

Enzymy v praxi

- částečně zmíněno již u použití imobilizovaných enzymů
- praktické využití mají samozřejmě i volné enzymy

Enzymy pro molekulární biologii

- přerušují řetězce DNA či RNA
- spojují řetězce DNA či RNA
- syntetizují nové řetězce DNA či RNA

- přidávají nebo odstraňují skupinu fosfátu na koncích nukleových kyselin

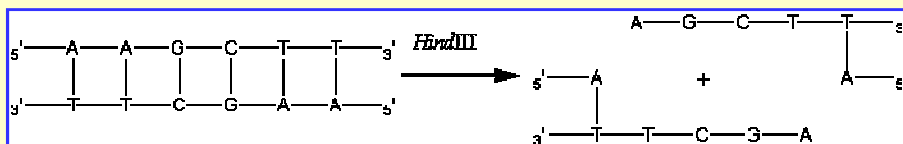
- ochraňují / povlékají / splétají / rozplétají řetězec DNA

Enzymy přerušující DNA / RNA

- **endonukleasy**
 - restrikční endonukleasy, restriktasy (3 typy)
 - deoxyribonukleasy (DNasy)
 - DNasa I, fazolová nukleasa (*Phaseolus aureus*, mung bean)
 - ribonukleasy (RNasy)
 - RNasa T1, U2, A, CL3, PhyM, B, H
- **exonukleasy**
 - exonukleasy III a VII
 - lambda exonukleasa
 - T7 gen 6 exonukleasa
 - fosfodiesterasa z jedových žlaz (venom)
 - fosfodiesterasa ze sleziny
- **endo- a exonukleasy**
 - nukleasa Bal31
 - nukleasa z *Neurospora crassa*
 - nukleasy P1 a S1

Restrikční enzymy

- **degradační enzymy, které reorganizují a stříhají DNA ve specifických "stříhových" místech = restrikční místa**
- **tři typy:**
 - I: náhodné štípání na nemetylovaných dsDNA délky 4 až 7 kbp
 - II: štípají v dvojité symetrické sekvenci dsDNA
 - III: rozpoznávají specifické penta- nebo hexamerní cílové sekvence v dsDNA, **ALE** štípají o 25 až 27 nukleotidů dále směrem k 3'-konci



DNasy a RNasy

- **DNasa I**
 - degraduje DNA hydrolýzou vnitřních fosfodiesterových vazeb
- **fazolová nukleasa**
 - vysoce specifická pro DNA nebo RNA postrádající uspořádanou strukturu
 - hydrolyzuje ve směru 5' -> 3'
- **RNasa H**
 - specificky degraduje RNA řetězce v DNA:RNA heteroduplexech

Exonukleasy

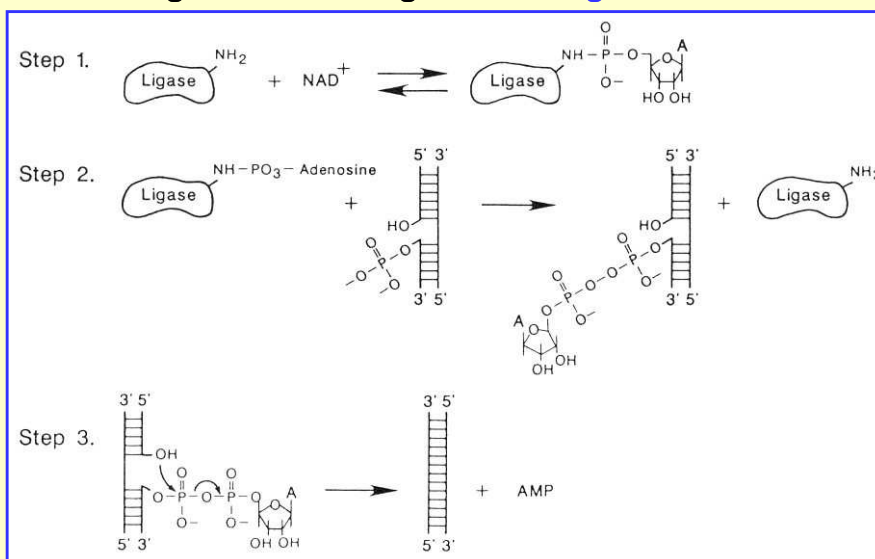
- **exonukleasa III**
 - 3' -> 5' exonukleasová aktivita plus další tři aktivity, pouze na dsDNA, neúčinkuje na ssDNA
- **exonukleasa VII**
 - účinkuje jak v 3' -> 5' tak v 5' -> 3' směru
 - specifická pro jednořetězcové nukleové kyseliny
 - neuvolňuje mononukleotidy
- **lambda exonukleasa**
 - účinkuje v 5' -> 3' směru, na dvouřetězcové nukleové kyseliny

Endo- i exonukleasy

- nukleasa Bal31
 - vysoce specifická endodeoxynukleasová aktivita pro jednořetězcové DNA
 - exonukleasová aktivita dokáže současně degradovat jak 3' tak 5' konce DNA duplexu
- nukleasa z *Neurospora crassa*
 - na ssDNA nebo RNA účinkuje jako endonukleasa
 - na dsDNA a ssDNA účinkuje jako exonukleasa

Ligasy - spojování DNA / RNA

- T4 DNA ligasa T4 RNA ligasa DNA ligasa z *E. coli*



Enzymy syntetizující nové vazby kostry DNA a RNA

- DNA polymerasa I
- velký fragment DNA polymerasy I (Klenowův fr.)
- T4 DNA polymerasa
- modifikovaná T7 polymerasa
- Taq polymerasa
- RNA polymerasa
 - bakteriální
 - z bakteriofága (T3, T7, SP6)
- reversní transkriptasa
- poly(A)-polymerasa
- terminální deoxynukleotidyltransferasa
- polynukleotidfosforylase

Enzymy přidávající / odstraňující fosfokupinu na koncích NA

- T4 polynukleotidkinasa
- alkalická fosfatasa
- kyselá pyrofosfatasa z tabáku

Enzymy (a další proteiny) co chrání, rozvíjí nebo zavinují DNA

- **DNA methylasy**
- **proteiny vážící ssDNA nebo ssRNA**
 - RecA protein, SSB protein, Gen 32 protein
- **topoisomerasy**

Enzymy v průmyslu

- **v praxi využívány od nepaměti (součást biol. materiálů)**
- **alkoholové kvašení (kvasinky), změkčování masa (proteasy), srážení kaseinu (chymosin z telecích žaludků)**
- **průmyslové enzymy**
 - velká množství (tuny/rok)
 - může být i nízká čistota
 - nízká cena (~\$5-40 / kg) ... relativně nízký zisk
- **speciální enzymy**
 - malá produkce (g až kg/rok)
 - vysoká čistota
 - vysoká cena (~ \$5 – 10 000 / g) ... vysoký zisk
- **roční nárůst výroby a spotřeby o 10-15%, hodnoty o 4-5%**

Rozdělení dle účinku

▪ podle substrátu

- hydrolyzující proteiny 59%
- hydrolyzující sacharidy 28%
- hydrolyzující lipidy 3%
- speciální (bioanalýza, zdravotnictví, výzkum) 10%

