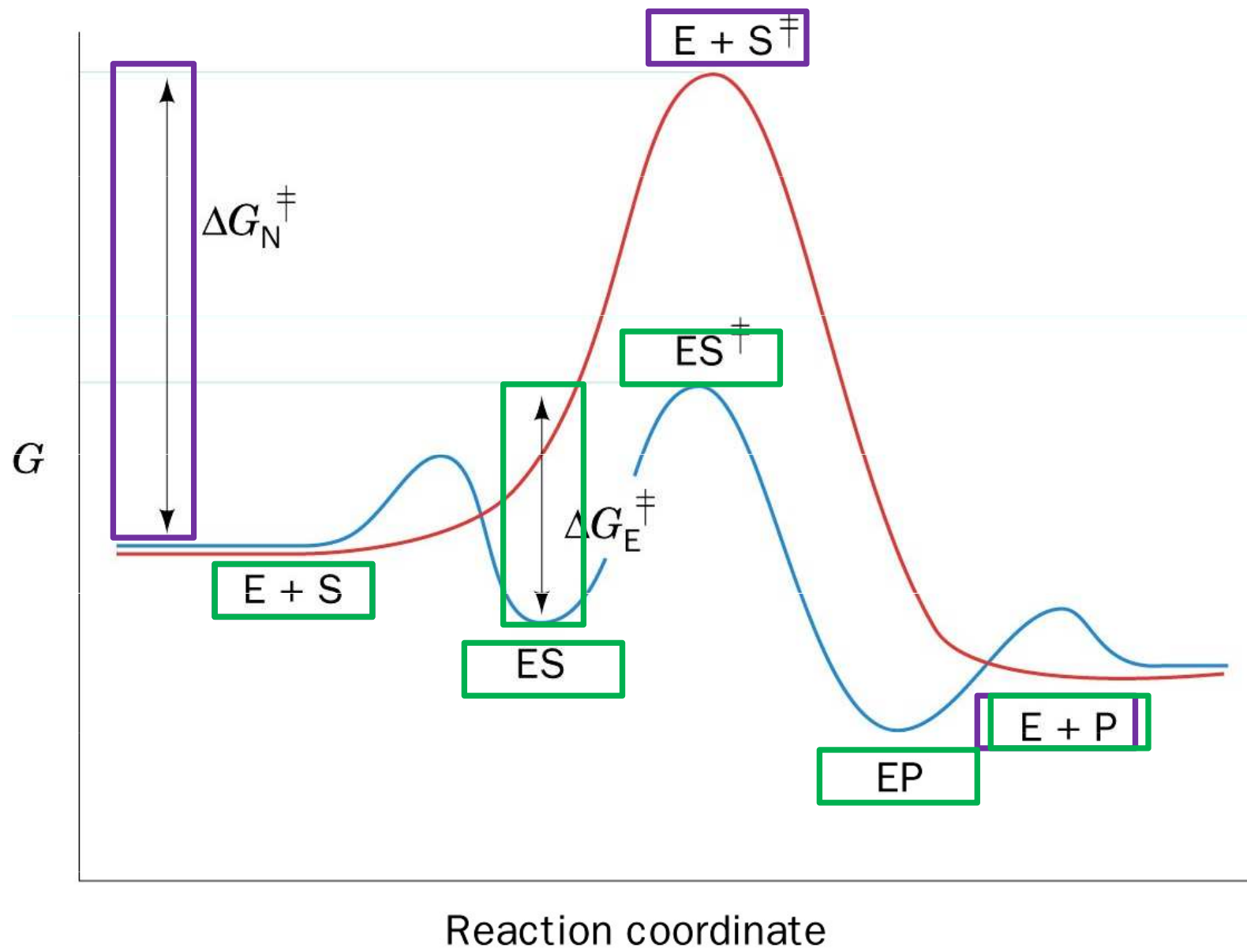


ENZYMLOGIE

Katalýza - Berzelius 1838



Požadavky na biokatalyzátory :

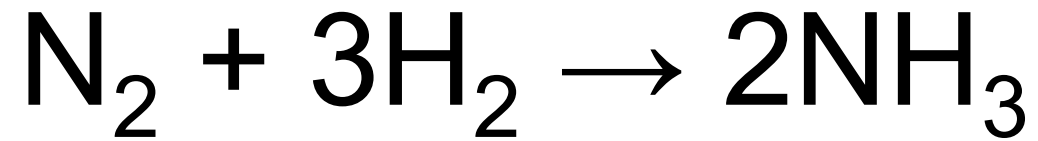
A. Reakce musí probíhat cíleně.

konstitutivní

inducibilní

Bio- versus chemokatalyzátory

- Vyšší reakční rychlosti
- Mírnější podmínky



Haber-Boschova syntesa
Fe 450 °C 20 MPa

Nitrogenasa
pH 7 normální tlak ATP

Bio- versus chemokatalyzátory

- Vyšší reakční rychlostí
- Mírnější podmínky
Citlivost vůči řadě vlivů a menší stabilita
- Vyšší specifita – typ reakce a typ substrátu
- Schopnost regulace

Biokatalyzátory

- Globulární bílkoviny – enzymy
- RNA – ribozymy Cech Altmann NC1986

Enzymy – molekulární stroje



Rychlostní konstanta :

- Bez katalýzy - $0,23 \text{ s}^{-1}$
- Pt - $1,3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$
- Enzym - katalasa - $3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$

Enzymy – molekulární stroje

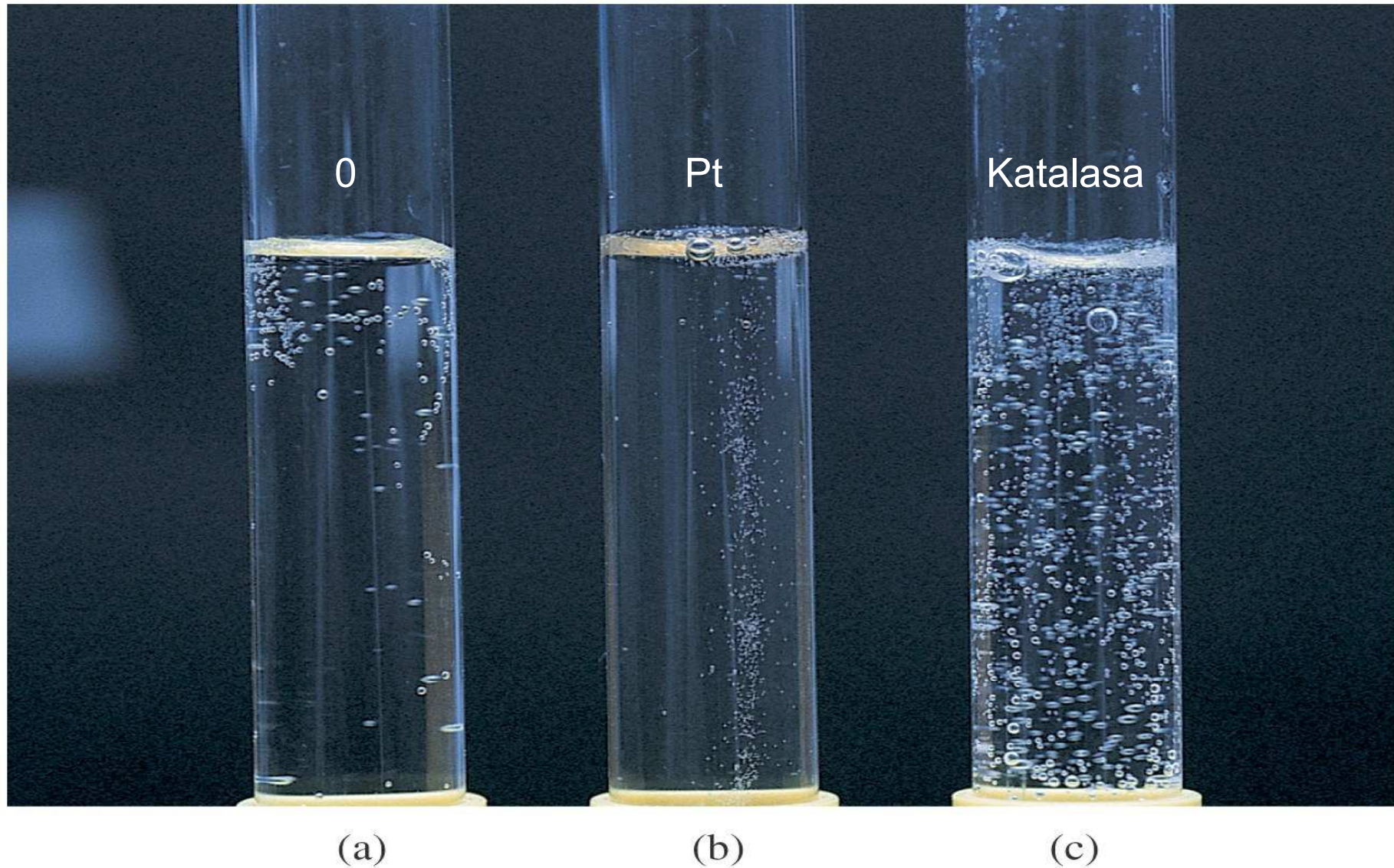
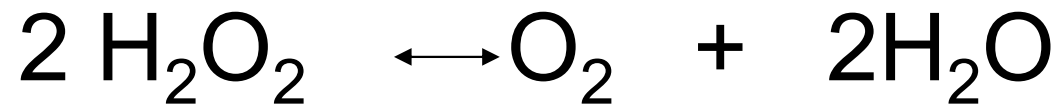


Figure 5-1 Concepts in Biochemistry, 3/e

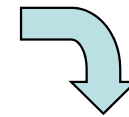
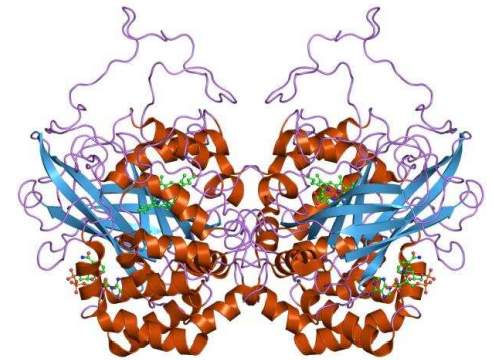
Enzymy – molekulární stroje

Katalasa



Číslo přeměny 40 000 000

1 molekula enzymu přemění
40 000 000 molekul substrátu za 1 s



Typy reakcí

jednoduché

- Katalasa

složité

- DNA polymerasa

Historie poznání enzymů

- 1878 - KUHNEN - ENZYM - *En Zyme* - v kvasnicích
- 1860 - PASTEUR - *vis vitalis* - životní síla v kvasinkách
- LIEBIG - *fermenty* - chemické látky
- 1897 - BUCHNER - extrakt kvasinek katalyzuje kvašení
- 1926 - SUMNER - bílkovinná povaha enzymů - ureasa

Enzymologie :

- studium struktury enzymů
- studium kinetiky enzymových reakcí
- studium reakčních mechanismů
- studium forem a lokalizace enzymů
- studium vztahu enzymů k patologii organismů
- praktické využití enzymů
- příprava a studium umělých enzymů

Názvosloví

1. triviální - *trypsin, pepsin, ptyalin*

2. název substrátu + asa - *lipasa, amylasa*

reakce + asa - *oxidasa, hydrolasa*

3. substrát + reakce - *alkoholdehydrogenasa*

substrát₁ + substrát₂ + reakce - *alkohol: NAD-oxidoreduktasa*

Enzymová nomenklatura

IUB 1961 - nejnovější 1984

1. OXIDOREDUKTASY - oxidačně redukční reakce
 - *alkoholdehydrogenasa*

2. TRANSFERASY - přenos skupin
 - *aspartátaminotransferasa*

3. HYDROLASA - hydrolytické štěpení (+ H₂O)
 - *proteasy*

4. LYASY

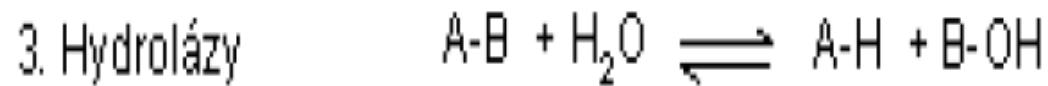
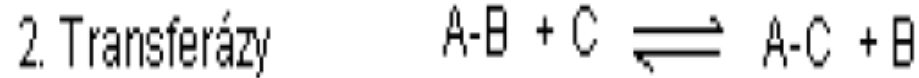
- **nehydrolytické štěpení (bez H₂O)**
- *karbonátanhydrasa*

5. IZOMERASY

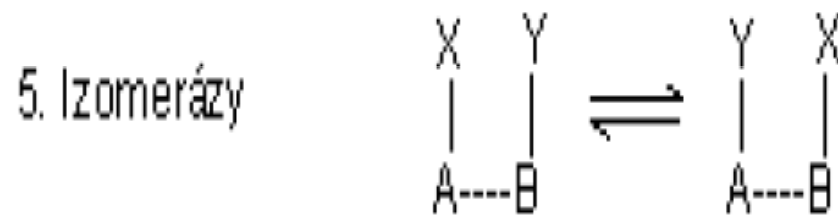
- **přesuny atomů a skupin**
- *glukosafosfátizomerasa*

6. LIGASY

- **vznik vazby za současného rozkladu ATP**
- *asparaginsynthetasa*



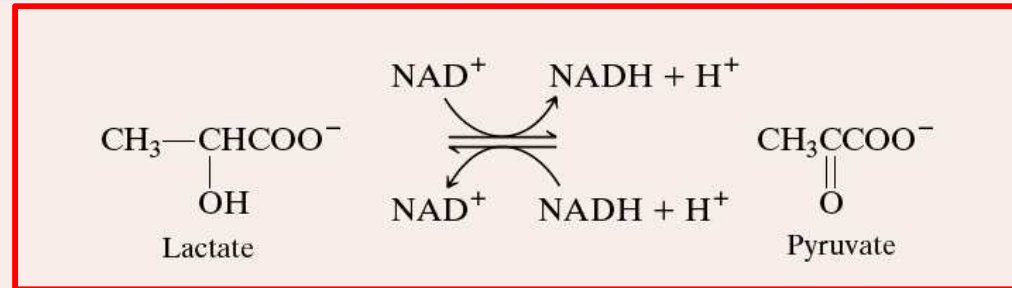
Synthasy



Syntethasy

Table 5.2**An example of each class of enzyme**

1. Oxidoreductases



Common name: Lactate dehydrogenase

Official name: L-Lactate:NAD⁺ oxidoreductase

Official number: 1.1.2.3

2. Transferases

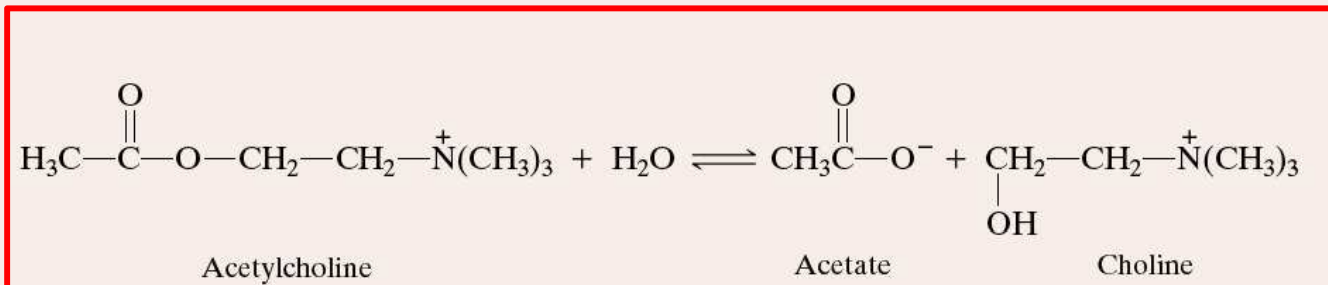
 $(dNMP)_n$ = DNA with n nucleotides $dNTP$ = deoxynucleoside triphosphate $(dNMP)_{n+1}$ = DNA with $n + 1$ nucleotides PP_i = Pyrophosphate

Common name: DNA polymerase

Official name: Deoxynucleoside triphosphate:DNA deoxynucleotidyltransferase (DNA-directed)

Official number: 2.7.7.7

3. Hydrolases



Common name: Acetylcholinesterase

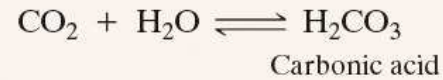
Official name: Acetylcholine acetylhydrolase

Official number: 3.1.1.7

Table 5.2

An example of each class of enzyme

4. Lyases

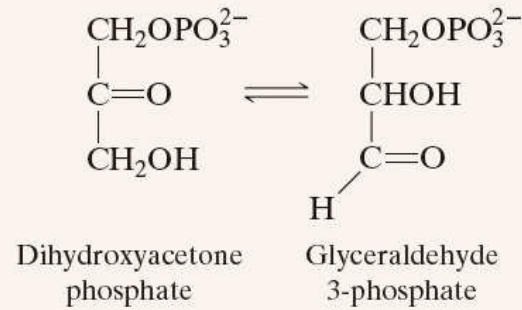


Common name: Carbonic anhydrase

Official name: Carbonate hydrolyase

Official number: 4.2.1.1

5. Isomerases

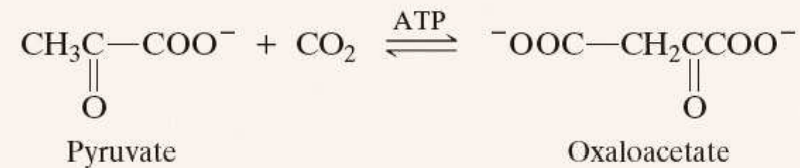


Common name: Triose phosphate isomerase

Official name: D-Glyceraldehyde-3-phosphate ketoisomerase

Official number: 5.3.1.1

6. Ligases



Common name: Pyruvate carboxylase

Official name: Pyruvate CO₂ ligase (ADP-forming)

Official number: 6.4.1.1

http://www.brenda-enzymes.info/

BRENDA
The Comprehensive Enzyme Information System

Technische Universität Braunschweig

EC-Number Enzyme Name Organism Protein Full text Advanced Search

Search Display 10 entries

NEW feature online!

Nomenclature	Reaction & Specificity	Functional Parameters
Enzyme Names EC Number Common/ Recommended Name Systematic Name Synonyms CAS Registry Number	Pathway Catalysed Reaction Reaction Type Natural Substrates and Products Substrates and Products Substrates Natural Substrate Products Natural Product Inhibitors Cofactors Metals/Ions Activating Compounds Ligands Biochemicals Reactions Aligned	Km Value kcat/Km Value Ki Value IC50 Value pI Value Turnover Number Specific Activity pH Optimum pH Range Temperature Optimum Temperature Range Kinetic ENzyme DATA NEW
Isolation & Preparation		Organism-related information
Purification Cloned Expression Renatured Crystallization		Organism Source Tissue Localization Protein-Specific Search
Stability	Enzyme Structure	Disease & References
pH Stability Temperature Stability General Stability Organic Solvent Stability Oxidation Stability Storage Stability	Sequence/ SwissProt link 3D-Structure/ PDB link Molecular Weight Subunits Posttranslational Modification	Disease/ Diagnostics References
		Application & Engineering
		Engineering Application

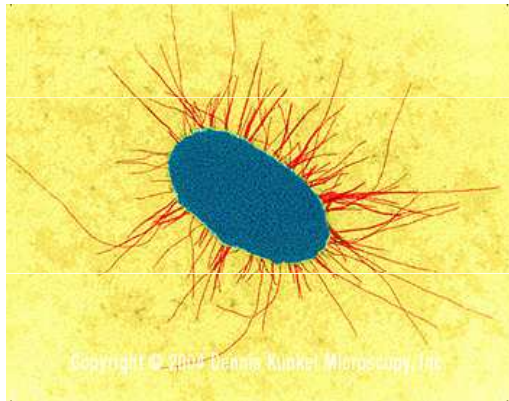
Webmaster: **Sandra Placzek**
s.placzek@tu-bs.de

For access to all features of the website Javascript must be activated, frames enabled and Java (at least version 1.4) has to be installed

Release 2012.2 (July 2012)

Enzymy – stanovení koncentrace

Escherichia coli



3 000 bílkovin

Homo sapiens



25 000 bílkovin

Koncentrace ↔ Katalytická aktivita



Substrát ↔ Produkt

Stanovení aktivity enzymů

- *Biochemie*
- *Molekulární biologie*

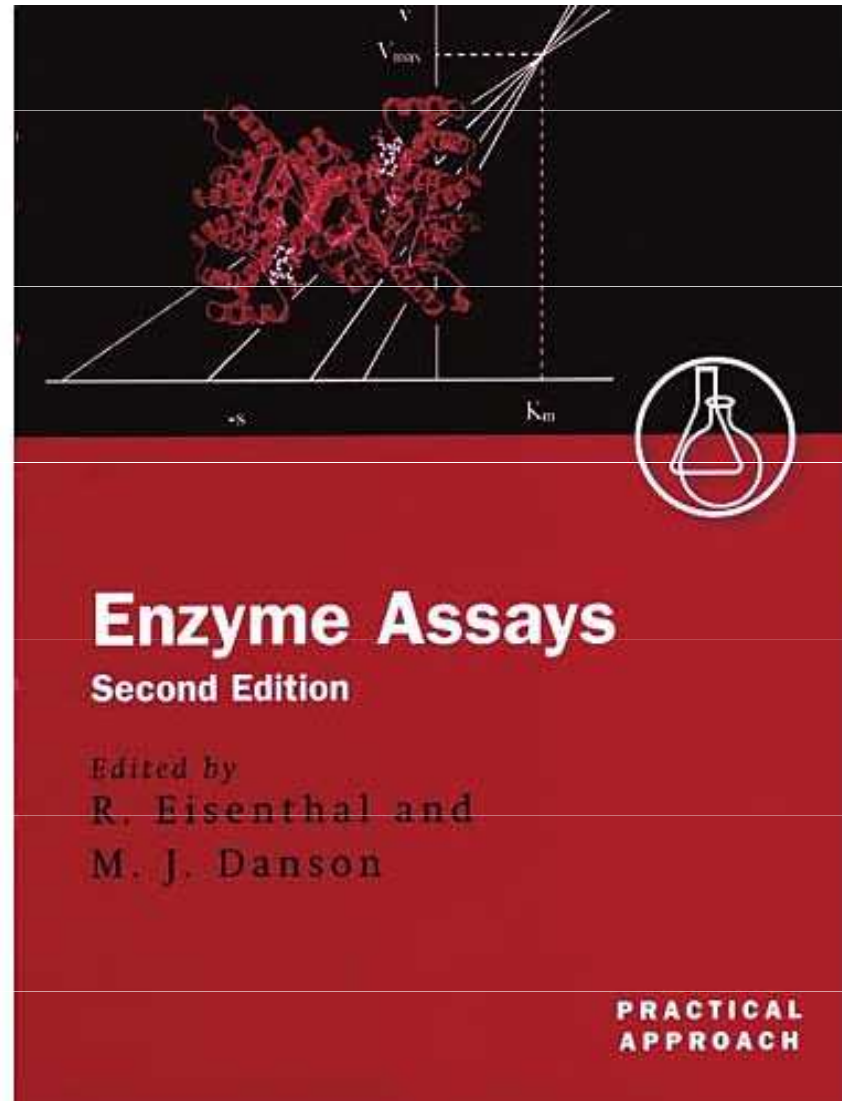
- *Klinická diagnostika*
- *Farmakologie – vývoj léčiv*
- *Biotechnologické procesy*
- *Bioanalytická chemie*

Metody používané pro stanovení aktivity enzymů

- Spektrofotometrické
- Spektrofluorimetrické
- Elektrochemické
- Radiochemické
- Separační – HPLC, GC, CE

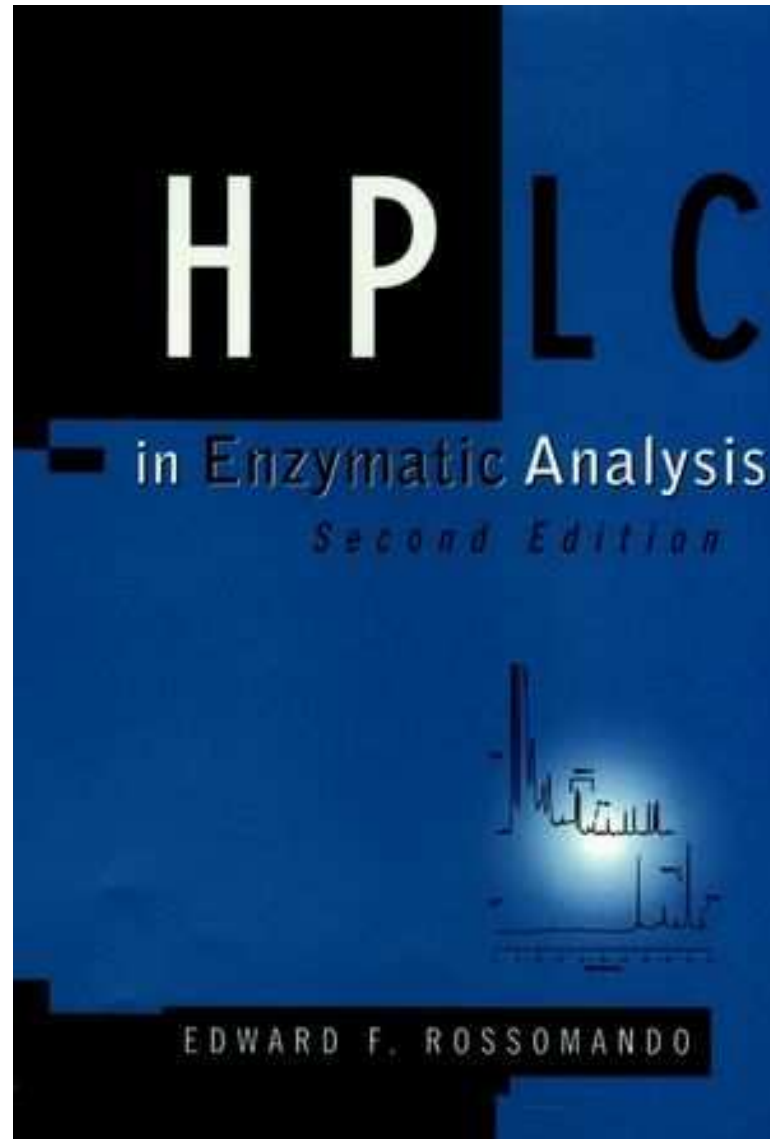
Enzyme Assays

R. Eisenthal and M.J. Danson



HPLC in Enzymatic Analysis

E.F. Rossomando



Vyjadřování aktivity enzymů :

- smluvené jednotky
- **IU - International Unit - mezinárodní jednotka (IUB 1961)**
- počet mikromolů přeměněného substrátu za minutu

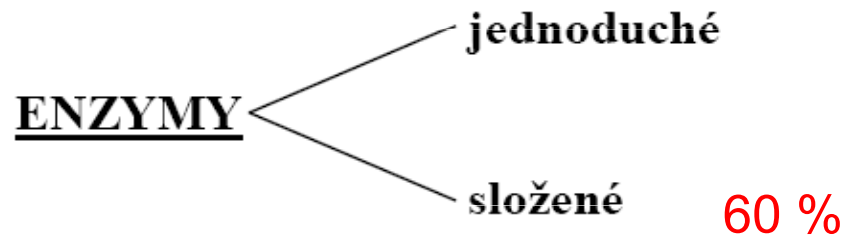
- **kat - katal (IUB 1971)**
- počet molů přeměněného substrátu za sekundu
mikrokatal (μkat) = 10^{-6} kat
nanokatal (nkat) = 10^{-9} kat
pikokatal (pkat) = 10^{-12} kat

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol}/\text{min} = 1/60 \mu\text{mol}/\text{s} = 1/60 \mu\text{kat} = 16,67 \text{ nkat}$$

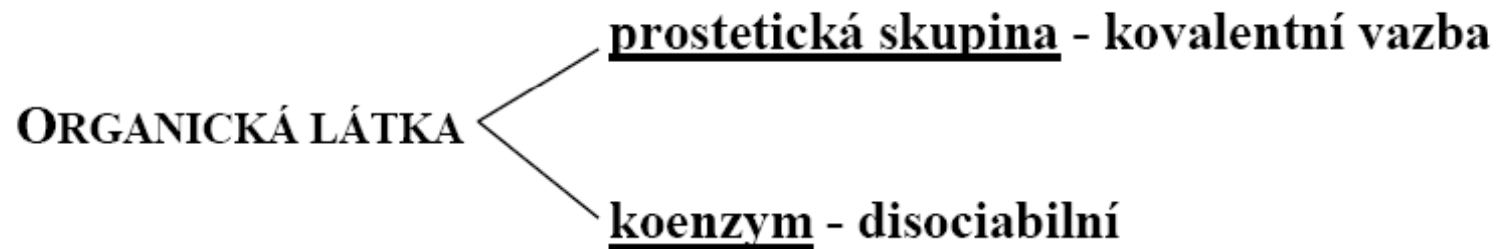
Specifická aktivita - aktivita vztažená na mg bílkoviny

Číslo přeměny - počet molů substrátu přeměněných molem
enzymu za jednu sekundu

STRUKTURA ENZYMŮ



KOFAKTOR + APOENZYM → HOLOENZYM



Kofaktor - kovový ion nebo organická látka

METALOENZYMY

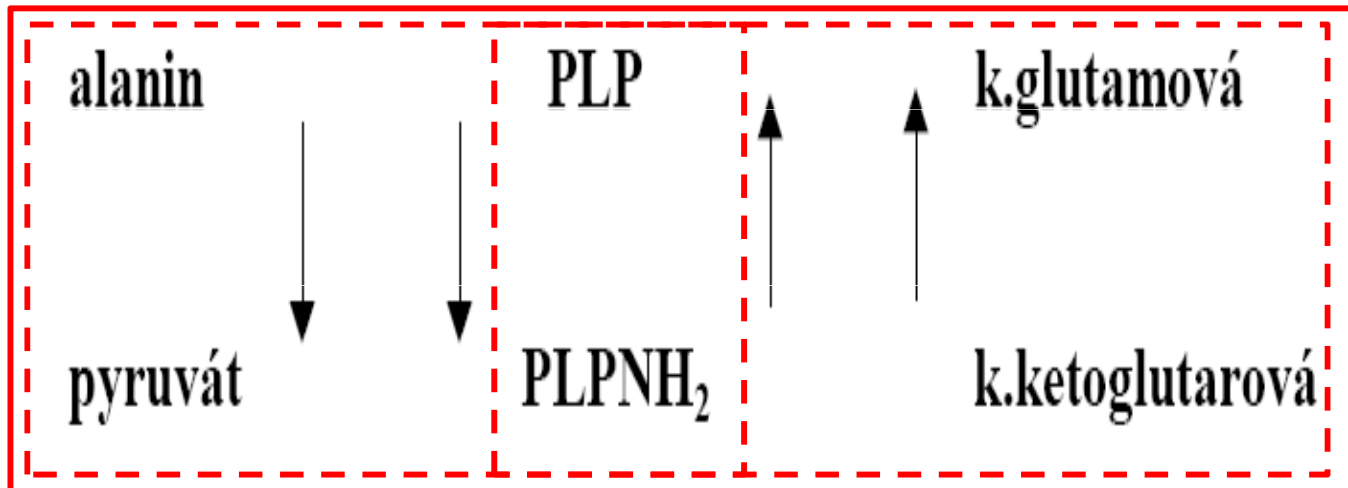
kovový ion	enzym
Zn^{2+}	alkoholdehydrogenasa alkalická fosfatasa karbonátanhydrasa
Mg^{2+}	fosfohydrolasy fosfotransferasy
Mn^{2+}	arginasa
Fe^{2+}, Fe^{3+}	cytochromy peroxidasa katalasa
Cu^{2+}, Cu^{+}	tyrosinasa diaminoxidasa

Table 6.2**Enzymes requiring metal ions as cofactors**

Enzyme	Metal Ion
Catalase, peroxidase, aconitase, and cytochrome oxidase	Fe ²⁺ and Fe ³⁺
Alcohol dehydrogenase, carboxypeptidase A, carboxypeptidase B, and DNA polymerase	Zn ²⁺
Cytochrome oxidase, lysyl oxidase, ascorbate oxidase, and superoxide dismutase	Cu ²⁺
Hexokinase and glucose-6-phosphatase	Mg ²⁺
Arginase	Mn ²⁺
Pyruvate kinase	K ⁺
Urease	Ni ²⁺
Nitrate reductase	Mo ⁴⁺ and Mo ⁶⁺
Carbonic anhydrase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺

Regenerace kofaktorů

1. *Prostetická skupina* se regeneruje na téže enzymové bílkovině :



2. *Koenzym* se odštěpí napojí se na jiný apoenzym a regeneruje se v jiné enzymové reakci :

ADH



Dýchací řetězec

KOFAKTORY A VITAMINY

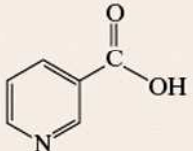
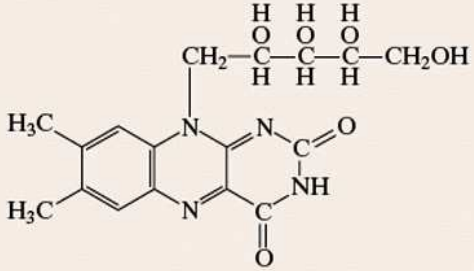
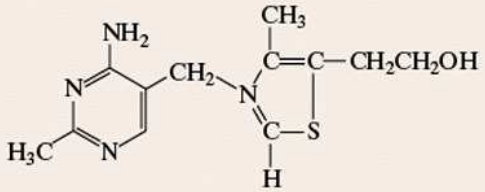
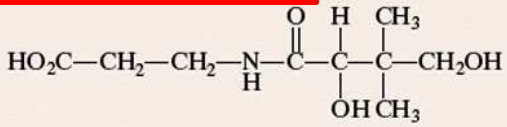
VITAMIN - FUNK - "amin potřebný pro život"

Vitamin	Kofaktor	Funkce
<u>rozpuštěné ve vodě</u>		
<u>thiamin - B₁</u>	thiamindifosfát TPP	<u>přenos (reakce)</u>
riboflavin - B₂	FMN, FAD	H
k.nikotinová(nikotinamid)	NAD⁺, NADP	H
k.pantothenová	CoA	acylové s.
k.listová	k.listová	C₁ skupin
pyridoxin - B₆	pyridoxalfosfát	aminoskupiny
kobalamin - B₁₂	kobalamin	izomerace
k.askorbová - C	k.askorbová	hydroxylace
biotin - H	biotin	COOH
k. lipoová	k. lipoová	H
<u>rozpuštěné v tucích</u>		
karotenoidy - A		proces vidění
kalciferoly - D		metabolismus Ca
 tokoferoly - E		antioxidans
maftochinony - A		srážení krve

Vitamíny rozpustné ve vodě

Table 6.1

Characteristics of vitamins and coenzymes

Name/Structure of Vitamin	Related Coenzyme	Reaction type (page numbers ^a)	Deficiency Disease
<p>Water-Soluble Vitamins</p> <p>Niacin Kyselina nikotinová B₃</p> 	NAD ⁺ , NADP ⁺	Oxidation–reduction (pp. 485-494, 505-508, 515-524)	Pellagra
<p>Riboflavin (vitamin B₂)</p> 	FAD, FMN	Oxidation–reduction (pp. 485-494, 515-524)	Growth retardation
<p>Thiamine (vitamin B₁)</p> 	Thiamine pyrophosphate	Decarboxylation (pp. 461, 463, 487-494)	Beriberi
<p>Pantothenic acid (vitamin B₃)</p> 	Coenzyme A	Acyl group activation and transfer (pp. 440-441, 485-494, 563-571)	Dermatitis (chickens)

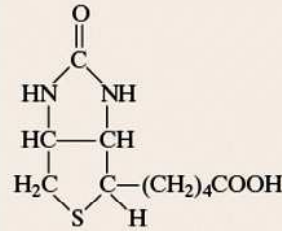
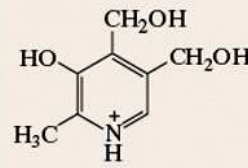
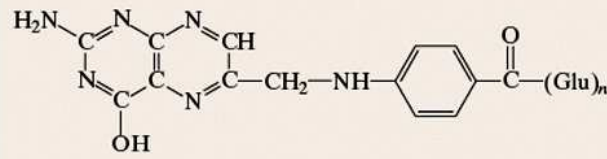
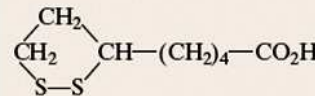
<p>Biotin</p> 	<p>Biotinylated enzymes</p>	<p>CO₂ activation and transfer (pp. 465-466)</p>	<p>Dermatitis (humans)</p>
<p>Pyridoxine (vitamin B₆)</p> 	<p>Pyridoxal phosphate</p>	<p>Amino group transfer (pp. 605-606)</p>	<p>Dermatitis (rats): neurological symptoms</p>
<p>Folic acid</p> 	<p>Tetrahydrofolate</p>	<p>Transfer of one carbon unit (pp. 600-601)</p>	<p>Anemias</p>
<p>Lipoic acid (may not be a vitamin)</p> 	<p>Attached to ε-NH₂ group of Lvs in protein</p>	<p>Acyl group activation and transfer (pp. 485-493)</p>	<p>Growth deficiencies</p>

Table 6.1 (continued)

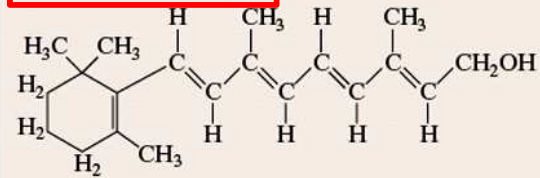
Characteristics of vitamins and coenzymes

Name/Structure of Vitamin	Related Coenzyme	Reaction type (page numbers ^a)	Deficiency Disease
Water-Soluble Vitamins (continued)			
<p>Cobalamin (vitamin B₁₂)</p>	5'-Deoxyadenosylcobalamin	<p>Methyl group transfer (pp. 370-371)</p>	Pernicious anemia
<p>L-Absorbic acid (vitamin C)</p>	L-Absorbic acid	<p>Hydroxylation (pp. 105-107, 493)</p>	Scurvy

Vitamíny rozpustné v tucích

Fat-Soluble Vitamins

trans-Retinol (vitamin A)



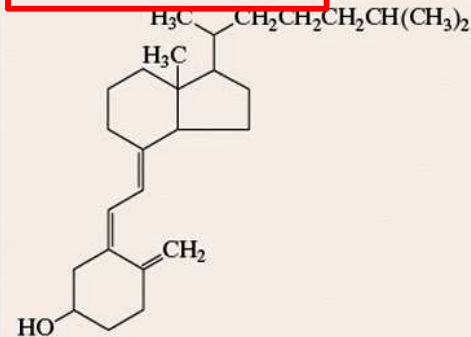
Associated with visual pigment

(pp. 123-125, 252)

Night blindness, other effects

procesy vidění

Cholecalciferol (vitamin D₃)



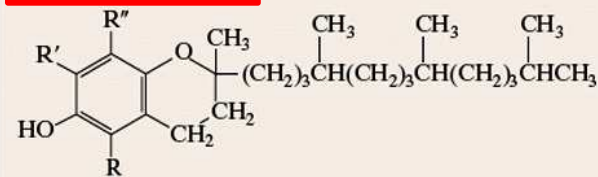
None

(pp. 252, 582-584)

Rickets

metabolismus Ca a P
křivice

Tocopherol (vitamin E)



None

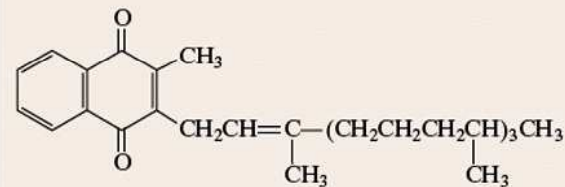
(p.252)

Reproductive and other problems in rats; uncertain in humans

antioxidant

(several variants, with R, R', R''=H or CH₃)

Phylloquinone (vitamin K₁)



None

(pp. 252, 539-544)

Problems in blood clotting

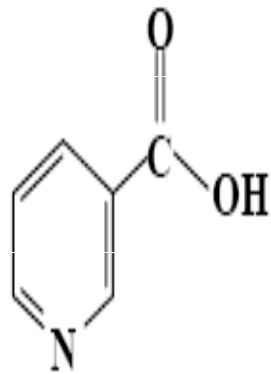
procesy srážení krve

^a Page numbers listed here refer to page numbers in this book.

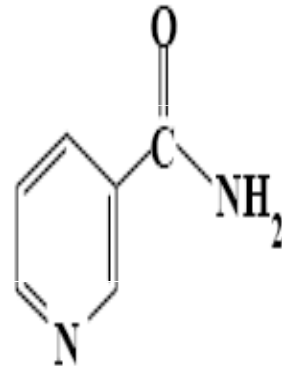
NIKOTINAMIDOVÉ KOENZYMY

1906

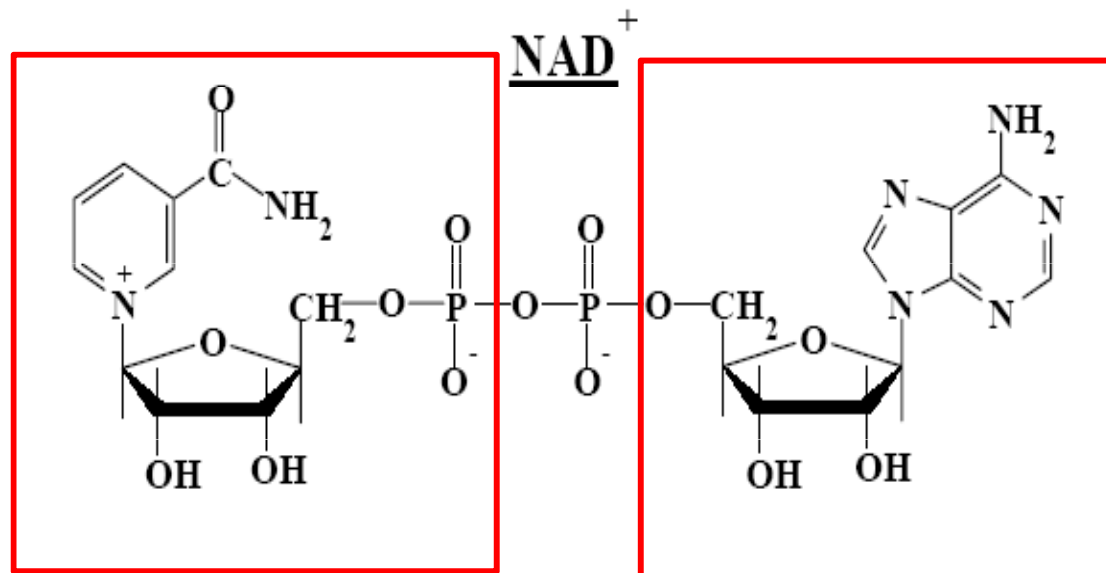
k. nikotinová



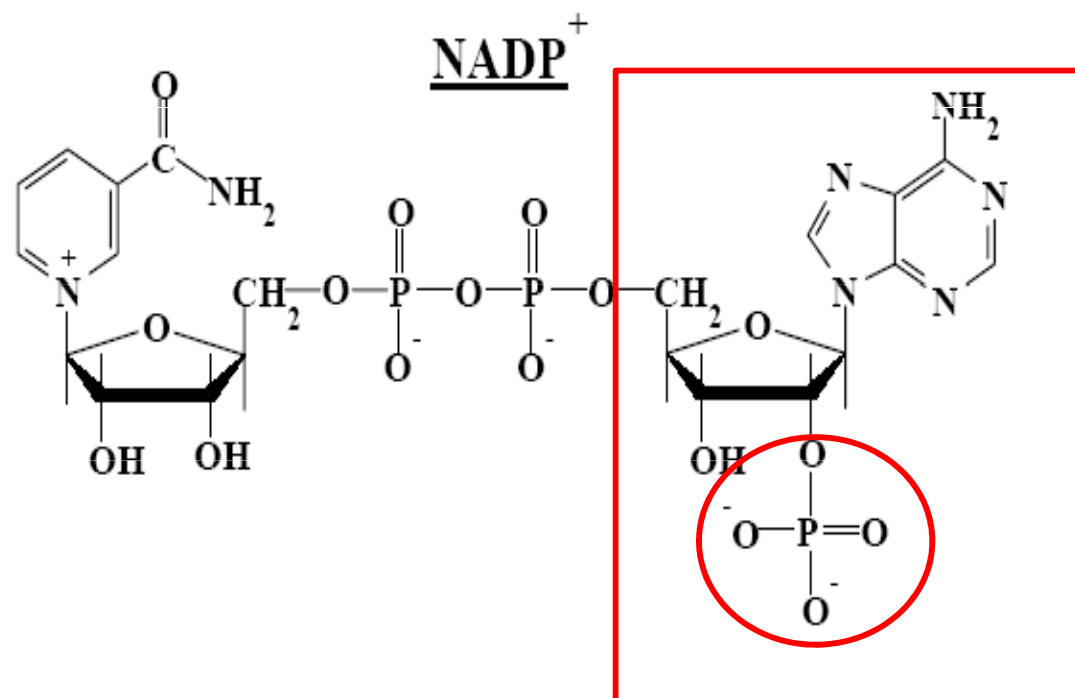
nikotinamid



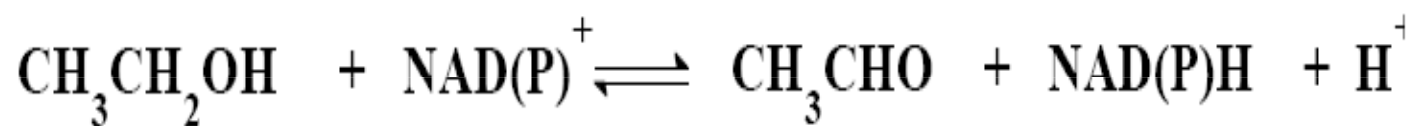
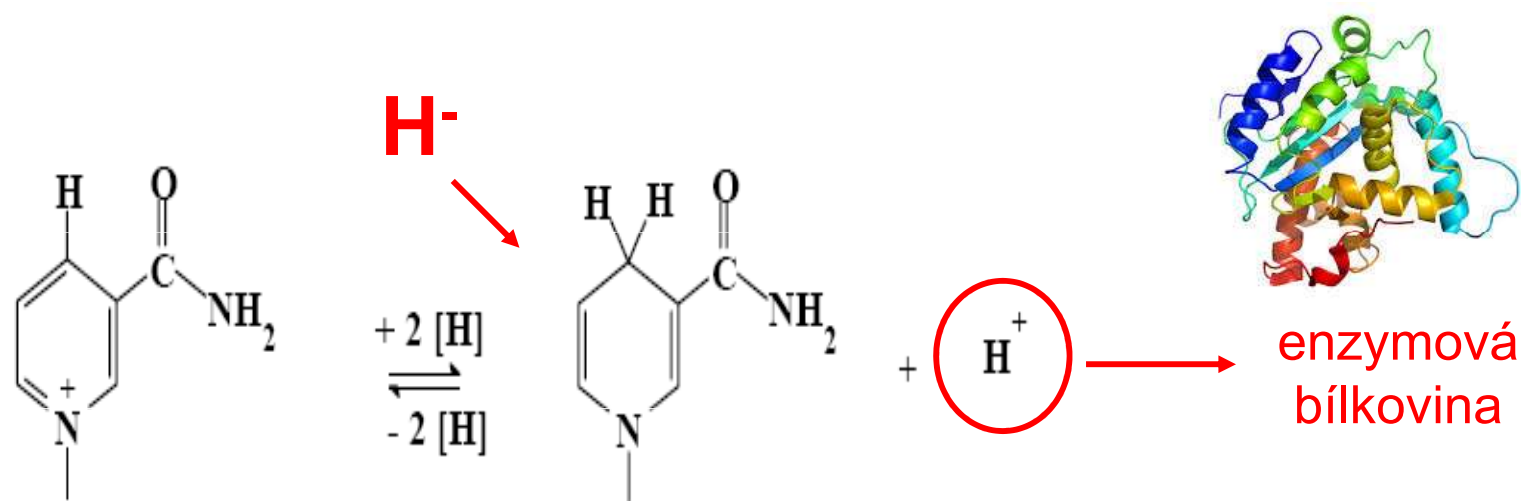
Katalytická
část



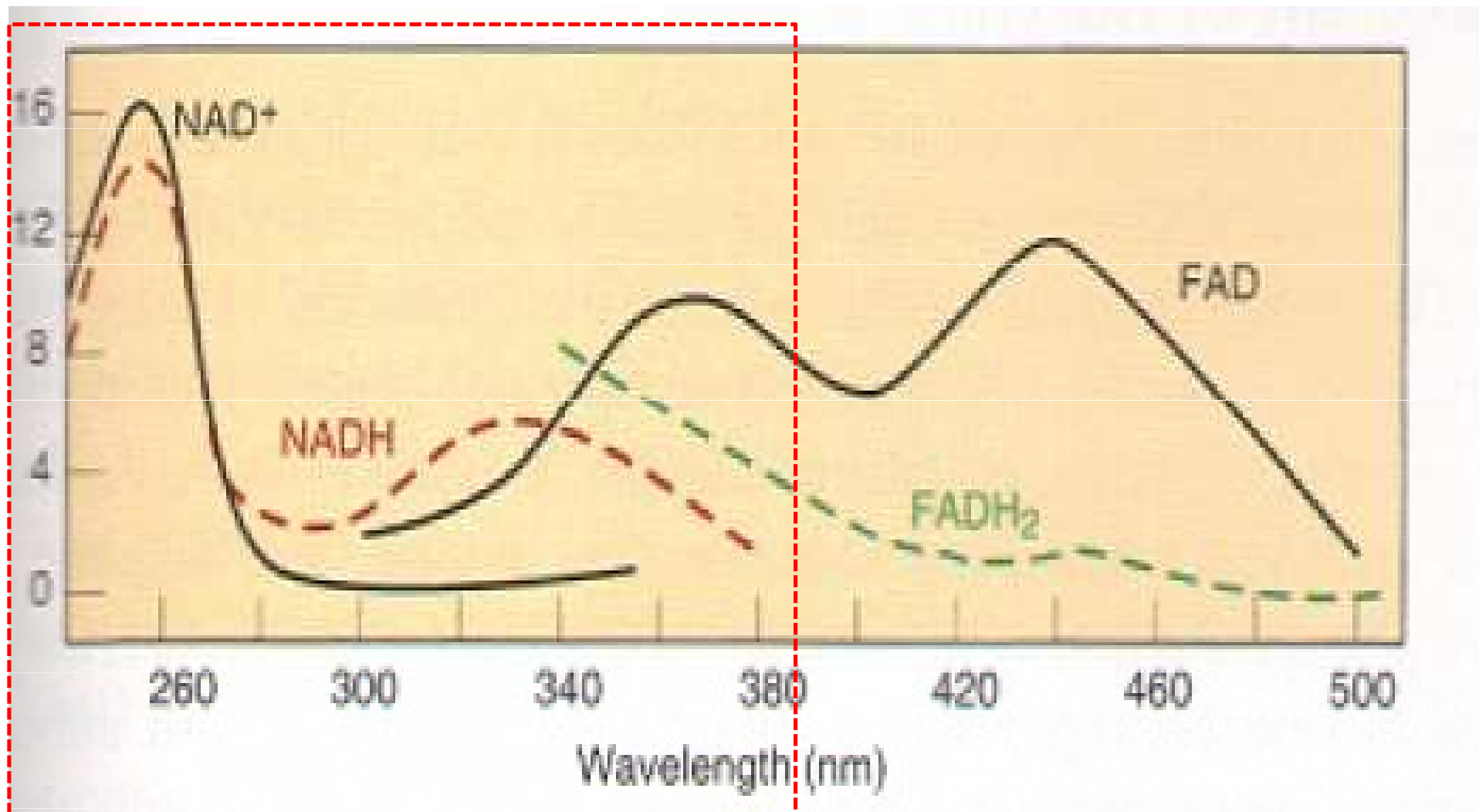
Vazebná
část



Vazebná
část

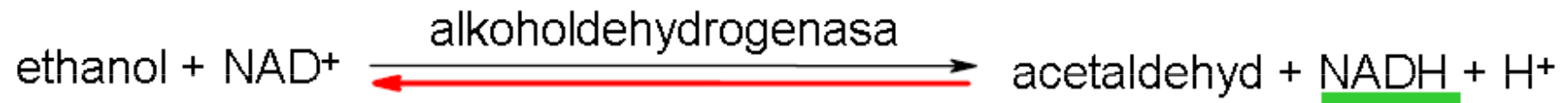


Warburgův optický test

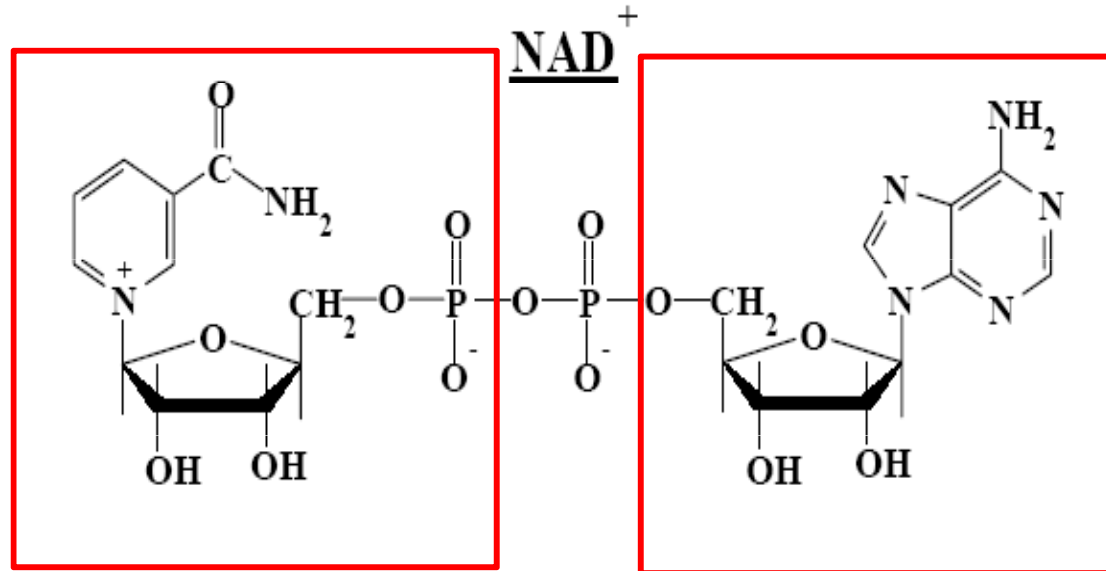


Δ 340 nm

- Přímé stanovení

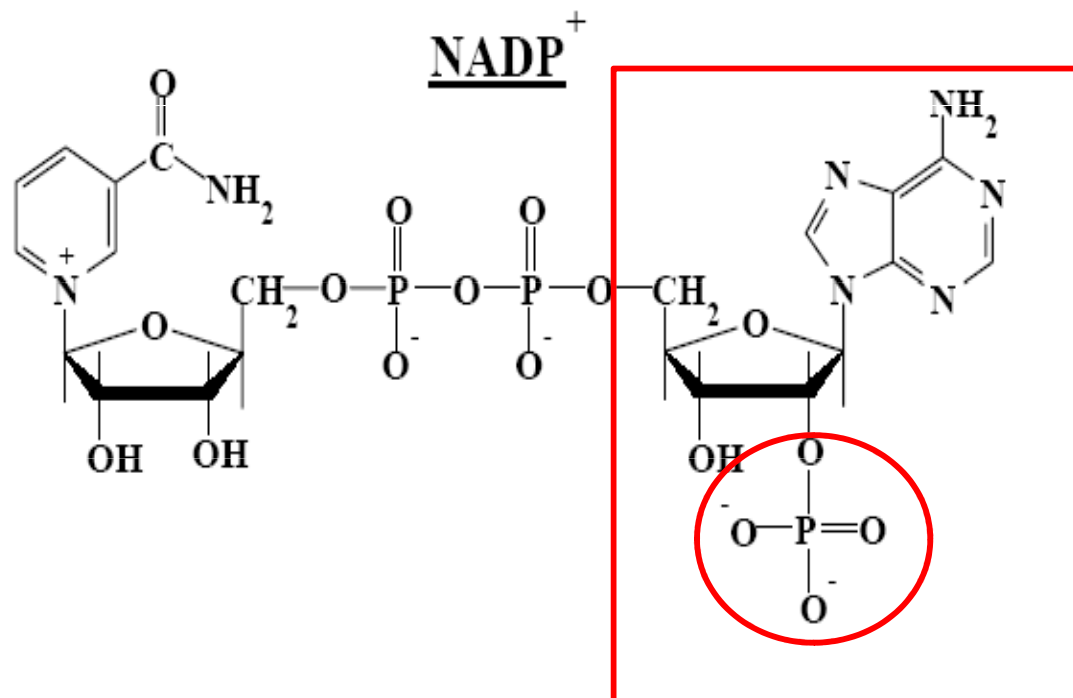


Katalytická
část



Energetická role

Vazebná
část

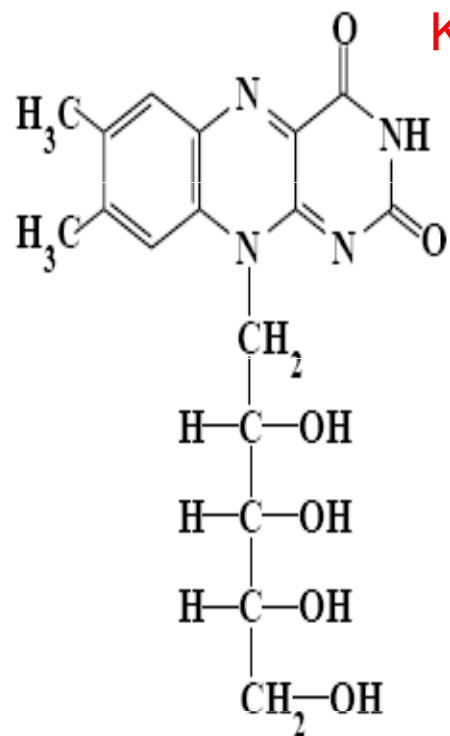


Biosyntetická role

Vazebná
část

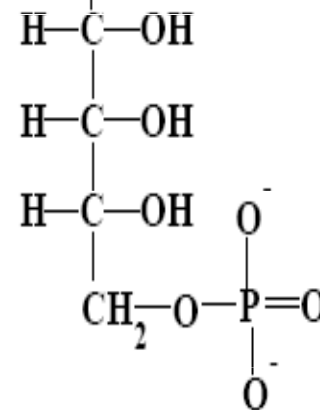
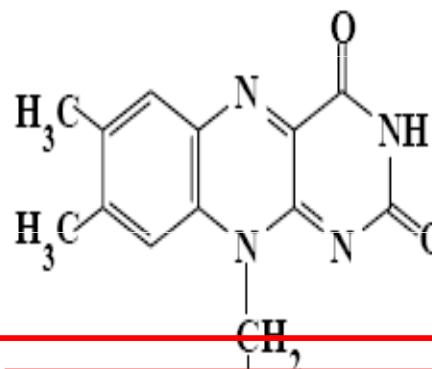
FLAVINOVÉ KOENZYMY

riboflavin



Katalytická
část

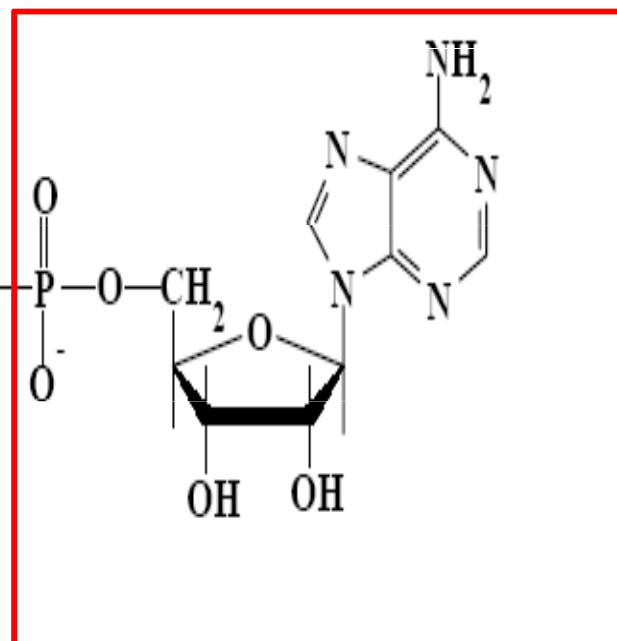
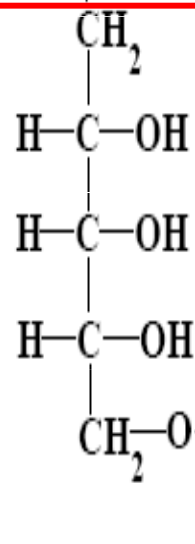
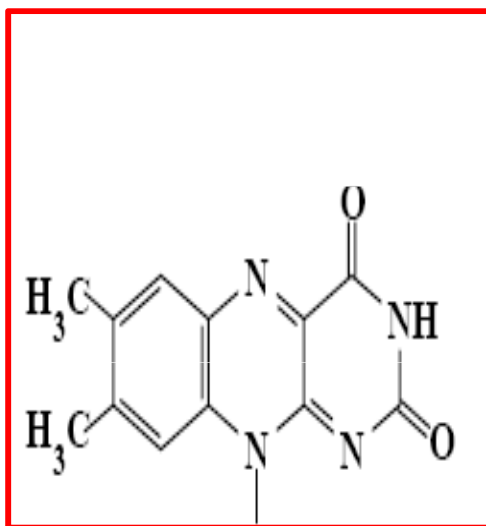
FMN



