

# Enzymy II

© Biochemický ústav LF MU 2018 (JG, JD)

# Katalytická aktivita enzymu

- Udává jaké látkové množství substrátu bylo přeměněno na produkt za určitou časovou jednotku
- SI Jednotka
  - kat = [mol/s]
  - $\mu\text{kat} = 10^{-6} \text{ kat} = \mu\text{mol/s}$
  - $\text{nkat} = 10^{-9} \text{ kat} = \text{mmol/s}$
- Mezinárodní jednotka
  - U/IU ... přeměna 1 $\mu\text{mol}$  substrátu za 1 minutu
  - Přepoččet ...  $1 \mu\text{kat} = 60 \text{ U}$   
 $1\text{U} = 16,6 \text{ nkat}$

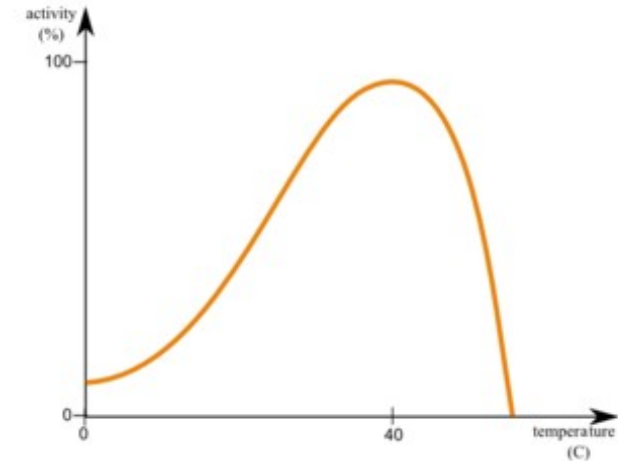
# Katalytická koncentrace enzymu

- Je katalytická aktivita vztažena na objem biologické tekutiny (krevní sérum/plazma)
- SI jednotka
  - Kat/l ... mol/l.s
- Mezinárodní jednotka
  - U/l ...  $\mu\text{mol}/\text{min.l}$
- Přepočet ...  $1\text{U/l} = 16,6 \text{ nkat/l}$

# Ovlivnění katalytické aktivity enzymu

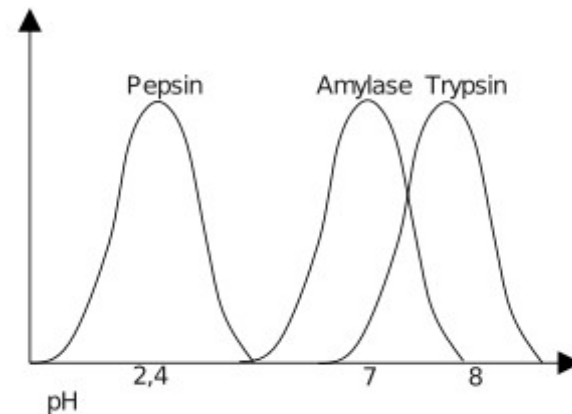
- Teplota

- Teplotní optimum obvykle 37°C
- Placentární isoenzym ALP je termostabilní až do 65°C, naopak kostní isoenzym ALP je při teplotě 56°C zcela inaktivován



- pH

- pH optimum



# Ovlivnění katalytické aktivity enzymu

- Aktivátor

- Ionty dvojmocných kovů
- $\text{Ca}^{2+}$  +... aktivace koagulačních faktorů
- $\text{Mg}^{2+}$  ... aktivátor kináz
- $\text{Zn}^{2+}$  ... alkalická fosfatáza (ALP)

- Inhibitor

- Zpomaluje či zastavuje enzymovou reakci
- Reverzibilní inhibice
  - Kompetitivní inhibice
  - Nekompetitivní inhibice
- Ireverzibilní inhibice
  - Kovalentní modifikace enzymu

# Inhibice enzymů (snížení aktivity)

- **Ireverzibilní**

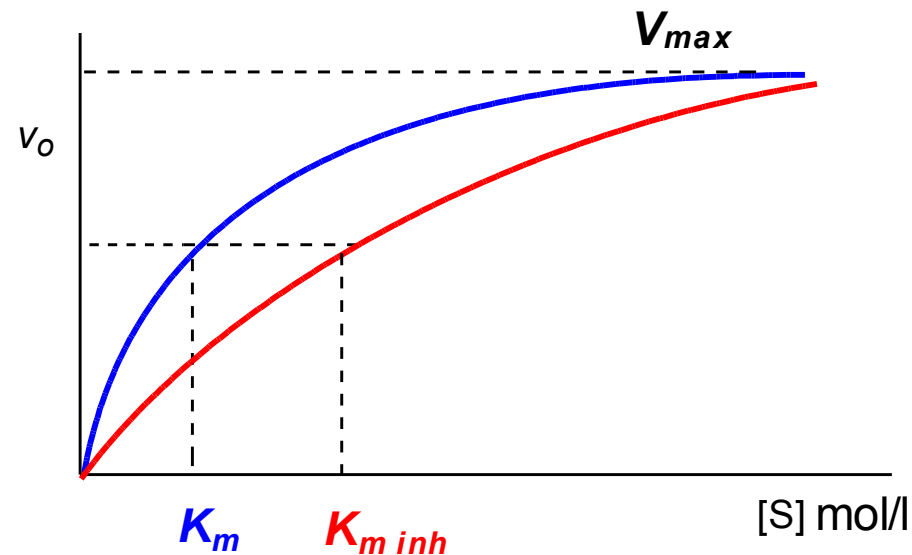
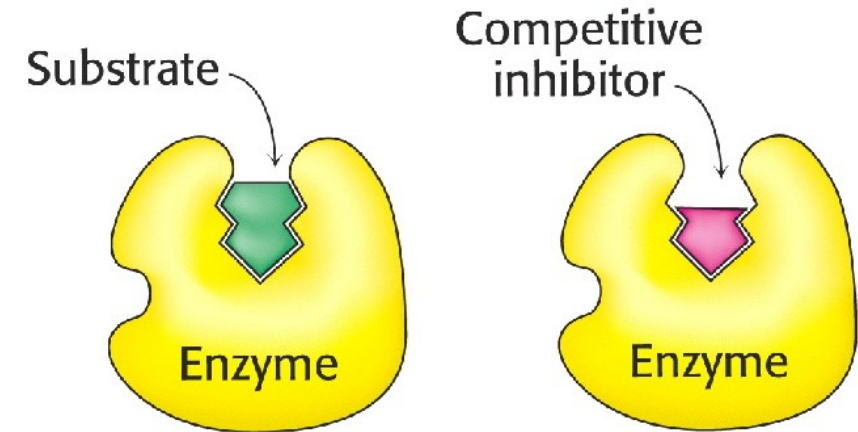
- nevratná
- inhibitor pevně vázán na enzym (aktivní místo)
- způsobí:
  - organofosfáty
  - ionty těžkých kovů
  - kyanidy

