

# Enzymy

Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.

## ENZYMY JAKO HOMOGENNÍ BOKATALYZÁTORY

1. Bílkovinná povaha ( + některé RNA-enzymy - ribozymy)
2. Větší účinnost (faktor minimálně  $10^6$ )
3. Specifičnost - substrátová
  - mechanismu účinku
3. Regulovatelnost - na úrovni genomu (indukce, represe)
  - na úrovni enzymu (allosterický efekt, kovalentně)
  - proteolyticky (prekursory - zymogeny)
4. Kompartmentace
5. Snižují aktivační energii, neovlivňují rovnovážnou konstantu
  - přiblížení reaktantů, stabilizace aktivovaného komplexu

### PŘÍKLADY ÚČINNOSTI ENZYMOVÉ KATALÝZY

rozklad 2 molů $\text{H}_2\text{O}_2$ na 2 $\text{H}_2\text{O}$ a $\text{O}_2$	$E_a$
nekatalyzovaná reakce	75 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
katalýza koloidní platinou (anorganická)	49 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
katalýza katalasou	8 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

Urychlení reakce při dané teplotě na desetinásobek snižuje aktivační energii o hodnotu - R.T. ln 10, tj. pro 37 °C, neboli 310,15 K o - 5,9  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . (log 10)

Pro nekatalyzovanou reakci zhruba platí orientační úvaha, že zvýšení teploty o 10 °C zrychluje reakci na dvojnásobek

Číslo přeměny některých enzymů ( $k_{\text{cat}}$ )	( $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) $\text{s}^{-1}$
karbonátdehydratasa	600 000
acetylcholinesterasa	25 000
laktátdehydrogenasa	1 000
chymotrypsin	100
DNA- polymerasa	15
lysozym	0,5

Pro většinu fyziologických substrátů je maximální molární aktivita v rozsahu 1 –  $10^4$  molekul za vteřinu přeměněných 1 molekulou enzymu za optimálních podmínek (saturace enzymu substrátem).

**AKTIVAČNÍ ENERGIE  $E_a$  ( $\Delta G^*$ )**  
**je minimální energie potřebná k zahájení reakce. Její hodnota je vždy kladná (endergonická reakce).**

Podle **kolizní teorie** je k zahájení reakce zapotřebí určité kritické *frekvence účinných srážek* reagujících molekul k překonání energetických bariér jejich elektronových slupek. Podíl *účinných srážek* vůči neúčinným je velmi malý (např.  $1:10^{10}$ ) a závisí na teplotě (kinetická energie molekul) a koncentraci reagujících látek.

Podle teorie **aktivovaného komplexu** je k zahájení reakce zapotřebí určitá kritická *koncentrace tohoto komplexu (přechodného stavu)* bohatšího energií.

$\Delta G^*$  je rozdíl volné enthalpie (energie) mezi tímto komplexem a substrátem a má vztah k rovnovážné konstantě tvorby a rozpadu tohoto komplexu. **Enzymy** usnadňují tvorbu přechodného stavu.

**Změna standardní volné enthalpie (standardní Gibbsovy energie)**

$$\Delta G^{\circ} = - R \cdot T \cdot \ln K_{eq}$$

vyjadřuje změnu **volné energie** (volné enthalpie), která by nastala za **standardních** podmínek, tj. při koncentraci všech složek  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a standardní teplotě a tlaku po zreagování jednoho molu látky ( $\text{pH}=7,0$ ).

**Volná energie** (volná enthalpie) je taková, která může **konat práci za isothermních podmínek**. Energetickou bilanci reakce však určuje **vzdálenost od rovnovážného stavu** při daných **koncentracích reagujících látek a produktů**. Ta je vyjádřena hodnotou změny **volné enthalpie  $\Delta G'$** .

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ} + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$$

V uzavřeném systému jsou **spontánně** možné pouze **exergonické** reakce. Vysocí záporná hodnota **volné enthalpie** znamená, že reakce je daleko od rovnováhy na straně reaktantů **A** a **B**.

