

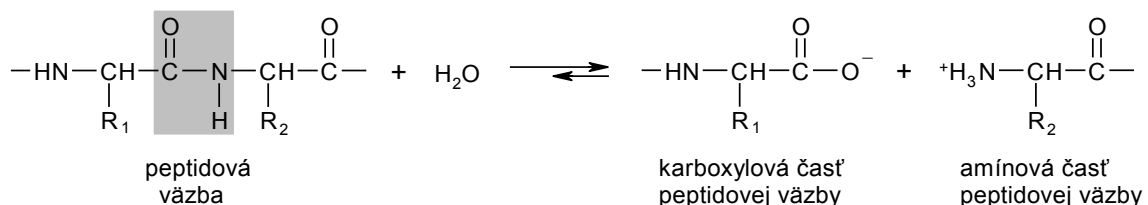
4 ENZÝMY

Enzýmy (z gréckeho *enzymon* = v droždí), katalyzátory v biologických systémoch, sú pozoruhodné molekulové prístroje, ktoré určujú charakter chemickej reakcie. Enzýmy sa tiež podieľajú na transformácii rôznych foriem energie. Najzaujímavejšími charakteristikami enzýmov sú ich **katalytická sila (efektivita)** a **špecificita**. Pôsobenie mnohých enzýmov je regulované. Väčšina známych enzýmov sú proteíny. Objav katalyticky aktívnych RNA molekúl však poukazuje na to, že proteíny nemajú absolútny monopol v katalýze.

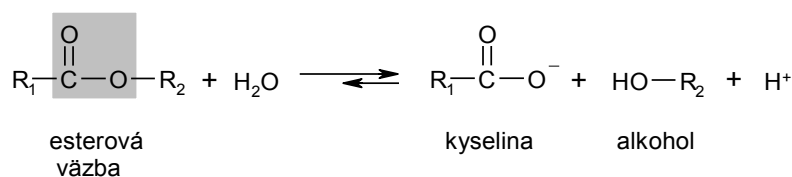
Proteíny ako trieda makromolekúl sú veľmi efektívne pri katalýze rôznych chemických reakcií, pretože sú schopné špecificky viazať veľmi rôzne molekuly. Využitím celého repertoára intermolekulových síl, enzýmy prinášajú substráty do optimálnej vzdialenosti a orientácie, umožňujúc tak efektívnu prestavbu chemických väzieb za vzniku produktov katalyzovanej reakcie. V podstate, enzýmy katalyzujú reakcie tak, že **stabilizujú prechodný stav substrátu**, t.j. stav s najvyššou energiou. Týmto spôsobom vlastne selektívne určujú, ktorá chemická reakcia prebehne.

Enzýmy urýchľujú reakcie minimálne miliónkrát. Bez ich prítomnosti by väčšina reakcií v biologických systémoch nemohla prebiehať, resp. by prebiehala veľmi pomaly. Dokonca aj taká jednoduchá reakcia, akou je hydratácia oxidu uhličitého, je katalyzovaná enzýmom **karboanhydrázou**. Prenos CO₂ z tkanív do krvi a následne do alveolárneho vzduchu by bol menej efektívny bez prítomnosti tohto enzýmu. V skutočnosti, karboanhydráza je jedným z najrýchlejších enzýmov, ktoré poznáme. Každá molekula enzýmu hydratuje 10⁵ molekúl CO₂ za sekundu. Rýchlosť katalyzovanej reakcie je 10⁷-krát vyššia ako nekatalyzovanej.

Enzýmy sú vysoko špecializované čo sa týka reakcie, ktorú katalyzujú, a výberu reaktantov, s ktorými interagujú (**tabuľka 4.1**). Reaktanty sa nazývajú **substráty**. Enzýmy zvyčajne katalyzujú jedinú chemickú reakciu alebo niekoľko veľmi podobných reakcií. Paralelné reakcie, ktoré by viedli k tvorbe podobných, ale nežiaducich produktov, sa pri enzymatických reakciách vyskytujú zriedkavo, na rozdiel od nekatalyzovaných reakcií. Stupeň špecificity voči substrátu je zvyčajne veľmi vysoký, až absolútny (výnimku tvoria tzv. "**moonlighting**" alebo "**námesačné**" proteíny). Ako príklad špecificity uvádzame **proteolytické enzýmy - proteázy**. Tieto enzýmy katalyzujú hydrolýzu peptidovej väzby:

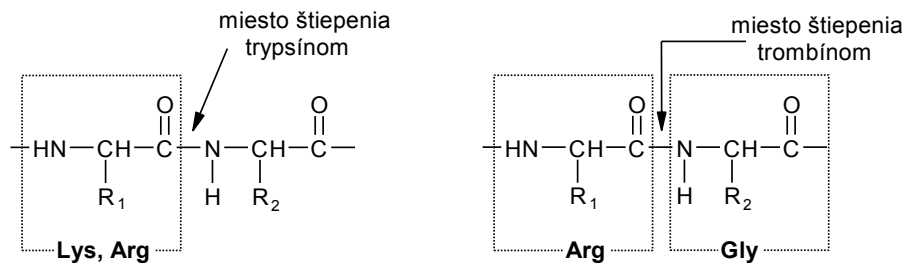


Väčšina proteolytických enzýmov taktiež katalyzuje inú, avšak podobnú reakciu – hydrolýzu esterovej väzby:



