Enzymy

Struktura, názvosloví, třídění enzymů

© Biochemický ústav JG, JD 2018

Enzymy = biokatalyzátory

- zvyšují rychlost reakce
- během reakce nejsou měněny
- proteinové povahy s kovalentně vázanou prostetickou skupinou (kov)
- oligomerní/ multienzymové komplexy / asociované s membránami atd.
- tvoří izoformy - různá distribuce v těle i v buňce
- specifické (typ reakce, substrát), vysoce účinné
- fungují za mírných podmínek (pH optimum u intracelulárních enzymů většinou ~ 7, výjimky v GIT, pepsin 1–2, trypsin ~ 8)
- *in vivo* - mohou být regulovány (aktivita enzymu, množství enzymu)
- *in vitro* - citlivé na vnější podmínky (teplota – nad 50 °C denaturace, pH)
- Ribozymy – RNA vykazující katalytickou aktivitu
- Prinip účinku: snižují aktivační energii

Specifičnost enzymu je dvojího typu

Účinková

- z možných reakcí substrátu katalyzují pouze jedinou

Substrátová

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

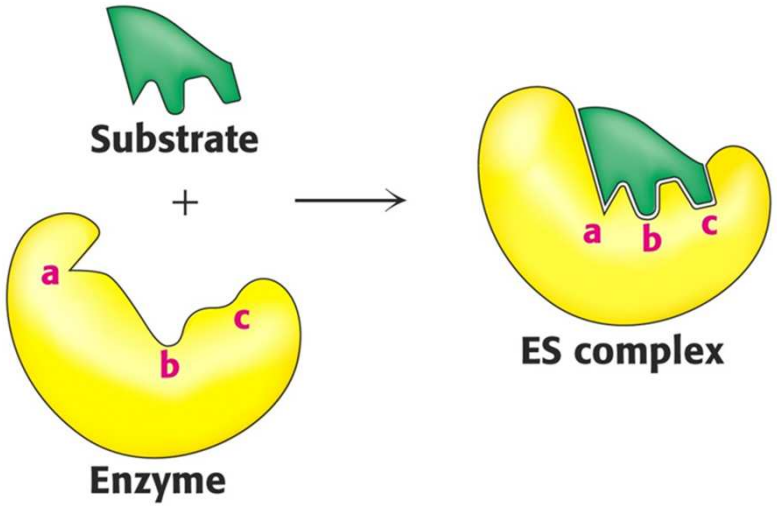
Struktura enzymů

- Bílkovina + neproteinová struktura = enzym
- Neproteinová struktura:
  - Kofaktor = Zn^{2+}; Mo^{2+}; Fe^{2+}; Mg^{2+} (kov)
  - Koenzym = malá organická molekula (často deriváty vitamínů B)
- Apoenzym = samotná bílkovina, enzymově neúčinná
- Kofaktor / koenzym sám o sobě není účinný

- Aktivní místo enzymu:
  - místo kam se napojuje substrát
  - Tvořeno AK zbytky ↔ je ovlivnitelné pH
- Komplex enzym-substrát (ES)
  - Nevazebné interakce

Mechanismus účinku enzymu

- substrát se musí navázat na aktivní místo enzymu
- místo je skutečně ***aktivní***
    - flexibilita proteinu umožňuje indukované přizpůsobení konformace, která odpovídá substrátu
- vazba substrátu do aktivního místa vyvolá odpovídající konformační změnu molekuly enzymu (indukované přizpůsobení)
- vytvoří se komplex enzym-substrát (ES)



Katalytický mechanismus závisí na počtu substrátů

- **Monosubstrátové reakce**

$$S + E \rightleftarrows \{ES.....EP\} \rightleftarrows P + E$$

- **Dvousubstrátové reakce (častější)**

$$E + S_A + S_B \rightleftarrows \{ES_{AB}.....EP_{AB}\} \rightleftarrows P_A + P_B + E$$

Sekvenční reakce:

oba substráty se navážou na enzym a pak proběhne chemická přeměna a uvolnění produktů

Ping-pongové reakce:

typické pro aminotransferasy, **jeden** substrát se naváže, přemění a uvolní, pak totéž s druhým substrátem

Názvosloví enzymů

- Triviální název:
  - pepsin
  - trypsin
- Obecný název:
  - laktátdehydrogenáza
  - Kreatinkináza
  - glukokináza
- Systematický název:
  - Laktát:NAD^+ oxidoreduktáza = laktátdehydrogenáza
  - L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferáza = alaninaminotransferáza

Klasifikace enzymů

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

EC1 Oxidoreduktázy

- katalyzují oxidaci nebo redukci substrátu

  podtřídy:

  - **dehydrogenázy** katalyzují transfer 2 H atomů
  - **oxygenázy** katalyzují zabudování jednoho nebo dvou O atomů do substrátu (monooxygenázy, dioxygenázy)
  - **oxidázy** katalyzují transfer elektronů mezi substráty (cytochrom-c-oxidáza, ferroxidáza)
  - **peroxidázy** katalyzují rozklad peroxidů

Příklad: laktát + NAD^+ ⇄ pyruvát + NADH + H^+

Doporučený název: laktátdehydrogenasa

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

EC 2 Transferázy

- katalyzují transfer skupiny za jednoho substrátu na druhý

Podtřídy:

- **aminotransferázy (alaninaminotransferáza – ALT, aspartátaminotransferáza – AST)**
- **methyltransferázy**
- **glukosyltransferázy**
- **kinázy –** fosforylace substrátů = transfer fosforylu PO_3^{2-} z ATP na substrát

  (hexokinázy, proteinkinázy)
- **DNA-polymeráza** – účastní se replikace (prodloužení 3'-konce DNA)

$$(DNA)_n + dNTP \rightarrow (DNA)_{n+1} + PP_i$$

Příklad: glukosa + ATP → glukosa-6-P + ADP

Doporučený název: glukokinasa

Systematický název: ATP:D-glukosa fosfotransferasa

EC 3 Hydrolázy

- katalyzují hydrolytické štěpení esterů, glykosidů, amidů, peptidů apod.

  podtřídy:

  - **esterázy** (lipázy, fosfolipázy, ribonukleázy, **fosfatázy**)
  - **glykosidázy** (sacharáza, maltáza, laktáza, amyláza)
  - **proteinázy** a **peptidázy** (pepsin, trypsin, kathepsiny, kaspázy/apoptosa, dipeptidázy, karboxypeptidázy, aminopeptidázy)
  - **amidázy** (glutamináza, asparagináza)
  - **ATPázy** (štěpí anhydridové vazby v ATP), např. helikáza
  - **nukleázy** (štěpí nukleové kyseliny – fosfodiesterové vazby)

Příklad: glukóza-6-P + H_2O → glukóza + P_i

Doporučený název: glukóza-6-fosfatáza

Systematický název: glukóza-6-fosfát fosfohydroláza

EC 4 Lyázy

- katalyzují **nehydrolytické** štěpení nebo vznik vazeb C–C, C–O, C–N, C–S odstraněním nebo přidáním malé molekuly jako H_2O, CO_2, NH_3

podtřídy:

- **amoniak lyázy** (histidinamoniaklyáza: histidin → urokanát + NH_3)
- **dekarboxylázy aminokyselin** (aminokyselina → amin + CO_2)
- **aldolázy** (štěpení nebo vznik aldolu)
- **dehydratázy/hydratázy** (karbonátdehydratáza: $CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$)

Příklad: fumarát + H_2O ⇄ L-malát

Doporučený název: fumaráthydratáza

Systematický název: (*S*)-maláthydrolyáza

EC 5 Isomerázy

- katalyzují intramolekulární přesmyky, příklady:
  - **epimerázy**
  - **racemázy**
  - **mutázy**
  - **topoisomeráza** (replikace DNA) má dvě enzymové aktivity, nukleázovou a ligázovou (superstočená DNA → relaxovaná DNA)

Příklad: UDP-glukóza ⇄ UDP-galaktóza

Doporučený název: UDP-glukóza 4-epimeráza

Systematický název: UDP-glukóza 4-epimeráza

EC 6 Ligázy

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

Potřídy:

- **karboxylázy**
- **synthetázy**

(glutaminsynthetáza: glutamát + ATP + NH_3 → glutamin + ADP + P_i)

- **DNA-ligáza:** $(dNMP)_n + (dNMP)_m + ATP \rightarrow (dNMP)_{n+m} + AMP + PP_i$