V rovnovážném stavu je rovna **nule**.

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$$

Při 37 °C a pH 7 platí:

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + 5,9 \cdot \log \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

$$\Delta G^{\circ'} = - 5,9 \cdot \log K_{\text{eq}} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

### AKTIVNÍ MÍSTO (CENTRUM) ENZYMŮ

relativně malá kapsa (štěrbina) uvnitř nebo při povrchu enzymu, často hydrofobní, umožňující **vazbu substrátu(ů)**, ev. nebiřkovinné části enzymu slabšími přechodnými, většinou nekovalentními vazbami:

- vodíkovými můstky (výrazně směřovaná)
- elektrostatickým přitahováním
- hydrofobními interakcemi
- van der Waalsovými silami

Obsahuje postranní řetězce sekvenčně vzdálených aminokyselin, které představují kontaktní, orientující a katalytické zbytky (často polární) a vytvářejí biospecifickou trojrozměrnou strukturu (konformaci). **Vzniká dočasně a reverzibilně komplex enzym-substrát (ES)**. Biokatalýza může mít charakter obecné acidobazické katalýzy (protonem), katalýzy kovovým iontem (Lewisovy kyseliny), někdy i kovalentní katalýzy. Při vytváření aktivovaného komplexu se přechodně účastní kovalentně vázaný proton, atom kovu nebo zbytky, které umožňují nukleofilní atak (Brönstedovy baze); nebo může být přechodně kovalentně vázán meziprodukt reakce.

### Nebílkovinné složky enzymů (kofaktory)

- dvojmocné kationty:  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$
- koenzymy (vztah k vitaminům) - připojeny nekovalentně
- prosthetická skupina (hem) - vázána kovalentně

**nezbytné pro mechanismus účinku některých enzymů**

### PŘEHLED KOENZYMŮ

Vitamin	koenzym	funkce
oxidoreduktas (přenos elektronů, H)		
Niacin (P-P) ( $B_3$ )	NAD, NADP	přenos $2 e^- + H^+$
$B_2$ (riboflavin)	FAD, FMN	přenos 2 H
přenosu skupin		
$B_1$ (thiamin)	thiamindifosfát (TDP)	oxidační dekarboxylace
$B_6$ (pyridoxin)	pyridoxalfosfát	transaminace
H (biotin)	biotinový koenzym	karboxylace
kys. listová (folacin)	THF (obsahuje PABA)	přenos 1 C zbytku
$B_{12}$	kobamid	přenos 1 C zbytku
pantothénát ( $B_5$ )	koenzym A (CoA)	přenos acylu

## KLASIFIKACE ENZYMŮ PODLE ENZYME COMMISSION (EC)

6 tříd podle typu reakce, každá má další podtřídy a podpodtřídy

název : substrát - typ reakce - asa

přídatná informace (v závorce)

systematické kódové číslo E.C. čtyřmístné

vedle toho doporučené (triviální) názvy

příklad : EC 2.7.1.1

transferasa - přenos fosfátu - alkohol jako akceptor - enzym

ATP: D-hexosa-6-fosfottransferasa (hexokinasa)

$G + ATP \rightleftharpoons G-6-P + ADP$

[www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme)

## KLASIFIKACE ENZYMŮ

**1. OXIDOREDUKTASY**

**2. TRANSFERASY**

**3. HYDROLASY**

**4. LYASY**

**5. ISOMERASY**

**6. LIGASY**

[www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme)

#### 1) Oxidoreduktasy

Katalyzují různé oxidoredukční reakce, často s využitím koenzymů jako např. NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>, nebo hemu. Triviální názvy v této třídě: dehydrogenasy, oxidasy, cytochromy, peroxidasa, katalasa.

#### 2) Transferasy

Katalyzují přenos skupin: amino-, methyl-, acyl-, glykosyl-, fosforyl-. Kinasy katalyzují přenos fosfátové skupiny z ATP nebo jiných nukleosidtrifosfátů. Triviální názvy v této třídě: aminotransferasy (transaminasy), acyltransferasy, fosfotransferasy.

