



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Obecný metabolismus. Enzymy - biokatalyzátory (6).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.
Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Enzymy - biokatalyzátory.

Osnova:

1. Charakteristika enzymů.
2. Termodynamická funkce enzymů.
- x. Názvosloví a třídění enzymů.
3. Vazba enzym - substrát.
4. Kinetické vlastnosti enzymů - rovnice Michaelise a Mentenové.
5. Limitní rychlost a Michaelisova konstanta.
6. Allosterické enzymy.
7. Vliv efektorů na enzymovou aktivitu.

Charakteristika enzymů.

Enzymy jsou katalyzátory biologických systémů. Katalyzují přenos jedné formy energie na druhou.

Enzymy jsou charakterizovány svojí katalytickou silou a specificitou.

Vlastní katalytická reakce probíhá v aktivním místě.

Téměř všechny známé enzymy jsou proteiny.

Enzymy urychlují ustavení reakční rovnováha oproti nekatalyzovaným reakcím faktorem milion i více.

Klasickým příkladem je hydratace a dehydratace oxidu uhličitého. Enzym se nazývá karbonátanhydratasa a reakce probíhá v plicních alveolách. Jedna molekula enzymu katalyzuje hydrataci 1 milionu molekul CO_2 za jednu sekundu. Reakce je 10^7 krát rychlejší než nekatalyzovaná.

Enzymy jsou vysoce specifické pokud se týká výběru reakcí i ve výběru reaktantů, které nazýváme substráty.

Charakteristika enzymů.

Jako příklad jsou proteolytické enzymy (proteasy nebo proteinasy), které katalyzují hydrolýzu peptidové vazby.

Jejich triviální názvy jsou pepsin, trypsin, chymotrypsin apod.

Všechny štěpí peptidovou vazbu, ale jsou specifické při výběru místa na kterém štěpí. Vykazují tedy substrátovou specificitu.

Papain je méně specifický, štěpí peptidové vazby mezi různými aminokyselinami. Trypsin je substrátově specifický - štěpí peptidovou vazbu na karboxylové straně lysinu a argininu.

Thrombin, přísně specifický enzym podílející se na srážení krve, štěpí jen vazby Arg - Gly.

Specificita enzymů spočívá v přesné interakci mezi substrátem a enzymem. Specificita a přesnost vyplývají z třírozměrné prostorové stavby enzymů jako proteinů.

Enzymy a kofaktory.

Aktivita mnoha enzymů závisí na přítomnosti malých molekul - **kofaktorů**. Kofaktory se obvykle během enzymové reakce chemicky mění.

Enzym bez kofaktoru se nazývá **apoenzym**. Kompletní katalyticky aktivní enzym se nazývá **holoenzym**.

Kofaktory dělíme do dvou skupin:

a) Kovové ionty

b) Malé organické molekuly nazývané koenzymy.

Koenzymy jsou často odvozeny z vitaminů.

Pevně vázané koenzymy se nazývají **prostetické skupiny**.

Volně vázané koenzymy na holoenzymy nazýváme **kosubstráty**.

Enzymy využívající stejné koenzymy katalyzují obvykle stejným mechanismem.

Enzymové kofaktory.

- | Kofaktor | Enzym |
|---------------------------------------|---------------------------|
| • Thiaminpyrofosfát (TPP) | Pyruvátdehydrogenasa |
| • Flavinadenin dinukleotid (FAD) | Aminoxidasa |
| • Nikotinamidadenin dinukleotid (NAD) | Dehydrogenasy |
| • Koenzym A (CoA) | Matabolismus mast.kyselin |
|
 | |
| • Kovy | |
| • Zn^{2+} | Karbonátanhydratasa |
| • Mg^{2+} | Hexokinasa |
| • Mo | Nitrátreduktasa |
| • Ni^{2+} | Ureasa |

Tvorba a přenos buněčné energie.

- Klíčovou aktivitou živých systémů je schopnost převodu jedné formy energie na druhou.
- Jako příklad lze uvést buněčnou respiraci probíhající v mitochondriích. Volná energie uložená v malých molekulách z potravy je nejdříve převedena na volnou energii gradientů iontů a posléze na volnou energii obsaženou v molekulách adenosintrifosfátu (ATP).
- Volná energie ATP může být dále, přes svalová vlákna aktinu a myosinu, uplatňována jako pohyb.

Tvorba a přenos buněčné energie.

- Enzymy urychlují reakce, ale průběh a směr reakce závisí na rozdílu energií mezi reaktanty a produkty.
- Volná energie neboli Gibbsova (G) je termodynamická veličina vyjadřující užitečnou energii neboli schopnost konat práci.
- Známe dvě termodynamické vlastnosti reakce:
 - a) Rozdíly volných energií (ΔG) mezi produkty a reaktanty.
 - b) energii potřebnou k zahájení převodu reaktantů na produkty.
- První (a) vyjadřuje jestli reakce proběhne spontánně, druhá (b) určuje rychlost reakce.

Změna volné energie je ukazatelem směru a spontánnosti chemické reakce a ne rychlosti.

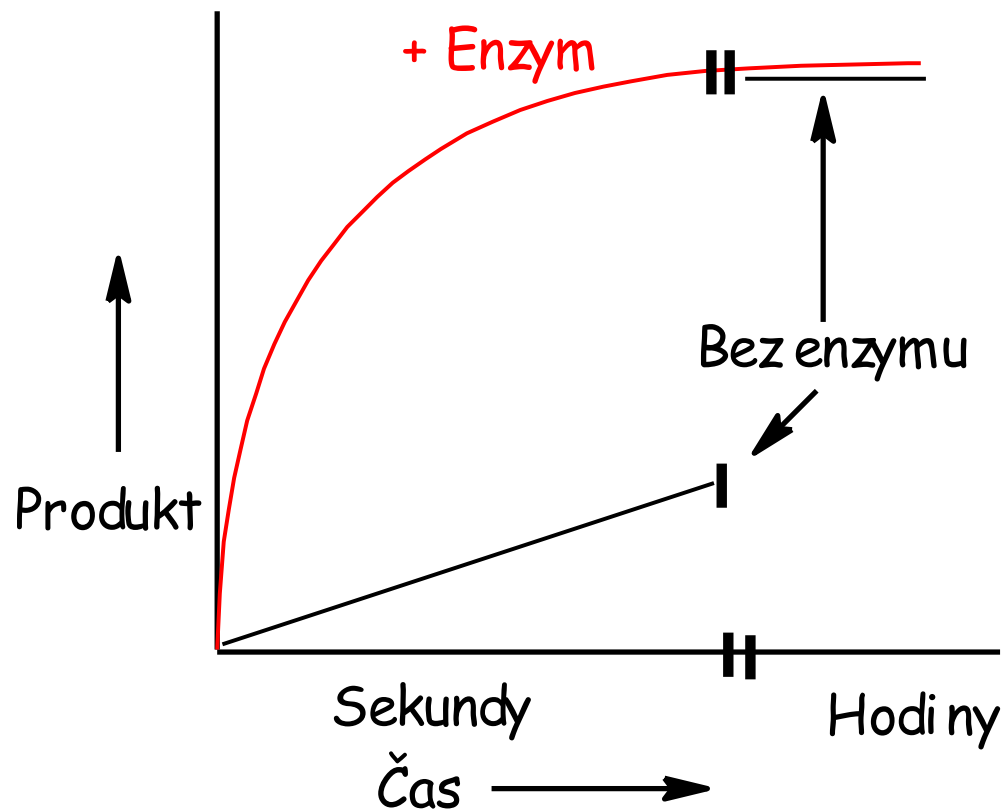
- 1. Reakce probíhá samovolně, když je ΔG negativní.
- 2. Systém je v rovnováze - nedochází ke změně, když je $\Delta G = 0$.
- 3. Reakce neprobíhá spontánně, když je ΔG kladné.
- 4. Změna volné energie závisí pouze na rozdílu volné energie produktu minus volná energie reaktantu. ΔG je nezávislá na dráze a mechanismu reakce.
- 5. Změna volné energie neříká nic o rychlosti reakce. Negativní hodnota ΔG znamená, že reakce proběhne spontánně, ale o tom jestli dostatečně rychle neříká nic.

Vztah změny standardní volné energie k rovnovážné konstantě.

