

Enzymy a Izoenzymy

Petr Breinek



Enzymy

enzymé „ v kvasinkách“

1926 J.Sumner: ureasa (bílkovinná povaha)

1 buňka živých organismů obsahuje až 3000 druhů enzymů

- **Biokatalyzátory**

(bílkoviny/makromolekuly, katalyzátory)

- **Snižují aktivační energii** potřebnou pro chemickou reakci - **urychlují reakce**

- Účinnost je o mnoho řádů vyšší než u jiných katalyzátorů

Kdyby reakce v biologických systémech nebyly katalyzovány enzymy, byly by tak pomalé, že by nemohly zajistit existenci živé hmoty

Izoenzymy

- Řada enzymů má stejné nebo velmi podobné katalytické účinky, **liší se v primární struktuře** (složením aminokyselin).

Pokud tyto změny mají **genetický základ**, tak tyto rozdílné formy jednoho enzymu nazýváme **izoenzymy**

- **Liší se fyzikálními, chemickými a imunologickými vlastnostmi**



Makroenzymy

Pokud jsou rozdíly ve struktuře způsobené sekundárními změnami, např.

- glykosylací
- tvorbou komplexů s imunoglobuliny, atd.

Nejsou to izoenzymy!

Složení enzymové molekuly

- **bílkovinná část** **apoenzym**
- **nebílkovinná část** **kofaktor**

Kofaktor

- **Prostetická skupina** (Mg^{2+} , Zn^{2+} , organické látky ve formě vitaminů,...): pevně vázaná
- **Koenzym** (NAD^+ , $P5P$): vázán slabě /disociovatelná molekula

Místa působení:

- ✓ extracelulární (krev, likvor,...)
- ✓ intracelulární (cytoplazma, buněčné organely)

Formy výskytu:

- Rozpuštěné
- Imobilizované (např. na buněčných membránách)
- Asociované (multienzymové komplexy)
- Neaktivní proenzymy (zymogeny)
(protrombin, pepsinogen)
- Izoenzymy, makroenzymy

Enzymatická reakce probíhá v několika stupních

- Vazba substrátu do aktivního místa/centra
- Tvorba komplexu enzym-substrát: $E + S \leftrightarrow ES$
- Aktivace komplexu ES: $ES \leftrightarrow ES^*$
- Chemická přeměna substrátu, přičemž vzniká komplex enzym-produkt: $ES^* \leftrightarrow EP$
- Oddělení enzymu od reakčního produktu:
 $EP \leftrightarrow E + P$



