

Enzymy

Struktura, funkce, vlastnosti

Popis enzymové reakce

Enzymy v diagnostice

Vybrané klinicky významné enzymy

MUDr. RNDr. Michal Řiháček, Ph.D.

Ústav laboratorní medicíny

Fakultní nemocnice Brno

Enzymy

- bílkoviny s **katalytickou aktivitou**
- s různou **specifitou** jsou schopny urychlit přeměnu **substrátů** (reaktantů) na **produkty**
- v přítomnosti enzymu je **snížená aktivační energie** reakce (v daném směru), čímž dochází k urychlení řádově 10^6 - $10^{14}x$
- enzymy je možné **regulovat** a fungují za **specifických podmínek**

Enzymy vs. anorganické katalyzátory

alanin + 2-oxoglutarát $\xrightarrow{\text{ALT}}$ pyruvát + glutamát

$2\text{CO} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Pd}} 2\text{CO}$

ALT (EC 2.6.1.2)

struktura: 500 aa, 54 kDa

teplota: 37 °C (stabilní několik hodin při 50 °C)

pH optimum: 7,0-9,0

tlak: fyziologické hodnoty

kofaktor: pyridoxal-5-fosfát



Palladium

struktura: prvek, 106 Da

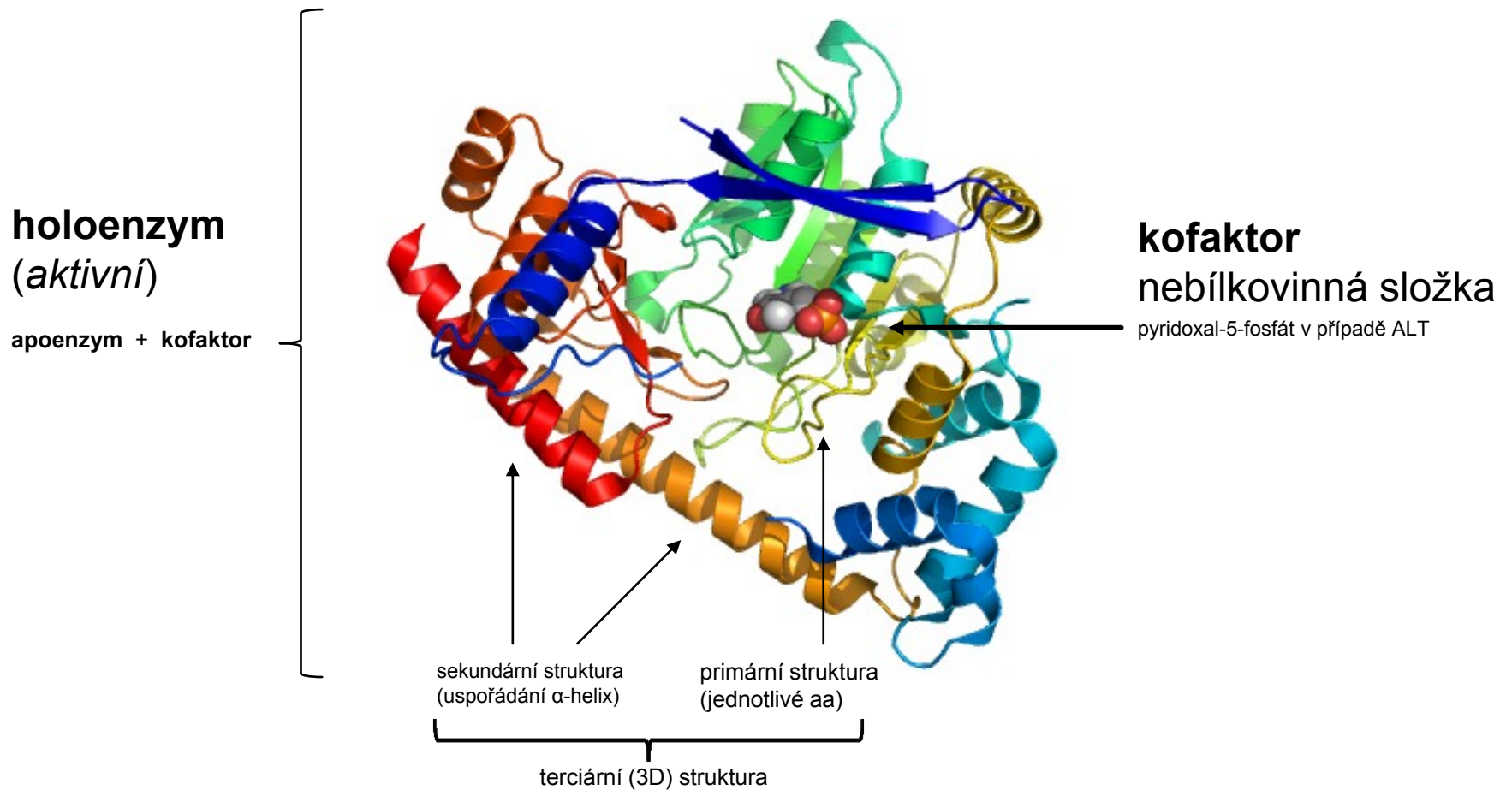
teplota: 300-600 °C

pH optimum: široké rozmezí

tlak: vysoký

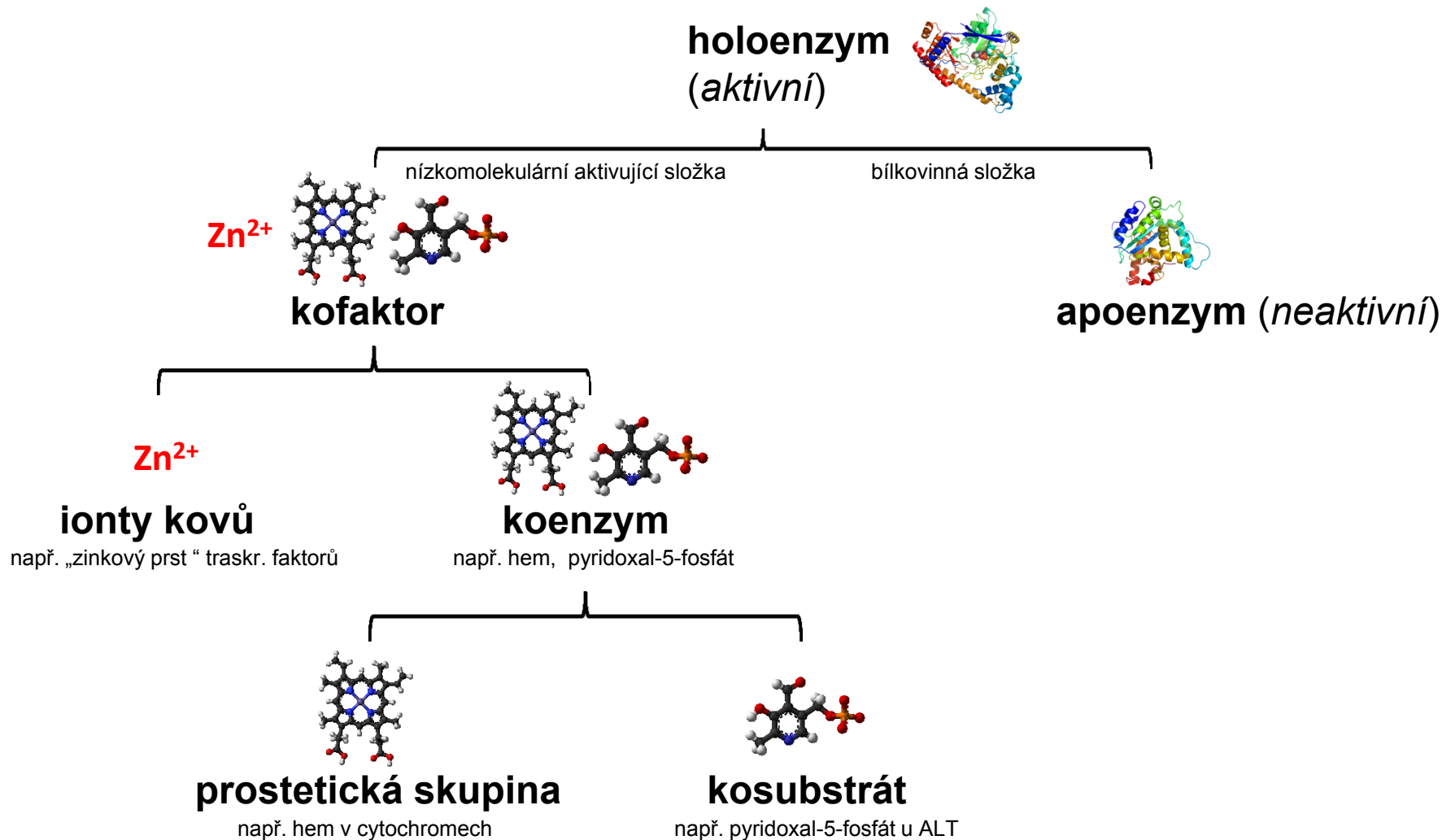


Struktura enzymů alanin aminotransferasa 2



bílkovinná část enzymu = **apoenzym** (*neaktivní*)

Struktura enzymů (VOET)



Názvosloví enzymů

Triviální

- často používané
- přípony **-in/-asa/-áza**
(aza)
- existují tzv. **doporučené triviální názvy**

- **příklady:**

alaninaminotransferasa

alkoholdehydrogenasa

Systematické

- komplikovanější, různý způsob tvorby názvu v závislosti na třídě enzymu
- přípony **-asa/-áza** **(aza)**

- **příklady:**

L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferasa

EC 2.6.1.2

ethanol:NAD⁺-oxidoreduktasa

EC 1.1.1.1

Názvosloví a dělení enzymů

6 hlavních tříd enzymů	reakce	systematický název enzymu
• OXIDOREDUKTASY	$A^- + B \leftrightarrow A + B^-$	donor:akceptor-oxidoreduktasa
• TRANSFERASY	$A-B + C \leftrightarrow A + B-C$	donor:akceptor-skupina transferasa
• HYDROLASY	$A-B + H_2O \leftrightarrow A-H + B-OH$	substrát-skupinahydrolasa
• LYASY (SYNTHASY)	$A-B + X-Y \leftrightarrow X-A-B-Y$	substrát-skupinalyasa
• ISOMERASY	$X-A-B-Y \leftrightarrow Y-A-B-X$	-racemasa, -epimerasa, -isomerasa, -mutasa
• LIGASY (SYNTHETASY)	$A + B \leftrightarrow A-B$	substrát-substrátligasa (tvořící nukleotid)

Názvosloví enzymů - příklady

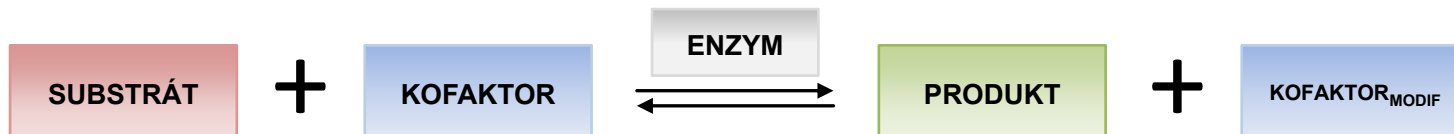
6 hlavních tříd enzymů

reakce a systematický název enzymu

- **OXIDOREDUKTASY**
D-glukosa-6-fosfát:NADP⁺-oxidoreduktasa (EC 1.1.1.49, G-6-P-DH)
D-glukosa-6-fosfát + NADP⁺ ↔ 6-fosfo-D-glukono-1,5-lakton + NADPH+H⁺
Favismus
X-vázané onem.
- **TRANSFERASY**
L-aspartát:2-oxoglutarát aminotransferasa (EC 2.6.1.1, AST)
L-aspartát + 2-oxoglutarát ↔ oxalacetát + L-glutamát
Marker poškoz.
buněk (játra...)
- **HYDROLASY**
α-D-galaktosid-α-D-galaktosyl hydrolasa (EC 3.2.1.22, α-galaktosidasa)
α-D-galactosid → α-D-galactosa + zbytek sloučeniny (gangliosyl, glykoprotein...)
Fabryho nemoc
střádavá choroba
- **LYASY (SYNTHASY)**
(S)-malát-hydrolyasa (EC 4.2.1.2, fumarasa)
(S)-malát ↔ fumarát + H₂O
Velmi vzácná
porucha (100/w)
- **ISOMERASY**
EC 4.2.1.2 triosafosfát isomerasa
dihydroxyacetonfosfát ↔ glyceraldehyd-3-fosfát
Závažná acidurie
(CNS symptom.)
- **LIGASY (SYNTHETASY)**
glutathion
γ-L-glutamyl-L-cystein:glycin ligasa (tvořící ADP) (glutathion synthasa EC 6.3.2.3)
ATP + γ-L-glutamyl-L-cystein + glycin → ADP + fosfát +
Anémie a CNS
postižení

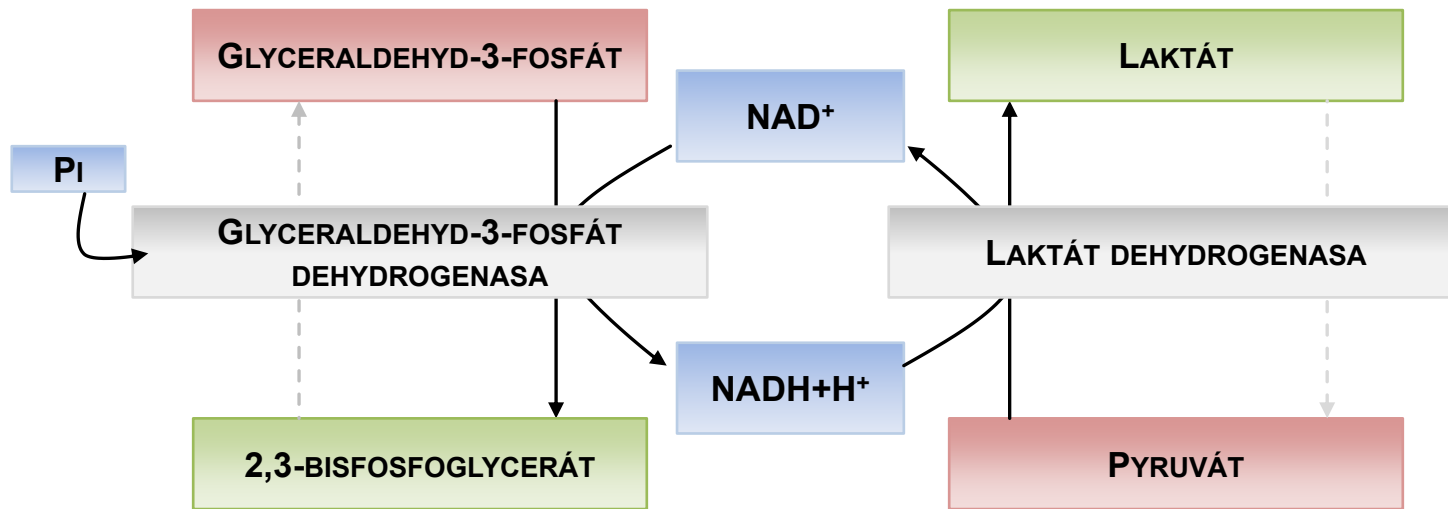
Kofaktory

- **nízkomolekulární** neproteinové sloučeniny
- podílejí se na **funkční specifičnosti** enzymů
- obecná zápis rovnice **enzymatické reakce**



- **modifikovaný kofaktor** vznikající při enzymatické reakci se v **jiné** (nebo zpětné) **reakci** může zpětně změnit na **kofaktor**

Příklad reaktivace kofaktoru: anaerobní glykolýza



- **modifikovaný** (redukovaný) kofaktor **NADH+H⁺** je nutné obnovit některou ze „spřažených reakcí“
- při **nedostatku O₂** se tak děje anaerobní glykolýzou a hromadí se **laktát**, reakce zpětně **oxiduje NADH+H⁺** za vzniku redukovaného laktátu z **pyruvátu**

Oxidoreduktasy

Oxidoreduktasy katalyzují **redoxní přeměny** (přenos e^- , $2H$, zabudování O do substrátu). V reakci dochází k **redukci** nebo **oxidaci** substrátu za současné oxidace/redukce **kofaktoru**.

