

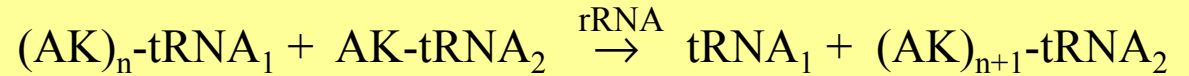
Enzymy

Doc. RNDr. Jiří Dostál, CSc.

Biochemický ústav LF MU

Obecné vlastnosti enzymů

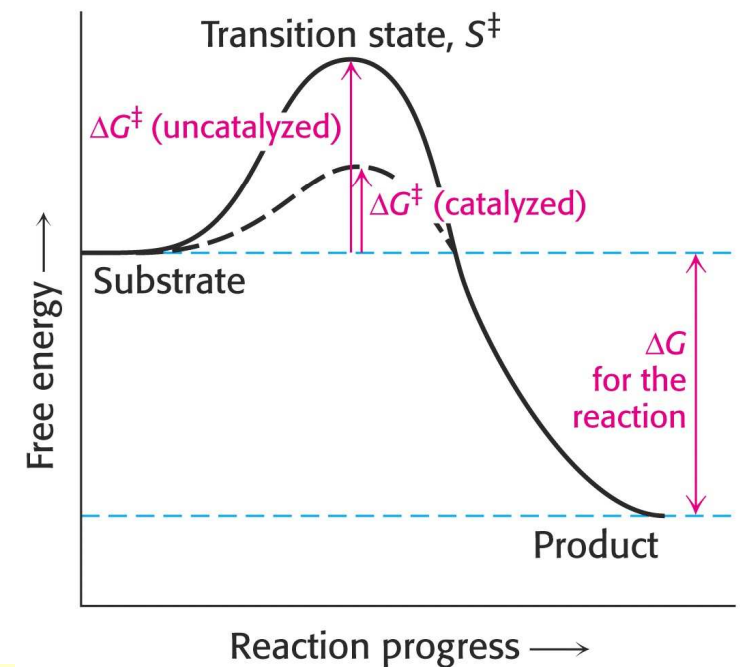
POZOR: peptidyltransferasa je **ribozym**



- biokatalyzátory
- různé proteiny / také RNA (ribozym)
 - s kovalentně vázanou prostetickou skupinou (kovem)
 - oligomerní / multienzymové komplexy / asociované s membránami atd.
- tvoří izoformy - různá distribuce v těle i v buňce
- specifické, vysoce účinné
- fungují za mírných podmínek
- *in vivo* - mohou být regulovány
- *in vitro* - citlivé na vnější podmínky

Enzymy jsou vysoce účinné katalyzátory

- snižují aktivační energii \Rightarrow **urychlují reakce**
- účinnost o mnoho řádů vyšší než u jiných katalyzátorů
- reakce s enzymem jsou o 10^6 - 10^{14} rychlejší než bez enzymu
- nemají vliv na rovnovážnou konstantu K
- z reakce vycházejí nezměněny
- poměrně málo stabilní



Kdyby reakce v biol. systémech nebyly katalyzovány enzymy, byly by tak pomalé, že by nemohly zajistit existenci živé hmoty

V lidském těle jsou enzymy regulovány

Aktivita enzymu

- aktivátory
- inhibitory
- kovalentní modifikace
(fosforylace)

Množství enzymu

- regulace proteosyntézy
a proteolýzy enzymu
- některé hormony –
induktory × represory

Specifičnost enzymů je dvojitá

Účinková

- z možných reakcí substrátu katalyzují pouze jedinou

Substrátová

- z možných substrátů pro určitou reakci si vybírají jediný (nebo jedinou skupinu substrátů)
- často stereospecifické

Enzymy jsou stereospecifické katalyzátory

existují dva typy přeměn:

- **achirální substrát** → **chirální produkt**_(jeden enantiomer)

např. pyruvát → L-laktát, fumarát → L-malát

- **chirální substrát**_(jeden enantiomer) → **produkt**

L-alanin → pyruvát (D-alanin nereaguje)

D-glukosa → → pyruvát (L-glukosa nereaguje)

chirální signální molekula → komplex s receptorem → biologická odpověď

chirální léčivo_{(ant)agonista} → komplex s receptorem → farmakologická odpověď

Názvy enzymů jsou dvojí

Systematické

- přípona *-asa*
- obsahují informaci o substrátu a typu reakce
- číselný kód EC

Doporučené triviální

- zjednodušené
- některé historické (pepsin, amylasa, lipasa)

EC (Enzyme Commission) of International Union of Biochemistry (IUB)
major class number
 . subclass number
 . sub-subclass number
 . enzyme number

Příklady názvů

- **Doporučený triviální název:** alkoholdehydrogenasa
 - **Systematický název:** EC 1.1.1.1 ethanol:NAD⁺-oxidoreduktasa
 - **Reakce:** ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH + H⁺
-
- **Doporučený triviální název:** alaninaminotransferasa (ALT)
 - **Systematický název:** EC 2.6.1.2 L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferasa
 - **Reakce:** L-alanin + 2-oxoglutarát → pyruvát + L-glutamát

Klasifikace enzymů: šest tříd podle typu reakce

[každá třída má další podtřídy]

Třída enzymu	Obecné schéma reakce
1. Oxidoreduktasy	$A_{\text{red}} + B_{\text{ox}} \rightleftharpoons A_{\text{ox}} + B_{\text{red}}$
2. Transferasy	$A-B + C \rightarrow A + C-B$
3. Hydrolasy	$A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$
4. Lyasy	$A-B \rightleftharpoons A + B$ (opačný směr: synthasy)
5. Isomerasy	$A-B-C \rightleftharpoons A-C-B$
6. Ligasy (synthetasy)	$A + B + ATP \rightarrow A-B + ADP + P_i$

1 Oxidoreduktasy

- katalyzují oxidaci nebo redukci substrátu
podtřídy:
- **dehydrogenasy** katalyzují transfer 2 H atomů
- **oxygenasy** katalyzují zabudování jednoho nebo dvou O atomů do substrátu (monooxygenasy, dioxygenasy)
- **oxidasy** katalyzují transfer elektronů mezi substráty (cytochrom-*c*-oxidasa, ferroxidasa)
- **peroxidasy** katalyzují rozklad peroxidů

Příklad: $\text{laktát} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Doporučený název: laktátdehydrogenasa

Systematický název: (*S*)-laktát:NAD⁺ oxidoreduktasa

2 Transferasy

- katalyzují transfer skupiny za jednoho substrátu na druhý

Podtřídy:

- aminotransferasy, methyltransferasy, glukosyltransferasy
- **kinasy** - fosforylace substrátů = transfer fosforýlu PO_3^{2-} z ATP na substrát (hexokinasy, proteinkinasy)

Příklad: glukosa + ATP \rightarrow glukosa-6-P + ADP

Doporučený název: glukokinasa

Systematický název: ATP:D-glukosa fosfotransferasa

3 Hydrolasy

- katalyzují hydrolytické štěpení esterů, glykosidů, amidů, peptidů apod. podtřídy:
- **esterasy** (lipasy, fosfolipasy, ribonukleasy, **fosfatasy**)
- **glykosidasy** (sacharasa, maltasa, laktasa, amylasa)
- **proteinasy a peptidasy** (pepsin, trypsin, kathepsiny, kaspasy, dipeptidasy, karboxypeptidasy, aminopeptidasy)
- **amidasy** (glutaminasa, asparaginasa)
- **ATPasy** (štěpí anhydridové vazby v ATP)

Příklad: $\text{glukosa-6-P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukosa} + \text{P}_i$

Doporučený název: glukosa-6-fosfatasa

Systematický název: glukosa-6-fosfát fosfohydrolasa

Jazyková poznámka: lysozym × lyzosom

Lysozym je enzym

- složenina, **lyso** (řec. *lysis* štěpit) + **zym** (od *enzym*)
- hydrolasa, glykosidasa, štěpí β -1,4-glykosidovou vazbu v bakteriálních mukopolysacharidech
- ve slinách, slzách, sekretech apod.

Lyzosom (lysosom) je organela

- složenina, z řečtiny, *lysis* – štěpit, *soma* – tělo
- typická pro živočišné buňky
- kyselé pH, obsahuje četné kyselé hydrolasy

4 Lyasy

katalyzují **nehydrolytické** štěpení nebo vznik vazeb C–C, C–O, C–N, C–S
odstraněním nebo přidáním malé molekuly jako H₂O, CO₂, NH₃

- **amoniak lyasy** (histidinamoniaklyasa: histidin → urokanát + NH₃)
- **dekarboxylasy aminokyselin** (aminokyselina → amin + CO₂)
- **aldolasy** (štěpení nebo vznik aldolu)
- **dehydratasy/hydratasy** (karbonátdehydratasa: CO₂ + H₂O ⇌ H₂CO₃)

Příklad: fumarát + H₂O ⇌ L-malát

Doporučený název: fumaráthydratasa

Systematický název: (*S*)-maláthydrolyasa

5 Isomerasy

katalyzují intramolekulární přesmyky, příklady:

- **epimerasy**
- **racemasy**
- **mutasy**

Příklad: UDP-glukosa → UDP-galaktosa

Doporučený název: UDP-glukosa 4-epimerasa

Systematický název: UDP-glukosa 4-epimerasa

6 Ligasy

katalyzují vznik vazeb C–C, C–O, C–N za současného **štěpení ATP**

- **karboxylasy**
- **synthetasy**

(glutaminsynthetasa: $\text{glutamát} + \text{ATP} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{glutamin} + \text{ADP} + \text{P}_i$)

Příklad: $\text{pyruvát} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{oxalacetát} + \text{ADP} + \text{P}_i$

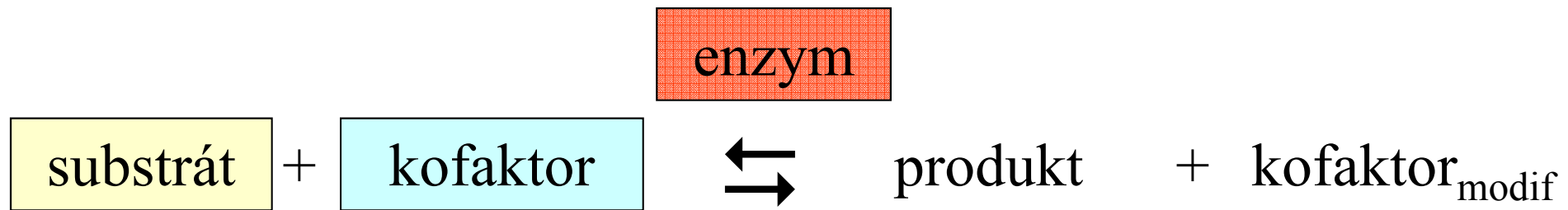
Doporučený název: pyruvátkarboxylasa

Systematický název: pyruvát:CO₂ ligasa

Tři enzymy „mají něco“ s fosfátem

Enzym (Třída)	Schéma reakce / Typ reakce
Kinasa (Transferasa)	$\text{substrát-OH} + \text{ATP} \rightarrow \text{substrát-O-P} + \text{ADP}$ fosforylace = transfer fosforu z ATP na substrát
Fosfatasa (Hydrolasa)	$\text{substrát-O-P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{substrát-OH} + \text{P}_i$ hydrolýza fosfoesterové vazby
Fosforylaza (Transferasa)	$(\text{glykogen})_n + \text{P}_i \rightarrow (\text{glykogen})_{n-1} + \text{glukosa-1-P}$ fosforolýza = štěpení O-glykosidové vazby fosfátem = transfer glukosylu na anorganický fosfát