TABUĽKA 4.1 Klasifikácia enzýmov. Pri každej triede sú uvedené tri príklady enzýmov spolu s reakciou, ktorú daný enzým katalyzuje.	
1 Oxidoreduktázy	<ul style="list-style-type: none"> - katalyzujú intermolekulové oxidačno-redukčné premeny - oxidoredukčné deje realizujú buď prenosom atómov vodíka (transhydrogenázy) alebo elektrónov (transelektronázy), príp. zabudovaním atómu kyslíka do substrátu (oxygenázy) - majú povahu zložených bielkovín
1.1.1.1 <i>alkoholdehydrogenáza</i> 1.1.3.4 <i>glukózaoxidáza</i> 1.11.1.6 <i>kataláza</i>	$\text{etanol} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetaldehyd} + \text{NADH}$ $\beta\text{-D-glukóza} + \text{O}_2 \rightarrow \text{D-glukono-}\delta\text{-laktón} + \text{H}_2\text{O}_2$ $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
2 Transferázy	<ul style="list-style-type: none"> - realizujú prenos skupín ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, glukózový zvyšok, atď.) v aktivovanej forme z ich donoru na akceptor - patria medzi zložené bielkoviny - zúčastňujú sa mnohých biosyntetických dejov
2.3.1.9 <i>acetyl-CoA-acetyltransferáza</i> 2.7.1.1 <i>hexokináza</i> 2.7.7.6 <i>RNA-polymeráza</i>	$2 \text{acetyl-CoA} \rightarrow \text{CoA} + \text{acetoacetyl-CoA}$ $\text{ATP} + \text{D-hexóza} \rightarrow \text{ADP} + \text{D-hexóza-6-fosfát}$ $m \text{nukleozidtrifosfát} + \text{RNA}_n \rightarrow \text{RNA}_{n+m} + m\text{PP}_i$
3 Hydrolázy	<ul style="list-style-type: none"> - hydrolyticky štiepia väzby, ktoré vznikli kondenzáciou, napr. peptidové, glykozidové, esterové - majú povahu jednoduchých bielkovín
3.1.3.9 <i>glukóza-6-fosfatáza</i> 3.4.17.1 <i>karboxypeptidáza A</i> 3.6.1.3 <i>adenozíntrifosfatáza</i>	$\text{D-glukóza-6-fosfát} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D-glukóza} + \text{monofosfát}$ $\text{peptidyl-L-aminokyselina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{peptid} + \text{L-aminokyselina}$ $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$
4 Lyázy	<ul style="list-style-type: none"> - katalyzujú nehydrolytické štiepenie a vznik (pokiaľ nie je energeticky náročný) väzieb C–C, C–O, C–N, apod. Prítom väčšinou zo substrátu odštiepujú alebo doň vnášajú malé molekuly (H_2O, CO_2, NH_3) - majú povahu zložených bielkovín
4.2.1.1 <i>karboanhydráza</i> 4.2.1.2 <i>fumaráthydratáza</i> 4.3.1.17 <i>serindeamináza</i>	$\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ $\text{L-malát} \rightarrow \text{fumarát} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{L-serín} \rightarrow \text{pyruvát} + \text{NH}_3$
5 Izomerázy	<ul style="list-style-type: none"> - realizujú vnútromolekulové presuny atómov a ich skupín, teda vzájomné premeny izomérov - najmenej početná skupina enzýmov väčšinou povahy jednoduchých bielkovín
5.1.2.1 <i>laktátracemáza</i> 5.1.3.1 <i>ribulóza-fosfát-3-epimeráza</i> 5.3.1.1 <i>triózafosfátizomeráza</i>	$\text{D-laktát} \leftrightarrow \text{L-laktát}$ $\text{D-ribulóza-5-fosfát} \leftrightarrow \text{D-xylulóza-5-fosfát}$ $\text{D-glyceraldehyd-3-fosfát} \leftrightarrow \text{dihydroxyacetónfosfát}$
6 Ligázy	<ul style="list-style-type: none"> - katalyzujú vznik energeticky náročných väzieb za súčasného rozkladu látky uvoľňujúcej energiu (ATP) - uplatňujú sa pri rôznych biosyntézach - majú povahu zložených bielkovín
6.1.1.7 <i>alanyl-tRNA-syntetáza</i> 6.4.1.1 <i>pyruvátkarboxyláza</i> 6.5.1.1 <i>DNA-ligáza</i>	$\text{ATP} + \text{L-Ala} + \text{tRNA}^{\text{Ala}} \rightarrow \text{AMP} + \text{difosfát} + \text{L-alanyl-tRNA}^{\text{Ala}}$ $\text{ATP} + \text{pyruvát} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{monofosfát} + \text{oxalacetát}$ $\text{ATP} + \text{DNA}_n + \text{DNA}_m \rightarrow \text{AMP} + \text{difosfát} + \text{DNA}_{n+m}$

Proteolytické enzýmy sa výrazne líšia v stupni substrátovej špecificity. **Subtilizín**, ktorý sa nachádza v niektorých baktériách, je dosť "nevyberavý", čo sa týka charakteru príľahlého aminokyselinového zvyšku štiepenej peptidovej väzby. **Trypsín** je zase dosť špecifický a katalyzuje štiepenie peptidovej väzby iba na karboxylovej strane lyzínového a arginínového zvyšku. **Trombín**, enzým zúčastňujúci sa procesu zrážania krvi, je ešte viac špecifickejší než trypsin. Katalyzuje hydrolýzu peptidovej väzby medzi Arg a Gly, aj to iba v určitých špecifických peptidových sekvenciách:

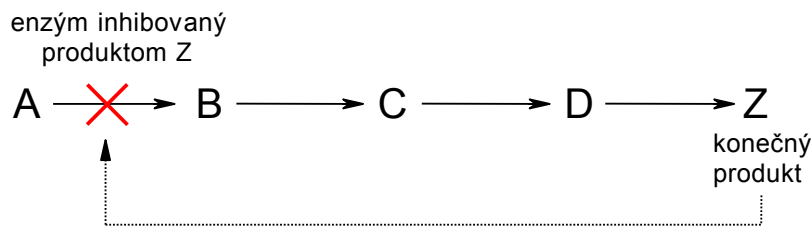


Iným príkladom veľmi špecifického katalyzátora je **DNA-polymeráza I** – templátovo-riadený enzým. Sekvencia (poradie) nukleotidov v DNA reťazci, ktorý je syntetizovaný, je určená sekvenciou nukleotidov v inom DNA reťazci, ktorý slúži ako templát (vzor). DNA-polymeráza I je pozoruhodne presný enzým, nesprávny nukleotid je zabudovaný do novosyntetizovaného reťazca, resp. enzým urobí chybu, po približne 1 milión správne zabudovaných nukleotidov. Je to preto, že DNA-polymeráza sama po sebe kontroluje správnosť zabudovania nukleotidu.

Ako výnimku z typickej enzýmovej špecificity sme uviedli tzv. "**námesačné**" enzýmy. Tieto enzýmy sa niekedy označovali aj ako "**katalyticky promiskuitné**" enzýmy. Námesačné proteíny sú tie, ktoré majú viacero funkcií, resp. sú schopné katalyzovať rozdielne reakcie. Ich schopnosť mať viacero funkcií závisí od ich lokalizácie v bunke, typu bunky, oligomérneho stavu, resp. koncentrácie ligandu, substrátu, kofaktora alebo produktu v bunke. Tieto mechanizmy sa vzájomne nevyklučujú a v mnohých prípadoch funkcia takéhoto enzýmu závisí od kombinácie týchto faktorov. Príkladom môže byť známy **tetramérny** enzým (ľudský), zúčastňujúci sa glykolýzy **glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza**, ktorý katalyzuje premenu glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-difosfoglycerát. V monomérnej forme sa z neho stáva DNA-glykoláza, ktorá odstraňuje uracil nachádzajúci sa v DNA reťazci, ktorý môže vznikáť deamináciou cytozínu alebo inkorporáciou deoxyuridín-5'-trifosfátu (dUTP) počas DNA syntézy.

