

3 – Enzymy

Enzymů se v našem těle nachází tisíce – účastní se každé katalyzované reakce a umožňují její průběh. V této kapitole se zaměříme na jejich obecné vlastnosti, kinetiku a kofaktory.

3.1 Obecné vlastnosti enzymů

O enzymech obecně můžeme říct, že se jedná o **bílkoviny**, které v našem těle fungují jako **biokatalyzátory**. Mají **různou specifitu** (vzhledem k substrátu i účinku) a jsou **vysoce účinné**. Jejich důležitou vlastností je, že **fungují již za mírných podmínek** a je **možné je regulovat**. Kdybychom enzymy z našeho těla chtěli použít *in vitro*, museli bychom velice jemně nastavit vnější podmínky, jinak by enzymy nefungovaly.

Na výše zmíněné obecné vlastnosti se nyní podíváme podrobněji.

Enzymy jako proteiny

Enzymy můžeme rozdělit na **jednoduché** a **složené**.

Jednoduché enzymy jsou tvořeny **pouze bílkovinou**, příkladem takových enzymů jsou **hydrolasy**.

Složené enzymy mají různou stavbu. Může se jednat o:

- proteiny s kovalentně navázanou prostetickou skupinou, či dočasně připojeným koenzymem
- metaloenzymy
- oligomerní multienzymové komplexy (tj. komplexy tvořené více podjednotkami)
- proteiny asociované s membránami
- ...

Enzymy jsou distribuovány různě a to, **jak v těle** (některé buňky produkují jen určité enzymy), tak v **buňce** (některé enzymy najdeme jen v cytoplazmě, jiné jen v mitochondrii). Některé enzymy tvoří tzv. **izoformy**, přičemž jedna izoforma se může nacházet v jedné části těla, druhá izoforma v jiné (příkladem takového enzymu je laktátdehydrogenasa, která tvoří 5 izoform).

Následující tabulka uvádí několik příkladů enzymů, které se vyskytují jen na určitých místech v buňce, a proto je možné tyto enzymy použít např. k **identifikaci buněčného kompartmentu**, ze kterého pocházejí (využíváno ve výzkumu).

Tabulka 1 - Enzymové markery subcelulárních frakcí

Frakce	Enzym	Typ enzymu	Funkce enzymu
Plazmatická membrána	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	hydrolasa	transport iontů
Jádro	DNA/RNA-polymerasa	transferasa	syntéza DNA/RNA
ER	Glc-6-fosfatasa	hydrolasa	hydrolýza glc-6-P
ER	cyt-b5-reduktasa	oxidoreduktasa	desaturace MK
GA	galaktosyltransferasa	transferasa	syntéza glykoproteinů
Lyzosom	kyselá fosfatasa	hydrolasa	hydrolýza fosfoesterů
Mitochondrie	sukcinátdehydrogenasa	oxidoreduktasa	sukcinát → fumarát
Peroxisom	katalasa	oxidoreduktasa	rozklad H ₂ O ₂
Cytosol	laktátdehydrogenasa	oxidoreduktasa	laktát → pyruvát

Enzymy jako biokatalyzátory

Úkolem enzymů v našem těle je **katalyzovat v něm probíhající reakce**. Fungují stejně jako anorganické katalyzátory – **snižují aktivační energii, čímž zvyšují rychlost reakce** (rychlost reakce je s enzymem o 10^6 - 10^{14} rychlejší, než bez něj!), **nijak neovlivňují rovnovážnou konstantu K**.

Kdyby se v našem těle nenacházely enzymy, probíhaly by reakce tak pomalu, že by nedokázaly zajistit existenci živé hmoty!

Pro zachování existence živé hmoty je důležité i to, že **enzymy fungují za mírných podmínek**:

- **atmosférický tlak**
- **úzké rozmezí teplot** (okolo 37°C)
- **úzké rozmezí pH** (tzv. pH optimum²)

V okamžiku, kdy teplota přesáhne 50°C, dochází k denaturaci enzymů (tj. ke změně terciární a kvartérní struktury, což znemožní enzymu provádět jeho funkci). Ke stejnému ději dojde i vlivem vyššího, či nižšího pH.

Regulace enzymů

Enzymy je nutné „ovládat“, tedy regulovat. Existují různé způsoby regulace enzymů, hlavními dvěma jsou:

- a) regulace **aktivity enzymu**
Aktivita enzymu může být ovlivňována **aktivátory, inhibitory a kovalentními modifikacemi** (např. *fosforylací*).
- b) regulace **množství enzymu**
Množství enzymu je možné ovlivnit v místě **proteosyntézy** (zabráníme nebo urychlíme syntézu enzymu), či v místě **proteolýzy** (urychlíme, či zpomalíme odbourávání enzymu). Na tomto způsobu regulace se podílejí **hormony** (tzv. **induktory** nebo **repressory**)

Specifičnost enzymů

Enzymy katalyzují jen určité reakce. Rozlišujeme dva typy specifičnosti:

- a) **specifičnost účinku**
Tzn., že enzymy katalyzují pouze **jeden typ reakcí** (např. oxidaci, redukci...). Za tuto specifitu je zodpovědný **kofaktor** (např. pokud je kofaktor NAD^+ , víme, že bude docházet k dehydrogenaci)
- b) **specifičnost substrátovou**
Tzn., že enzymy katalyzují **přeměnu pouze jednoho daného substrátu**. Za tuto specifitu je zodpovědný enzym (do jeho aktivního místa pasuje jen určitý substrát)

Stereospecifita enzymů

Enzymy jsou stereospecifické. V tomto ohledu můžeme rozlišit dva druhy přeměn:

- a) přeměna **achirálního substrátu** na **chirální produkt**
Tzn. že látka, která není chirální (např. **pyruvát**) je přeměněna na chirální strukturu (např. **L-laktát**). Druhá forma chirální struktury (R x L) nevzniká.
- b) přeměna **chirálního substrátu** na produkt
Tzn. že enzym je vysoce specifický a když si má vybrat, zda přemění L nebo R formu, vybere se pouze jednu (významné pro farmakologii).

¹ Tento fakt je odlišuje od anorganických katalyzátorů, které reakce urychlují o několik řádů méněkrát.

² V našem těle se nacházejí různé pufrací systémy jako např. systém hydrogenfosfátový, hydrogenkarbonátový a bílkovinný, které se podílejí na udržování pH optima.

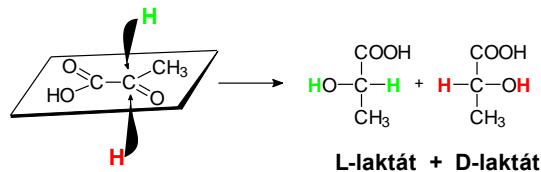
Příklady stereospecifity enzymů:

ADa) Přeměna achirálního produktu na chirální produkt

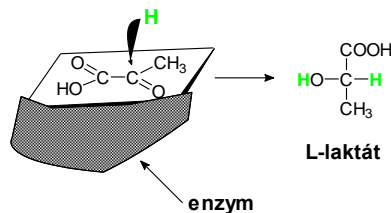
Př. A1: Hydrogenace pyruvátu

Pyruvát je achirální molekula – neobsahuje uhlík se čtyřmi různými substituenty. Jeho hydrogenace vede k vytvoření **laktátu**, který již chirální centrum obsahuje.

In vitro (tedy ve zkumavce) dojde ke vzniku racemické směsi L-laktátu a R-laktátu (nic nebrání vodíkům připojit se „zleva“ nebo „zprava“):



In vivo (tedy v našem těle s působením **enzymů**) vznikne pouze L-laktát, protože enzym zabrání hydrogenaci „zprava“, která by vedla ke vzniku R-laktátu.



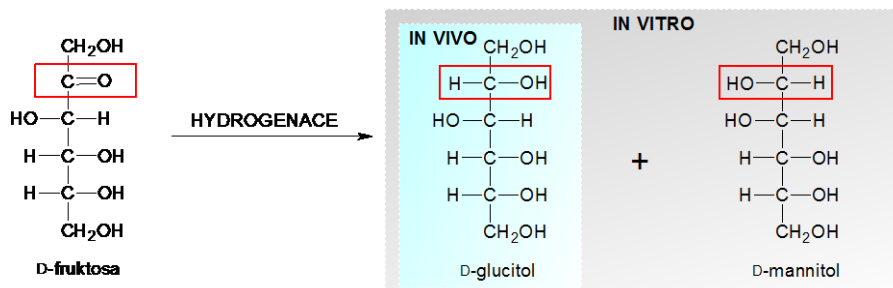
Př. A2: Hydrogenace D-fruktosy

D-fruktosa je sice chirální molekula, ale obsahuje **achirální uhlík C2** na kterém je dvojná vazba.

Při hydrogenaci fruktosy se tento achirální uhlík přeměňuje na chirální.

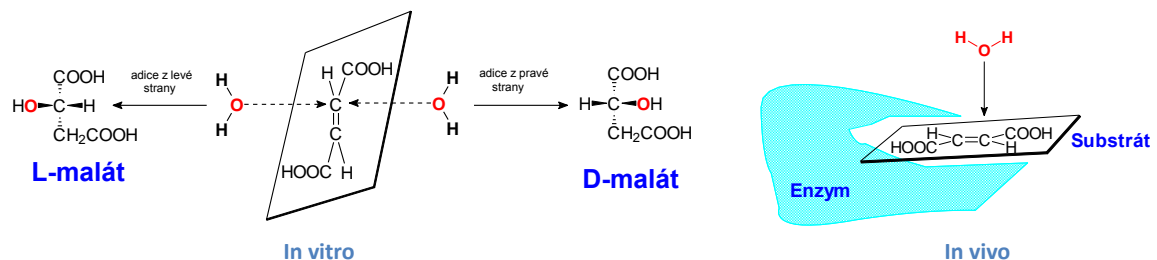
In vitro vzniká racemická směs D-glucitolu a D-mannitolu.

In vivo vzniká pouze D-glucitol.



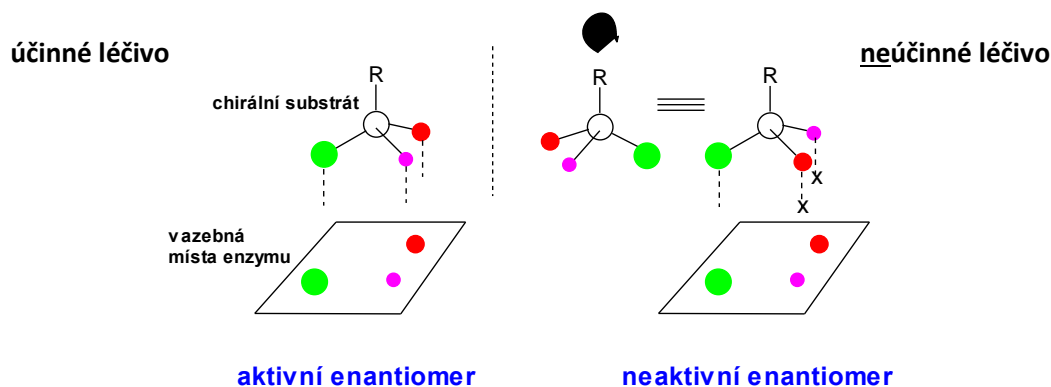
Př. A3: Hydratace fumarátu

Fumarát není chirální sloučeninou, jeho hydratací však vzniká jeden z možných enantiomerů **malátu**. V těle je to vždy **L-malát**.



ADb) Přeměna chirálního substrátu na produkt

Některá léčiva fungují na základě toho, že do těla je vpravena jejich neaktivní forma a až některou reakcí v těle vzniká forma aktivní. Je velice důležité, aby neaktivní forma „pasovala“ do enzymu, který ji má za úkol přeměnit (přeměňuje-li enzym L-formu, musí být podána v L-formě).



Obdobně některá léčiva inhibují funkci enzymů – je tedy rovněž nezbytné, aby byla podána ve vhodné konformaci, která zablokuje jejich aktivní místo.

3.2 Názvosloví enzymů a jejich klasifikace

Názvosloví enzymů rozlišujeme:

a) Triviální

Velice často používané, názvy mají historický původ. Často končí příponou **-in** nebo **-asa**.

Např. trypsin, pepsin; amylasa, lipasa

Existují i tzv. **doporučené triviální názvy**, které by se měly používat a jsou (alespoň některé) odvozeny od „vlastností“ enzymu (*viz dále*)

b) Systematické (systémové)

Systematické názvosloví je komplikovanější. Název končí příponou **-asa** a obsahuje **informace o substrátu** (substrátech) a **typu reakce**.

Všechny známé enzymy jsou navíc popsány čtyřmístným kódem EC X.X.X.X, kde X je číslo.