dNMP = deoxyribonukleosidmonofosfát

Příklad: pyruvát + CO_2 + ATP → oxalacetát + ADP + P_i

Doporučený název: pyruvátkarboxyláza

Systematický název: pyruvát:CO_2 ligáza

Kinetika enzymově katalyzovaných reakcí

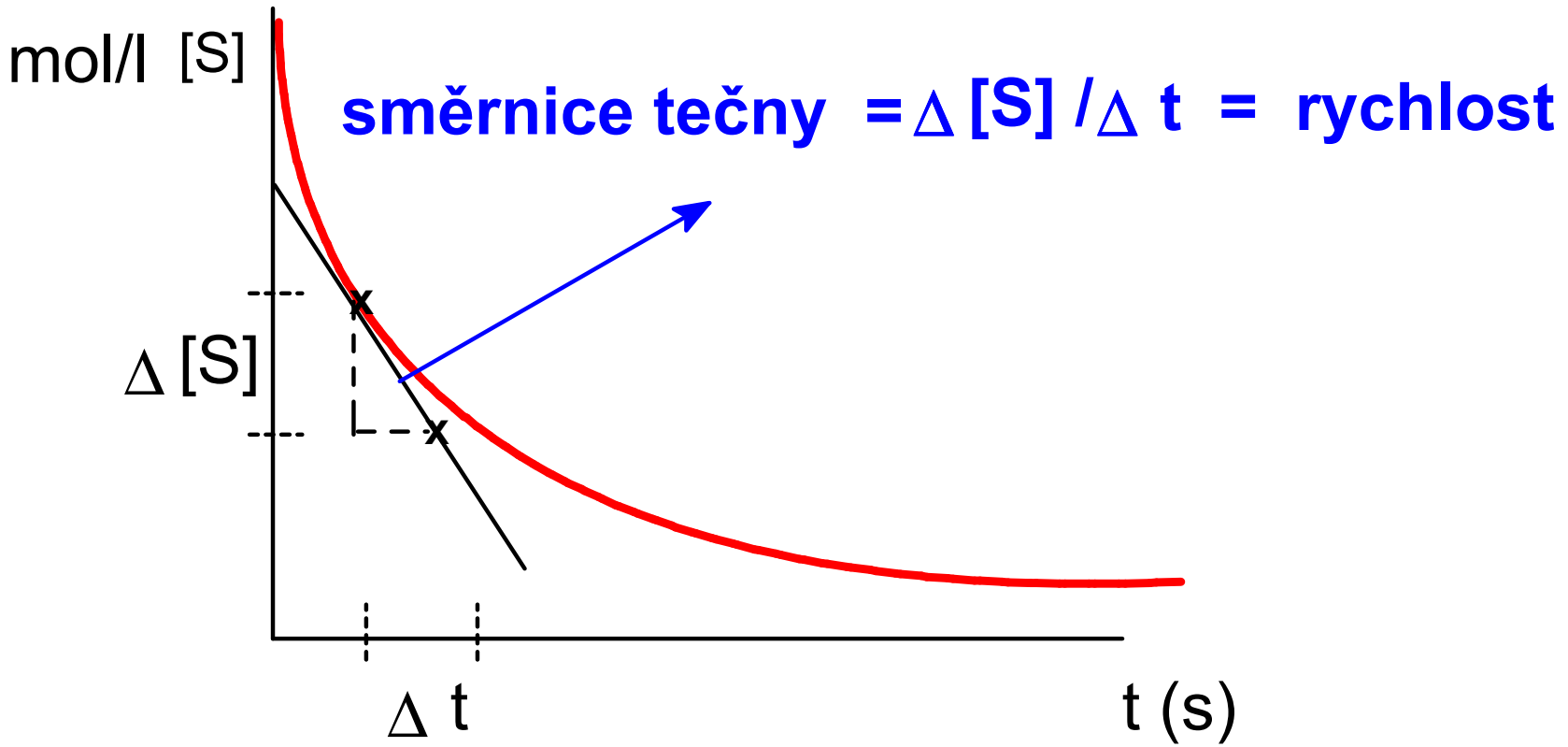
Rychlost enzymové reakce

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

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

16

Z kinetické křivky se zjistí rychlost



17

Počáteční rychlost v_o

- rychlost změřená dříve než vznikne významnější množství produktu
- nejvyšší hodnota rychlosti
- není ovlivněna úbytkem substrátu ani vratnou přeměnou produktu
- **stanovuje se z kinetických křivek**

Na čem závisí rychlost reakce?

- na koncentraci substrátu [S] .... kinetická rovnice
- na teplotě ... Arrheniova rovnice
- u reaktantů v plynné fázi (*g*) na tlaku
- na přítomnosti efektoru (katalyzátoru, inhibitoru)

  katalyzátory snižují aktivační energii (E_A)

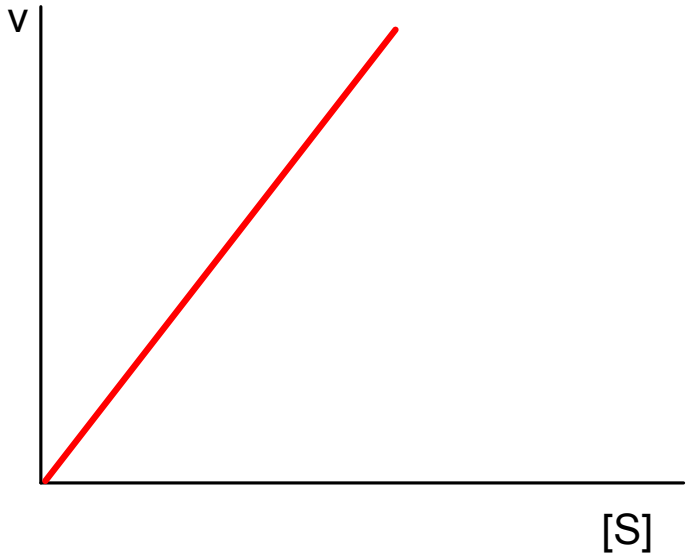
U enzymových reakcí navíc:

- koncentrace enzymu [E]
- pH

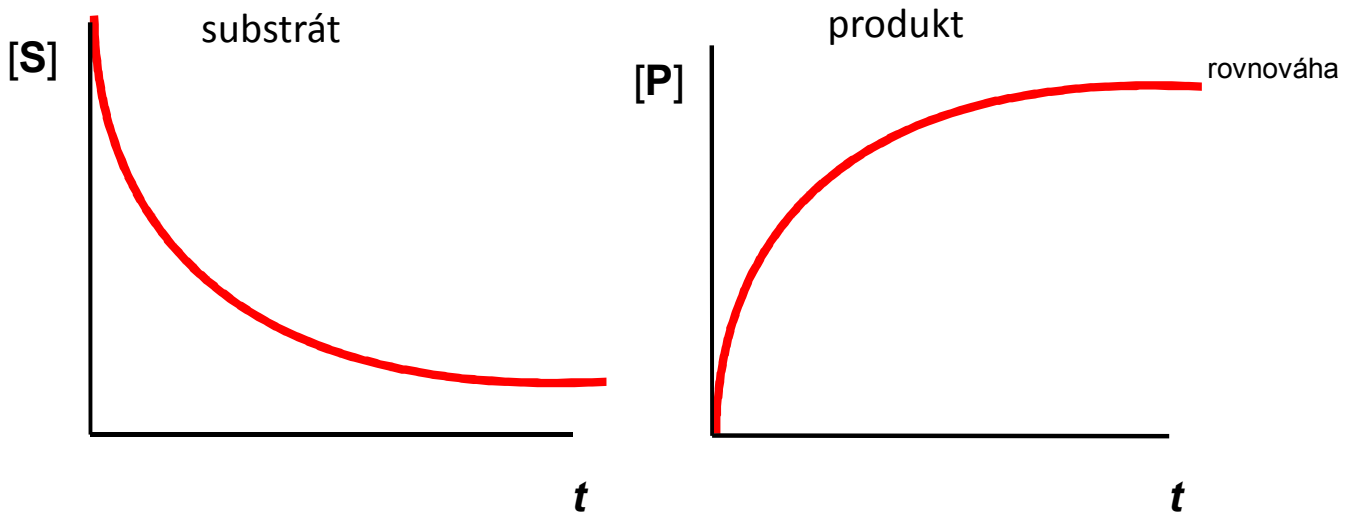
Kinetická rovnice pro reakci 1. řádu

$$v = k[S] = k[S]^1 \Rightarrow \text{reakce 1. řádu}$$

k = rychlostní konstanta



Kinetické křivky pro reakci 1. řádu



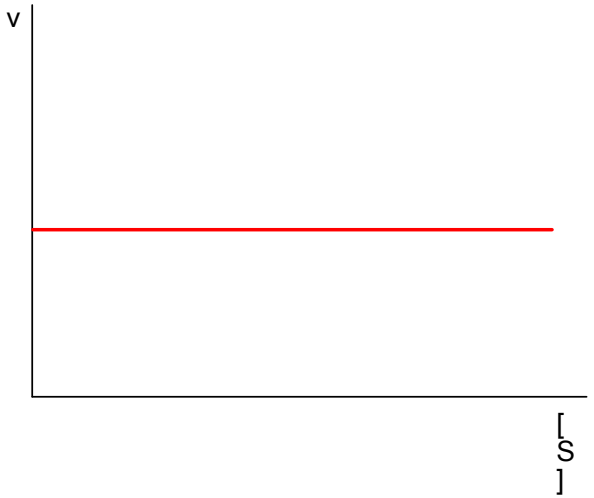
během reakce:
koncentrace substrátu klesá
koncentrace produktu vzrůstá

z kinetické křivky se zjišťuje rychlost

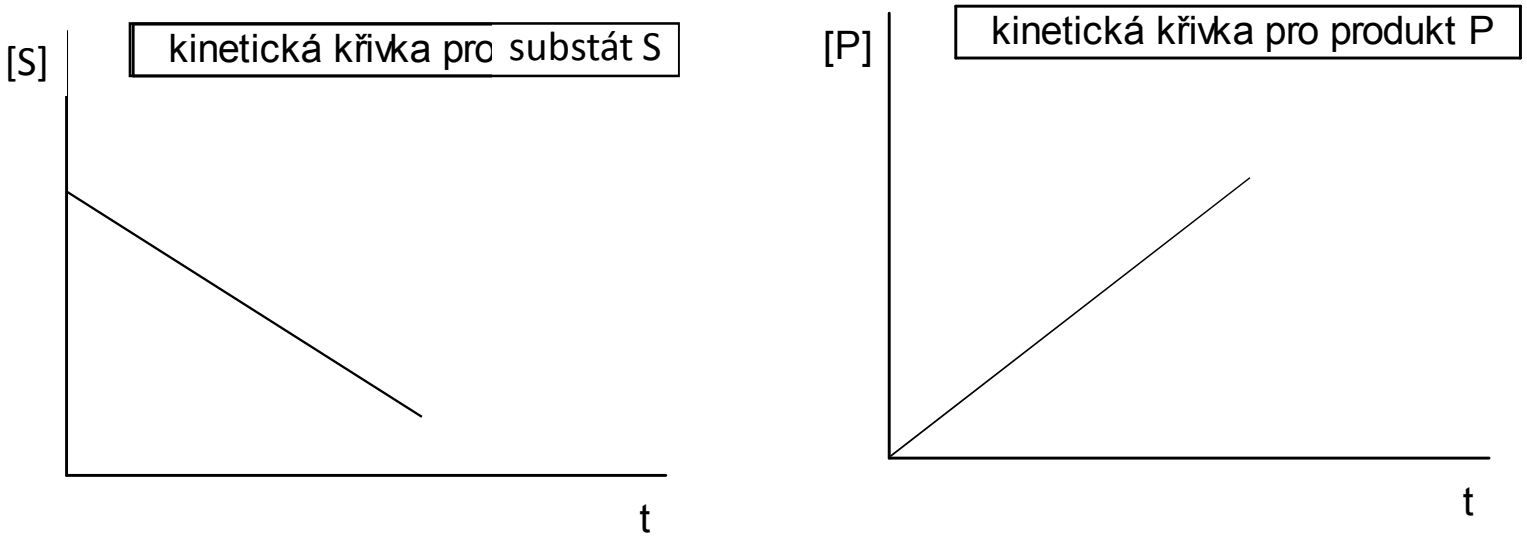
Okamžitá rychlost v_x v čase t_x se rovná směrnici tečny ke křivce v daném čase.