- Abychom zjistili jestli daná reakce proběhne spontánně nebo bude třeba dodat energii musíme stanovit ΔG .
- Musíme vzít v úvahu charakter obou reaktantů a jejich koncentraci.
- $A + B \rightleftharpoons C + D$
- $\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln [C][D] / [A][B]$
- ΔG° = změna standardní volné energie. R je univerzální plynová konstanta, T absolutní teplota, [A], [B], [C], [D] jsou molární koncentrace (lépe aktivity) reaktantů.
- ΔG° je změna volné energie za standardních pomínek, to zn., že všechny reaktanty jsou přítomny v 1 M koncentracích.
- ΔG reakce závisí na povaze reaktantů (vyjádřené výrazem ΔG°) a jejich koncentracích (vyjádřené logaritmickým výrazem).
- **Biochemická konvence:**
- Standardní stav pH = 7. Pokud je reaktantem H^+ , je jeho aktivita rovna 1 (odpovídá pH 7). Aktivita vody je také rovna 1.
- **Změna standardní volné energie v biochemii je výraz: ΔG°**
- **Jednotky energie jsou 1 kJ a 1 kcal; 1 kJ = 0, 239 kcal.**

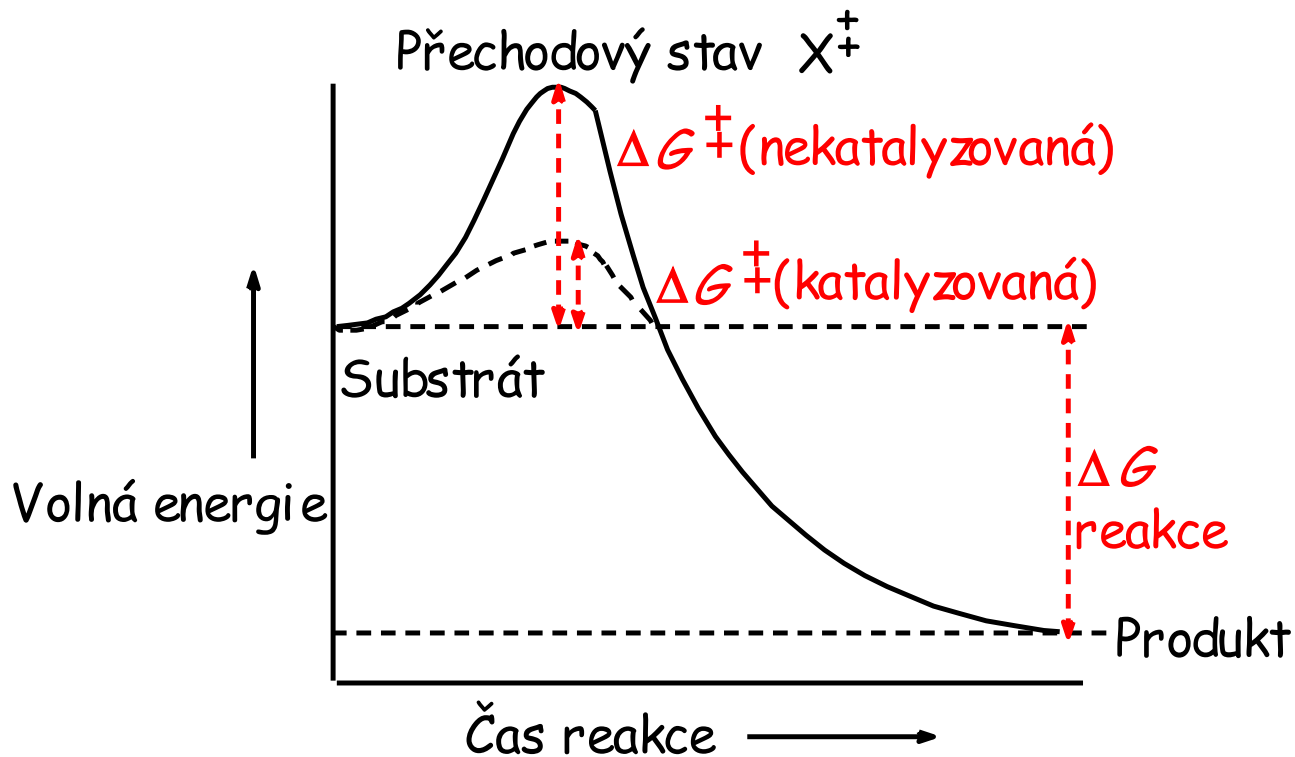
Enzymy ovlivňují pouze rychlost katalyzované reakce. Neovlivňují reakční rovnováhu !!

- Rovnovážná konstanta reakce je **jen** funkcí změny volné energie reaktantů a produktů.
- Stejná rovnováha se dosáhne za přítomnosti enzymu daleko rychleji !!



Enzymy urychlují ustanovení rovnováhy tvorbou přechodového stavu. Enzymy snižují aktivační energii reakce.

- Přechodový stav (X^\ddagger) má vyšší obsah volné energie než substrát a produkt !!
- $S \rightarrow X^\ddagger \rightarrow P$



Enzymy urychlují ustanovení rovnováhy tvorbou přechodového stavu.

- Rozdíl volné energie mezi přechodovým stavem a substrátem se nazývá **Gibbsova volná energie aktivace**, zjednodušeně, **aktivační energie**. Symbol: ΔG^\ddagger .
- Protože je enzymem snížena aktivační energie může přechodový stav překročit více molekul.
- Snížení aktivační energie má analogii ve skoku vysokém - snížení laťky je schopen zdolat větší počet atletů.

Aktivní místa enzymů.

- Aktivní místo enzymu je oblast v jeho molekule kde se váží substráty, případně kofaktory.
- Aktivní místo tvoří vedlejší řetězce nesousedních aminokyselin polypeptidového řetězce. Tyto skupiny nazýváme - katalytické.
- Interakce substrátu a enzymu v aktivním místě vede ke tvorbě přechodového stavu.
- Aktivní místo tvoří třídimenziální strukturu do které vstupuje substrát.
- Aktivní místo tvoří malou část celkového objemu enzymu.
- Substráty se váží do aktivního místa řadou slabých interakcí.
- Vytváří se komplex enzym - substrát (ES).
- Specificita vazby enzym - substrát je založena na přesně uspořádaných atomech v aktivním místě.
- Při tvorbě komplexu ES se uvolňuje vazebná energie přispívající ke snížení energie aktivační a tvorbě přechodového stavu.

Enzymová kinetika. Rovnice Michaelise a Mentenové a její konsekvence.

- Enzymy ovlivňují rychlost ustavení rovnováhy chemických reakcí a proto je možné je studovat metodami enzymové kinetiky.
- Základní pojmy:
- Když je rychlost reakce závislá na koncentraci jednoho reaktantu (substrátu) s úměrnou rychlostní konstantou k , jedná se o reakci prvního řádu a rychlostní konstanta má rozměr: s^{-1} .
- $V = k[A]$
- Mnohé biochemické reakce mají dva reaktanty, jsou bimolekulární, jejich rychlostní konstanty je druhého řádu a má rozměr: $M^{-1}.s^{-1}$.
- $V = k[A]^2$ nebo $V = k[A].[B]$
- V řadě případů lze reakci druhého řádu převést na reakci prvního řádu (např. koncentrace reaktantu $[A]$ mnohonásobně převažuje nad koncentrací reaktantu $[B]$), reakce nazýváme **pseudoprvního řádu**.

Enzymová kinetika. Rovnice Michaelise a Mentenové a její konsekvence.