První číslo ze čtveřice **zařazuje enzym do jedné ze šesti hlavních skupin** (*viz dále*)

Příklady některých názvů:

Doporučený triviální název: alkoholdehydrogenasa

Systémový název: EC 1.1.1.1 ethanol:NAD⁺-oxidoreduktasa

Reakce: ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH+H⁺

Doporučený triviální název: alaninaminotferasa (ALT)

Systémový název: EC 2.6.1.2 L-alanin:2-oxoglutarát-aminotferasa

Reakce: L-alanin + 2-oxoglutarát → pyruvát + L-glutamát

Enzymy rozdělujeme do následujících 6 hlavních tříd (každá třída má své podtřídy):

1. OXIDOREDUKTASY
2. TRANSFERASY
3. HYDROLASY
4. LYASY

5. ISOMERASY
6. LIGASY

Obecná charakteristika jednotlivých skupin:

AD1) OXIDOREDUKTASY

Katalyzují redoxní přeměny substrátů – používají k tomu různé mechanismy:

- přenos elektronů (např. cytochrom-c-oxidasa)
- přenos dvou atomů H (např. dehydrogenasy)
- zabudování atomu O do substrátu (např. monoxygenasy, dioxygenasy)

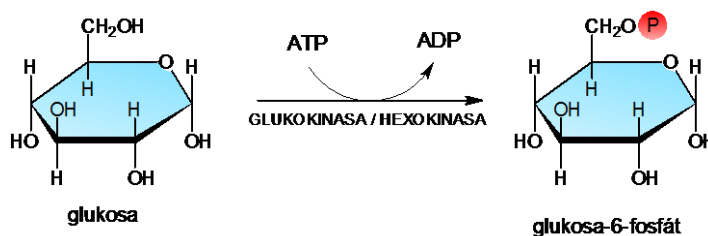
Příklady viz výše (uvedené hydrogenace)

AD2) TRANSFERASY

Transferasy katalyzují přenos skupin z jednoho substrátu na druhý. Tyto skupiny mohou být malé (methyl, aminoskupina, glukosa) i velké (např. nukleotidy...).

Jednou podtřídou transferas jsou **kinasy**, které katalyzují **přenos fosforylové skupiny $-PO_3^{2-}$ z ATP na $-OH$ skupinu substrátu.**

Např. fosforylace glukosy:



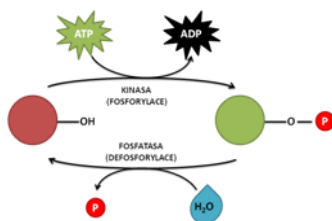
AD3) HYDROLASY

Hydrolasy mají za úkol **štěpit vazby vzniklé kondenzací** za pomoci molekul **vody**. Následující tabulka uvádí několik příkladů:

Tabulka 2 - Účinek hydrolas

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

*Poznámka: Je velice důležité rozlišovat **kinasy** (přenos fosforylové skupiny) a **fosfatasy** (hydrolasy odstraňující fosfát):*

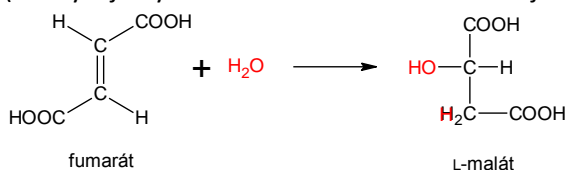


AD4) LYASY

Jedná se o další skupinu enzymů, které **štěpí různé typy vazeb**, avšak jejich štěpení je **nehydrolytické**. Navíc vytvářejí vazby C-C, C-O a C-N.

Ze substrátu odštěpují, nebo do něj vnášejí malou molekulu (CO₂, H₂O...).

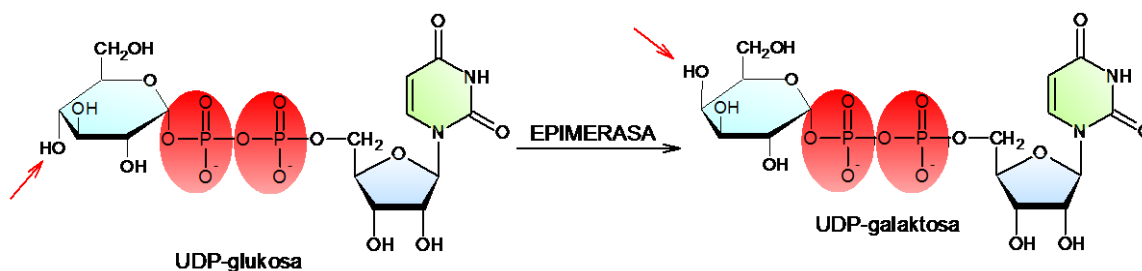
Např. fumaráthydratasa (katalyzuje hydrataci fumarátu – vnáší do něj vodu)



AD5) ISOMERASY

Katalyzují **intramolekulové přesmyky atomů**.

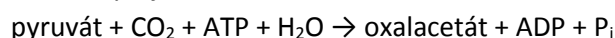
Např. **glukosa-4-epimerasa** přemění UDP-glukosu na UDP-galaktosu:



AD6) LIGASY

Ligasám se někdy též říká **synthetasy**. Katalyzují **vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu makroergní sloučeniny** (nejčastěji ATP).

Např. **pyruvátkarboxylasa** katalyzuje reakci:



Praktické poznámky:

Enzymy, které mají co do činění s fosfátem:

Enzym (třída)	Schéma reakce Typ reakce
Kinasa (transferasa)	substrát-OH + ATP → substrát-O-P + ADP fosforylace = přenos fosforylu na substrát
Fosfatasa (hydrolasa)	substrát-O-P + H ₂ O → substrát-OH + P _i hydrolýza fosfoesterové vazby
Fosforylase (transferasa)	(glykogen) _n + P _i → (glykogen) _{n-1} + glukosa-1-P fosforolýza = štěpení O-glykosidové vazby pomocí P _i (transfer glykosylu na P _i)

„Lýza“ třikrát jinak:

„Lýza“	Popis
Hydrolýza	štěpení substrátu vodou, velmi časté v GIT, např:

	sacharosa + H ₂ O → glukosa + fruktosa (škrob) _n + H ₂ O → (škrob) _{n-2} + maltosa
Fosforolýza	štěpení O-glykosidové vazby fosfátem: (glykogen) _n + P _i → (glykogen) _{n-1} + glukosa-1-P
Thiolýza	štěpení vazby C-C sírou z koenzymu A (skupina –SH) např. při β-oxidaci MK nebo při štěpení ketolátek R-CH ₂ -CO-CH ₂ -CO-SCoA + CoA-SH → RCH ₂ -CO-SCoA + CH ₃ -CO-SCoA

3.3 Kofaktory enzymů

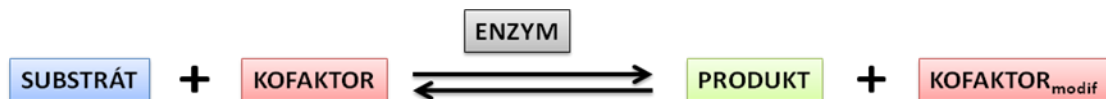
Kofaktory jsou **nízkomolekulární neproteinové sloučeniny**, které se podílejí na funkční specifičnosti enzymů. Většinou se podílejí na přenosu:

- 2H nebo e⁻ (oxidoreduktasy)
- jiných skupin (transferasy)

Kofaktory rozlišujeme na:

- a) **prostetické skupiny** (jsou **pevně** navázány k enzymu)
- b) **koenzymy** (kosubstráty; jsou vázány volně/dočasně)

Podíváme-li se na obecný průběh enzymové reakce, můžeme říct, že se jí **účastní tři hlavní složky: substrát(y) + enzym + kofaktor**



Substráty jsou většinou **nízkomolekulární látky**, stejně jako **kofaktory**. Právě s kofaktory substráty reagují, přičemž dochází k jejich přeměně na **produkty** a k **modifikaci kofaktory**.

Enzymy jsou vysokomolekulární látky a jejich úkolem je **koordinovat a urychlovat reakci**.

(Vše má ale své výjimky a některé reakce probíhají bez kofaktoru – např. reakce hydrolas; jindy jsou zase substráty vysokomolekulárními látkami).

V dalším textu se budeme věnovat podrobněji vybraným kofaktorům jednotlivých enzymových skupin.

A) Kofaktory oxidoreduktas

Tabulka 3 - Kofaktory a vitaminy oxidoreduktas

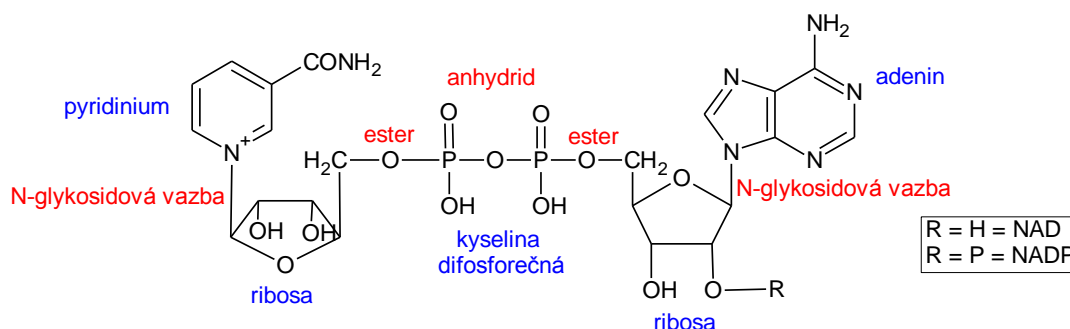
Vitamin	Kofaktor	Funkce kofaktoru
niacin	NAD ⁺	akceptor 2H ³
niacin	NADPH+H	donor 2H
riboflavin	FAD, FMN	akceptor 2H
vznikají v lidském těle (nepotřebují vitamin)	tetrahydrobiopterin	donor 2H
	molybdopterin	přenos elektronů
	lipoát	akceptor 2H
	ubichinon	přenos 2 elektronů (a 2H ⁺)
	hem cytochromů	přenos 1 elektronu
	nehemové železo a síra	přenos 1 elektronu
	2 GSH (glutathion)	donor 2H

³ Rozlišujeme od sebe donory 2H (=redukční činidla) a akceptory 2H (=oxidační činidla) od donorů H⁺ (=kyselin) a akceptorů H⁺ (bází).

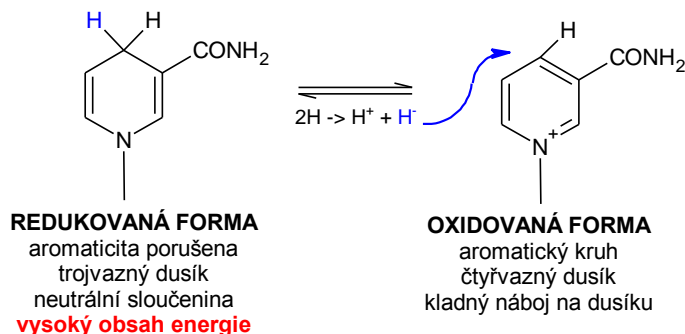
Kofaktory oxidoreduktas se vždy mohou vyskytovat **buď ve své redukované formě**, nebo ve své **oxidované formě**. Oxidovaná a redukovaná forma tvoří **redoxní pár** charakterizovaný hodnotou E° (pH=7,00).

NAD⁺

NAD⁺ slouží jako **dehydrogenační činidlo**. Zkratka NAD se odvozuje z názvu **nikotinamidadenindinukleotid**, znaménko plus se udává proto, že v molekule NAD⁺ se vyskytuje **čtyřvázný dusík**, který je kladně nabitý.



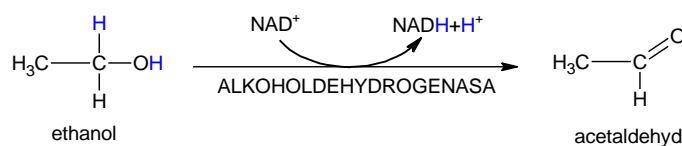
NAD⁺ je kofaktorem enzymů **dehydrogenas**. Ze substrátu odjímá 2H (2H = H⁺ + H⁻). Jeden vodík v podobě **hydridového aniontu (H⁻)** se napojí do *p*-polohy pyridinového kruhu a druhý vodík se ve formě **protonu (H⁺)** uvolní do prostředí (resp. naváže na enzym; proto se redukovaná forma zapisuje jako NADH+H⁺).



