

Základy biochemie KBC / BCH

ENZYMY - enzymová katalýza.

Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu

CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



- Enzymy jsou katalyzátory biologických systémů umožňující chemické přeměny. Umožňují také transformaci jedno druhu energie na druhý.
- Pro enzymy je charakteristická katalytická síla a specifita.
- Katalytická síla enzymu je definována jako poměr rychlosti reakce katalyzované enzymem a rychlosti reakce nekatalyzované.
- Katalýza se uskutečňuje v místě molekuly enzymu nazvaném **aktivní místo**.
- Látka jejíž přeměnu enzym katalyzuje se nazývá **SUBSTRÁT**.
- Téměř všechny známé enzymy jsou proteiny (RNA jsou pravděpodobně nejranější katalyzátory - ribozymy).

UREASA z fazolu

- Ureasa EC 3.5.1.5; systematický název: urea (močovina): amidohydrolasa;
- Enzym obsahuje Ni^{2+} ; katalyzuje hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amonné ionty.
- Při teplotě 20°C je rychlostní konstanta ureasou katalyzované reakce $3 \times 10^4 \cdot \text{sec}^{-1}$.
- Nekatalyzovaná reakce má rychlostní konstantu $3 \times 10^{-10} \cdot \text{sec}^{-1}$.
- Poměr rychlostních konstant: 10^{14} .
- Katalytická síla ureasy je 10^{14} .

- Enzymy urychlují ustanovení rovnováhy chemické reakce. Neovlivňují rovnovážnou konstantu.
- Např. karbonátanhydratasa může katalyzovat hydrataci milionu molekul CO_2 za sekundu.
- Enzymy jsou specifické ve smyslu katalyzované reakce (specifita účinku) a ve smyslu výběru substrátu (substrátová specifita).
- Enzymy snižují aktivační energii reakce. Tvoří komplex se substrátem.

- Součástí enzymů jsou malé molekuly - **kofaktory**.
- Proteinová část enzymu - **apoenzym**.
- Katalyticky aktivní enzym - **holoenzym**.
- Apoenzym + kofaktor = holoenzym.
- Kofaktory rozumíme neproteinové částice, obvykle nízké molekulové hmotnosti, které jsou nezbytné pro aktivitu enzymů. Kofaktory, jako např. kovové ionty různé ionty solí, které zvyšují aktivitu enzymů se nazývají **aktivátory**. Organické molekuly, které se dají od apoenzymu oddělit (např. hydrolýzou) se nazývají **koenzymy**.
- Kofaktory kovalentně vázané na apoenzym se označují jako **prosthetická skupina**.

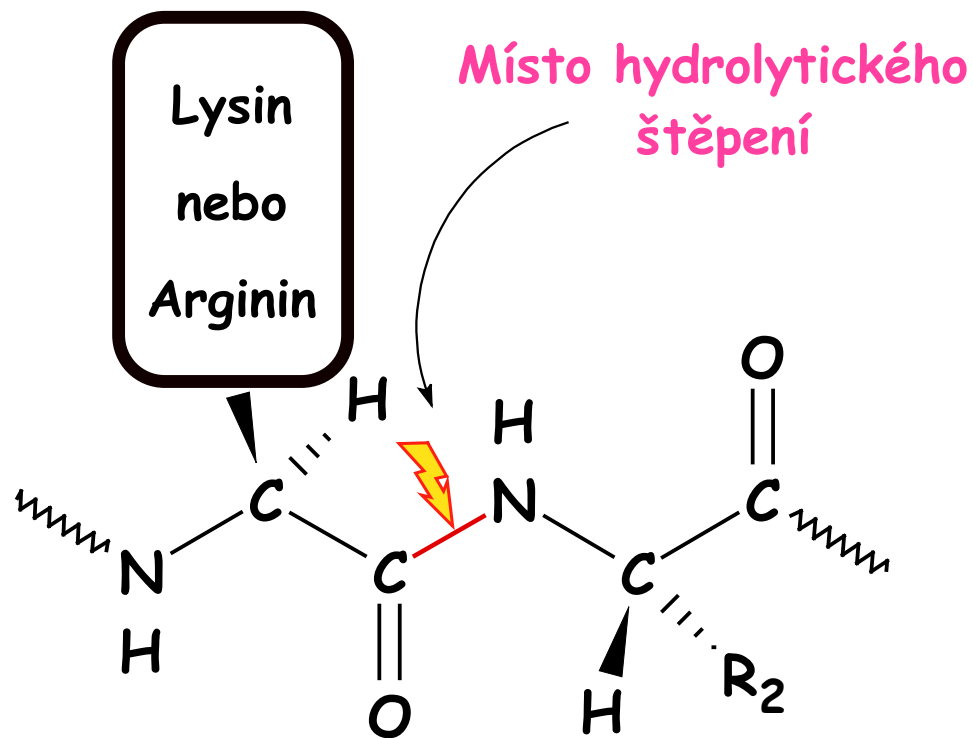
Enzymové kofaktory:

• Kofaktory	Enzymy
• Koenzymy	
• Thiaminpyrofosfát (TPP)	Pyruvátdehydrogenasa
• Flavinadeninindinukleotid (FAD)	Monoaminoxidasa
• Nikotinamidadeninindinukleotid (NAD ⁺)	Laktátdehydrogenasa
• Pyridoxalfosfát	Glykogenfosforylasa
• Koenzym A (CoA)	Acetyl CoAkarboxylasa
• Biotin	Paruvátkarboxylasa
• 5' - Deoxyadenosylkobalamin	Methylmalonylmutasa
• Tetrahydrofolát	Thymidylátsynthasa
• Kovy	
• Zn ²⁺	Karbonátanhydrasa
• Zn ²⁺	Karboxypeptidasa
• Mg ²⁺	Hexokinasa
• Ni ²⁺	Ureasa
• Mo	Nitrátreduktasa
• Se	Glutathionperoxidasa
• Mn ²⁺	Superoxiddismutasa
• K ⁺	Propionyl CoA karboxylasa

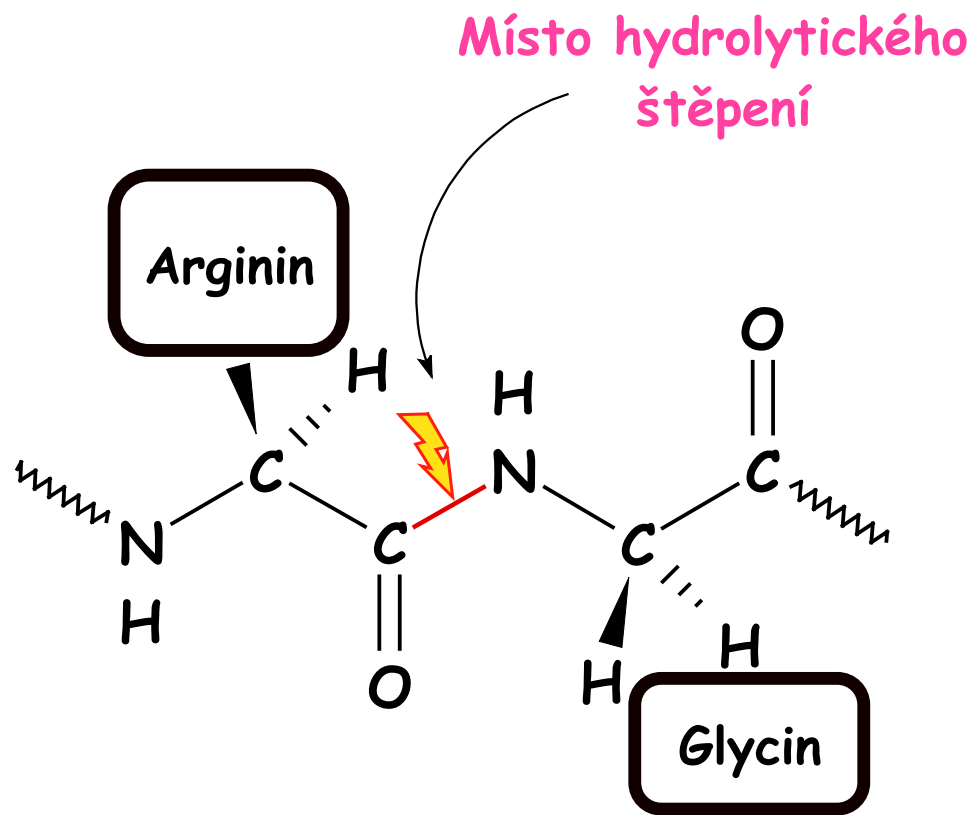
Proteolytické enzymy (proteasy, proteinasy):

- Enzymy druhově nespecifické - specifické na štěpenou vazbu.
- Mnohé katalyzují také reakce štěpení esterů což se využívá ke sledování jejich aktivity.
- Trypsin štěpí peptidovou vazbu v místě, kde je na straně karboxylu Lys nebo Arg nenásleduje-li Pro.
- Thrombin, enzym podílející se na procesu srážení krve štěpí pouze vazbu Arg-Gly.

Vazebné místo peptidu štěpené trypsinem:



Vazebné místo peptidu štěpené thrombinem:



Názvosloví enzymů

- Triviální názvy - např. ureasa, trypsin, pepsin.
- Systematické - popis chemické reakce, kterou enzym katalyzuje, koncovka -asa.
- Např. alkoholdehydrogenasa katalyzuje reakci (oxidaci alkoholu na aldehyd):
 - **Ethanol + akceptor elektronů = acetaldehyd + redukovaný akceptor**
 - V tomto případě je akceptorem NAD^+ , který se redukuje na $\text{NADH} + \text{H}^+$ (proton se uvolňuje do prostředí).
 - NAD^+ je nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma)

Systematická klasifikace enzymů dle enzymové komise (EC):

- EC x. y. z. p. čtyřciferný kód
- Příklad: Alkoholdehydrogenasa, EC 1.1.1.1
- Systematický název: Alkohol:NAD⁺ oxidoreduktasa
- 1. oxidoreduktasy (oxidačně-redukční reakce)
- 1. 1 Působí na CH-OH skupinu donoru
- 1. 1. 1 Akceptor NAD⁺ nebo NADP⁺
- 1. 1. 1. 1(pořadí enzymu v podpodtřídě)

Enzymové třídy

- Třídy enzymů

Třída	Katalyzovaná reakce	Příklad
1. Oxidoreduktasy	Oxidačně-redukční	Alkoholdehydrogenasa
2. Transferasy	Přenos skupin	Proteinkinasy
3. Hydrolasy	Štěpení vazeb za účasti vody	Trypsin
4. Lyasy	Adice na dvojnou vazbu nebo odštěpení skupin za tvorby dvojně vazby	Fumarasa
5. Isomerasy	Izomerace (geometrické a strukturní změny uvnitř molekuly)	Glukosafosfátmutasa
Podřídý: 5. 1	racemasy nebo epimerasy	
5. 2	cis-trans-isomerasy	
5. 3	intramolekulaární oxidoreduktasy	
5. 4	intramolekulární transferasy (mutasy)	
5. 5	intramolekulární lyasy	
5. 6	ostatní isomerasy	
6. Ligasy	Spojení dvou substrátů za spotřeby ATP	Karbamoylfosfát- synthetasy

Energetika enzymových reakcí

- Změna volné (Gibbsovy) energie je termodynamická funkce vedoucí k pochopení katalytického účinku enzymů.
- 1. Reakce probíhá samovolně, když má ΔG negativní znaménko.
- 2. Systém je v rovnováze, když je $\Delta G = 0$.
- 3. Reakce neprobíhá samovolně, když je ΔG pozitivní. Musí být dodána volná energie.
- Negativní ΔG neznamená, že reakce proběhne **dostatečně rychle**. Rychlost reakce závisí na volné aktivační energii ΔG^* .

Standardní volná energie a její vztah k rovnovážné konstantě reakce.



$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln [C][D] / [A][B]$$

ΔG° = změna standardní volné energie

- Standardní podmínky: všechny reaktanty jsou přítomny v koncentracích 1, 0 M.
- V biochemii: standardní stav pH = 7. Aktivita H⁺ a vody je rovna 1.
- Označení: $\Delta G^{\circ'}$.

Rovnovážná konstanta za standardních podmínek:

- $K_{eq}' = [C][D] / [A][B]$

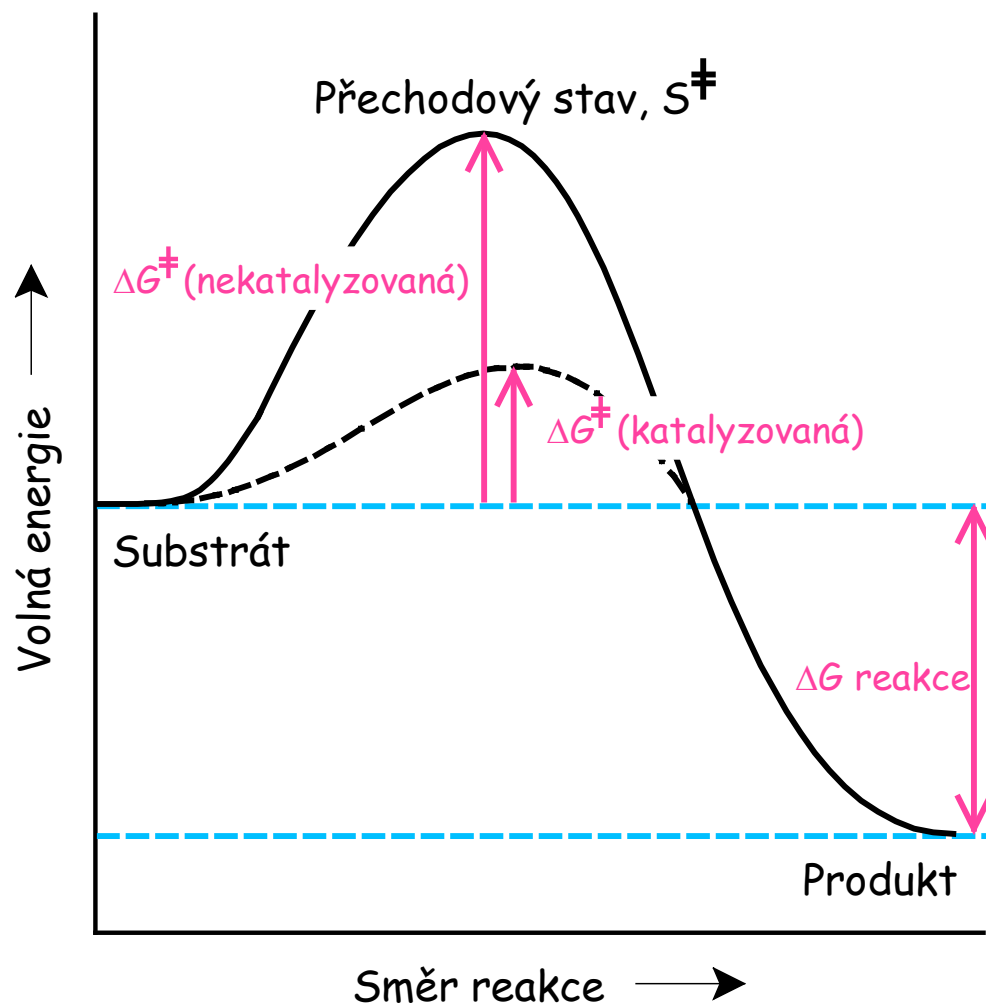
$$\Delta G^{\circ'} = -2,303 RT \log_{10} K_{eq}'$$

- $K_{eq}' = 10^{-\Delta G^{\circ'} / (2,303 RT)}$

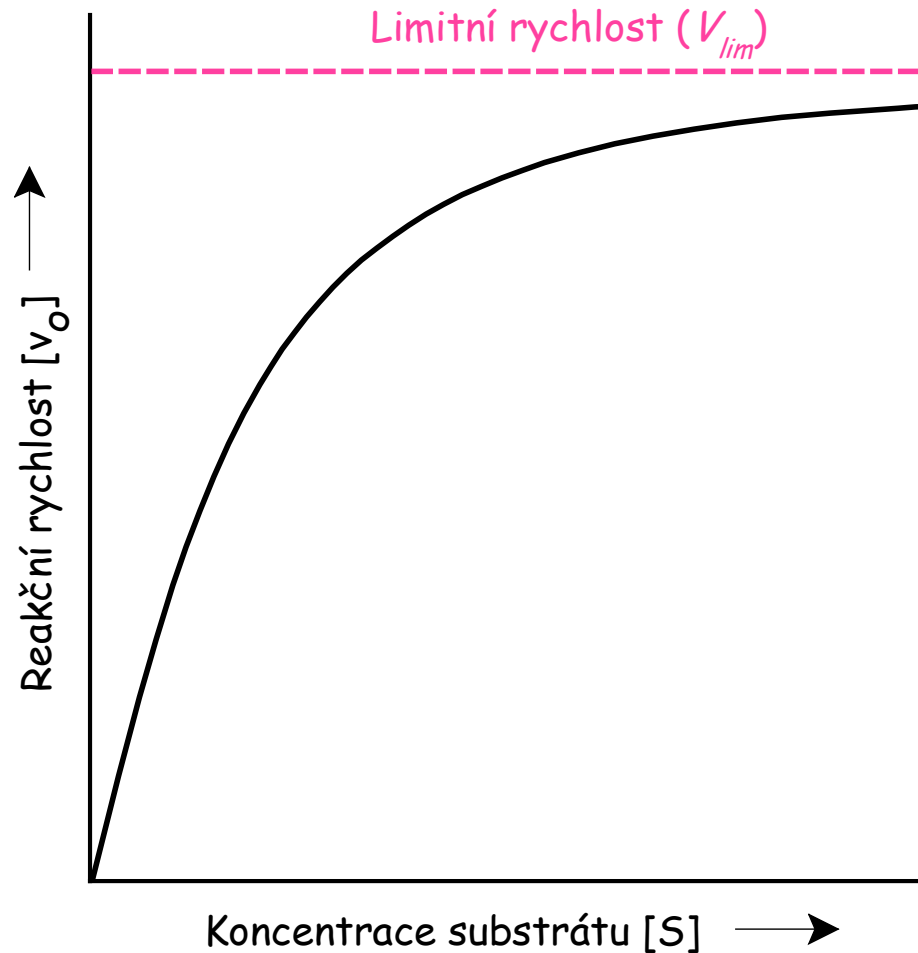
- Při 25°C

- Po zjednodušení: $K_{eq}' = 10^{-\Delta G^{\circ'} / 1,36}$

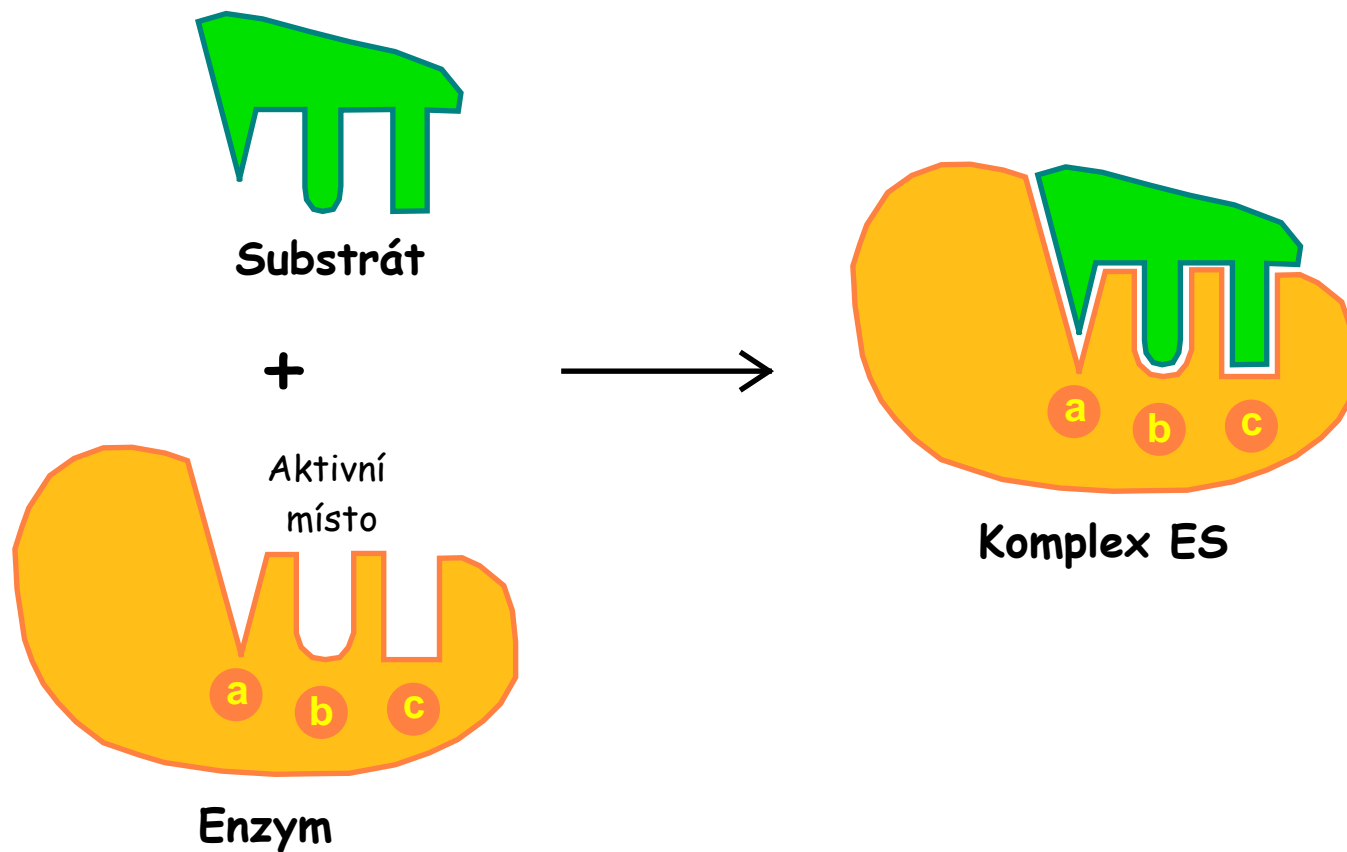
Enzymy snižují aktivační energii - volnou energii aktivace



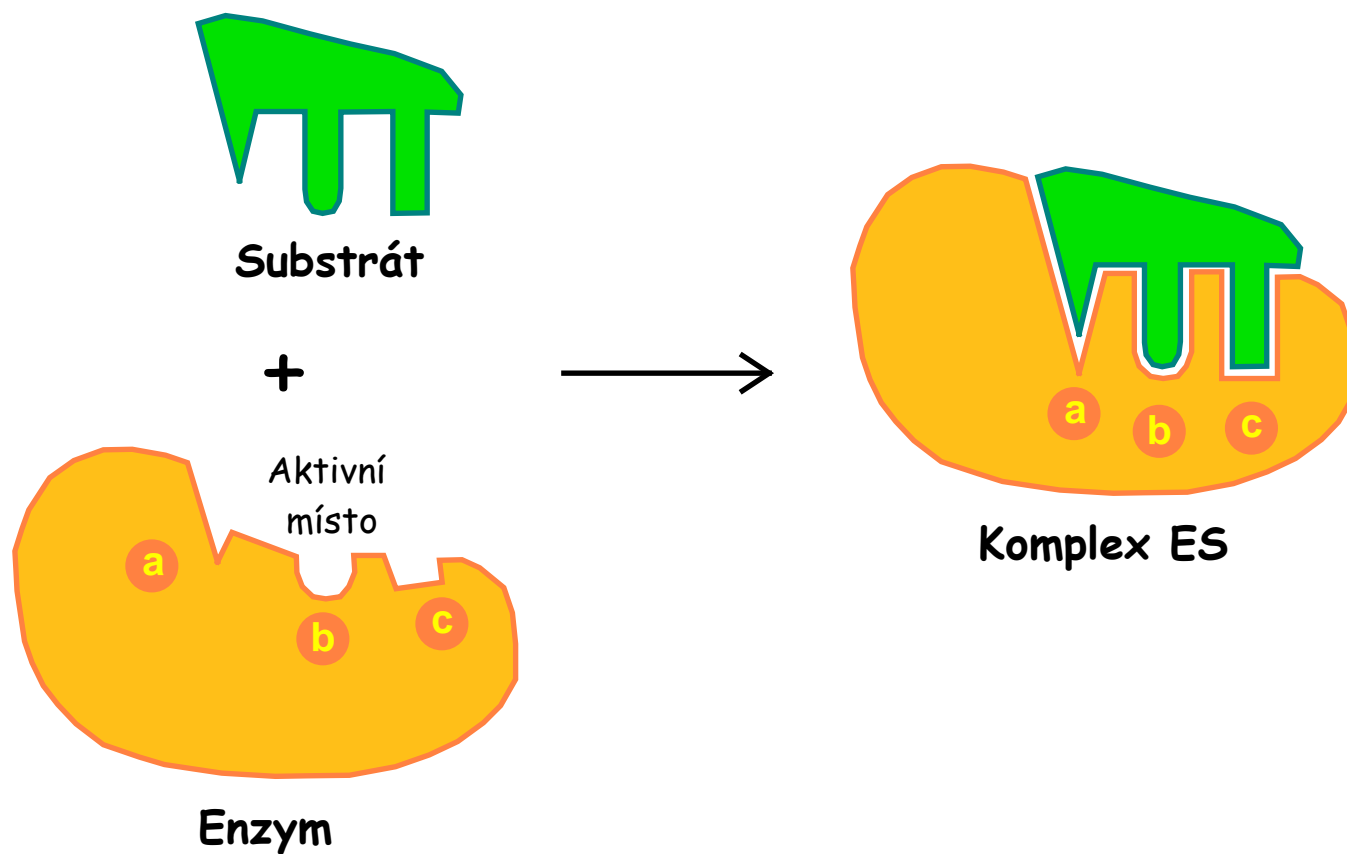
Závislost reakční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu. Reakce dosahuje limitní rychlosti, dříve označované jako maximální (V_{lim}).



Model zámeček a klíč (lock and key)

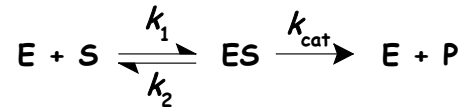


Model indukovaného přizpůsobení (induced fit)



Rovnice Michaelise a Mentenové:

- Kinetický popis aktivity enzymu.
- Reakční rychlost v_0 se obvykle vyjadřuje jako počet molů produktu vytvořených za sekundu.
- Podmínky pro odvození kinetické rovnice Michaelise a Mentenové:
 - Tvorba komplexu enzym-substrát [ES]
 - Měříme počáteční rychlost v_0 , kdy se nenahromadilo takové množství produktu, že by ovlivňovalo zpětnou reakci.
 - Ustálený stav - koncentrace [ES] se nemění i když koncentrace substrátu a produktu se mění. Rychlost tvorby [ES] je shodná s rychlostí rozpadu [ES].