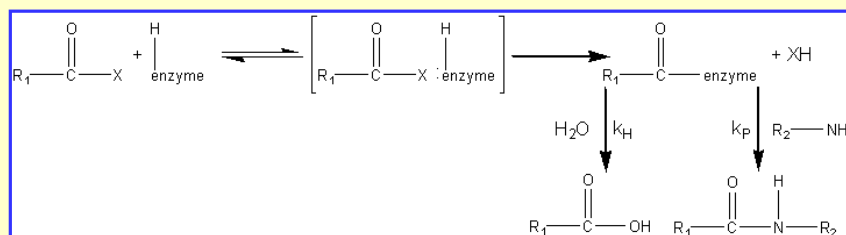
Průmyslové proteasy

Enzym	preferované místo štěpení ^a (N-konec → C-konec)
bromelain	-Lys↓-Z; -Arg↓-Z; -Phe↓-Z; -Tyr↓-Z
chymotrypsin	-Trp↓-Z; -Tyr↓-Z; -Phe↓-Z; -Leu↓-Z
papain	-Phe-AA↓-Z; -Val-AA↓-Z; -Leu-AA↓-Z; - Ile-AA↓-Z
pepsin	-Phe(or Tyr,Leu)↓-Trp(or Phe,Tyr)-
thermolysin	-AA↓-Leu-; -AA↓-Phe-; -AA↓-Ile-; -AA↓- Val-
trypsin	-Arg↓-Z; -Lys↓-Z

^a AA libovolné aminokyseliny, Z aminokyselina, ester nebo amidový zbytek. Místo štěpení platí pro purifikované enzymy.

Proteasy

- jsou schopny katalyzovat vznik polymerů z konc. roztoků bílkovin, peptidů nebo aminokyselin (plasteiny)
- využívá se pro odbarvování a odstranění špatné chuti (sojové proteiny, biomasy)
- syntetické využití při tvorbě peptidů - využití stereospecifity, omezení nutnosti chránění postranních skupin
 - důležitá volba pH, vhodné další skupiny usnadňující precipitaci produktů
 - kinetická kontrola - přenos skupiny ne na vodu, ale na alternativní AK nebo peptid, co je silnějším nukleofilem než voda:



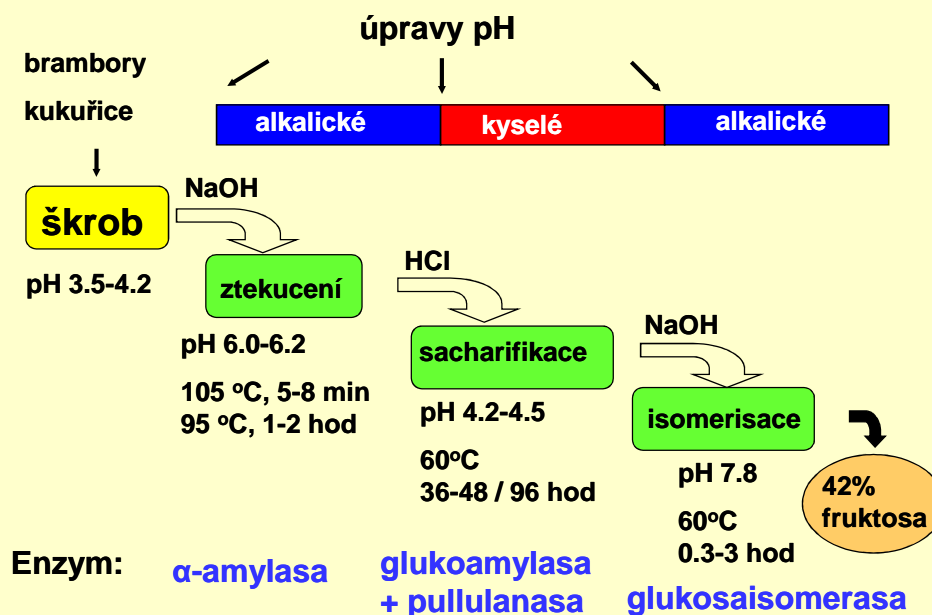
Prací prostředky

- biodetergenty – možnost praní při nižších teplotách se stejnou účinností jako „klasické“ prostředky
- **α -amylasy** ... odstraňování škrobového pojidla z textilních vláken, v prostředcích do automatických myček
- termostabilní, alkalické bakteriální **proteasy**
- **lipasy** – rozklad mastnoty

Kvasný průmysl - výroba piva

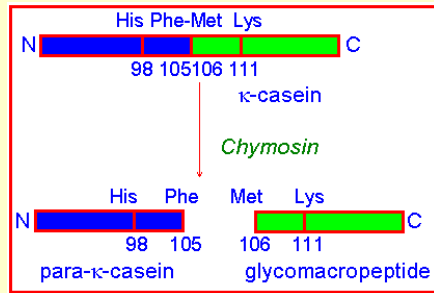
- přísady **α -amylasy** (hydrolýza 1,4- α -glukosidických vazeb uvnitř polysacharidové molekuly - ztekucování škrobu, lepší filtrovatelnost) a **β -amylasy** (odštěpují maltosové jednotky z neredukujícího konce polysacharidu) - degradace dextrinů (vyšší podíl alkoholu)
- přísada **pullulanasy** (štěpení α -1,6- větvení škrobu)
- **β -glukanasa** - snižování nežádoucí viskozity beta glukanů
- **glukoamylasa** (odštěpuje glukosy od neredukujícího konce) - odbourávání zbytkových dextrinů v pivu - vyšší stupeň prokvašení, diabetické pivo
- **papain** - enzymové stabilizátory piva (odstraňování chladových zákalů) - bránění vzniku polyfenolových komplexů bílkovin, ale nadměrná hydrolýza bílkovin nežádoucí

Sacharidy ze škrobu



Mlékárenství

- mléčné produkty
 - **chymosin** (syřidlo)
sražení bílkoviny kaseinu po jeho rozštěpení
 - **lipasy** - zrání sýrů,
specifická vůně a aroma
 - **β -galaktosidasy** štěpení laktosy - výroba delaktosovaného mléka pro intolerance vedoucí k gastrointestinálním obtížím, galaktosa a glukosa se metabolizují snadno;
mléko pro výrobu zmrzliny (zabránění krystalizace laktosy)



Celulasy

- komplexní enzymový systém katalyzující hydrolýzu celulosy
- celulasa z *Trichoderma viridae* → odbourání nativní celulosy
- zpracování celulosové suroviny (dřevěné odpady, odpadní papír)
- výroba instantních potravin (káva, čaj), digestiva pro krmné směsi, lepší účinnost extrakce šťáv z rostlinných materiálů a ovoce

Lipasy

- **postupná hydrolýza lipidů**
 - triacylglyceroly → diacylglyceroly → monoacylglyceroly → glycerol + **uvolněné mastné kyseliny**
- rychlost se postupně snižuje - totální hydrolýza je obtížná
- heterogenní reakce (lipidy jsou nerozpustné ve vodě)
- ovlivnění chuti a vůně potravinářských výrobků (výroba sýrů)
- součást digestivních přípravků