SKUPINY

- | | | |
|-----------------------|----------------------|---------------------|
| • PŘENOS ELEKTRONU | OXIDASY | cytochrom-c-oxidasa |
| • PŘENOS DVOU ATOMŮ H | DEHYDROGENASY | laktátdehydrogenasa |
| • ZABUDOVÁNÍ ATOMU O | OXIGENASY | cyklooxygenasa |

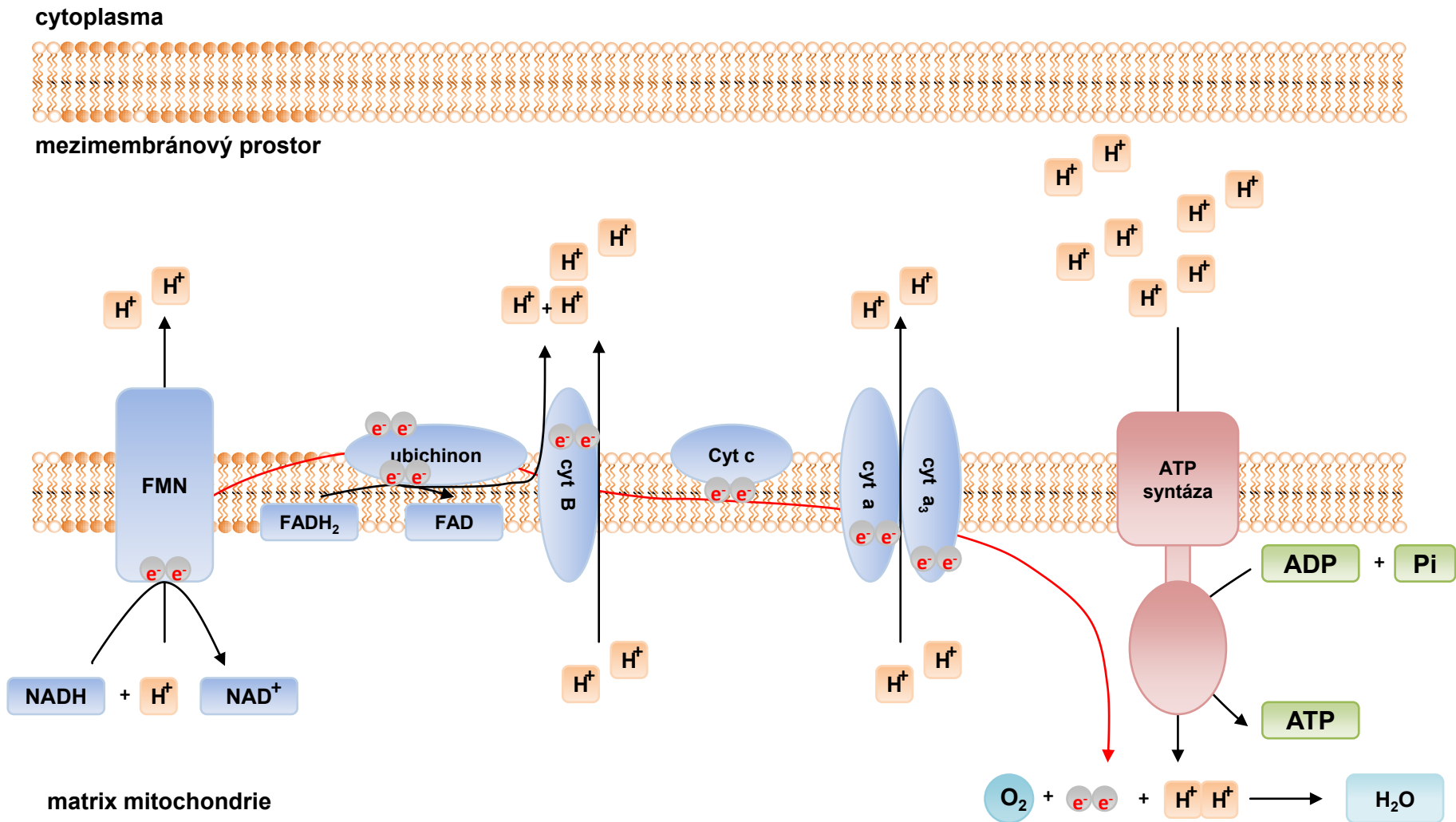
Donory $2H$ a donory $2e^-$ lze dle chemicky označit jako **redukční činidla** (redukují substrát a sami se oxidují).

Akceptory $2H$ a $2e^-$ lze dle chemicky označit jako **oxidační činidla** (oxidují substrát a sami se redukují).

Kofaktory oxidoreduktas a jejich prekursory

Vitamin	Kofaktor	Funkce
niacin (vitamin PP/B3)	NAD ⁺	akceptor 2H
niacin (vitamin PP/B3)	NADPH+H ⁺	donor 2H
riboflavin (vitamin B2)	FAD, FMN	akceptor 2H (CC, DŘ)
	tetrahydrobiopterin	donor 2H (Phe→Tyr)
	molybdopterin	přenos e ⁻ (XO)
	lipoát	akceptor 2H (Pyr→AcCoA)
	ubichinon	přenos 2e ⁻ a 2H ⁺ (CC, DŘ)
	hem cytochromů	přenos e ⁻ (CC, DŘ)
	nehemové železo/síra	přenos e ⁻ (CC, DŘ)
	glutathion	donor 2H (H ₂ O ₂ →H ₂ O)

Oxidačně redukční děje v dýchacím řetězci buněk



NAD⁺-dependentní dehydrogenasy

Metabolická dráha	Dehydrogenasa	Reakce
citrátový cyklus	isocitrátdehydrogenasa	isocitrát → 2-oxoglutarát
	2-oxoglutarátdehydrogenasa	2-oxoglutarát → sukcinyl-CoA
	malátdehydrogenasa	malát → oxalacetát
glykolýza	glyceraldehyd-3-P-dehydrogenasa	glyceraldehyd-3-P → 1,3-BPG
	laktátdehydrogenasa	laktát → pyruvát
oxidace ethanolu	alkoholdehydrogenasa	ethanol → acetaldehyd
	acetaldehyddehydrogenasa	acetaldehyd → kyselina octová

Transferasy

Transferasy katalyzují **přenos skupin** z jednoho substrátu na druhý. Tyto skupiny mohou být malé (-CH₃, -NH₂, -Glc) i velké (nukleotidy). Významnou podskupinou transferas jsou **kinasy**.

SKUPINY

- | | | |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| • PŘENOS -CH ₃ | METHYLTRANSFERASY | thiopurin-S-methyltransferasa |
| • PŘENOS -NH ₂ | AMINOTRANSFERASY | AST, ALT |
| • PŘENOS -P | KINASY | hexokinasa |
| • tvorba polymerů | POLYMERASY | DNA polymerasa |

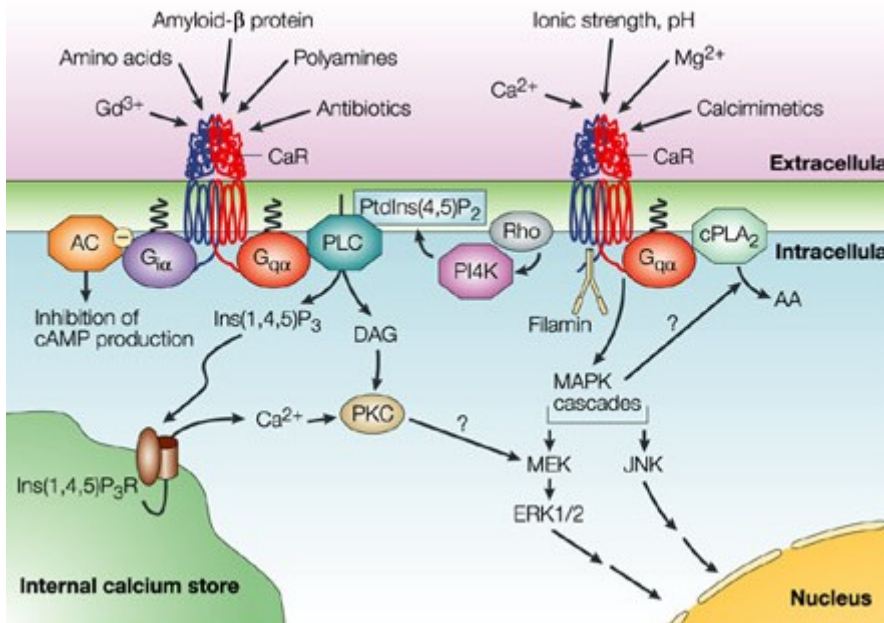
Transferasy hrají důležitou roli jak v **intermediárním metabolismu** (aminotransferasy, methyltransferasy), tak v **signálních drahách** (kinasy).

Kofaktory transferas

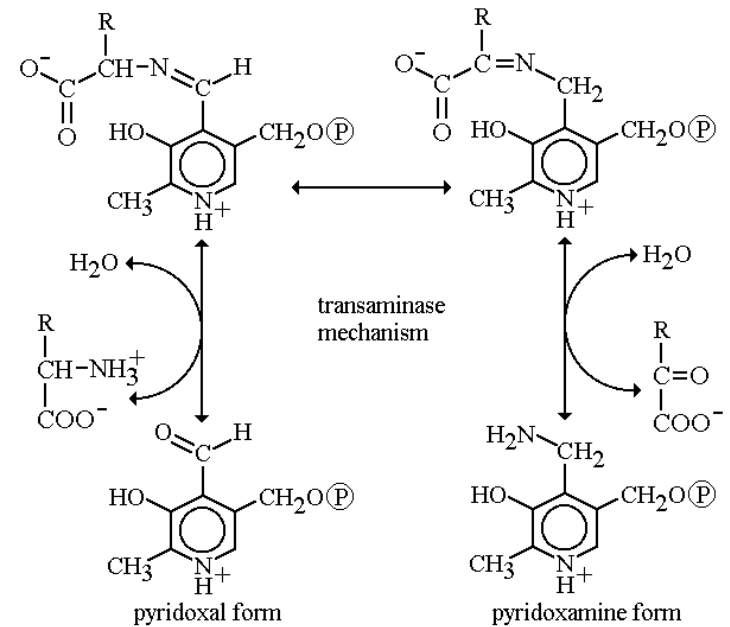
Vitamín	Kofaktor	Přenášená skupina
-----	ATP	$-\text{PO}_3^{2-}$
-----	PAPS	$-\text{SO}_3^{2-}$
listová kyselina	tetrahydrofolát (H_4F)	jednouhlíkaté skupiny
biotin	karboxybiotin	CO_2
thiamin	thiamindifosfát (TDP)	„aktivní aldehyd“
pyridoxin	pyridoxalfosfát	$-\text{NH}_2$
pantothenová kyselina	CoA-SH	acyl
-----	dihydrolipoát	acyl
[methionin]	SAM	$-\text{CH}_3$
kyanokobalamin	methylokobalamin	$-\text{CH}_3$

Transferasy

kinasové dráhy

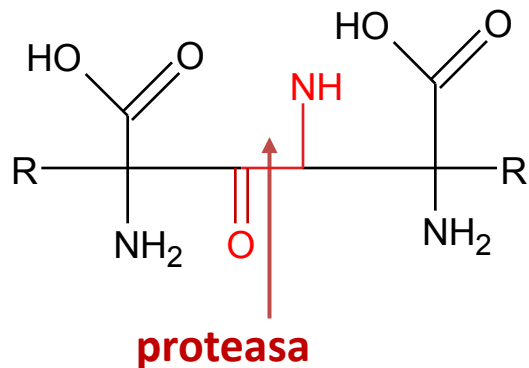


pyridoxalfosfát a transaminasy

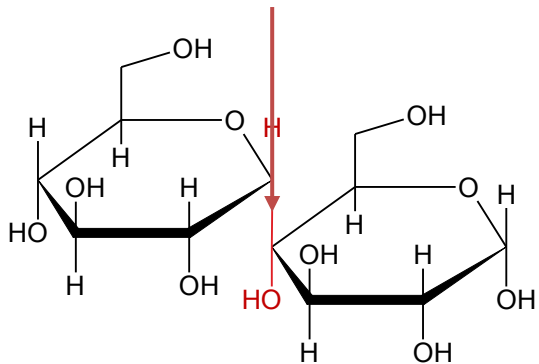


Hydrolasy

Hydrolasy štěpí vazby vzniklé **kondenzací** za pomoci molekul **vody**.



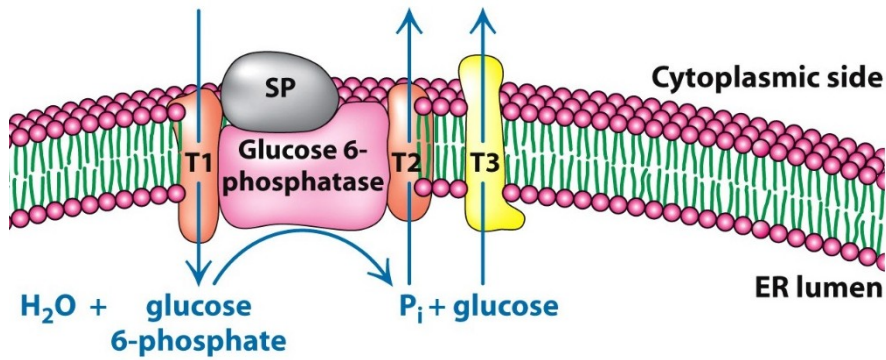
α-glukosidasa



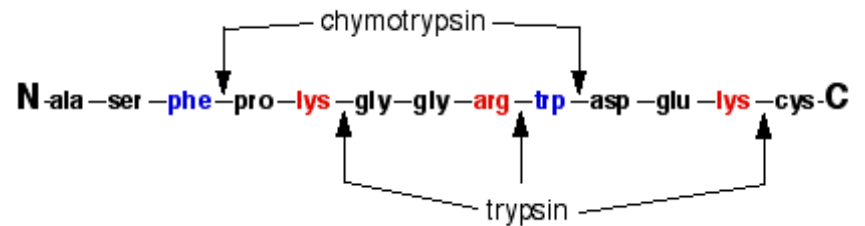
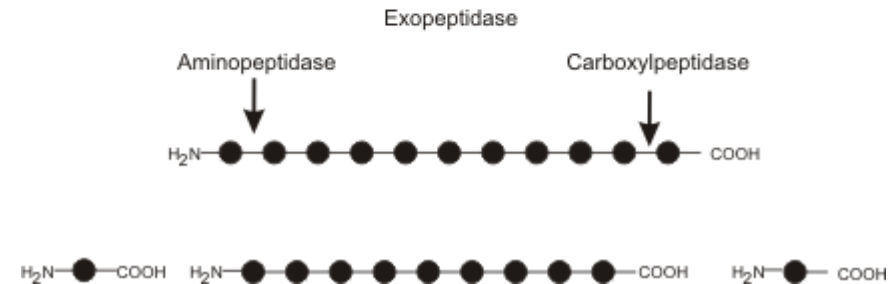
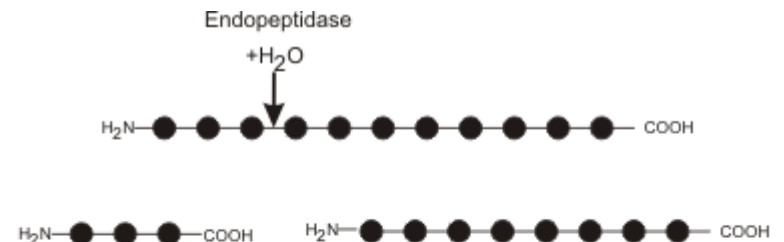
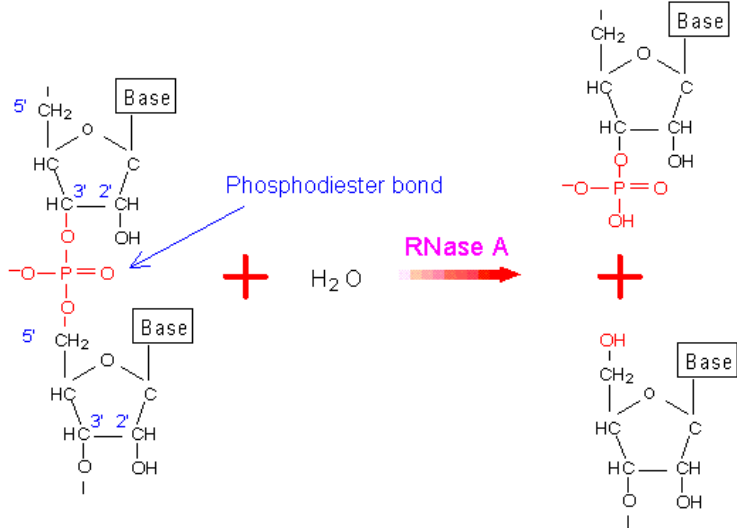
Hydrolasa	Typ štěpené vazby
glukosidasa	glykosidová
galaktosidasa	glykosidová
hyaluronidasa	glykosidová
arylsulfatasa	sulfoesterová
lysozym	glykosidová
pepsin, trypsin	peptidová
kathepsin	peptidová
kolagenasa	peptidová
elastasa	peptidová
ribonukleasa	fosfodiesterová
lipasa	esterová
fosfatasa	fosfoesterová
ceramidasa	amidová

Hydrolasy

Hydrolasy jsou jednoduché enzymy tvořené **pouze bílkovinou**. Tzn. **nemají kofaktory**.