- **Reverzibilní**

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

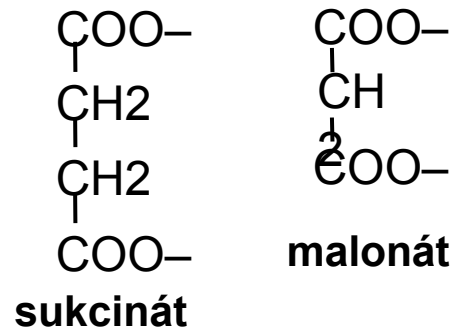
# Kompetitivní inhibice

- inhibitor se váže do aktivního místa enzymu
- strukturní podoba substrátu
- soutěží s přirozeným substrátem o vazebné místo
- komplex enzym-inhibitor se nepřemění na produkt
- maximální rychlost je dosažena až za vyšších hodnot [S]
- $V_{max}$  se nemění,  $K_m$  se zvyšuje

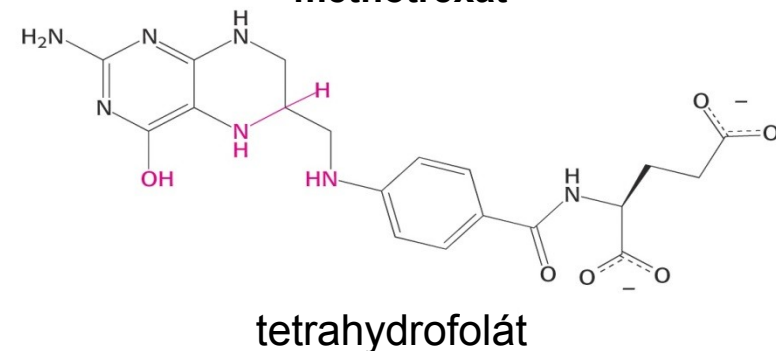
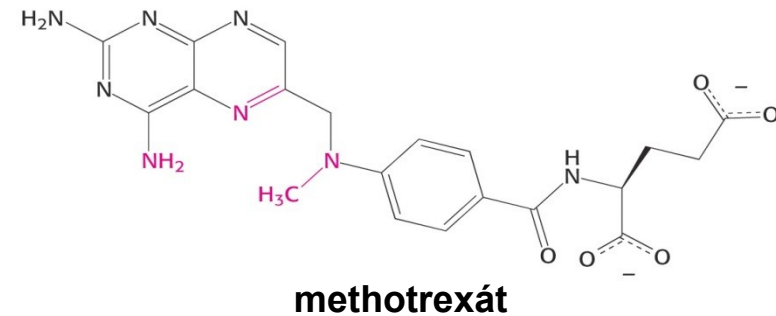


# Příklady kompetitivních inhibitorů

**Malonát** je kompetitivním inhibitorem sukcinátdehydrogenasy

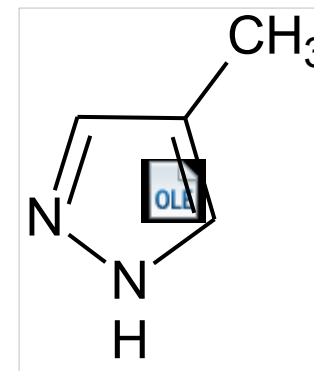
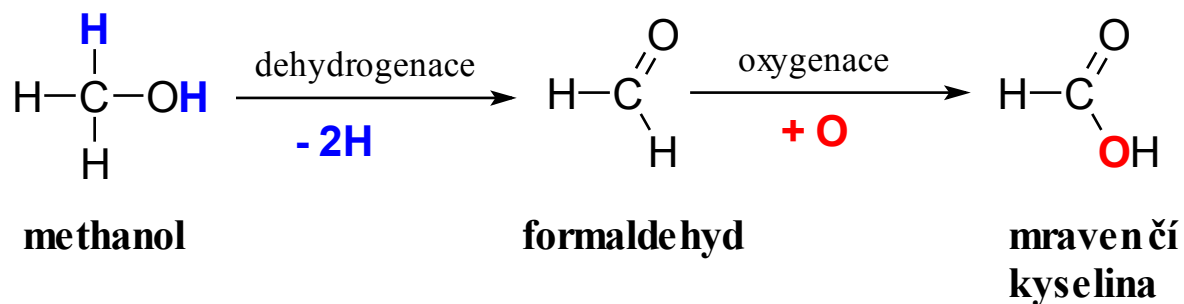


**Methotrexát** kompetitivně inhibuje aktivní místo pro tetrahydrofolát Dihydrofolátreduktasy během syntézy purinových a pyrimidinových bází nukleových kyselin. Používá se jako cytostatikum.