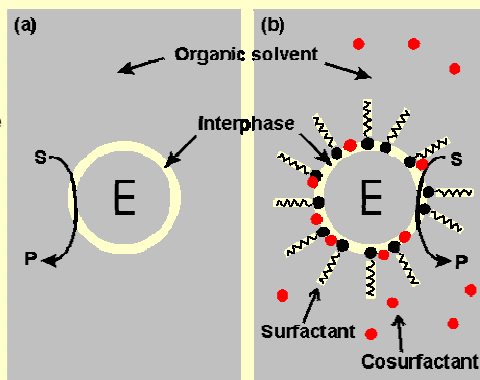
Enzymy v organických rozpouštědlech

- voda je nevhodné médium pro většinu reakcí organické chemie
- mnohé reaktanty (kyslík, steroidy, lipidy) jsou mnohem rozpustnější v organickém rozpouštědle
- mnohé produkty jsou ve vodném prostředí labilní
- nadbytek vody (55,5 M koncentrace) často upřednostní hydrolytické reakce proti jiným užitečnějším procesům
 - transesterifikační reakce esteras a lipas
 - posun termodynamických rovnováh žádoucím směrem - enzym sám jako katalyzátor nemění velikost rovnovážné konstanty katalyzované reakce!
- stabilizace - nehrozí mikrobiální kontaminace
- velmi často zde enzym funguje v dvoufázovém systému
 - usnadnění separačních kroků
- polaritu prostředí charakterizuje partiční koeficient log P
 - rozdělovací poměr daného rozpouštědla mezi oktanolem a vodou

$$\text{Log}P = \text{Log}_{10} \left(\frac{[\text{Material}]_{\text{octanol}}}{[\text{Material}]_{\text{water}}} \right)$$

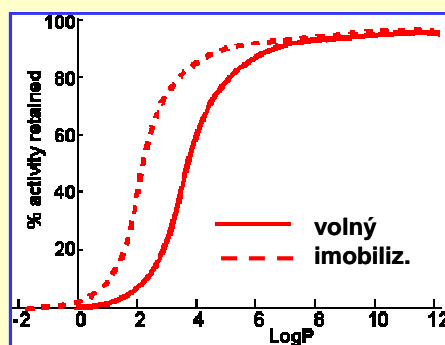
Enzymy v organických rozpouštědlech

- v zásadě existují dvě možnosti:
- téměř bezvodý enzym je suspendován v organickém rozpouštědle
 - na jeho povrchu je velmi tenká vodná vrstvička
- enzym je rozpuštěn v reverzních micelách tvořených molekulami surfaktantu a kosurfaktantu
 - surfaktant: cetyltrimethylamonium bromide (CTAB), bis(2-ethylhexyl) sulfosukcinát Na (AOT), fosfatidylcholin, tetraethylglycoldodecylether - nachází se na rozhraní vodné interfáze a org. rozpouštědla
 - kosurfaktant (butanol, hexanol, oktanol) - pokud je přítomen, tak modifikuje polaritu interfáze



Polarita prostředí

- aktivita enzymu je úměrná polaritě prostředí vyjádřené pomocí log P
- ve speciálních případech může být užitečné použít těžkou vodu D₂O
- příklady log P pro nejčastěji používaná rozpouštědla

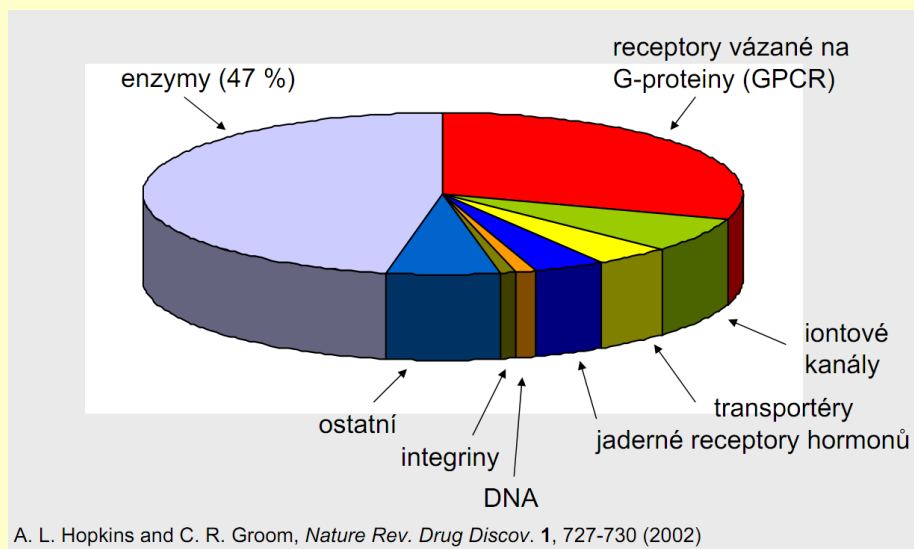


Solvent	LogP	Solvent	LogP
Butanone	0.3	1,1,1-trichloroethane	2.8
Ethyl acetate	0.7	Carbon tetrachloride	2.8
Butanol	0.8	Dibutyl ether	2.9
Diethyl ether	0.8	Cyclohexane	3.1
Methylene chloride	1.4	Hexane	3.5
Butyl acetate	1.7	Petroleum ether (60-80)	3.5
Di-isopropyl ether	2.0	Petroleum ether (80-100)	3.8
Benzene	2.0	Dipentyl ether	3.9
Chloroform	2.2	Heptane	4.0
Tetrachloroethylene	2.3	Petroleum ether (100-120)	4.3
Toluene	2.7	Hexadecane	8.7

Enzymy ve zdravotnictví

- fibrinolýza - cílené rozpouštění krevních sraženin, plasmin, **streptokinasa, urokinasa (aktivátory plasminogenu)**
- cílená tvorba krevních sraženin - **thrombin**
- trávicí enzymy
- **trypsin, papain, bromelain** - čištění ran od hnisu

Enzymy jako cíl léčiv



dle Spiwok, Kodíček, VŠCHT, Praha, webové materiály

Klinické studie

- **1. fáze**
 - podávání zdravým dobrovolníkům (20 – 100)
 - studium účinků na tělesné funkce, vedlejších účinků,
 - farmakokinetiky, určení dávkování
- **2. fáze**
 - podávání vybraným pacientům (stovky)
 - „blind“/„double blind“
 - bezpečnost, účinnost, dávka, farmakokinetika
- **3. fáze**
 - podávání větší skupině pacientů (stovky až tisíce)
 - srovnání se standardní terapií
 - povolovací řízení
- **4. fáze**
 - zkoušení v praxi, dlouhodobé vyhodnocování