Vazebná
část

FAD

Katalytická
část

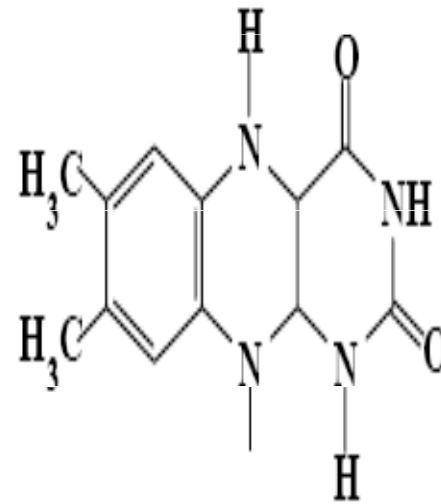
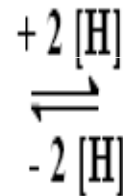
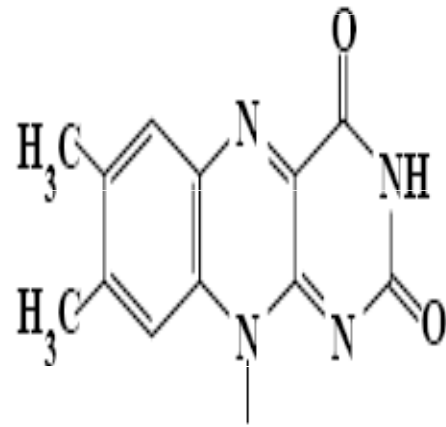


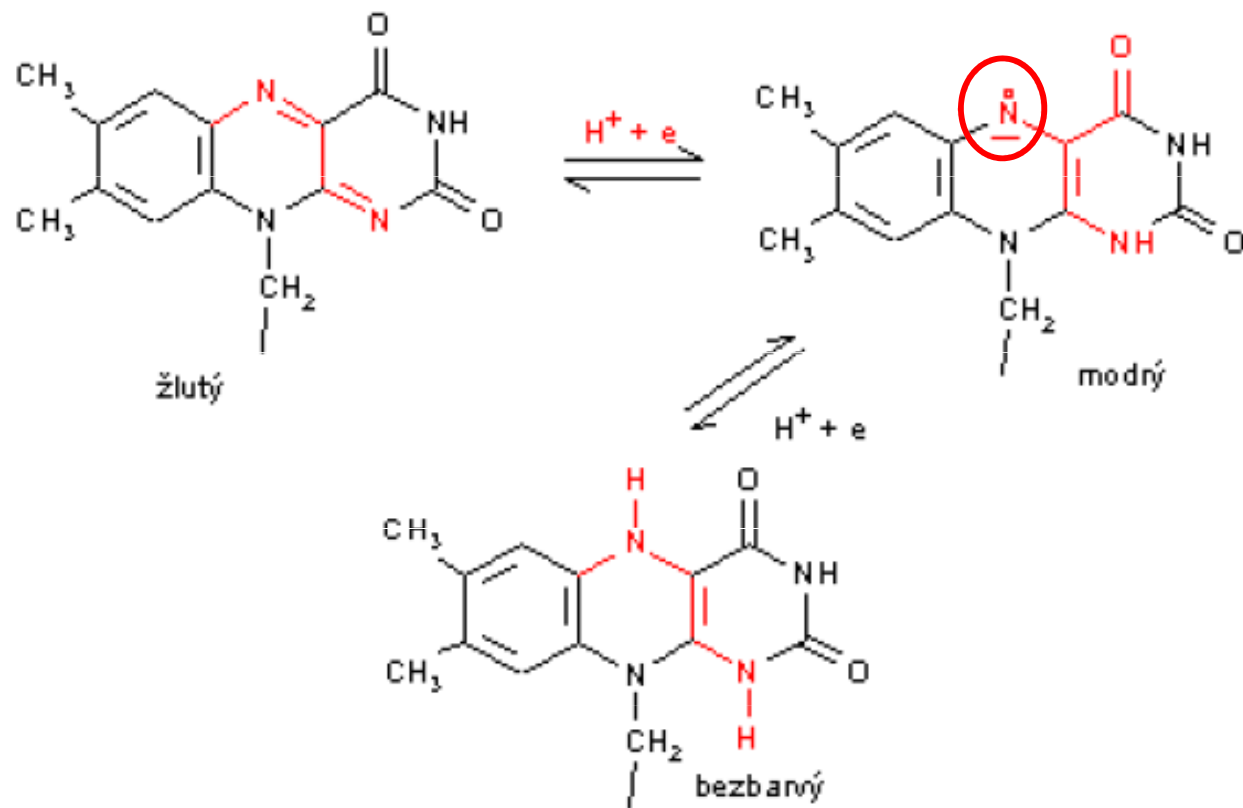
Vazebná
část

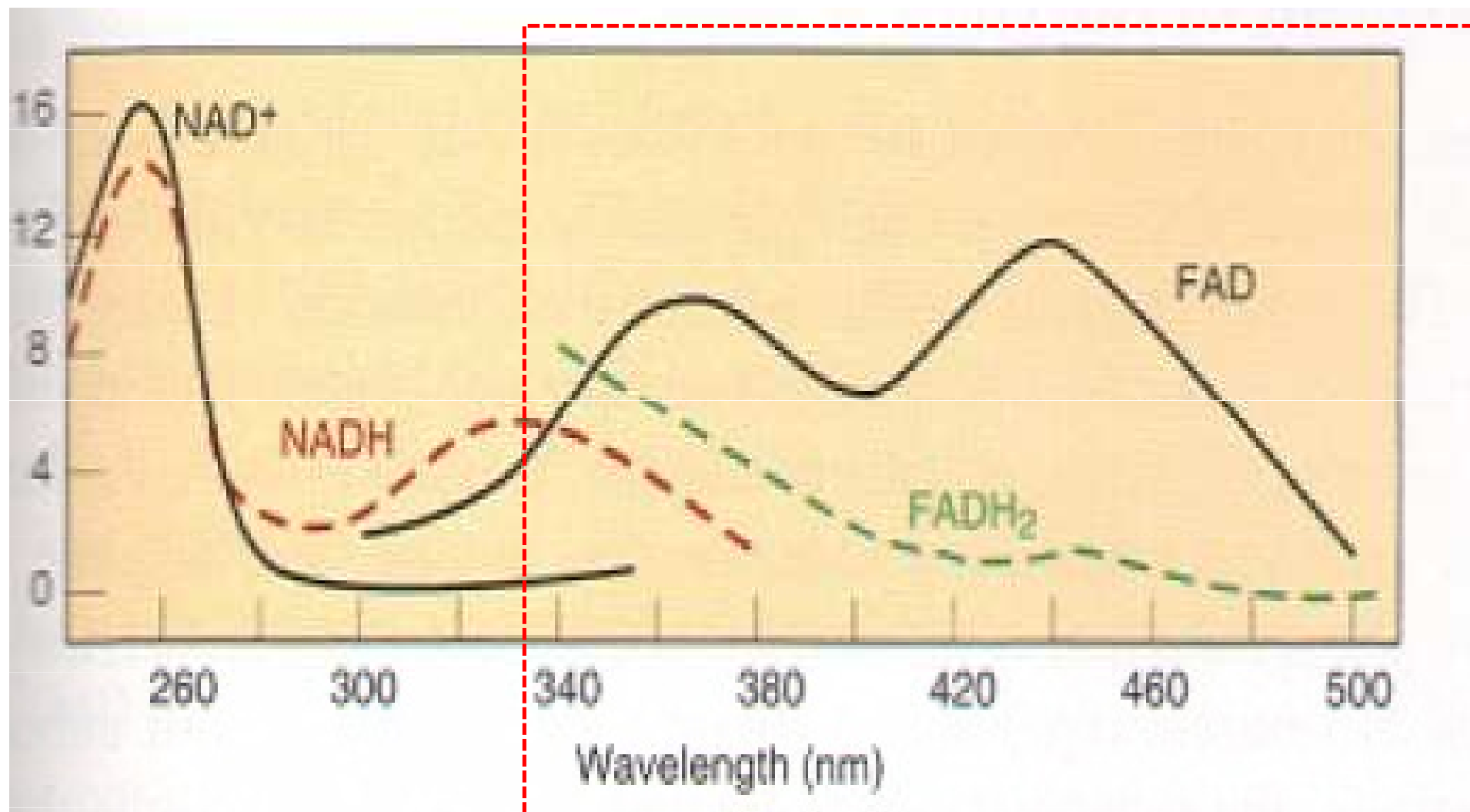
FAD (FMN)



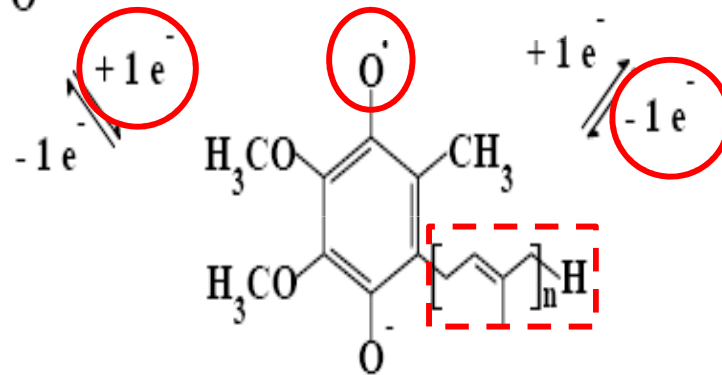
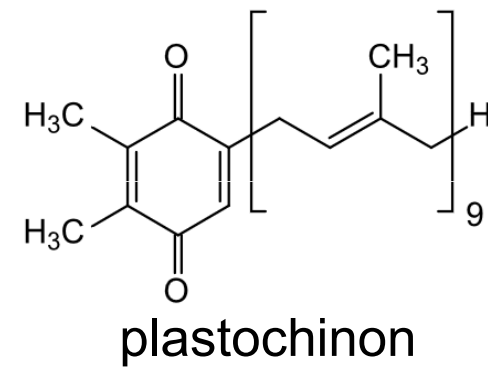
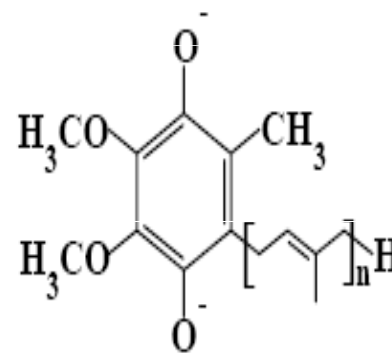
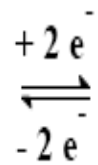
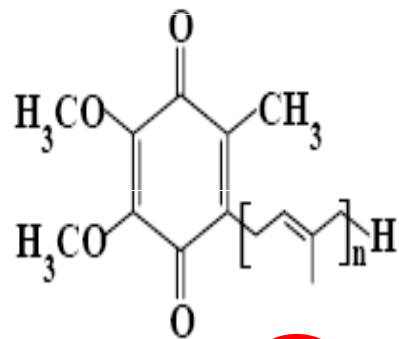
FADH₂ (FMNH₂)







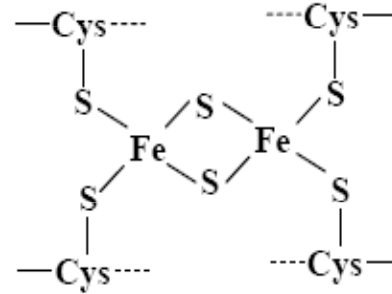
ubichinon



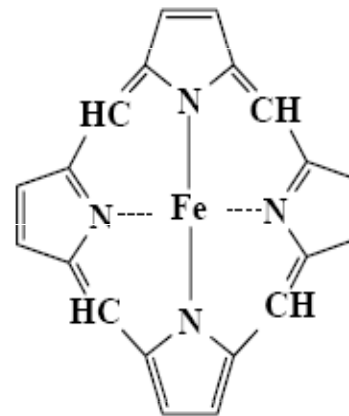
Q6

Q10

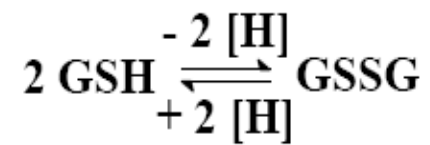
ferredoxin



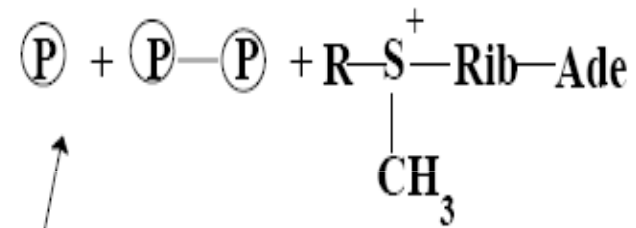
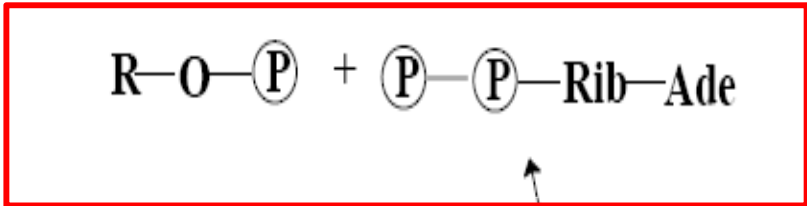
hem



glutathion

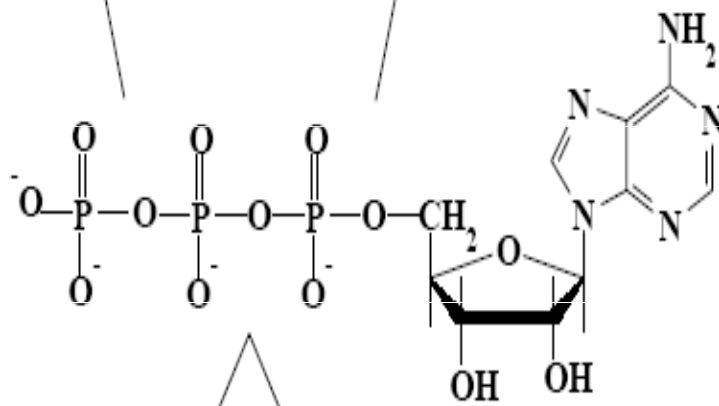


ATP



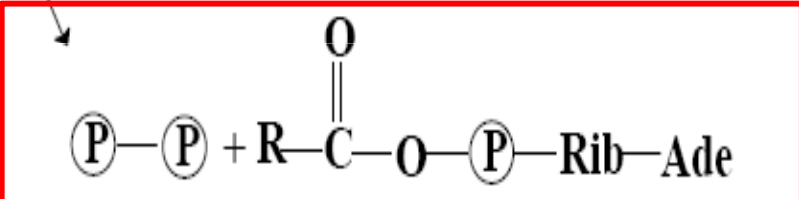
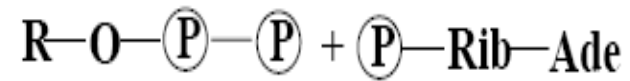
R-OH

R-S-CH₃

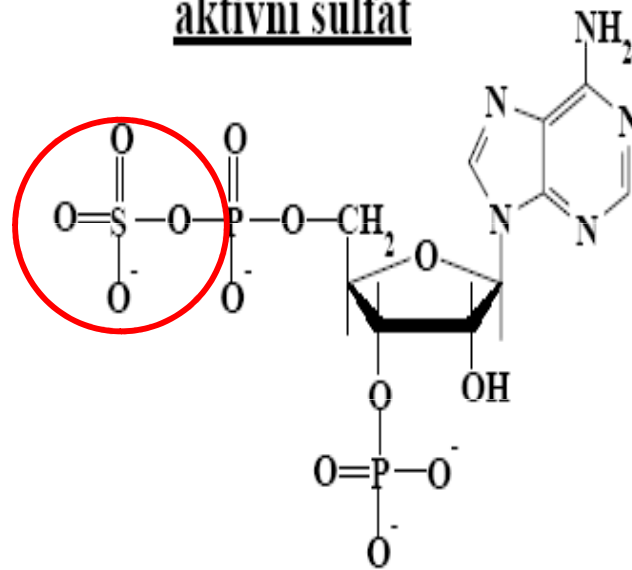


R-OH

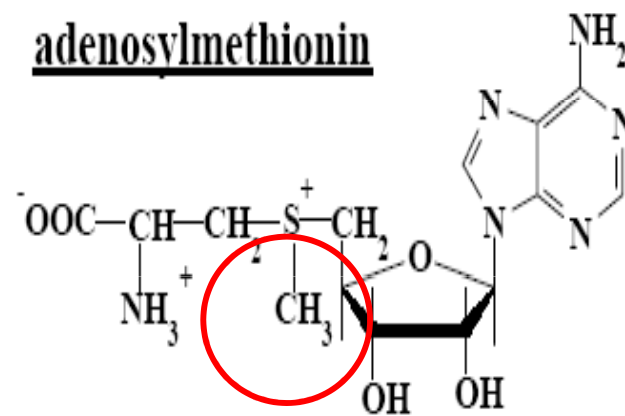
R-COOH



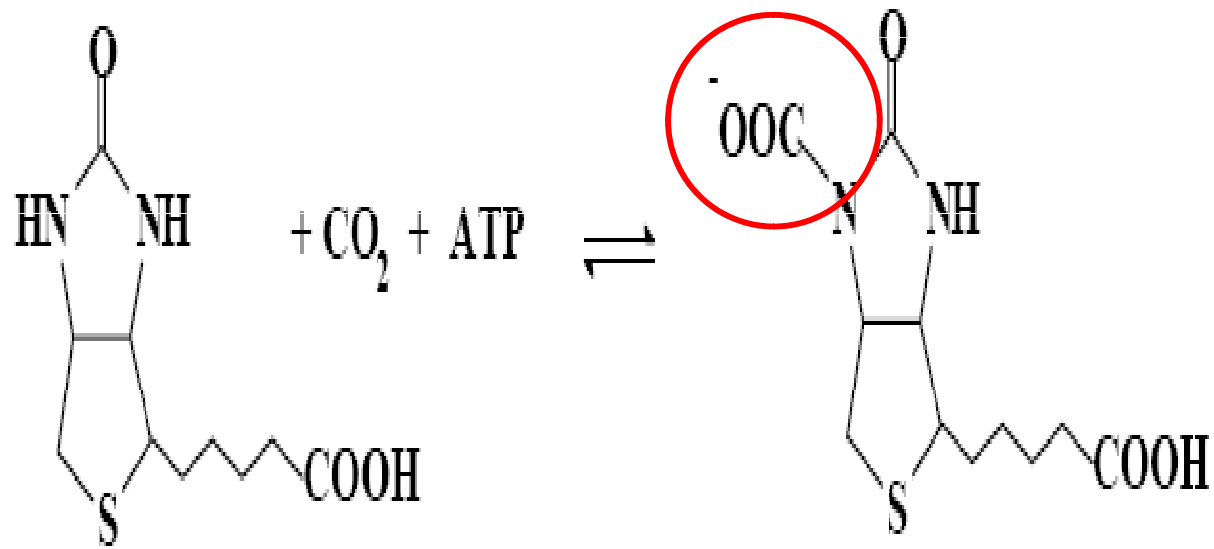
aktivní sulfát



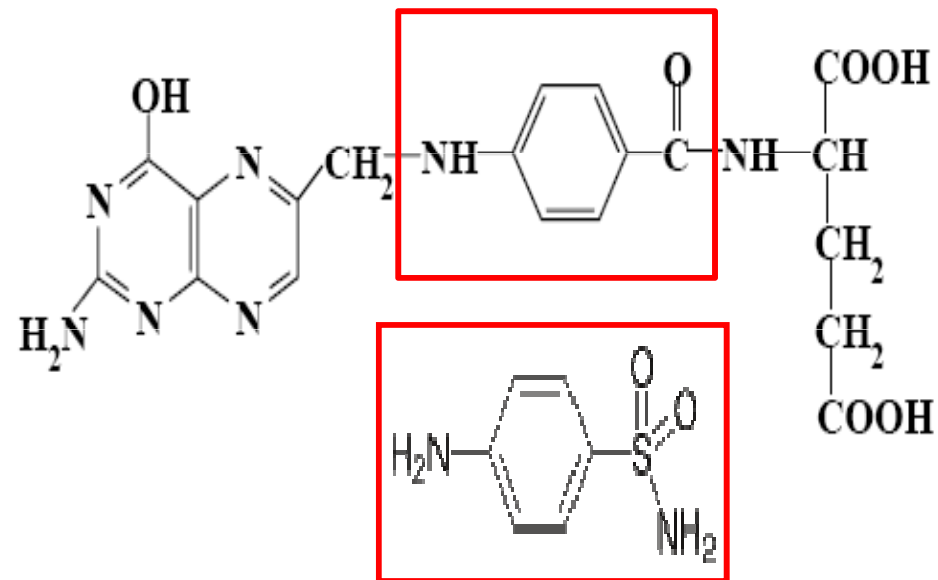
adenosylmethionin



biotin

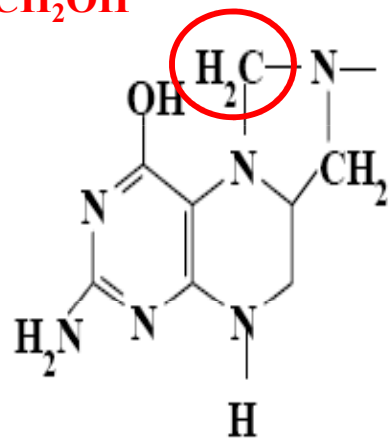


tetrahydrolistová k.



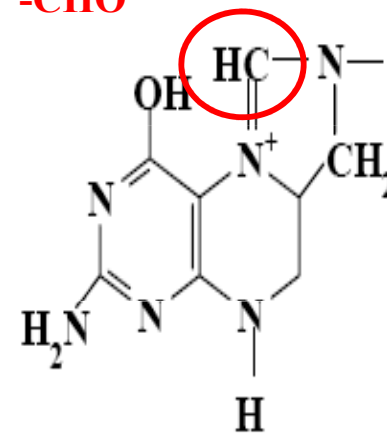
methylenetetrahydrolistová k.

-CH₂OH

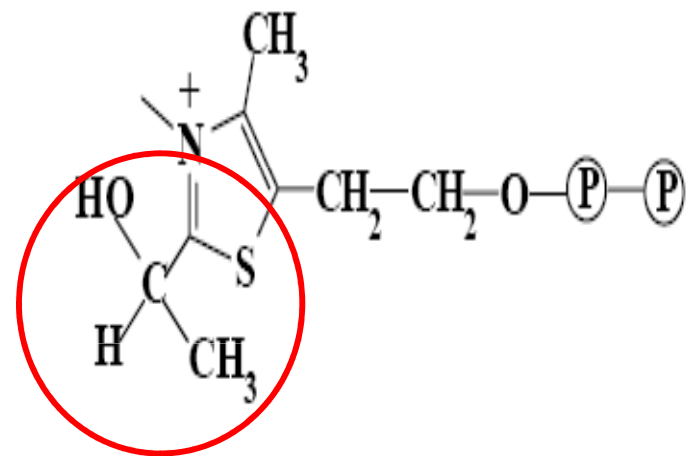
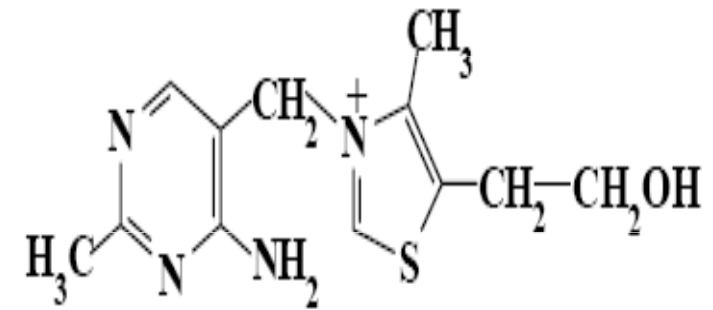


methenyltetrahydrolistová k.

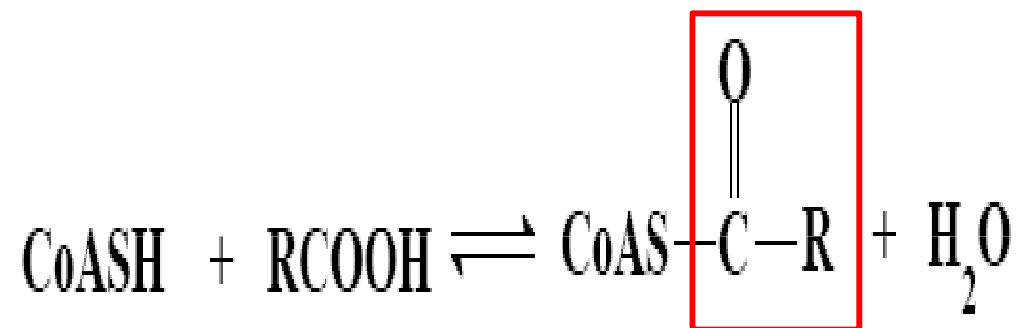
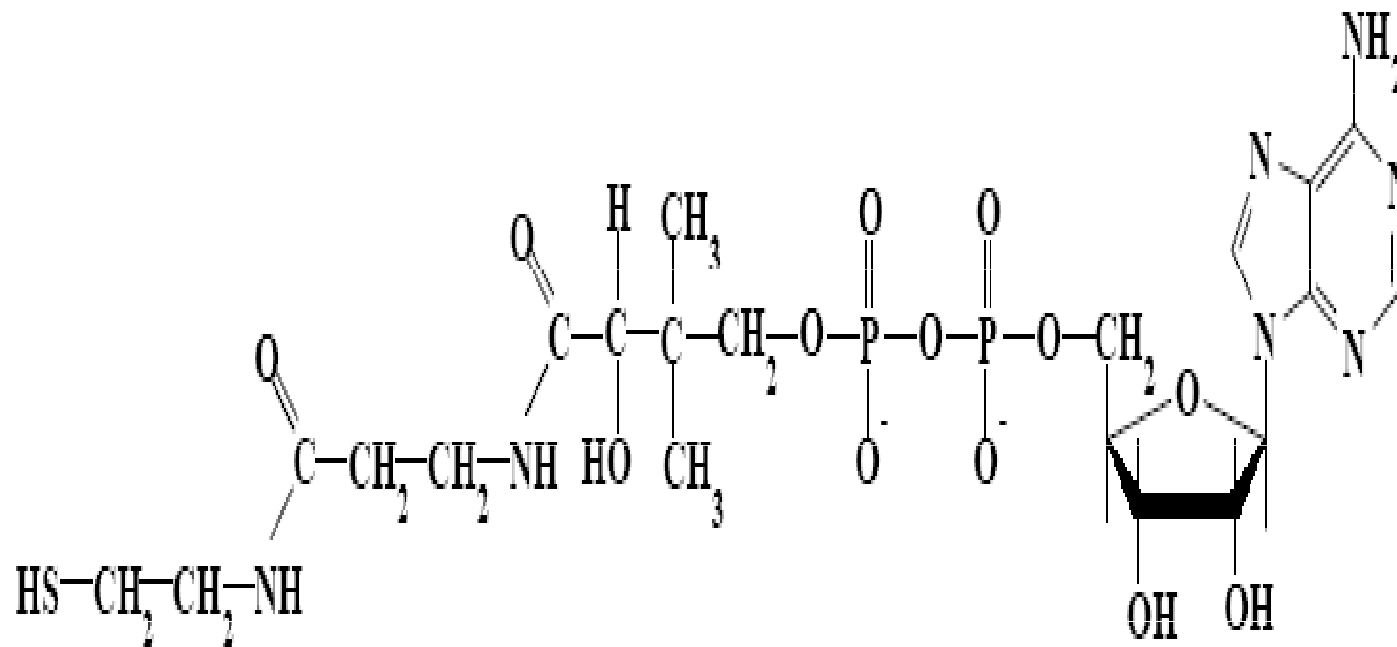
-CHO



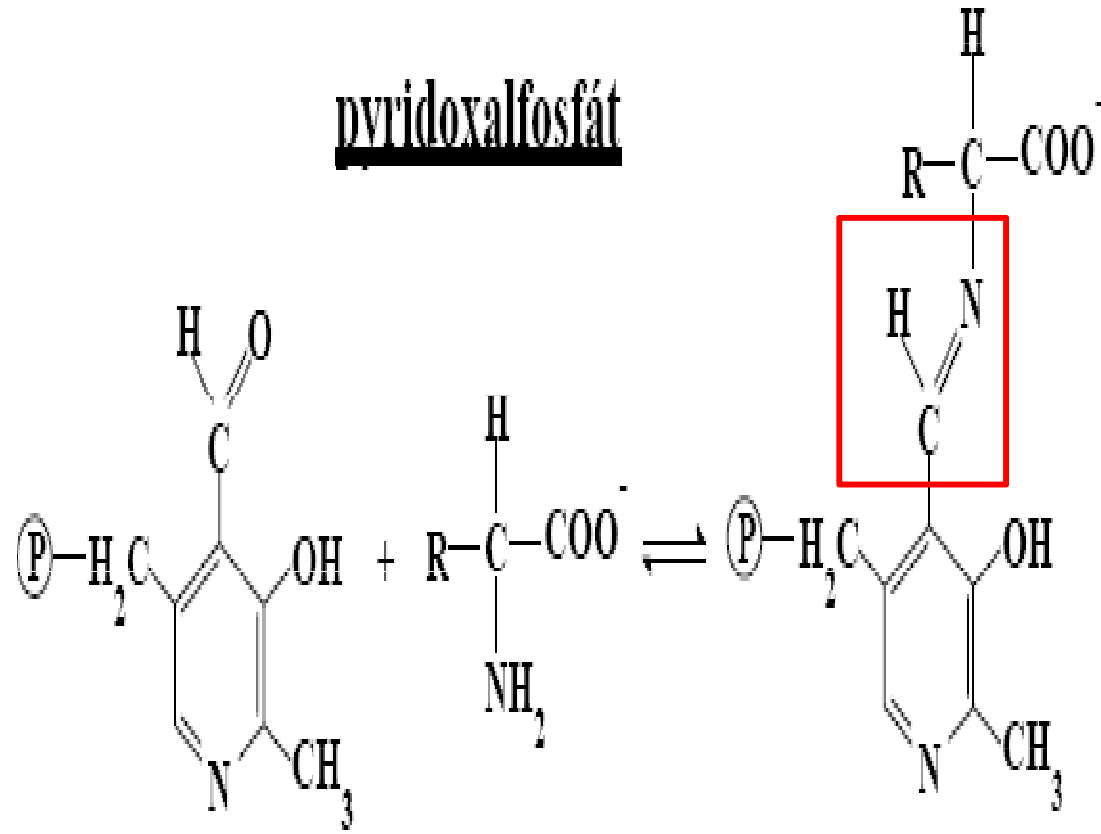
thiamin



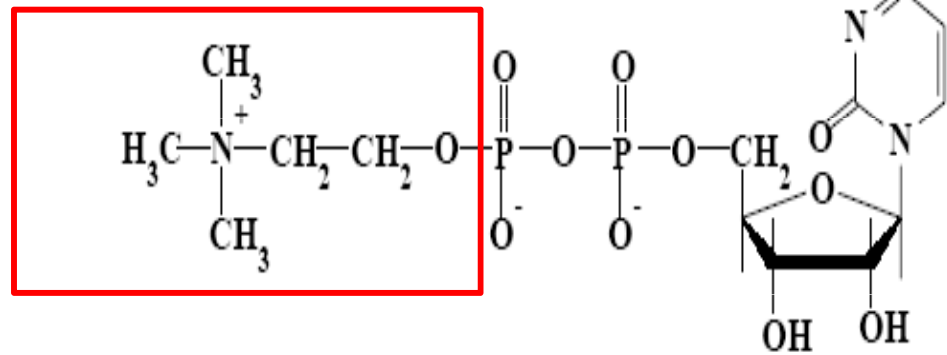
koenzym A - CoA - CoASH



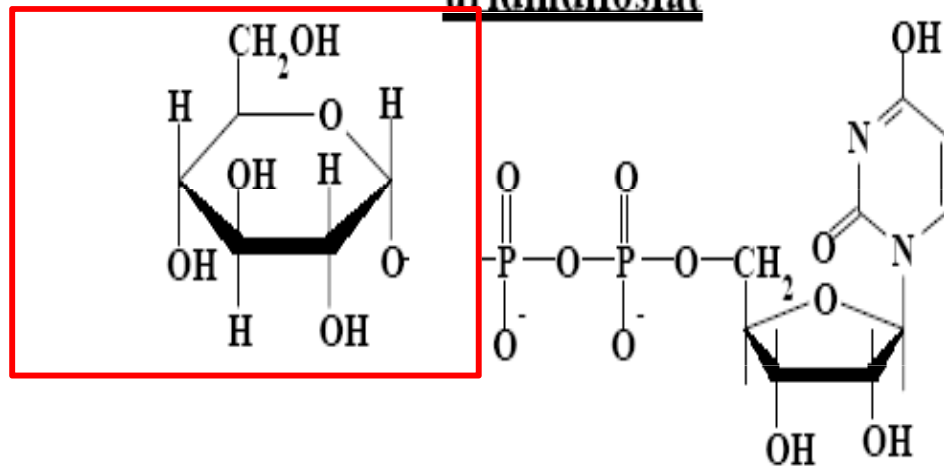
pyridoxalfosfát



cytidindifosfát



uridindifosfát



Lyasy a ligasy - bez kofaktoru nebo již popsáným kofaktorem TPP

Hydrolasy - bez kofaktoru

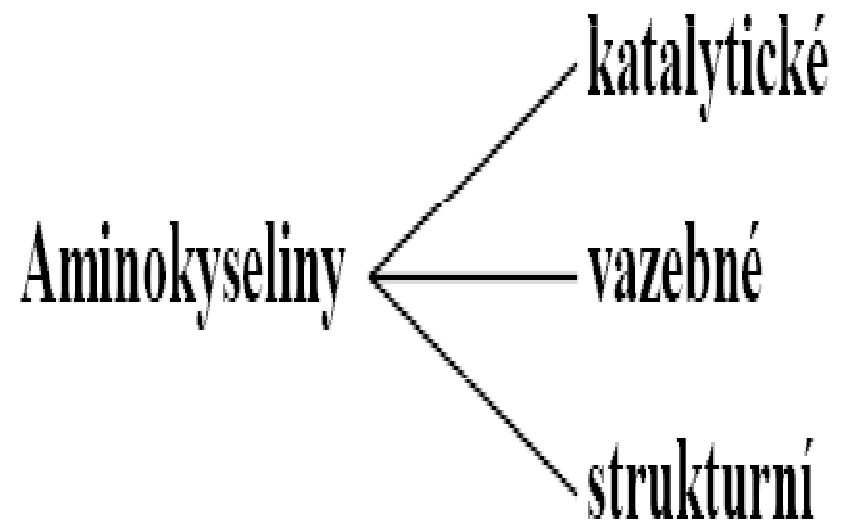
Izomerasy - většinou bez kofaktoru nebo kobalamin,

Enzymové bílkoviny

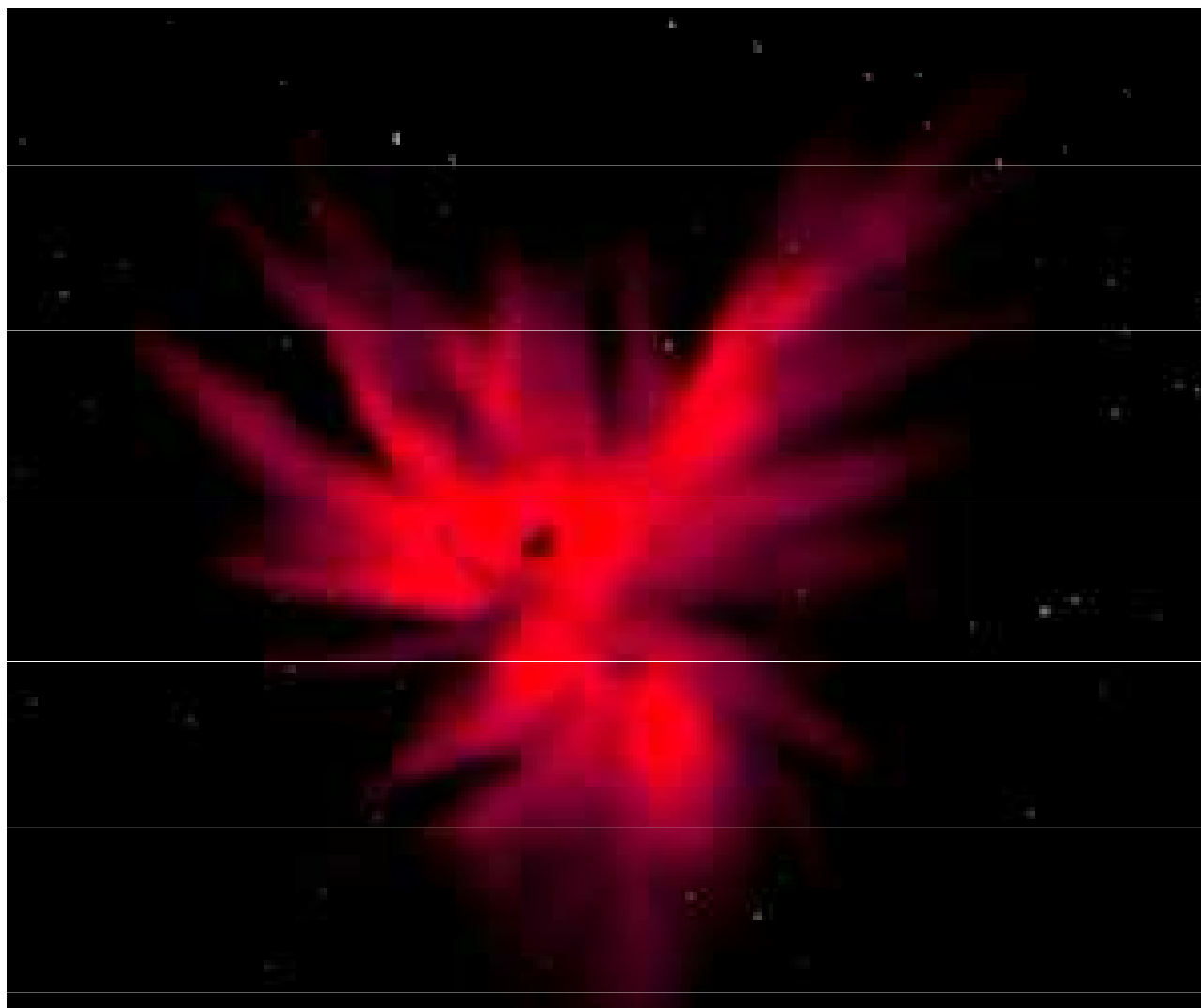
- monomerní
- oligomerní
- multienzymové komplexy

Izoenzymy

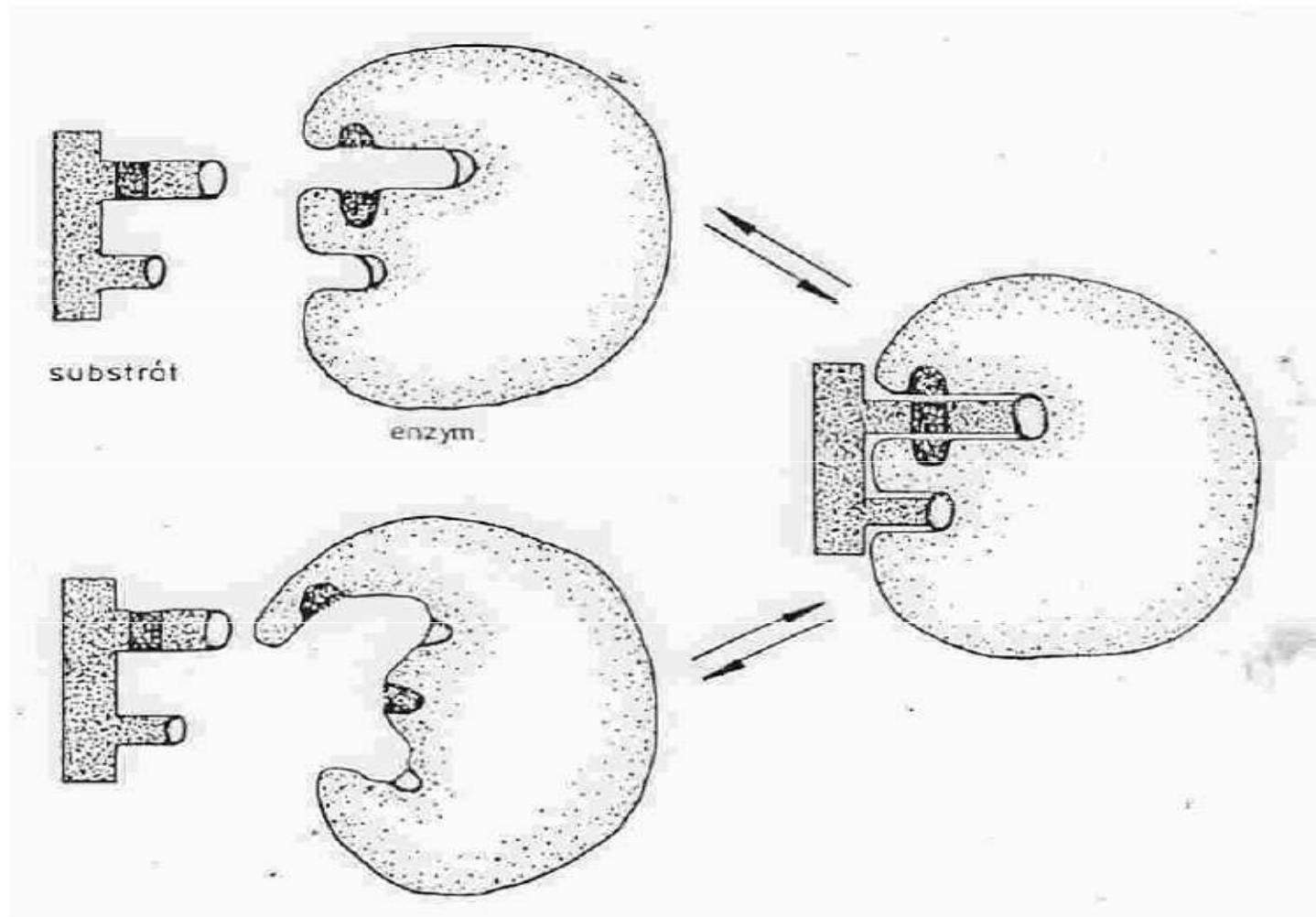
Aktivní místo enzymů



Katalytická triáda

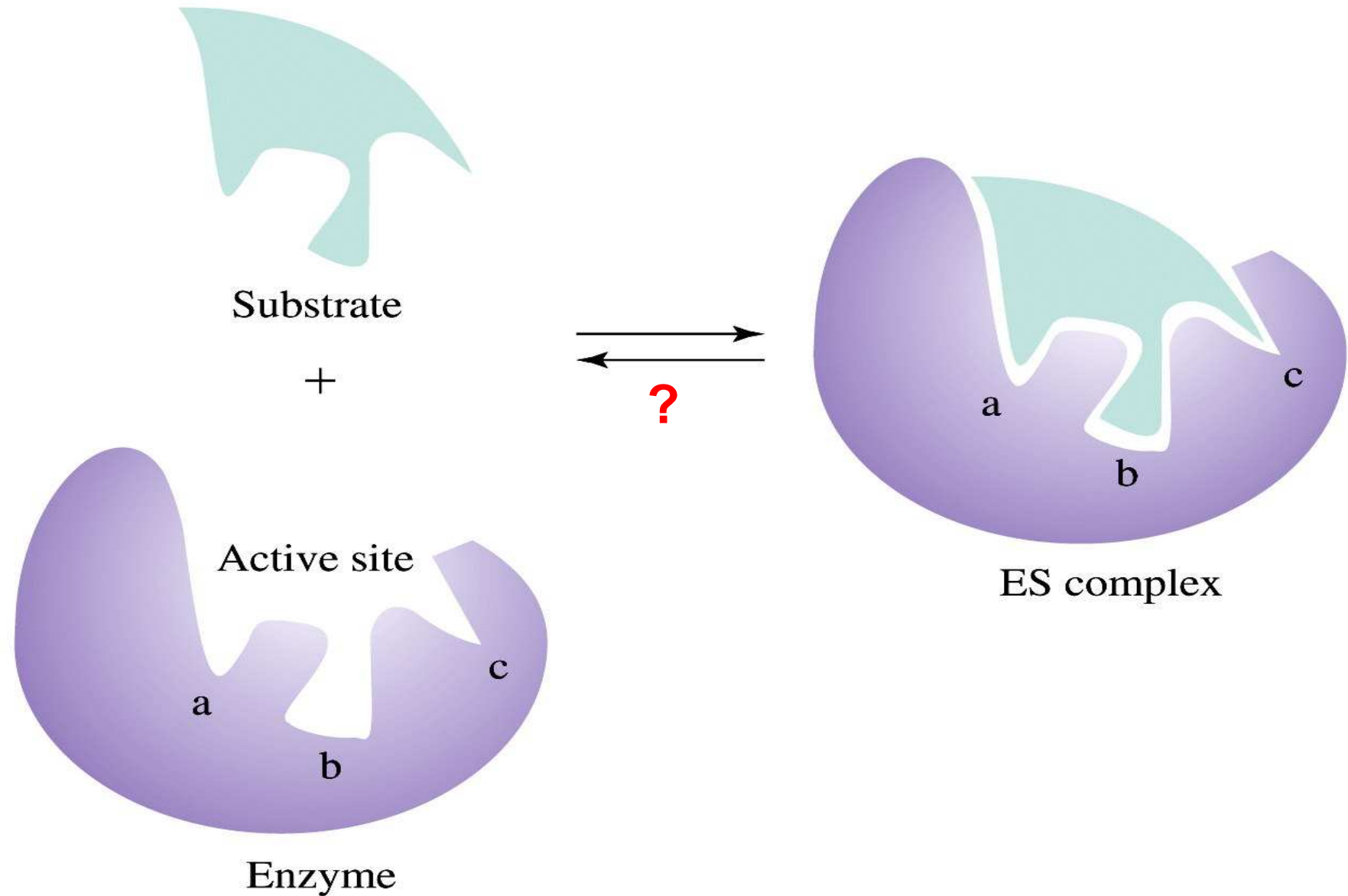


Fischer - 1894 - *teorie o zámku a klíči*



Koshland - 1959 - *teorie indukovaného přizpůsobení*

„Lock and key“ model



„Induced fit“ model

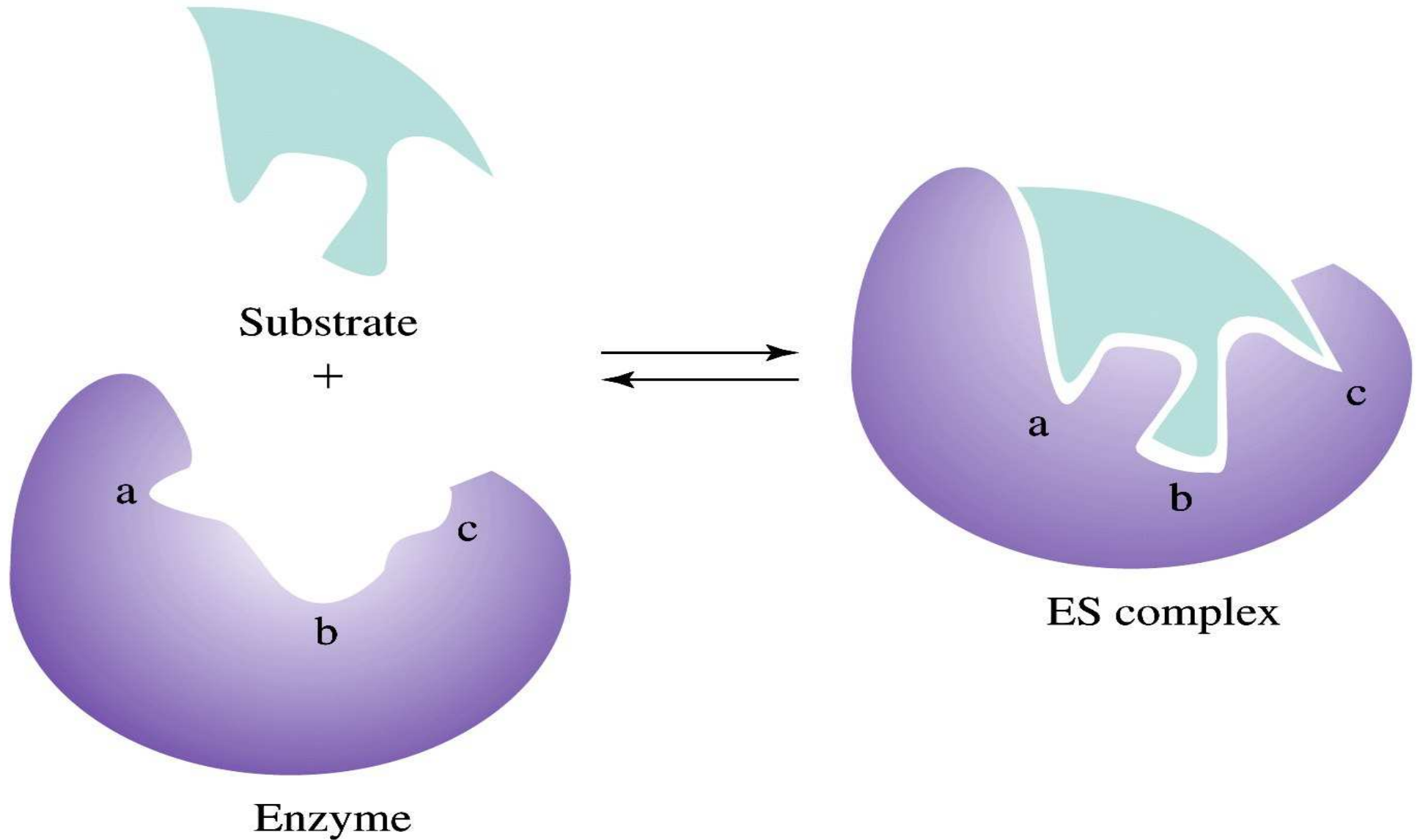


Figure 5-10 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

„Transition state“ model

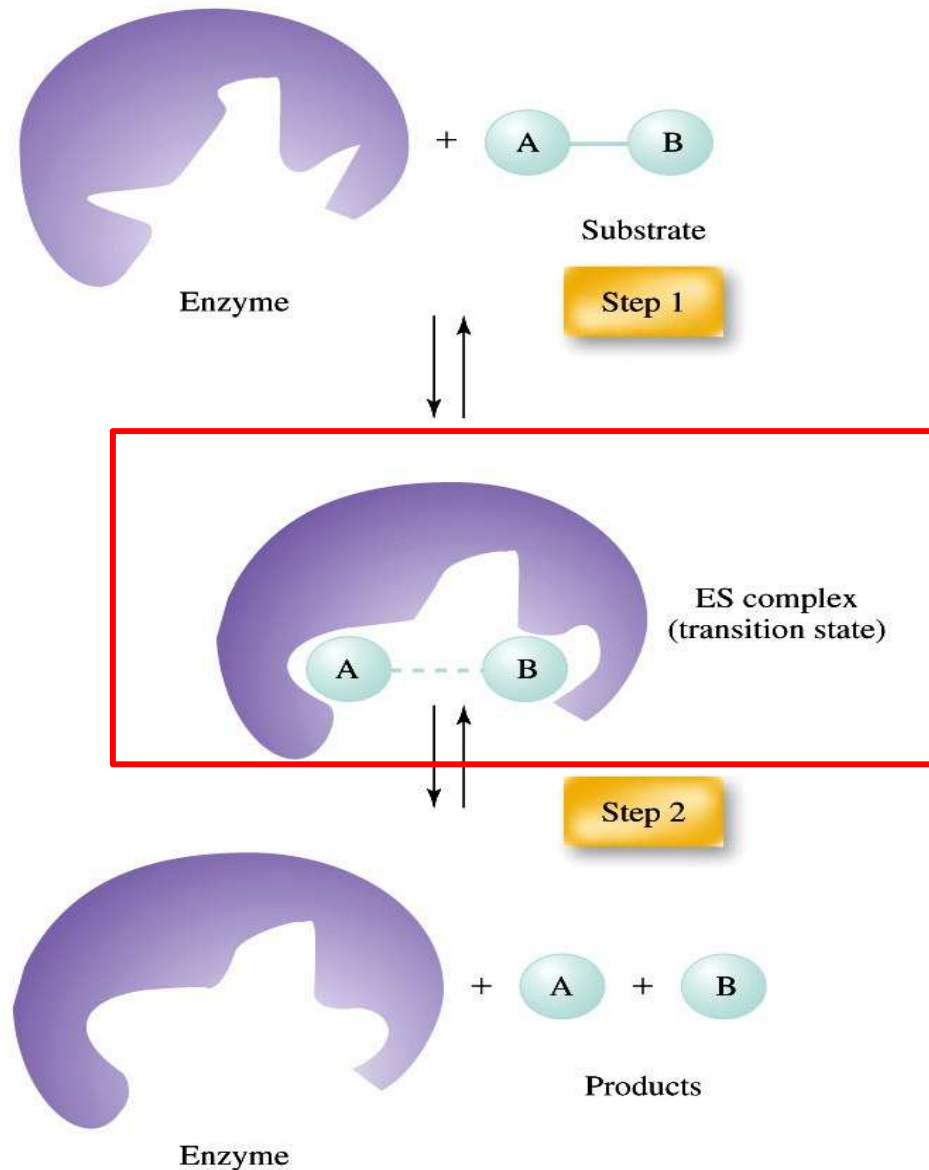


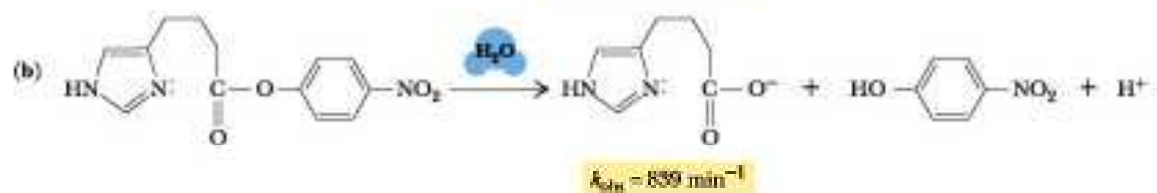
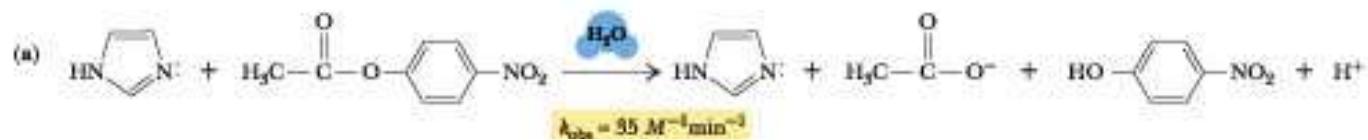
Figure 5-11 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Aktivní místo

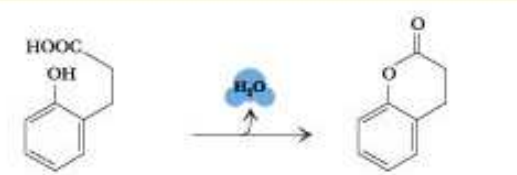
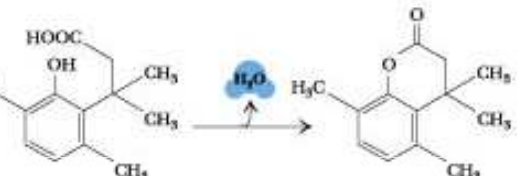
- Efekt přiblížení – překryv orbitalů
- Specifické mikroprostředí – pH, I, hydrofobita atd
- Dehydratace
- Koncentrační efekt - 10^5
- Vhodná orientace

Proximitní a orientační

INTRAMOLEKULÁRNÍ REAKCE



INTERMOLEKULÁRNÍ REAKCE

Reaction	Rate const. ($\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)	Ratio
	5.9×10^{-6}	
	1.5×10^6	2.5×10^{11}

Aktivační energie



Uvolněna při vazbě substrátu na enzym

Mechanismus katalýzy

- Acidobazická – Asp, Glu, His, Lys, Arg, Cys, Ser, Tyr

Aminokyselina	Kyselá forma (donor protonů)	Zásaditá forma (akceptor protonů)				
Glu, Asp	R - COOH	R - COO ⁻				
L C H S	Skupina	pK	Skupina	pK	Skupina	pK
	α COOH	1.8 - 2.5	β COOH	3.9	γ COOH	4.1
	α NH ₂	9 - 10	ϵ NH ₂	10.8	guanidin	12.5
	imidazol	6.0	SH	8.3	OH	10.1
Tyr						