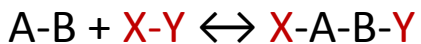
(a)



Ostatní skupiny

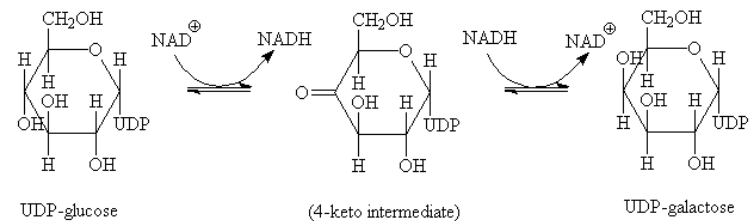
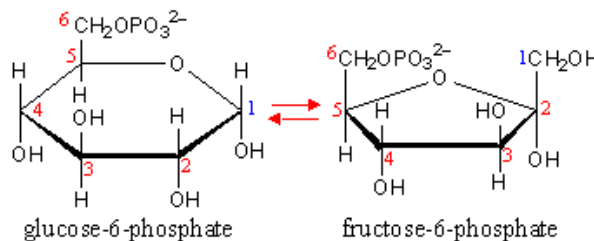
LYASY

Nehydrolytické štěpení různých typů vazeb, vytváření vazeb C-C, C-O, C-N. Ze **substrátu odštěpí** nebo do něj **vnáší malou molekulu** jako je CO_2 , H_2O a jiné. Vyskytují se například v citrátovém cyklu.



ISOMERASY

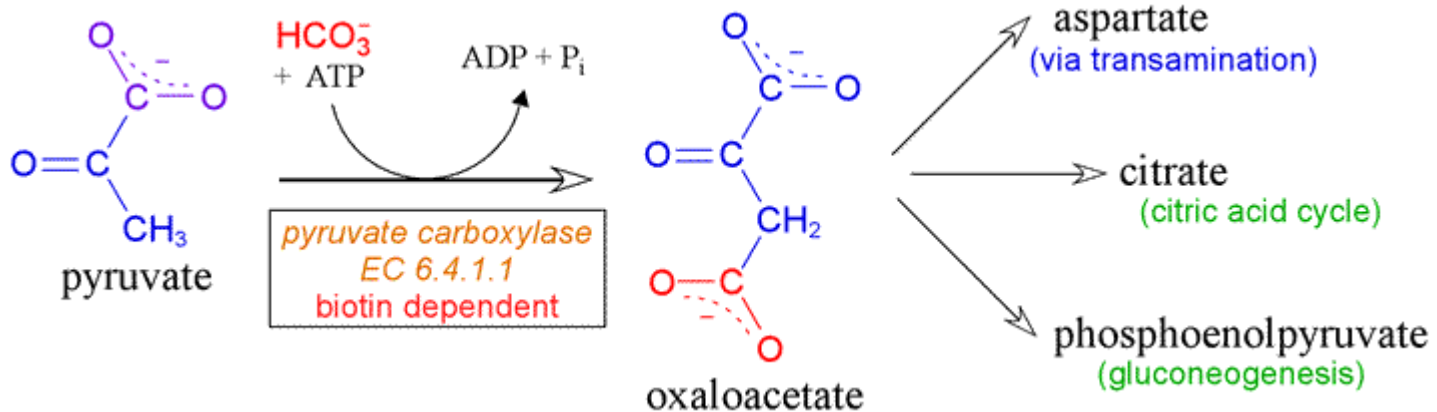
Katalyzují **intramolekulové přesmyky atomů**. Výskyt v glykolýze, přeměny sacharidů v nukleotidech.



Ostatní skupiny

LIGASY (SYNTHETASY)

Katalyzují **vznik energeticky náročných vazeb** za současného **rozkladu makroergní sloučeniny** (nejčastěji ATP). Příkladem je významná **reakce** katalyzovaná **pyruvátkarboxylasou**, která je úvodní reakcí **glukoneogeneze** a **resyntézy glukózy**.



Kofaktory této reakce jsou **biotin** a **acetyl-CoA**.

Mechanismus enzymové reakce

- **vazba na enzym** (aktivní místo enzymu)
- **vytvoření prostoru pro vazbu substrátu**
- **re. s různými počty substrátů** (jedno-, dvou-)

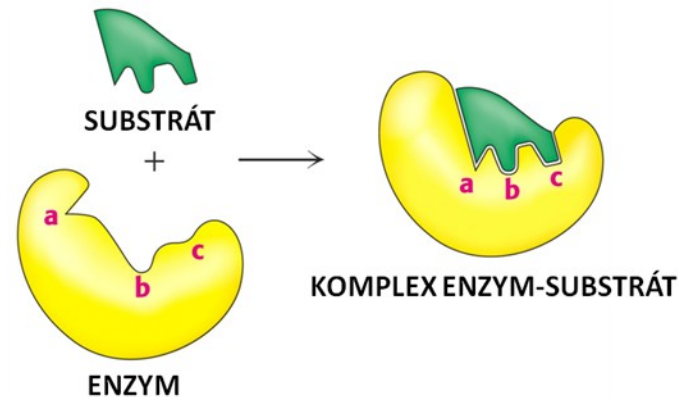
- **metaloenzymy**

Interakce enzym-substrát

Malá část molekuly enzymu, jejíž podoba je udána **trojrozměrným uspořádáním aminokyselin** (místo je formováno vlastnostmi aminokyselin – hydrofobní a hydrofilní interakce)

AKTIVNÍ MÍSTO

- povrchová prohlubeň
- hluboká štěrbina



VAZBA

- substrát vyvolá malou **konformační změnu** při přiblížení
- vytvoří se **komplex enzym substrát**

Reakce dle počtu substrátů

JEDNOSUBSTRÁTOVÉ REAKCE

- substrát se naváže na enzym, změní se na produkt a odpojí se z enzymu



DVOUSUBSTRÁTOVÉ REAKCE

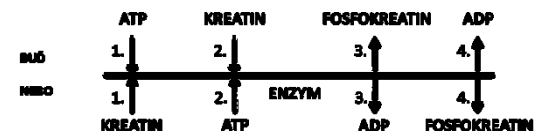
- druhým substrátem reakce je často kofaktor



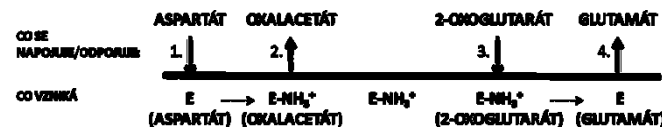
- sekvenční uspořádané reakce



- sekvenční nahodilé reakce



- „ping pong“ reakce

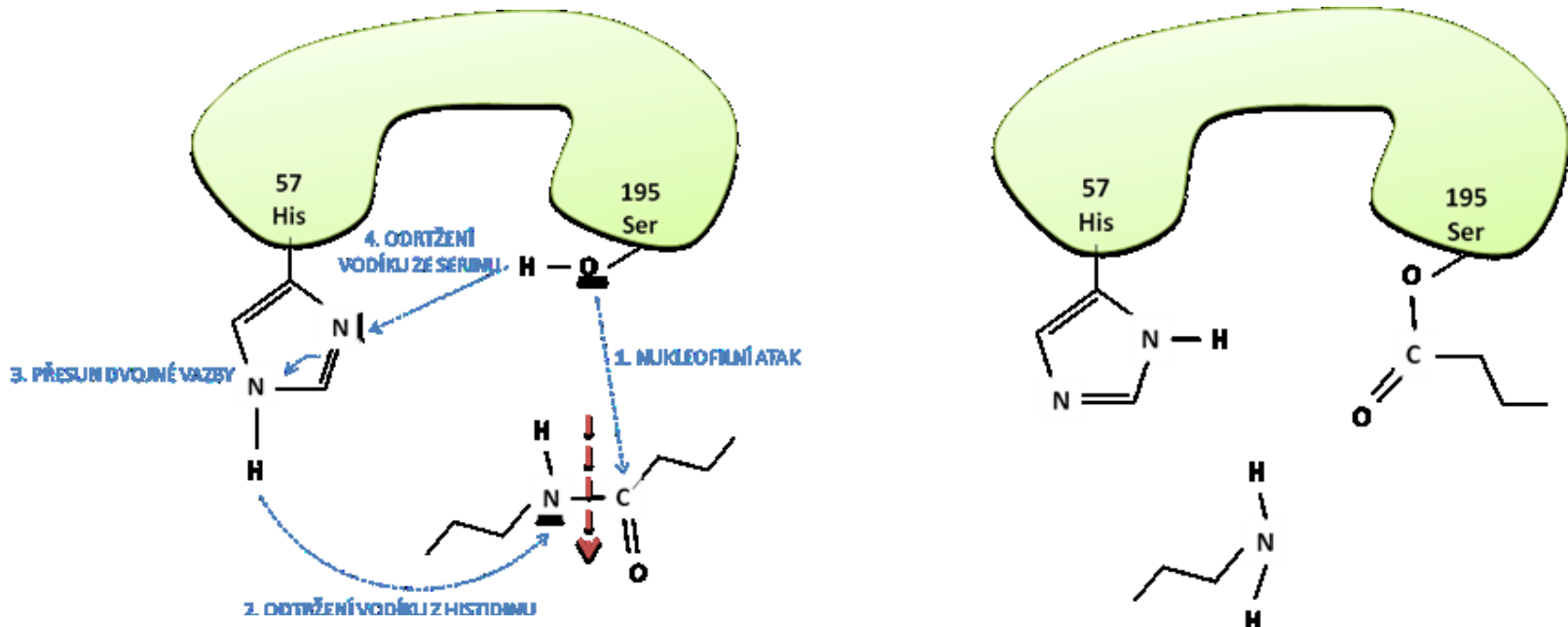


Aktivní místo enzymu

KATALYTICKÉ SKUPINY AKTIVNÍHO MÍSTA

Chemickou přeměnu katalyzují katalytické skupiny aminokyselin v aktivním místě. Mohou být **nuklofilní** (cystein, serin), **kyselé** (asp, glu), **bazické** (his, arg, lys).

Příklad: Reakce katalyzovaná chymotrypsinem.



Metaloenzymy

OPAKOVÁNÍ – ROZDĚLENÍ PRVKŮ

BIOGENNÍ

Makrobiogenní: H, C, O, N, P, S, Na, K, Mg, Ca, Cl

Mikrobiogenní: Zn, Mn, Cu, Mo, Co, I

STOPOVÉ

Stopové prvky: F, B, Br, Se, As, Ci, Al, Li, Ti, V, Ni, Au

Makrobiogenní prvky jsou **základními stavebními kameny** živé hmoty (prvky) a podílejí se nejvýznamněji na **homeostáze** (ionty). **Mikrobiogenní prvky** a **stopové prvky** podmiňují zejména **funkci biokatalyzátorů**.

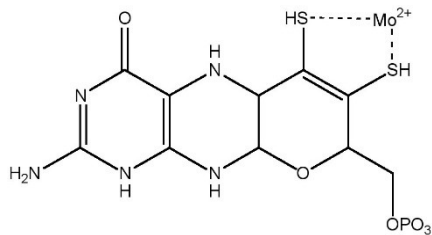
Metaloenzymy

MOLYBDEN

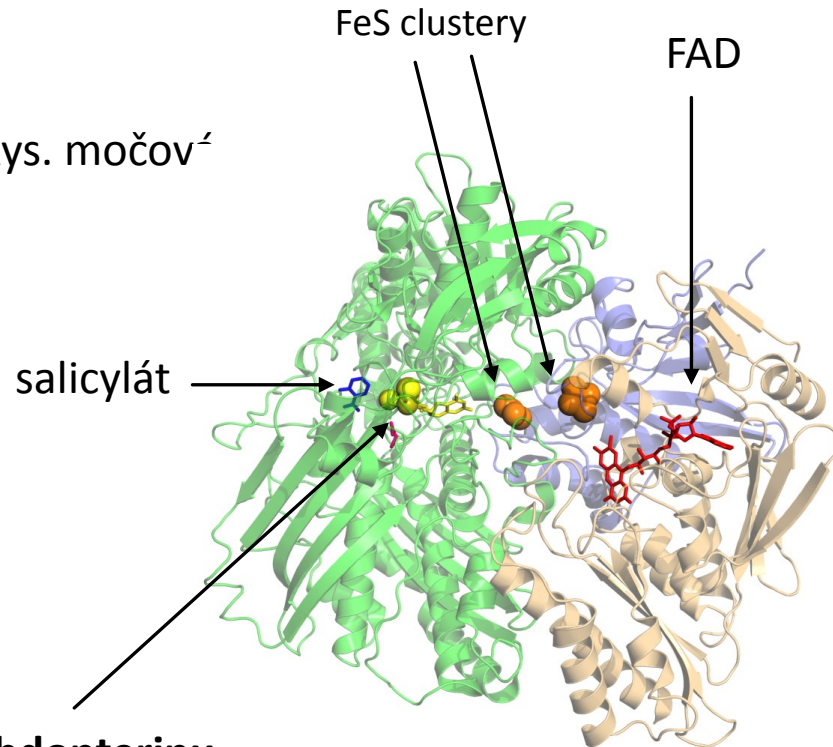
Součástí některých **oxidoreduktas**. Např.: xanthin oxidasa, aldehydoxidasa.

xanthin oxidasa (E.C. 1.17.3.2)

Puriny → hypoxanthin → xanthin → kys. močův^á



molybden jako součást molybdopterinu



Metaloenzymy

ZINEK

alkoholdehydrogenasa, karbonátdehydrogenasa, karboxypeptidáza, superoxiddismutasa

MĚĎ

ceruloplazmin (ferroxidasa, $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), cytochrom-c-oxidasa, monoaminoxidasy (MAO)

MANGAN

hydroxylasy, dekarboxylasy, transferasy

ŽELEZO

cytochromy

Popis enzymatické reakce

Kinetika enzymové reakce

- kinetika se zabývá průběhem enzymatické reakce
- veličinou je rychlost chemické reakce

RYCHLOST ENZYMATICKÉ REAKCE

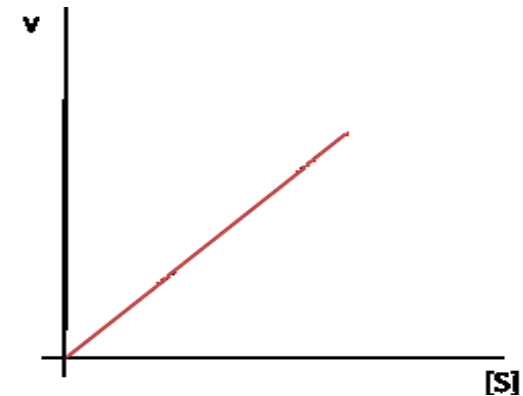
- úbytek koncentrace substrátu [S] v čase (t)
- příbytek koncentrace produktu [P] v čase (t)

