazba inhibitoru ovlivňuje vazbu S (zvyšuje se K_M) a zároveň snižuje počet aktivních molekul enzymu (snížení V_{max})
- inhibiční efekt může být redukován, ale ne potlačen zvýšenou koncentrací S

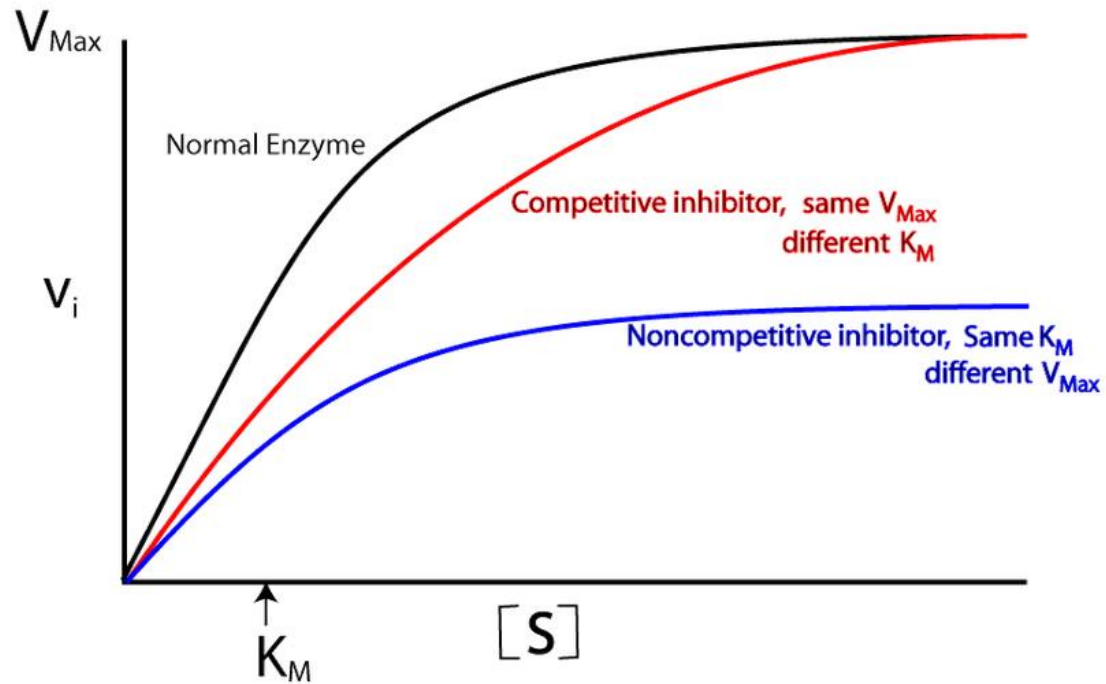


Reverzibilní enzymové inhibice

Nekompetitivní reverzibilní inhibice

- specifický případ smíšené enzymové inhibice
- inhibitor redukuje afinitu enzymu k substrátu, ale neovlivňuje jeho vazbu (S se tedy na enzym neváže)
- podobně jako u akompetitivní inhibice váže na jiné místo proteinu a vyvolává strukturální změny v aktivním místě enzymu.





