

enzymy

- Kataliza
- Kinetyka
- Inhibicja

reakcje chemiczne

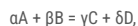
Reakcja chemiczna, przemiana chemiczna to przemiana jednych substancji, zwanych substratami, w inne substancje, zwane produktami reakcji chemicznej.

Substratami i produktami, ogólnie – reagentami, mogą być:

- atomy,
- cząsteczki
- jony,
- rodniki.

Jeśli wszystkie reagenty występują w tej samej fazie (np. są gazami) reakcję chemiczną nazywa się reakcją homogeniczną, jeśli w różnych fazach – reakcją heterogeniczną. Reakcje homogeniczne zachodzą jednocześnie w całej fazie (całej objętości układu), heterogeniczne – głównie na granicy faz.

Stosunki ilościowe między reagentami podaje równanie stechiometryczne, zwane równaniem chemicznym. W równaniu tym substraty umieszcza się po lewej stronie, produkty po prawej:

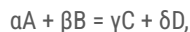


- gdzie α , β , γ i δ są współczynnikami stechiometrycznymi;
- równanie chemiczne odzwierciedla prawo zachowania masy spełnione podczas reakcji chemicznej, podaje jej sumaryczny, a nie rzeczywisty przebieg.

Reakcje chemiczne zwykle składają się z kilku następujących po sobie etapów zwanych reakcjami elementarnymi (procesami elementarnymi).

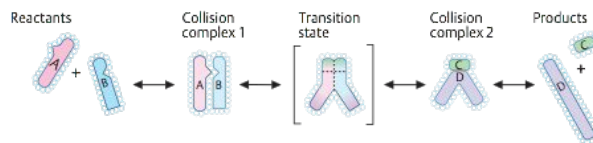
przebieg reakcji

Dla reakcji:



- substraty A i B znajdujące się w roztworze wodnym są otoczone cząsteczkami wody (powłoczka hydratacyjna).

Poruszają się w różnych kierunkach cząsteczki te mogą przereagować tylko jeżeli zderzą się ze sobą w odpowiedniej orientacji – co następuje rzadko.



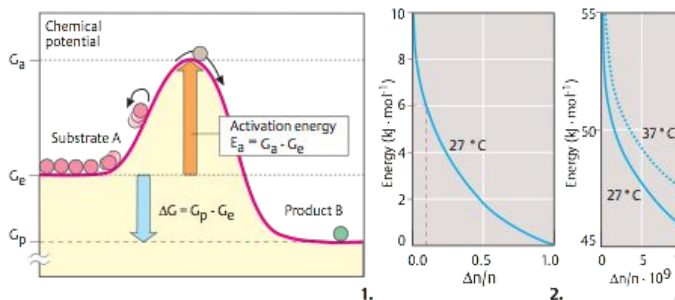
stan przejściowy

Przed konwersją w produkty C i D kompleks „kolizyjny” musi przejść przez stan przejściowy, stworzenie którego wymaga dużego nakładu energii aktywacji (E_a).

Dlatego też stan przejściowy występuje jeszcze rzadziej niż stan „kolizyjny” – nie wszystkie kompleksy A-B są w stanie wyprodukować potrzebną energię.

Zdecydowana większość tej energii potrzebna jest do usunięcia otoczki hydratacyjnej z cząsteczek substratów

Z tych powodów spontaniczne reakcje są bardzo rzadkie nawet jeżeli są termodynamicznie możliwe.



Substrat A ma swój potencjał chemiczny (G_a), podobnie jak produkt B (G_p), zmiana wolnej energii reakcji ΔG_0 jest różnicą tych potencjałów.

Aby substrat A został przekonwertowany w produkt B musi zostać pokonana bariera potencjału energetycznego – pik G_e leży znacznie powyżej G_e . Różnica potencjałów między G_a a G_e to energia aktywacji (E_a) liczona w kJ/mol.

Dystrybucja energii jest wyrażona jako funkcja $\Delta n/n$ cząsteczek które osiągnęły lub przewyższyły dany poziom energii E.

Zmiana temperatury o 10 stopni powoduje podwojenie szybkości procesów biologicznych - reguła Q10.

katalizowane reakcje chemiczne

Podstawową funkcją enzymów jest kataliza reakcji chemicznych.

Enzymy ewoluowały przez miliony lat stąd reakcje przez nie katalizowane przewyższają reakcje chemiczne pod względem:

- szybkości,
- selektywności,
- specyficzności.

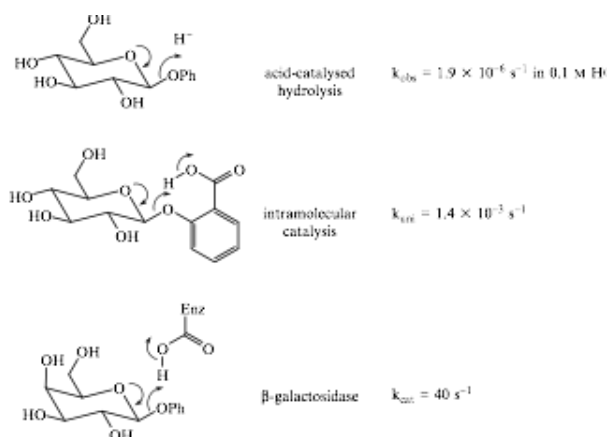
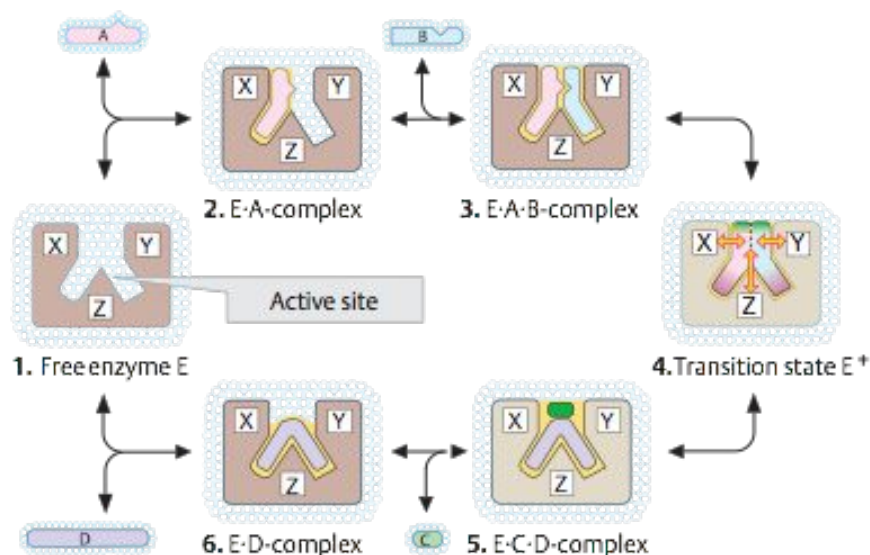


Figure 3.1 Rate acceleration of glycoside hydrolysis by intramolecular and enzyme catalysis.

aspekty katalizy enzymatycznej

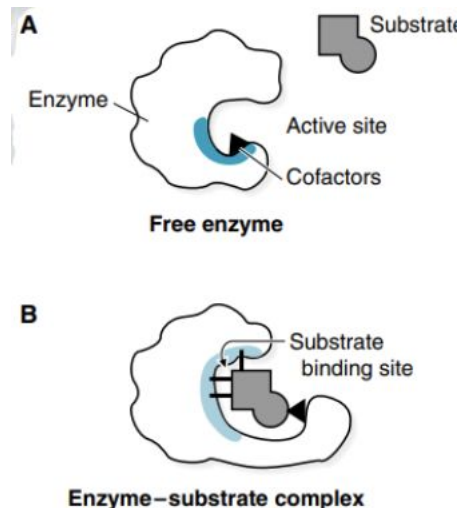


aspekty katalizy enzymatycznej

Wiązanie substratu i powstanie kompleksu enzym-substrat (ES)

Substrat(y) wiązane są na powierzchni enzymu bardzo blisko siebie w ściśle określonej konfiguracji. Ogranicza to wszelkie ruchy translacyjne i rotacyjne (substratów), które występowałyby w roztworze.