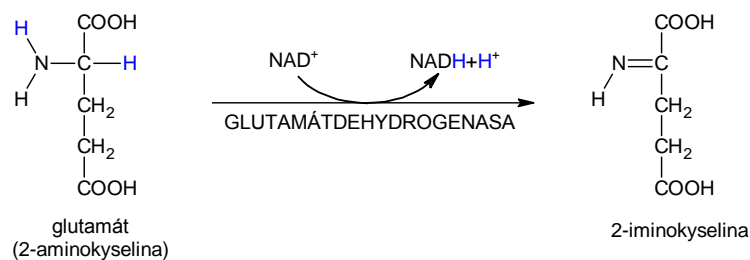
Dehydrogenasy, které mají jako kofaktor NAD⁺, způsobují **vznik dvojně vazby** mezi skupinami (atomy):

- -CH₂OH (primární alkoholová skupina)
- >CHOH (sekundární alkoholová skupina)
- >CHNH₂ (sekundární aminová skupina)

Př. 1 Dehydrogenace etanolu (alkoholdehydrogenasa)



Př. 2 Dehydrogenace glutamátu (glutamátdehydrogenasa)



Příklady NAD^+ -dependentních enzymů (též zvaných **pyridinové dehydrogenasy**):

Tabulka 4 - 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

$\text{NADPH}+\text{H}^+$

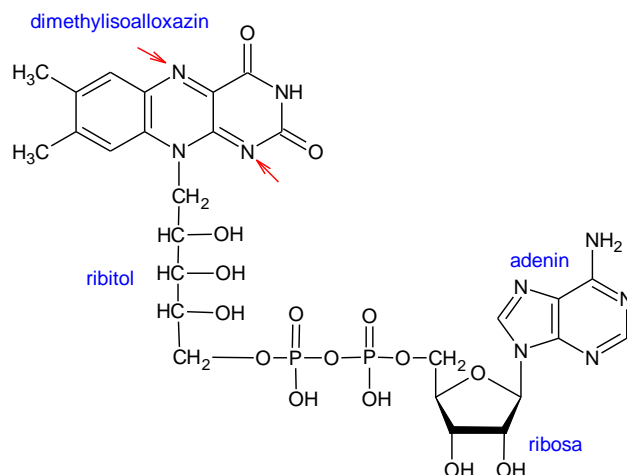
Oproti NAD^+ , je $\text{NADPH}+\text{H}^+$ **hydrogenačním činidlem** (tedy donorem 2H). Účastní se:

- různých **redukčních syntéz** (např. syntéza mastných kyselin a cholesterolu)
- **regenerace GSH v erytrocytech**
- jako **koreduktant** různých **hydroxylačních reakcí**⁴
 - obecně: $\text{R-H} + \text{O}_2 + \text{NADPH}+\text{H}^+ \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$
 - **příklady:**
 - cholesterol → žlučové kyseliny
 - kalcinol → kalcitriol
 - xenobiotikum → hydroxylované xenobiotikum

FAD

FAD je podobně jako NAD^+ **dehydrogenační činidlo**, zkratka pochází z názvu flavinadenindinukleotid.

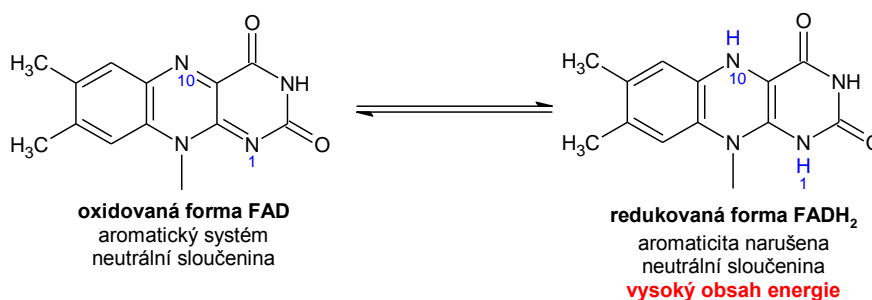
⁴ Hydroxylační reakce jsou **monooxygenasové reakce** – do molekuly substrátu se vnáší pouze jeden z atomů kyslíku. Druhý atom kyslíku je potřeba odstranit, čehož se chopí $\text{NADPH}+\text{H}^+$ tak, že věnuje své dva vodíky a umožní vznik **vody**.



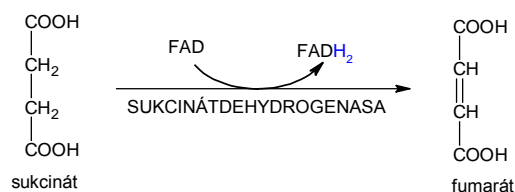
Jedná se rovněž o **kofaktor dehydrogenas**, konkrétněji se jedná o **prostetickou skupinu** (flavinové kofaktory jsou pevně vázány na enzym a **většinou se vyskytují na vnitřní mitochondriální membráně**).

Katalyzují **vznik dvojné vazby** mezi **dvěma uhlíky** ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \rightarrow -\text{CH}=\text{CH}-$). Odtržené 2H se vážou na **dusíky riboflavinu** (naznačeno **červenými šipkami**).

Redoxní pár kofaktoru:

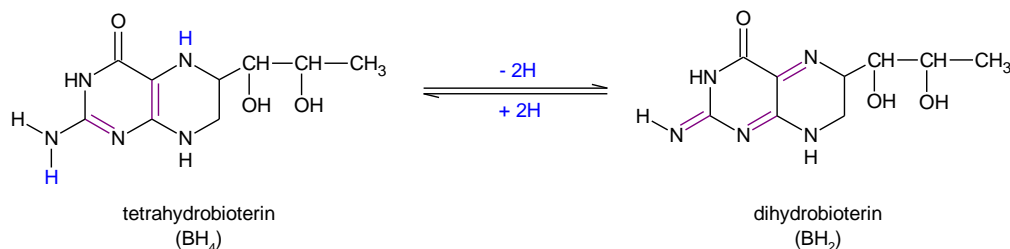


Př. Dehydrogenace **sukcinátu na fumarát (flavinová dehydrogenasa)**

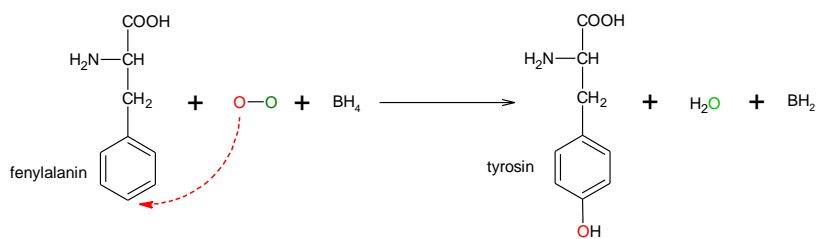


Tetrahydrobiopterin (TH₄)

Tetrahydrobiopterin je **hydrogenační činidlo**, účastní se **hydroxylačních reakcí**, při nichž poskytuje dva vodíky, které „odstraní“ nepoužitý druhý atom kyslíku ve formě vody (podobně jako u NADPH+H⁺). Po odevzdání 2H (oxidaci) se přeměňuje na **dihydrobiopterin**.

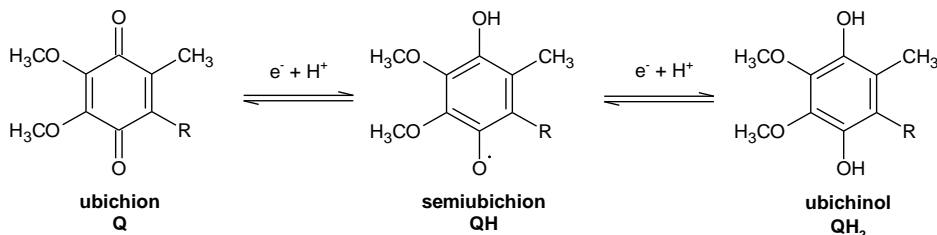


Účastní se např. **hydroxylace fenylalaninu na tyrosin**



Koenzym Q (ubichinon)

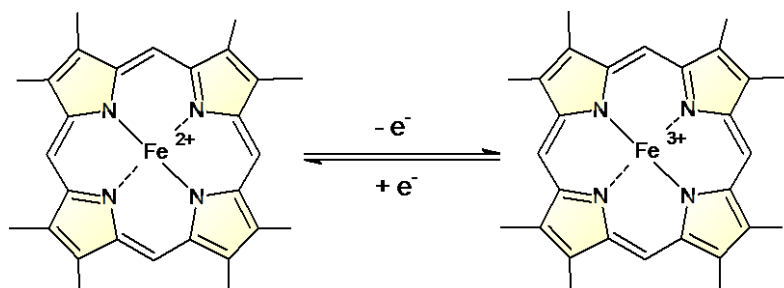
Koenzym Q je derivátem 1,4-benzochinonu a je důležitou součástí dýchacího řetězce. Je schopen postupně přijmout **dva elektrony** (pochází z živin) a **dva protony** (pochází z matrix mitochondrie), čímž se postupně redukuje na **semiubichinon a ubichinol**.



*Poznámka: R ve vzorci je 50C dlouhý isoprenoidní řetězec, který ubichinonu uděluje **lipofilní charakter** a ukotvuje jej v membráně.*

Hem cytochromů

Hemy cytochromů **přenášejí jeden elektron** – nastává reverzibilní přechod mezi Fe^{2+} a Fe^{3+} .

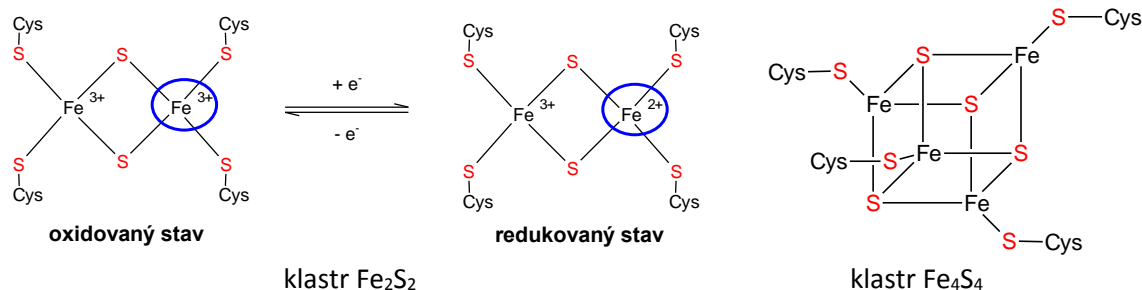


Cytochromy jsou hemové proteiny, které jsou významnou složkou dýchacího řetězce.

Nehemové železo a síra

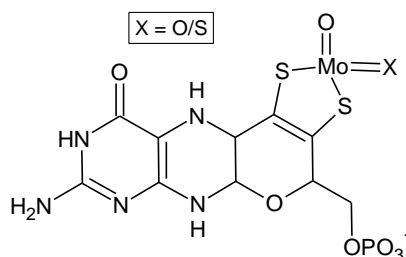
Proteiny se železem a sírou jsou rovněž významnou složkou dýchacího řetězce, jejich úkolem je přenášet jeden elektron. I když obsahují více iontů železa (jejich oxidační číslo by se mohlo měnit), mění se vždy oxidační číslo **jen jednoho atomu**.

Nehemové železo a síra tvoří klastry Fe_2S_2 nebo Fe_4S_4 (podrobněji viz *Dýchací řetězec*).



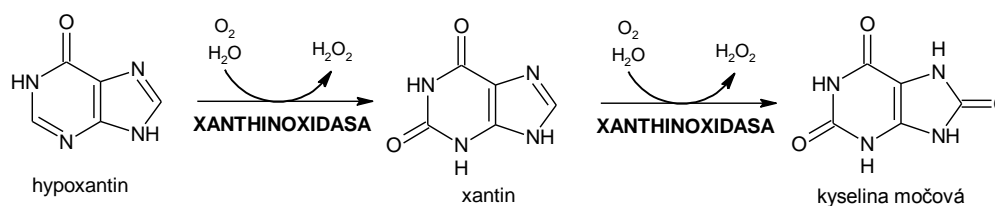
Molybdopterin

Molybdopterin obsahuje ve své molekule pteridin, na který je navázán **heterocyklus obsahující molybden**.



Jedná se o **kofaktor oxygenas**, např. **xanthinoxidasy**, či **sulfitoxidasy**.

Př. Reakce katalyzovaná xanthinoxidasou (**oxygenace purinů**)



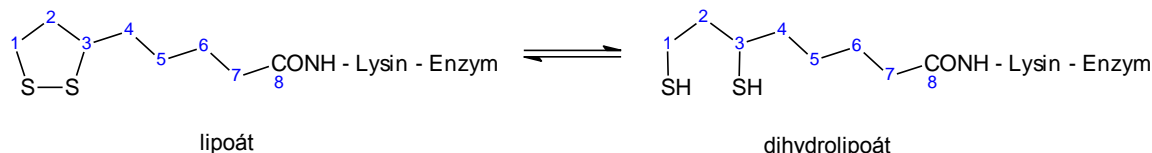
Př.2 Sulfitoxidasa katalyzuje vznik **síranového aniontu (sulfátu)**:

–SH skupina cysteinu je odbourána na HSO_3^- , který je oxidován na SO_4^{2-} (při této oxidaci vznikají i protony, které okyselují vnitřní prostředí).

Lipoát

Lipoát je **cyklický disulfid**, systematickým názvem 1,2-dithiolan-3-pentanová kyselina. Na enzym je napojen **amidovou vazbou** na **lysin**.

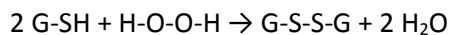
Po přijetí 2H, dojde k otevření cyklu a ke vzniku dvou –SH skupin:



Lipoát je **jedním z kofaktorů komplexu oxidační dekarboxylace 2-oxokyseliny** (např. pyruvátu)

Glutathion

Jedná se o tripeptid složený z glutamátu, cysteinu a glycinu, systematický název zní **γ-glutamylcysteinylglycin**. Jedná se o kofaktor enzymu **glutathionperoxidasy** (což je enzym obsahující selenocystein), která má za úkol **redukovat peroxidy na vodu**.



