



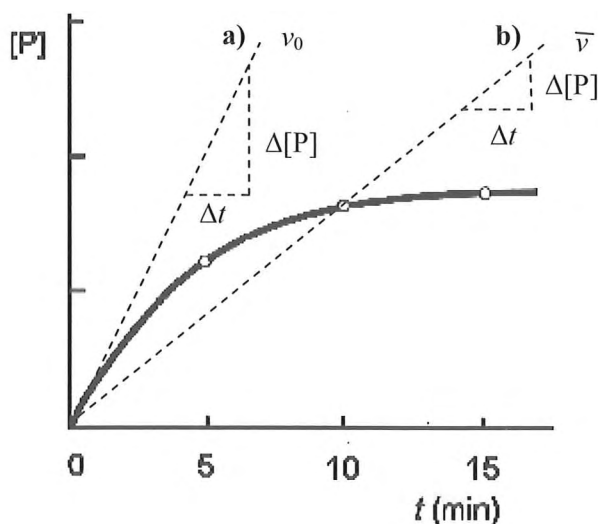
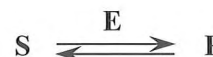
Rychlost a řád chemické reakce, kinetika reakcí 0. a 1. řádu.
 Mechanismus enzymové reakce, aktivita a katalytická koncentrace enzymu,
 faktory ovlivňující enzymovou aktivitu, saturační křivka, K_M , inhibitory, izoformy.

Kvantifikace enzymu

Vyjádření množství	Jednotka	Rozměr
Katalytická (enzymová) aktivita	Katal (kat)
	Mezinárodní jednotka (U, IU)	$\mu\text{mol}/\text{min}$
Katalytická koncentrace
Hmotnostní koncentrace	g/l	g/l

1. Uveďte vztah pro přepočítání katalytické aktivity v μkat na IU a opačně.

Možnosti stanovení kvantity enzymu



$$\text{katalytická koncentrace} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t}$$