Regulácia katalytickej aktivity enzýmov

Enzýmy, ktoré katalyzujú prvý krok v biosyntetickej dráhe sú zvyčajne inhibované konečným produktom. Biosyntézu izoleucínu v baktériách ilustruje tento typ kontroly, ktorá sa nazýva **inhibícia spätnou väzbou**. Treonín sa transformuje na izoleucín v piatich krokoch, prvý krok katalyzuje **treoníndeamináza**. Tento enzým je inhibovaný, keď izoleucín dosiahne dostatočne vysokú koncentráciu. Izoleucín inhibuje enzým naviazaním sa na regulačné miesto, ktoré je odlišné od katalytického miesta. Tento typ inhibície je sprostredkovaný reverzibilnou **alosterickou interakciou**. Ak koncentrácia izoleucínu poklesne pod istú úroveň, treoníndeamináza sa stane znova aktívnou.



Enzýmy sú taktiež regulované **regulačnými proteínmi**, ktoré ich môžu stimulovať alebo inhibovať. Aktivita mnohých enzýmov je regulovaná **kalmodulínom**, proteín s molekulovou hmotnosťou 17 000 g/mol, ktorý funguje ako senzor na prítomnosť vápnika takmer vo všetkých eukaryotických bunkách. Väzba Ca^{2+} do viacerých väzbových miest na kalmodulíne indukuje veľkú konformačnú zmenu, ktorá ho zmení z neaktívnej na aktívnu formu. Aktivovaný kalmodulín sa následne viaže na viacero iných enzýmov alebo cieľových proteínov v bunke a modifikuje tým ich aktivitu.

Kovalentná modifikácia je ďalším mechanizmom enzýmovej regulácie. Mnoho enzýmov je kontrolovaných reverzibilným pripojením fosforylovej skupiny na špecifické serínové alebo treonínové aminokyselinové zvyšky (týmto spôsobom je napríklad riadená aktivita enzýmov syntetizujúcich a degradujúcich glykogén). Fosforylácia tyrozínového zvyšku na receptore rastového faktora je kritickým krokom pri indukcii diferenciácie a proliferácie bunky. Špecifické enzýmy nazývané **kinázy** katalyzujú pripojenie fosforylovej skupiny; **fosfatázy** katalyzujú ich odstránenie hydrolýzou.

Niektoré enzýmy sú syntetizované ako neaktívne prekurzory, ktoré sú aktivované vo vhodnom fyziologickom čase a na konkrétnom mieste. Takýmto spôsobom sú riadené napríklad tráviace enzýmy – tento spôsob kontroly sa nazýva **proteolytická aktivácia**. Napríklad, **trypsinogén** je syntetizovaný v pankrease a je aktivovaný štiepením peptidovej väzby v tenkom čreve na aktívny **trypsin**. Tento typ kontroly sa využíva aj pri procesoch zrážania krvi. Enzymaticky neaktívne prekurzory proteolytických enzýmov sa nazývajú **zymogény**.

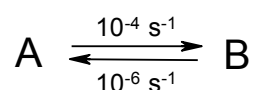
Enzýmy transformujú rozličné formy energie

V mnohých biochemických reakciách je energia reaktantov pretransformovaná s vysokou efektivitou na inú formu energie. Napríklad pri fotosyntéze je svetelná energia pretransformovaná do energie chemickej väzby. V mitochondriách je voľná energia obsiahnutá v malých molekulách získaných z potravy pretransformovaná na voľnú energiu ATP (adenozíntrifosfát). Energia obsiahnutá v chemických väzbách ATP je následne využívaná mnohými spôsobmi. Pri svalovej kontrakcii je energia z ATP premenená pomocou myozínu na mechanickú energiu. Membrány v bunkách a organelách obsahujú pumpy, ktoré využívajú energiu z ATP na transport molekúl a iónov proti chemickému a elektrickému gradientu.

Enzýmy nemenia reakčnú rovnováhu

Enzým je katalyzátor, a preto **nemôže meniť** rovnováhu chemickej reakcie. To znamená, že enzým urýchľuje priamu aj spätnú reakciu presne o ten istý faktor.

Uvažujme reakciu premeny látky *A* na látku *B*. Bez prítomnosti enzýmu je rýchlostná konštanta priamej reakcie $k_f 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a rýchlostná konštanta spätnej reakcie $k_r 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Rovnovážna konštanta *K* je daná pomerom týchto rýchlostných konštánt:

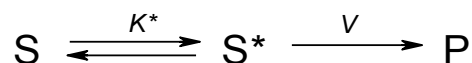


$$K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_f}{k_r} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

Rovnovážna koncentrácia B je 100-krát väčšia ako A , či je enzým prítomný, alebo nie. Dosiahnutie rovnováhy by trvalo viac ako hodinu pre nekatalyzovanú reakciu, avšak za použitia vhodného enzýmu by rovnováha mohla byť dosiahnutá za sekundu. **Enzýmy urýchľujú dosiahnutie stavu dynamickej rovnováhy, ale rovnováhu nemenia.**

Enzýmy urýchľujú reakcie stabilizáciou aktivovaného stavu

Chemická reakcia premeny substrátu S na produkt P prechádza cez aktivovaný (prechodový) stav S^* , ktorý má väčšiu voľnú energiu ako S aj ako P :



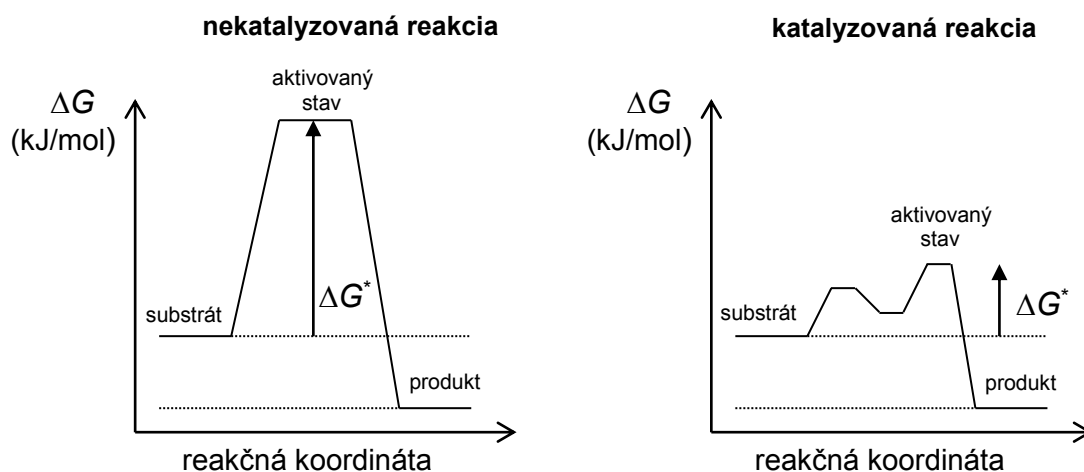
Aktivovaný stav je najmenej zastúpený počas reakcie, pretože má najvyššiu energiu (a je teda nestabilný). Voľná energia aktivácie ΔG^* sa rovná rozdielu voľnej energie medzi aktivovaným stavom a substrátom.