- Na początku musi dojść do zetknięcia się cząsteczki substratu i enzymu w odpowiedniej orientacji. W gruncie rzeczy proces ten jest losowy natomiast otoczenie chemiczne miejsca aktywnego enzymu może zwiększać prawdopodobieństwo takiego zetknięcia poprzez charakter chemiczny grup tworzących centrum aktywne. Specyficzność będzie zatem tutaj wynikać z komplementarności obu struktur (tj. enzymu i substratu) na poziomie struktury geometrycznej (zawady przestrzenne etc.) jak również obecności określonych grup chemicznych (oddziaływania elektrostatyczne etc.).
- Po zetknięciu, substrat jest „układany” w miejscu aktywnym w odpowiedniej orientacji głównie za pomocą słabych oddziaływań niekowalencyjnych. Na tym etapie nie można wykluczać wstecznej reakcji dysocjacji substratu od enzymu (proces jest bardzo dynamiczny i zależy od warunków otoczenia np. stężenie substratu).
- Jeśli nie dochodzi do dysocjacji (proces mniej prawdopodobny ale nie niemożliwy) substratu z miejsca aktywnego to mamy do czynienia z utworzeniem kompleksu enzym-substrat (ES)

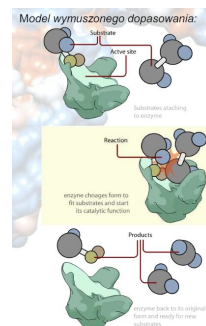
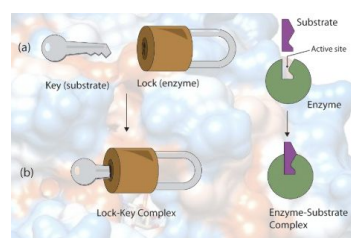


aspekty katalizy enzymatycznej

Wiązanie substratu i powstanie kompleksu enzym-substrat (ES)

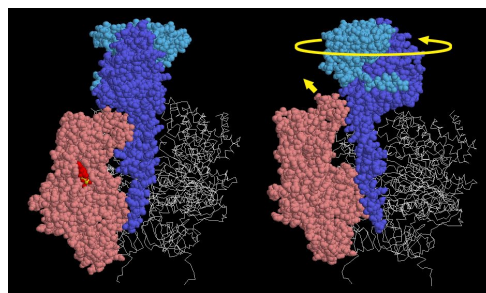
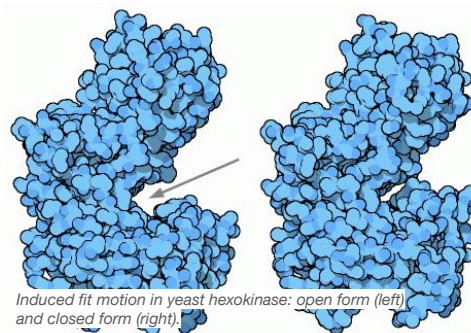
Substrat(y) wiązane są na powierzchni enzymu bardzo blisko siebie w ściśle określonej konfiguracji. Ogranicza to wszelkie ruchy translacyjne i rotacyjne, które występowałyby w roztworze.

- Modele oddziaływań pomiędzy enzymem a substratem:
 - Model klucza i zamka
 - Model wymuszonego dopasowania (ang. induced fit)



aspekty katalizy enzymatycznej

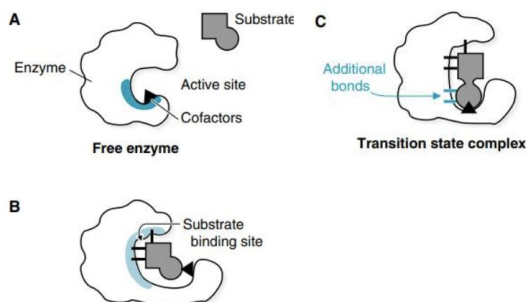
- Miejsce aktywne enzymu niekoniecznie musi być komplementarne do substratu(ów), obserwuje się zmiany pozycji atomów enzymu kiedy związany jest substrat. Zmiana ta powoduje lepsze dopasowanie między substratem i enzymem i powoduje, że reaktywne grupy enzymu ustawiają się w odpowiednim miejscu (tzw. wymuszone dopasowanie).
- Przykładem może być heksokinaza fosforylująca glukozę – związanie glukozy powoduje zmianę konformacji enzymu i zamknięcie cukru w kieszeni tworzącej miejsce aktywne, to z kolei powoduje ustawienie w odpowiednim miejscu grup reaktywnych biorących udział w katalizie
- Jest to dobry przykład zachowania białek jak motory molekularne - gdy pojawiają się te zmiany konformacyjne, wykonywana jest praca mechaniczna, umożliwiającą enzymowi wywieranie siły fizycznej na wiązania w cząsteczce substratu. To ma wpływ na destabilizację substratu, pozwalając mu przyjąć stan przejściowy, w którym naprężenia zostają zwolnione.



aspekty katalizy enzymatycznej

Destabilizacja substratu i powstanie stanu przejściowego – grupy funkcyjne aminokwasów znajdujących się w miejscu aktywnym jak również kofaktory destabilizują cząsteczkę substratu poprzez: indukowanie zmian jej konformacji, tworzenie napięć przestrzennych, zmianę otoczenia elektrostatycznego, modyfikację otoczki hydratacyjnej cząsteczki (odwodnienie - częściej lub hydratacja – rzadziej).

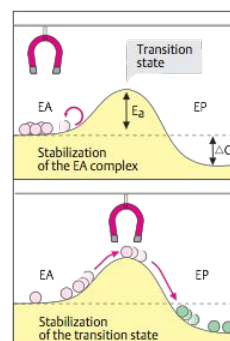
- Procesom de-stabilizacyjnym towarzyszą przemieszczenia gęstości elektronowej w strukturze substratu
- Dzięki tym działaniom, substrat w łatwiejszy sposób może przejść w stan przejściowy umożliwiając pokonanie bariery energetycznej co w przypadku reakcji niekatalizowanej byłoby dużo trudniejsze ze względu na większą wartość energii aktywacji.



aspekty katalizy enzymatycznej

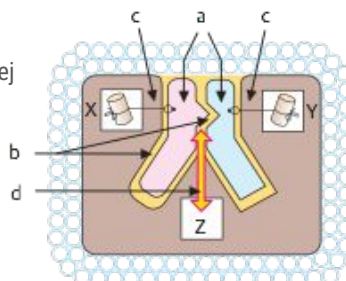
Działanie enzymu wygląda więc jak magnes na obrazku – aby substraty o energii E_a zmieniły się w produkty z energią E_p , muszą przejść wysokoenergetyczny stan przejściowy.

Rolą enzymu jest pomoc w pokonaniu tej różnicy potencjałów.



Enzymy osiągną ten cel poprzez:

- zbliżenie i ustawienie substratów we właściwej orientacji,
- usunięcie powłoki hydratacyjnej,
- stabilizację stanu przejściowego,
- kontrolowane przeniesienie grup funkcyjnych.



- Przybliżenie kształtu i orientacji przestrzennej substratu/ów.
- Wykluczenie wody z miejsca aktywnego.
- Stabilizacja stanu przejściowego.
- Przeniesienie grup funkcyjnych.

teorie mechanizmu katalizy enzymatycznej

- Hipoteza elektrostatycznej stabilizacji stanu wzbudzonego
W skrócie, mechanizm ten polega na istnieniu silnie naładowanych, odpowiednio rozmieszczonych i odpowiednio zorientowanych ugrupowań, stanowiących miejsce katalityczne enzymu. Grupy te biorą udział w tworzeniu i stabilizacji zdecydowanie polarnego stanu wzbudzonego substratów.
- Wiązania wodorowe o niskiej barierze
Możliwość tworzenia w miejscu aktywnym wiązań wodorowych o znacznie bardziej kowalencyjnym charakterze niż zwykle wiązania wodorowe powstające w roztworze wodnym. Właśnie takie mocne wiązania wodorowe biorą udział w stabilizacji polarnego stanu wzbudzonego; natomiast przyczyną zwiększenia ich mocy oraz przyczyną nadania im charakteru kowalencyjnego jest niska polarność środowiska wnętrza centrum aktywnego enzymów.
- Hipoteza desolvatacji
Oparta o dane wskazujące na głównie hydrofobowy charakter reszt wyścielających kieszeń centrum aktywnego enzymów, zakłada cofanie polaryzacji reaktywnych elementów substratów podczas ich przejścia ze stanu podstawowego w stan przejściowy.

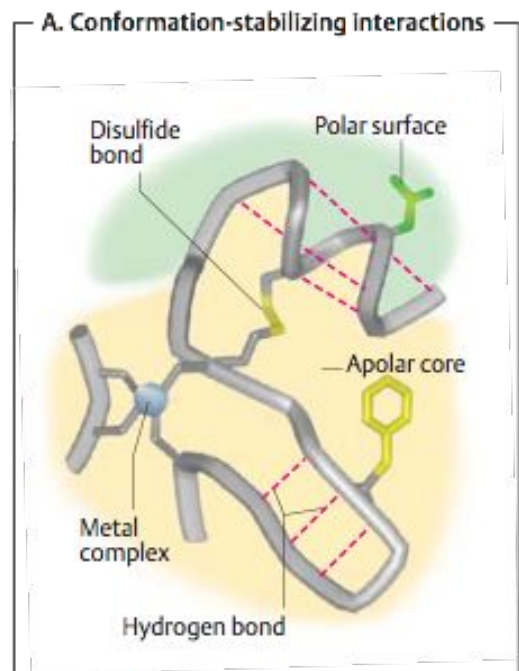
teorie mechanizmu katalizy enzymatycznej