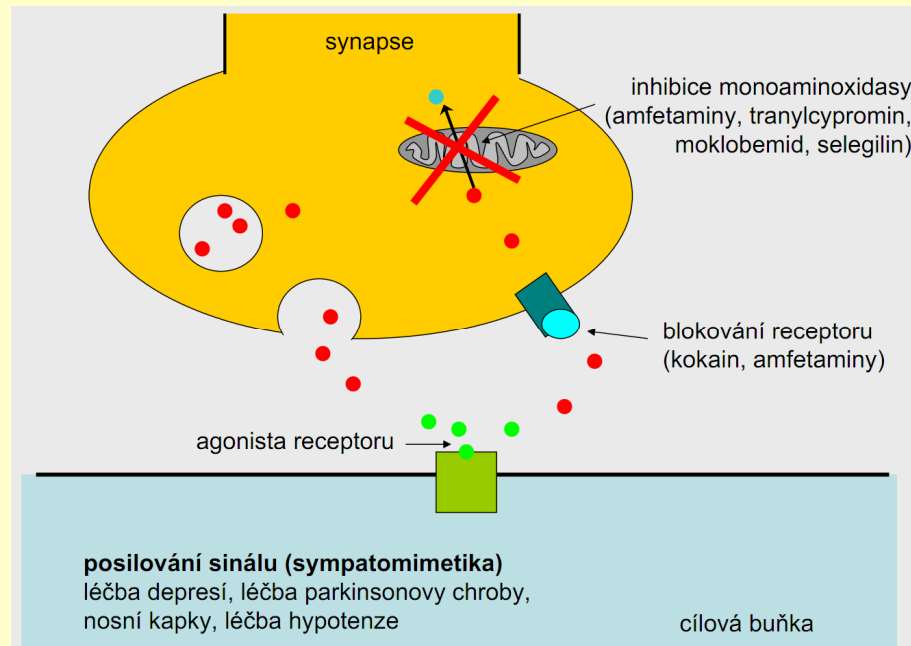
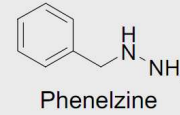
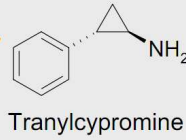
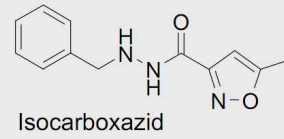
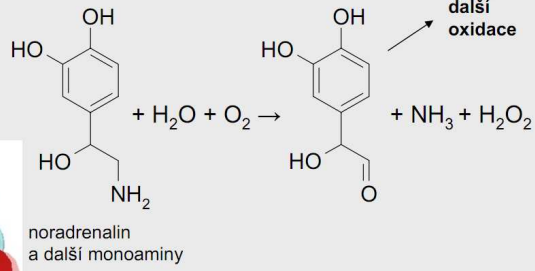
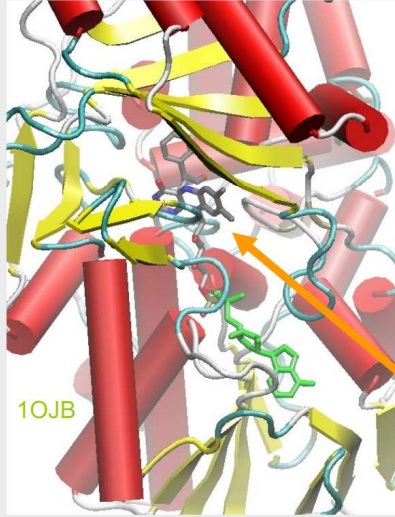
Nejprodávanější v USA (2004)

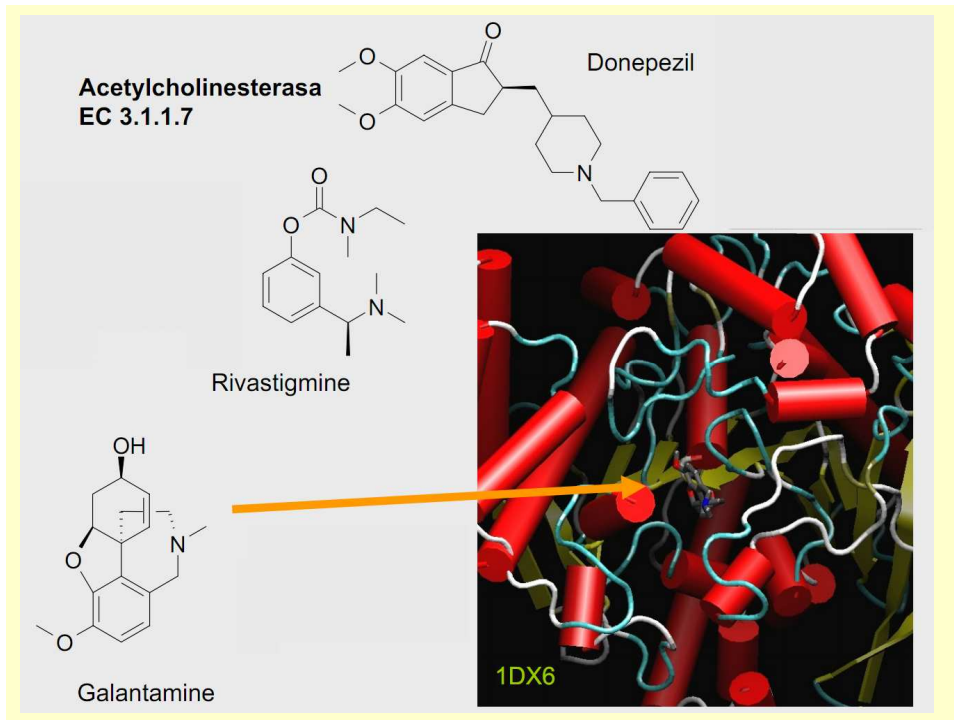
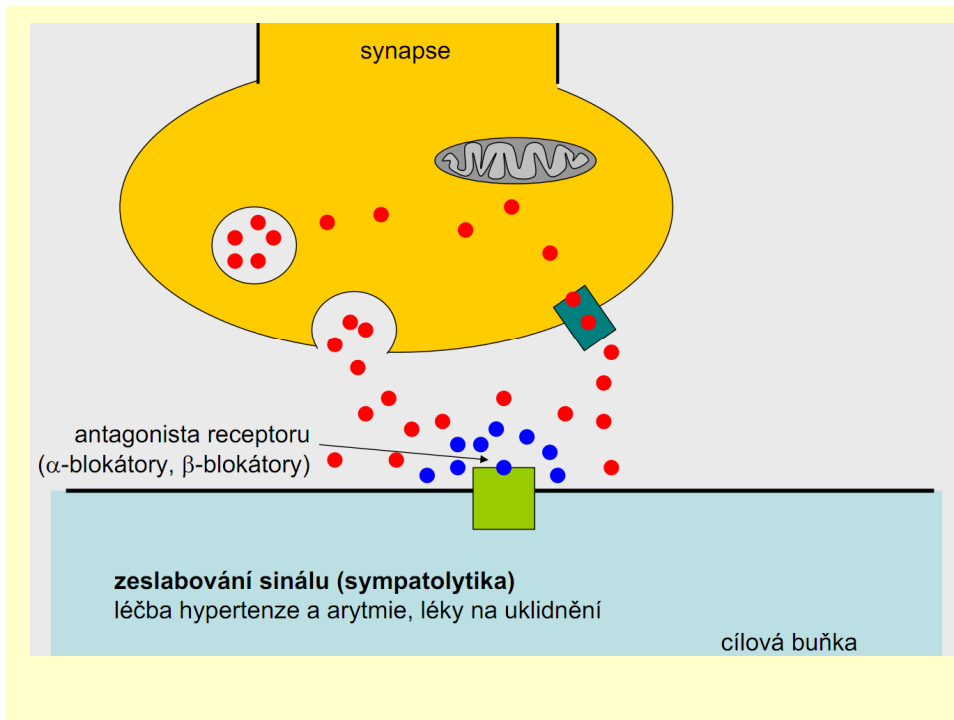
název	látka	účinek	cíl	výrobce	mld USD/rok
1 LIPITOR	atorvastatin	tuky	HMG-CoA reductasa	PFIZER	7.1
2 ZOCOR	simvastatin	tuky	HMG-CoA reductasa	MERCK	5.5
3 PREVACID	lansoprazol	žaludek	H+/K+-ATPasa	TAP PHARMA	4.0
4 NEXIUM	esomeprazol	žaludek	H+/K+-ATPasa	ASTRAZENECA	3.6
5 PROCRIT	erythropoetin	krvetvorba	EPOR	JOHNSON & J.	3.3
6 ZOLOFT	sertralin	deprese, obezita	serotonin transporter	PFIZER	3.0
7 PLAVIX	clopidogrel	oběh. systém	ADP receptor	BRISTOL-MYERS	2.9
8 ADVAIR DISKUS	fluticason	astma	glukokort. rec.	GLAXO	2.8
9 ZYPREXA	olanzapin	hlava	serotonin-dopam. rec.	ELI LILLY	2.7
10 CELEBREX	celecoxib	záněty	COX-2	PFIZER	2.7