Reakčná rýchlosť V je úmerná koncentrácii aktivovaného stavu S^* , ktorá závisí od ΔG^* , pretože je v rovnováhe so substrátom S :

$$[S^*] = [S]e^{-\Delta G^*/RT}$$

$$V = v[S^*] = \frac{kT}{h}[S]e^{-\Delta G^*/RT}$$

kde k je Boltzmannova konštanta a h je Planckova konštanta. Pomer kT/h je pri 25 °C rovný $6,2 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$. Predpokladajme, že voľná energia aktivácie (aktivačná energia) je 28,5 kJ/mol. Pomer $[S^*]/[S]$ je potom 10^{-5} . Za predpokladu, že $[S] = 1$, rýchlosť reakcie $V = 6,2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Pokles ΔG^* o ~ 5,6 kJ/mol urýchli reakciu 10-krát.



Enzýmy urýchľujú reakcie znížením hodnoty ΔG^* , teda aktivačnej bariéry. Interakcia substrátu a enzýmu vytvára novú reakčnú cestu, v ktorej je energia aktivovaného stavu nižšia ako bez prítomnosti enzýmu. **Podstatou katalýzy je špecifická väzba aktivovaného stavu.**

Aktívne miesta enzýmov majú niektoré spoločné črty

Aktívne miesto enzýmu je oblasť, kde sa viažu substráty (a prostetická skupina, ak nejaká je) a obsahuje aminokyselinové zvyšky, ktoré sa priamo zúčastňujú pri prestavbe väzieb v substráte. Tieto zvyšky sa nazývajú **katalytické skupiny**. Napriek tomu, že sa enzýmy navzájom líšia štruktúrou, špecificitou a spôsobom katalýzy, je možné vysloviť niekoľko zovšeobecnení, čo sa týka týchto aktívnych miest:

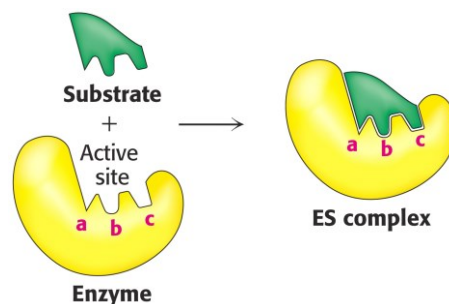
1. Aktívne miesto zaberá relatívne malú časť celkového objemu enzýmu. Väčšina aminokyselinových zvyškov enzýmu neprichádza do kontaktu so substrátom. Vzniká zaujímavá otázka: *prečo sú enzýmy také veľké?* Väčšina enzýmov je zložená z viac ako 100 aminokyselín, t.j. majú hmotnosť $\sim 10\,000$ g/mol a priemer väčší ako 25 Å (1 Å = 10^{-10} m).

2. Aktívne miesto je trojrozmerná samostatná jednotka, ktorá je vytvorená zo skupín, ktoré pochádzajú z rôznych častí lineárneho polypeptidového reťazca. Napríklad, aktívne miesto lyzozýmu je tvorené aminokyselinovými zvyškami 35, 52, 62, 63 a 101 z lineárneho polypeptidového reťazca zloženého zo 129 aminokyselín.

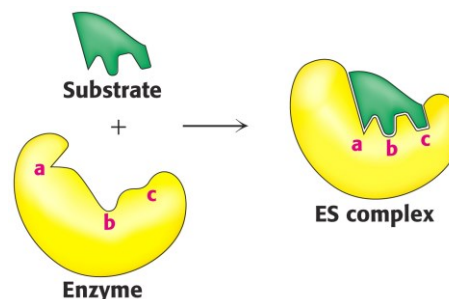
3. Substráty sú viazané do enzýmov mnohými slabými interakciami. Rovnovážna konštanta pre komplex enzým-substrát (ES) je zvyčajne 10^{-2} až 10^{-8} M, čo zodpovedá interakcii od ~ -15 do -50 kJ/mol. Nekovalentné interakcie v ES komplexe sú oveľa slabšie ako kovalentné väzby, ktoré majú energiu od -250 do -450 kJ/mol. Reverzibilné interakcie medzi molekulami sprostredkovávajú elektrostatické interakcie, vodíkové väzby, van der Waalsove sily a hydrofóbne interakcie. Van der Waalsove sily sa prejavujú iba v prípade, ak sa množstvo atómov substrátu súčasne dostane do tesnej blízkosti atómov enzýmu. Preto enzým a substrát musia mať komplementárne tvary. Smerový charakter vodíkových väzieb medzi enzýmom a substrátom určuje vysoký stupeň špecificity tejto interakcie.

4. Aktívne miesta sa nachádzajú v štrbinách a priehlbínach. Vo všetkých známych enzýmoch sa molekula substrátu viaže do štrbín alebo priehlbín. Voda je zvyčajne vytlačená z týchto priestorov a v aktívnom mieste sa nachádza iba v prípade, že sa zúčastňuje reakcie. Nepolárny charakter väčšiny väzobných miest zvyšuje afinitu pre substrát. Avšak, aktívne miesta často obsahujú aj polárne skupiny. V tomto mikroprostredí niektoré skupiny získavajú špeciálne vlastnosti nevyhnutné pre katalýzu. Prítomnosť polárnych skupín v aktívnych miestach porušuje pravidlo, že polárne skupiny sú v styku s vodným prostredím.

5. Špecificita interakcie závisí na presne definovanom usporiadaní atómov v aktívnom mieste. Pre interakciu musí mať substrát vhodný tvar. Metafora *Emila Fishera "kľúča a zámky"* (obrázok 4.1), vyslovená v roku 1890, sa ukázala byť stimulujúca a veľmi plodná. Avšak, v súčasnosti je zrejme, že aktívne miesta mnohých enzýmov sa výrazne modifikujú v dôsledku väzby substrátu. Aktívne miesto nadobúda komplementárny tvar až **po naviazaní** substrátu. Tento proces dynamického rozpoznávania bol nazvaný **indukovaný fit** (obrázok 4.2), a to *Danielom E. Koshlandom* v roku 1958.