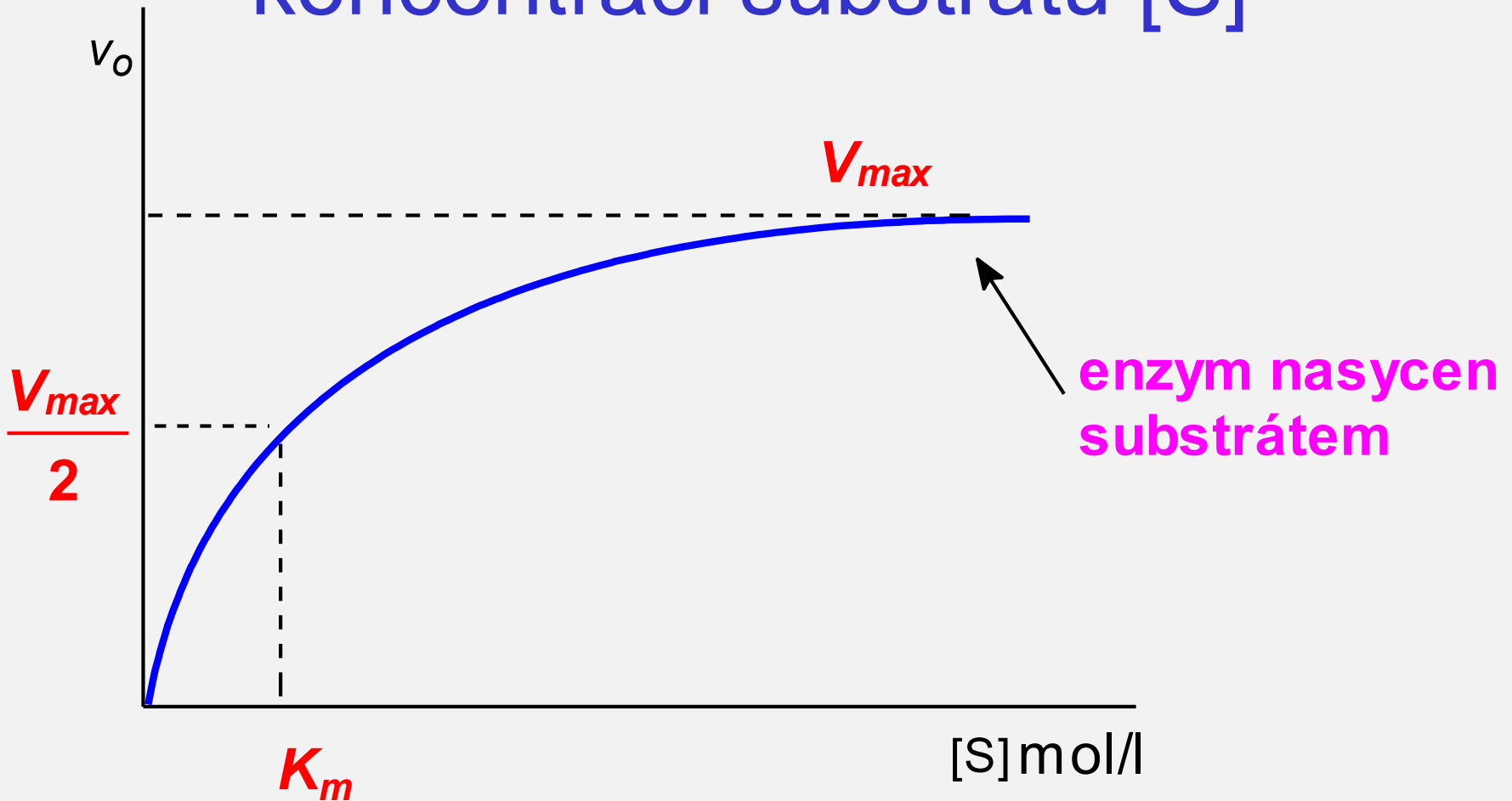
Faktory ovlivňující enzymovou reakci

1. **Teplota** (25 - 30 - 37 °C)
2. **Puf** (pH, iontová síla, typ pufu)
3. **Koncentrace substrátu a koenzymu**
4. **Moderátory enzymové aktivity**
 - inhibitory (kompetitivní a nekompetitivní)
 - aktivátory

Na čem závisí rychlost reakce?

- **Na koncentraci substrátu** a koenzymu
- **Na teplotě** (doporučená teplota 37°C není však teplotou optimální !)
- **Na přítomnosti aktivátoru, inhibitoru)**

Závislost reakční rychlosti (v_o) na koncentraci substrátu [S]



Při nízkých koncentracích substrátu se reakce řídí kinetikou 1. řádu

Při vysokých koncentracích substrátu se reakce řídí kinetikou 0. řádu

Reakční rychlost

- Reakce: $S \longrightarrow P$ (S = substrát, P = produkt)

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} > 0 \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}\cdot\text{s}} \right]$$

Inhibice enzymů (snížení aktivity)

Ireverzibilní

- Inhibitor pevně vázán na enzym (akt. místo)
- organofosfáty
- ionty těžkých kovů
- kyanidy

Reverzibilní

- Inhibitor volně vázán
- Rovnováha $E+I \Leftrightarrow E-I$
- Inhibitor lze odstranit (dialýza, gel. filtrace)
- *Dva základní typy:*

kompetitivní

nekompetitivní

Příklad: léky

- Mnohá léčiva jsou inhibitory enzymů
- **Statiny** (HMG-CoA reductáza) – hypolipidemika, snižují syntézu cholesterolu (lovastatin)
- **Inhibitory ACE** (angiotensin konvertující enzym) – léčba hypertenze (enalapril)
- **Antibiotika** inhibují enzymy nutné pro určitý životní děj bakterií (peniciliny – inhibují transpeptidázy (výstavba buněčné stěny; tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol – inhibice proteosyntézy)

Třídění enzymů

- 1. Oxidoreduktázy** (LD, GLDH, CHOD)
- 2. Transferázy** (AST, ALT, GGT,CK)
- 3. Hydrolázy** (ALP, LPS, AMS, CHE)
- 4. Lyázy** (NSE)
- 5. Ligázy** (Syntetázy)
- 6. Izomerázy**

Principy analytických metod stanovení enzymů

Množství enzymu v biologickém materiálu lze vyjádřit dvojitým způsobem

Nepřímé stanovení

- katalytická koncentrace aktivity
- **$\mu\text{kat/l}$**
- stanoví se reakční rychlost
- většina klinicky významných enzymů