*Praktická poznámka: sloučeniny obsahující –SH skupinu mají **vždy redukční vlastnosti**.*

B) Kofaktory transferas

Tabulka 5 - Kofaktory a vitaminy transferas

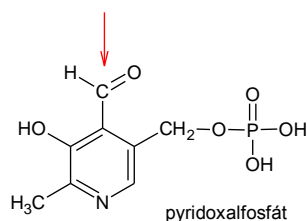
Vitamin	Kofaktor	Přenášená skupina
-----	ATP	$-\text{PO}_3^{2-}$
-----	PAPS	$-\text{SO}_3^{2-}$
listová kyselina	tetrahydrofolát (H_4F)	jednouhlíkaté skupiny

biotin	karboxybiotin	CO ₂
thiamin	thiamindifosfát (TDP)	„aktivní aldehyd“
pyridoxin	pyridoxalfosfát	-NH ₂
pantothenová kyselina	CoA-SH	acyl
-----	dihydrolipoát	acyl
[methionin]	SAM	-CH ₃
kyanokobalamin	methylkobalamin	-CH ₃

Všechny kofaktory transferas mají společné to, že jsou na sebe schopny navázat jistou skupinu a přenést ji na jinou molekulu.

Pyridoxalfosfát

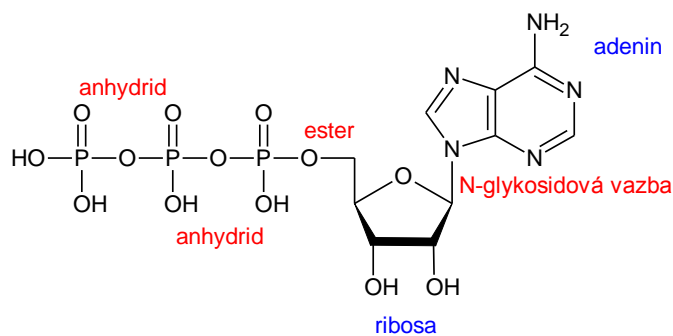
Pyridoxalfosfát je kofaktorem transaminas – podílí se na přenosu -NH₂ skupiny z aminokyseliny na 2-oxokyselinu (*reakce se odehrává na skupině označené červenou šipkou; pro přesný popis reakce viz Metabolismus AK*).



ATP (adenosintrifosfát)

ATP je sloučenina, která má dvojitý význam:

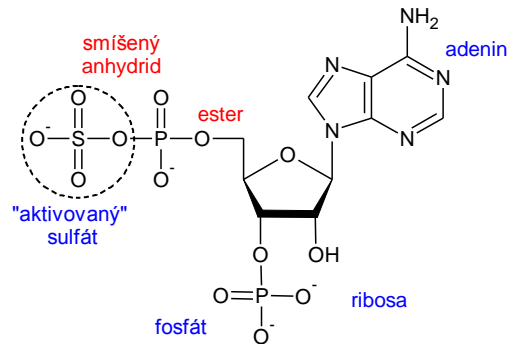
- jako makroergní sloučenina** je schopná **odávat energii** do endergonních procesů
- slouží jako **kofaktor kinas** (tedy jako **fosforylační činidlo**)



Jako kofaktor kinas katalyzuje přenos -PO₃²⁻ (fosforylové) skupiny.

PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát)

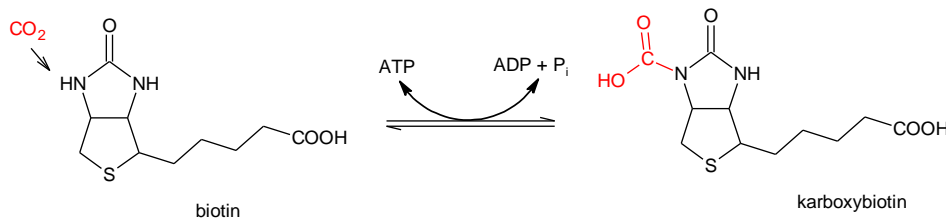
PAPS slouží jako **sulfatační činidlo**. Ve své molekule obsahuje **smíšený anhydrid kyseliny fosforečné a kyseliny sírové**.



Katalyzuje **esterifikaci** –OH skupin kyselinou sírovou.

Karboxybiotin

Jedná se o **kofaktor karboxylačních reakcí**. Aby bylo možné nějakou skupinu karboxylovat, je nutné nejprve **napojit oxid uhličitý na biotin** (tato reakce vyžaduje energii v podobě ATP), za vzniku **karboxybiotinu**, až po té, je možné –CO₂ skupinu přenášet na další sloučeniny.

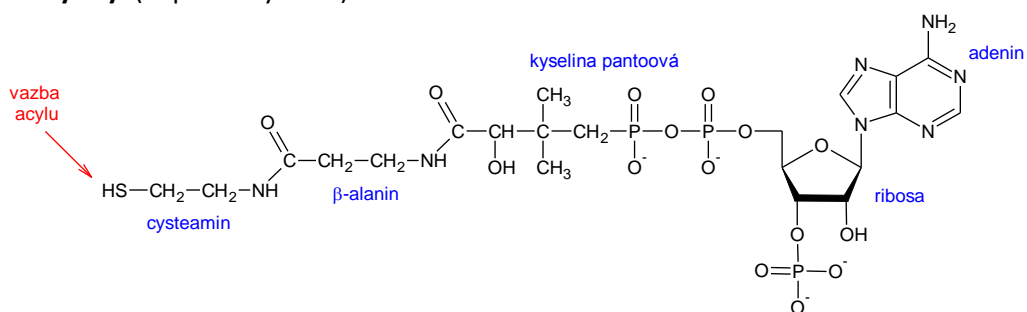


Karboxybiotin se účastní např. karboxylace pyruvátu na **oxalacetát**.

Pozor! Karboxylace není obrácením dekarboxylace! Karboxylace vyžadují karboxybiotin, dekarboxylace mohou probíhat spontánně (acetoacetát → aceton), nebo mohou být katalyzovány enzymově, přičemž se jich účastní **pyridoxalfosfát** (u AK) nebo **TDP** (u 2-oxokyselin)!

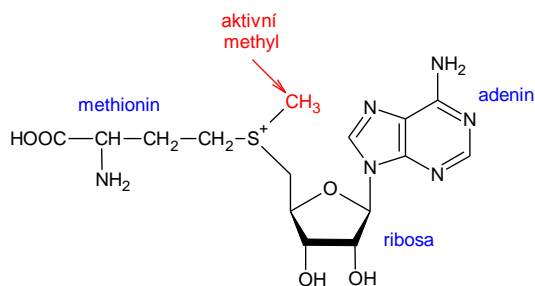
Koenzym A (CoA-SH)

Koenzym A přenáší **acyly vázané na atomu síry thioesterovou vazbou**. Acyl-CoA je tzv. **aktivovaný acyl** (např. acetyl-CoA).



SAM (S-adenosylmethionin)

Kofaktor **metylačních enzymů** – přenáší tzv. **aktivní methyl** navázaný na **sulfonovém kationtu** (trojvazné síře). Trojvazná síra vzniká tak, že se **methionin** naváže na pátý uhlík ribosy právě přes síru.



Účastní se např. přeměny **fosfatidylethanolamin** → **fosfatidylcholin**.

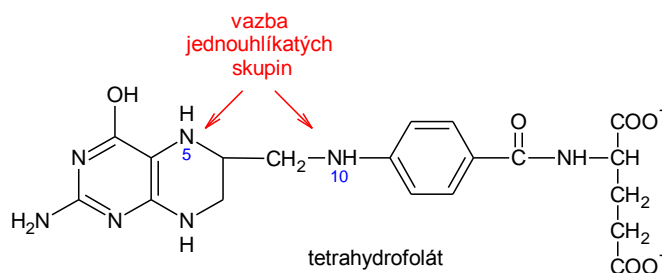
Po předání methylu, dojde k odštěpení **homocysteinu** od ribosy (homocystein se od methioninu liší právě oním odevzdaným methylem).

H₄F (H₄-folát; tetrahydrofolát)

Jedná se o přenašeč **jednouhlíkatých skupin**:

- **methylu** (–CH₃) (vznik: metabolismus **methioninu** přes SAM)
- **methylenu** (–CH₂–) (vznik: katabolismus **serinu** a **glycinu**)
- **formylu** (–CHO) (vznik: katabolismus **tryptofanu**)
- **formiminoskupiny** (–CH=NH) (vznik: katabolismus **histidinu** (**FIGLU**))
- **methenyly** (–CH=) (vznik: katabolismus **histidinu**)

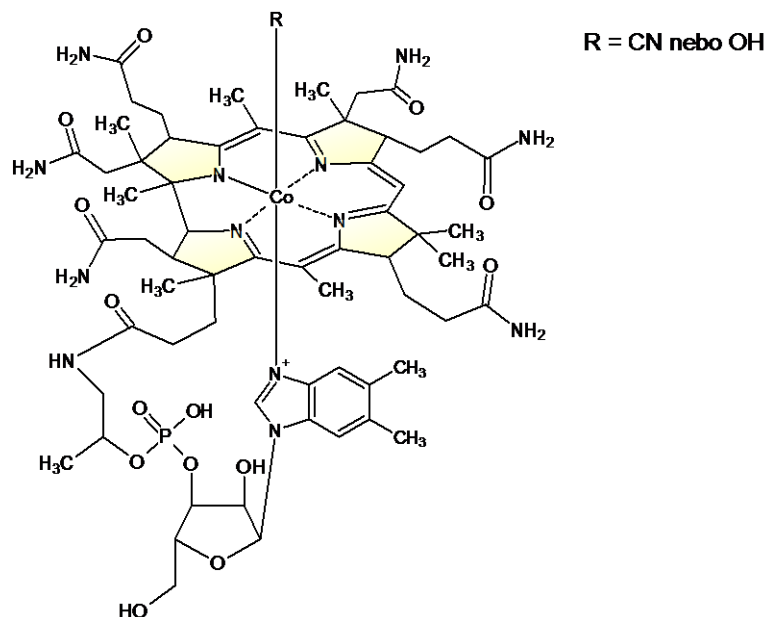
Jednouhlíkaté fragmenty se vážou na dusíky 5 a/nebo 10.



Tetrahydrofolát se uplatňuje při **syntéze purinů** a při **metylaci uracilu**.

Methylkobalmin

Methylkobalamin vzniká z vitamínu B₁₂ (=buď **kyanokobalamin** nebo **hydroxokobalmin**).



Poznámka: Povšimněme si, že vitamin B₁₂ ve své struktuře obsahuje **korinový cyklus**.

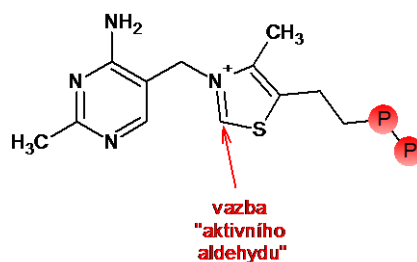
Methylkobalamin je důležitý pro:

- **regeneraci methioninu** (provádí S-methylaci přidáním **methyly**, který předtím získal z tetrahydrofolátu)
- **regeneraci tetrahydrofolátu** (odebírá **methyl** z methyl-tetrahydrofolátu, čímž jej zregeneruje na tetrahydrofolát)
- průběh reakce **propionyl-CoA → sukcinyl-CoA**

Poznámka: Hydroxokobalmin se využívá při otravě kyanidy (váže kyanidové ionty a přeměňuje se na netoxický kyanokobalmin).

TDP (thiamindifosfát)

Thiamin difosfát vzniká **napojením dvou fosfátů** na **thiamin** (tedy vitamin B₁). Je přenašečem tzv. **aktivního aldehydu**.



TDP je jeden z kofaktorů **oxidační dekarboxylace 2-okyselin** (stejně jako lipoát), např. pyruvátu na acetyl-CoA a 2-oxoglutarátu na sukcinyl-CoA.

3.4 Mechanismus enzymové reakce

Doposud jsme se bavili o obecných vlastnostech enzymů, jejich názvosloví, klasifikaci a kofaktorech. Moc jsme si toho ale neřekli o tom, jak přesně probíhá enzymem katalyzovaná reakce a co se při ní odehrává – to je naším úkolem nyní.