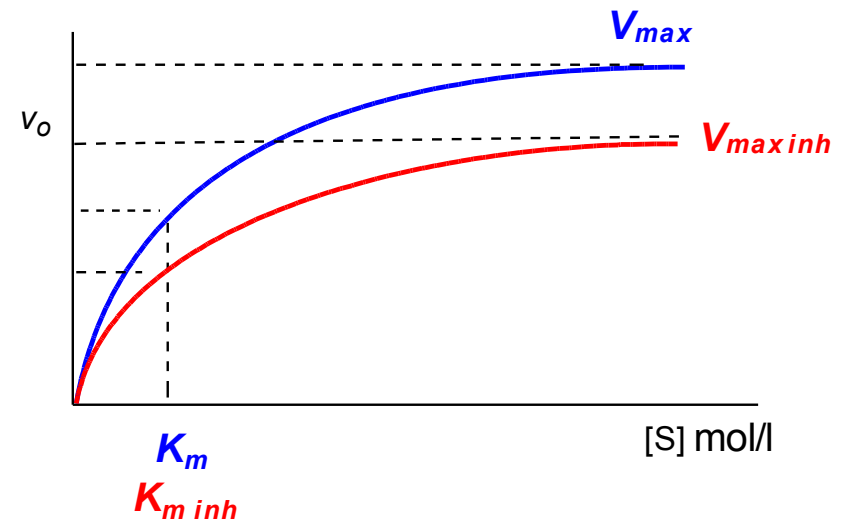
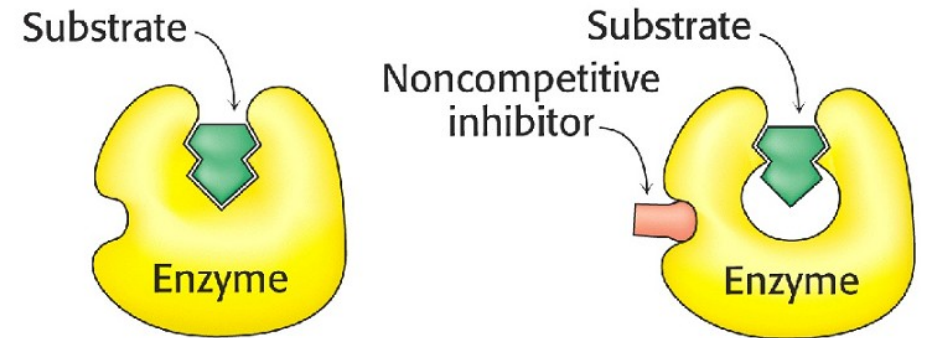
# Otrava methanolem se léčí inhibicí alkoholdehydrogenasy



- 1) Aktivní místo enzymu je přednostně obsazeno strukturně podobným substrátem – ethanolem (kompetice, inhibice vůči methanolu)
- 2) Aktivní místo enzymu obsahuje Zn<sup>2+</sup> (chelatovaný 2x Cys a His), inhibice nastane vazbou fomepizolu na Zn<sup>2+</sup>

# Nekompetitivní inhibice

- inhibitor se váže jak na volný enzym (E), tak na komplex enzym-substrát (ES), ale **mimo aktivní místo!**
- inhibice nemůže být překonána vysokou koncentrací substrátu
- systém se chová jako **zředěný roztok enzym**
- **$K_m$**  se **nemění** (aktivní místo je volné pro substrát)
- **$V_{max}$**  se **snižuje**, protože klesá koncentrace funkčního komplexu E-S



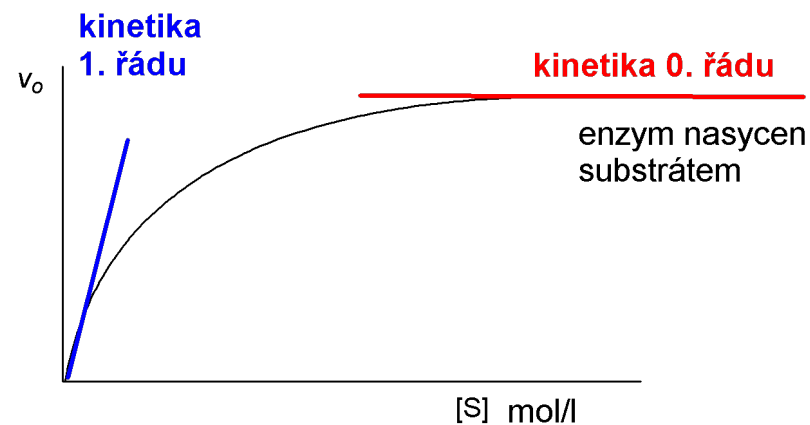
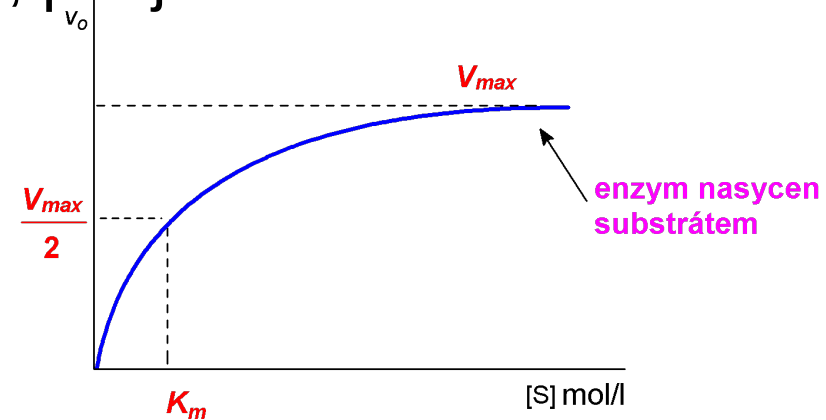
## Mnohá léčiva jsou inhibitory lidských/bakteriálních enzymů

- Acetylsalicylová kyselina, 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)

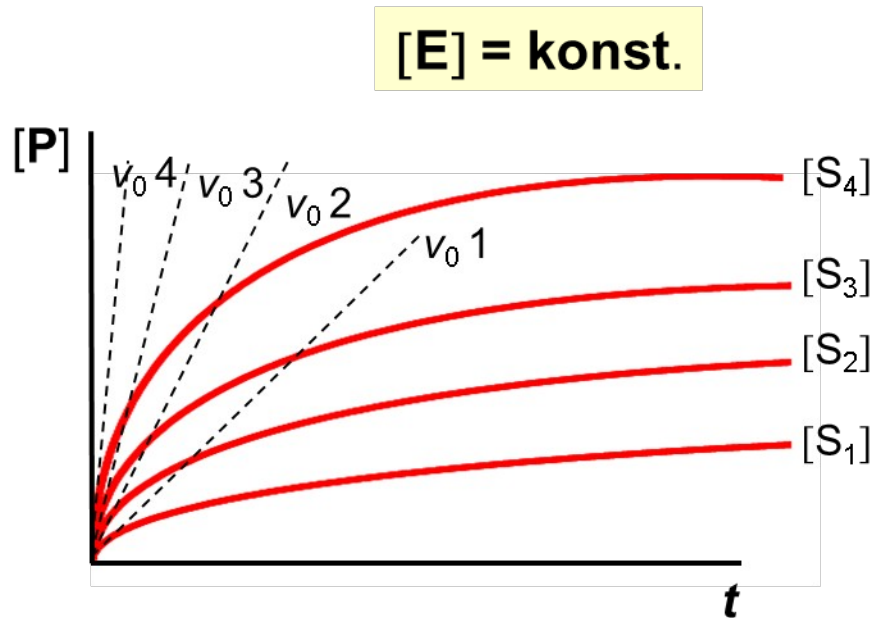
# Ovlivnění katalytické aktivity enzymu

- Koncentrace substrátu
  - rovnice Michaelise a Mentenové, pro jednosubstrátové reakce

