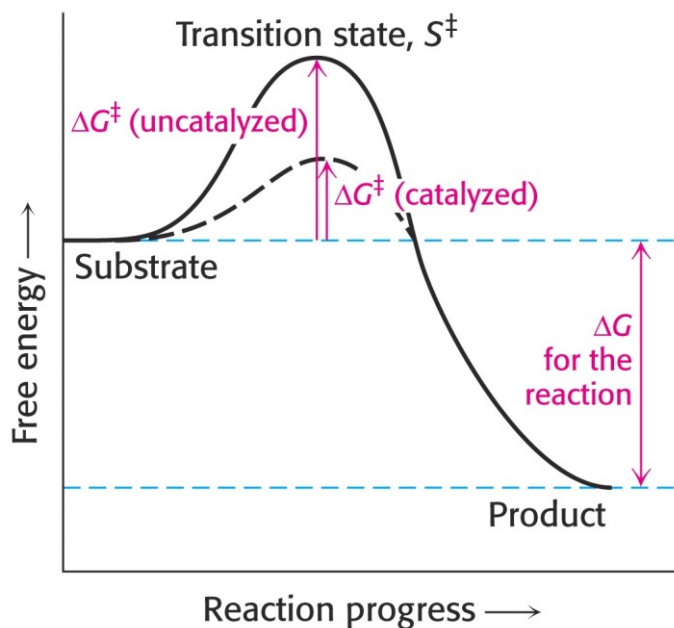


13. Enzymy

Průběh chemických reakcí závisí též na schopnosti molekul přiblížit se dostatečně blízko a překonat repulsní energetickou bariéru. K tomu je zapotřebí energie typické pro každou reakci, tzv. **aktivační energie**. Ta vystupuje nejčastěji ve formě kinetické energie molekul projevující se jako teplota. V chemii je běžné urychlovat průběh reakce jejím zvýšením (asi $3 \times /10^\circ \text{C}$). Tímto způsobem ovšem živé organismy tento problém řešit nemohou (až na výjimky jsou přizpůsobeny nižším teplotám). Jiným způsobem zvýšení rychlosti reakce je **katalýza**. Katalyzátor urychluje průběh reakce snížením aktivační energie (rozložením energeticky náročné interakce do několika dílčích přeměn – transitní stavy), významná je též jeho schopnost orientovat vzájemně reagující částice tak, aby interakce byla usnadněna. není schopen ovlivnit průběh reakce ve smyslu změny rovnovážného stavu. Katalyzátor však neovlivňuje rovnováhu reakce. Posun reakce v žádaném směru je možný zvýšením koncentrace reaktantů (substrátů) nebo odčerpáváním produktů (u anabolických pochodů značně omezeno) nebo dodáním energie ve vhodné formě (v biochemii jako **makroergické sloučeniny**).

Mnoho chemických reakcí využívá katalýzy k usnadnění průběhu reakcí. V biochemických reakcích hraje katalýza zcela zásadní roli,



Schematické znázornění účinku katalyzátoru na průběh chemické reakce (snížení aktivační energie).

Pozn.: Energetické minimum vpravo odpovídá koncentračním poměrům pro rovnovážný stav, nikoli samotným produktům!

Mnoho chemických reakcí využívá katalýzy k usnadnění průběhu reakcí. V biochemických reakcích hraje katalýza zcela zásadní roli, všechny reakce v živých organizmech jsou katalyzovány. Téměř výlučně tuto úlohu plní bílkoviny s katalytickou funkcí zvané **enzymy** (jen několik málo reakcí je katalyzováno RNA, tzv. ribozymy – snad jde o vývojový relikv).

Katalýza – Berzelius 1835

Chemické katalyzátory

- jsou to látky, jež urychlují chemické reakce
- nemění přitom rovnováhy chemických reakcí
- snižují aktivační energii

Lze tedy předpokládat, že katalyzátor se podílí na tvorbě labilních meziproductů, jejichž vznik je provázen menší spotřebou aktivační energie než je tomu u reakce nekatalyzované

V živých organismech od organismů prokaryotních po eukaryotní probíhá obrovské množství reakcí, z nichž téměř všechny probíhají za účasti biokatalyzátorů, jinak by tyto reakce probíhaly pomalu.

Vzhledem ke komplexnímu charakteru biochemických reakcí plynou na biokatalyzátory některé charakteristické požadavky

- A. Reakce, které katalyzují, probíhají cíleně podle přesného genetického plánu.
- B. Průběh reakcí musí být specifický.
- C. Jejich aktivita musí být přesně regulována podle potřeb organismu.

Proto se biokatalyzátory liší od běžných chemických katalyzátorů:

- 1) Vyšší reakční rychlostí
- 2) Mírnějšími podmínkami reakce – T, pH, tlak.
- 3) Vyšší specifitou.
- 4) Schopnosti regulace

Biologické katalyzátory

Globulární proteiny – enzymy

RNA – ribozymy 1986 Cech, Altman (Nobelova cena)

TABLE 8.1 Rate enhancement by selected enzymes

Enzyme	Nonenzymatic half-life	Uncatalyzed rate ($k_{un} s^{-1}$)	Catalyzed rate ($k_{cat} s^{-1}$)	Rate enhancement (k_{cat}/k_{un})
OMP decarboxylase	78,000,000 years	2.8×10^{-16}	39	1.4×10^{17}
Staphylococcal nuclease	130,000 years	1.7×10^{-13}	95	5.6×10^{14}
AMP nucleosidase	69,000 years	1.0×10^{-11}	60	6.0×10^{12}
Carboxypeptidase A	7.3 years	3.0×10^{-9}	578	1.9×10^{11}
Ketosteroid isomerase	7 weeks	1.7×10^{-7}	66,000	3.9×10^{11}
Triose phosphate isomerase	1.9 days	4.3×10^{-6}	4,300	1.0×10^9
Chorismate mutase	7.4 hours	2.6×10^{-5}	50	1.9×10^6
Carbonic anhydrase	5 seconds	1.3×10^{-1}	1×10^6	7.7×10^6

Abbreviations: OMP, orotidine monophosphate; AMP, adenosine monophosphate.
Source: After A. Radzicka and R. Wofenden. *Science* 267 (1995):90–93.

Příklady katalytického působení enzymů – porovnání rychlostních konstant spontánní a katalyzované reakce.

I tak snadno a rychle probíhající pochod jako je disociace CO_2 je v organizmech katalyticky urychlena.

Historie poznávání enzymů

Kühn 1878 – „Enzym“ *en zyme* – v kvasnicích

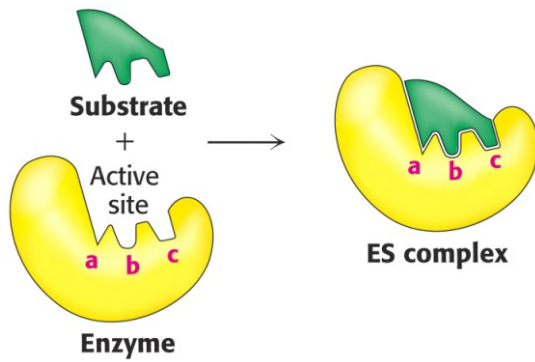
Paster 1860 – fermentace je katalyzována látkami, tuto schopnost však nelze oddělit od živých buněk, které jsou vybaveny tzv. životní silou *vis vitalis*

Liebig – fermenty jsou schopny katalyzovat tyto reakce i mimo živou buňku – spor s Pasterem.

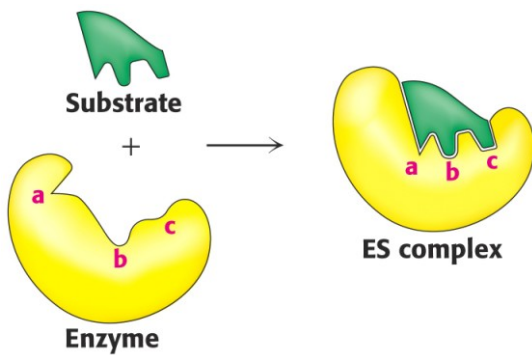
Buchner 1897 – tyto reakce je schopen katalyzovat i samotný extrakt kvasinek

Sumner 1926 – bílkovinná povaha enzymů – ureasa

Substrátová specifita



Model zámku a klíče



Indukované přizpůsobení

KLASIFIKACE A TŘÍDĚNÍ ENZYMŮ

Názvosloví enzymů

- A. Triviální – názvy souvisely s místem výskytu nebo funkcí – trypsin, pepsin
- B. Název substrátu nebo reakce + koncovka asa – amylasa
- C. Systematické názvosloví
 - a. Substrát A + reakce R + asa
glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

b. Substrát A + substrát B + reakce R + asa

alkohol:NAD:oxidoreduktasa

Systematické názvy jsou však pro praktické použití příliš složité a proto se v dané publikaci používají jenom při prvním představení enzymů.