Kinetická rovnice pro reakci 0. řádu

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



Kinetické křivky pro reakci 0. řádu



Počáteční rychlost v_o

- rychlost změřená dříve než vznikne významnější množství produktu
- nejvyšší hodnota rychlosti, protože není ovlivněna úbytkem substrátu ani vratnou přeměnou produktu
- **stanovuje se z kinetických křivek**

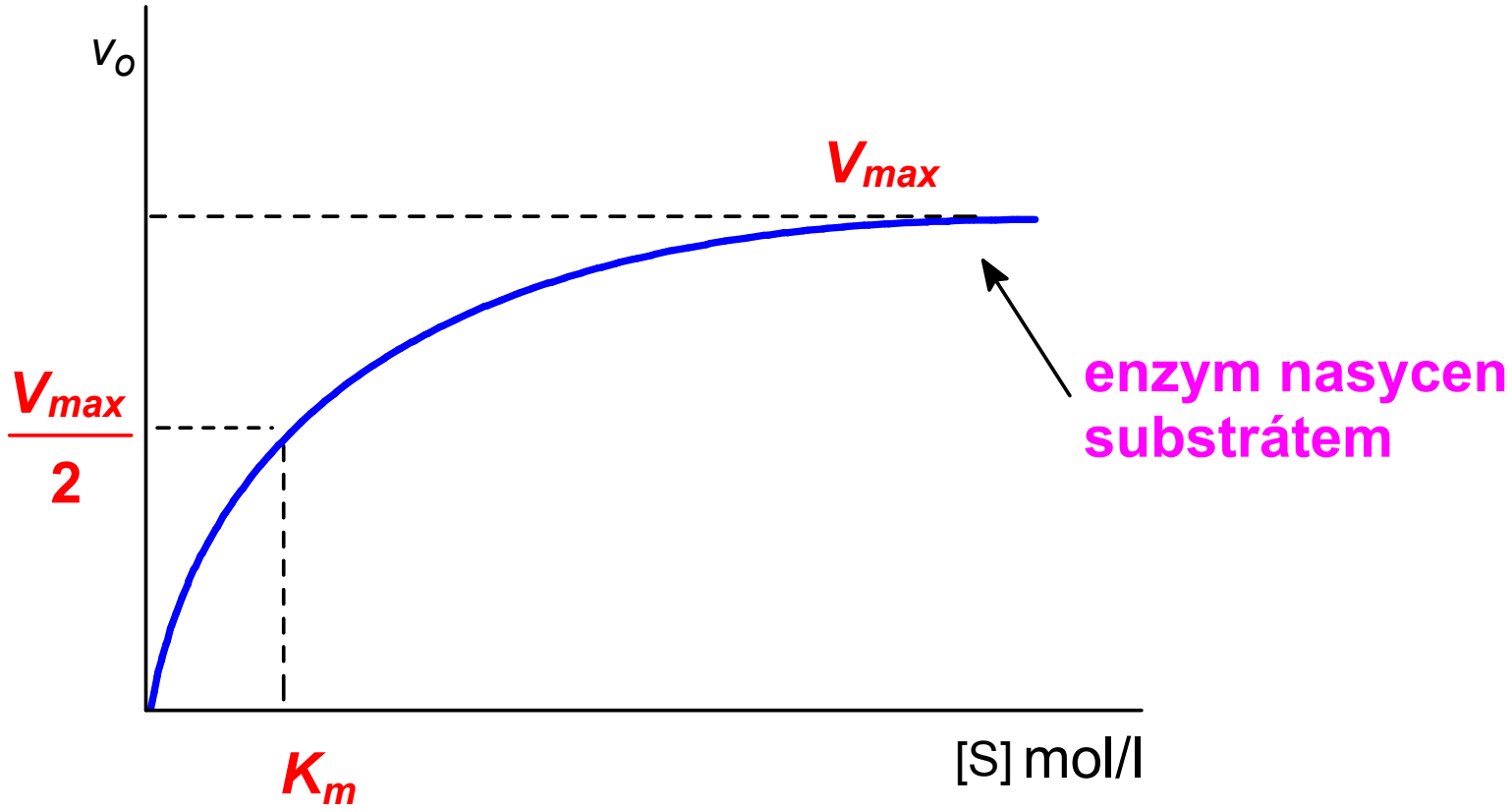
Závislost v_o na koncentraci substrátu

rovnice Michaelise a Mentenové, pro jednosubstrátové reakce

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

- V_{max} = maximální rychlost (pro danou koncentraci enzymu)
- K_m = Michaelisova konstanta
- K_m je koncentrace substrátu, při níž reakce probíhá polovinou maximální rychlosti V_{max} , při této koncentraci je enzym z 50 % nasycen
- 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
- pro měření aktivity enzymu by měla být koncentrace substrátu > 100 K_m

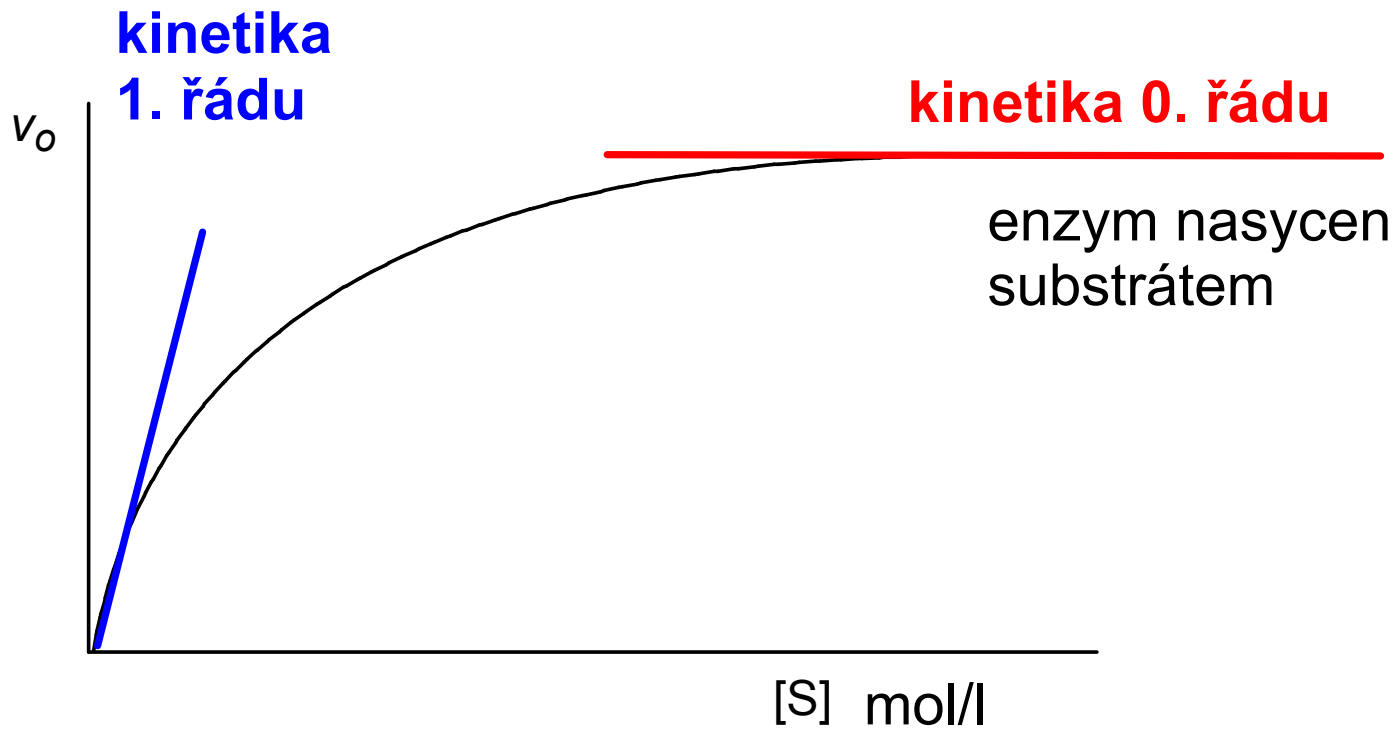
Grafickým vyjádřením předchozí rovnice je saturační křivka



Různé oblasti saturační křivky

[S] << K_m	$v_o = V_{\max}\frac{[S]}{[S]+K_m} = \frac{V_{\max}}{K_m}[S] = k[S]^1$
[S] >> K_m	$v_o = V_{\max}\frac{[S]}{[S]+K_m} = V_{\max}\frac{[S]}{[S]} = V_{\max} = k[S]^0$
[S] = K_m	$v_o = V_{\max}\frac{[S]}{[S]+[S]} = V_{\max}\frac{[S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2}$

Dvě oblasti v saturačním grafu



Rozlišujte

Kinetická křivka

- časový záznam **jedné** reakce
- závislost [P] nebo [S] na čase (t)

Saturační křivka

- závislost získaná z **mnoha** stejných reakcí
- závislost v_o na [S]