2. Charakterizujte základní metody měření enzymové aktivity:

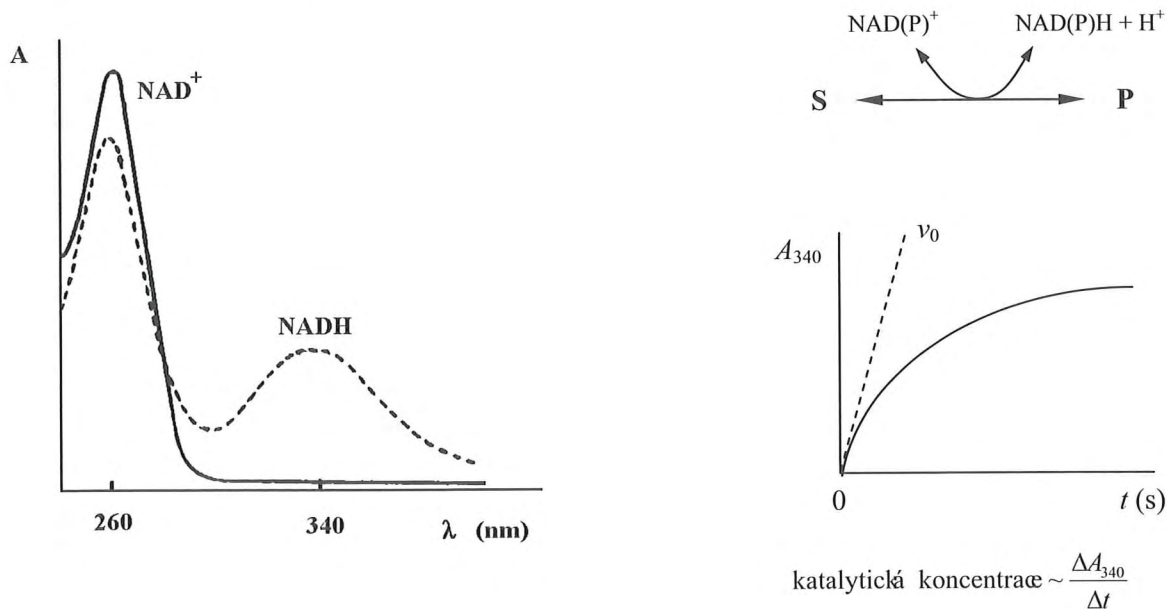
a) kinetická metoda

b) metoda konstantního času

c) imunochemické stanovení

3. Laktátdehydrogenasa má katalytickou aktivitu $2 \mu\text{kat}$. Kolik molekul laktátu vznikne z pyruvátu za 1 minutu při nadbytku substrátu? ($7,23 \cdot 10^{19}$)
4. Jaké množství produktu vznikne za 10 minut při reakci katalyzované enzymem o aktivitě $10 \mu\text{kat}$? Co je podmínkou toho, aby teoreticky vypočtené množství skutečně vzniklo? (6 mmol)
5. Do reakční směsi obsahující substrát a pufr bylo přidáno 0,1 ml séra. Jaká je katalytická koncentrace enzymu, jestliže po 10 min. měření metodou konstantního času obsahovala reakční směs 6 μmol produktu? Bude se výsledek lišit od aktivity stanovené kinetickou metodou? (100 $\mu\text{kat/l}$)
6. Reakční směs obsahuje: 2,5 ml pufru, 0,2 ml roztoku NAD^+ , 0,1 ml séra a 0,2 ml roztoku laktátu. Reakce probíhala přesně 10 minut a po této době byla naměřena koncentrace vzniklého NADH 1,2 mmol/l. Vypočtete katalytickou aktivitu a katalytickou koncentraci enzymu *LD*. (6 nkat, 60 $\mu\text{kat/l}$)
7. Určete aktivitu katalasy, bylo-li zjištěno, že při nadbytku H_2O_2 v reakční směsi se uvolní po 10 minutách 6,72 μl O_2 (za normálních podmínek). (1 nkat)

Optický (UV, Warburgův) test



Využití optického testu:

- a) stanovení aktivity enzymů – NAD(P) -dependentních dehydrogenas (NAD(P)-DH)
 - stanovení aktivity ostatních enzymů po spřažení s NAD(P)-DH

b) stanovení koncentrace substrátu – např.: laktátu

8. Jak se bude měnit absorbance při 340 nm při stanovení laktátu v séru s využitím optického testu?

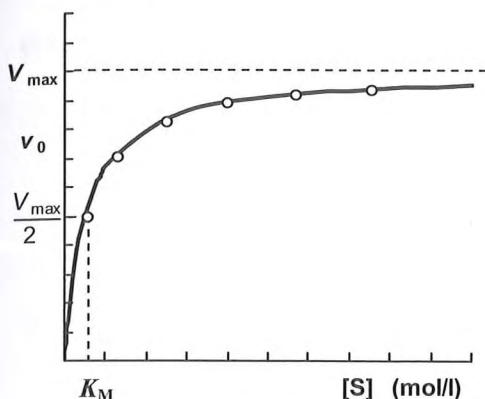
Faktory ovlivňující rychlost enzymové reakce

I. Koncentrace substrátu

Průběh enzymové reakce s jedním substrátem:



Saturační křivka



Ustálený stav: $[ES] = \text{konst.}$

rovnice Michaelise-Mentenové

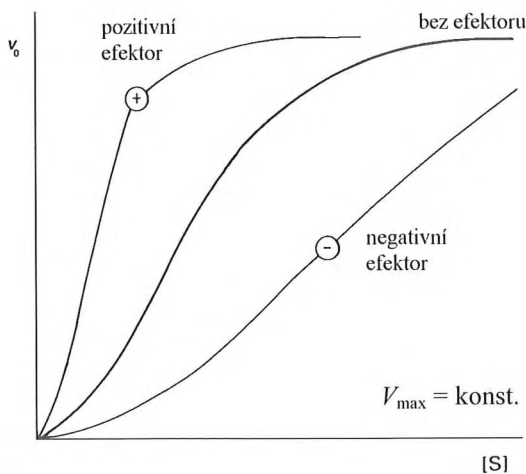
$$v_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$[S]$. . . počáteční koncentrace substrátu