Tři různé složky v enzymové reakci



1. substrát(y)
 2. kofaktor
- } přímo spolu reagují
3. enzym katalyzuje (= koordinuje + urychluje) reakci

Poznámky:

- substrát může být jeden nebo dva (dehydrogenace × transaminace)
- substrát může být nízko / vysokomolekulární (hexokinasa × proteinkinasa)
- některé reakce probíhají bez kofaktoru (např. hydrolýzy)
- reakce může vratná i nevratná (dehydrogenace × dekarboxylace)

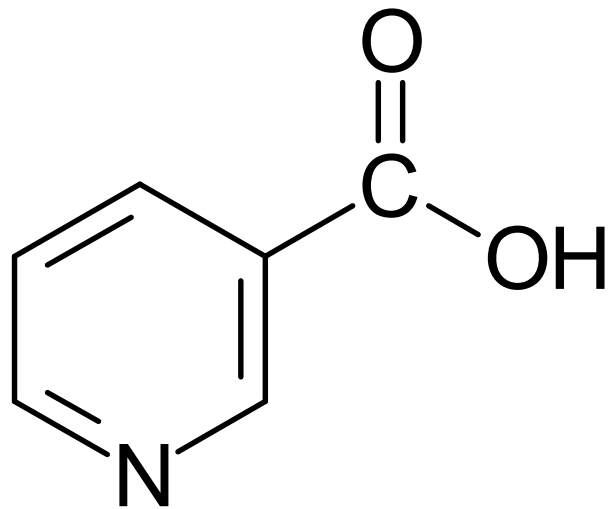
Kofaktory enzymů jsou deriváty vitaminů

- nízkomolekulární neproteinové sloučeniny
- **přenášejí 2 H nebo e^- → oxidoreduktasy**
- **přenášejí skupiny → transferasy**
- pevně vázané - prostetická skupina
- volně vázané - koenzymy (kosubstráty)

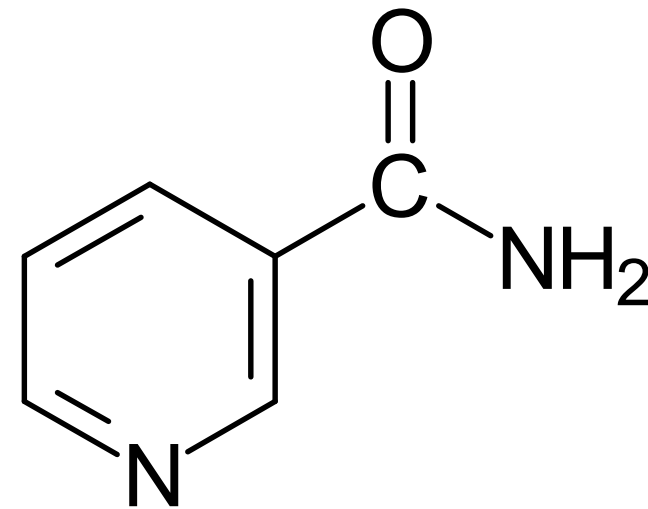
Kofaktory oxidoreduktas

Oxidovaná forma	Redukovaná forma	Funkce kofaktoru
NAD ⁺ (niacin)	NADH+H ⁺	NAD ⁺ akceptor 2 H
NADP ⁺ (niacin)	NADPH+H ⁺	NADPH+H ⁺ donor 2 H
FAD (riboflavin)	FADH ₂	FAD akceptor 2 H
Dihydrobiopterin (BH ₂)	tetrahydrobiopterin (BH ₄)	BH ₄ donor 2 H
Molybdopterin _{oxid}	molybdopterin _{red}	přenos elektronů
Lipoát (-S-S-)	dihydrolipoát (2 -SH)	antioxidant / přenos acylu
Ubichinon (Q)	ubichinol (QH ₂)	přenos 2 elektronů a 2 H ⁺
Hem-Fe ³⁺	hem-Fe ²⁺	přenos 1 elektronu
Nehem-S-Fe ³⁺	nehem-S-Fe ²⁺	přenos 1 elektronu
Glutathion _{oxid} (G-S-S-G)	glutathion _{red} (GSH)	2 GSH donorem 2 H

Nikotinamid (niacin, vitamin B₃)



nikotinová kyselina
(pyridin-3-karboxylová)



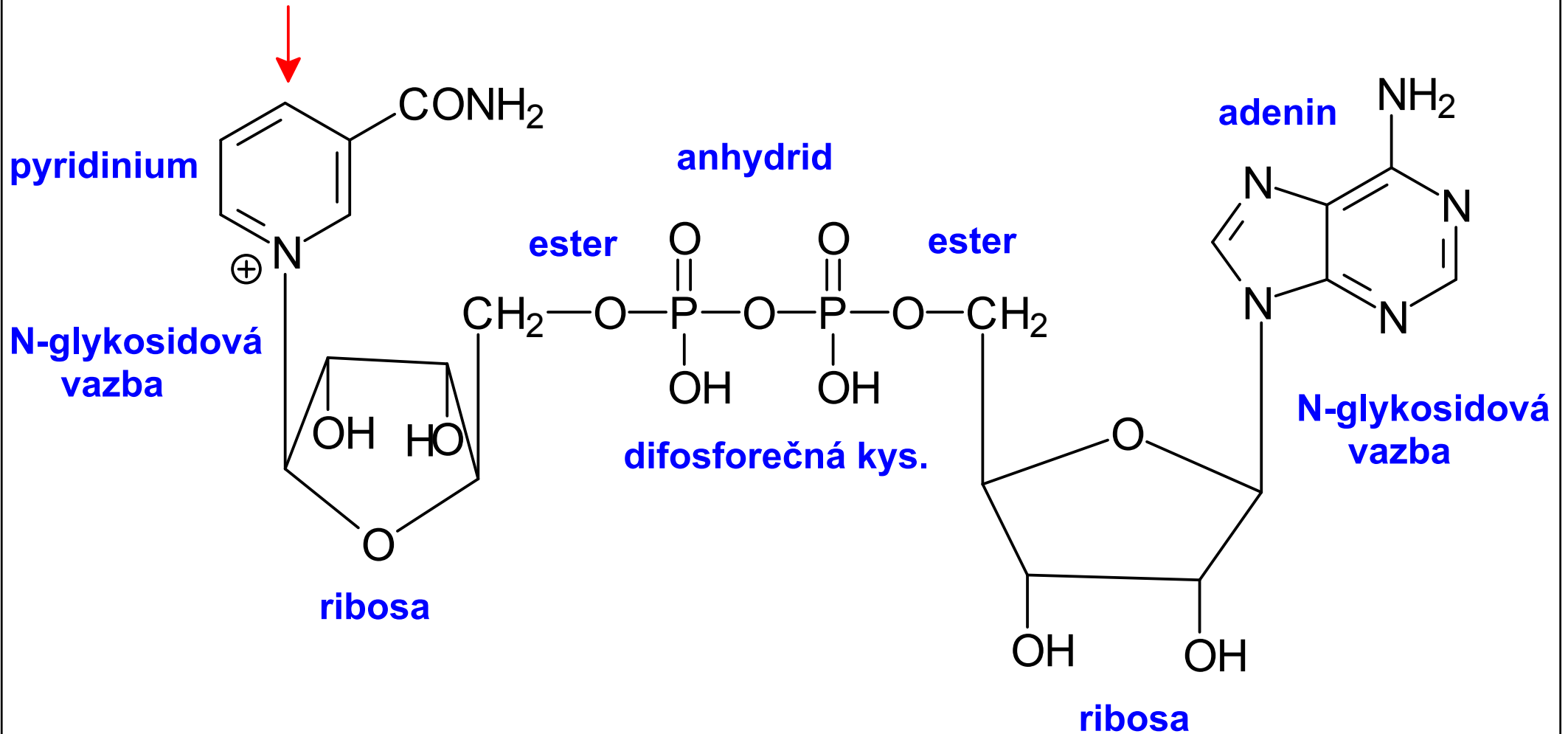
nikotinamid

játra, maso, kvasnice,
částečně vzniká z tryptofanu

Struktura NAD⁺

odvozen od vitamínu niacinu

adice hydridového aniontu

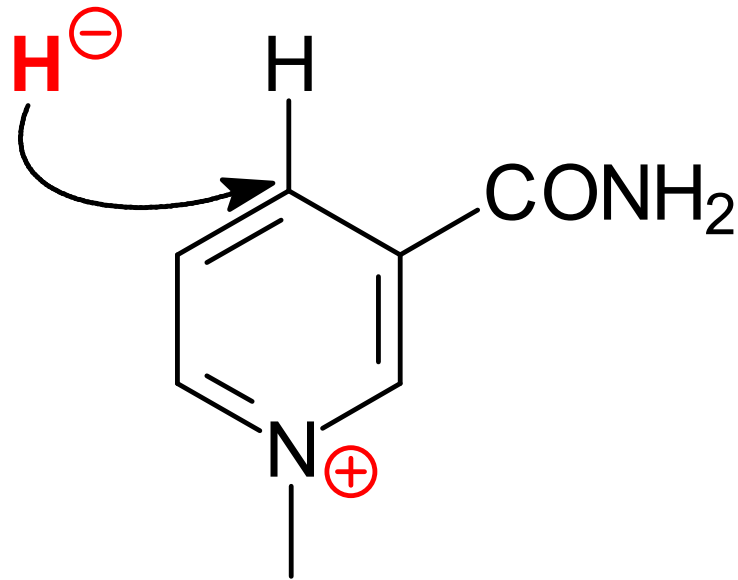


NAD⁺ je dehydrogenační činidlo

- nikotinamidadenindinukleotid
- kofaktor dehydrogenas
- odnímá **2H** ze substrátu
- jeden se jako hydridový anion **H⁻** aduje do *p*-polohy pyridiniového kruhu
- druhý se jako proton **H⁺** váže na enzym