Acidobazická kyselá proteázy

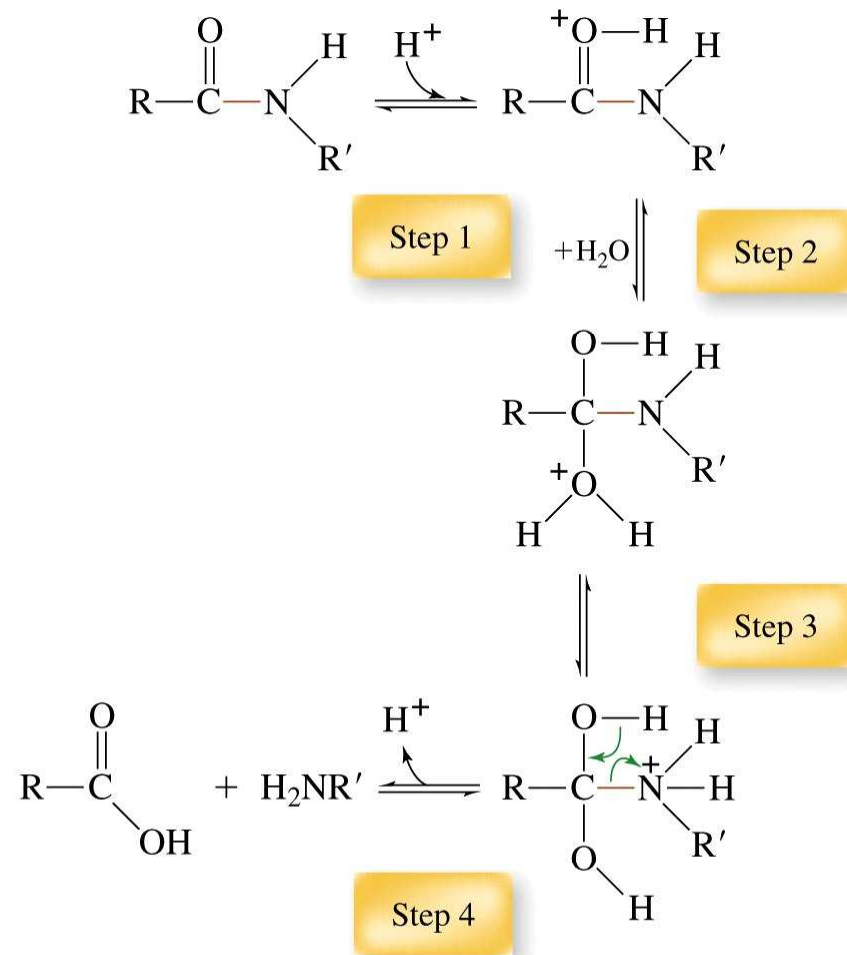
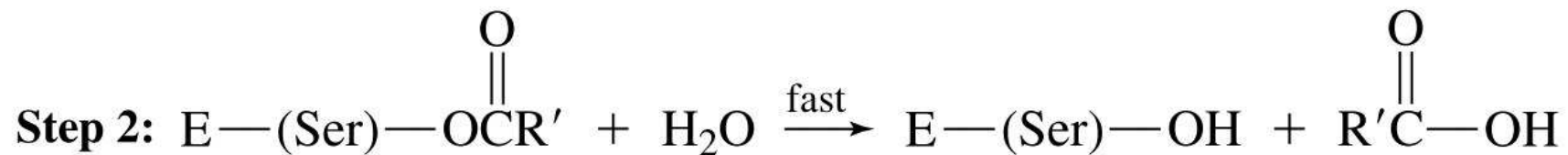
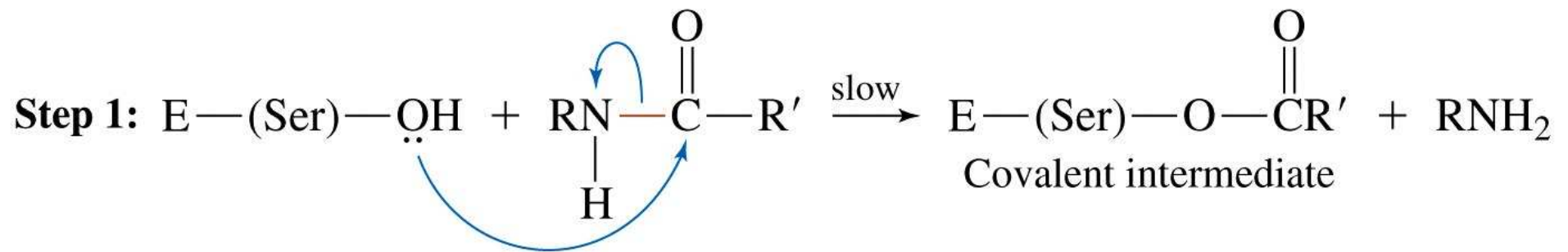


Figure 5-12 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Kovalentní serinové proteázy



Unnumbered figure pg150 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Kovovými ionty

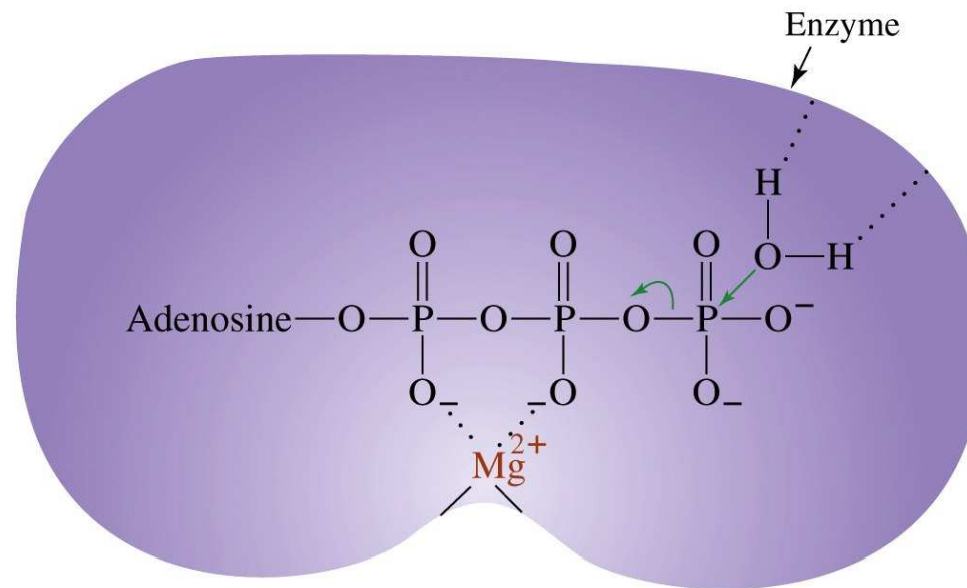


Figure 5-13a Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Kovovými ionty

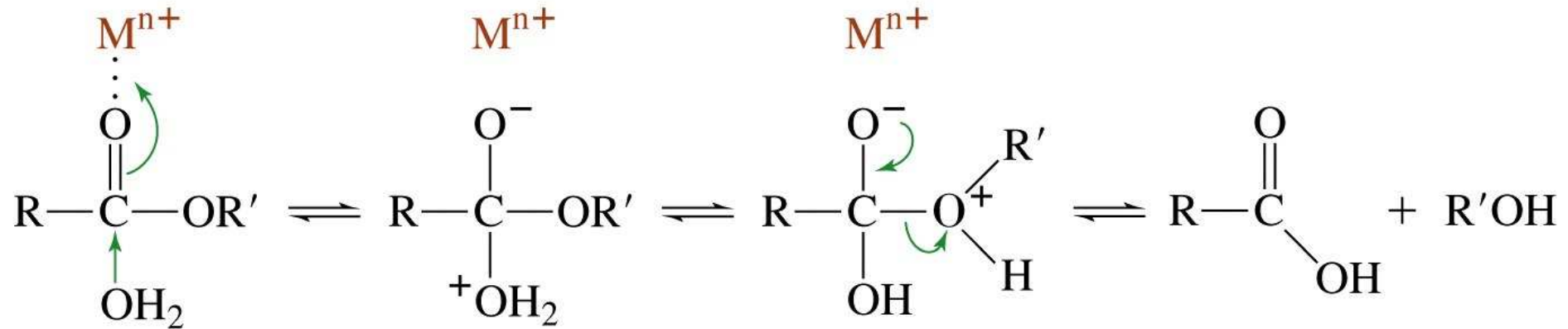


Figure 5-13b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

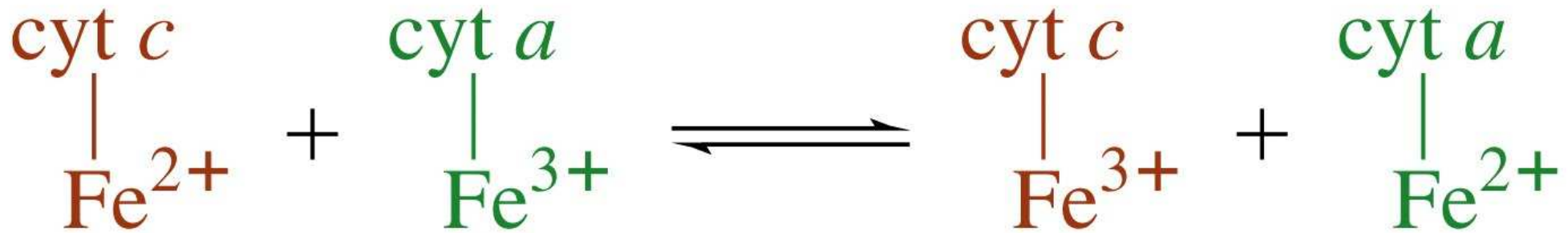
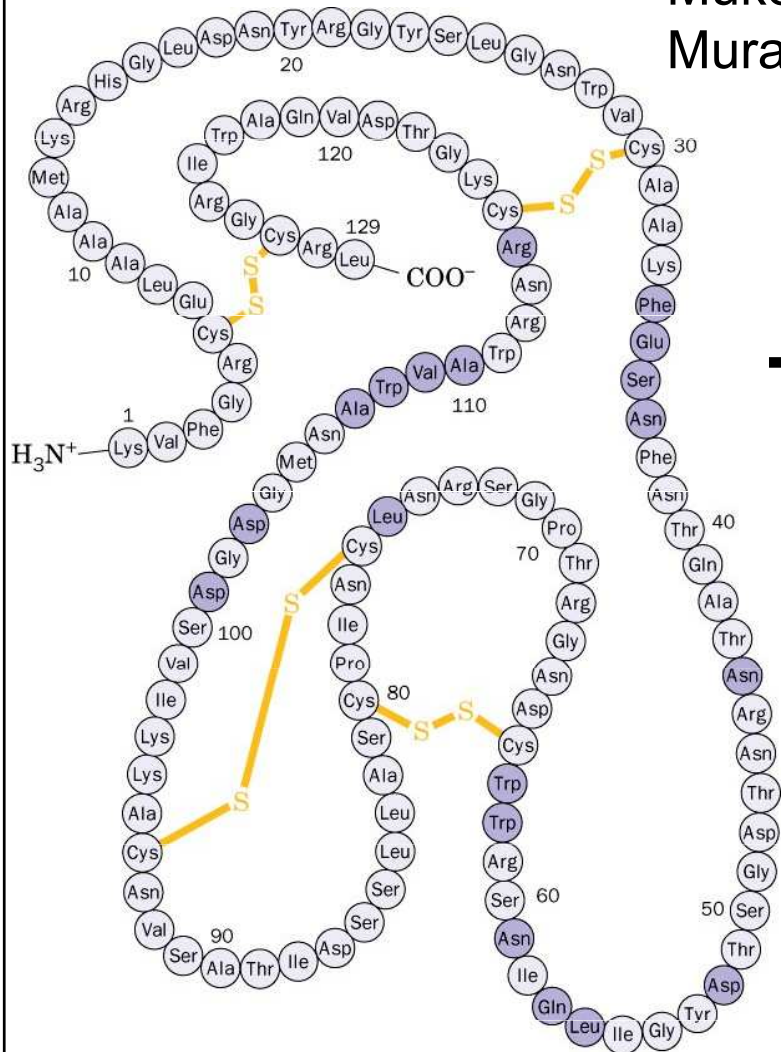
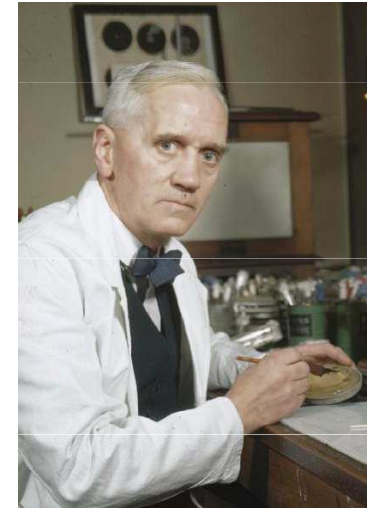


Figure 5-13c Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

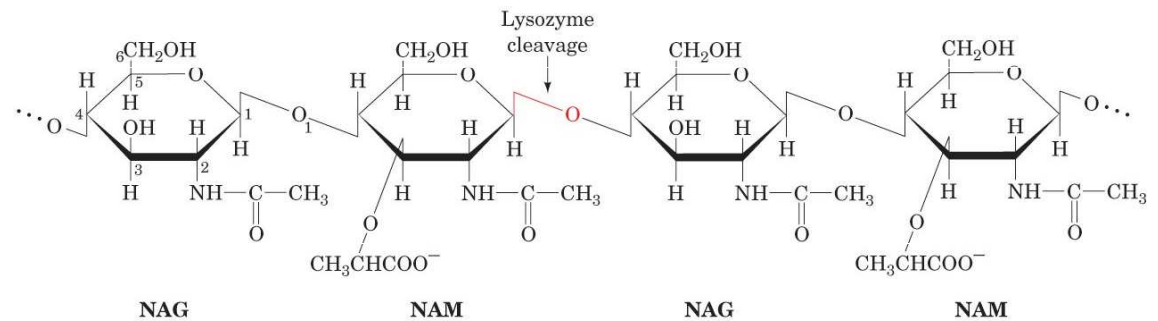
Lysozym

EC 3.2.1.17 peptidoglykan *N*-acetylmuramoylhydrolase

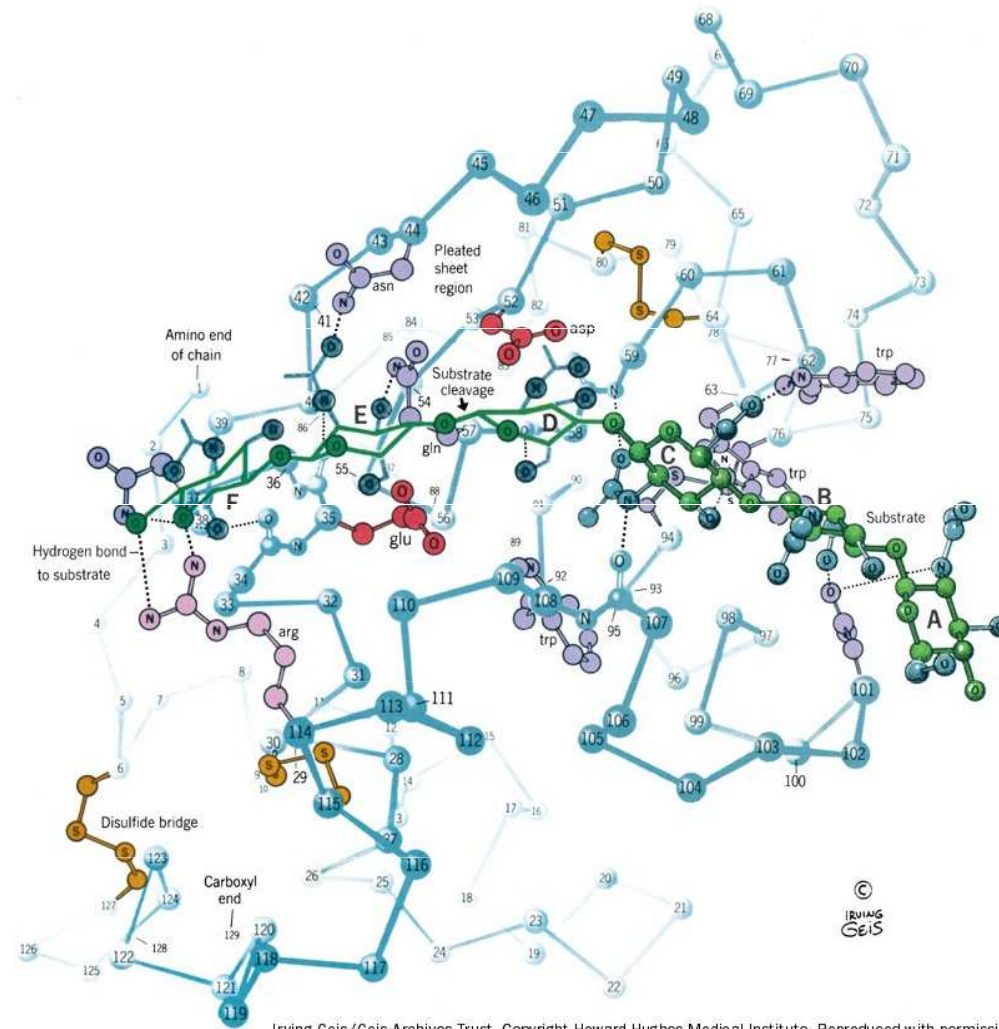
Mukopeptid *N*-acetylmuramoylhydrolase,
Muramidase



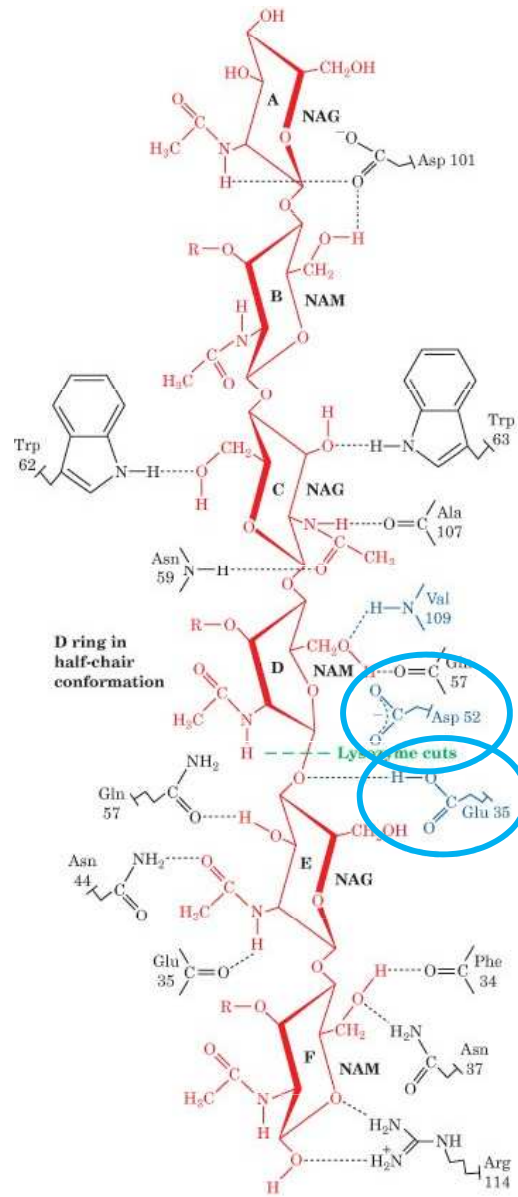
+



Lysozym

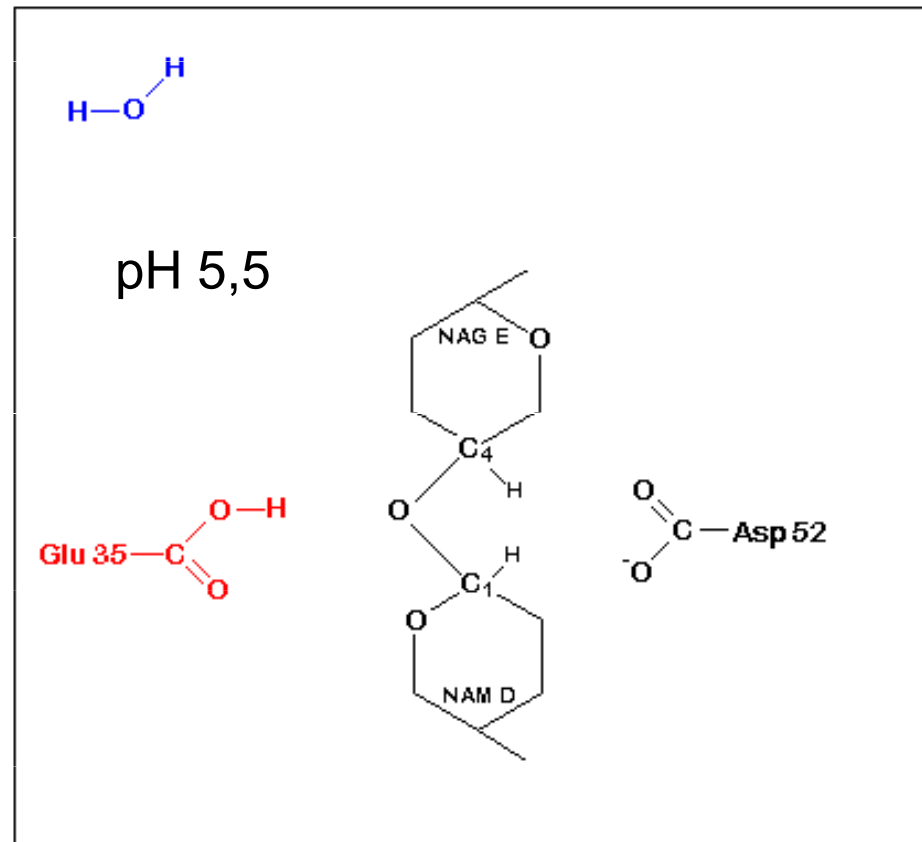


Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission



Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission

Lysozym

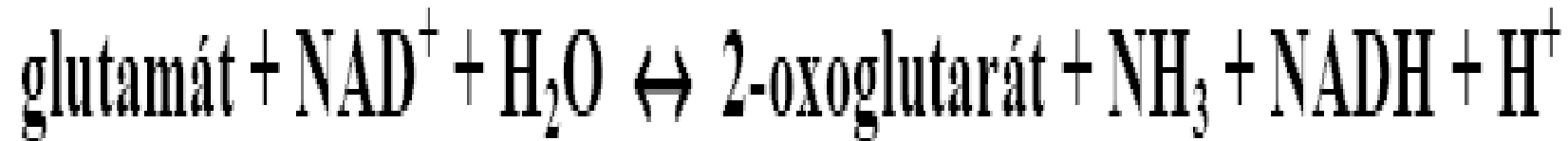


Specifita enzymové reakce

specifita reakční - účinku - jaká reakce proběhne

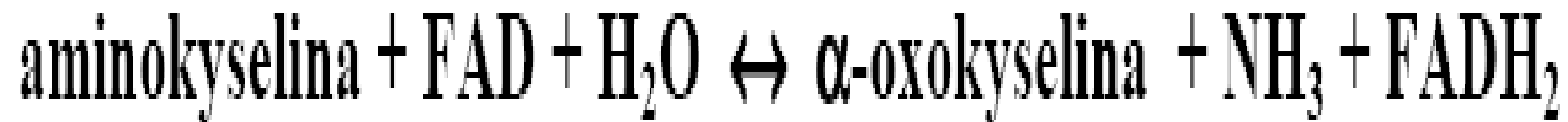
savci

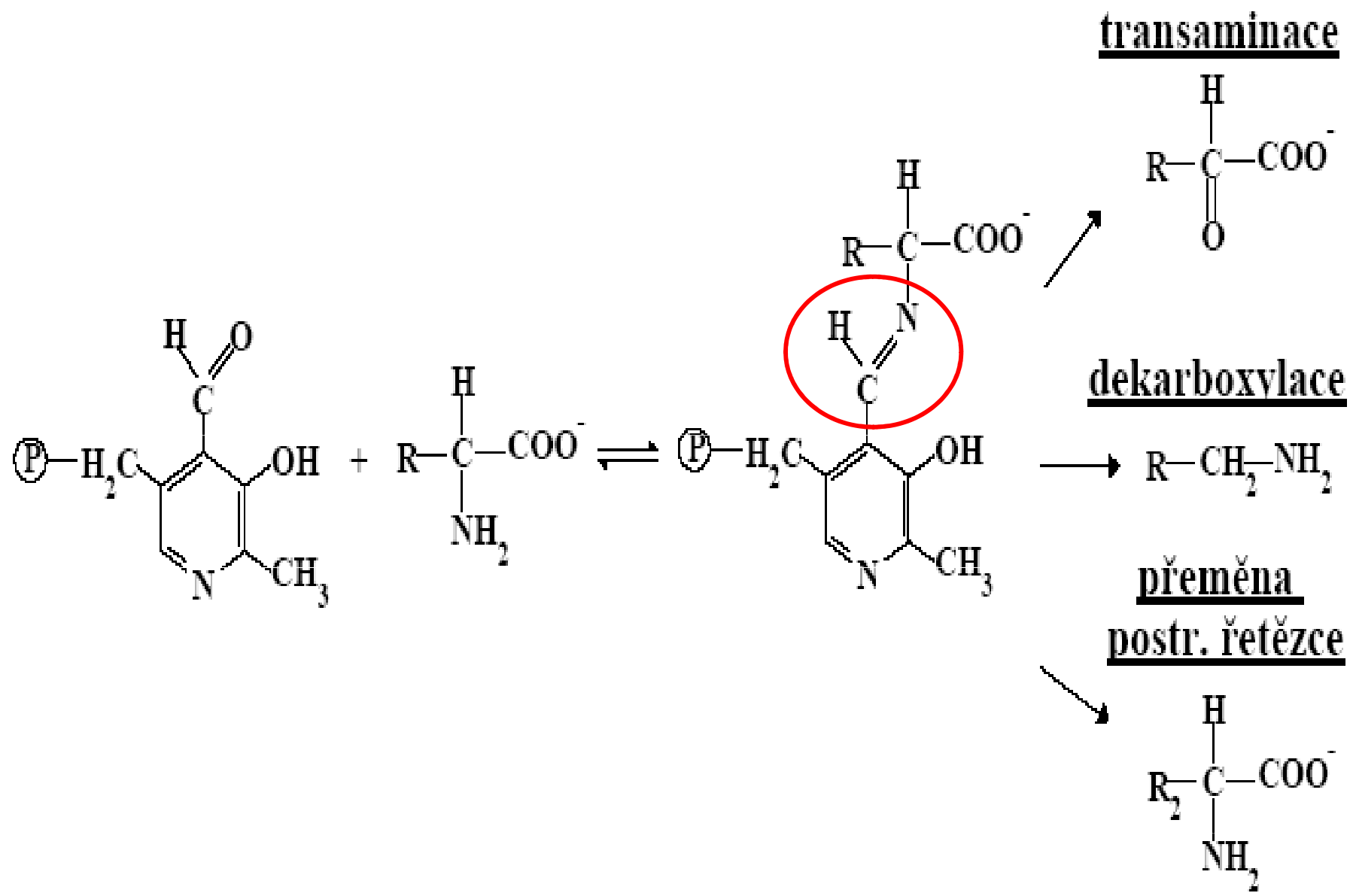
Glutamát dehydrogenasa



vejcorodi

Oxidasa aminokyselín





Specifita enzymové reakce

specifita substrátová - absolutní

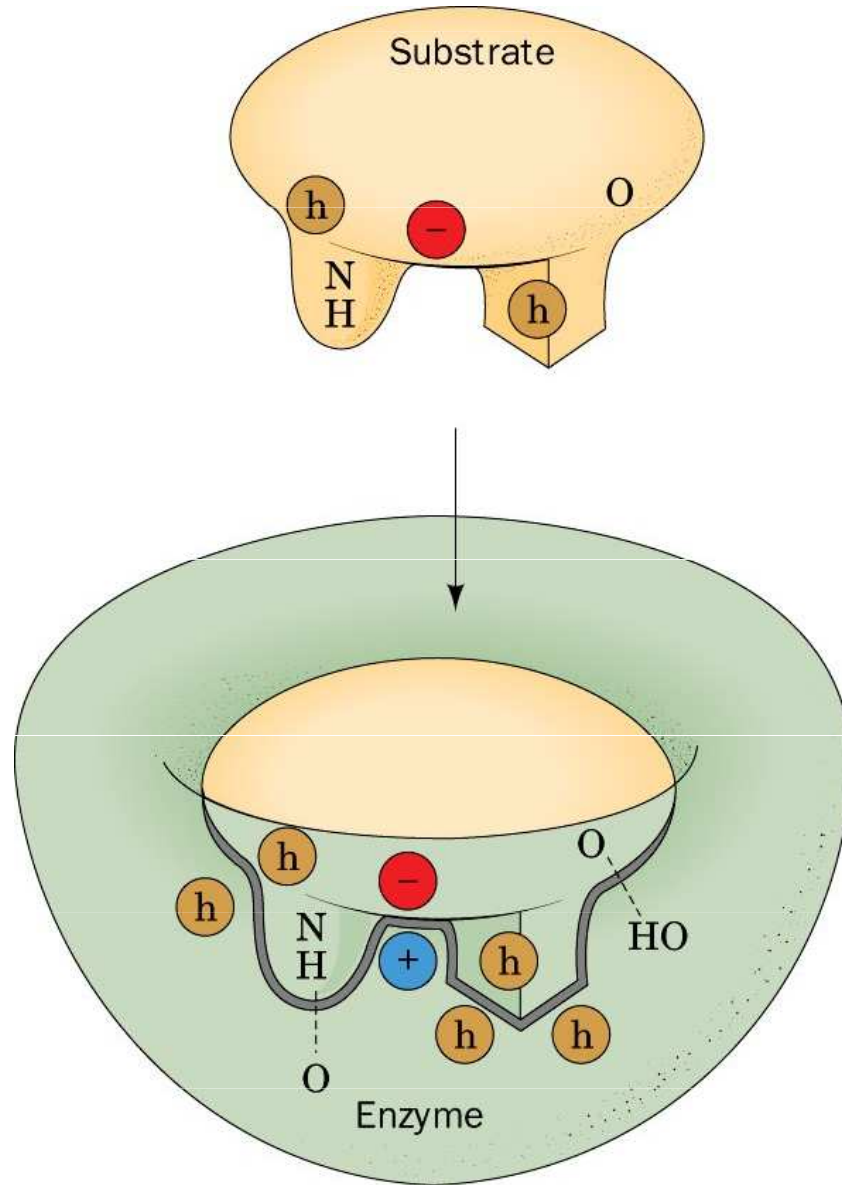
ureasa

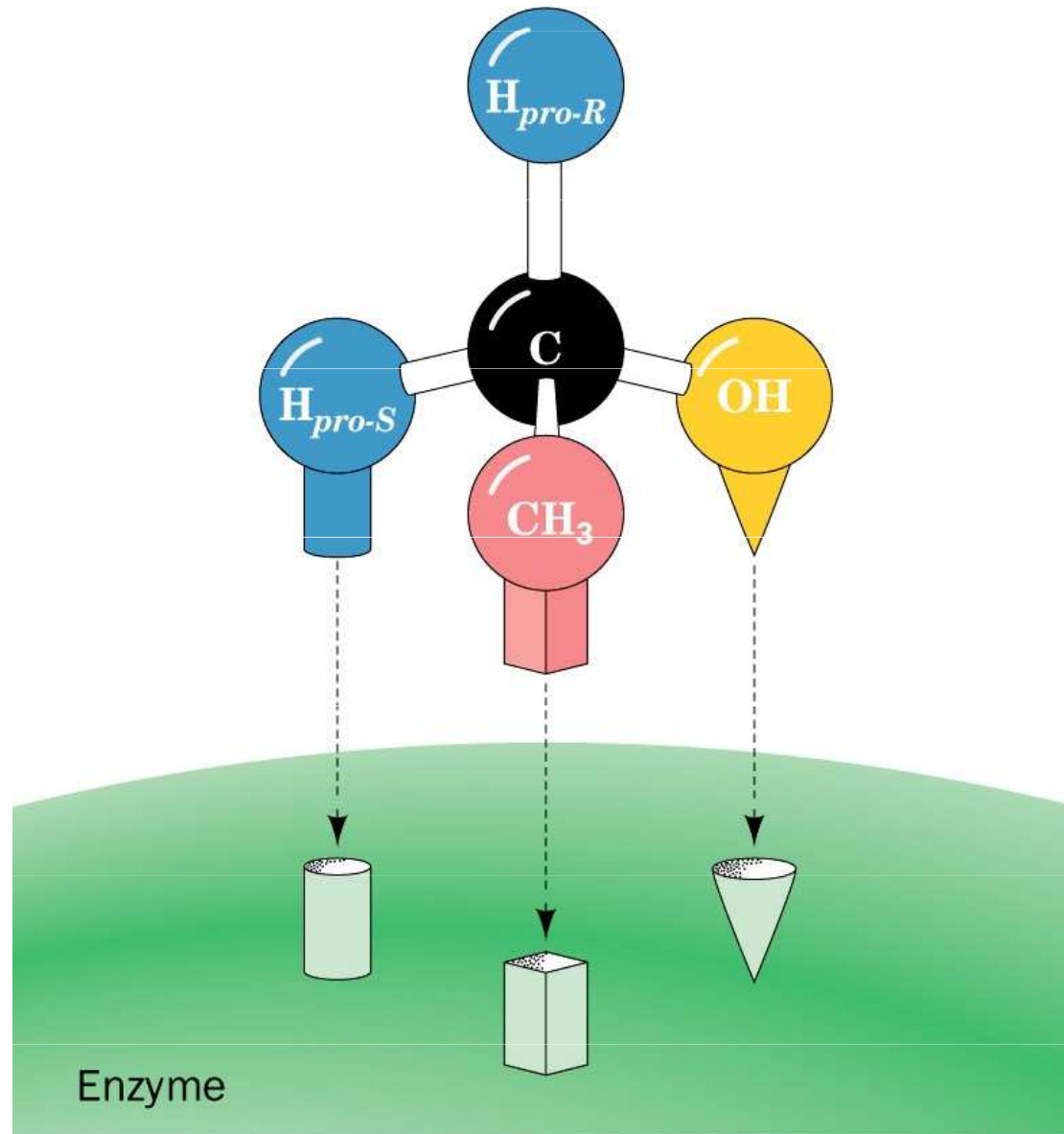
- skupinová

ADH

- stereospecifita

oxidasa L-aminokyselin





Enzymová kinetika

Studium vlivu různých chemických a fyzikálních faktorů na enzymové reakce

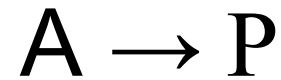
[E], [S], [I], pH, I, T



- Mechanismus reakce
- Stavba aktivního místa
- Regulaci

Enzymové reakce

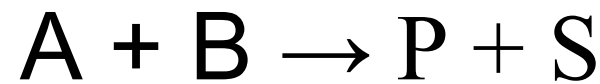
- Jednosubstrátové



$$v = -\frac{d[A]}{dt}$$

$$v = k[A]$$

- Dvousubstrátové



$$v = -\frac{d[A]}{dt} \quad \left(= -\frac{d[B]}{dt} \right)$$

$$v = k[A]^g [B]^h$$

- Vícesubstrátové



ENZYMOVÁ KINETIKA

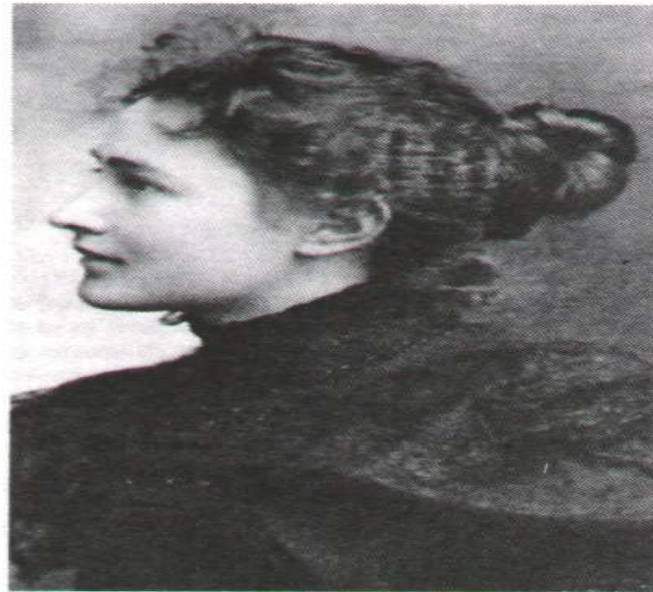
Reakce s jedním substrátem

BROWN 1902

MICHAELIS MENTENOVÁ 1913

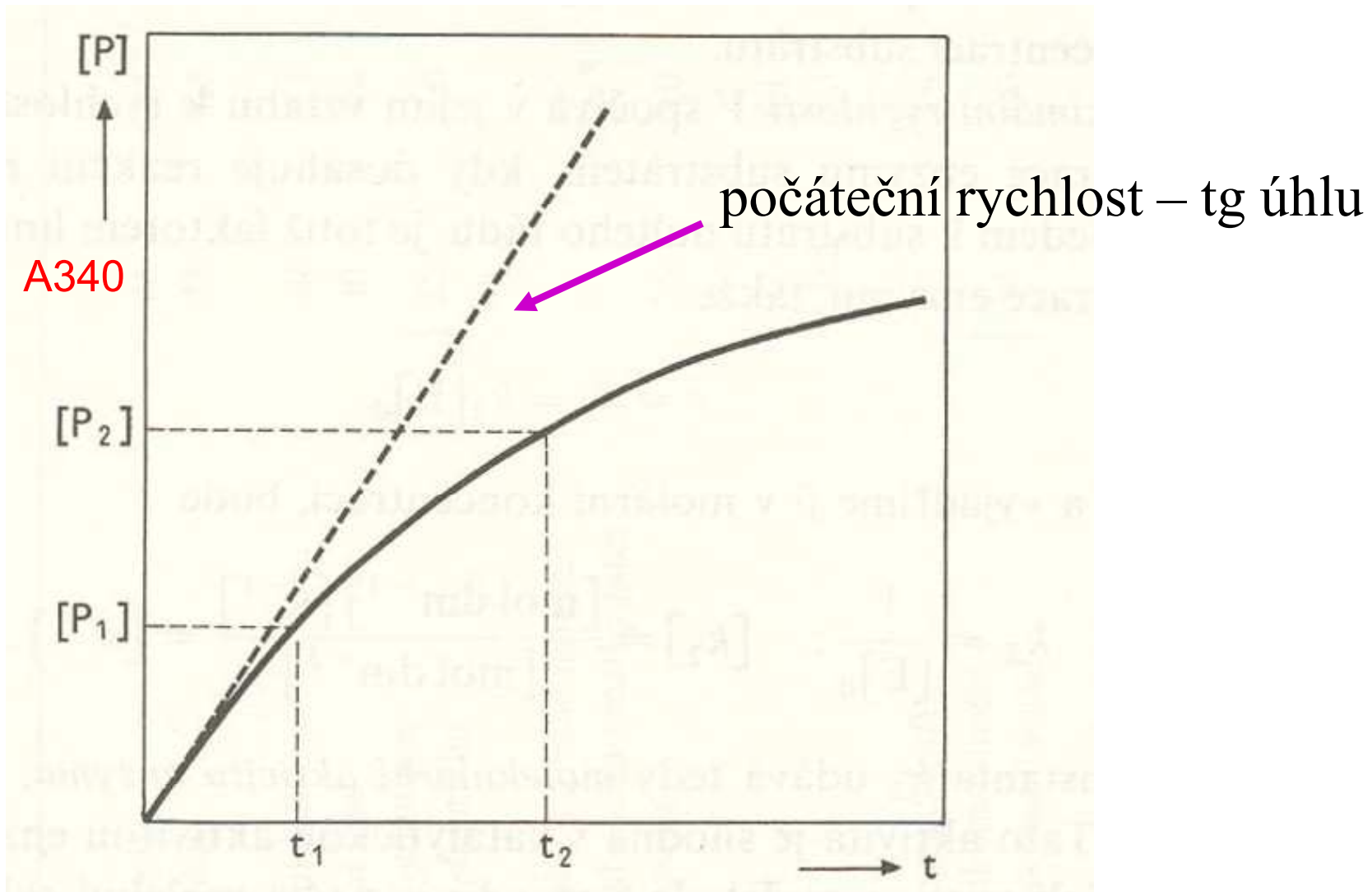
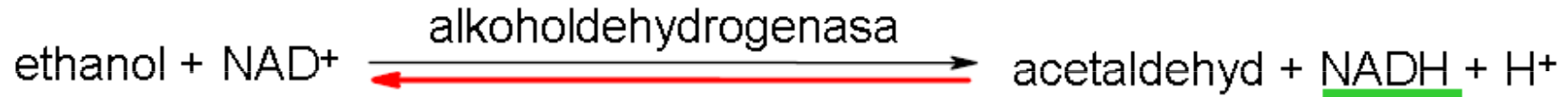


Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

Počáteční rychlost enz.reakce



b) závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu

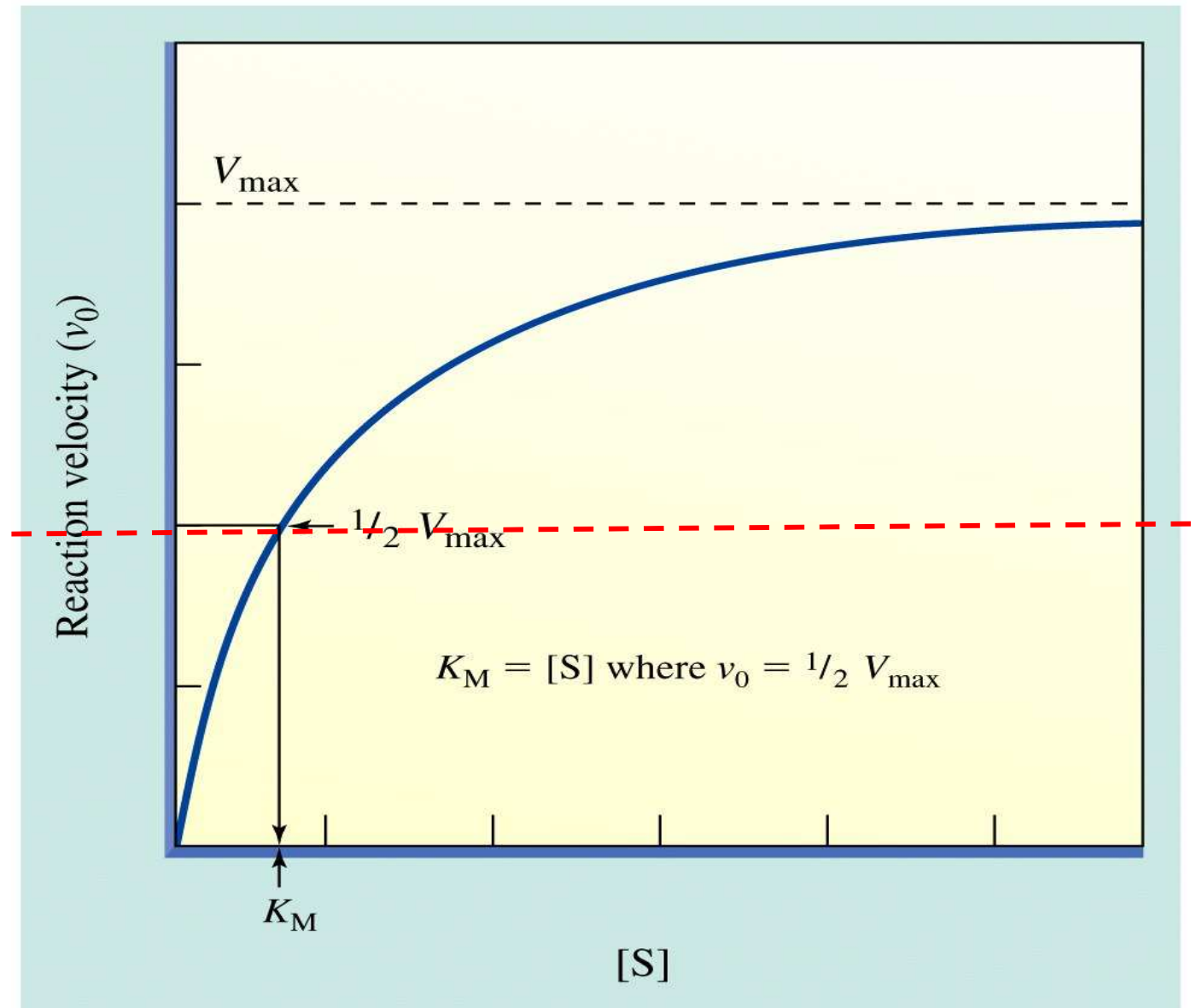
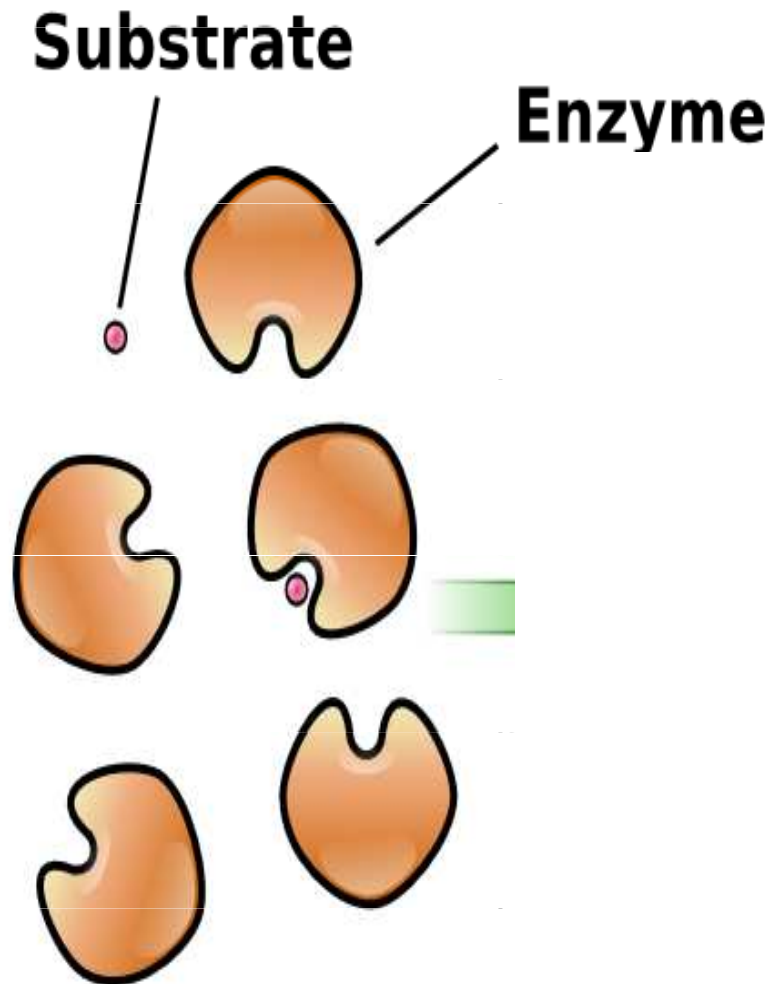


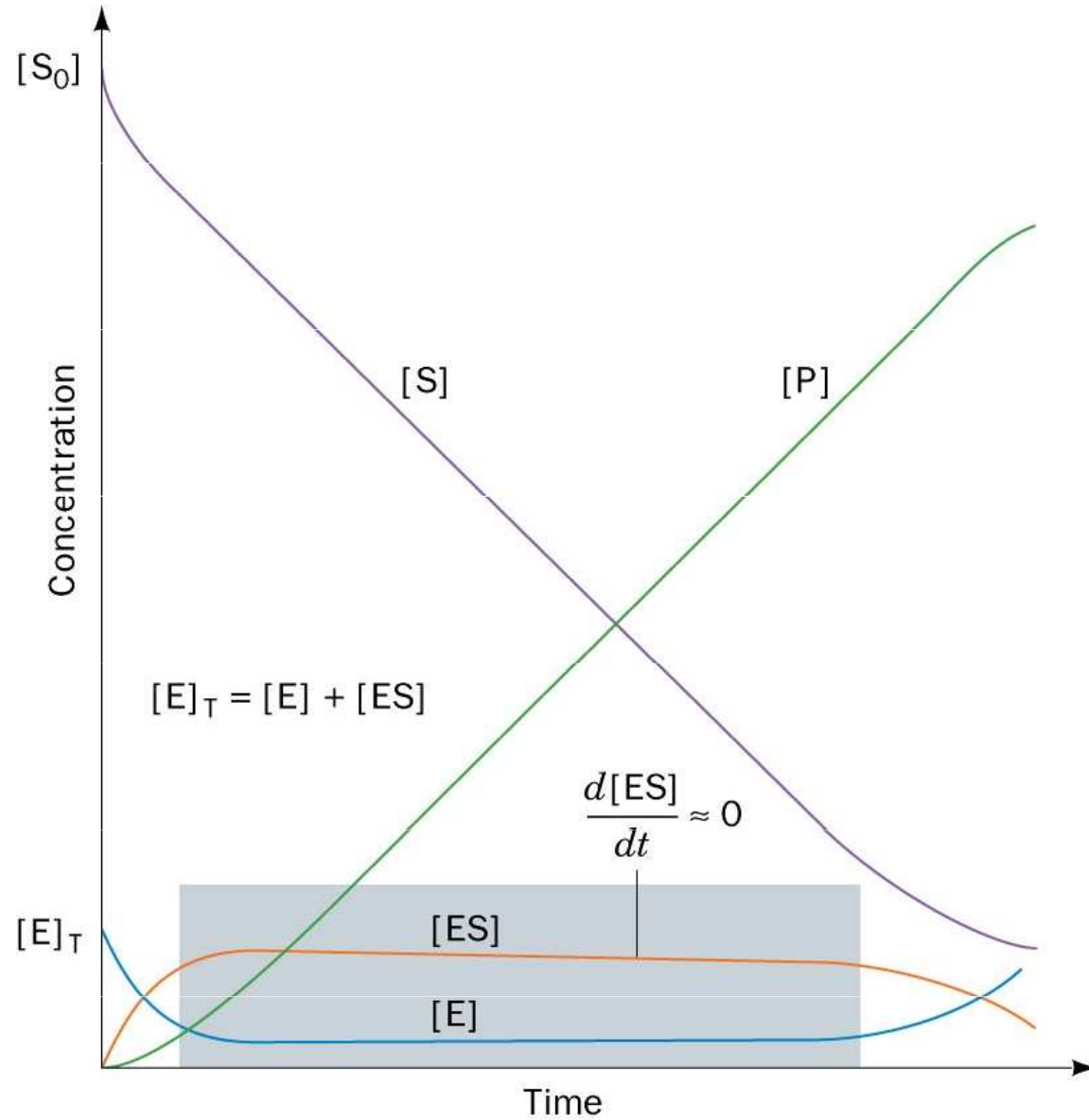
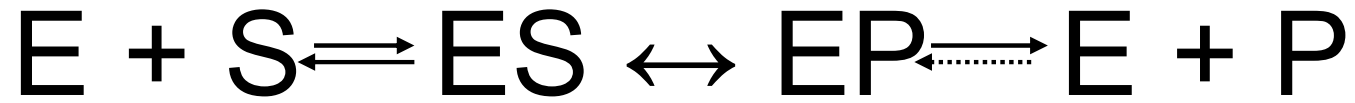
Figure 5-4 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

b) závislost počáteční rychlosti na koncentraci **substrátu**

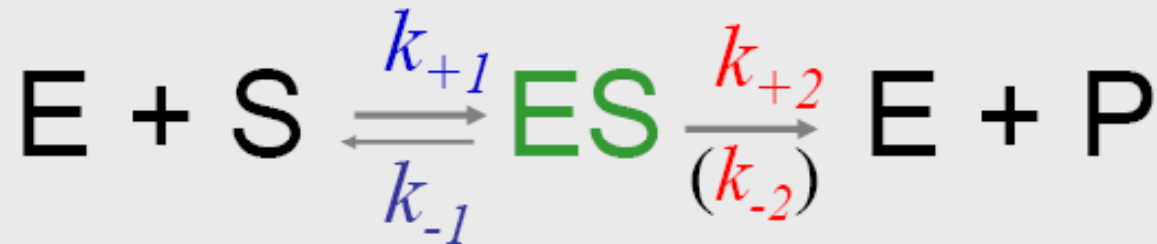


Low substrate

Ustálený stav

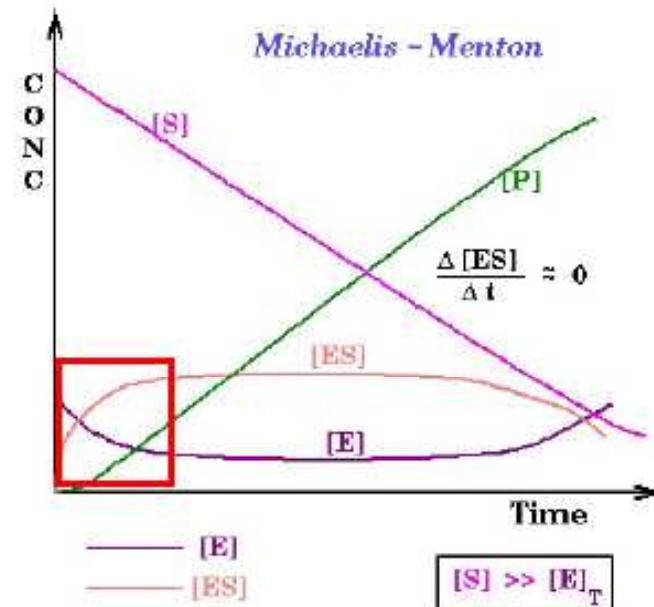


Základní model - Michaelis & Mentenová

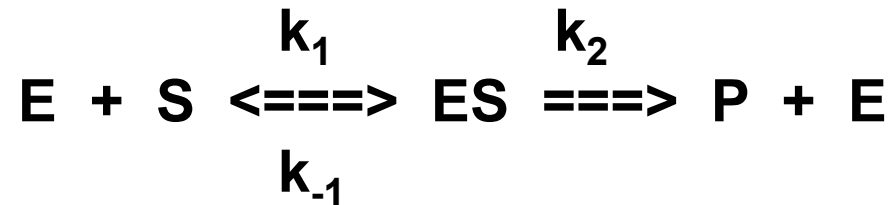


Předpoklady:

1. Koncentrace [ES] je v ustáleném stavu
2. Tvorba produktu P je přímo úměrná koncentraci [ES], tudíž $v_0 = k_2 [\text{ES}]$
3. Koncentrace [S] je mnohem vyšší než [E]
4. Zpětnou reakci lze zanedbat?