Kinetika enzymové reakce

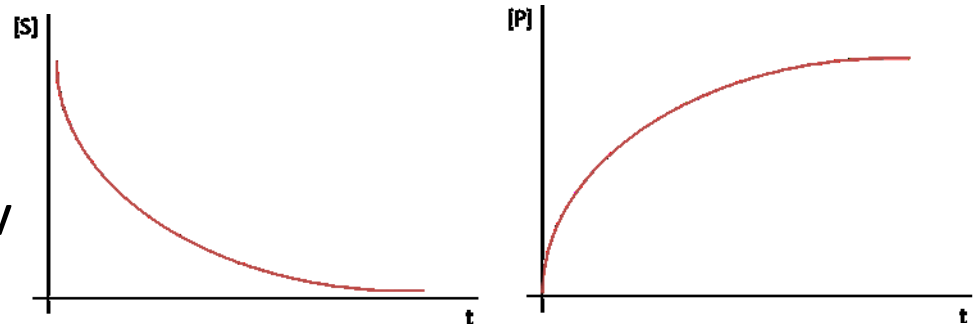
- závislost rychlosti reakce (v) na koncentraci substrátu $[S]$ lze navíc vyjádřit **kinetickou rovnicí** (k =konstanta)
- index „na první“ udává řád reakce, tzn. jak je **rychlost reakce (v)** závislá na **koncentraci substrátu $[S]$**
- pokud **index=1**, pak **v** přímo úměrně stoupá s **$[S]$**
- Pokud **index=0**, pak **v =konst.** protože je nezávislá na **$[S]$**

Kinetika enzymové reakce

- z toho vyplývá, že pokud máme kinetickou rovnici $v = k \cdot [S]^1$, tzn. $v = k \cdot [S]$, bude graf závislosti vypadat takto:



- pokud necháme reakci běžet **bez přidavku substrátu/odebrání produktu**, dostáváme tyto závislostní grafy s tzv **kinetickými křivkami**:



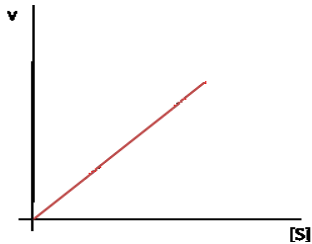
Kinetika enzymové reakce

[E] enzym
(koncentrace)

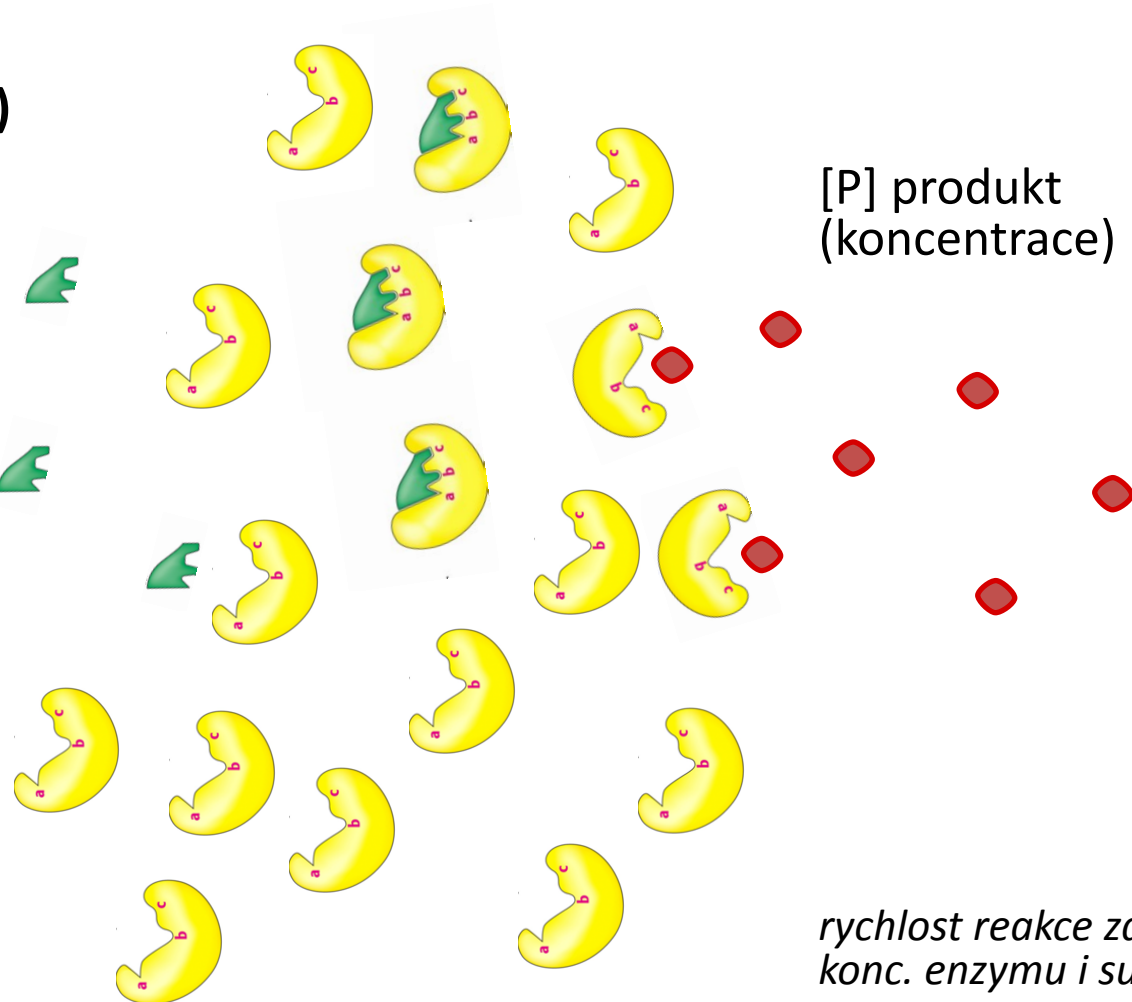
kinetika I. řádu

[S] substrát
(koncentrace)

[P] produkt
(koncentrace)



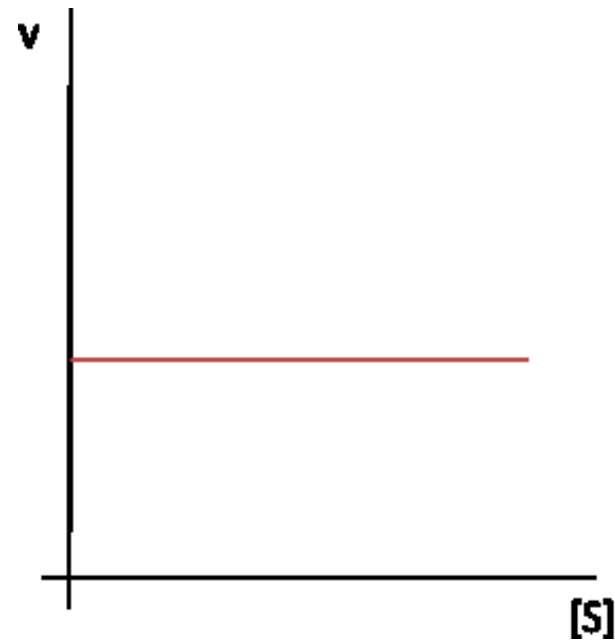
čím více substrátu, tím vyšší rychlost reakce (nárůst konc. produktu)



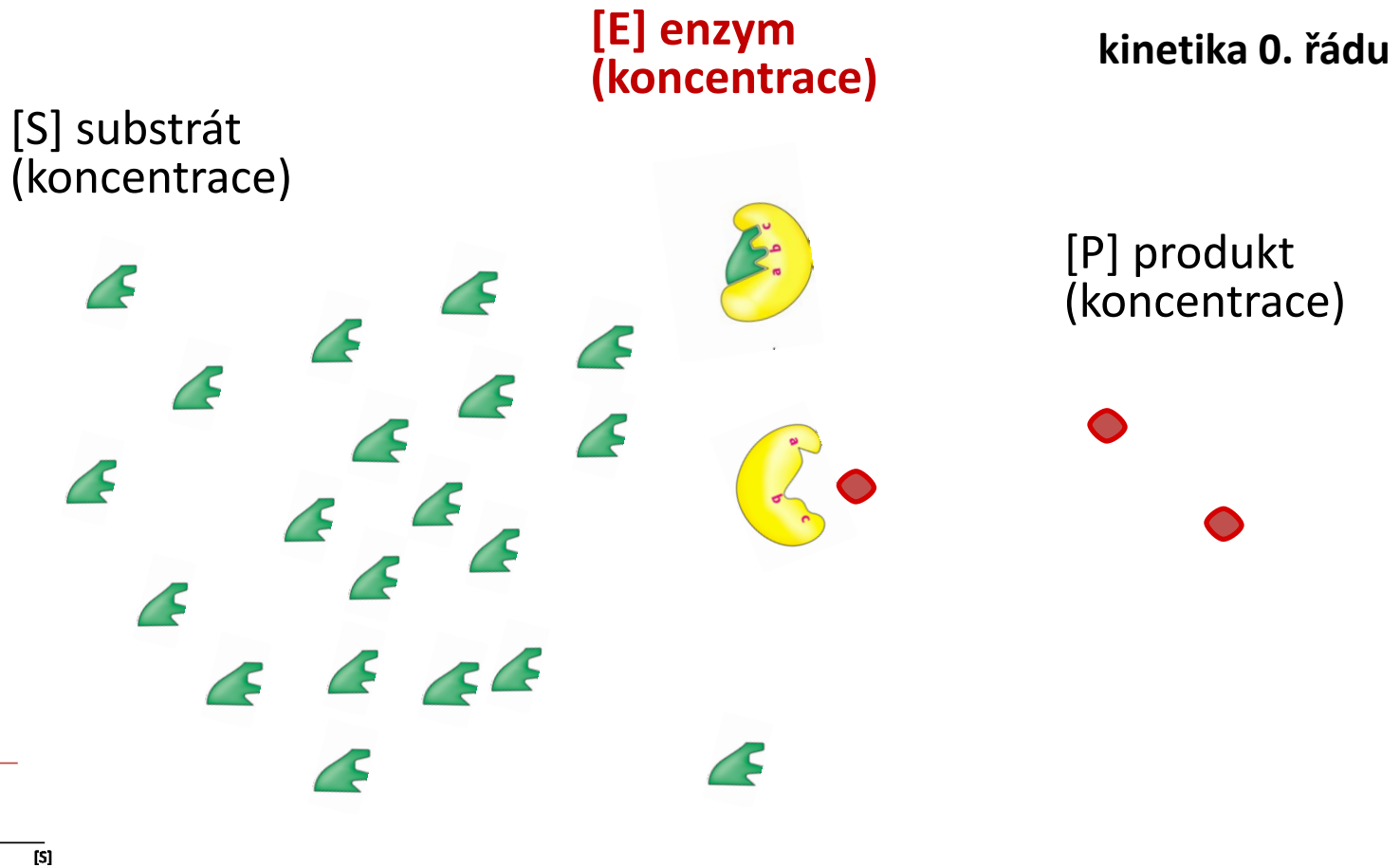
rychlost reakce závislá na konc. enzymu i substrátu

Kinetika enzymové reakce

- při **velkém nadbytku substrátu**, kdy není jeho úbytek rozhodující vypadá kinetická rovnice takto $v = k \cdot [S]^0$, tzn. $v = k$
- rychlost nárůstu produktu **není limitovaná přísunem substrátu**, ale např. **koncentrací enzymu**, čehož lze laboratorně využít k **analýze enzymů**



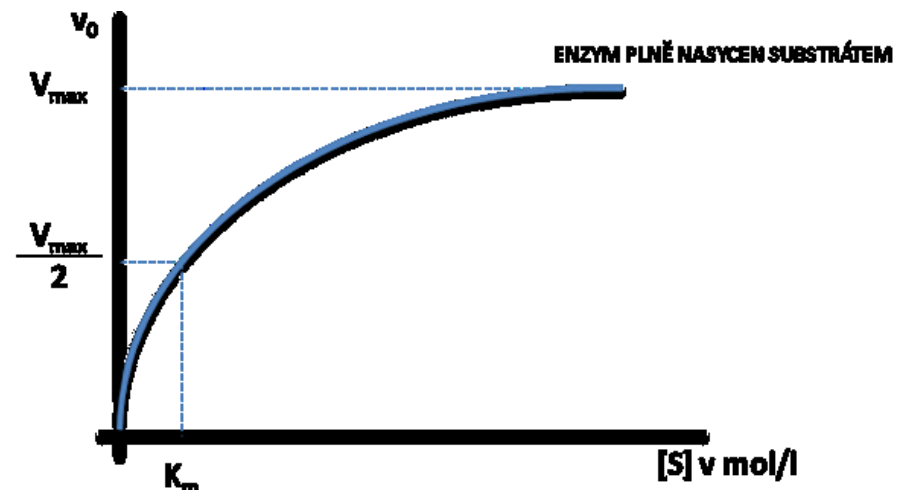
Kinetika enzymové reakce



množství substrátu je pro rychlost reakce irelevantní, je limitována jen množstvím enzymu

Počáteční rychlost v_0

- rychlost změřená **na začátku reakce**, je **nejvyšší hodnota rychlosti reakce** (není ovlivněna úbytkem [S] jeho vratnou přeměnou [P])
- je však **závislá na vstupní koncentraci [S]** dle rovnice Michaelise a Mentenové (**saturační křivka**)



↑
maximální rychlost při dané [E] ↙
koncentrace [S] při které běží reakce **polovinou** V_{max}

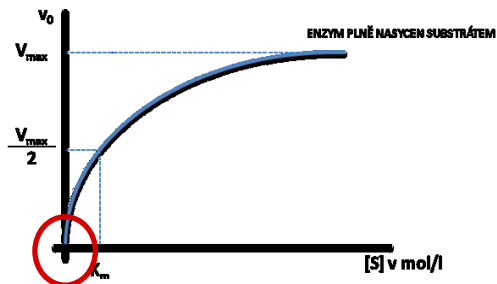
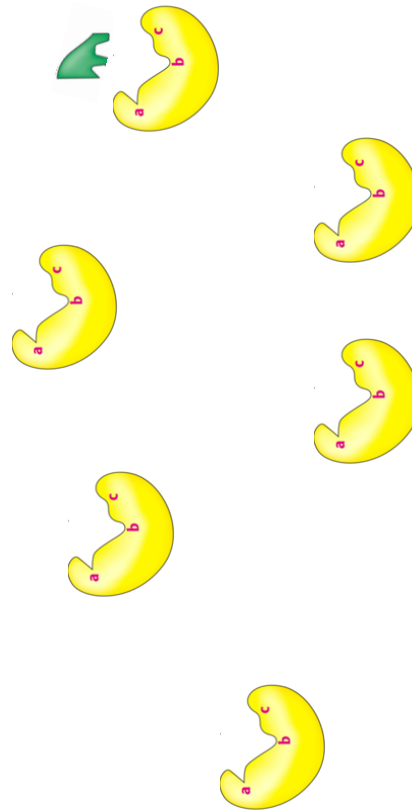
Kinetika enzymové reakce

- stav na začátku reakce (v_0)

[S] substrát (koncentrace)

[E] enzym (koncentrace)

[P] produkt (koncentrace)



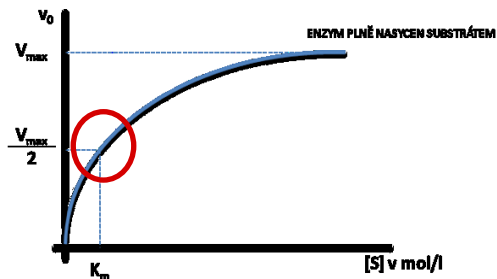
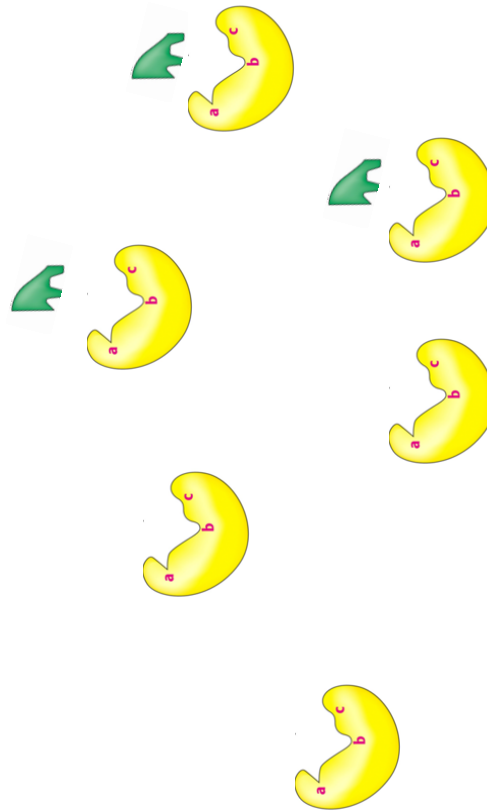
Kinetika enzymové reakce

- stav na začátku reakce – polovina max. rychlosti (K_m)