Redoxní pár kofaktoru

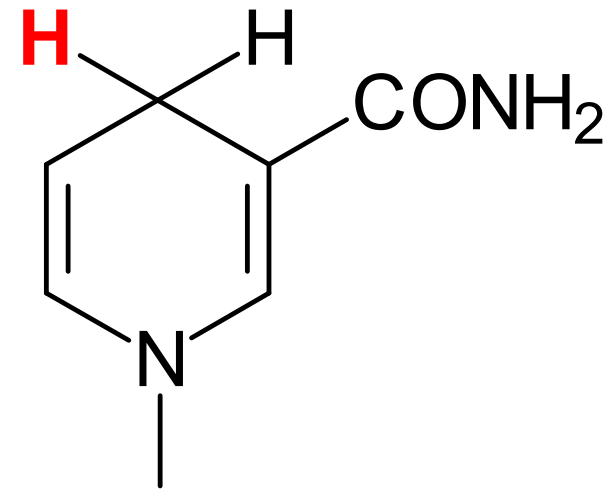


oxidovaná forma NAD^+

aromatický kruh

čtyřvazný dusík

kladný náboj na dusíku



redukováná forma NADH

aromaticita **zcela** porušena

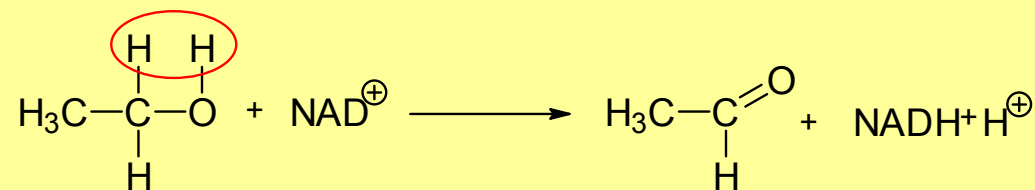
trojvazný dusík

neutrální sloučenina

vysoký obsah energie

Typické NAD⁺ dehydrogenace

Substrát	Produkt
primární alkohol	aldehyd
sekundární alkohol	keton
aldehyd hydrát	karboxylová kys.
hemiacetal	ester
cyklický hemiacetal	lakton
hydroxykyselina	oxokyselina
aminokyselina	iminokyselina



Redukovaný kofaktor NADPH+H⁺ je hydrogenační činidlo

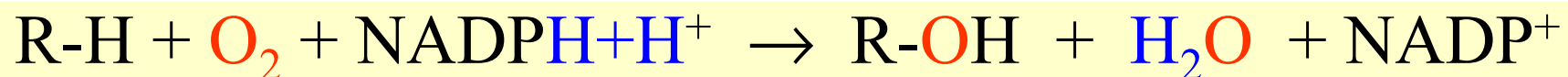
- donor 2H při hydrogenaci
- kofaktor **redukčních syntéz** (mastné kyseliny, cholesterol)
- regenerace glutathionu (GSH) v erytrocytech
- kofaktor **hydroxylačních reakcí**:

cholesterol → → žlučové kyseliny

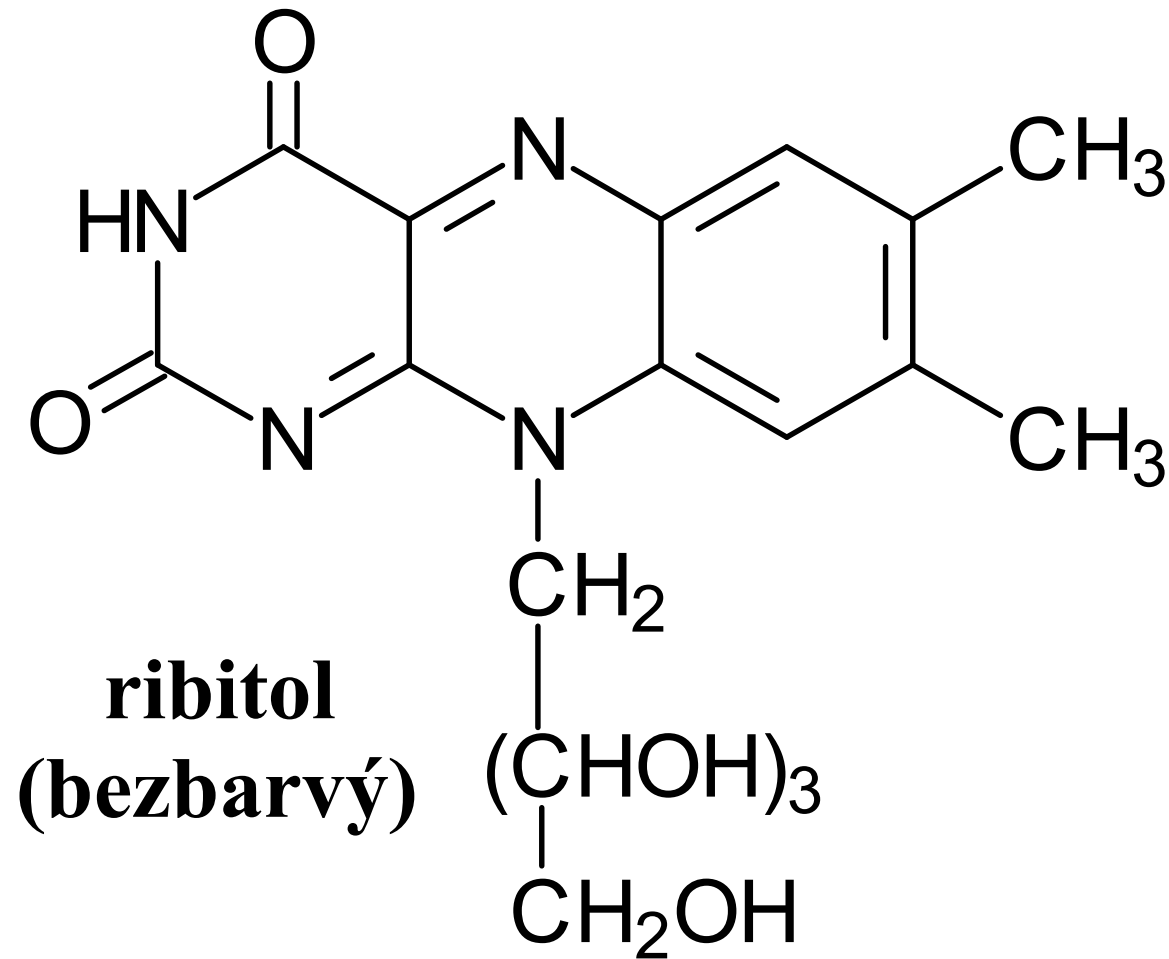
kalciol → → kalcitriol

xenobiotikum → hydroxylované xenobiotikum

- obecné schéma hydroxylace:

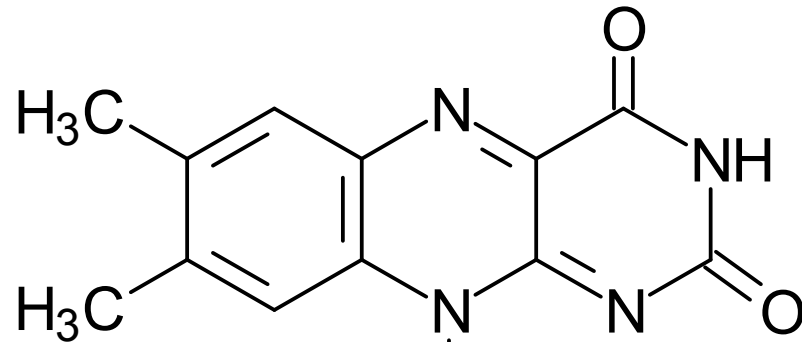


Riboflavin obsahuje ribitol navázaný na flavin (dimethylisoalloxazin)



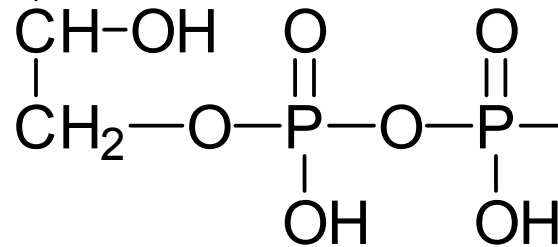
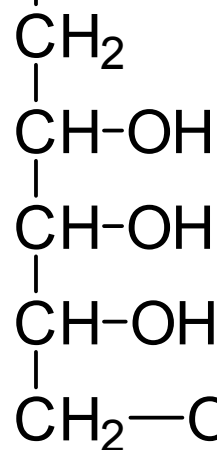
Struktura FAD