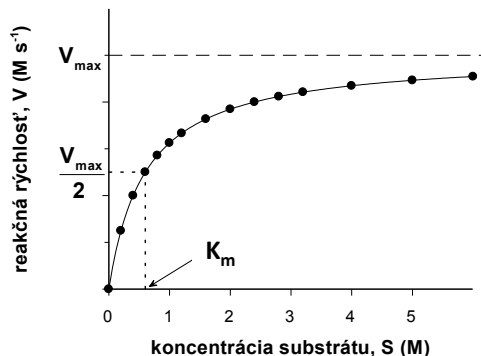
Obrázok 4.1 Schematické znázornenie aktívneho miesta ako kľúča a zámky.



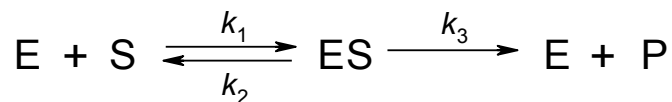
Obrázok 4.2 Schematické znázornenie dynamického rozpoznávania substrátu.

Michaelis-Mentenovej model

Pre mnohé enzýmy závisí rýchlosť katalýzy V od koncentrácie substrátu $[S]$ ako ukazuje nasledujúci graf:



Pri danej koncentrácii enzýmu je rýchlosť V takmer lineárne závislá od $[S]$, keď je $[S]$ nízka. Pri vysokej $[S]$, je V takmer nezávislá od $[S]$. V roku 1913, *Leonor Michaelis* a *Maud Menten* navrhli jednoduchý model, ktorý vysvetlil tieto kinetické charakteristiky. Podstatnou črtou ich modelu je vznik intermediárneho stavu – komplexu enzým-substrát. Tento najjednoduchší model vysvetľuje kinetické vlastnosti mnohých enzýmov:



Enzým E interaguje so substrátom S za vzniku komplexu ES s rýchlostnou konštantou k_1 . Komplex ES má dve možnosti – buď disociuje späť na enzým E a substrát S s rýchlostnou konštantou k_2 , alebo pokračuje v reakcii za vzniku produktu P s rýchlostnou konštantou k_3 . Predpokladá sa, že reakcia z ES na $E + P$ je nevratná.

Takáto reakcia je v podmienkach ustáleného stavu (*steady-state*) popísaná **Michaelis-Mentenovej rovnicou**:

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

kde $V_{\text{max}} = k_3[E_T]$, pričom E_T je celková koncentrácia enzýmu a K_m je **Michaelisova konštantá**, pre ktorú platí: $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$.

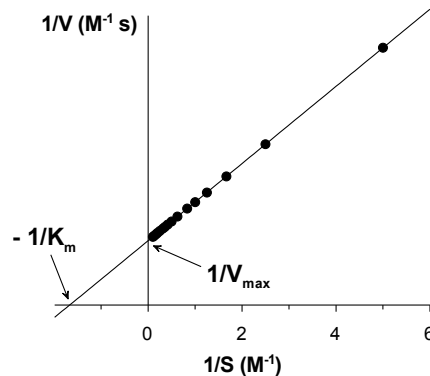
Táto rovnica vysvetľuje kinetické údaje z predchádzajúceho grafu. Pri veľmi malej koncentrácii substrátu, keď je $[S]$ oveľa menšia ako K_m , $V = [S]V_{\text{max}}/K_m$; to znamená, že rýchlosť je priamoúmerná koncentrácii substrátu. Pri príliš vysokej koncentrácii substrátu, keď je $[S]$ oveľa väčšia ako K_m , $V = V_{\text{max}}$; t.j. rýchlosť dosiahne maximálnu hodnotu a nezávisí od koncentrácie substrátu.

Význam hodnoty K_m je zrejmý z rovnice. Keď $[S] = K_m$, potom $V = V_{\text{max}}/2$. **Hodnota K_m je teda rovná koncentrácii substrátu, pri ktorej je reakčná rýchlosť rovná polovici maximálnej rýchlosti.**

Hodnoty K_m a V_{max} je možné určiť z experimentálne zistenej závislosti počiatočnej rýchlosti V meranej pri rôznych koncentráciách substrátu. Pre presné určenie oboch hodnôt je vhodné transformovať Michaelis-Mentenovej rovnicu na tvar, ktorý bude dávať lineárnu závislosť medzi veličinami V a $[S]$. Jedným zo spôsobov je tvar, ktorý dostaneme recipročným vyjadrením oboch strán rovnice:

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

Závislosť $1/V$ od $1/[S]$, nazývaná tiež **Lineweaver-Burkova závislosť**, dáva priamku, ktorá pretína os y v hodnote $1/V_{\max}$ a má smernicu K_m/V_{\max} . Priesečník s osou x je rovný $-1/K_m$.



Význam hodnôt K_m a V_{\max}

K_m nadobúda pre jednotlivé enzýmy/substráty veľmi rozdielne hodnoty (**tabuľka 4.2**). Pre väčšinu enzýmov leží hodnota K_m v intervale od 10^{-1} do 10^{-7} M. Veľkosť hodnoty K_m závisí

TABUĽKA 4.2 Hodnoty K_m pre niektoré enzýmy		
Enzým	Substrát	K_m (μM)
chymotrypsín	acetyl-L-tryptofanamid	5000
lyzozým	hexa-N-acetylglukozamín	6
β -galaktozidáza	laktóza	4000
treonindeamináza	treonín	5000
karboanhydráza	CO_2	8000
penicilináza	benzylpenicilín	50
pyruvátdekarboxyláza	pyruvát	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60
arginín-tRNA-syntetáza	arginín	60
	tRNA	0,4
	ATP	300

od charakteru substrátu a vlastností prostredia – ako pH, teplota a iónová sila. Hodnota K_m má dva významy. Prvý, K_m určuje koncentráciu substrátu, pri ktorej je polovica aktívnych miest obsadená. Keď poznáme K_m , frakciu obsadených aktívnych miest substrátom, f_{ES} , môžeme vypočítať z nasledovného vzťahu:

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Druhý význam K_m je ten, že hodnota K_m sa dá vyjadriť cez jednotlivé rýchlostné konštanty ako $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$. Uvažujme limitný prípad, pri ktorom je k_2 oveľa väčšie ako k_3 . To znamená, že disociácia komplexu ES na E a S je oveľa rýchlejšia ako tvorba E a P . V takomto prípade ($k_2 \gg k_3$):

$$K_m = \frac{k_2}{k_1}$$

Disociačná konštanta komplexu ES je daná vzťahom:

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1}$$

Inými slovami, K_m sa rovná disociačnej konštante komplexu ES v prípade, že k_2 je oveľa väčšia ako k_3 . Ak platí táto podmienka, potom K_m je mierou pevnosti komplexu ES : veľká hodnota K_m naznačuje slabú väzbu E a S ; nízka hodnota K_m poukazuje na pevný komplex. Treba však zdôrazniť, že K_m poukazuje na afinitu komplexu ES **iba** v prípade, že k_2 je oveľa väčšie ako k_3 .

