

## Vzorečkovník

Vzorec pro výpočet rovnovážné konstanty:

$$K = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}}$$

Lambert-Beerův zákon:

$$A = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

Enzymová aktivita:

$$a = -\frac{\Delta n_S}{\Delta t} = \frac{\Delta n_P}{\Delta t}$$

Rovnice Michaelise a Mentenové:

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

Vztah limitní rychlosti a katalytické konstanty:

$$V_{\text{lim}} = k_{\text{cat}} \cdot [E]$$

E ... enzym, S ... substrát, P ... produkt, I ... inhibitor, ES ... enzym-substrát komplex, EI ... enzym-inhibitor komplex, ESI ... enzym-substrát-inhibitor komplex

[X] ... molární koncentrace látky X;  $n_x$  ... látkové množství látky X

$\Delta Y$  ... změna veličiny Y

$K$  ... rovnovážná konstanta

$G^0$  ... standardní Gibbsova volná energie

$a$  ... enzymová aktivita

$t$  ... čas

$A$  ... absorbance

$c$  ... látková (molární) koncentrace

$d$  ... optická dráha kyvety

$\varepsilon$  ... molární absorpční koeficient

$v$  ... reakční rychlost

$V_{\text{lim}}$  ... limitní rychlost enzymové reakce

$K_m$  ... Michaelisova konstanta

$k_{\text{cat}}$  ... katalytická konstanta

## Reakční rychlost chemické reakce

Jak spočítat průměrnou rychlost jedoucího automobilu určitě víte – prostě vezmete dráhu, kterou za určitý čas ujel, podělíte ji tímto časem a je hotovo. Jak ale měřit rychlost chemických reakcí? Vezměme si nejjednodušší model chemické reakce:



V tomto případě samozřejmě není možné se na reakci dívat a počítat, kolikrát za jednotku času proběhne. Proto je nutné rychlost chemických reakcí vyjádřit trochu oklikou: podíváme se, jaká je koncentrace výchozí látky = substrátu (S) v roztoku v čase 0, potom znovu v čase  $t$  a z rozdílu těchto koncentrací podělených časem získáme naši reakční rychlost. Samozřejmě nemusíme pozorovat, jak rychle ubývá substrát reakce, ale třeba jak rychle přibývá její produkt (P). Reakční rychlost pak můžeme vyjádřit rovnicí:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

(pozn.: [S] = koncentrace látky S)

Je však důležité si uvědomit, že tato rovnice pracuje s diferenciály, které vyjadřují neuvěřitelně malý rozdíl dané veličiny; reakční rychlost je (až na speciální případy) platná pouze pro jeden daný okamžik reakce a není tak vhodná ke srovnávání různých reakcí. To by bylo, jako byste srovnávali výkon závodního auta a trabantu na základě informace, že závoďák zrovna jede dvacítkou a trabant padesátkou. Zde potřebujeme jinou veličinu, která reakci charakterizuje, jako například u našich aut jejich maximální dosažitelnou rychlost.

## Reakce nultého a prvního řádu v souvislosti s enzymovou kinetikou

V klasické enzymologii se setkáme nejčastěji s reakcemi nultého a prvního řádu. Reakce prvního řádu jsou nejtypičtějšími chemickými reakcemi. Tyto reakce probíhají rychlostí, která je závislá na koncentraci substrátu v reakční směsi – čím déle taková reakce probíhá, tím méně substrátu zbývá a tím pomaleji reakce probíhá. Reakční rychlost rovnice prvního řádu je tak charakterizována rovnicí:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k \cdot [S]$$

kde  $k$  je takzvaná *rychlostní konstanta reakce*, což je veličina, která již charakterizuje danou reakci a je pro ni za daných podmínek neměnná.

S reakcemi nultého řádu se setkáme v případě, že je daný enzym v určitém čase zcela nasycen substrátem – je vyčerpána jeho kapacita a každá jedna molekula enzymu v roztoku pracuje na přeměně substrátu na produkt. Nehledě na to, kolik substrátu ještě přidáme, v roztoku je jen omezený počet enzymu, který jej může přeměňovat a reakce tak pracuje svou tzv. *limitní rychlostí* ( $V_{lim}$ ), která je v každém okamžiku reakce stejná. Reakční rychlost rovnice nultého řádu je popsána rovnicí:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = k$$

kde  $\Delta[S]$  a  $\Delta t$  jsou již makroskopicky pozorované veličiny. Pokud tedy více, že reakce  $S \rightarrow P$  je nultého řádu, v čase 0 s změříme  $[S]_1 = 10 \text{ mM}$  a v čase 30 s  $[S]_2 = 1 \text{ mM}$ , pak můžeme říct, že reakce probíhá konstantní rychlostí o velikosti:

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = -\frac{[S]_2 - [S]_1}{t_2 - t_1} = -\frac{(1 - 10) \text{ mM}}{(30 - 0) \text{ s}} = 0,3 \text{ mM s}^{-1}$$