Ustálený stav

Tvorba [ES] = Rozpad [ES]

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

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

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

$$k_1 ([E_T] - [ES]) [E] = k_2 [ES] + k_{cat} [ES]$$

$$k_1 [E_T] [S] - k_1 [ES] [S] = k_2 [ES] + k_{cat} [ES]$$

$$k_1 [E_T] [S] = k_2 [ES] + k_{cat} [ES] + k_1 [ES] [S]$$

$$k_1 [E_T] [S] = [ES] (k_2 + k_{cat} + k_1 [S])$$

$$[ES] = \frac{k_1 [E_T] [S]}{(k_2 + k_{cat} + k_1 [S])} = \frac{[E_T] [S]}{(k_2 + k_{cat} + k_1 [S])} = \frac{[E_T] [S]}{(k_2 + k_{cat}) / k_1 + [S]}$$

$$[ES] = \frac{[E_T] [S]}{K_m + [S]} \quad K_m = (k_2 + k_{cat}) / k_1$$

$$dP/dt = v_o = k_{cat} [ES]$$

$$dP/dt = v_o = \frac{k_{cat} [E_T] [S]}{K_m + [S]} \quad V_{lim} = k_{cat} [E_T]$$

$$v_o = \frac{V_{lim} [S]}{K_m + [S]}$$

Rovnice Michaelise a Mentenové

$$v_o = \frac{V_{lim} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Rovnice Michaelise a Mentenové}$$

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m + [S]}{V_{lim} [S]}$$

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{lim} [S]} + \frac{[S]}{V_{lim} [S]}$$

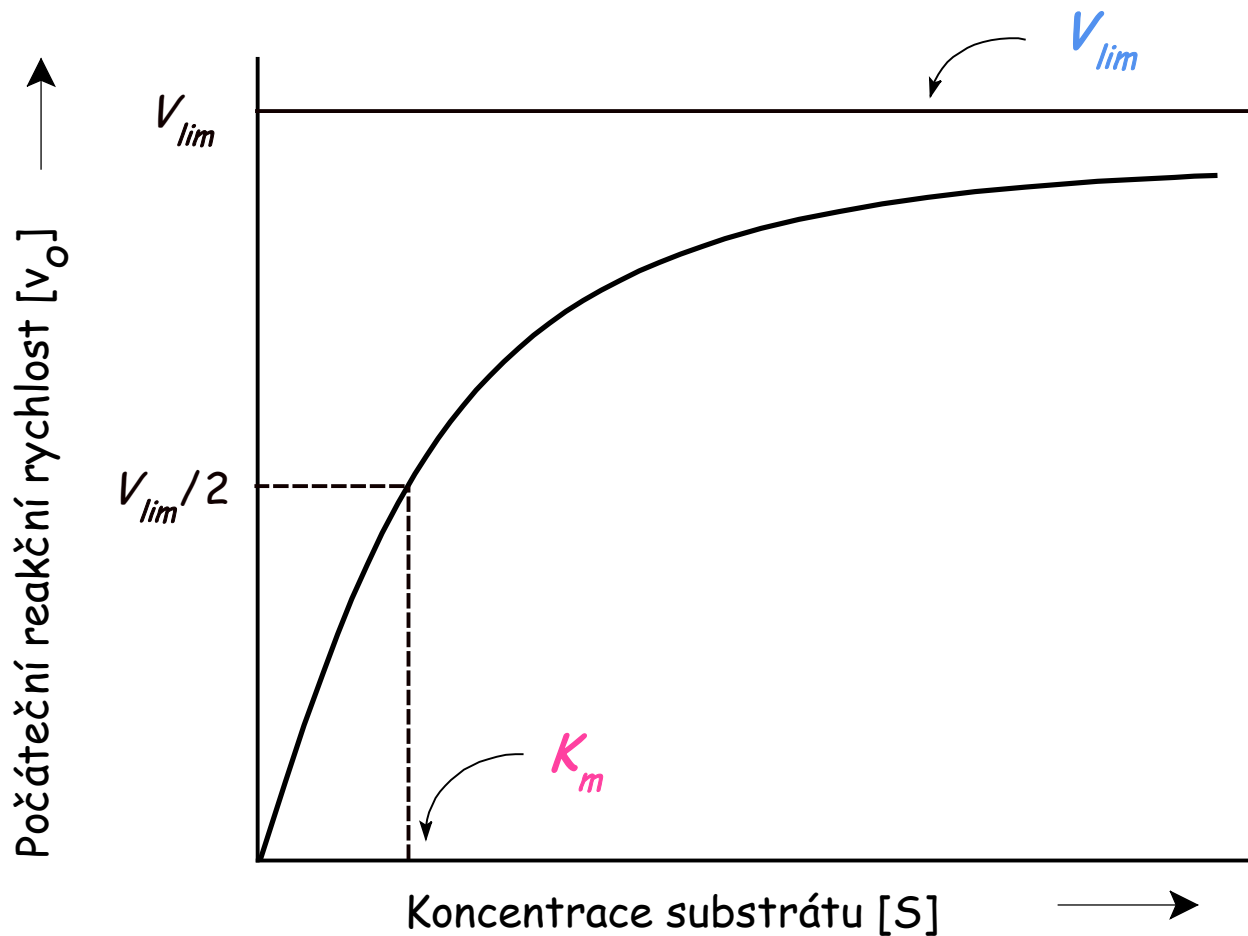
$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{lim} [S]} + \frac{1}{V_{lim}}$$

$$\text{Sklon} = K_m / V_{lim}$$

$$\text{Průsečík} = 1 / V_{lim}$$

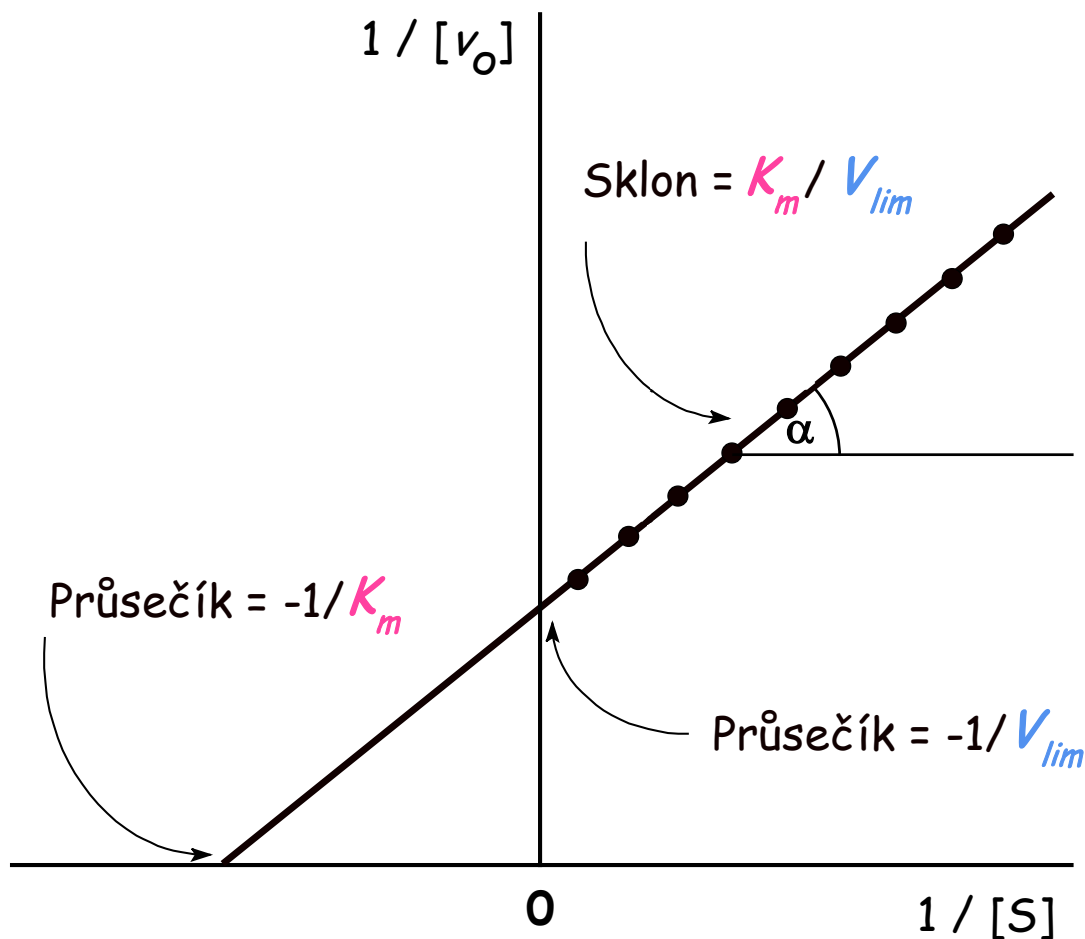
Dvojnásobně reciproká rovnice
 Lineweaver a Burka

Závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu (hyperbola):



Dvojnásobně reciproké vynesení $1 / v_o$ proti $1 / [S]$
dle Lineweavera a Burka

$$1 / v_o = K_m / V_{lim} \cdot 1 / [S] + 1 / V_{lim}$$



Obvyklá chyba studentů.

- Uvažují, že rychlostní konstanta k_{cat} nemůže být větší než k_1 neboť by to znamenalo, že se komplex ES se rozpadá rychleji než se tvoří.
- Pozor: konstanty mají různé jednotky a proto nemohou být srovnávány !!
- Konstanta k_1 má jednotky $M^{-1} \times s^{-1}$ nebo $(\text{min})^{-1}$, konstanta k_{cat} má jednotky s^{-1} nebo min^{-1} .
- **Nejsou to rychlosti, ale rychlostní konstanty prvního a druhého řádu !!!**
- Rychlost tvorby [ES] je $k_1 [E][S]$ a rychlost rozpadu [ES] na E + P $k_{\text{cat}}[ES]$.
- Může nastat stav, kdy $k_{\text{cat}} \gg k_2$!! V tom případě se K_m redukuje na k_{cat} / k_1 !

Význam hodnot K_m a $V_{lim} (max)$

- Michaelisova konstanta:
- Závisí na typu substrátu a podmínkách, jako jsou pH, teplota (doporučuje se 30°C) a iontová síla roztoku.
- Dva základní významy K_m :
 - a) Koncentrace substrátu při které je substrátem obsazena polovina aktivních míst enzymu. Odpovídá koncentraci substrátu *in vivo*.
 - b) $K_m = (k_2 + k_{cat}) / k_1$ je vztah mezi K_m a rychlostními konstantami enzymové reakce ve smyslu rovnice Michaelise a Mentenové.

- V případě, že k_2 je mnohem větší než k_{cat} to znamená, že ES komplex disociuje na E a S mnohem rychleji, než se tvoří produkt.
- Vztah se zjednoduší na $K_m = k_2 / k_1$. Disociační konstanta komplexu ES je:

$$K_{ES} = [E] [S] / [ES] = k_2 / k_1$$

- Jinými slovy: K_m je v tomto případě rovno disociační konstantě komplexu ES.
- Vysoké hodnoty K_m ukazují na slabou afinitu substrátu k enzymu, a naopak nízké hodnoty na vysokou afinitu.

Hodnoty K_m některých vybraných enzymů a substrátů:

Enzym	Substrát	K_m ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$)
• Trypsin	<i>N</i> -Benzoyl-Arg ethyester	3 000
• Pyruvátkarboxylasa	Pyruvát	400
•	HCO_3^-	1 000
•	ATP	60
• Penicillinasa	Benzylopenicilin	50
• Karbonátanhydratasa	CO_2	8 000
• β -Galaktosidasa	Laktosa	4 000
• Hexokinasa	D-Glukosa	32
•	ATP	1 200
• Glukokinasa	D-glukosa	340
•	ATP	250

Číslo přeměny enzymu

- Maximální nebo nověji nazvaná limitní rychlost enzymové reakce je číslo přeměny enzymu.
- Definujeme jako počet molekul substrátu převedených na produkt enzymovou molekulou za časovou jednotku při plné saturaci enzymu substrátem. Nazývá se také katalytická konstanta k_{cat} .

Čísla přeměny (turnover numbers) některých enzymů:

Enzym	Číslo přeměny (sec)
• Karbonátanhydrasa	600 000
• Acetylcholinesterasa	25 000
• Penicilinasa	2 000
• Laktátdehydrogenasa	1 000
• Chymotrypsin	100
• Tryptofansynthetasa	2

Kinetická dokonalost enzymové katalýzy. Kriterium k_{cat} / K_m .

- V případě, že koncentrace substrátu je mnohem vyšší než K_m je rychlost enzymové reakce rovna k_{cat} což je číslo přeměny.
- Za fyziologických podmínek enzym nebývá substrátem nasycen. Poměr $[S] / K_m$ je mezi 0,01 až 1,0.
- Za situace, kdy je $[S] \ll K_m$ je rychlost enzymové reakce mnohem menší než k_{cat} , protože je mnoho aktivních míst neobsazeno.

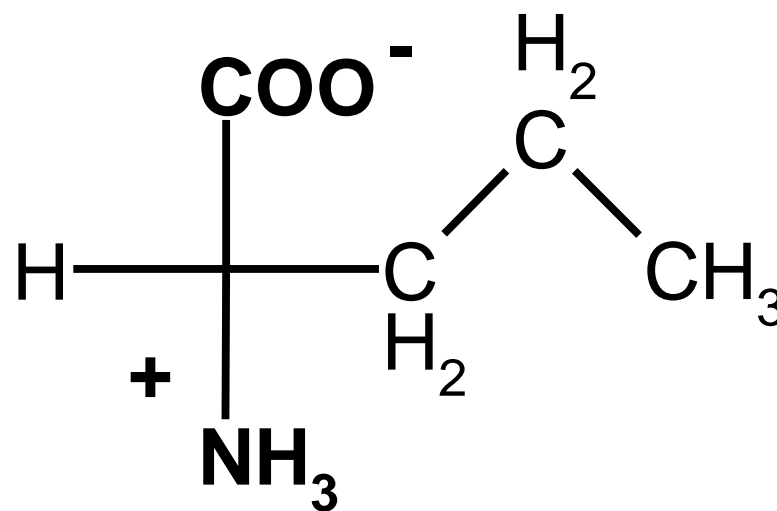
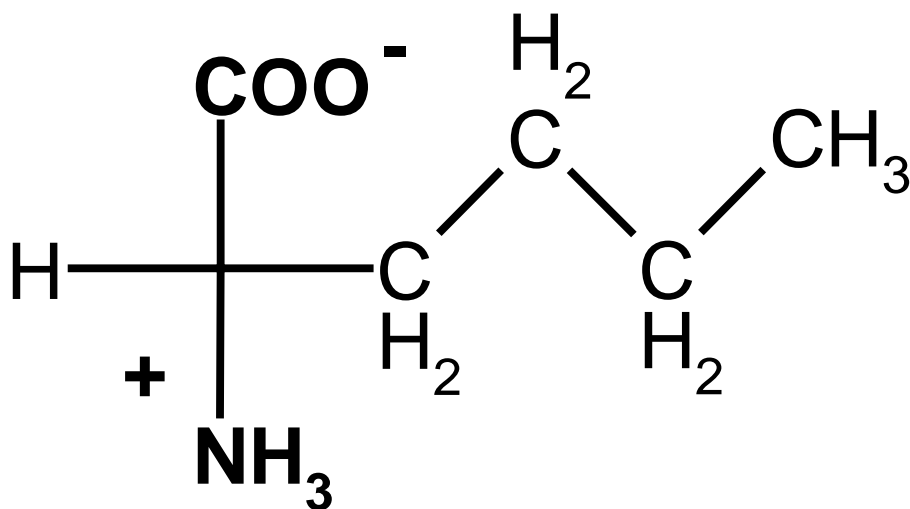
- Existuje nějaké číselné měřítko, které by charakterizovalo enzym za podmínek v buňce ?
-
- Za podmínek, kdy je $[S] \ll K_m$, závisí rychlost enzymové reakce na k_{cat} / K_m a na celkovém množství enzymu $[E]_T$.
-
- Pomocí tohoto kritéria můžeme porovnávat preferenci enzymu pro různé substráty.
- Horním limitem je rychlost difúze substrátu do aktivního místa enzymu.

Estery aminokyselin jako substráty chymotrypsinu dle rostoucí hodnoty k_{cat} / K_m :

Ester aminokyseliny	Vedlejší řetězec	k_{cat} / K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
Glycin	- H	$1,3 \times 10^{-1}$
Valin	isopropyl	2,0
Norvalin	<i>n</i> -propyl	$3,6 \times 10^2$
Norleucin	<i>n</i> -butyl	$3,0 \times 10^3$
Fenylalanin	benzyl	$1,0 \times 10^5$

Nejdokonalejším substrátem je fenylalanin.

L-norleucin a L-norvalin. Neproteinogenní
 α -aminokyseliny.



Enzymy pro které je hodnota k_{cat} / K_m blízko difúzí kontrolované rychlosti vstupu substrátu do aktivního místa.

Enzym	k_{cat} / K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
Acetylcholinesterasa	$1,6 \times 10^8$
Karbonátanhydratasa	$8,3 \times 10^7$
Katalasa	$4,0 \times 10^7$
Fumarasa	$1,6 \times 10^8$
Triosafosfátisomerasa	$2,4 \times 10^8$
β -Laktamasa	$1,0 \times 10^8$
Superoxiddismutasa	$7,0 \times 10^9$

Jednotky enzymové aktivity

- 1 katal (1 kat) je aktivita enzymu, který katalyzuje přeměnu jednoho molu substrátu za jednu sekundu.
- Používají se μkat (10^{-6} kat) a nkat (10^{-9} kat).
- Aktivita se měří za optimálních podmínek - teplota, pH a iontová síla roztoku.
- Specifická aktivita: Aktivita enzymu vztažená na množství proteinu v jednotce objemu (např. nkat/mg - vše v jednom mL).

Dvousubstrátové reakce

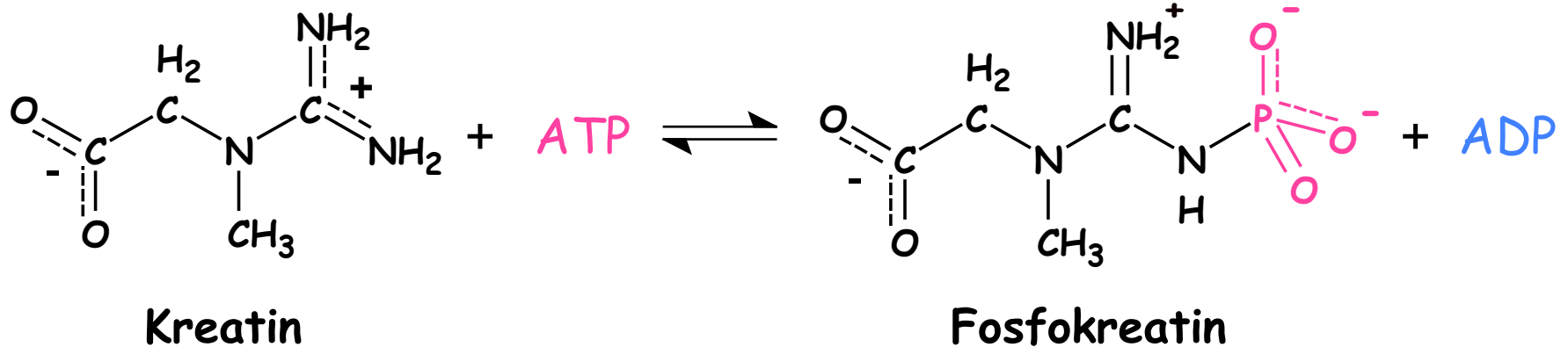
- **Sekvenční:**
 - A) Náhodný mechanismus (bi - bi)
 - B) Uspořádaný mechanismus (bi - bi)
- **Pingpongový mechanismus**

Náhodný mechanismus

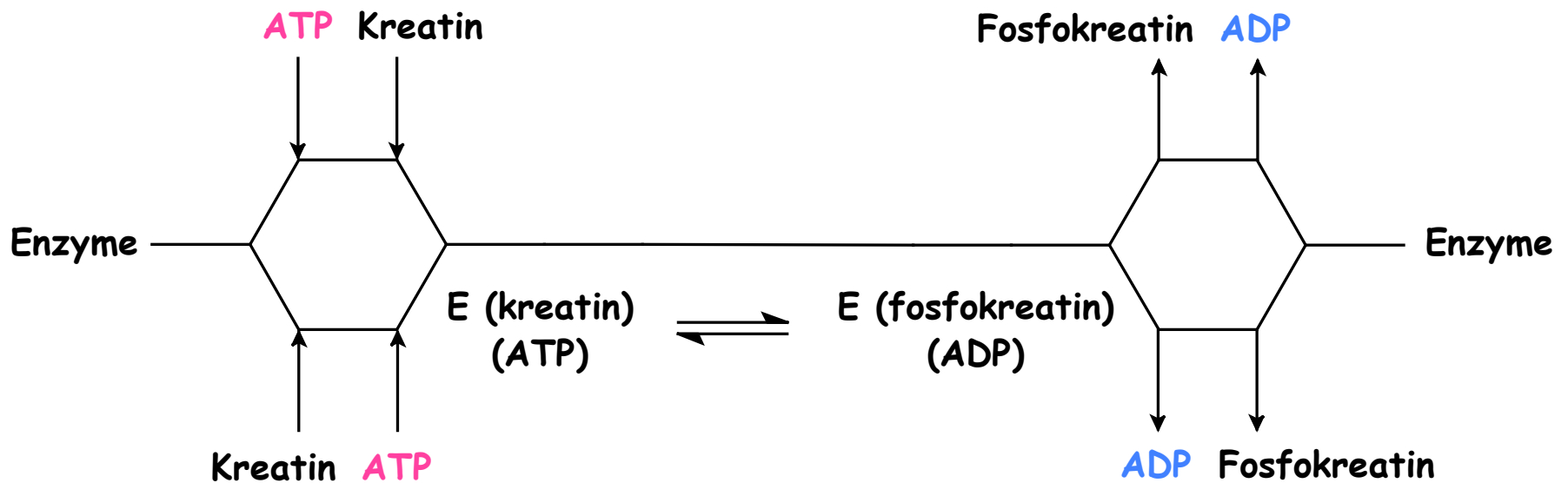
- Je takový mechanismus enzymové reakce, kdy nezáleží na tom, který z obou substrátů se váže jako první na enzym.

Příklad: kreatinkinasa

Náhodný sekvenční mechanismus (kreatinkinasa):



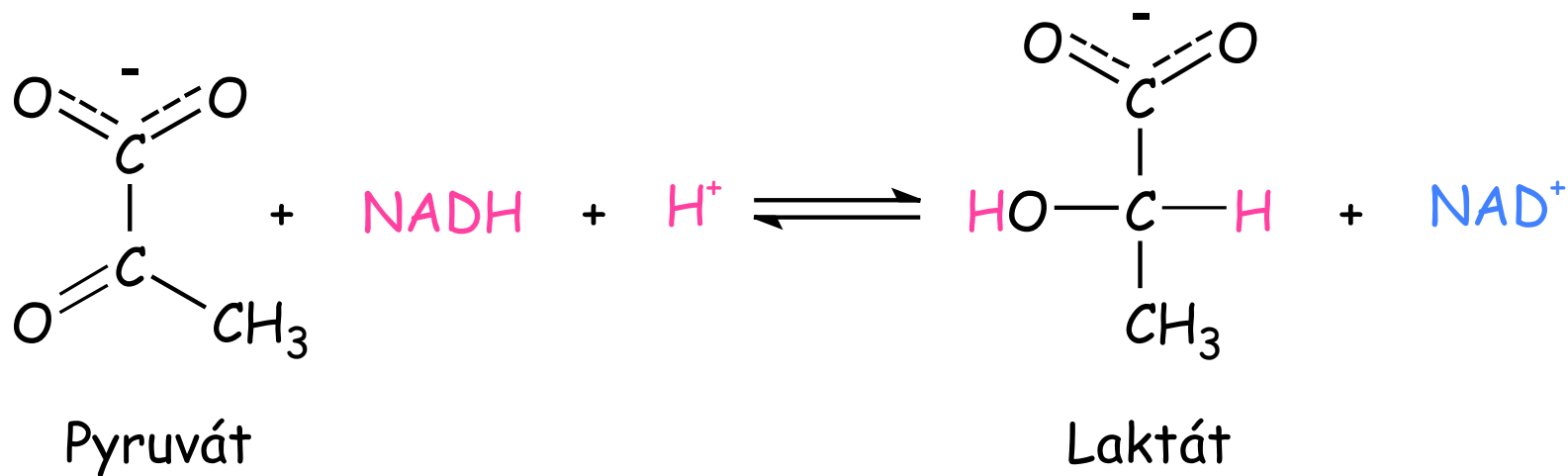
Clelandovo schéma - náhodný sekvenční mechanismus (kreatinkinasa):



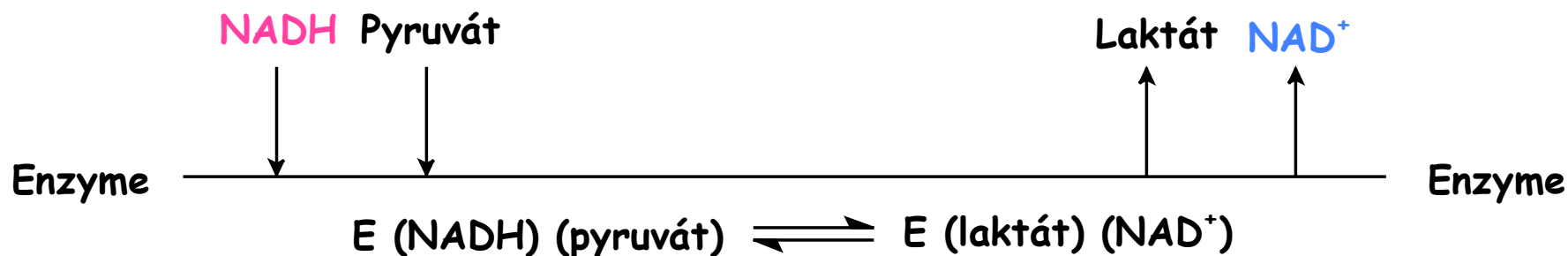
Uspořádaný mechanismus

- Vyznačuje se tím, že substráty se váží do aktivního místa v určitém pořadí.
- Příklad: alkoholdehydrogenasa, laktátdehydrogenasa (nejdříve se váže koenzym NAD^+ a poté druhý substrát)

Uspořádaný sekvenční mechanismus (laktátdehydrogenasa):



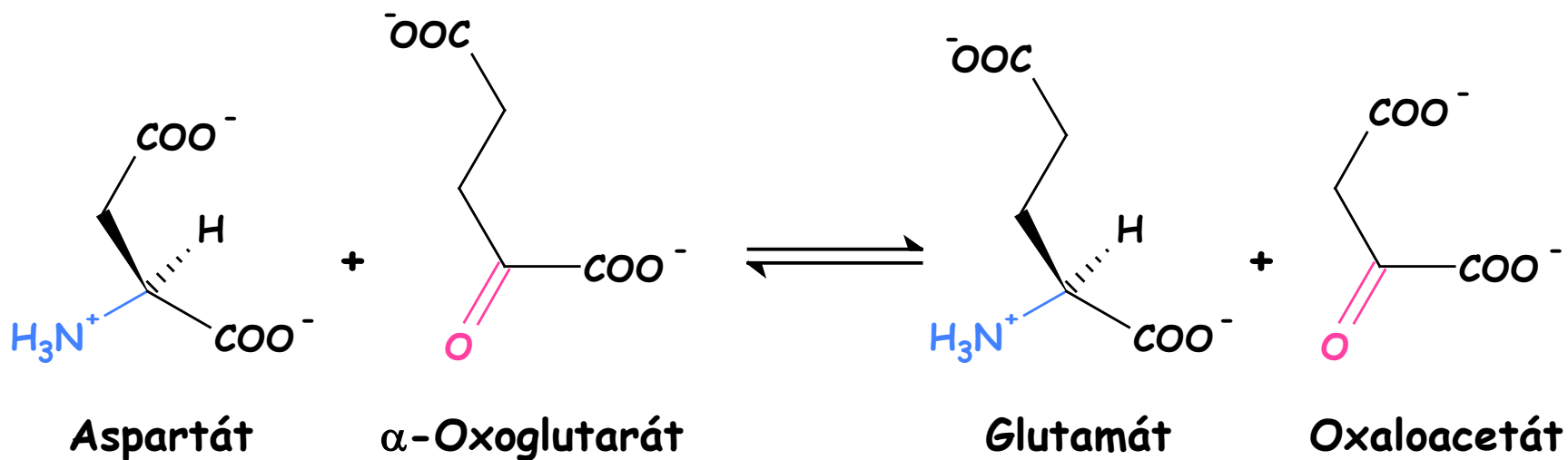
Clelandovo schéma uspořádaného sekvenčního mechanismu (laktátdehydrogenasa):



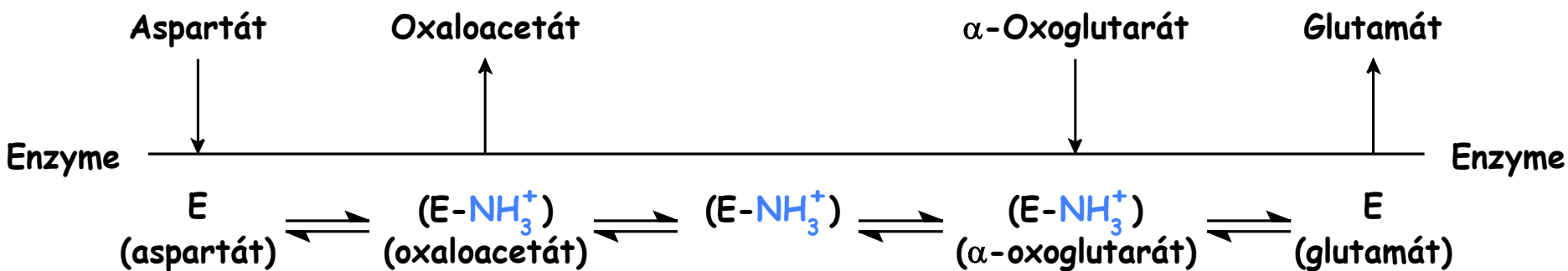
Pingpongový mechanismus

- Vyznačuje se tím, že enzym přechází mezi dvěma stálými formami.
- Po vazbě prvního substrátu se tvoří substituovaný enzymový meziprodukt, modifikovaný enzym.
- První produkt se uvolní a poté se váže na modifikovaný enzym druhý substrát a odštěpí se druhý produkt.
- Příklad: aspartátaminotransferasa.