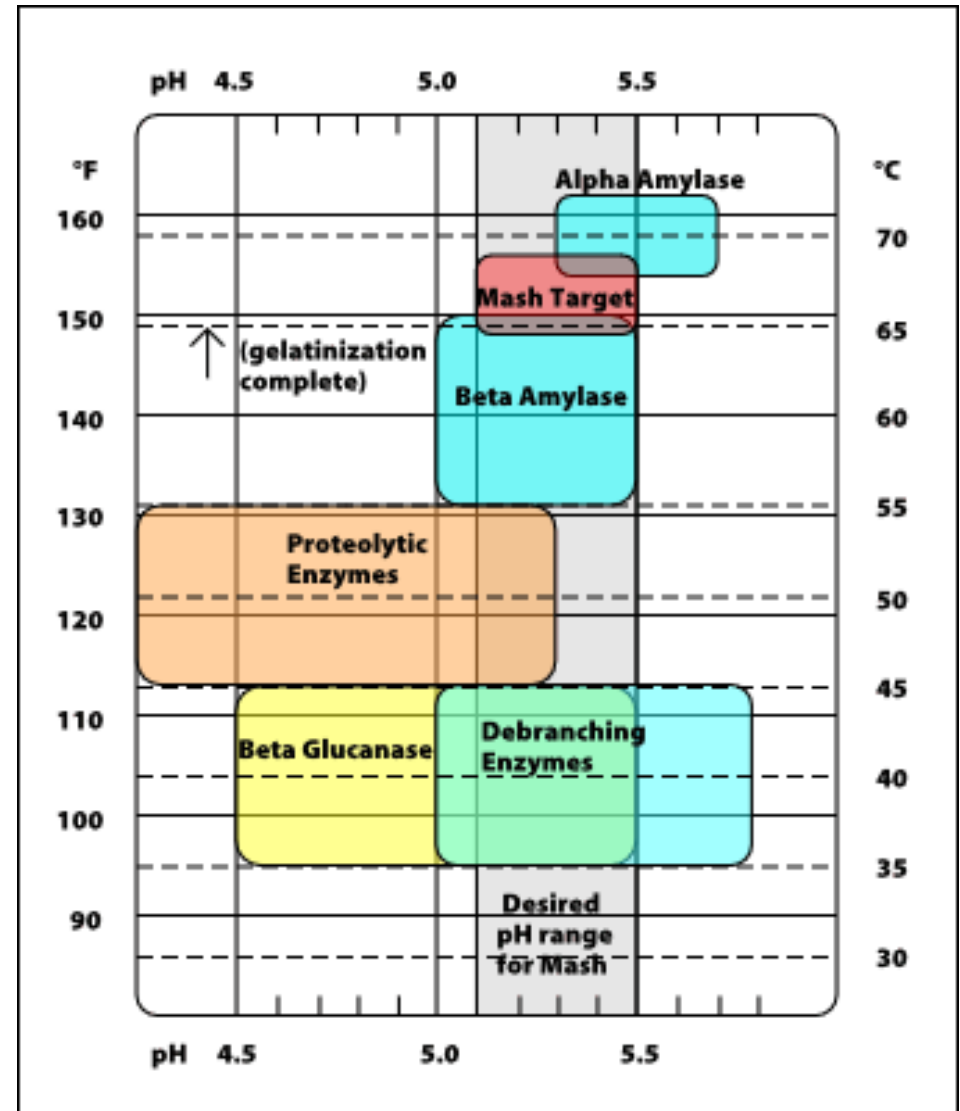
- inhibice je přímo závislá na koncentraci **I**, ne na koncentraci **S**
- když dojde k inhibici 50% enzymu, tak jak při nízké i vysoké koncentraci substrátu
- V_{max} klesá - aktivita enzymu už je redukována a vysoká koncentrace **S** na ni nemá efekt
- K_M zůstává stejná (mechanismus enzymatické reakce je stejný, ale s omezeným množstvím aktivních enzymů)

<u>Types Reversible Inhibition</u>	<u>Characteristics of the Inhibition</u>	<u>Effects of V_{max}</u>	<u>Effects on K_m</u>
Competitive	<ul style="list-style-type: none"> • Binds to the <u>ACTIVE SITE</u> • Shape of the inhibitor is similar to the shape of the active site • Increased substrate reverses inhibition 	<ul style="list-style-type: none"> • V_{max} is the <u>SAME</u> in the presence of the inhibitor • Reversed by an increase in [substrate] 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>INCREASES</u> the apparent K_m for the given substrate • More substrate is required to get half V_{max}
Non-Competitive	<ul style="list-style-type: none"> • Binds at <u>DIFFERENT SITES</u> on the enzyme NOT the active site • Binds to either free enzymes or enzyme-substrate complex • Inhibition is not reversed with substrate 	<ul style="list-style-type: none"> • V_{max} is apparently <u>DECREASES</u> in the presence of the inhibitor 	<ul style="list-style-type: none"> • K_m is the <u>SAME</u> in the presences or absences of the inhibitor
Uncompetitive	<ul style="list-style-type: none"> • <u>ONLY</u> binds to the <u>enzyme-substrate complex</u> away from the active site. • Not with free enzymes 	<ul style="list-style-type: none"> • V_{max} is apparently <u>DECREASE</u> to the <u>SAME</u> value as K_m 	<ul style="list-style-type: none"> • K_m is apparently <u>DECREASE</u> to the <u>SAME</u> value as V_{max}
Mixed Inhibition	<ul style="list-style-type: none"> • Binds at a <u>SEPARATE SITE</u> from the active site • Either free enzymes or enzyme-substrate complex 	<ul style="list-style-type: none"> • V_{max} <u>ALWAYS DECREASES</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • K_m <u>MAYBE increased OR decreased</u>