## Enzymová aktivita

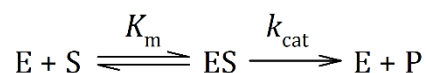
Za podmínek nasycení enzymu substrátem měříme veličinu, která se nazývá *enzymová aktivita* ( $a$ ). Tato veličina je definována rovnicí:

$$a = -\frac{\Delta n_S}{\Delta t} = \frac{\Delta n_P}{\Delta t}$$

a přestože se může zdát, že se téměř neliší od definice reakční rychlosti reakce nultého řádu, až na to, že nepracuje s koncentrací nýbrž látkovým množstvím substrátu resp. produktu reakce, opak je pravdou. Všimněte si, že v rovnici vůbec nefiguruje koncentrace enzymu. Enzymová aktivita je totiž sama mírou množství enzymu. Pro enzymovou aktivitu se nejčastěji používá jednotka *katal*, z jejíž definice plyne také význam enzymové aktivity: 1 katal enzymu je takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za 1 sekundu. Pokud tedy máte 1 katal dvou různých enzymů, které katalyzují stejnou reakci, vůbec to neznamená, že jich máte stejné množství, ale to, že za podmínek nasycení substrátem budou reakce katalyzované oběma enzymy probíhat stejnou rychlostí.

## Rovnice Michaelise a Mentenové

Enzymová kinetika často potřebuje mechanismus reakce nultého a prvního řádu skloubit dohromady. Pokud je substrátu dost a enzym je nasycený, přeměna probíhá reakcí nultého řádu. Pokud je ale substrátu méně, nemusí jej být dostatek pro nasycení veškerého enzymu, a určitá část molekul enzymu tak v roztoku plave, aniž by se na katalýze v daný okamžik podílela. Tento model je pro zjednodušený model obecné enzymové reakce:



charakterizován tzv. *rovnici Michaelise a Mentenové*:

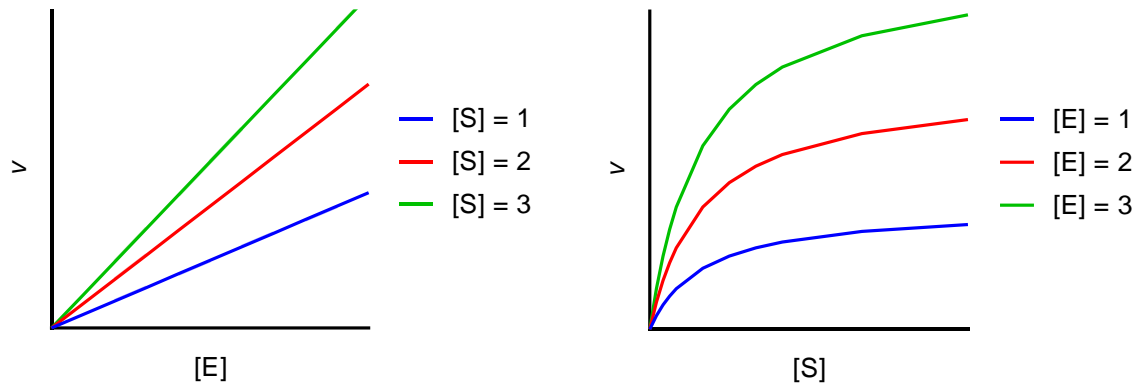
$$v_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde  $v_0$  je tzv. *počáteční rychlost reakce*, tedy rychlost enzymové reakce na jejím samém začátku, kdy můžeme zanedbat úbytek substrátu, vliv produktu a spoustu dalších otravností. Kromě koncentrace substrátu  $[S]$  v rovnici vystupuje limitní rychlost reakce  $V_{lim}$ , vyjadřující rychlost, kterou enzymová reakce probíhá, když je enzym zcela nasycen substrátem.  $K_m$  je tzv. Michaelisova konstanta, která se rovná takové koncentraci substrátu, při které enzymová reakce probíhá právě polovinou limitní rychlosti reakce (což si snadno ověříte tak, že pokud za  $K_m$  do rovnice dosadíte  $[S]$ , zjistíte, že  $v = V_{lim}/2$ ). Tato veličina je mírou rychlosti a stability vazby substrátu do aktivního místa enzymu, je pro danou enzymovou reakci specifická a za daných podmínek neměnná. Možná si ale říkáte: „Moment, a nehraje koncentrace enzymu také nějakou roli? Přece, čím více enzymu, tím vyšší musí být maximální rychlost reakce!“ A měli byste samozřejmě pravdu. Tato skutečnost je ukrytá ve veličině  $V_{lim}$ , kterou lze vypočítat jako:

$$V_{lim} = k_{cat} \cdot [E]$$

kde  $[E]$  je koncentrace enzymu a  $k_{cat}$  rychlostní konstanta enzymové reakce, také nazývána jako *katalytická konstanta*, *molekulová aktivita* nebo *číslo přeměny* enzymu. Tato veličina udává, kolik molekul substrátu je jedna molekula enzymu schopná přeměnit za jednu sekundu a společně s  $K_m$  se jedná o druhou veličinu, která je pro enzymovou reakci charakteristická.