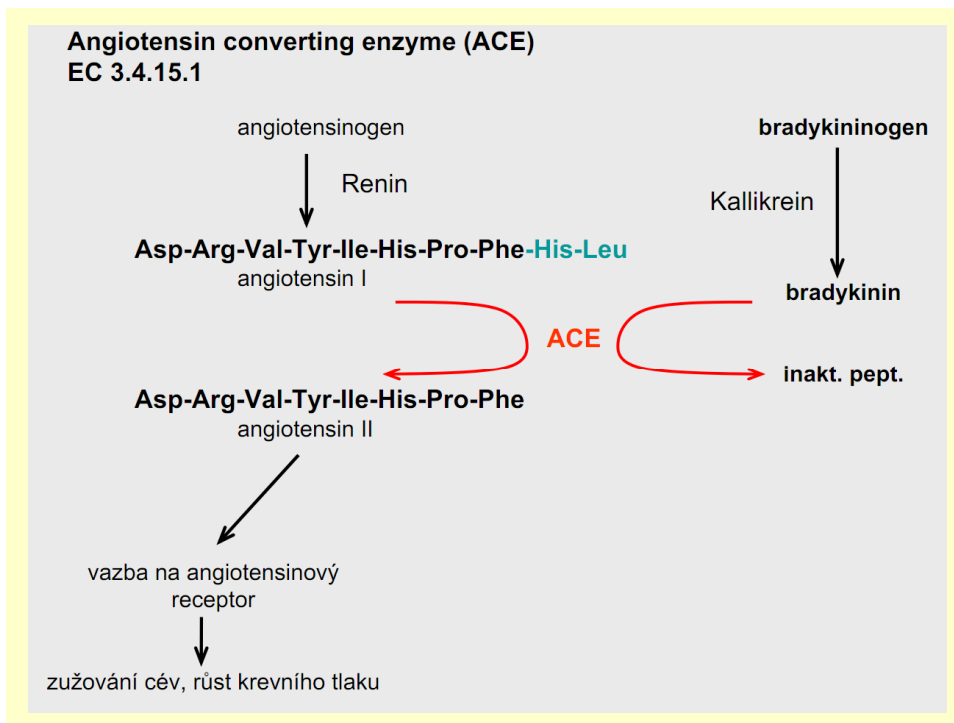
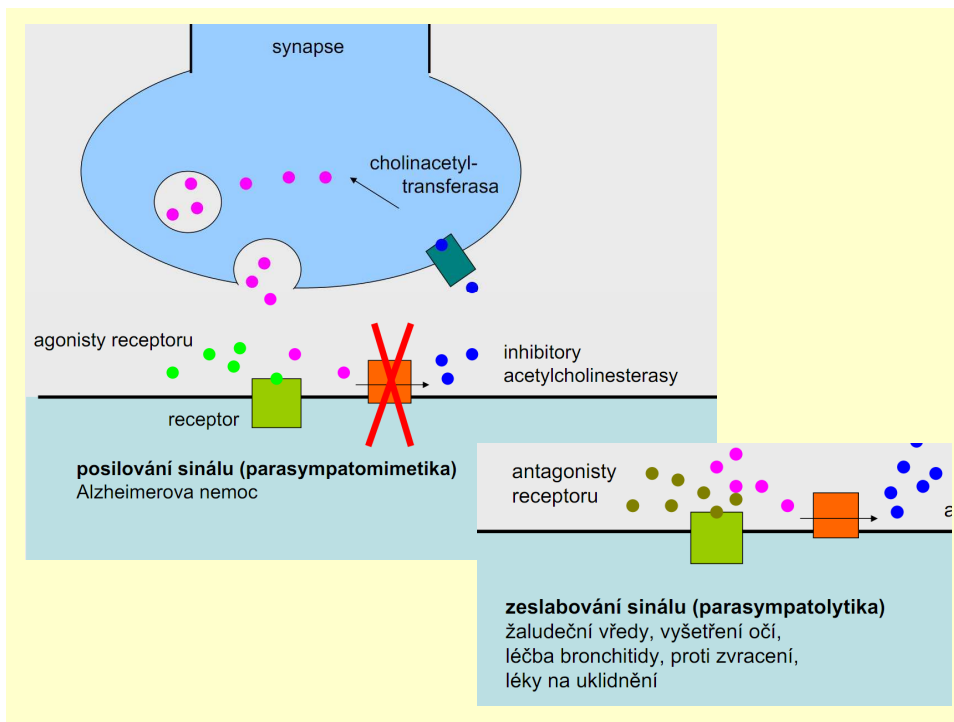
enzymy ...

Monoaminoxidasa (MAO)
EC 1.4.3.4

léčba depresí

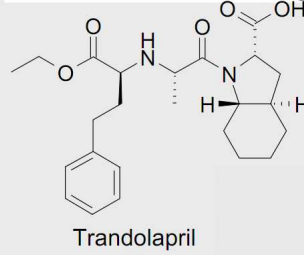
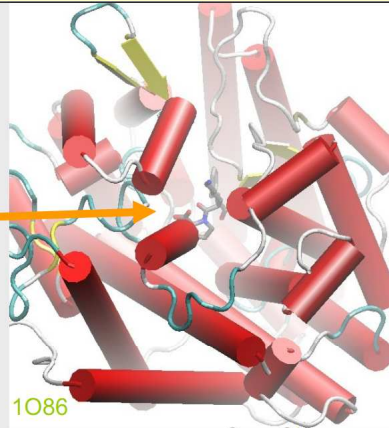
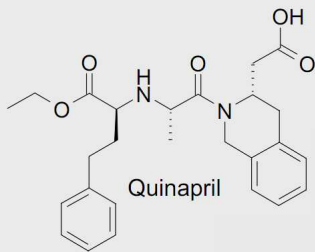
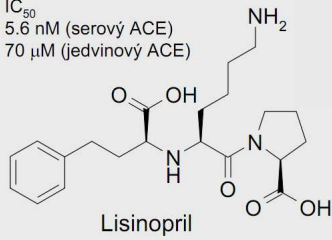