Klasifikace enzymů

IUB – 1961

6 tříd podle typu reakce, kterou katalyzují, dále podtřídy podle vazby, kterou vytvářejí, případně štěpí, dále podle případného kofaktoru a nakonec podle místa uvnitř skupiny

1. třída **oxidoreduktasy** – oxidačně redukční reakce – nejpočetnější třída
laktatdehydrogenasa

2. třída **transferasy** – přenos skupin
aspartataminotransferasa

3. třída **hydrolázy** – hydrolytický (za účast H_2O) štěpí vazby – početná skupina
ureasa

4. třída **lyasy** – nehydrolytický (bez účast H_2O) štěpí vazby
karbonatdehydratasa

5. třída **izomerasy** – intramolekulární přesuny atomů či skupin
glukosa-6-fosfátizomerasa

6. třída **ligasy** – vznik energeticky náročných vazeb nejčastěji za spotřeby ATP
asparaginsyntethasa

TABLE 8.3 Six major classes of enzymes

Class	Type of reaction	Example	Chapter
1. Oxidoreductases	Oxidation-reduction	Lactate dehydrogenase	16
2. Transferases	Group transfer	Nucleoside monophosphate kinase (NMP kinase)	9
3. Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)	Chymotrypsin	9
4. Lyases	Addition or removal of groups to form double bonds	Fumarase	18
5. Isomerases	Isomerization (intramolecular group transfer)	Triose phosphate isomerase	16
6. Ligases	Ligation of two substrates at the expense of ATP hydrolysis	Aminoacyl-tRNA synthetase	29

Číslování enzymů :

alkohol:NAD:oxidoreduktasa (alkoholdehydrogenasa) EC 1.1.1.27

EC 1 – oxidoreduktasy

EC 1.1. – skupina CHOH

EC 1.1.1. – kofaktor NAD

EC 1.1.1.27 – číslo uvnitř skupiny

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>

Struktura enzymů

1) Jednoduché enzymy – složené pouze z proteinu

2) Složené enzymy – obsahují nebílkovinou složku – tzv **kofaktor**

Kofaktor (neaktivní) + **apoenzym** (neaktivní) ↔ **holoenzym** (aktivní)

Starší názvy – koenzym obecně

Kofaktor :

Kovový ion – tzv **metaloenzymy**

Zn²⁺ - alkalická fosfatasa, alkoholdehydrogenasa

Cu²⁺ - tyrosinasa, diaminoxidasa

Organická látka

A) Pevně (většinou kovalentně) vázaná – **prostetická skupina** – širší význam

B) Volně vázaná - **koenzym**

Jak prostetická skupina, tak koenzym vstupují do enzymové reakce, liší se však způsobem regenerace :

prostetická skupina – na téže enzymové bílkovině, je kovalentně vázaná

koenzym – disociuje z dané enzymové bílkoviny a může se regenerovat v jiné enzymové reakci – též druhý substrát

Enzymové bílkoviny

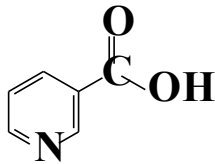
Chemickou strukturou a konformací se enzymy neliší od molekul jiných globulárních proteinů. Podle složitosti lze rozlišovat enzymy monomerní, tvořené jedinou podjednotkou, oligomerní, tvořené z více podjednotek a na tzv.multienzymové komplexy, tvořené vlastně několika molekulami enzymu.

Typy kofaktorů (koenzymů a prostetických skupin) – vztah k vitaminům

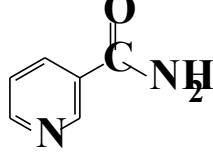
Koenzymy oxidoreduktáz

NIKOTINAMIDOVÉ KOEN

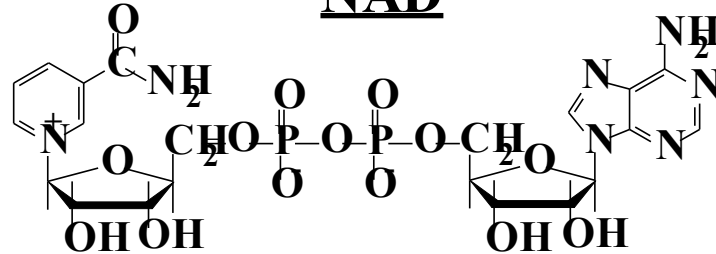
k. nikotinová



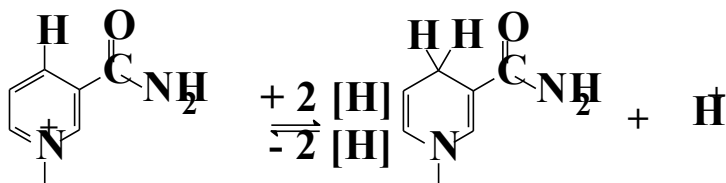
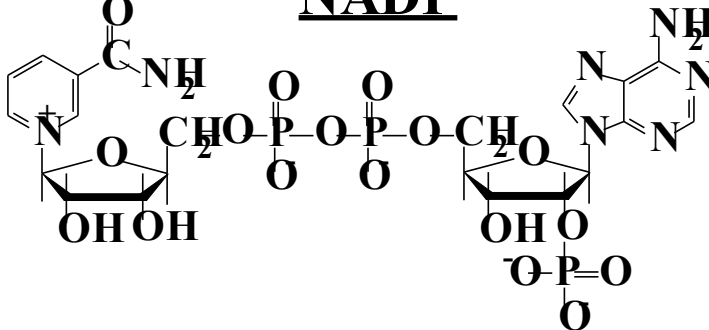
nikotinamid



NAD⁺

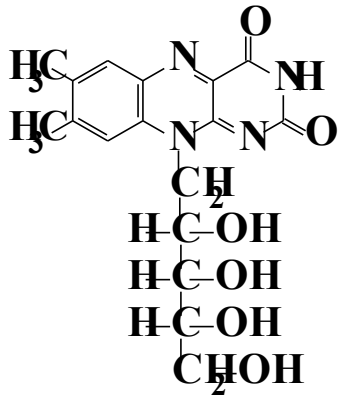


NADP⁺

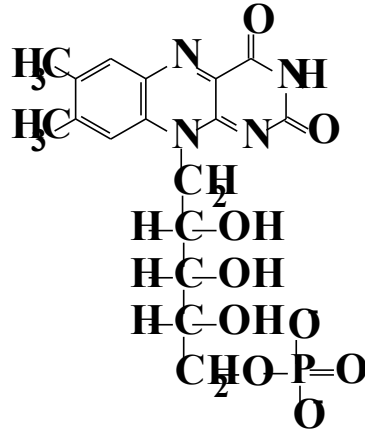


FLAVINOVE KOENZYM

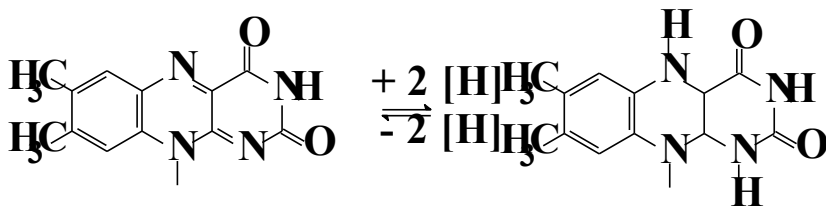
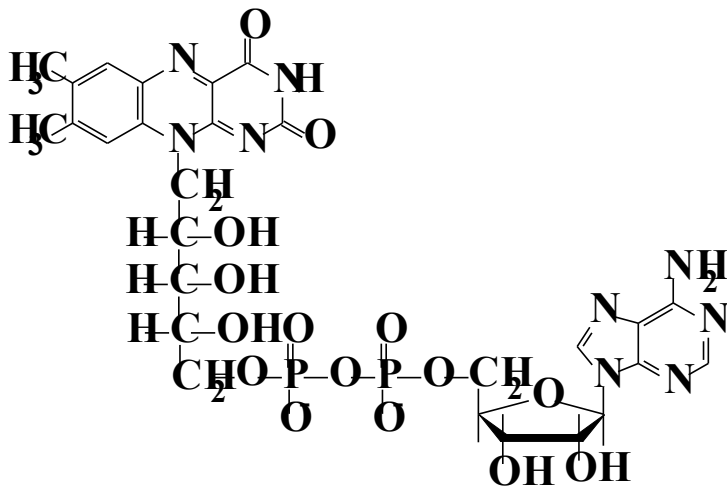
riboflavin