Pingpongový mechanismus (aspartátaminotransferasa):

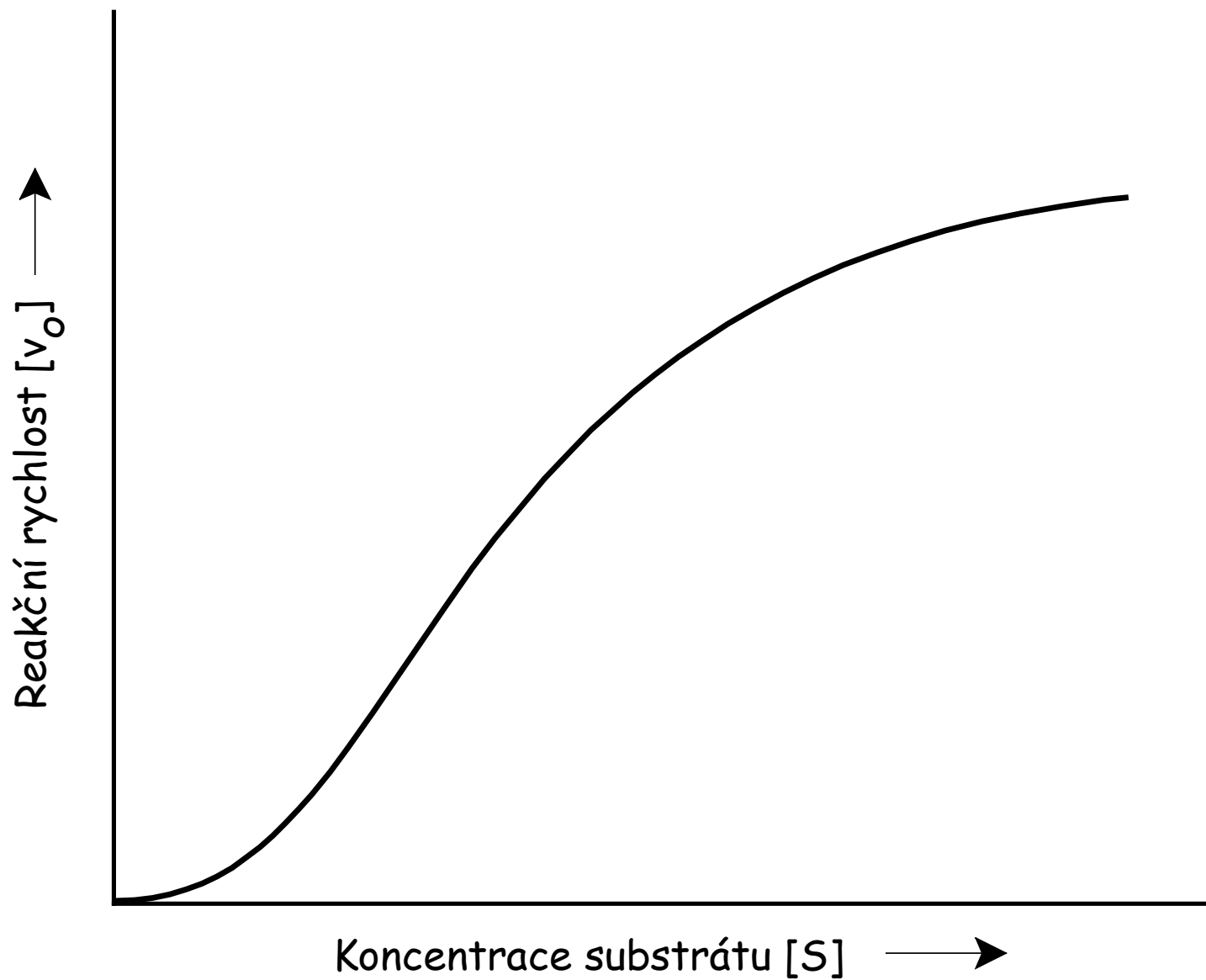


Clelandovo schéma pingpongového mechanismu (aspartátaminotransferasa):



Allosterické enzymy

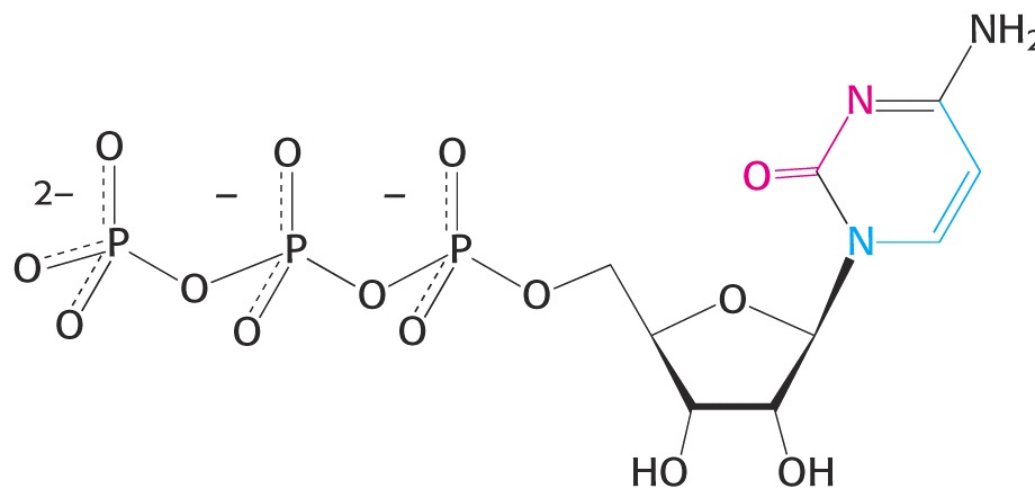
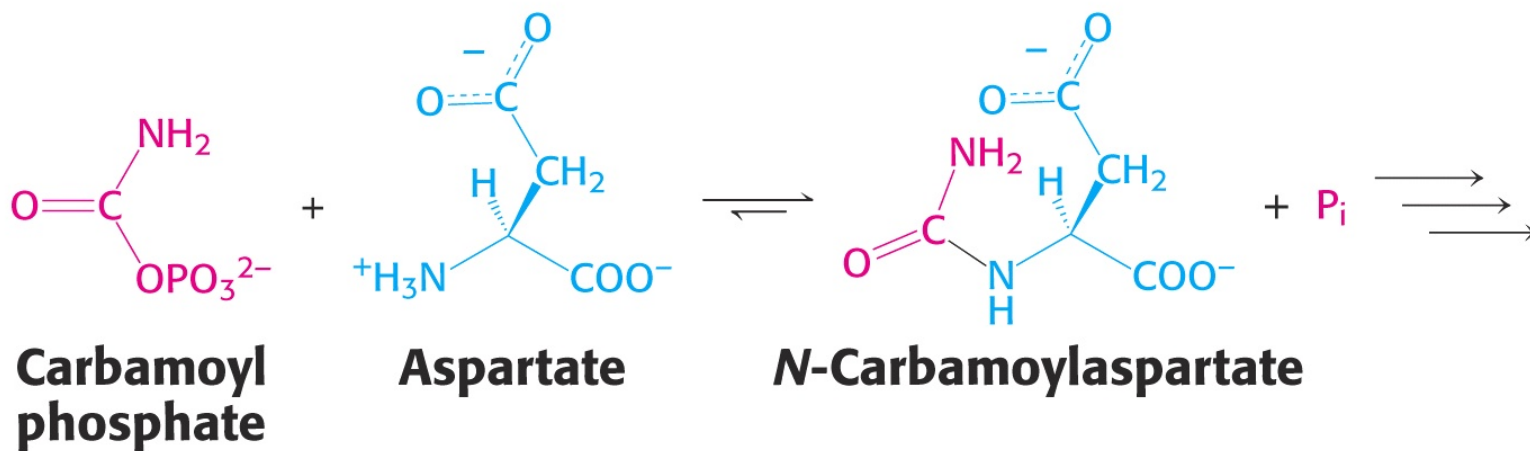
- Allosterické enzymy se neřídí kinetikou Michaelise a Mentenové.
- Skládají se z podjednotek (kvarterní struktury). Mají více aktivních míst a míst do kterých se váže inhibitor nebo aktivátor.
- Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu má sigmoidní charakter.



Aspartáttranskarbamoylasa (ATCasa).

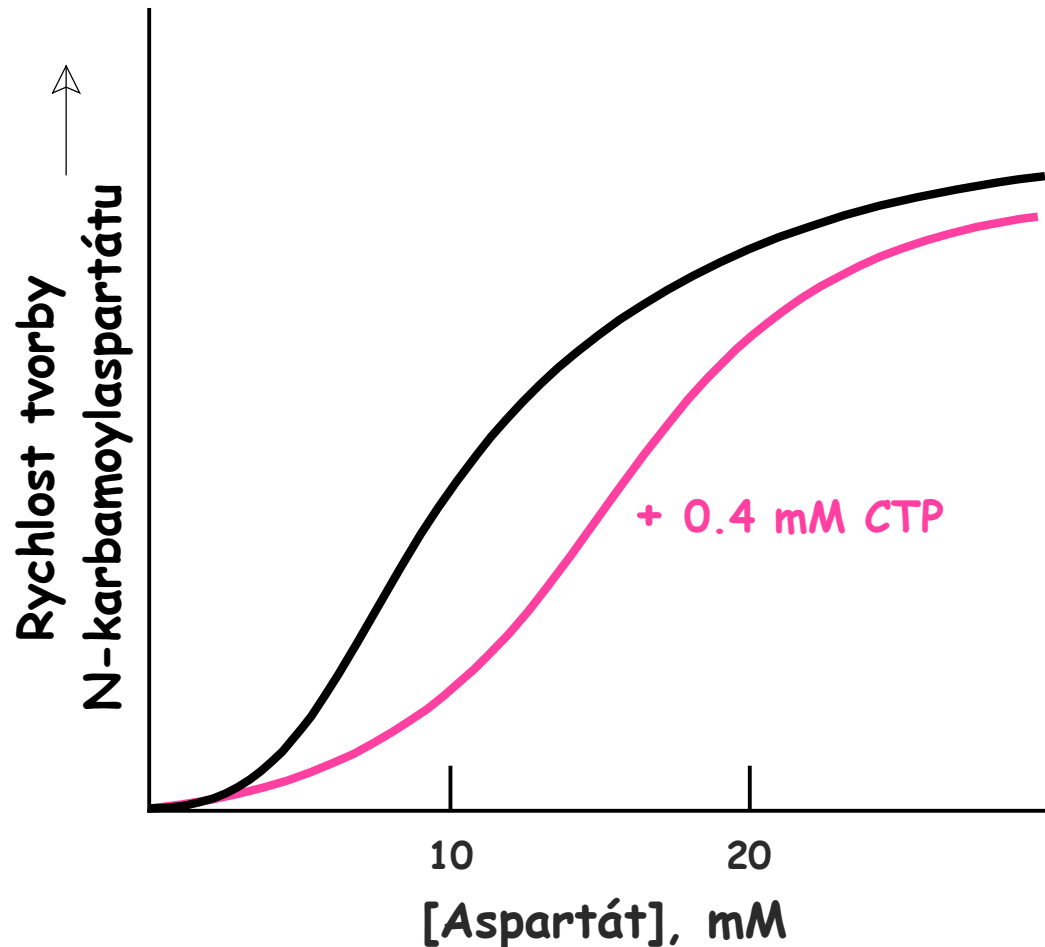
- ATCasa katalyzuje první krok biosyntézy pyrimidinových nukleotidů.
- ATCasa je inhibována produktem - cytidintrifosfátem (CTP).
- Tento typ inhibice se nazývá - zpětnovazebná inhibice nebo inhibice konečným produktem. Vždy je inhibován první reakční krok.
- *CTP je strukturně odlišný od substrátu a váže se proto na jiné místo enzymu než substrát. Taková místa se nazývají allosterická (z řečtiny *allos* jiná a *steros* struktura, místo).*
- ATCasa je složena ze dvou katalytických podjednotek (každá obsahuje tři řetězce) a tří regulačních podjednotek (každá obsahuje dva řetězce).
- *ATP je allosterický aktivátor, CTP je allosterický inhibitor.*

Aspartáttranskarbamoylasa

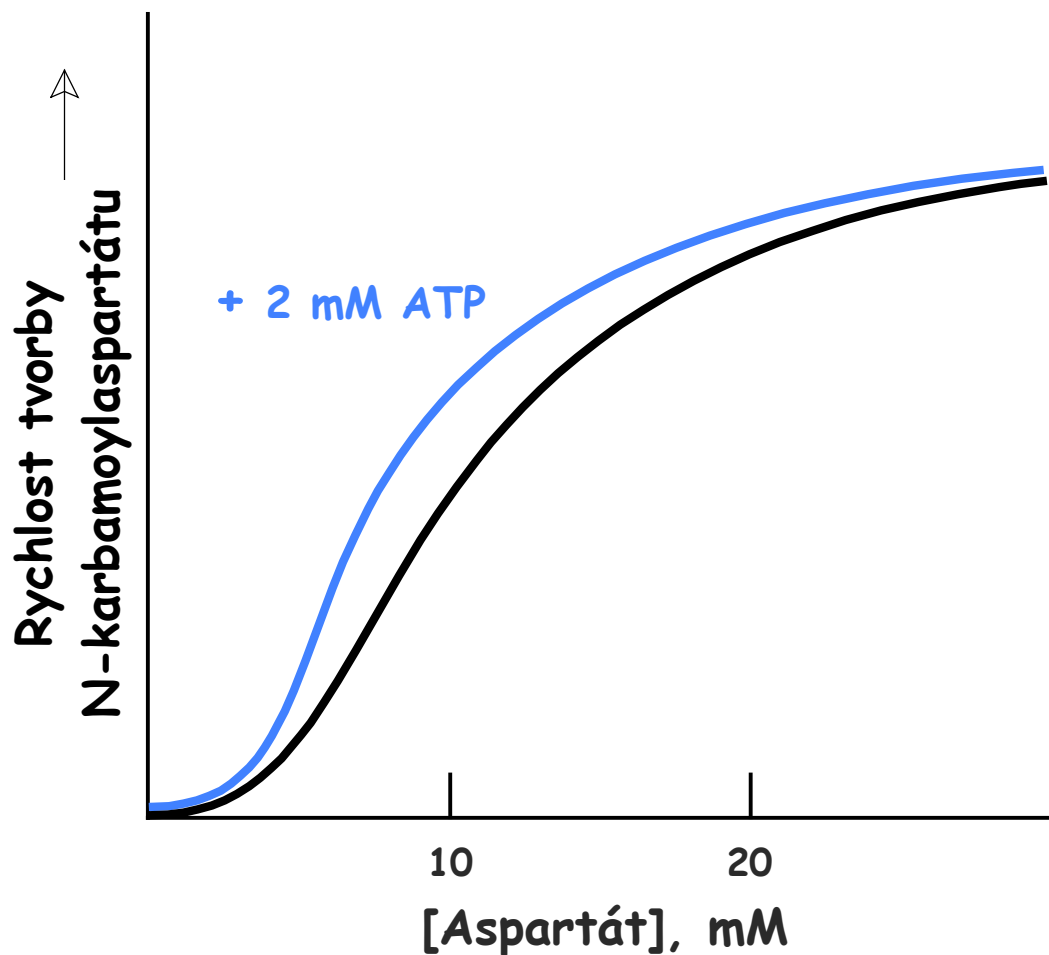


Cytidine triphosphate (CTP)

Aspartáttranskarbamoylasy jako příklad allosterického enzymu. Přidavek allosterického inhibitoru - CTP.



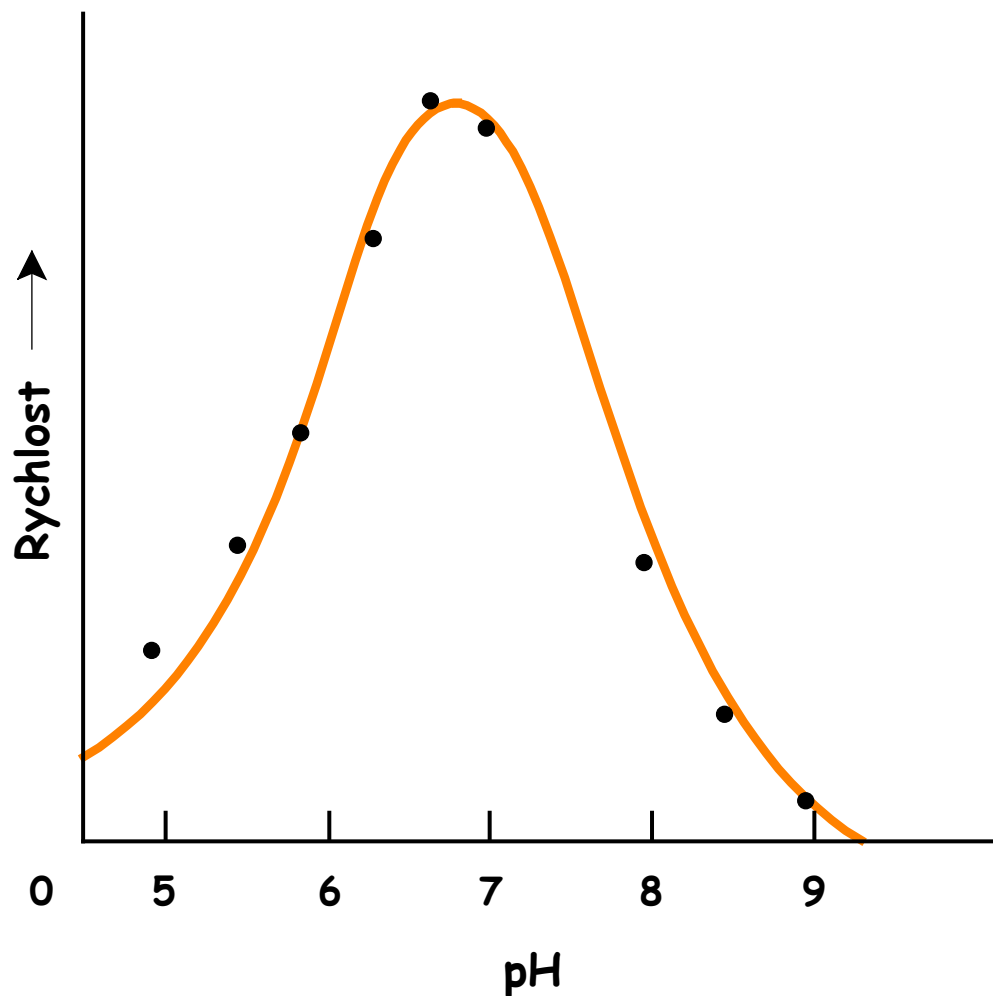
Aspartáttranskarbamoylasa. Přídavek allosterického aktivátoru ATP.



Rychlost enzymové reakce závisí na pH, teplotě a iontové síle prostředí.

- Většina enzymů je aktivní pouze v úzkém rozmezí pH. Spočívá to ve vlivu pH na kombinaci faktorů:
 - A) Vazba substrátu na enzym
 - B) Stav ionizace substrátu
 - C) Ionizační stavy vedlejších řetězců aminokyselin v aktivním místě
- Většina enzymových reakcí vytváří zvonovou křivku závislosti reakční rychlosti na pH. Např. fumarasa.
- **Hodnotu pH, při které dochází k nejvyšší rychlosti enzymové reakce nazýváme pH optimum.**

Fumarasa (enzym cyklu trikarboxylových kyselin).



Vliv teploty na stabilitu a aktivitu enzymů.

- Teplotní stabilita enzymů závisí na řadě faktorů jako je pH, iontová síla prostředí a přítomnost nebo nepřítomnost ligandů. Substráty obecně chrání enzymy před tepelnou denaturací. Nízkomolekulární enzymy s jednoduchým polypeptidovým řetězcem obsahující disulfidové vazby, jsou obvykle teplotně stabilnější než vysokomolekulární oligomerní enzymy.
- Obecně, se zvyšující se teplotou roste aktivita enzymů. Enzymy jsou proteiny u kterých se terciární a kvarterní struktura udržuje slabými interakcemi jako jsou vodíkové vazby, iontové interakce atd. Závislost rychlosti na teplotě obvykle vykazuje vrchol, který označujeme jak **teplotní optimum**. Při dalším zvyšování teploty obvykle dochází k denaturaci proteinu. Závislost mezi rychlostní konstantou reakce a aktivační energií se vyjadřuje exponenciální Arrheniovou rovnicí.
- Vliv teploty na rychlost reakce se také vyjadřuje termínem teplotní koeficient Q_{10} . Q_{10} je faktor kterým vzroste rychlost enzymové reakce při růstu teploty o 10 °C.
- Pro teplotní oblast mezi 25 až 35 °C je tímto faktorem číslo 2.
- Pro práci s enzymy je doporučována IUB teplota 30 °C.

Inhibice enzymové aktivity

Ireversibilní

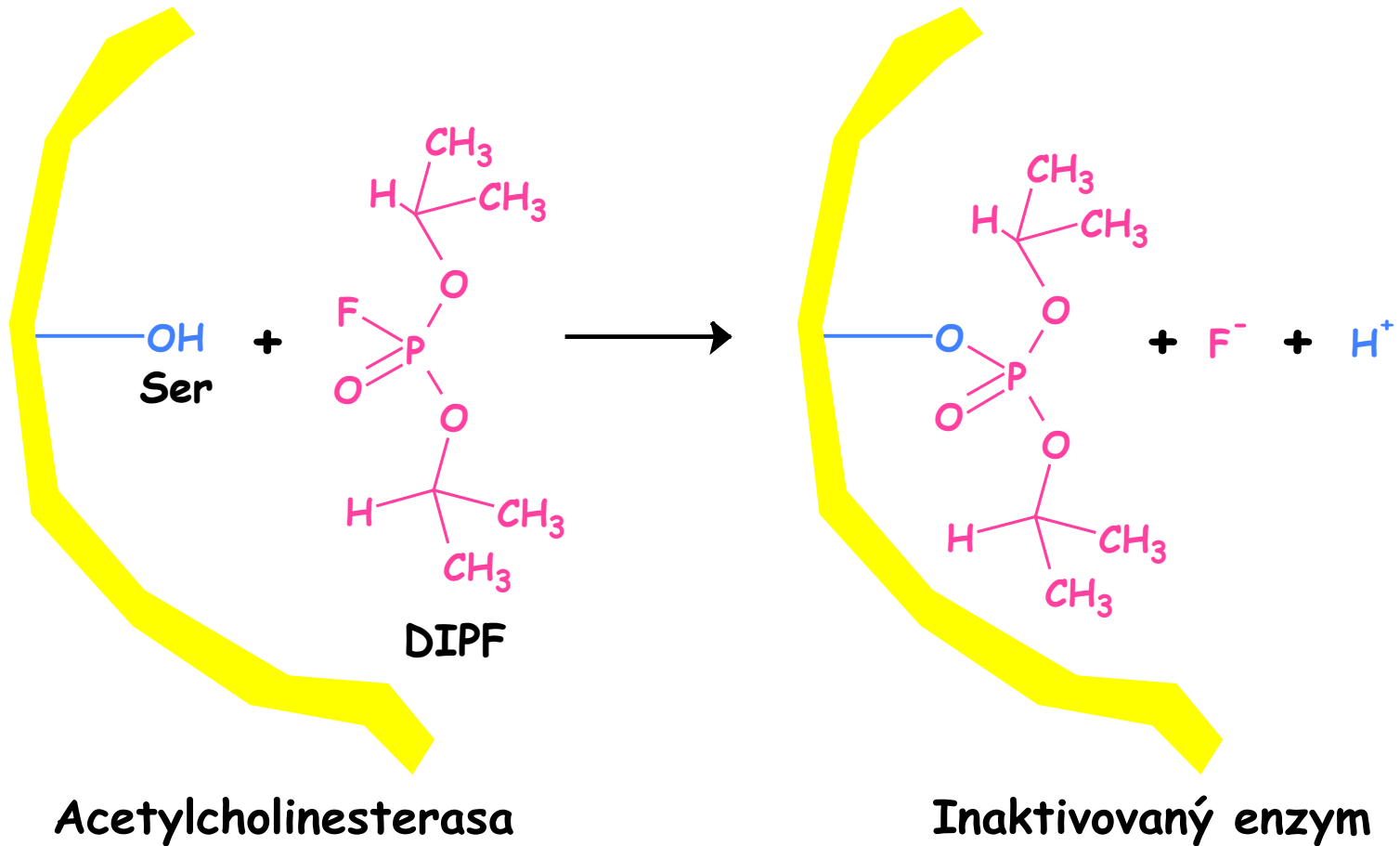
Reversibilní

- a. Kompetitivní
- b. Nekompetitivní
- c. Akompetitivní

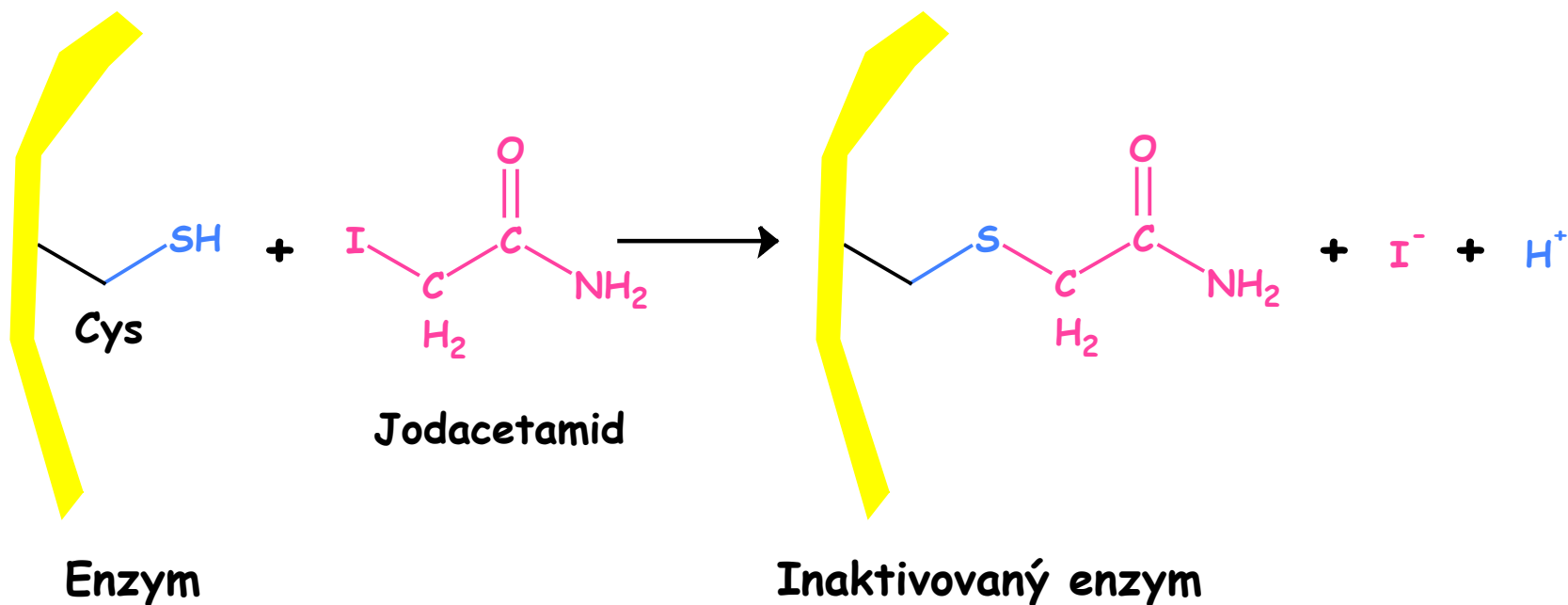
Ireversibilní inhibice

- Ireversibilní inhibitory blokují nevratně enzymovou aktivitu tím, že vytváří s enzymem velmi pevný kovalentní komplex enzym - inhibitor.
- Příklad: Inhibice cholinesterasy a proteinas diisopropylfluorfosfátem, který se kovalentně váže na Ser v aktivním místě nebo reakce enzymů s ionty těžkých kovů.

Ireversibilní inhibice acetylcholinesterasy (enzym přenosu nervového vzruchu) diisopropylfosfofluoridem (DIPF):



Inaktivace cysteinového řetězce enzymu jodacetamidem:

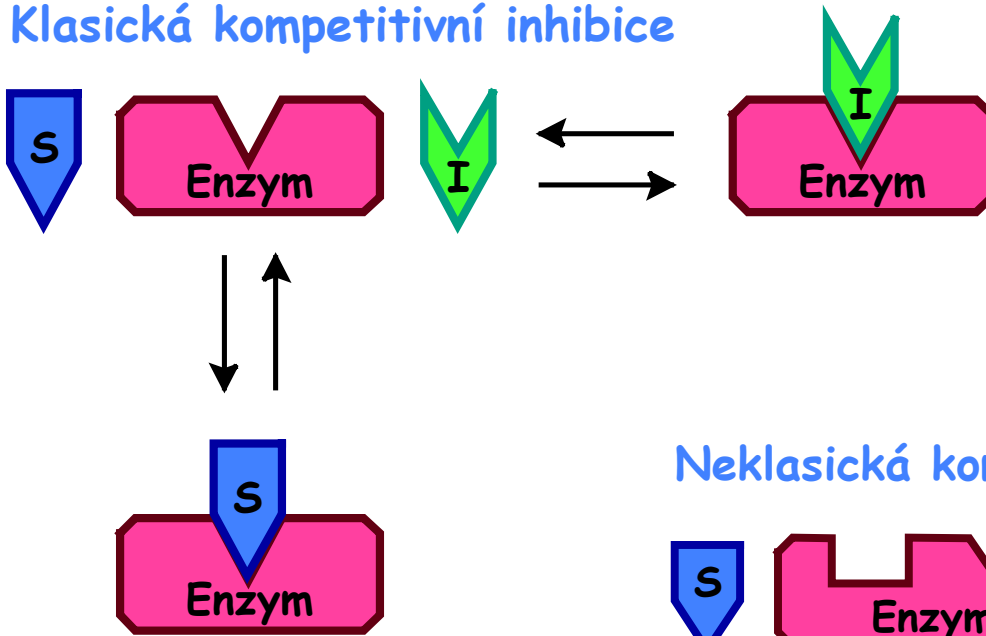


Reversibilní inhibice

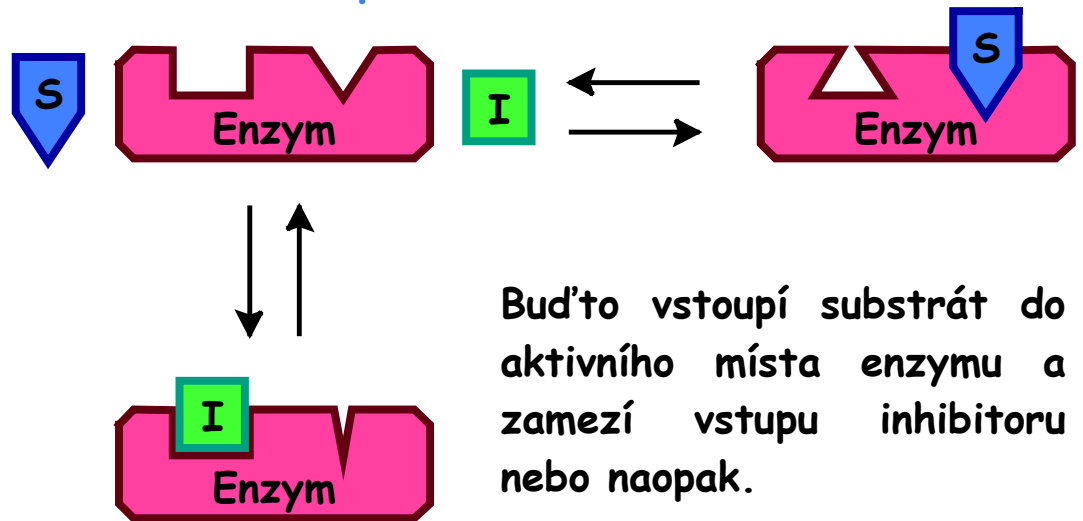
- Vytváří se reversibilní komplex mezi inhibitorem a enzymem nebo mezi inhibitorem, enzymem a substrátem.
- Rozeznáváme tři typy reversibilních inhibicí:
- A) Kompetitivní - soutěží substrát a inhibitor o aktivní místo.
- B) Nekompetitivní - inhibitor se váže na molekulu enzymu do jiného místa než substrát, ale brání tvorbě produktu.
- C) Akompetitivní - vazba substrátu na enzym předchází vazbě enzymu. **Teprve vazbou substrátu na na enzym se vytvoří vazebné místo pro inhibitor a vzniklý ternární komplex je inaktivní.**

Kompetitivní inhibice

Klasická kompetitivní inhibice

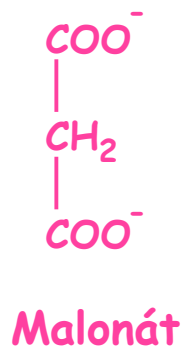
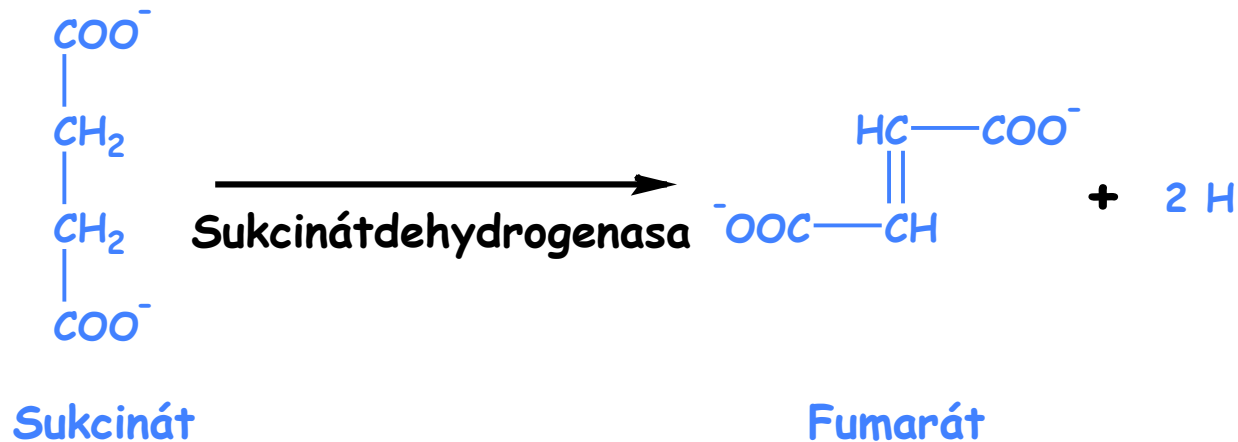


Neklasická kompetitivní inhibice



Buďto vstoupí substrát do aktivního místa enzymu a zamezí vstupu inhibitoru nebo naopak.

