

Enzymy

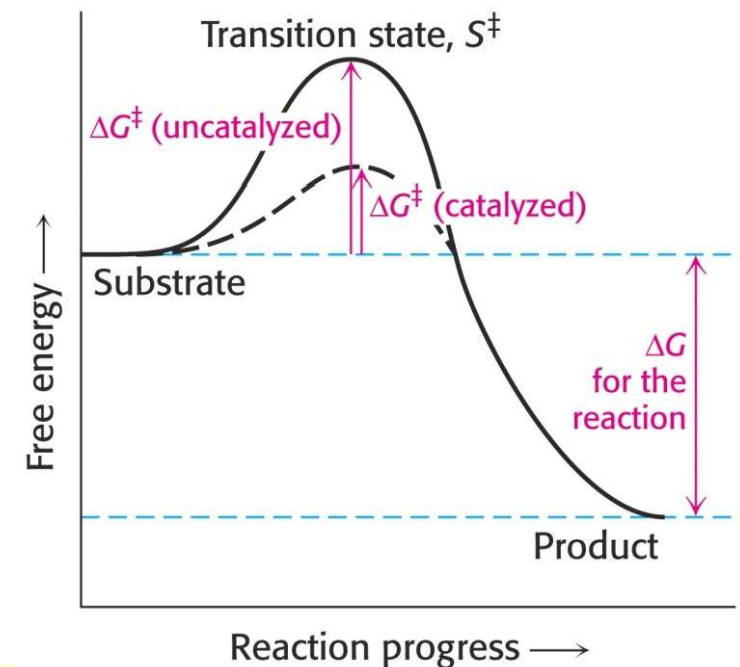
Biochemický ústav LF MU

ET,JD

2016

Enzymy jsou biokatalyzátory

- 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

Specifičnost enzymů je dvojí

Účinková

- z možných reakcí substrátu katalyzují pouze jedinou

Substrátová

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

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

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**

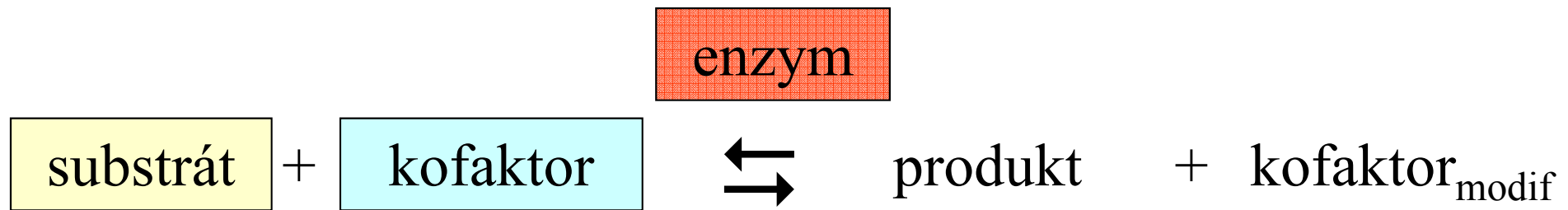
(glutaminsynthetasa: $\text{glutamát} + \text{ATP} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{glutamin} + \text{ADP} + \text{P}_i$)

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 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

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

Příklady kofaktorů oxidoreduktas – vztah k vitamínům

Kofaktor - oxidovaná forma	Vitamin	Funkce kofaktoru
NAD ⁺	Niacin (B ₃)	NAD ⁺ akceptor 2 H
NADP ⁺	Niacin (B ₃)	NADPH+H ⁺ donor 2 H
FAD	Riboflavin (B ₂)	FAD akceptor 2 H
Lipoát (-S-S-)	--	antioxidant / přenos acylu
Ubichinon (Q)	---	přenos 2 elektronů a 2 H ⁺
Glutathion _{oxid} (G-S-S-G)	--	2 GSH donorem 2 H

Příklady kofaktorů transferas – vztah k vitaminům

Kofaktor	Vitamin	Přenášená skupina
pyridoxalfosfát	Pyridoxin (B ₆)	-NH ₂ (transaminace)
ATP	(Vzniká v těle)	-PO ₃ ²⁻ (fosforyl)
karboxybiotin	Biotin (H)	CO ₂
CoA-SH	Pantothenová kys. (B ₅)	acyl
tetrahydrofolát	Listová kys. (folát) (B ₁₁)	C ₁ skupiny
Methylkobalamin	Kyanokobalamin (B ₁₂)	-CH ₃
Thiamindifosfát	Thiamin (B ₁)	zbytek některých oxokyselin