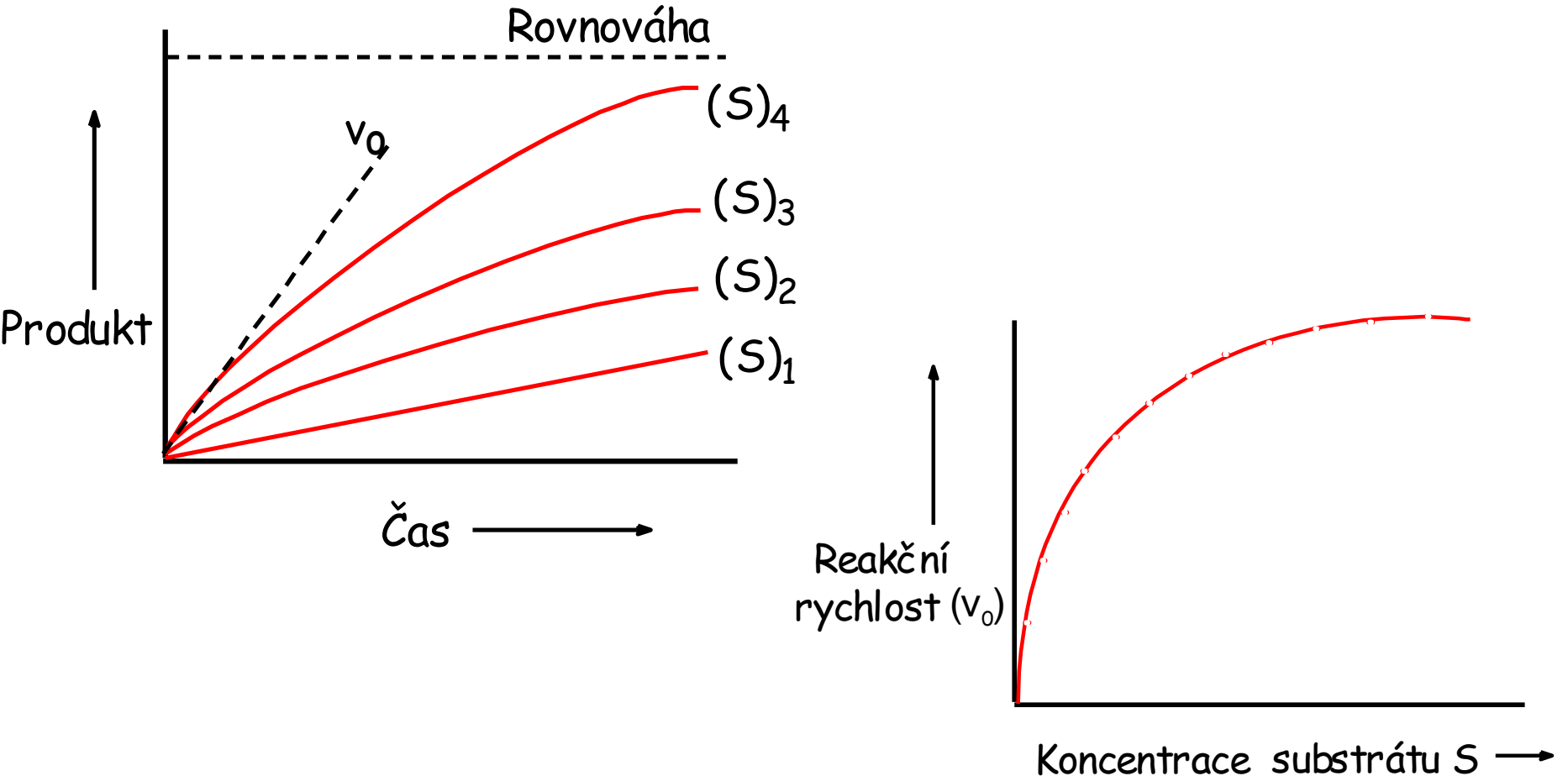
- Nejjednodušší způsob jak prozkoumat rychlost enzymové reakce je sledování přírůstku reakčního produktu jako funkce času.
- Množství produktu s časem roste, respektive se koncentrace substrátu a produktu s časem nemění. Byla dosažena rovnováha.
- Účelnější je sledování reakce ve směru k produkci produktu (dopředná reakce).
- Definice rychlosti reakce v_0 : Počet molů substrátu nebo produktu přeměněných za sekundu na počátku (těsně po startu) reakce ($t \approx 0$). Množství enzymu se nemění - zůstává stejné.
- Vyneseme v_0 proti koncentraci substrátu $[S]$. Získáme hyperbolickou závislost.
- V roce 1913 vytvořili Leonor Michaelis a Maud Mentenová jednoduchý model:

Enzymová kinetika. Rovnice Michaelise a Mentenové a její konsekvence.

- •
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$
- • Zjednodušení, zpětná přeměna produktu na komplex ES je neměřitelná - počáteční rychlost !!!
- •
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$
- • Zpětná rychlost je nulová: $k_{-2} \cdot [E] \cdot [P] = 0$
- Vytvoříme graf, kde vyneseme v_0 pro každou koncentraci substrátu při počáteční rychlosti (hyperbola).

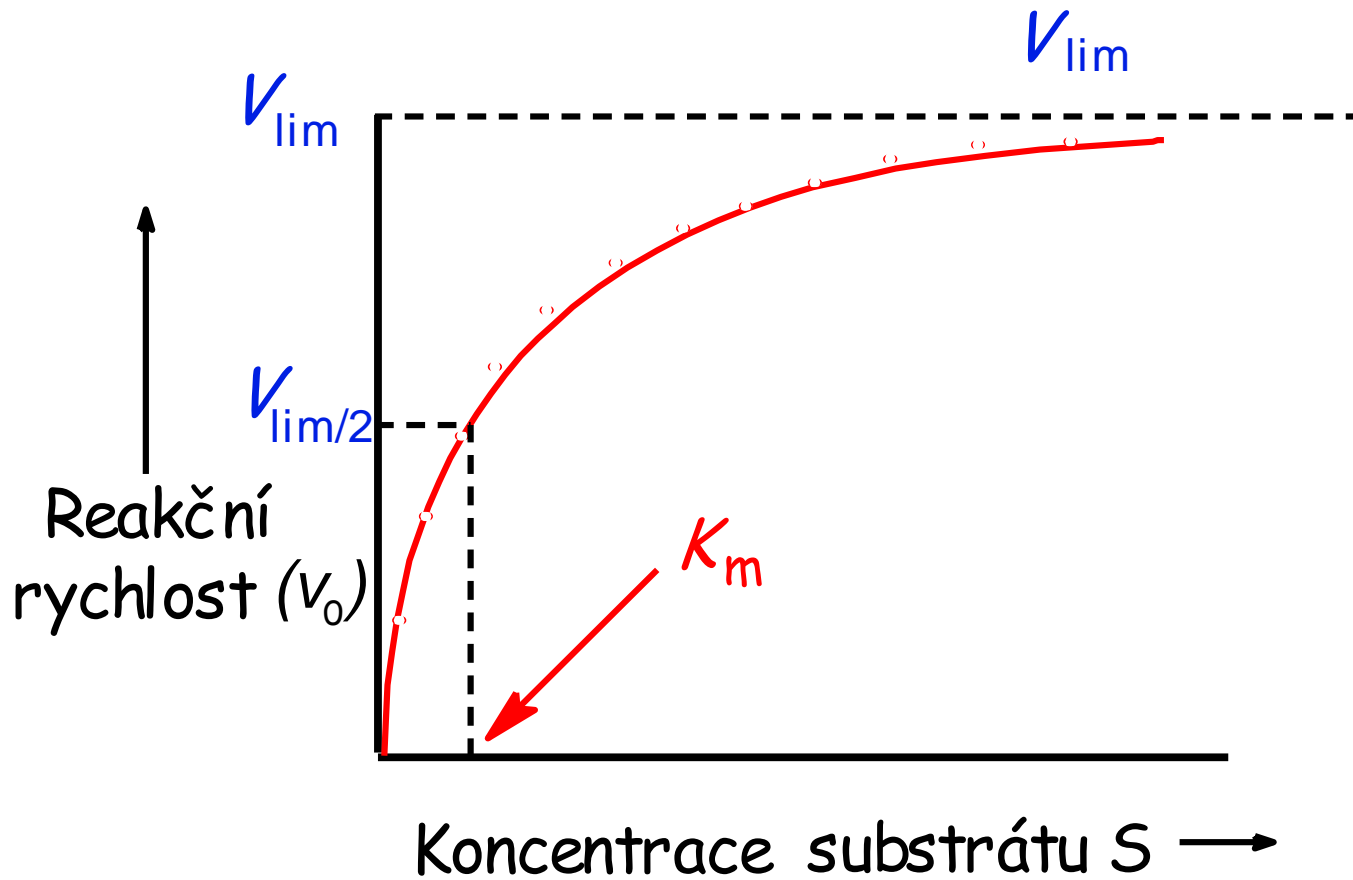
Určení vztahu mezi počáteční rychlostí a koncentrací substrátu. Vytvořený produkt za časovou jednotku. Počáteční rychlost v_0 pro každou koncentraci substrátu (S) se určí ze sklonu křivky v počátku.