Příklad klasické kompetitivní inhibice sukcinátdehydrogenasy (enzym citrátového cyklu) malonátem:



Kompetitivní
inhibitor



$$K_i = [E] [I] / [EI]$$

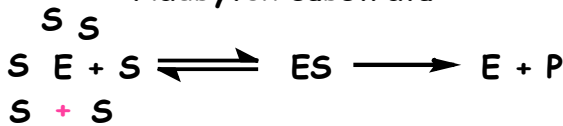
Kompetitivní inhibice

dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka:

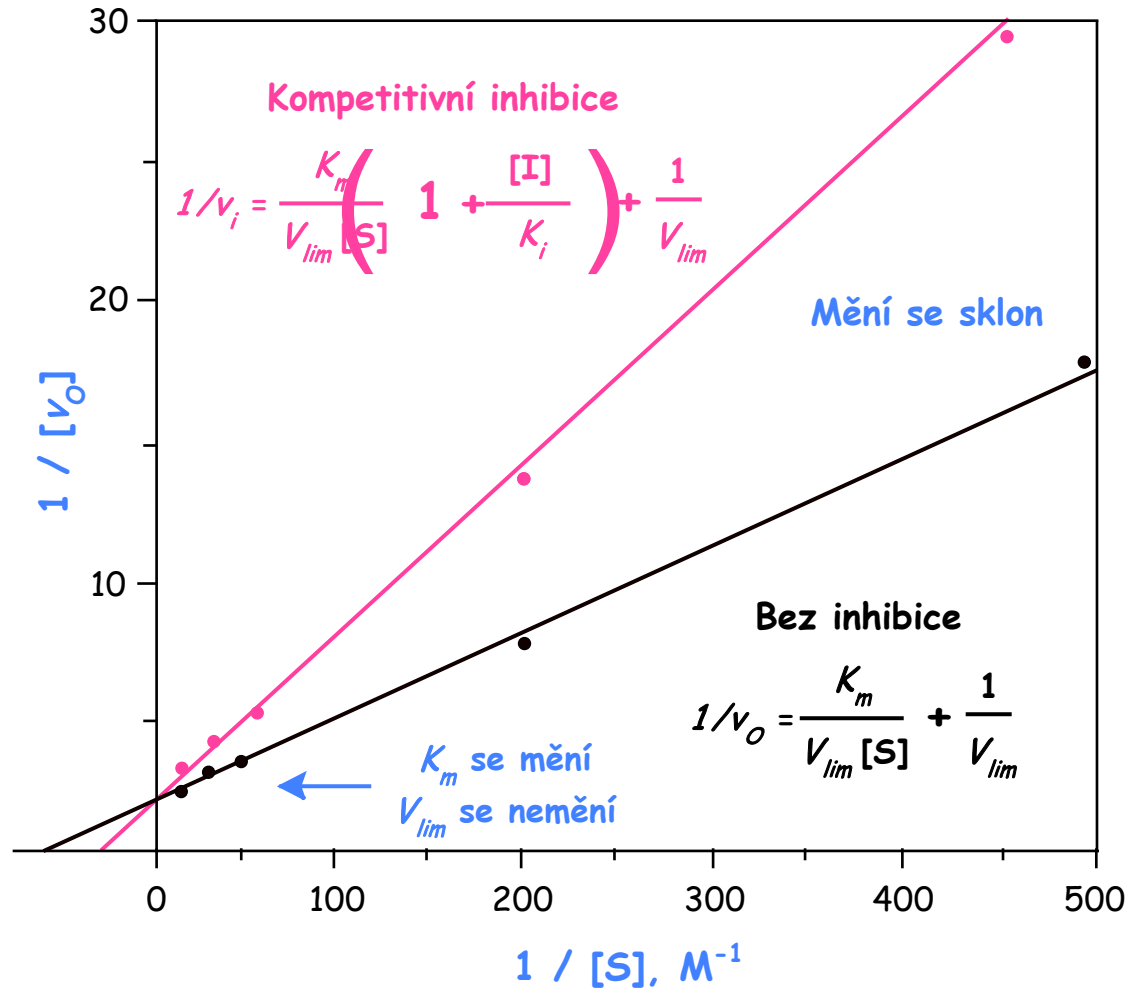
Stejné množství
substrátu a inhibitoru:



Nadbytek substrátu:



$$K_i = [E][I] / [EI]$$



Potlačení intoxikace ethylenglykolem - ethanolem:

Tvorba oxalové kyseliny z ethylenglykolu je inhibována ethanolem:

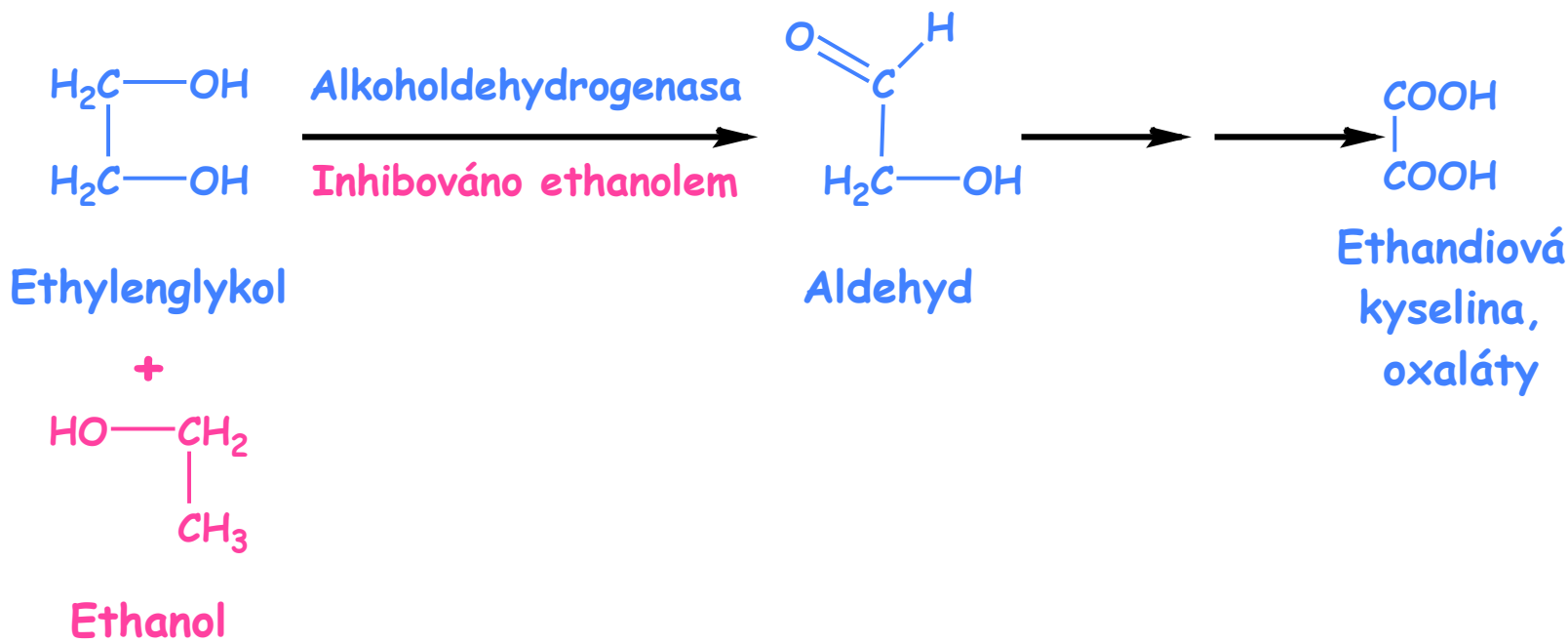


Schéma nekompitivní inhibice:

Nekompitivní inhibice

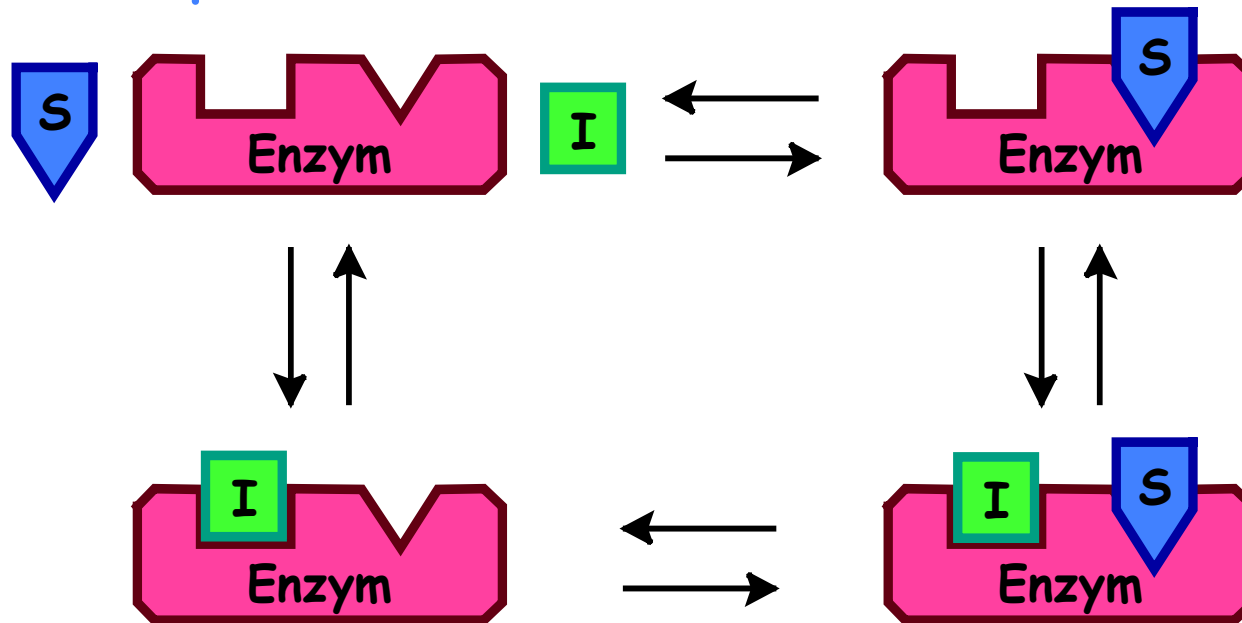
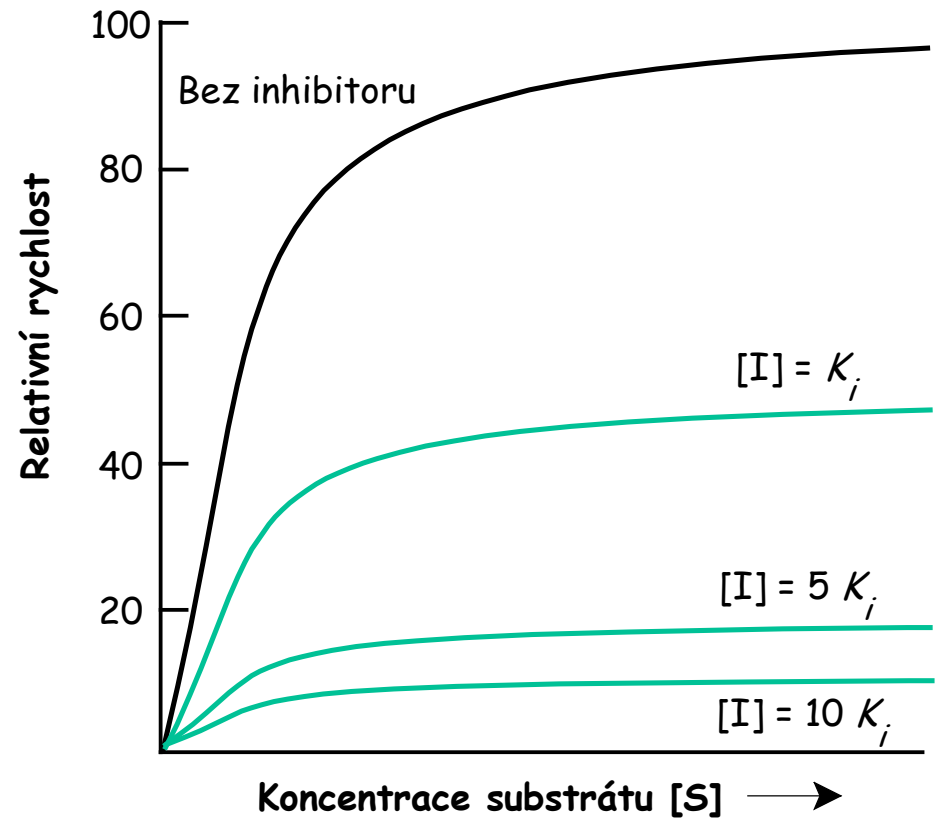
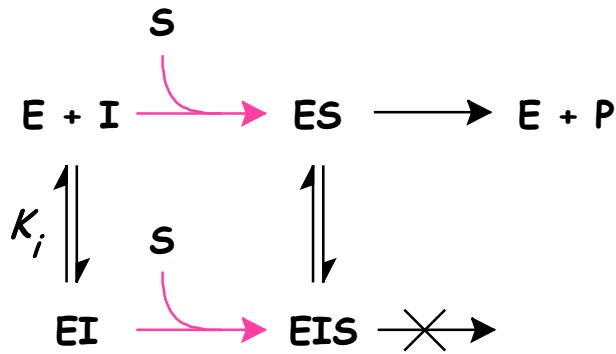


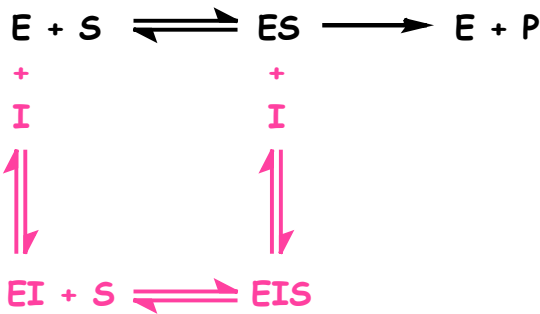
Schéma a grafické vynesení nekompetitivní inhibice dle rovnice Michaelise a Mentenové:



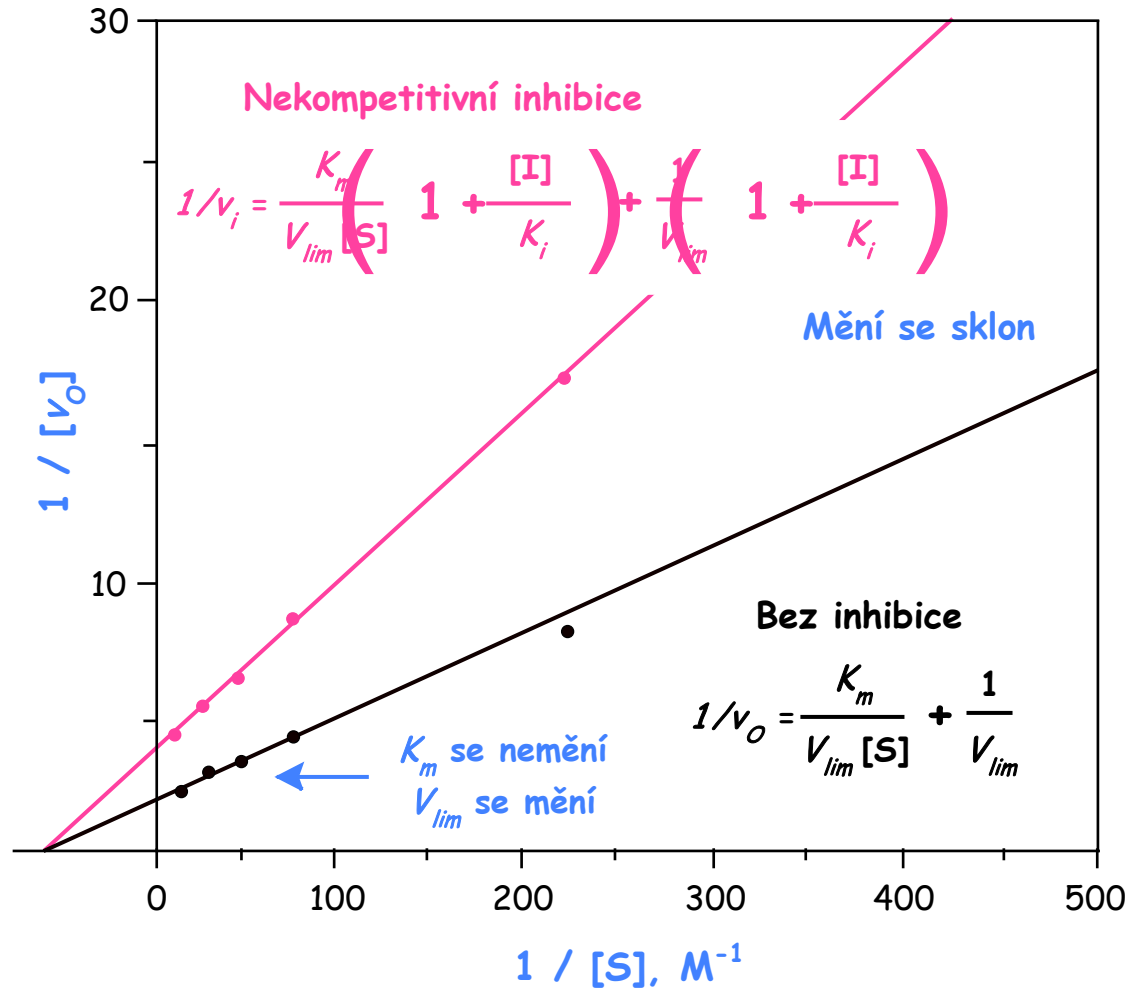
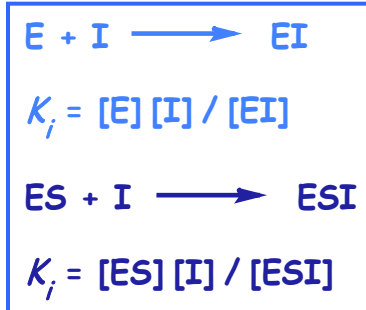
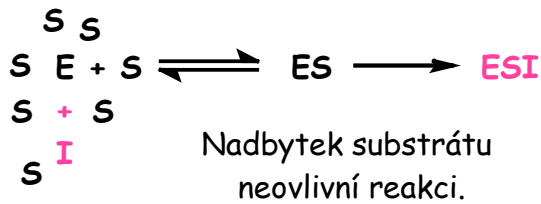
Nekompetitivní inhibice

dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka:

Stejné množství
substrátu a inhibitoru:

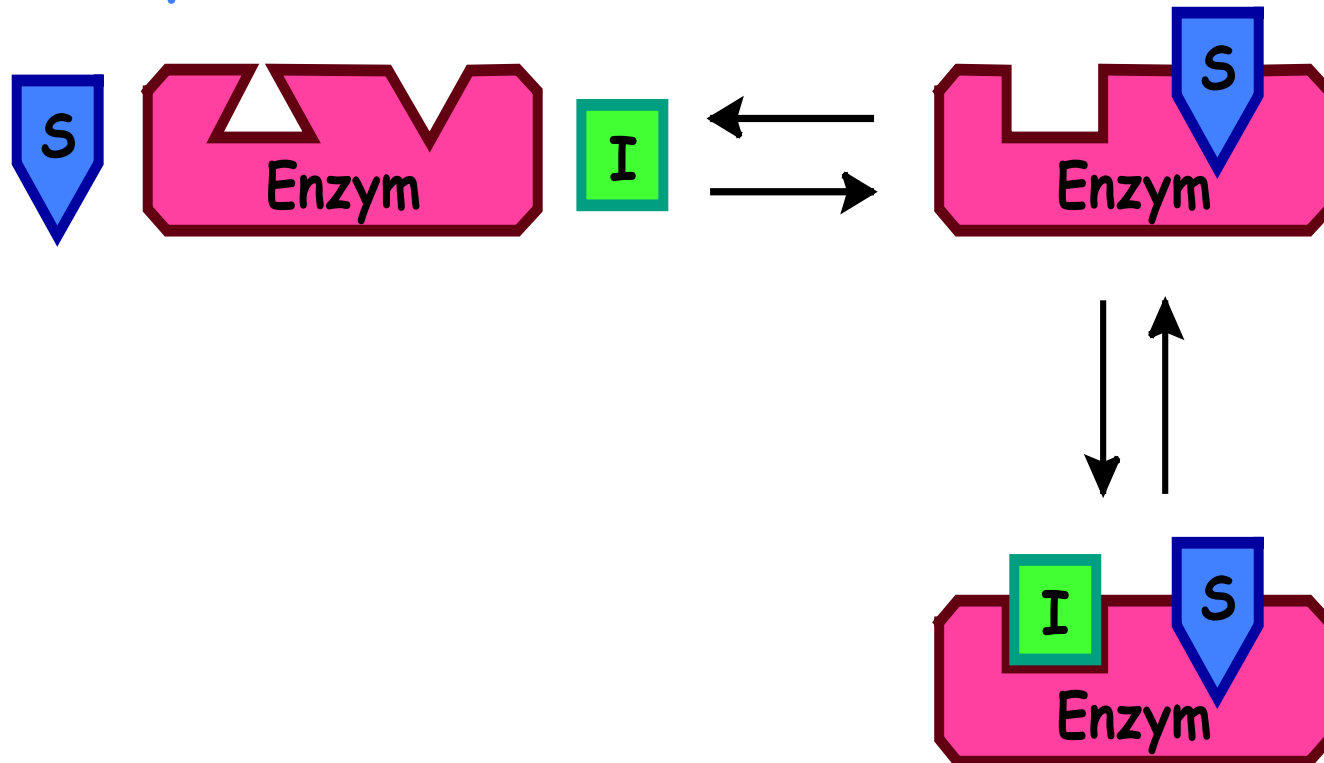


Nadbytek substrátu:



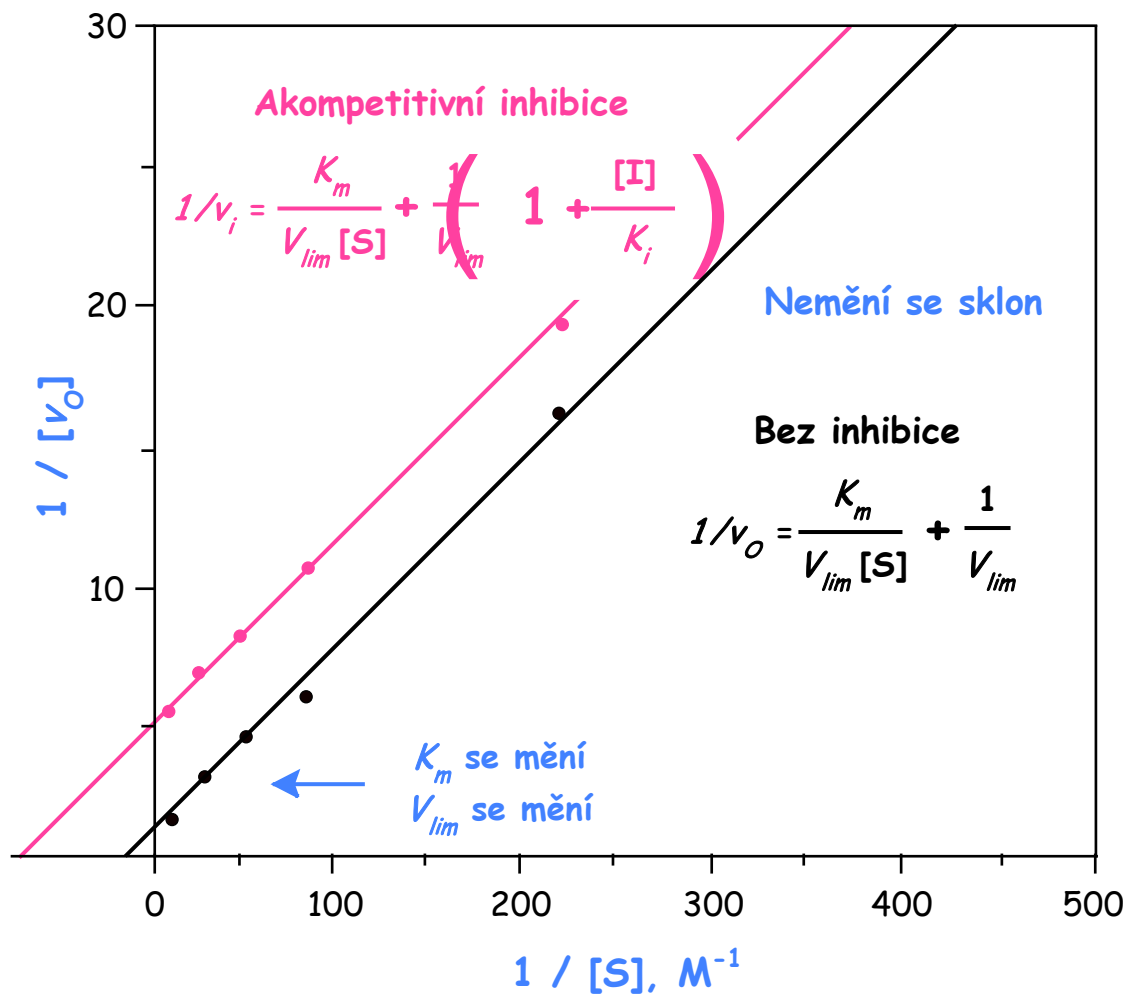
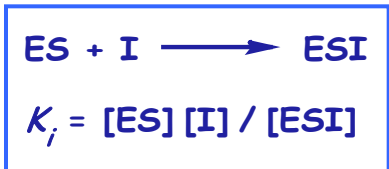
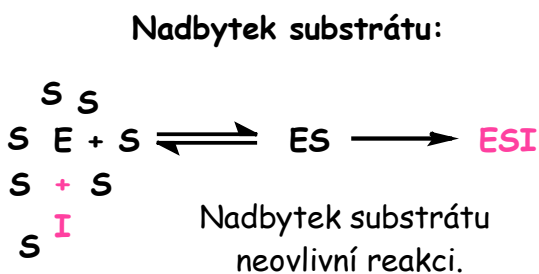
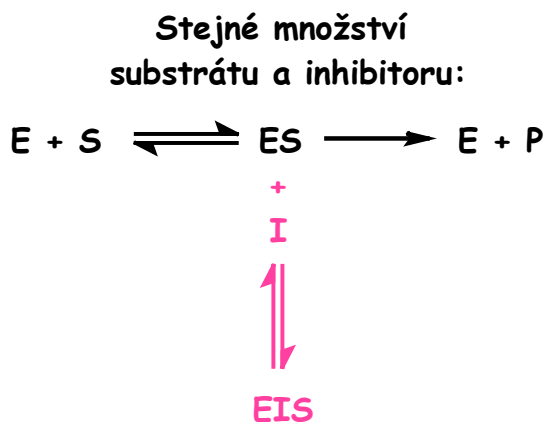
Akompetitivní inhibice. Podmínkou vazby inhibitoru je vazba substrátu. Ternární komplex.

Akompetitivní inhibice



Akometitivní inhibice

dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka:



Tabulka typů inhibice a příslušných konstant:

Inhibice	Konstanty
Kompetitivní I se váže jen na E	Roste K_m , V_{lim} se nemění.
Nekompetitivní I se váže jak na E tak na ES	Klesá V_{lim} , K_m se nemění
Akompetitivní I se váže jen na ES	Klesá V_{lim} a K_m Poměr V_{lim} / K_m se nemění

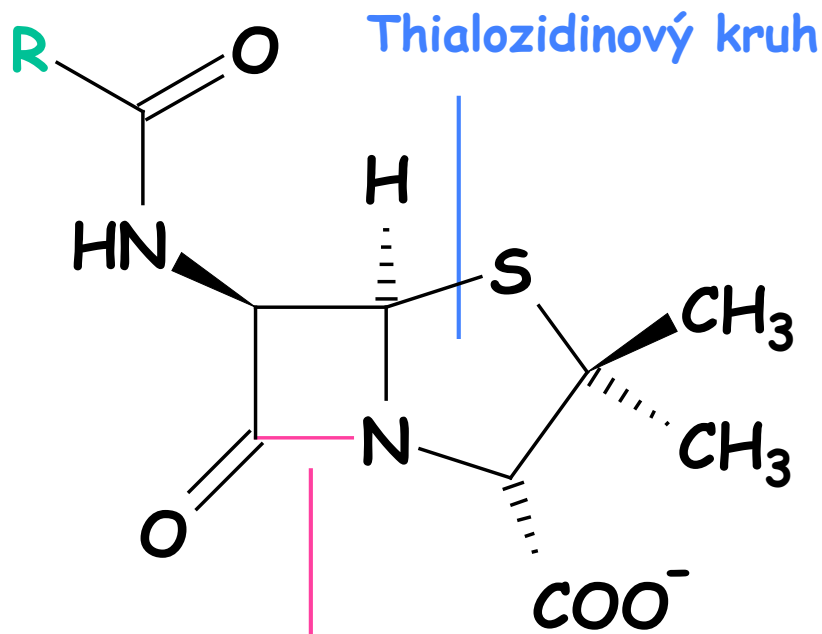
PENICILIN jako INHIBITOR vzniklý enzymovou reakcí - sebevražedný substrát.