Přehled hydrofilních vitaminů

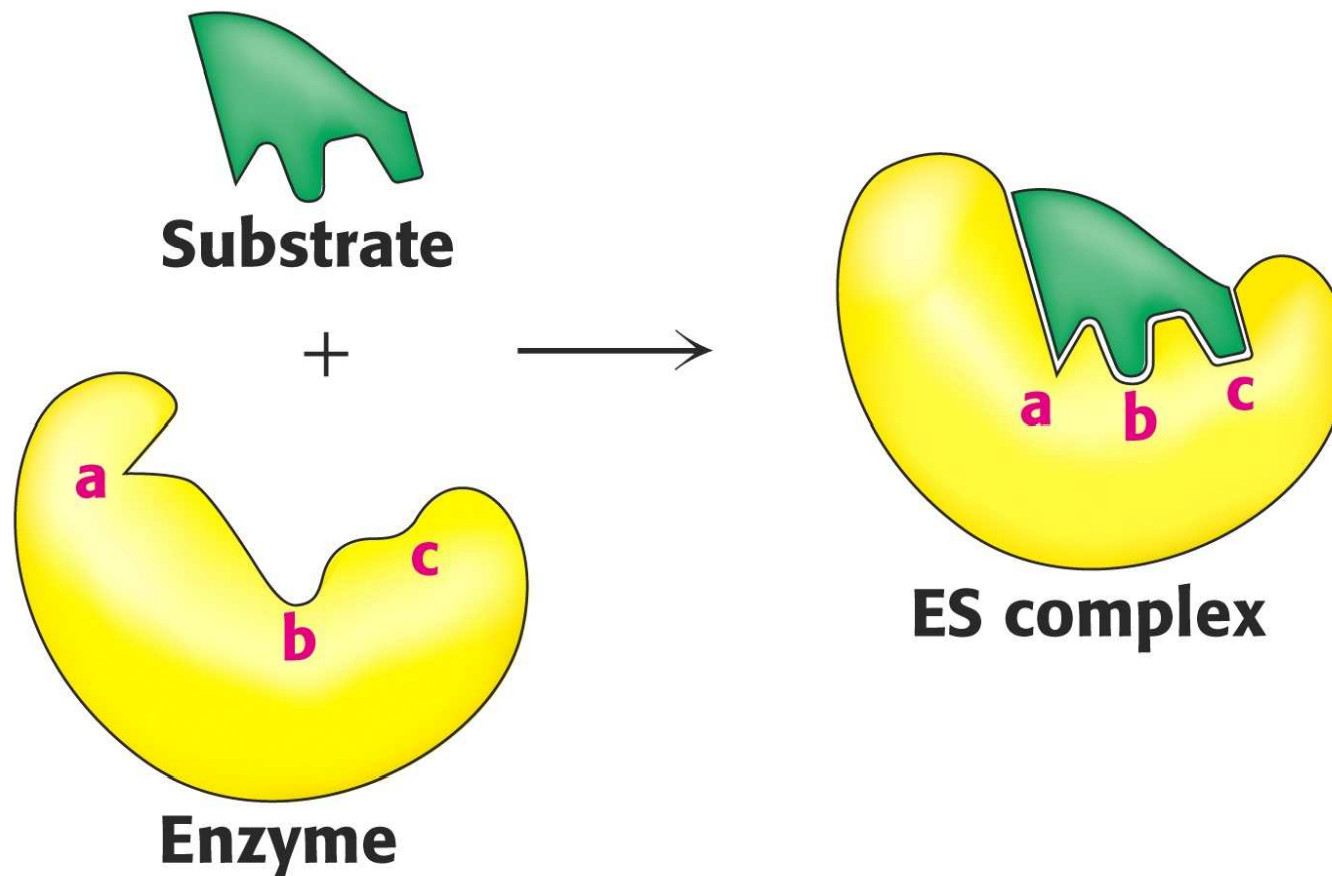
vitamin	název	zdroj	účinek	deficit	DDD (mg)
C	L-askorbát	Čerstvé ovoce, zelenina	antioxidant	Únava, infekce, krvácení z dásní	60
B ₁	thiamin	Maso, vejce, celozrnné obilniny, kvasnice	Koenzym thiamin-difosfát	Únavnost, svalová slabost, sklon k neuritidám	1,5
B ₂	riboflavin	Vejce, mléko, játra, obilniny, kvasnice	Kofaktor FMN, FAD	Postižení sliznic	1,8
B ₆	pyridoxin	Maso, játra, obilné klíčky, kvasnice	Kofaktor transaminace	Postižení sliznic, zmatenost, deprese	2
B ₃	niacin	Maso, játra (částečně vzniká v buňkách)	Kofaktory NAD, NADP	Diarhea, demence, dermatitis – 3D	20
B ₁₂	kobalamin	Živočišné potraviny	Kofaktor methylací	anemie	0,002
B ₁₁	Listová kyselina	Listová zelenina, játra	Kofaktor přenašející jednouhlíkaté zbytky	anemie	0,2
B ₅	Panθοthenová kys.	Játra, mléko, vejce	Součást koenzymu A	Deprese, nespavost	10
H	biotin	Žloutek, játra (částečná syntéza ve střevech)	Kofaktor karboxylace	Anorexie, ztráta vlasů	0,1 1

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)