Type of inhibition	V_{\max}^{app}	$V_{\max}^{\text{app}} / K_{\text{M}}^{\text{app}}$	$K_{\text{M}}^{\text{app}}$
competitive	V_{\max}	$\frac{V_{\max} / K_{\text{M}}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{i}}}\right)}$	$K_{\text{M}} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{i}}}\right)$
mixed	$V_{\max} / \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{iu}}}\right)$	$\frac{V_{\max} / K_{\text{M}}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{i}}}\right)}$	$K_{\text{M}} \left\{ \frac{1 + ([\text{I}] / K_{\text{i}})}{1 + ([\text{I}] / K_{\text{iu}})} \right\}$
noncompetitive	$V_{\max} / \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{i}}}\right)$	$\frac{V_{\max} / K_{\text{M}}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{i}}}\right)}$	K_{M}
uncompetitive	$V_{\max} / \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{iu}}}\right)$	V_{\max} / K_{M}	$K_{\text{M}} / \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{\text{iu}}}\right)$

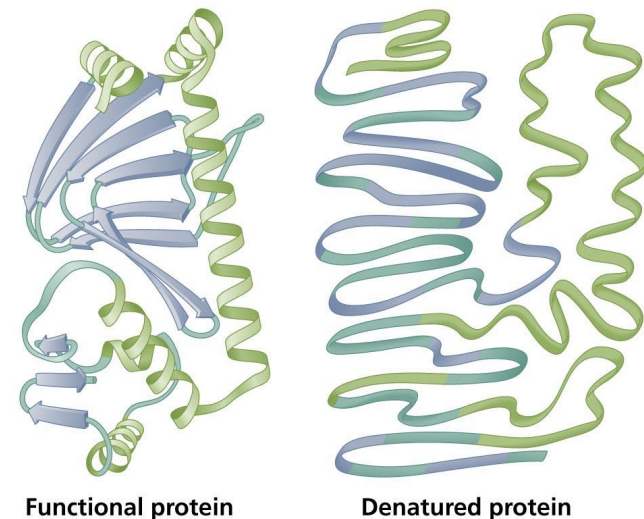
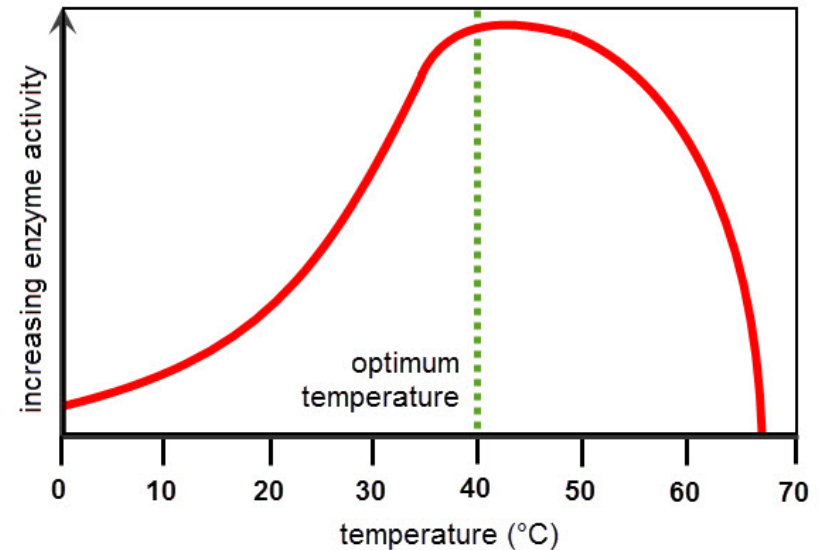
Vliv teploty na enzymatickou reakci