- Penicilin ireversibilně inhibuje růst bakterií - narušuje syntézu bakteriální stěny.
- Penicilin inhibuje enzym glykopeptidtranspeptidasu tím, že napodobuje přirozený substrát enzymu a tím je D-Ala-D-Ala (dipeptid). Penicilin se kovalentně naváže na Ser aktivního místa glykopeptidtranspeptidasy.
- Inhibice penicilinem zasahuje do stavby buněčné stěny. Penicilin zabraňuje zesít'ování peptidoglykanových vláken buněčné stěny.

Struktura penicilinu. Dipeptid (Val a Cys).

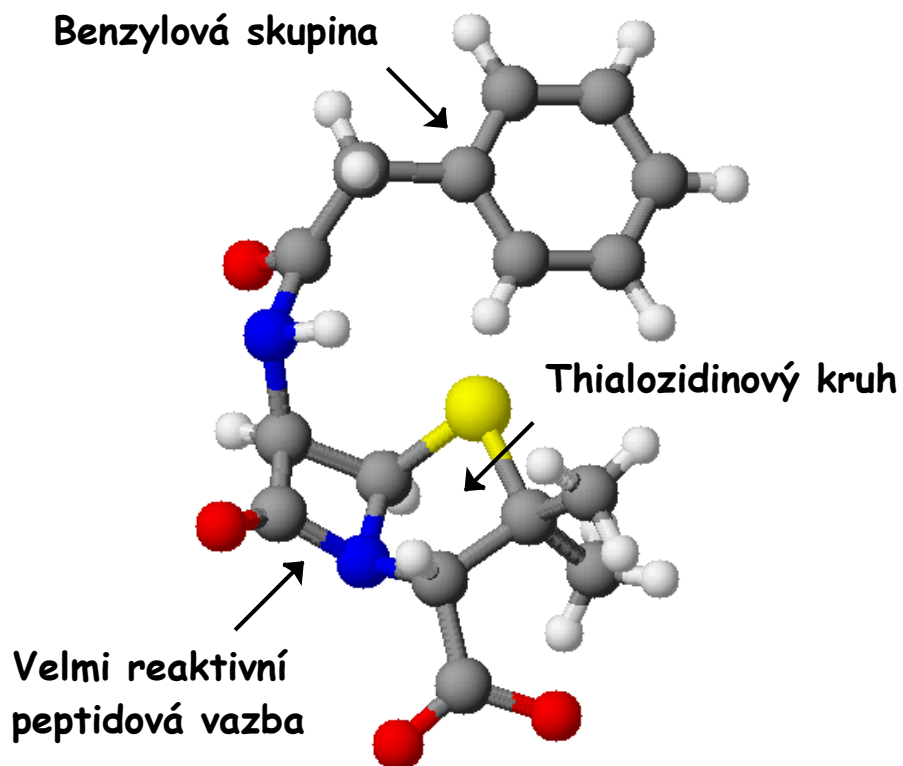
Thiazolidinový kruh, reaktivní peptidová vazba β -laktamového kruhu a R je zaměnitelná skupina.

Variabilní skupina

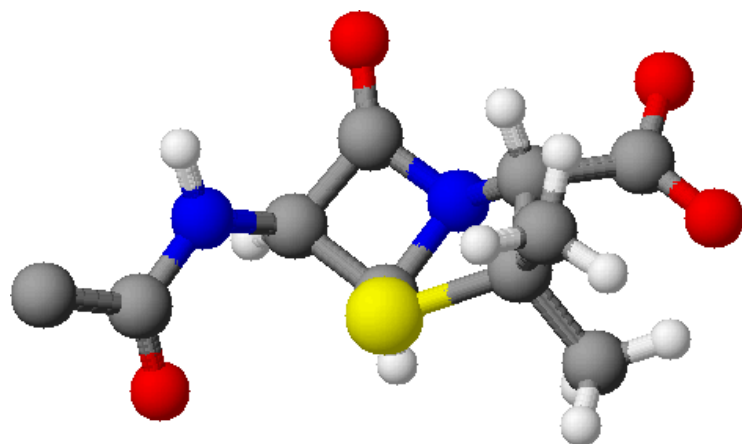


Reaktivní peptidová
vazba v β -laktamovém
kruhu

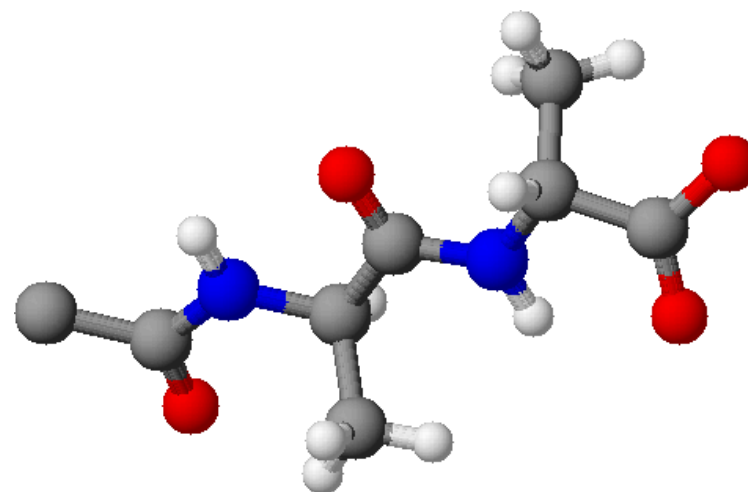
Model benzylpenicilinu - penicilin G. Na místě skupiny R je benzyl.



Porovnání konformací penicilinu a dipeptidu
D-Ala-D-Ala, který penicilin napodobuje:



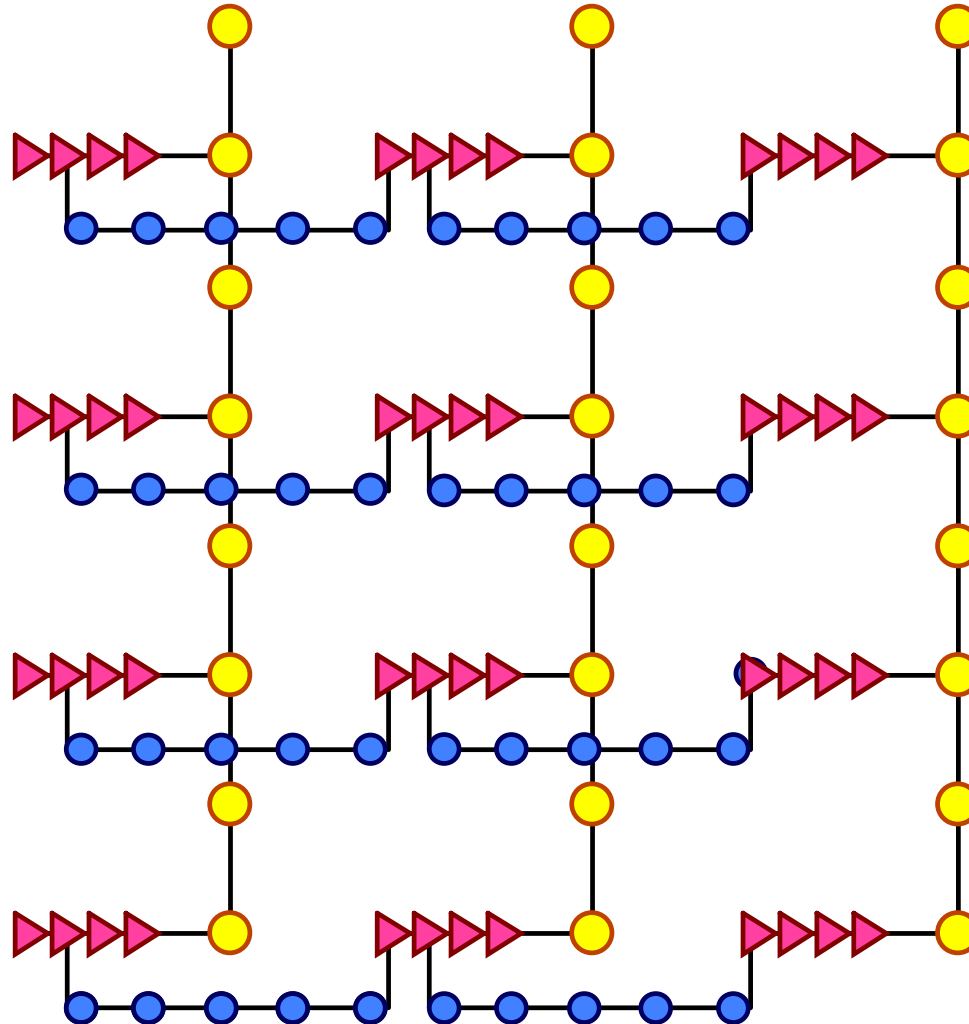
Penicilin



R-D-Ala-D-Ala peptid

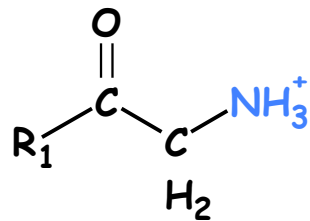
Schématické znázornění peptidoglykanu bakterie *Streptococcus aureus*.

Žlutý je sacharid, červený tetrapeptid a pentaglycinový můstek je modrý.

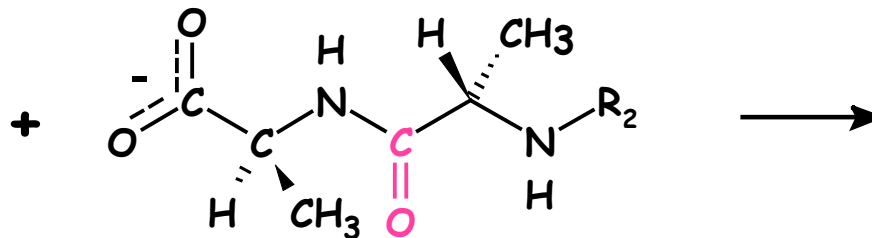


Tvorba sítě peptidoglykanu (*S. aureus*).

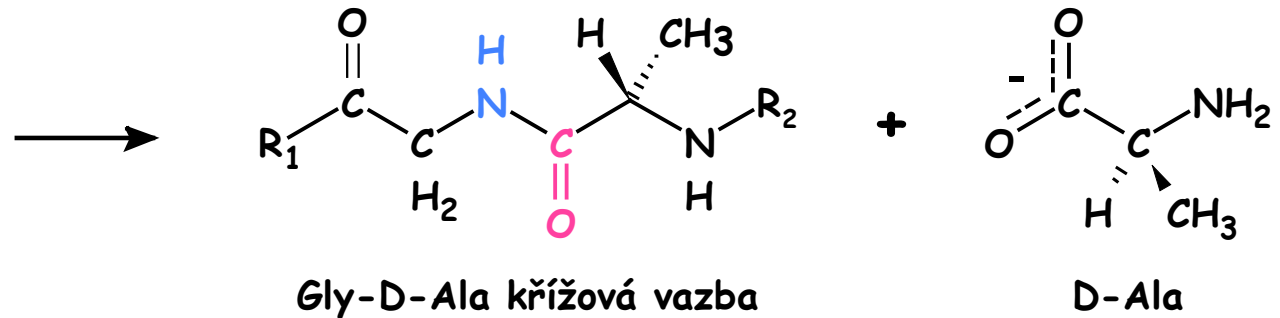
Koncová aminoskupina pentaglycinového můstku napadá peptidovou vazbu mezi dvěma D-alaniny a tím dochází k zesít'ování.



Koncový glycin
pentaglycinového můstku



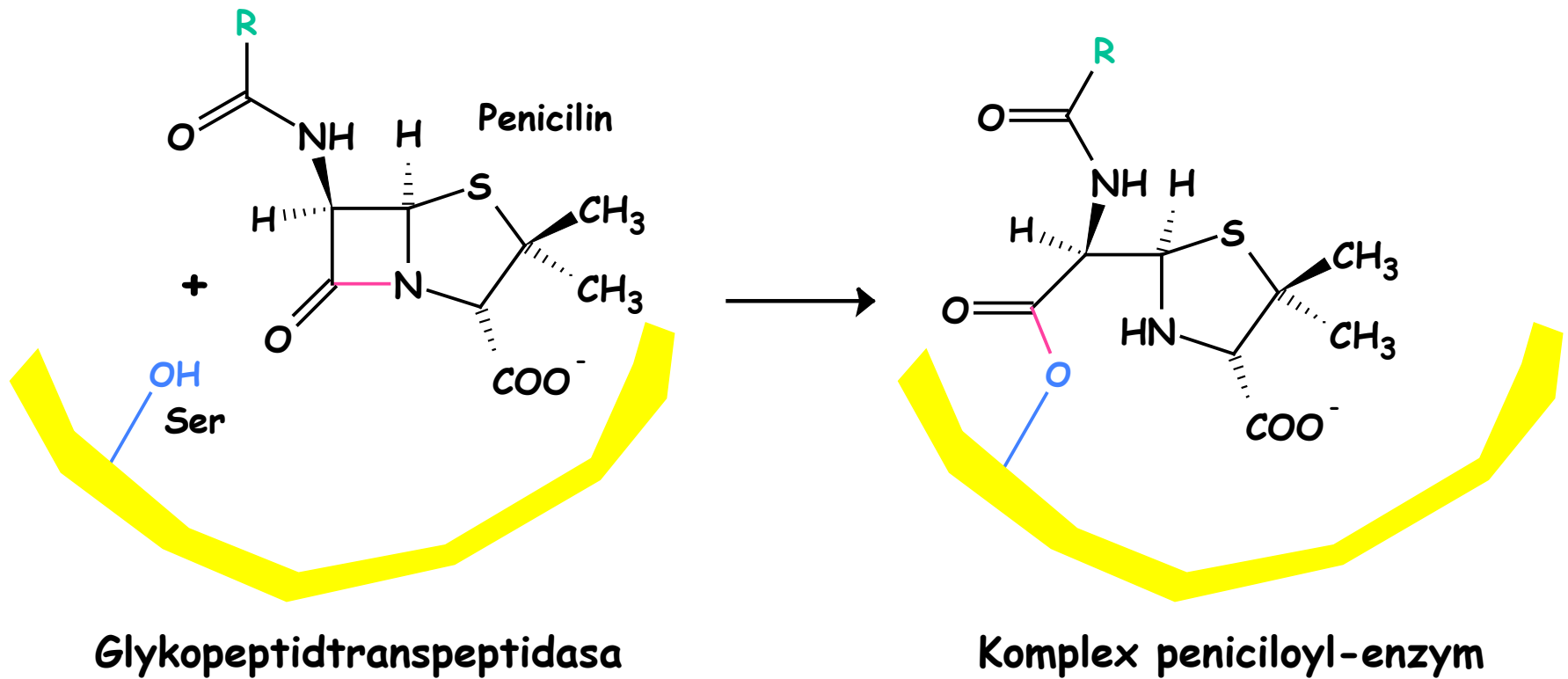
Koncová D-Ala-D-Ala
skupina



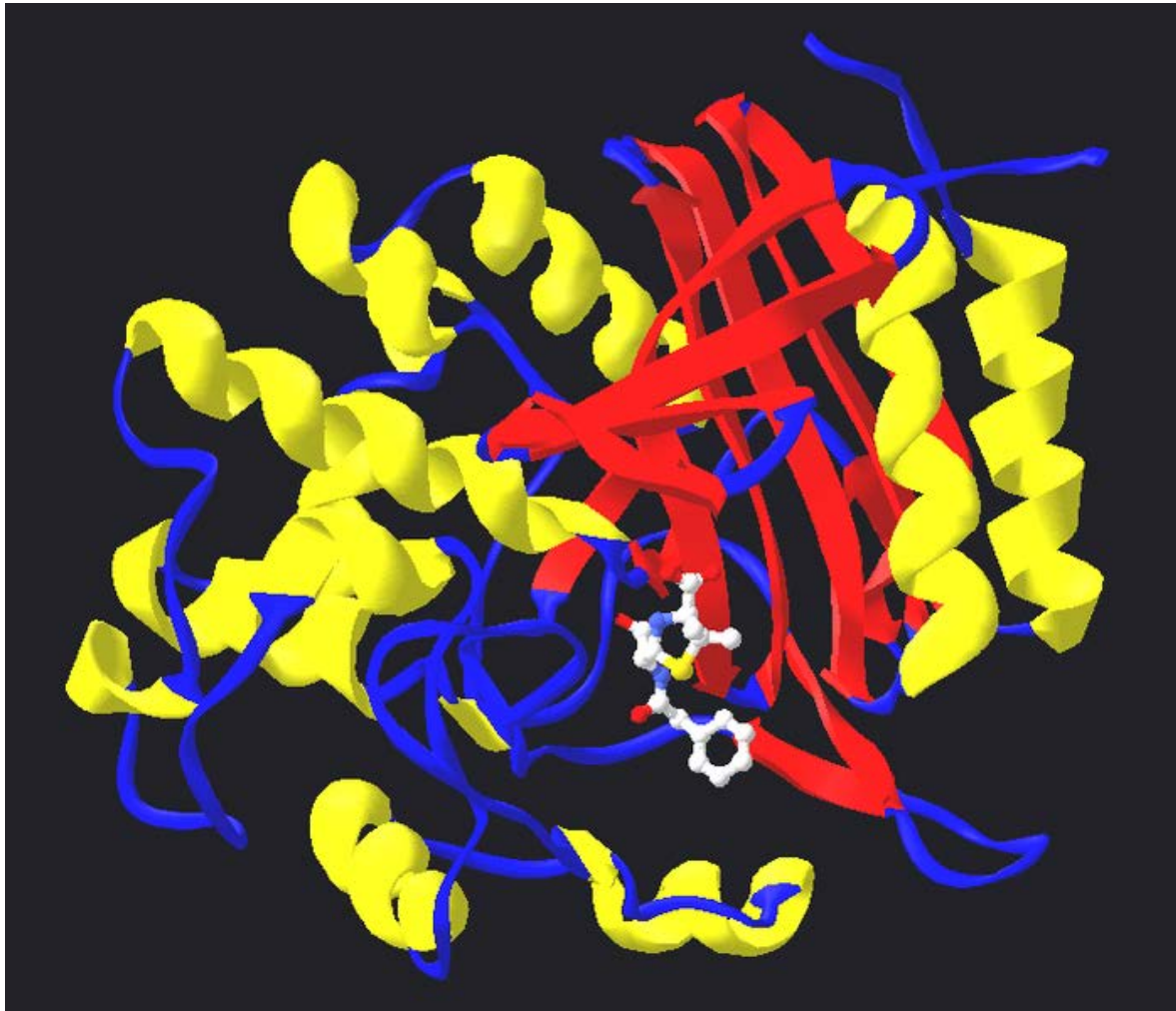
Gly-D-Ala křížová vazba

D-Ala

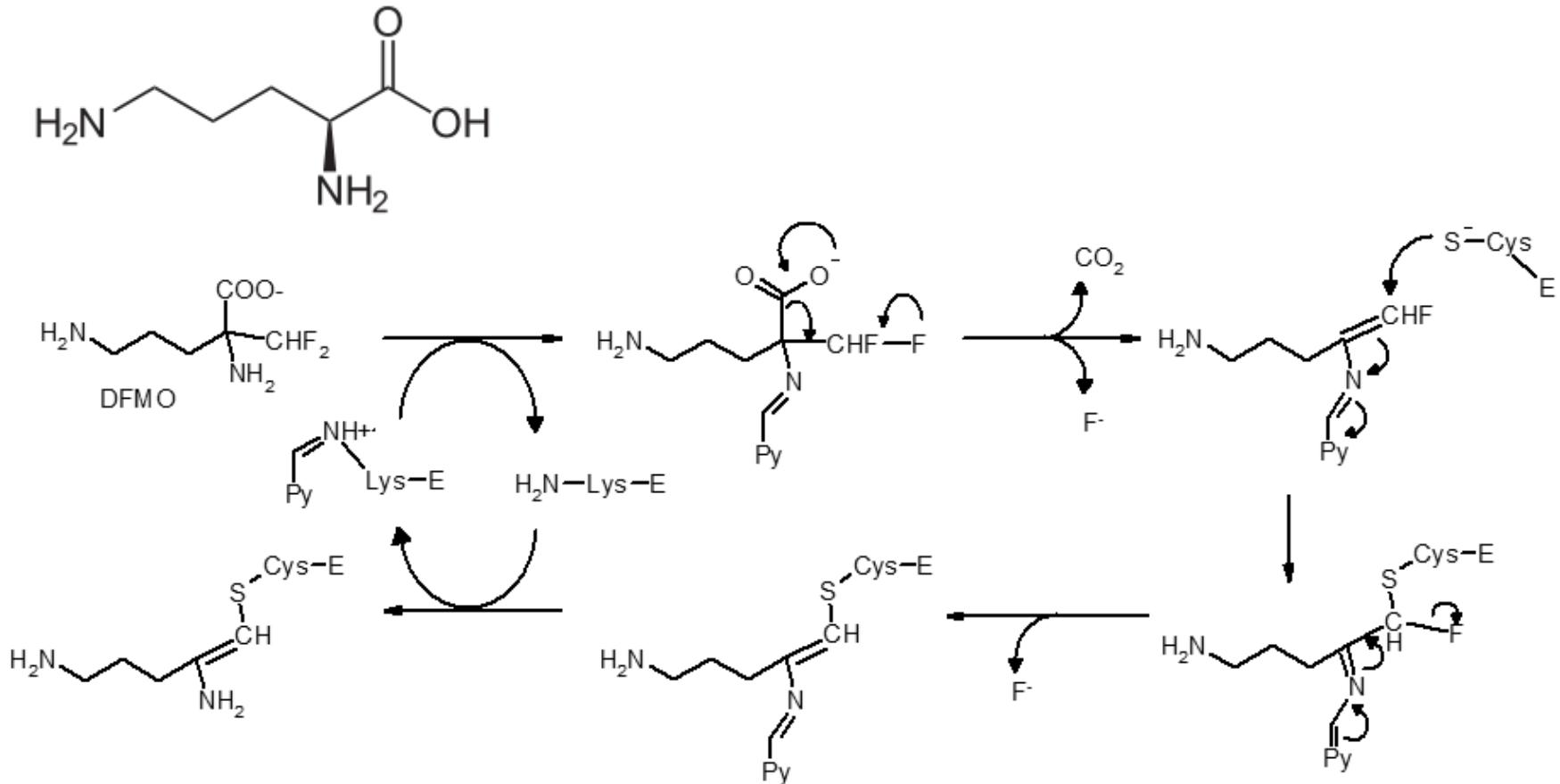
Interakce penicilinu s transpeptidasou vedoucí k velmi stabilnímu inaktivnímu komplexu.



Struktura transpeptidasy s vázaným penicilinem.



Suicide substrates, mechanism based inhibitors - sebevražedný substrát. Příklad: ornithindekarboxylasa a difluormethylornithin (DFMO).



KOENZYMY

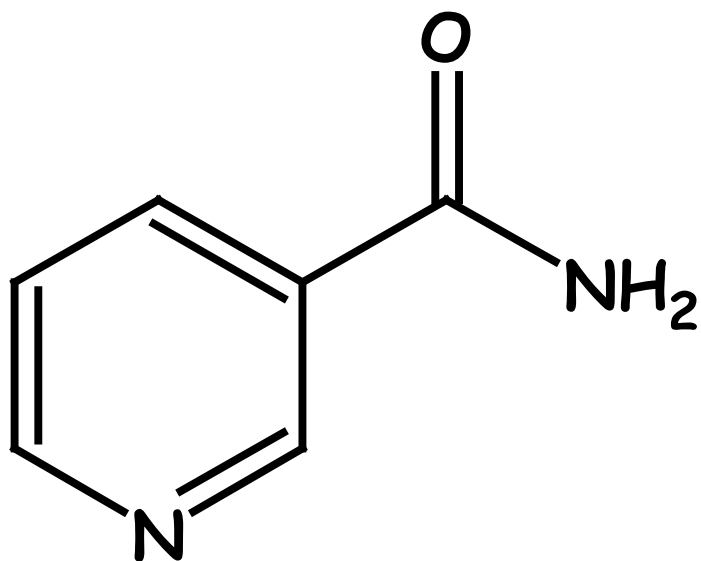
- **A) Oxidoreduktas**
- **B) Transferas**
- **C) Isomeras, ligas, lyas**

Přehledná tabulka běžných koenzymů:

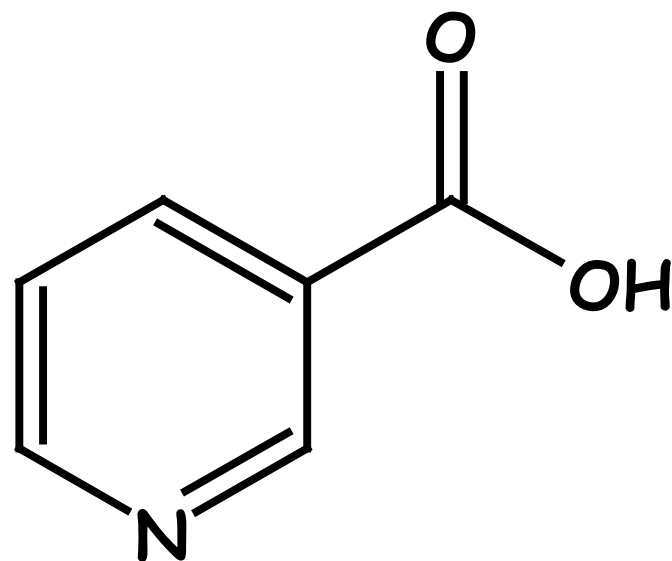
Koenzym	Enzymová reakce	Vitaminový zdroj	Onemocnění z nedostatku
Biocytin	Karboxylace	Biotin	Není známo
Koenzym A	Přenos acylů	Pantothenát (B ₅)	Není známo
Kobalaminové koenzymy	Alkylace	Kobalamin (B ₁₂)	Perniciosní anemie
Flavinové koenzymy	Oxidace-redukce	Riboflavin (B ₂)	Není známo
Lipoová kyselina	Přenos acylů	-	Není známo
Nikotinamidové koenzymy	Oxidace-redukce	Nikotinová kyselina (niacin, B ₃)	Pelagra
Pyridoxalfosfát	Přenos aminoskupin	Pyridoxin (B ₆)	Není známo
Tetrahydrofolát	Přenos C ₁ skupin	Listová kyselina	Megaloblastická anemie
Thiaminpyrofosfát	Přenos aldehydů	Thiamin (B ₁)	Beriberi

Koenzymy oxidoreduktas:

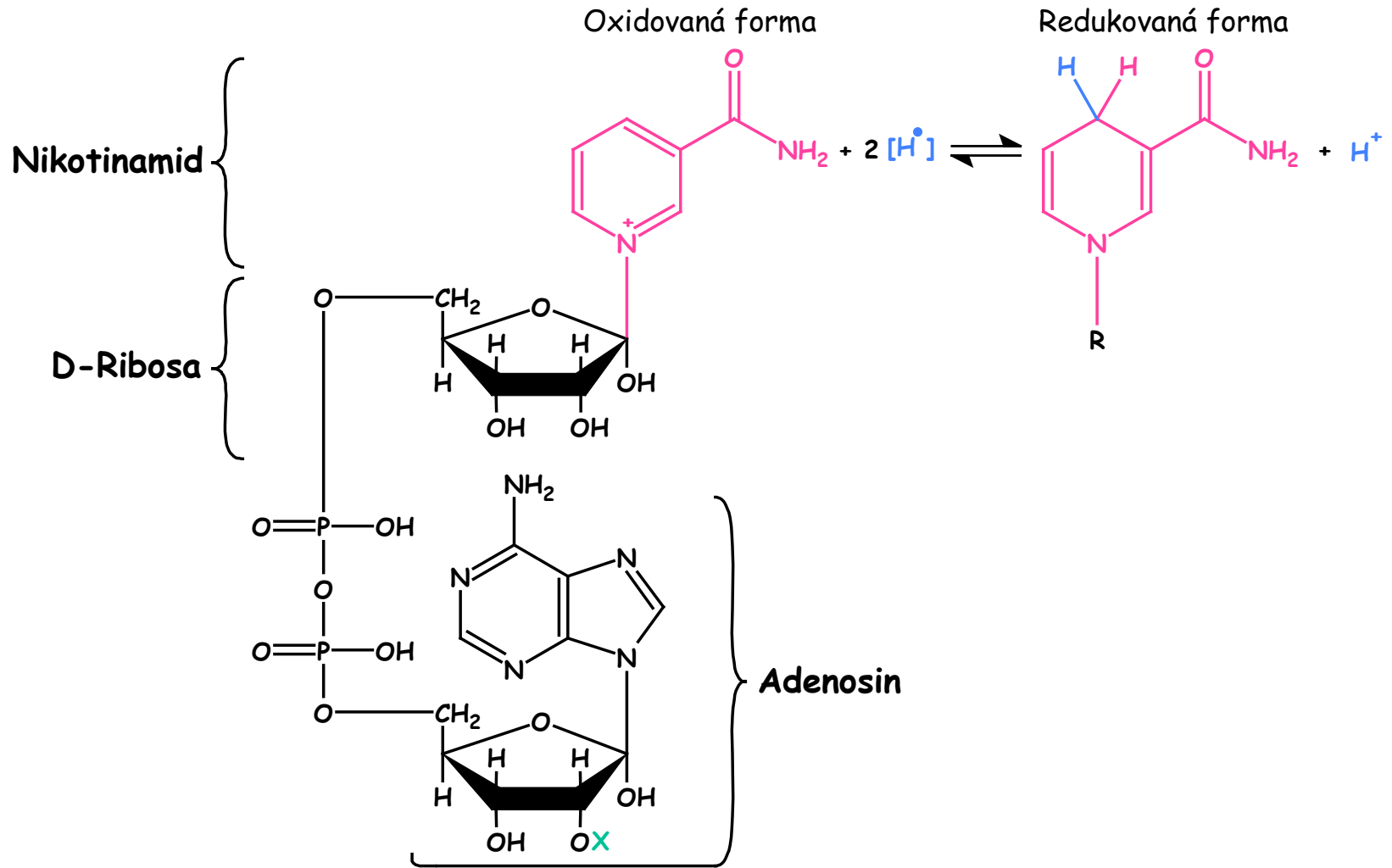
- A) Nikotinamidové
- B) Flavinové



**Nikotinamid
(niacinamid)**



**Nikotinová kyselina
(niacin)**



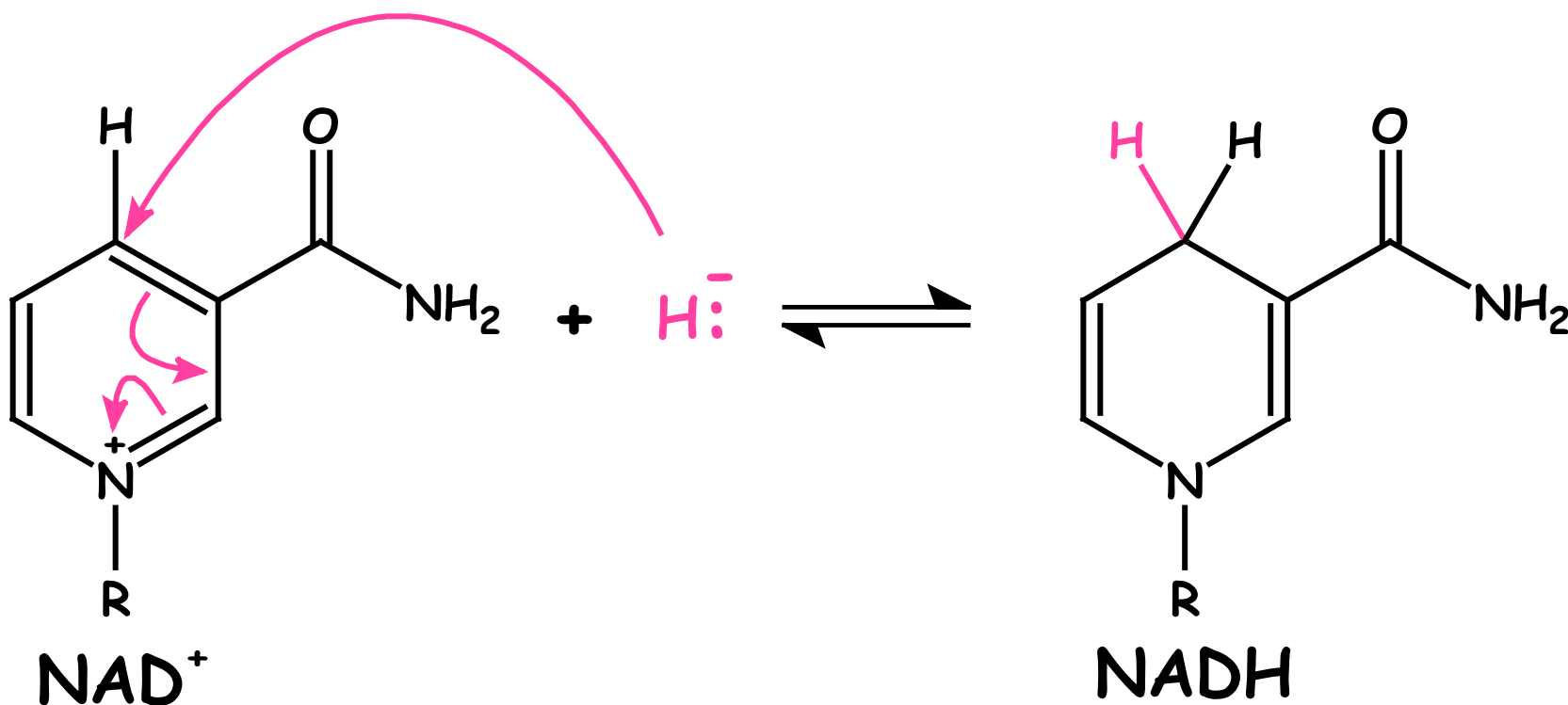
X = H

Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)