V súvislosti s aktivitou enzýmu sa používa hodnota, ktorá **určuje množstvo molekúl substrátu, ktoré sa premenilo na produkt jedinou molekulou enzýmu za jednotku času, keď bol enzým úplne saturovaný substrátom**. Táto hodnota sa nazýva **rýchlosť premeny**, alebo podľa doslovného prekladu anglického originálu – **číslo premeny** (*turnover number*). Táto hodnota je rovná hodnote k_3 . V literatúre sa tiež označuje ako k_{cat} . Vzťah medzi maximálnou rýchlosťou V_{max} a k_3 , keď sú aktívne miesta na enzýme saturované substrátom je nasledovný:

$$V_{max} = k_3[E_T]$$

Napríklad, roztok karboanhydrázy s koncentráciou 10^{-6} M "vytvorí" 0,6 M H_2CO_3 za sekundu, keď je enzým úplne saturovaný substrátom. Hodnota k_3 sa rovná 6×10^5 s⁻¹. Táto hodnota je jednou z najväčších známych hodnôt k_3 . Jeden proces katalýzy v prípade karboanhydrázy trvá približne 1,7 μs. Väčšina k_3 hodnôt známych enzýmov je v rozmedzí 1 až 10^4 s⁻¹ (tabuľka 4.3).

TABUĽKA 4.3 Hodnoty k_3 pre niektoré enzýmy	
Enzým	k_3 (s ⁻¹)
karboanhydráza	600 000
3-ketosteroidizomeráza	280 000
acetylcholinesteráza	25 000
penicilináza	2 000
laktátdehydrogenáza	1 000
chymotrypsín	100
DNA-polymeráza I	15
tryptofansyntetáza	2
lyzozým	0,5

Mnoho enzýmov katalyzuje reakcie s dvoma alebo viacerými substrátmi

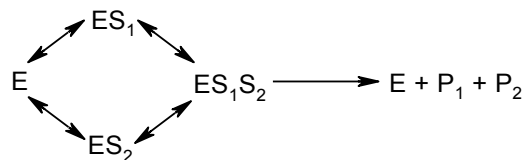
Michaelis-Mentenovej rovnica ukazuje, že rýchlosť jednoduchej enzýmovej reakcie ($S \rightarrow P$) závisí iba na koncentrácii jedného substrátu. Avšak v mnohých enzýmových reakciách sa do enzýmu viažu dva (a niekedy aj viac) rozličné substráty a zúčastňujú sa enzymatickej reakcie. Ako príklad môžeme uviesť reakciu katalyzovanú **hexokinázou**, kde sa ako substrát viažu ATP a glukóza za vzniku produktov glukóza-6-fosfát a ADP:



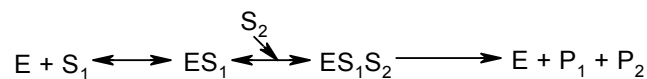
Rýchlosť takejto bisubstrátovej reakcie môže byť taktiež analyzovaná prístupom podľa Michaelisa a Mentenovej. Hexokináza má charakteristickú K_m pre každý zo substrátov.

Enzymatické reakcie s dvoma substrátmi zvyčajne zahŕňajú prenos atómu alebo funkčnej skupiny z jedného substrátu na druhý. Tieto reakcie sa môžu uskutočňovať viacerými mechanizmami. V niektorých prípadoch sú obidva substráty v istom čase naviazané do enzýmu súčasne tvoriac tak **ternárny komplex**:

- Enzymová reakcia zahŕňajúca tvorbu ternárneho komplexu:
Náhodné poradie

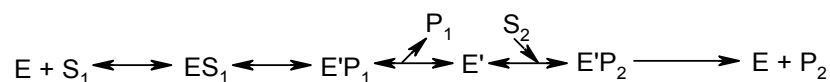


Usporiadané poradie

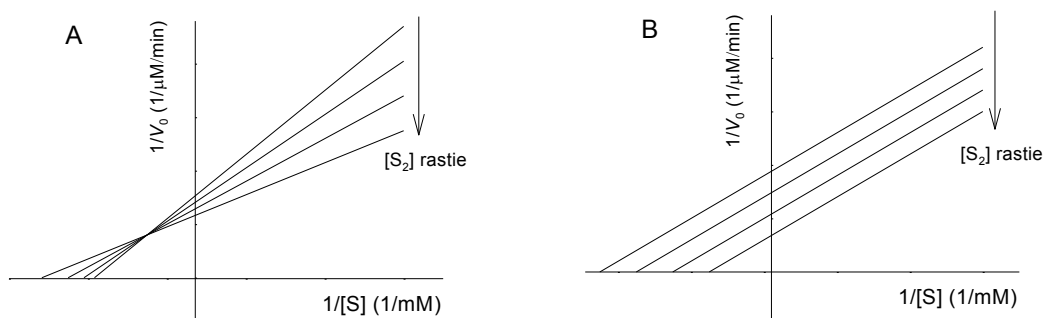


Takýto komplex môže vzniknúť naviazaním substrátov v náhodnom alebo v špecifickom poradí. Ternárny komplex sa nevytvára, keď prvý naviazaný substrát sa mení na produkt, ktorý z enzýmu disociuje pred naviazaním druhého substrátu. Príklad takéhoto mechanizmu je **ping-pongový mechanizmus**, alebo mechanizmus dvojitého nahradenia:

- Enzymová reakcia, pri ktorej sa ternárny komplex nevytvára:



Meranie reakčných kinetík často umožňuje rozlíšiť tieto dva mechanizmy.



Obrázok 4.3 Rovnovážna kinetická analýza bisubstrátových reakcií. V týchto grafoch sa $[S_1]$ mení, zatiaľ čo $[S_2]$ je konštantná. Tieto merania sa opakujú pre niekoľko hodnôt $[S_2]$, vytvárajúc tak niekoľko lineár. Vznik priesečníka poukazuje na vznik ternárneho komplexu (A); paralelné závislosti poukazujú na ping-pongový mechanizmus (B).

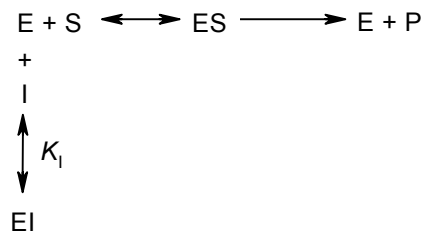
Inhibícia enzýmov

Enzýmové inhibítory sú látky, ktoré spomaľujú alebo spôsobujú zastavenie chemických reakcií. Enzýmy katalyzujú prakticky všetky bunkové procesy, preto nie je prekvapujúce, že enzýmové inhibítory patria k najdôležitejším látkam vo farmaceutickom priemysle. Napríklad acylpyrín (aspirín, acetylsalicylát) inhibuje enzým, ktorý katalyzuje prvý krok v syntéze prostaglandínov, látok, ktoré sa zúčastňujú mnohých procesov vrátane tých, ktoré produkujú pocit bolesti. Štúdium enzýmových inhibítorov tiež poskytuje dôležité informácie ohľadom enzýmového mechanizmu a pomohlo pri určení niektorých metabolických dráh. Existujú dve veľké triedy enzýmových inhibítorov: **reverzibilné** a **ireverzibilné**.