- Entropowe efekty zbliżenia, orientacji i sterowania orbitalami
Olbryzmie przyspieszenia reakcji wewnątrzcząsteczkowych, a więc i enzymatycznych, osiągane są dzięki następującym czynnikom: wiązaniu reagujących elementów w konformacji przypominającej stan przejściowy (ang. near attack conformation); utracie entropii ruchów translacyjnych w skutek zbliżenia reagujących elementów; utracie entropii ruchów rotacyjnych po wstępnym „właściwym zorientowaniu substratów, np. po utracie jednego ze swobodnie rotujących wiązań albo po usztywnieniu jednego z „rotamerów”.
- Hipoteza sterowania orbitalami zakłada z kolei ścisłą zależność poziomu energii stanu przejściowego od kąta zderzenia reagujących substratów.
- Kataliza przez wykorzystanie efektów dynamicznych
Szereg danych doświadczalnych wskazuje, że pewna grupa ruchów dynamicznych wielkiej cząsteczki jest zdominowana przez fluktuacje momentu dipolowego solwentu. Zatem obdarzone ładunkiem grupy wewnątrz cząsteczki białka, oraz jej osłonka solwacyjna, są elementami sprzęgającymi dynamikę strukturalnych elementów wielkiej cząsteczki z otaczającym środowiskiem. W ten sposób dynamiczne ruchy solwentu mogą kontrolować szeroką gamę procesów w białku, począwszy od zmian konformacyjnych aż po przemieszczanie ligandu w procesie katalizy.
- Kataliza przez jądrowy efekt tunelowania
Sprężystość struktury enzymu zapewnia możliwość przeniesienia termalnych wibracji środowiskowych na grupy kontaktowe centrum aktywnego. Wibracje takie mogą doprowadzić do zmian zarówno szerokości jak i wysokości bariery energetycznej katalizowanej reakcji. Mamy wtedy do czynienia z cyklicznym „bramkowaniem”, możliwości pokonania bariery zarówno na drodze jej przekraczania jak i na drodze kwantowo-mechanicznego efektu tunelowego

aspekty katalizy enzymatycznej

Przekształcenie stanu przejściowego w kompleks enzym-produkt (EP) – To na tym etapie dochodzi do faktycznych zmian w składzie atomowym substratu. Zaktywowany stan przejściowy ulega konkretnym przekształceniom. Wymieniane/dołączane/usuwane mogą być całe grupy funkcyjne lub same elektrony.

- Na tym etapie pierwszoplanową rolę odgrywają ataki nukleofilowe i/lub elektrofilowe ze strony grup funkcyjnych enzymu.
- Kofaktory (np. kationy metali) często odgrywają istotną rolę w przekształceniu stanu przejściowego ($ES^\ddagger$) do kompleksu enzym-produkt (EP).



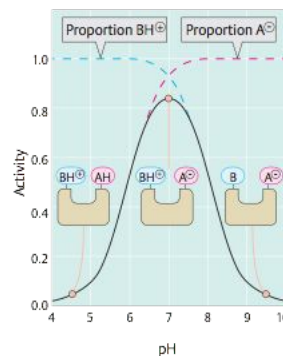
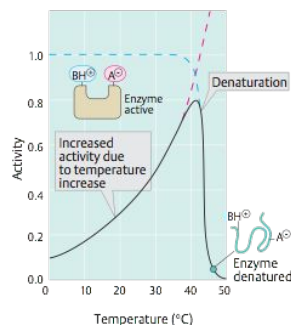
aspekty katalizy enzymatycznej

Aktywność enzymatyczna ma ścisły związek z jego strukturą przestrzenną, tzw. konformacją natywną.

W momencie zniszczenia tej struktury, denaturacji, właściwości enzymatyczne zanikają.

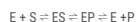
Oddziaływania stabilizujące:

- wiązanie/mostki disiarczkowe,
- wiązania wodorowe,
- tworzenie kompleksów,
- efekty hydrofobowe.



moc katalityczna

Enzymy nie zmieniają równowagi chemicznej reakcji tylko powodują jej przyspieszenie. Równanie najprostszej reakcji enzymatycznej ma postać:



Bariera energetyczna pomiędzy S a P jest energią potrzebną do:

- przemieszczenia reagujących grup,
- tworzenia przejściowych,
- niestabilnych zmian ładunków cząsteczek,
- reorganizacji wiązań i innych przemian niezbędnych do zajścia reakcji.

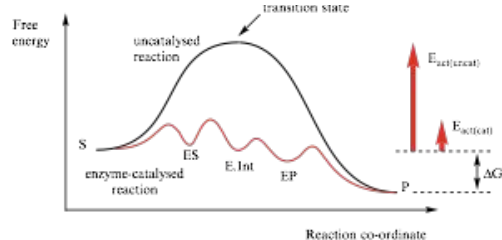
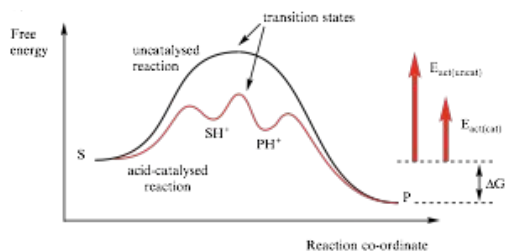
Wszystko to obrazuje pik na wykresie energii związanej z reakcją enzymatyczną

Wierzchołek tego piku jest punktem w którym rozpad kompleksu z enzymem do S i E lub P i E jest równie prawdopodobne – punkt ten nazywamy stanem przejściowym.

Jest to stan energetyczny a nie żaden pośredni etap reakcji, czy związek pośredni – jest to płynny moment, w którym zrywanie wiązań, tworzenie wiązań czy przenoszenie ładunków dochodzi do takiego momentu, gdzie równie prawdopodobne jest uzyskanie S jak i P.

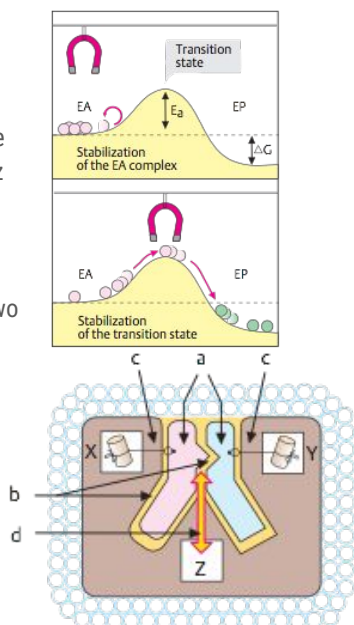
Różnica między energią (potencjałem) produktu i substratu to energia aktywacji $\Delta G^\ddagger$ – energię tą można obniżyć poprzez dodanie katalizatora – enzymu

Katalizator zwiększa szybkość reakcji poprzez obniżenie energii aktywacji.



moc katalityczna

Obecnie uważa się, że najważniejszym zadaniem enzymu jest stabilizacja stanu przejściowego. To nie ścisłe wiązanie substratu jest więc ważne, ponieważ paradoksalnie zwiększałoby to energię aktywacji wymaganą przez reakcję, a nie ją zmniejszało, ale właśnie wiązanie stanu przejściowego. Za tym wnioskiem przemawia bardzo wysokie powinowactwo wielu enzymów do analogów stanu przejściowego.



- Przybliżenie kształtu i orientacji przestrzennej substratu/ów.
- Wykluczenie wody z miejsca aktywnego.
- Stabilizacja stanu przejściowego.
- Przeniesienie grup funkcyjnych.

moc katalityczna

- Enzymy wykazują zdolności do przyspieszania reakcji chemicznych rzędu nawet miliardów razy (**nawet w warunkach fizjologicznych!**)
- Ich moc katalityczna opiera się na obniżeniu bariery energetycznej reakcji (tj. energii aktywacji reakcji $\Delta G^\ddagger$, E_A). Jednocześnie, nie wpływają one na energię swobodną substratu i produktu ani na wartość stałej równowagi. Innymi słowy enzymy przyspieszają osiągnięcie stanu równowagi reakcji.
- Reakcja chemiczna jest niemożliwa do uruchomienia bez osiągnięcia energii aktywacji nawet jeśli substraty posiadają znacznie większą energię swobodną niż produkty.
- Obecność odpowiedniego enzymu silnie obniża próg energetyczny (energię aktywacji reakcji), zapewniając wzrost liczby cząsteczek S, które pokonują barierę energetyczną i przechodzą w postać P.