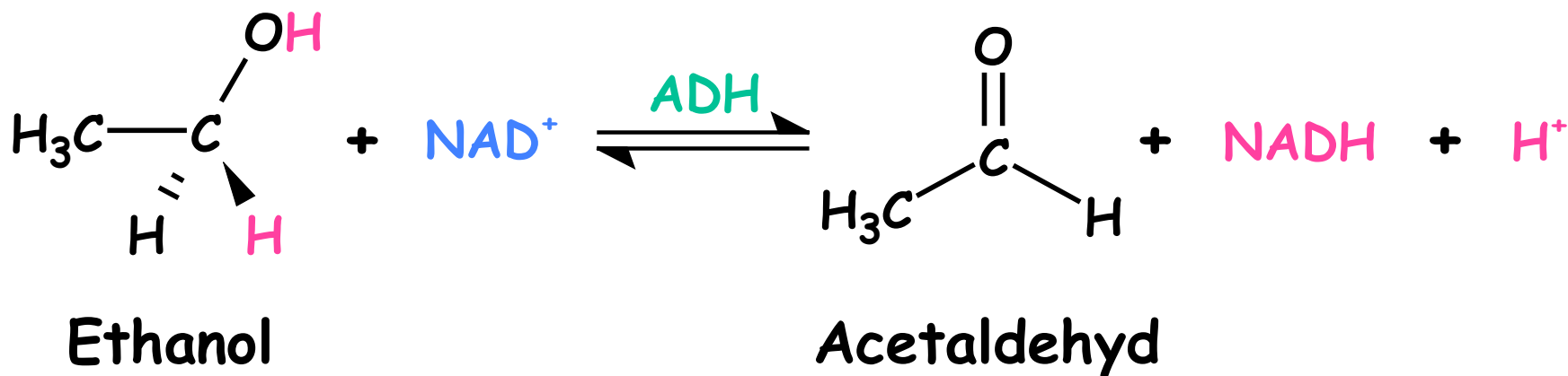
X = PO₃²⁻

Nikotinamidadenindinukleotidfofát (NADP⁺)

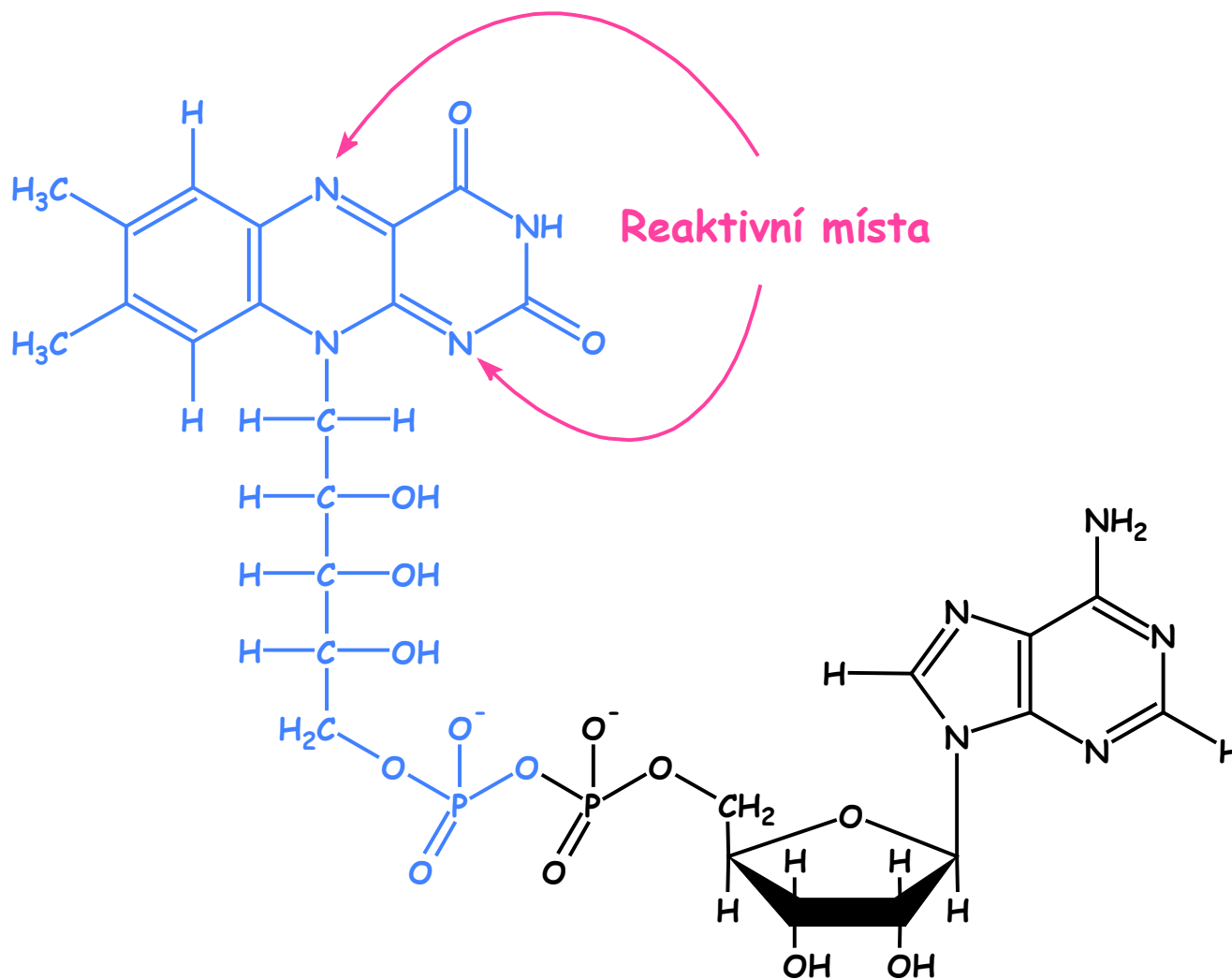
Dvouelektronový přenos (hydridový aniont)
 při oxidačně-redukční reakci NAD^+ na NADH .

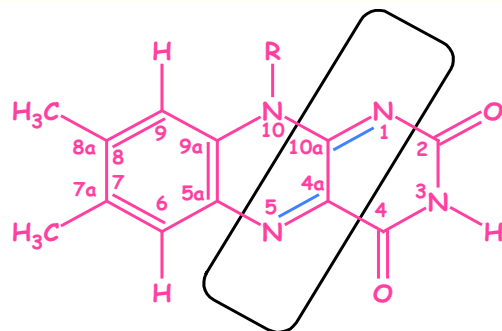


Alkoholdehydrogenasová reakce za účasti nikotinamidového koenzymu:

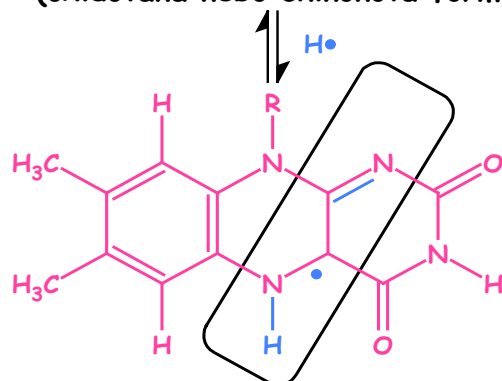


Struktura flavinadenindinukleotidu (FAD) s vyznačením reaktivních míst.

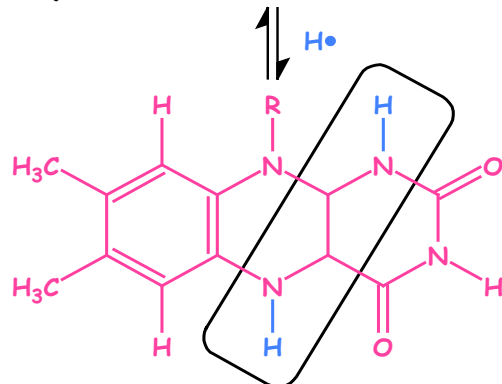




Flavinadenin dinucleotid (FAD)
(oxidovaná nebo chinonová forma)

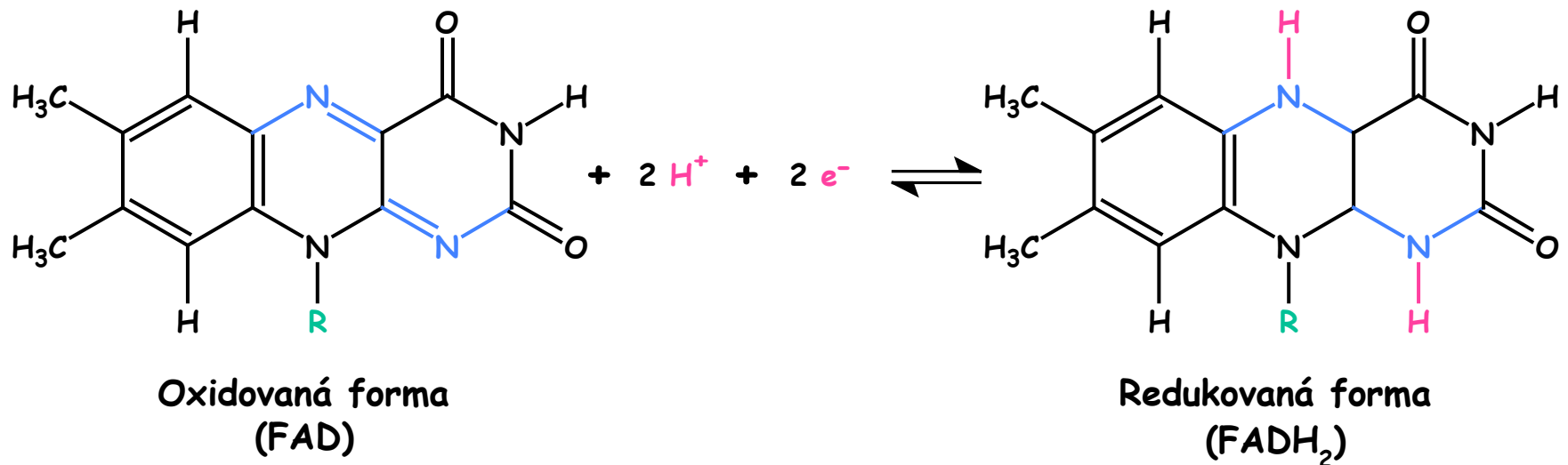


FADH• (radikálová nebo semichinonová forma)

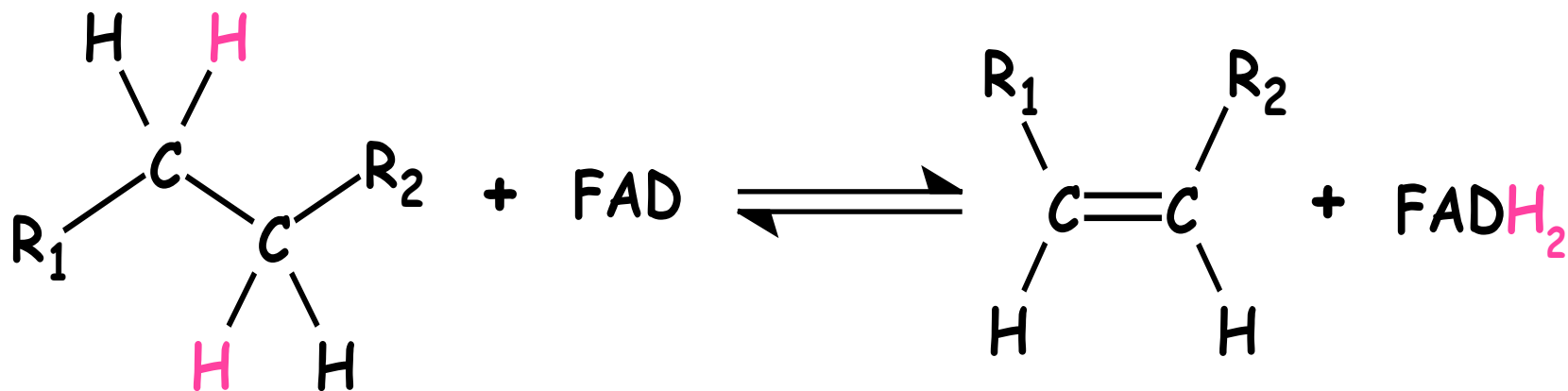


FADH2 (redukováná nebo hydrochinonová forma)

Oxidovaná a plně redukovaná forma flavinového koenzymu (FAD).
Mechanismus shodný s flavinmononukleotidem (FMN).



Oxidace (dehydrogenace) vazby mezi dvěma uhlíky
za účasti FAD:

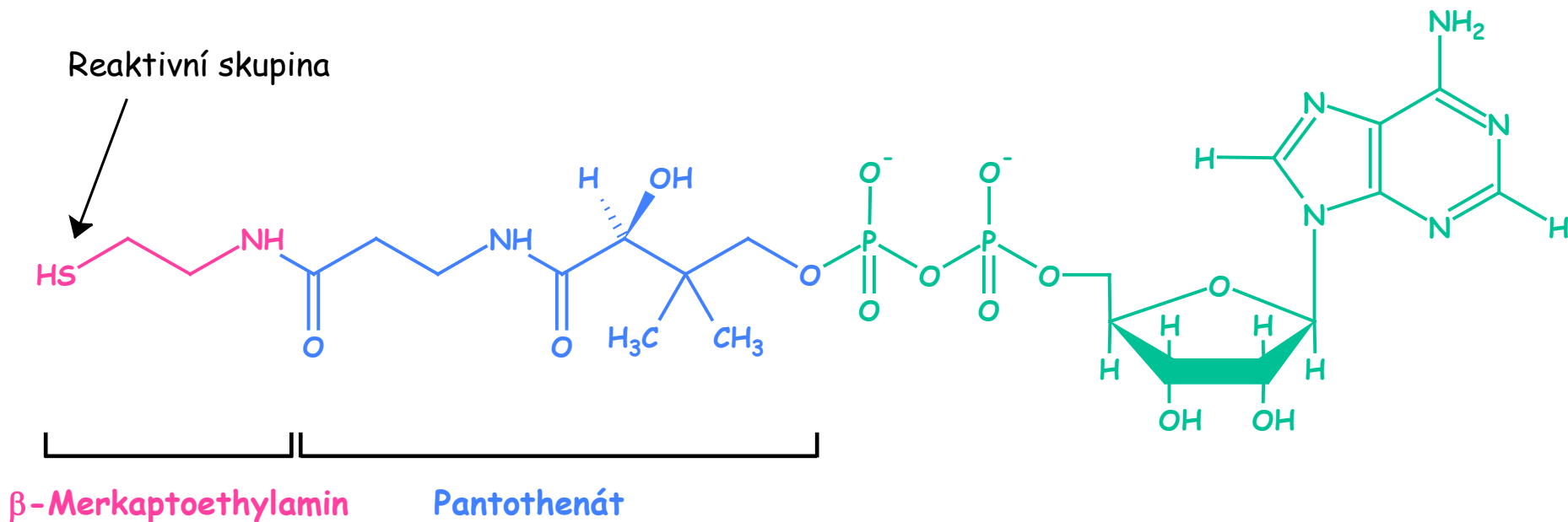


Koenzymy transferas:

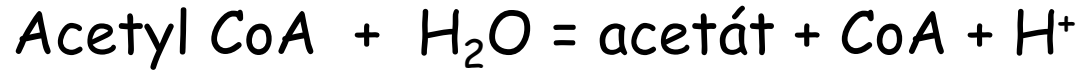
- A) Koenzym A
- B) Lipoová kyselina
- C) Thiaminpyrofosfát (TPP)

Koenzym A, CoA, CoASH.

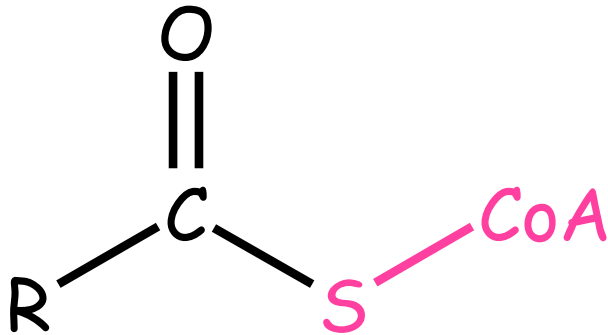
Vyznačena struktura složeného nukleotidu s reaktivní SH skupinou na konci.
Pantothenát - vitamin B₅.



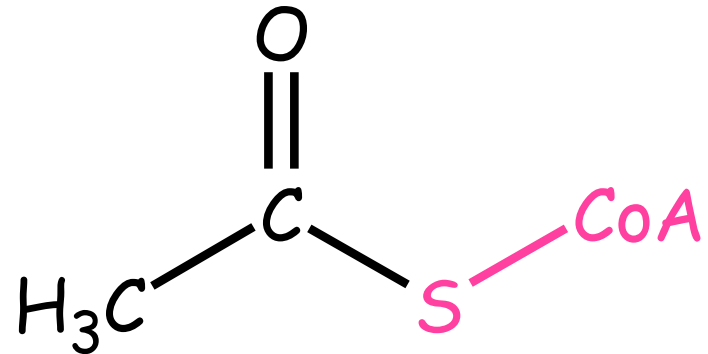
Thioesterová vazba s vysokým obsahem energie.



$$\Delta G^{\circ} = -31,4 \text{ kJ/mol}$$

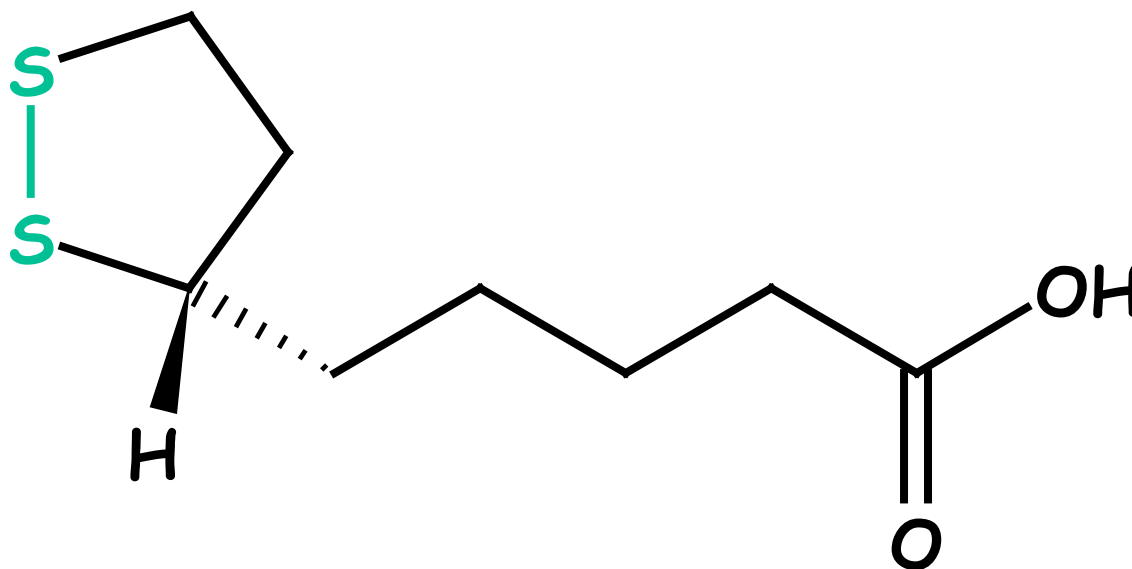


Acyl CoA



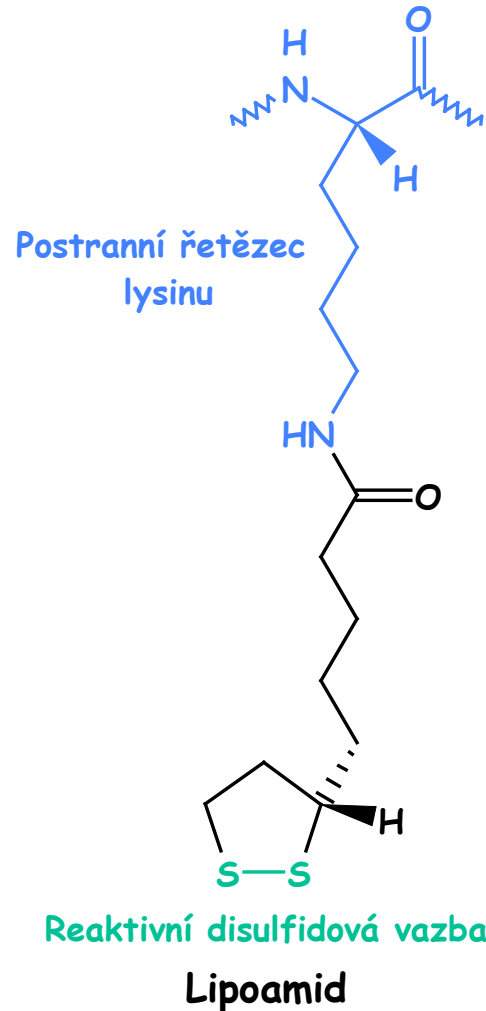
Acetyl CoA

Lipoová kyselina

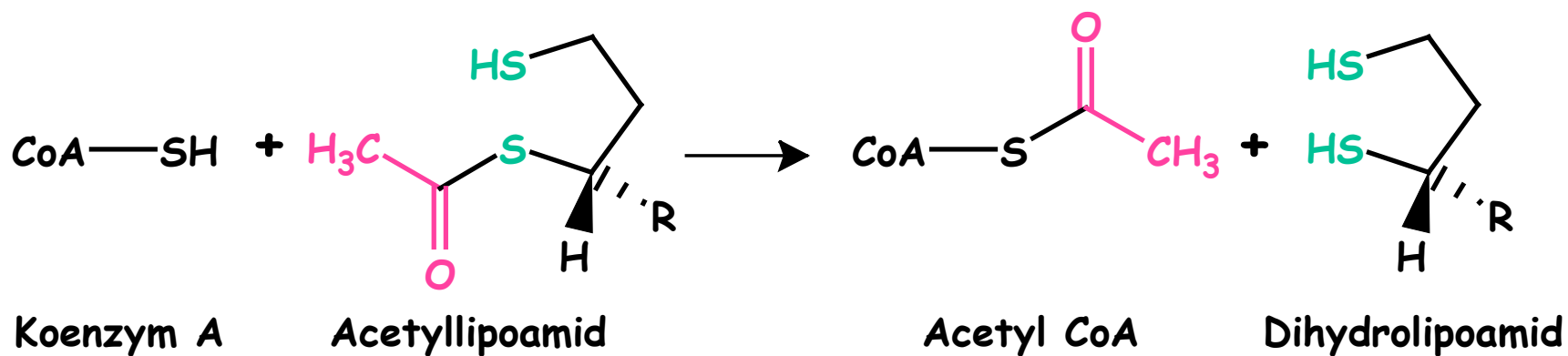


Lipoová kyselina

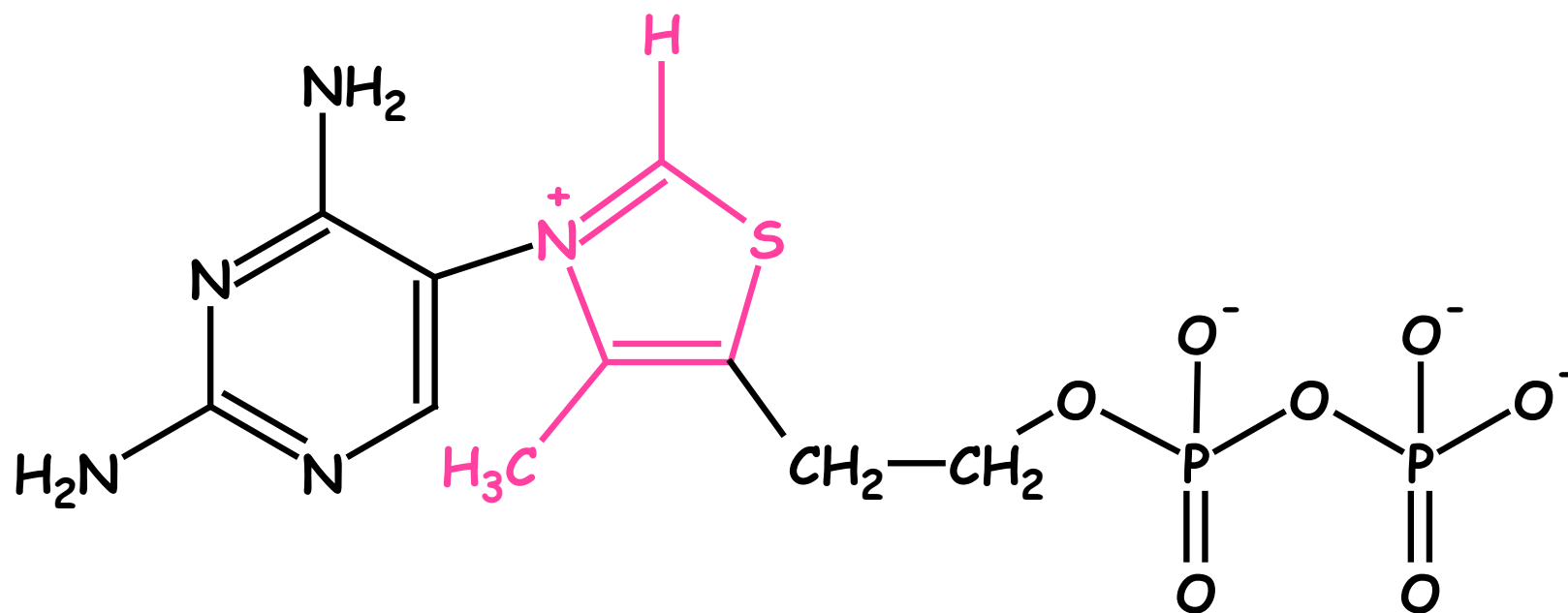
Lipoamid - isopeptidová vazba lipoové kyseliny na vedlejší řetězec apoenzymu (Lys) s vyznačením reaktivní disulfidové vazby:



Přenos acetylu z acetyldihydrolipoamidu na CoA:

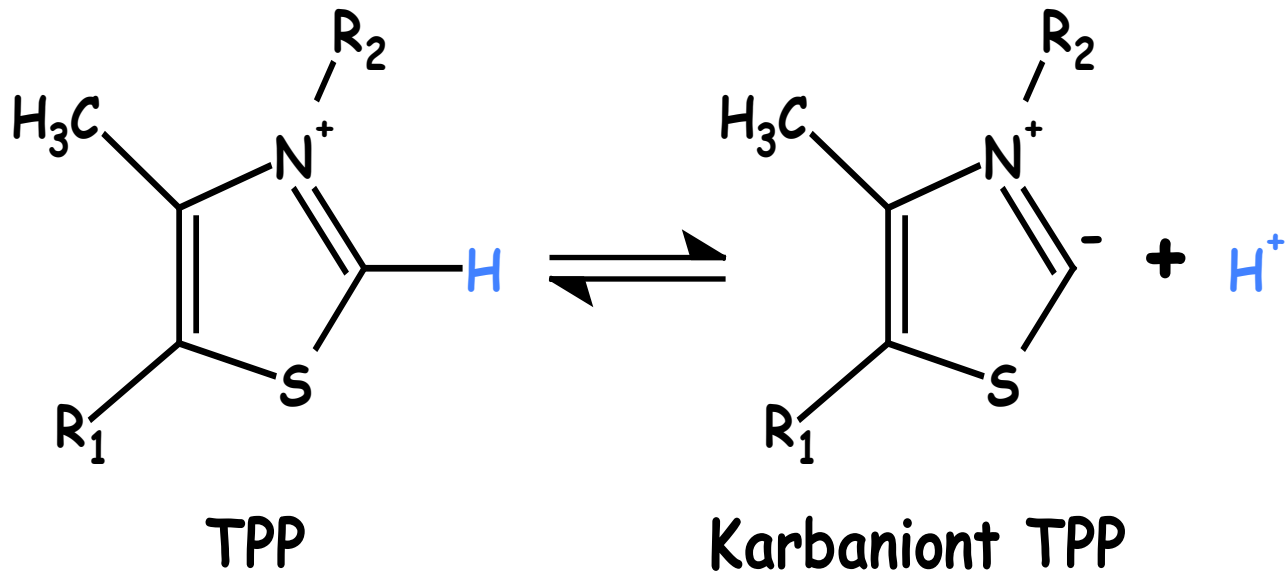


Struktura thiaminpyrofosfátu:

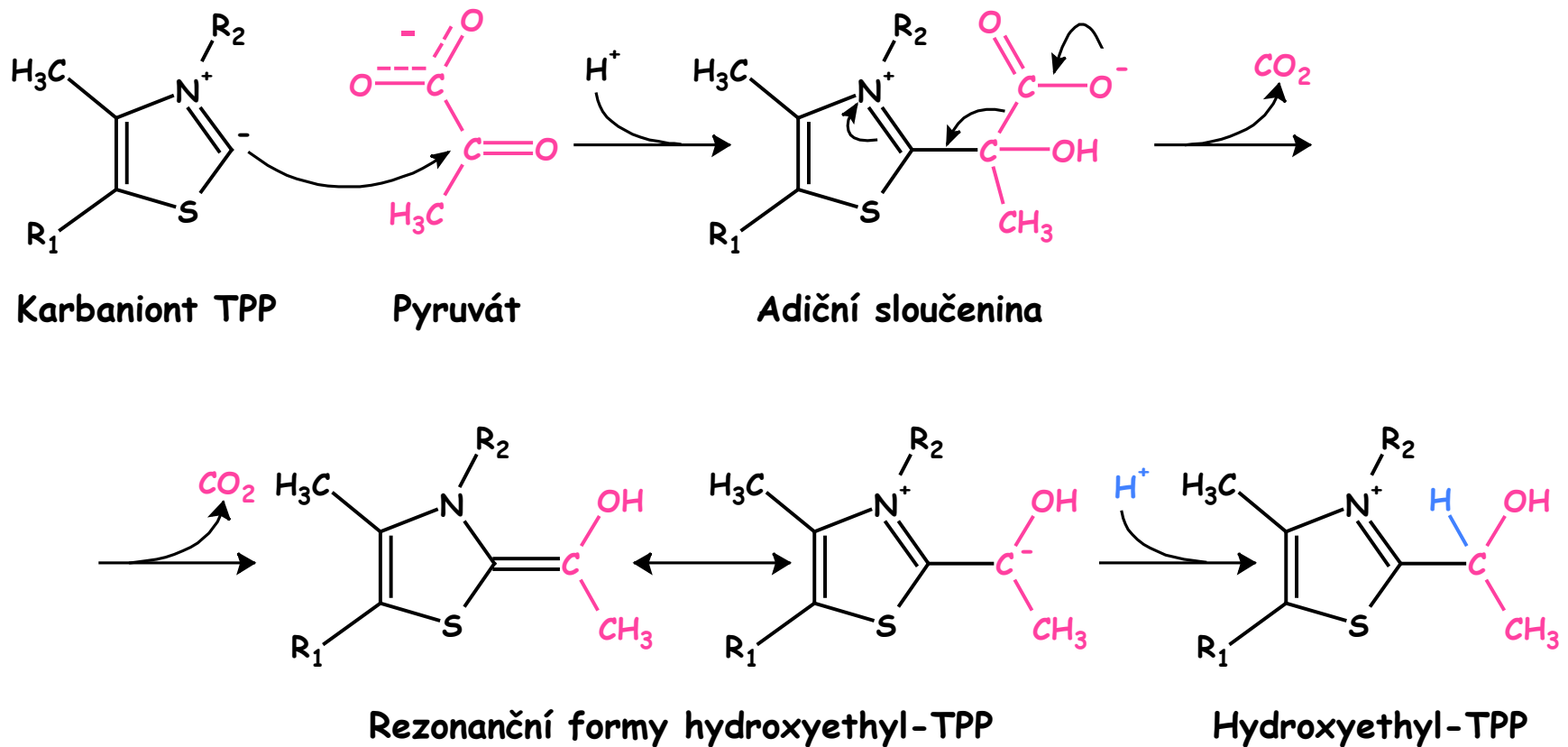


Thiaminpyrofosfát (TPP)

Uhlíkový atom mezi atomy dusíku a síry thiazolového kruhu je silně kyselý ($pK_a = 10$). Dochází k ionizaci za tvorba karbaniontu, který se váže na oxoskupiny (např. pyruvátu v pyruvátdehydrogenase).

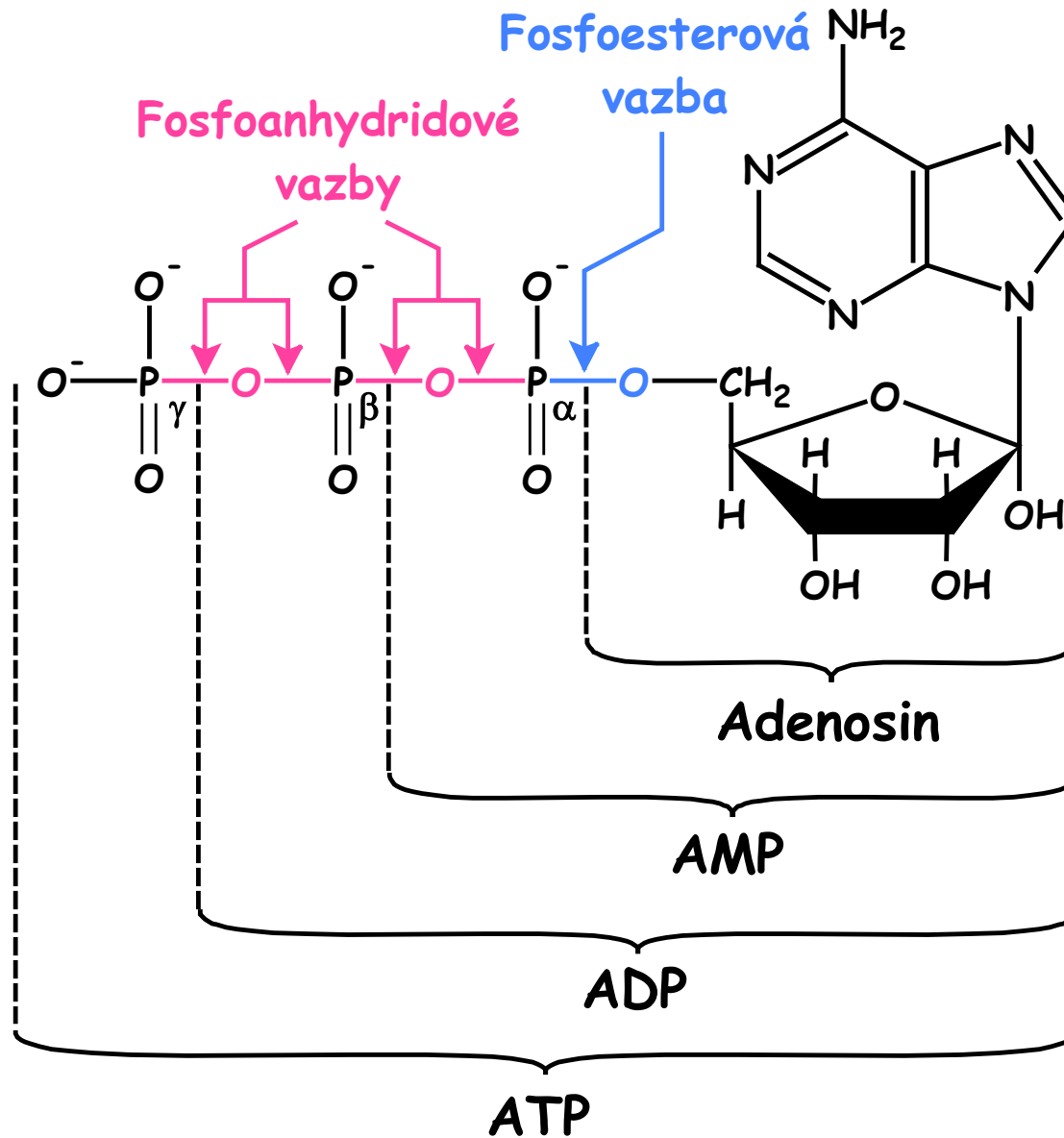


Interakce karbaniontu TPP s pyruvátem (součást pyruvátdehydrogenasy).
Hydroxyethyl-TPP se také označuje jako „aktivní acetaldehyd“.



Adenosintrifosfát - ATP, univerzálně významný koenzym a enzymový regulátor.

- ATP urychluje řadu metabolických reakcí při kterých dochází k jeho hydrolýze.
- Chemická energie ATP se uplatňuje při aktivním transportu, může se převést na mechanickou práci (svaly), na světlo (bioluminiscence), elektrickou energii a teplo.
- ATP se účastní řady biosyntetických reakcí přenosem fosfátu, difosfátu, adenosylu a adenylu na druhé metabolity.



Proč je ATP tak energeticky bohatá molekula?

- Aktivní forma ATP je obvykle komplex ATP s Mg^{2+} nebo Mn^{2+} .
- ATP je energeticky bohatá molekula, protože její trifosfátová část obsahuje dvě fosfoanhydridové vazby. Důvodem je rezonanční stabilizace, elektrostatické odpuzování a stabilita produktů.
- Produkty hydrolýzy, jako je fosfát: AMP (adenosinmonofosfát) nebo ADP (adenosindifosfát), vykazují větší stabilitu a menší elektrostatickou repulzi než ATP.

**Tabulka změny standardní Gibbsovy energie
 hydrolýzy fosfátů některých biologicky
 významných sloučenin:**

• Sloučenina	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ.mol ⁻¹)
• Fosfoenolpyruvát	- 61, 9
• 1,3-bisfosfoglycerát	- 49, 4
• ATP (→ AMP + PP_i → 2P_i)	- 45, 6
• Acetylfosfát	- 43, 1
• Fosfokreatin	- 43, 1
• ATP (→ ADP + P_i)	- 30, 5
• Glukosa-1-fosfát	- 20, 9
• PP _i	- 19, 2
• Fruktosa-6-fosfát	- 13, 8
• Glukosa-6-fosfát	- 13, 8
• Glycerol-3-fosfát	- 9, 2

Výpočet změny volné energie hydrolýzy ATP na ADP a P_i v buňce.

- Vnitrobuněčná koncentrace ATP se udržuje v rozmezí:
2 - 10 mM.
Koncentrace ADP a P_i jsou variabilní.

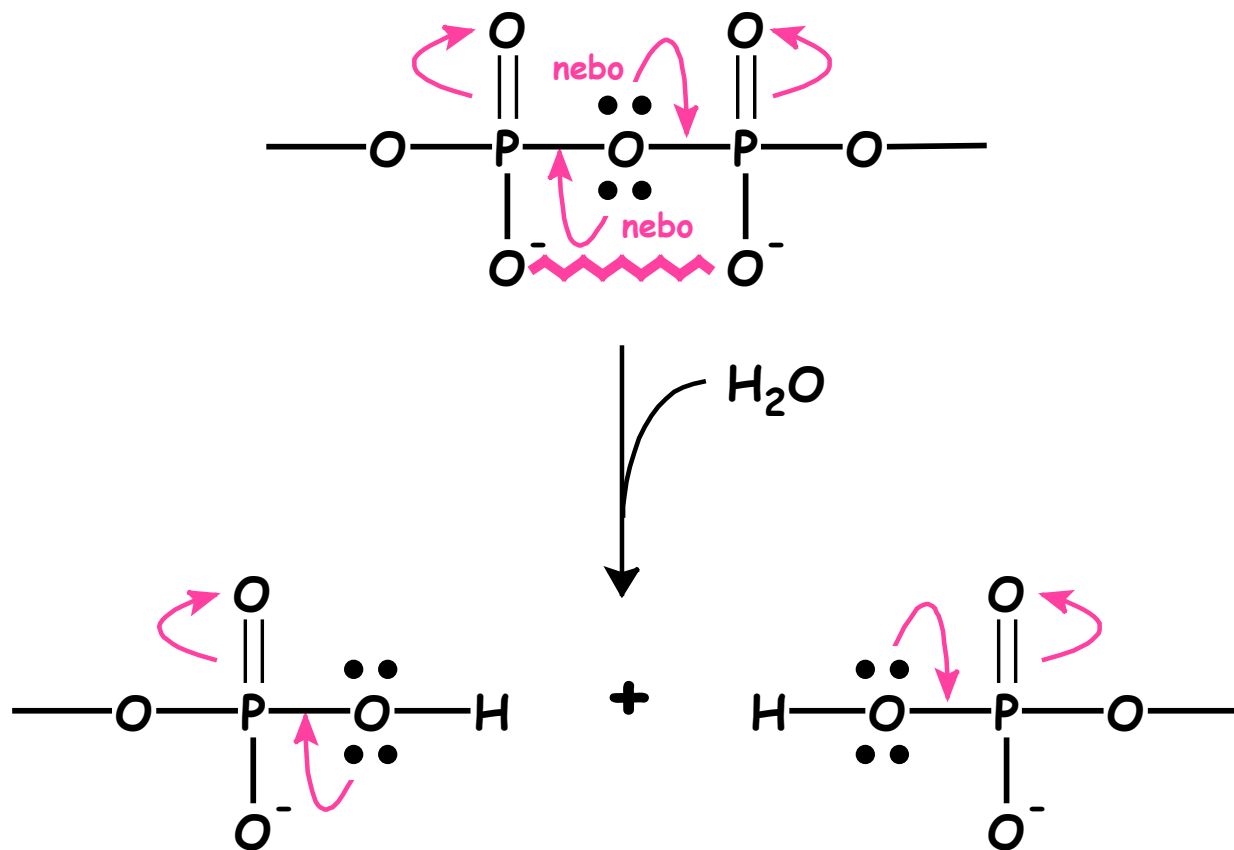
- Při typické buněčné koncentraci
 $[ATP] = 3,0 \text{ mM}$,
 konc. $[ADP] = 0,8 \text{ mM}$
 konc. $[P_i] = 4,0 \text{ mM}$ je volná energie hydrolýzy ATP na
 ADP a P_i při 37°C : $-48,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Podle vzorce:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ'} + RT \cdot \ln \frac{[ADP] \cdot [P_i]}{[ATP]}$$

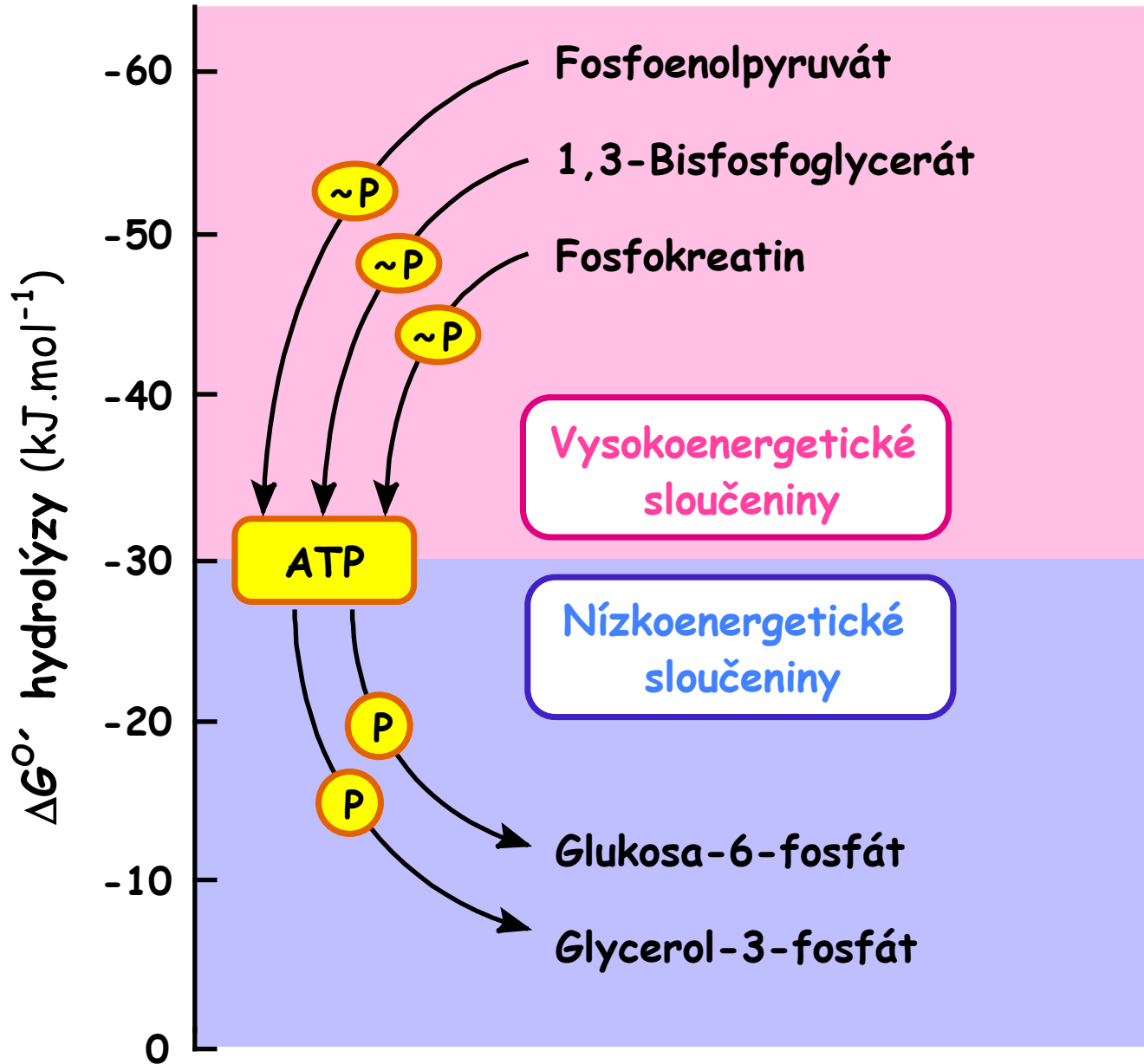
$$\Delta G^{\circ'} = -35,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Hydrolýza fosfoanhydridové vazby:

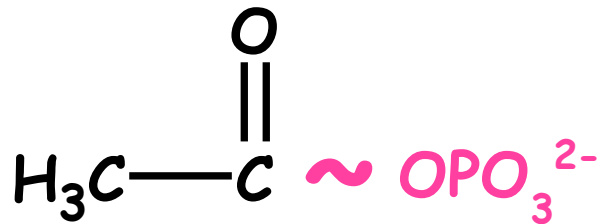


Spojení endergonní reakce s exergonní (hydrolýza ATP):

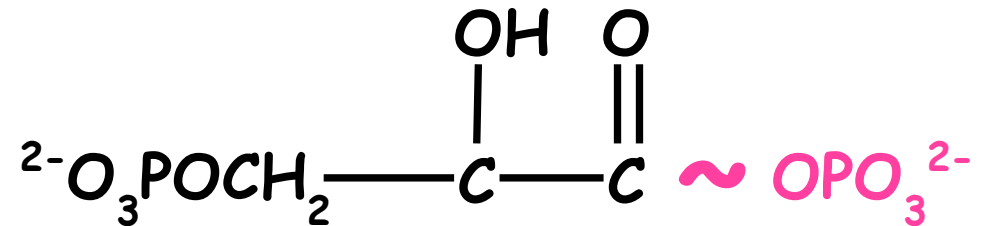
				<u>G' (kJ.mol⁻¹)</u>
Endergonní poloreakce 1	$P_i + \text{glukosa}$	\rightleftharpoons	glukosa-6-P	+ 13.8
Exergonní poloreakce 2	$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$	\rightleftharpoons	$\text{ADP} + P_i$	- 30.5
<hr/>				
Celková spojená reakce	$\text{ATP} + \text{glukosa}$	\rightleftharpoons	$\text{ADP} + \text{glukosa-6-P}$	- 16.7



Fosfoanhydridová vazba bývá často značena ~
 a používán název „makroergická vazba“.



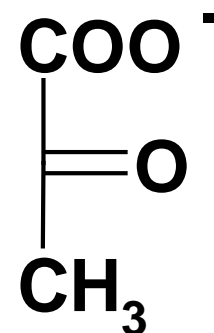
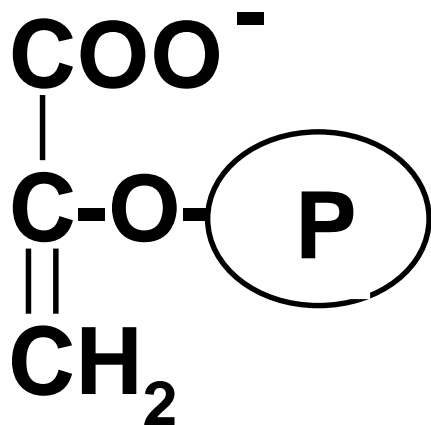
Acetylfosfát



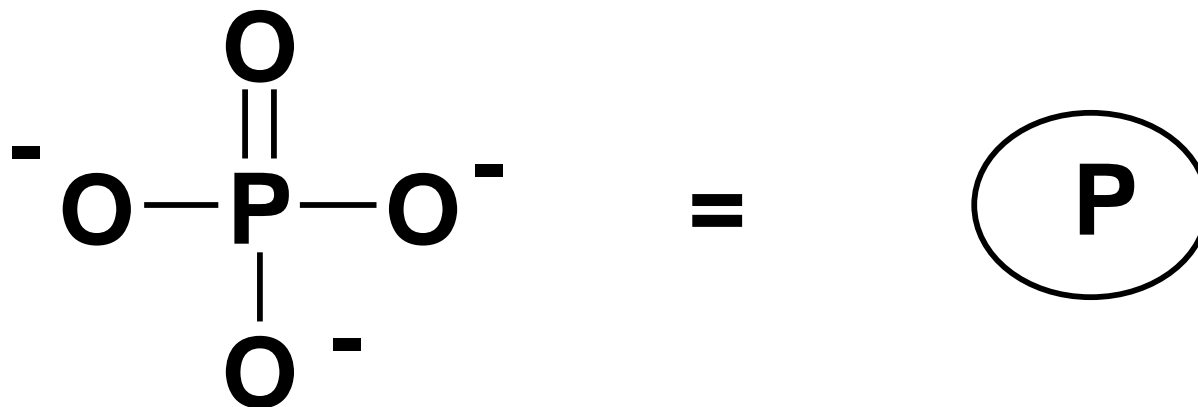
1,3-Bisfosfoglycerát

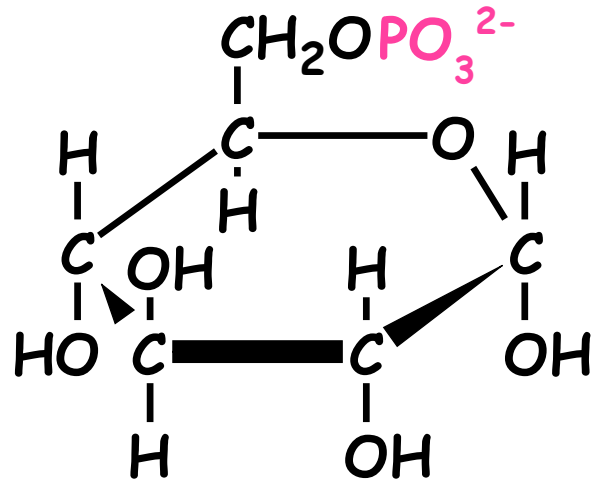
Fosfoenolpyruvát ΔG° (kJ.mol⁻¹) = 61, 9

P v kroužku značí fosfát, zde esterově vázaný.

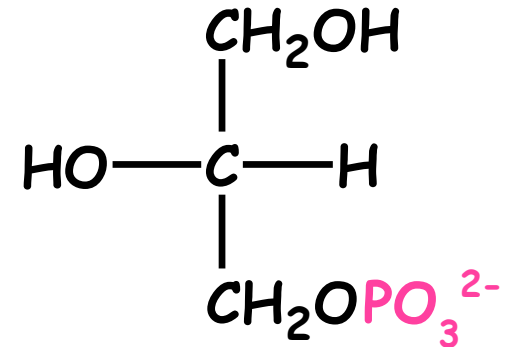


Pyruvát



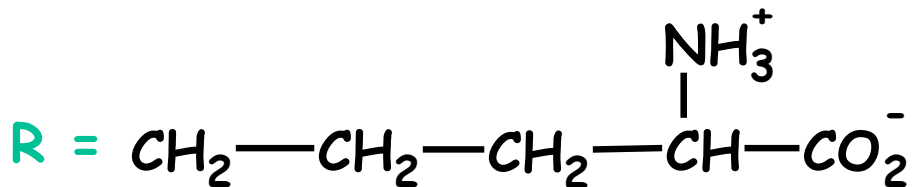
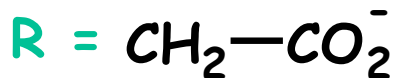
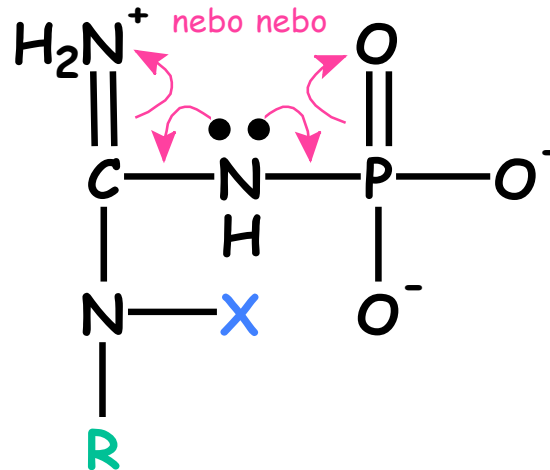


α -D-Glukosa-6-fosfát



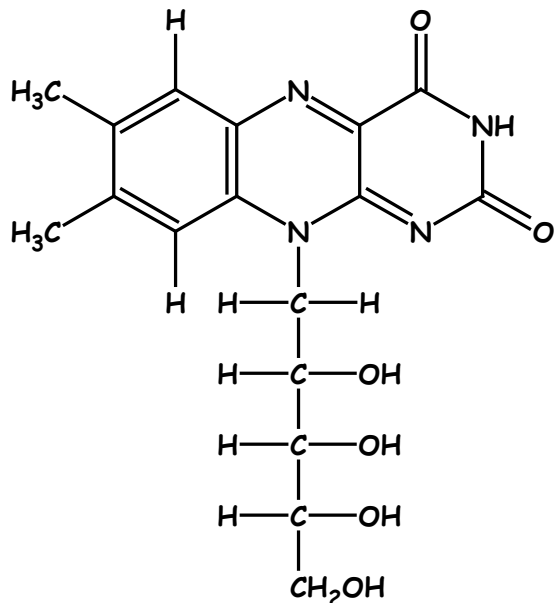
L-Glycerol-3-fosfát

Zásobní fosfageny (guanidinové fosfáty) obratlovců:

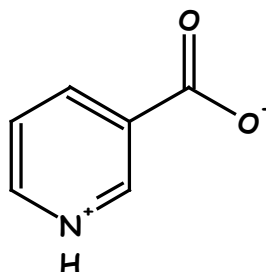


Doplňěk:

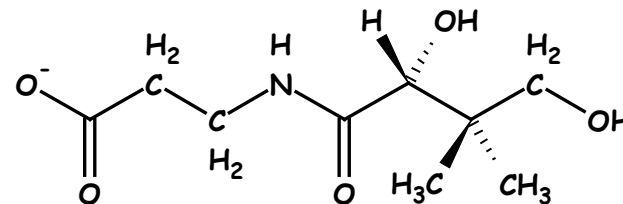
Strukturní vzorce vitaminů rozpustných ve vodě a uplatňujících se jako prekurzory koenzymů a vitaminu C (L-askorbová kyselina):



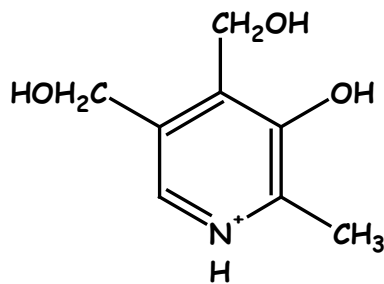
Vitamin B₂
(Riboflavin)



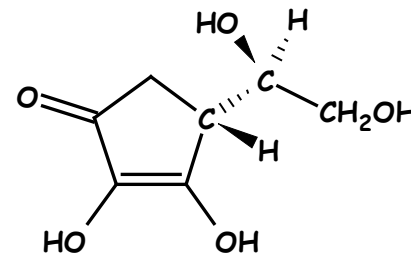
Vitamin B₃
(Niacin)