Hodnoty v_0 jsou v druhém grafu vyneseny proti konc. $[S]$.



Kinetika Michaelise a Mentenové.

Závislost počáteční rychlosti (v_0) na koncentraci substrátu [S].



Rovnice Michaelise a Mentenové a její konsekvence.

- Při odvození kinetické rovnice Michaelise a Mentenové uplatnili G. Briggs a J. Haldane v roce 1924 další zjednodušující podmínku:
- „Steady - state assumption“, zjednodušení ustálený stav.
- Ustálený stav znamená, že se během enzymové reakce koncentrace meziprojektu [ES] nemění, mění se pouze koncentrace substrátu a produktu. Tohoto stavu je dosaženo, když je rychlost tvorby komplexu ES rovna rychlosti jeho rozpadu.
- Na základě výše uvedeného byla odvozena rovnice Michaelise a Mentenové v tomto tvaru:
 - $v_0 = V_{lim} \cdot [S] / [S] + K_m$
 - K_m je Michaelisova konstanta (z odvození: $K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$), respektive: $[E] \cdot [S] / [ES]$.
 - Michaelisova konstanta má rozměr koncentrace a je nezávislá na koncentraci enzymu i substrátu !!

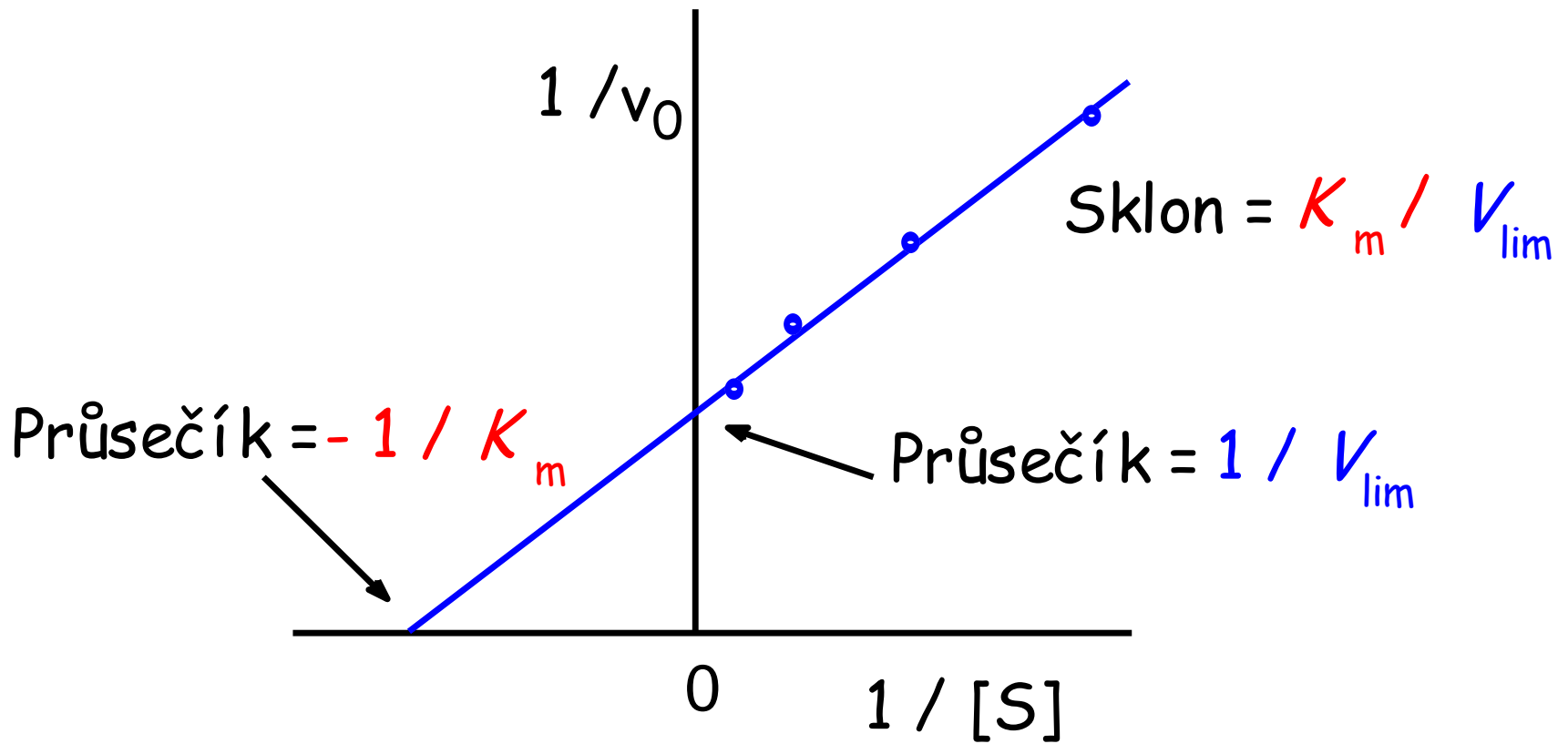
Rovnice Michaelise a Mentenové a její konsekvence.

- Při velmi nízkých koncentracích substrátu, když $[S]$ je mnohem menší než V_{lim} pak $v_0 = (V_{lim} / K_m) \cdot [S]$. $[S]$ dostáváme reakci prvního řádu s rychlostí přímo úměrnou $[S]$.
- Když je koncentrace substrátu vysoká, $[S]$ je mnohem vyšší než K_m , pak $v_0 = V_{lim}$; tj. reakce probíhá limitní rychlostí, reakce nultého řádu nezávislá na koncentraci substrátu.
Když je $[S]$ rovno K_m pak $v_0 = V_{lim} / 2$!!
- K_m je rovna koncentraci substrátu při které má enzymová reakce rychlost rovnou $V_{lim} / 2$.

Dvojnásobně reciproké vynesení dle Lineweaver a Burka.

- Nevýhodou grafu závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátu je nemožnost přesně určit hodnotu V_{lim} .
- Používá se počítačové zpracování křivky (derivace V_{lim} , V_{lim} a K_m).
- V praxi se často používá úprava rovnice Michaelise a Mentenové dle Lineweaver a Burka, kteří převedli původní rovnici rovnoosé hyperboly na přímku. Dvojnásobně reciproké vynesení.
- $$1 / v_0 = K_m / V_{lim} \cdot 1 / [S] + 1 / V_{lim}$$
- Získáme přímkový graf ($y = kx + q$), přímka neprochází počátkem, průsečík s osou y je $1 / V_{lim}$, sklon K_m / V_{lim} , průsečík na ose x je $-1 / K_m$.

Dvojnásobně reciproké vynesení dle Lineweaver a Burka.



Hodnoty K_m a V_{lim} charakterizují enzymy.

- Hodnoty K_m většiny enzymů se pohybují mezi 10^{-1} až 10^{-7} M.
- Hodnoty K_m závisí daném substrátu, pH, iontové síle roztoku a teplotě. Doporučená teplota pro kinetická měření je 30°C .
- Michaelisova konstanta má dva významy: Reprezentuje koncentraci substrátu při které je obsazena polovina aktivních míst. Při měření aktivity enzymů je nutné saturovat enzym substrátem. Doporučuje se měřit při koncentracích substrátu 10 až 100x K_m . U mnoha enzymů reprezentuje K_m přibližnou koncentraci substrátu *in vivo*.
- K_m je ve vztahu k rychlostním konstantám jednotlivých fází enzymové reakce.
- $K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$. V případě, že k_{-1} je mnohem větší než k_2 , znamená to, že komplex ES disociuje na E + S rychleji než se tvoří produkt.
- $K_m \approx k_{-1} / k_1$, což odpovídá disociační konstantě komplexu ES !!
- **Konsekvence: Vysoká hodnota K_m slabou vazbu substrátu na enzym, nízká hodnota K_m silnou vazbu. Afinity enzymu k danému substrátu.**

Hodnoty K_m a V_{lim} charakterizují enzymy.