V_{\max} . . . maximální (limitní V_L) rychlost

9. Srovnajte: kinetická křivka: závislost na
saturační křivka: závislost na
10. Navrhněte uspořádání pokusu, v němž lze zjistit průběh saturační křivky.
11. Jaký je rozměr K_M ?
12. Charakterizujte koncové úseky saturační křivky pro hodnoty: a) $[S] \ll K_M$; b) $[S] \gg K_M$.
Jaké jsou řády reakcí za uvedených podmínek?
13. Charakterizujte bod na saturační křivce pro hodnotu $[S] = K_M$.
14. Určete podíl $[S]/K_M$, při kterém reakce probíhá: a) $v_0 = 90\% V_{\max}$; b) $v_0 = 99\% V_{\max}$ (a) 9; b) 99)
15. Ke kterému ze substrátů S_1 , S_2 a S_3 má enzym s širokou substrátovou specifikou nejvyšší afinitu ($K_{M1} = 400 \mu\text{mol/l}$, $K_{M2} = 1000 \mu\text{mol/l}$, $K_{M3} = 60 \mu\text{mol/l}$)?
16. Jaká by měla být koncentrace laktosu, aby reakce katalyzovaná β -galaktosidasou, která má $K_M(\text{laktosa}) = 400 \mu\text{mol/l}$, probíhala podle kinetiky 0. řádu? ($\geq 100 K_M$, tj. $\geq 40 \text{ mmol/l}$)
17. Při mutaci enzymu došlo k dvojnásobnému zvýšení K_M pro substrát oproti normální hodnotě. Jak se musí změnit koncentrace daného substrátu, aby se rychlost dané reakce nezměnila?
18. L-Asparagin je nezbytný pro proteosyntézu v některých nádorových buňkách. Při léčbě určitých typů leukemie může být mj. podáván enzym asparaginasa, přeměňující Asn na Asp a amoniak. Tím dochází k poklesu koncentrace Asn v oběhu a ke snížení proliferace. Která z uvedených forem asparaginasy by byla pro léčbu nejvhodnější, je-li koncentrace Asn v krvi 0,2 mM?
 - a) $K_M = 0,2 \text{ mM}$; $V_{\max} = 0,1 \text{ mM/h}$
 - b) $K_M = 0,2 \text{ mM}$; $V_{\max} = 0,5 \text{ mM/h}$
 - c) $K_M = 2 \text{ mM}$; $V_{\max} = 0,1 \text{ mM/h}$
 - d) $K_M = 0,1 \text{ mM}$; $V_{\max} = 0,5 \text{ mM/h}$
19. Na příkladu hexokinasy a glukokinasy vysvětlete pojem substrátová specifita.

Saturační křivka allosterických enzymů



Allosterický modulátor (efektor)

nízkomolekulární látka (často meziproduct nebo produkt dané dráhy)

- vazba v oblasti jiné než aktivní centrum
- změna konformace enzymu → změna aktivity

Allosterický enzym

- obvykle více podjednotek (často regulační a katalytické)
- regulační funkce v metabolismu

II. Koncentrace enzymu

Obecně: $v_0 = k \cdot [E]_t$

Pro plně nasycený enzym ($[E]_t = [ES]$): $v_0 = V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E]_t$

kde celková (total) koncentrace enzymu $[E]_t = [E] + [ES]$;

$k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]_t$ **molová/molekulární aktivita (číslo přeměny)**

20. Sestrojte saturační křivky pro 3 různé koncentrace ($[E_1] < [E_2] < [E_3]$) téhož enzymu a stejný typ reakce. Jak se změní hodnoty K_M , V_{\max} ?
21. Karbonátdehydratasa má molekulární aktivitu $6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$. Kolik molekul H_2CO_3 vznikne za katalýzy jednou molekulou enzymu za 10 milisekund, je-li enzym saturován substrátem? (6 000)
22. Lysozym má molekulární aktivitu $0,5 \text{ s}^{-1}$. Kolik glykosidových vazeb hydrolyticky rozštěpí 1 μmol lysozymu za 1 s, je-li nasycen substrátem? ($0,5 \mu\text{mol} = 3,01 \cdot 10^{17}$)

III. Teplota

IV. pH

V. Aktivátory

23. Jakým způsobem ovlivňují aktivitu enzymů a) teplota; b) pH; c) aktivátory? Uveďte příklady.
24. Co je to *Taq* polymerasa, při které metodě se používá?