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



# Jak se získá saturační křivka



- sada pokusů při nichž je koncentrace enzymu konstantní
- různé koncentrace substrátu, rozpětí 2-3 řády
- z jednotlivých kinetických křivek se stanoví  $v_0$
- $v_0$  se graficky vynesou proti příslušným [S]
- vznikne hyperbolická saturační křivka

## Koncentrace enzymu [E] také ovlivňuje rychlost

nasyčený enzym:  $v_0 = k [E]_t$

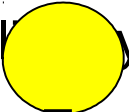
[E]<sub>t</sub> je celková (totální) koncentrace enzymu



**$K_M$  se nemění,  $V_{max}$  se zvyšuje s koncentrací enzymu**

# Množství enzymu v biologickém materiálu lze stanovit dvojím způsobem

- **Katalytická koncentrace**

- $\mu\text{kat/l}$
  - stanoví se produkt enzymové reakce
  - většina klíčových významných enzymů
- substrát  E → produkt

- **Hmotnostní koncentrace**

- $\mu\text{g/l}$ ,  $\text{ng/l}$ ,  $\text{pg/l}$
  - stanoví se enzym (jako antigen, imunochemicky)
- enzym (antigen) + protilátka → imuno-komplex
- jen některé, např. tumorové markery



## Dvě metody pro zjištění katalytické koncentrace

- 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 se blíží  $V_{max}$

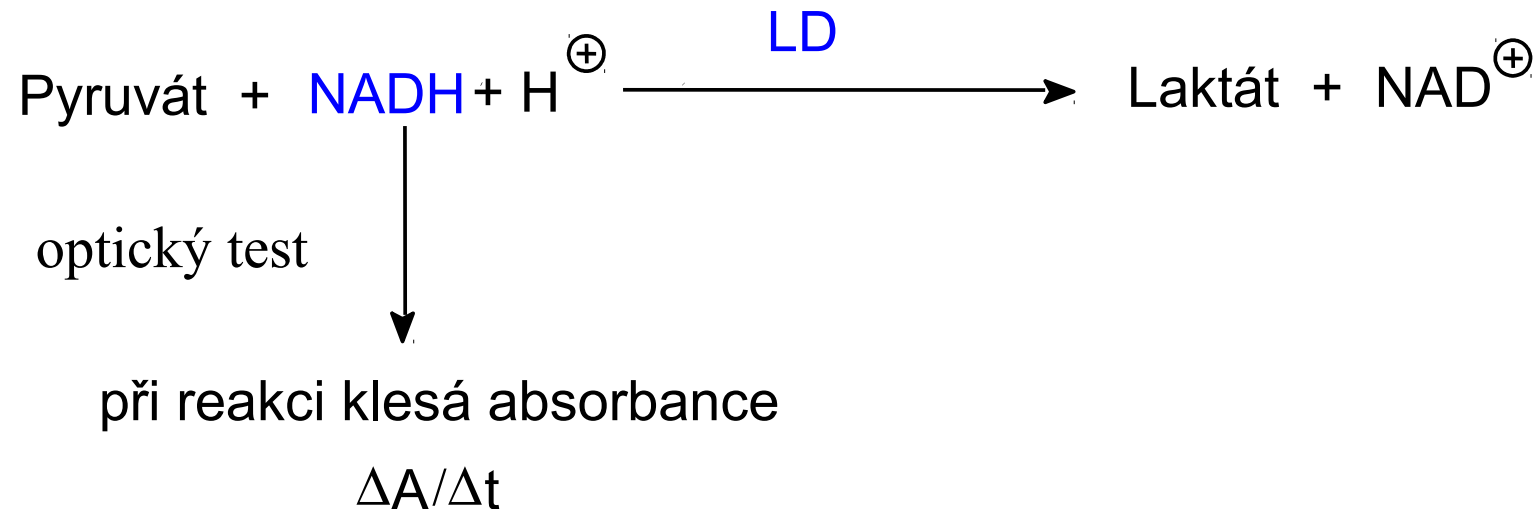
Charakteristika	Kinetická metoda	Metoda konstantního času
Co se měří	[S] nebo [P]	[P]
Jak	kontinuálně (např. po 10 s)	po urč. čase (např. 10 min) je reakce inhibována
Kinetická křivka hodnocena	ano	ne
Co se stanoví	počáteční rychlost $v_0$	průměrná rychlost
Metoda je	přesná	méně přesná