Odvození rovnice Michaelis Mentenové



1. Předpoklad – koncentrace [ES] se v ustáleném, stavu nemění

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

$$v_1 = v_{-1} + v$$

$$k_1 [E][S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

$$[E]_{\text{tot}} = [E] + [ES]$$

$$[E] = [E]_{\text{tot}} - [ES]$$

$$k_1 ([E]_{\text{tot}} - [ES])[S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

$$([E]_{\text{tot}} - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2/k_1) [ES]$$

$$([E]_{\text{tot}} - [ES])[S] = K_m [ES]$$

$$[E]_{\text{tot}} [S] - [ES][S] = K_m [ES]$$

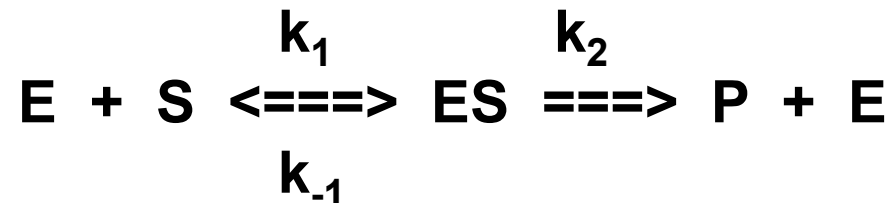
$$[E]_{\text{tot}} [S] = K_m [ES] + [ES][S]$$

$$[E]_{\text{tot}} [S] = [ES] (K_m + [S])$$

$$[ES] = [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2/k_1)$$

Odvození rovnice Michaelis Mentenové



2. Předpoklad – tvorba produktu je přímo úměrná koncentraci [ES] $v_0 = k_2 \cdot [ES]$

$$[ES] = [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

$$[ES] = v_0 / k_2$$

$$v_0 / k_2 = [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

$$v_0 = k_2 [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

$$V_{\text{max}} = k_2 [E]_{\text{tot}}$$

$$v_0 = V_{\text{max}} [S] / (K_m + [S])$$

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

Rovnice Michaelis Mentenové

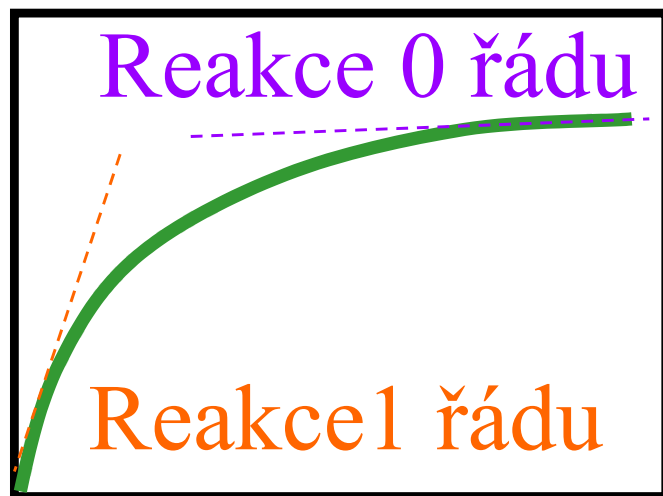
$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

v - počáteční reakční rychlost

V - maximální (limitní) reakční rychlost

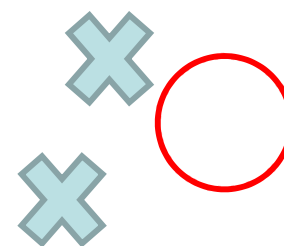
K_m - Michaelisova konstanta

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



$[S] \ll K_m$

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m} = \text{konst.} \cdot [S]$$



$[S] = \text{nizká} \rightarrow \text{vysoká}$

Stanovení K_m a V_{max}

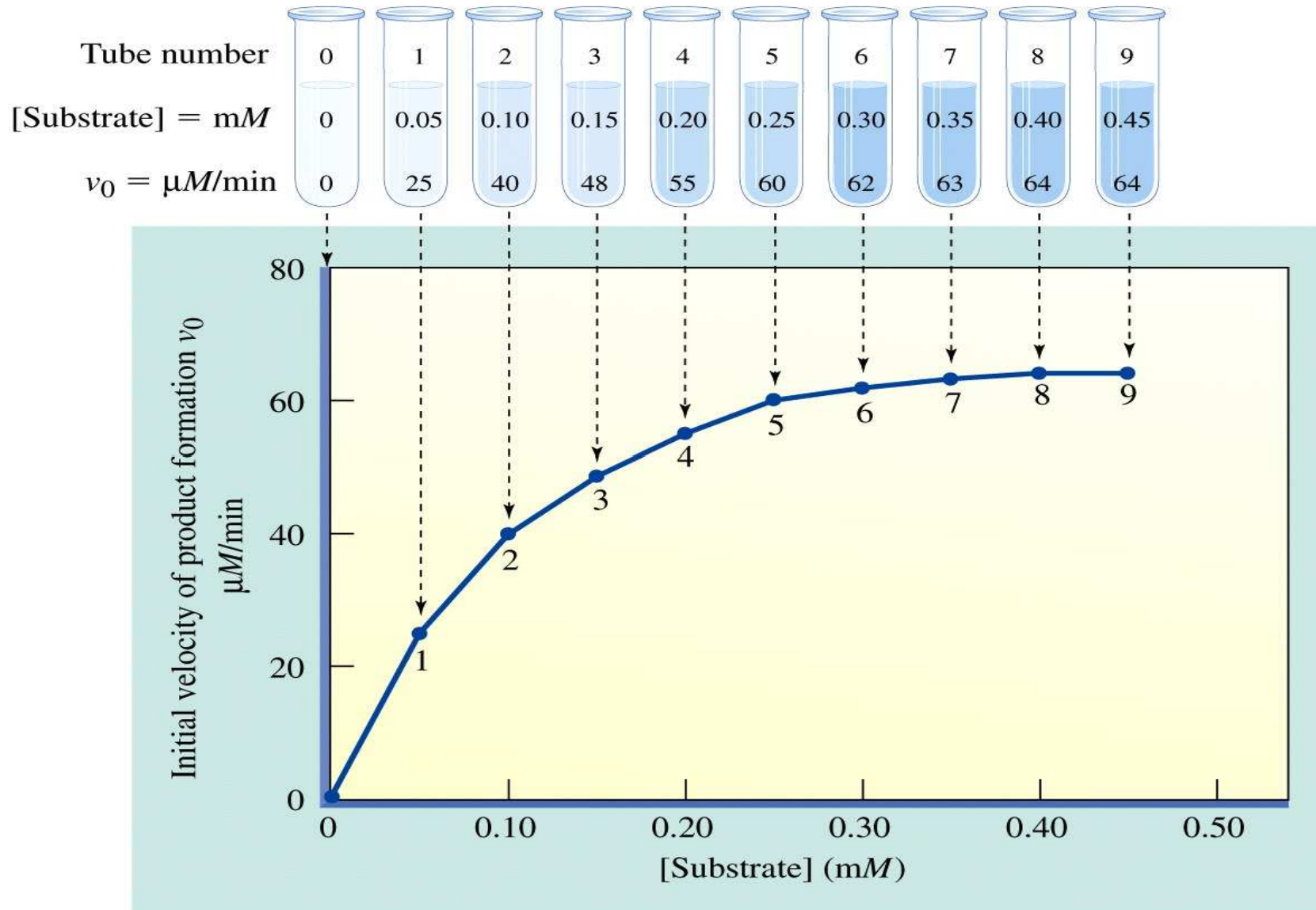


Figure 5-3 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Stanovení K_m :

LINEWEAVER BURKE

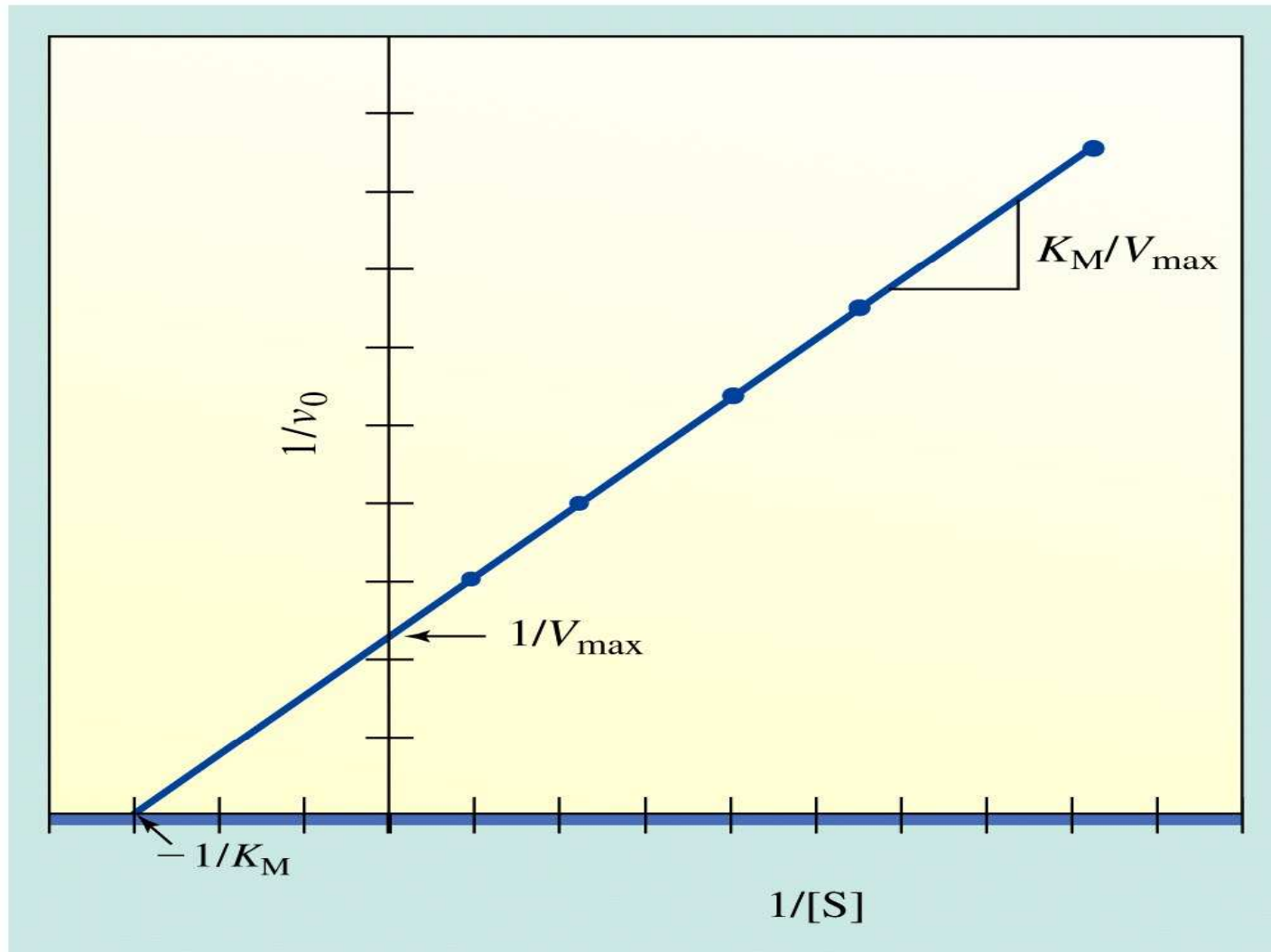


Table 5.3 **K_M values for some enzyme–substrate systems**

Enzyme	Substrate	K_M (mM)
Catalase	H ₂ O ₂	0.001
Hexokinase from brain	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	9
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	<i>N</i> -Benzoyltyrosinamide	2.5
β-Galactosidase	Lactose	4.0
Penicillinase	Benzylpenicillin	0.050
Pyruvate carboxylase	ATP	0.060
	Pyruvate	0.40
	HCO ₃ ⁻	1.0
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco)	Ribulose-1,5-bisphosphate	0.028
	CO ₂	0.009
Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase (rubisco)	Ribulose-1,5-bisphosphate	0.028
	O ₂	0.535

Table 5.4

Turnover numbers, k_3 , for some enzymes

Enzyme	Substrate	k_3 (sec ⁻¹)
Catalase	H ₂ O ₂	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	25,000
Penicillinase	Benzympenicillin	2,000
Lactate dehydrogenase	Lactate	1,000
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	100
DNA polymerase	DNA	15
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	Ribulose-1,5-bisphosphate + CO ₂	3.3
Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase	Ribulose-1,5-bisphosphate + O ₂	2.4

Table 5-4 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

K_m ??

- Taková koncentrace substrátu, že reakce pobeží polovinou V_{max}
[mol/dm³]
- Je mírou afinity substrátu k enzymu
- Nezávisí na koncentraci enzymu, závisí na prostředí T, I, pH, efektory atd.

Proč K_m ??

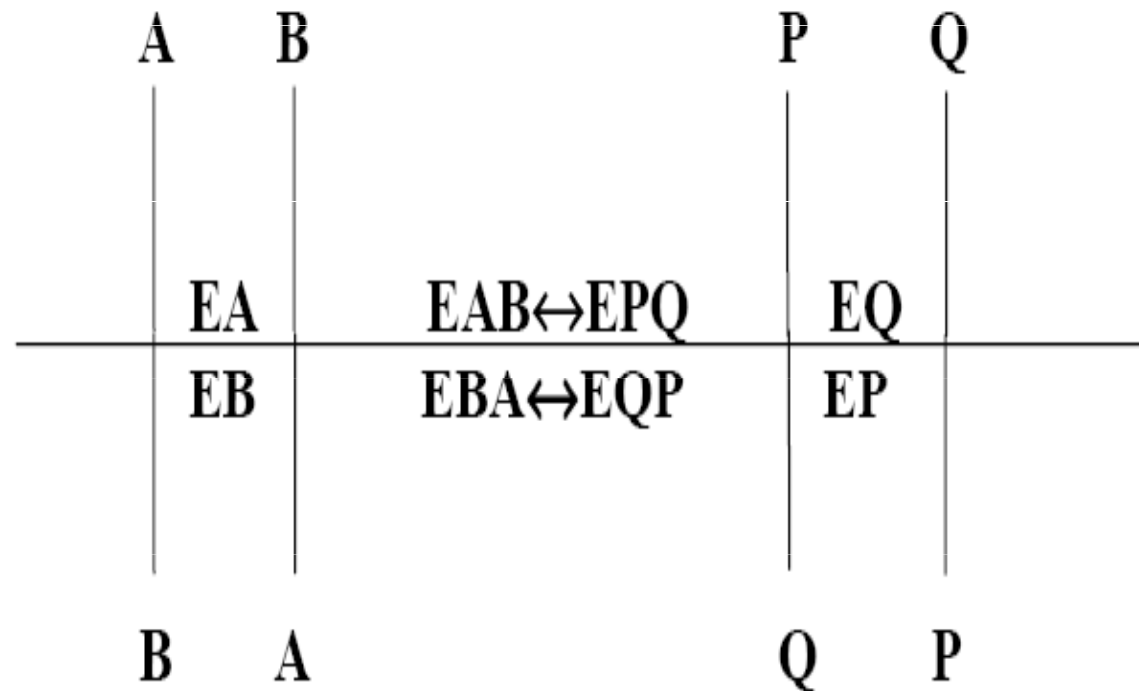
- Přibližná hodnota intracelulární koncentrace substrátu
- Substrát s nižší hodnotou K_m je pravděpodobně fyziologický
- Hodnotu lze ovlivňovat – možnost regulace
- Srovnání enzymů
- Stanovení enzymové aktivity

Reakce se dvěma substráty

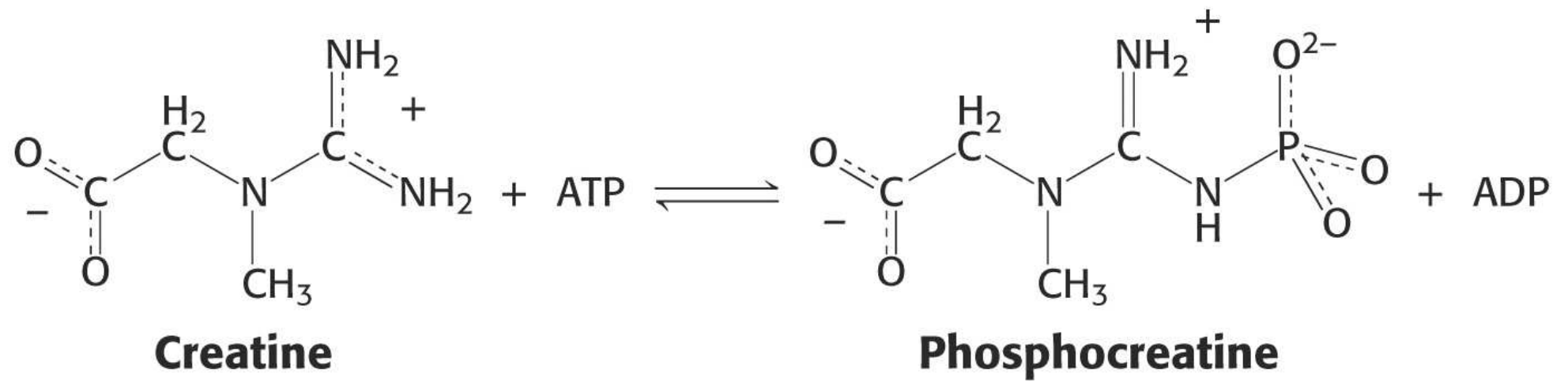
Mechanismy - CLELAND

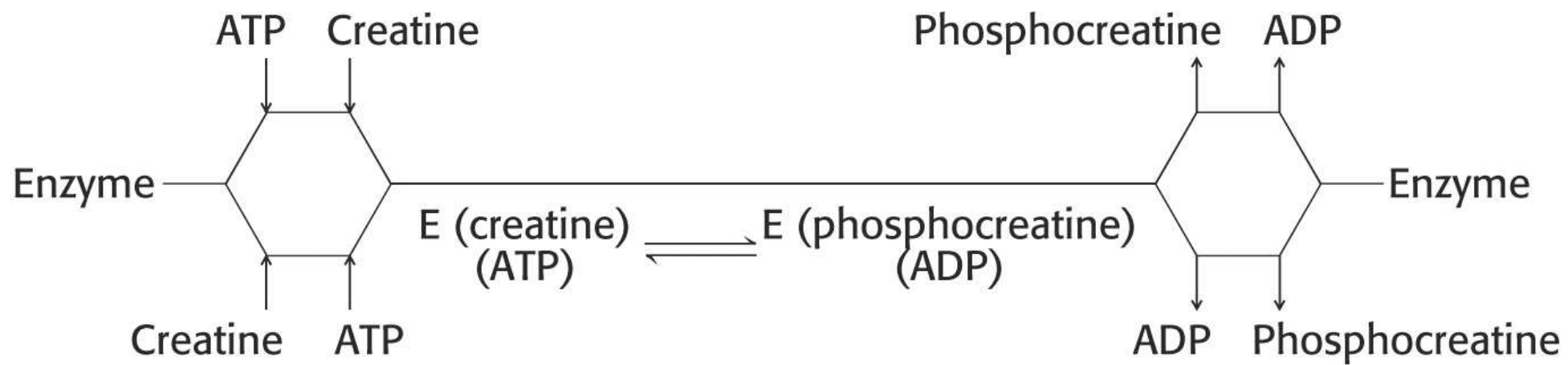
Sekvenční :

a) *náhodný*



fosforylasa
kreatinkinasa

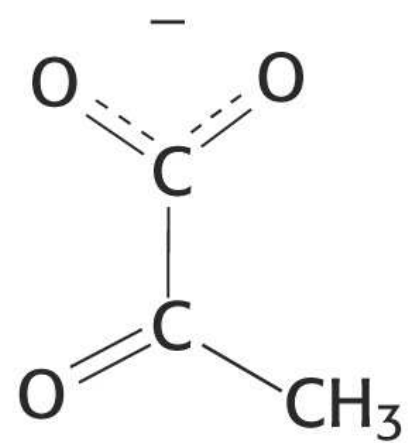




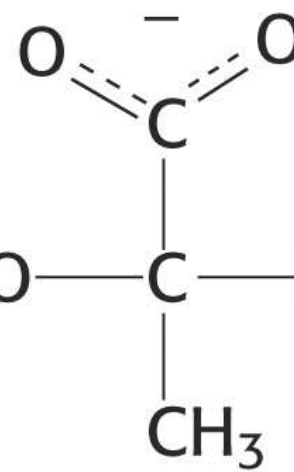
b) *uspořádaný*



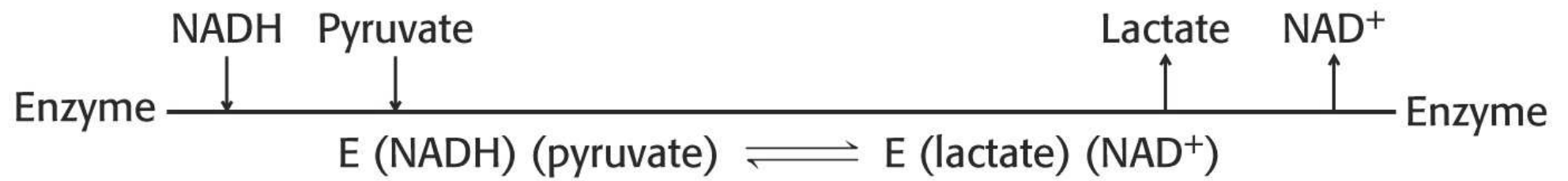
Laktátdehydrogenasa
A – NADH, B – Pyr)



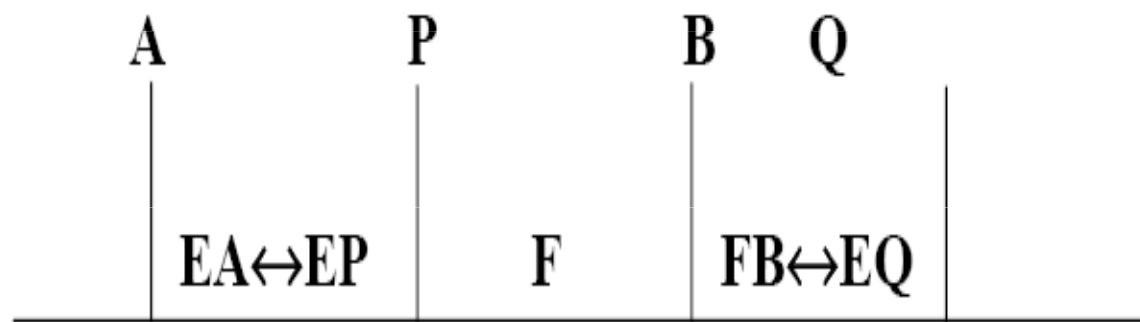
Pyruvate



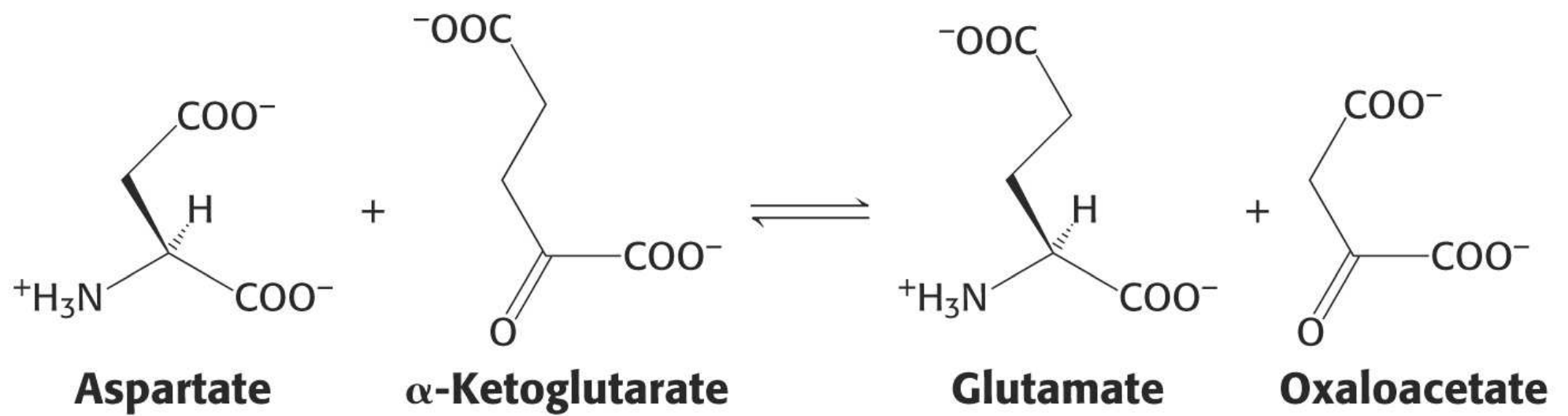
Lactate



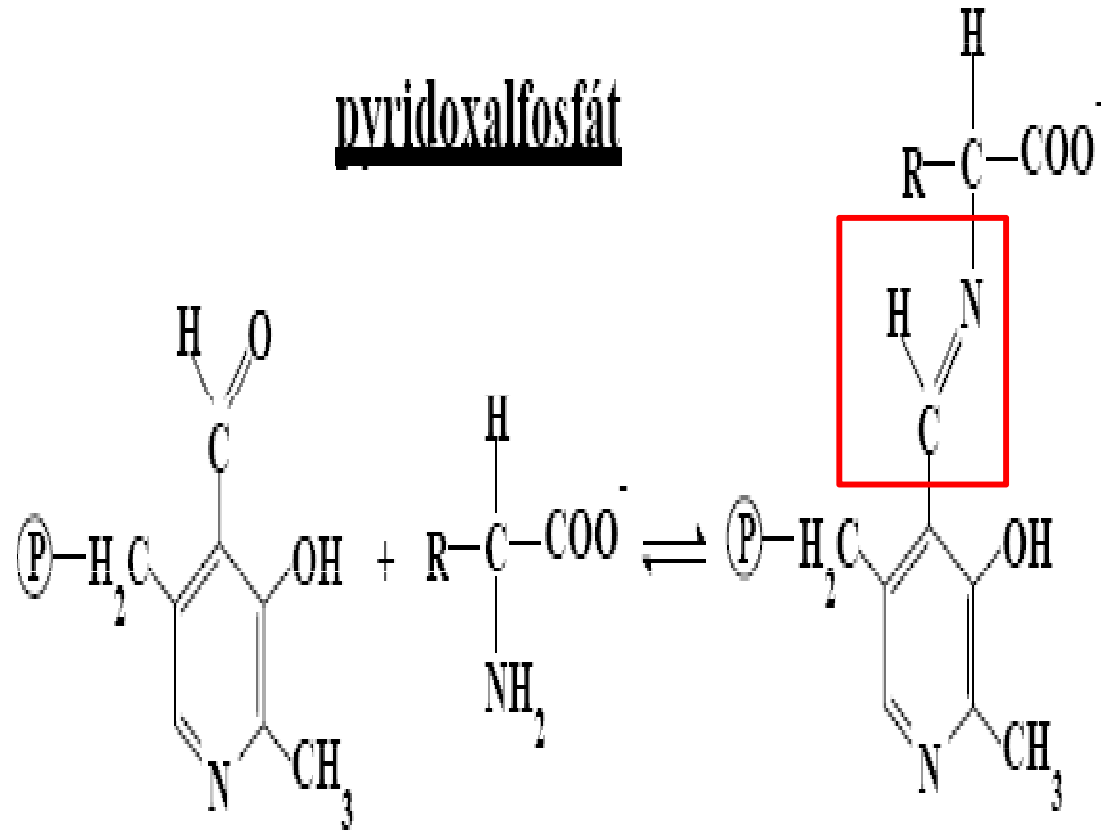
Pingpongový

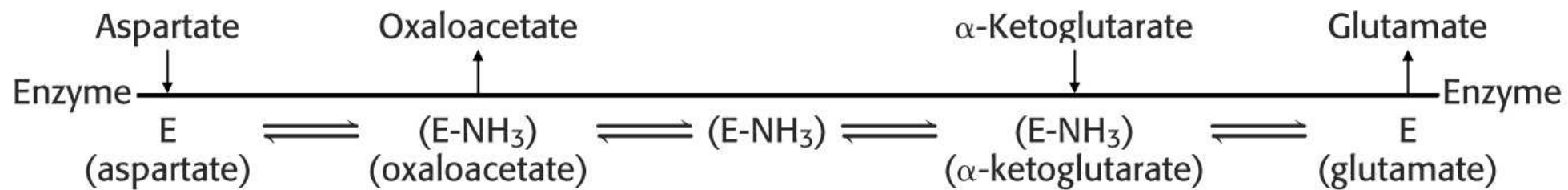


Transaminasy
A-AMK, B-OxoK



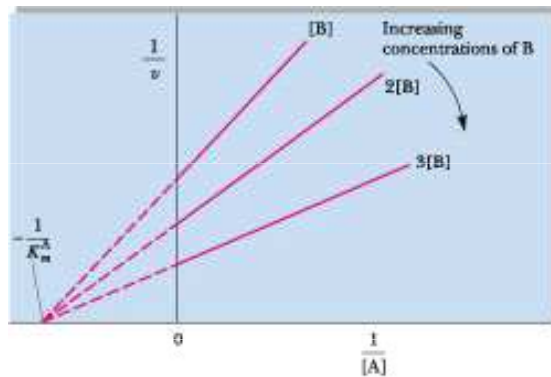
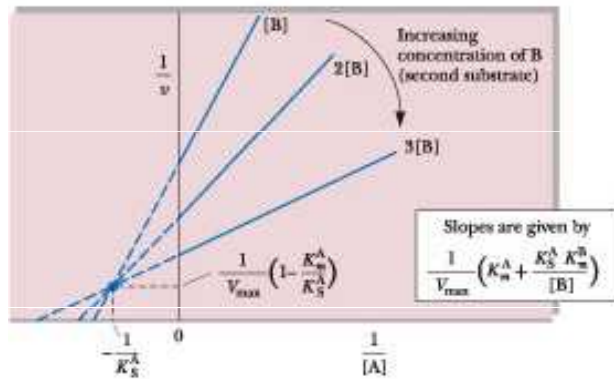
pyridoxalfosfát





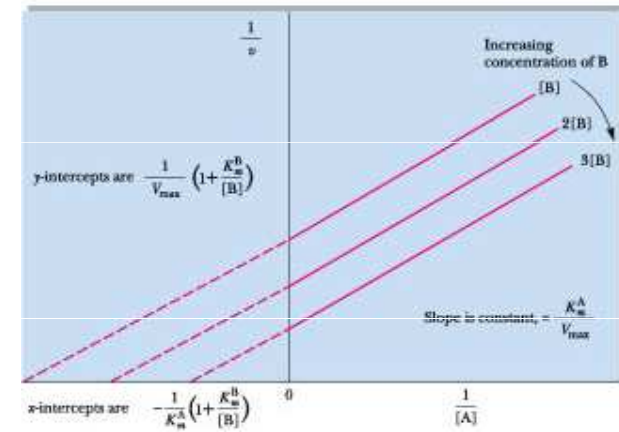
Sekvenční

Double-reciprocal form of the rate equation: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(K_m^A + \frac{K_m^A K_m^B}{[B]} \right) \left(\frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) \right)$



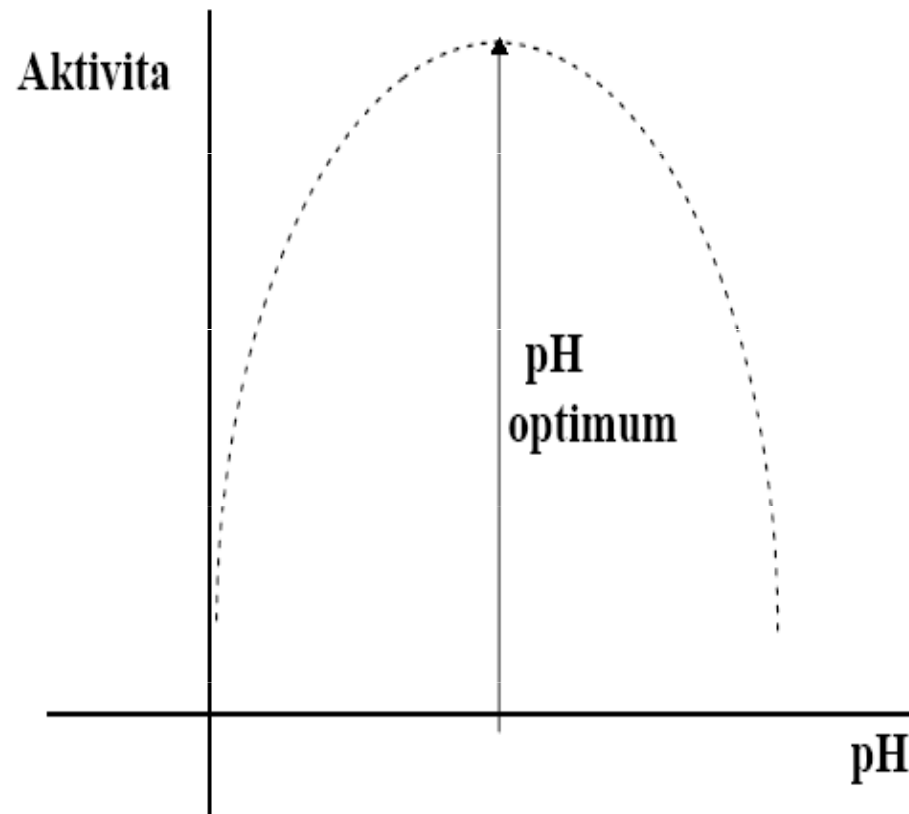
Ping-pongový

Double-reciprocal form of the rate equation: $\frac{1}{v} = \frac{K_m^A}{V_{max}} \left(\frac{1}{[A]} \right) + \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) \left(\frac{1}{V_{max}} \right)$

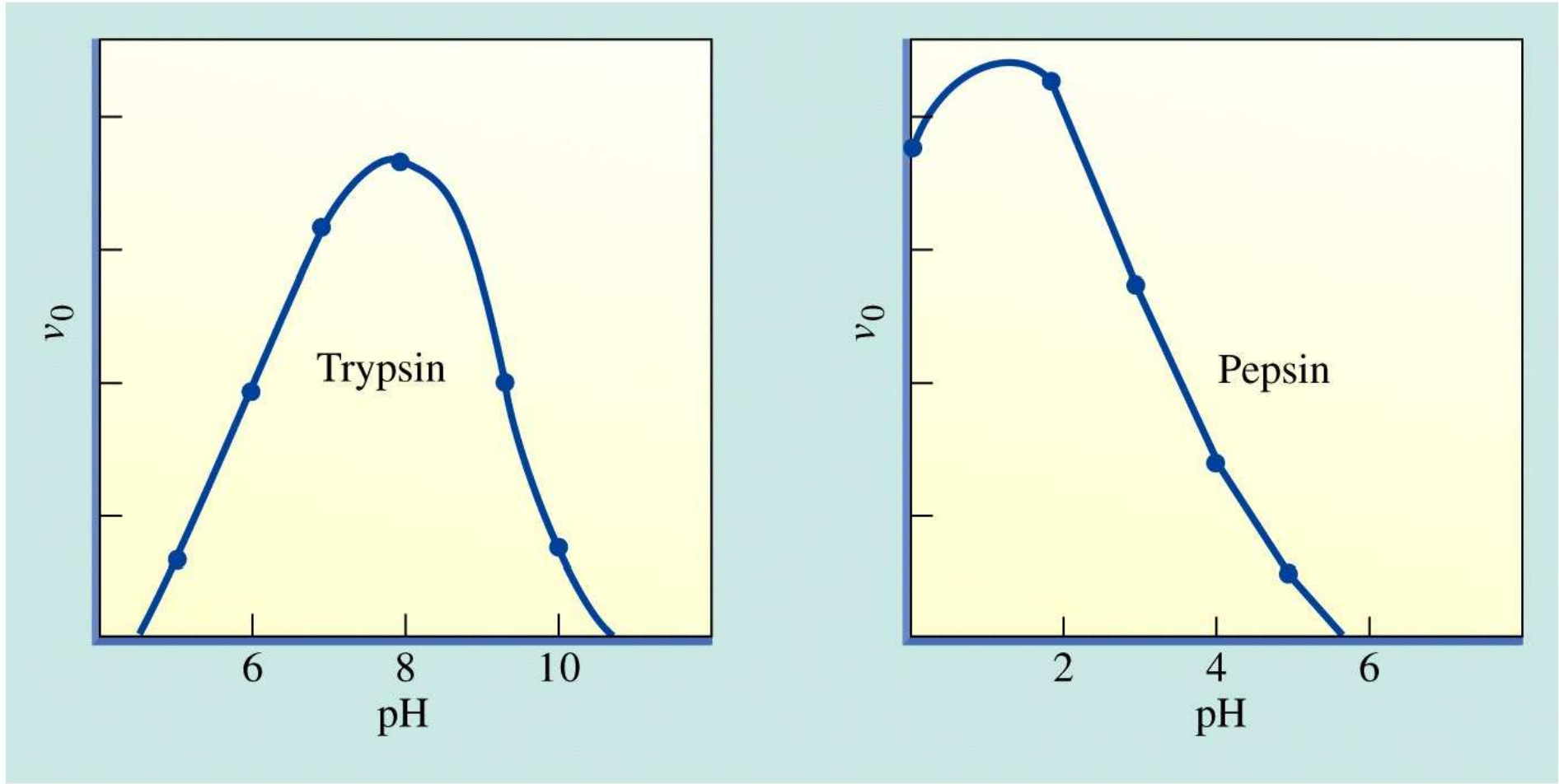


Fyzikálně chemické faktory
ovlivňující rychlost enzymové reakce

Vliv pH



pH stabilita!!!

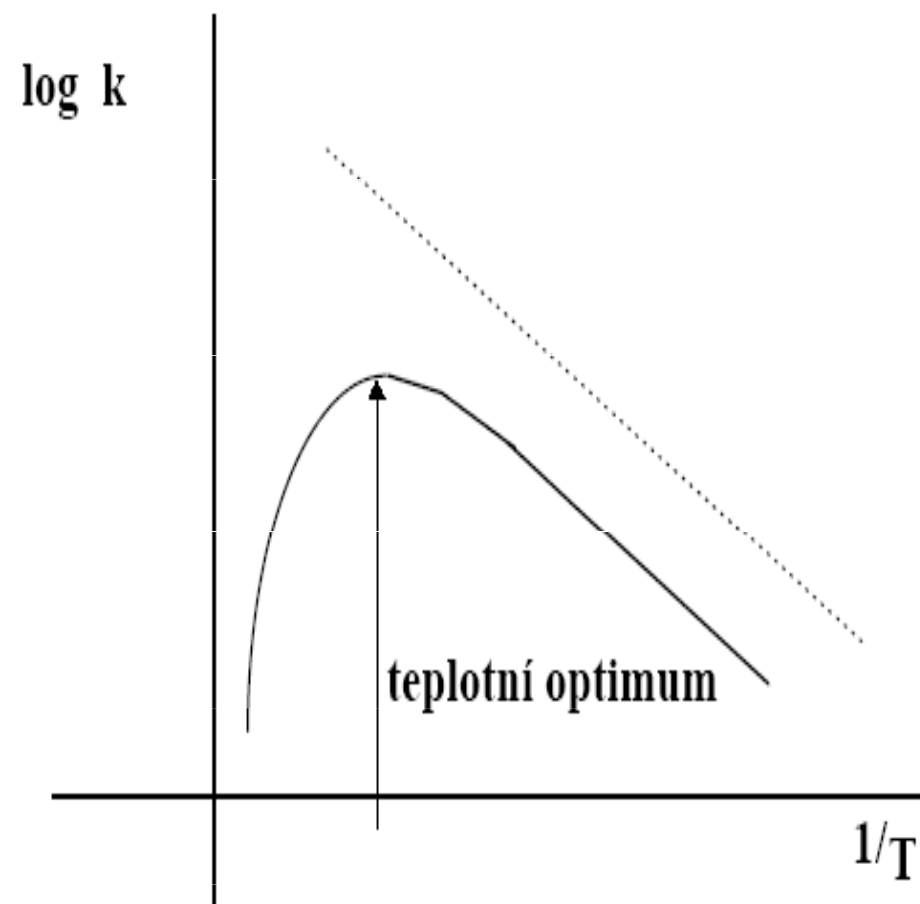


(a)

(b)

Figure 5-6 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Vliv teploty



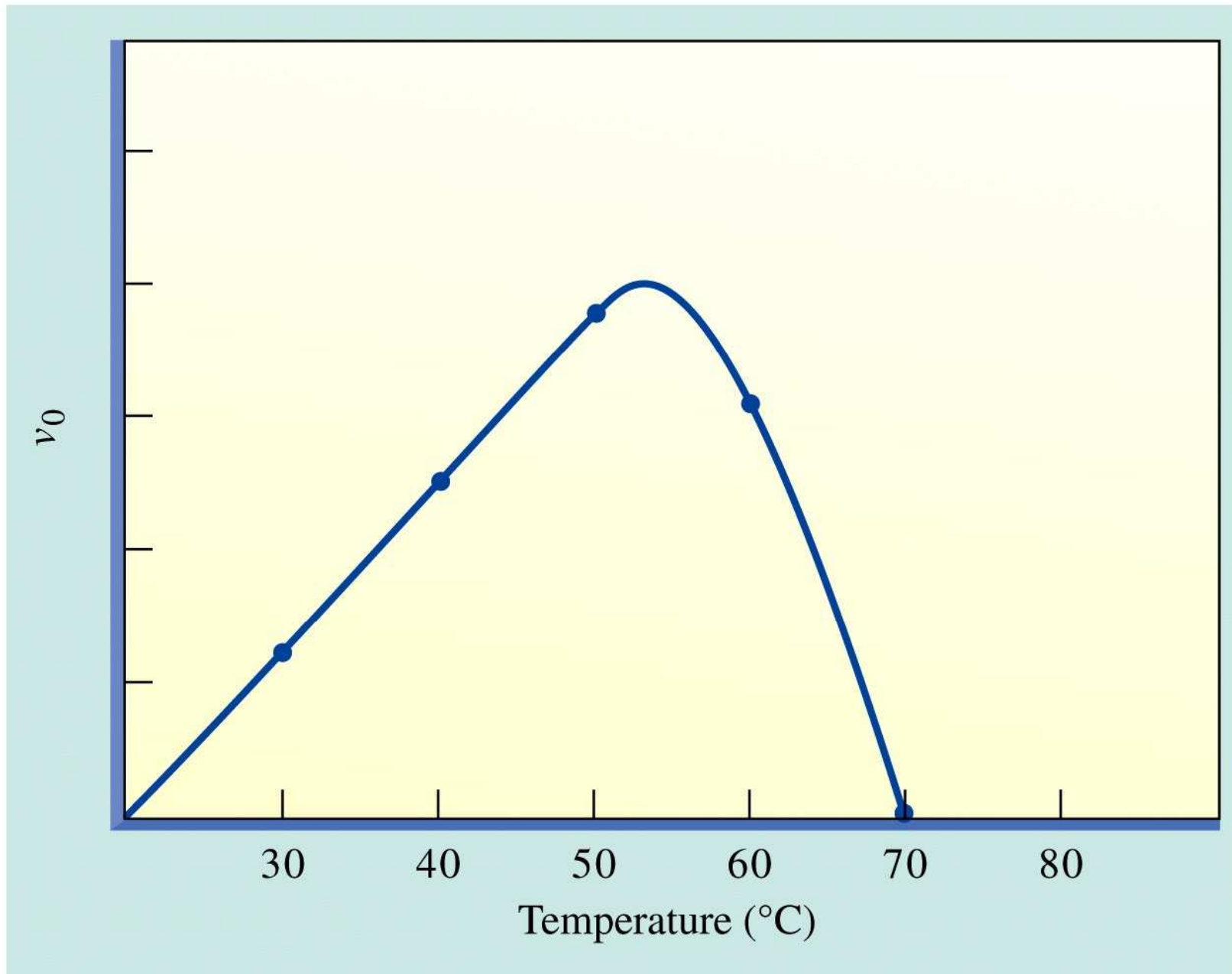
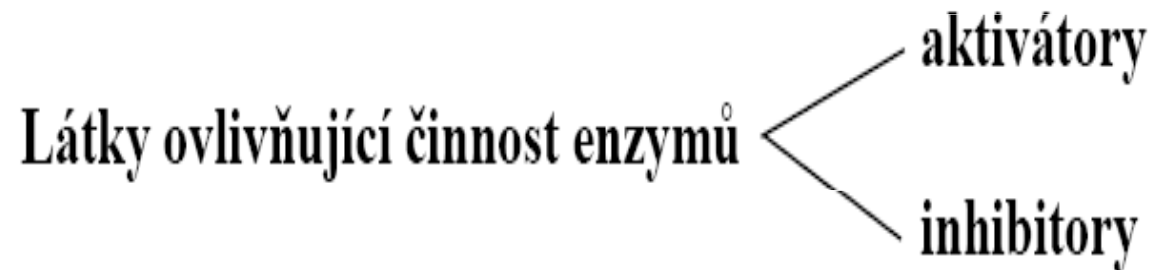


Figure 5-7 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Látky ovlivňující činnost enzymů



Aktivátory - zvyšují rychlost enzymové reakce

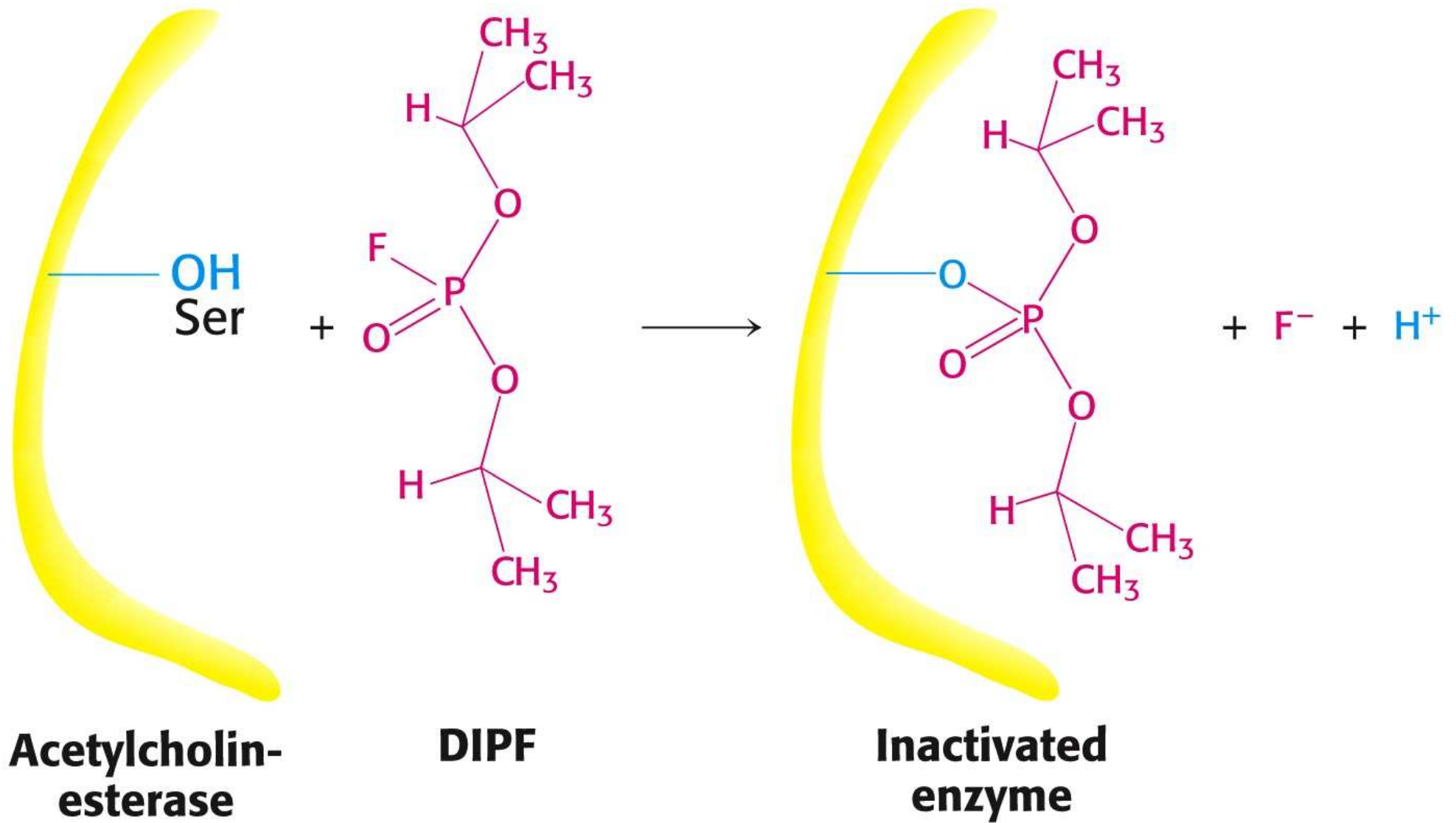
Inhibitory - snižují rychlost enzymové reakce

Inhibice

- Ireverzibilní inhibice

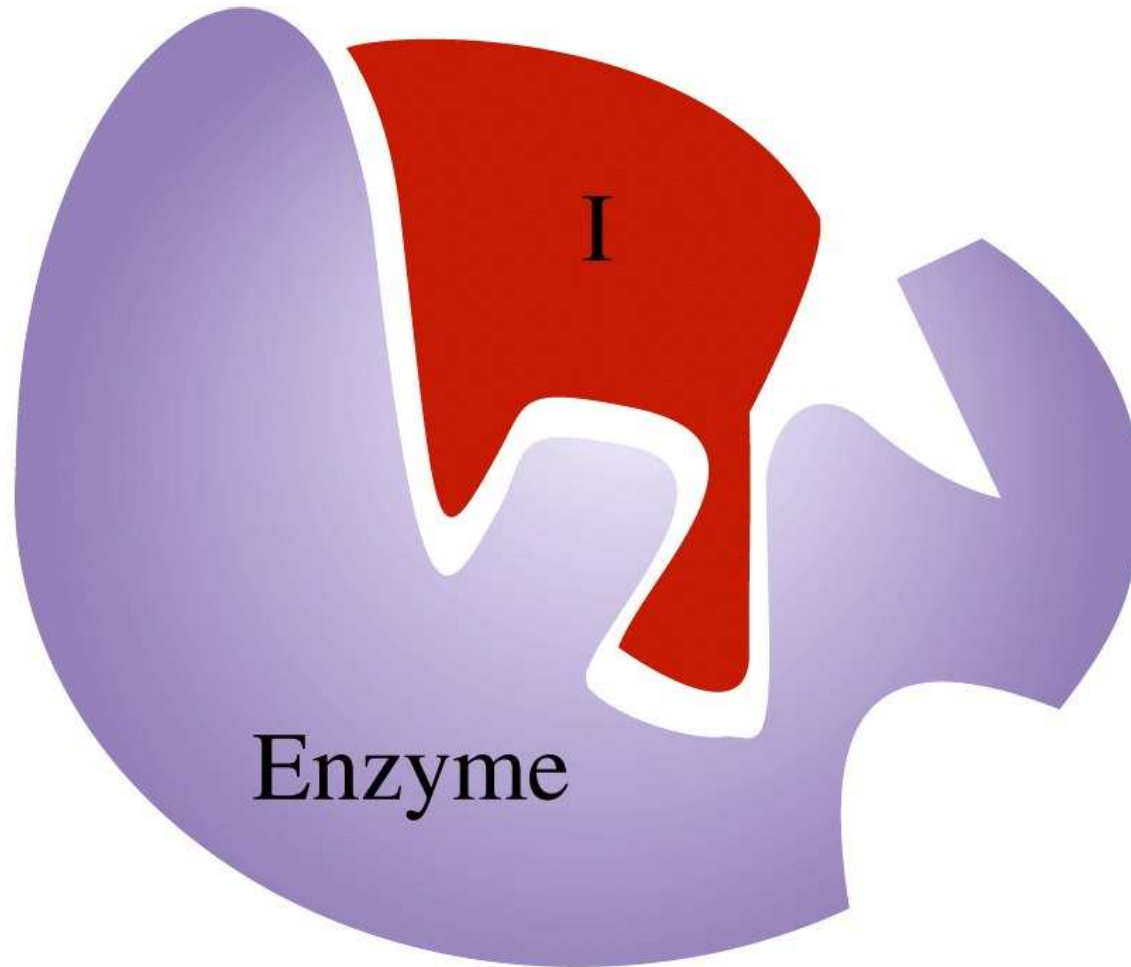


Inaktivace Ser diisopropylfosfofluoridem (**DIPF**)



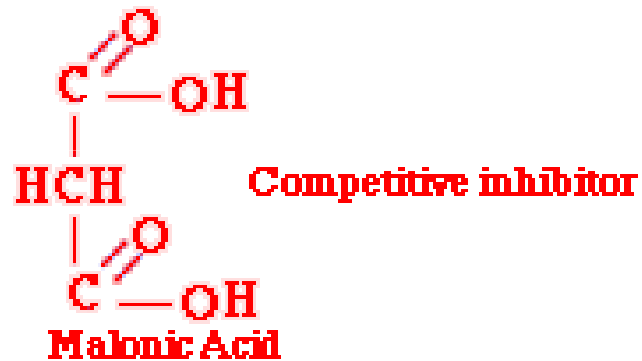
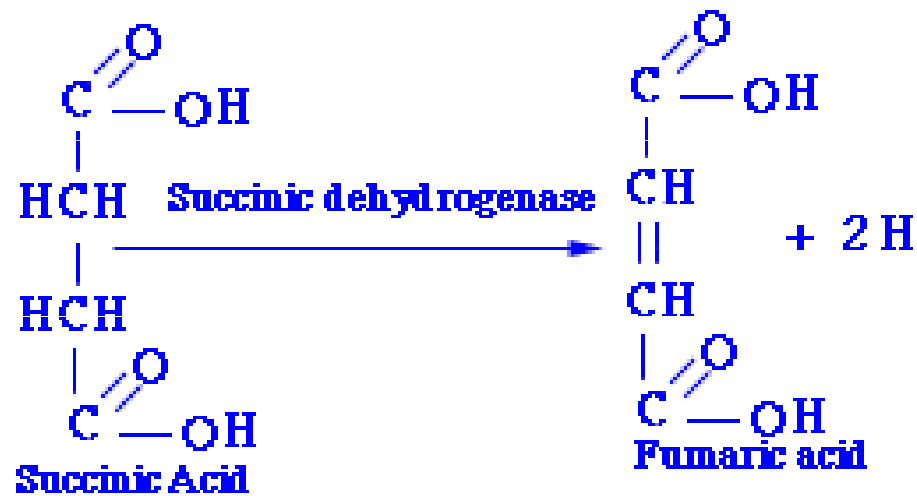
- Reverzibilní inhibice

Kompetitivní inhibice



Competitive
(inhibitor binds
in active site)

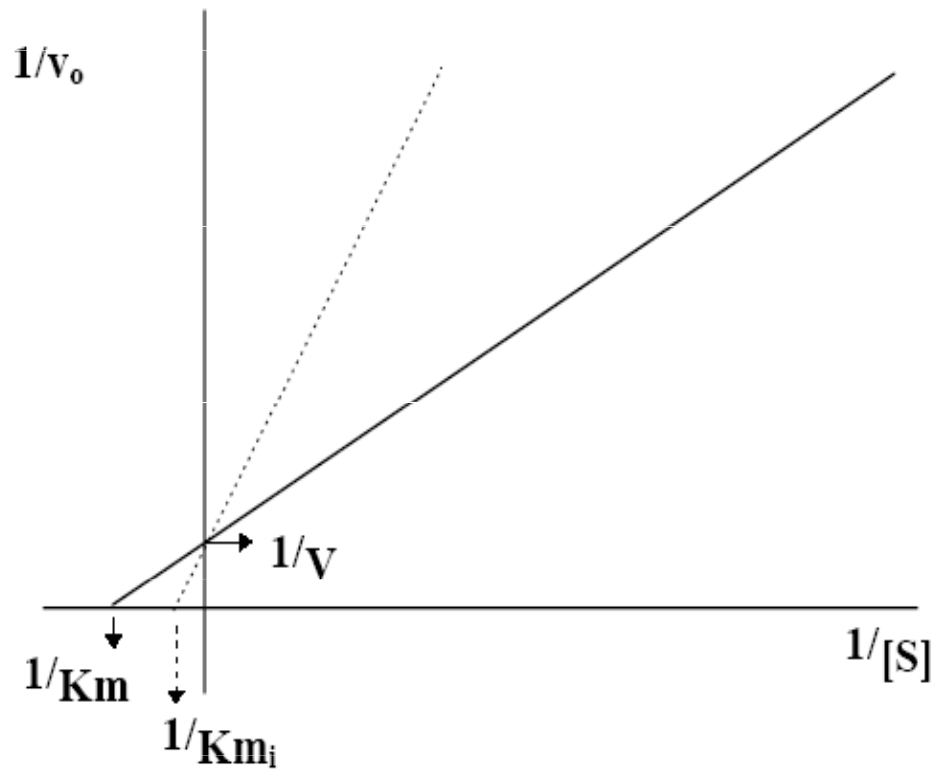
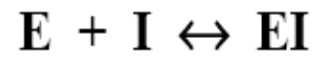
Inhibice SDH malonátem



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

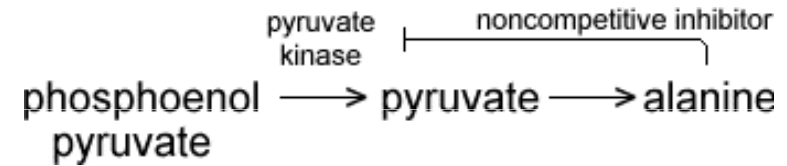
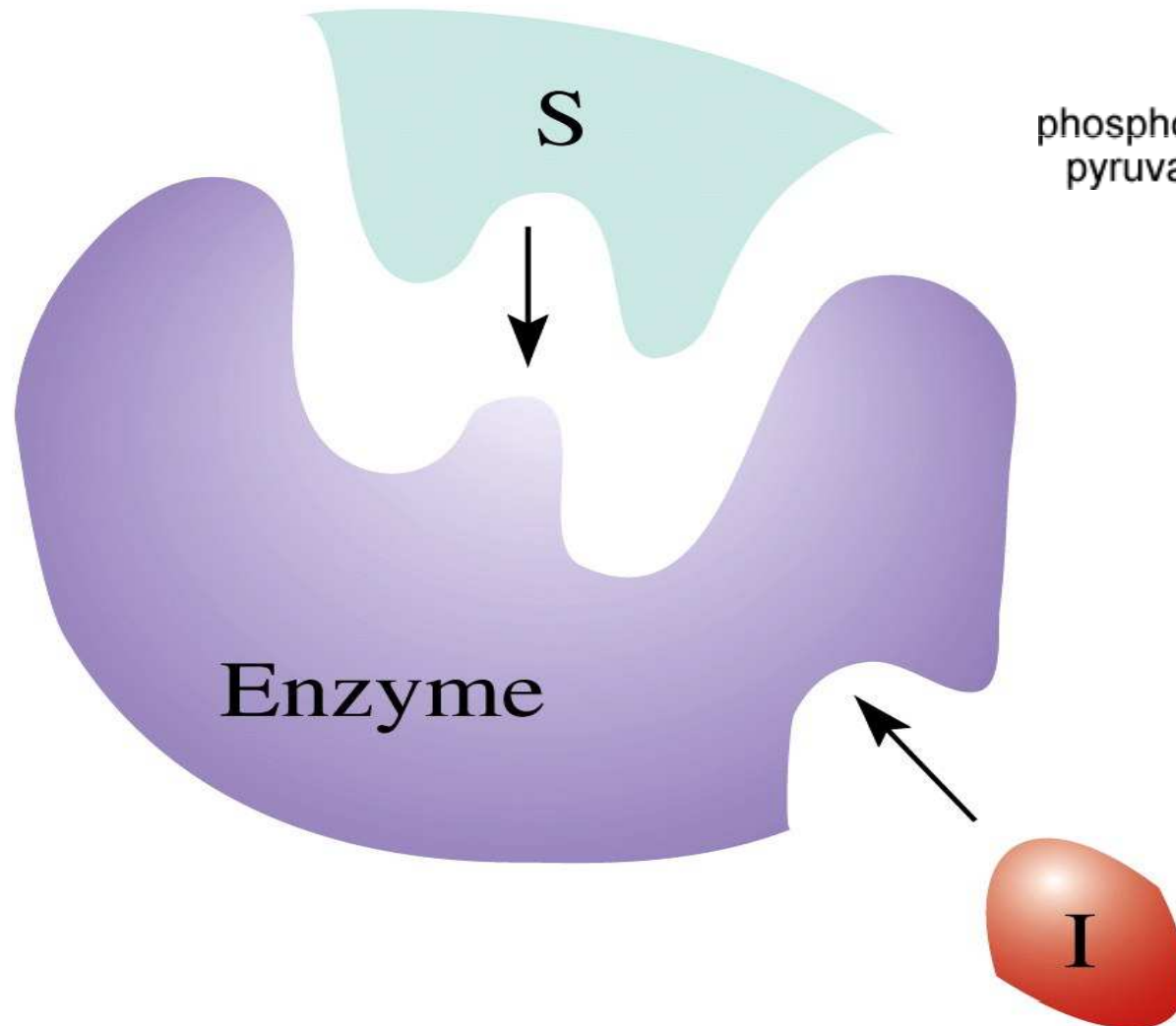
- Reverzibilní inhibice

Kompetitivní inhibice



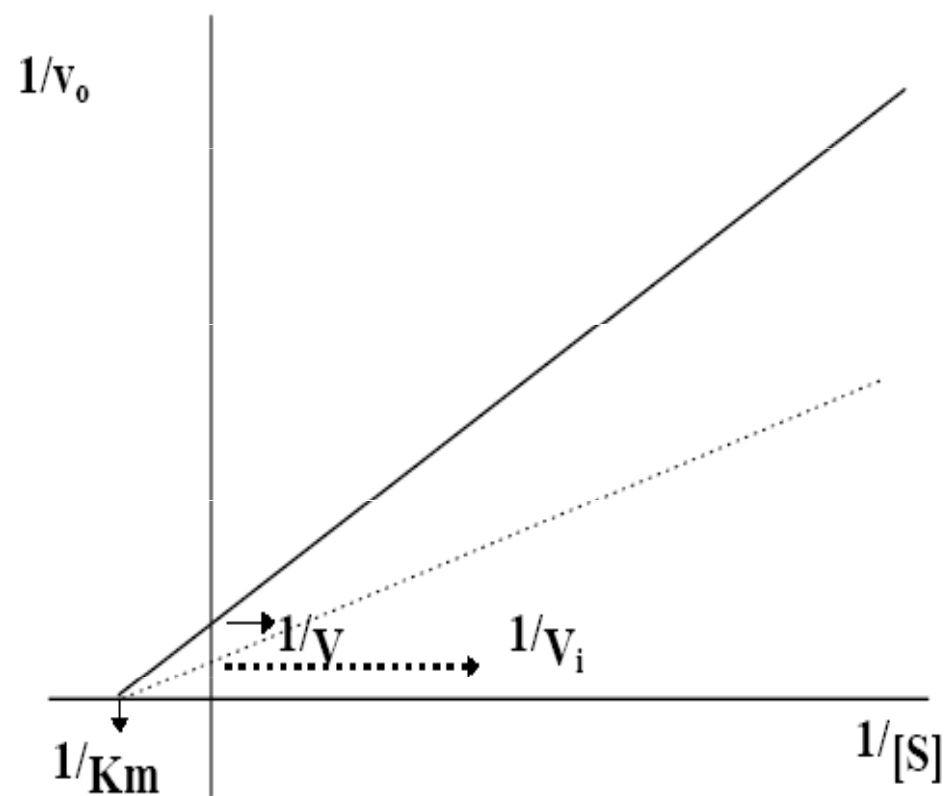
$$K_{m_i} > K_m \quad V_i = V$$

Nekompetitivní inhibice



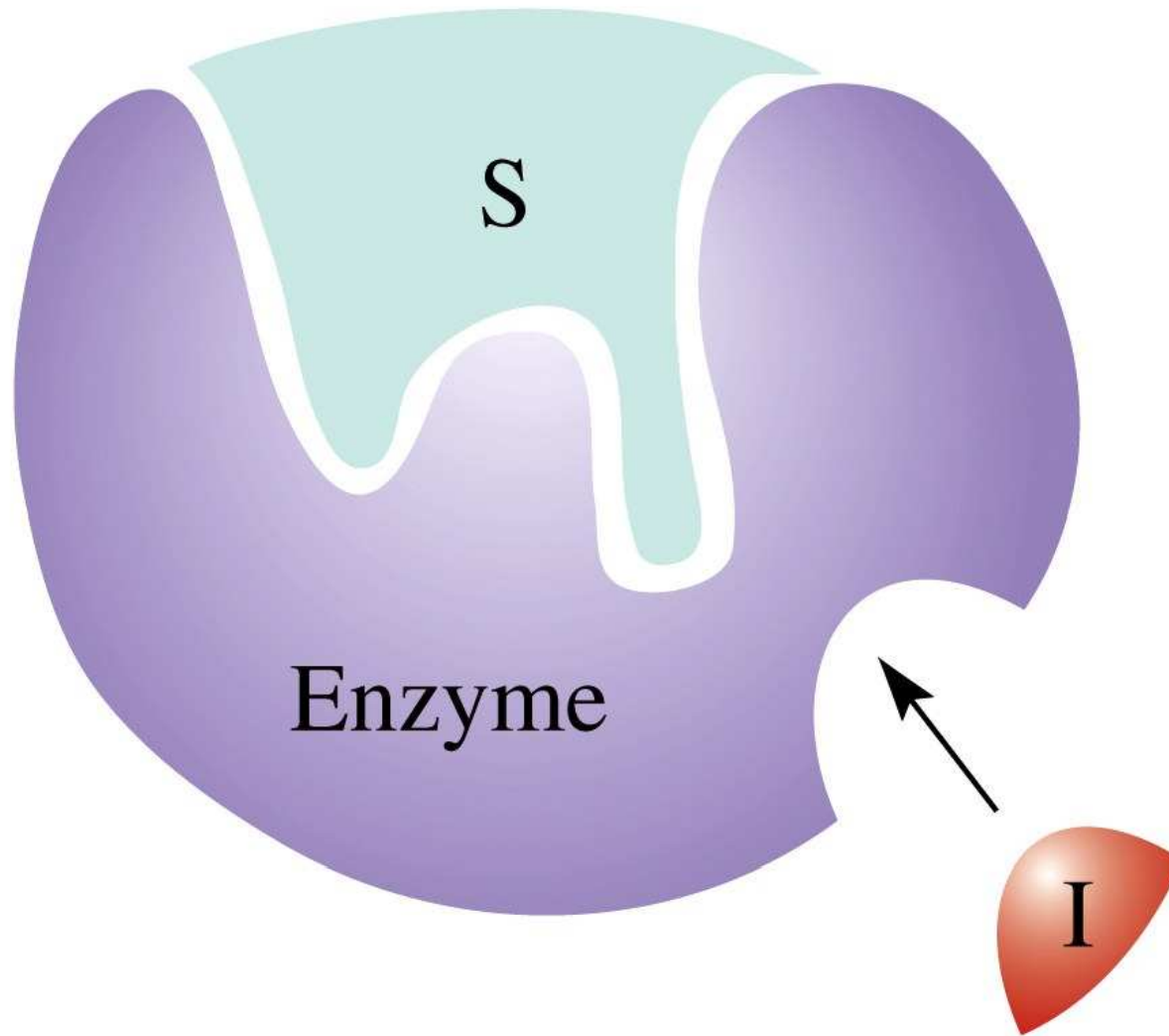
Noncompetitive
(inhibitor binds
at another site)