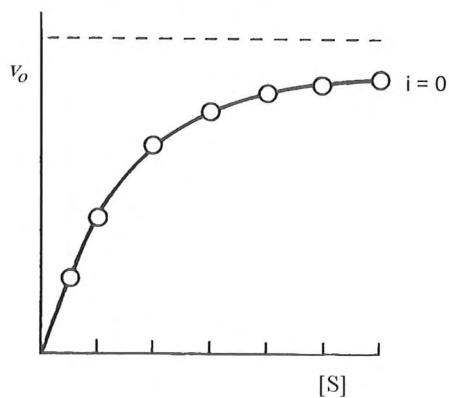
VI. Inhibitory

25. Vysvětlete rozdíl mezi reversibilní a ireversibilní inhibicí.
 26. Uveďte příklady ireversibilní inhibice.
 27. Jaké základní typy reversibilní inhibice rozlišujeme?
 28. Doplněte do tabulky, jak se mění při inhibici hodnoty K_M a V_{max} a uveďte příklady inhibitorů.

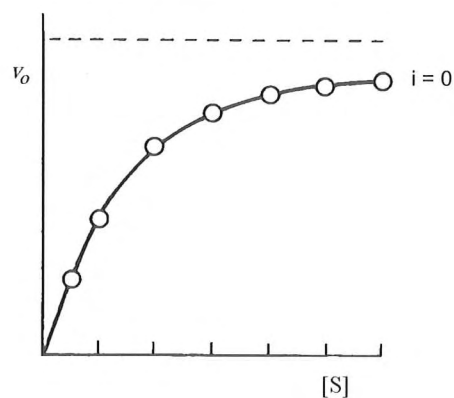
Parametr	Kompetitivní inhibice	Nekompetitivní inhibice
K_M		
V_{max}		
Inhibitor		

29. Vyznačte do grafu průběh saturační křivky při kompetitivní a nekompetitivní inhibici. Vyznačte parametry K_M , V_{max} .

a) kompetitivní inhibice



b) nekompetitivní inhibice



30. Vysvětlete pojmy: proenzym, izoenzym a izoforma.
 31. Uveďte, jaké metody lze použít k rozlišení izoenzymů.

12. Doplňte vzorec redukované formy FAD:

.....

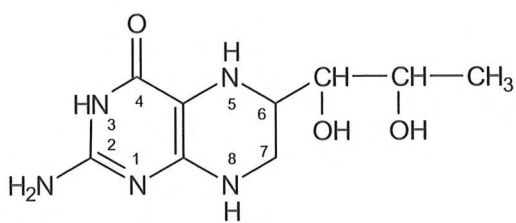
13. Napište rovnici reakci FAD se sukcinátem.

FMN-dependentní enzymy, např. (dýchací řetězec): NADH-dehydrogenasa

FAD-dependentní enzymy, např. (citrátový cyklus): (doplňte)

(oxidační dekarboxylace 2-oxokyselin): pyruvátdehydrogenasa

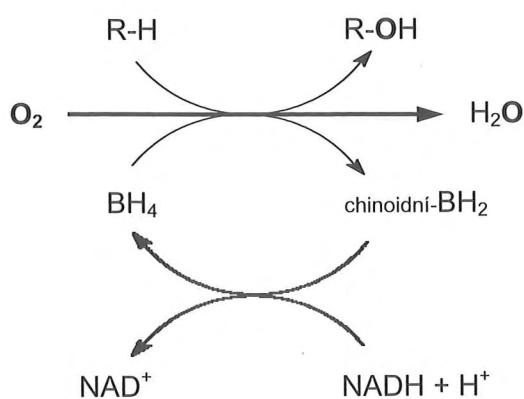
Tetrahydrobiopterin (BH₄)



14. Který heterocyklus je základem struktury BH₄?

5,6,7,8-tetrahydrobiopterin

Funkce BH₄ u některých hydroxylací katalyzovaných monooxygenasami



Enzymy využívající BH₄, např. (hydroxylasy aromatických aminokyselin):

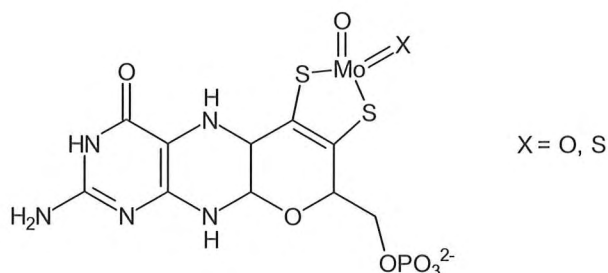
(doplňte)

.....