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 enzymové reakce

Rychlost enzymové reakce

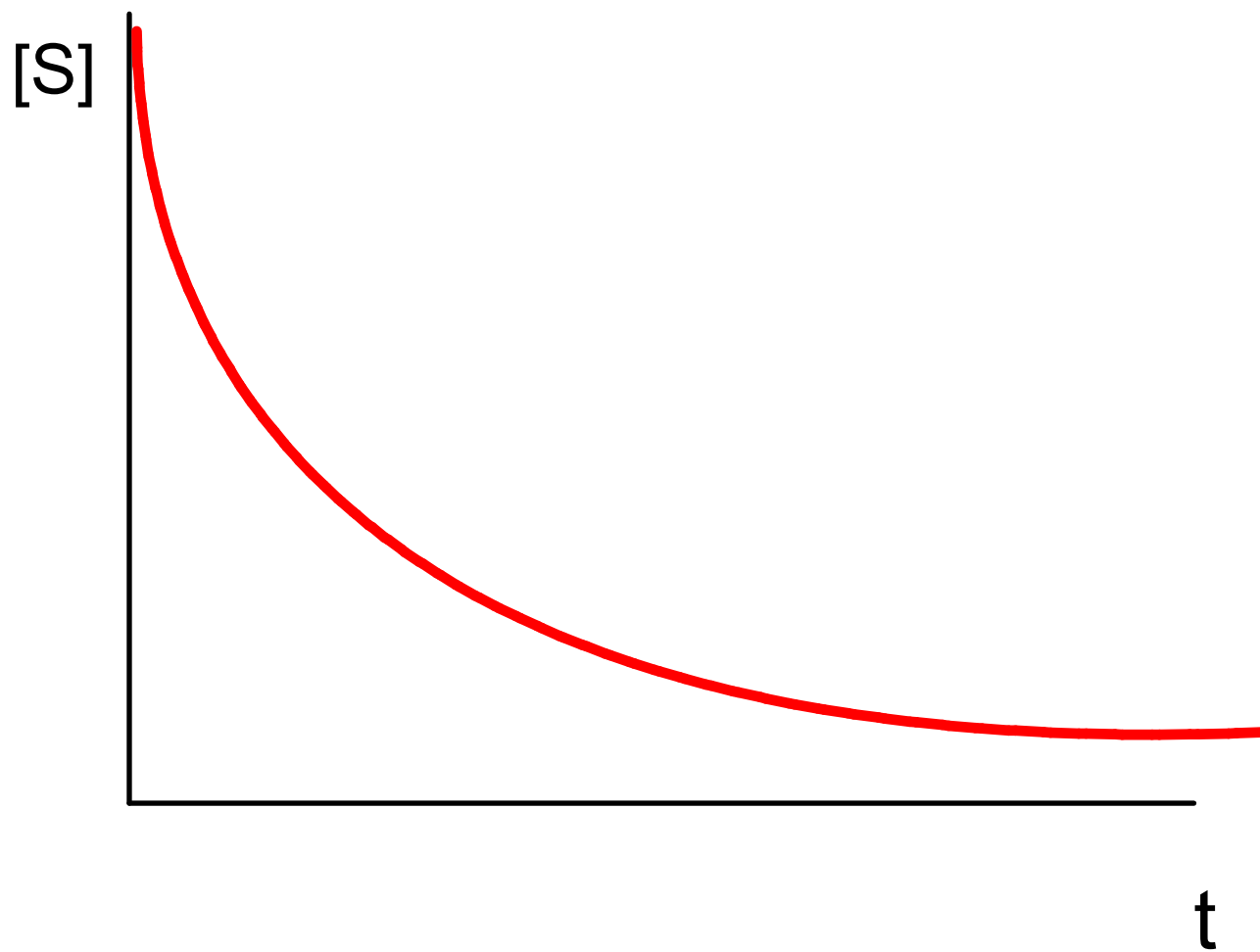
- reakce: $S \longrightarrow P$ (S = substrát, P = produkt)
- definice reakční rychlosti:

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} > 0 \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}\cdot\text{s}} \right]$$

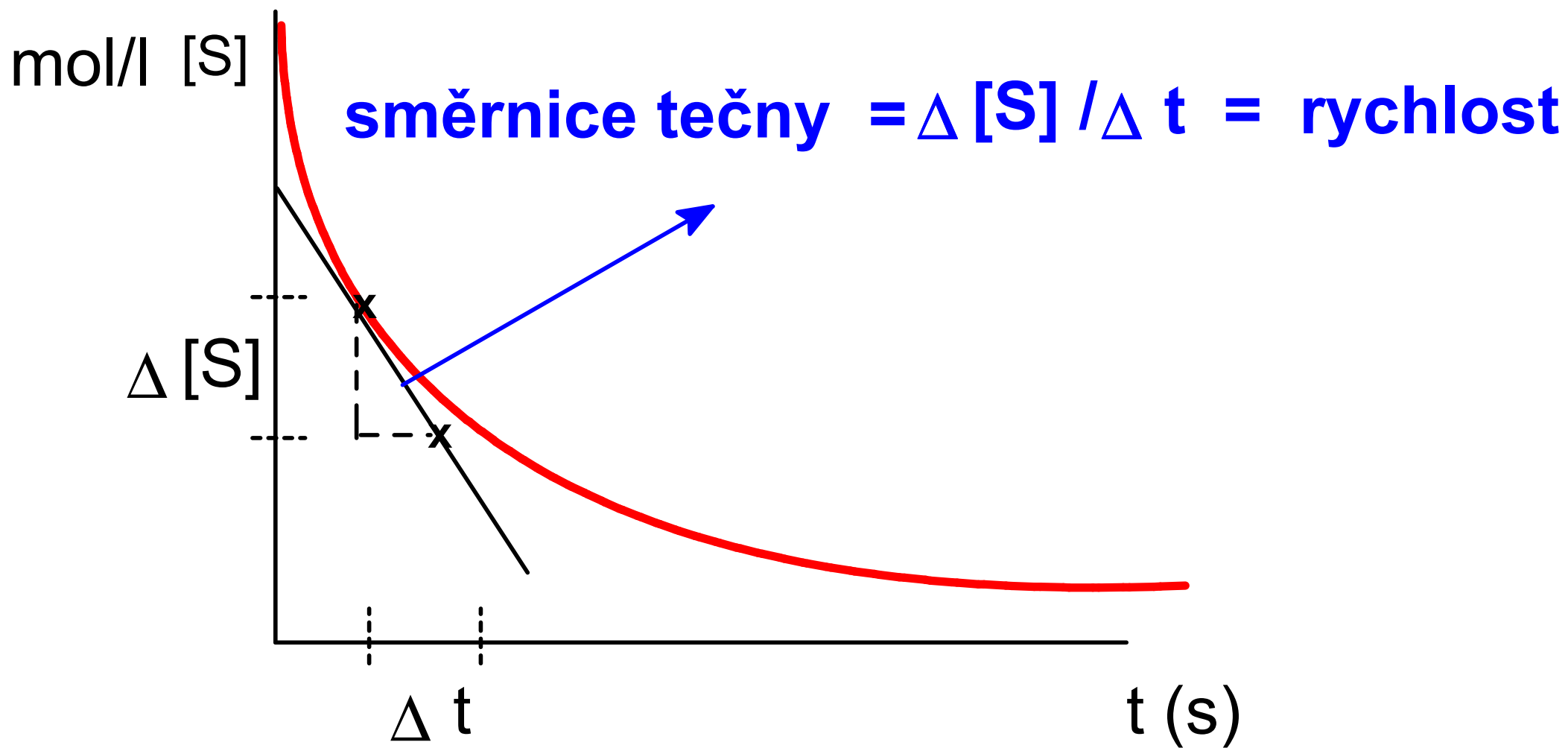
Na čem závisí rychlost enzymové reakce?