A) Aktivní místo enzymu

Substráty se při reakci vážou do **tzv. aktivního místa enzymu**. Jedná se o malou část molekuly, jejíž podoba je udána **trojrozměrným uspořádáním aminokyselin** (toto uspořádání je ovlivněno tím, jaké AK se v aktivním místě nacházejí – jejich skupiny se mohou odpuzovat nebo přitahovat). Obecně lze rozlišit:

- a) tvar **hluboké štěrbiny** (např. **amylasa**)
- b) tvar **povrchové prohlubně**

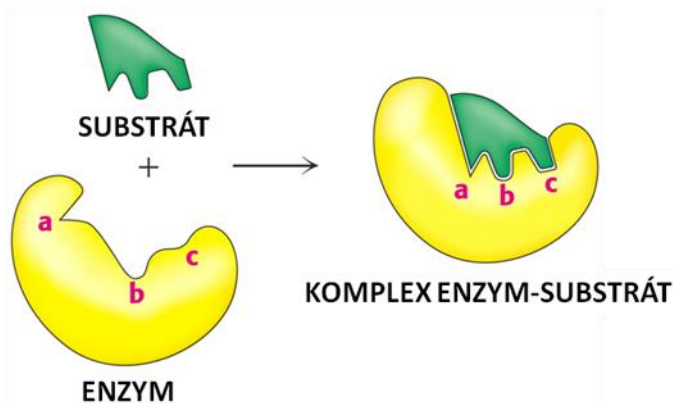
Důležité je uvědomit si, že na stavbě aktivního místa se mohou podílet AK, které jsou od sebe v primární struktuře velice vzdáleny (při úpravě enzymu do jeho konečné terciární struktury se k sobě tyto AK mohou přiblížit).

Aktivní místo není rigidní struktura – může se přizpůsobit tvar substrátu, pro který je určeno.

B) Teorie indukovaného přizpůsobení

Teorie indukovaného přizpůsobení se týká **vazby substrátu na enzym**. Vychází z výše uvedeného faktu, že aktivní místo má možnost trochu pozměnit svou konformaci, která umožní vazbu substrátu a průběh reakce.

Po přiblížení substrátu k aktivnímu místu enzymu, **vyvolá substrát odpovídající konformační změnu** v aktivním místě a napojí se na enzym, čímž se vytvoří **komplex enzym-substrát (ES)**:



Vazbu substrátu v aktivním místě je poměrně slabá.

C) Počet substrátů

Počet substrátů, které se reakce účastní, ovlivňuje **katalytický mechanismus** působení enzymu.

Monosubstrátové reakce probíhají podle následujícího schématu:



Substrát se naváže na enzym, přemění se na produkt a oddělí se od enzymu.

Dvousubstrátové reakce probíhají následujícím způsobem:



Uvědomme si, že druhým substrátem reakce je ve velkém množství případů **kofaktor**.

Průběh **dvousubstrátových reakcí** může být dvojitý, rozlišujeme:

- a) **sekvenční reakce**
 - a. **uspořádané**
 - b. **nahodilé**
- b) **ping-pongové reakce**

Při **sekvenční reakci** se **oba substráty navážou na enzym**, pak proběhne chemická přeměna a následně uvolnění produktů.

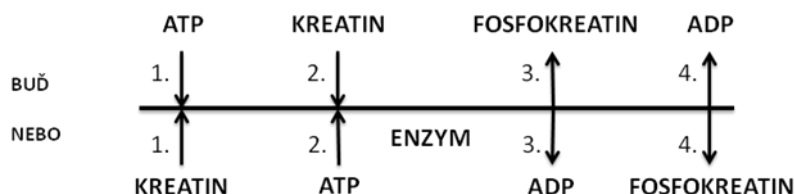
Je-li **sekvenční reakce uspořádaná**, napojují se substráty na enzym v určitém pořadí a stejně tak se z něj v určitém pořadí uvolňují produkty.

Např. Přeměna pyruvátu na laktát:



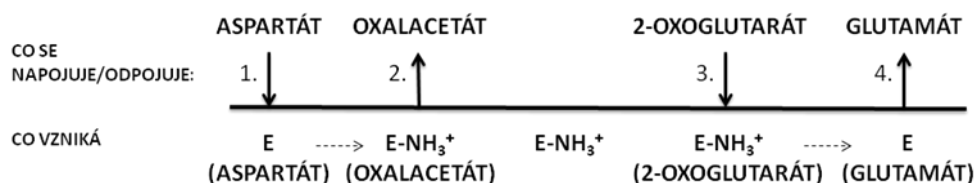
Je-li **sekvenční reakce nahodilá**, je jedno, v jakém pořadí se substráty napojují. Reakce proběhne v obou případech.

Např. Vznik fosfokreatinu:



Při **ping-pongových reakcích**, které jsou typické pro **aminotransferasy**, dojde k navázání jednoho substrátu, jeho přeměně, uvolnění (*na enzymu většinou zůstane část molekuly prvního substrátu, která má být přenesena na druhý substrát*) a následně k tomu stejnému s druhým substrátem.

Např. Transaminace:



D) Katalytické skupiny aktivního místa

Chemickou přeměnu v aktivním místě **katalyzují katalytické skupiny** pocházející z aminokyselin, které aktivní místo tvoří.

Rozlišujeme katalytické skupiny:

- a) **nukleofilní** (cystein-SH, serin-OH)
- b) **kyselé** (aspartát, glutamát)
- c) **bazické** (histidin, arginin, lysin)

Podle charakteru katalytické skupiny pak probíhají reakce různými mechanismy:

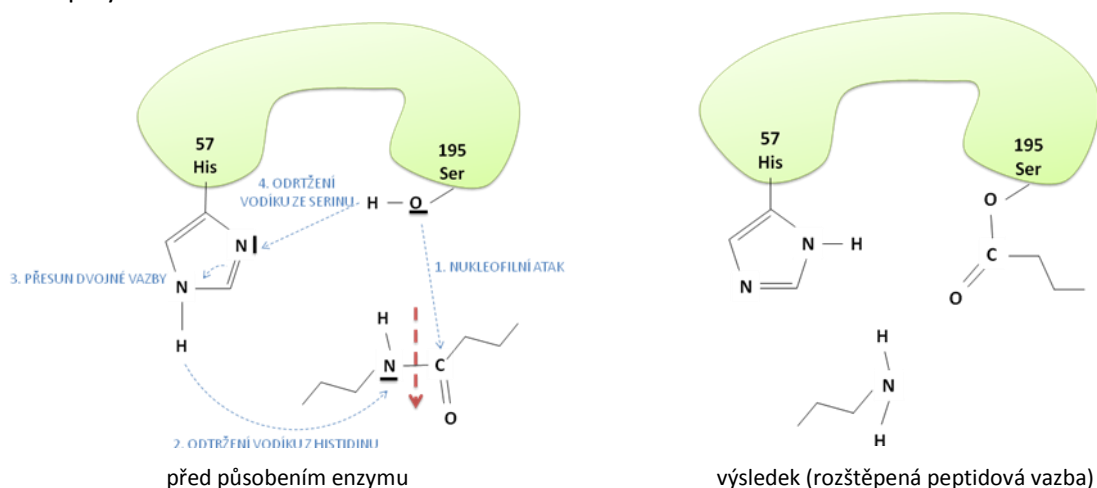
- a) **acidobazické reakce** (přenáší se **proton**)
- b) **vytvoření přechodné kovalentní vazby**
- c) **katalýza kovovým iontem** (metaloenzymy)

d) **elektrostatické interakce** (bez vody)

e) **deformace substrátu**

Fungování katalytických skupin si vysvětlíme na příkladu **chymotrypsinu**, enzymu, který štěpí peptidovou vazbu.

V jeho aktivním místě se nachází **histidin** (poloha 57) a **serin** (poloha 195). –OH skupina serinu provede nukleofilní atak na karbonylový uhlík peptidové vazby. Tím se s ním spojí a oddělí jej od dusíku, který se na sebe naváže vodík z histidinu. Aby vodík histidinu nechyběl, sebere si jej od –OH skupiny serinu.



3.5 Metaloenzymy

Metaloenzymy obsahují ve své molekule **kovové ionty**. Můžeme rozlišit dvě skupiny enzymů:

- enzymy, které obsahují **funkční kovové ionty**, které se přímo účastní katalyzované reakce (v tomto případě jsou ionty kovů na enzym **pevně navázány**)
- enzymy, které potřebují ionty kovů **pouze k aktivaci** (v tomto případě jsou ionty kovů na enzym **navázány slabě**; většinou se jedná o **dvojmocné ionty** jako Ca^{2+} u koagulačních faktorů, nebo Mg^{2+} některých kinas)

Kation kovu je součástí tzv. **ternárního komplexu** (tj. komplexu obsahujícího tři složky):

- **enzym** (Enz)
- **substrát** (S)
- **kationt kovu** (M)

V komplexu mohou být složky různě napojeny:

- Enz-S-M
- Enz-M-S

Podle způsobu napojení mohou vznikat i **cyklické komplexy**, případně **chaláty**.

Ionty kovu mohou reakci katalyzovat různými mechanismy:

- do svých vakantních orbitalů přijmou elektronový pár nukleofilu, čímž vznikne σ -vazba
- napojí se na vhodné skupiny enzymu či substrátu (**vytvoří chelát**), čímž deformují jejich strukturu, což se může projevit jako **pnutí**, které usnadní chemickou přeměnu (tj. *napjaté molekuly jsou méně stabilní – je snazší na ně něco napojit, nebo z nich něco odebrat*)
- kolem každého kationtu kovu je jistá **koordinační sféra**, která působí jako **trojrozměrný templát**, což může sloužit pro **stereospecifickou kontrolu** (tj. *kov upraví aktivní místo enzymu tak, že bude odpuzovat jednu z konformací a do reakce vpustí jen tu správnou konformaci*).

Kationty kovů, které se uplatňují v metaloenzimech:

Molybden

Je součástí některých **oxidoreduktas** – např. může být složkou kofaktoru **molybdopterinu**.

Ten je kofaktorem: **xanthinoxidasy** (xantin → kyselina močová)
sulfitoxidasy ($\text{HSO}_3^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$)

Zdroje molybdenu: luštěniny, celozrnné obiloviny

Zinek

Zinek je součástí velkého množství enzymů, např:

- alkoholdehydrogenasa (ethanol → acetaldehyd)
- karbonátdehydratasa ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$)
- karboxypeptidasy (štěpení polypeptidů od C-konce)
- Cu,Zn-superoxiddismutasa (**cytosolová izoforma SOD**; $2 \cdot \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$)

Zdroje zinku: červené maso, koryši, luštěniny, slunečnicová a dýňová semínka, celozrnné obilniny

Měď

Je součástí mnoha **oxidoreduktas**:

- ceruloplazmin (též ferroxidasa; $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)
- cytochrom-c-oxidasa (DŘ, přenos elektronů na kyslík)
- monoaminoxidasy (MAO; aktivují biogenní aminy přeměnou na aldehydy; vzniká H_2O_2)
- dopaminhydroxylasa (dopamin → noradrenalin)
- lisyloxidasa (vyzrávání kolagenu; lysin → allysin)

Zdroje mědi: játra, maso, kakao, luštěniny, ořechy

Mangan

Je součástí **hydroxylas, dekarboxylas a transferas**.

- Mn-superoxiddismutasa (**mitochondriální forma SOD**)
- arginasa (arginin → močovina + ornithin)
- syntéza proteoglykanů a glykoproteinů

Zdroje manganu: luštěniny, celozrnné obilniny, ořechy

Železo

Je součástí **hemových enzymů**, či **nehemových přenašečů** elektronů.

- katalasa (hem; $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$)
- myeloperoxidasa (hem; neutrofil; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}$)
- cytochromy (hem; přenašeče elektronů v DŘ)
- Fe-S proteiny (**nehem**; přenašeče elektronů v DŘ)

Zdroje železa: výrobky z vepřové, husí a kachní krve, (červené) maso, játra, žloutek, ořechy

Selen

Selen obsahuje několik enzymů, které obsahují ve své molekule AK **selenocystein**. Účastní se **redoxních reakcí**.

- glutathionperoxidasa ($2 \text{GSH} + \text{H-O-O-H} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{G-S-S-G}$)
- dejodasy thyroninů (tyroxin T4 → trijodthyronin T3)
- thioredoxin reduktasy (ribosa → deoxyribosa)

- selenoprotein P (plazma; antioxidační funkce)

Zdroje selenu: hlavonožci, mořské ryby, luštěniny

3.6 Kinetika enzymových reakcí

Kinetika je oblast chemie, která se zabývá tím, jak reakce probíhají. Základní veličinou v tomto ohledu bude **rychlost chemické reakce (reakční rychlost)**, která je dána jako **úbytek koncentrace substrátu za určitý čas**, respektive **příbytek koncentrace produktů za určitý čas** (obecně řečeno: změna koncentrační složky za čas).

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{s}} \right]^5$$

Jedná se o vždy kladnou veličinu, jejíž jednotkou je **mol/l·s**.

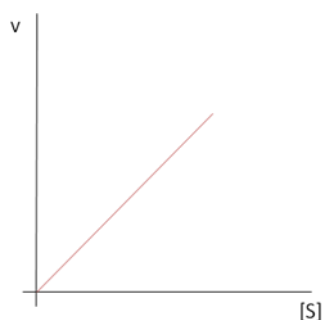
Další možností, jak rychlost reakce vyjádřit, je využití **kinetické rovnice**, která udává **závislost reakční rychlosti na koncentraci reaktantů**.