(syntéza oxidu dusnatého, viz str. 43): NO-synthasa

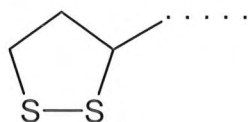
Koenzym Q, Fe-S, hem – viz kapitola Respirační řetězec, str. 75.

Molybdopterin (molybdenový kofaktor)



Enzymy využívající molybdopterin, např.: xanthinoxidasa, sulfitoxidasa

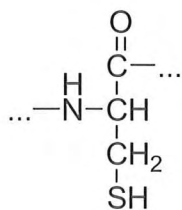
Lipoová kyselina



15. Doplňte chybějící část struktury
16. Jakým způsobem je vázána lipoová kyselina na enzym?
17. Na jakém typu reakcí se lipoová kyselina podílí?
18. Nakreslete strukturu dihydrolipoátu a naznačte vazbu acetylu.

Enzymy závislé na lipoátu, např. (oxidační dekarboxylace 2-oxokyselin): (doplňte)

Glutathion (GSH)

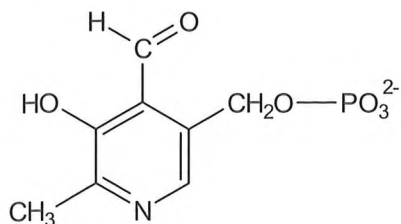


19. Doplňte chybějící část struktury a její název.
20. GSH se podílí na odstraňování H_2O_2 a organických hydroperoxidů v buňce. Napište rovnici obecné schéma jeho funkce.
21. Jakým způsobem dochází k regeneraci redukované formy glutathionu? Který koenzym je k tomu zapotřebí?

Enzymy závislé na GSH, např. (selenoprotein): glutathionperoxidasa
(nejen oxidoreduktasy) (konjugace xenobiotik): glutathion-S-transferasa
(membránový transport AK): γ -glutamyltranspeptidasa

Kofaktory transferas

Pyridoxalfosfát (PLP)

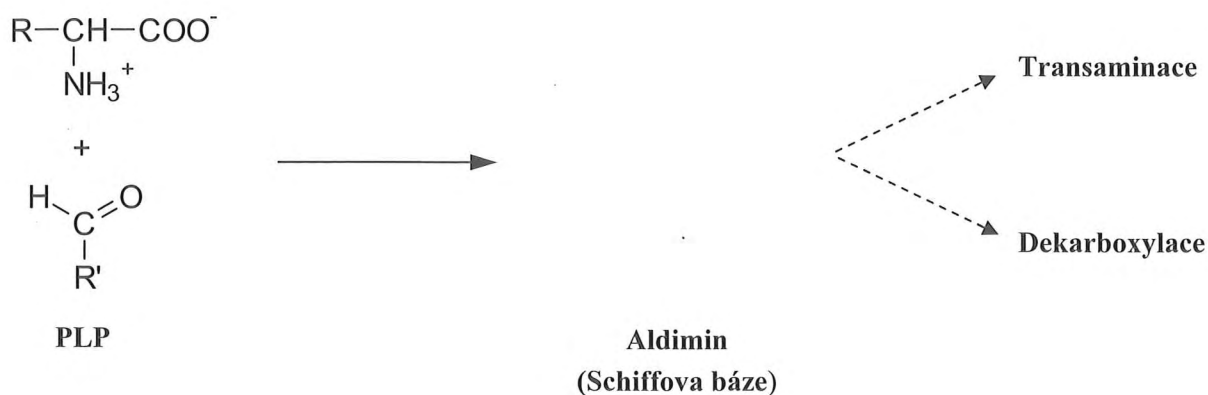


22. Který vitamin má vztah k PLP?

23. Který heterocyklus je základem struktury PLP?

24. Jakých dalších forem může PLP nabývat při reakci s aminokyselinami? Nakreslete dílčí struktury.

Schéma vzniku aldiminu při reakci PLP s aminokyselinami (*doplňte*)

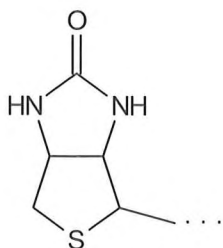


Enzymy závislé na pyridoxalfosfátu, např. (transaminace):

(*doplňte*)