odvozen od vitamínu riboflavínu

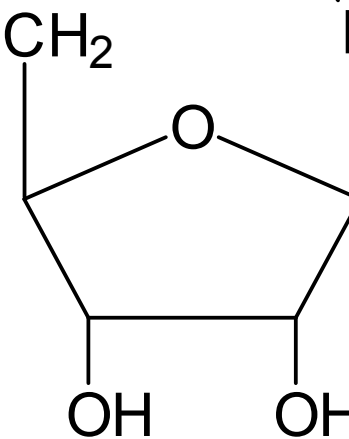


dimethylisoalloxazin

ribitol

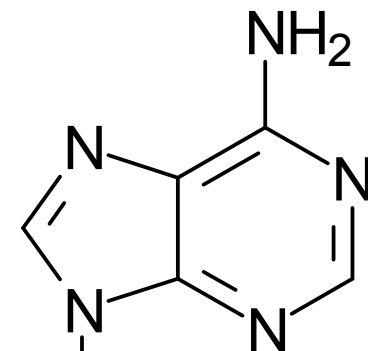


difosfát



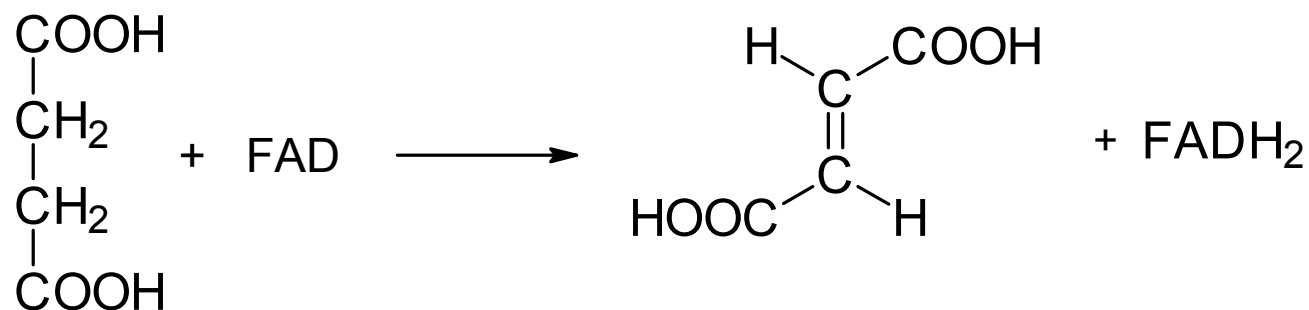
ribosa

adenin



FAD je dehydrogenační činidlo

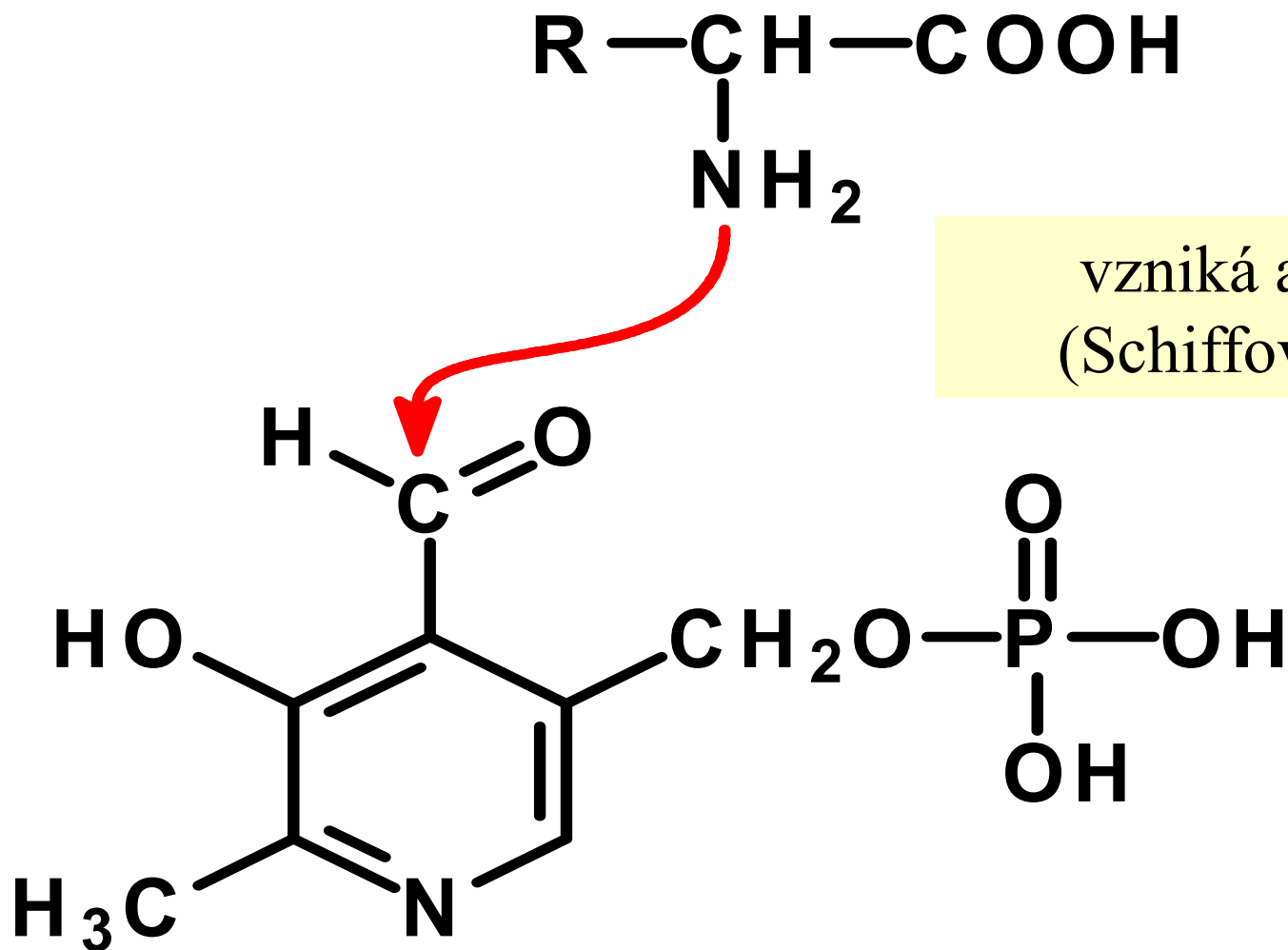
- flavinadenindinukleotid
- kofaktor flavinových dehydrogenas
- dehydrogenace -CH₂-CH₂- skupiny
- **2H** se vážou na dva dusíky riboflavinu
- příklad: dehydrogenace sukcinátu na fumarát (CC)



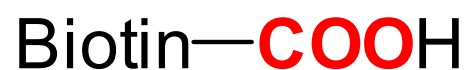
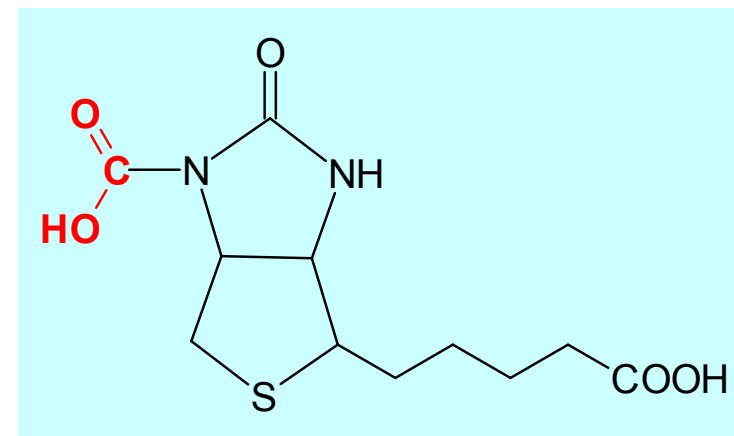
Vitaminy a kofaktory transferas

Vitamin	Kofaktor	Přenášená skupina
Pyridoxin (Vzniká v těle)	pyridoxalfosfát	-NH ₂ (transaminace)
(Vzniká v těle)	ATP	-PO ₃ ²⁻ (fosforyl)
	PAPS	-SO ₃ ²⁻
Biotin	karboxybiotin	CO ₂
Pantothenová kys. (Vzniká v těle)	CoA-SH	acyl
(Methionin)	dihydrolipoát	acyl
	SAM	-CH ₃
Listová kys. (folát)	tetrahydrofolát	C ₁ skupiny
Kyanokobalamin	methylokobalamin	-CH ₃
Thiamin	thiamindifosfát	zbytek některých oxokyselin

Pyridoxalfosfát je kofaktor transaminace a dekarboxylace aminokyselin



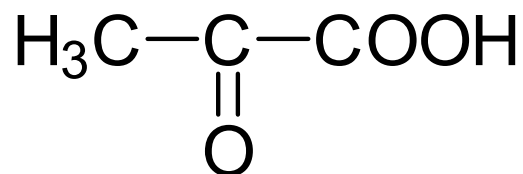
Karboxybiotin je kofaktor karboxylačních reakcí



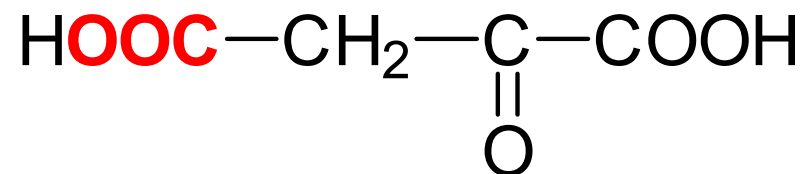
pyruvátkarboxylasa



+



pyruvát

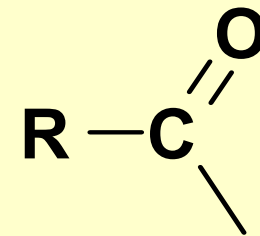


oxalacetát

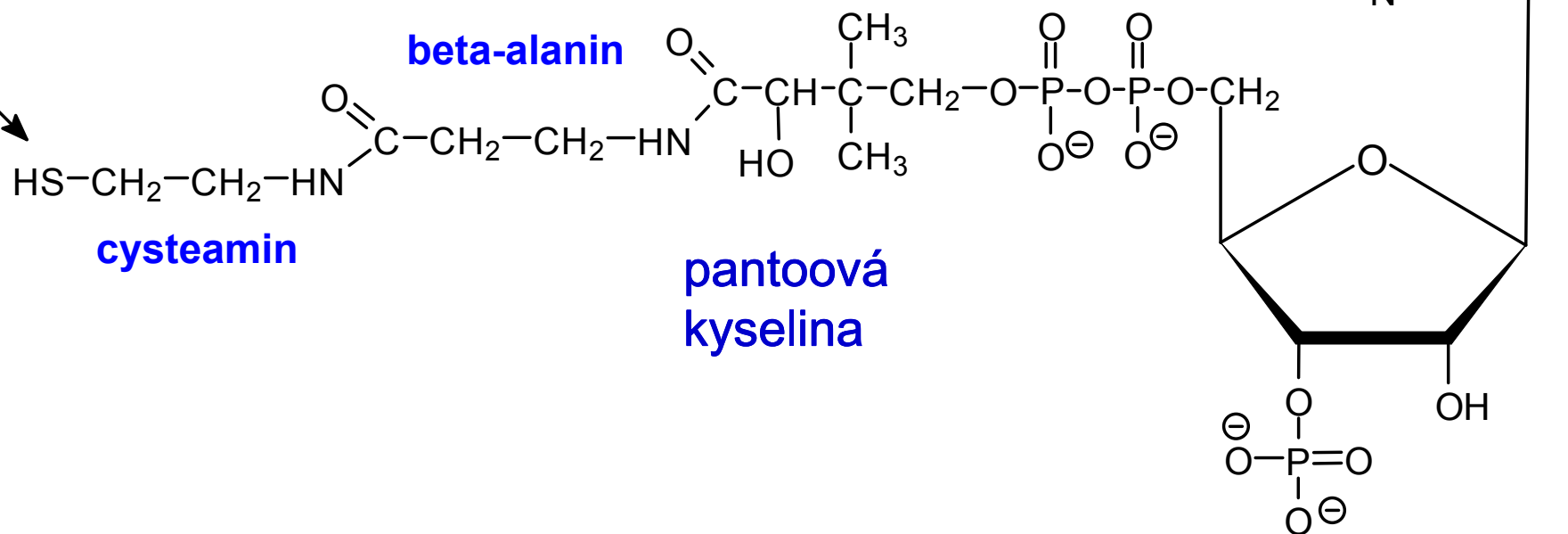
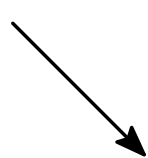
Rozlišujte: Dekarboxylace vs. Karboxylace

Kofaktor	Dekarboxylace
Thiamin-diP	pyruvát \rightarrow acetyl-CoA + CO ₂ 2-oxoglutarát \rightarrow sukcinyl-CoA + CO ₂
Pyridoxal-P	aminokyselina \rightarrow amin + CO ₂
Žádný	acetoacetát \rightarrow aceton + CO ₂ (neenzymová, spontánní)
Kofaktor	Karboxylace
Biotin	pyruvát + CO ₂ + ATP \rightarrow oxalacetát acetyl-CoA + CO ₂ + ATP \rightarrow malonyl-CoA propionyl-CoA + CO ₂ + ATP \rightarrow methylmalonyl-CoA \rightarrow sukcinyl-CoA karboxylace (+ ATP) během katabolismu Val, Leu, Ile
Fylochinon (vitamin K)	protein-Glu + O ₂ + fylochinon _{red} + CO ₂ \rightarrow protein- γ -karboxyGlu posttranslační karboxylace glutamátu, srážení krve
Žádný	Hb-NH ₂ + CO ₂ \rightarrow Hb-NH-COOH (nestabilní Hb-karbamát, spontánně)

Koenzym A (CoA-SH) přenáší acyly



vazba acylu



S-Adenosylmethionin (SAM)