Pro reakci **S → P** je její tvar následující:

$$v = k \cdot [S] = k \cdot [S]^1$$

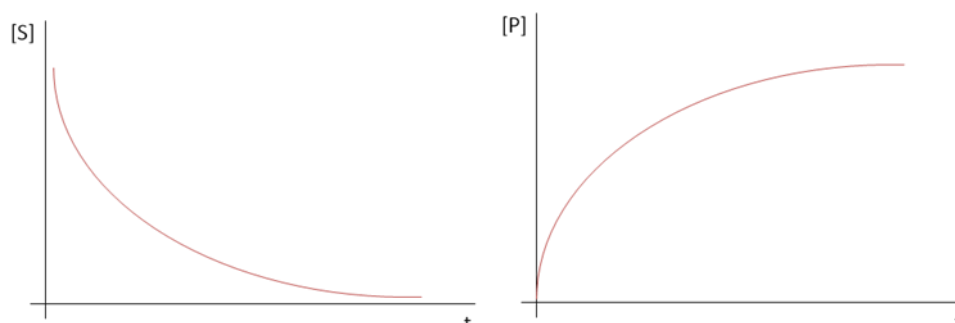
kde **k** je **rychlostní konstanta**.

Index „na prvou“ u koncentrace substrátu udává řád reakce – **jedná se tedy o reakci 1. řádu**, při níž je **rychlost reakce přímo úměrná koncentraci substrátu** (grafické znázornění závislosti velikosti rychlosti na koncentraci substrátu je přímka).



Během reakce dochází k **poklesu koncentrace substrátu** a k nárůstu **koncentrace produktu**. Při vynesení koncentrace (substrátu/produktu) na osu y a při vynesení času na osu x, získáme tzv. **kinetickou křivku**, která nám popisuje **časovou závislost koncentrace reaktantů na čase**.

Kinetická křivka se vždy týká pouze jedné reakce.



Z kinetické křivky je možné odvodit **rychlost chemické reakce** tak, že k ní vytvoříme tečnu, zvolíme si čas 1 a čas 2 a k nim odpovídající hodnoty koncentrace, které následně odečteme

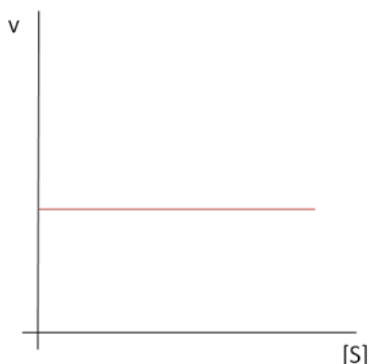
⁵ Tato definice platí pro průměrnou rychlost, pro výpočet okamžité rychlosti bychom museli vycházet z **derivací**, tedy nekonečně malých čísel.

(získáme rozdíl času Δt a rozdíl koncentrace $\Delta[S]$ nebo $\Delta[P]$) a takto získané hodnoty pak vydělíme.

Zvláštním typem reakce je reakce **0. řádu**:

$$v = k \cdot [S]^0 = k \cdot 1 = k$$

Rychlost takovéto reakce **není závislá na koncentraci substrátu**, je konstantní a odpovídá **rychlostní konstantě**.



Reakce 0. řádu nastávají **při velkých nadbytcích substrátu** (tzn. jeho úbytek je prakticky zanedbatelný) a **v těle neprobíhají**. Je možné je uskutečnit pouze v laboratorních podmínkách.

Počáteční rychlost

Počáteční rychlost v_0 je rychlost změřená na začátku reakce, ještě dříve, než stihne vzniknout významnější množství produktu. **Jedná se o nejvyšší hodnotu rychlosti**, není ovlivněna úbytkem substrátu ani vratnou přeměnou produktu. **Stanovujeme ji z kinetických křivek**.

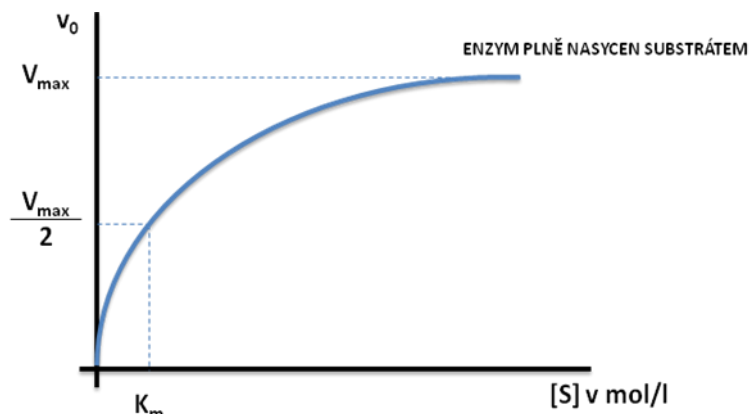
I počáteční rychlost je závislá na **koncentraci substrátu** – tuto závislost popisuje **rovnice Michaelise a Mentenové** (platí ale pouze pro jednosubstrátové reakce).

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

kde: V_{\max} je maximální rychlost (pro danou koncentraci **enzymu [E]**)

K_m je Michaelisova konstanta

Grafickým znázorněním rovnice Michaelise a Mentenové je saturační křivka (neplést s křivkou kinetickou!). Ta popisuje **závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu** a získává se tak, že **provedeme mnoho měření** se stále **stejnou koncentrací enzymu**, avšak **měníme koncentrace substrátu** (tímto způsobem získáme sadu kinetických křivek, ze kterých odečteme počáteční rychlosti a ty graficky zaznačíme k příslušným koncentracím substrátu). **Tvar saturační křivky odpovídá hyperbole**.



Z rovnice Michaelise a Mentenové vyplývají následující fakta:

- 1) **Je-li koncentrace enzymu [S] mnohem menší, než Michaelisova konstanta, řídí se reakce kinetikou prvního řádu**

Je-li $[S] \ll K_m$, lze rovnici zapsat takto:

$$v_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{\max}}{K_m} \cdot [S] = k \cdot [S]^1$$

- 2) **Je-li koncentrace enzymu [S] mnohem větší, než Michaelisova konstanta, řídí se reakce kinetikou nultého řádu**

Je-li $[S] \gg K_m$, lze zapsat rovnici takto:

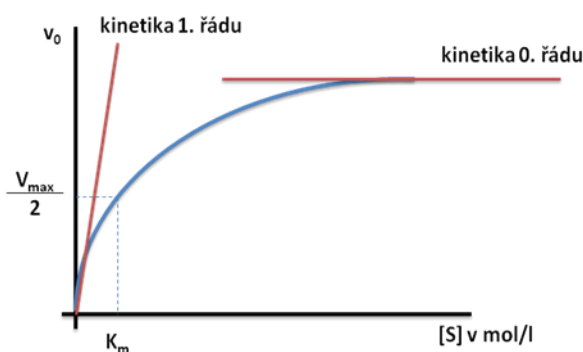
$$v_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S]} = V_{\max} \cdot 1 = k[S]^0$$

- 3) **Je-li koncentrace enzymu [S] rovna Michaelisově konstantě, probíhá reakce **polovinou maximální rychlosti****

Je-li $[S] = K_m$, lze zapsat rovnici takto:

$$v_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + [S]} = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2}$$

Výše popsané skutečnosti lze **znázornit i na saturační křivce**. Hodnota K_m ji více méně rozděljuje na dvě poloviny – v levé polovině běží reakce „kinetikou nultého řádu“, v pravé polovině běží „kinetikou prvního řádu“.



Michaelisova konstanta K_M

Rozměr Michaelisovy konstanty je stejný jako **rozměr koncentrace (mol/l)**, jelikož Michaelisova konstanta udává **koncentraci substrátu, při které reakce probíhá polovinou maximální rychlosti** (viz případ 3). To také znamená, že při této koncentraci substrátu je **enzym z poloviny nasycen**. Další význam Michaelisovy konstanty tkví v tom, že je **nepřímo úměrná afinitě enzymu pro daný substrát** (tzn., že existuje-li více strukturálně podobných substrátů, tak ten, který má **nejnižší hodnotu K_M** se považuje za **nejpřirozenější** pro daný enzym, tedy bude nejnáze podléhat reakci; lze říci, že jej „enzym bude preferovat“)

Hodnoty K_m a V_{max} charakterizují **kinetické vlastnosti enzymu**. Dají se snadno zjistit z linearizovaného grafu. Graf zlinearizujeme **dvojitým reciprokým vynesemím** podle Lineweaver-Burka. $1/v_0$ se vynášší proti $1/[S]$.

Matematicky lze reciproký vztah odvodit následovně:

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

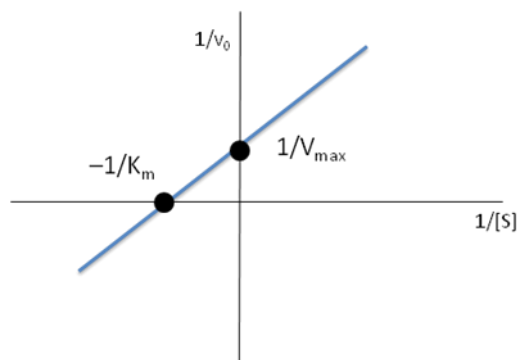
$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{[S] + K_m}{[S]} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(\frac{[S]}{[S]} + \frac{K_m}{[S]} \right)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Takto získaný vztah je již **rovnici přímky**, přičemž:

- $1/v_0$ je **závisle proměnná**
- $1/[S]$ je **nezávisle proměnná**
- K_M/V_{max} je **směrnice přímky**
- $1/V_{max}$ je **úsek na ose závisle proměnné**

Linearizovaný graf by vypadal následovně:



Koncentrace enzymu

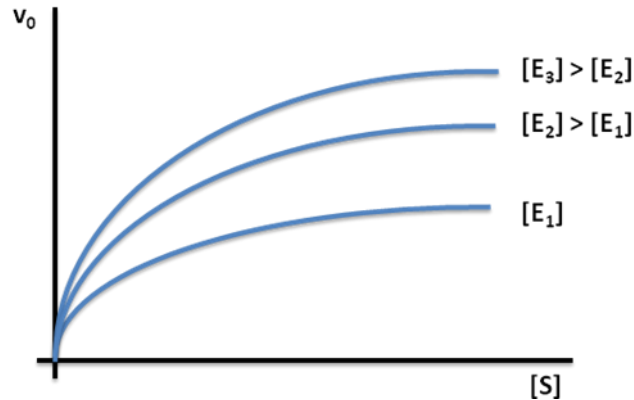
Doposud jsme se bavili o tom, jak koncentrace substrátu ovlivňuje průběh reakce. Ale průběh reakce je ovlivněn i **koncentrací enzymu**.

Počáteční rychlost je přímoúměrná celkové koncentraci enzymu:

$$v_0 = k \cdot [E]_t$$

kde: $[E]_t$ je celková (totální) koncentrace enzymu

Od koncentrace enzymu se odvíjí i tvar **saturační křivky**:



Povšimněme si, že enzym neovlivňuje hodnotu K_M , ale mění se hodnota V_{max} .

Stanovení množství enzymu v biologickém materiálu

Stanovit množství enzymu, nacházející se např. v krevním séru, je velmi obtížné hned z několika důvodů:

- ve vzorcích se nacházejí stopové koncentrace enzymů
- ve vzorcích se nachází velké množství dalších proteinů
- nelze využít běžné chemické důkazové reakce (nelze podle jejich výsledků rozlišit jednotlivé enzymy)

Pro stanovení množství enzymu v biologickém materiálu se užívají dva typy metod:

a) nepřímé stanovení

Při nepřímém stanovení **stanovujeme produkt enzymové reakce**.

Využíváme veličinu zvanou **katalytická koncentrace** ($\mu\text{katal/l}$).

Tímto způsobem se stanovuje většina klinicky významných enzymů.

b) přímé stanovení

Při přímém stanovení stanovujeme rovnou **množství enzymu** (označíme jej jako antigen, či imunochemicky).

Využíváme veličinu **hmotnostní koncentrace** ($\mu\text{g/l}$).

Tímto způsobem se stanovují jen některé specifické enzymy, např. *tumorové markery*.

Katalytická aktivita enzymu

Jedná se o veličinu, jejíž jednotkou je **katal** [$\text{kat} = \text{mol/s}$]. **Jeden katal je katalytická aktivita enzymu, při které se v reakci přemění jeden mol substrátu za jednu sekundu.**

Kromě katalu se pro vyjádření katalytické aktivity využívá i tzv. **mezinárodní jednotka IU** (*international unit*), kterou definujeme pomocí vztahu: **1 IU = $\mu\text{mol/min}$.**

Z definičního vztahu vyplývají i následující vztahy převodní:

- 1 $\mu\text{kat} = 60 \text{ IU}$
- 1 IU = 16,6 nkat

Katalytická koncentrace enzymu

Tato jednotka se využívá při nepřímém stanovení a je definována jako **katalytická aktivita vztahená na objem biologické tekutiny** (např. krevní sérum).

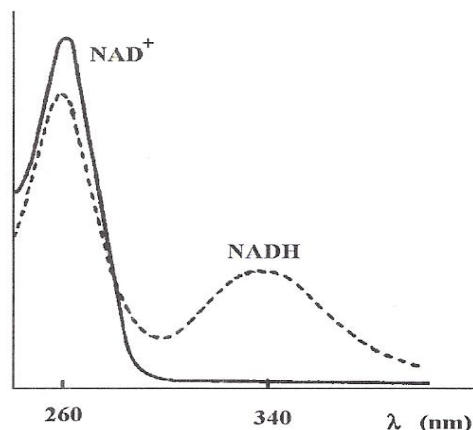
Jednotkou je **mkat/l**, či **ukat/l**.