Faktory ovlivňující rychlost enzymové reakce

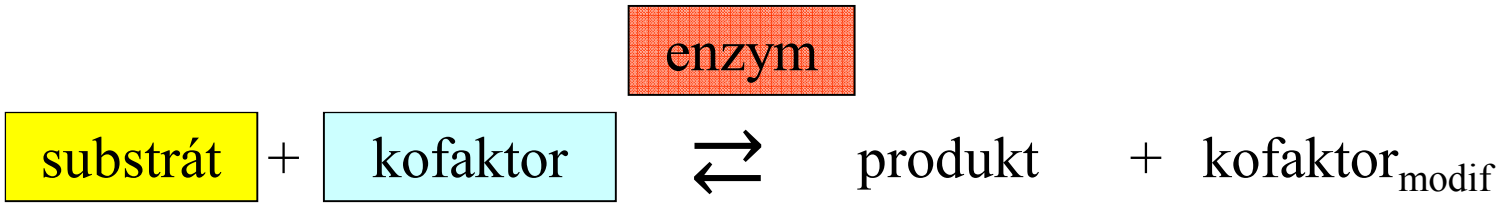
Teplota	S rostoucí teplotou rychlost reakce vzrůstá, optimální je kolem 40 °C, při vyšších teplotách rychlost klesá – denaturace enzymu
pH	Ovlivňuje stav ionizace skupin v aktivním místě enzymu a jeho okolí konstatní pH v tělesných tekutinách udržují pufrační systémy každý enzym má pH optimum, intracelulární 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

Kofaktory

Kofaktory enzymů

- nízkomolekulární neproteinové sloučeniny
- mnohé odvozeny od vitaminů B komplexu
- mnohé mají charakter nukleotidů
- **přenášejí 2 H nebo e^- (spolupracují s oxidoreduktázami)**
- **přenášejí skupiny (spolupracují s transferázami)**
- pevně (kovalentně) vázané se nazývají prostetické skupiny
- volně vázané se nazývají kosubstráty

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 oxidoreduktas

Oxidovaná forma	**Redukovaná forma**	**Funkce kofaktoru**
NAD^+	**$NADH+H^+$**	**NAD^+ akceptor 2 H**
$NADP^+$	**$NADPH+H^+$**	**$NADPH+H^+$ donor 2 H**
FAD	**$FADH_2$**	**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
Dehydroaskorbát	askorbát	přenos 2 elektronů a 2 H^+
$Glutathion_{oxid}$ (G-S-S-G)	$glutathion_{red}$ (GSH)	2 GSH donorem 2 H

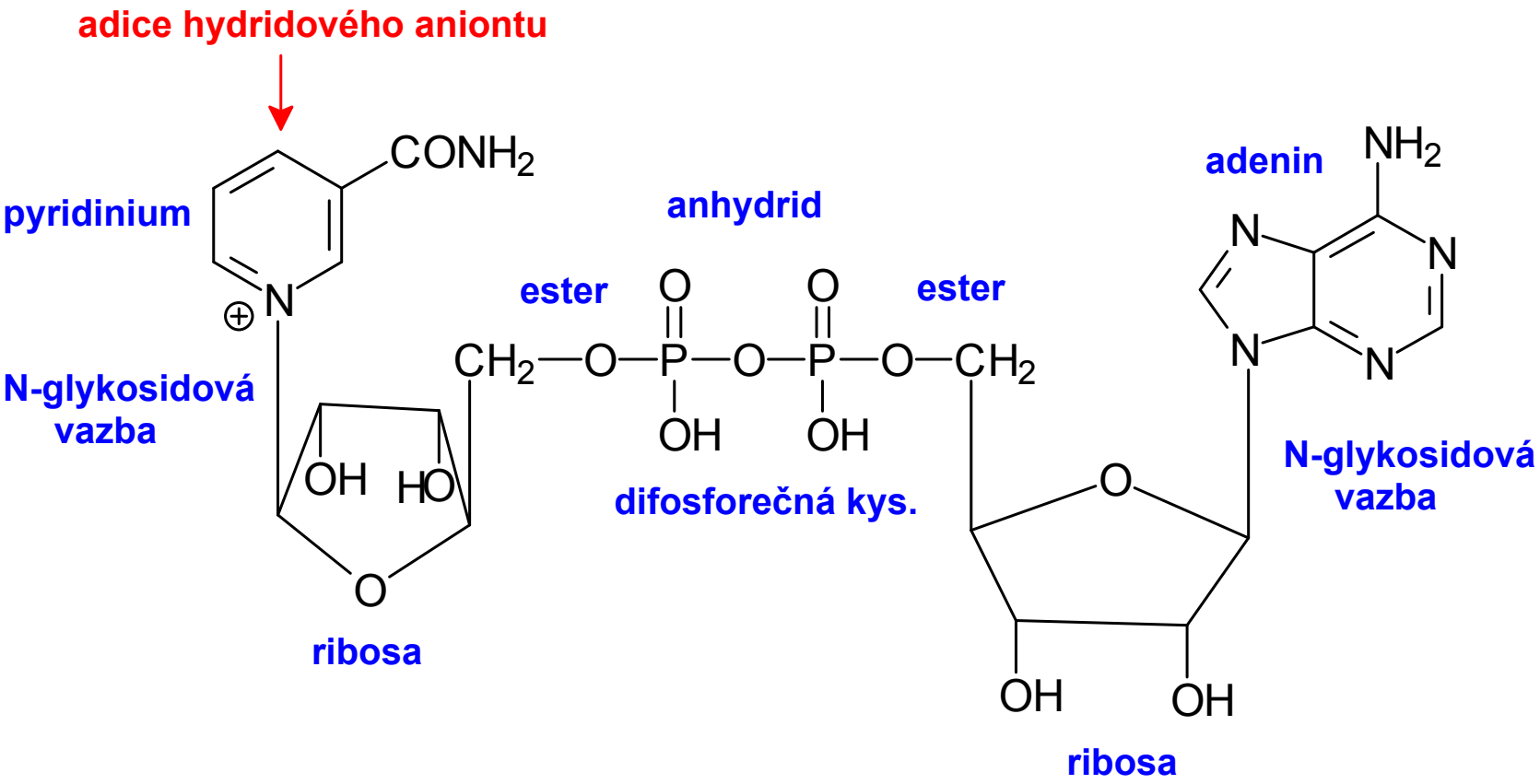
NAD^+ je dehydrogenační kofaktor, derivát nikotinamidu (vitamin B3)

- nikotinamidadenindinukleotid
- kofaktor dehydrogenas
- odnímá **2H** ze substrátu

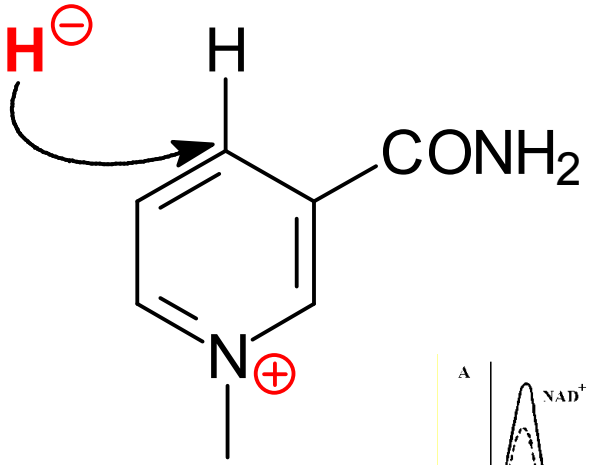
$$2\,H = H^- + H^+$$

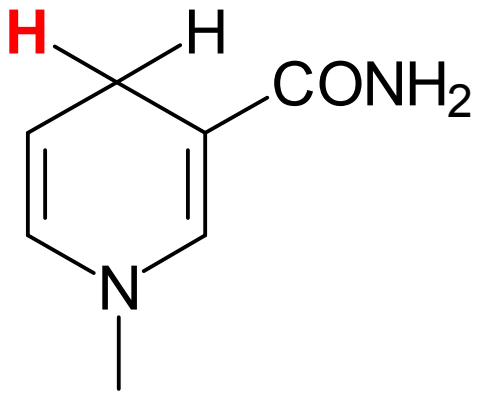
- jeden se jako hydridový anion H^- aduje do *p*-polohy pyridiniového kruhu
- $NAD^+ + H^- = NADH$ = ekvivalent dvou elektronů
- druhý se jako proton H^+ váže na enzym

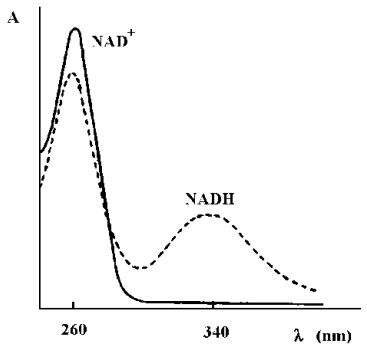
Struktura NAD^+



Redoxní pár kofaktoru







oxidovaná forma NAD^+

aromatický kruh

čtyřvazný dusík

kladný náboj na dusíku

UV absorpce při 260 nm

redukovaná forma NADH

aromaticita **zcela** porušena

trojvazný dusík

neutrální sloučenina

UV absorpce při 260 a 340 nm

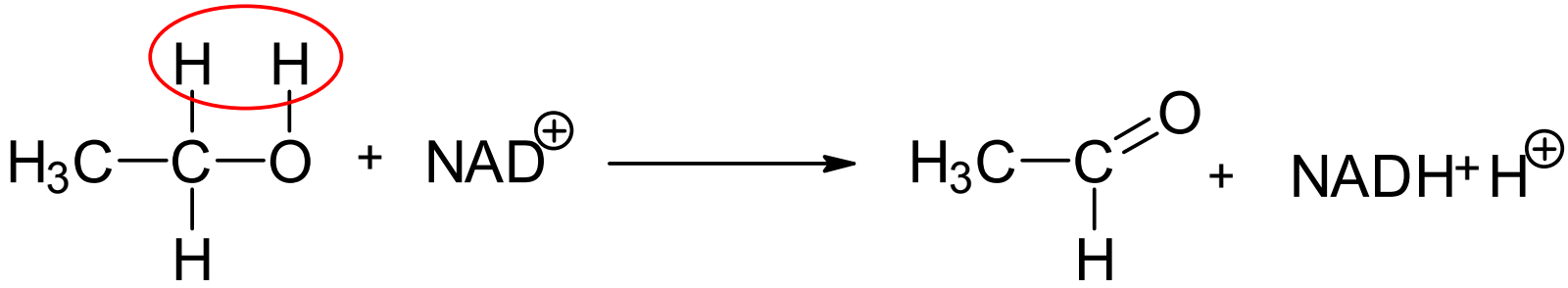
vysoký obsah energie

Dehydrogenace působením NAD^+

- substrát ztrácí 2 atomy H ze skupin:
- primární alkoholová skupina $-CH_2-OH$
- sekundární alkoholová skupina $>CH-OH$
- sekundární aminová skupina $>CH-NH_2$
- **vzniká dvojná vazba (C=O, C=N)**