- **Limitní rychlost V_{lim} reprezentuje číslo přeměny enzymu** - počet molekul substrátu přeměněných enzymem na produkt za sekundu při plně substrátem saturovaném enzymu.
- V tom případě je číslo přeměny rovno k_2 a označuje se jako k_{cat} !
- V případě, když koncentrace substrátu mnohokrát převyšuje K_m je rychlost enzymové reakce rovna V_{lim} a potažmo k_{cat} .
- Za fyziologických podmínek je koncentrace substrátu mnohem nižší než K_m a rychlost je mnohem nižší než k_{cat} - enzym není saturován substrátem.
- Jak lze číselně charakterizovat tento stav ?
- Za této situace je téměř veškerý enzym volný. Rychlost enzymové reakce závisí na poměru k_{cat} / K_m .
- Tento poměr je měřítkem efektivity reakce. Je to poměr rychlosti k afinitě enzymu k substrátu !

Hodnoty K_m a V_{lim} charakterizují enzymy.

- Rychlost enzymové reakce a tedy hodnota k_{cat} / K_m nemůže být vyšší než difúze (vstup substrátu do aktivního místa).
- Hodnota k_{cat} / K_m může být maximálně 10^8 až $10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.
- Čísla přeměny některých enzymů:

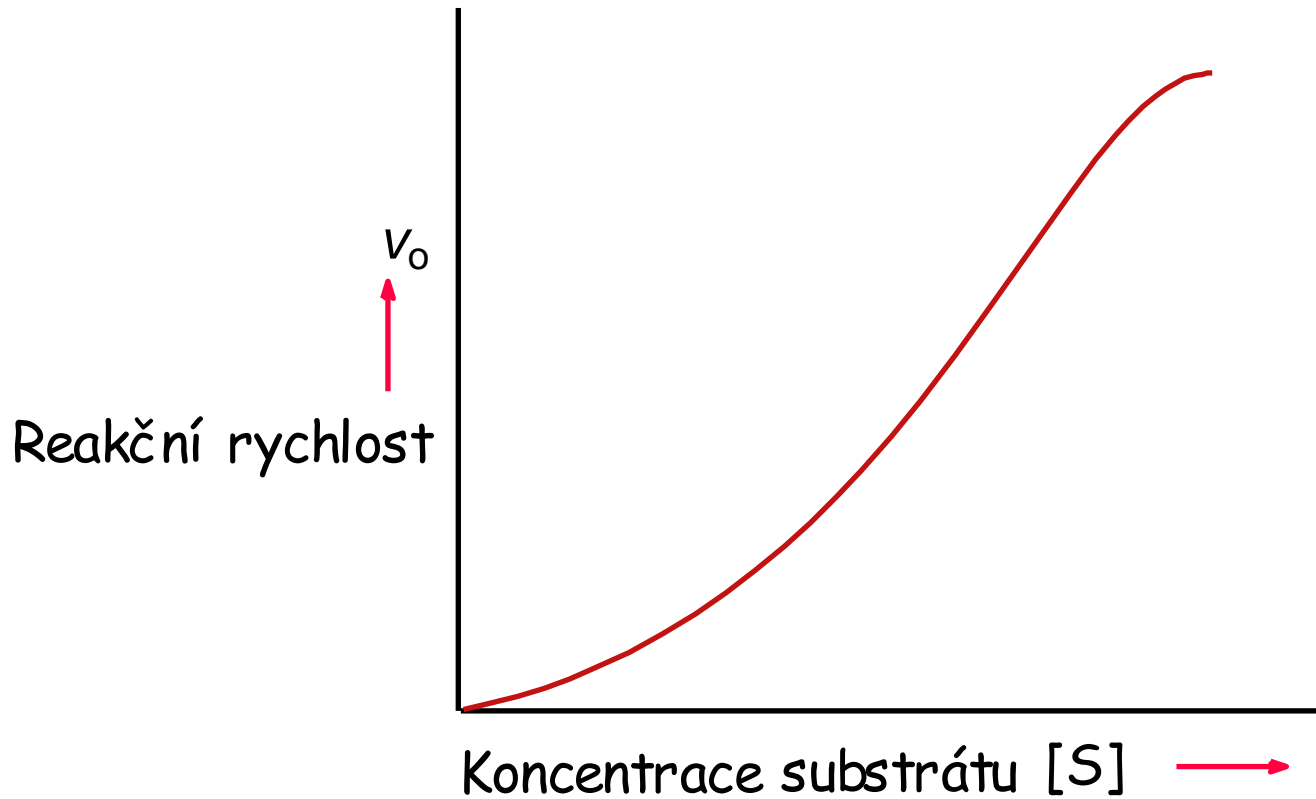
• Karbonátanhydratasa	600 000
• Acetylcholinesterasa	25 000
• Chymotrypsin	100
• DNAPolymerasa I	15

Vícesubstrátové reakce.

- Sekvenční reakce. Všechny substráty musí být navázány na enzym než se oddělí kterýkoliv produkt.
- Náhodné sekvenční reakce. Vstup substrátů a oddělení kteréhokoliv produktu je náhodné.
- Ping - pongový mechanismus. Jeden nebo více produktů se z enzymu oddělí dříve než se naváží všechny substráty.
- Zobrazení sekvencí dle W.W. Clelanda:
- Příklad sekvenční reakce. Laktátdehydrogenasa.
- $\text{Pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Laktát} + \text{NAD}^+$



Graf závislosti reakční rychlosti allosterického enzymu na koncentraci substrátu.

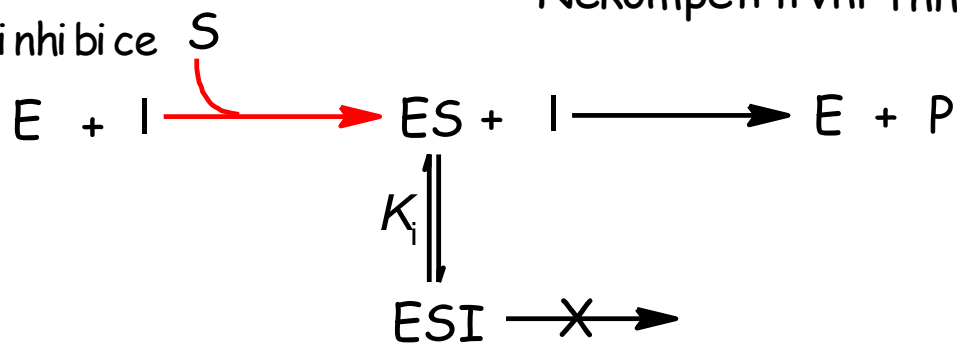
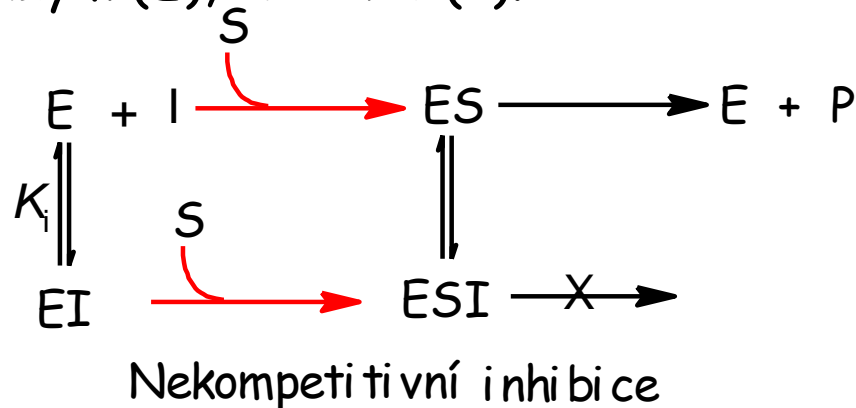
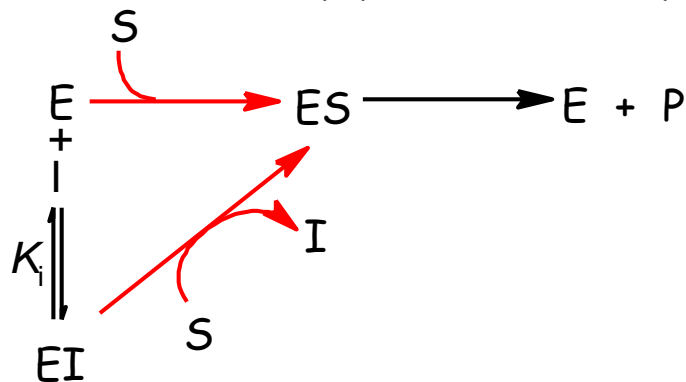


Allosterické enzymy.