[S] substrát (koncentrace)

[E] enzym (koncentrace)

[P] produkt (koncentrace)



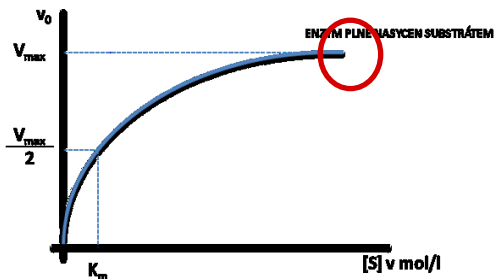
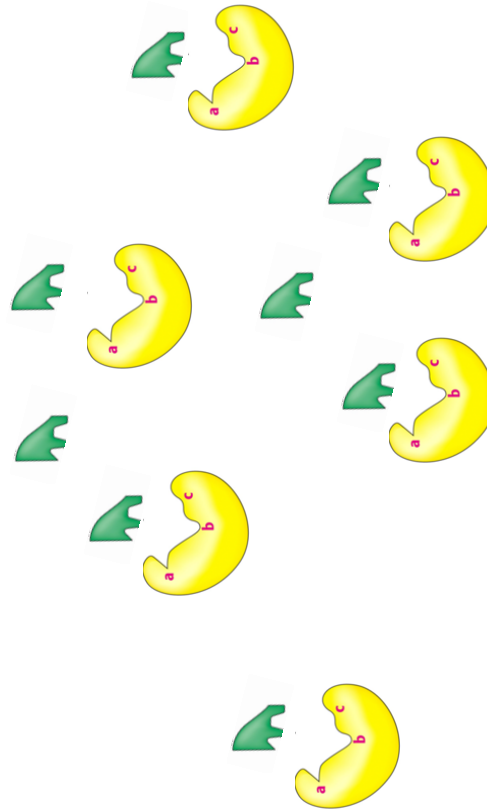
Kinetika enzymové reakce

- stav na začátku reakce – polovina max. rychlosti (K_m)

[S] substrát (koncentrace)

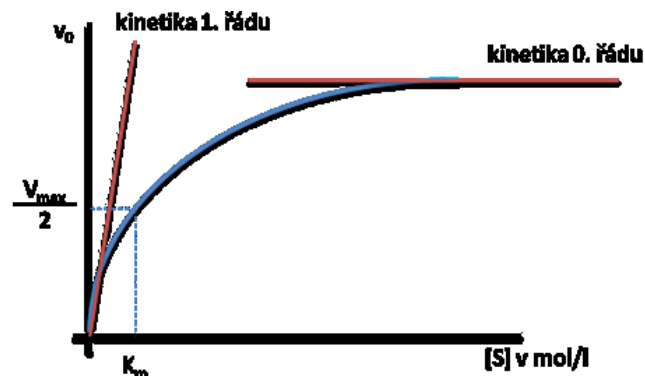
[E] enzym (koncentrace)

[P] produkt (koncentrace)



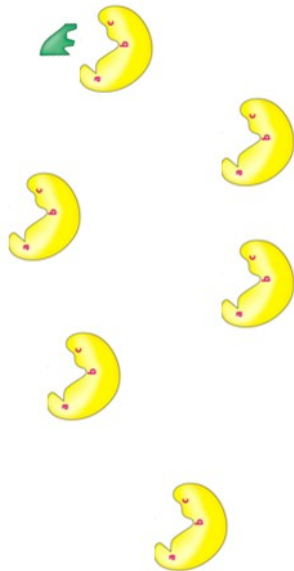
Co lze zjistit z rovnice MM?

- máme-li reakční směs s koncentrací **[S] mnohem menší**, než je **M. konstanta K_m** , pak reakce probíhá **kinetikou 1. řádu**
- máme-li reakční směs s koncentrací **[S] mnohem větší**, než je **M. konstanta K_m** , pak reakce probíhá **kinetikou 0. řádu**



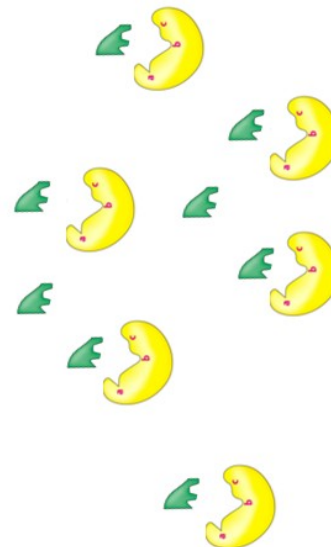
Co lze zjistit z rovnice MM?

[E] enzym (koncentrace)

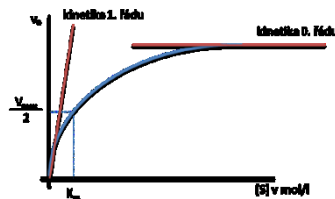


máme-li reakční směs s koncentrací **[S] mnohem menší**, než je **M**. konstanta K_m , pak reakce probíhá **kinetikou 1. řádu**

[E] enzym (koncentrace)



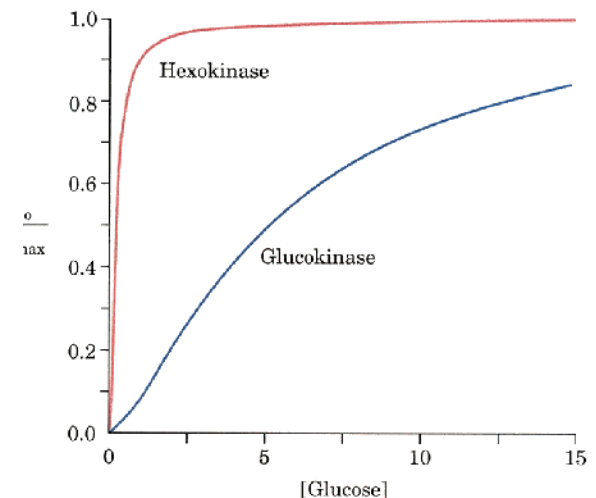
máme-li reakční směs s koncentrací **[S] mnohem větší**, než je **M**. konstanta K_m , pak reakce probíhá **kinetikou 0. řádu**



Michaelisova konstanta a afinita enzymu

- **Michaelisova konstanta K_m** je hodnota koncentrace **konkrétního substrátu [S]** při níž reakce katalyzovaná **konkrétním enzymem** běží $\frac{1}{2}$ rychlosti v_{max}
- **různé substráty** mohou mít (při stejné koncentraci) **s jedním enzymem** různou hodnotu K_m
- stejně tak **jeden substrát** může mít (při stejné koncentraci) **s mnoha enzymy** různou hodnotu K_m

Příkladem je utilizace glukózy v organismu: Při nízké koncentraci je aktivována primárně **hexokinasa** ($\downarrow K_m$ pro glukosu). Při vyšších koncentracích již její aktivita neroste, ale aktivuje se nízkoafinitní **glukokinasa** ($\uparrow K_m$ pro glukosu).

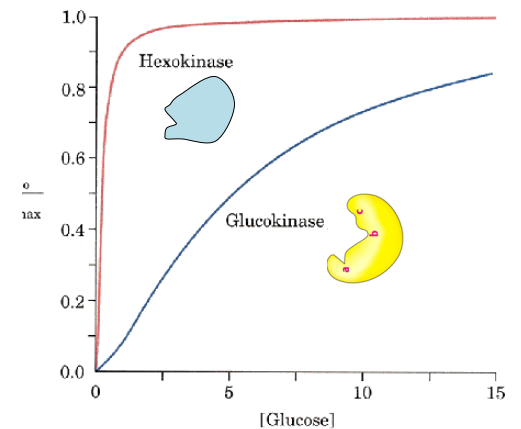
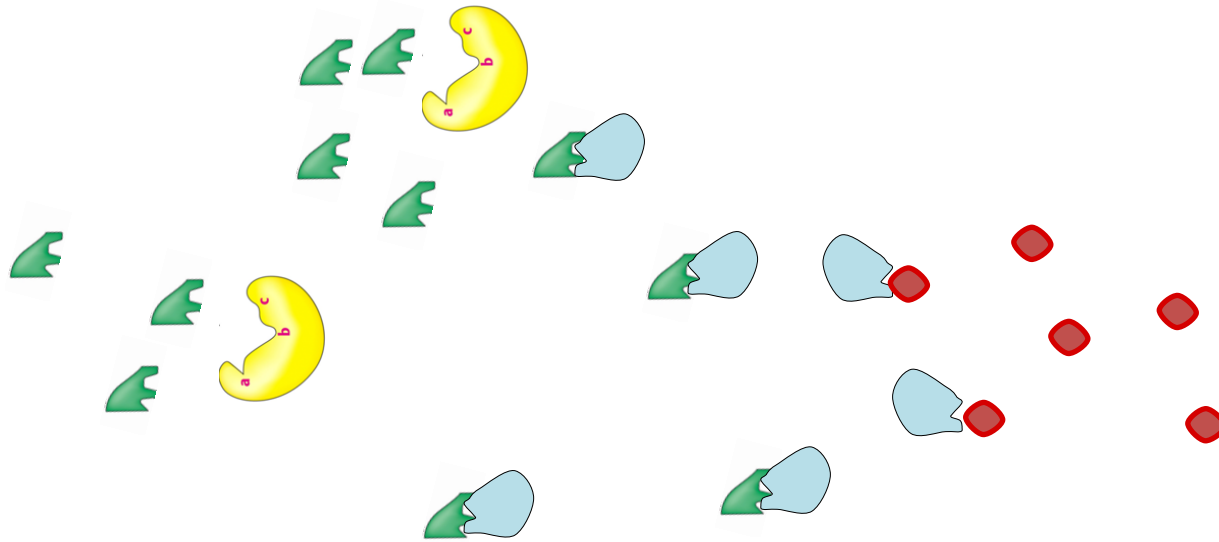


Afinita enzymu (v_0)

[S] substrát (koncentrace)

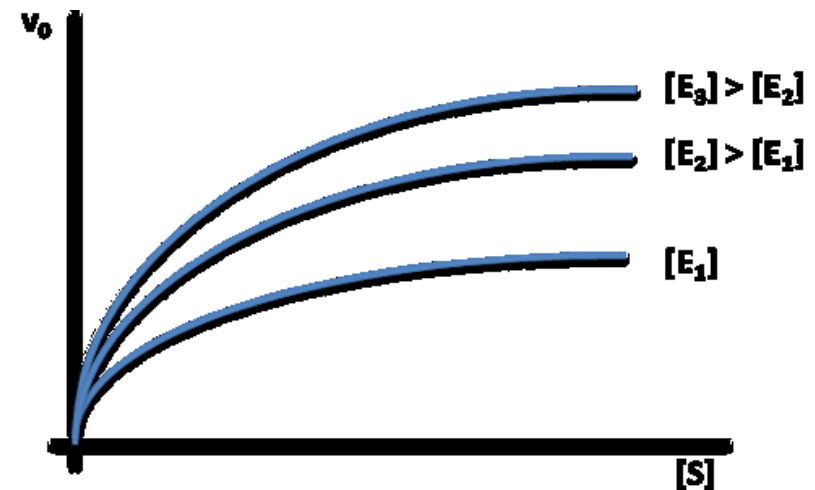
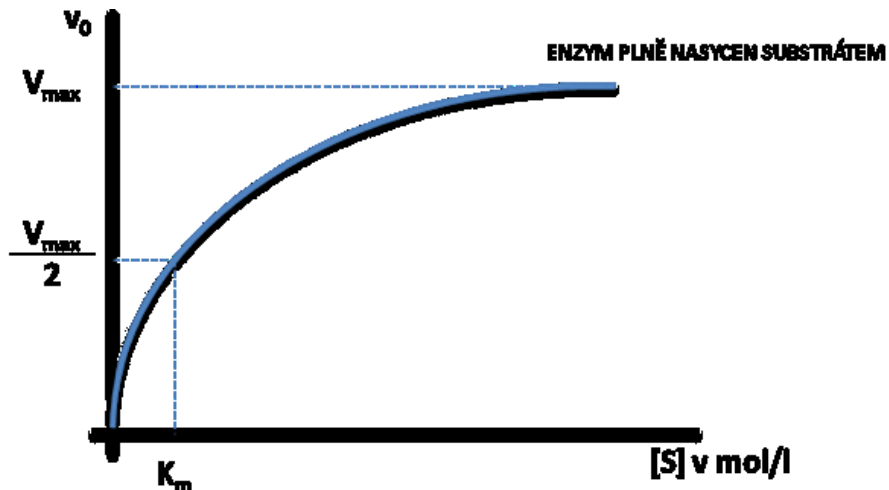
[E] enzym (koncentrace)

[P] produkt (koncentrace)



Kinetika reakce z pohledu konc. [E]

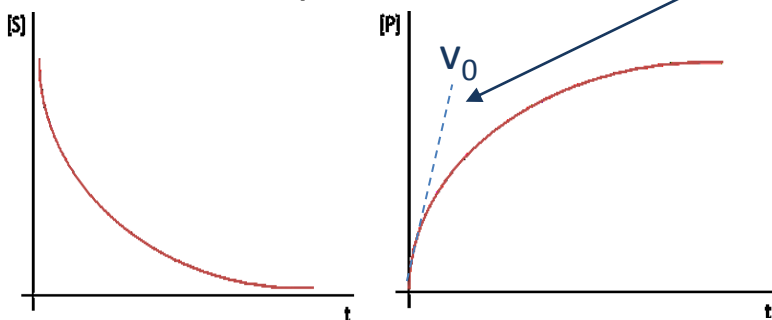
- průběh reakce ovlivňuje i **koncentrace enzymu [E]**
- **počáteční rychlost reakce v_0** je přímo úměrná **koncentraci enzymu [E]**
- Michaelisova k. K_m se s **koncentrací enzymu [E]** nemění
- čím **nižší je [E]** tím **nižší rychlostí v_{max}** může reakce běžet



Rozdíl mezi kinetickou a saturační křivkou

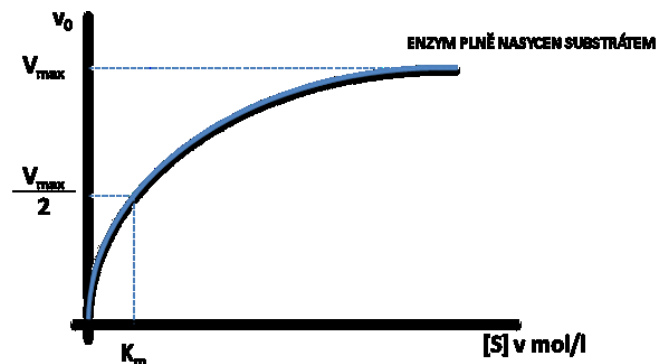
KINETICKÁ KŘIVKA

- je vlastně **časový záznam** **jedné konkrétní enzymatické reakce**, kdy v **různých časech** měříme **koncentraci** substrátu nebo produktu ve formě odezvy (absorbance, fluorescence, turbidita...)



SATURAČNÍ KŘIVKA

- saturační křivku lze získat naopak z **mnoha stejných reakcí** s konstantní koncentrací enzymu s **různými koncentracemi substrátu**, kde v_0 bude počáteční směrnici v grafu



Shrnutí důležitých faktů

- pro hodnocení průběhu enzymatické reakce jsou důležité koncentrace základních komponent **[E]**, **[S]**, **[P]**
- **rychlost reakce** je **přírůstek** koncentrace (mol/l) **[P]** nebo **úbytek [S]** v **čase t (s)** (výsledná jednotka: mol/l.s) a tuto závislost charakterizuje **kinetická křivka**
- závislost **počáteční rychlosti** reakce v_0 (včetně maximální rychlosti v_{\max} rce.) na koncentraci substrátu určuje **saturační křivka**, která vychází z **rovnice Michaelise a Mentenové**
- **konstanta K_m** má vztah k **afinitě** mezi **enzymy** a **substráty**, a to **nepřímo úměrně**
- kinetika **1. řádu** znamená, že rychlost reakce je **přímo úměrná koncentraci substrátu [S]**
- kinetika **0. řádu** znamená, že rychlost reakce je **nezávislá na koncentraci substrátu [S]**

Regulace enzymové aktivity

- regulace **množství molekul enzymu**
exprese genů, transkripce, translace
- regulace **biologické aktivity enzymu**
izoenzymy
aktivace enzymů (např. pepsinogen->pepsin,
fibrinogen->fibrin, angiotensinogen->angiotensin)
kovalentní modifikace (kinasy)
allosterie – enzym má kromě aktivního místa **další místo pro vazbu**
„alosterického modifikátoru“ (inhibitor/aktivátor), ten po navázání **změní**
kvarterní strukturu a aktivita je **inhibována/aktivována**
- dostupnost a koncentrace **substrátu a/nebo kofaktoru, teplota, pH**

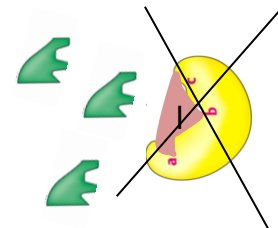
Inhibitory enzymů

- látky, snižující aktivitu enzymů

INHIBICE IREVERZIBILNÍ (NEVRATNÁ)

Trvalé poškození enzymu, který již **není schopen plně vykonávat** svou funkci. **Inhibitor se pevně váže** do aktivního místa **kovalentní vazbou** a tím zabrání navázání substrátu.

