

Stanovení enzymové aktivity

Enzymy jsou v biologickém materiálu obsaženy ve velmi nízkých koncentracích. Pro popis biochemických dějů je navíc užitečnější znát jejich účinnost spíše než samotné množství enzymu. Namísto měření koncentrace enzymu se proto většinou s výhodou využívá substrátové specifčnosti enzymů a jejich značné katalytické účinnosti při **měření aktivity enzymu**. Množství enzymu tedy kvantifikujeme nepřímou na základě **rychlosti**, jakou enzym katalyzuje přeměnu **substrátu na produkt** ve zvoleném **časovém** intervalu. Tato metoda je dostatečně specifická za předpokladu, že na substrát působí v daném materiálu jen jeden enzym. Je i dostatečně citlivá a přesná, je-li zvolena vhodná koncentrace substrátu vzhledem k enzymu a vhodná **metoda stanovení úbytku substrátu nebo přírůstku produktu v čase**, neboli vhodná metoda **stanovení rychlosti přeměny** substrátu na produkt.

Enzymová aktivita

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

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

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

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

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

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

Michaelisova konstanta

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

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

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

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

Stanovení Michaelisovy konstanty

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

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

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

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

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

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

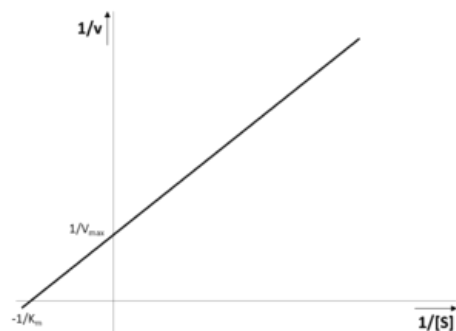
Vynášíme-li $1/v$ na svislou osu a $1/[S]$ na vodorovnou osu, budou za podmínek kinetiky 2. řádu naměřená data ležet v přímce. Tato přímka protíná svislou osu v hodnotě $1/V_{\max}$ a vodorovnou osu v hodnotě $-1/K_m$.

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

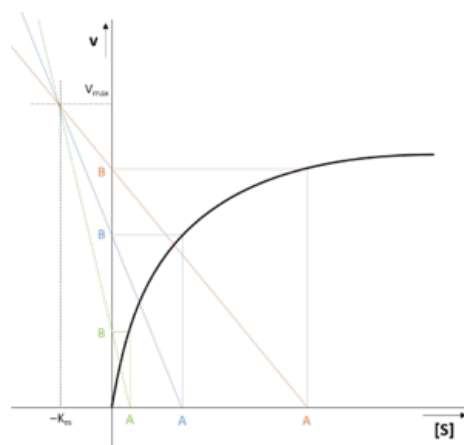
1. Pro několik koncentrací substrátu $[S]$ naměříme experimentálně reakční rychlosti v . Tyto hodnoty vyneseme do grafu jako závislost v na $[S]$.
2. Pro každý vynesení bod vyznačíme hodnotu $[S]$ na vodorovné ose (bod A) a hodnotu v na svislé ose (bod B). Sestrojíme přímku, která prochází body A a B.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

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

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



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



Vynesení podle Eisenthala a Cornish-Bowdena