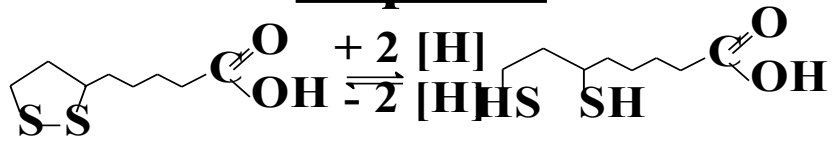
FMN



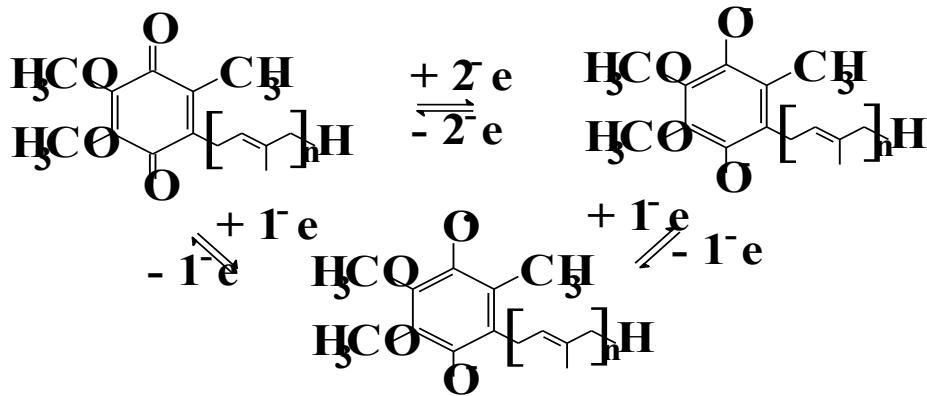
FAD



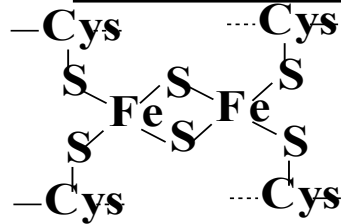
k.lipoova



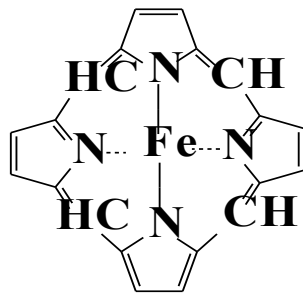
ubichinon



ferredoxiny



hem

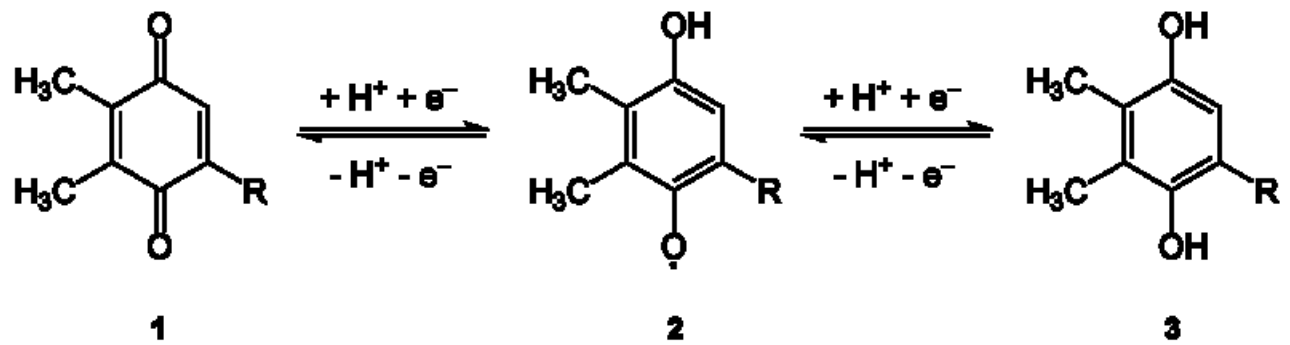


glutathion



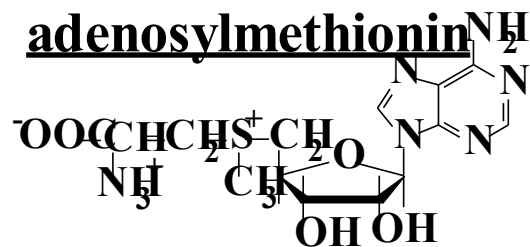
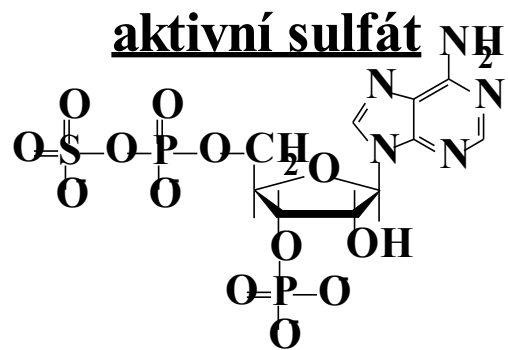
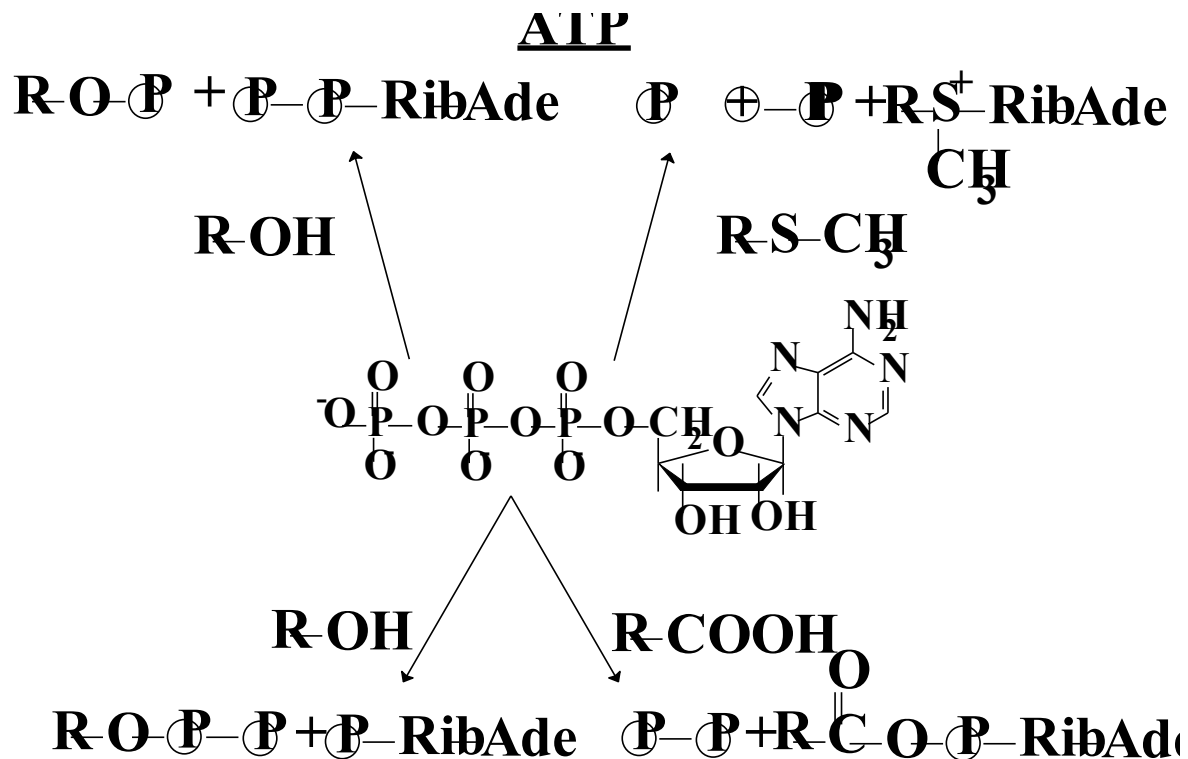


Plastochinon (PQ₉)

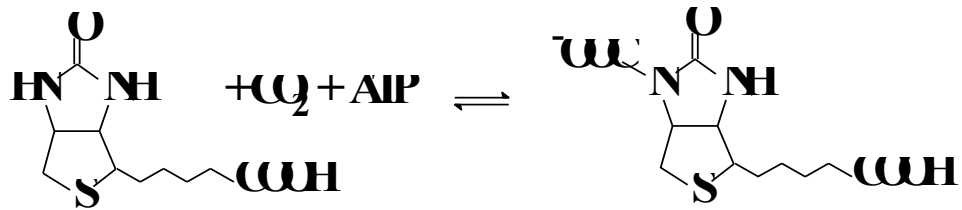


Redukce plastochinonu

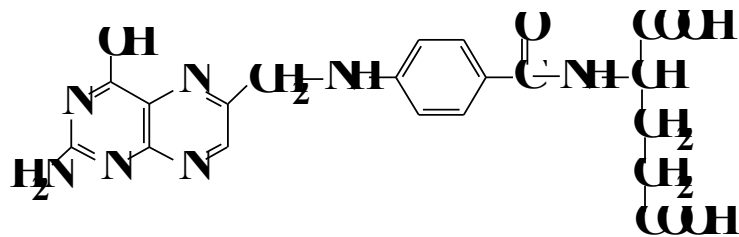
Koenzymy transferáz



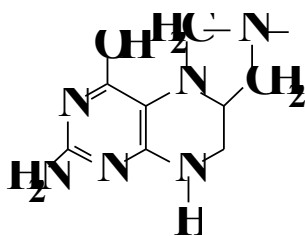
biotin



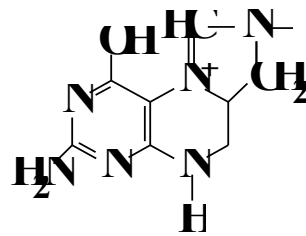
tetrahydrolistovák



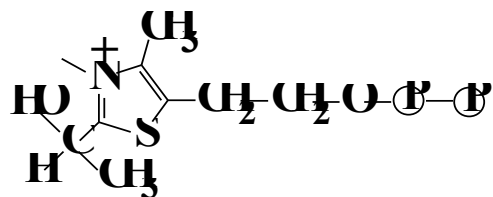
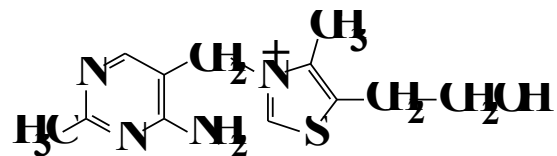
metiltetrahydrolistovák