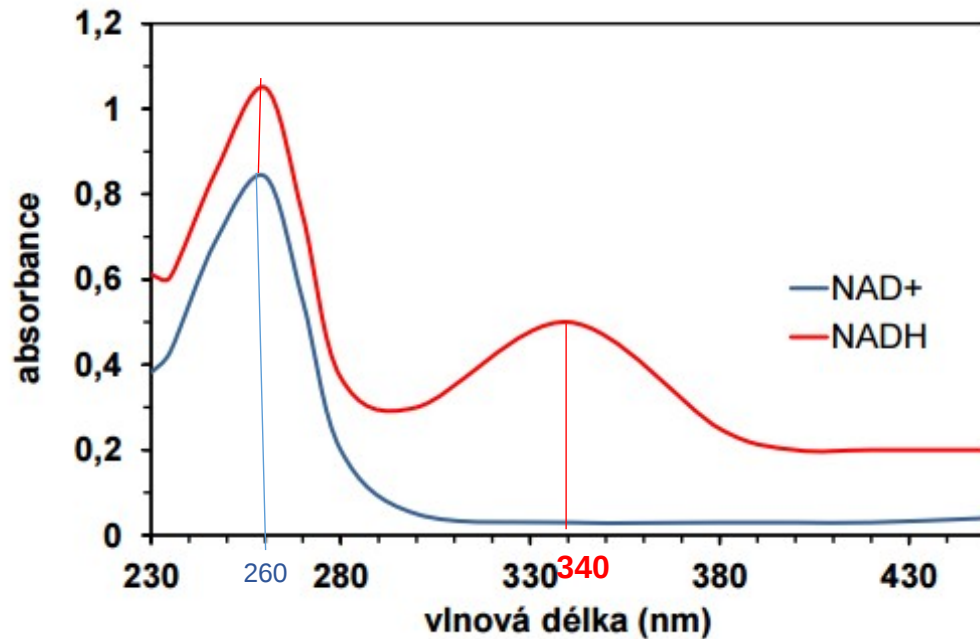
Jak stanovíme aktivitu  
laktátdehydrogenázy LD?

# Princip měření aktivity laktátdehydrogenasy

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



# Absorpční spektrum oxidované a redukované formy NAD<sup>+</sup> (princip „Warburgova optického testu“)



- Oxidovaná forma NAD<sup>+</sup> 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).

# 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, cholinestráza

- **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) – lipáza, amyláza ...

# 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:  $AST/ALT > 1$

# Trojí využití enzymů v lékařství

1. enzymy jako **indikátory** patologického stavu
2. enzymy jako **analytická činidla** v klinické 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 $\mu$ kat/l	hepatopatie
CK	do 4 $\mu$ kat/l	myopatie, infarkt
PSA	do 4 $\mu$ g/l	myokardu karcinom prostaty

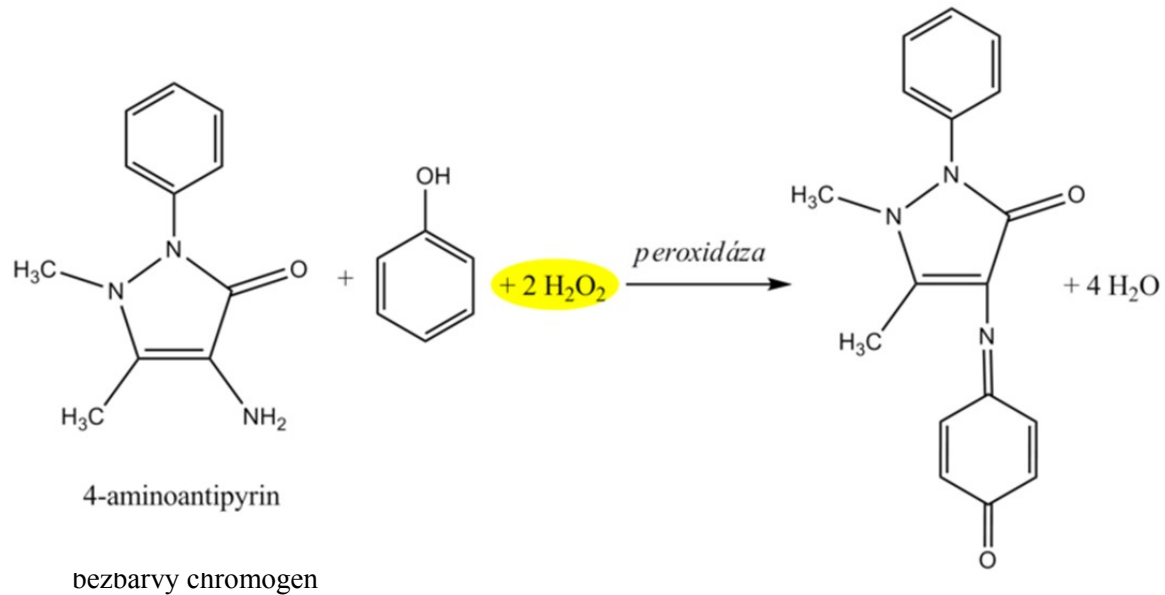
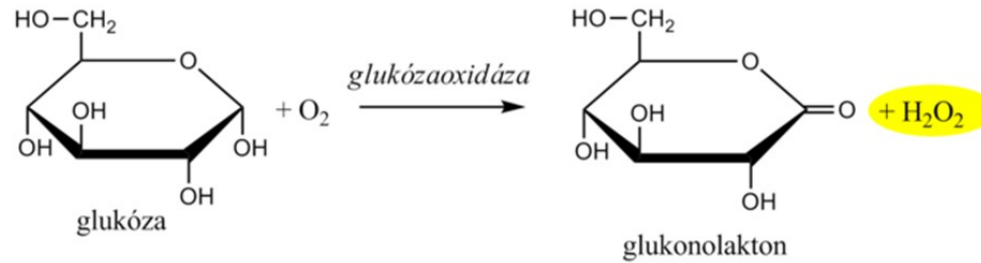
ALT alaninaminotransferasa, CK kreatinkinasa, PSA prostatický specifický antigen

# Enzymy jako analytická činidla

Enzym	Původ enzymu	Stanovení
Glukosaoxidasa	Aspergillus niger	glukosa
Peroxidasa	křen (Armoracia sp.)	glukosa
Lipasa	Candida sp.	triacylglyceroly
Cholesterodoxidasa	Pseudomonas sp.	cholesterol
Urikasa	Candida sp.	kyselina
Bilirubinoxidasa	Myrothecium sp.	močová
Ureasa	bob (Canavalia sp.)	bilirubin
Laktátdehydrogenasa	Pediococcus sp.	močovina
	Thermus aquaticus	ALT, AST
Taq polymerasa		PCR metoda