- na koncentraci substrátu
- na teplotě
- na přítomnosti efektoru (katalyzátoru, inhibitoru)

Koncentrace substrátu během reakce klesá \Rightarrow kinetická křivka

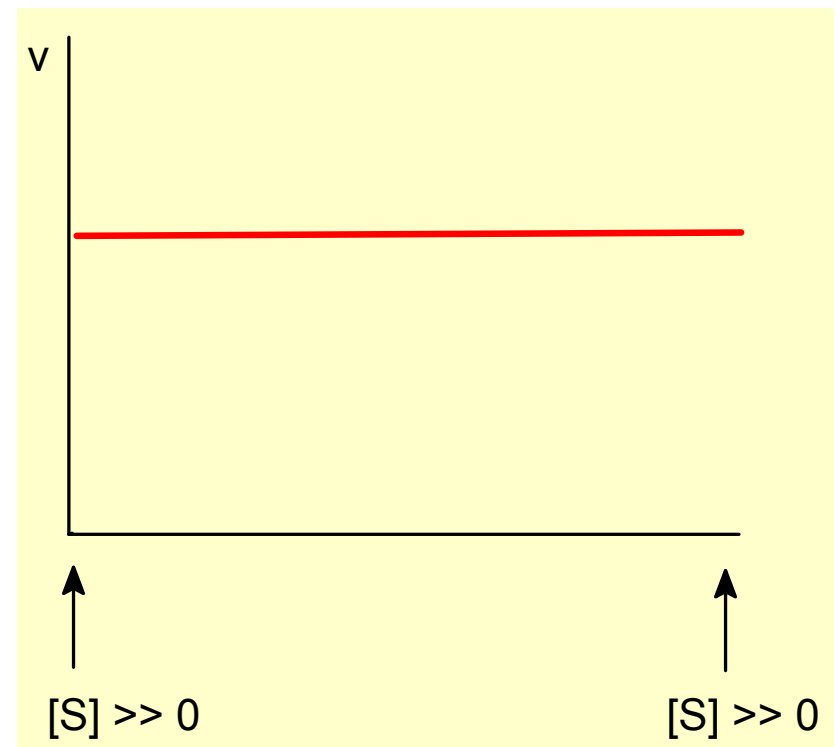


Z kinetické křivky se zjistí rychlost



Reakce 0. řádu je zvláštní případ

- rychlost reakce nezávisí na koncentraci substrátu (S)
- $v = k [S]^0 = k \cdot 1 = k = \text{konstanta}$
- nastává při velkém nadbytku S, takže jeho úbytek je prakticky zanedbatelný



Počáteční rychlost v_0

- rychlost změřená dříve než vznikne produkt
- nejvyšší hodnota rychlosti
- není ovlivněna úbytkem substrátu
- není ovlivněna vratnou přeměnou produktu

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

Inhibice enzymů

Ireverzibilní

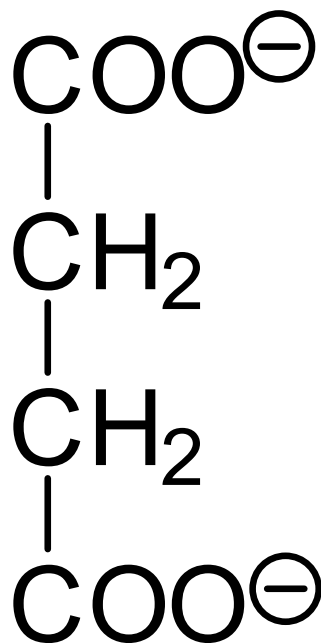
- inhibitor pevně vázán na enzym (akt. místo)
- organofosfáty
- ionty těžkých kovů
- kyanidy

Reverzibilní

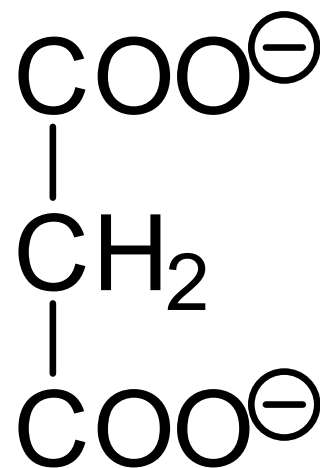
- inhibitor volně vázán
- rovnováha $E+I \rightleftharpoons E-I$
- inhibitor lze odstranit (dialýza, gel. filtrace)
- dva základní typy:

kompetitivní, nekompetitivní

Přirozený substrát vs. kompetitivní inhibitor



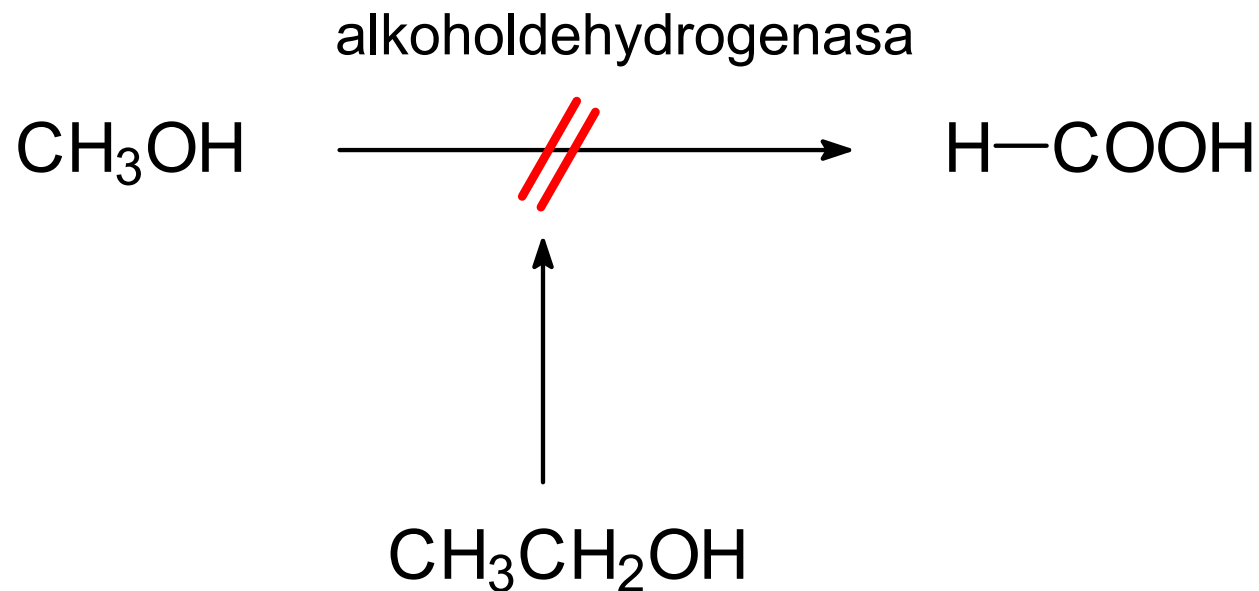
sukcinát



malonát

malonát je inhibítozem 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)

Michaelisova konstanta K_m

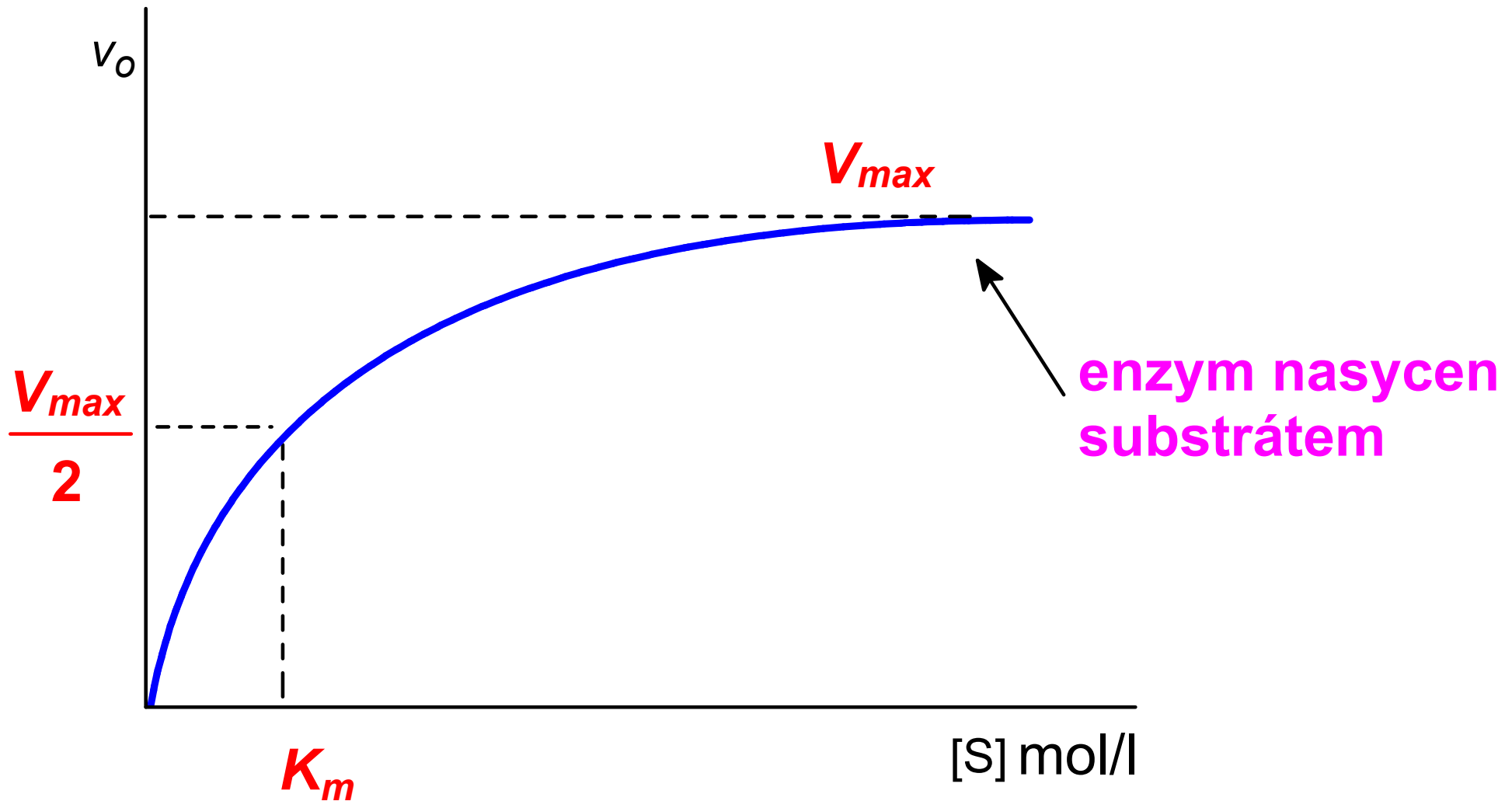
- Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu vyjadřuje rovnice Michaelise a Mentenové
- v_o je počáteční rychlost (nejvyšší hodnota)