Nekompetitivní inhibice



$$K_{m_i} = K_m \quad V_i < V$$

Akompetitivní inhibice



Uncompetitive
(inhibitor binds
after S binding)

Akompetitivní inhibice

GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE

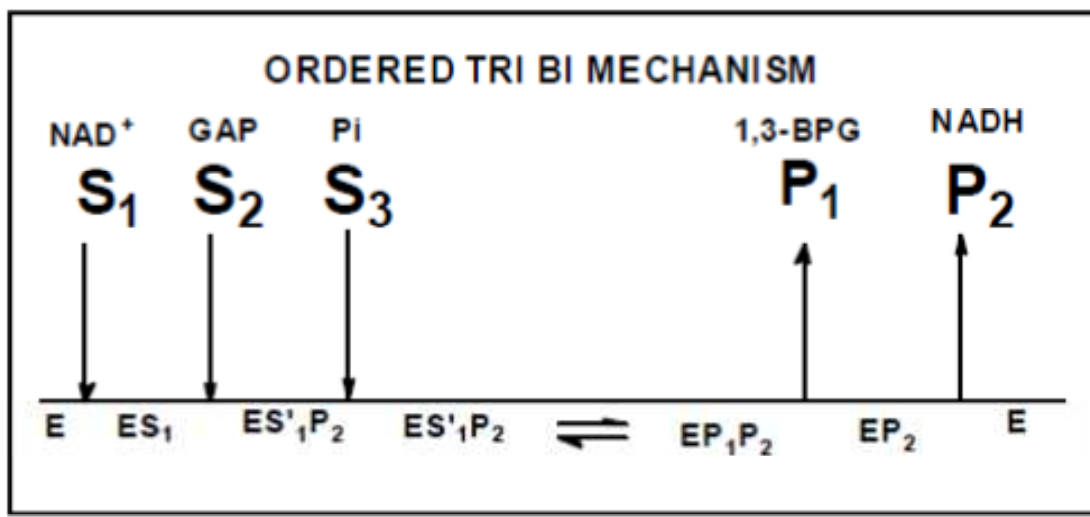
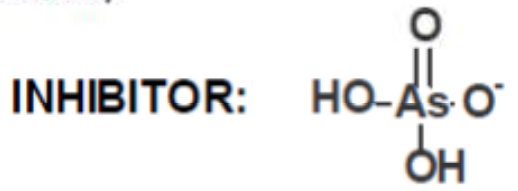
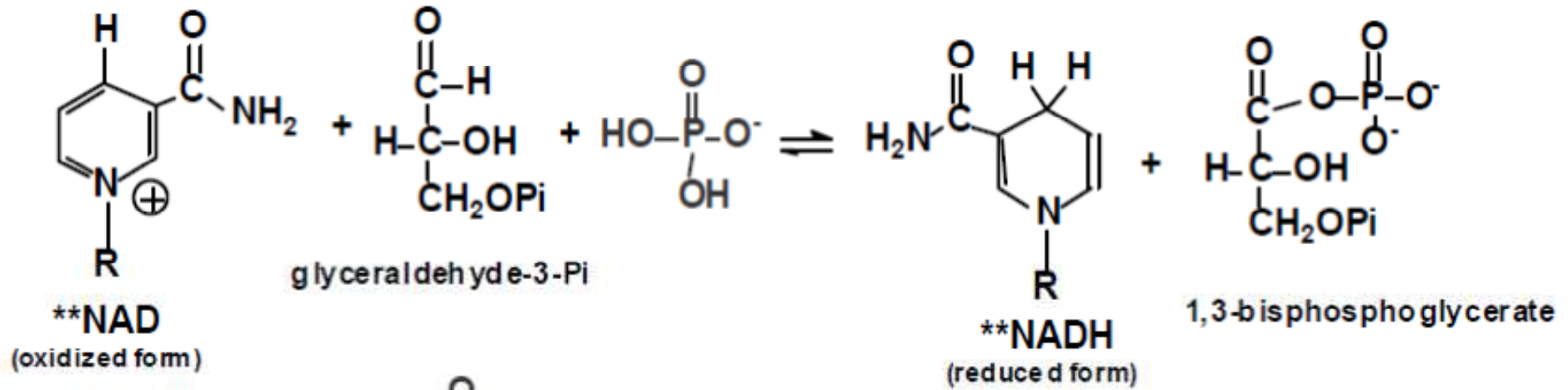


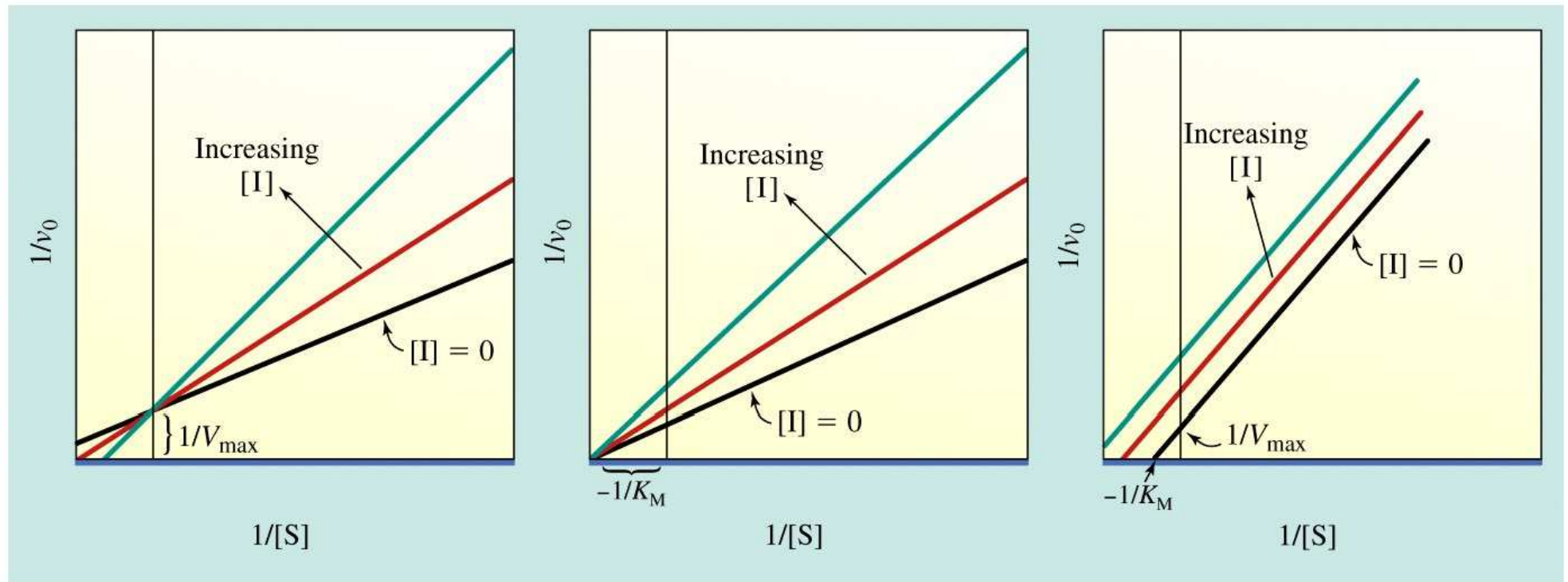
Table 5.5**Kinetic characteristics of reversible inhibition**

Type of Inhibition	<i>Effect of Inhibition^a</i>		
	K_M	V_{\max}	K_M/V_{\max} (slope)
Competitive	Higher	Same	Increase
Uncompetitive	Lower	Lower	Same
Noncompetitive			
Pure	Same	Lower	Increase
Mixed	Higher	Lower	Increase

^a Compared to uninhibited reaction.

Table 5-5 Concepts in Biochemistry, 3/e

© 2006 John Wiley & Sons



(a) Competitive inhibition

(b) Noncompetitive inhibition

(c) Uncompetitive inhibition

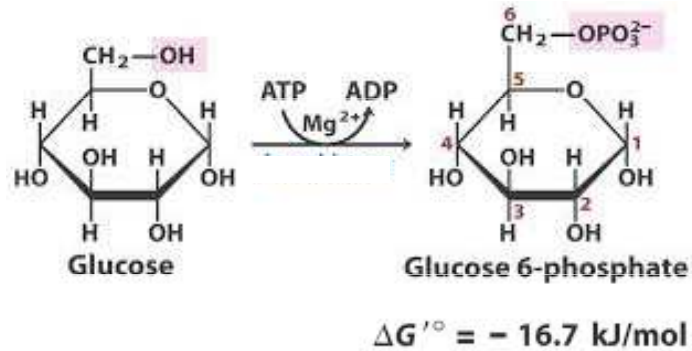
Regulace činnosti enzymu

- **Regulace kinetikou**
- **Regulace koncentrace enzymu**
- **Allosterická regulace MONOD 1963**
- **Regulace zpětnou vazbou**
- **Regulace kovalentní modifikací**
- **Kompartimentace**

Regulace kinetikou enzymu

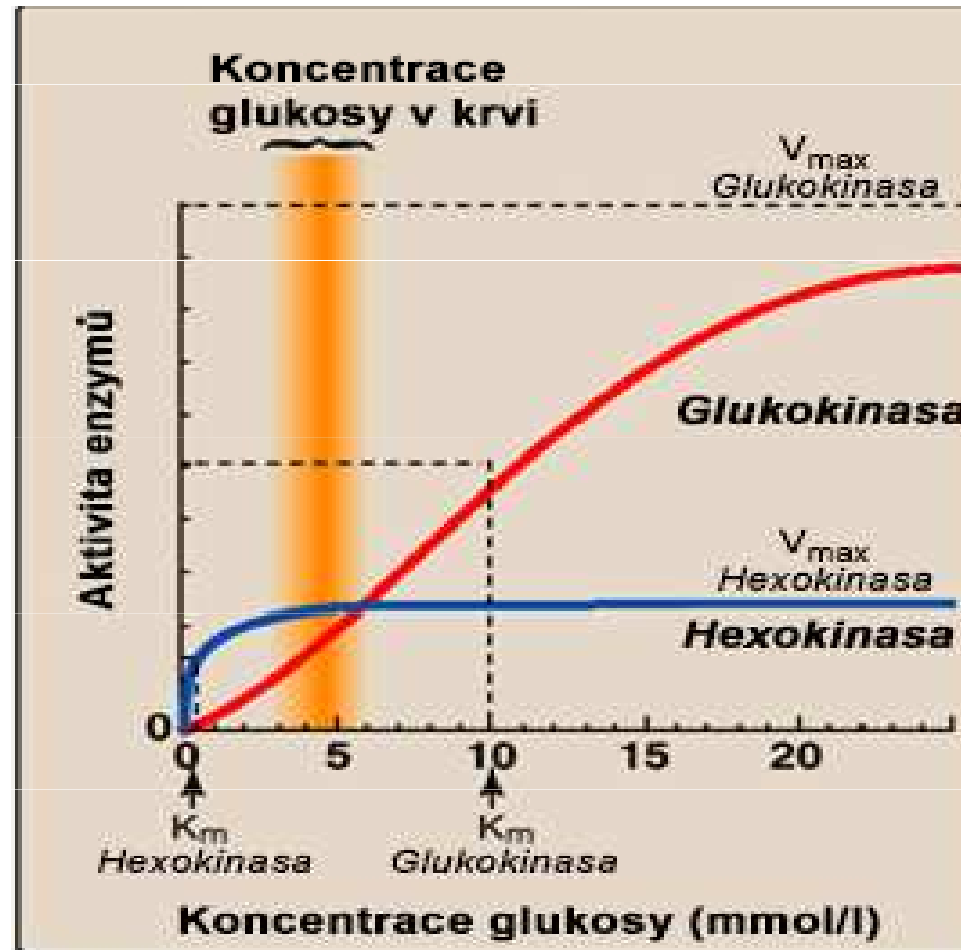
ostatní
hexokinasa

$K_m = 0,1 \text{ mM}$



játra
glukokinasa

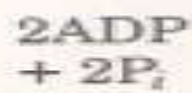
$K_m = 10 \text{ mM}$



GLYKOLÝZA



glukosa



fruktosa-1,6-bisfosfát



2 pyruvát

anaerobní mléčné kvašení

aerobní oxidace

anaerobní alkoholové kvašení

CITRÁTOVÝ CYKLUS

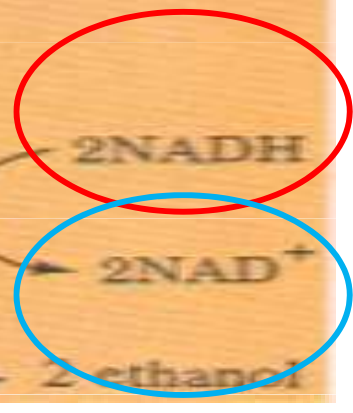
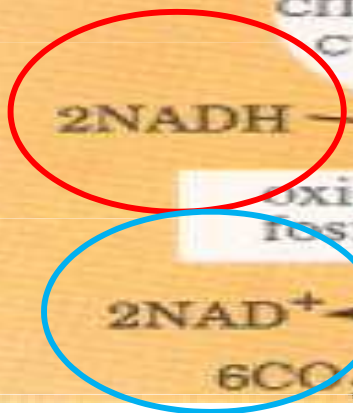
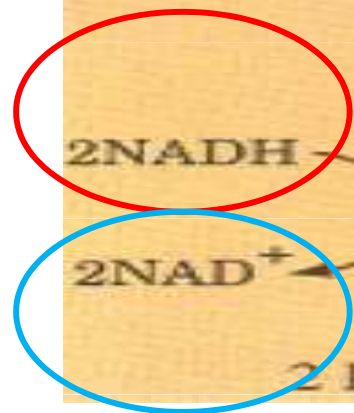


2 laktát

$6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$

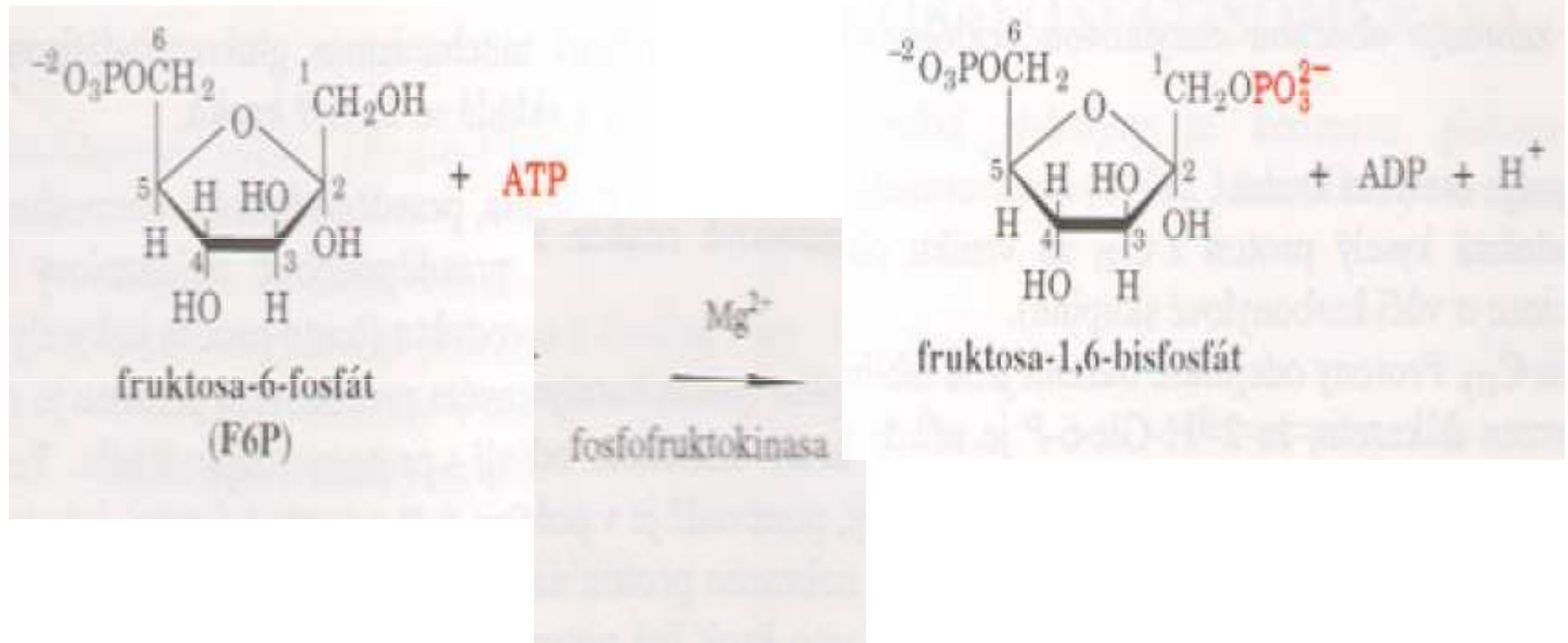
$2\text{CO}_2 + 2\text{ethanol}$

oxidační fosforylace



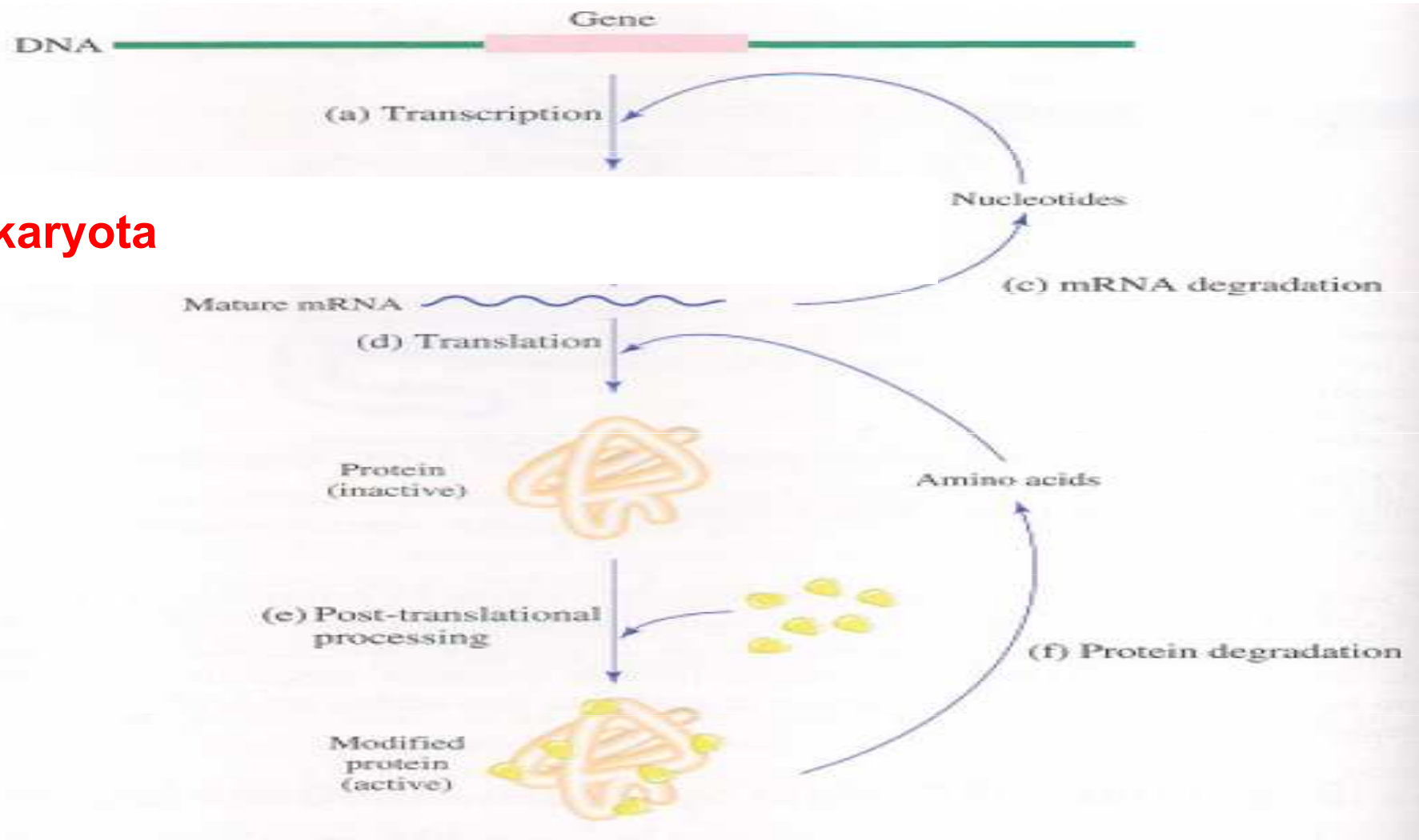
Fosfofruktokinasa

regulace snížením pH

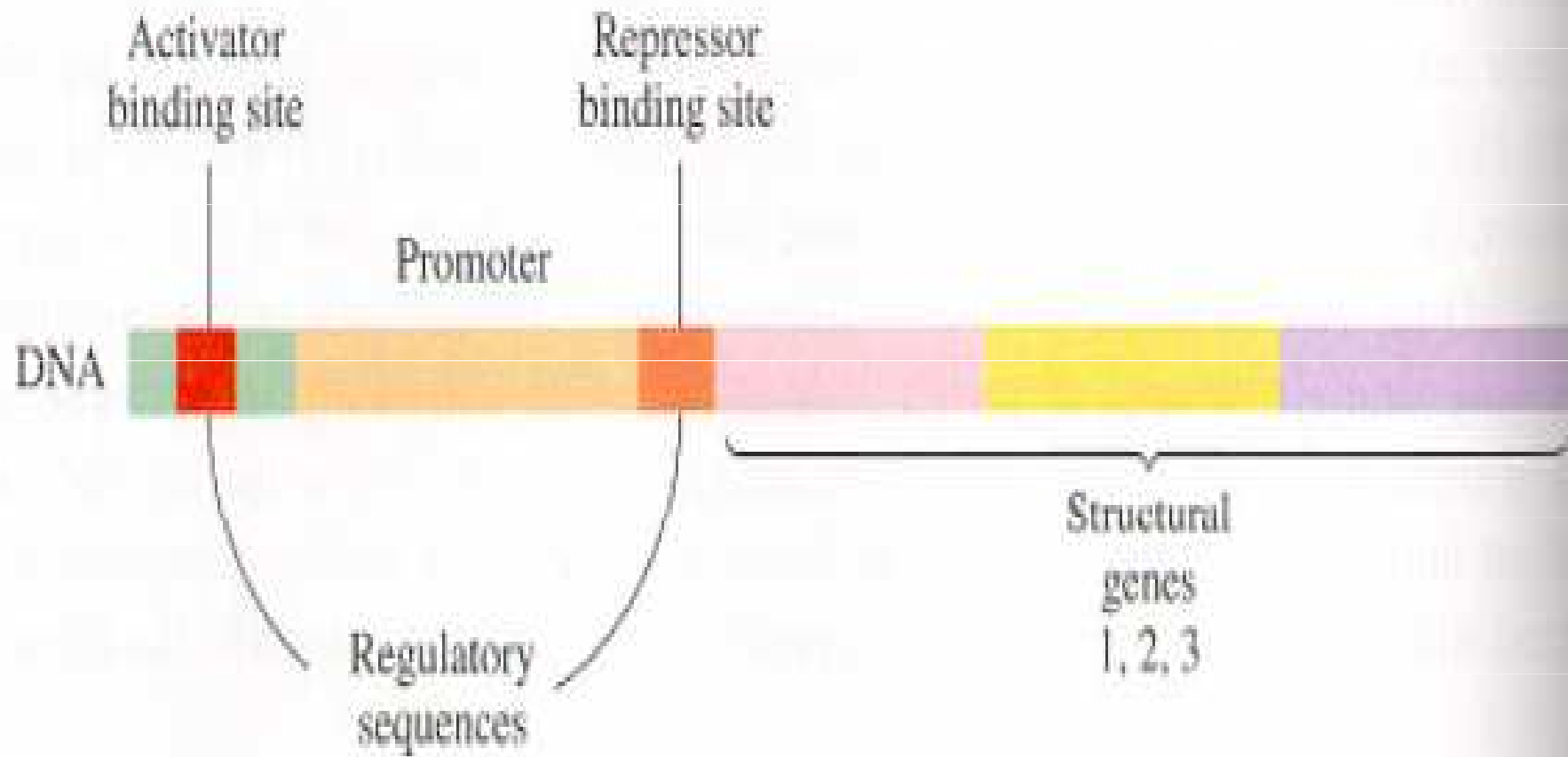


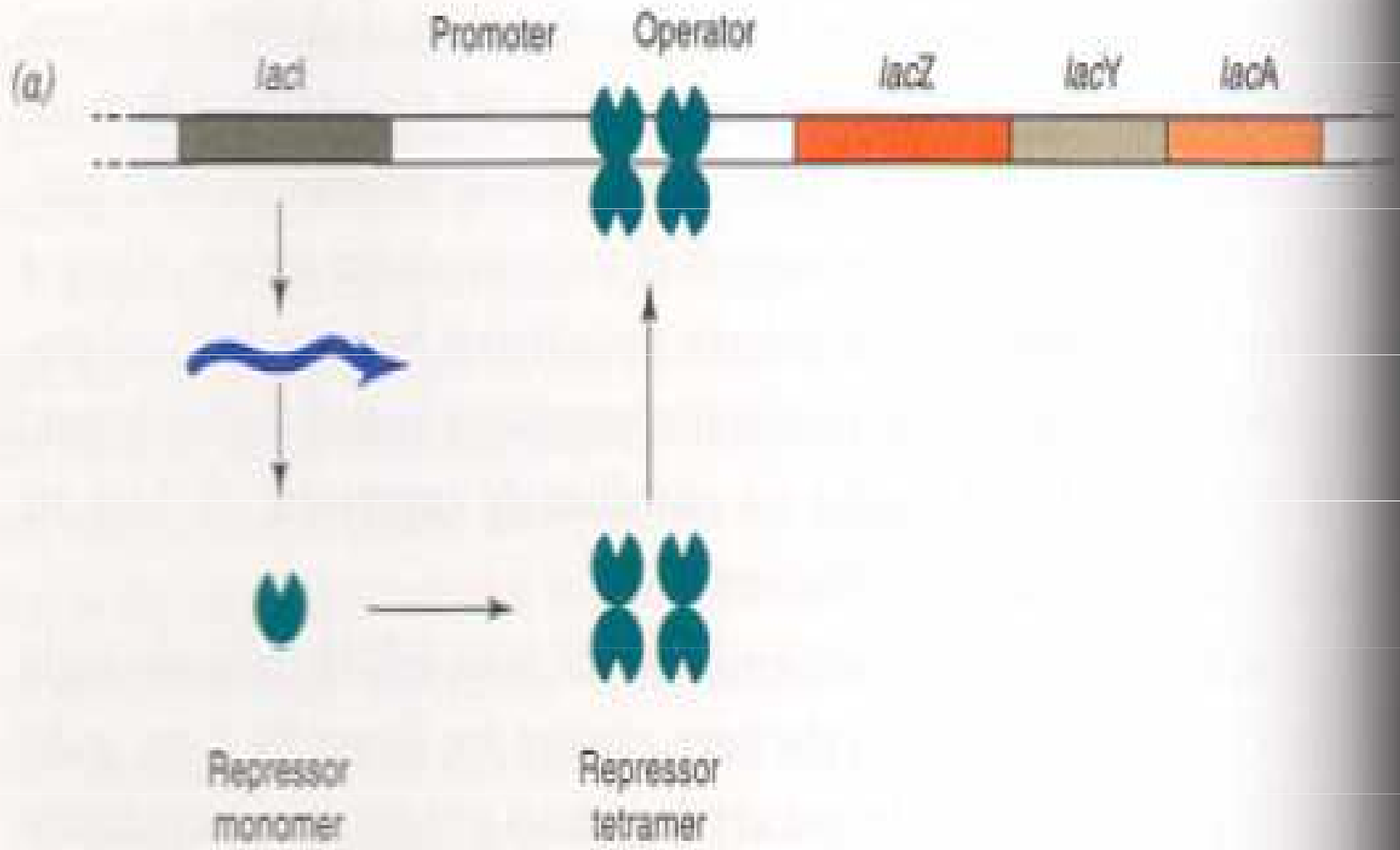
Regulace koncentrací enzymu

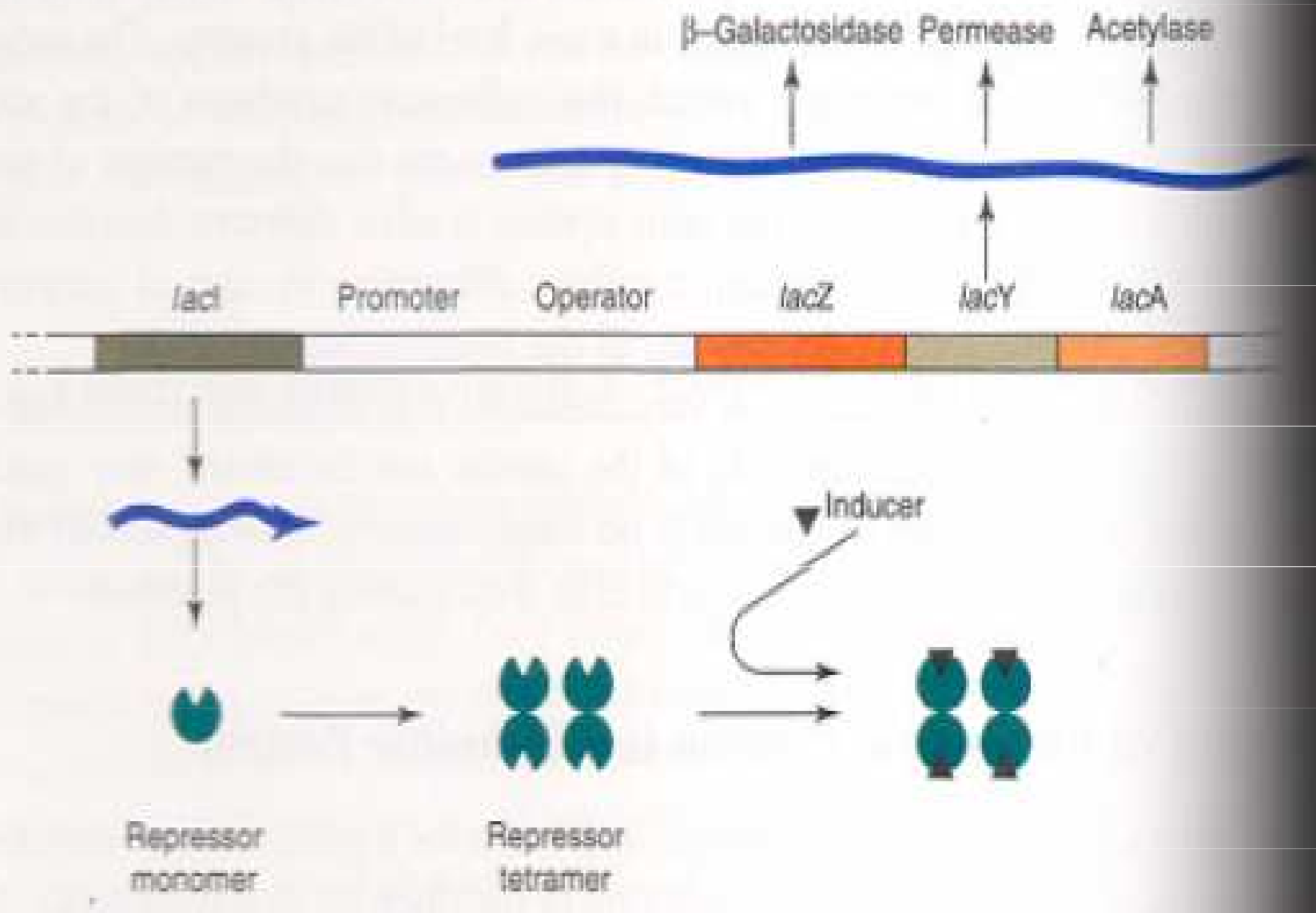
Prokaryota



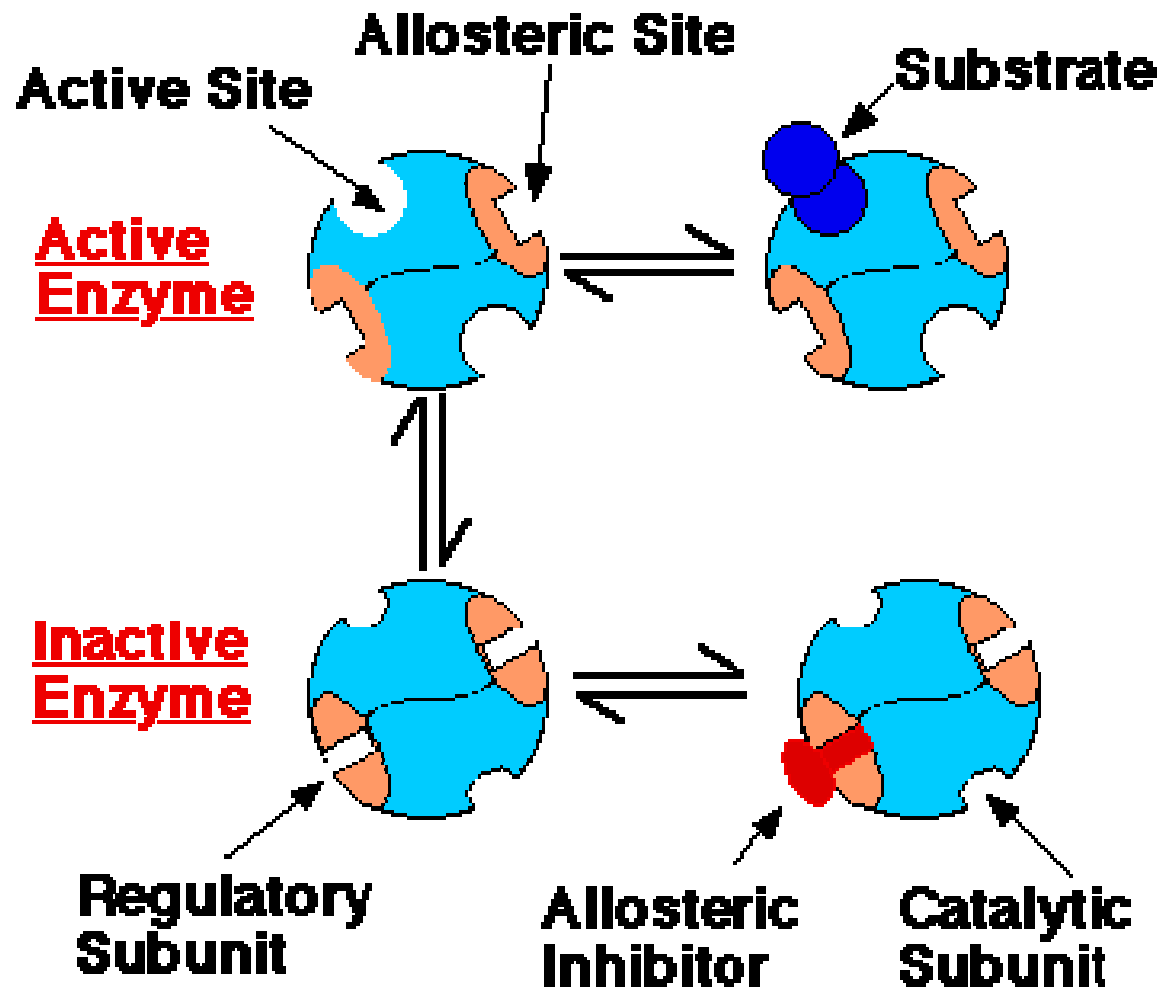
Operonový model



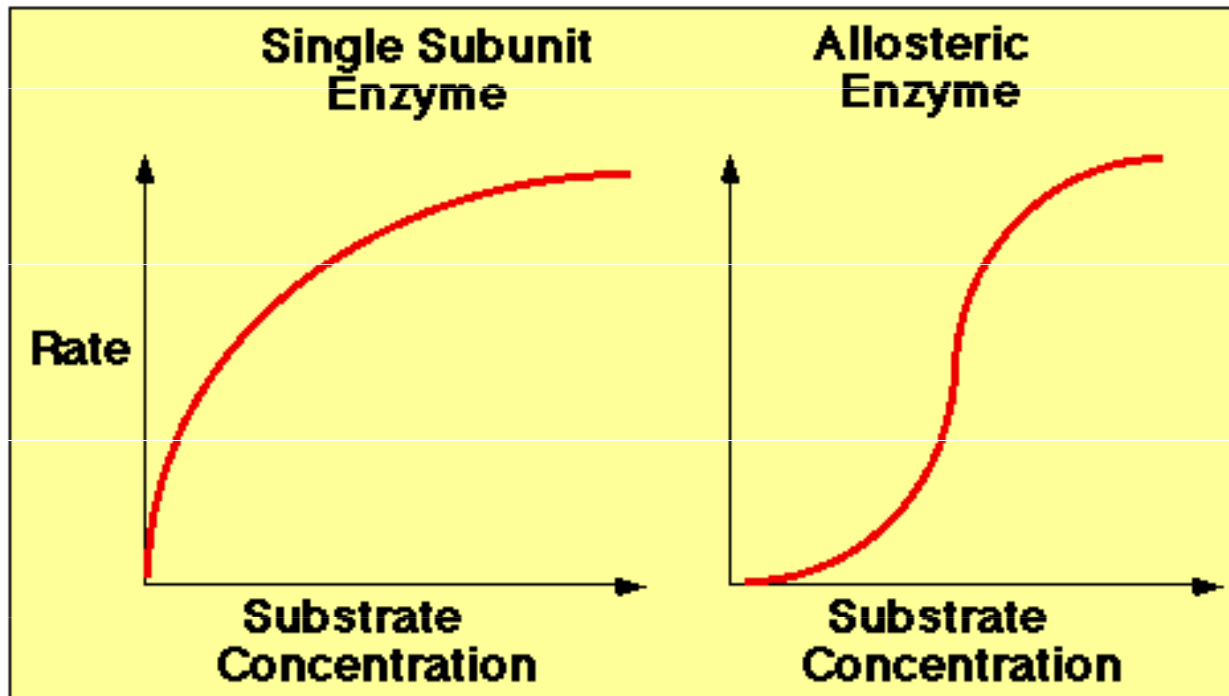




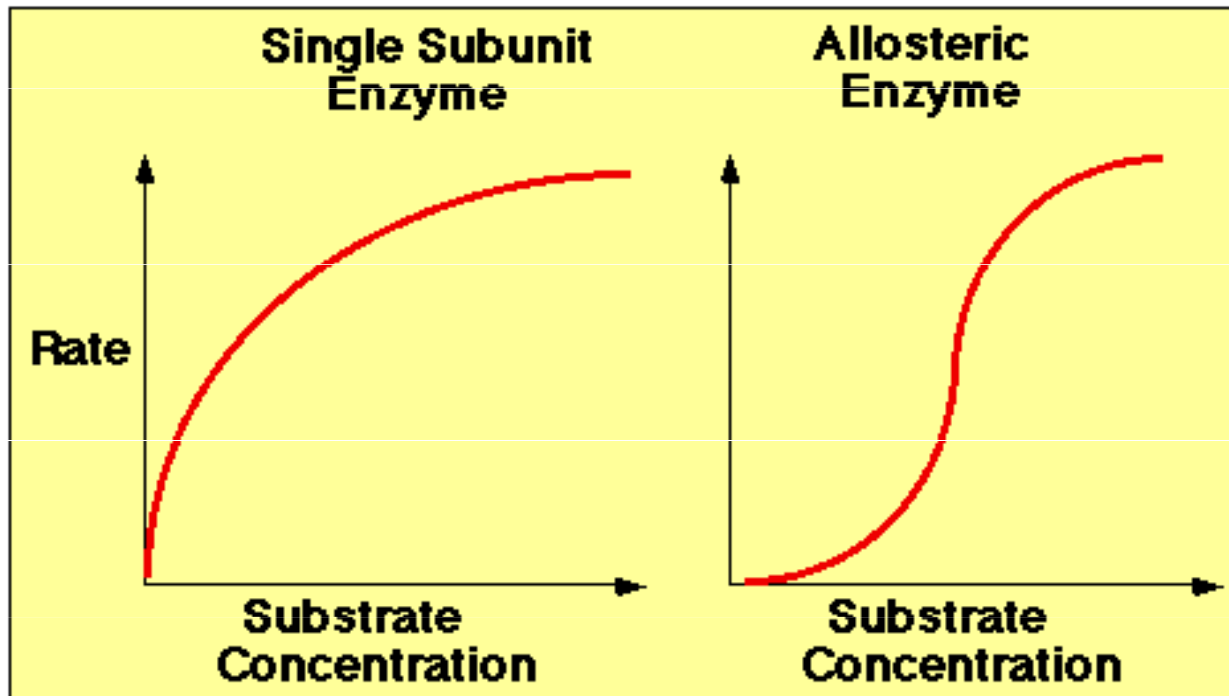
Allosterie



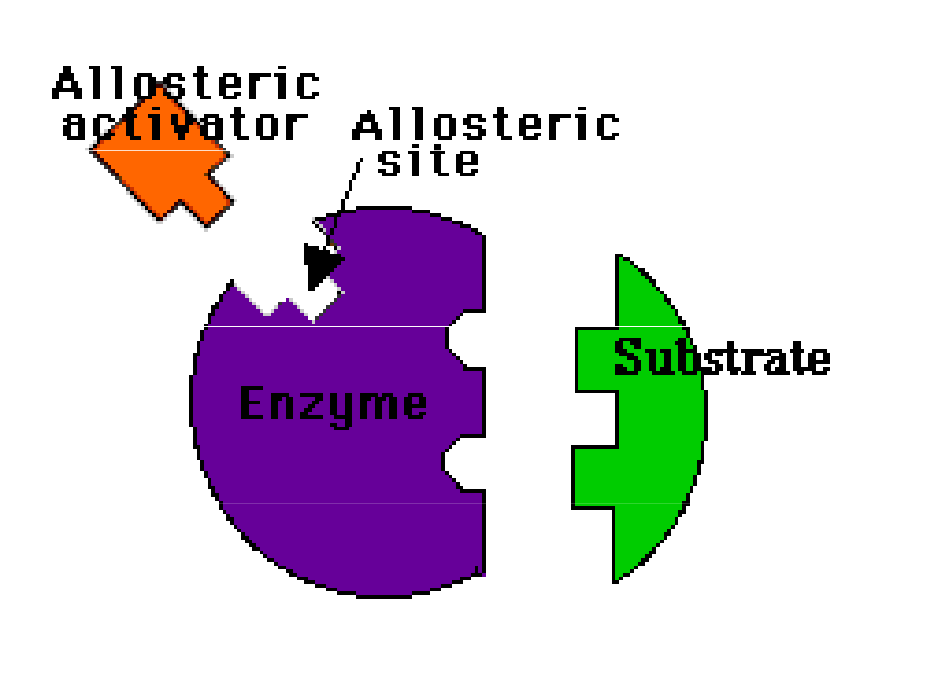
Allosterie



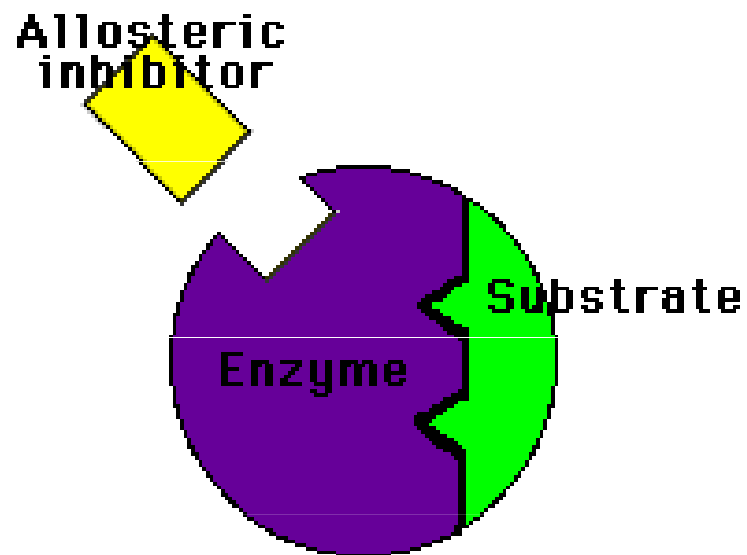
Allosterie



Allosterický aktivátor



Allosterický inhibitor



Symetrický model

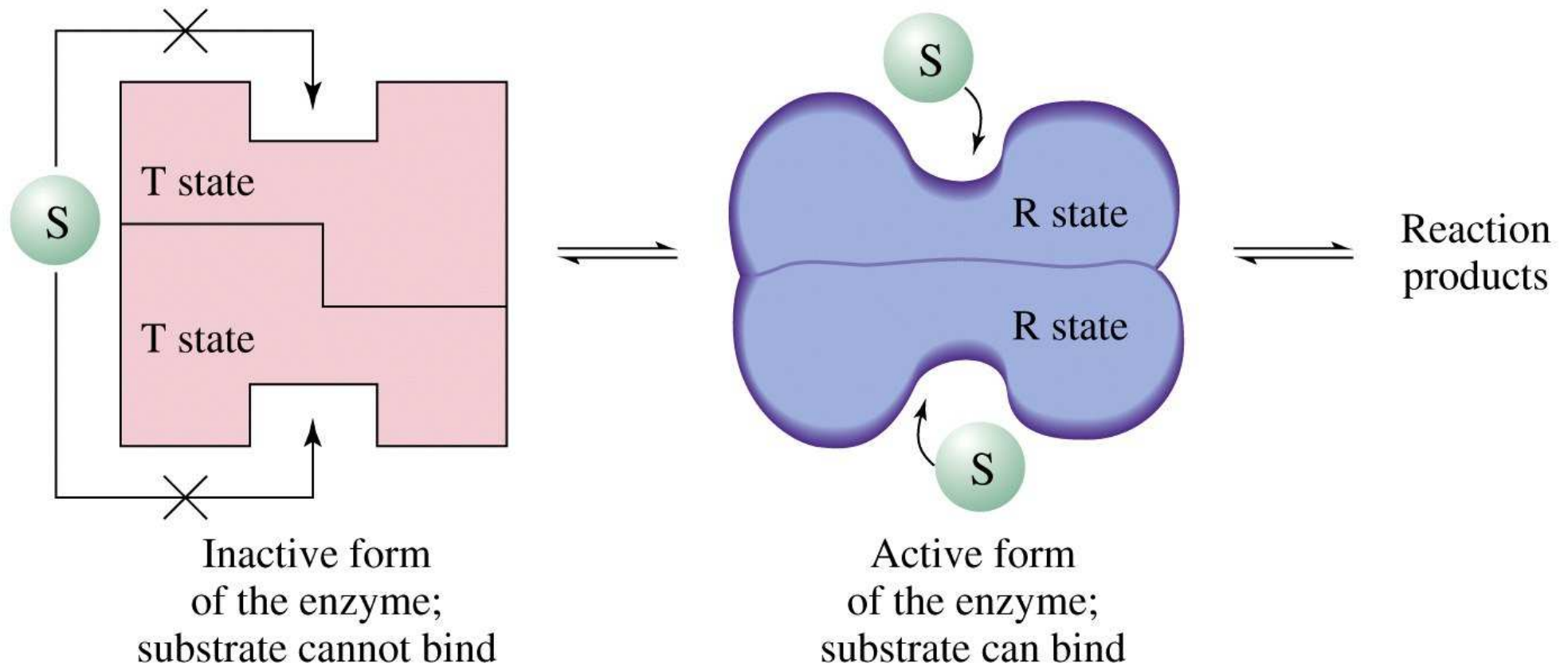


Figure 6-5 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Sekvenční model

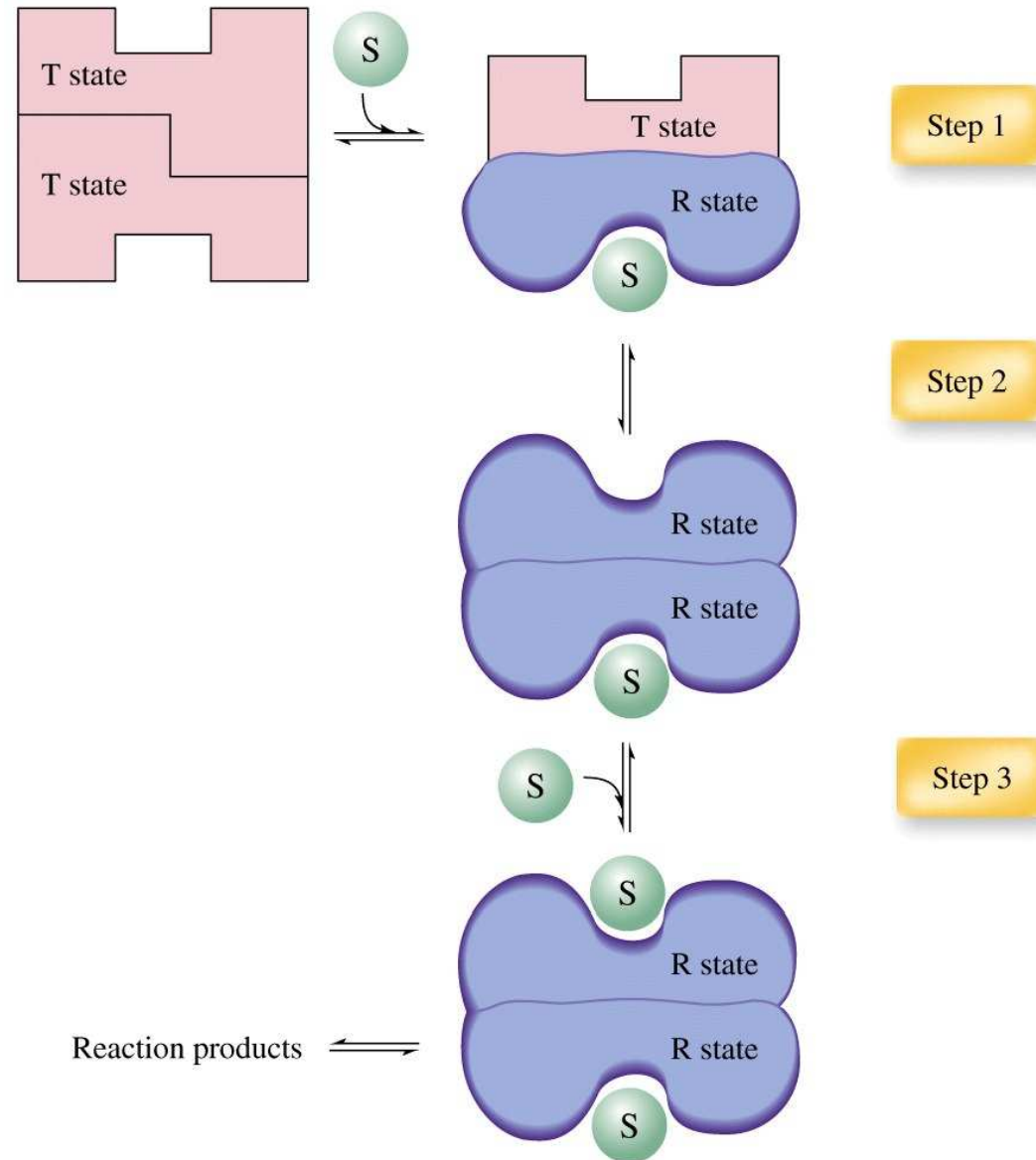
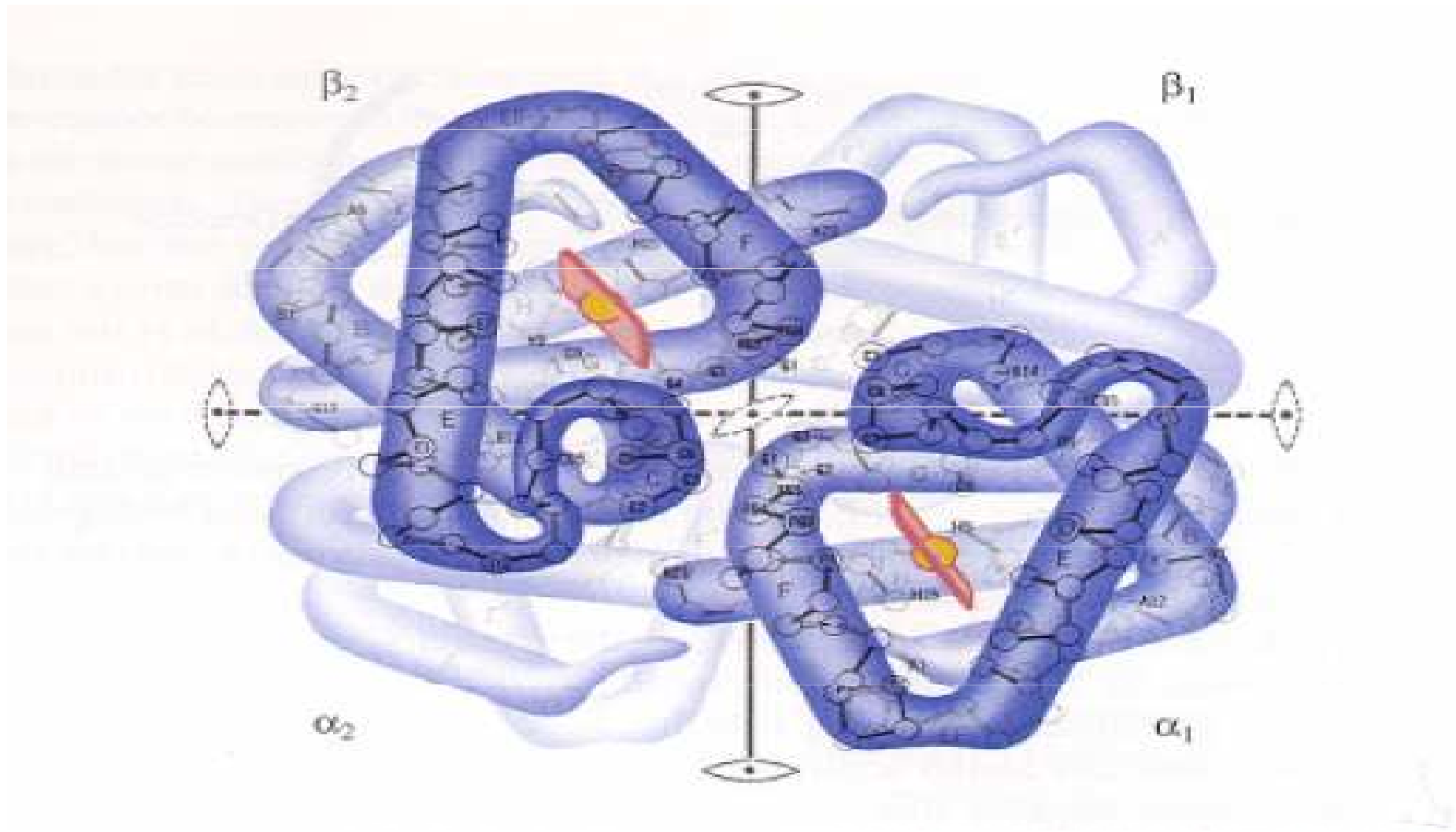
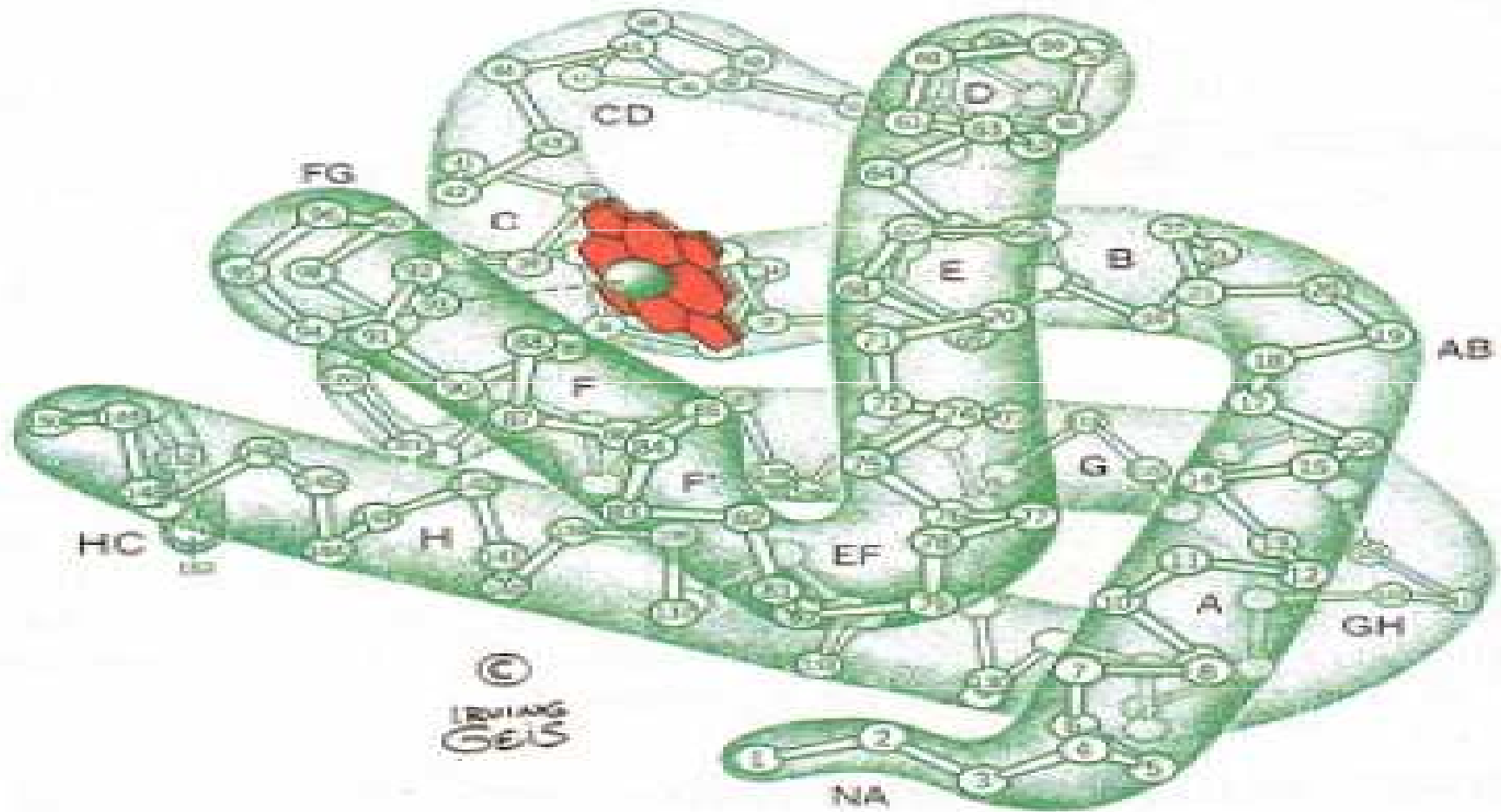