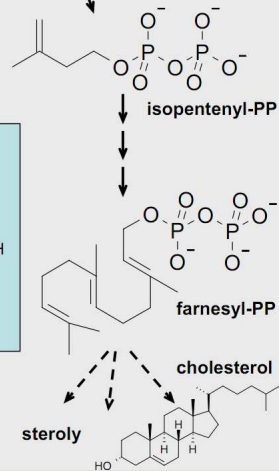
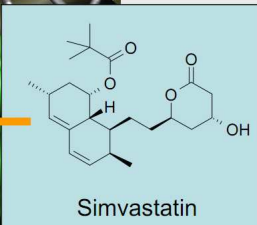
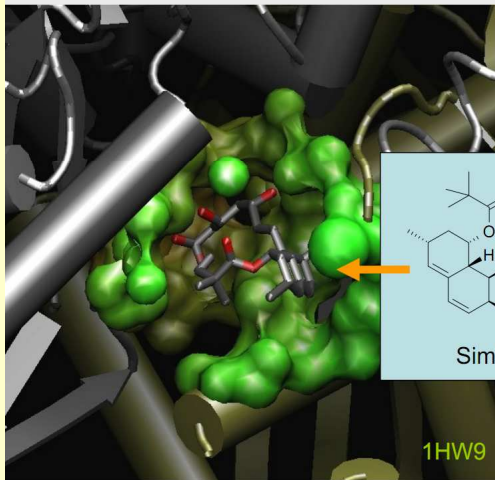
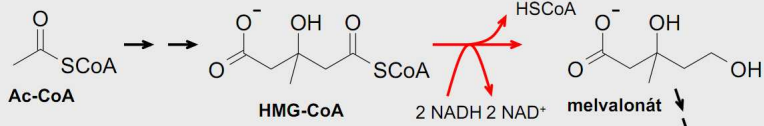


ACE inhibitory

IC₅₀
5.6 nM (serový ACE)
70 μM (jedvinový ACE)



HMG-CoA reduktasa EC 1.1.1.34



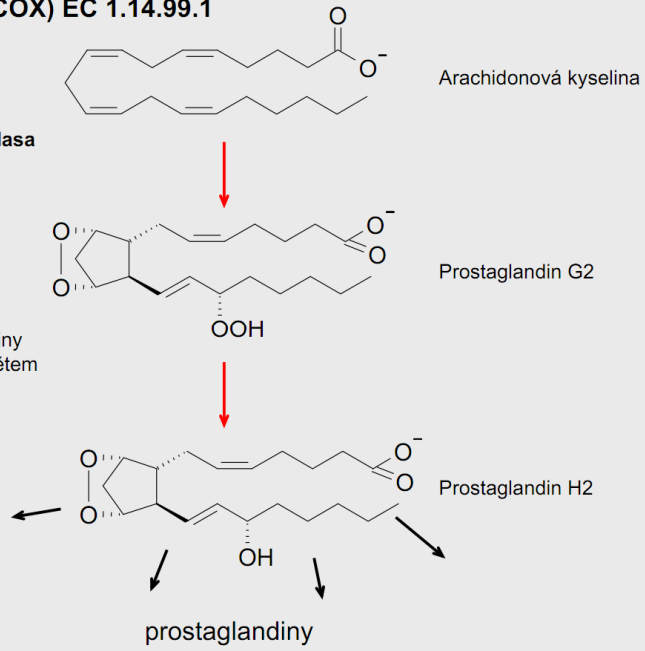
Cykloxygenasa (COX) EC 1.14.99.1

Prostaglandin-endoperoxidsynthasa

dioxygenasa a peroxidasa zároveň

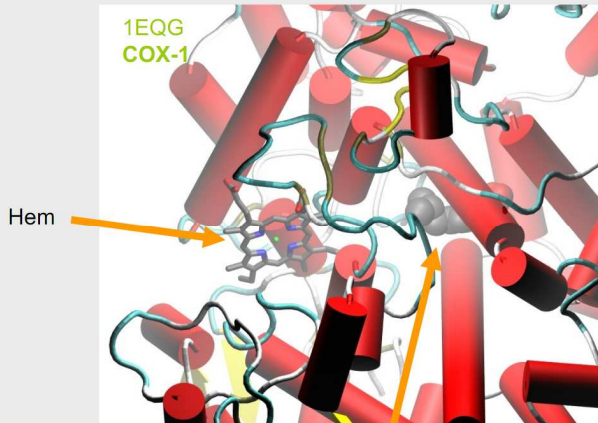
Isoenzymy

- COX-1 – žaludek, ledviny
- COX-2 – tkáně se zánětem



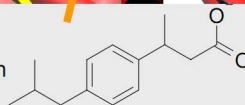
Cykloxygenasa

neselektivní (COX-1 & COX-2)

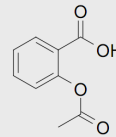


IC₅₀
2.6 μM (COX-1)
1.5 μM (COX-2)

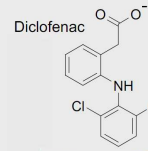
Ibuprofen



neselektivní (COX-1 & COX-2)



kyselina
acetylsalicylová

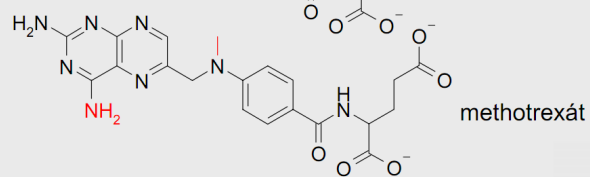
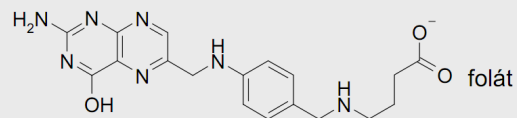
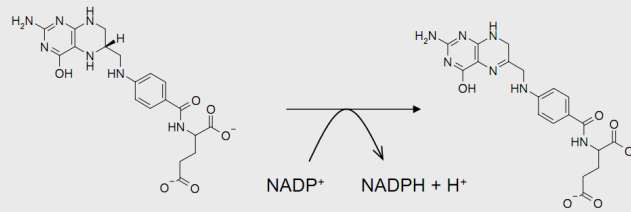


IC₅₀
300 nM (COX-1)
18 nM (COX-2)



Dihydrofolát reduktasa

EC 1.5.1.3

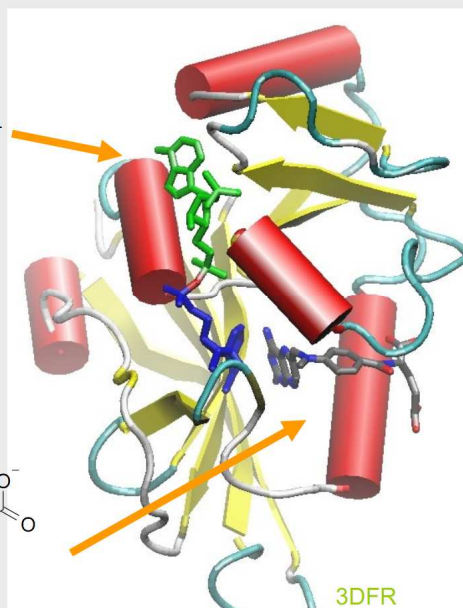
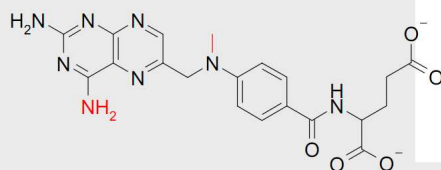


účinky: protinádorové (acute lymphoblastic leukemia a další)
imunosupresivní (revmatismus a jiná autoimunní onemocnění)