# Enzymové stanovení glukózy



# Enzymy jako léčiva

Enzym	Použití
Pankreatické trávicí enzymy	směs enzymů (lipasy, amylasy, proteasy) získaná z vepř. pankreatů, acidorezistentní tobolky indikace: sekreční nedostatečnost pankreatu různé etiologie, cystická fibróza, užívání: 3 × denně při jídle, řada přípravků volně prodejných
Laktasa	užívá se laktosové intoleranci
Asparaginasa	asparaginasa se nevyskytuje v lidském těle katalyzuje hydrolýzu deamidaci 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
Urokinasa	fibrinolytikum, rozpouští krevní sraženiny v cévách, proteasa, štěpí plazminogen na plazmin – ten vyvolá degradaci fibrinu a trombolýzu, indikace: žilní trombóza, plicní embolie, akutní IM
Proteasy různého původu	fibrinolyzin, chymotrypsin, kolagenasa, papain (papaya), bromelain (ananas), po lokální aplikaci vedou k lýze nekrotické tkáně, nepoškozují zdravé buňky, hnisavé rány, bércové vředy, diabetické gangrény, dekubity apod. celková aplikace: některé studie naznačují protizánětlivý účinek, ovlivnění imunity u autoimunitních onemocnění, indikace: pomocná léčiva při revmatoidní artritidě, traumatické záněty a otoky, lymfedémy aj. (Wobenzym, Phlogenzym)

Nadstavbový materiál

# Tři obecné způsoby regulace enzymů

Princip regulace	Komentář
Změna koncentrace substrátu	<ul style="list-style-type: none"><li>• rychlost enzymových reakcí závisí na koncentraci substrátu</li><li>• enzymy vykazují saturační kinetiku</li><li>• izoformy enzymů s různou <math>K_m</math> jsou různě citlivé na koncentraci substrátu (hexokinasa × glukokinasa)</li><li>• dostupnost substrátu v aktivním místě enzymu snižuje kompetitivní inhibitor</li><li>• velmi důležitý faktor <i>in vitro</i></li></ul>
Změna koncentrace enzymu	<ul style="list-style-type: none"><li>• regulace syntézy enzymu (indukce × represe)</li><li>• regulace degradace enzymu (selektivní × neselektivní)</li></ul>
Změna konformace aktivního místa enzymu	<ul style="list-style-type: none"><li>• štěpení proenzymů (<b>nevratný děj</b>)</li><li>• fosforylace enzymu</li><li>• allosterické regulátory</li><li>• protein-protein interakce</li><li>• nekompetitivní inhibitory</li></ul>

pomalá změna

rychlá změna

# Regulace množství enzymu

- **Řízená proteosyntéza enzymu**

konstitutivní a indukovaná exprese genů, regulace rychlosti transkripce, posttranskripčních úprav RNA, regulace rychlosti translace a posttranslačních úprav

- **Řízená degradace enzymu**

specifické intracelulární proteinasy – určují rozdílné biologické poločasy enzymů

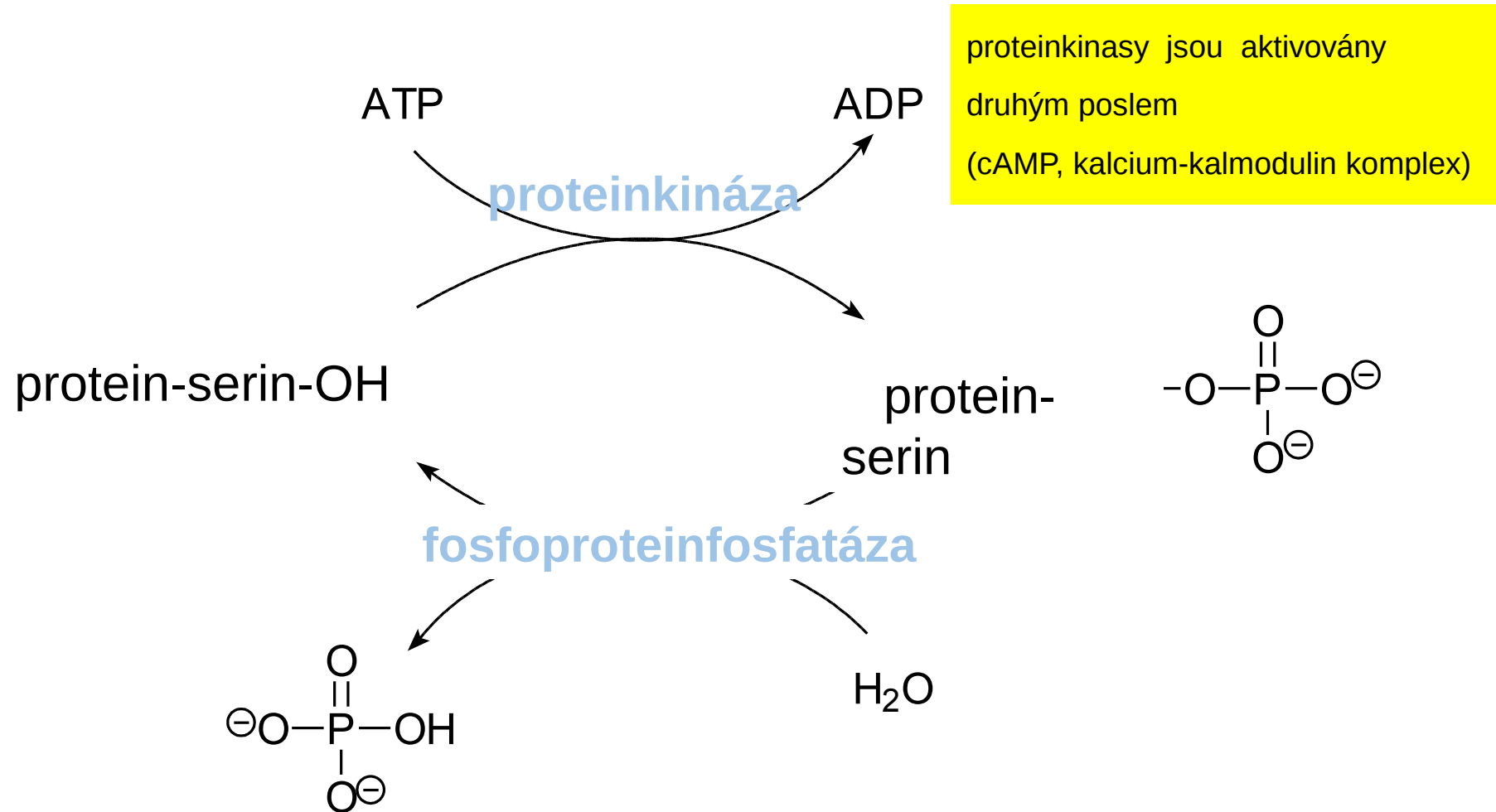
# Aktivace enzymu částečnou proteolýzou

- aktivní enzym vzniká **nevratným** odštěpením určité sekvence (propeptidu) z molekuly **proenzymu**
- obecně: proenzym + H<sub>2</sub>O → enzym + propeptid
- nastane změna konformace molekuly, která exponuje aktivní místo, takže je připraveno navázat substrát
- Proteinasy v GIT (pepsinogen → pepsin)
- Faktory krevního srážení
- Proteinasy (kaspasy) aktivované v průběhu apoptózy