Figure 6-6 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

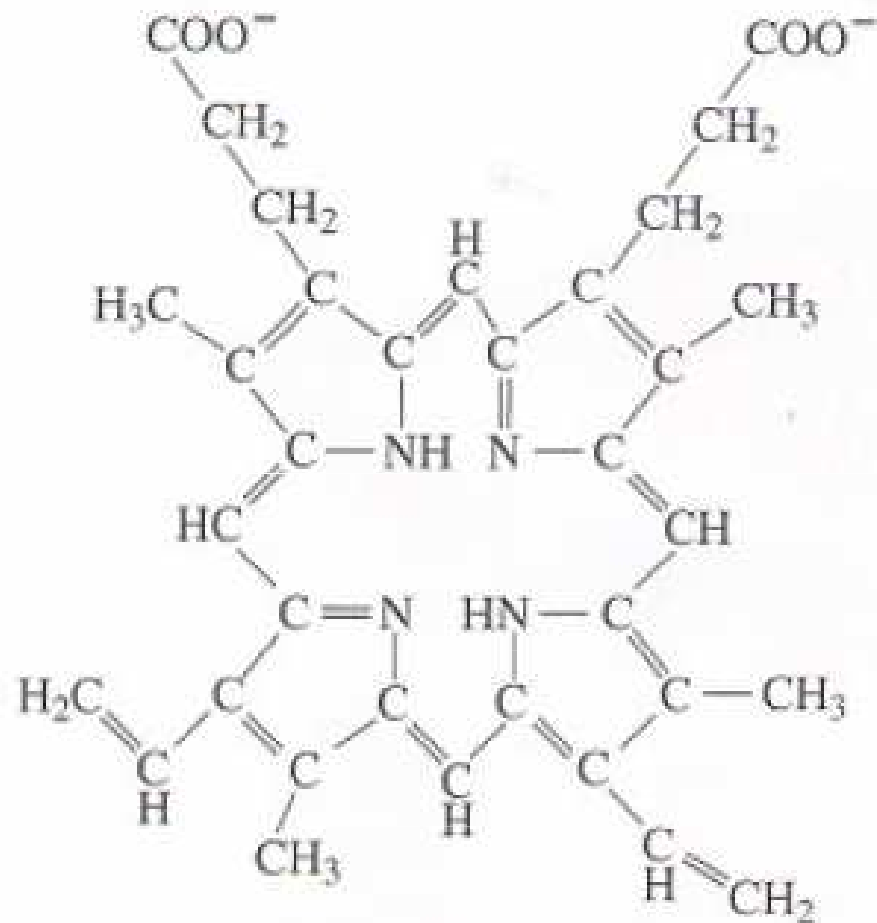
Allosterie hemoglobinu



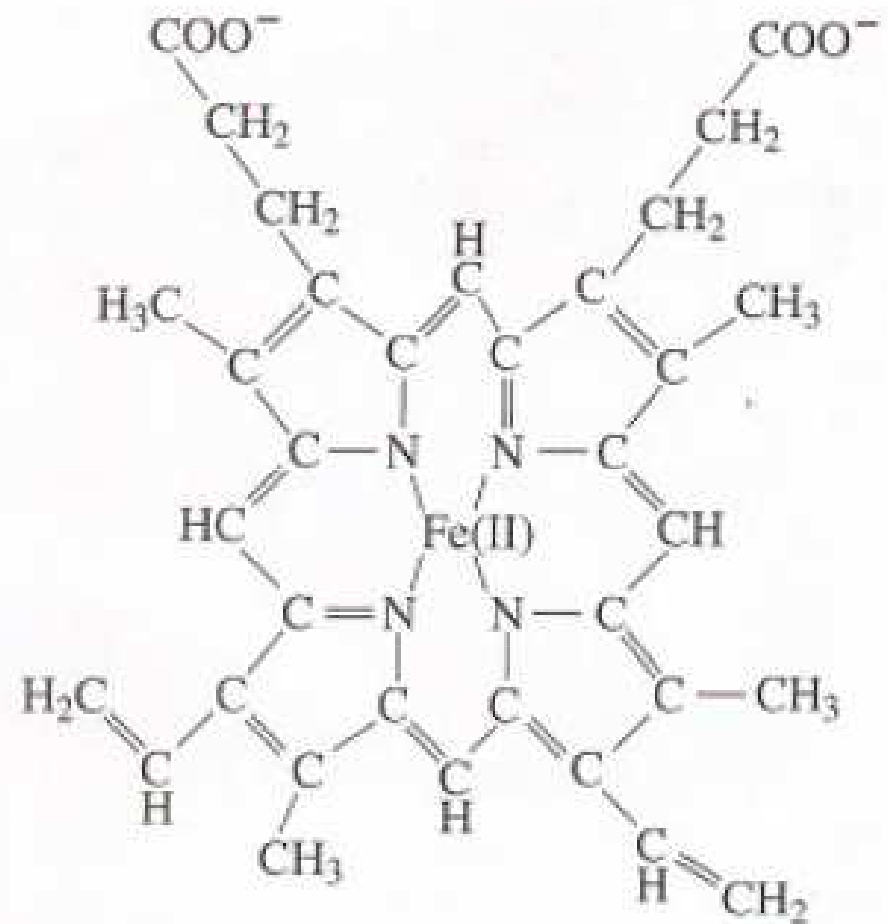
Myoglobin



Hem

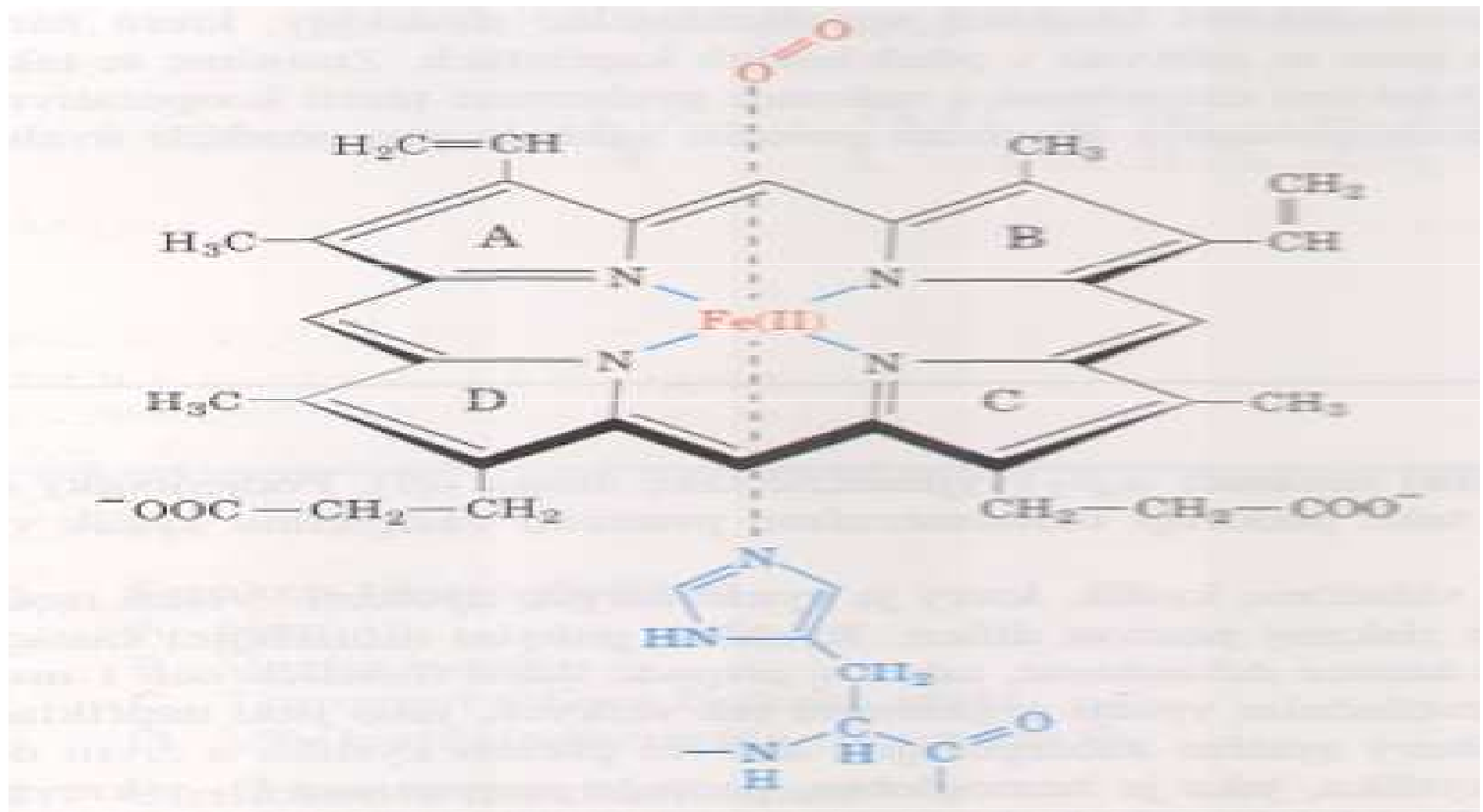


(a) Protoporphyrin IX

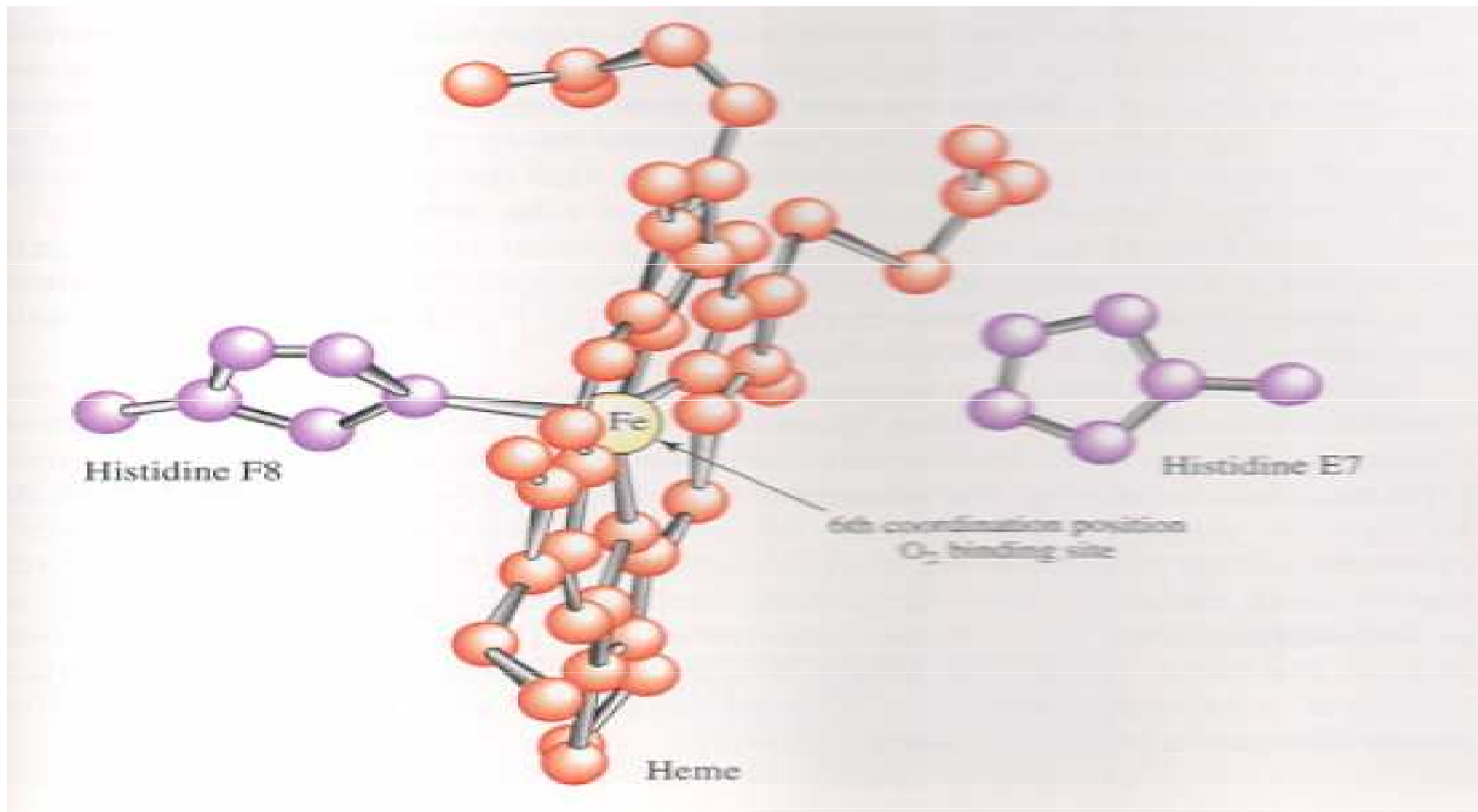


(b) Heme (Fe-protoporphyrin IX)

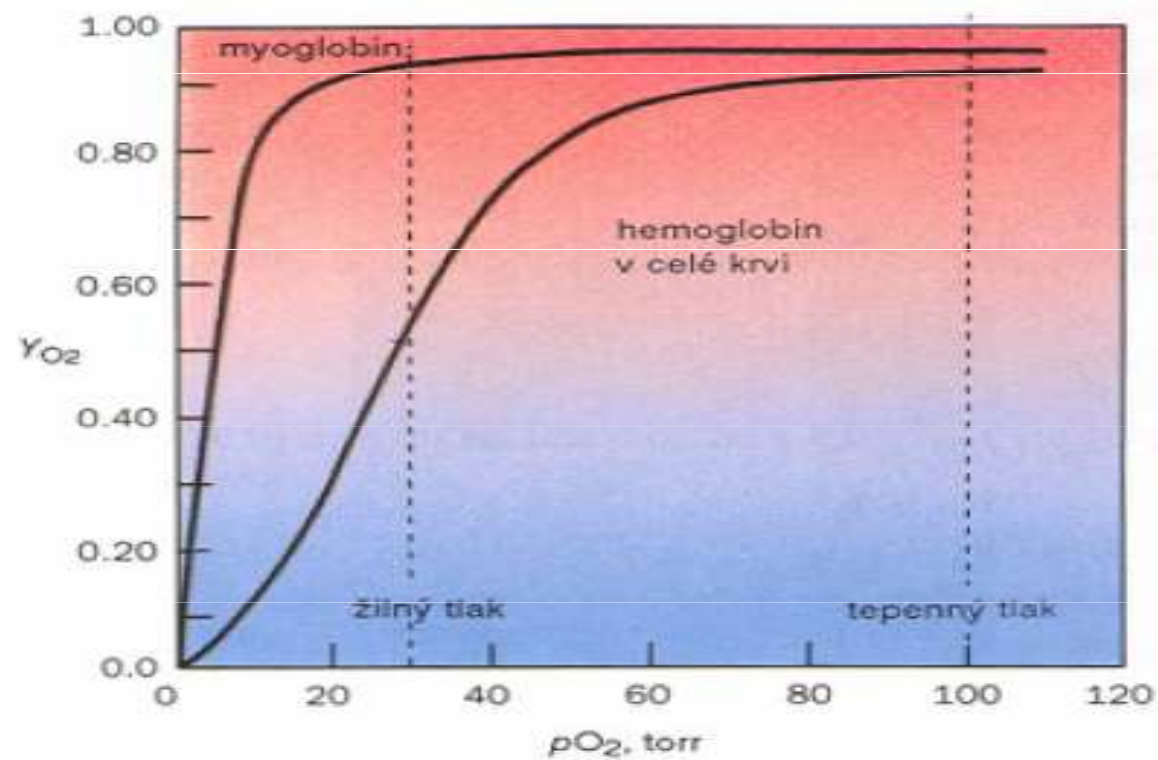
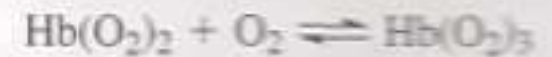
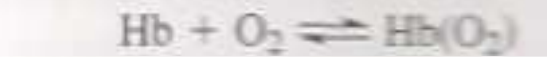
Vazba O₂ na Hb



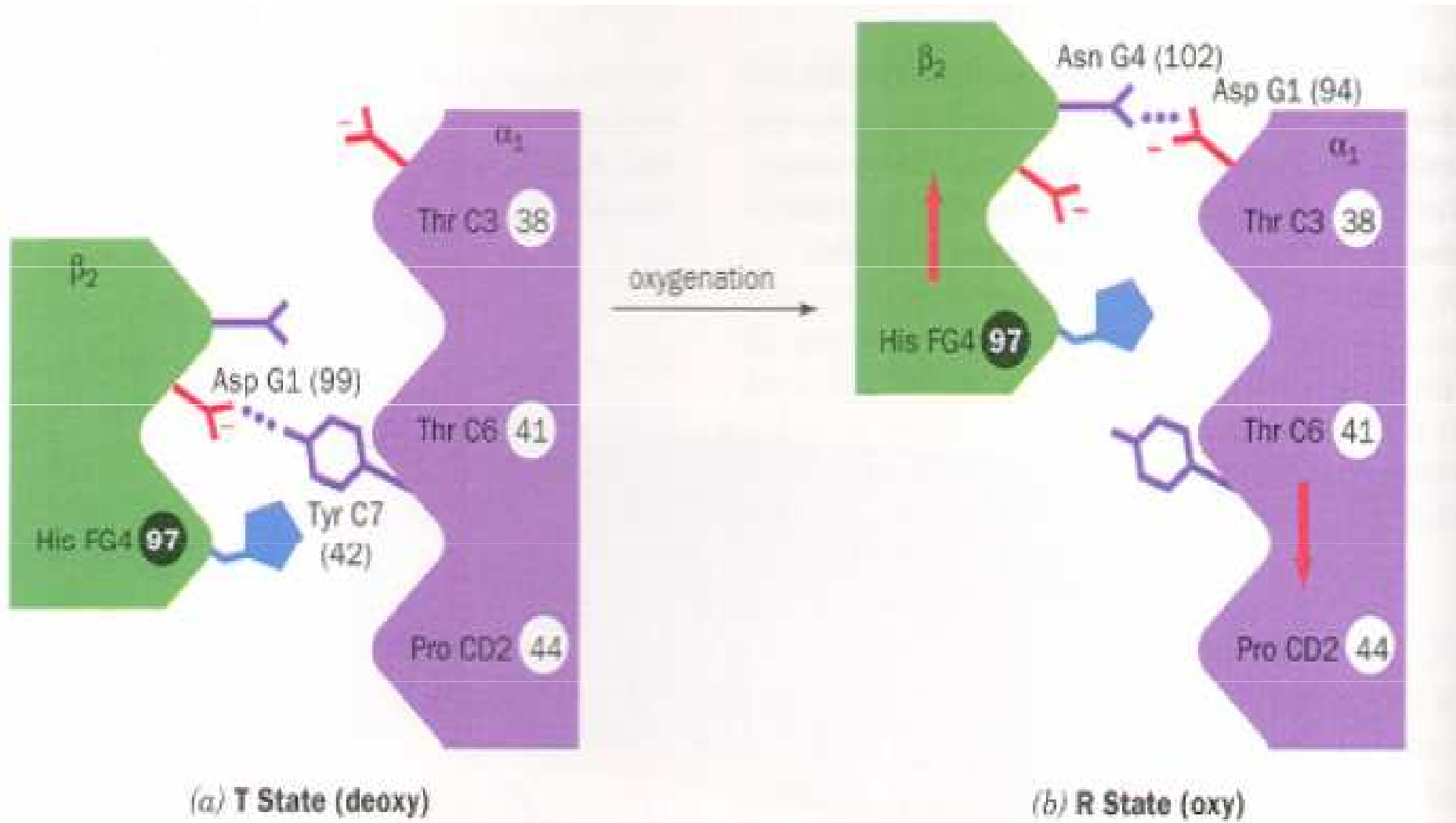
Vazba O_2 na Hb



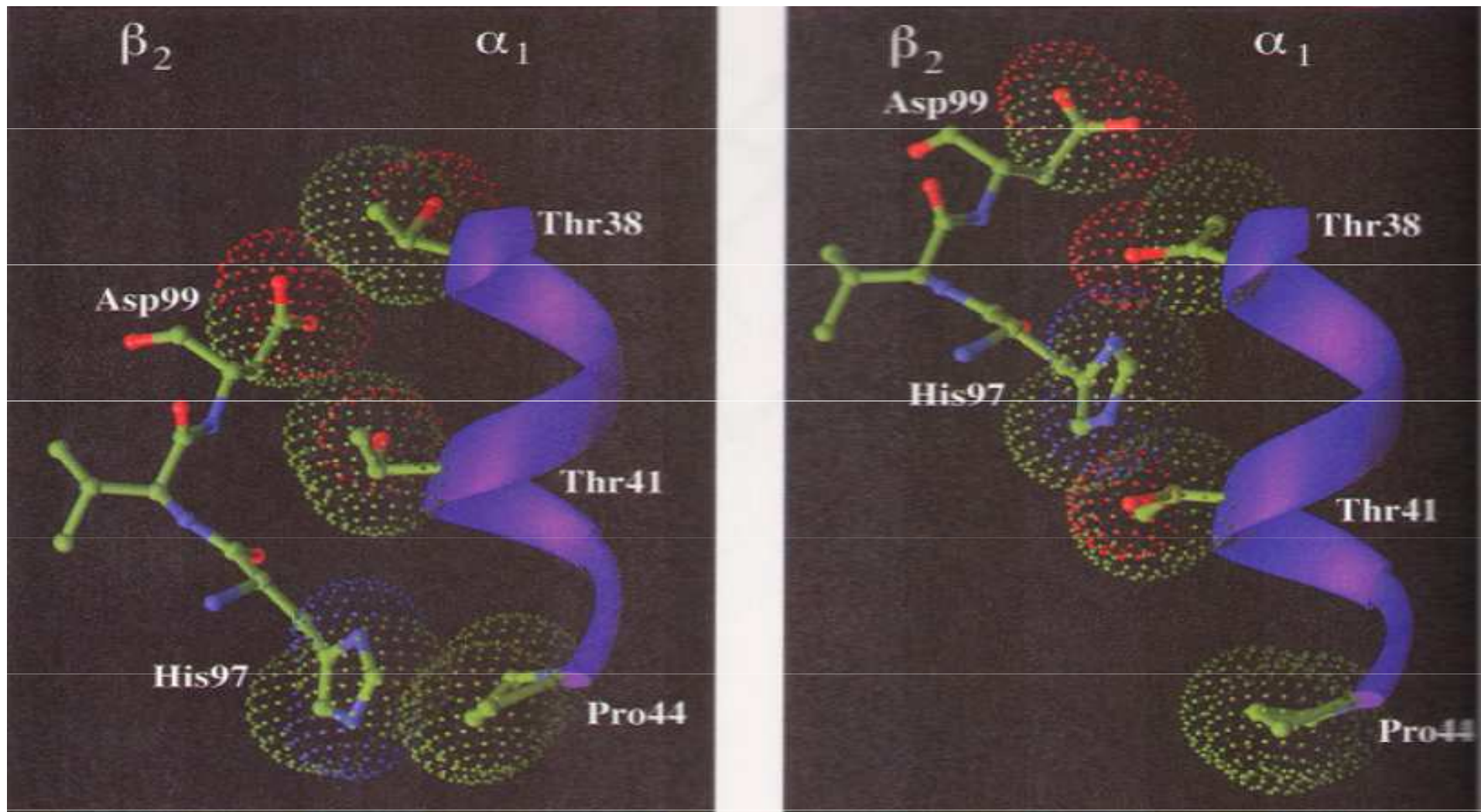
Hb versus Mb



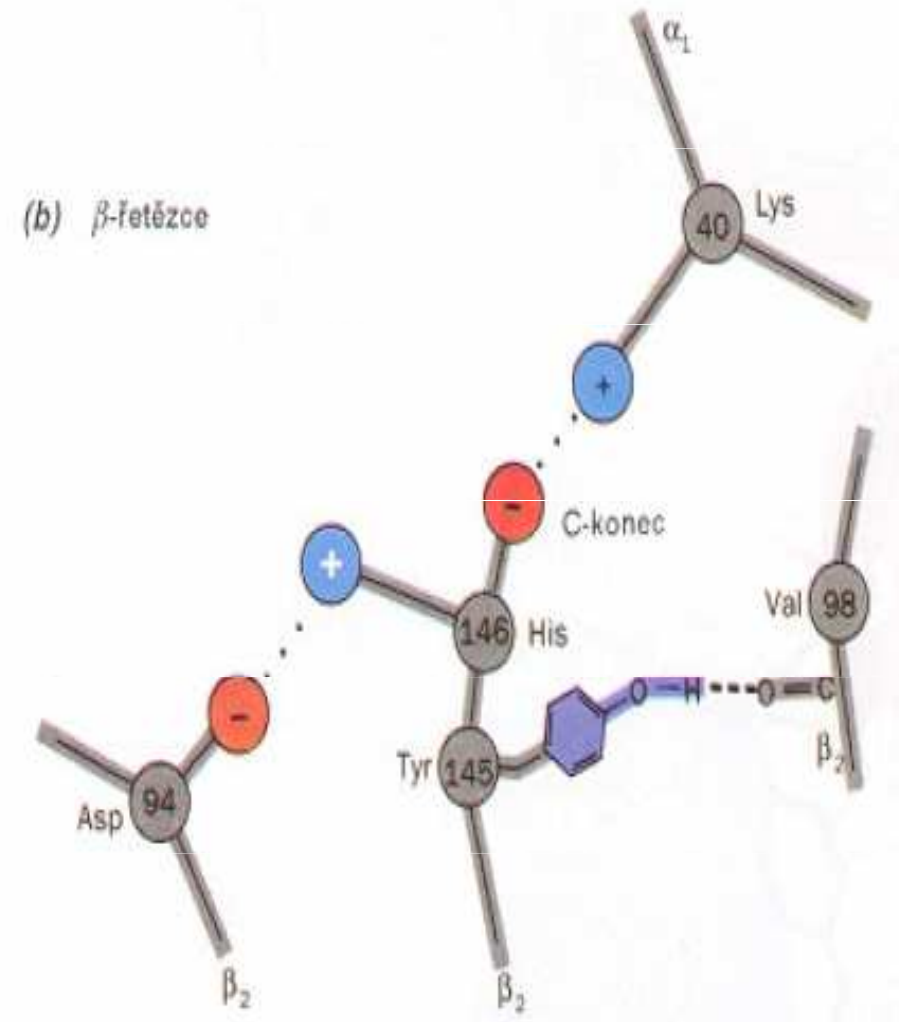
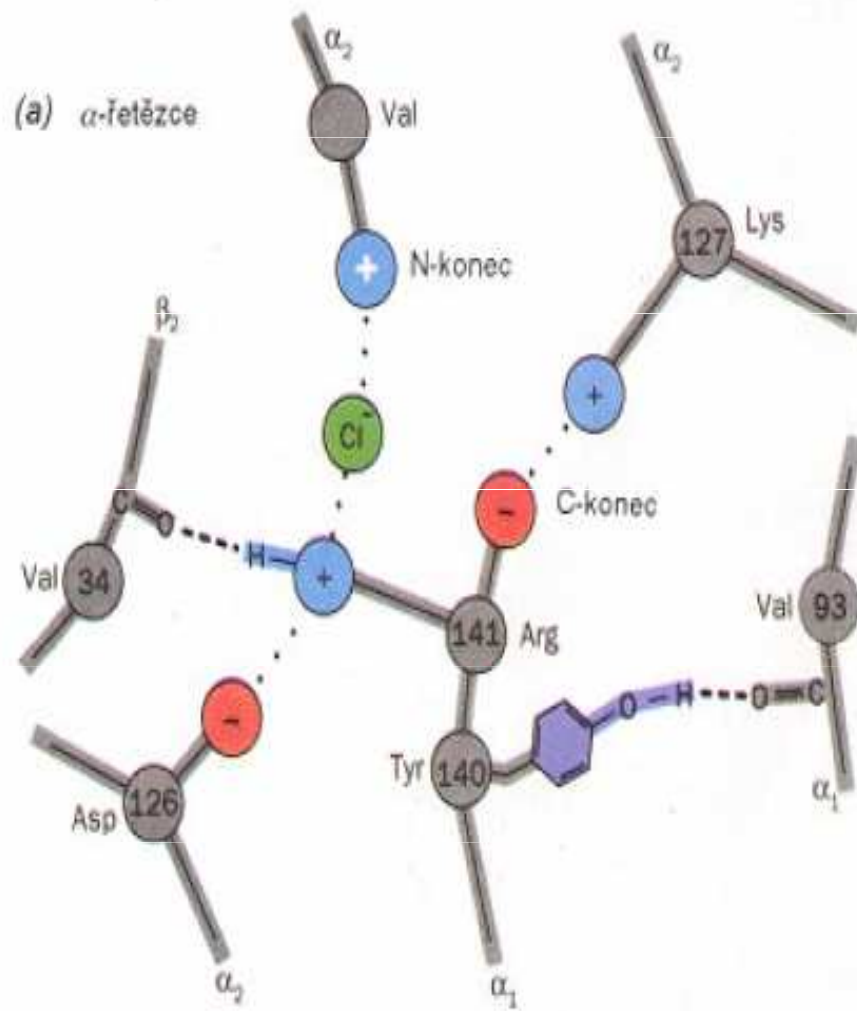
Solné můstky



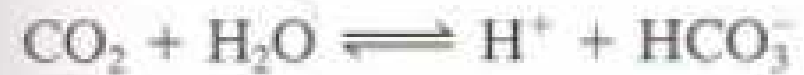
Solné můstky



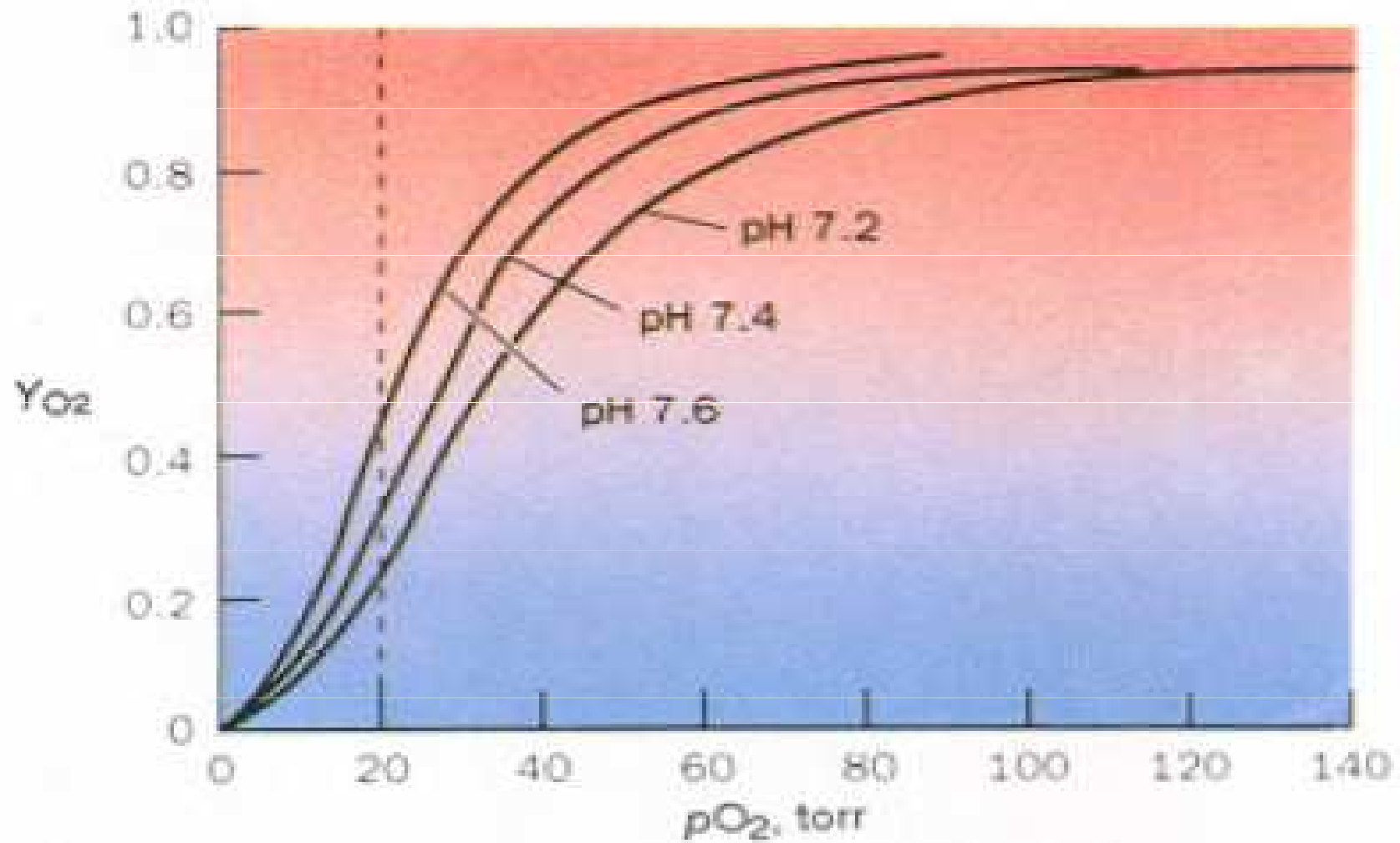
Solné můstky



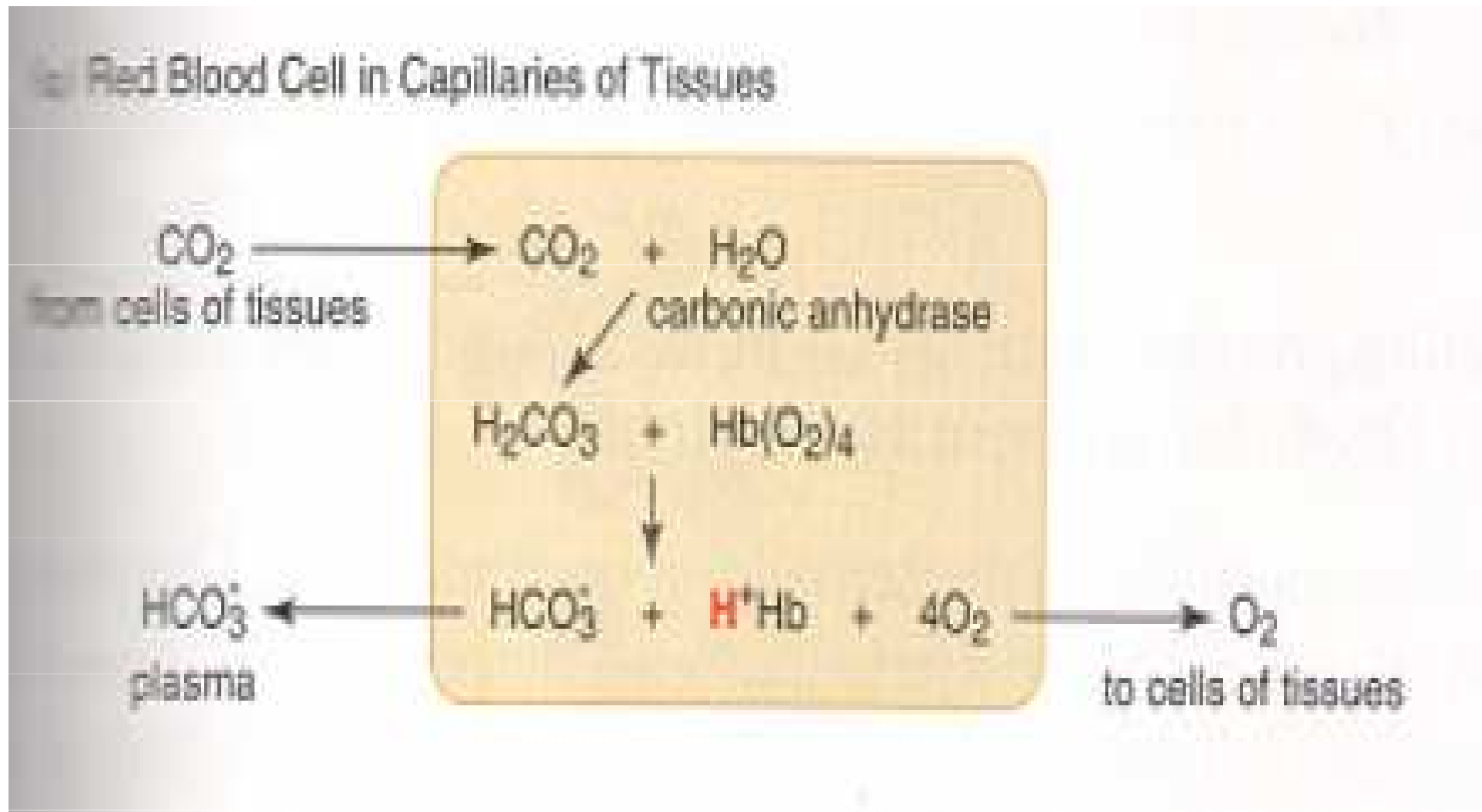
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



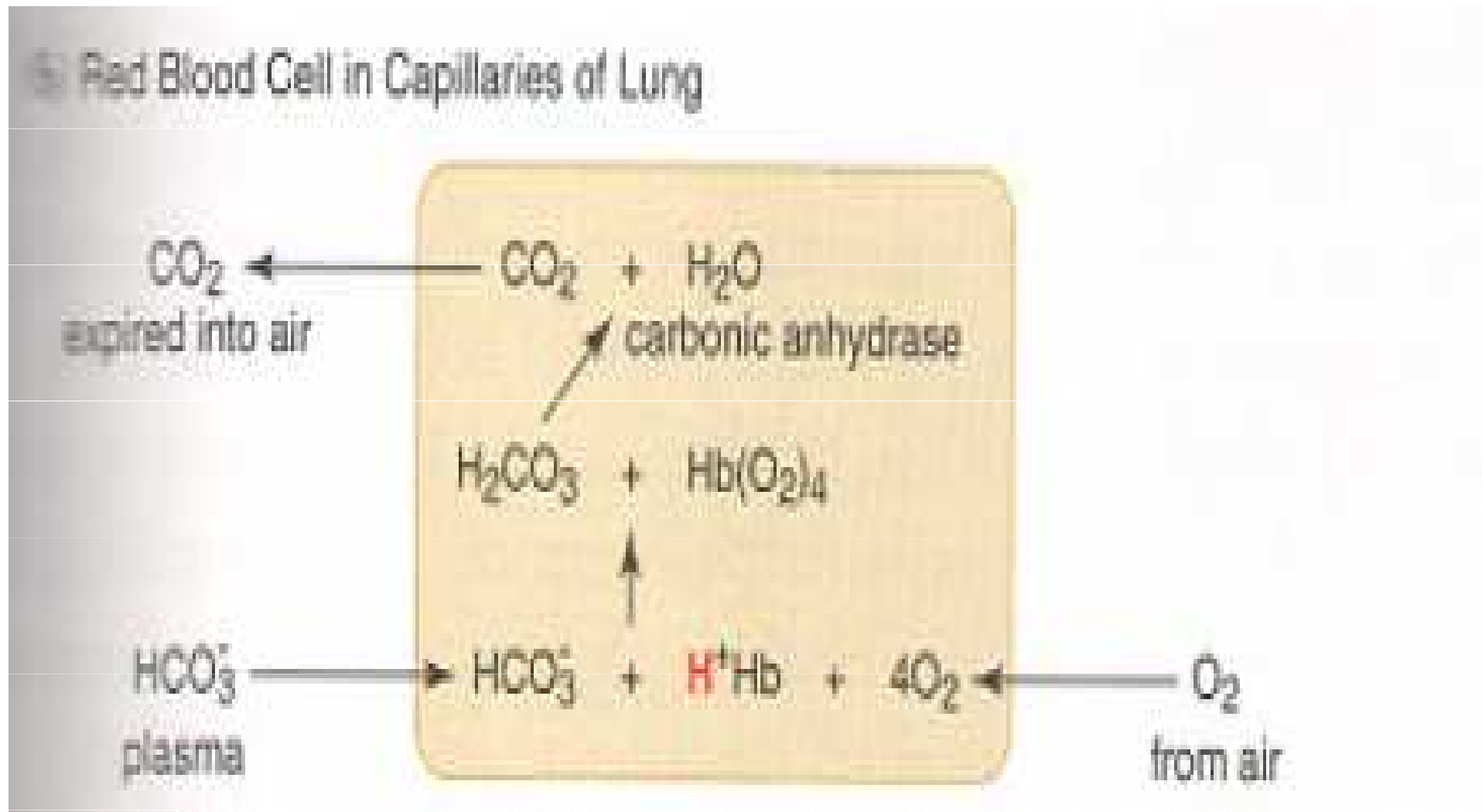
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



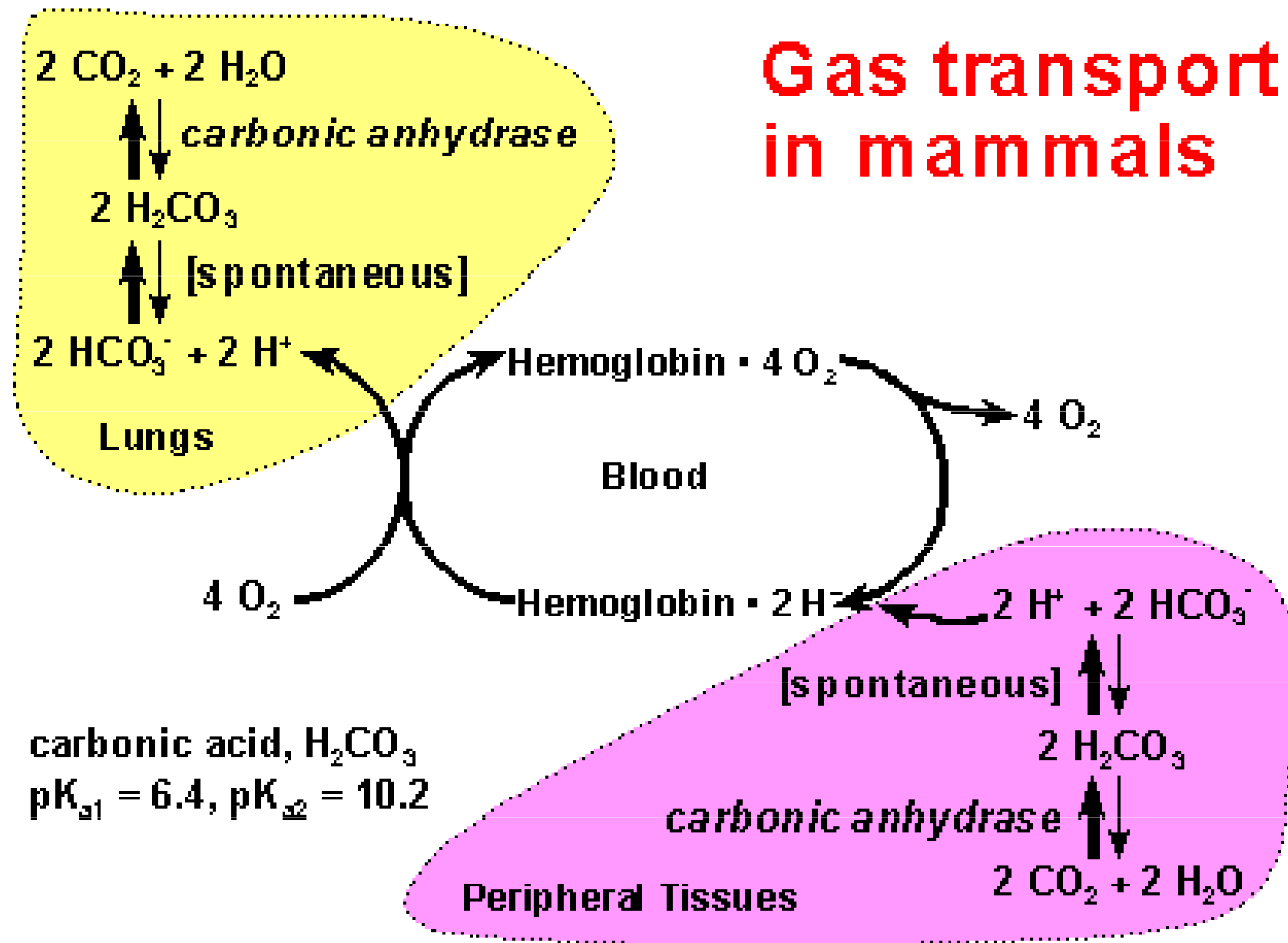
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



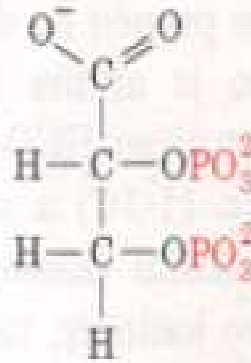
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



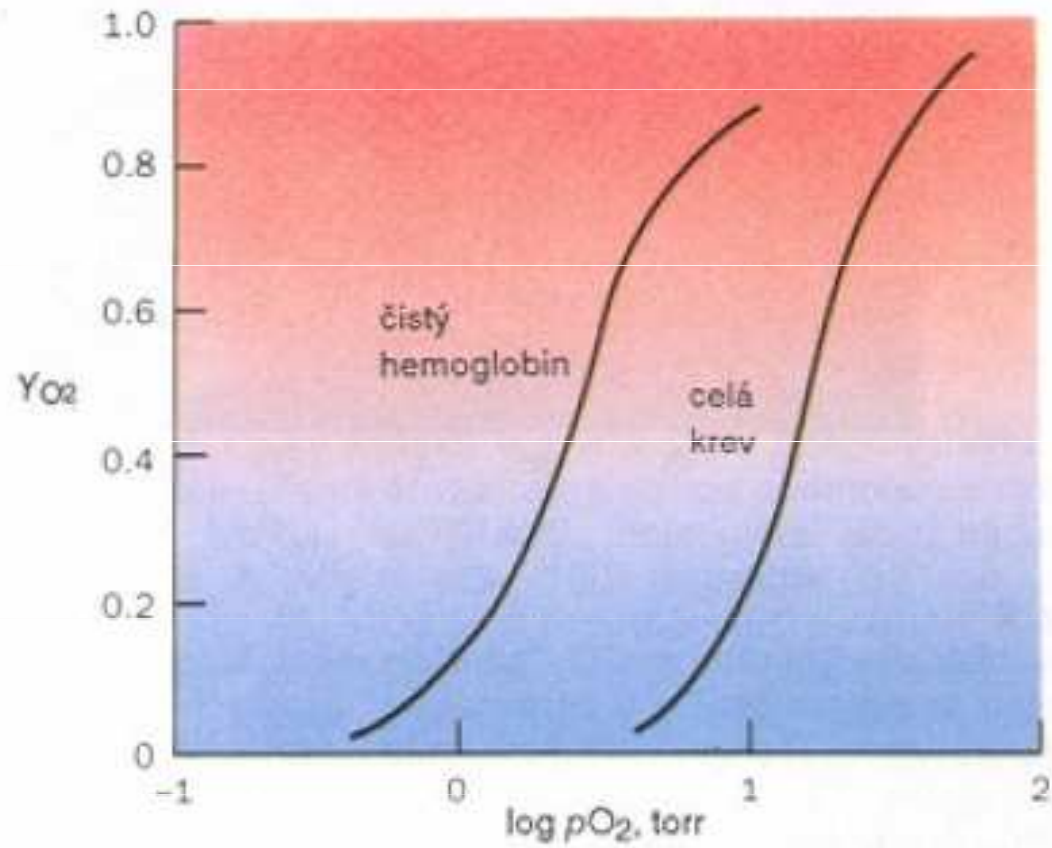
Gas transport in mammals



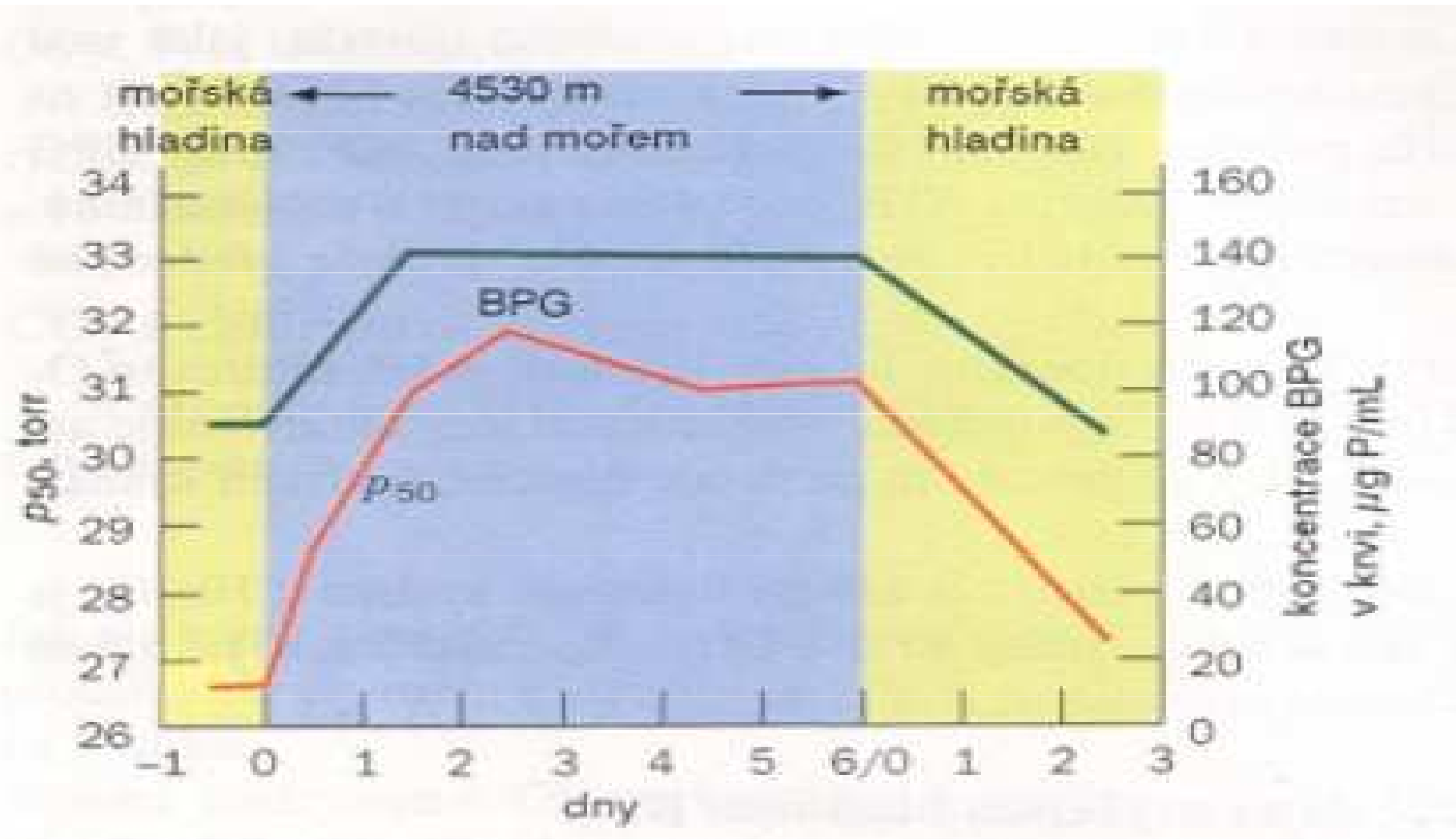
Vliv BPG



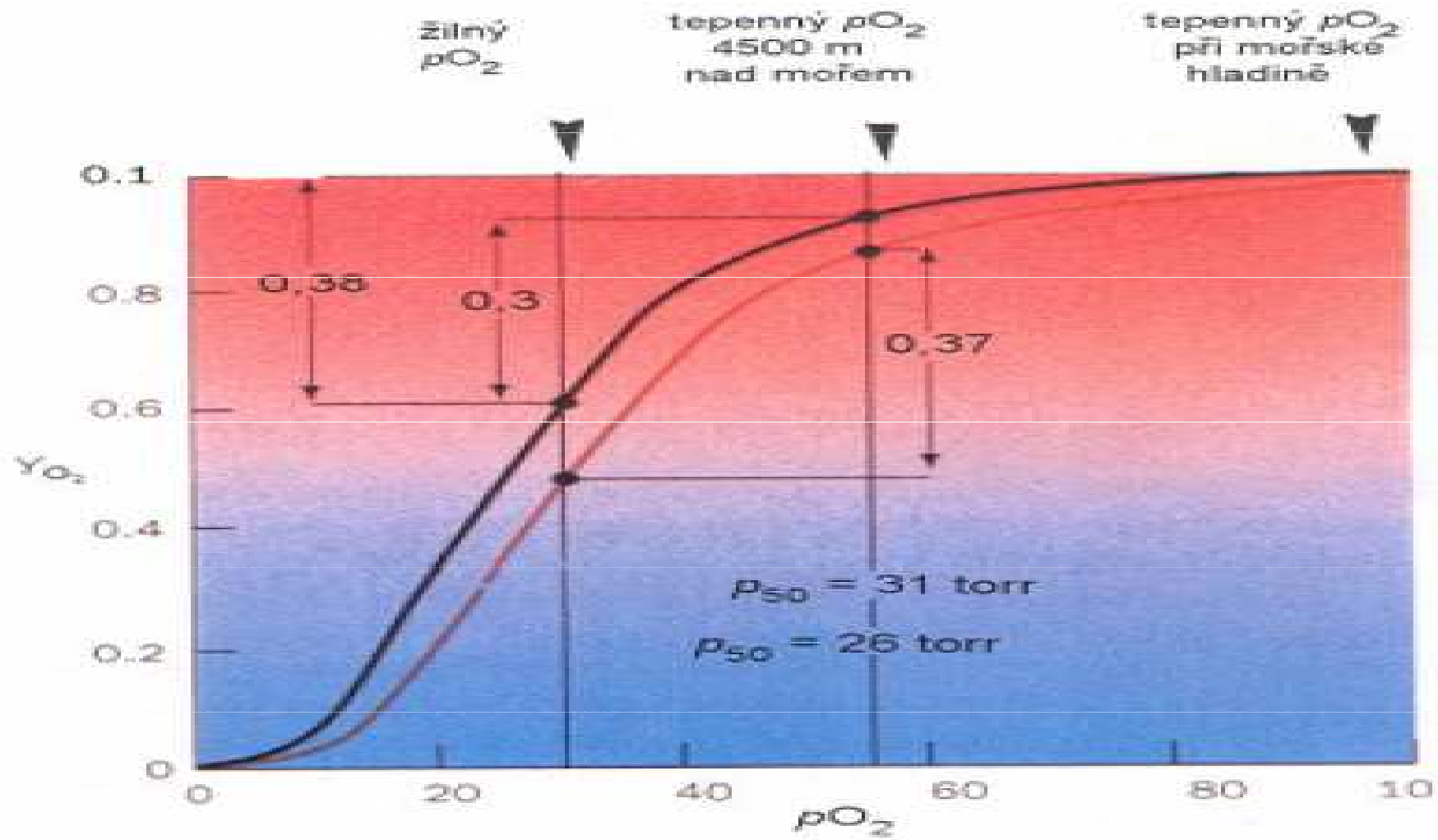
D-2,3-bisfosfoglycerát (2,3-P₂-G)