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

Dehydrogenace ethanolu (alkoholdehydrogenáza)



Redukovaný kofaktor NADPH+H$^+$ je hydrogenační činidlo

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

  cholesterol $\rightarrow\rightarrow$ žlučové kyseliny

  kalciol $\rightarrow\rightarrow$ kalcitriol

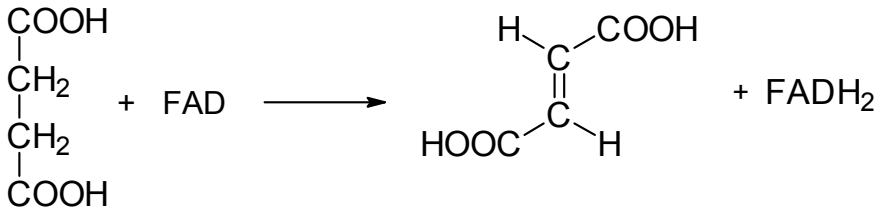
  xenobiotikum $\rightarrow$ hydroxylované xenobiotikum

- obecné schéma hydroxylace:

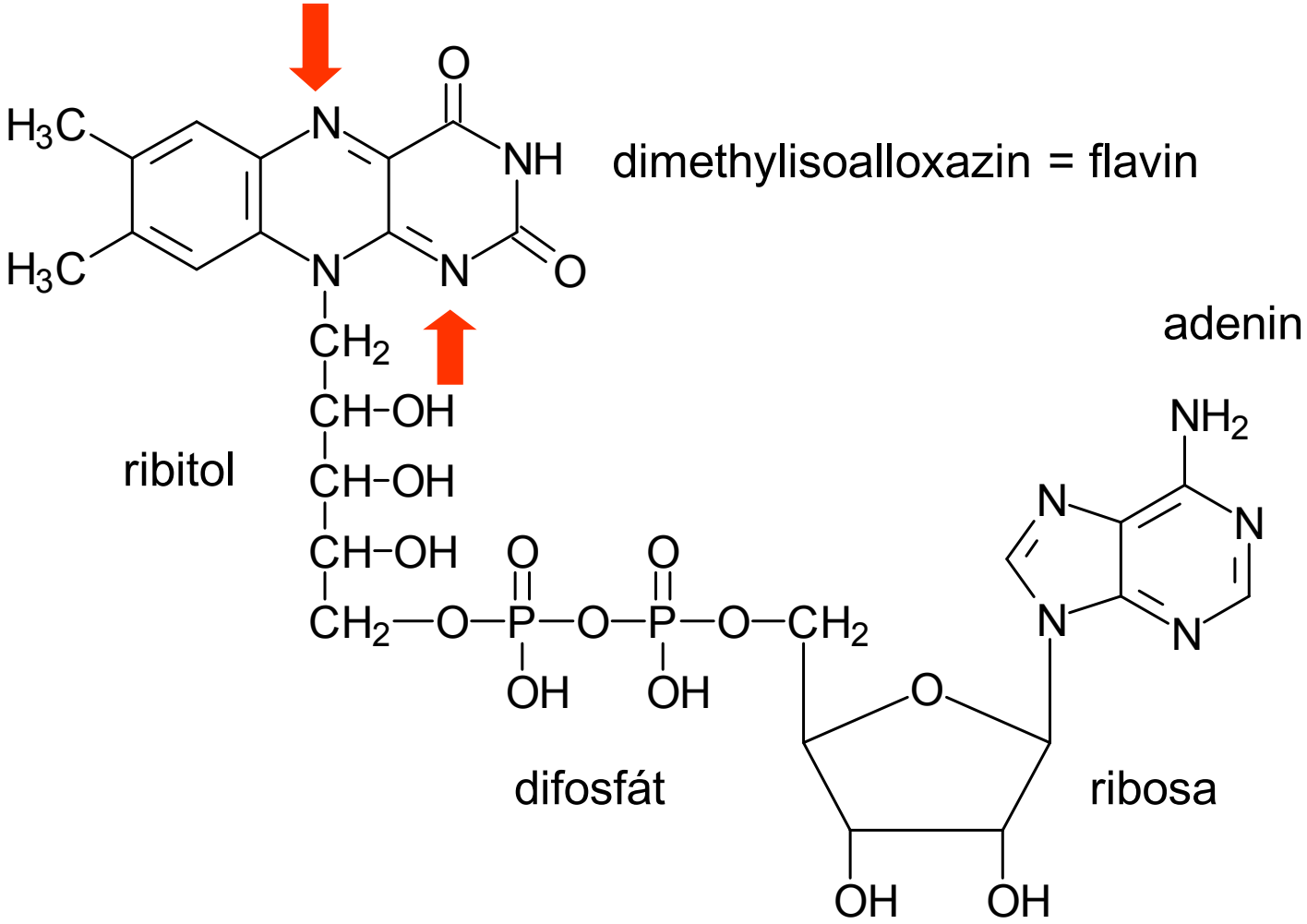
$$R\text{-}H + O_2 + NADPH{+}H^+ \rightarrow R\text{-}OH + H_2O + NADP^+$$

FAD je dehydrogenační kofaktor derivát riboflavinu (vitamin B2)

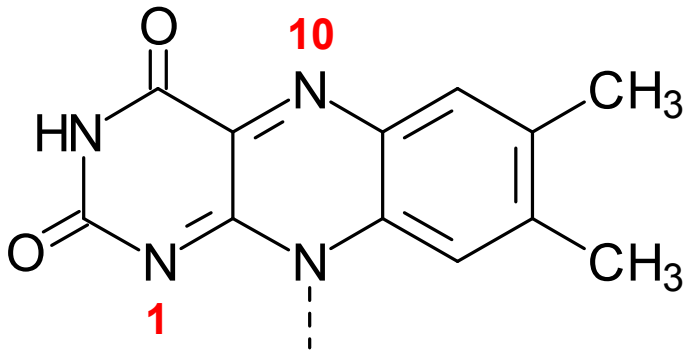
- flavinadenindinukleotid
- kofaktor flavinových dehydrogenáz
- dehydrogenace $-CH_2-CH_2-$ skupiny
- 2H se vážou na dva dusíky riboflavinu
- $FAD + 2H \rightarrow FADH_2$



Struktura FAD



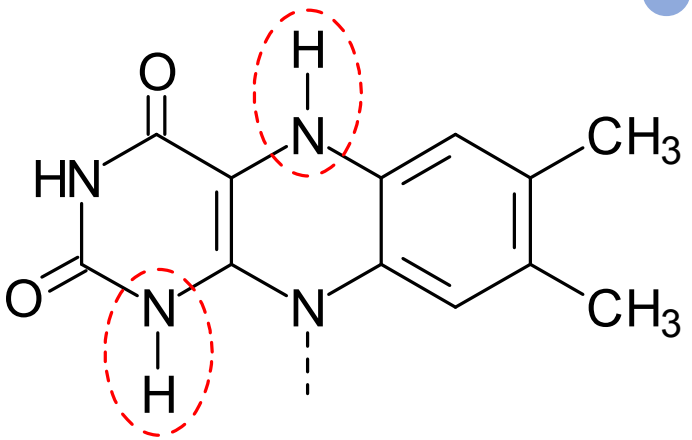
Redoxní pár kofaktoru



oxidovaná forma FAD

aromatický systém

neutrální sloučenina



redukovaná forma $FADH_2$

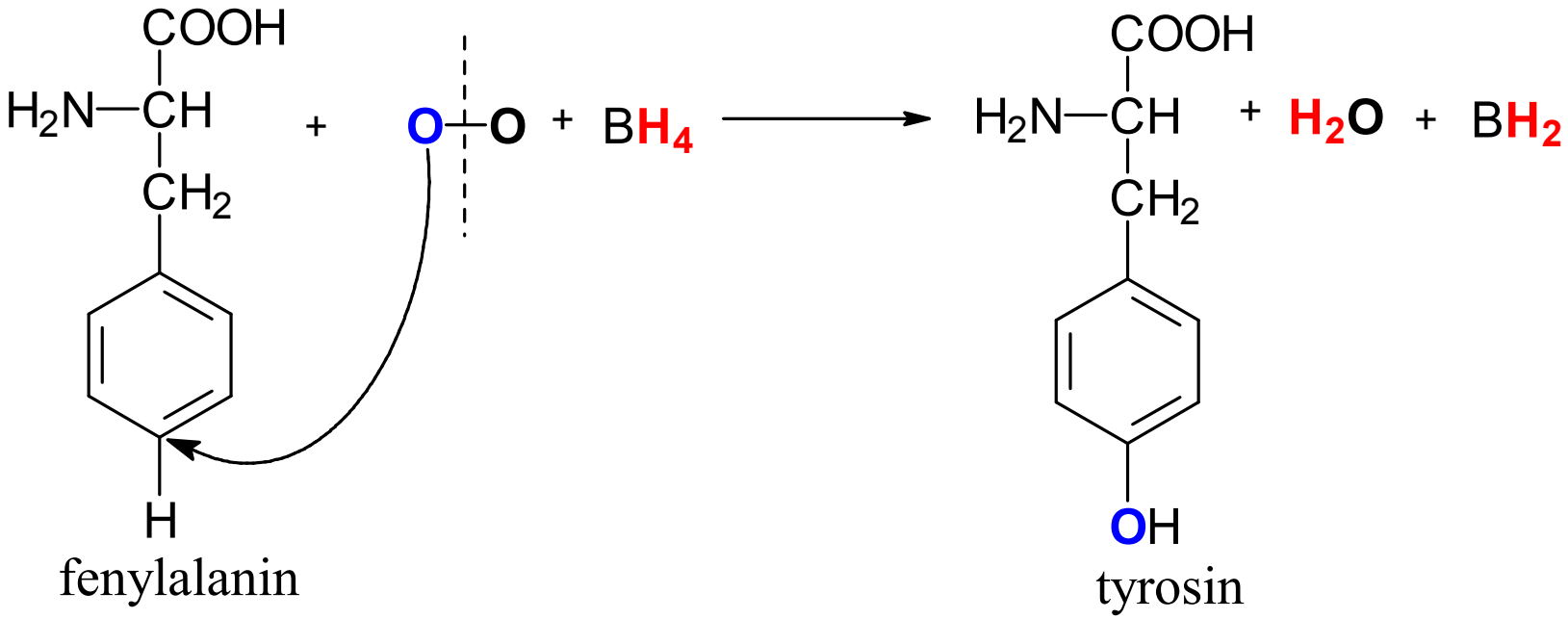
aromaticita **<u>částečně</u>** porušena