#### 3) Hydrolasy

Katalyzují štěpení vazeb mezi atomem uhlíku a jinými atomy prostřednictvím spotřebované molekuly vody. Obvyklé triviální názvy: esterasy, peptidasy, amylasy, fosfatasy, lipasy, proteasy (pepsin, trypsin, chymotrypsin).

#### 4) Lyasy

Katalyzují adiční reakci na dvojně vazbě nebo eliminační reakci mezi dvěma C atomy za vzniku dvojně vazby. Příklady: fumaráthydratasa (fumarasa), karbonátdehydratasa (karboanhydrasa), aldolasa, citrátlyasa, dekarboxylasy.

#### 5) Isomerasy

Katalyzují racemizaci optických isomerů nebo vytváření polohových isomerů: epimerasy, racemasy, mutasy.

#### 6) Ligasy

Katalyzují tvorbu vazeb mezi uhlíkem a jinými atomy spojenou se štěpením ATP (spřažení exergonické a endergonické reakce): karboxylasy, synthetasy (glutaminsynthetasa).

## DĚLENÍ PEPTIDAS (PROTEAS)

### 3.4.21 Serinové endopeptidasy

- chymotrypsin, trypsin, thrombin, plasmin, enterokinasa

### 3.4.22 Cysteinové endopeptidasy

- kathepsin B, papain, bromelain, kaspasy

### 3.4.23 Aspartátové endopeptidasy

- pepsin

### 3.4.24 Metaloendopeptidasy

- prokolagen-N-proteinasa

### 3.4.17.1 Karboxypeptidasa A (obsahuje Zn)

## JEDNOTKY VYJADŘOVÁNÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

**katal (zkratka kat)** : množství enzymové aktivity, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za sekundu;  $10^{-6}$  kat =  $\mu$ kat ;  $10^{-9}$  kat = nkat  
starší mezinárodní jednotka

**IU** : množství enzymové aktivity, které katalyzuje přeměnu 1  $\mu$ molu substrátu za minutu ;  $10^{-3}$  IU = mU

### PŘEVOD:

1 IU = 16,67 nkat



### BIOLOGICKÝ A KLINICKÝ VÝZNAM ENZYMŮ

Jsou nástrojem exprese genů. Umožňují látkovou a energetickou přeměnu v organismu.

V medicíně :

- 1) Jejich vrozený a dědičný defekt způsobuje dědičnou metabolickou poruchu.
- 2) Při poškození buněk a tkání se objevuje zvýšená aktivita v plasmě.
- 3) Využívají se v substituční terapii.
- 4) Slouží jako diagnostické prostředky.
- 5) Využívají se průmyslově, např. při výrobě léčiv.

### SEPARACE A PURIFIKACE ENZYMŮ

- 1) Podle rozpustnosti: frakcionovaná precipitace, krystalizace
- 2) Podle pI: elektroforéza, ionexová chromatografie
- 3) Podle  $M_r$ : gelová chromatografie, ultracentrifugace, ultrafiltrace
- 4) Biospecificky: afinitní chromatografie

### ISOENZYMY (ISOZYMY)

jsou mnohočetné formy enzymů vyskytující se u téhož druhu, které katalyzují stejnou reakci a liší se pořadím aminokyselin vzhledem k tomu, že jsou kódovány různými geny, jež vznikly genovou duplikací a divergencí. Příklad: laktátdehydrogenasa. Liší se např. elektroforetickou pohyblivostí, pI, pH - optimem, substrátovou specifičností ( $K_m$ ), citlivostí vůči inhibitorům . Jsou výrazem vývojové, orgánové a buněčné diference a specializace. Významné diagnosticky.

### FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ENZYMOVOU AKTIVITU

1. koncentrace substrátu ( $K_m$ ,  $V$ ,  $k_{cat}$ )
2. teplota (optimum)
3. pH (optimum)
4. iontová síla
5. aktivátory a inhibitory