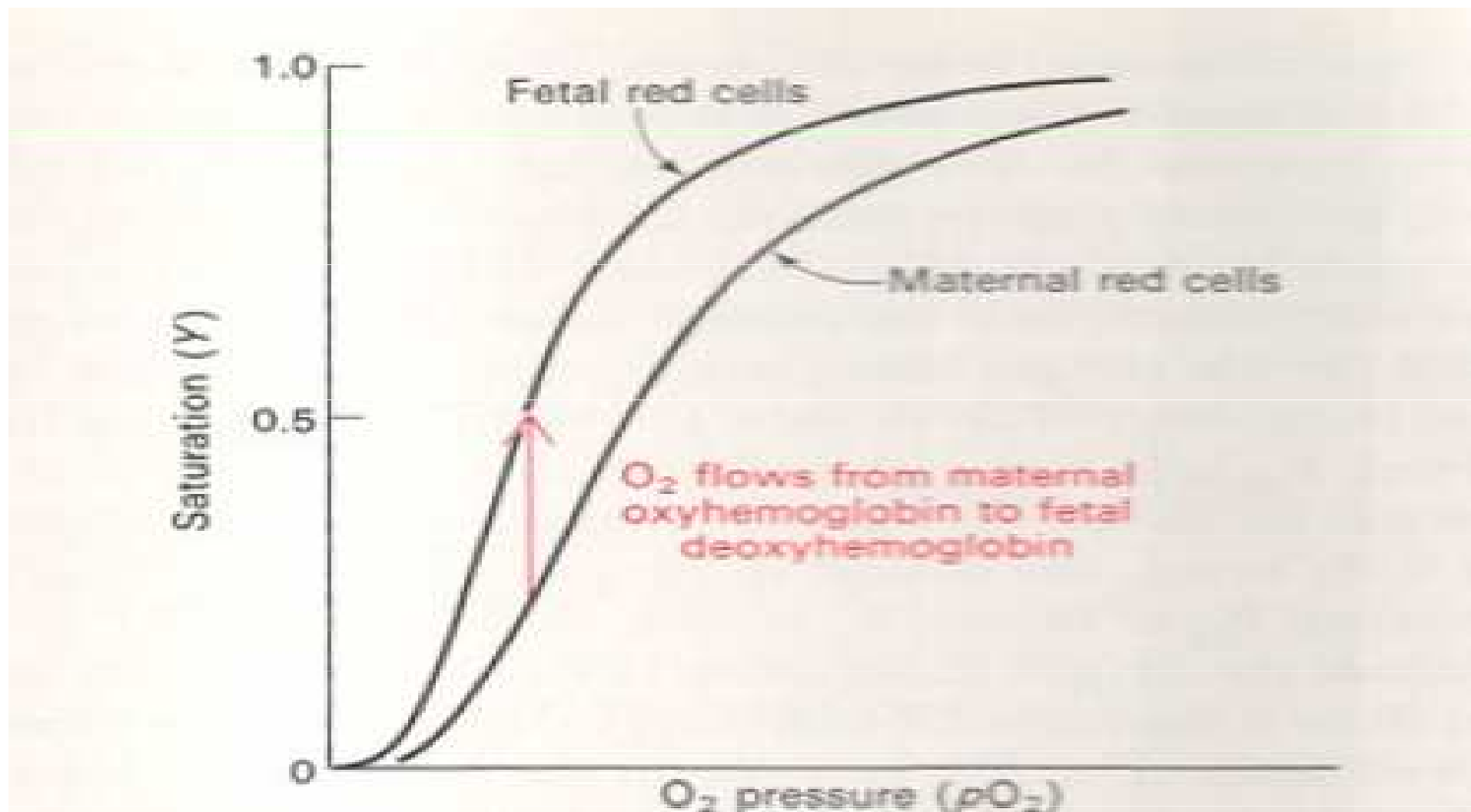
Vliv BPG a nadmořská výška



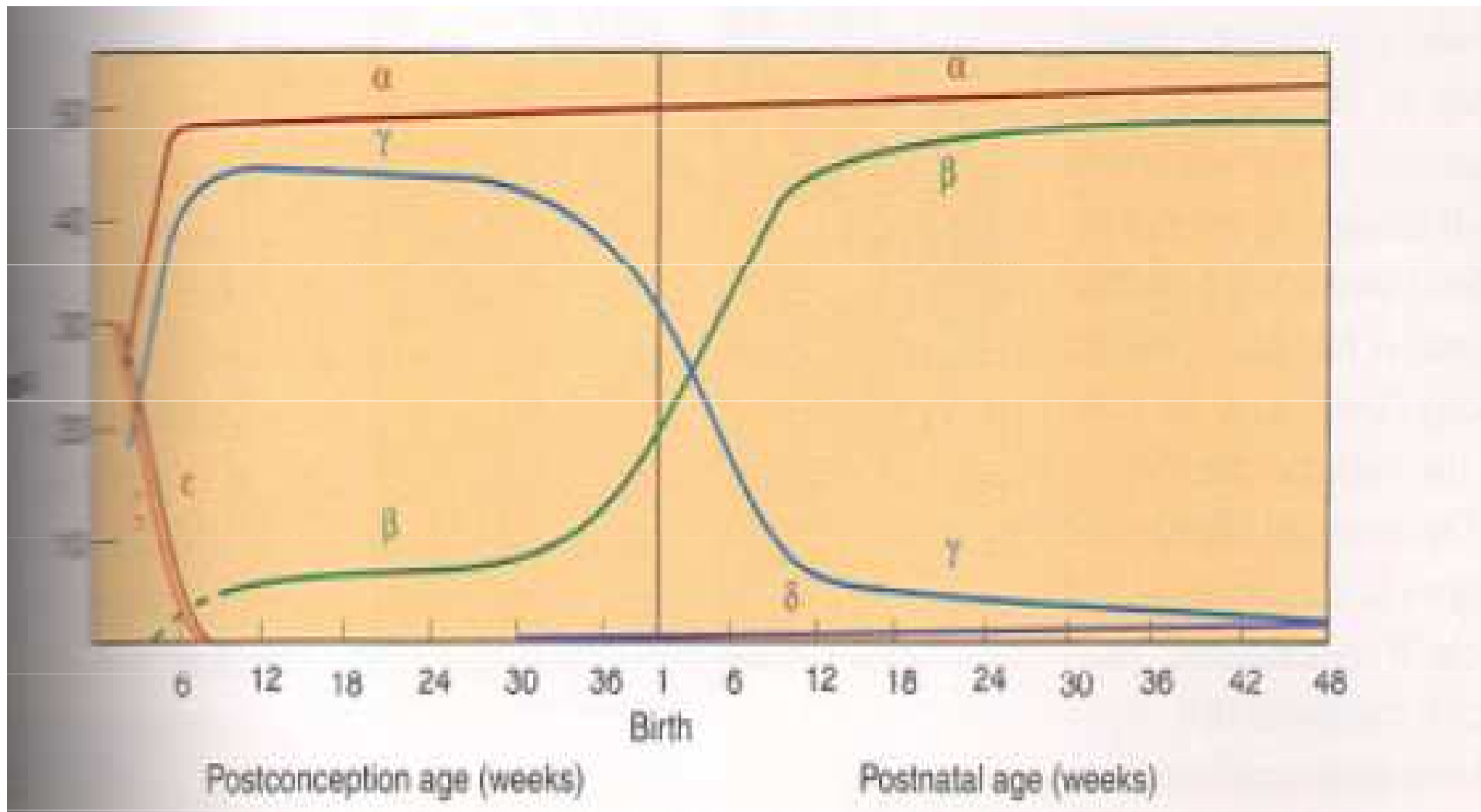
Vliv BPG a nadmořská výška



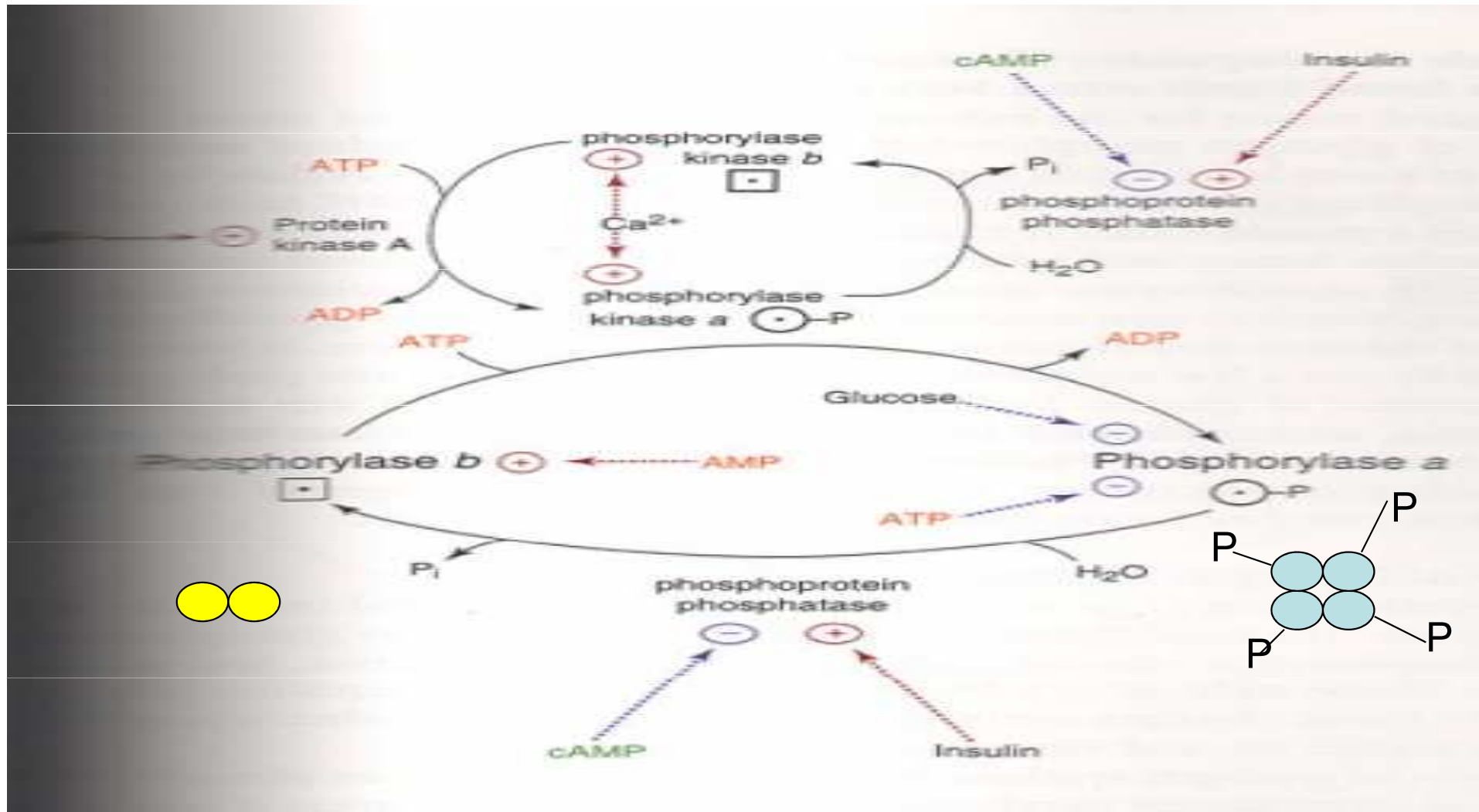
Fetální versus normální Hb



Fetální versus normální Hb



Regulace kovalentní modifikací glykogenfosforylasy



Regulace kovalentní modifikací glykogenfosforylasy

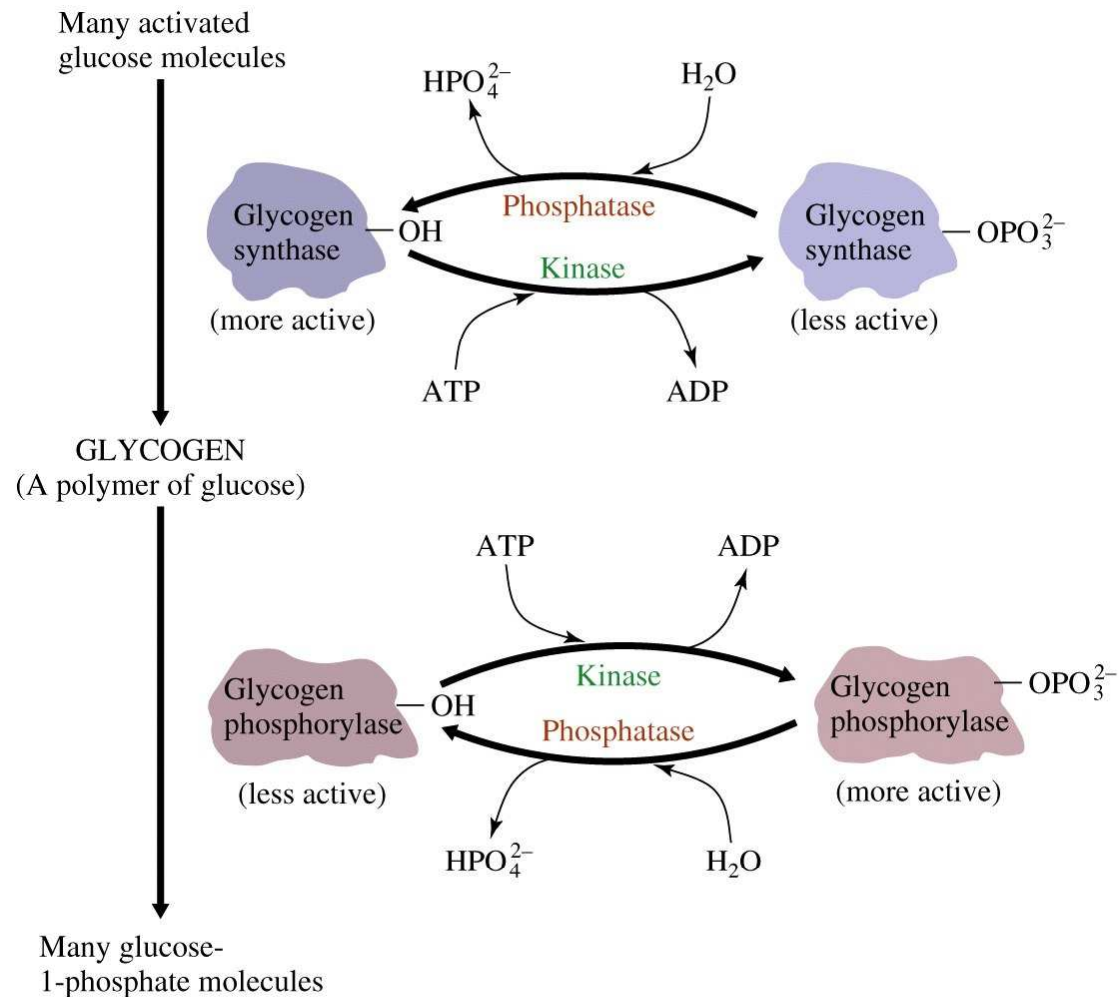
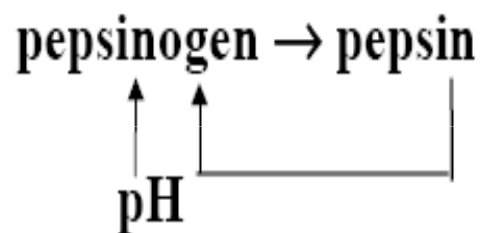


Figure 6-7 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Aktivace zymogenů

žaludek



slinivka břišní

enterokinasa



trypsinogen → trypsin



chymotrypsinogen → chymotrypsin

proelastasa → elastasa



Regulace kovalentní modifikací

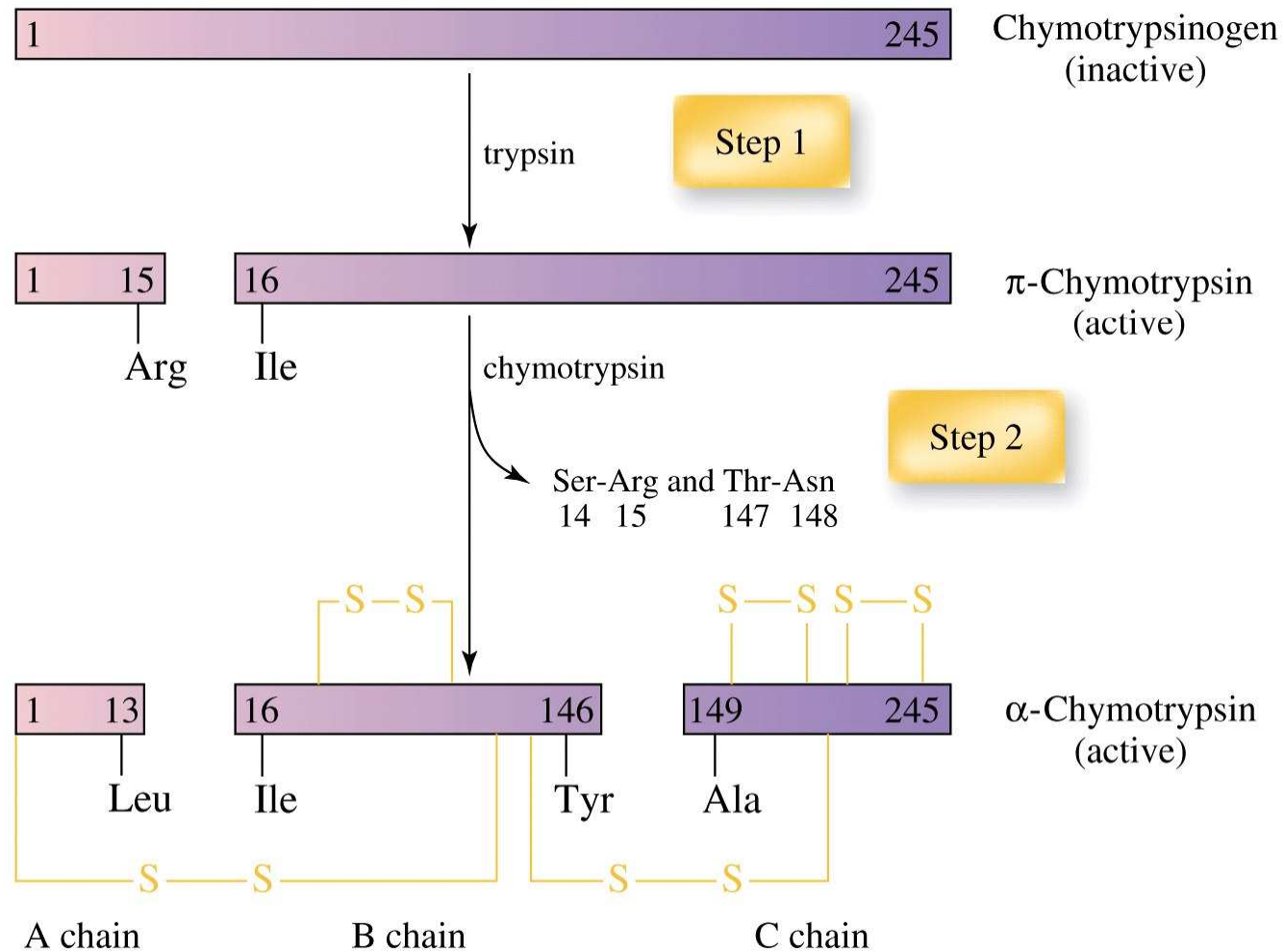
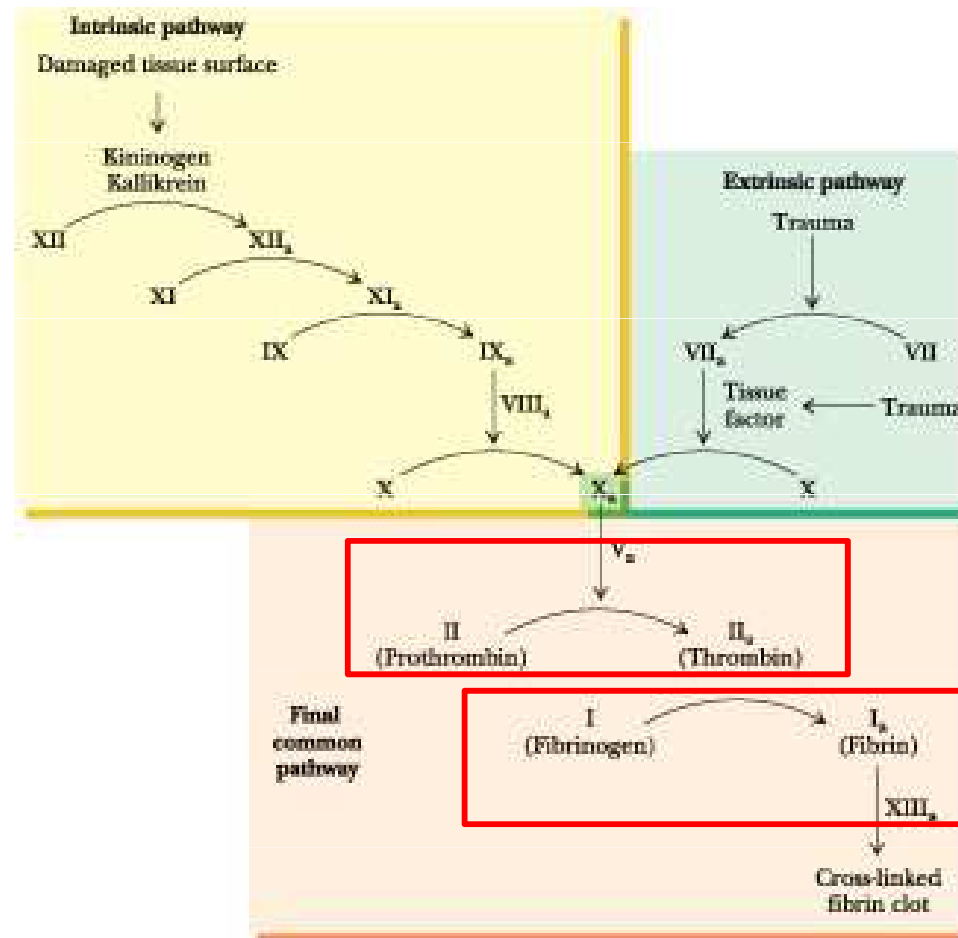
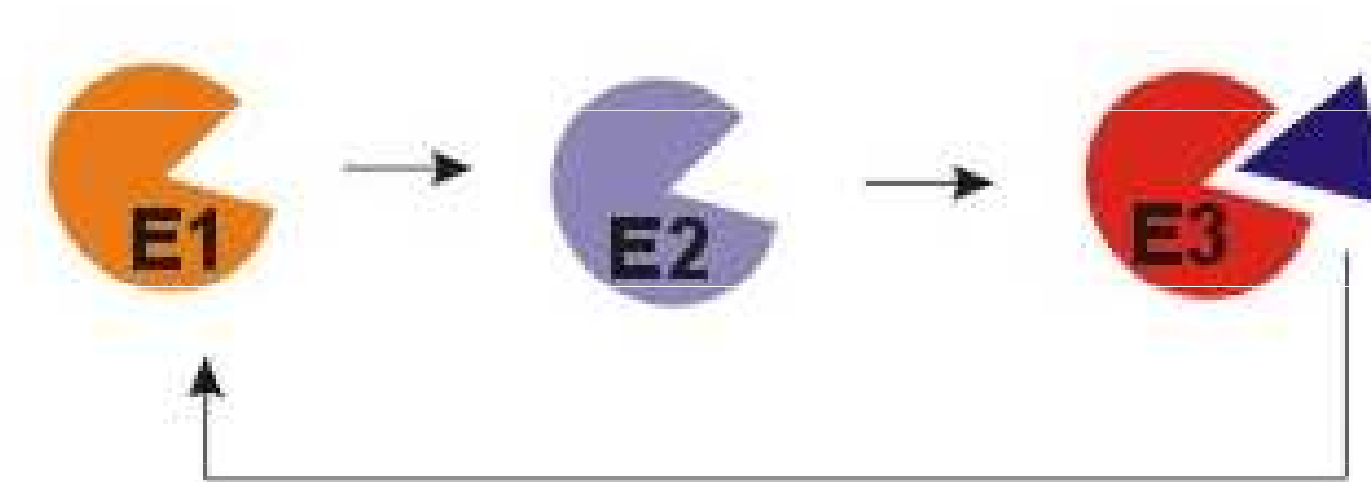


Figure 6-8 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

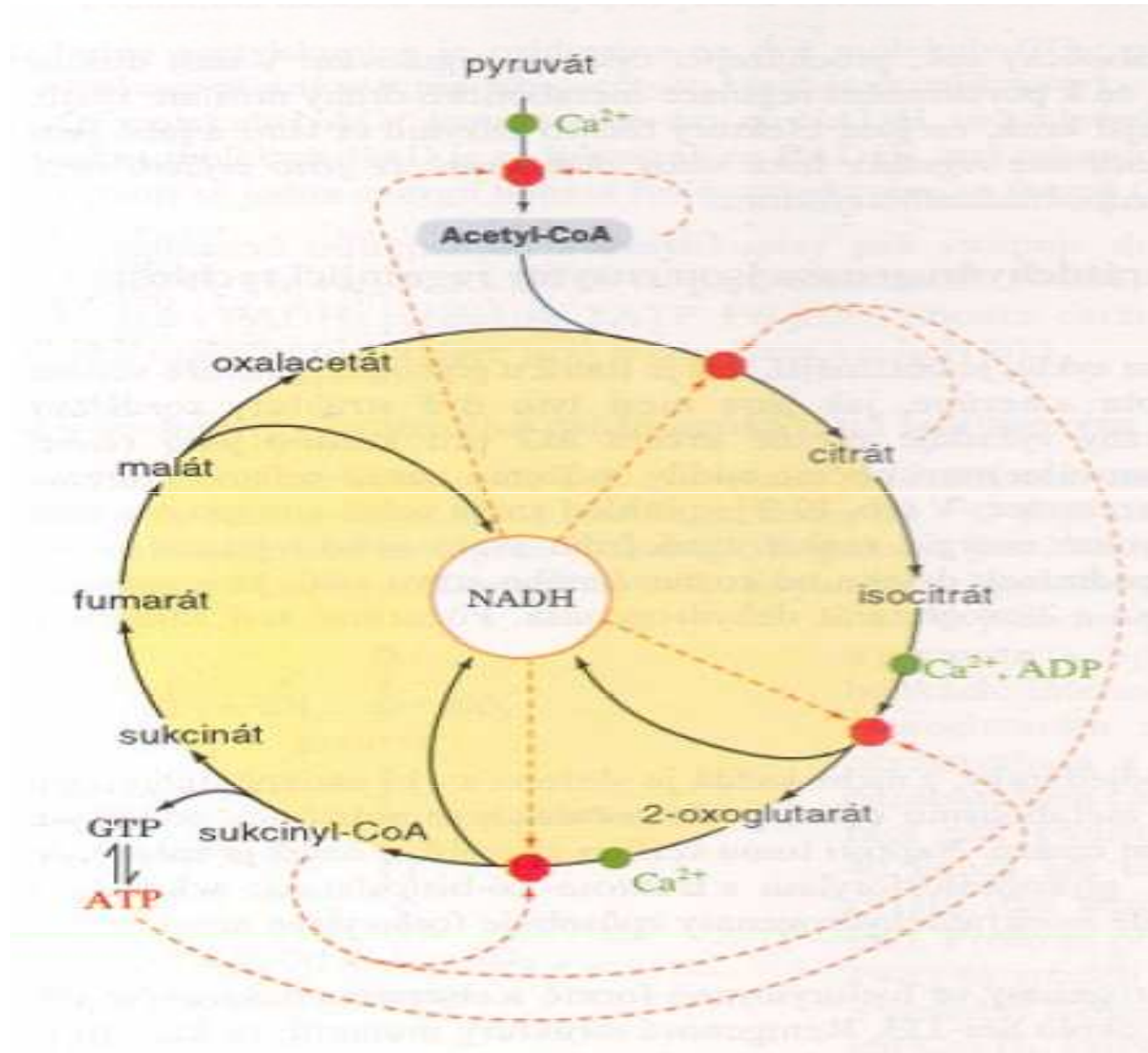
Regulace kovalentní modifikací



Regulace zpětnou vazbou



Regulace



Regulace činnosti enzymu

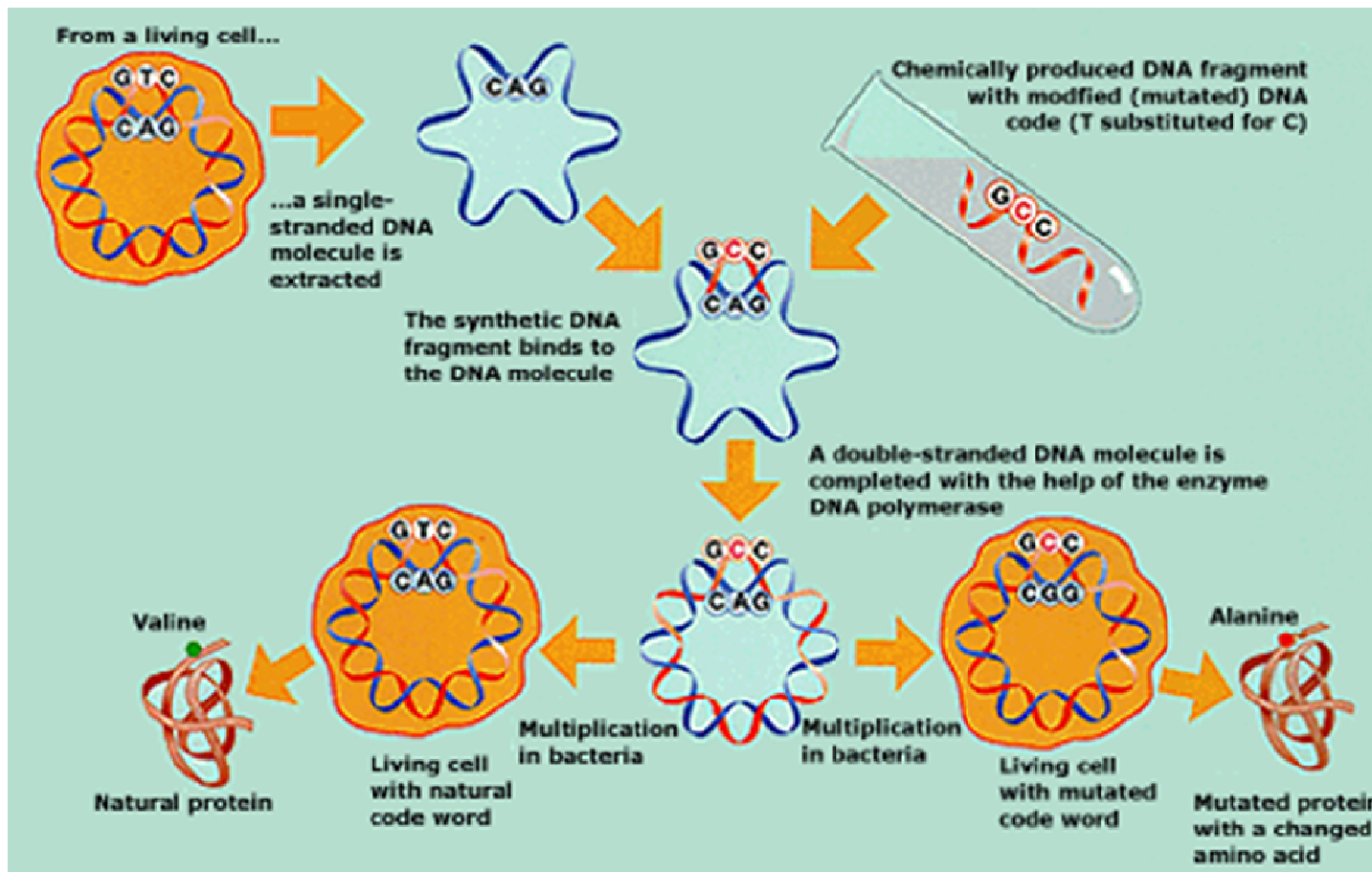
- Kompartimentace

Umělé enzymy



Úprava přírodních enzymů

Řízena evoluce *versus* Místně cílená mutageneze



RACIONÁLNÍ DESIGN

1. Počítačové modelování



2. Místně cílená mutagenese



Samostatný mutovaný gen

3. Transformace

4. Expres proteinu

5. Purifikace proteinu

6. *není aplikován*



Zkonstruovaný mutantní enzym

7. Biochemické testování

ŘÍZENÁ EVOLUCE

1. *není aplikováno*

2. Náhodná mutagenese



Knihovna mutovaných genů
(>10,000 klonů)

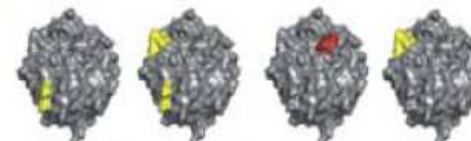
3. Transformace

4. Expres proteinu

5. *není aplikována*

6. Screening a výběr

- stabilita
- selektivita
- afinita
- aktivita



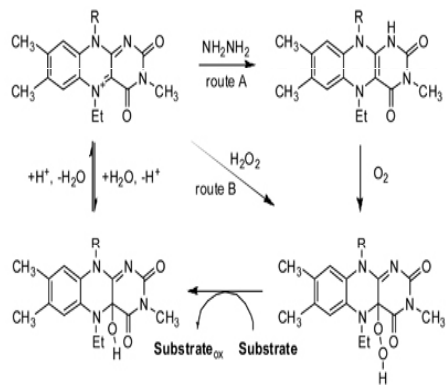
Vybrané mutantní enzymy

**VYLEPŠENÝ
ENZYM**

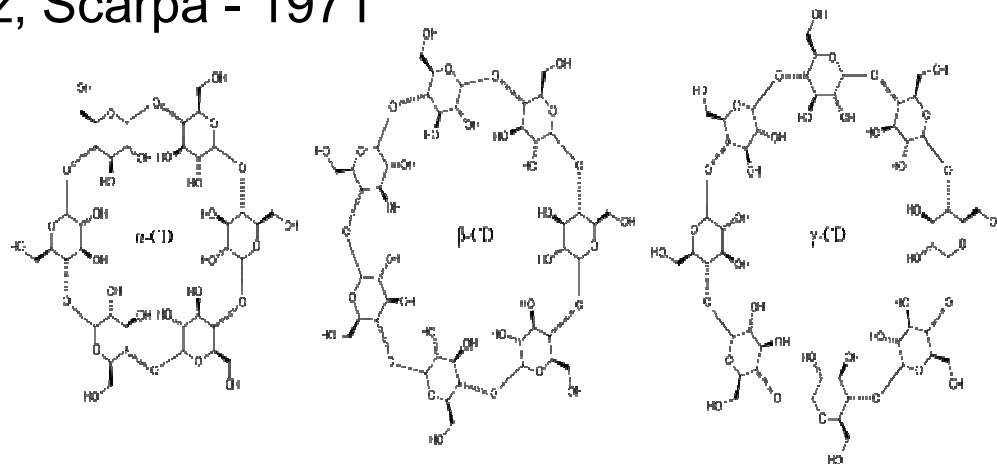
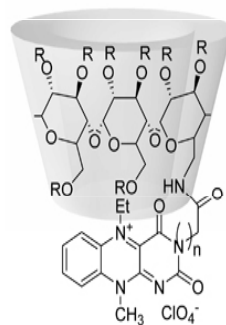
Umělé enzymy

Klotz, Scarpa - 1971

Synzymy

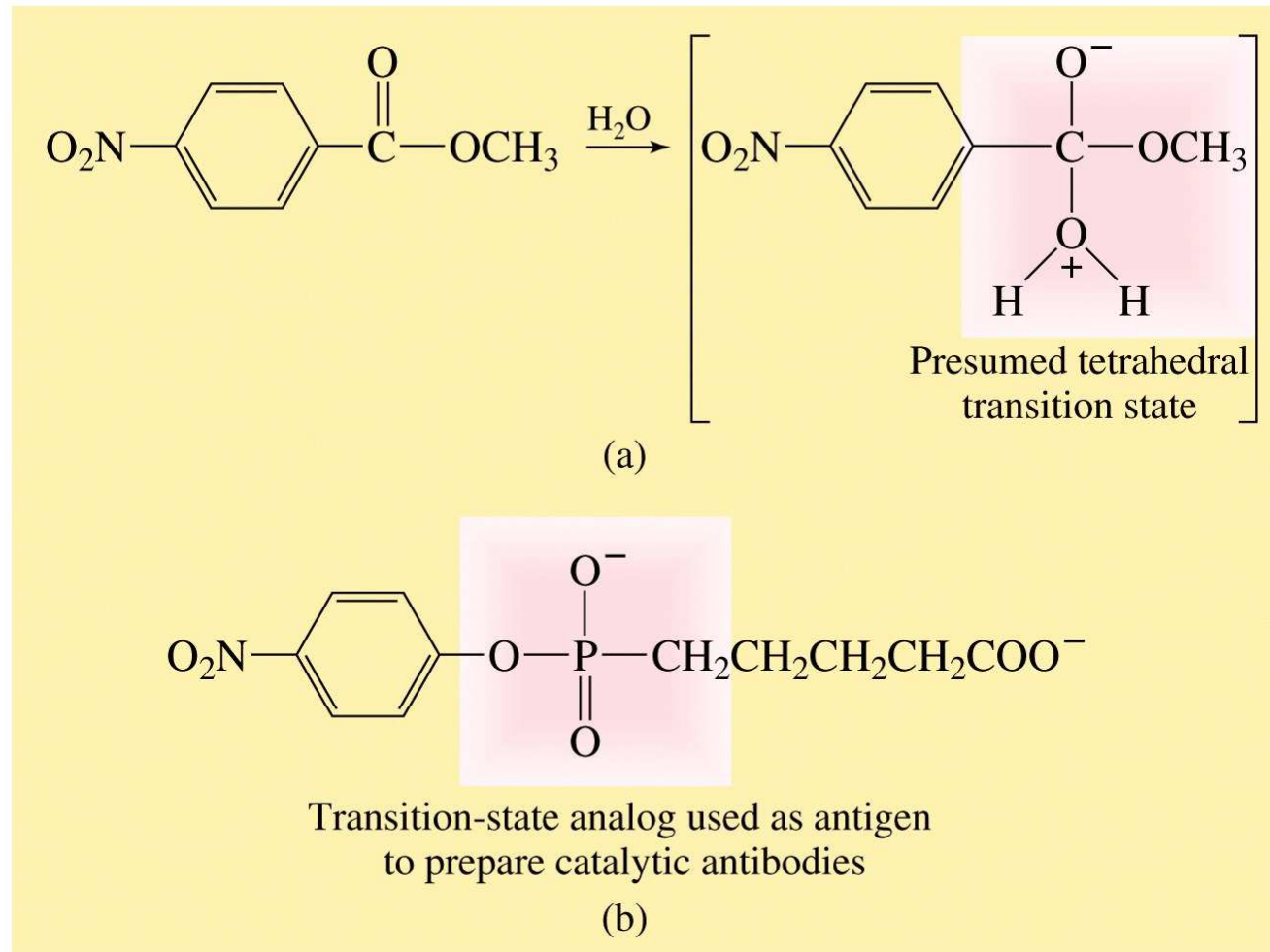
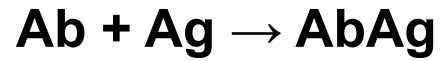


Flavin-4a-hydroperoxide



Abzymy

Schultz, Lerner - 1986



Ribozymy – katalytická RNA

1989 Nobelova cena

- Altman (Yale University) ribonukleasa P
- Cech (University of Colorado) mRNA



Ribonukleasa P (Altman)

všechny organismy

zrání tRNA

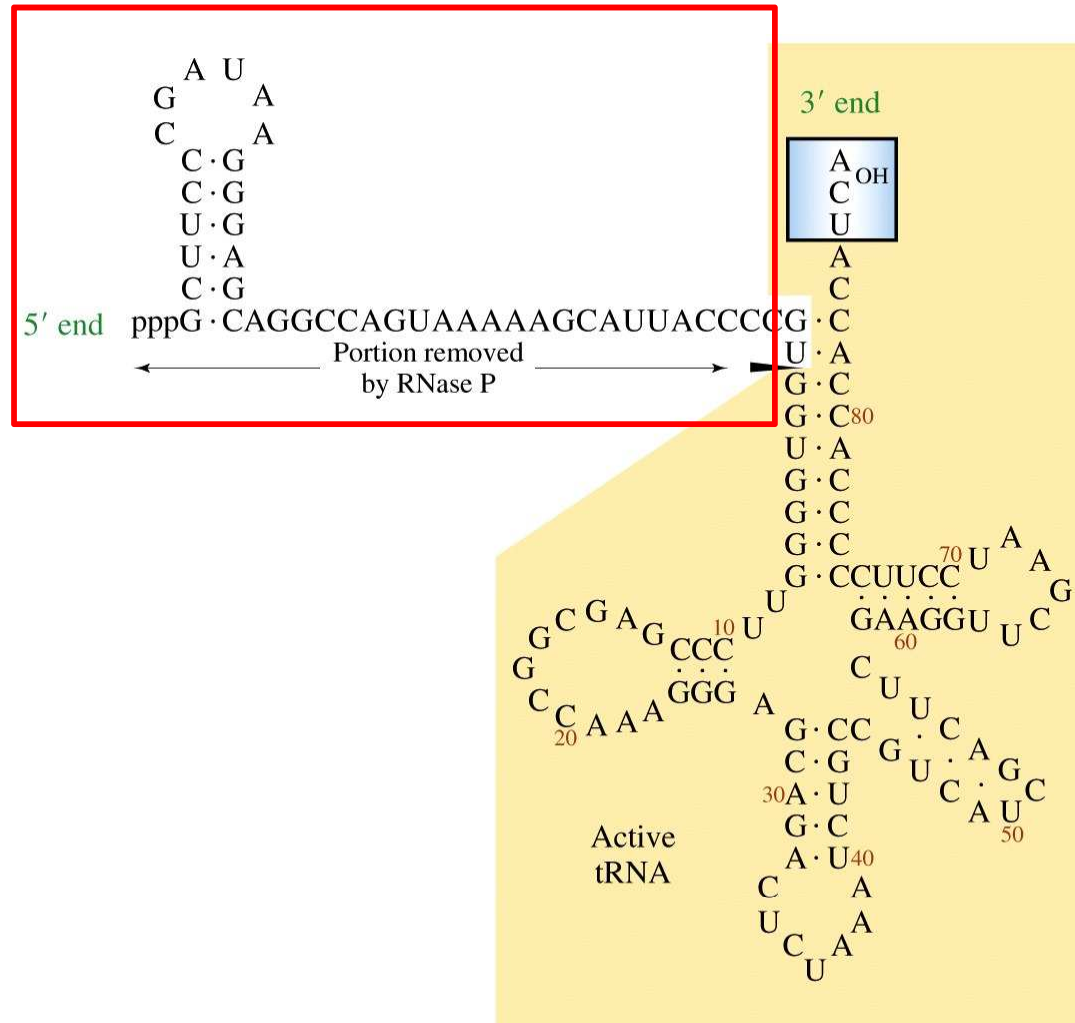


Figure 6-12 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Autokatalytická mRNA (Cech)

Tetrahymena thermophila

splicing

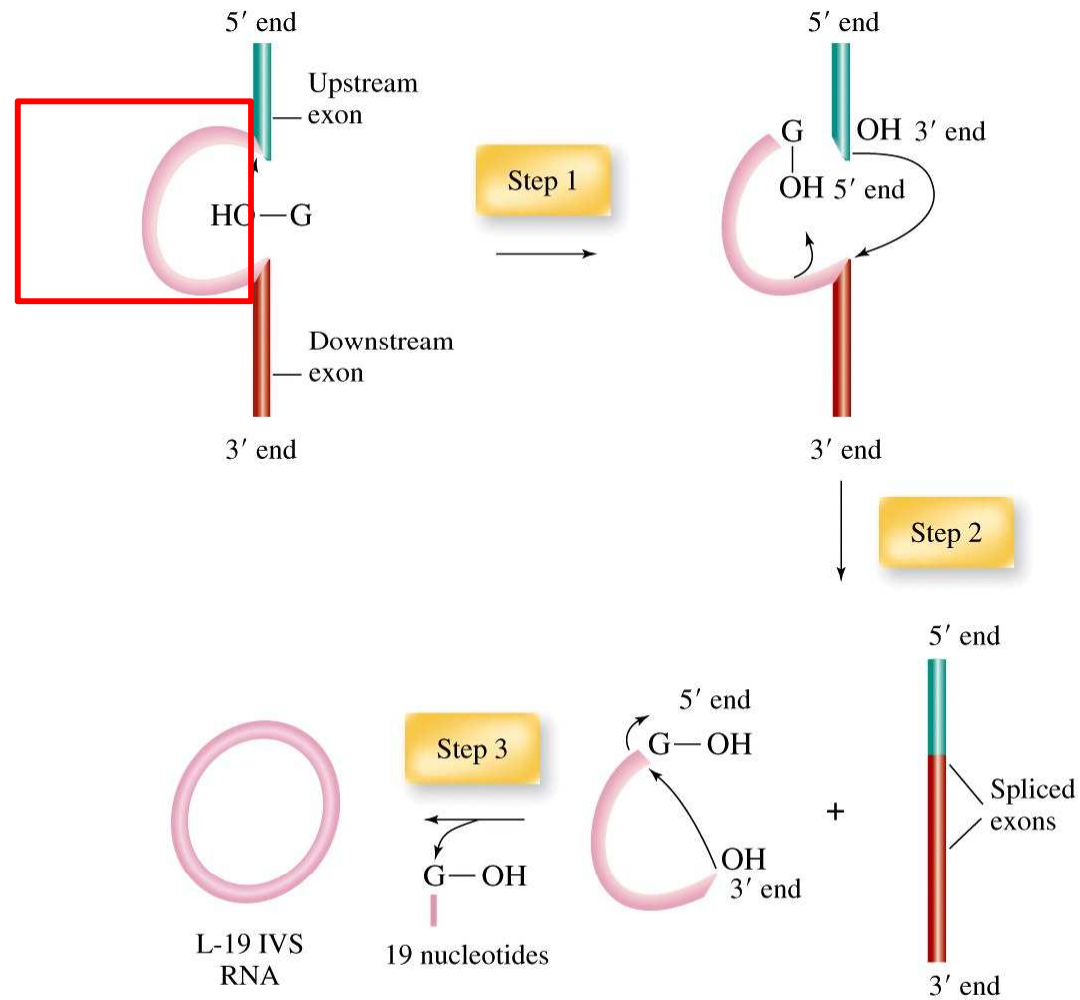
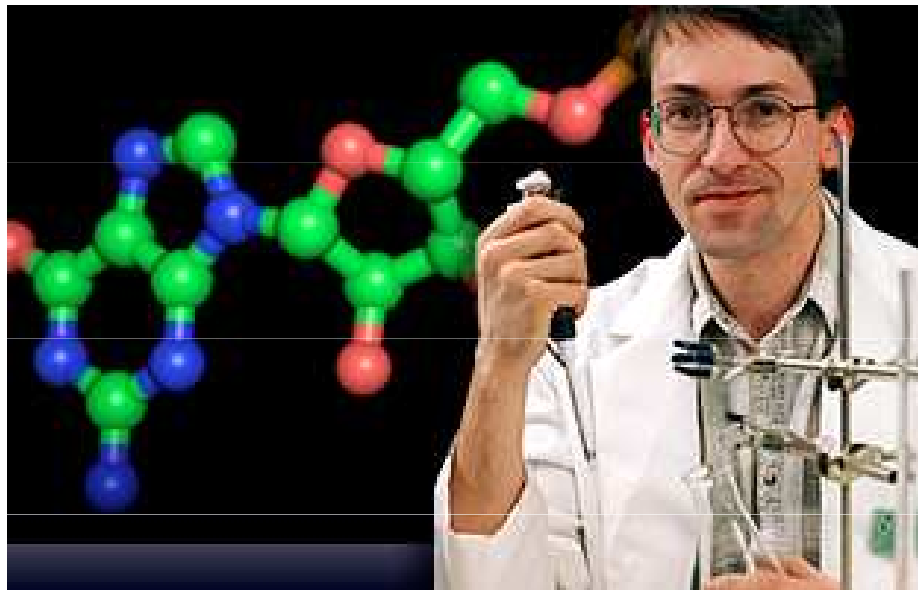


Figure 6-13 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

DNAzymy (1994)

- Ronald R. Breaker (Yale University)
- Štěpení RNA v přítomnosti Pb^{2+}

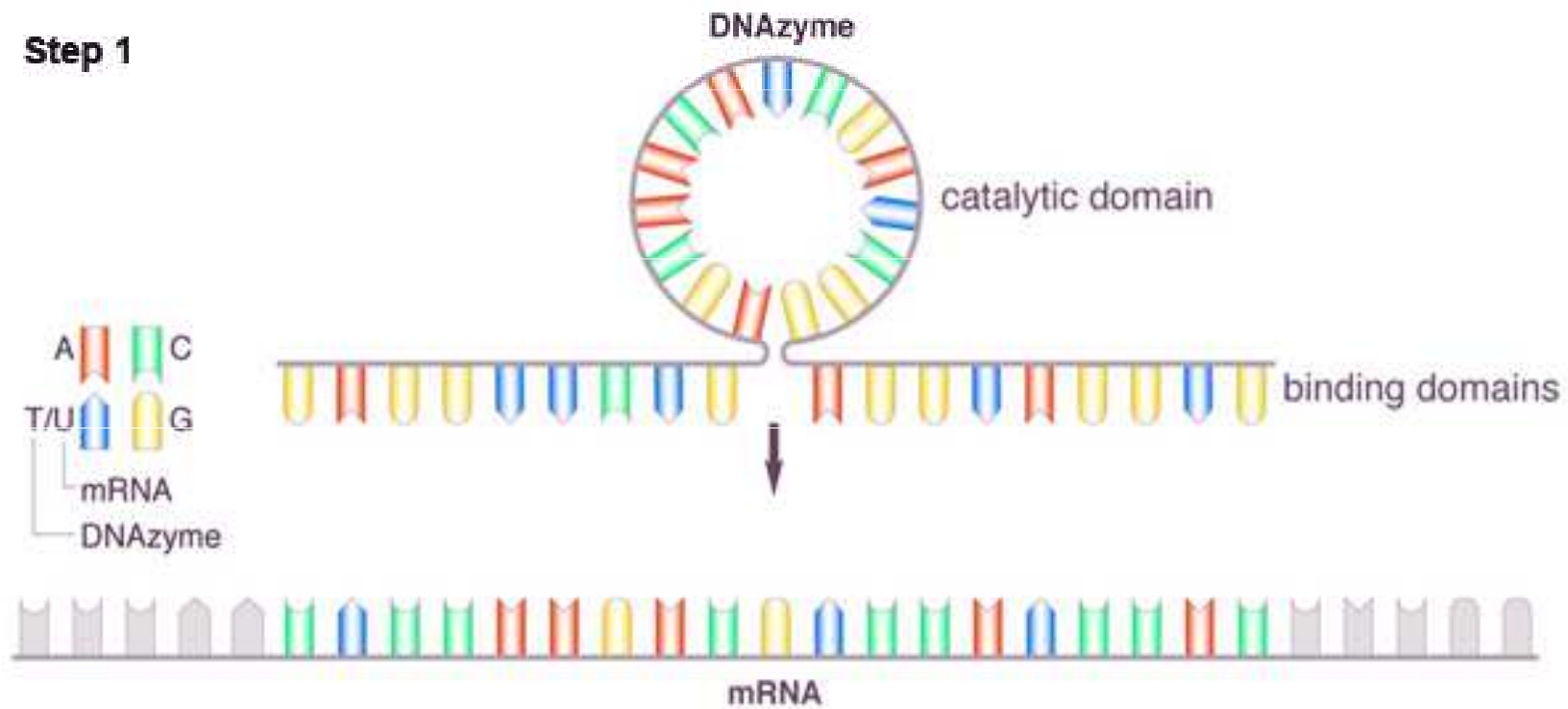


DNAzomy

- Katalyzují např. :
 - DNA fosforylaci
 - DNA adenylaci
 - DNA deglykosylaci
 - DNA štěpení

10-23 DNzyme

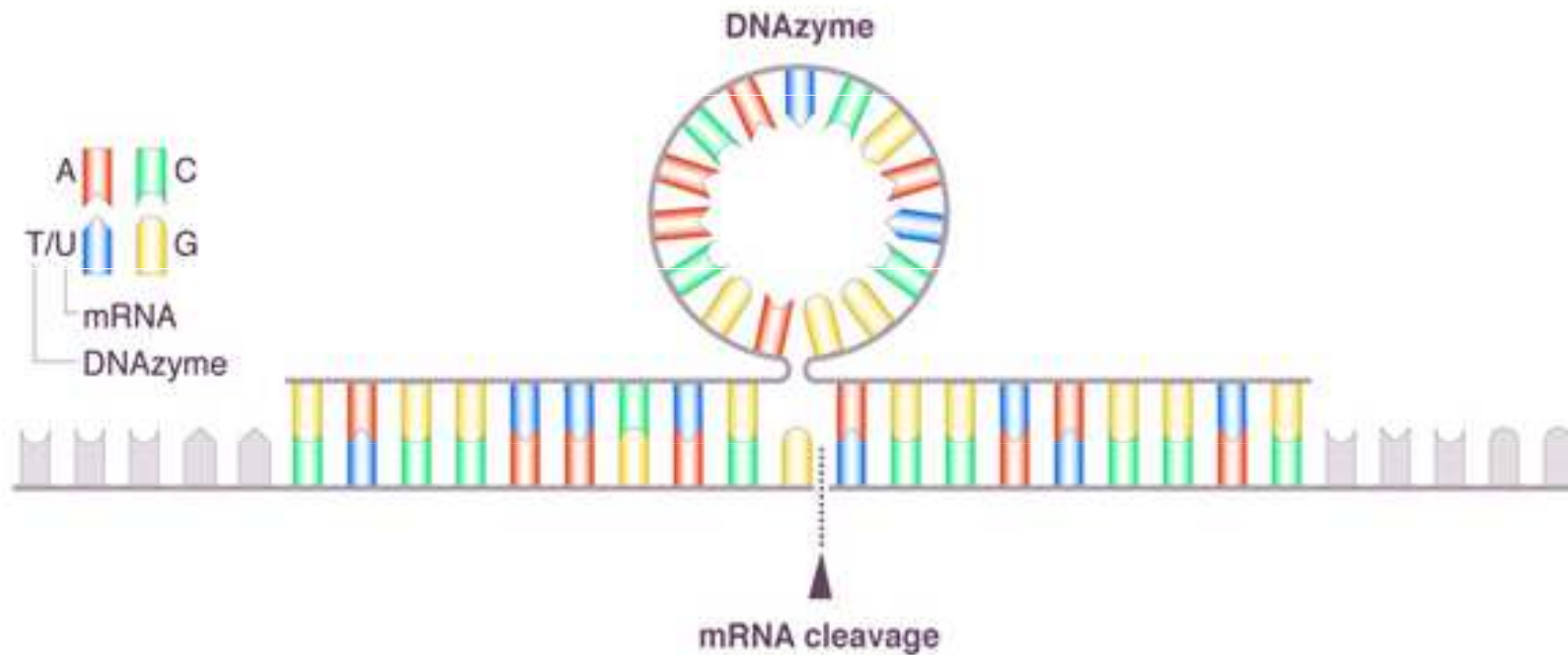
Step 1



Copyright sterna biologicals, all rights reserved.

10-23 DNazyme

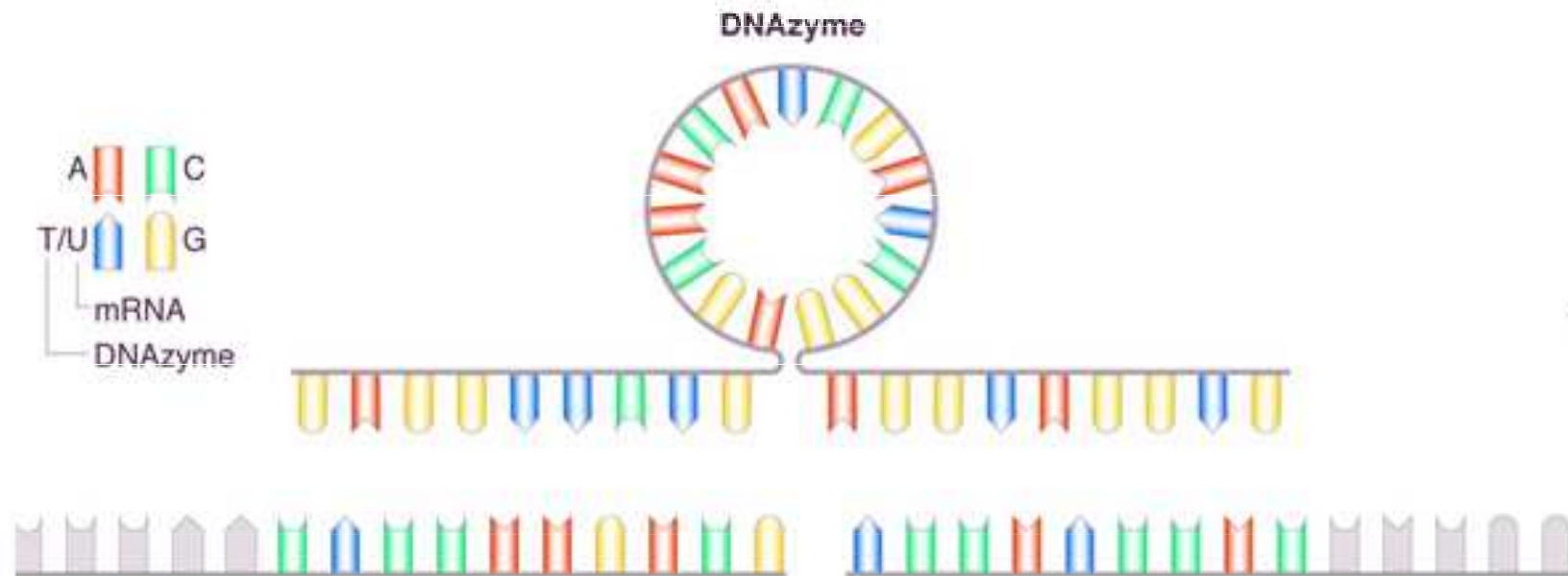
Step 2



Copyright sterna biologicals, all rights reserved.

10-23 DNzyme

Step 3



Copyright sterna biologicals, all rights reserved.