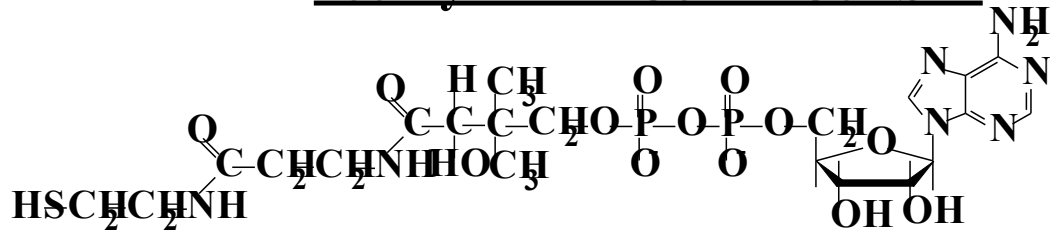
metiltetrahydrolistovák



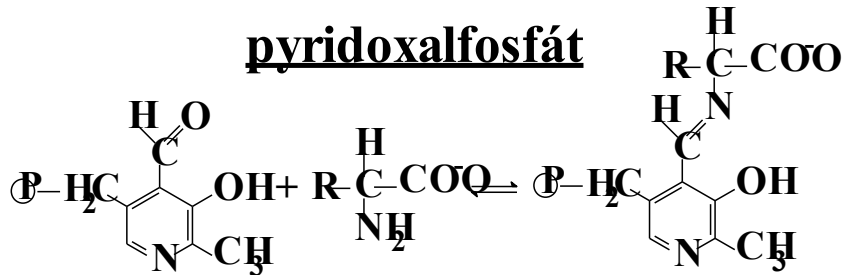
thiamin



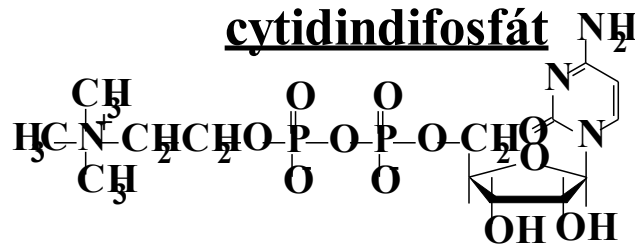
koenzym A - CoA - CoASH



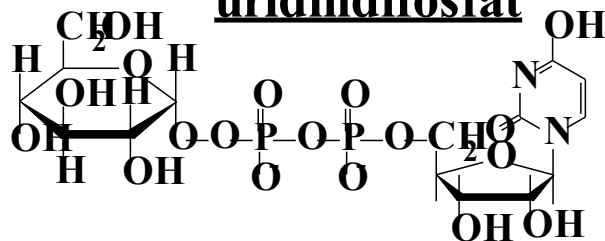
pyridoxalfosfát

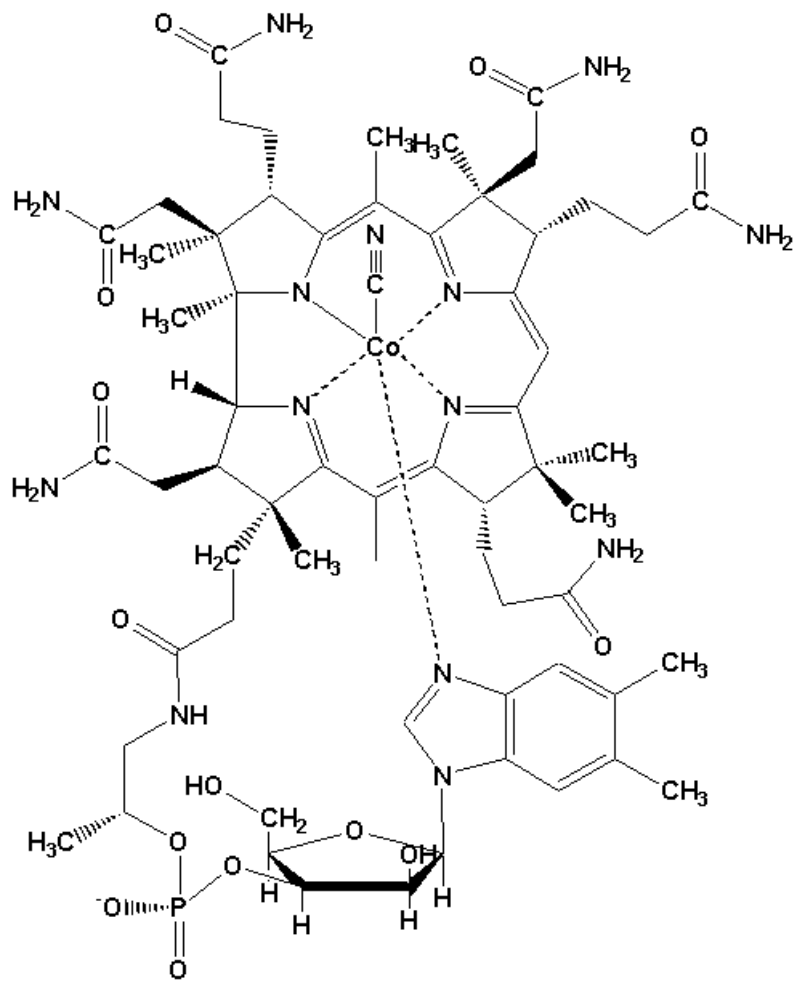


cytidindifosfát



uridindifosfát





Cyanocobalamin (Vitamin B12)

Vyjadřování katalytické účinnosti enzymů

Množství (koncentraci) enzymů jak čistých tak v komplexní proteinové směsi, lze vyjádřit hmotností, látkovým a katalytickým množstvím (koncentrací). Poslední z nich má největší význam a odráží účinnost enzymu. Vyjadřuje se ve formě **aktivity** tj. odvozeně od rychlosti enzymové reakce – jako množství přeměněného substrátu či vzniklého produktu za časovou jednotku. Tato rychlost (dc/dt) se stanovuje vhodnými metodami, s výhodou fotometricky.

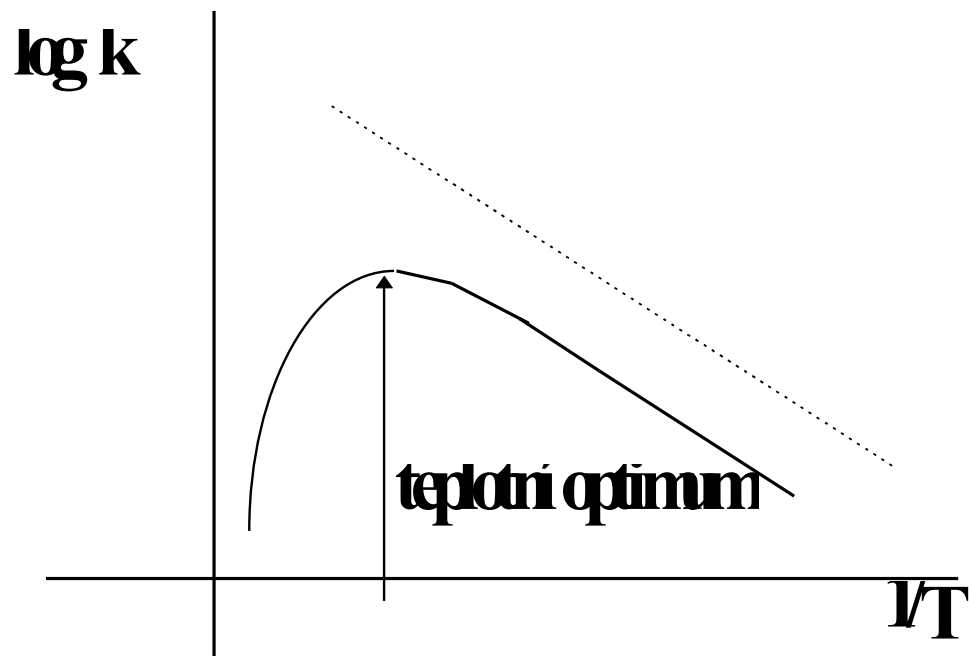
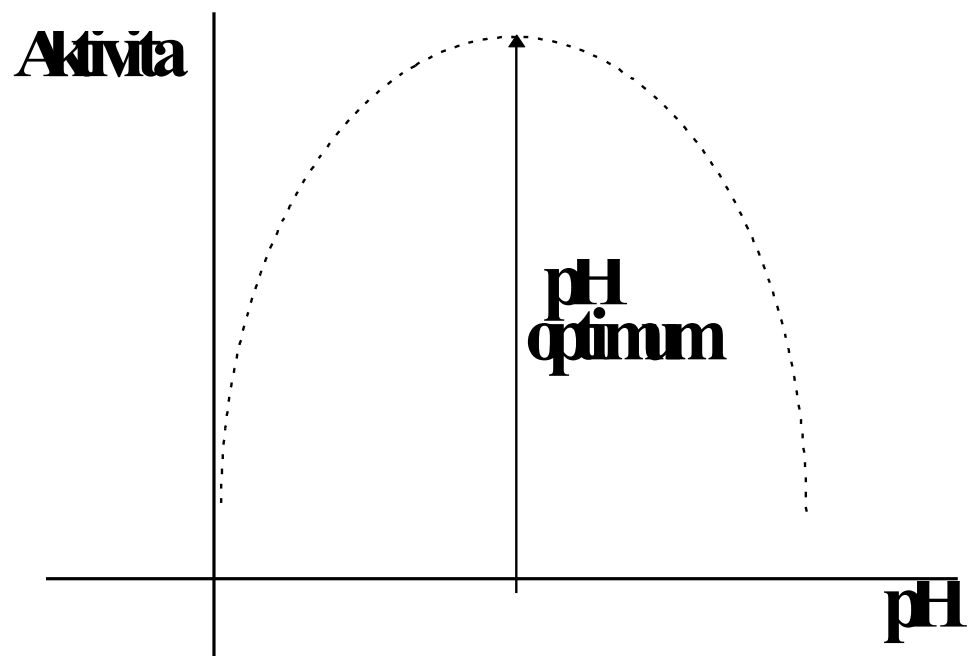
Jednotky aktivity:

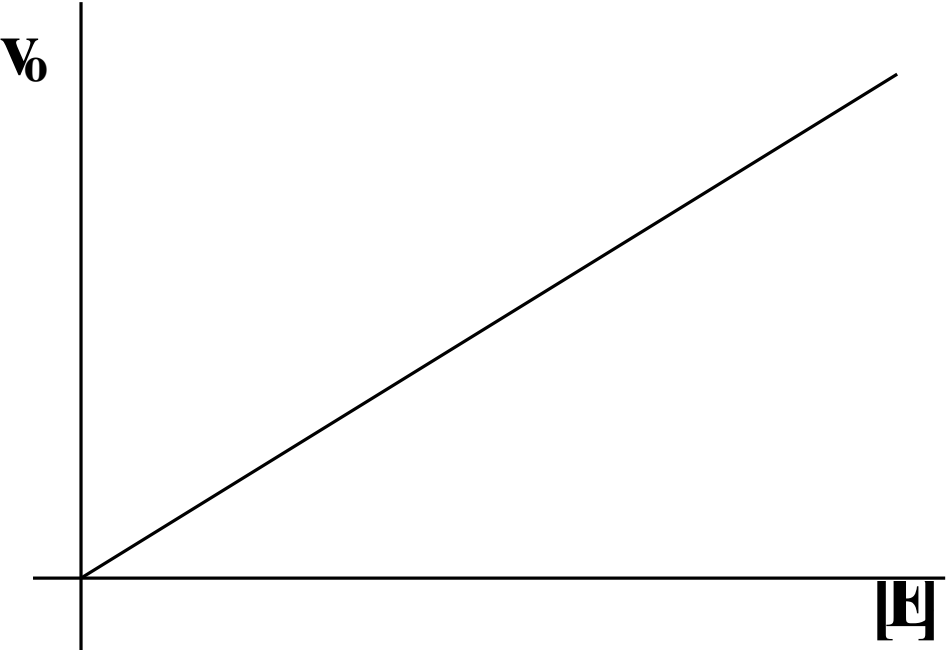
- A) **Smluvní jednotky** – např. u amylasy - množství enzymu, které rozštěpilo za 30 min při 40 °C dané množství škrobu aby ten nedával reakci s jodem
- B) **IU mezinárodní jednotky** 1961 – množství enzymu, jež přemění 1 μ mol substrátu za 1 minutu za standardních podmínek (pH, T. přebytek substrátu, přítomnost aktivátorů)
- C) **Katal** (podle soustavy SI) 1971 - množství enzymu, jež přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu za standardních podmínek (pH, T. přebytek substrátu, přítomnost aktivátorů)

Specifická aktivita – aktivita vztažená na celkovou koncentraci bílkoviny (katal/gram)

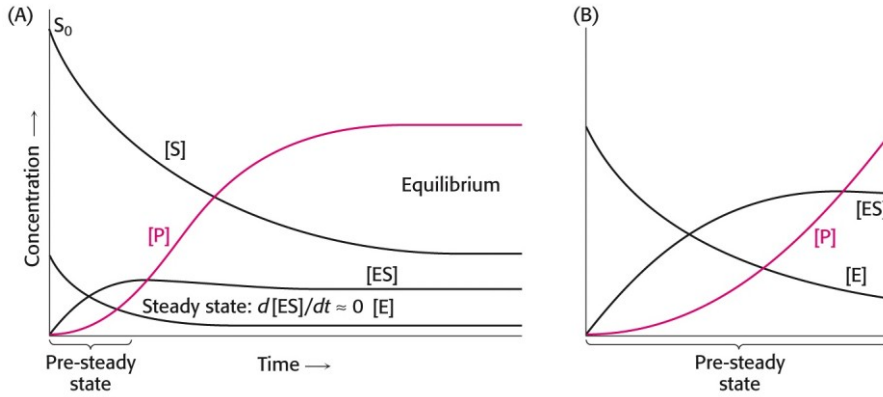
Číslo přeměny – látkové množství substrátu přeměněné molem enzymu za časovou jednotku

Vliv prostředí na rychlost enzymové reakce



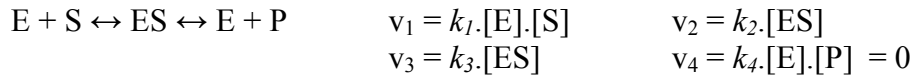


Kinetika enzymové reakce



Časový průběh enzymové reakce – prestacionární a stacionární stav.

Za stacionárních podmínek

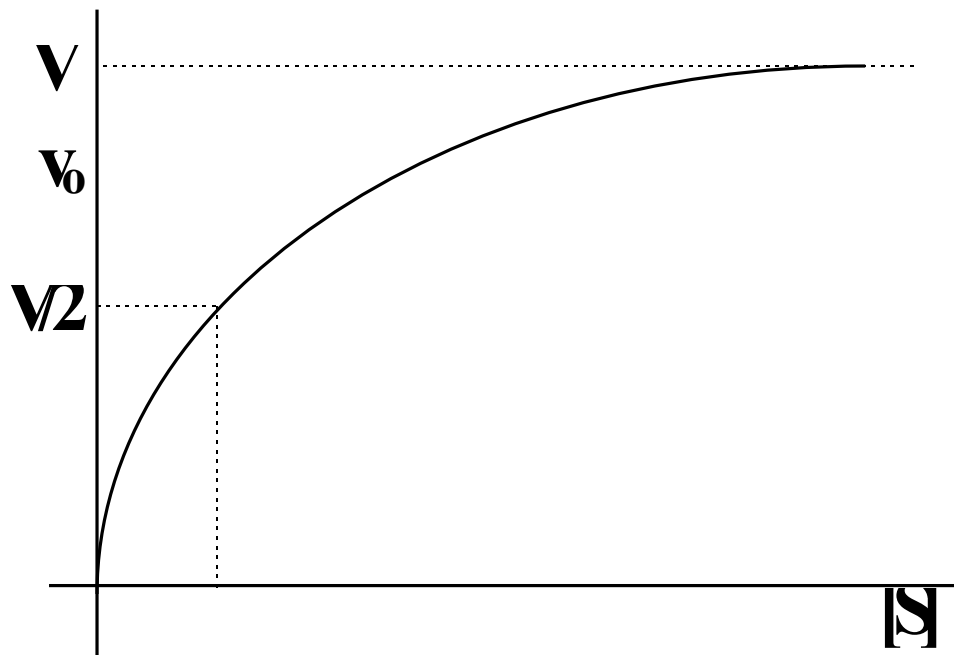


Za stacionárních podmínek $v_1 + v_4 = v_2 + v_3$

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] + 0 = k_2 \cdot [ES] + k_3 \cdot [ES] = (k_2 + k_3) \cdot [ES]$$

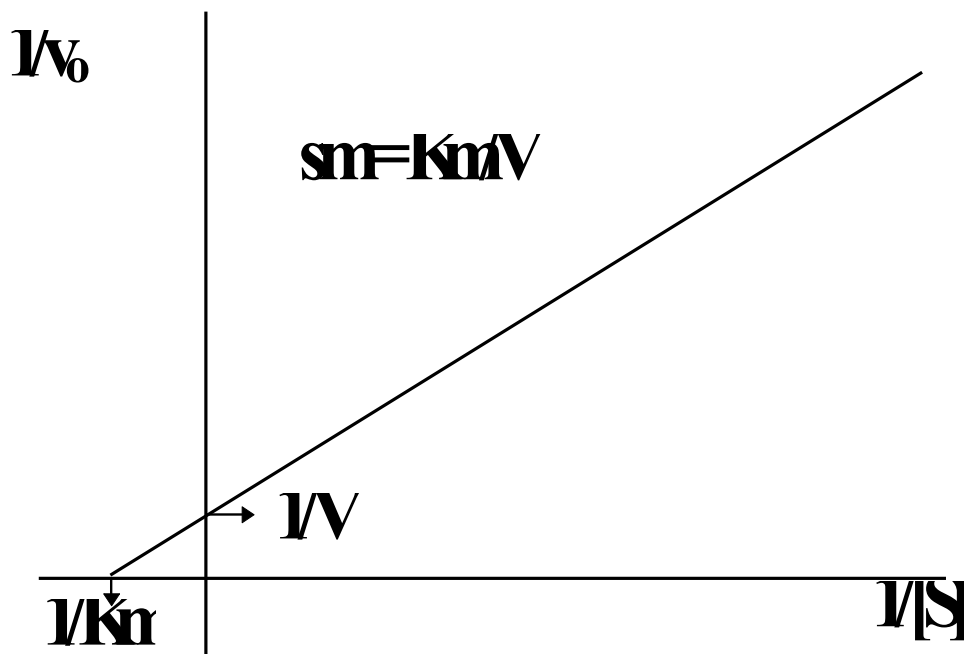
$$[E] \cdot [S] / [ES] = (k_2 + k_3) / k_1 = K_m \quad v_0 = k \cdot [ES] \quad V_{lim} = k \cdot [E]_t = k \cdot ([E] + [ES])$$