Warburgův (optický, UV) test

Warburgův test je možné využít pro **stanovení aktivity NAD(P)-dependentních dehydrogenas** nebo pro **stanovení aktivity ostatních enzymů**, po té, co je reakce jimi katalyzovaná **spřažena s některou z NAD(P)-dependentní dehydrogenasou**.

Jak je tedy patrné, je možné využít tento test pouze pro reakce, kterých se účastní NAD(P)⁺.

Warburgův test totiž vychází z následujícího předpokladu: NAD(P)⁺ a NAD(P)H+H⁺ **absorbují při vlnové délce 340 nm značně odlišná množství procházejících paprsků (mají jinou absorpanci A)**.



Absorbance je veličina, kterou je možné měřit **kontinuálně**, tedy **během testu**. To nám umožňuje pozorovat **nárůst koncentrace NAD(P)H+H⁺** (absorbance se zvyšuje) nebo **úbytek jeho koncentrace** (absorbance se snižuje).

Katalytickou koncentraci (tedy *aktivitu* enzymu v biologickém materiálu) pak lze odvodit **od rychlosti nárůstu absorbance** (čím větší aktivita enzymu, tím rychleji absorbance roste):

$$\text{katalytická koncentrace} \approx \frac{\Delta A_{340}}{\Delta t}$$

Např. Stanovujeme-li katalytickou koncentraci enzymu laktátdehydrogenasy (LD), která bude katalyzovat reakci: pyruvát + NADH+H⁺ ↔ laktát + NAD⁺, bude **absorbance klesat**.

V laboratořích se ve skutečnosti při stanovování katalytické aktivity postupuje následovně:

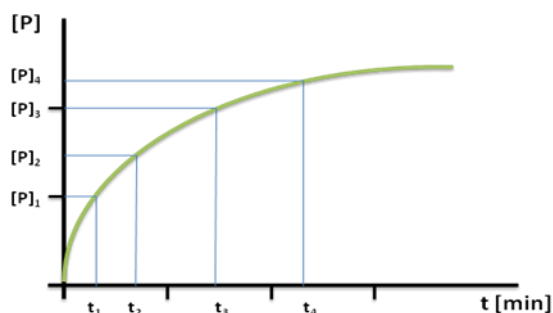
- jsou zajištěny optimální podmínky (teplota, pH, dostatek kofaktorů)
- měří se Δ[S] nebo Δ[P] v určitém časovém intervalu:
 - je-li to možné průběžně – např. s využitím Warburgova testu
 - není-li průběžné měření možné, využívají se konstantní časové úseky; viz dále
- reakční podmínky jsou nastaveny tak, aby reakce probíhala kinetikou **0. řádu** ([S] >> K_M), tedy aby byla rychlost reakce konstantní a přibližovala se V_{max}⁶

Pro stanovení katalytické koncentrace se tedy využívají dvě metody:

a) **Metoda kinetická**

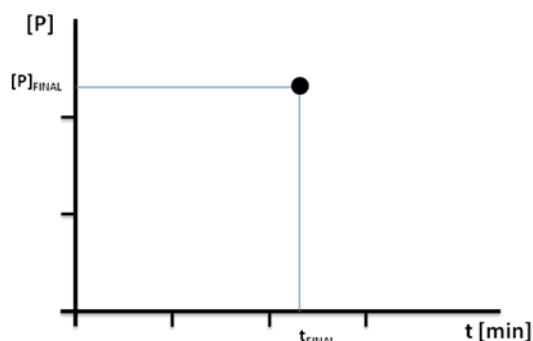
Používá se u reakcí, u kterých lze průběžně měřit [S] nebo [P], např. po deseti sekundách. Tímto měřením můžeme sestavit **kinetickou křivku**, ze které zjistíme v₀. Jedná se o metodu velmi přesnou, ale bohužel není proveditelná u všech enzymů.

⁶ Koncentrace substrátu [S] by měla být asi 100x větší, než K_M.



b) Metoda konstantního času

Používá se tam, kde nelze použít metodu předchozí. Měříme [P] po proběhnutí reakce. Kinetickou křivku nejsme tedy schopni sestavit (známe jen konečné hodnoty). Z naměřených hodnot však získáme **průměrnou rychlost** ($\Delta[P]/\Delta t$). Metoda je méně přesná.



3.7 Příklady

- 1) *Laktát dehydrogenasa má katalytickou aktivitu 2 μkat . Kolik molekul laktátu vznikne z pyruvátu za 1 minutu při nadbytku substrátu?*
 Katalytická aktivita 2 μkat znamená, že za sekundu vzniknou **2 μmoly** laktátu.
 Za 60 sekund vznikne $60 \cdot 2 \mu\text{mol} = 120 \mu\text{mol} = \mathbf{120 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}$.
 Látkové množství vynásobíme Avogadrovou konstantou a získáme výsledek: **$7,23 \cdot 10^{19}$ molekul**
- 2) *Jaké látkové množství produktu vznikne za 10 minut při reakci katalyzované enzymem o aktivitě 10 μkat ? Co je podmínkou toho, aby teoreticky vypočtené množství skutečně vzniklo?*
 Při aktivitě 10 μkat je daný enzym schopný vytvořit 10 μmol dané látky za sekundu. Za 10 minut (tedy 600 sekund) vznikne **6000 μmol** dané látky, po převedení pak **6 mmol**.
 Aby mohlo výše vypočtené množství, je potřeba, aby byl v reakční směsi nadbytek substrátu.
- 3) *Do reakční směsi obsahující substrát a pufr bylo přidáno 0,1 ml séra. Jaká je katalytická koncentrace enzymu, jestliže po 10 minutách měření metodou konstantního času obsahovala reakční směs 6 μmol produktu?*
 Ze zadání vyplývá, že za 10 minut (600 sekund) vzniklo 6 μmol produktu. Za 1 sekundu tedy vznikne **0,01 μmol** , z čehož vyplývá, že katalytická aktivita je **0,01 μkat** .
 Katalytickou koncentraci získáme tak, že katalytickou aktivitu podělíme objemem séra, tedy: $0,01/0,0001 = \mathbf{100 \mu\text{kat/l}}$.
- 4) *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).*
 Nejdříve zjistíme, kolik molů O_2 se uvolnilo: $6,72 \mu\text{l} = 6,72 \mu\text{dm}^3 = [6,72 \cdot 10^{-6}]/22,4 \text{ dm}^3 = \mathbf{0,3 \mu\text{mol}}$

0,3 μmol vzniklo za 10 minut (600 sekund), za 1 sekundu vzniklo tedy **0,5 nmol** O_2 .

Reakce probíhá dle rovnice: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Z rovnice vyplývá, že aby mohl vzniknout 1 mol kyslíku, musí kataláza rozložit 2 moly H_2O_2 .

Vzniklo-li tedy 0,5 nmol O_2 , bylo potřeba rozložit 1 nmol H_2O_2 a aktivita katalasy je tedy **1 nkat**.

- 5) Při enzymové reakci byl do roztoku substrátu v pufru přidán vzorek obsahující enzym (0,1 ml). Po 5 minutách bylo stanoveno 0,2 mmol produktu. Jaká je katalytická koncentrace enzymu? Za 5 minut (300 sekund) vzniklo 0,2 mmol produktu. Za 1 sekundu by tedy vzniklo **0,67 μmol** . Reakce proběhla v 1 ml roztoku, po převedení na litry získáme katalytickou koncentraci: $0,67 \mu\text{mol} / 0,0001 \text{ l} = 6700 \mu\text{kat} = \mathbf{6,7 \text{ mkat/l}}$.

- 6) Reakční směs obsahovala:

2,5 ml pufru

0,1 ml krevního séra

0,2 ml roztoku koenzymu NADH

0,2 ml roztoku substrátu

Po 60 sekundách byl pokles absorbance koenzymu $\Delta A = 0,03$. Víme, že $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$, šířka kyvety byla 1 cm. Jaká je katalytická koncentrace enzymu?

Dle Lambert-Beerova zákona víme, že $\Delta A = \epsilon \cdot \Delta c \cdot l$ (vyjádříme si Δc). Navíc víme, že k této změně došlo za 60 sekund (= Δt ; tento čas zahrneme do vzorečku)

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l \cdot \Delta t} = \frac{0,03}{6220 \cdot 1 \cdot 60} = 0,08 \mu\text{mol/s}$$

Musíme si uvědomit, že enzym, který nás zajímá se nacházel v krevním séru (0,1 ml), objem vzorku s ostatními přísadami je ale 3 ml, sérum je tedy 30x zředěno! Toto zředění započítáme: $0,08 \mu\text{mol/s} \cdot 30 = \mathbf{2,4 \mu\text{kat/l}}$

3.8 Inhibice enzymů

Inhibitory jsou látky, které **snižují aktivitu enzymů**.

Inhibici můžeme rozdělit na:

- **ireverzibilní (nevratnou)**
- **reverzibilní (vratnou)**
 - **kompetitivní**
 - **nekompetitivní**

Ireverzibilní inhibice

V případě nevratné inhibice dochází k trvalému poškození enzymu, který již nadále není schopen plnit svou funkci. Inhibitory se **pevně naváží do aktivního místa** (kovalentní vazbou) a zabrání navázání substrátu.

Příkladem ireverzibilních inhibitorů jsou:

- organofosfáty (inhibují např. acetylcholinesterázu)
- ionty těžkých kovů (navazují se na $-\text{SH}$ a $-\text{OH}$ skupiny)
- kyanidy (vytvářejí komplexy s kationty kovů; inhibují např. cytochrom-c-oxidázu)

Reverzibilní inhibice

V případě vratné inhibice se inhibitory volně váží do aktivního místa enzymu nebo mimo něj. Dochází ke vzniku rovnováhy v reakci $\text{E} + \text{I} \leftrightarrow \text{EI}$.

Inhibitor lze z enzymu odstranit pomocí dialýzy, gelové filtrace apod.

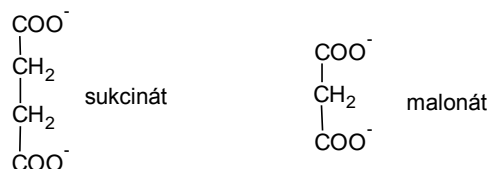
Rozlišujeme dva základní typy reverzibilní inhibice: **kompetitivní a nekompetitivní**.

Kompetitivní inhibice

V případě kompetitivní (od slova *compete* – soutěžit), je **inhibitor strukturně podobný substrátu**. Stejně jako substrát se váže do aktivního místa a *soutěží* s přirozeným substrátem o toto místo (většinou *vyhrává* ten, který se v okolí enzymu nachází ve vyšší koncentraci).

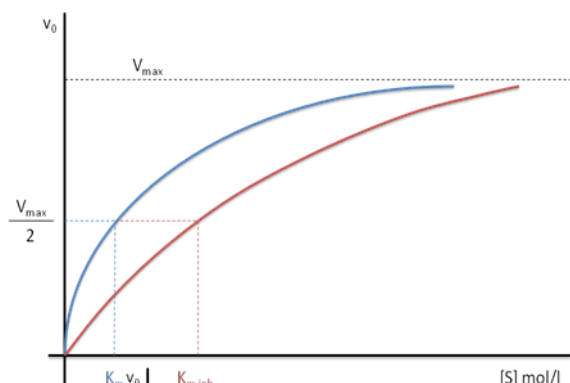
Př. Inhibitor **sukcinátdehydrogenasy je malonát**

(Sukcinátdehydrogenasa je enzym citrátového cyklu; katalyzuje reakci: sukcinát → fumarát)



Kompetitivní inhibice se (z pohledu kinetiky) projevuje tak, že **maximální rychlosti je dosaženo za vyšších hodnot koncentrace substrátu**⁷:

- V_{\max} se tedy **nemění**
- K_m se ale **zvyšuje**⁸

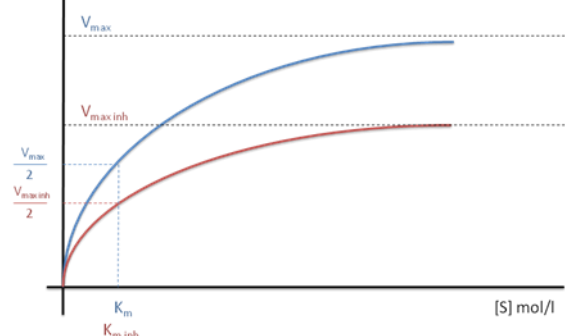


Nekompetitivní inhibice

V tomto případě nedochází k žádné soutěži.