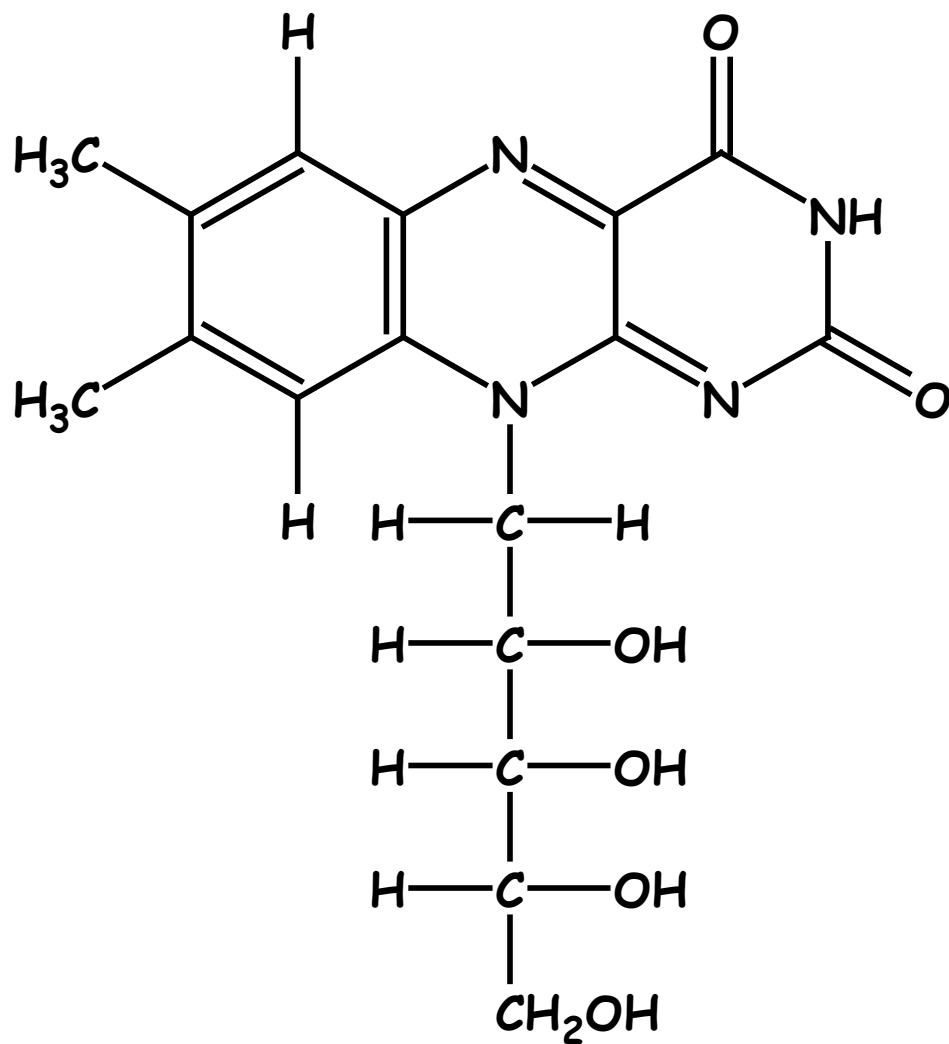
Vitamin B₅
(Pantothenát)



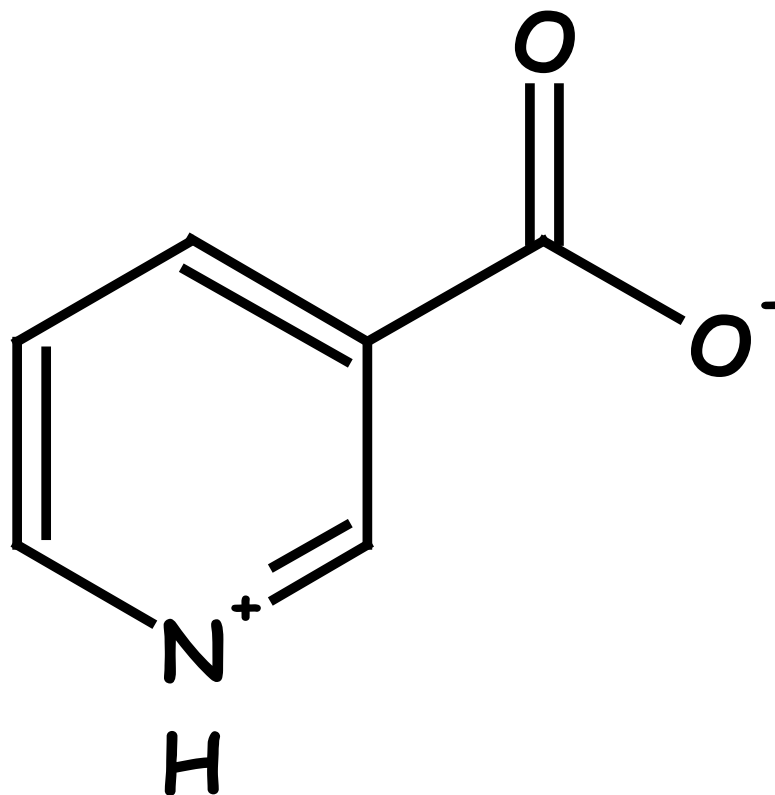
Vitamin B₆
(Pyridoxin)



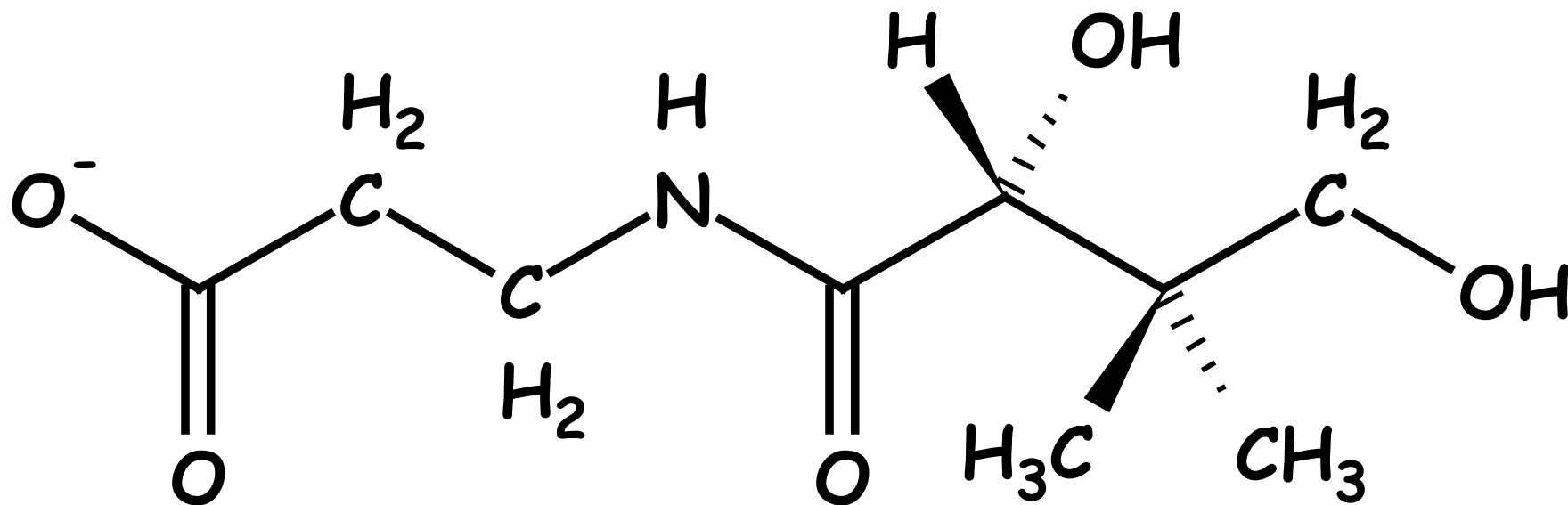
Vitamin C
(Askorbová kyselina)



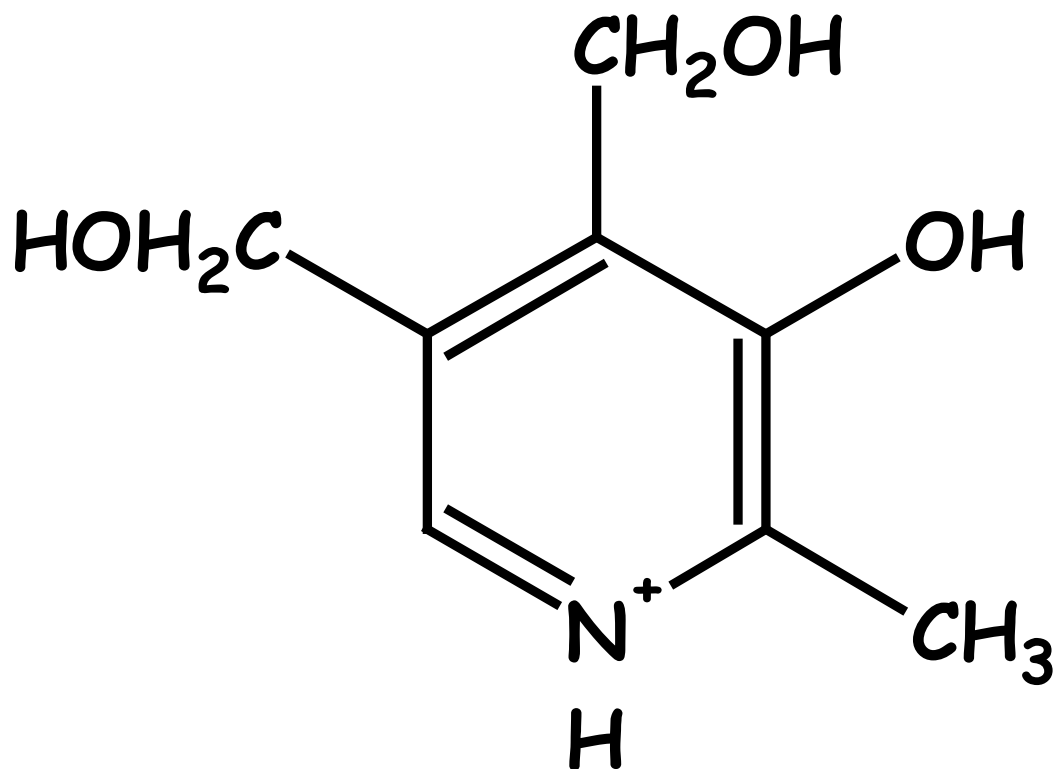
Vitamin B₂
(Riboflavin)



Vitamin B₃
(Niacin)

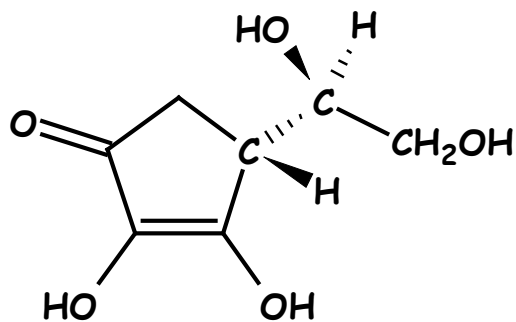


Vitamin B₅
(Pantothenát)

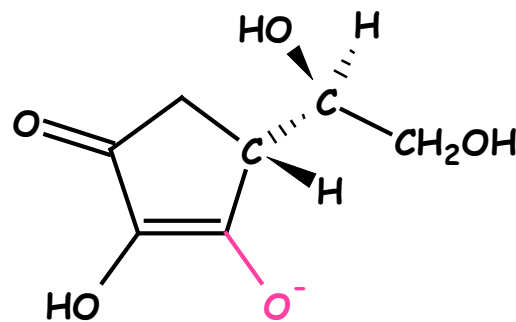


Vitamin B₆
(Pyridoxin)

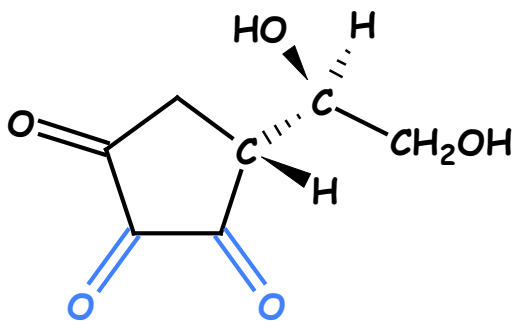
Askorbová kyselina, askorbát (aniont) a oxidovaná forma dehydroaskorbová kyselina.



Askorbová kyselina

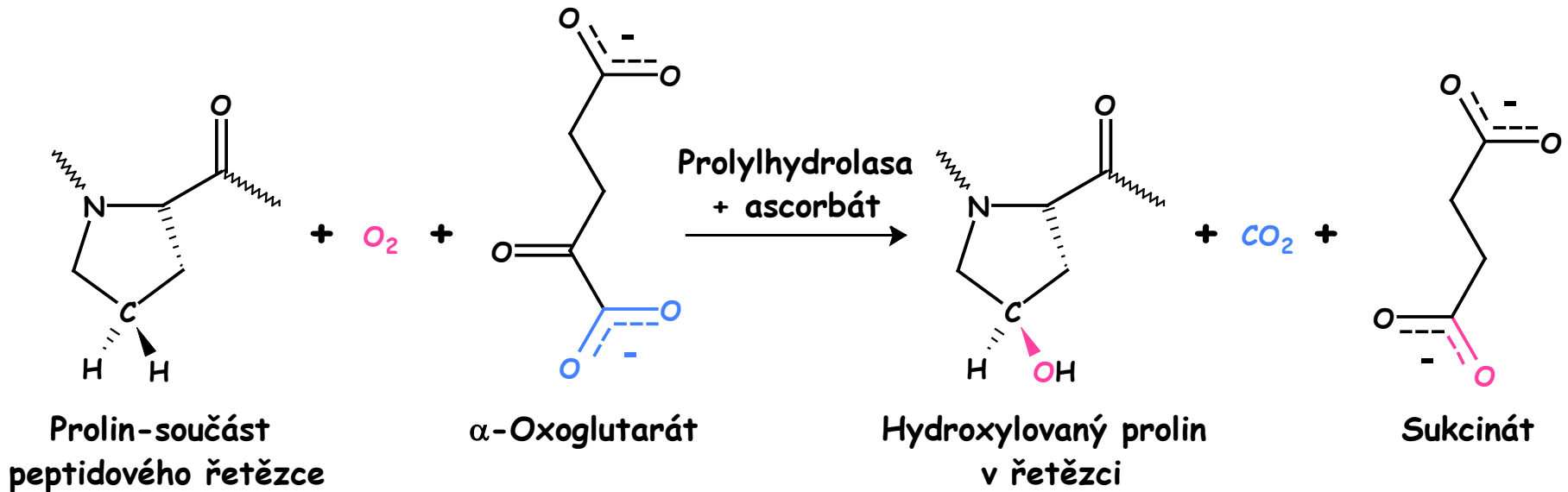


Askorbát

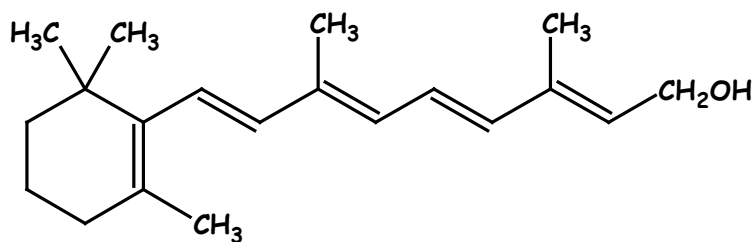


Dehydroaskorbová kyselina

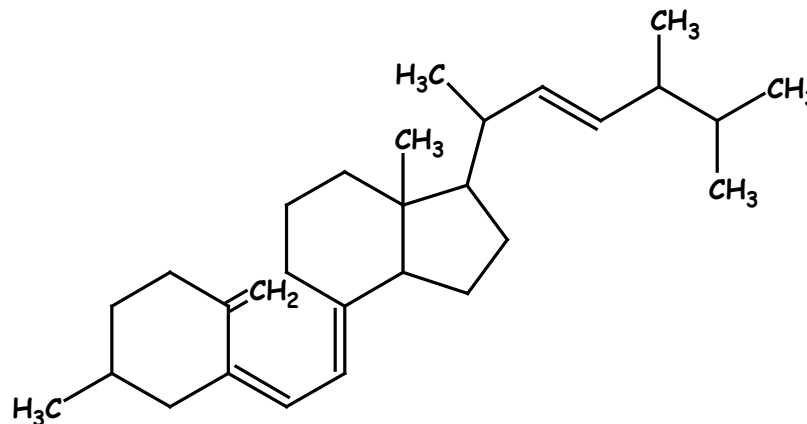
Účast askorbátu (vitaminu C) na hydroxylaci prolinu na *trans*-4-hydroxy-L-prolin v peptidovém řetězci - klíčová role při syntéze kolagenu. Dalším kofaktorem je Fe^{3+} . Nedostatek vit. C - skorbut.



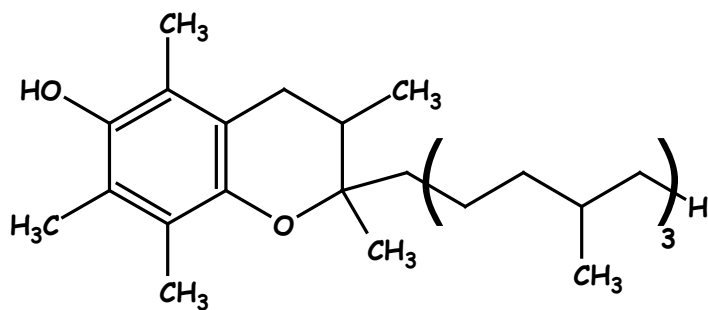
Strukturální vzorce vitaminů rozpustných v tucích:



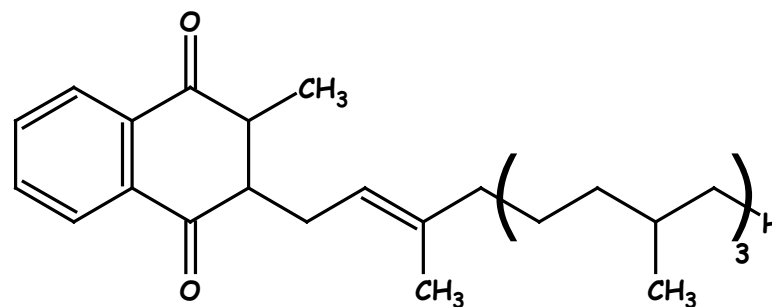
Vitamin A
(Retinol)



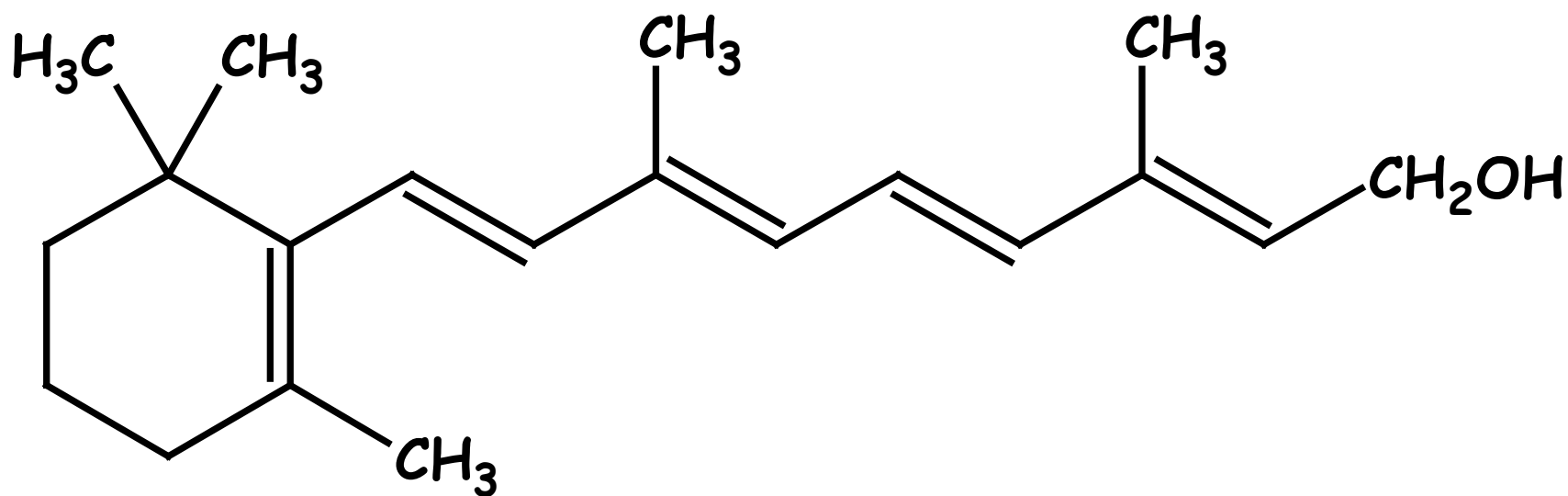
Vitamin D₂
(Kalciferol)



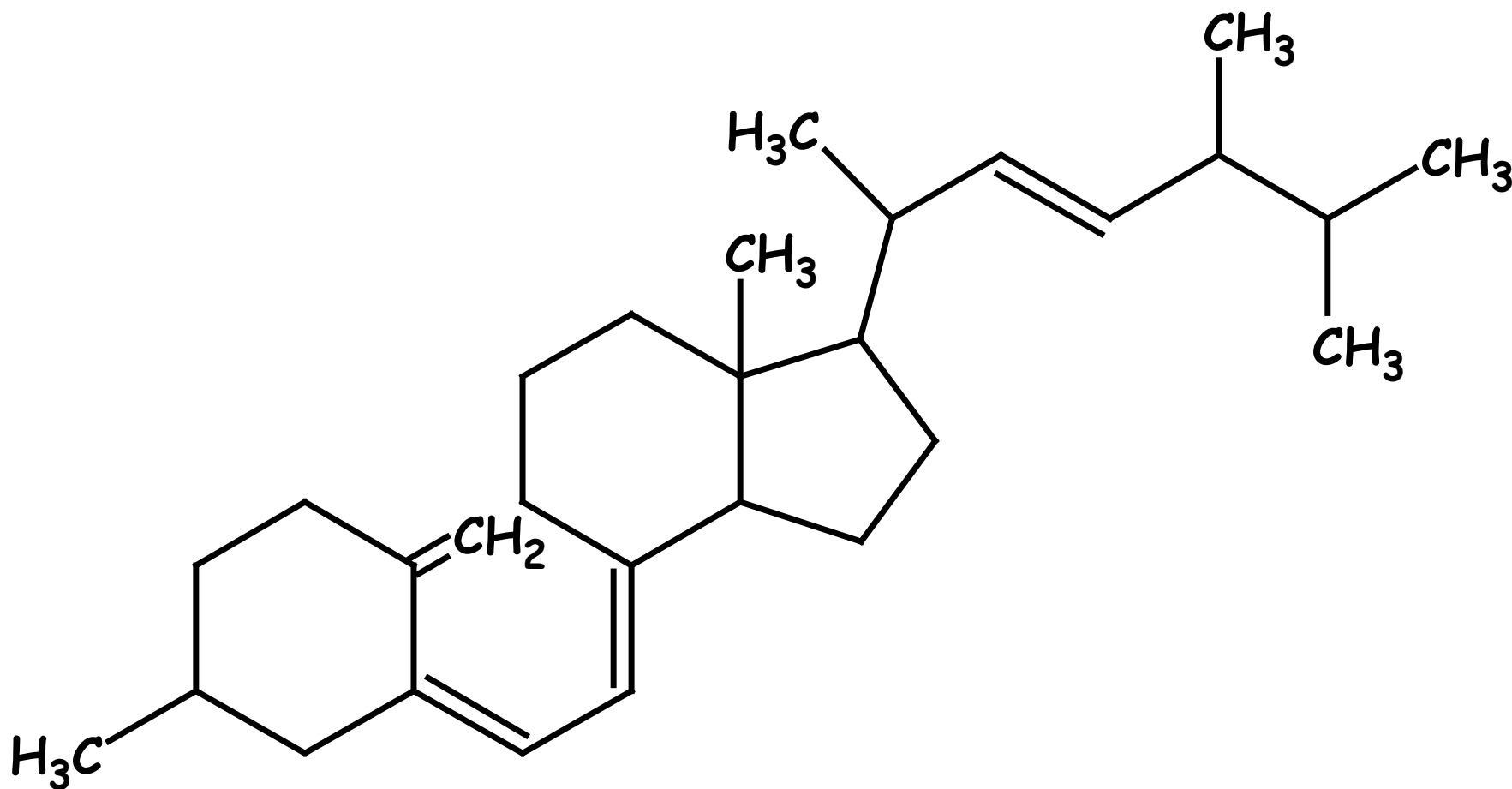
Vitamin E
(α-Tokoferol)



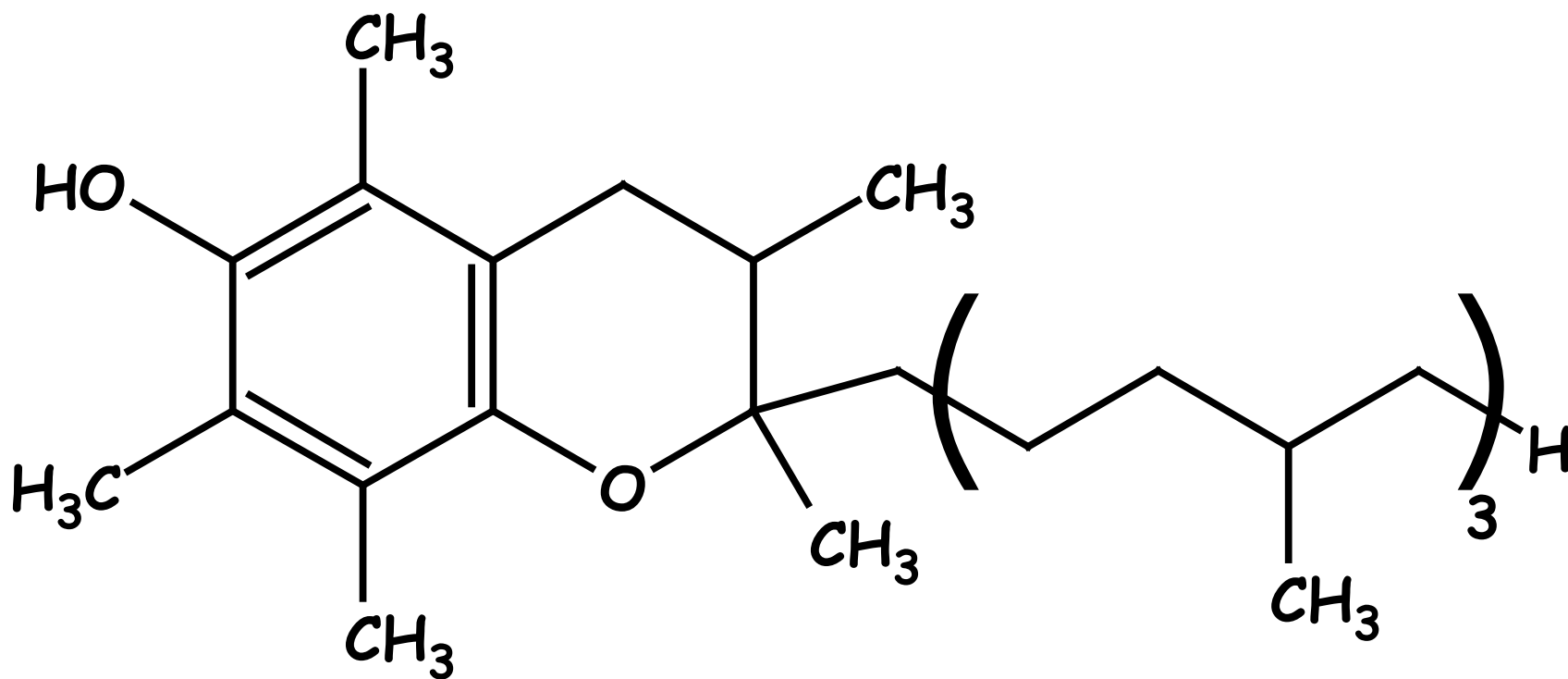
Vitamin K₁



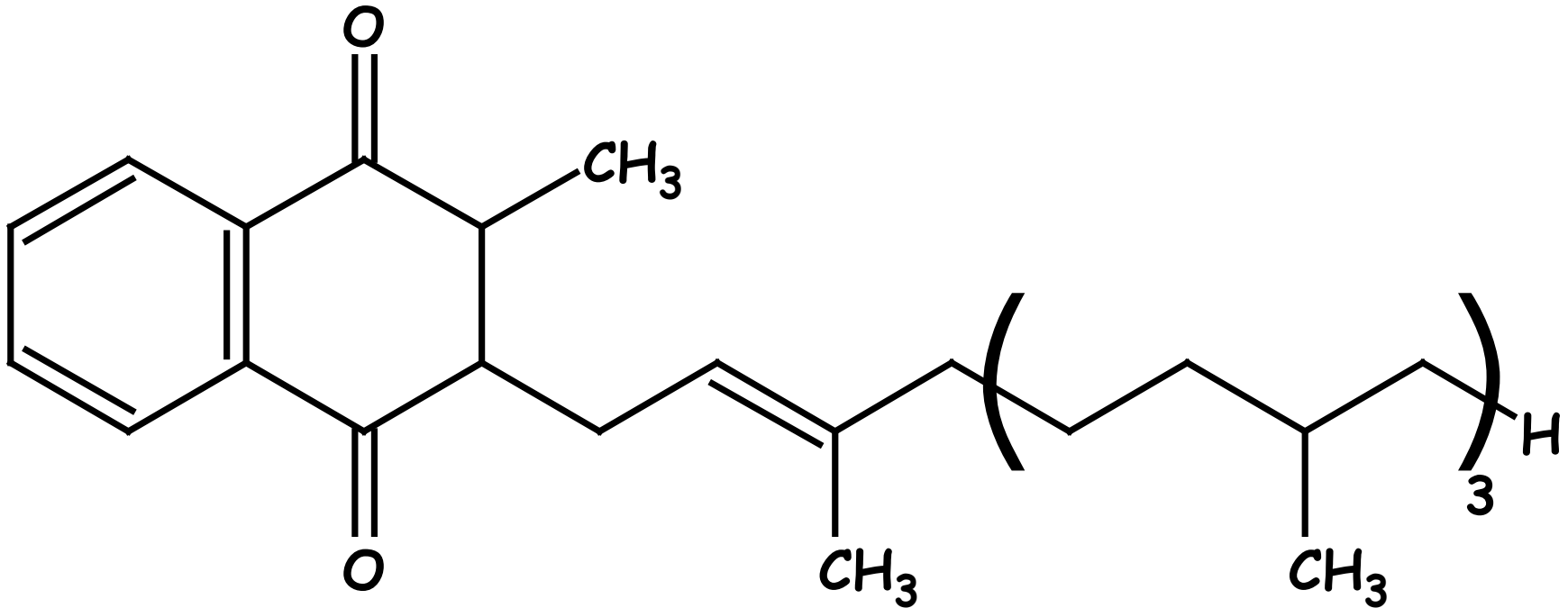
Vitamin A
(Retinol)



Vitamin D₂
(Kalciferol)



Vitamin E
(α-Tokoferol)

Vitamin K₁