- Allosterické enzymy se neřídí kinetikou Michaelise a Mentenové.
- Allosterické enzymy jsou proteiny s kvarterní strukturou - jsou složeny z podjednotek.
- Graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu má esovitý (sigmoidní) tvar.
- Allosterické enzymy mají více katalytických a regulčních míst do kterých se váží aktivátory a inhibitory.
- Mezi podjednotkami dochází ke kooperaci - buď pozitivní nebo negativní.
- Allosterické enzymy jsou obvykle na regulačních a klíčových místech metabolických drah (např. fosfofruktokinasa v glykolýze)
- Typickým allosterickým proteinem je hemoglobin.

Inhibice enzymové aktivity.

- Malé organické molekuly mohou reagovat s enzymy tak, že zpomalují jejich reakční rychlost. Inhibují - brzdí !!
- Inhibitor (I), Substrát (S), Enzym (E), Produkt (P).



Inhibice enzymové aktivity.

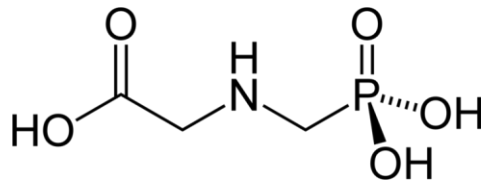
- Enzymová inhibice může být ireversibilní nebo reversibilní.
- Ireversibilní inhibitor disociuje z vazby na enzym velmi pomalu nebo vůbec. Obvykle je na enzym vázán kovalentně.
- Příkladem je aspirin (acetylsalicylová kyselina), který se váže kovalentně na enzym cyklooxygenasu a snižuje tak syntézu signálních molekul zánětu.
- Reversibilní inhibitor je charakterizován rychlou disociací z vazby na molekulu enzymu (komplex enzym-inhibitor).
- Tři typy reversibilních inhibitorů:
 - A) Kompetitivní
 - B) Nekompetitivní
 - C) Akompetitivní.

Inhibice enzymové aktivity.

- **Kompetitivní inhibitor** soutěží se substrátem o aktivní místo. Buď se váže substrát nebo inhibitor. Kompetitivní inhibitor je často strukturně podobný substrátu. Kompetitivní inhibice se dá potlačit nadbytkem substrátu. V_{lim} se nemění, K_m roste.
- Např. malonát je kompetitivním inhibitorem sukcinátdehydrogenasy, kde soutěží s sukcinátem (citrátový cyklus).
- Disociační konstanta inhibitoru je: $K_i = [E] [I] / [EI]$. Čím menší hodnota inhibiční konstanty K_i tím silnější inhibitor.
- **Nekompetitivní inhibitor** se váže na enzym nebo na komplex enzym-substrát nezávisle na vazbě substrátu. Váže se na jiné místo než substrát, ale omezuje tvorbu produktu. Nekompetitivní inhibitor snižuje koncentraci funkčního enzymu. Snižuje k_{cat} . Nekompetitivní inhibici nelze potlačit nadbytkem substrátu.
- Z ternárního komplexu EIS se netvoří produkt. V_{lim} klesá, K_m se nemění.

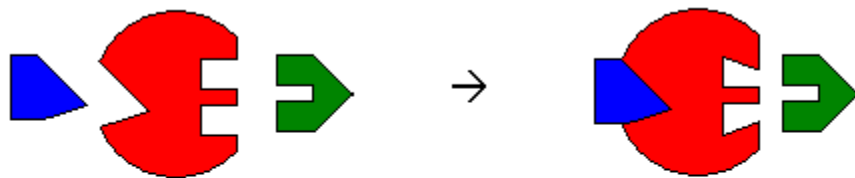
Inhibice enzymové aktivity.

- Nekompetitivní inhibice poskytuje dvě disociační konstanty - (inhibiční konstanty) komplexů EI a EIS. Při pravé nekompetici jsou obě konstanty shodné.
- Příklad nekompetitivního inhibitoru: Jaterní alkoholdehydrogenasa (ADH) je nekompetitivně inhibována fomepizolem (chemicky 3 - methylpyrazol). ADH je zablokována, netvoří se mravenčí kyselina a toxické alkoholy (methanol) se vyplavují močí.
- **Akompetitivní inhibitor** se váže na enzym až po vazbě substrátu (substrát vytvoří vazebné místo pro inhibitor). Komplex EIS neposkytuje produkt. V_{lim} klesá, K_m klesá.
- Jako příklad lze uvést herbicid glyfosát (Roundap), který blokuje u rostlin metabolickou dráhu tvorby aromatických aminokyselin.

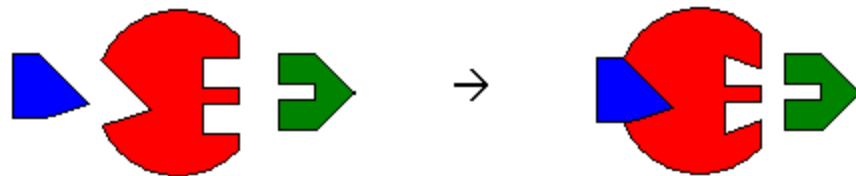


Schematické znázornění vazby inhibitorů na enzym.

- Nahoře - vazba kompetitivního inhibitoru na enzym do stejného místa jako substrát.
- Dole - vazba nekompetitivního inhibitoru na enzym.



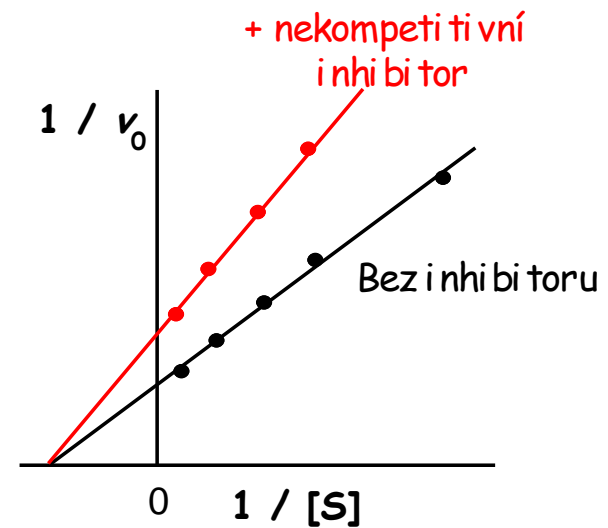
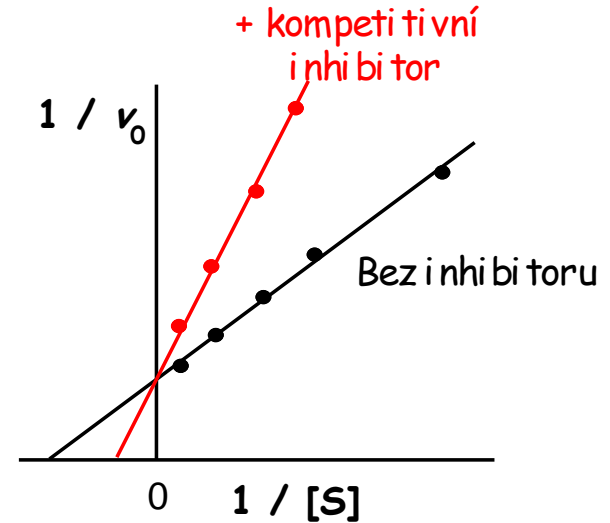
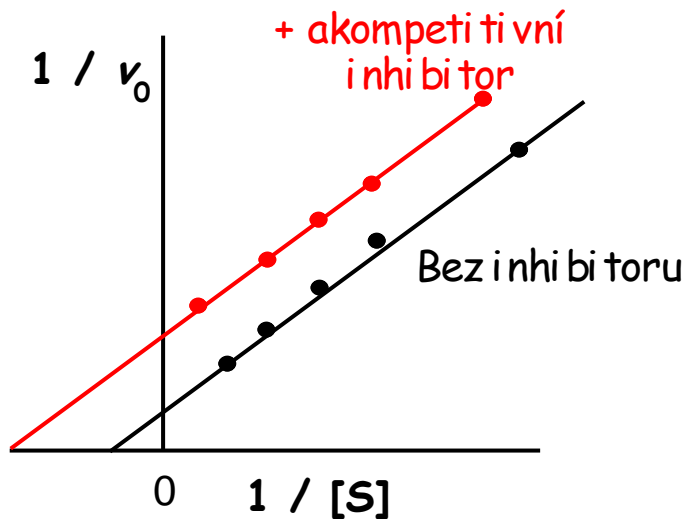
ENZYM SUBSTRÁT INHIBITOR



ENZYM SUBSTRÁT INHIBITOR

Inhibice enzymové aktivity.