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

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

K_m = Michaelisova konstanta

Grafickým vyjádřením předchozí rovnice je saturační křivka



Biochemický význam K_m

- koncentrace substrátu, při níž reakce probíhá polovinou maximální rychlosti
- při této koncentraci je enzym z 50 % nasycen
- K_m má rozměr koncentrace (mol/l)
- K_m je nepřímo úměrná afinitě enzymu pro daný substrát
- existuje-li více strukturně podobných substrátů, ten který má nejmenší K_m se považuje za nejpřirozenější pro daný enzym

Jestliže $[S] \ll K_m$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{\max}}{K_m} [S] = k[S]^1$$

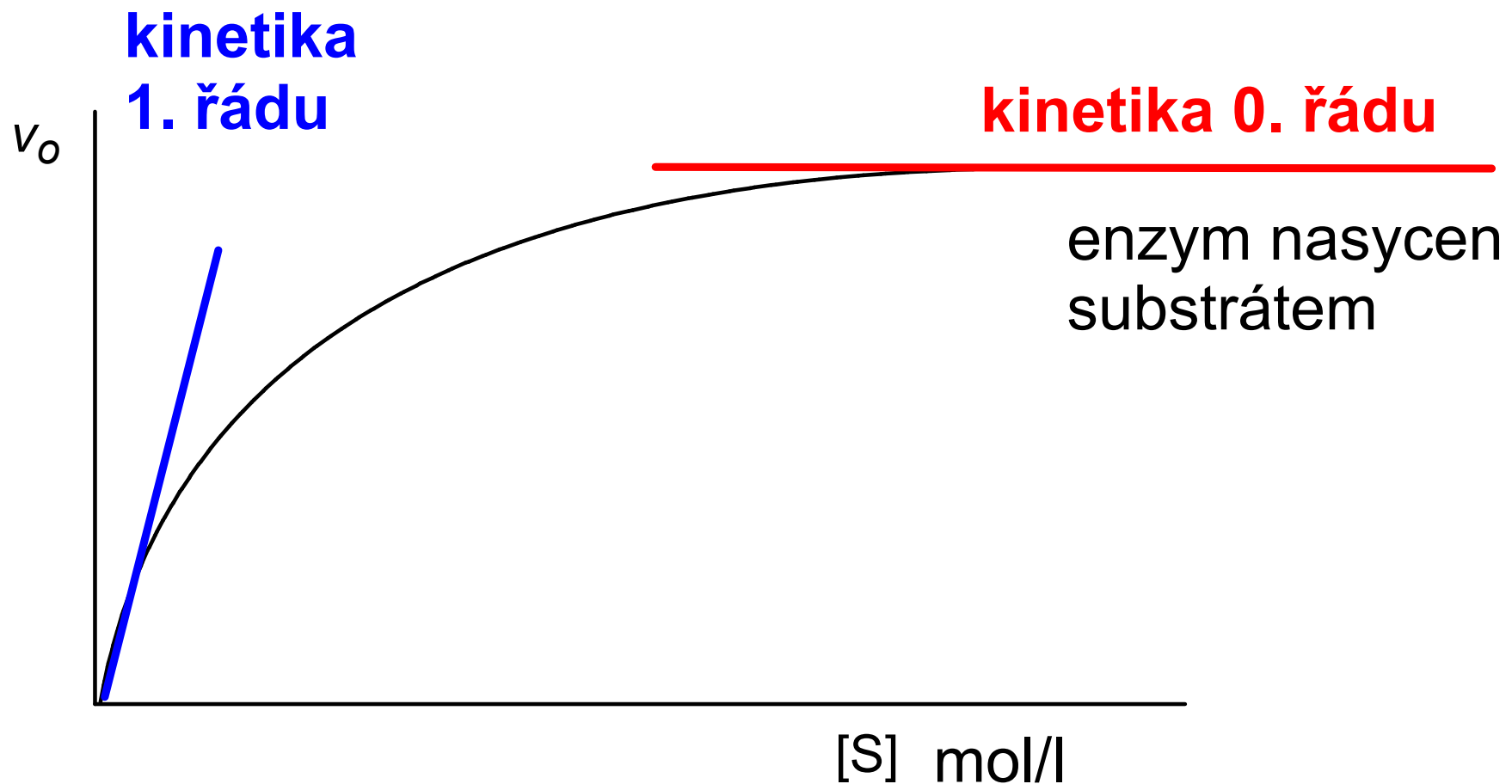
Při nízkých koncentracích substrátu se reakce
řídí **kinetikou 1. řádu**

Jestliže $[S] \gg K_m$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} = V_{\max} \frac{[S]}{[S]} = V_{\max} = k[S]^0$$

Při vysokých koncentracích substrátu se reakce řídí **kinetikou 0. řádu**

Dvě oblasti v saturačním grafu



Jak lze zjistit K_m

Jestliže $[S] = K_m$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + [S]} = V_{\max} \frac{[S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2}$$