neutrální sloučenina

vysoký obsah energie

Tetrahydrobiopterin (BH4) je kofaktor hydroxylačních reakcí

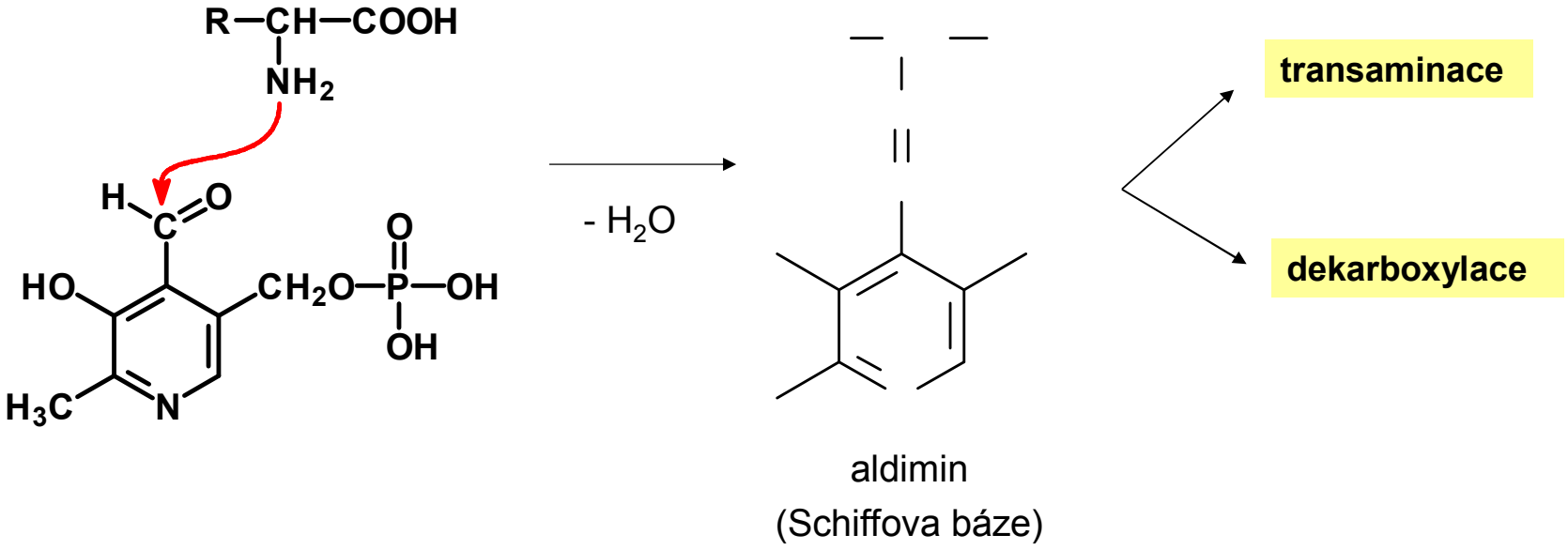
Monoxygenázová reakce



Vitaminy a kofaktory transferas

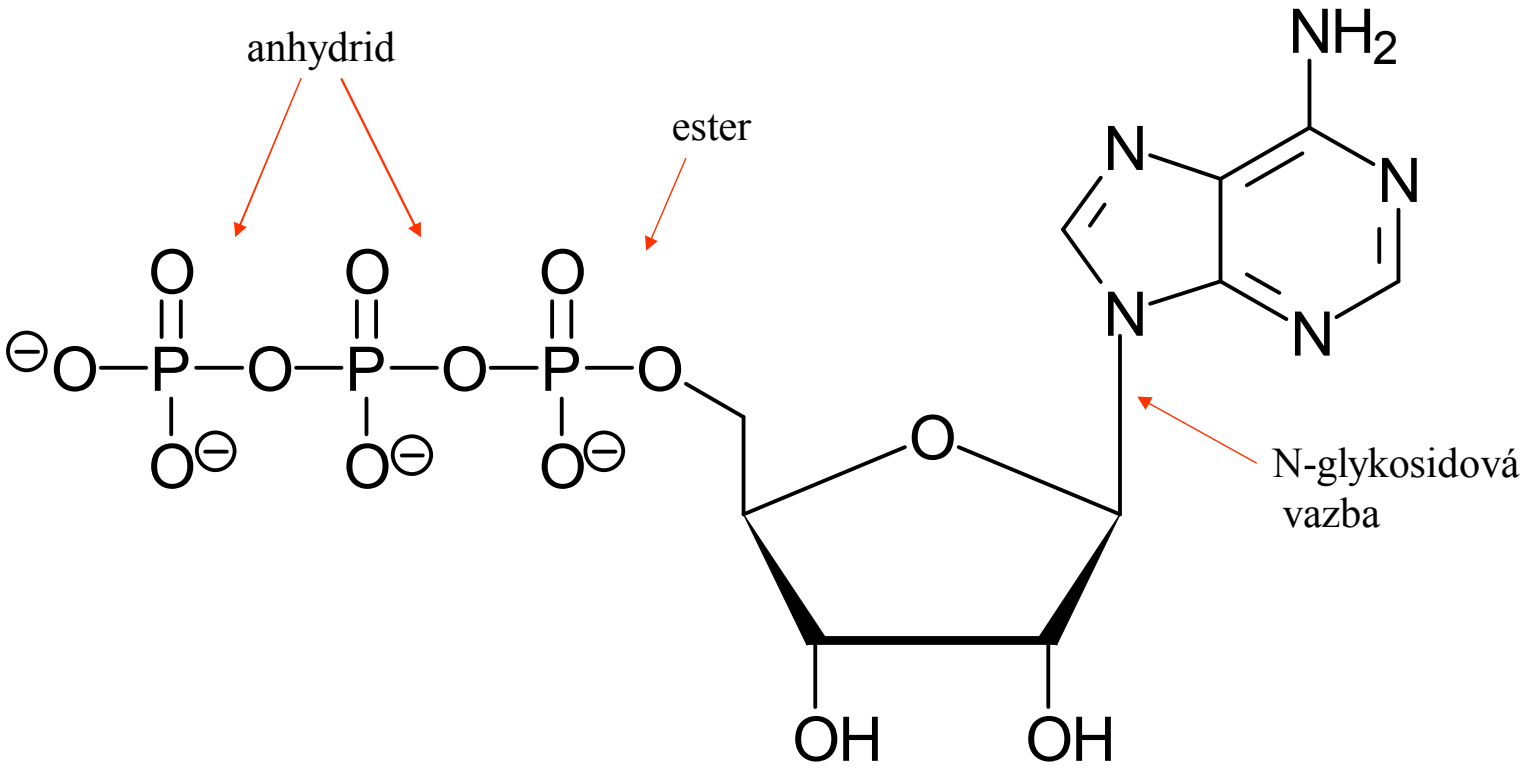
Vitamin	**Kofaktor**	**Přenášená skupina**
Pyridoxin (B6)	pyridoxalfosfát	$-NH_2$ (transaminace)
---	ATP	$-PO_3^{2-}$ (fosforyl)
---	PAPS	$-SO_3^{2-}$
Biotin (vitamin H)	karboxybiotin	CO_2
Pantothenová kys. (B5)	CoA-SH	acyl
---	dihydrolipoát	acyl
---	SAM	$-CH_3$
Listová kys. (folát; B9)	tetrahydrofolát	C_1 skupiny (z aminokyselin)
Kyanokobalamin (B12)	methylkobalamin	$-CH_3$
Thiamin (B1)	thiamindifosfát	zbytek některých oxokyselin