(syntéza hemu): δ -aminolevulinátsynthasa

Biotin



25. Které heterocykly jsou obsaženy v molekule biotinu?

26. Na jakém typu reakcí se podílí biotin a kterou skupinu přenáší?

27. Vyznačte místo, na které se váže přenášená skupina.

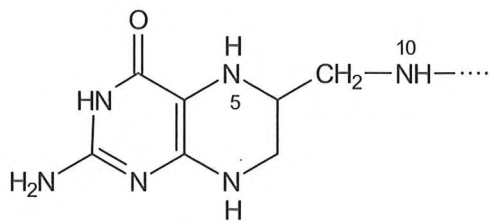
Enzymy závislé na biotinu, např. (anaplerotická reakce citrátového cyklu):

(*doplňte*)

(syntéza mastných kyselin): acetyl-CoA-karboxylasa

28. Který z doposud uvedených kofaktorů (FAD, NAD^+ , lipoát, biotin) je typickým koenzymem?

Tetrahydrofolát (H₄-folát)



29. Popište strukturu kofaktoru. Doplňte zbývající část molekuly.

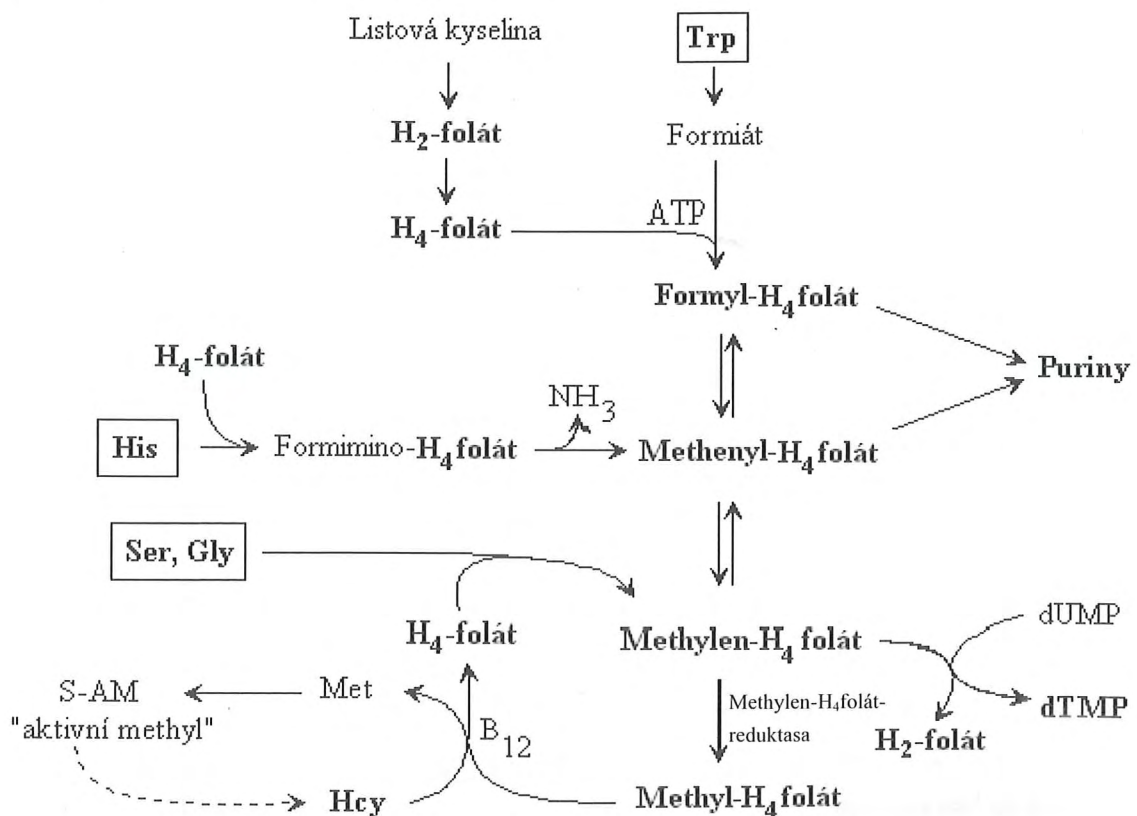
H₄-folát přenáší jednouhlíkové fragmenty (doplňte):