- enzymy mohou být stabilní mezi teplotou 0 až 100°C
- termofilní bakterie mají např. velmi stabilní enzymy, které jsou aktivní i při 110°C
- v lidském těle jsou enzymy konstruovány na teplotu okolo 37°C
- aktivní pouze v malém teplotním intervalu
- teplota, při kterém je enzym nejvíce aktivní - **teplotní optimum**



Vliv teploty na enzymatickou reakci

- závislost reakce na teplotě je v oblasti teplotního optima definováno **Arheniovou rovnicí**
- s rostoucí teplotou získávají molekuly (S i E) větší kinetickou energii a narůstá pravděpodobnost ideální srážky mezi S a E
- při nízkých teplotách je sice enzym stabilní a není ovlivněna struktura proteinu, ale počet srážek je omezený
- při vyšších teplotách pak dochází k částečné nebo úplné denaturaci (rozpadu 3D struktury a tvorbě neuspořádaných proteinových klubek) a degradaci proteinu



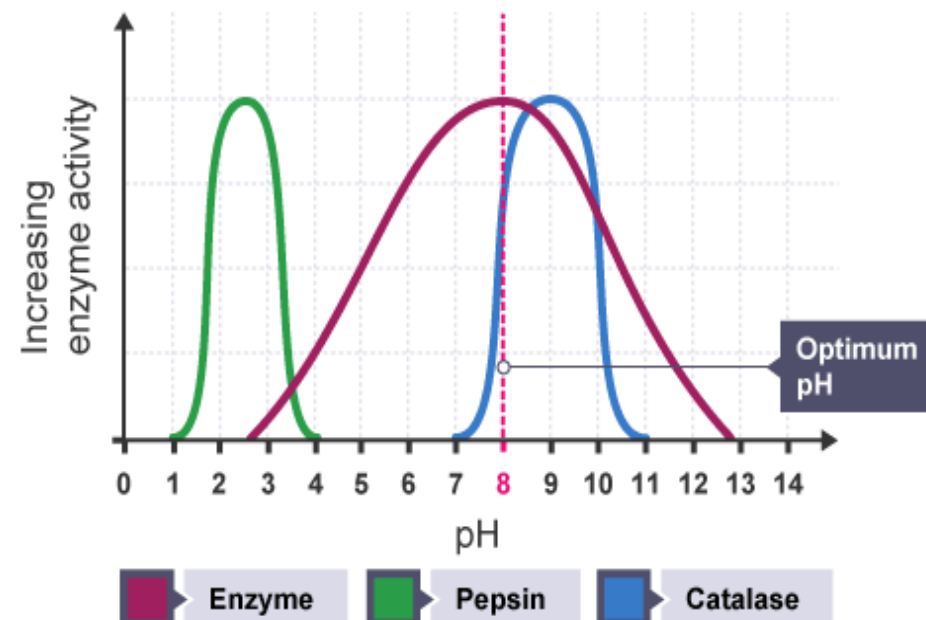
Vliv pH na enzymatickou reakci

- pH optimum závisí na funkci a prostředí, ve kterém se protein vyskytuje
- záleží na AMK zbytcích v aktivním místě
- katalytická aktivita enzymů se odvíjí od toho zda jsou AMK ionizované
- vysoké a nízké pH denaturuje proteinovou strukturu

pH 7 – trypsin, enzymy v krvi

pH 2 – pepsin

pH 10 - arginasa



Děkuji za pozornost

Lívia Eiselleová

eiselle@med.muni.cz