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

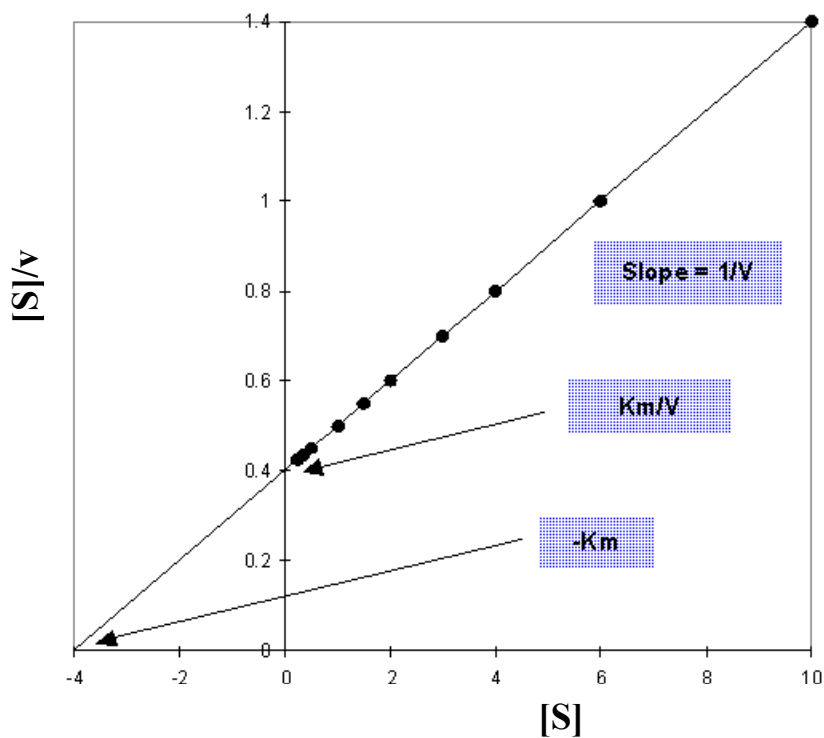


Rektifikace - Lineweaver-Burkovo vynesení

$$1/v_0 = \frac{K_M + [S]}{V_{lim} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{lim}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}}$$



Jiná vynesení – Hanes – $[S]/v$ vs. $[S]$



Význam nalezených konstant

K_m je mírou afinity enzymu a substrátu (formálně disociační konstantou komplexu ES), není závislá na katalytickém množství (aktivitě enzymu) v pokusu, pokud pracujeme v oblasti lineární závislosti v na $[E]$ – viz výše. Lze ji tabelovat a užít jako srovnávací parametr. Liší se pro různé substráty téhož enzymu.

V_{lim} je ukazatelem aktivity enzymu, závisí na katalytickém množství enzymu v experimentu. Dá se užít k vyjádření katalytické účinnosti a čistoty enzymu. V těchto případech se vypočítá tzv. specifická aktivita jako poměr V_{lim} a množství enzymu (typicky v mg bílkoviny neznáme-li jeho M_r , nebo pracujeme se směsí – homogenát, krevní sérum apod.) Známe-li látkové množství enzymu, pak specifickou aktivitu vztahenou na látkové množství enzymu nazýváme číslem přeměny (TN):

$$V_{lim} / E \text{ (mol.s}^{-1} / \text{mol) = TN (s}^{-1}\text{) = } k_{cat}$$

TN pak značí počet molů (molekul) substrátu přeměněné 1 molem (molekulou) enzymu za 1 s a jde o tzv. katalytickou konstantu (celkovou rychlostní konstantu katalysované reakce) – objektivní vyjádření účinnosti enzymu.

TABLE 8.5 K_M values of some enzymes


Enzyme	Substrate	$K_M(\mu\text{M})$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa-N-acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	CO_2	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3
	tRNA	0.4
	ATP	300

TABLE 8.6 Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

Jako spolehlivější ukazatel substrátové specifity – preference substrátů – se ukázal poměr k_{cat} (čím vyšší, tím účinnější katalýza) a K_m (čím nižší, tím větší afinita enzymu k substrátu).

TABLE 8.7 Substrate preferences of chymotrypsin

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Glycine	—H	1.3×10^{-1}
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	—CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.6×10^2
Norleucine	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.0×10^3
Phenylalanine	—CH ₂ — 	1.0×10^5

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 7.3.

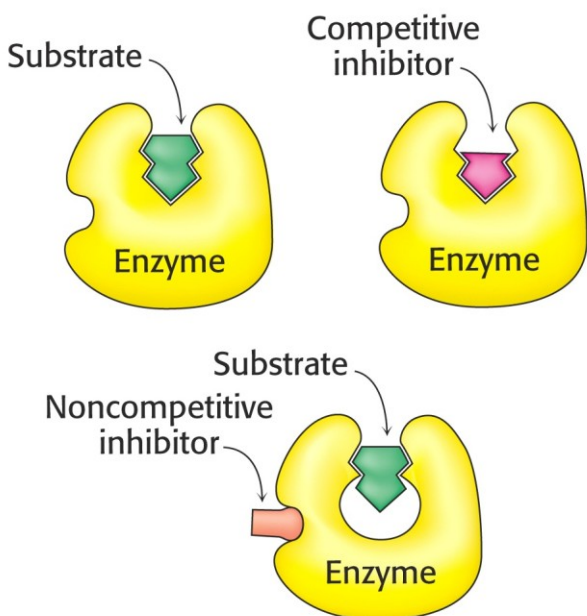
Ovlivnění rychlosti enzymové reakce

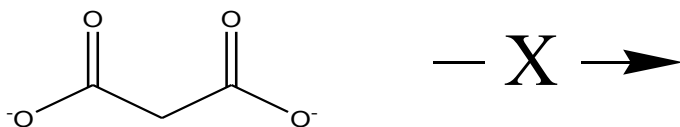
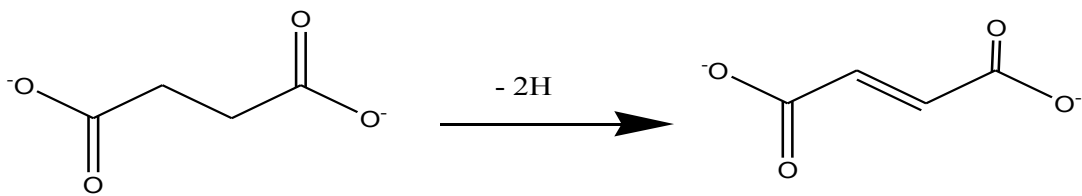
V organismech i laboratorních podmínkách lze ovlivnit rychlost enzymové reakce působením chemických látek – efektorů či modulátorů (pozitivních a negativních), běžně zvaných aktivátory (zvyšují) a inhibitory (snižují rychlost) enzymů. Mají regulační poslání, v laboratoři slouží ke studiu mechanismu působení enzymů. V tomto směru je nejčastější použití inhibitorů.

K tomu slouží především reversibilní inhibitory, jež interagují s enzymem vratně, dají se odstranit např. dialýzou, gelovou chromatografií apod. Inhibitory ireversibilní se vážou pevně a nevratně.

Reversibilní inhibice se dělí na několik typů, z nichž nejvýznamnější je kompetitivní a nekompetitivní,

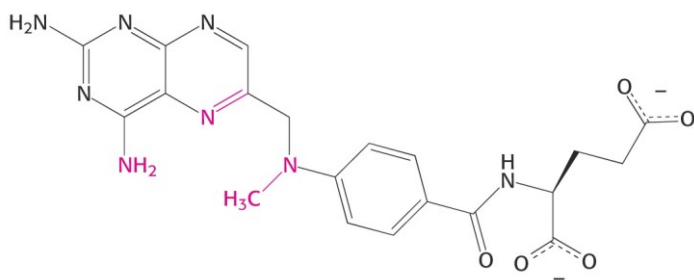
Kompetitivní inhibice



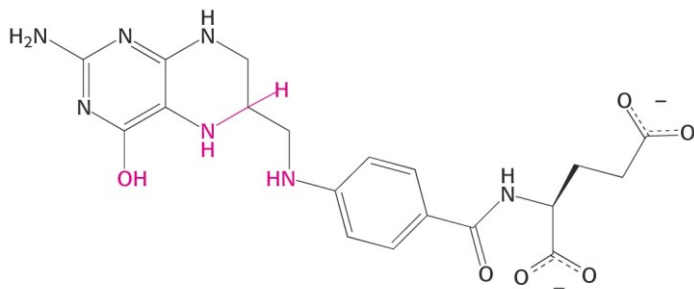


Jantaran (sukcinát) je substrátem enzymu sukcinátdehydrogenasy, vzniká fumarát. Malonát je kompetitivním inhibítorem tohoto enzymu, nelze ho dehydrogenovat. Nutno odlišit od konkurence několika substrátů, které mohou podlehnout enzymové reakci (např. zde deriváty jantaranu).

Podobný strukturální vztah bývá základem inhibičního působení tzv. antimetabolitů, např. methotrexátu a THF (dole), podobně sulfonamidy působí kompeticí s p-aminobenzoátem.