Dihydrofolát reduktasa

NADP⁺

methotrexát

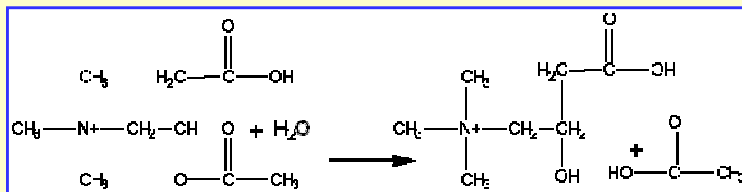


Trendy

- enzymy stále zůstávají v popředí zájmu biotechnologie
- relativně málo enzymů se produkuje ve velkém (> kg) a ve stavu vhodném pro průmyslové nasazení
- nové enzymy se hledají z přírodních zdrojů a **selekcí** existujících mikrobiálních kmenů
- průmyslově **rozšířené** enzymy nachází další **nové aplikace**
- nové enzymy jsou **navrhovány** metodami molekulového modelování, bioinformatickými technikami a genetickým a proteinovým inženýrstvím
- jsou navrhovány a syntetizovány nové **organické katalyzátory** s využitím "**enzymologického**" know-how
- začínají se prosazovat i složitější enzymové **komplexy**

"Nepřirozené" substráty

- mnohé enzymy nejsou zcela specifické pro své přirozené substráty
- některé mohou katalyzovat i reakce neodpovídající jejich zařazení
 - např. v nepřirozeném prostředí dvou fází (org. rozpouštědla)
 - lipasa (hydrolasa) v nevodném prostředí funguje jako transesterasa
 - řada oxidas může jako akceptor místo kyslíku využívat širokou škálu jiných oxidantů (benzochinon, ferricinium, ferrikyanid, ...)
- **acetylcholinesterasa - příprava L-karnitinu**
 - syntetická racemická směs acetyl-DL-karnitinu, z ní se D-anomer enzymaticky zhydrolyzuje
 - směs acetyl-L-karnitinu a D-karnitinu se separuje na ionexu
 - acetyl-L-karnitin je biologicky aktivní stejně jako L-karnitin



- ač je rychlostní konstanta pro acetyl-D-karnitin 10^4 x nižší než pro acetylcholin, výtěžnost je stejná (acetylcholin při nadbytku inhibuje...)

„Nové“ enzymy - požadavky

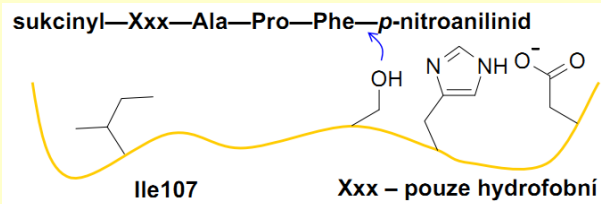
- stabilita (teplotní, v rozpouštědlech)
- substrátová specifita
- schopnost katalyzovat jiné reakce
- schopnost fungovat jako součást biosensorů
- alergen / imunogenicitu
- další

Enzymy z extrémofilních organismů

- termo- a hypertermofilní
 - Aeropyrum pernix K1, Aquifex aeolicus VF5, Archaeoglobus fulgidus DSM4304,
 - Chlorobium tepidum TLS, Idiomarina loihiensis L2TR,
 - Methanobacterium thermoautotrophicum delta H, Methanococcus jannaschii DSM2661,
 - Methanopyrus kandleri AV19, Picrophilus torridus DSM 9790, Pyrobaculum aerophilum IM2,
 - Pyrococcus abyssi GE5, Pyrococcus furiosus DSM 3638, Pyrococcus horikoshii shinkaj OT3,
 - Sulfolobus solfataricus P2, Sulfolobus tokodaii strain 7,
 - Symbiobacterium thermophilum IAM14863, Thermoanaerobacter tengcongensis MB4(T),
 - Thermococcus kodakarensis KOD1, Thermoplasma acidophilum DSM 1728,
 - Thermoplasma volcanium GSS1, Thermosynechococcus elongatus BP-1,
 - Thermotoga maritima MSB8, Thermus thermophilus HB27, Thermus thermophilus HB8
- psychrofilní
 - Colwellia psychrerythraea 34H, Desulfotalea psychrophila LSv54, Methanogenium frigidum,
 - Methanococcoides burtonii, Pseudoalteromonas haloplanktis,
 - Photobacterium profundum SS9
- halofilní
 - Haloarcula marismortui ATCC 43049, Halobacterium sp. NRC-1
- radioresistentní
 - Deinococcus radiodurans R1

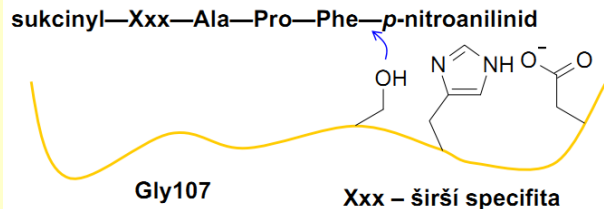
Subtilisin

- **nativní (WT)**



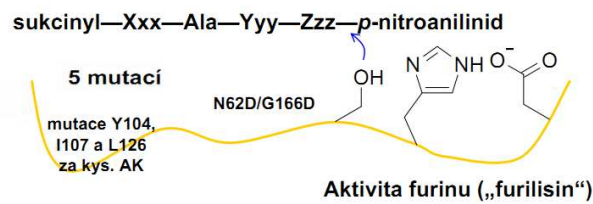
- **mutace I 107 G**

- Rhennecker, *Biochem.* 32 (1993) 1199.

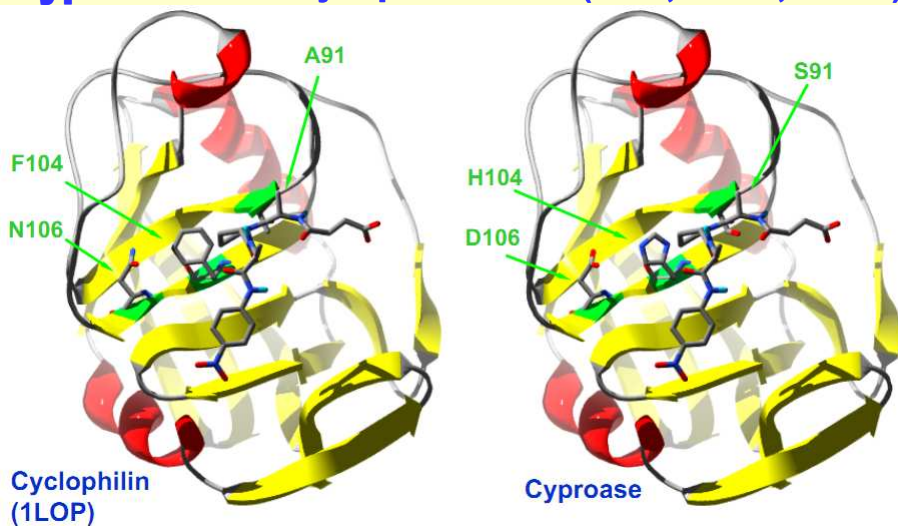


- **další mutace**

- Ballinger, *Biochem.* 35 (1996) 13579.