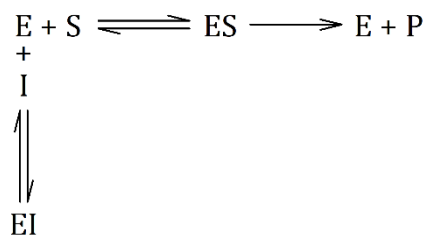
Z rovnice Michaelise a Mentenové a definice limitní rychlosti enzymové reakce zároveň zpětně vyplývá poznatek, který dal těmto veličinám základ: při konstantní koncentraci substrátu je počáteční rychlost enzymové reakce **přímo úměrná** koncentraci enzymu, zatímco při konstantní koncentraci enzymu je tato závislost **hyperbolická**:



### Aktivátory a inhibitory enzymové aktivity

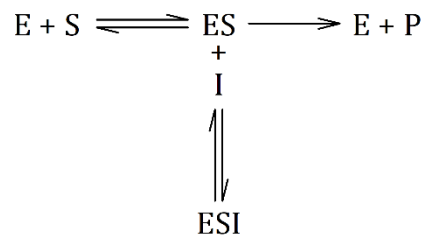
Látky, které se vážou na molekulu enzymu a touto vazbou ovlivňují rychlost enzymové reakce, nazýváme enzymové **aktivátory** (pokud reakci urychlují) anebo **inhibitory** (které zase rychlost reakce snižují). Zatímco způsobů aktivace enzymů je celá řada většinou specifických pro daný enzym anebo dokonce jen jednu enzymovou reakci, enzymové inhibitory můžeme do jisté míry klasifikovat. Enzymovou inhibici rozlišujeme dle charakteru vazby inhibitoru na **reverzibilní (vratnou)**, kdy se inhibitor váže na enzym slabě a po jeho odstranění se obnoví původní funkce enzymu a **irreverzibilní (nevratnou)**, kdy se inhibitor na enzym naváže pevně, například kovalentní vazbou, látku tak bez denaturace enzymu není možné z enzymu odstranit a způsobená změna je tím trvalá. Reverzibilní inhibitory můžeme dále rozlišit na základě toho, jaký mají vliv na katalytické parametry dané enzymové reakce.

**Kompetitivní inhibitory** jsou takové inhibitory, které se vážou pouze na volný enzym:



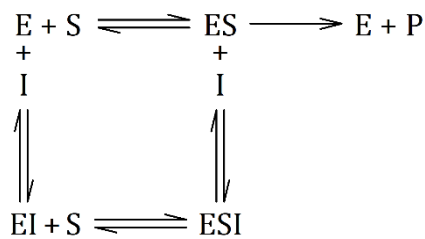
Kompetitivní inhibitory soutěží se substrátem o vazbu do aktivního místa enzymu a způsobují zvýšení hodnoty Michaelisovy konstanty, zatímco limitní rychlost reakce zůstává konstantní.

**Akometitivní inhibitory** se zase vážou pouze na komplex enzym-substrát:



Akometitivní inhibitory vazbou na enzym-substrát komplex tento komplex zablokují a enzym není schopen přeměny substrátu na produkt. Akometitivní inhibitory způsobují snížení hodnoty Michaelisovy konstanty i limitní rychlosti reakce.

**Nekometitivní inhibitory** se vážou stejně silně jak na volný komplex, tak na komplex enzym-substrát:



a to zpravidla proto, že jejich vazba probíhá do místa, které je zcela odlišné a nezávislé na aktivním místě enzymu, avšak vazba inhibitoru do něj aktivní místo ovlivňuje a způsobuje zablokování enzymové reakce. Nekometitivní inhibitory způsobují snížení limitní rychlosti reakce, zatímco Michaelisova konstanta není ovlivněna.

Poslední typ reverzibilních inhibitorů, **směsné inhibitory**, se stejně jako inhibitory nekometitivní vážou jak na volný enzym, tak na komplex enzym-substrát (proto platí stejné schéma, jako při inhibici nekometitivní). V tomto případě je ale situace o něco složitější: nejenže vazba inhibitoru ovlivňuje vazbu substrátu, ale platí to i naopak; aktivní místo a vazebné místo inhibitoru se tak vzájemně ovlivňují a síla vazby inhibitoru na volný enzym a komplex enzym-substrát se liší. Směsné inhibitory vždy způsobují snížení limitní rychlosti reakce a buďto zvýšení anebo snížení Michaelisovy konstanty podle toho, ze se směsný inhibitor váže silněji na volný enzym anebo na komplex enzym-substrát.