Enzym	Substrat	$K_{\text{kat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Katalaza	H_2O_2	40×10^6
Anhidraza węglanowa	HCO_3^-	1×10^6
Esteraza acetylocholinowa	Acetylocholina	14×10^3
Izomeraza triozofosforanowa	Fosfotrioza	$4,3 \times 10^3$
Fumaraza	Fumaran	$0,8 \times 10^3$



energia

aktywacji vs. swobodna

- **Energia aktywacji reakcji chemicznej**- jest podawaną często w przeliczeniu na 1 mol substancji wielkością bariery energetycznej (w skali mikroskopowej- bariera potencjału), którą musi pokonać układ reagujących indywiduów chemicznych, aby doszło do reakcji chemicznej [Wikipedia].
- **Energia aktywacji reakcji chemicznej**- energia, która musi zostać dostarczona do układu aby zapoczątkować daną reakcję chemiczną.
- **Energia swobodna Gibbsa (entalpia swobodna, G)** układu jest miarą ilości użytecznej energii (energii, która może być zamieniona w pracę) w tym układzie. Zmiana energii swobodnej Gibbsa podczas reakcji dostarcza użytecznych informacji na temat energii i spontaniczności reakcji

$$\Delta G = G_{\text{końcowe}} - G_{\text{początkowe}}$$

$$\Delta G = G_{\text{produktów}} - G_{\text{substratów}}$$

- **Energia swobodna Gibbsa** określa maksymalną użyteczną energię, jaka może zostać uwolniona lub pochłonięta podczas reakcji przechodząc ze stanu początkowego do końcowego. Znak ΔG (dodatni lub ujemny) informuje, czy reakcja będzie zachodziła spontanicznie, czyli bez dostarczania dodatkowej energii.

energia swobodna vs. entalpia i entropia

- Przy stałej temperaturze i ciśnieniu zmianę energii swobodnej można wyrazić:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

- **Zmiana entalpii (ΔH)** w biologii to różnica energii w wiązaniach między substratami a produktami.
 $\Delta H < 0$ oznacza, że ciepło podczas reakcji jest uwalniane, a
 $\Delta H > 0$ że jest pochłaniane (przy przechodzeniu od substratów do produktów).
- **ΔS to zmiana entropii** układu podczas reakcji.
Jeśli $\Delta S > 0$ to układ staje się bardziej nieuporządkowany podczas reakcji (np. gdy jedna duża cząsteczka dzieli się na kilka mniejszych).
Jeśli $\Delta S < 0$, oznacza to, że system staje się bardziej uporządkowany.
- Temperatura (T) określa względny wpływ warunków ΔS i ΔH na całkowitą zmianę energii swobodnej. Im wyższa temperatura, tym większy wpływ ΔS w stosunku do ΔH :
 $\Delta G > 0$ - reakcje niespontaniczne (endoenergetyczne)
 $\Delta G < 0$ - reakcje spontaniczne (egzoenergetyczne)
 $\Delta G = 0$ - reakcja pozostaje w równowadze

$\Delta S > 0$	$\Delta H < 0$	$\Delta H > 0$
	Spontaniczna at all T ($\Delta G < 0$)	Spontaniczna at high T ($\Delta H - T\Delta S$ is large)
$\Delta S < 0$	Spontaniczna at low T ($\Delta H - T\Delta S$ is small)	Non-spontaneous at all T ($\Delta G > 0$)

temperatura, tym

Ważne: słowo *spontanicznie* oznacza, że reakcja odbędzie się bez dodatkowej energii, ale nie mówi nic o tym, jak szybko nastąpi reakcja. Spontaniczna reakcja może zająć kilka sekund, ale może też trwać dni, lata lub nawet dłużej. To oznacza, że ΔG reakcji mówi nam o termodynamicznej stronie reakcji (czy reakcja może zajść) ale nie mówi nic o kinetyce (jak szybko będzie zachodzić).

stan przejściowy

Dlaczego reakcje spontaniczne ($\Delta G < 0$) wciąż potrzebują dostarczenia dodatkowej energii (energii aktywacji), aby zachodzić w rozsądnym czasie?

- Aby reakcja zaszła wiązania chemiczne w substratach muszą zostać zerwane/zmodyfikowane aby powstały nowe wiązania produktów.
- Aby to się stało, cząsteczki substratów muszą zostać doprowadzone do ekstremalnych warunków np. poprzez „zdeformowanie lub zgięcie cząsteczki” do niestabilnego stanu zwanego stanem przejściowym.
- Stan przejściowy jest stanem wysokoenergetycznym i wymaga dostarczenia energii zwanej energią aktywacji, aby cząsteczka osiągnęła go.
- Energia aktywacji zawsze jest potrzebna, niezależnie od tego, czy reakcja jest endoenergetyczna czy egzoenergetyczna.
- Stan przejściowy reakcji zawsze znajduje się na wyższym poziomie energii niż substraty lub produkty.
- **Energia aktywacji** reakcji jest obniżana poprzez obniżanie energii stanu przejściowego. Enzymy zatem obniżają tę energię np. poprzez stabilizację jego struktury

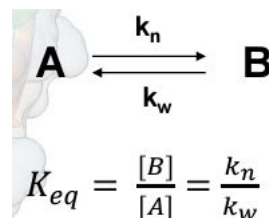
stała równowagi

Stała równowagi reakcji chemicznej (K_{eq}) to stosunek stężenia substancji o energii swobodnej niższej do substancji z wyższą energią (np. $[B]/[A]$) w stanie równowagi reakcji (gdy reakcja „ustaje”) ale może być też wyrażona jako stosunek stałych szybkości reakcji naprzód i wstecz (k_n/k_w).

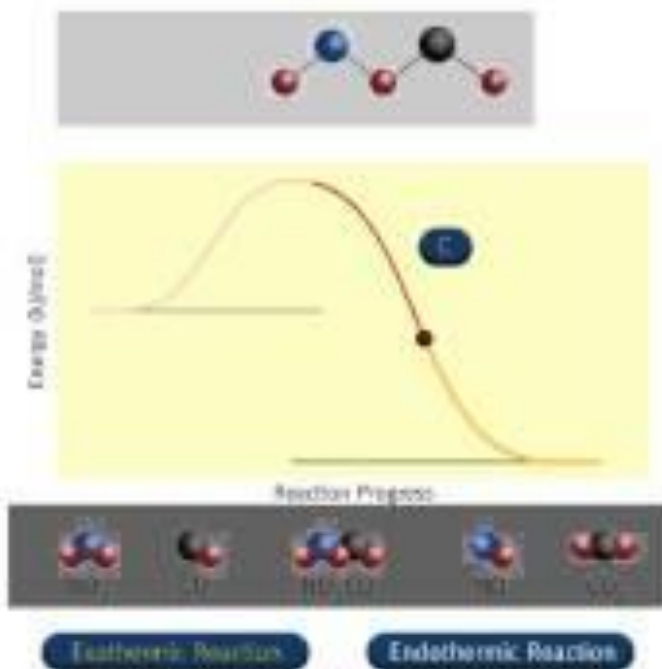
- Enzymy nie potrafią i nie wpływają na energię swobodną substratów i produktów ani na ogólny kierunek reakcji chemicznej.
- **Enzymy przyspieszają szybkość reakcji w obu kierunkach w jednakowym stopniu co prowadzi do szybkiego osiągnięcia stanu równowagi.**

Podsumowując:

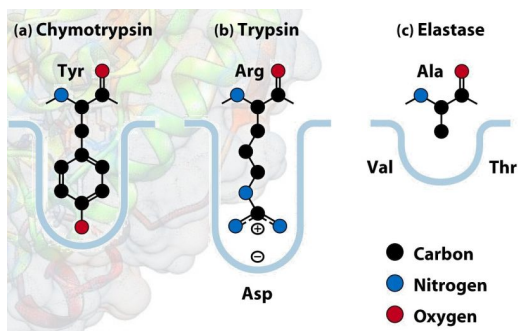
- Enzymy ogromnie przyspieszają szybkość reakcji wskutek obniżenia energii aktywacji E_A bez ingerencji w energię swobodną substratów i produktów oraz w stałą równowagi reakcji chemicznej.
- Energia swobodna Gibbsa determinuje spontaniczność reakcji i jej kierunek, natomiast energia aktywacji wpływa na szybkość zachodzenia tej reakcji.



$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$$



specyficzność enzymów



- Każdy enzym jest specyficzny w działaniu i katalizuje tylko jedną lub kilka powiązanych reakcji chemicznych.
- Specyficzność enzymów jest wynikiem unikalnej struktury i kształtu aktywnego miejsca, w którym substrat łączy się z enzymem.
- Aktywne miejsce enzymu ma specyficzne grupy funkcyjne, które oddziałują z substratem i umożliwiają przeprowadzenie reakcji chemicznej.
- Specyficzność enzymów jest kluczowa dla utrzymania homeostazy organizmu, ponieważ każda reakcja musi być przeprowadzana z dokładnością i skutecznością.
- Specyficzność enzymów może być modyfikowana przez zmiany warunków fizycznych i chemicznych, takich jak pH, temperatura, ilość substratu i inhibitorów.
- Przykładem specyficzności substratowej są trzy proteazy: trypsyna, chymotrypsyna oraz elastaza – katalizują tę samą reakcję hydrolizy wiązania peptydowego, lecz dokonują tego na różnych odcinkach łańcucha polipeptydowego substratu.

regulacja aktywności enzymatycznej

To które reakcje chemiczne i z jaką szybkością zachodzą w organizmie można regulować na różne sposoby, aby zaspokoić potrzeby metaboliczne komórki. Nie wszystkie enzymy w organizmie człowieka są poddawane regulacji.