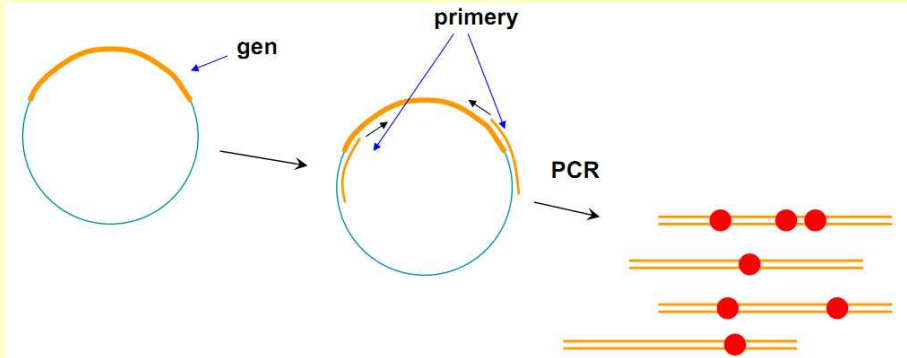
Cyproase 1 ... cyclophilin z *E.coli* (A91S, F104H, N106D)



- mutace poblíž peptid-vázcího místa vytvořila třídu podobnou serinovým proteinasám
- endopeptidasa, štěpí před prolinovým zbytkem

Náhodné mutace – kombinatorický přístup

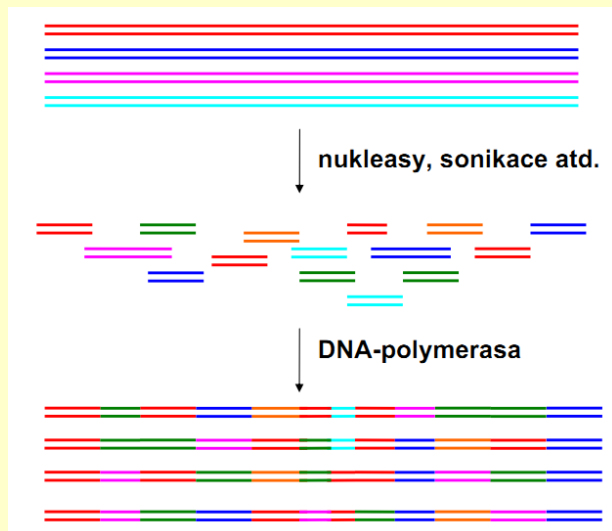
- error-prone PCR – „chybuující ...“



- ze získané knihovny sekvencí se screeningem naleznou vylepšené varianty enzymu

DNA shuffling

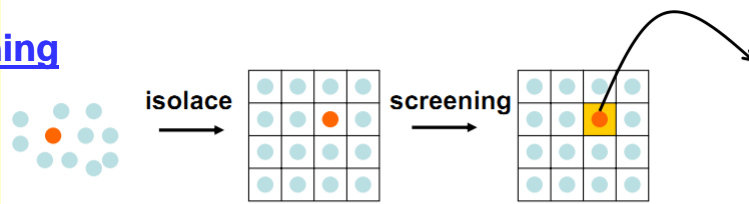
- náhodné kombinování sekvencí z původních genů
- genová knihovna



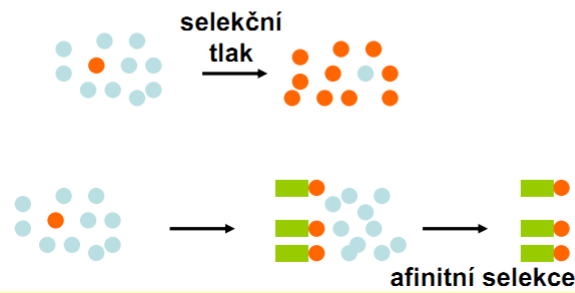
Nalezení vhodného kandidáta

- screening

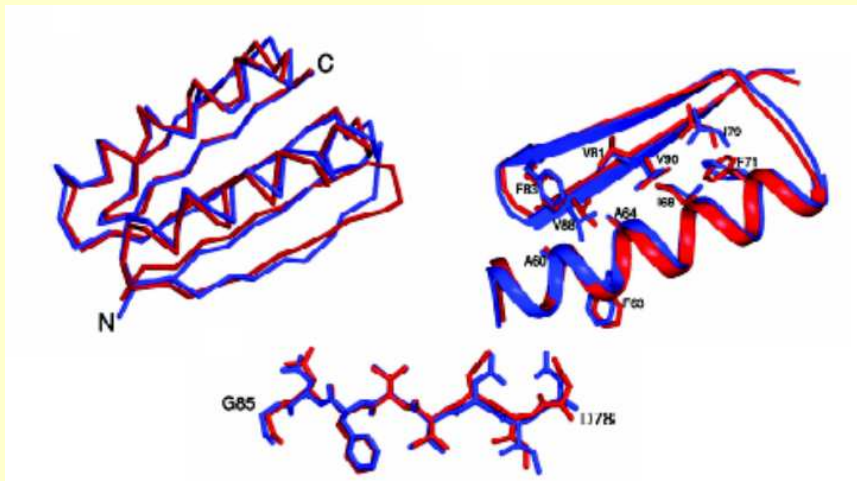
nebo



- selekce



Počítačové metody „in silico“



Synzymy - umělé enzymy

- syntetické poly / oligomery vykazující enzymovou aktivitu - **synzymy**
- mají místo vázící substrát a katalyticky aktivní skupiny
 - první se vytváří rel. snadno, druhé je mnohem náročnější
 - často je vzorem přechodový stav očekávaný v plánované reakci
- katalýza odpovídá saturační MM kinetice:



- některé synzymy jsou pouze derivatizované proteiny
 - přidáním $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$ k myoglobinu (přenašeč kyslíku) - naváží se na 3 povrchové histidinové zbytky - se získá umělá askorbát oxidasa
- zcela umělé synzymy
 - polyglutamová kyselina - esterasová aktivita - hydrolyzuje 4-nitrofenylacetát, pH optimum 5,3, $K_M = 2 \text{ mM}$
 - cyklodextriny (toroidní molekuly ze 6 až 10 1,4-D-glukosových jednotek, vytváří hydrofobní komůrku 0,5 až 1 nm širokou a 0,7 nm hlubokou, místo jednoho C-6 hydroxyly se přidal pyridoxal - vznikla transaminasa

Abzymy - katalyticky aktivní protilátky

- protilátky vytvořené proti analogům předpokládaného přechodového stavu očekávané reakce
- např. fosfonátové estery $\text{R-PO}_2\text{-OR}'$ jsou stabilní analogy přechodového stavu při hydrolýze karboxyesterů
 - protilátky připravené proti této sloučenině fungují jako esterasy
 - K_m v mikromolární oblasti, zrychlení reakce až o tři řády oproti nekatalyzované reakci

Molekulární otisky

- MIPs, molecularly imprinted polymers - analog přechodového stavu je obklopen strukturou polymeru při jeho vzniku
 - polymer poskytne vhodné skupiny vytvářející vazebné a katalyticky aktivní zbytky
 - poté se vymyjí templátové molekuly
- velmi stabilní, odolné při vysokých teplotách

ZÁVĚR

- **enzymová technologie prochází fází zralosti a evoluce**
 - zralost - existuje teorie popisující fungování enzymů a vztahy mezi funkcí a primární strukturou a 3D-konfigurací
 - evoluce - existují široké možnosti vývoje užitečných procesů a materiálů využívajících získané vědomosti
- **budoucnost enzymů je jasně pozitivní**
 - mnohem širší nasazení
 - objevy nových enzymů
 - vylepšování existujících enzymů
 - katalýza nových reakcí

- **enzymologie startuje nové období enzymových technologií**