Reverzibilná inhibícia môže byť:

- kompetitívna,
- akompetitívna,
- zmiešaná.

Kompetitívny inhibítor súťaží so substrátom o aktívne miesto enzýmu. Ak inhibítor (I) obsadí aktívne miesto, bráni tak väzbe substrátu do enzýmu. Kompetitívne inhibítory sú štruktúrne často veľmi podobné substrátu a interagujú s enzýmom za vzniku komplexu EI , avšak bez nasledujúcej katalytickej reakcie:



Kompetitívna inhibícia môže byť analyzovaná kvantitatívne rovnovážnou kinetikou. V prítomnosti inhibítora, vyzerá Michaelis-Mentenovej rovnica nasledovne:

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

kde

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

a

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Michaelis-Mentenovej rovnica pre kompetitívnu inhibíciu poukazuje na dôležitú črtu kompetitívnej inhibície. Experimentálne určená hodnota αK_m pozorovaná v prítomnosti inhibítora, sa často nazýva *apparent*, t.j. zjavná, pozorovaná, K_m .

Pretože sa inhibítor viaže reverzibilne do enzýmu, môže byť kompetitívne vytlačený substrátom zvýšením koncentrácie substrátu. Keď $[S] \gg [I]$, pravdepodobnosť, že molekula inhibítora bude viazaná do enzýmu je minimalizovaná a reakcia vykazuje normálnu hodnotu V_{\max} . Avšak hodnota $[S]$, pri ktorej $V = V_{\max}/2$, t.j. pozorovaná K_m , je zvýšená v prítomnosti inhibítora faktorom α . Tento efekt kompetitívneho inhibítora na hodnotu K_m , kombinovaný s faktom, že V_{\max} ovplyvnená nie je, charakterizuje kompetitívnu inhibíciu a je ľahko odhaliteľný pomocou Lineweaver-Burkovho vynesenia. Rovnovážna konštanta pre väzbu inhibítora, K_i , môže byť získaná z toho istého typu vynesenia:

kde

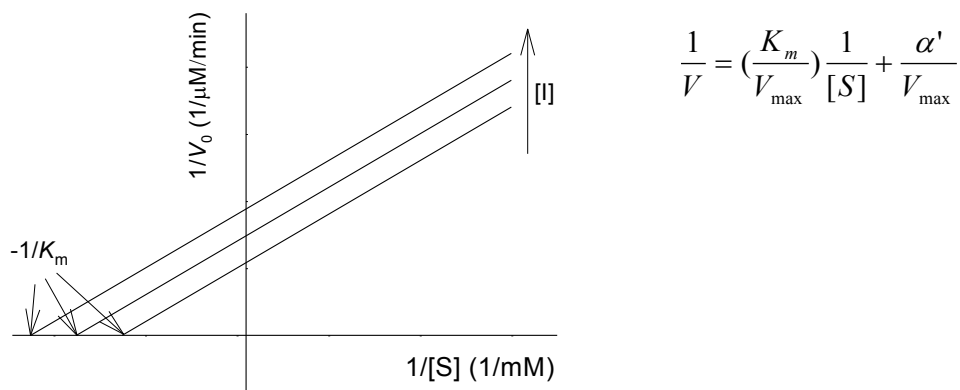
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$$

a

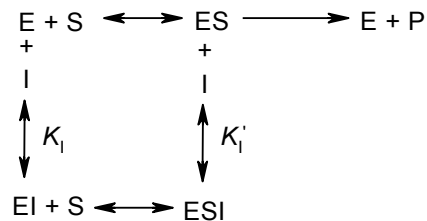
$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Ako vyplýva z uvedenej Michaelis-Mentenovej rovnice, pri vysokej koncentrácii substrátu sa bude hodnota V blížiť k hodnote V_{\max}/α' . Akompetitívny inhibítor preto znižuje meranú hodnotu V_{\max} . Pozorovaná hodnota K_m taktiež klesá, pretože $[S]$ potrebné na dosiahnutie $V_{\max}/2$ je znížená faktorom α' .

Lineweaver-Burkov graf v prípade akompetitívnej inhibície vyzera nasledovne:



Zmiešaný inhibítor sa taktiež neviaže do aktívneho miesta, ale interaguje aj s E aj s komplexom ES , pričom afinita k obom z nich je rôzna:

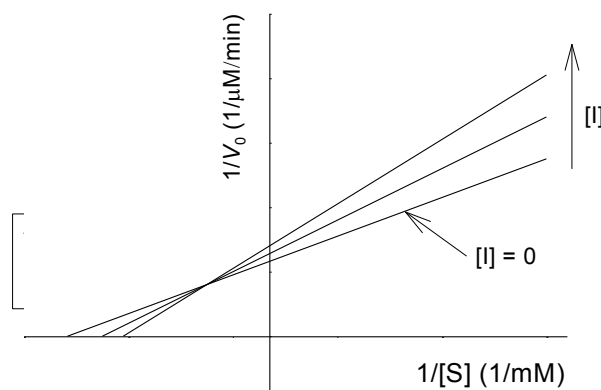


Rýchlostná rovnica popisujúca zmiešanú inhibíciu vyzera nasledovne:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]}$$

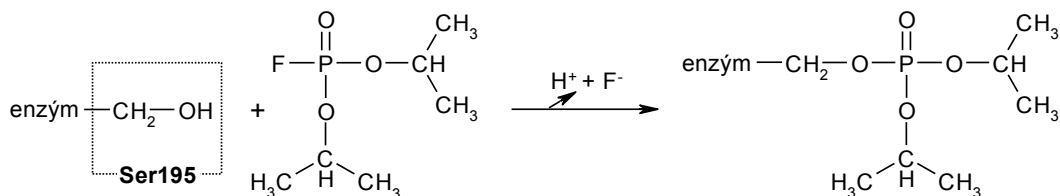
kde α a α' sú definované vyššie. Zmiešaná inhibícia zvyčajne ovplyvňuje aj K_m aj V_{\max} . Špeciálny prípad, zriedka sa vyskytujúci v praxi, keď $\alpha = \alpha'$, definuje **nekompetitívnu inhibíciu**. V tomto prípade bude ovplyvnená iba hodnota V_{\max} , ale nie hodnota K_m (použitím predchádzajúcej rovnice skúste vysvetliť prečo). Afinita nekompetitívneho inhibítora k E a ku komplexu ES je rovnaká.