- „aktivní methyl“, trojvazná síra \Rightarrow **sulfoniový kation**

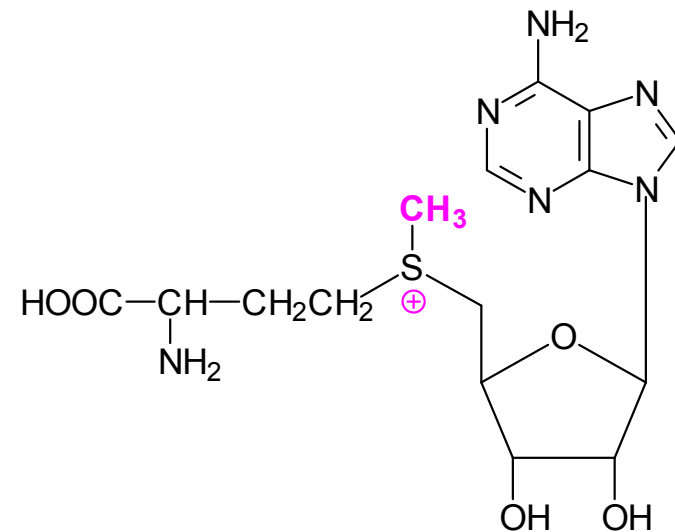
- kofaktor methylačních reakcí:

ethanolamin \rightarrow cholin

guanidinacetát \rightarrow kreatin

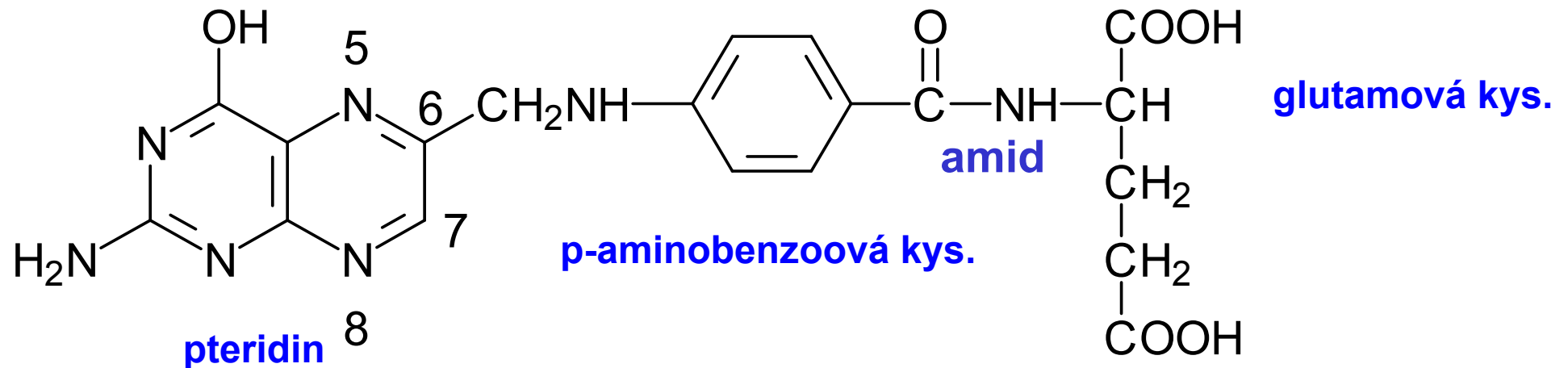
noradrenalin \rightarrow adrenalin

- z methioninu vzniká **homocystein**
- pro remethylaci homocysteinu je nutný methyl-FH₄ a B₁₂ kofaktor

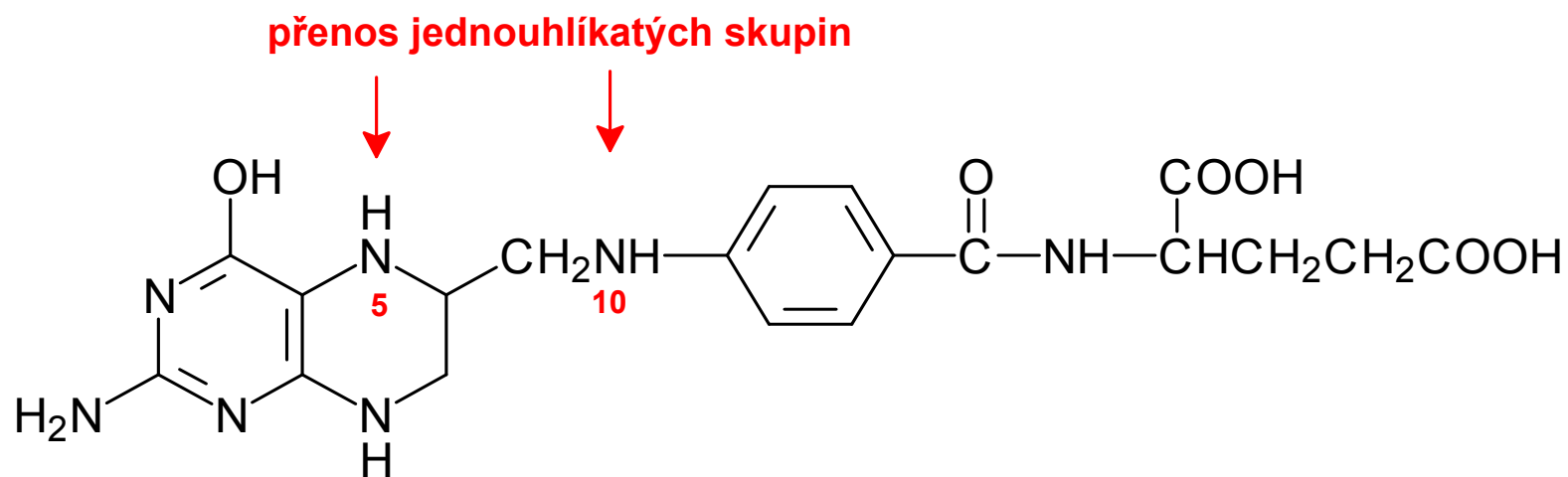


Kyselina listová je vitamin.

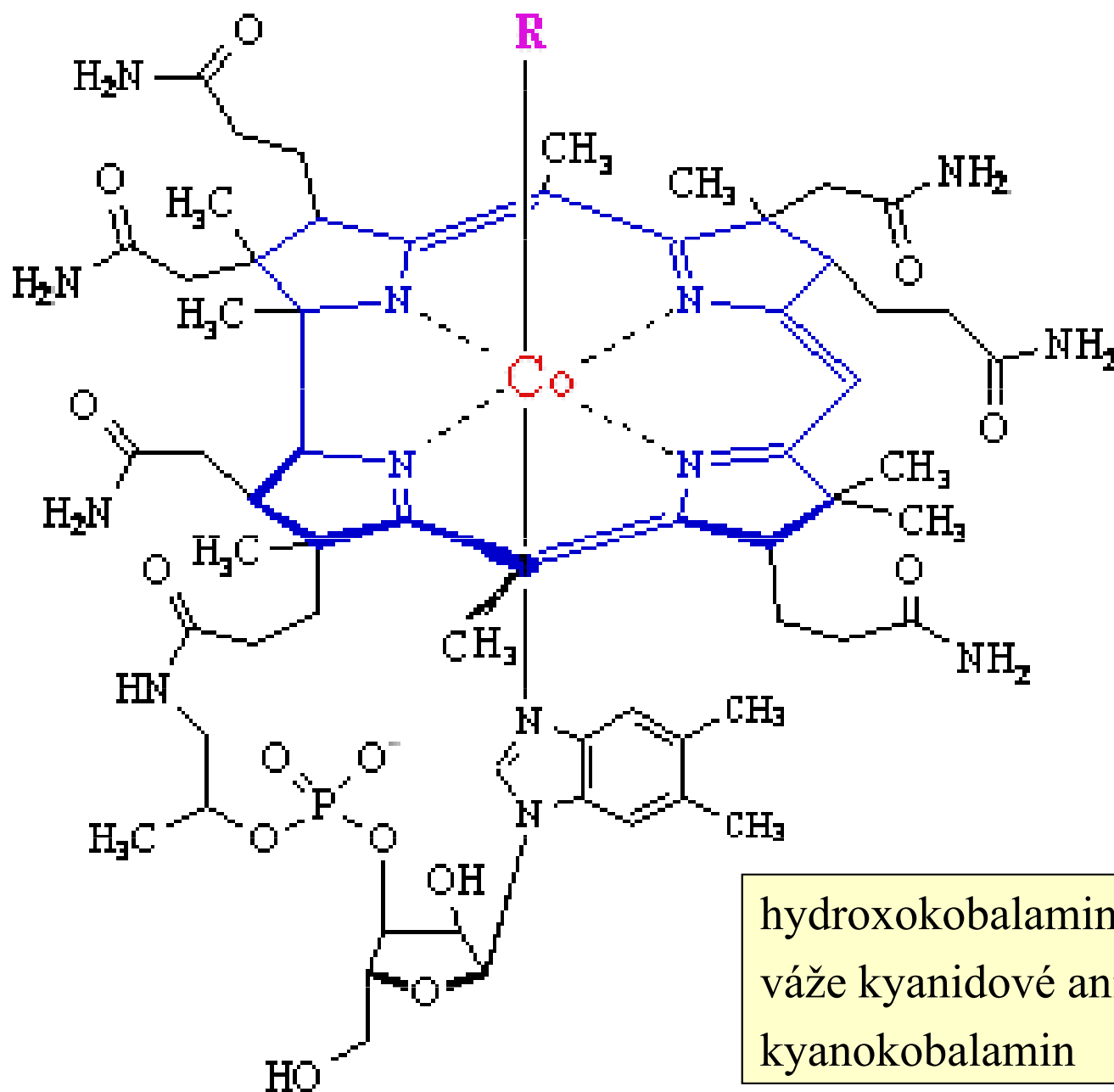
V těle je hydrogenována na 5,6,7,8-tetrahydrofolát (FH₄)



Tetrahydrofolát (FH₄) je kofaktor pro transfer C₁ skupin



B₁₂ vitamin je kyano nebo hydroxokobalamin



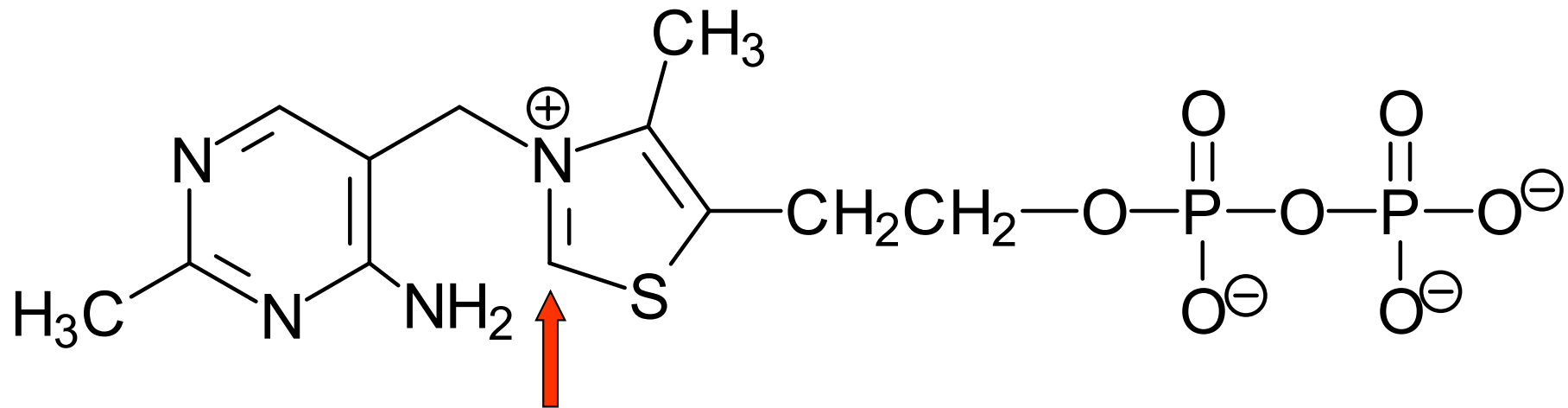
R = CN nebo OH
korinový cyklus

hydroxokobalamin - terapie otravy kyanidy
váže kyanidové anionty na netoxický
kyanokobalamin