Aptamery

Synteticky vytvořené :

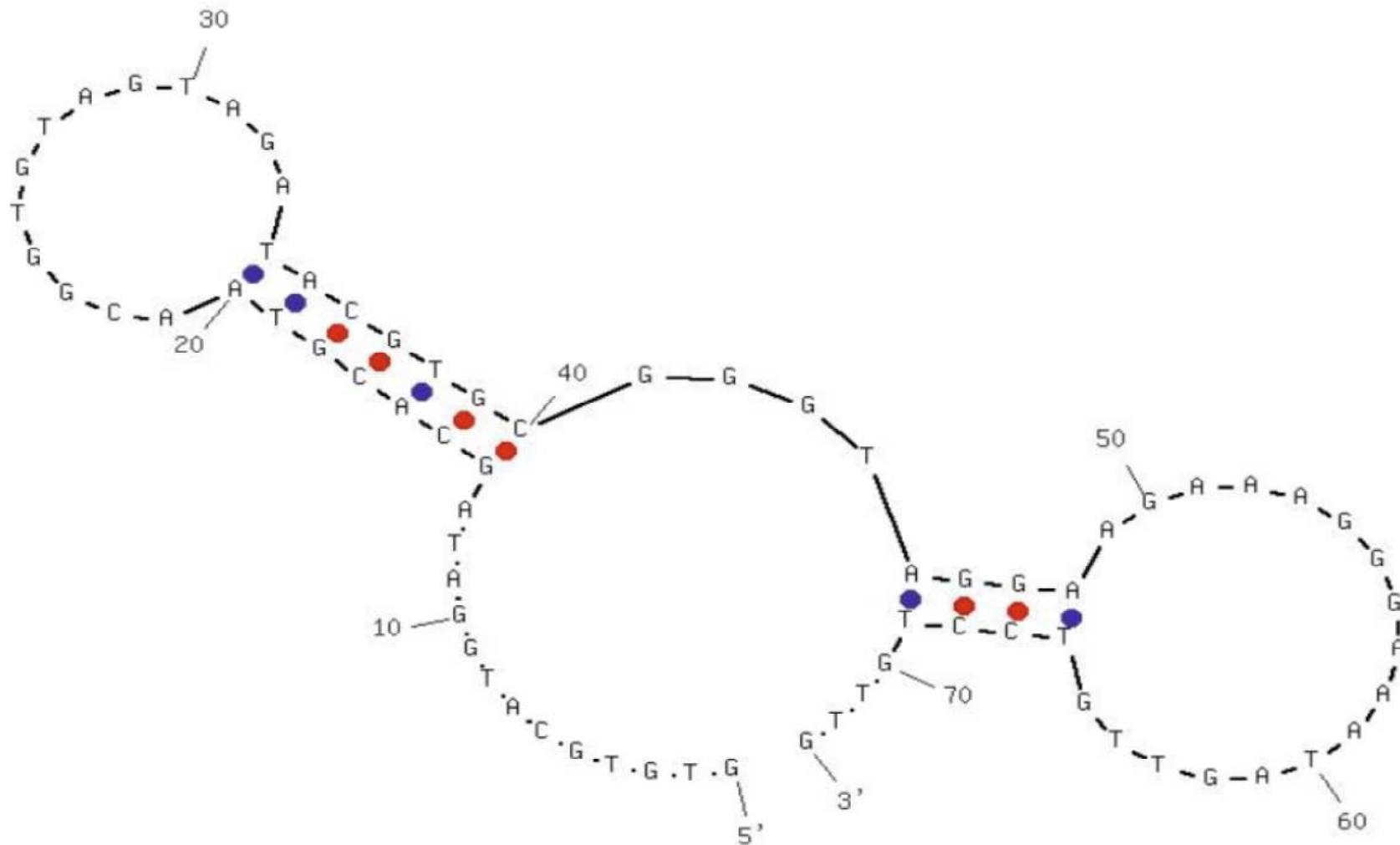
- RNA oligonukleotidy
- ssDNA oligonukleotidy
- peptidy

Aptamery

Synteticky vytvořené molekuly schopné se vázat na cílové molekuly :

- s vysokou afinitou
- s vysokou specifitou

Struktura aptameru proti hemaglutininu viru chřipky typu H5N1

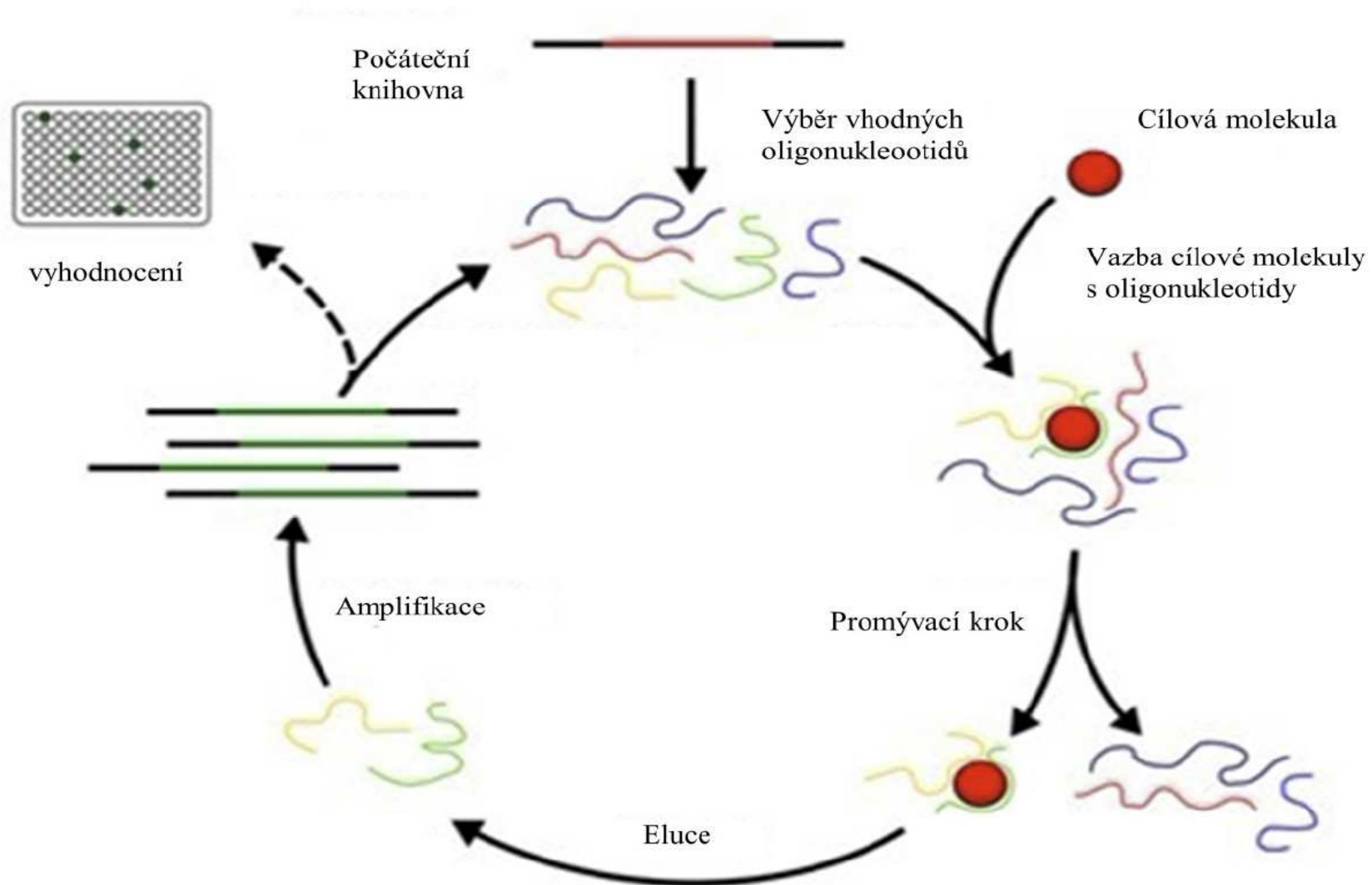


Aptamery versus protilátky

- Vysoká stabilita
- Jednoduchá výroba
- Nízká imunogenita
- Různé cílové molekuly

SELEX

Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment



Využití enzymů

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

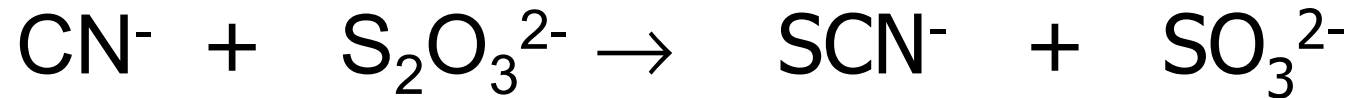
Využití enzymů

- Celé buňky
- Extrakty z buněk
- Enzymy volné *versus* imobilizované

Využití enzymů – celé buňky

- Nejstarší metody
- Potravinářství
 - Výroba sýrů a jogurtů (*Lactobacillus*)
 - Výroba piva a vína (*Saccharomyces cerevisiae*)
 - Výroba octa (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Chemické výroby
 - Výroba kyseliny citronové (*Aspergillus niger*)
 - Výroba antibiotik (plísně)
 - Výroba vitaminů, steroidů a aminokyselin
- Těžké technologie
 - Čištění odpadních vod
 - Zpracování rud

Rhodanasa (EC 2.8.1.1)



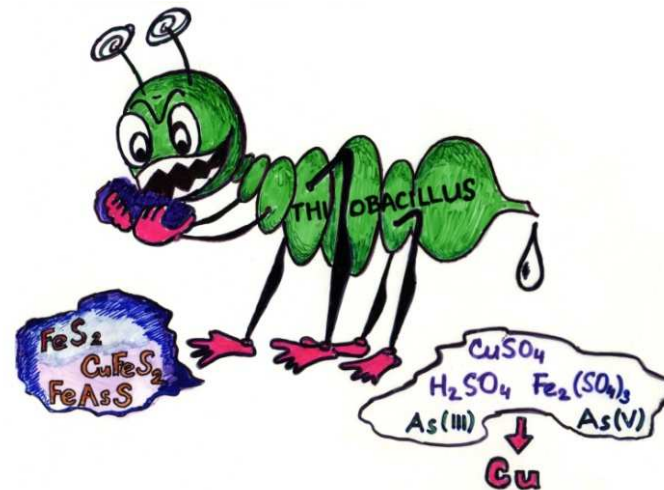
Homo sapiens

- Detoxikace kyanidu - otravy
- cigaretový kouř
 - glykosinoláty *Brassicaceae*

Acidithiobacillus ferrooxidans

Biohydrometalurgie

Životní prostředí



Využití enzymů – izolované enzymy

- Široká paleta enzymových preparátů
- Invertasa – výroba invertovaného cukru
- Proteasy, lipasy – prací prostředky
- DNA-polymerasy, restriční endonukleasy, ligasy – genové technologie
- β -galaktosidasa – odstraňování laktosy z mléka
- Další možná využití:
 - chemické synthesisy

Organické syntézy

- +
 - specifita (stereospecifita)
 - neextrémní podmínky (ekonomika, ŽP)
- - malá stabilita
 - nevodná prostředí
 - omezená dostupnost (cena)
 - regenerace

Volné *versus* imobilizované enzymy

Imobilizace enzymů

Vazba na nosič

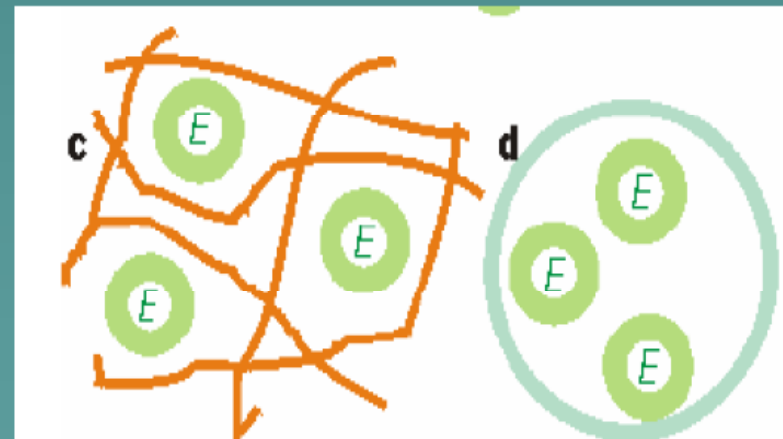
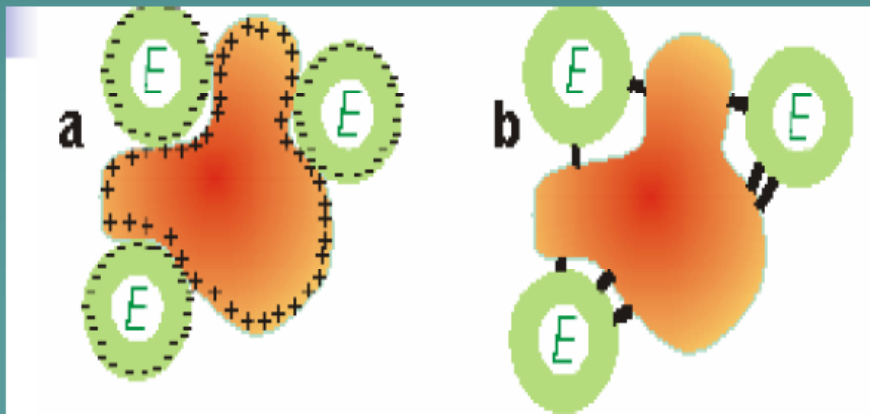
sorpcí

Kovalentní vazbou

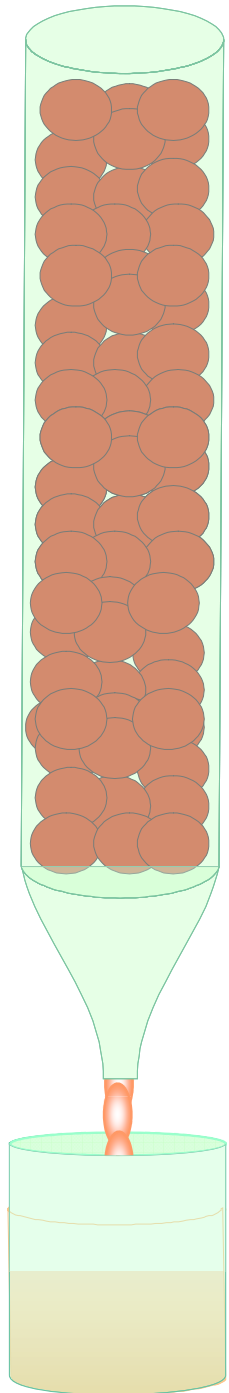
Zachycení (entrapment)

V matrici gelu

Opouzdření (encapsulation)



Výhody imobilizovaných enzymů



Stabilita enzymů vzrůstá v imobilizovaném stavu

Imobilizované enzymy mohou být používány opakovaně → pokles nákladů

Produkt reakce není kontaminován enzymem → odpadá potřeba purifikace

Imobilizované enzymy mohou být použity v kontinuálních procesech

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Proteolytické enzymy

- Biodetergenty (termostabilní, alkalické bakteriální proteasy)
- Mlékárenský průmysl (chymosin z telecích žaludků → specifická proteolýza kapa-kaseinu → tvorba sýřeniny)
- Krmivářský průmysl → výroba technických hydrolyzátů bílkovin
- Masný průmysl → tenderizace (změkčení) masa (rostlinná proteasa papain)
- Pivovarnictví → enzymové stabilizátory piva (odstraňování chladových zákalů)

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Amylasy

- α -amylasy \rightarrow hydrolýza 1,4- α -glukosidických vazeb uvnitř polysacharidové molekuly
- Ztekucování škrobu (nezbytné při následné výrobě glukosových syrupů a glukosy)
- Součást biodetergentů (odstraňování škrobového pojidla z textilních vláken)

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů (glykosidasy)

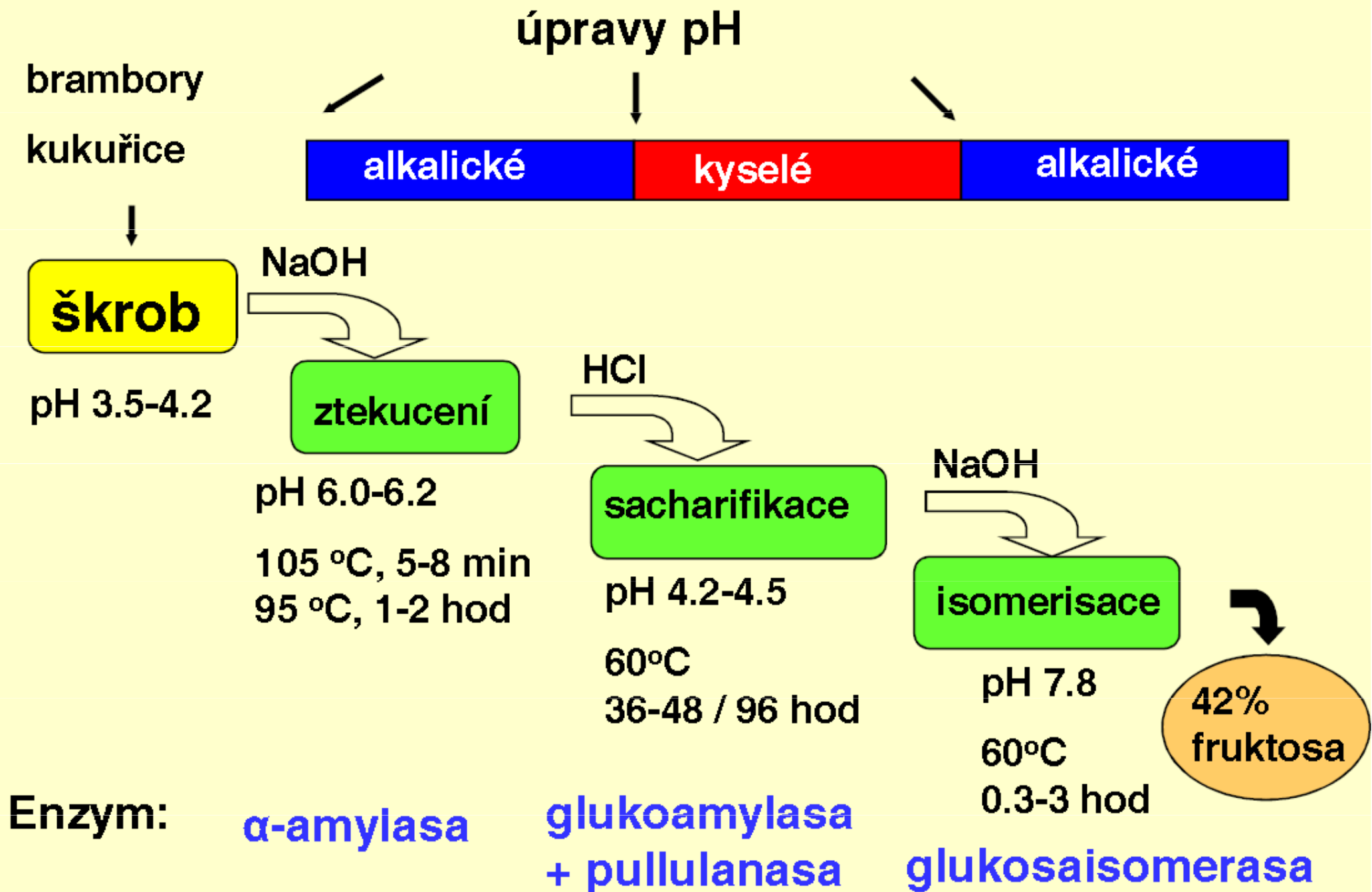
- β -amylasy \rightarrow odštěpují maltosové jednotky z neredukujícího konce polysacharidového řetězce
- Glukoamylasa \rightarrow odštěpuje glukosové jednotky od neredukujícího konce (zpracování škrobu na škrobové sirupy; odbourávání zbytkových dextrinů v pivu \rightarrow vyšší stupeň prokvašení, diabetické pivo)
- Invertasa \rightarrow hydrolýza sacharosy na glukosu a fruktosu, výroba invertního cukru
- β -galaktosidasa \rightarrow hydrolýza laktosy na glukosu a galaktosu (výroba delaktosovaného mléka, mléko pro výrobu zmrzliny (zabránění krystalizace laktosy))

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Glukosaisomerasa (xylosaisomerasa)

- Isomerace glukosy na fruktosu
- Výroba fruktosových sirupů (42 % - 55 % fruktosy) z glukosových sirupů (zejména z kukuřičných a obilních škrobů) → vyšší sladivost

Sacharidy ze škrobu



Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

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 v krmných směsích, zvýšení účinnosti extrakce šťav z rostlinných materiálů

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Lipasy

- Biodetergenty
- Ovlivnění chuti a vůně potravinářských výrobků (sýrařství !!!)
- Součást digestivních přípravků

Příklady lékařských aplikací enzymů

- Fibrinolýza (cílené rozpouštění krevních sraženin) → plasmin, **streptokinasa, urokinasa (aktivátory plasminogenu)**
- Cílená tvorba krevních sraženin → thrombin
- Trávicí enzymy
- Trypsin → čištění ran od hnisu
- Lysozym → oční kapky

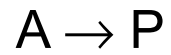
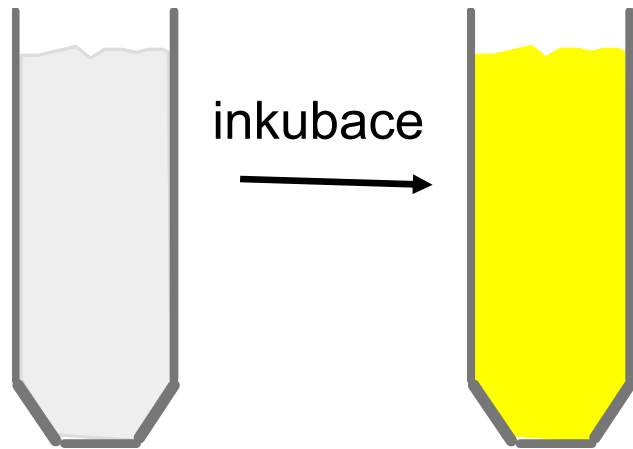
Enzymy jako analytická čidla

- Specifita – reagují pouze s daným substrátem
- Citlivost
- Analýza nepřečištěným vzorků – tělní tekutiny

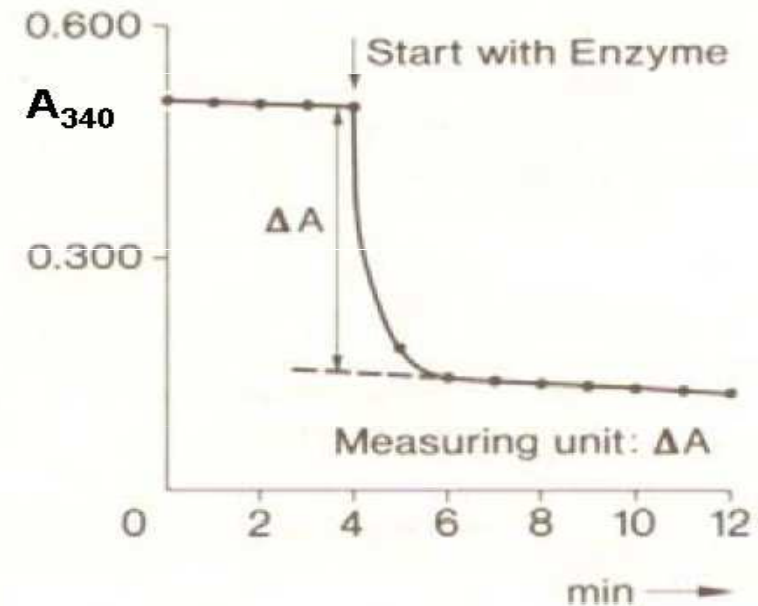
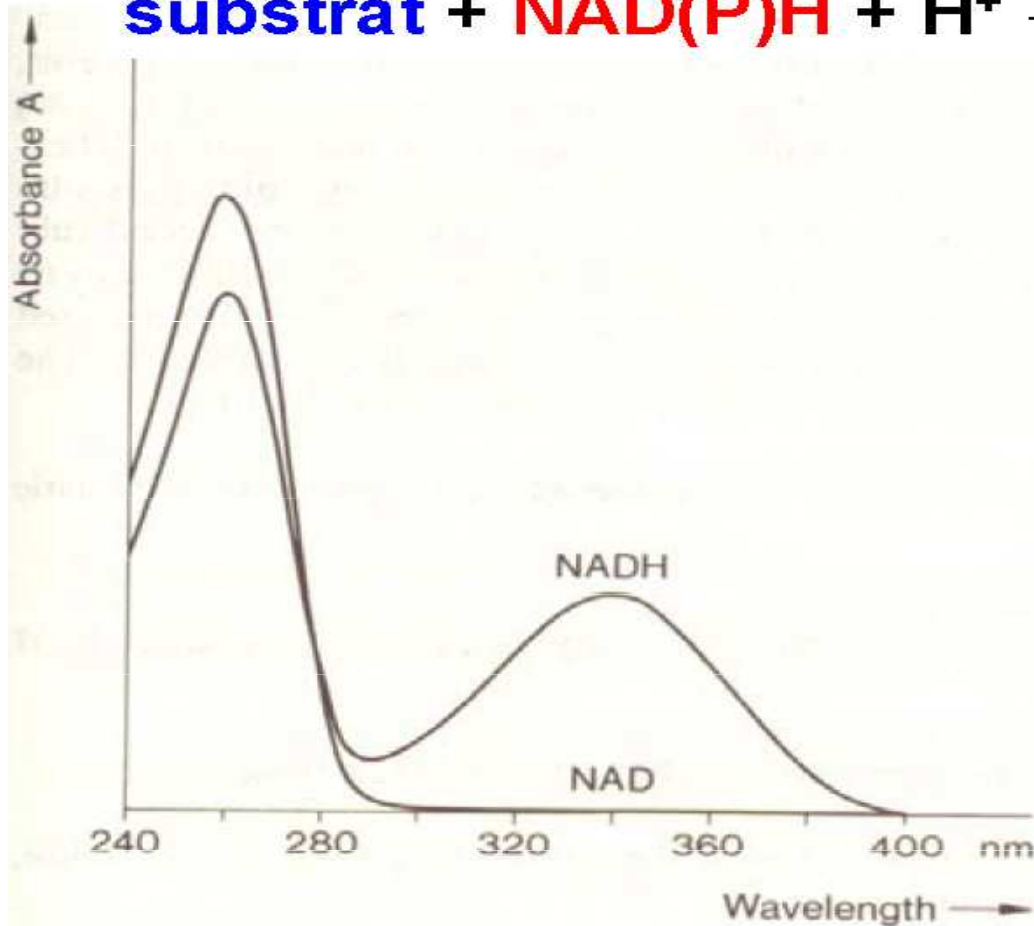
Analytická biochemie

- Stanovení substrátů
- Stanovení inhibitorů
- Stanovení aktivity enzymů

End-point versus kinetické stanovení



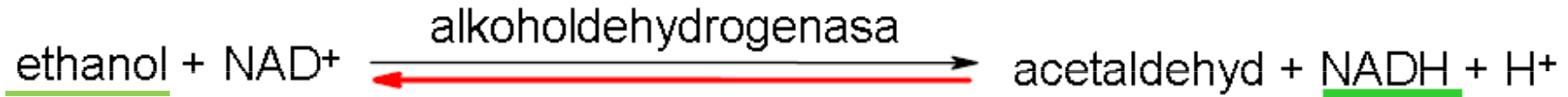
Reakce v roztoku



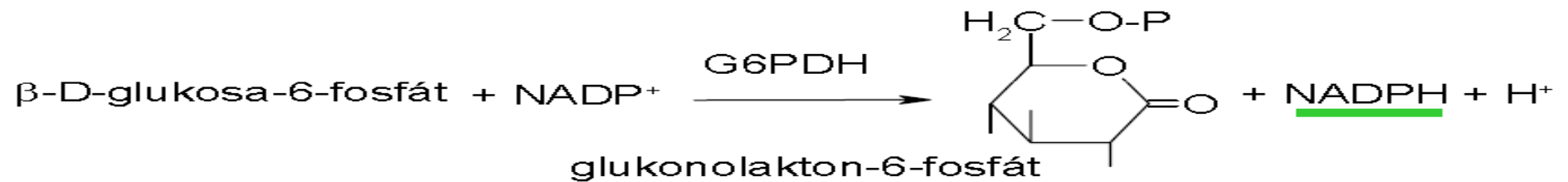
Výpočet látkového množství substrátu:

$$n = \frac{V \cdot \Delta A}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot l}$$

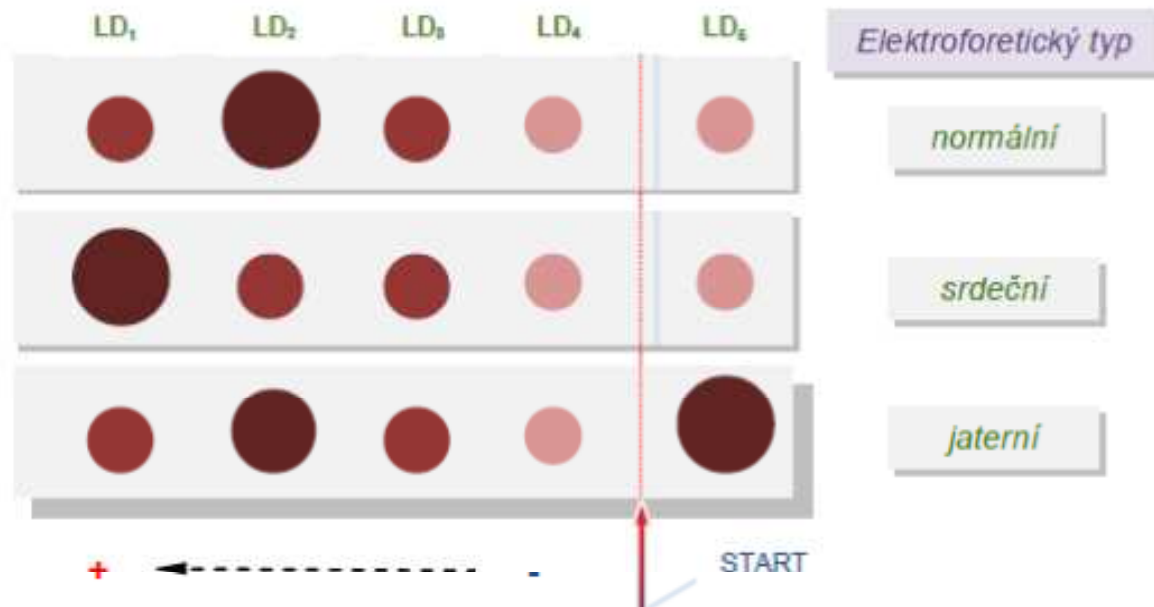
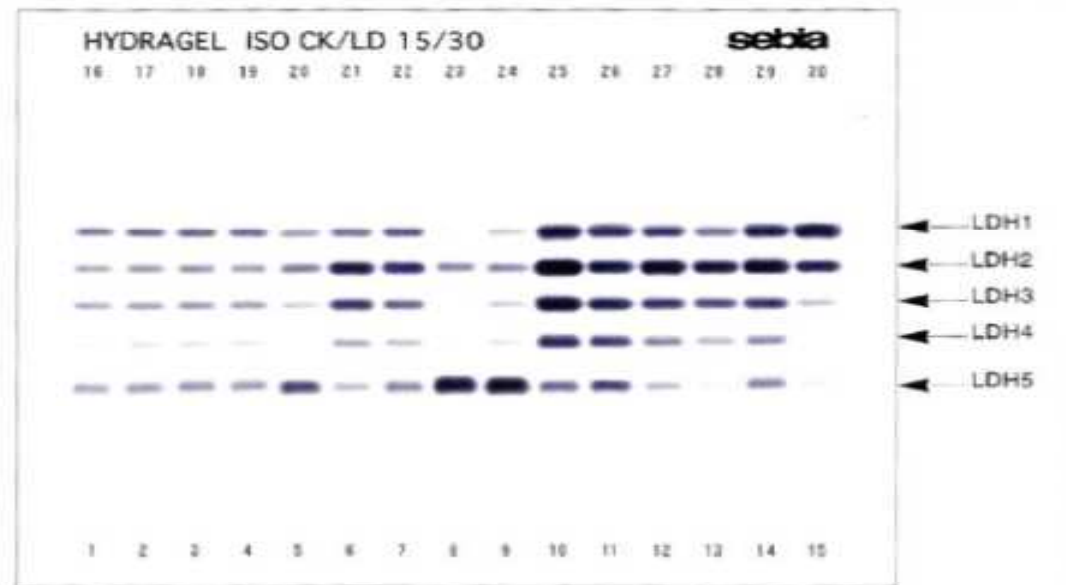
- Přímé stanovení



- Pomocná reakce



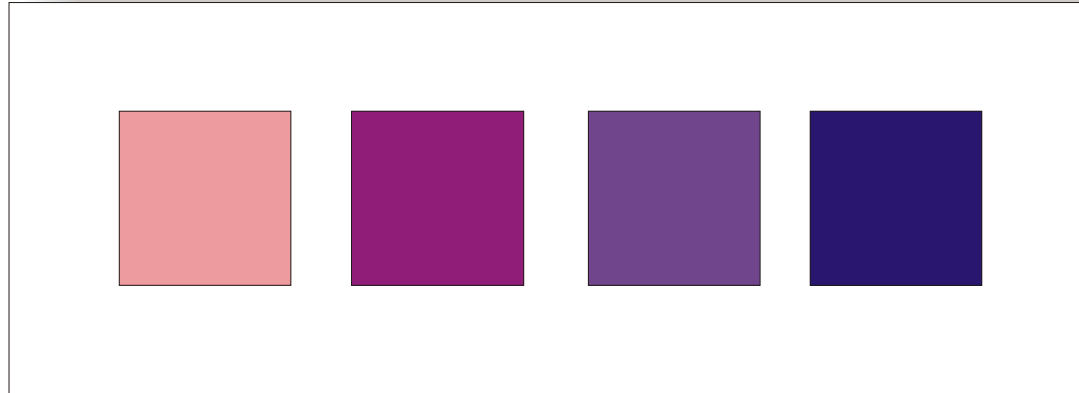
Izoenzymy LHD



Automatické analyzátořy

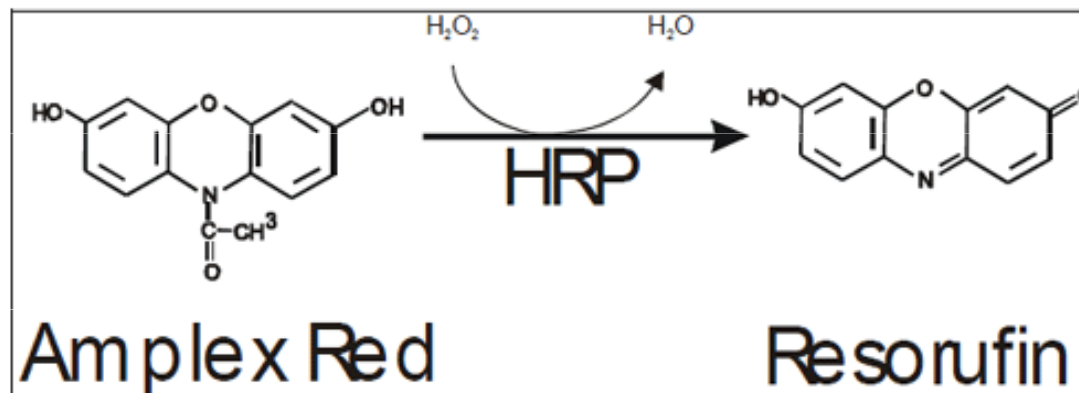
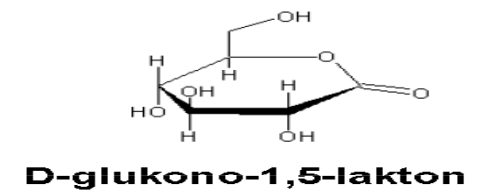
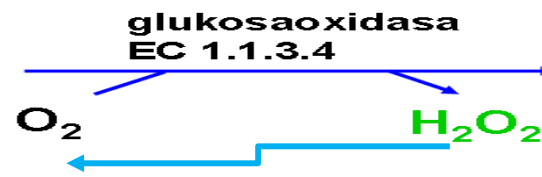
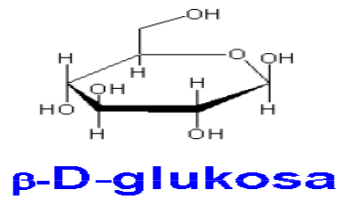


Diagnostické proužky

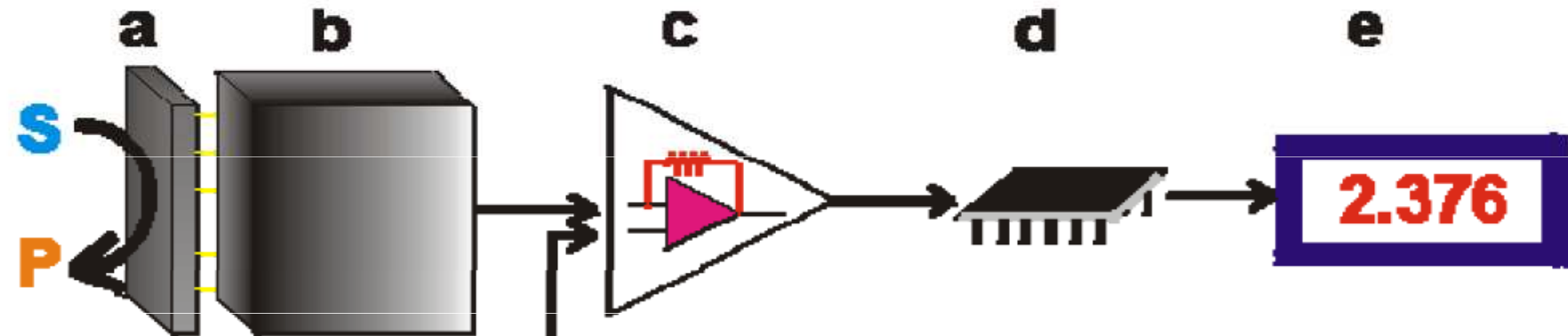


žádná
glukosa

Zvyšující se množství glukosy →



Biosenzory



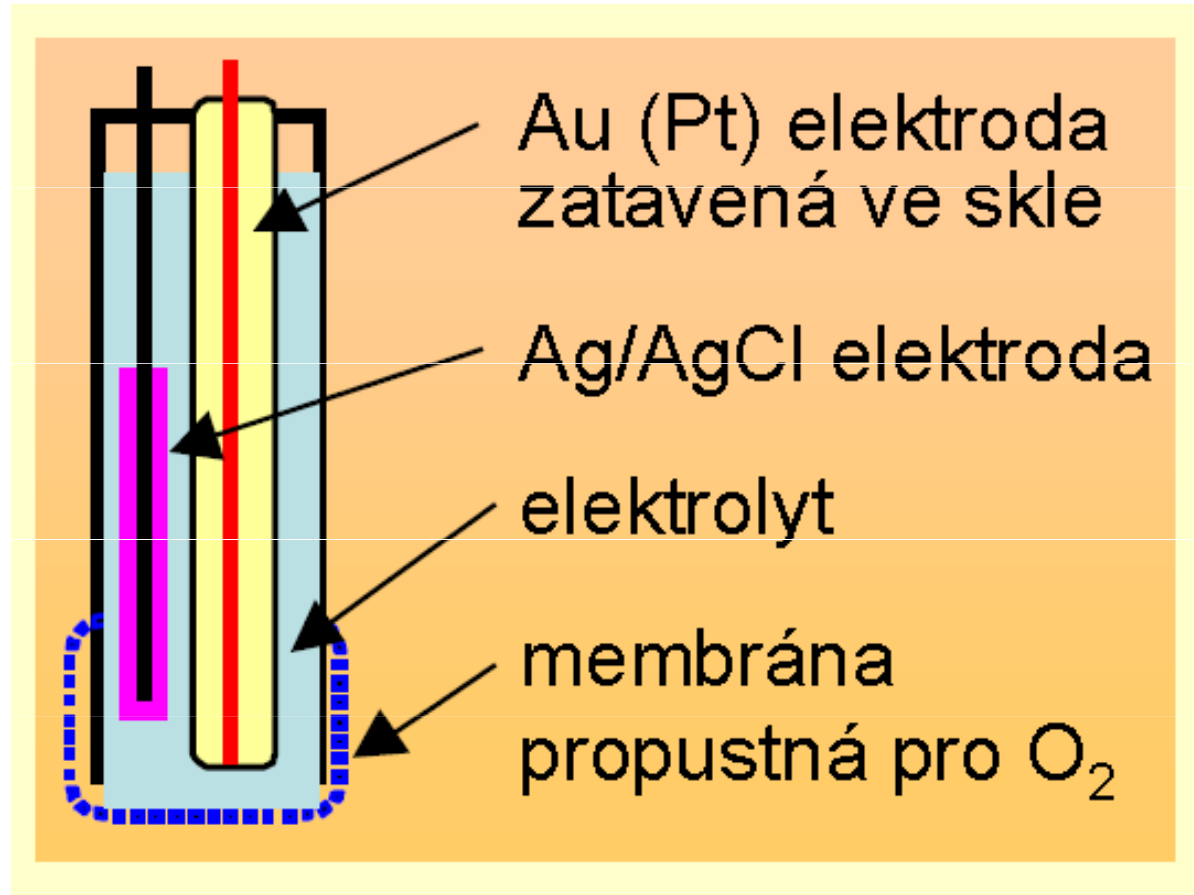
Reference

- a) Biokatalyzátor (přeměna substrátu na produkt)
- b) Převodník (generování elektrického signálu)
- c) Zesilovač (zesílení signálu)
- d) Procesor (vyhodnocení signálu)
- e) Výstup výsledku

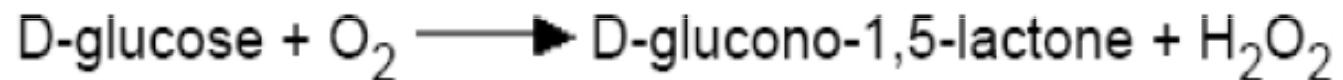
- výměna tepla
- redistribuce iontů a změna elektrického potenciálu
- výměna elektronů
- změna vodivosti
- změna optických vlastností
- změna hmotnosti

Amperometrické biosenzory

Leland C. Clark Jr.
1956



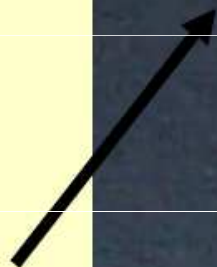
glucose oxidase



Biosensor pro glukosu

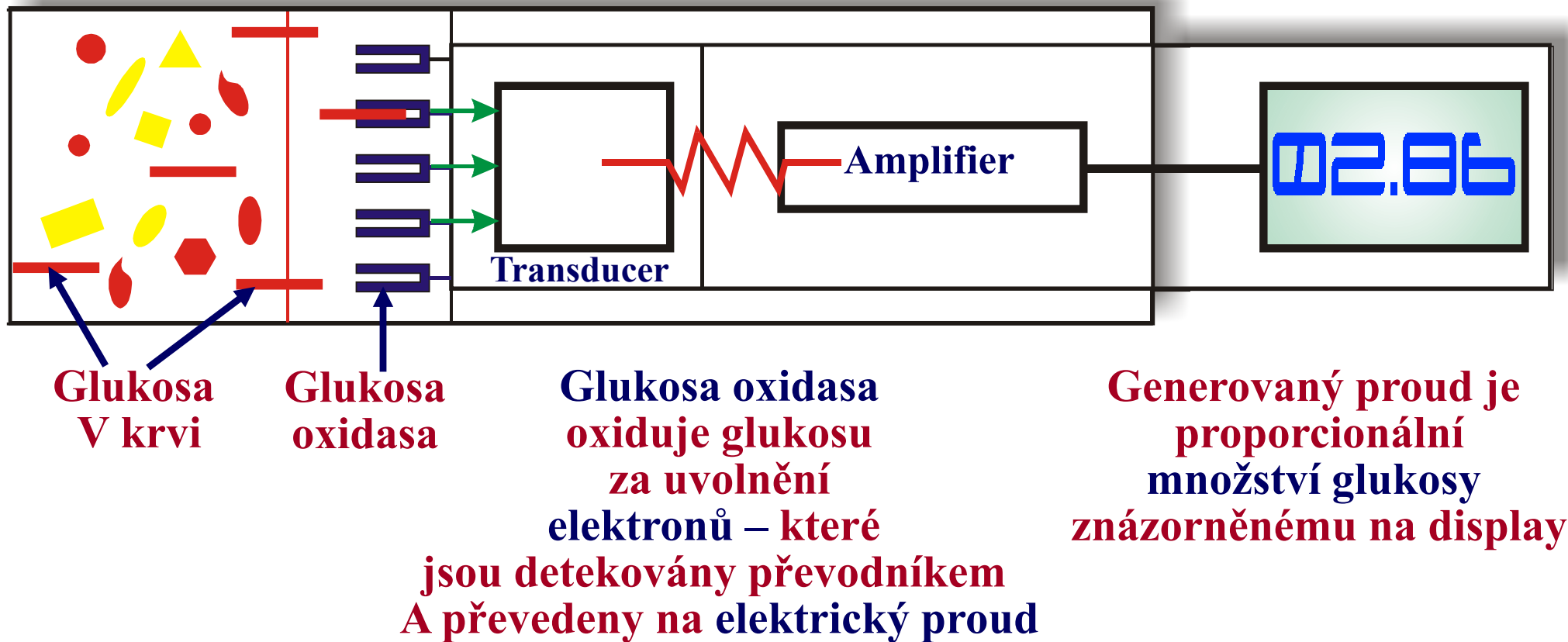


Enzymová elektroda
na jedno použití

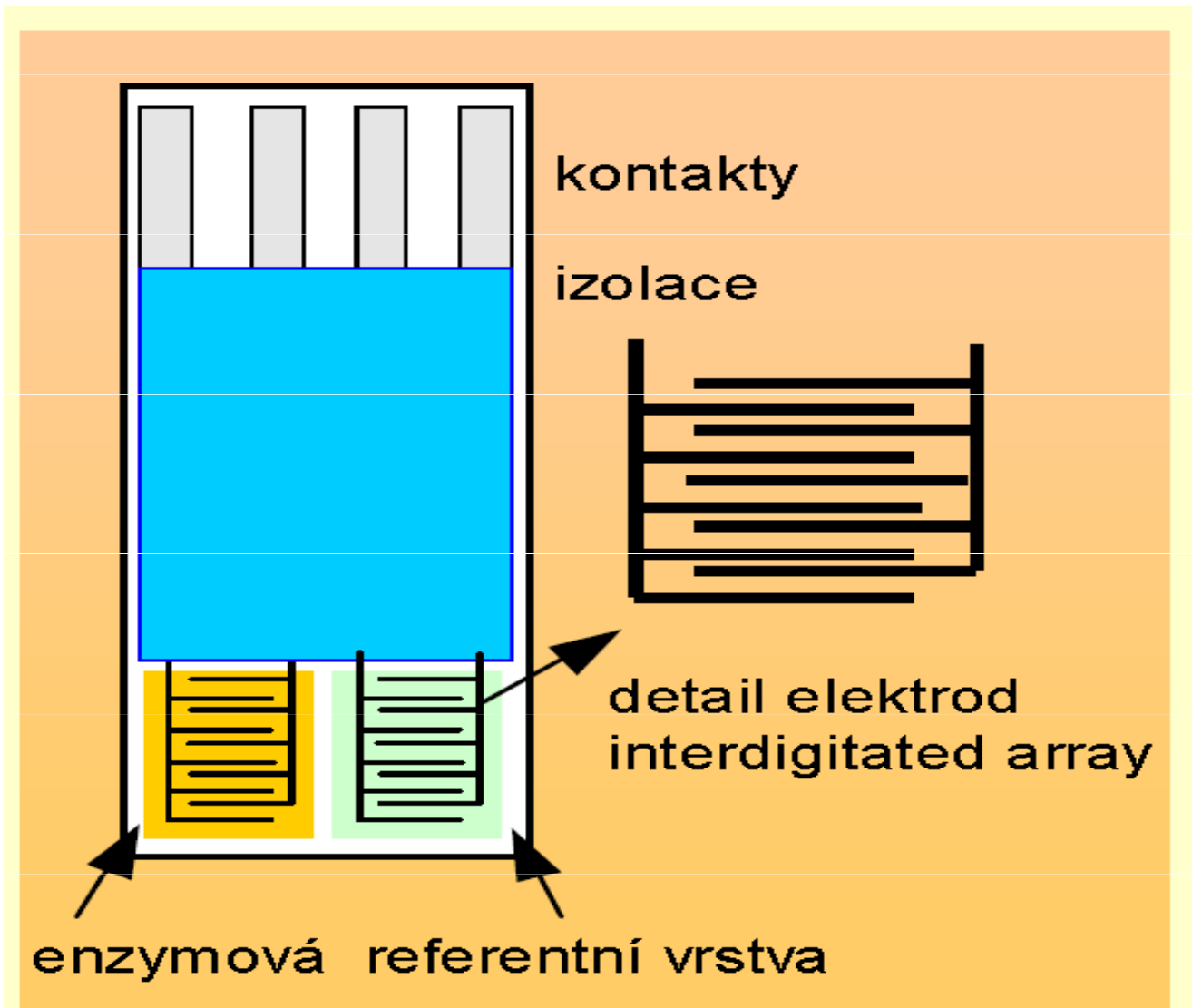


Měřicí jednotka

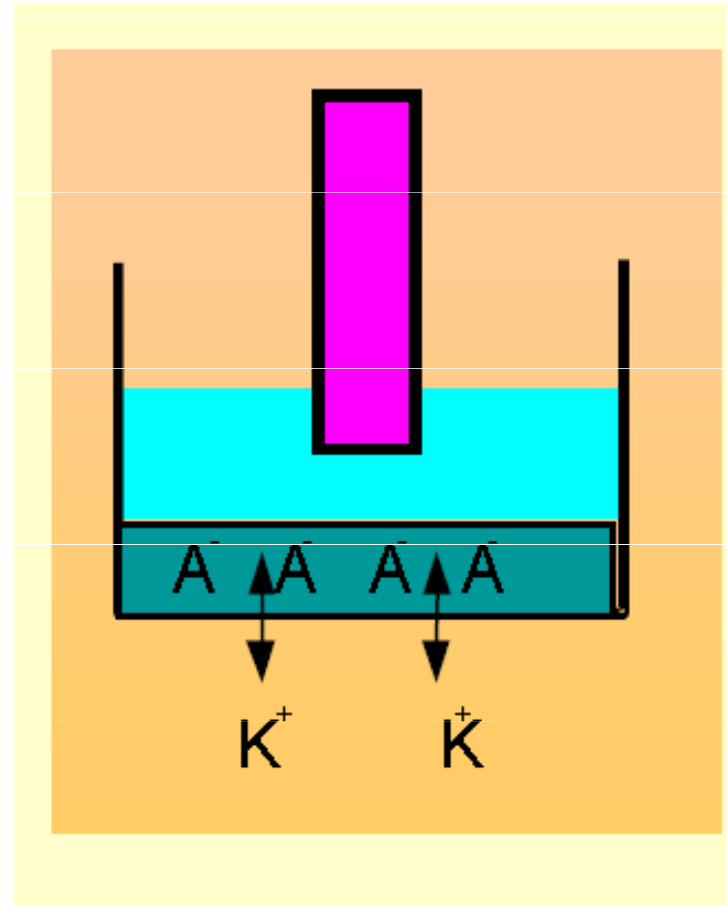
Biosensor na glukosu



Konduktometrické biosenzory

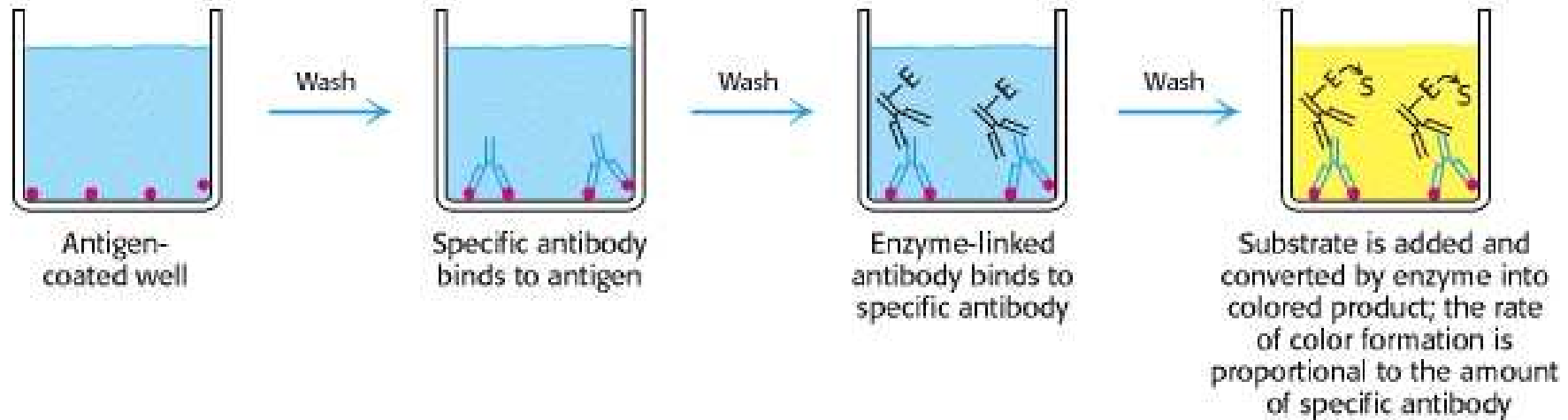


Potenciometrické biosenzory

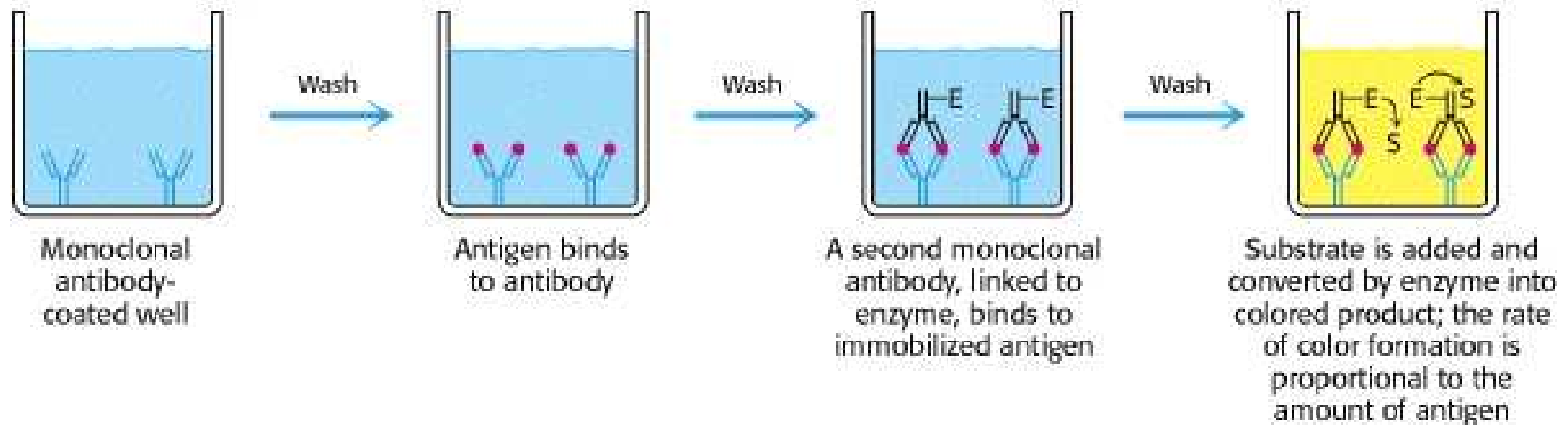


ELISA

(A) Indirect ELISA



(B) Sandwich ELISA

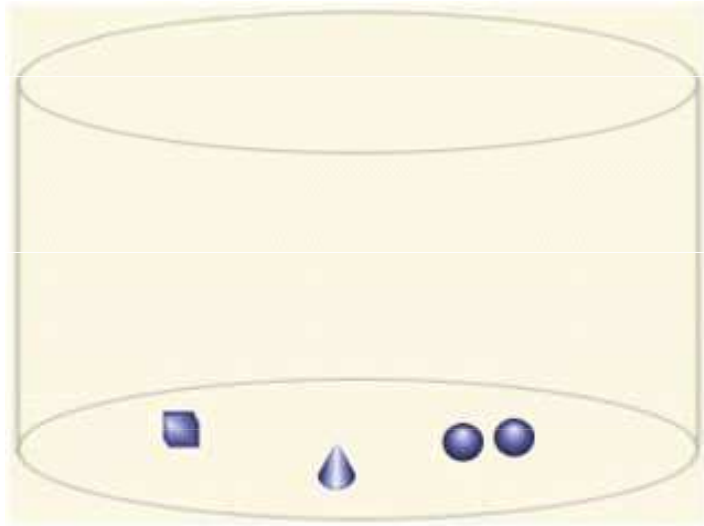


ELISA – stanovení antigenu

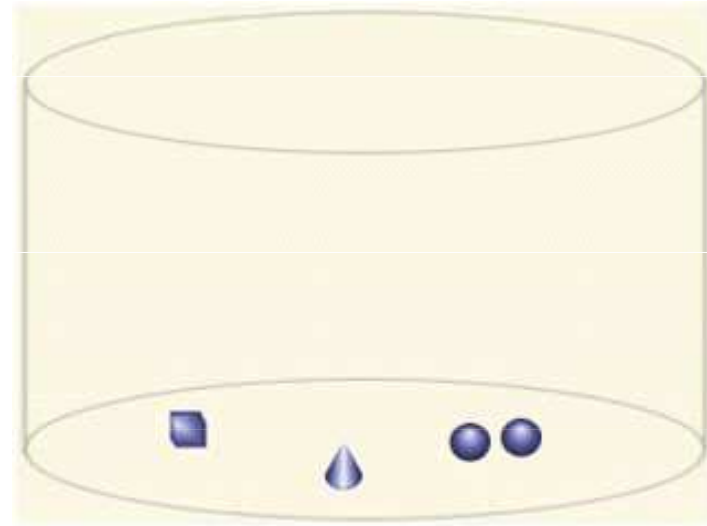


ELISA – stanovení protilátky

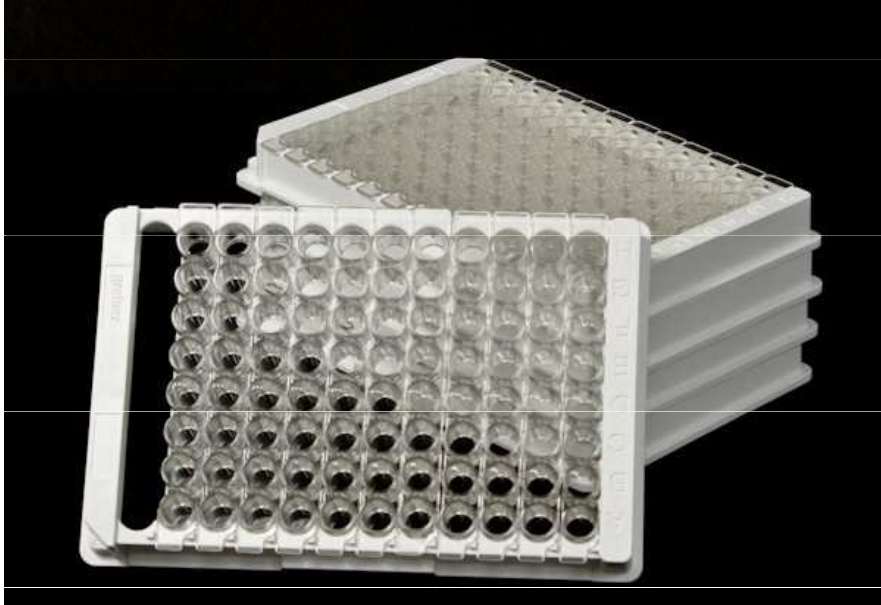
negativní



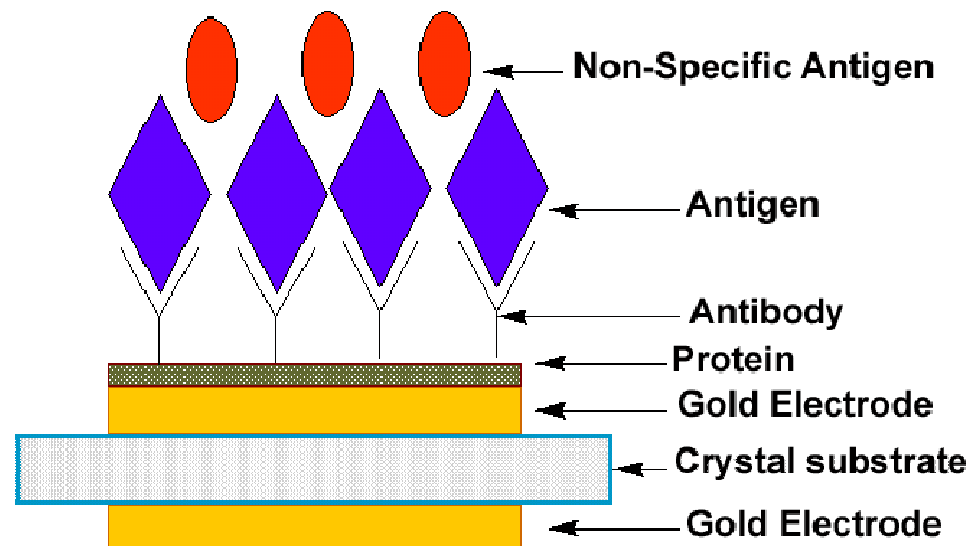
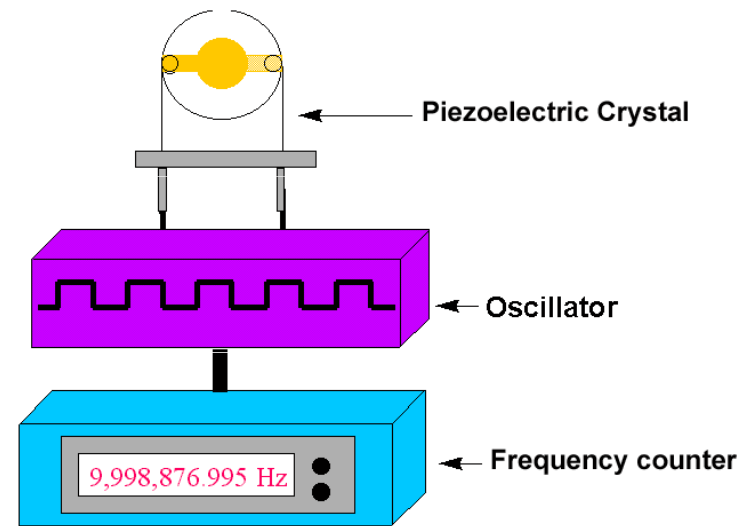
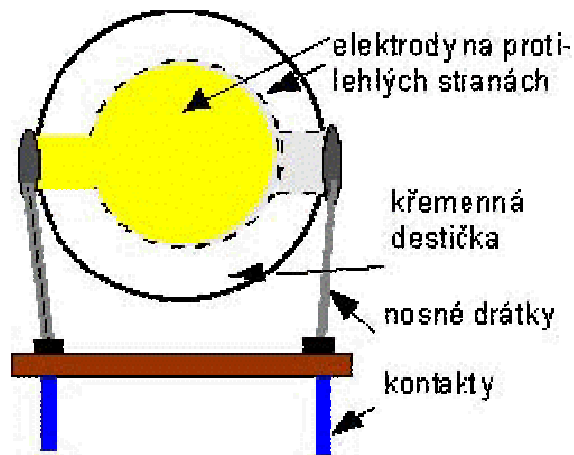
pozitivní



ELISA - vybavení



Piezoelektrický biosenzor



Kantilever