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:

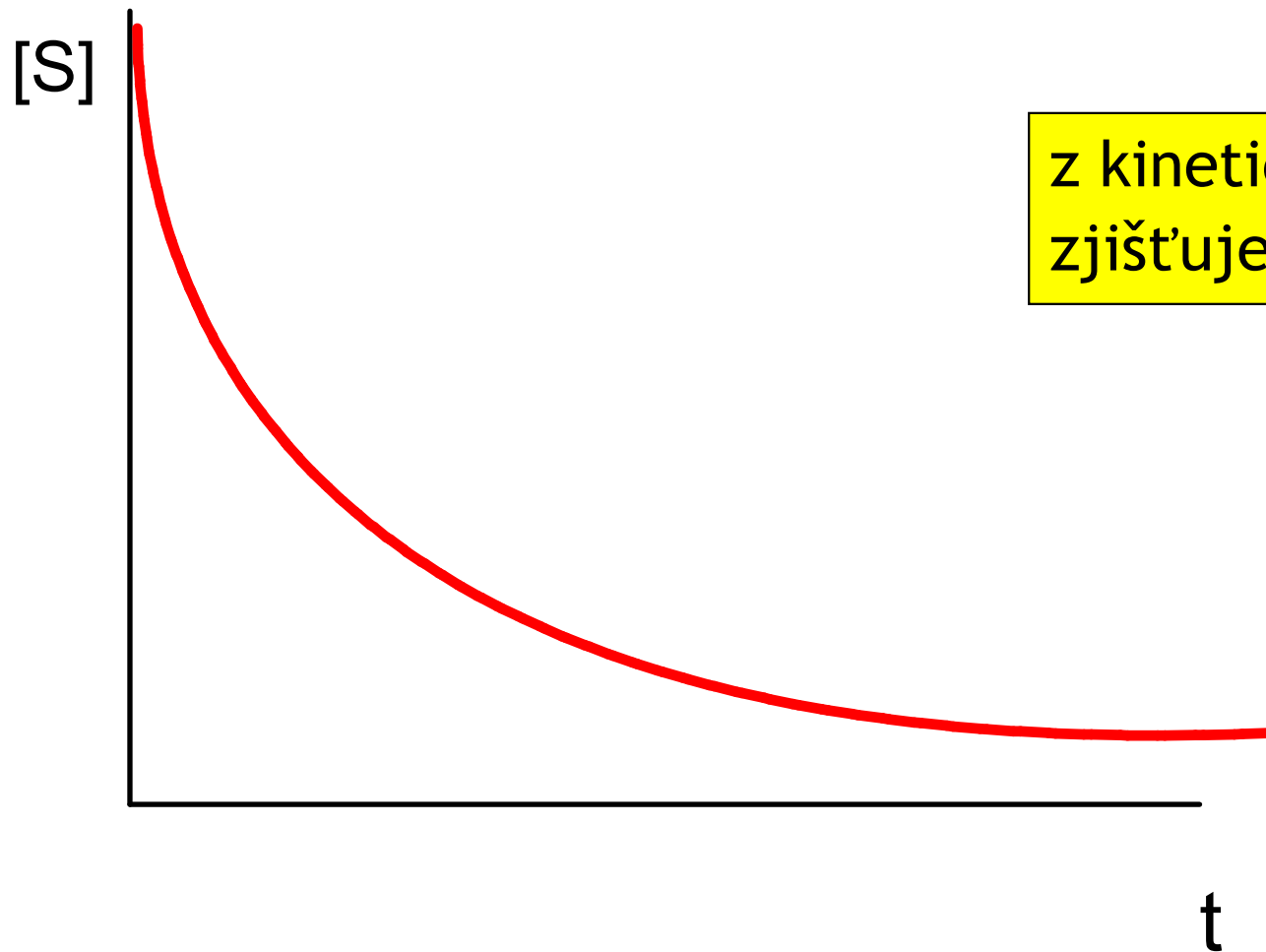
$$1 \mu\text{kat} = 60 \text{ IU}$$

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

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

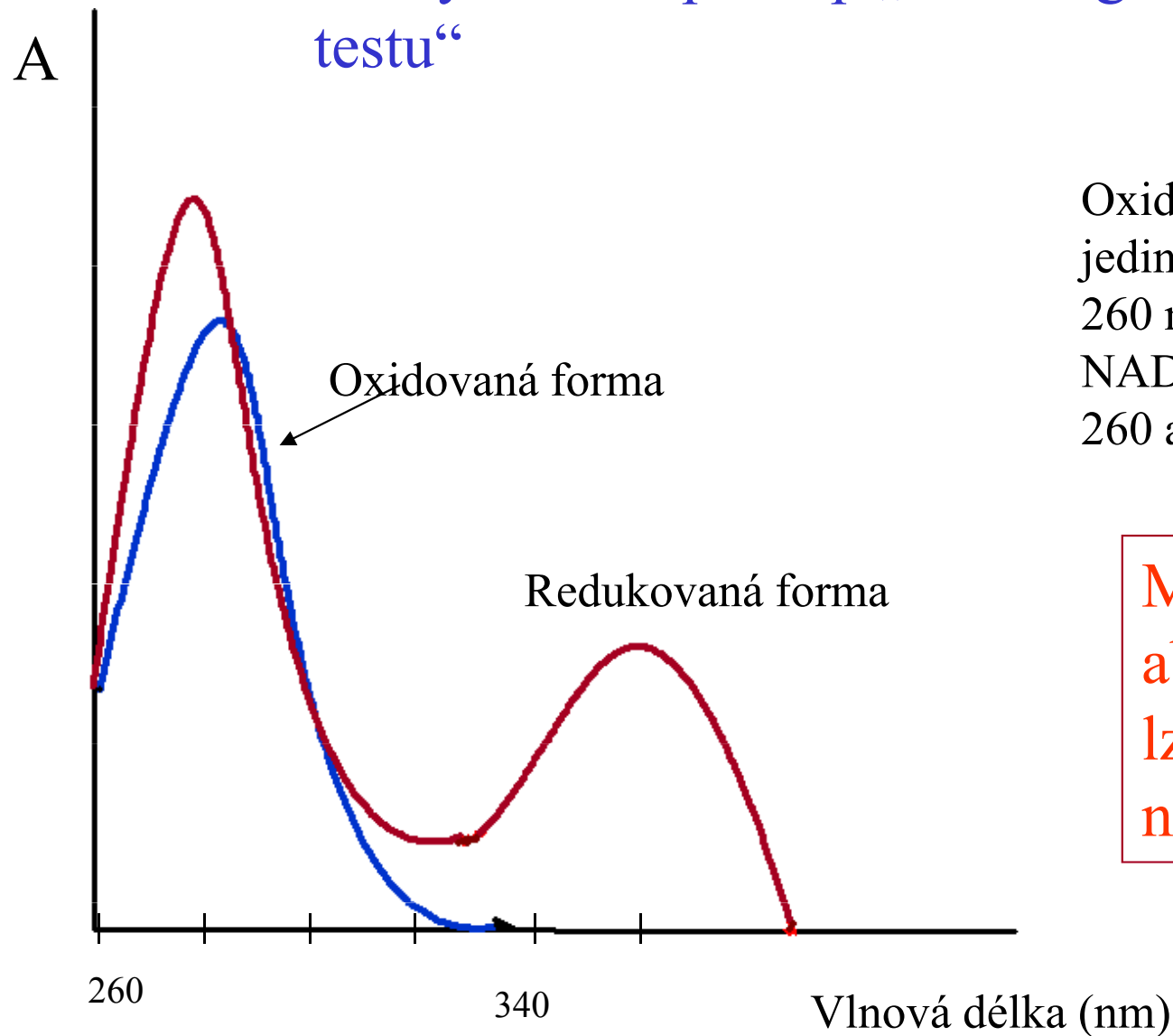


z kinetické křivky se
zjišťuje rychlost

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

Absorpční spektrum oxidované a redukované formy NAD^+ - princip „Warburgova optického testu“

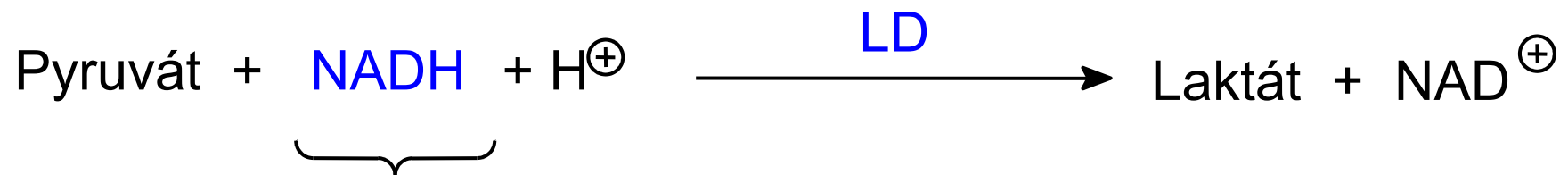


Oxidovaná forma NAD^+ má jediné absorpční maximum při 260 nm, redukovaná forma NADH má absorpční maxima při 260 a 340 nm

Měřením změn absorbance při 340 nm lze sledovat přírůstek nebo úbytek NADH

Lze též měřit fluorescenci při 450 nm (pouze redukovaná forma).

Princip měření aktivity laktátdehydrogenasy LD