Lineweaver-Burkov graf v prípade zmiešanej inhibície vyzera nasledovne:



$$\frac{1}{V} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

Ireverzibilné inhibítory sú tie, ktoré interagujú alebo ničia funkčnú skupinu na enzýme, ktorá je nevyhnutná pre enzýmovú aktivitu alebo vytvárajú zvlášť stabilné nekovalentné komplexy s enzýmom. Tvorba kovalentnej väzby ireverzibilného inhibítora a enzýmu je bežná. Je veľmi dôležitým nástrojom pri štúdiu reakčného mechanizmu enzýmov. Aminokyselina s kľúčovou katalytickou funkciou v aktívnom mieste môže byť niekedy identifikovaná na základe toho, ktorá aminokyselina je kovalentne modifikovaná inhibítorm. Ako príklad môžeme uviesť ireverzibilnú inhibíciu proteáz (v danom prípade chymotrypsínu) **diizopropylfluorofosfátom** (DIFP):

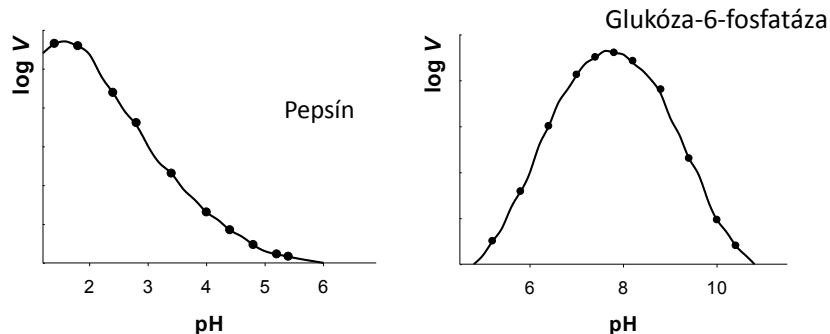


Táto inhibícia je špecifická pre proteázy v tom zmysle, že napriek tomu, že tieto enzýmy obsahujú viacero serínových aminokyselinových zvyškov, modifikovaná je výnimočne serínová hydroxylová skupina v aktívnom mieste.

Špeciálnu triedu inhibítorov tvoria **samovražedné inhibítory**. Tieto zlúčeniny sú relatívne nereaktívne, až kým sa nenaviažu do aktívneho miesta špecifického enzýmu. Samovražedný inaktívator sa zúčastňuje na prvých krokoch normálnej enzýmovej reakcie, ale namiesto toho, aby sa transformoval na "normálny" produkt, mení sa tento inhibítor na reaktívnu zlúčeninu, ktorá ireverzibilne reaguje s enzýmom. Tieto zlúčeniny sa taktiež nazývajú **na mechanizme založené inaktívatory**, pretože využívajú normálny enzýmový reakčný mechanizmus na inaktíváciu enzýmu. Samovražedné inaktívatory hrajú centrálnu úlohu pri tvorbe nových liekov – je to moderný prístup modelovania/vytvárania vysokoaktívnych liekov založený na znalosti štruktúry substrátu a reakčného mechanizmu daného enzýmu. Dobře vytvorený samovražedný inaktívator je špecifický pre jediný typ enzýmu a je nereaktívny, až kým sa nedostane do aktívneho miesta enzýmu – lieky založené na takomto prístupe budú mať významnú vlastnosť, že ich vedľajšie účinky budú minimalizované.

Enzýmy sú citlivé na pH hodnotu prostredia

Enzýmy majú **pH optimum** (alebo pH oblasť), pri ktorom je ich aktivita maximálna. Pri nižšom alebo vyššom pH ich aktivita klesá.



Obrázok 4.5 pH závislosť aktivity dvoch enzýmov. Tieto krivky boli zostrojené na základe meraní počiatočných rýchlostí uskutočnených v tlmivých roztokoch s rôznou hodnotou pH. pH optimum aktivity enzýmov sa vo všeobecnosti nachádza v oblastiach pH, aké má prirodzené prostredie výskytu daného enzýmu. Pepsín, ktorý hydrolyzuje peptidové väzby v proteínoch počas trávenia v žalúdku, má pH optimum okolo 1,6. pH žalúdočkovej šťavy je 1 až 2. Glukóza-6-fosfatáza v hepatocytoch (pečeňových bunkách), s pH optimom pri 7,8, zodpovedá za uvoľňovanie glukózy do krvi. Normálne pH v cytoplazme hepatocytov je 7,2.

To samozrejme nie je prekvapujúce, pretože bočné skupiny v aktívnom mieste s vlastnosťami slabých kyselín alebo báz majú kritickú funkciu pre aktivitu mnohých enzýmov. Odstránenie protónu z histidínového zvyšku môže napríklad eliminovať iónovú interakciu nevyhnutnú pre stabilizáciu aktívnej konformácie enzýmu. Menej bežným prípadom pH senzitivity je titrácia skupiny na substráte.

pH oblasť, v ktorej dochádza ku zmene aktivity enzýmu môže naznačiť, ktorá aminokyselina sa nachádza v aktívnom mieste. Zmena aktivity v oblasti pH 7, napríklad, poukazuje na titráciu histidínového zvyšku. Pri interpretácii pH efektu je však nevyhnutná opatrnosť. V zbalenom proteíne môže byť pK_a mnohých aminokyselín výrazne zmenená. Napríklad, blízka lokalizácia pozitívneho náboja znižuje pK_a konštantu lyzínového zvyšku a negatívny náboj ju zvyšuje. Takéto efekty môžu spôsobiť posun o 2 a viac jednotiek pH v porovnaní s pK_a hodnotou voľnej aminokyseliny. V enzýme *acetoacetátdekarboxyláza* má jeden z Lys (normálne $pK_a = 10,5$) pK_a posunutú na 6,6 v dôsledku elektrostatického efektu blízkeho pozitívneho náboja.

Použitá literatúra

- Barna K., Paščenko A. Je., Barnová E., Guzy J.: Lekárska chémia a biochémia, 3. prepracované vydanie, Košice 1989.
- Creighton T. E.: Proteins structures and molecular properties, 2nd edition, W. H. Freeman and Company, New York 1993.
- Podhradský D., Mihalovová H.: Praktické cvičenia z biochémie, Košice 1989.
- Stryer L.: Biochemistry, 8th edition, W.H. Freeman and Company, New York 2015.
- Vodrážka Z.: Biochemie, 2. vydanie, Academia, Praha 2002.