PŘÍKLADY: **organofosfáty**, kyanidy, těžké kovy



Inhibitory enzymů

INHIBICE REVERZIBILNÍ (VRATNÁ)

Vazba inhibitoru není kovalentní (trvalá). Může se vázat do aktivního místa nebo mimo něj.

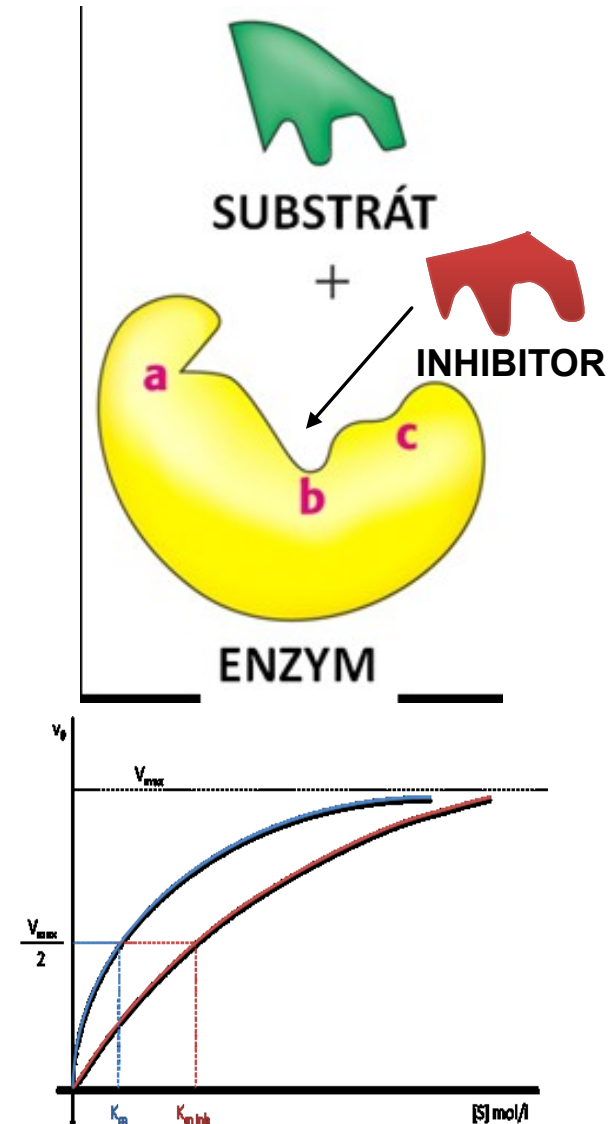
I) INHIBICE KOMPETITIVNÍ

Inhibitor se váže na enzym **v aktivním místě**, o které **soutěží** se substrátem.

V přítomnosti **kompetitivního** inhibitoru

roste K_m substátu pro enzym.

V_{max} zůstane stejná (ale s vyšší [S])



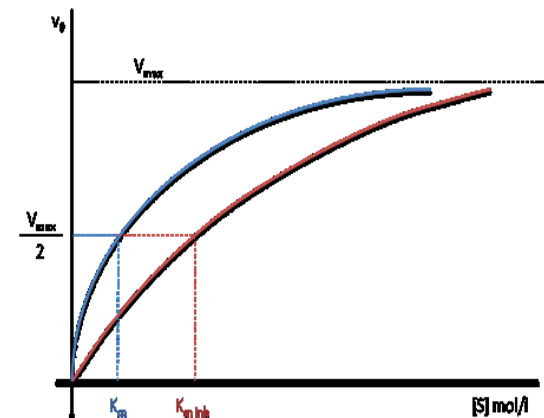
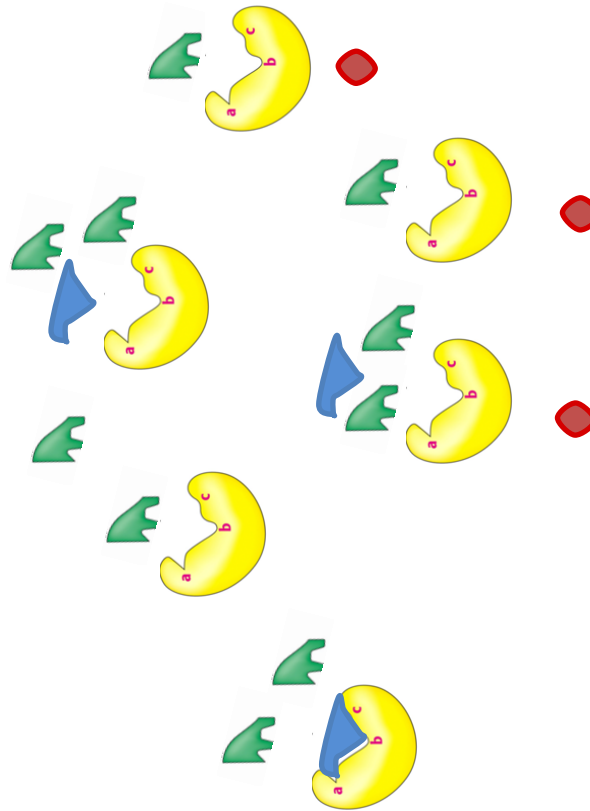
Kompetitivní inhibice

- roste hodnota (K_m), substrát koncentrací může „přebít“ inhibitor

[S] substrát (koncentrace)

[E] enzym (koncentrace)

[P] produkt (koncentrace)



Inhibitory enzymů

INHIBICE REVERZIBILNÍ (VRATNÁ)

Vazba inhibitoru není kovalentní (trvalá). Může se vázat do aktivního místa nebo mimo něj.

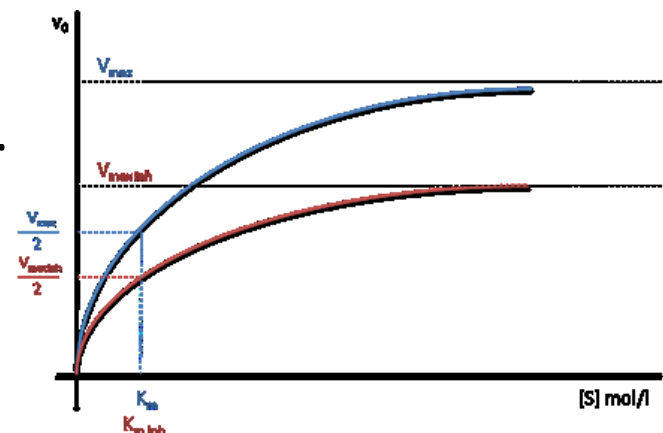
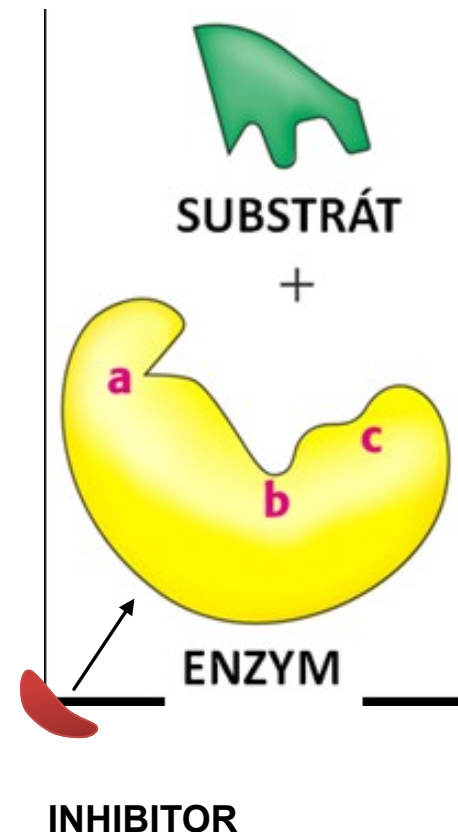
II) INHIBICE NEKOMPETITIVNÍ

Inhibitor se váže mimo **aktivní místo enzymu**.
Váže se rovnoměrně na **samotný enzym** a na **komplex enzym-substrát**.

V přítomnosti **nekompitivního** inhibitoru probíhá reakce tak, jakoby enzymu bylo méně.

K_m substrátu pro enzym zůstává stejná.

V_{max} se snižuje (ale s vyšší [S])



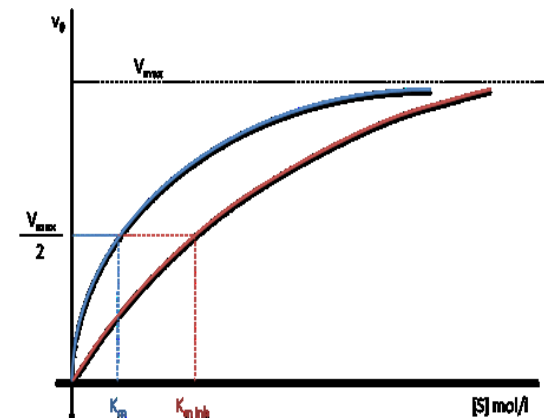
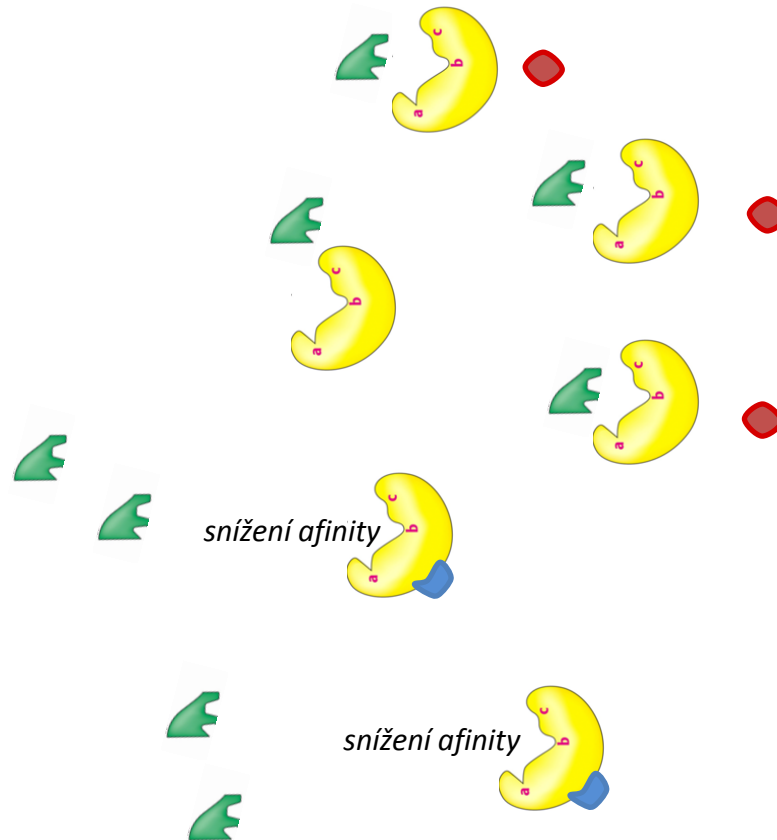
Nekompetitivní inhibice

- stejná hodnota (K_m), snížení koncentrace aktivního enzymu snižuje

[S] substrát (koncentrace)

V_{max}
[E] enzym (koncentrace)

[P] produkt (koncentrace)



Inhibitory enzymů v lékařství

LÉČIVA

aspirin, ibuprofen (neselektivní inhibitory cyklooxygenasy)

nimesulid (Aulin, selektivní inhibitor cyklooxygenasy II)

statiny (Lescol, inhibitor HMG-CoA-reduktasy)

antibiotika

penicilin (inhibice transpeptidasy – syntéza buň. Stěny)

tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol (proteosyntéza bakterií)

fluorované chinolony (bakteriální gyrasy)

Enzymy v diagnostice

Jak zjistíme množství enzymu v biologickém materiálu a jak lze diagnosticky enzymy využít.

Jak enzymy stanovujeme?

- stanovení se může jevit obtížné kvůli velmi nízkým koncentracím enzymů
- jedná se o bílkoviny, kterých je v biologickém materiálu velké množství
- běžnými chemickými způsoby je neodlišíme, není zde dostatečná specifita

Kvantitativní analýza zahrnuje v zásadě dvě hlavní možnosti

katalytická koncentrace ($\mu\text{kat/l}$)

- stanovujeme **produkt** enzymatické reakce
- takto se stanovuje většina klinicky významných enzymů
- jednotka je podle **kinetické křivky** mol/l.s , kde $\text{mol/s}=\text{kat}$

hmotnostní koncentrace ($\mu\text{g/l}$)

- stanovujeme **enzym** jako **bílkovinu**
- imunochemická analýza
- podstatně méně používaná
- zejména má využití u **tumorových markerů (PSA, NSE...)**

Jednotky při stanovení katalytické koncentrace

katalytická aktivita enzymu

- jednotkou je mol/s tedy **katal**
- jeden **katal** odpovídá **aktivitě enzymu**, při které se v reakci přemění **jeden mol substrátu na produkt za jednu sekundu**
- **mezinárodní jednotka (IU)** odpovídá **1 $\mu\text{mol}/\text{min}$**
- **1 IU = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ = 1/60 $\mu\text{mol}/\text{s}$ = 1/60 μkat = 0,0166 μkat = 16,6 nkat**

katalytická koncentrace enzymu

- je aktivita vztažená na **objem biologické tekutiny**
- jednotky: **$\mu\text{kat}/\text{l}$, nkat/l**

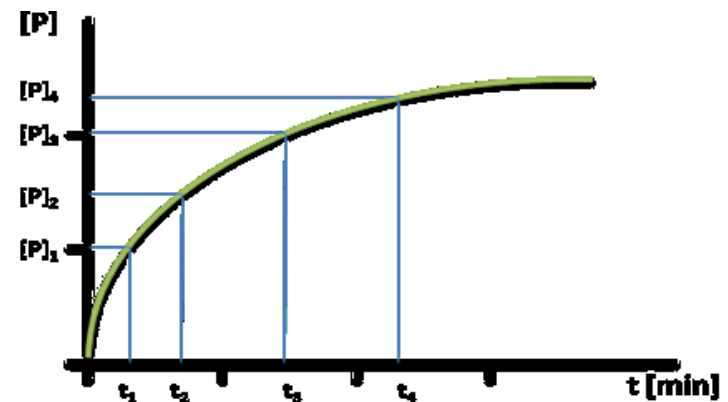
Jak postupujeme při stanovení enzymu?

- zajistíme optimální podmínky reakce: **teplota, pH, dostatek kofaktoru**
- měří se $\Delta[S]$ nebo $\Delta[P]$ v určitém časovém intervalu a to nejlépe průběžně nebo alespoň v určitých časových úsecích
- stanovujeme enzym tudíž reakci nesmí limitovat **nedostatečná koncentrace substrátu**, proto by se měla pohybovat řádově ve **stonásobku K_m**
- tímto zajistíme konstantní rychlost po celou dobu reakce

Jak postupujeme při stanovení enzymu?