optický test



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

Dělení enzymů dle původu a funkce

Enzymy se specifickou funkcí v krvi

- syntetizovány v játrech hlavně v játrech
- mají svou funkci v krvi – koagulační faktory, cholinestrasy

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, např. v trávicím traktu
- enzymy velkých žláz (pankreas) – lipasa, amylasa ...

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

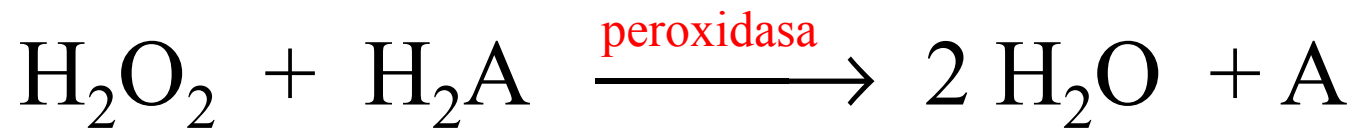
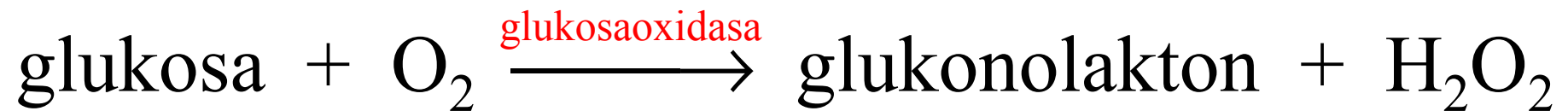
Enzym	Referenční hodnoty	Interpretace zvýšení
ALT	do 0,9 μ kat/l	hepatopatie
CK	do 4 μ kat/l	myopatie, infarkt myokardu
PSA	do 4 μ g/l	karcinom prostaty

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

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.)