Inhibitor se váže mimo aktivní místo enzymu – váže se tedy stejnou měrou jak na samotný enzym, tak na komplex enzym-substrát. Z pohledu kinetiky to vypadá, **jakoby enzymu bylo méně**, což se projeví tak, že:

- V_{\max} se **snižuje**
- K_m se **nemění**



Využití inhibitorů v lékařství

Mnohá léčiva slouží jako inhibitory různých enzymů:

- **kyselina acetylsalicylová**, či **ibuprofen** slouží jako inhibitor enzymu **cyklooxygenasy (COX)**
- **statiny** inhibují **HMG-CoA-reduktasu** (snižují syntézu cholesterolu; př. lovastatin)
- **inhibitory ACE** (angiotensin konvertujícího enzymu) slouží k léčbě **hypertenze** (př. enalapril)
- **reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy** se užívají k léčbě nervosvalových chorob, či pooperační atonii střev (př. neostigmin)
- **selektivní inhibitory mozkové acetylcholinesterázy** slouží k léčbě **Alzheimerovy choroby** (př. rivastigmin, galantamin)

Jiné inhibitory jsou využívány jako antibiotika:

- **peniciliny** inhibují bakteriální **transpeptidasy** (zabraňují tak výstavbě buněčné stěny)

⁷ Lze říci, že při kompetitivní inhibici to vypadá, **jakoby enzym ztrácel afinitu k substrátu** (zmenšuje-li se afinita, zvyšuje se K_m)

⁸ K_m je taková koncentrace substrátu, při které reakce probíhá polovinou maximální rychlosti... zvýší-li se koncentrace potřebná pro dosažení maximální rychlosti, zvýší se i K_m

- **tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol** inhibují **proteosyntézu**
- **fluorované chinoliny** inhibují **bakteriální gyrasy**, které slouží k uvolňování superstáčení během replikace DNA, čímž replikaci zastaví (např. ciprofloxacin)

Závěr a doplnění z kapitol 3.6 a 3.8:

Ve zmíněných kapitolách jsme se bavili o enzymové kinetice a o faktorech, které **ovlivňují rychlost** enzymem katalyzované reakce. Zmínili jsme následující:

- koncentraci substrátu [S]
- koncentraci enzymu [E]
- přítomnosti aktivátorů a inhibitorů

Dalšími faktory, které rychlost reakce ovlivňují, jsou **teplota** (při vysokých teplotách enzymy denaturují) a **pH** (rovněž při vysokém/nízkém pH enzymy denaturují, pracují pouze při tzv. pH optimum).

3.9 Regulace enzymové aktivity

Obecně je možné enzymovou aktivitu regulovat třemi způsoby:

- a) **regulace množství molekul enzymu**
- b) **regulace biologické aktivity enzymu**
- c) **dostupnost a koncentrace substrátu a/nebo kofaktoru⁹**

Regulace množství enzymu

Množství enzymu, které se v daném okamžiku nachází v organismu, je **výslednicí dvou dějů: syntézy a odbourávání**.

Proteosyntézu je možné ovlivnit na každém jejím kroku:

- **na úrovni exprese genů**
 - konstitutivní exprese (enzym je syntetizován neustále v určitém množství)
 - indukovaná exprese (enzym je syntetizován pouze na podnět)
- **na úrovni transkripce**
 - lze ovlivnit **rychlost** transkripce
 - lze ovlivnit **posttranskripční úpravy RNA** (např. sestřih RNA)
- **na úrovni translace**
 - lze ovlivnit **rychlost** translace
 - lze ovlivnit **posttranslační úpravy proteinu** (např. metylace, glykace...)

Degradaci enzymu je rovněž možné ovlivnit – např. v buňce se nachází celá řada **specifických proteinas**, které rozkládají jen konkrétní enzym, nebo typ enzymu (a opět je možné řídit i syntézu těchto proteinas...).

Regulace biologické aktivity enzymu

Regulace biologické aktivity je zajištěna:

- Existencí **izoenzymů¹⁰**

⁹ Poslední zmíněný způsob nemá *in vivo* větší význam

¹⁰ Existuje i pojem **izoforma**, který je obecnější, než pojem izoenzym. Izoforma v obě zahrnuje i tzv. pseudoizoenzymy, či různé posttranslační varianty daného enzymu.

Izoenzymy jsou takové enzymy, které katalyzují stejnou reakci, ale liší se primární strukturou a tedy i fyzikálně-chemickými a kinetickými vlastnostmi. **Mají** (velmi často) **rozdílnou tkáňovou distribuci**, přičemž v každé tkáni může být daný izoenzym regulován jiným způsobem.

V laboratořích je stanovujeme pomocí elektroforézy.

Např. Kreatinkinasa je dimer, který vytváří 3 izoenzymy složené z podjednotek M – *muscle* a B – *brain*:

Tabulka 6 - Izoformy kreatinkinasy (CK)

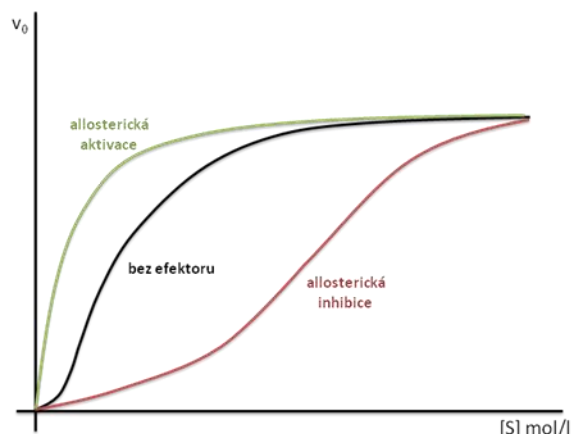
Izoenzym	Výskyt	Procento celkové aktivity	Zvýšení
CK-MM	svaly	94-96%	svalové trauma
CK-MB	srdce	do 6%	infarkt
CK-BB	mozek	stopy	poranění mozku

- **Aktivací enzymů částečnou a nevratnou proteolýzou**
Enzym je nasyntetizován ve své neaktivní formě (=proenzym) a až po té, co je z něj odštěpena část molekuly se stává aktivním. Tento způsob aktivace enzymu je typický **pro enzymy GIT** (např. pepsinogen → pepsin), pro **faktory krevního srážení** a pro **proteiny (kaspasy)**, které se účastní **apoptózy**.

- **Aktivací/deaktivací enzymu kovalentní modifikací**
V předchozím případě byl enzym upraven tak, že jsme z něj něco odstranili, v tomto případě na něj něco přidáváme. **Nejběžnější kovalentní modifikací enzymů je fosforylace**, tedy přenos fosforylové skupiny z ATP na –OH skupinu **serinu, treoninu, či tyrosinu** katalyzovaný **kinasami**. Jedná se o vratný děj, opačnou reakci (defosforylaci) katalyzují enzymy **fosfatasy** (hydrolyzují vazbu mezi enzymem a fosforylovou skupinou).
Dalšími příklady kovalentní modifikace enzymů jsou např. karboxylace, acetylace, methylace apod.
Enzymy, které podléhají fosforylaci a defosforylaci jsou např. **glykogenfosforylasa a glykogensynthetasa** (viz Kapitola 5 – *Metabolismus sacharidů*)

- **Allosterickým ovlivňováním**
Allosterické enzymy jsou zvláštní skupinou enzymů, které se vždy skládají z **více podjednotek**. Kromě aktivního místa můžeme na jejich molekule najít i tzv. **allosterické místo**, do kterého se váže **allosterický modifikátor**¹¹ (inhibitor nebo aktivátor). Svým navázáním změni **konformaci enzymu** a tím sníží/zvýší jeho aktivitu.
Saturační křivka alosterických enzymů je podobná té, kterou jsme viděli u hemoglobinu (hemoglobin se rovněž skládá z více podjednotek), má tedy sigmoidní tvar:

¹¹ Allosterickým modifikátorem je často **produkt reakce**; v takovém případě mluvíme o **inhibici/aktivaci produktem**.



Stejně jako u hemoglobinu hovoříme i zde o **kooperativním efektu** – allosterické enzymy mají více podjednotek, tedy více vazebných míst pro substrát nebo allosterické modifikátory. Navázání substrátu/aktivátoru/inhibitoru na jednu podjednotku indukuje změny konformace u ostatních podjednotek a další molekuly (substrátu/aktivátoru/inhibitoru) se vážou snadněji nebo obtížněji.

3.10 Využití enzymů v lékařství

Enzymy mají v lékařství **trojí využití**:

- jako **indikátory patologického stavu**
- jako **analytická činidla v klinické biochemii**
- jako **léčiva**

Příklady enzymů v klinické diagnostice

Při poškození buněk (z různých patologických důvodů), dochází k tomu, že se **zvýšuje aktivita intracelulárních enzymů v extracelulární tekutině**. Zvýšenou aktivitu je možné zjistit z rozboru krevního séra.

Tabulka 7 - Enzymy jako indikátory patologických procesů

Enzym	Referenční hodnoty	Interpretace zvýšení
ALT (alaninaminotransferasa)	do 0,9 μ kat/l	hepatopatie
CK (kreatinkinasa)	do 4 μ kat/l	myopatie, infarkt myokardu
PSA (prostatický specifický antigen)	do 4 μ g/l	karcinom prostaty
NSE (neuron specifická enolasa)	do 13 μ g/l	bronchogenní karcinom

*Poznámka: povšiměme si, že první dva enzymy (ALT, CK) se stanovují pomocí nepřímých metod (např. metodou konstantního času), další dva (PSA, NSE) jsou **tumorové markery**, které se stanovují přímou metodou (např. imunobiochemicky).*

Enzymy jako analytická činidla

Enzymy sloužící jako analytická činidla většinou pracují tak, že jistou látku (kterou chceme stanovit) přeměňují na jinou látku, přičemž koncentraci této „jiné látky“ je možné nějak měřit (vznikne-li např. látka barevná, je možné měřit absorbancí apod.)

Tabulka 8 - Enzymy jako analytická činidla

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

Podrobněji se zaměříme na **enzymové stanovení glukosy**:

A) Stanovení v analyzátorech

Využíváme při něm dva enzymy – glukosaoxidasu a peroxidasu.

Glukosaoxidasa katalyzuje dehydrogenaci glukosy: $\text{glukosa} + \text{O}_2 \rightarrow \text{glukonolakton} + \text{H}_2\text{O}_2$

Peroxidasa katalyzuje rozklad peroxidu vodíku: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{A} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{A}$

Látka H_2A je **bezbarvá**, ale reakcí s peroxidem vodíku z ní vzniká látka **A**, která je **barevná** a je možné měřit její absorbanci.

B) Osobní glukometry

Další možností je využití osobního **glukometru**, které slouží k osobní potřebě diabetiků. Glukosaoxidasa je zakotvena na pevné fázi přístroje, vznikající H_2O_2 se stanovuje pomocí **platinové elektrody**. Na displeji se následně ukazuje koncentrace glukosy v mmol/l.

Enzymy jako léčiva

Enzymy sloužící jako léčiva mají velmi široké spektrum užití. O některých dalších příkladech se občas objeví zmínka i v jiných kapitolách než této.

Pankreatické enzymy

Jedná se o směs enzymů (lipasy, amylasy, proteinasy), která se získává z vepřových pankreatů. Užívají se v případě **sekreční nedostatečnosti pankreatu** (která může mít různý původ) a při **cystické fibróze**, 3x denně při jídle.

Jsou volně prodejné ve formě **acidorezistentních** tobolek (tobolka se rozpadne až v duodenu).

Asparaginasa

Asparaginasa je enzym, který se využívá v terapii leukémie (konkrétně **lymfoblastické leukémie**).

Enzym katalyzuje hydrolýzu **amidové skupiny asparaginu**: $\text{asparagin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{aspartát} + \text{NH}_3$

L-asparagin je nezbytný pro proteosyntézu některých nádorových buněk – tím, že jej hydrolyzujeme, omezíme tak jejich proliferaci.

Enzymová fibrinolytika

Jedná se o léčiva, která **rozpuštějí krevní sraženiny v cévách**, např. enzymy streptokinasa (bakteriální původ) a urokinasa (lidský enzym). Štěpí plazminogen na plazmin, který následně vyvolá degradaci fibrinu a trombolýzu.

Využívají se při léčbě žilních trombóz, plicních embolií a akutním infarktu myokardu.

Proteasy

Slouží v **lokální terapii a systémové terapii**.

V lokální terapii se jedná např. o enzymy fibrinolyzin, chymotrypsin a kolagenasu. Po lokální aplikaci způsobí lýzu (rozklad) nekrotické tkáně a **nepoškozuje zdravé buňky** (zdravé buňky totiž obsahují inhibitory těchto proteas).

Využívají se v chirurgii pro léčbu hnisavých ran, bércových vředů, diabetických gangrén, dekubitů, pooperačních ran apod.

V systémové terapii se využívají např. enzymy **trypsin a chymotrypsin**, dále pak rostlinné proteázy **papain** (papaya), či **bromelin** (ananas). Některé studie naznačují jejich **protizánětlivý účinek a ovlivnění imunity u autoimunitních onemocnění**.

Využívají se jako pomocná léčiva při revmatoidní artritidě, u léčby traumatických zánětů a otoků, lymfedémů, zánětů žil apod.

Jedná se i o některé volně prodejné přípravky (Wobenzym, Phlogenzym), které jsou dosti drahé a některé je potřeba konzumovat v množství až 30 tablet denně.