- Reversibilní inhibice se nejlépe zobrazují ve vynesení dle Lineweavera a Burka (dvojitě reciproké vynesení).



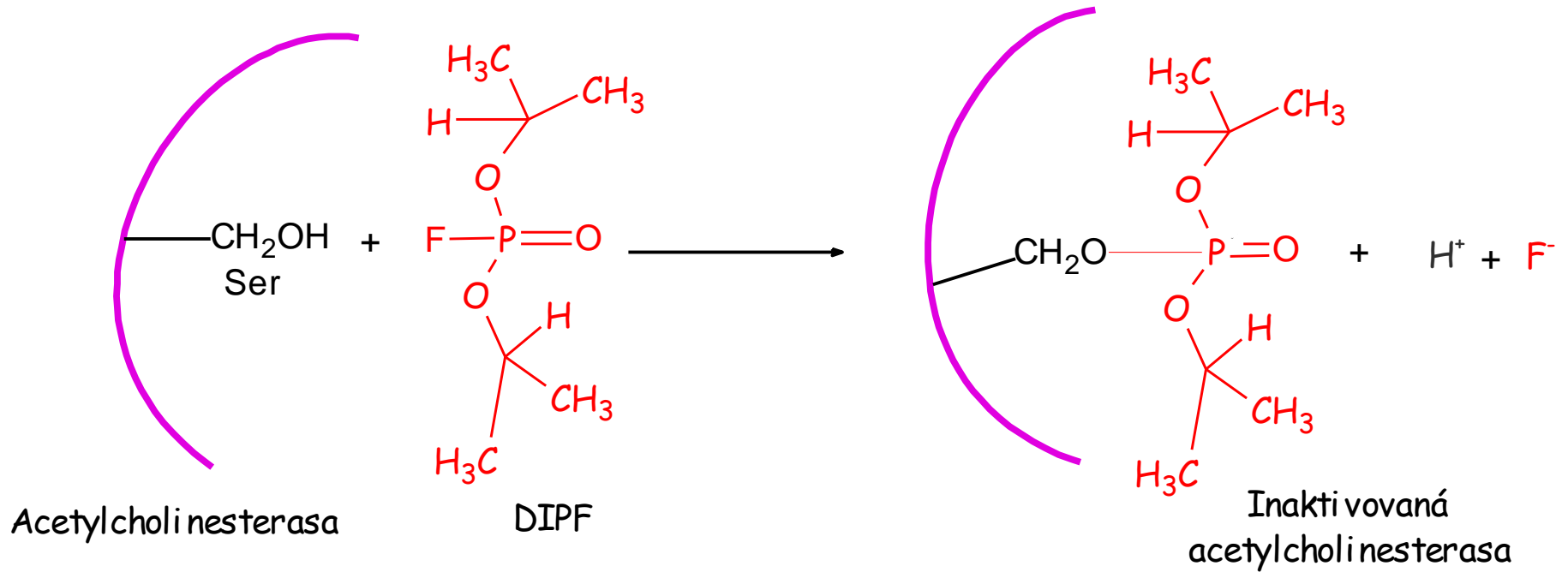
Inhibice enzymové aktivity.

- Rovnice dvojitého reciprokého vynesení při kompetitivní inhibici:
- $1 / v_0 = 1 / V_{lim} + K_m / V_{lim} \cdot (1 + [I] / K_i) \cdot (1 / [S])$
- Rovnice dvojitého reciprokého vynesení při akompetitivní inhibici:
- $1 / v_0 = K_m / V_{lim} \cdot 1 / [S] + 1 / V_{lim} \cdot (1 + [I] / K_i)$
- Rovnice dvojitého reciprokého vynesení při nekompetitivní inhibici:
- $1 / v_0 = K_m / V_{lim} \cdot 1 / [S] + 1 / V_{lim} \cdot (1 + [I] / K_i)$

Ireversibilní inhibice.

- Ireversibilní inhibitor se váže na apoenzym pevnou, často kovalentní vazbou. Ireversibilní inhibitory jsou využívány k identifikaci esenciální skupiny v aktivním místě enzymu. Označují se jako „affinity labels nebo reaktivní substrátová analoga“.
- Jako příklad lze uvést organofosfáty, které se váží do aktivního místa cholinesterasy (na vedlejší řetězec serinu), která se účastní přenosu nervového vzruchu. Např. diisopropylfosfofluorid (DIFP).

Ireversibilní inhibice acetylcholinesterasy DIPF - skupinově specifické činidlo (affinity label)



Názvosloví enzymů a rozdělení enzymů do tříd.

- U enzymů se používají často triviální názvy jako např. enzym štěpící močovinu na oxid uhličitý a amoniak se nazývá ureasa, enzymy hydrolyzující proteiny trypsin, pepsin, atd.
- Důležitější je systematické názvosloví, které charakterizuje chemickou reakci katalyzovanou enzymem s koncovkou **-asa**.
- Např. alkoholdehydrogen**asa**, aminoxid**asa**, karbamoylfosfátsynthet**asa** atp.
- Mezinárodní biochemická unie seřadila všechny známé a uznané enzymy do šesti základních tříd. Každý řádně charakterizovaný enzym má vedle systematického názvu ještě EC (enzyme comission) číslo složené ze čtyř číslic. První označuje třídu, druhé podtřídu, třetí podpodtřídu a čtvrté je pořadovým číslem v podpodtřídě.
- Alkoholdehydrogenase patří EC 1.1.1.1

Tabulka enzymových tříd (EC x.y.z.č). x = 1 až 6.

- **1. třída** - oxidoreduktasy (katalyzují intermolekulární oxidačně-redukční reakce, např. ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH + H⁺);
- **2. třída** - transferasy (přenos chemických skupin z molekuly donoru na akceptor, např. ATP + glukosa → glukosa-6-fosfát + ADP);
- **3. třída** - hydrolasy (štěpení vazeb vodou, např. sacharosa + H₂O → glukosa + fruktosa);
- **4. třída** - lyasy (nejčastěji adice na dvojnou vazbu nebo eliminace za vzniku dvojné vazby, např. hydratace fumarátu v citrátovém cyklu $^{-}\text{OOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}^{-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow ^{-}\text{OOC}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COO}^{-}$);
- **5. třída** - isomerasy (isomerace, např. D-glukosa → D-fruktosa nebo L-alanin → D-alanin);
- **6. třída** - ligasy (spojení dvou molekul, k němuž se dodává energii štěpením ATP nebo GTP, např. karboxylace pyruvátu na oxaloacetát $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{COO}^{-} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow ^{-}\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{COO}^{-} + \text{ADP} + \text{P}_i$).

Stanovení aktivity enzymů.

- Enzymy jsou obsaženy v biologickém materiálu v tak nízkých koncentracích, že je nelze stanovit přímo. Naproti tomu lze s výhodou využít jejich substrátové specifity a značné katalytické účinnosti při **nepřímém stanovení kinetickou metodou**, tj. na základě **rychlosti**, jakou enzym katalyzuje přeměnu **substrátu na produkt** ve zvoleném časovém intervalu.
- Tato metoda je dostatečně specifická za předpokladu, že na substrát působí v daném materiálu jen jeden enzym. Je i dostatečně citlivá a přesná, je-li zvolena vhodná koncentrace substrátu vzhledem k enzymu a vhodná **metoda stanovení úbytku substrátu nebo přírůstku produktu v čase**, neboli vhodná **metoda stanovení rychlosti přeměny** substrátu na produkt.
- Aby byla zajištěna srovnatelnost těchto změn v jednotlivých časových intervalech, je účelné, aby **úbytek substrátu nebo přírůstek produktu v čase byl lineární**, tj. aby reakce probíhala podle **kinetiky nultého řádu**, s konstantní rychlostí v .

Stanovení aktivity enzymů.