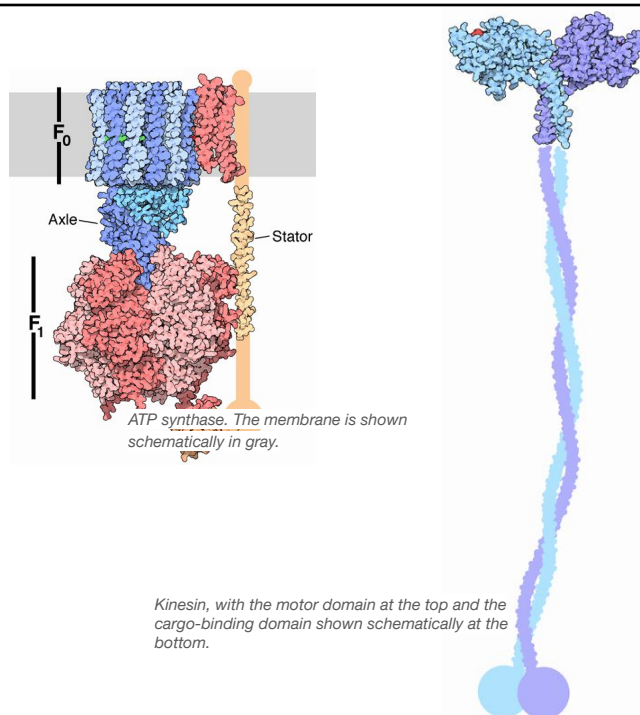
- Główne rodzaje regulacji aktywności enzymów:
 - Regulacja allosteryczna: Aktywność enzymu jest kontrolowana przez wiązanie cząsteczki w innym miejscu niż miejsce aktywne enzymu. Wiązanie cząsteczki może aktywować lub hamować enzym.
 - Regulacja izosteryczna: Aktywność enzymu jest regulowana w miejscu aktywnym poprzez związanie określonych aktywatorów/inhibitorów reakcji
 - Modyfikacja kowalencyjna: Aktywność enzymu jest kontrolowana przez dodanie lub usunięcie grupy chemicznej, takiej jak np. grupa fosforanowa, metylowa, ubikwitynowa. Te modyfikacje mogą aktywować lub hamować enzym.
 - Proteolityczna aktywacja niektórych enzymów: proteolityczne odcięcie zbędnego fragmentu białkowego u niektórych enzymów powoduje jego aktywację.

- Reakcje chemiczne zachodzące w organizmie mogą być również regulowane poprzez kontrolę poziomu biosyntezy poszczególnych enzymów (operony, ryboprzełączniki, hormony, degradacja enzymów)
- Występowanie izozymów o różnej aktywności enzymatycznej pozwala kontrolować szybkość niektórych reakcji chemicznych
- Szybkość reakcji chemicznych w organizmie (i nie tylko) może być regulowana również poprzez zmiany stężeń substratów, stosunku stężeń substratów/produkty, zmiany dostępności kofaktorów, wartości pH, temperatury itd.

transformacja energetyczna

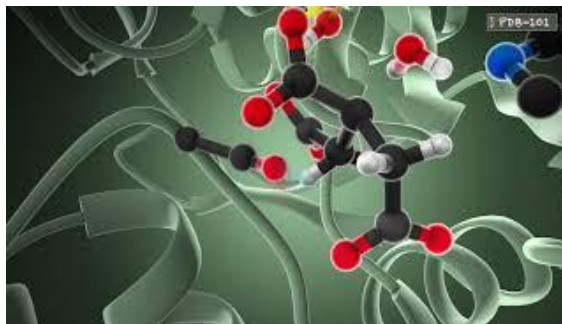
W wielu reakcjach biologicznych energia substancji reagujących jest przekształcana z dużą wydajnością w inną formę energii.

- W fotosyntezie energia świetlna jest przekształcana na energię wiązań chemicznych
- W mitochondriach energia cząsteczek pochodzących z pokarmu jest zamieniana w energię swobodną ATP
- Energia zgmagazynowana w wiązaniach ATP może być zamieniana np. na energię mechaniczną (podczas skurczu mięśni)

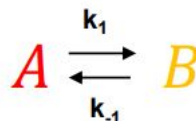


kinetyka enzymów

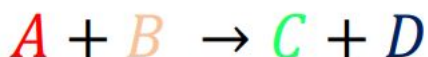
- Kinetyka enzymatyczna zajmuje się badaniem przebiegu reakcji (przede wszystkim szybkości) biochemicznych z udziałem katalizatorów, którymi w tym przypadku są enzymy.
- Określenie kluczowych parametrów kinetycznych w różnych warunkach pozwala dowiedzieć się jak szybko działa enzym, jak mocno wiąże substraty aby stworzyć kompleks enzym-substrat (ES), który jest kluczowy dla katalizy, ale również jak bardzo specyficzny jest enzym w stosunku do struktury substratu i jak wpływają na jego działanie różne związki: inhibitory i aktywatory katalizy.
- Szybkość reakcji katalizowanej enzymatycznie zależy od szeregu czynników. Najważniejsze to:
 - Stężenie substratu/enzymu/produktu
 - Temperatura
 - pH środowiska
 - Obecność i stężenie kofaktorów
 - Obecność i stężenie aktywatorów
 - Obecność i stężenie inhibitorów



kinetyka enzymów



- Kinetyka enzymatyczna zajmuje się badaniem przebiegu reakcji (przede wszystkim szybkości) biochemicznych z udziałem katalizatorów, którymi w tym przypadku są enzymy.
- Szybkość reakcji chemicznej może być opisywana poprzez określenie jak szybko ubywa substratu lub jak szybko przybywa produktu. Co ważne, nie jest to wielkość stała, ponieważ zmienia się w czasie przebiegu reakcji. Największa jest na początku reakcji, a najmniejsza pod koniec.



$$V = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[B]}{\Delta t} = \frac{\Delta[C]}{\Delta t} = \frac{\Delta[D]}{\Delta t}$$

- Równanie kinetyczne reakcji i stałe szybkości:
- Szybkość powyższej elementarnej reakcji chemicznej można opisać przy wykorzystaniu równania kinetycznego reakcji. Równanie szybkości reakcji (kinetyczne) zależy od stałej szybkości (proporcjonalności) k oraz zazwyczaj od efektywnego stężenia substratów (z wyjątkiem reakcji 0-rzędu).

$$\text{Szybkość reakcji naprzód} = V = k_1[A]$$

$$\text{Szybkość reakcji wstecz (powrotnej)} = V = k_{-1}[B]$$

równowaga reakcji

Równowaga reakcji jest nierozwalnie związana ze zmianą energii swobodnej ΔG_0 a szybkość reakcji z energią aktywacji $\Delta G^\ddagger$.

Stała równowagi K_{eq} lub K w standardowych warunkach biologicznych jest opisywana jako:

$$K = [P]/[S]$$

Zależność ta powoduje, że bardzo ujemna wartość ΔG_0 skutkuje korzystną wartością równowagi reakcji – co jednak nie ma wpływu na szybkość samej reakcji.

Reaction $A + B \rightleftharpoons C + D$

Law of mass action $K = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$

Equilibrium constant

Only applies in chemical equilibrium

Relationship between ΔG° and K

$\Delta G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K$

$R = 8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

In any conditions

$\Delta G = \Delta G^\circ + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$

Measure of group transfer potential

For a redox system

$E = E^\circ + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[A_{ox}]}{[A_{red}]}$

Measure of electron transfer potential

For any redox reaction

$\Delta E = \Delta E^\circ + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[B_{ox}] \cdot [A_{red}]}{[B_{red}] \cdot [A_{ox}]}$

Definition and sizes

$\Delta E = E_{\text{acceptor}} - E_{\text{donor}}$

$\Delta G = -n \cdot F \cdot \Delta E$

n = No. of electrons transferred

F = Faraday constant

Standard reaction

$HA + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$

Law of mass action

$K = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[HA] \cdot [H_2O]}$

Simplified

$K_a = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[HA]}$

Henderson-Hasselbalch equation

$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$

Measure of proton transfer potential

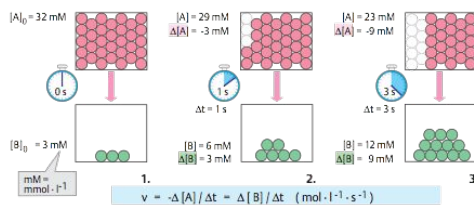
39

szybkość reakcji

Szybkość reakcji zależy od stężenia reagentów (lub substratów) i od stałej szybkości zazwyczaj oznaczonej przez k .

Dla prostej reakcji $S \rightarrow P$, szybkości (prędkości) reakcji, V - przedstawiającej ilość S , który reaguje na jednostkę czasu jest wyrażona równaniem:

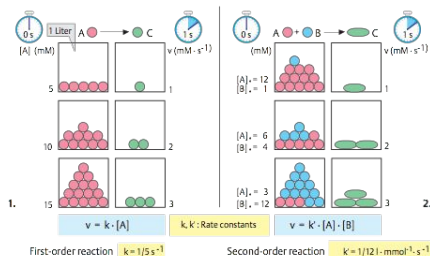
$$V = k[S]$$



40

rzędowość reakcji

- W przypadku gdy szybkość reakcji zależy tylko od stężenia substratu mamy do czynienia z reakcją pierwszego rzędu. Czynniki k jest proporcjonalnie stały, co oznacza prawdopodobieństwo reakcji w danych warunkach (temperatura, pH, itd.). Jako stała pierwszego rzędu jest wyrażana w jednostkach czasu, np. s^{-1} . Jeżeli reakcja ma stałą k równą $0,03 s^{-1}$ można to interpretować, jako 3% substratu przekształcane w produkt w ciągu 1 sekundy. Reakcja ze stałą $k=2000 s^{-1}$ zakończy się w ułamku sekundy.
- Jeżeli szybkość reakcji zależy od dwóch składników lub reakcja zachodzi między dwiema cząsteczkami tego samego związku, reakcja jest drugorzędowa i k staje się stałą drugiego rzędu [$M^{-1}s^{-1}$].