Methyl
Methylen
Methenyl	-CH=
Formyl
Formimino

vazba na H₄-folát

N ⁵
N ⁵ , N ¹⁰
N ⁵ , N ¹⁰
N ¹⁰
N ⁵

Tvorba, vzájemné přeměny a utilizace derivátů H₄-folátu

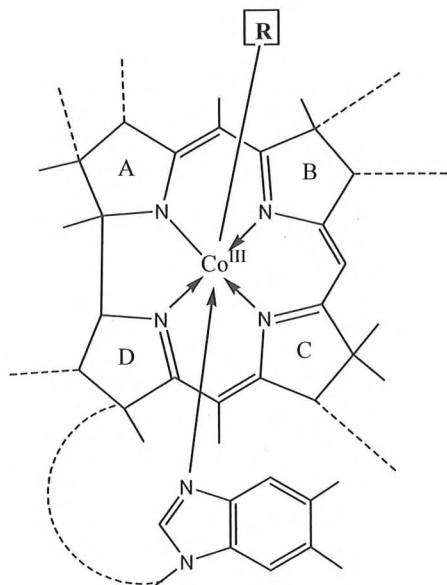


Hcy ... homocystein, S-AM ... S-adenosylmethionin

Jednotlivé reakce poskytující jednouhlíkové zbytky – viz kapitola Metabolismus aminokyselin, str. 42.

30. Napište dílčí rovnici přeměny methylen- H_4 folátu na methyl- H_4 folát (kofaktorem je NADH).
31. Uveďte hlavní zdroje jedouhlíkových zbytků v organismu.
32. Uveďte příklad methylační reakce, při které je donorem methylu jedouhlíkový fragment vázaný na H_4 -folát.
33. Jaký je princip antibakteriálního působení sulfonamidů?

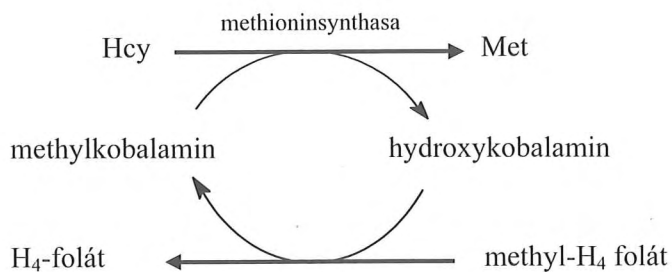
Kobalaminy (vitamin B_{12})



R ... 5'-deoxyadenosin (mitochondrie)
 -OH (cytosol)
 - CH_3 (cytosol)

34. Popište strukturu kofaktoru.
35. Nakreslete strukturu 5'-deoxyadenosinu.

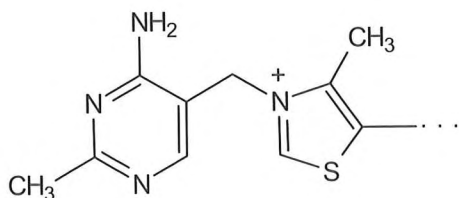
Význam methylkobalaminu



Enzymy závislé na vitaminu B_{12} , např. (resyntéza methioninu): methioninsynthasa
 (utilizace propionátu): methylmalonyl-CoA-mutasa

36. Proč při nedostatku vitamínu B₁₂ dochází k vyčerpání tetrahydrolistové kyseliny (vzniká tzv. "folátová past")?
37. Jedna z příčin vzniku anémií (megaloblastické/perniciózní) je nedostatek vitamínu B₁₂, který se projeví poruchou tvorby DNA a vzniku nových erytrocytů. Vysvětlete.

Thiamindifosfát (TDP)



- Enzymy závislé na TDP, např. (citrátový cyklus):
- (doplňte) (oxidační dekarboxylace 2-oxokyselin):
transketolasová reakce v pentosovém cyklu

38. Pojmenujte oba heterocykly obsažené v molekule TDP.
39. Jaká část struktury není znázorněna? Doplňte.
40. Jaká skupina je přenášena a v jaké formě?
41. Na kterém atomu kofaktoru dochází k vazbě přenášené skupiny a proč?
42. Který vitamin je součástí kofaktoru?
43. Na jakém typu reakcí se účastní TDP?
44. Jedním z projevů nemoci beri-beri (*singálsky = nemohu*) je výrazné zvýšení hladiny pyruvátu v krvi. Vysvětlete, proč. Jak lze příznaky choroby odstranit?