Pyridoxalfosfát je kofaktor transaminace a dekarboxylace AK

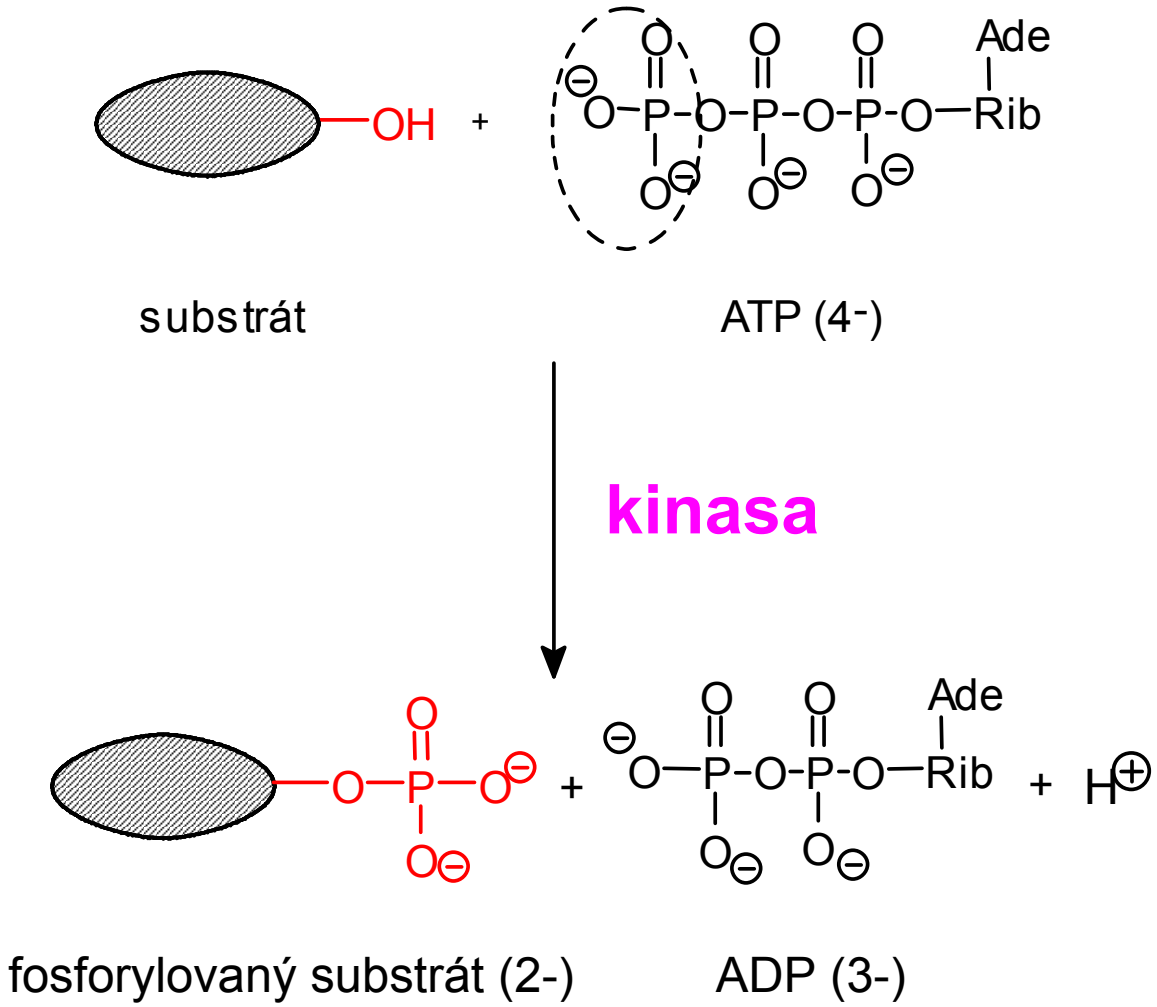


aldimin
(Schiffova báze)

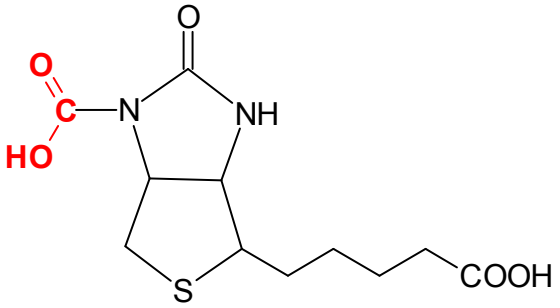
ATP je kofaktor kináz – fosforylační činidlo

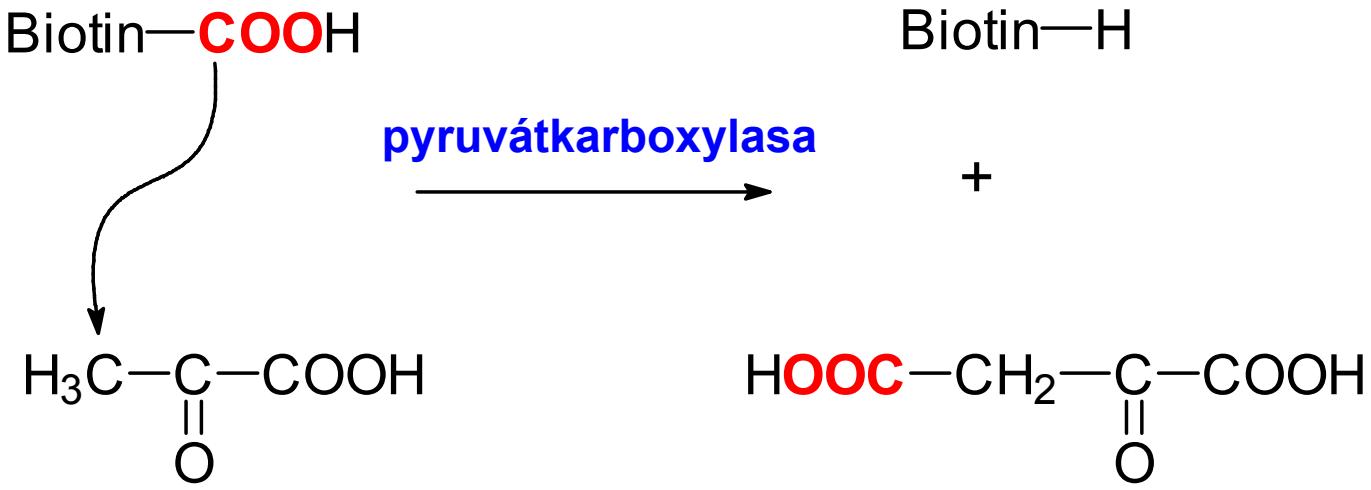


Fosforylace substrátu



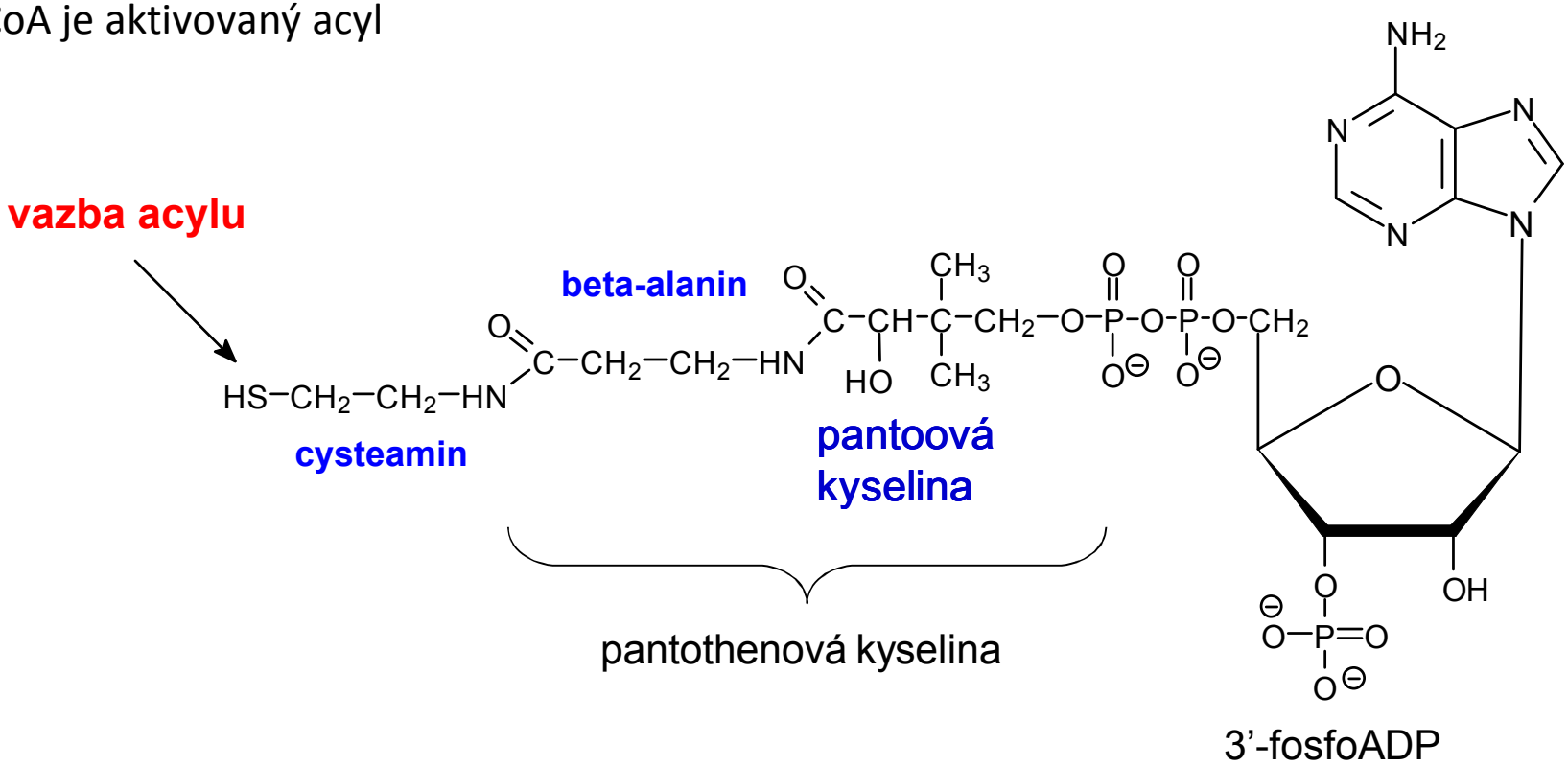
Karboxybiotin je kofaktor karboxylačních reakcí





Koenzym A

- přenáší acyly vázané na atom síry
- **thioesterová vazba**
- acyl-CoA je aktivovaný acyl