41

kryteria podstawowe pomiarów enzymatycznych

Warunki fizykochemiczne:

- roztwory i siła jonowa
- pH
- punkt izoelektryczny
- temperatura

Aspekty molekularne:

- substraty
- kofaktory

Effect	Conditions of inactivation	Protection
Temperature	High temperature Very low temperature (seldom)	Low temperature ($\sim 4^{\circ}C$)
pH	Extreme (low and high) pH values	pH optimum
Ionic strength	Very high ($>1 M$) and very low ($<10 mM$) electrolyte concentrations*	Medium electrolyte concentration ($\sim 0.05-0.2 M$)
Proteolysis	Contaminations with proteases, not completely removed by purification procedure	Protease inhibitors (cf. Table 2.3) Use of recombinant enzymes
Chemical modification	Contamination with reactive reagents (SH-active compounds)	High purity of all components Avoidance of oxidative conditions Chelating reagents
SH poisoning	Oxidative conditions, promoted by heavy metal ions	SH reagents, mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE)

4

roztwory i siła jonowa

Lokalizacja komórkowa enzymów wpływa na optymalne warunki pomiaru aktywności:

- o enzymy błonowe preferują apolarne warunki, np. rozpuszczalniki organiczne.
- o enzymy wewnątrzkomórkowe preferują warunki zgodne z ich naturalnym środowiskiem, a więc wodne (polarne) roztwory.

Obecność niewielkich ilości rozpuszczalników w warunkach pomiarowych może być jednak konieczna i wynikać z konieczności wprowadzenia do układu badawczego substancji nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczalnych w roztworach wodnych np. substratów reakcji, kofaktorów.

Najczęściej wykorzystuje się:

- o alkohole (etanol, metanol, propanol),
- o aceton,
- o tetrahydrofuran,
- o dimetylosulfotlenek (DMSO).

Należy sprawdzić czy substancje te nie mają charakteru inhibitorów danej reakcji!

roztwory i siła jonowa

Wszystkie odczynniki użyte w czasie badania aktywności muszą być neutralne w stosunku do enzymu oraz wszystkich komponentów reakcji.

Optymalizacji wymagają:

- o stężenia wszystkich komponentów roztworu:
 - objętości enzymu i jego rozcieńczenia,
 - stężenia substratów (możliwa jest inhibicja przy nadmiernym stężeniu jednego z komponentów),
- o oddziaływania pomiędzy komponentami roztworu:
 - mieszaniny składników mogą wpływać na wzajemną rozpuszczalność, np. dwuwartościowe kationy w buforach fosforanowych,
 - poziom redox podlega wpływowi czynników środowiskowych, np. tlen atmosferyczny.
- o poziom siły jonowej roztworu (zazwyczaj ca. 0.1M),

Większość enzymów wykazuje tolerancję w stosunku do warunków prowadzenia reakcji.

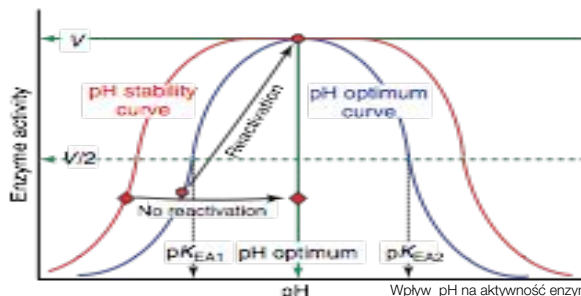
zależność od pH

Zależność od pH roztworu jest związana z:

- wykorzystaniem przez enzymy naładowanych grup w mechanizmach katalitycznych,
- enzymy są substancjami amfoterycznymi,

Analizując krzywą stabilności pH należy brać pod uwagę:

- wpływ pH na stabilność struktury,
- występowanie punktu izoelektrycznego (IP),
- odwracalność procesu.



Wpływ pH na aktywność enzymu.
Krzywe przedstawiają aktywność enzymu w różnym pH i jego wpływ na:
stabilność oraz optymalną aktywność.

Amfoteryczność
[gr. amphóteros 'dwustronny'],
właściwość niektórych związków chemicznych i jonów polegająca na wykazywaniu przez nie zarówno kwasowego, jak i zasadowego charakteru.

45

pK_a

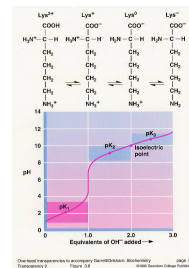
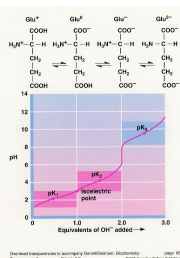
pK_a
wartość pH odpowiadająca stanowi, w którym grupa funkcyjna jest w połowie protonowana.
Punkt ten można określić wyznaczając punkt przegięcia na krzywej miareczkowania.

Amino acid	pK_a
Aspartic acid	3.86
Glutamic acid	4.32
Histidine	6.09
Cysteine	8.30
Serine	9.35
Tyrosine	10.30
Threonine	10.40
Lysine	10.53
Arginine	12.30

Krzywa miareczkowania białka może być traktowana jako wypadkowa krzywych miareczkowania poszczególnych aminokwasów.

Wyznaczenie optymalnego pK_a dla danej reakcji enzymatycznej pozwala wnioskować o aminokwasach biorących udział w mechanizmie reakcji pod warunkiem:

- iż pojedynczy aminokwas jest związanych z katalizą,
- środowisko reakcji i miejsca aktywnego nie wpływa na pK_a aminokwasu (możliwe przesunięcia o 1-2 jednostki pH).



46

stabilność temperaturowa

Reguła Van Hoff'a
szybkość reakcji enzymatycznej
zwiększa się 2-3 krotnie przy zmianie
temperatury o 10 stopni.

Praktycznie w wyższych temperaturach
enzymy ulegają nieodwracalnej
denaturacji i tracą aktywność.

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

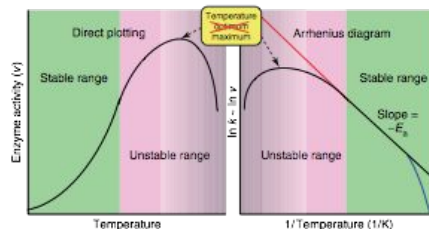
Transforming into the logarithm

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.303RT}$$

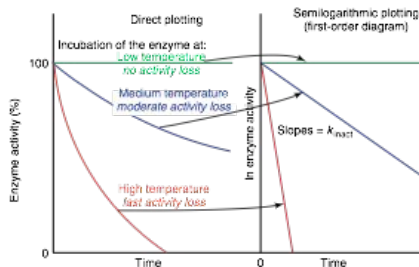
$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.303R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

Definitions:
 E_a : activation energy
 A : collision factor
 T : absolute temperature
 R : gas constant
 k : catalytic rate constant (can be replaced by the velocity v)



Zależność temperaturowa aktywności enzymatycznej w układzie bezpośrednim i na wykresie Arrhenius'a.

Krzywa eksperymentalna (czarna), teoretyczna (czerwona), fizjologiczna (niebieska).



47

stabilność temperaturowa

Konsekwencje niestabilności temperaturowej:

- Odstępstwa w obszarze liniowym mogą wynikać ze zmian strukturalnych izoenzymów.
- Enzymy tracą stabilność w wysokich temperaturach.
- Po przekroczeniu maksimum następuje gwałtowna utrata aktywności.