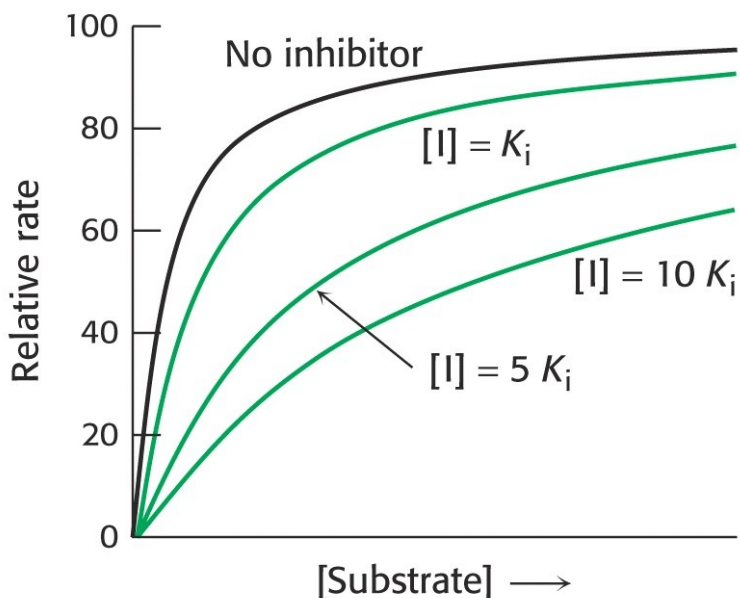
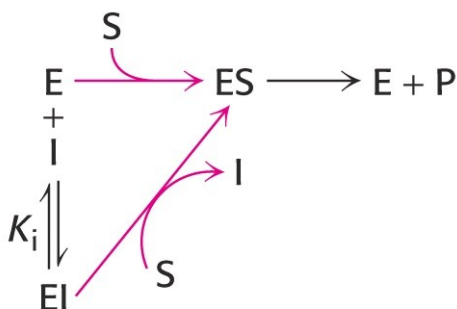


Methotrexate



Tetrahydrofolate

Kompetitivní inhibitor reaguje s volným enzymem a soutěží se substrátem o vazné místo v aktivním centru. Může se navázat pouze na volný enzym. V reakční směsi pak máme kromě E, S a ES ještě formu EI (komplex enzym-inhibitor), který se tvoří vratně mezi volným enzymem a inhibitorem:



Schema reakcí v přítomnosti kompetitivního inhibitoru a jeho vliv na kinetiku enzymové reakce

Zavedeme-li do vztahu Michaelise a Mentenové faktor

$$K_i = [E] \cdot [I] / [EI] \text{ a } [E]_t = [E] + [EI] + [ES]$$

dostaneme vztah

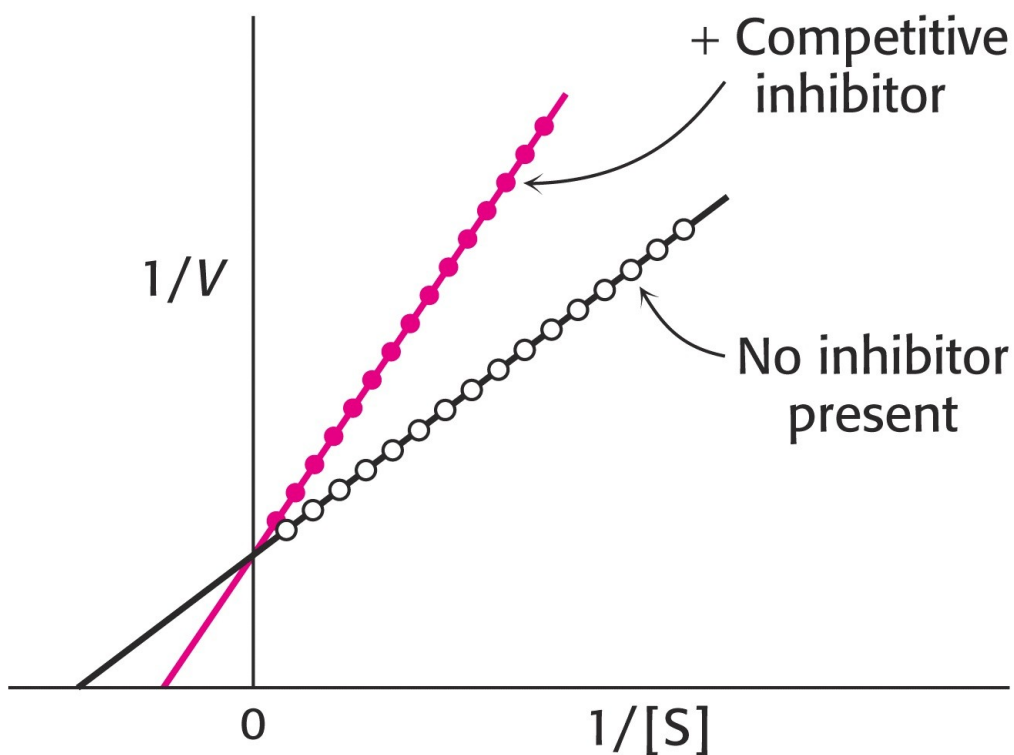
$$v = V_{lim} \cdot [S] / [K_m (1 + [I]/K_i) + [S]], \text{ kde } K_m (1 + [I]/K_i) = K_{app}$$

a po rektifikaci

$$1/v = 1/V_{lim} + K_{app}/V_{lim} \cdot 1/[S]$$

Výraz K_{app} nazýváme zdánlivou Michaelisovou konstantou, je vyšší než skutečná přímo úměrně koncentraci inhibitoru a nepřímo K_i .

Grafické vzjádření této závislosti vidíme na vynesení dle Lineweavera a Burka

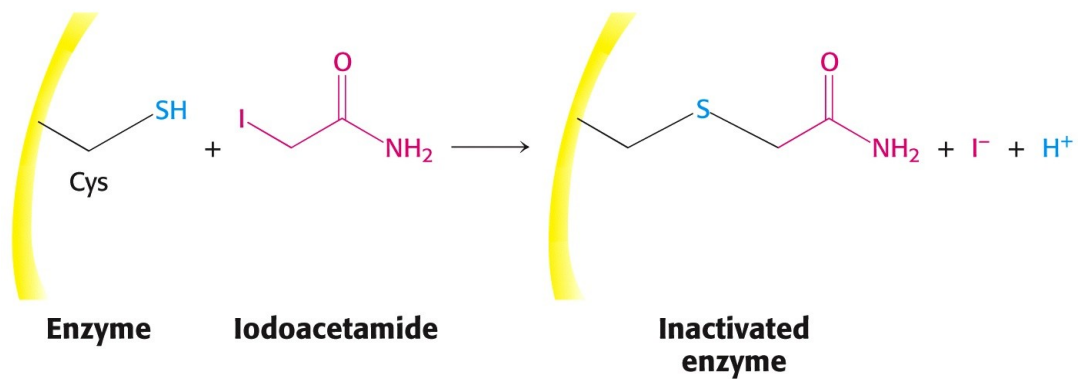
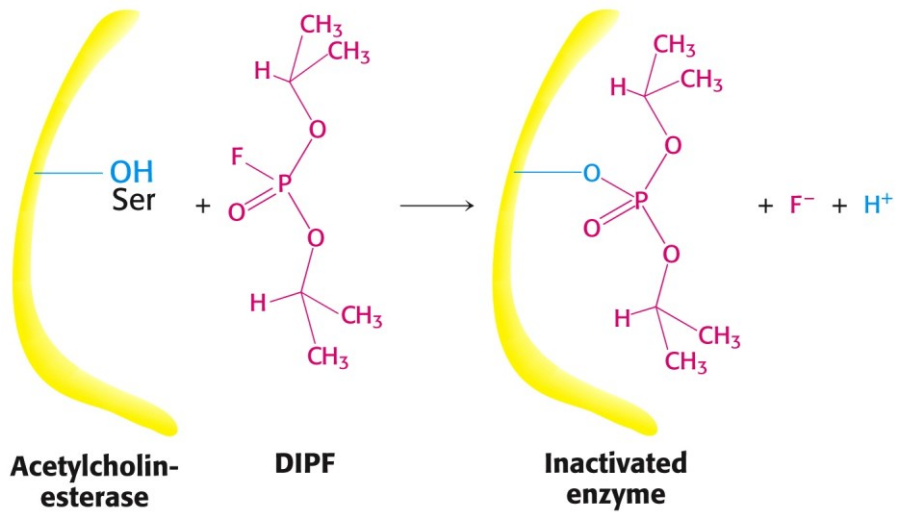


Vidíme, že V_{lim} se nemění, hodnota K_m je zvýšena na hodnotu K_{app} .

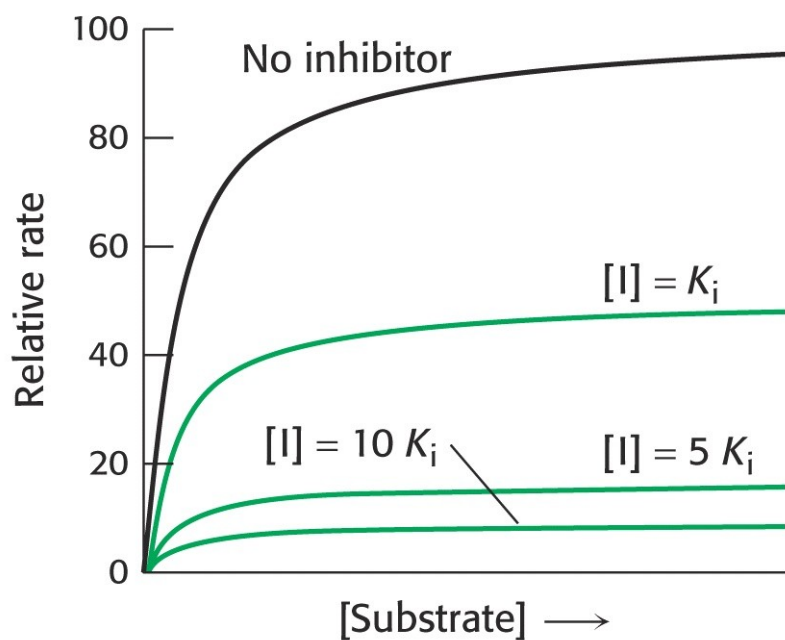
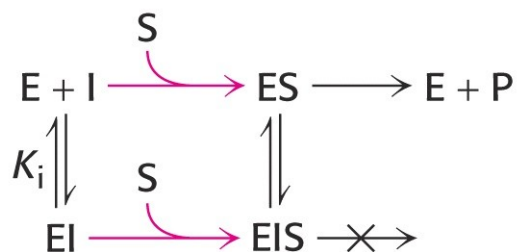
Analogicky se mění i grafy užívané v jiných vyneseníh, např. dle Hanese (směrnice = $1/V_{lim}$ je stejná, průsečíky se vzdalují od 0).