- Toho by bylo dosaženo exaktně vzato jen tehdy, kdyby veškerý enzym byl substrátem nasycen, tj. kdyby veškerý enzym o celkové koncentraci E byl vázán ve formě enzym-substrátového komplexu ES , což je možné jen při velkém nadbytku substrátu. Pak probíhá enzymová reakce limitní rychlostí V (V_{lim}).
- Za podmínek určování V (V_{lim}), tj. při značném nadbytku substrátu S , lze tedy kineticky stanovit E . Množství enzymu, správněji množství enzymové aktivity, pak vyjadřujeme v katalach. Toto novější vyjádření vychází, na rozdíl od staršího, ze základního látkového množství 1 mol a z časové jednotky 1 sekunda. Jako jednotka enzymové aktivity se tedy nyní označuje takové množství enzymové aktivity, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za sekundu. Tato nová jednotka se označuje katal (ve zkratce kat). Uvedená jednotka je ovšem pro praxi příliš veliká. Ve většině případů je vhodnější vyjádření v mikrokatalach (μkat) = 10^{-6} kat, nanokatalach (nkat) = 10^{-9} kat a pikokatalach (pkat) = 10^{-12} kat.

Vliv teploty na aktivitu enzymů.

- Většina chemických reakcí závisí na teplotě a reakce katalyzované enzymy v tom nejsou výjimkou.
- **Teplotní koeficient Q_{10}** je poměr, kolikrát se rychlost chemické reakce změní se vzrůstem teploty o $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. U většiny chemických reakcí činí tento poměr asi 2, ale pro některé fyziologické pochody, katalyzované enzymy, je vyšší.
- Pro většinu enzymů je **optimální teplota** zhruba shodná s teplotou, která existuje v prostředí buňky, a pro teplokrevné organismy, k nimž patří **člověk**, činí **$37\text{ }^{\circ}\text{C}$** . U rostlin **$30\text{ }^{\circ}\text{C}$** .
- Pro některé bakterie, žijící v extrémních podmínkách, může optimální teplota (ale i optimální pH a optimální iontové složení) dosahovat značně extrémních hodnot. Např. některé nikroorganismy žijící v horkých přírodních pramenech mají optimální teplotu pro své enzymy blízko bodu varu vody.
- U savčích enzymů však takové teploty leží již za optimální teplotou. V takových podmínkách je kinetická energie enzymových molekul tak velká, že překročí energetickou bariéru pro rozrušení sekundárních vazeb a interakcí, udržujících enzymovou molekulu v té konformaci (sekundární a terciární struktúře), která je pro enzymovou katalýzu nezbytná. **Tím nastává denaturace provázená úbytkem až i ztrátou enzymové aktivity.**

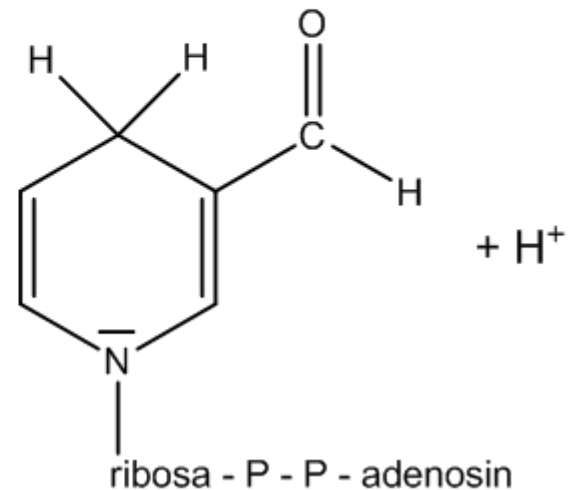
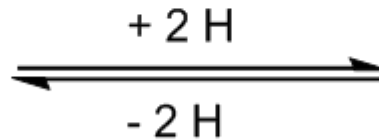
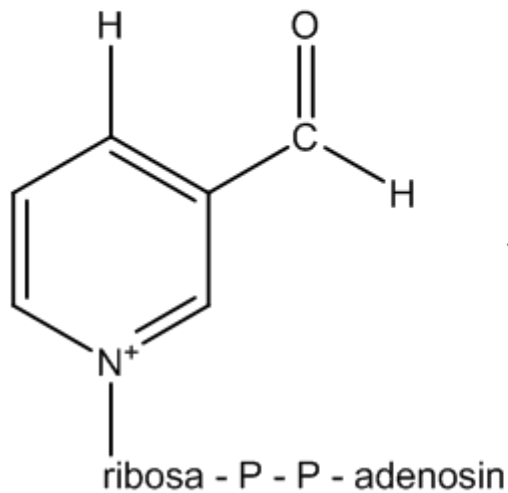
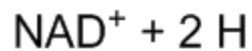
Závislost enzymové aktivity na pH.

- Závislost enzymové aktivity na pH je jiným významným činitelem, ovlivňujícím aktivitu **enzymů**. Také tuto závislost lze vyjádřit graficky zvonovitou křivkou s vrcholem u **optimálního pH**, které u většiny enzymů leží v rozmezí **5,0 až 9,0**.
- Některé enzymy jsou však výjimkou, např. pepsin, působící v silně kyselém prostředí žaludeční šťávy, má optimální pH mezi **1,5 až 2,0**.
- Vliv pH na vzrůst enzymové aktivity až do dosažení optimálního pH lze vyložit ovlivněním disociace ionizovatelných funkčních skupin substrátu i enzymu, které odpovídají za interakci enzymu se substrátem při tvorbě *enzym-substrátového komplexu*, ale i za *udržování konformace enzymu*. Krom toho se některé ionizovatelné funkční skupiny v *aktivním místě* podílejí na acidobazické katalýze. Protože enzymy jsou proteiny, jsou stále jako amfolyty jen v určitém rozmezí hodnot pH blízkém neutralitě.
- **Extrémně kyselé nebo alkalické roztoky** enzymy denaturují opět změnou konformace. To je podmíněné rozrušením sekundárních vazeb a interakcí, někdy i rozpadem kvartérní struktury na podjednotky nebo disociací neproteinové složky enzymu (apoenzym).

Vliv iontů na enzymy

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

Warbugův optický test. (NAD^+ = nikotinamidadenindinukleotid).



Warbugův optický test.

- Převážná většina dnes rutinně používaných metod ke stanovení aktivity enzymů je založena přímo nebo nepřímo na fotometrii absorbance reakčních směsí, které obsahují pyridinový koenzym. Tento princip dal také metodě její označení „**optický test**“.
- Reverzibilní hydrogenace nikotinamidadeninukleotidu (NAD^+), která nastává na pyridinovém kruhu nikotinamidu, vede k redukované formě ($\text{NADH} + \text{H}^+$) a je provázena výraznou změnou absorpčního spektra. Zatímco oxidovaná forma (NAD^+) má absorpční maximum při vlnové délce 260 nm, je zrušení aromatického charakteru pyridinového jádra a jeho přechod v chinoidní formu ($\text{NADH} + \text{H}^+$) provázeno vznikem dalšího absorpčního maxima při 340 nm.
- Velikost, případně změny absorbance při vlnové délce 340 nm jsou přímo úměrné počtu redukovaných molekul koenzymu. Přeměna jednoho molu koenzymu zase odpovídá přeměně jednoho molu substrátu, a navíc lze tuto přeměnu sledovat v čase, tedy kontinuálně měřit rychlost reakce pomocí spektrofotometru.
- Tak je možné připravit reakční směs ze sledovaného enzymu (nebo biologického materiálu, v němž ho stanovujeme), koenzymu a příslušného substrátu v optimální koncentraci, a za optimálního pH i teploty zjišťovat reakční rychlost měřením změn absorbance na vhodném fotometru při vlnové délce 340 nm.

Spřažené reakce.

- Vzhledem ke skutečnosti, že NAD^+ je koenzymem jen některých dehydrogenas a že existuje řada klinicky významných enzymů z jiných tříd než jsou právě oxidoreduktasy, používá se vedle „jednoduchého optického testu“ ještě častěji „**složených optických testů**“, kdy se výše uvedeného principu využívá pouze jako indikátorové reakce, zatímco vlastní reakce měřící aktivitu příslušného enzymu je předřazena nebo dokonce spřažena v celou sérii s dalšími pomocnými reakcemi.
- Např:
- Enzym: **Alaninaminotransferasa EC 2.6.1.2**
- Reakce: Alanin + 2-oxoglutarát \rightleftharpoons glutamát + pyruvát
- Indikační reakce: pyruvát + $\text{NADH} + \text{H}^+$ \rightleftharpoons laktát + NAD^+
- Spektrofotometricky se sleduje úbytek absorbance při 340 nm, který početně odpovídá aktivitě alaninaminotransferasy.