**B₁₂ kofaktor je methyl nebo deoxyadenosylkobalamin,
je nutný pro dvě reakce v těle**

- homocystein $\xrightarrow{\text{B}_{12}}$ methionin
- homocystein $\rightarrow\rightarrow$ propionyl-CoA $\xrightarrow{\text{B}_{12}}\rightarrow$ sukcinyl-CoA

Thiamindifosfát (TDP) je kofaktorem oxidační dekarboxylace pyruvátu



vazba pyruvátu a jeho dekarboxylace

glukosa → pyruvát **TDP** → acetyl-CoA

↓
CC

Metaloenzymy

- obsahují **funkční** kovové ionty, které se přímo účastní katalyzované reakce, ionty kovu vázány poměrně pevně (Enz-M)
- některé enzymy potřebují ionty kovů pouze k **aktivaci**, v tom případě jsou vázány slabě (Enz ...M), ionty dvojmocných kovů, Ca^{2+} (koagulační faktory), Mg^{2+} (kinasy)

Molybden

- Součást některých oxidoreduktas
- Součást kofaktoru – molybdopterin
- **Xanthinoxidasa** (xanthin \rightarrow kys. močová)
- **Sulfitoxidasa** ($\text{HSO}_3^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$)

Zdroje Mo: luštěniny, celozrnné obilniny

Zinek

- Mnoho enzymů
- **Alkoholdehydrogenasa**
(ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH+H⁺)
- **Karbonátdehydratasa** (H₂O + CO₂ ⇌ H₂CO₃)
- **Karboxypeptidasy** (štěpení polypeptidů od C-konce)
- **Cu, Zn-superoxiddismutasa** (cytosolová izoforma)
(2 •O₂⁻ + 2 H⁺ → O₂ + H₂O₂)

Zdroje Zn: červené maso, korýši, luštěniny,
slunečnicová a dýňová semínka, celozrnné obilniny

Měď

- Četné oxidoreduktasy
- **Ceruloplazmin (ferrooxidasa)** ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)
- **Cytochrom-c-oxidasa** (DŘ, přenos el. na O_2)
- **Monoaminoxidasy** (MAO, inaktivace biogenních aminů)
- **Dopaminhydroxylasa** (dopamin \rightarrow noradrenalin)
- **Lysyloxidasa** (vyzrávání kolagenu, Lys \rightarrow alLys)

Zdroje Cu: játra, maso, kakao, luštěniny, ořechy

Mangan

- Četné hydrolasy, dekarboxylasy, transferasy
- **Mn-superoxiddismutasa** (mitochondriální izoforma)
- **Arginasa** (Arg → močovina + ornithin)
- Syntéza proteoglykanů + glykoproteinů

Zdroje Mn: luštěniny, celozrnné obilniny, ořechy

Železo

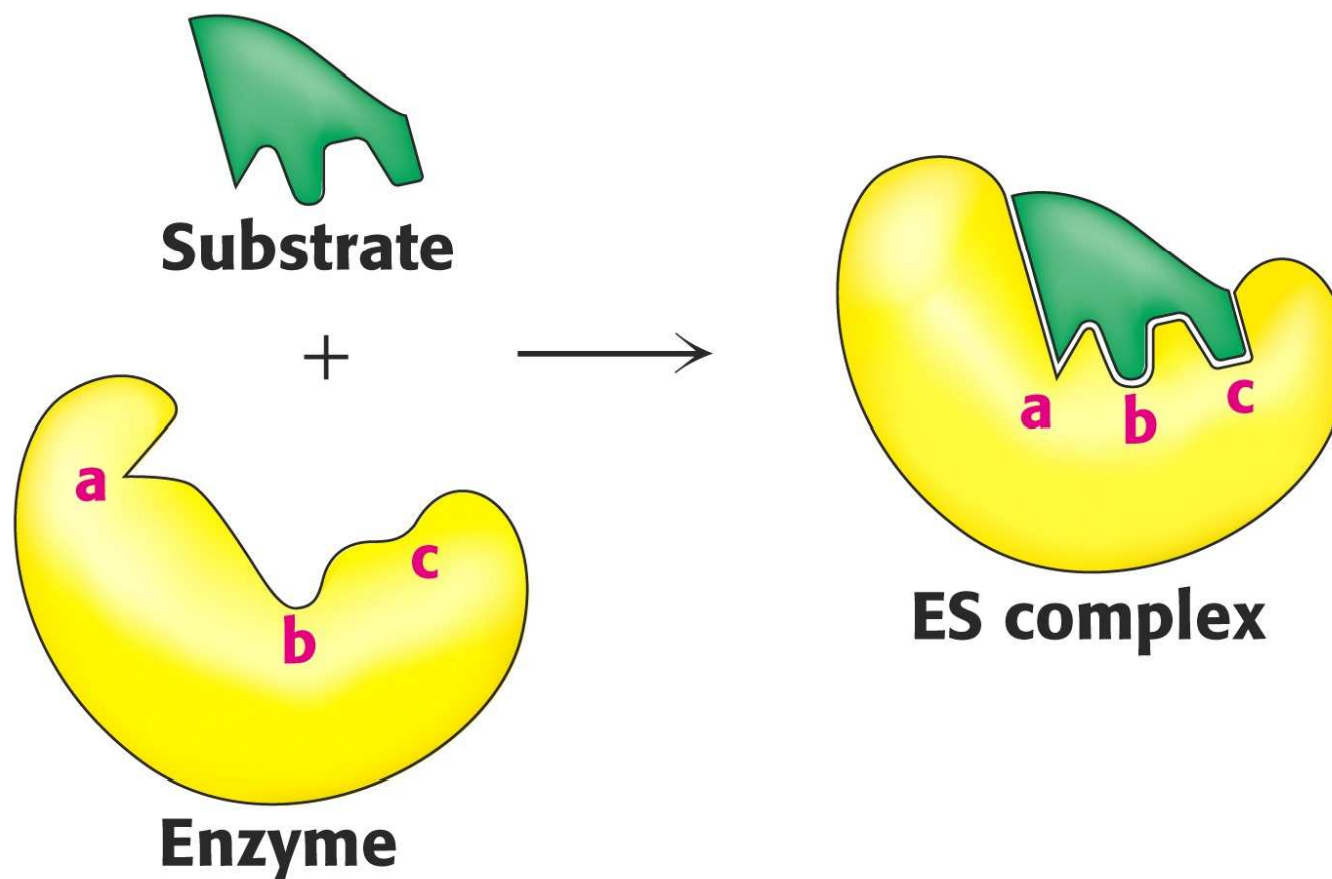
- Hemové enzymy, nehemové přenašeče
- **Katalasa** (hem, $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$)
- **Myeloperoxidasa** (hem, neutrofily)
 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}$
- **Cytochromy** (hem, přenašeče elektronů v DŘ)
- **Fe-S proteiny** (nehem, přenos elektronů v DŘ)

Zdroje Fe: výrobky z vepřové, husí, kachní krve, (červené) maso, játra, žloutek, ořechy

Faktory ovlivňující enzymové reakce

Vazba substrátu na enzym

- vazba substrátu do aktivního místa vyvolá odpovídající konformační změnu molekuly enzymu (indukované přizpůsobení)
- vytvoří se komplex enzym-substrát (ES), který se rozpadne na produkt a enzym



Faktory ovlivňující rychlost enzymové reakce

Teplota	S rostoucí teplotou rychlost reakce vzrůstá, optimální je kolem 40 °C, při vyšších teplotách rychlost klesá – denaturace enzymu
pH	Ovlivňuje stav ionizace skupin v aktivním místě enzymu a jeho okolí konstatní pH v tělesných tekutinách udržují pufrční systémy každý enzym má pH optimum, intracelulární enzymy kolem pH 7 trávicí enzymy mají odlišné: pepsin pH 2
Aktivátory	Umožňují nebo urychlují enzymovou reakci Často ionty dvojmocných kovů: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}
Inhibitory	Zpomalují nebo zastavují enzymovou reakci Kompetitivní: podobné substrátu, soutěží o aktivní místo Jiné: např. ionty těžkých kovů, pevně se vážou na důležité skupiny
Koncentrace substrátu	Při vysoké koncentraci substrátu je enzym nasycen, reakce probíhá maximální rychlostí, graficky vyjadřuje saturační křivka

Příklady denaturace bílkovin/enzymů

Denaturační faktor	Přerušené interakce	Příklad
Zahřívání nad 50 °C	H-vazby, hydrofobní interakce	vaření, pečení jídla, autoklávování chirurgických nástrojů
Kyseliny	H-vazby, solné můstky	kyselina mléčná z <i>Lactobacillus sp.</i> sráží mléčnou bílkovinu na jogurt
Organické sloučeniny	H-vazby, hydrofobní interakce	ethanol a isopropylalkohol dezinfikují kůži
Ionty těžkých kovů (Pb ²⁺ , Hg ²⁺)	disulfidové vazby	inhibice enzymů, otrava těžkými kovy
Třepání, šlehání apod.	H-vazby, hydrofobní interakce	příprava sněhu z vaječného bílku

Konstantní pH tělesných tekutin udržují pufry

Pufrační systém	Pufrační báze	Pufrační kyselina	Zastoupení v krvi	pK_A	Poměr [báze] : [kys]
Ideální	Ideální	Ideální	100 %	7,4	1 : 1
Hydrogen uhličitanový	HCO_3^-	$\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$	50 %	6,1	20 : 1
Proteinový ^a	Protein-His	Protein-His- H^+	45 %	6,0–8,0 ^b	?
Hydrogen fosfátový	HPO_4^{2-}	H_2PO_4^-	5 %	6,8	4 : 1

^a V krevní plazmě hlavně albumin, v erythrocytech hemoglobin.

^b Hodnoty pK_A protonizovaného histidinu (His-H^+) závisejí na typu bílkoviny a strukturním okolí histidinu.