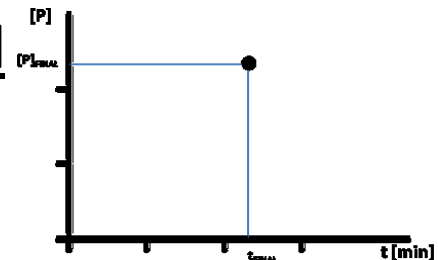
KINETICKÁ METODA STANOVENÍ

- používá se u reakcí, kde lze **průběžně měřit [S] nebo [P]** např. po deseti sekundách
- sestrojíme kinetickou křivku
- touto metodou získáme v_0 (kat)



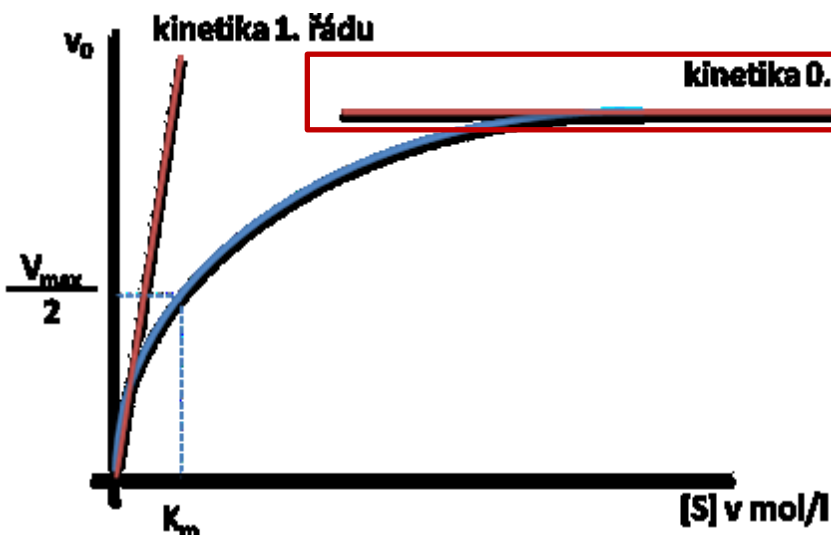
METODA KONSTANTNÍHO ČASU (dvoubodová)

- alternativa, pokud **nejsme schopni průběžně měřit [S] či [P]**
- změříme [P], **start, stop**, změříme [P] = rozdíl
- získáme pouze **průměrnou rychlost v** (kat)



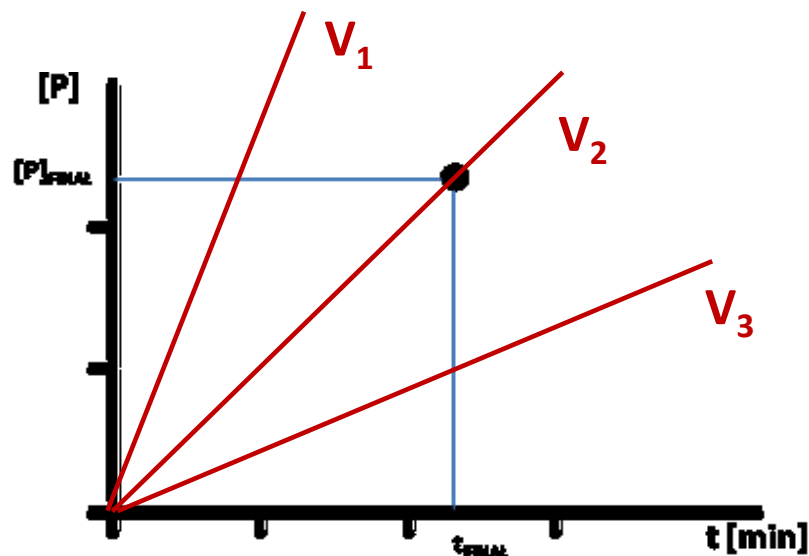
Stanovení enzymů v praxi

Pokud je $K_m \ll [S]$, pak:



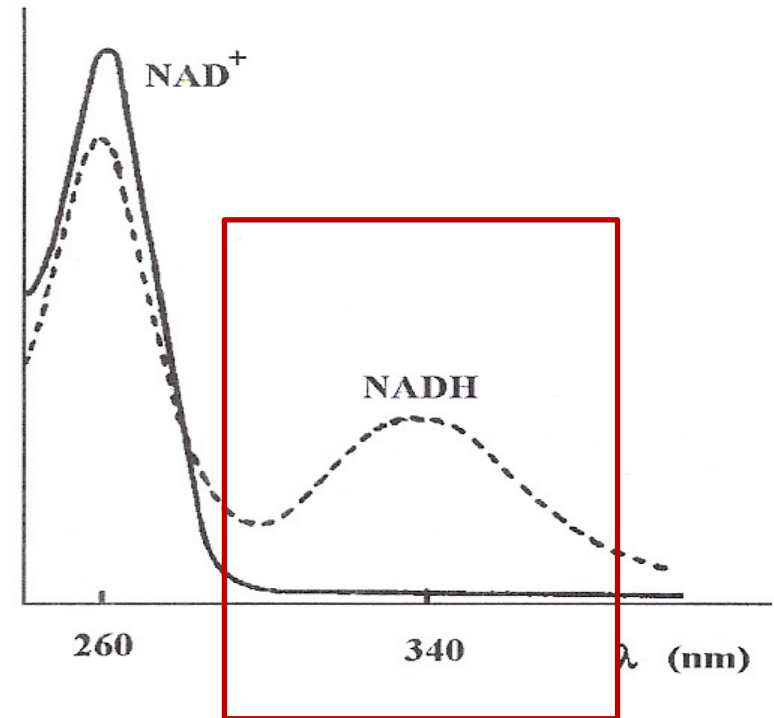
...a z toho vyplývá, že **přírůstek koncentrace produktu (reakční rychlost) v reakci bude závislý jen na koncentraci enzymu, a to přímo úměrně**

$$V_1 > V_2 > V_3 \quad [E]_1 > [E]_2 > [E]_3$$



Warburgův optický UV test

- test, využitelný ke stanovení aktivity **NAD(P)-dependentních dehydrogenas** nebo **spřažených reakcí** (reakcí se účastní NAD^+ nebo NADP^+)
- test vychází z předpokladu přeměny $\text{NAD(P)}^+ \rightarrow \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$
- při vlnové délce **340 nm** mají NAD(P)H a NAD(P)^+ **různou absorbtivitu**, takže spolu **neinterferují**
- při enzymatické reakci tedy měříme **úbytek/nárůst NAD(P)H**

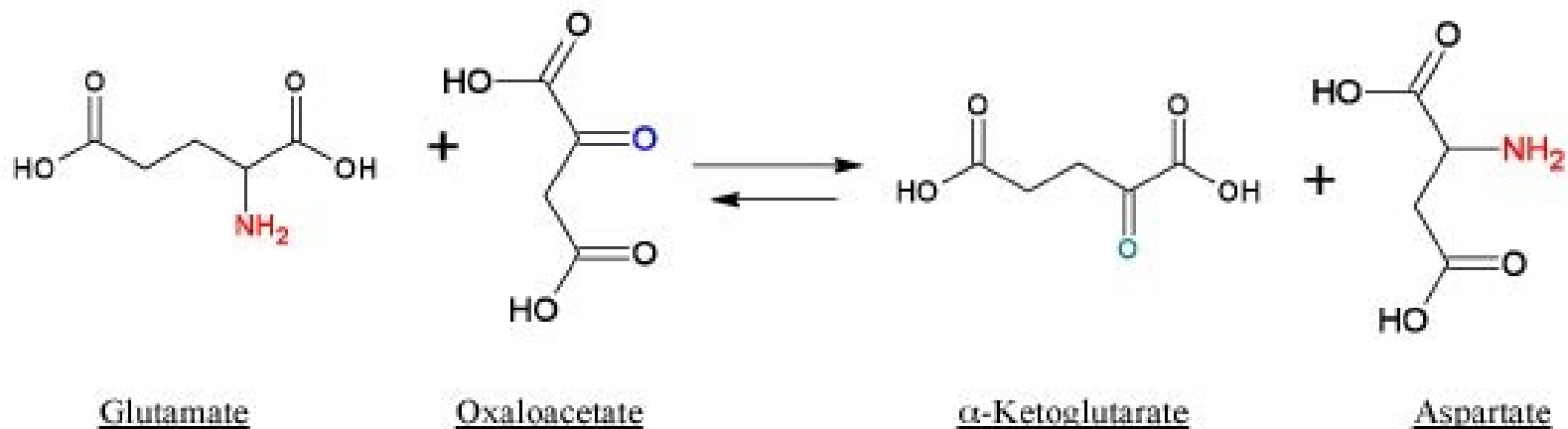


Vybrané klinicky významné enzymy

- AST, ALT, ALP a izoenzymy
- GGT, AMS, CK a izoenzymy, CK-Mb_{mass}
- LD a izoenzymy, LPS, cholinesterasa

ASPARTÁT AMINOTRANSFERASA (AST)

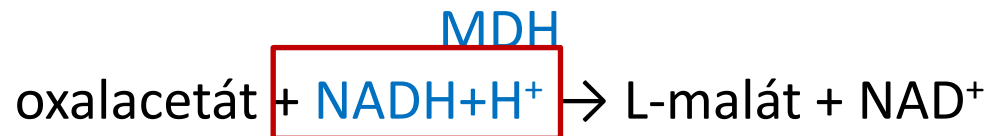
- třída: **transaminasa**



- lokalizace: **cytoplazmatický enzym (30%), mitochondriální enzym (70%)**
- tkáňová distribuce: hlavně játra, myokard, ledviny a kosterní svaly

ASPARTÁT AMINOTRANSFERASA

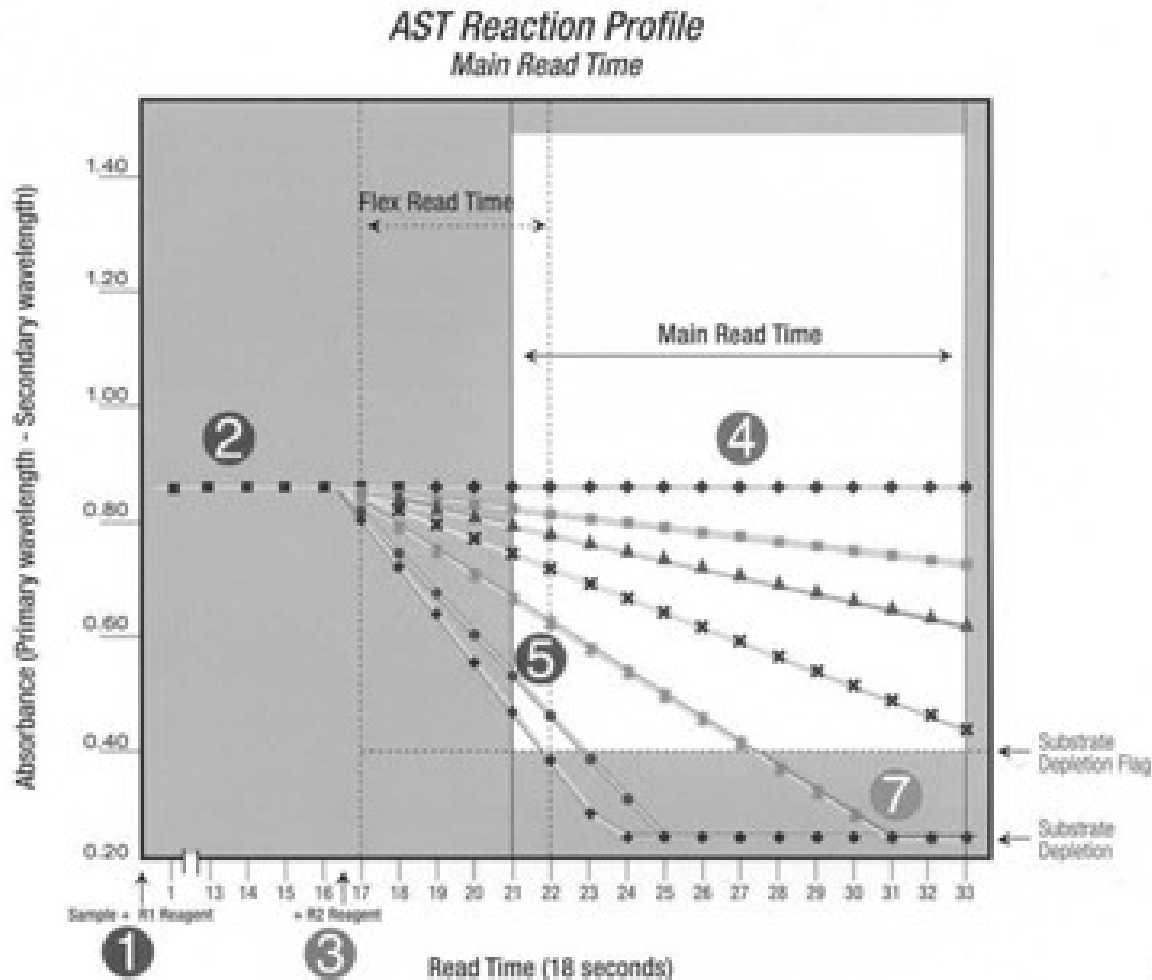
- princip stanovení (příklad): Warburgův test při použití **spřážené reakce** katalyzované **malátdehydrogenasou (MDH)**



měříme **úbytek absorbance při 340 nm**

- reagencie: **R1** (pufr 7,8, **L-aspartát**, **NADH**, **MDH**, konzervans)
R2 (**2-oxoglutarát**)

ASPARTÁT AMINOTRANSFERASA



- 1) známé množství vzorku smícháno se známým množstvím R1
- 2) změří se **blank**
- 3) přidá se startovací reagencie R2, zahájí se měření startu reakce
- 4) měří se **úbytek absorbance NADH** na základě **Warburgova testu**
- 5) odečtení **hodnot změny absorbance v čase** a **vyhodnocení z kalibrace**

ASPARTÁT AMINOTRANSFERASA

- klin. význam:

marker poškození tkáně (enzym se při poškození vylévá z buňek a jeho aktivita je měřitelná v séru)

infarkt myokardu

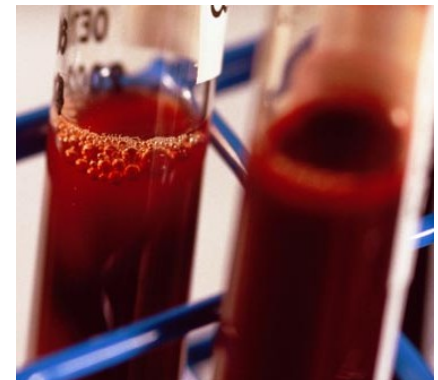
hepatopatie – infekční a toxické hepatitidy

poškození kosterního svalu – úrazy, DMD

poměr AST/ALT: do 0,7 (méně závažné poškození tkáně), **nad 0,7 závažnější**

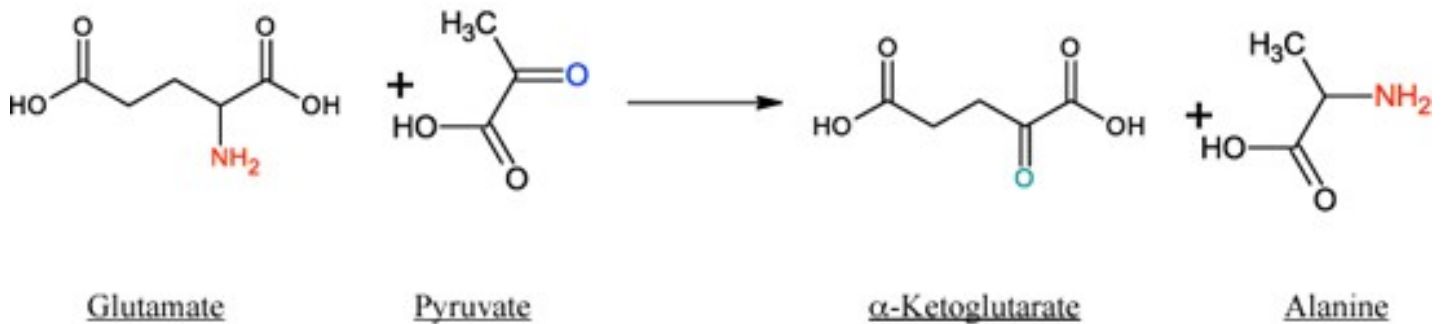
ASPARTÁT AMINOTRANSFERASA

- fyziol. hodnoty: $<0,58 \mu\text{kat/l}$ (37 °C)
- biol. materiál: sérum/plazma
- preanalytická fáze a interference: **hemolýza**,
dodržet čas od odběru (může se lišit
mezilaboratorně)



ALANIN AMINOTRANSFERASA (ALT)