Jak dobrać warunki reakcji:

- Wykres w oparciu o równanie Arrhenius'a powinien znajdować się w zakresie liniowym,
- Energia aktywacji powinna być w zakresie 40-60 kJ mol⁻¹

Temperature (°C)	Reasons in favor	Reasons against
25	Slightly above room temperature Easy to maintain No need for preincubation of the assay mixture Suited especially for thermosensitive enzymes	Low enzyme activities Relatively high enzyme amounts required per assay
30	Only modest tempering necessary Closer to physiological conditions Medium enzyme activity Reasonable enzyme requirement	Preincubation of assay mixture required
37	Physiological temperature High enzyme activities Low enzyme amounts required	Preincubation of assay inevitably Long warming up intervals Risk of incipient inactivation

48

czynniki stabilizujące enzymy

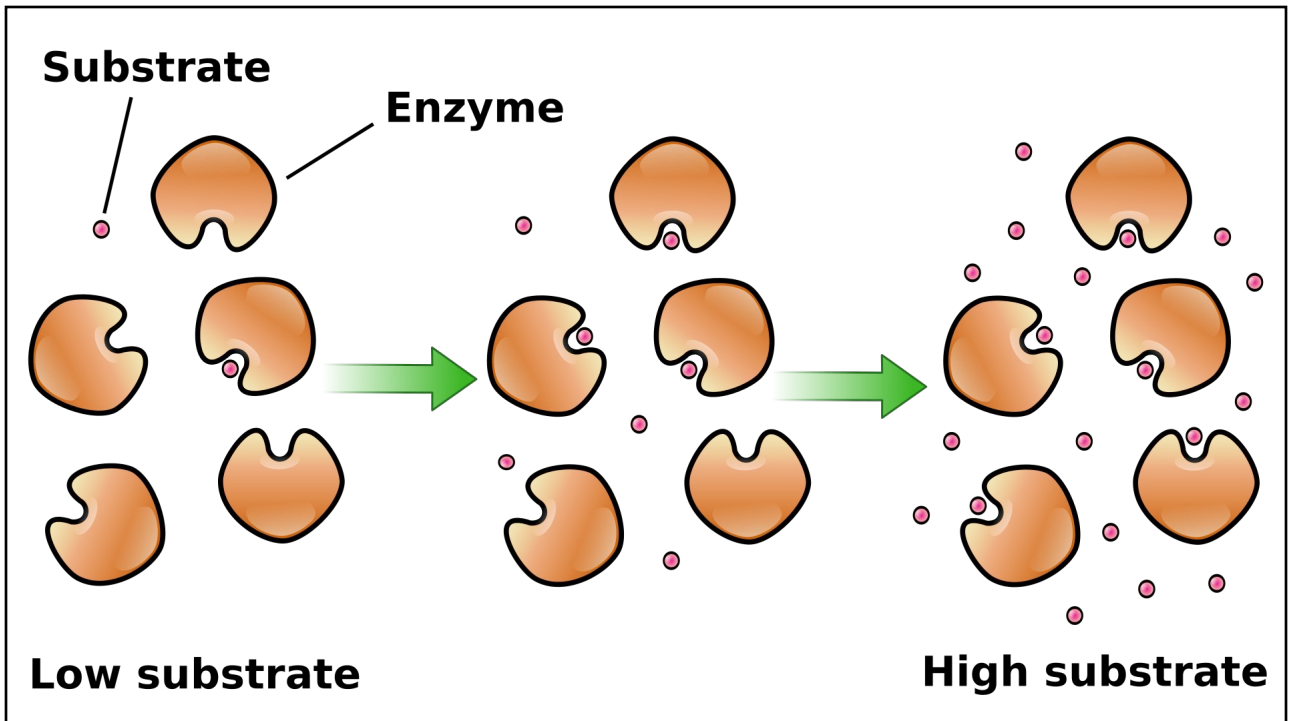
• Kationy metali:

- jedno i dwu wartościowe,

- Związki chelatujące
- Tiole
- Inhibitory proteaz
- Białka pomocnicze
- Antyutleniacze ("pułapki telenowe")

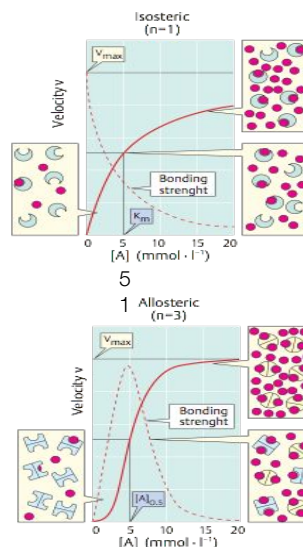
Monovalent cations	K^+ , Na^+	Dependent on special enzyme requirements, ~0.1 M	Essential for several enzyme reactions and for protein structure (counterions of surplus charges)
Bivalent cations	Mg^{2+} , Ca^{2+}	Dependent on special enzyme requirements, ~1 mM	Components of several buffers
Chelate former	EDTA, EGTA	1–2 mM	Cofactors of several enzyme reactions (metalloproteases, kinases, neutralization of di- and triphosphates (e.g. ATP, GTP, UTP))
Thiol reagents	DTT, DTE, mercaptoethanol	0.1–0.2 mM	Stabilization of protein structure
Protease inhibitors	α_2 -macroglobulin, leupeptin, TLCK, TPCK, PMSE	~0.5 $\mu g\ ml^{-1}$, ~0.05 $\mu g\ ml^{-1}$, 0.1 $\mu g\ ml^{-1}$, 0.1 $mg\ ml^{-1}$	Capture divalent cations to protect from oxidative processes, however also removal of cations essential for catalysis and structure
	E-64, calpain inhibitor I	~0.01 $mg\ ml^{-1}$	Protects SH group from oxidation and formation of ~S-S bridges
	EDTA	1 mM	General protease inhibitors
Proteins	Serum albumin	1 $mg\ ml^{-1}$	Inhibitors for serine and cysteine proteases
Oxygen traps	GOD/catalase, sodium dithionite	cf. assay in Section 3.3.1.14, ~0.1 mM	Inhibits serine proteases, insoluble in aqueous solution (0.5 h half-life)
			Inhibits cysteine proteases
			Inhibit metalloproteases by complexing of divalent cations
			Protects against denaturation, especially in diluted solutions
			Prevent oxidative modifications
			Strong reducing reagents

49



kinetyka enzymów

- Enzymy mogą występować w wielu konformacjach, które różnią się właściwościami katalitycznymi i których udział w całkowitej liczbie cząsteczek enzymu zmienia się w zależności od obecności substratu lub ligandów.
- Enzymy allosteryczne występują zazwyczaj jako oligomery i charakteryzują się sigmoidalną krzywą wysycenia substratem, co uniemożliwia opisanie ich równaniem M-M. W przypadku enzymów allosterycznych wydajność wiązania substratu wzrasta wraz ze wzrostem $[A]$, ponieważ wolny enzym występuje w „słabo-wiążącej” konformacji i zostaje przekształcony w „silnie-wiążącą” pod wpływem połączenia z A.
- Ożywiście może do tego dojść tylko przy wysokim stężeniu A, przy braku wolnych miejsc do jego wiązania siła wiązania ponownie spada, zatem powinowactwo enzymów allosterycznych nie jest stałe i zależy od typu i stężenia ligandu
- Enzymy izosteryczne występują tylko w jednej formie i wydajność wiązania substratu wzrasta stale wraz z wzrastającym $[A]$, ponieważ liczba wolnych cząsteczek enzymu sukcesywnie maleje.



szybkość reakcji

Równanie Arrheniusa

równanie, podane przez szwedzkiego chemika Svantego Arrheniusa, wyrażające zależność stałej szybkości reakcji od temperatury.

Stała szybkości k zależy od:

- częstotliwości zderzeń między cząsteczkami (A),
- temperatury (T),
- energii aktywacji (E_a) reakcji chemicznej.

Enzymy zatem obniżając energię aktywacji reakcji wpływają bezpośrednio na stałą szybkości reakcji podwyższając ją.

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$$

k – stała szybkości reakcji,

A – czynnik przedeksponencjalny związany z częstością zderzeń skutecznych w danej reakcji

e – podstawa logarytmu naturalnego,

E_a – energia aktywacji reakcji ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$),

T – temperatura (K),

R – uniwersalna stała gazowa wynosząca $8,31446261815324 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

przebieg reakcji enzymatycznej

Na całkowitą szybkość takiej reakcji wpływać będą wszystkie jej poszczególne procesy:

- szybkość tworzenia się kompleksu ES jak również szybkość rozpadu kompleksu ES w kierunku substratów
- szybkość rozpadu kompleksu ES w kierunku produktów

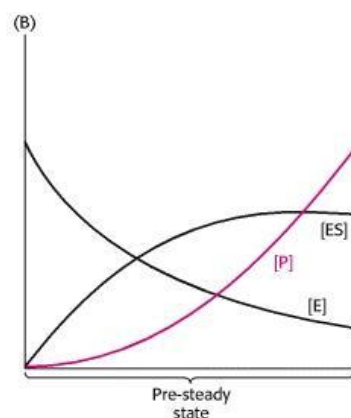
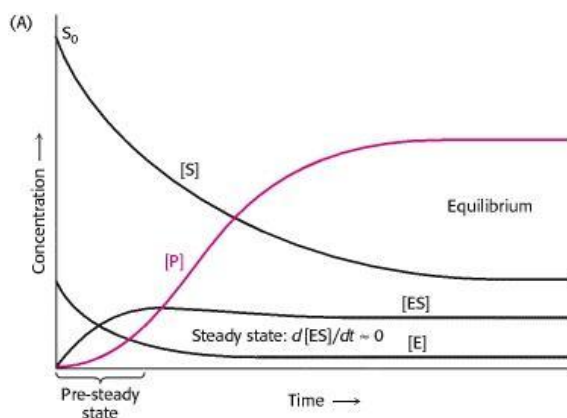
Oczywiście stopień w jakim dany proces będzie wpływać na całkowitą szybkość reakcji nie jest taki sam i zależy od szybkości danego procesu (np. proces rozpadu ES z powrotem do substratów może być często zdecydowanie wolniejszy niż proces tworzenia kompleksu ES). Co więcej, szybkość reakcji jest najbardziej ograniczana i stąd też limitowana przez jej najwolniejszy etap.