Nekompetitivní inhibice

Inhibitor není podobný substrátu, váže se jak na volný enzym tak komplex ES. Vytváří komplex EI, jehož koncentrace nezávisí na koncentraci substrátu, ale pouze inhibitoru.

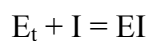


Příklad nekompetitivních inhibitorů serinových hydroláz a sulfhydrylových enzymů.



Schema rovnováh v reakční směsi v přítomnosti nekompetitivního inhibitoru a jeho ovlivnění enzymové kinetiky vyjádřeno graficky.

V reakční směsi pak vzniká komplex EI podle rovnice



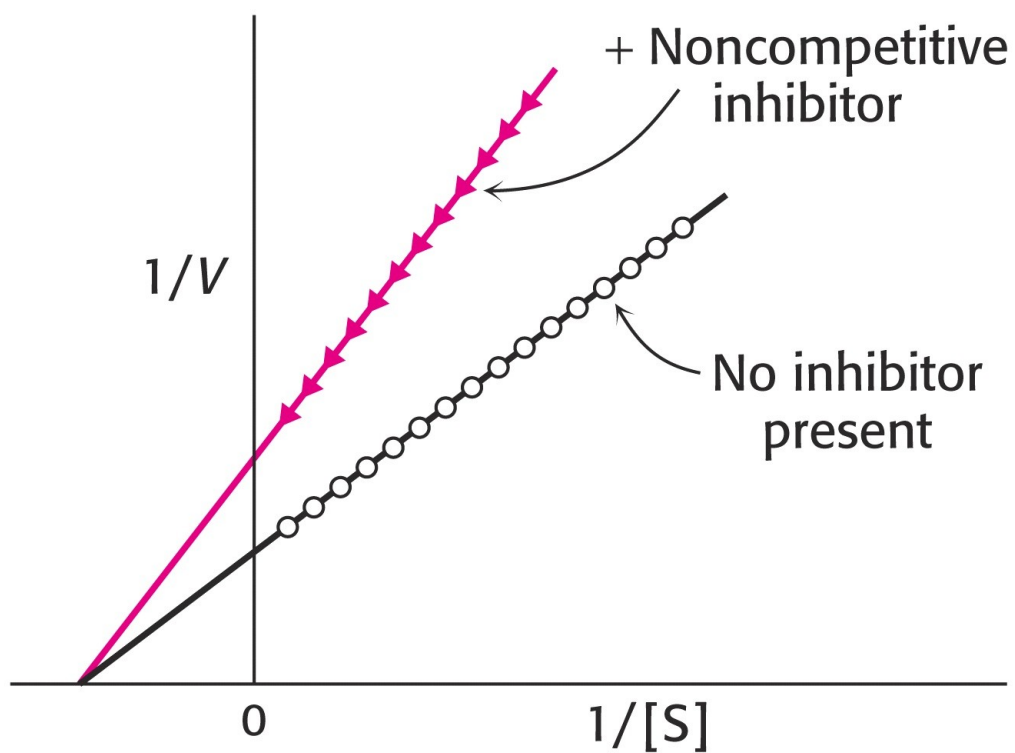
Zavedením do základní rovnice Michaelise a Mentenové pak dostáváme

$$v = V_{lim} (1 + [I]/K_i) \cdot [S] / [K_m + [S]]$$

a po rektifikaci

$$1/v = (1/V_{lim} + K_m/V_{lim} \cdot 1/[S]) \cdot (1 + [I]/K_i)$$

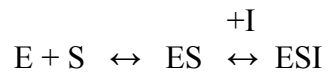
Grafické vyjádření této závislosti je na obrázku dole. Vidíme, že hodnota K_m se nemění, zvýší se průsečík $1/V_{lim}$.



Analogické změny najdeme v jiných vyneseních, u vynesení podle Hanese se zvýší směrnice při zachování průsečíku s osou $[S]$.

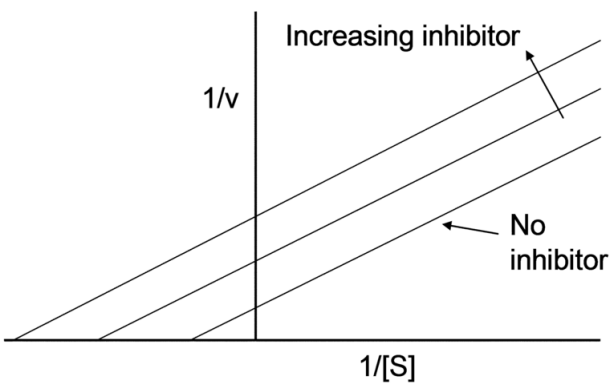
Akompetitivní inhibice

Inhibitor reaguje s komplexem ES – sekvenční děj



Typické pro vícesubstrátové reakce

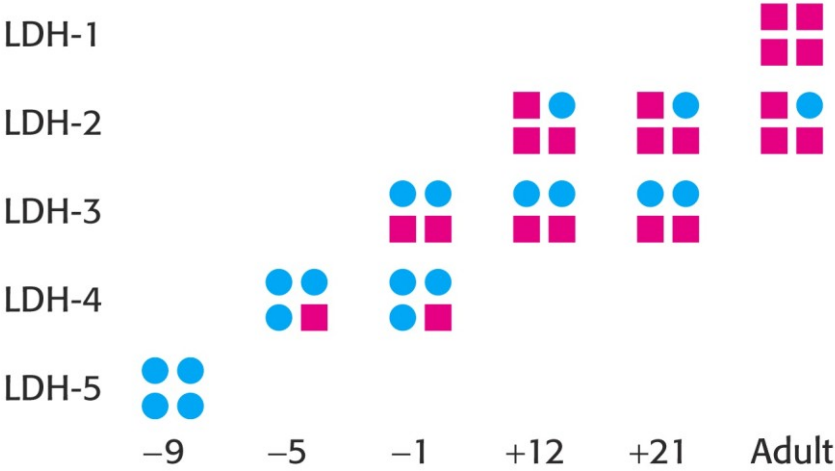
Nejmenší inhibice při nejnižších [S]



Mění se K_m i V_{lim} , jejich poměr je stejný

ISOENZYMY

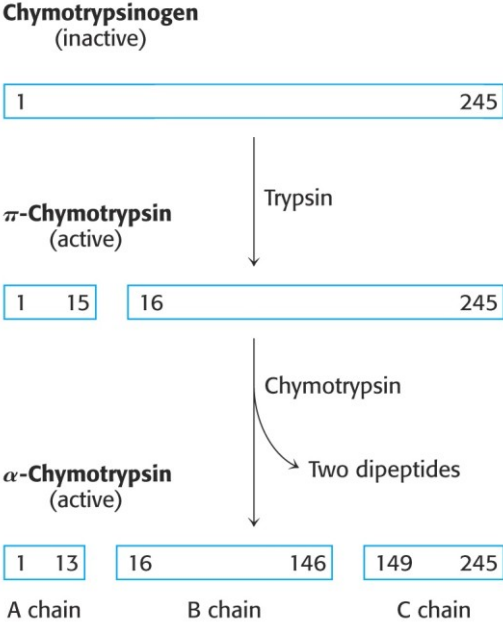
(A)



(B)

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
M ₄	thick green bar	thick green bar	thick green bar	thin green bar	thin green bar	thin green bar	thin green bar
HM ₃	thick green bar	thick green bar	thick green bar	thick green bar	thin green bar	thin green bar	thin green bar
H ₂ M ₂	thin green bar	thick green bar	thin green bar	thick green bar	thick green bar	thick green bar	thin green bar
H ₃ M	thin green bar	thin green bar	thin green bar	thin green bar	thick green bar	thin green bar	thin green bar
H ₄	thin green bar	thin green bar	thin green bar	thin green bar	thin green bar	thick green bar	thick green bar

Zymogeny - proenzymy



Organizace enzymů

- enzymy volně rozpuštěné (cytoplasma – glykolýza)
- multienzymové komplexy (zvl. pro anabolické pochody – syntéza MK, ale i katabolické pochody – využití energie)
- membránově vázané enzymy (organizovanost, vektoriální průběh reakcí – využití energie – oxidační a fotosyntetická fosforylace)

Využití enzymů

- **bioanalytická chemie** - **stanovení substrátů**
 - **stanovení inhibitorů**
 - **nepřímé stanovení**
- **lékařství**
- **průmyslové využití** - **prací prostředky**
 - **krmivářství**
 - **potravinářství**
 - **farmacie**
- **enzymová katalýza v organické chemii**

Umělé enzymy

- **Synzymy**
- **Abzymy**