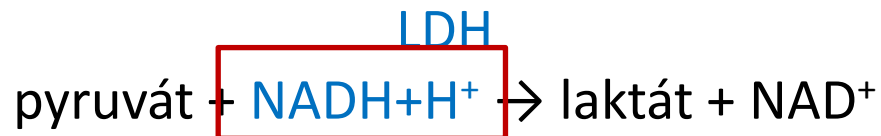
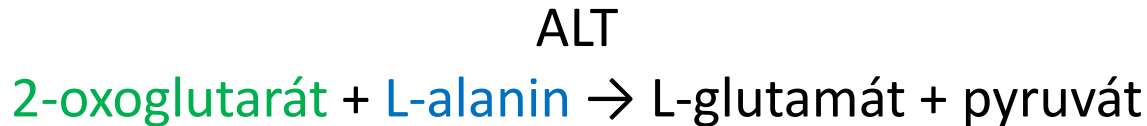
- třída: **transaminasa**



- lokalizace: **cytoplazmatický enzym**
- tkáňová distribuce: játra, ledviny, srdce, kosterní sval, pankreas, plíce

ALANIN AMINOTRANSFERASA

- princip stanovení (příklad): Warburgův test při použití **spřážené reakce** katalyzované **laktátdehydrogenasou (LDH)**



měříme **úbytek absorbance při 340 nm**

- reagencie: **R1** (pufr, **L-alanin**, **NADH**, **LDH**, konzervans)
R2 (**2-oxoglutarát**)

ALANIN AMINOTRANSFERASA

- klin. význam:

marker poškození tkáně

hepatopatie – spíše virové hepatitidy (↑EBV) a chronická onemocnění jater

poškození kosterního svalu – úrazy, záněty

ALANIN AMINOTRANSFERASA

- fyziol. hodnoty:
M < 0,75 $\mu\text{kat/l}$
Ž < 0,58 $\mu\text{kat/l}$
- biol. materiál: sérum/plazma
- preanalytická fáze a interference: **hemolýza**, dodržet čas od odběru (může se lišit mezilaboratorně)

ALKALICKÁ FOSFATÁZA (ALP)

- třída: **hydrolasa**
- reakce: v alkalickém prostředí katalyzuje hydrolýzu **organických monoesterů kys. fosforečné**
- princip stanovení: fotometrická **detekce *p*-nitrofenolu**, který za katalýzy ALP vzniká z *p*-nitrofenylfosfátu
- lokalizace: epiteliální **buněčná membrána**
- tkáňová distribuce: **3 hlavní izoenzymy**
 - placentární**
 - střevní**
 - tkáňové (kostní/jaterní/ledvinná)**

ALKALICKÁ FOSFATÁZA

- klin. význam:

zvýšená aktivita při

JÁTRA: cholestáza (obstrukce žlučových cest), **nádory**,

KOSTI: **osteoblasty** (reparace kostní tkáně), zlomeniny a **metastázy v kostech**, **Pagetova choroba**, **osteomalacie**, růst u dětí

OSTATNÍ: hyperparathyreóza, selhání ledvin

preanalytická fáze a interference: **hemolýza**, věk pacienta (u dětí fyziologicky vyšší)

γ -GLUTAMYL TRANSFERASA (GGT)

- třída: **transferasa**
- reakce: katalyzuje přenos glutamátového zbytku, γ -glutamylový cyklus zabezpečuje transport aminokyselin a peptidů přes buněčnou membránu
- princip stanovení: přenos glutamátové skupiny ze substrátu na glycyglycin, substrát se mění na barevný **5-amino-2-nitrobenzoát**
- lokalizace: **membrána**
- tkáňová distribuce: **játra, žlučové cesty, ledvinné tubuly**

γ -GLUTAMYL TRANSFERASA

- klin. význam:

játerní onemocnění

poruchy cytoplazmatické membrány hepatocytů, výrazně se zvyšuje u **alkoholických hepatopatií, cirrhózy, steatózy a maligních nádorů jater a pankreatu**

α -amylasa (AMS)

- třída: **hydrolasa**
- reakce: hydrolyzuje **α -1,4-glykosidovou** vazbu škrobu a glykogenu
- princip stanovení: ***p*-nitrofenylované polysacharidy** jsou štěpeny na ***p*-nitrofenol** a **glukosu**, ***p*-nitrofenol** stanovíme fotometricky
- lokalizace: sliny, pankreatická šťáva
- tkáňová distribuce: **slinné žlázy, pankreas** (izoenzymy)

α -amylasa (AMS)

- klin. význam:

zvýšená aktivita při

SLINNÉ ŽLÁZY: záněty, nádory

PANKREAS: záněty, nádor

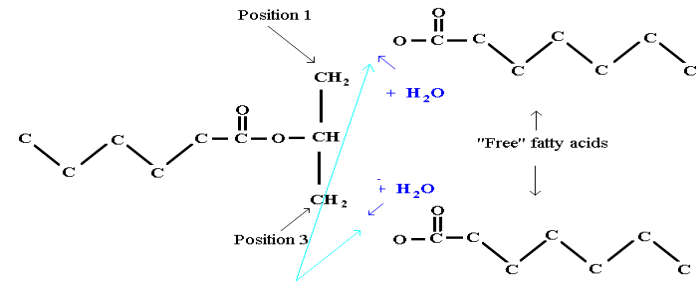
OSTATNÍ: poškození jater, ledvinová nedostatečnost

materiál: sérum, plazma, moč

preanalytická fáze a interference: **hemolýza**, věk pacienta (u dětí fyziologicky vyšší)

lipasa (LPS)

- třída: **hydrolasa**
- reakce: katalyzuje hydrolýzu TG v tenkém střevě na 1. a 3. uhlíku v přítomnosti **žluči a Ca^{2+}**



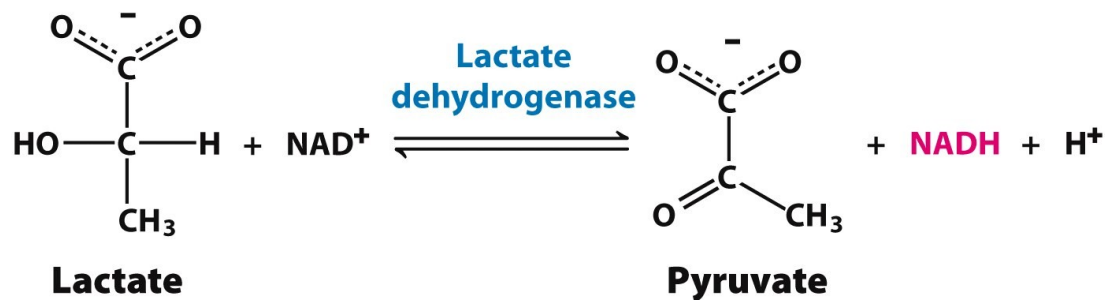
- lokalizace: pankreatická šťáva, lipoproteiny, tuková tkáň
- tkáňová distribuce: **pankreas, endotel cév, tuková tkáň**

lipasa (LPS)

- princip stanovení: substrát lipasy s navázaným chromogenem (**metylresorufin**) je štěpen na chromogen a detekuje se intenzita červeného záření (fotometricky)
- klin. význam:
 - detekce a vyloučení akutní pankreatitidy**
 - obstrukce pankreatického traktu**
 - relaps chronické pankreatitidy**

LAKTÁT DEHYDROGENASA (LDH)

- třída: oxidoreduktasa



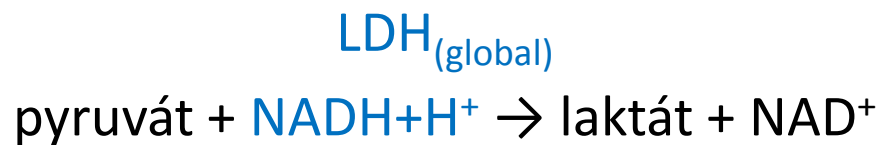
Unnumbered 3 p67
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

- lokalizace: cytoplazma
- tkáňová distribuce: všechny tkáně, celkem 5 izoenzymů s různými podjednotkami – srdce (H) kosterní sval (M)

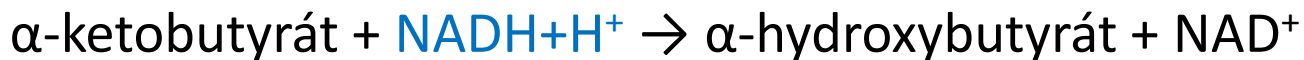


LAKTÁT DEHYDROGENASA

- princip stanovení (příklad): Warburgův test při stanovení **LDH** (global), srdeční izoenzym **HBDH (LDH1)** má schopnost štěpit α -ketobutyrát



HBDH (LDH izoenzym 1, 4H)



- fyziol. hodnoty: $<4,2 \mu\text{kat/l}$ (37 °C)
- preanalytická fáze a interference: **hemolýza**

LAKTÁT DEHYDROGENASA

- klin. význam:

marker hypoxie a poškození tkáně

infarkt myokardu (význam izoenzymu HBDH!)

nádorová onemocnění

jaterní onemocnění

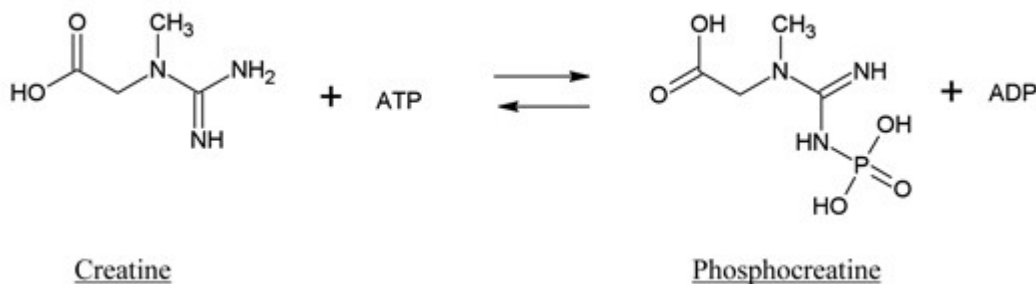
hemolytická anémie

leukemie (i jako prognostický marker)

KREATINKINASA (CK)

- třída: transferasa

katalyzuje tvorbu fosfokreatinu, čímž konzervuje energii (zpětná reakce tvoří ATP substrátovou fosforylací) a naopak

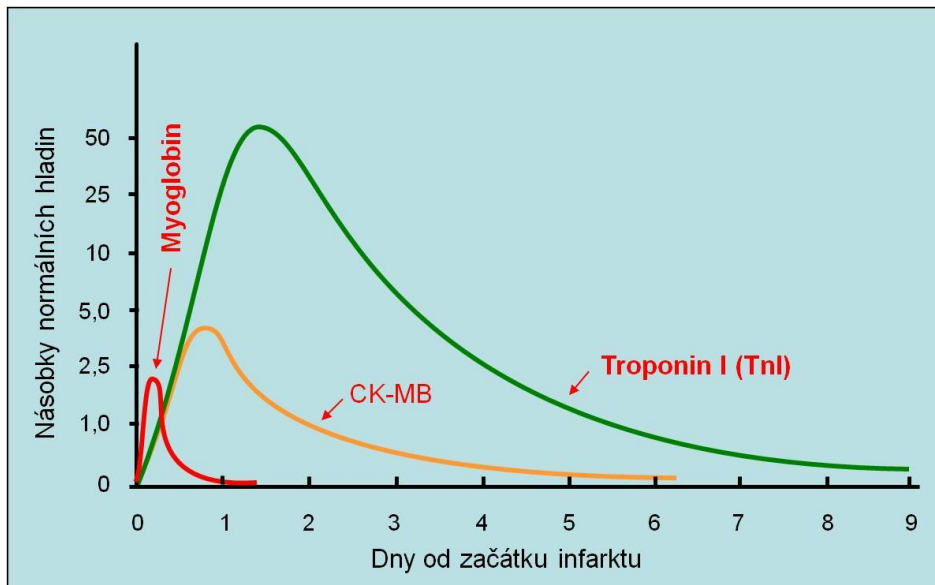


- lokalizace: cytoplazma
- tkáňová distribuce: izoenzymy - kosterní svalstvo (**CK-MM**), mozek (**CK-BB**), srdce (**CK-MB**)
u zdravých osob v séru 95% CK-MM a 5% CK-MB, CK-BB 0%

KREATINKINASA (CK)

- klin. význam:

poškození srdce infarkt myokardu: **po 4-8 hodinách** se zvyšuje aktivita CK-MB (nekróza a vylití z buněk), normální hodnoty 3-5 dní po IM, **musí se stanovit imunochemicky (CK-Mb_{mass})**, protože její aktivitu překrývá plazmatická CK-MM



KREATINKINASA (CK)

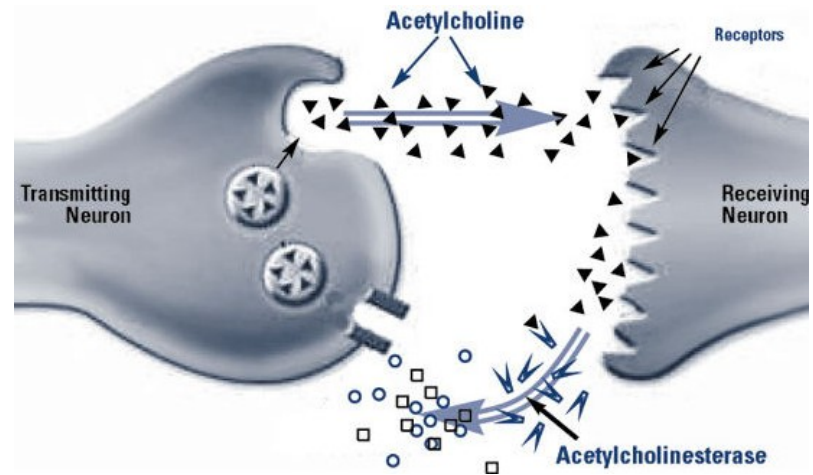
- klin. význam:
 - poškození kosterních svalů:** úrazy a záněty, **svalové dystrofie** (obrovské hodnoty CK-MM, doprovázené elevací transaminas)

 - onemocnění CNS:** aktivita CK-BB se zvyšuje úměrně poškození mozkové tkáně
- princip metody (celková CK): Warburgův optický test

při nadbytku kreatinfosfátu a ADP se tvoří kreatin a **ATP**, ATP se využije v navazující **hexokinasové reakci** (vznik glukosy), **glukosa** je potom přeměněna na **fosfoglukonát** za vzniku NADPH (měří se nárůst)

CHOLINESTERASA (CE)

- třída: hydrolasa
hydrolýza esterů cholinu
inaktivace acetylcholinu v
nervosvalové ploténce a
cholinergních synapsích a tím
zastavení regulace přenosu
vzruchu



- lokalizace: cytoplazma, cholinergní nervy
- tkáňová distribuce: izoenzymy **acetylcholinesterasa** (erytrocyty, cholinergní nervy), **pseudocholinesterasa** (syntéza v játrech)

CHOLINESTERASA

- klin. význam:
 - intoxikace organofosfáty** (stanovení aktivity AchE v erytrocytech)
 - familiární idiopatická acholinesetazémie**
 - dědičný defekt syntézy enzymu
 - způsobuje problémy při anestézii (podání sukcinylcholinu, který se potom nemůže odbourávat)
 - vysoké riziko až zástavy dechu
 - onemocnění jater, proteinová malnutrice
- princip stanovení: substrátem je **butyrylthiocholin**, ten se mění v reakci CHE na **thiocholin**, který tvoří komplex s **hexakynoželeznatanem** (barevný produkt)

STANOVENÍ IZOENZYMŮ

- laktát dehydrogenasa – LDH₁₋₅
- kreatinkinasa – CK-MM, CK-MB, CK-BB
- alkalická fosfatasa – střevní, placentární tkáňová (jaterní, kostní, ledvinná)

METODY

imunoanalýza (specifické mAb proti konkrétnímu izoenzymu, stanovíme tím **hmotnostní koncentraci**)

elektroforéza (separace na základě různé pohyblivosti v elektrickém poli a různé Mr)

specifický substrát (v případě HBDH)

KVALITATIVNÍ ANALÝZA ENZYMŮ

- enzym = **bílkovina**
- bílkoviny jsou **kódovány v DNA**
- **fenotyp** enzymu (aktivita) je zakotvena na úrovni genu tohoto enzymu (**genotyp**)
- využití: screening **vrozených metabolických poruch**, genotypizace enzymů metabolismu léčiv (cytostatika – TPMT, DPD) a jiné...
- metody: **PCR**

Děkuji za pozornost.