Równanie szybkości tworzenia się produktów wyglądać będzie następująco:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P]$$



przebieg reakcji enzymatycznej

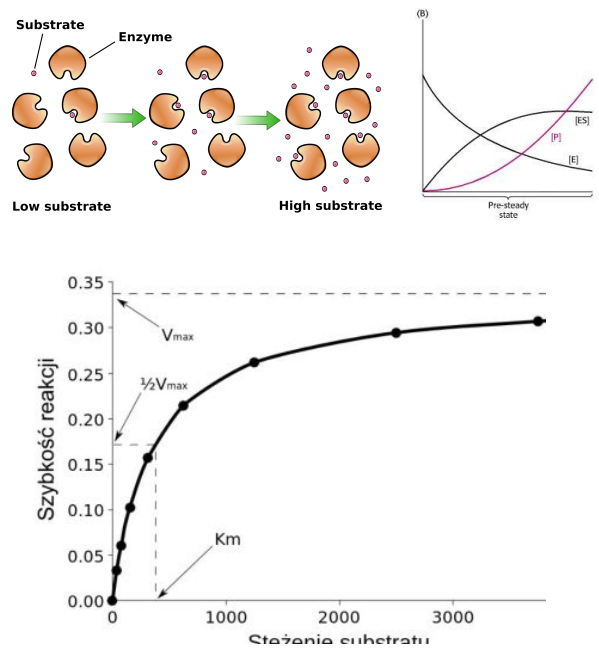


szybkość reakcji enzymatycznej

Szybkość całej reakcji możemy mierzyć eksperymentalnie.

Aby wyznaczyć wartości najważniejszych parametrów kinetycznych reakcji katalizowanych enzymatycznie najczęściej wykonuje się pomiar szybkości (najczęściej szybkości początkowej!) reakcji dla różnych stężeń substratu.

W wyniku takiego eksperymentu wykreślić można następującą zależność ->



model Michaelis-Menten

Leonor Michaelis



Born 16 January 1875
Berlin, German Empire
Died 8 October 1949 (aged 74)
New York City, United States
Nationality German

Maud Leonora Menten



Born 20 March 1879
Died July 17, 1960 (aged 81)
Leamington, Ontario, Canada
Nationality Canadian

Badając eksperymentalnie reakcję enzymatyczną, analizujemy jej początkowy przebieg czyli w momencie gdy czas jest bliski zeru ($t \sim 0$), a szybkość reakcji jest szybkością początkową ($V = V_0$).

W takim momencie reakcji niewiele produktu zdążyło się utworzyć więc reakcja powrotna tworzenia się kompleksu ES od produktu i enzymu jest zaniedbywalna.

W reakcjach egzoenergetycznych łatwiej o spełnienie tego założenia.



Z takiego schematu wynika, że szybkość tworzenia się produktu bezpośrednio zależy od szybkości ostatniego etapu (szybkości rozpadu kompleksu ES w kierunku produktów oraz stężenia kompleksu ES):



$$V_0 = k_2[ES]$$

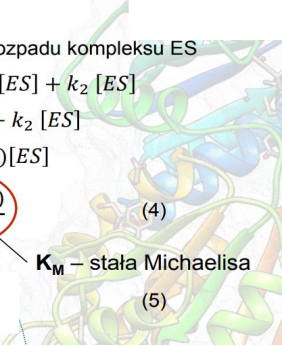
$$[ES] = V = k_1[E][S]$$

$$V = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Zakłada się, że stężenie kompleksu enzym-substrat (ES) pozostaje stałe w trakcie analizowania reakcji. Zakłada się zatem, że szybkość tworzenia się kompleksu ES jest równa szybkości rozpadu kompleksu ES.

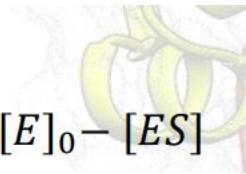
$$\begin{aligned}
 &[ES] = \text{const.} \\
 &\text{Szybkość tworzenia się kompleksu ES} = \text{Szybkość rozpadu kompleksu ES} \\
 &V = k_1[E][S] = V = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \\
 &k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \\
 &k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \\
 &\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (4) \\
 &[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (5)
 \end{aligned}$$

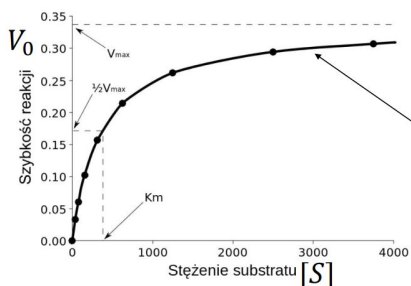
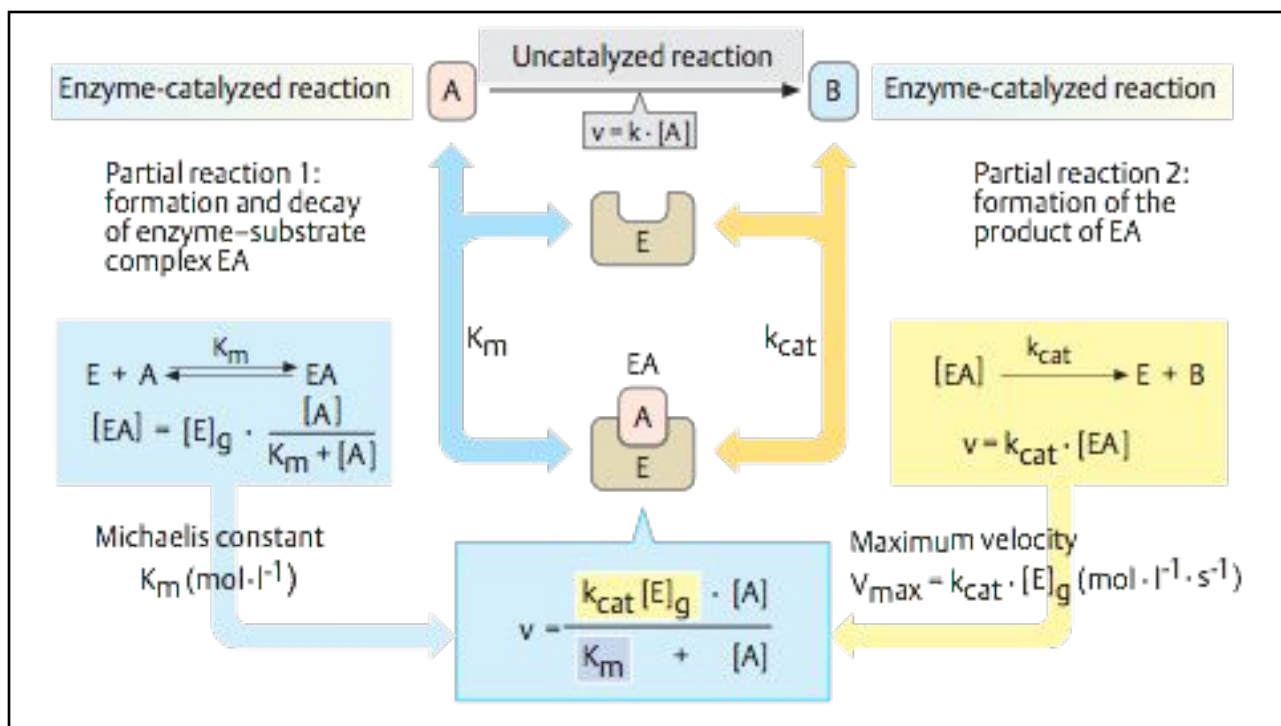
K_M – stała Michaelisa



Na początku reakcji, gdy czas $t \sim 0$, stężenie wolnego substratu jest dużo większe niż stężenie substratu związanego z enzymem (założenie praktyczne).

Aby upewnić się, że jest spełnione założenie reakcji enzymatycznej planuje się w taki sposób, aby prowadzić ją w warunkach $[S]_0 \gg [E]_0$.

$$\begin{aligned}
 [S]_0 &= [S] + [ES] \approx [S] \\
 [E]_0 &= [E] + [ES] \Rightarrow [E] = [E]_0 - [ES]
 \end{aligned}$$




O czym mówi nam równanie Michaelisa-Menten?

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

1. Jeśli $[S] = K_M$ to: $V_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{max}}{2}$

To oznacza, że kiedy stężenie substratu równe jest stałej Michaelisa K_M to szybkość reakcji wynosi połowę szybkości maksymalnej V_{max} .

2. Jeśli wartość $[S] \ll K_M$ to: $K_M + [S] \approx K_M \Rightarrow V_0 = \frac{V_{max}}{K_M} [S]$

To reakcja zachowuje się jak reakcja pierwszego rzędu i jest bezpośrednio proporcjonalna do stężenia substratu

3. Jeśli wartość $[S] \gg K_M$ to: $K_M + [S] \approx [S] \Rightarrow V_0 = V_{max}$

To reakcja zachowuje się jak reakcja zerowego rzędu i jest niezależna od stężenia substratu

$$V = k [A]^0 = k$$