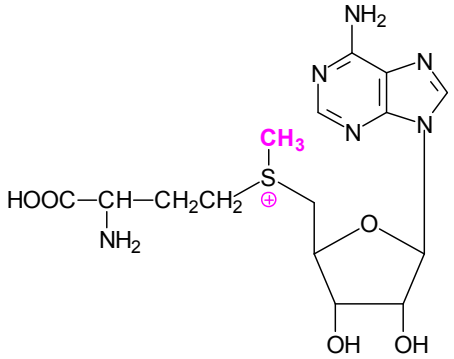
S-Adenosylmethionin (SAM)

- „aktivní methyl“, trojvazná síra ⇒ **sulfoniový kation**
- kofaktor methylačních reakcí:

  ethanolamin → cholin (trojnásobná methylace)

  guanidinacetát → kreatin

  noradrenalin → adrenalin ..... a řada dalších

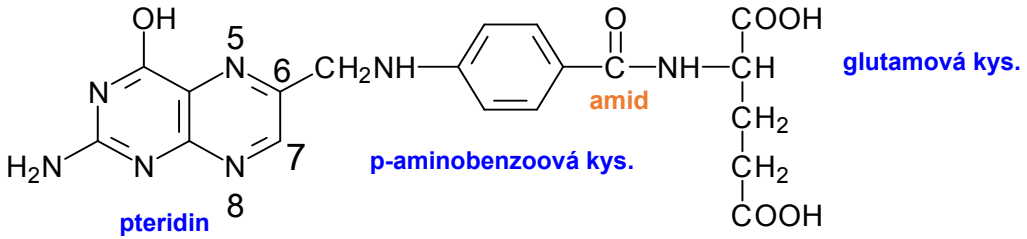


- z methioninu vzniká **homocystein**
- pro remethylaci homocysteinu je nutný methyl-FH_4 a B_{12} kofaktor

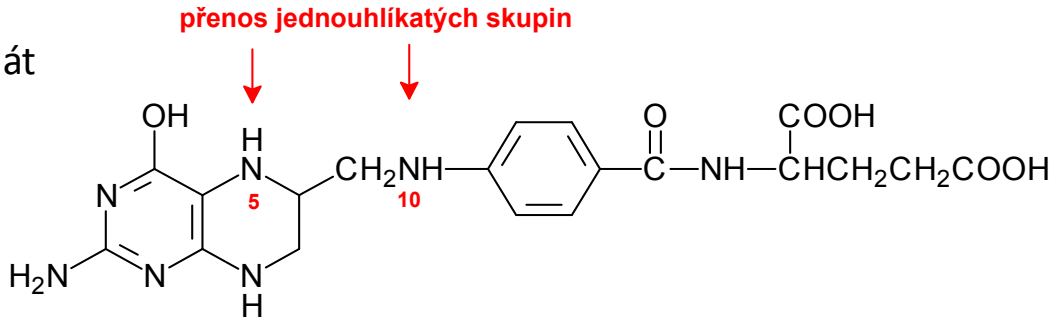
Tetrahydrofolát H_4F

- Přenáší 1C zbytky
- Přijímána ve formě kyseliny listové, která je v těle je hydrogenována na 5,6,7,8-tetrahydrofolát (H_4F)

Kyselina listová



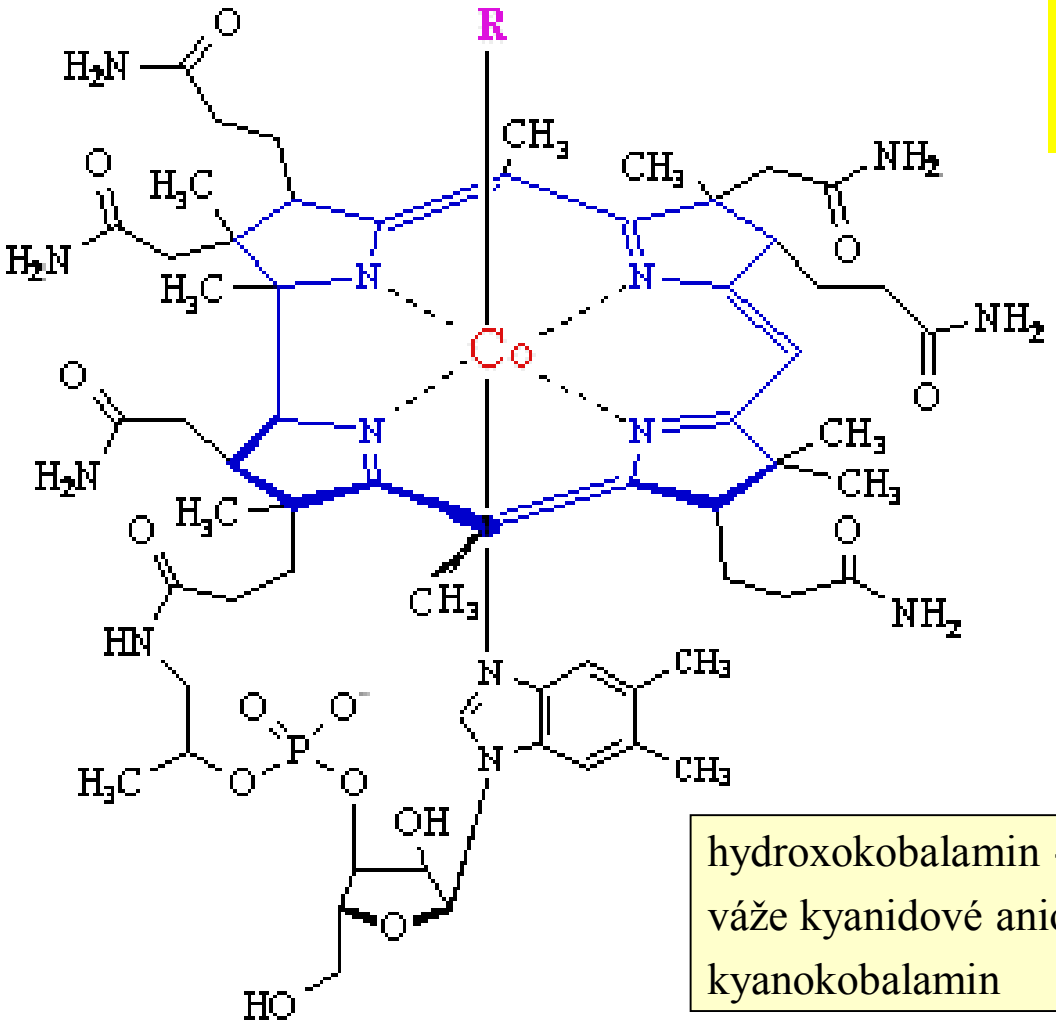
Tetrahydrofolát



C1 skupiny přenášené tetrahydrofolátem

Oxid. č. C	Vzorec	Název	Metabolický původ / Využití
-III	$-CH_3$	methyl	redukce methylen-H_4F (ze serinu, glycinu) (N-$\mathbf{CH_2}$-N)H_4F + NADPH+H^+ → HN(H_4F)N-$\mathbf{CH_3}$ + $NADP^+$ methyl-H_4F spolupracuje s B_{12} při methylaci homocysteinu
-II	$-CH_2-$	methylen	katabolismus serinu a glycinu syntéza dTMP → DNA dUMP + methylen-H_4F → dTMP + H_2F (thymidylátsynthasa) H_2F + NADPH+H^+ → H_4F + $NADP^+$ (dihydrofolátreduktasa)
-I	-CH=	methenyl (methin)	meziprodukt, deaminace formimino-H_4F (z histidinu) konverze na formyl-H_4F, syntéza purinových bází
+I	-CH=O	formyl	katabolismus tryptofanu → formiát → formyl-H_4F syntéza purinových bází
+I	-CH=NH	iminoformyl	katabolismus histidinu (FIGLU – formiminoglutamát)

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:

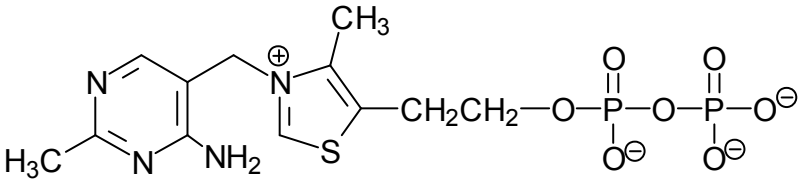
1. homocystein $\xrightarrow{H_4F / B_{12}}$ methionin

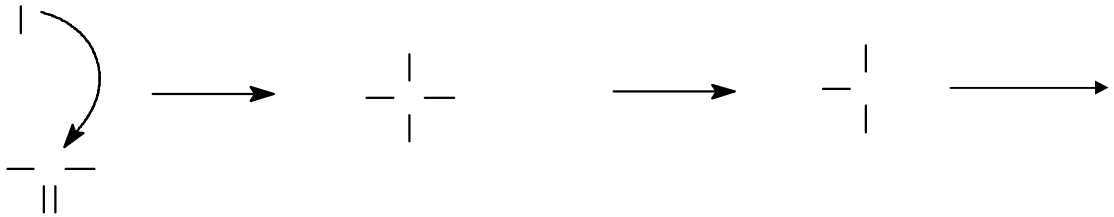
2. homocystein $\rightarrow\rightarrow$ propionyl-CoA $\xrightarrow{B_{12}}\rightarrow$ sukcinyl-CoA

Thiamindifosfát (TDP) je kofaktor

Oxidační dekarboxylace některých 2-oxokyselin

- pyruvát → acetyl-CoA
- 2-oxoglutarát → sukcinyl-CoA (CC)
- 2-oxokyseliny z katabolismu Val, Leu, Ile





Transketolasové reakce v pentosovém cyklu

- ribosa-5-P + xylulosa-5-P ⇄ glyceraldehyd-3-P + sedoheptulosa-7-P
- xylulosa-5-P + erythrosa-4-P ⇄ fruktosa-6-P + glyceraldehyd-3-P

Izoenzymy/Izoformy

- katalyzují stejnou reakci
- liší se primární strukturou a tedy fyzikálně-chemickými a kinetickými vlastnostmi
- mají často různou tkáňovou distribuci
- stanovují se elektroforézou nebo imunochemicky

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