Inhibice enzymů

Ireverzibilní

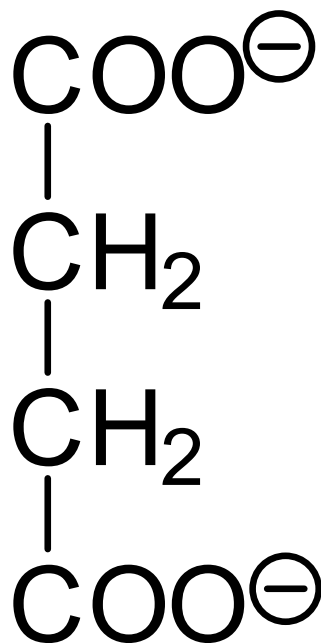
- inhibitor pevně vázán na enzym (akt. místo)
- organofosfáty
- ionty těžkých kovů
- kyanidy

Reverzibilní

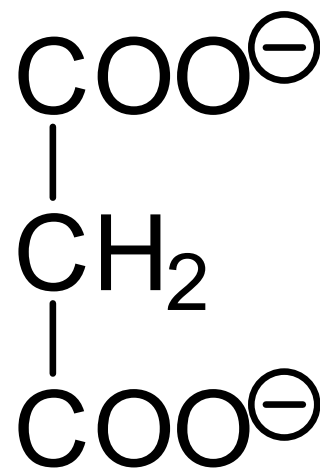
- inhibitor volně vázán
- rovnováha $E+I \rightleftharpoons E-I$
- inhibitor lze odstranit (dialýza, gel. filtrace)
- dva základní typy:

kompetitivní, nekompetitivní

Přirozený substrát vs. kompetitivní inhibitor



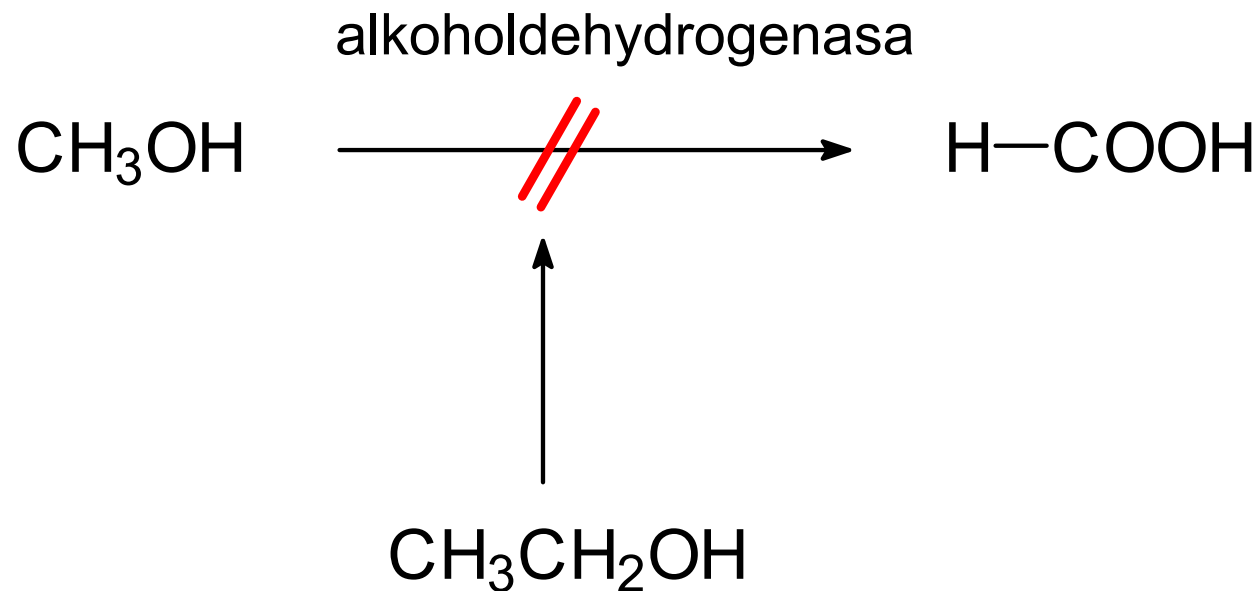
sukcinát



malonát

malonát je inhibitorem sukcinátdehydrogenasy

Otrava methanolem se léčí ethanolem



Vznik toxických produktů je inhibován ethanolem, který vytěsňuje methanol z vazebného místa enzymu – kompetitivní inhibice dehydrogenace methanolu

Mnohá léčiva jsou inhibitory enzymů

- Acetylsalicylová kyselina (cyklooxygenasa)
- Ibuprofen (cyklooxygenasa)
- Statiny (HMG-CoA reductasa) – hypolipidemika, snižují syntézu cholesterolu (lovastatin)
- Inhibitory ACE (angiotensin konvertující enzym) – léčba hypertenze (enalapril)
- Reverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy (neostigmin) – nervosvalové choroby, pooperační atonie střev
- Selektivní inhibitory mozkové acetylcholinesterasy (rivastigmin, galantamin) - Alzheimerova choroba

Antibiotika inhibují enzymy nutné pro určitý životní děj bakterií

- Peniciliny – inhibují transpeptidasy (výstavba buněčné stěny)
- Tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol – inhibice proteosyntézy
- Fluorované chinolony (ciprofloxacin) – inhibice bakteriální gyrasy (topoisomerasy II) (rozplétání DNA během replikace)

Závislost na koncentraci substrátu

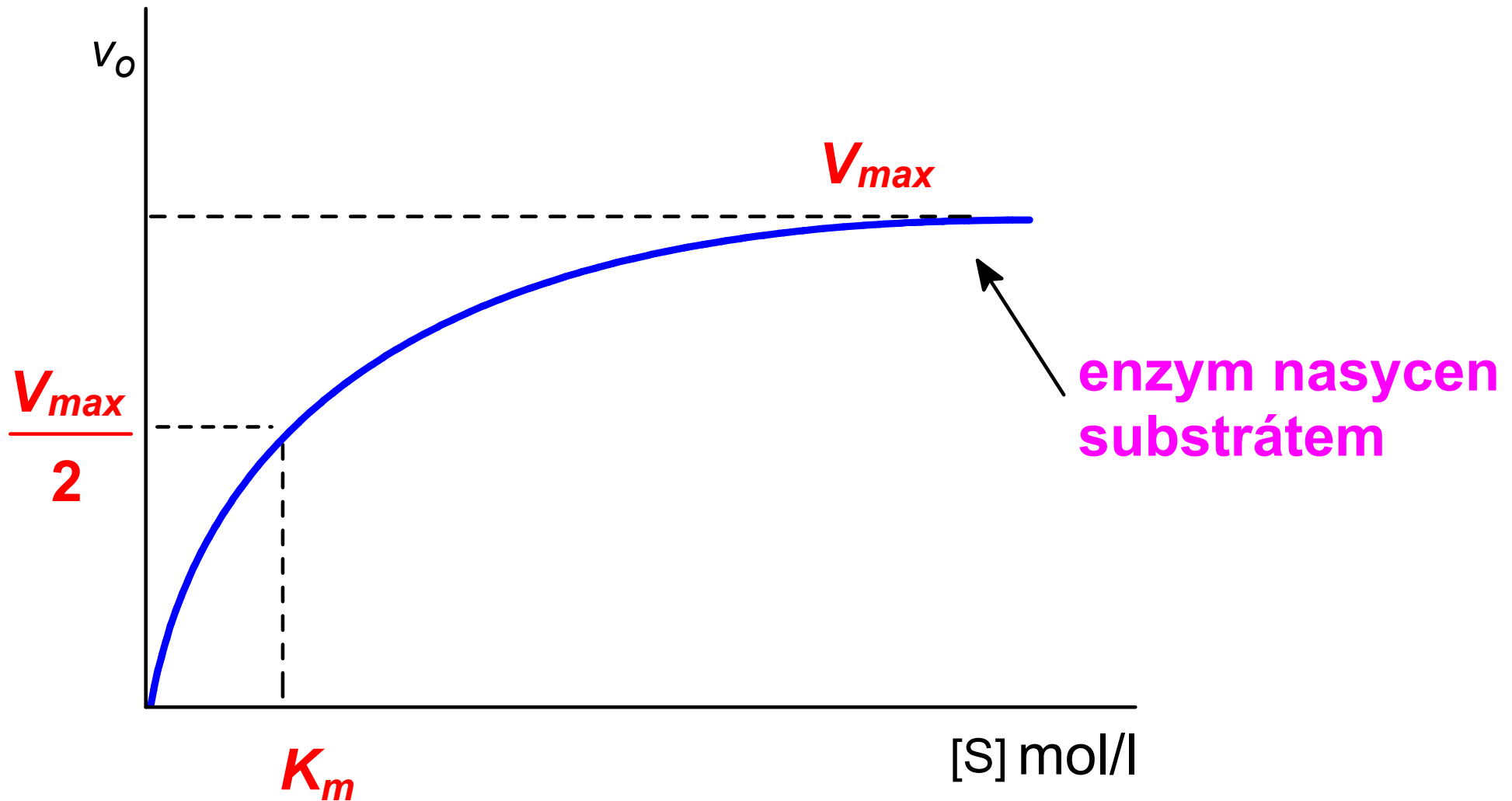
- rovnice Michaelise a Mentenové
- v_o je počáteční rychlost (nejvyšší hodnota)

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

V_{\max} = maximální rychlost (pro danou koncentraci enzymu)

K_m = Michaelisova konstanta

Grafickým vyjádřením předchozí rovnice je saturační křivka



Jak zjistit množství enzymu v biologickém materiálu?

Množství enzymu v biologickém materiálu lze stanovit dvojím způsobem

- **katalytická koncentrace**
- **$\mu\text{kat/l}$**
- stanoví se produkt enzymové reakce
- většina klinicky významných enzymů
- **hmotnostní koncentrace**
- **$\mu\text{g/l}$**
- stanoví se enzym (jako antigen, imunochemicky)
- jen některé, např. tumorové markery

Katalytická aktivita enzymu

- zavedena jednotka **katal**, $1 \text{ kat} = \text{mol/s}$
- jeden katal je katalytická aktivita enzymu, při které se v reakci přemění jeden mol substrátu

mezinárodní jednotka **IU** (international unit)

$$1 \text{ IU} = \mu\text{mol/min}$$

Převodní vztahy:

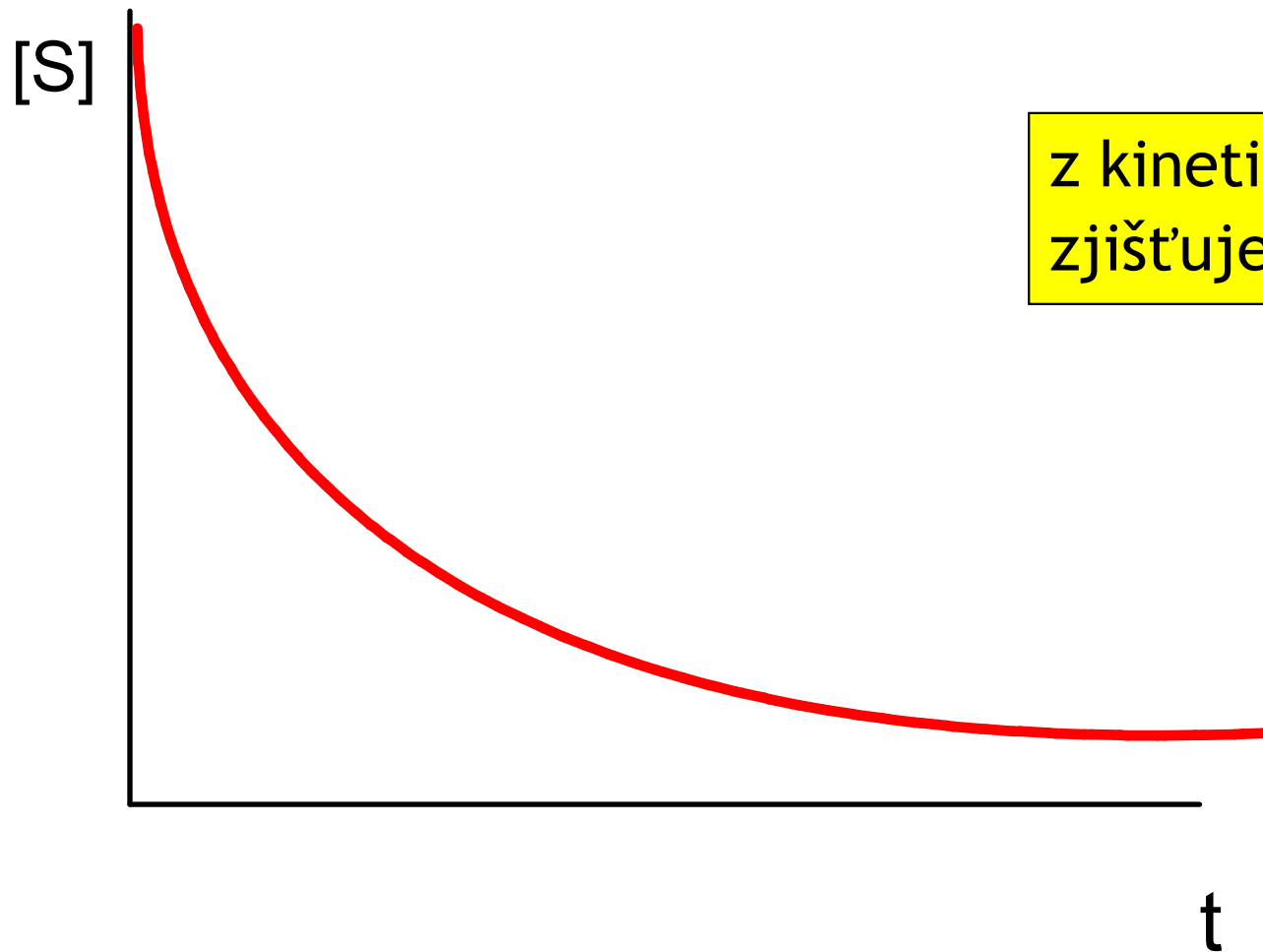
$$1 \mu\text{kat} = 60 \text{ IU}$$

$$1 \text{ IU} = 16,6 \text{ nkat}$$

Katalytická koncentrace enzymu

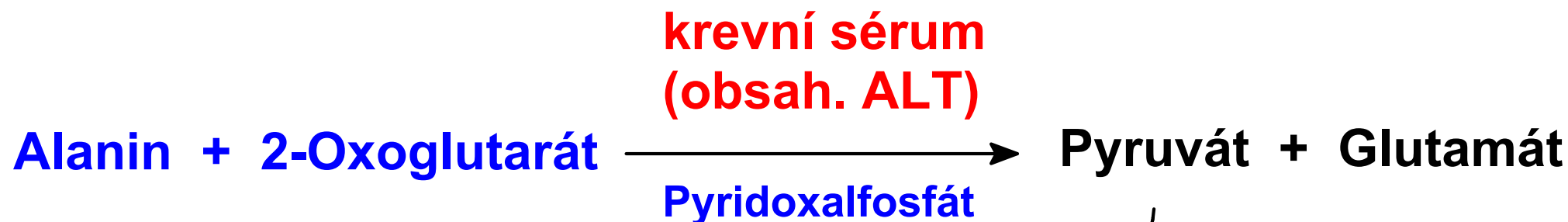
- aktivita je vztažena na **objem biologické tekutiny** (krevní sérum)
- jednotky mkat/l, μ kat/l

Koncentrace substrátu během reakce klesá ⇒ kinetická křivka



z kinetické křivky se
zjišťuje rychlost

Příklad: Metodika stanovení ALT (všechny složky jsou bezbarvé)



optický test

při reakci klesá absorbance
 $\Delta A / \Delta t$

Legenda:
složky reakční směsi
vzorek s enzymem

Stanovení katalytické koncentrace v laboratoři

- optimální podmínky (teplota, pH, kofaktory)
- měří se $\Delta[S]$ nebo $\Delta[P]$ v určitém časovém intervalu
- kinetika 0. řádu, $[S] \gg K_m \Rightarrow$ nasycený enzym, rychlost je konstantní, blíží se V_{\max}

Dvě metody pro zjištění katalytické koncentrace

Charakteristika	Kinetická metoda	Metoda konstantního času
Co se měří	[S] nebo [P]	[P]
Jak	kontinuálně (např. po 10 s)	po urč. čase (např. 10 min) je reakce inhibována
Kinetická křivka hodnocena	ano	ne
Co se stanoví	počáteční rychlost v_0	průměrná rychlost
Zhodnocení metody	přesná	méně přesná

Uvědomte si, že

katal. koncentrace enzymu = rychlost chemické reakce

$$\mathbf{[kat/l] = [mol/l.s]}$$

Dělení enzymů podle místa vzniku

Buněčné (intracelulární) enzymy

- mají svou funkci uvnitř buňky, v místě vzniku
- při poškození buňky se uvolní a dostanou se do krve, kde lze zjistit jejich zvýšenou aktivitu
- příklady: ALT, AST, CK, GMT, LD ...

Sekreční enzymy

- působí jinde
- enzymy velkých žláz (pankreas) – lipasa, amylasa ...
- jaterní enzymy na export: koagulační faktory

Intracelulární lokalizace enzymů

Různé typy poškození buňky vedou k tomu, že se do krve uvolňují jen enzymy z určité subcelulární struktury.

Organela	Enzym
Cytoplazma	LD, ALT , cAST (30 %)
Mitochondrie	mAST (70 %)
Golgi komplex, ER	CHS, AMS
Lyzosom	ACP
Membrána	GMT, ALP

lehké poškození jater: $AST/ALT < 1$

těžší poškození jater: $AST/ALT > 1$

Izoenzymy (izoformy) a makroenzymy

- katalyzují stejnou reakci
- ale liší se primární strukturou a/nebo posttranslačními úpravami (glykosylace), tedy fyz.-chem. a kinetickými vlastnostmi
- mají často různou subcelulární / tkáňovou distribuci
- stanovují se elektroforézou, afinitní chromatografií, imunochem. metodami
- makroenzymy – komplexy enzymů a imunoglobulinů, mají dlouhý poločas

Kreatinkinasa (CK) je dimer a tvoří tři izoenzymy

Izoenzym	Výskyt	Procento celk. aktivity	Zvýšení
CK-MM	svaly	94-96 %	svalové trauma
CK-MB	srdce	do 6 %	infarkt
CK-BB	mozek	stopy	poranění mozku

Trojí využití enzymů v lékařství

1. enzymy jako **indikátory** patologického stavu
2. enzymy jako **analytická činidla** v klin. biochemii
3. enzymy jako **léčiva**

Příklady enzymů v klinické diagnostice

Při poškození buněk se zvyšuje aktivita intracelulárních enzymů v extracelulární tekutině

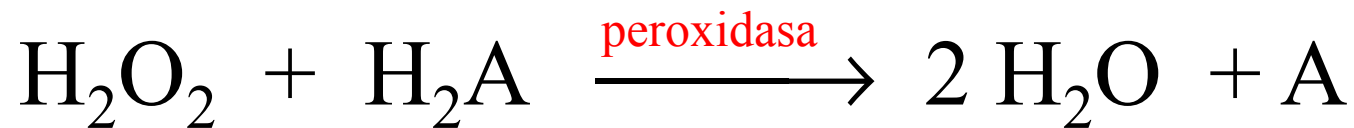
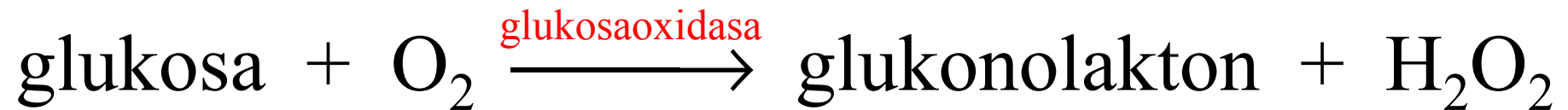
Enzym	Referenční hodnoty	Interpretace zvýšení
ALT	do 0,9 μ kat/l	hepatopatie
CK	do 4 μ kat/l	myopatie, infarkt myokardu
PSA	do 4 μ g/l	karcinom prostaty

ALT alaninaminotransferasa, CK kreatinkinasa, PSA prostatický specifický antigen

Enzymy jako analytická činidla

Enzym	Původ enzymu	Stanovení
Glukosaoxidas	<i>Aspergillus niger</i>	glukosa
Peroxidas	křen (<i>Armoracia</i> sp.)	glukosa
Lipasa	<i>Candida</i> sp.	triacylglyceroly
Cholesteroloxidas	<i>Pseudomonas</i> sp.	cholesterol
Urikasa	<i>Candida</i> sp.	kyselina močová
Bilirubinoxidas	<i>Myrothecium</i> sp.	bilirubin
Ureasa	bob (<i>Canavalia</i> sp.)	močovina
Laktátdehydrogenasa	<i>Pediococcus</i> sp.	ALT, AST
<i>Taq</i> polymerasa	<i>Thermus aquaticus</i>	PCR metoda

Enzymové stanovení glukosy



bezbarvý
chromogen

barevný produkt
(měří se absorbance)

Princip stanovení glukosy v analyzátorech

Osobní glukometry

- určené pro osobní kontrolu u diabetiků
- glukosaoxidas je zakotvena na pevné fázi
- vznikající H_2O_2 se stanovuje jiným způsobem (pomocí Pt-elektrody)
- na displeji se ukáže koncentrace glukosy (mmol/l)



Pankreatické enzymy v terapii

- směs enzymů (lipasy, amylasy, proteiny)
získaná z vepřových pankreatů
- indikace: sekreční nedostatečnost pankreatu různé etiologie, cystická fibróza
- užívání: 3 × denně při jídle
- řada přípravků volně prodejných

acidorezistentní
tobolky,
rozpadají se
až v duodenu

Asparaginasa v terapii leukémie

- Katalyzuje hydrolýzu amidové skupiny asparaginu
- $\text{Asn} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Asp} + \text{NH}_3$
- L-asparagin je nezbytný pro proteosyntézu některých nádorových buněk, Hydrolýza Asp vede k omezení proliferace
- Indikace: akutní lymfoblastické leukemie

Enzymová fibrinolytika

- léčiva, která rozpouštějí krevní sraženiny v cévách
- urokinasa (lidská)
- štěpí plazminogen na plazmin – ten vyvolá degradaci fibrinu a trombolýzu
- indikace: žilní trombóza, plicní embolie, akutní IM

Proteasy v terapii



Lokální působení:

- fibrinolyzin, chymotrypsin, kolagenasa
- po lokální aplikaci vedou k lýze nekrotické tkáně, nepoškozují zdravé buňky (obsahují inhibitory proteas)
- hnisavé rány, bércové vředy, diabetické gangrény, dekubity apod.

Celkové působení:

- trypsin, chymotrypsin, rostlinné proteasy - papain (papaya), bromelain (ananas)
- některé studie naznačují protizánětlivý účinek, ovlivnění imunity u autoimunitních onemocnění
- indikace: pomocná léčiva při revmatoidní artritidě, traumatické záněty a otoky, lymfedémy, apod., volně prodejné přípravky (Wobenzym, Phlogenzym aj.)