# Fosforylace/defosforylace enzymu

- kovalentní modifikace, katalyzují proteinkinasy
- přenos fosforylu  $-PO_3^{2-}$  z ATP na  $-OH$  skupinu enzymu (Ser, Thr, Tyr)
- v zásadě vratný děj
- defosforylaci katalyzují **fosfatázy**, hydrolýza esterově vázaného fosfátu

# Fosforylace a defosforylace enzymu mění jeho aktivitu





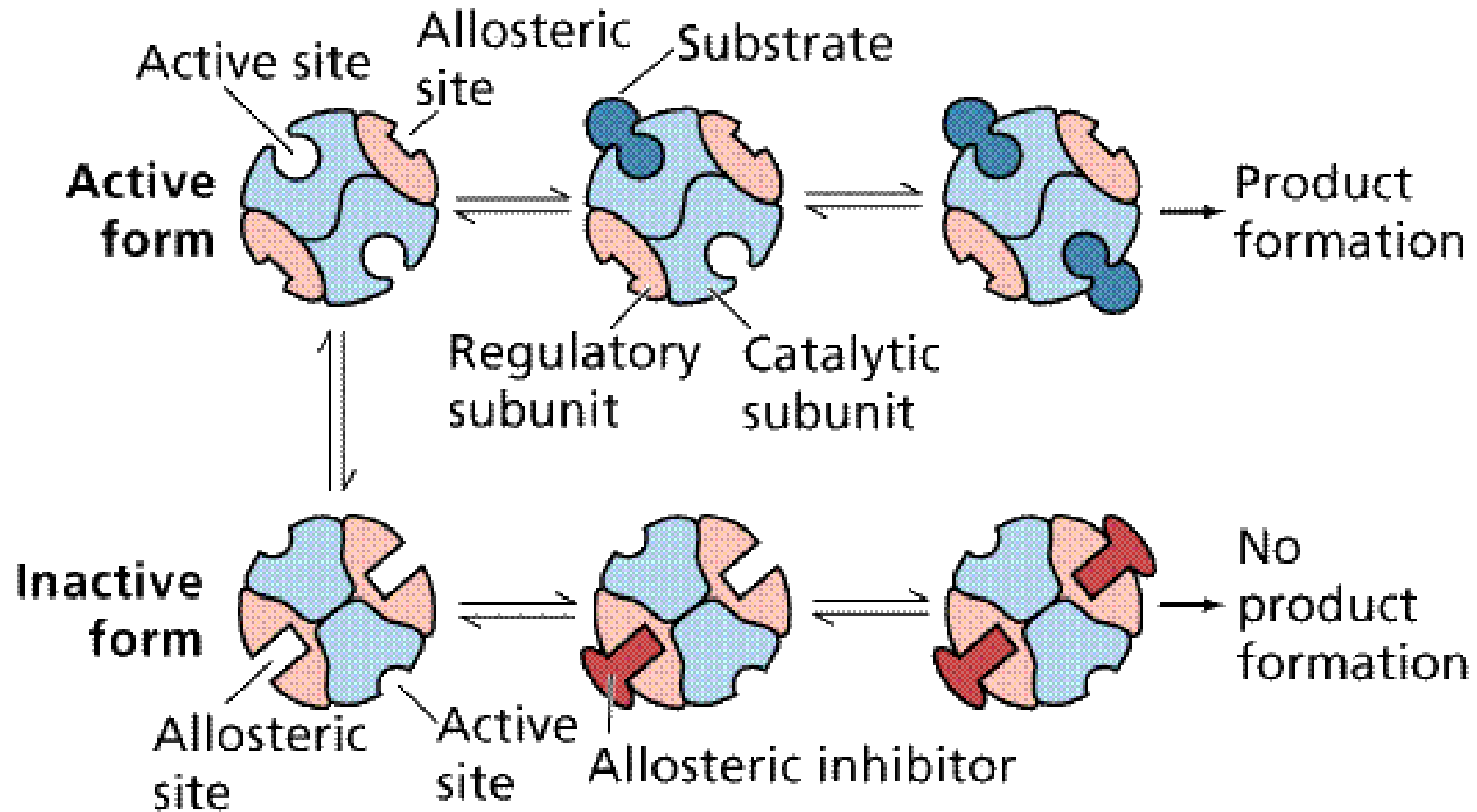
## Příklad důsledků fosforylace/defosforylace dvou enzymů

Charakteristika	Glykogenfosforylasa	Glykogensynthasa
Enzym je aktivován	glukagonem	inzulinem
Enzym katalyzuje	štěpení energeticky bohatého glykogenu energeticky chudým fosfátem (Pi) = transfer glukosylu z (Glc) <sub>n</sub> na Pi (= transferasa)	syntézu energeticky bohatého glykogenu z energeticky bohaté UDP-glukosy = transfer glukosylu z UDP-Glc na (Glc) <sub>n</sub> (= transferasa)
Katalyzovaná reakce	$(Glc)_n + Pi \rightarrow (Glc)_{n-1} + Glc-1-P$	$(Glc)_n + UDP-Glc \rightarrow (Glc)_{n+1} + UDP$
Fosforylace enzym	<b>aktivuje</b>	<b>inhibuje</b>
Defosforylace enzym	<b>inhibuje</b>	<b>aktivuje</b>

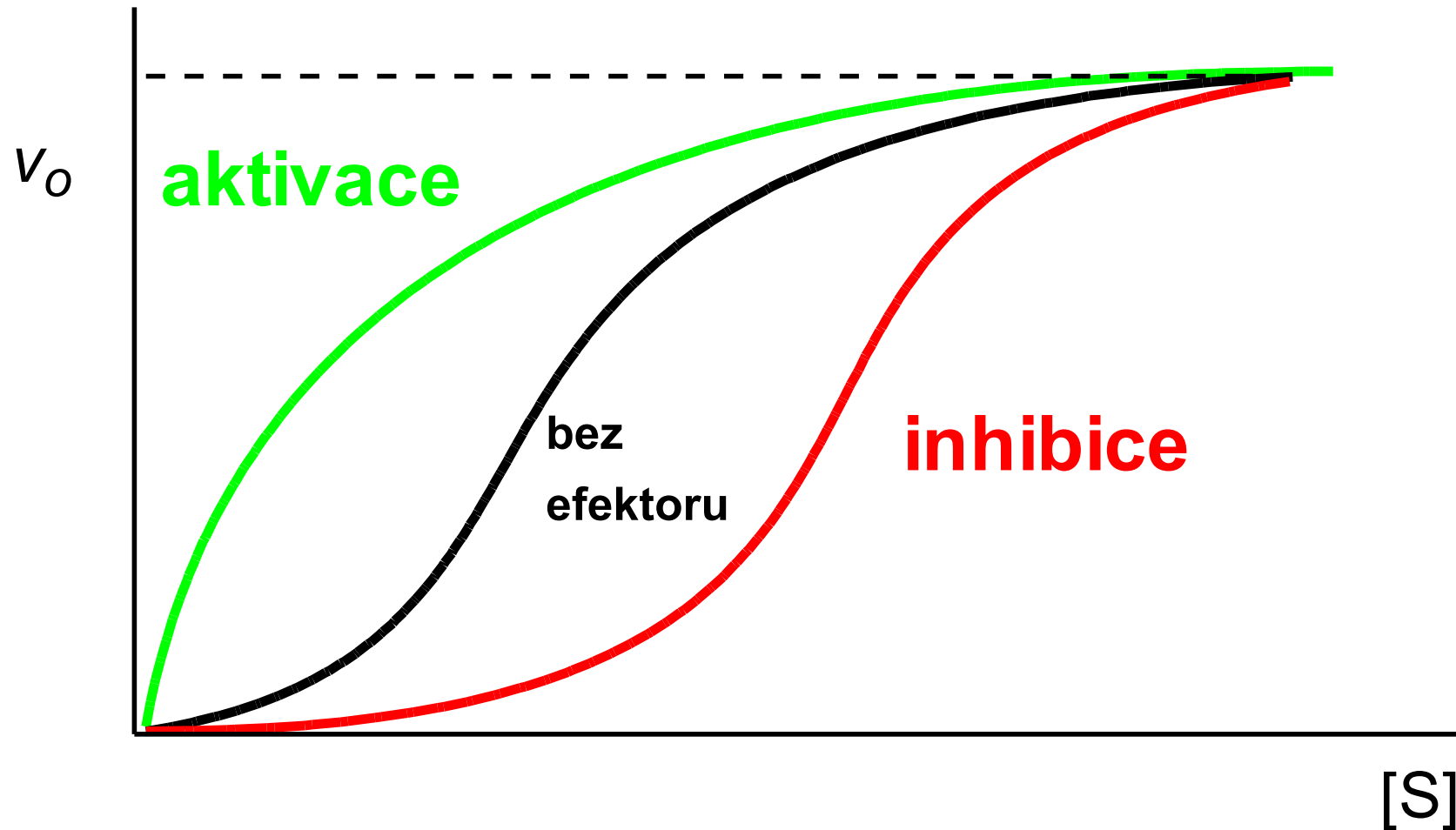
# Allosterické enzymy jsou oligomerní

- více podjednotek, často regulační a katalytická
- na enzym se váže efektor strukturně odlišný od substrátu, často produkt
- váže se do allosterického místa – **jiné než aktivní místo**
- vazba vyvolá změnu konformace enzymu  $\Rightarrow$  změna aktivity
  - allosterická aktivace nebo inhibice

# Allosterické enzymy jsou oligomerní



Saturační křivka allosterických enzymů je sigmoidní

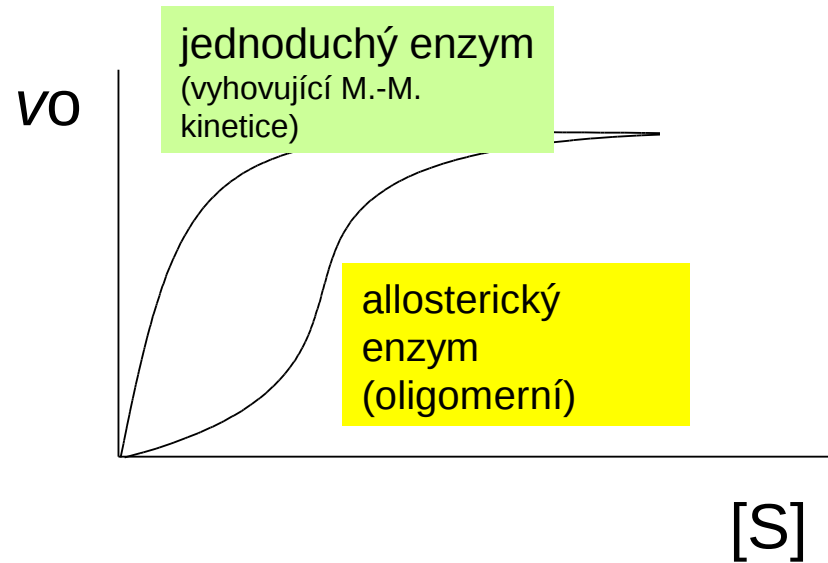


# Kooperativní efekt

- u oligomerních enzymů a proteinů (např. Hb)
- více podjednotek  $\Rightarrow$  více vazebných míst
- navázání substrátu (nebo O<sub>2</sub> na Hb) na jednu podjednotku indukuje změny konformace u ostatních, že se další molekuly substrátu (nebo O<sub>2</sub>) vážou snadněji (obtížněji)
- příklad: hemoglobin (tetramer)  $\times$  myoglobin (monomer)

# Srovnejte

Saturace enzymu  
substrátem



Saturace hemoglobinu kyslíkem