Přímé stanovení

- hmotnostní koncentrace
- **$\mu\text{g/l}$, ng/l**
- stanoví se molekula enzymu jako antigen (imunochemicky)
- např. tumorové markery, ALP kostní

Metody stanovení katalytické koncentrace aktivity enzymu

Kinetické

- Spektrofotometrické stanovení rychlosti enzymové reakce kontinuálním měřením absorbance v závislosti na čase
- Průběžně se měří [S] nebo [P]
- Řada měření

Konstantního času

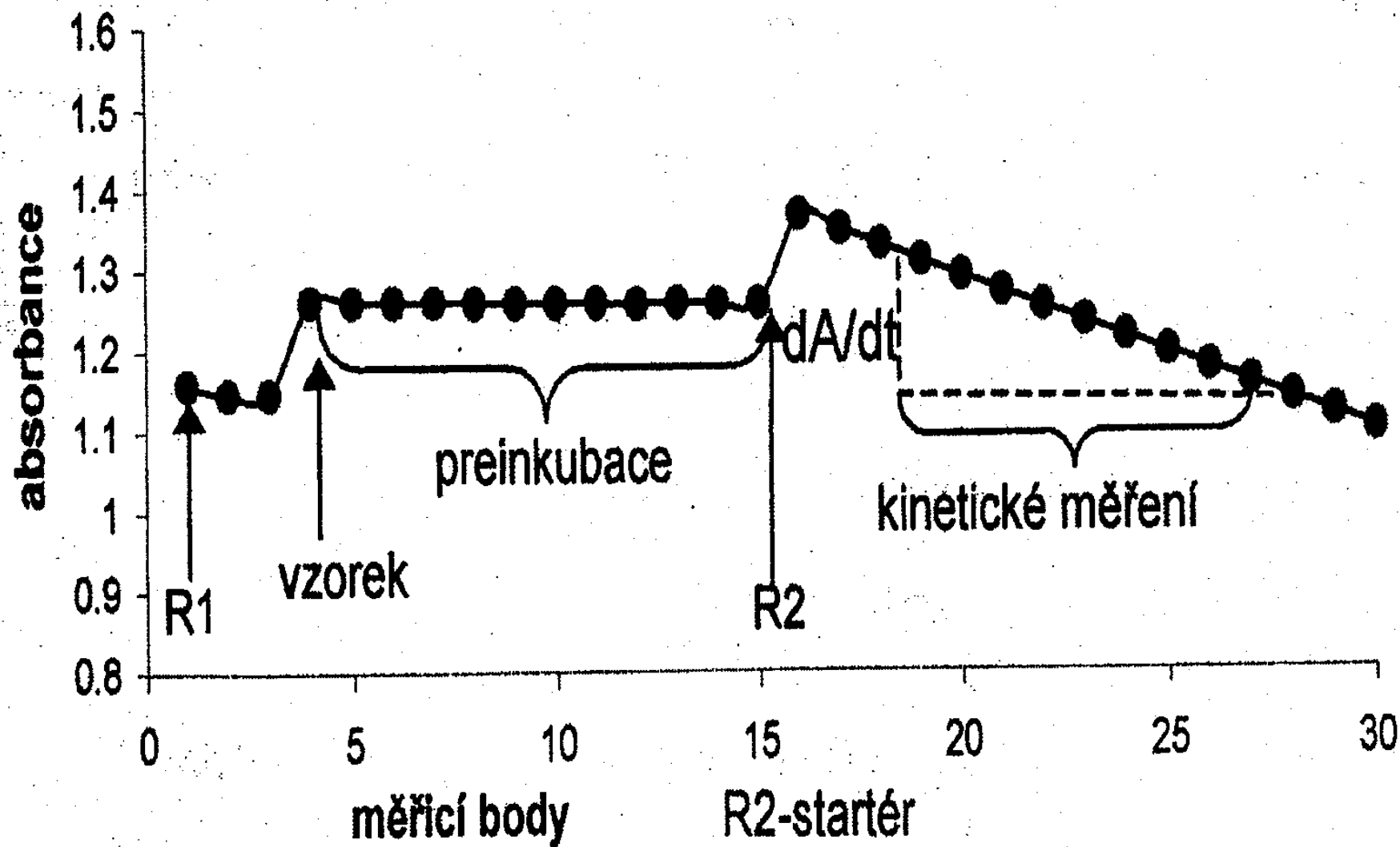
- „dvoubodové stanovení“

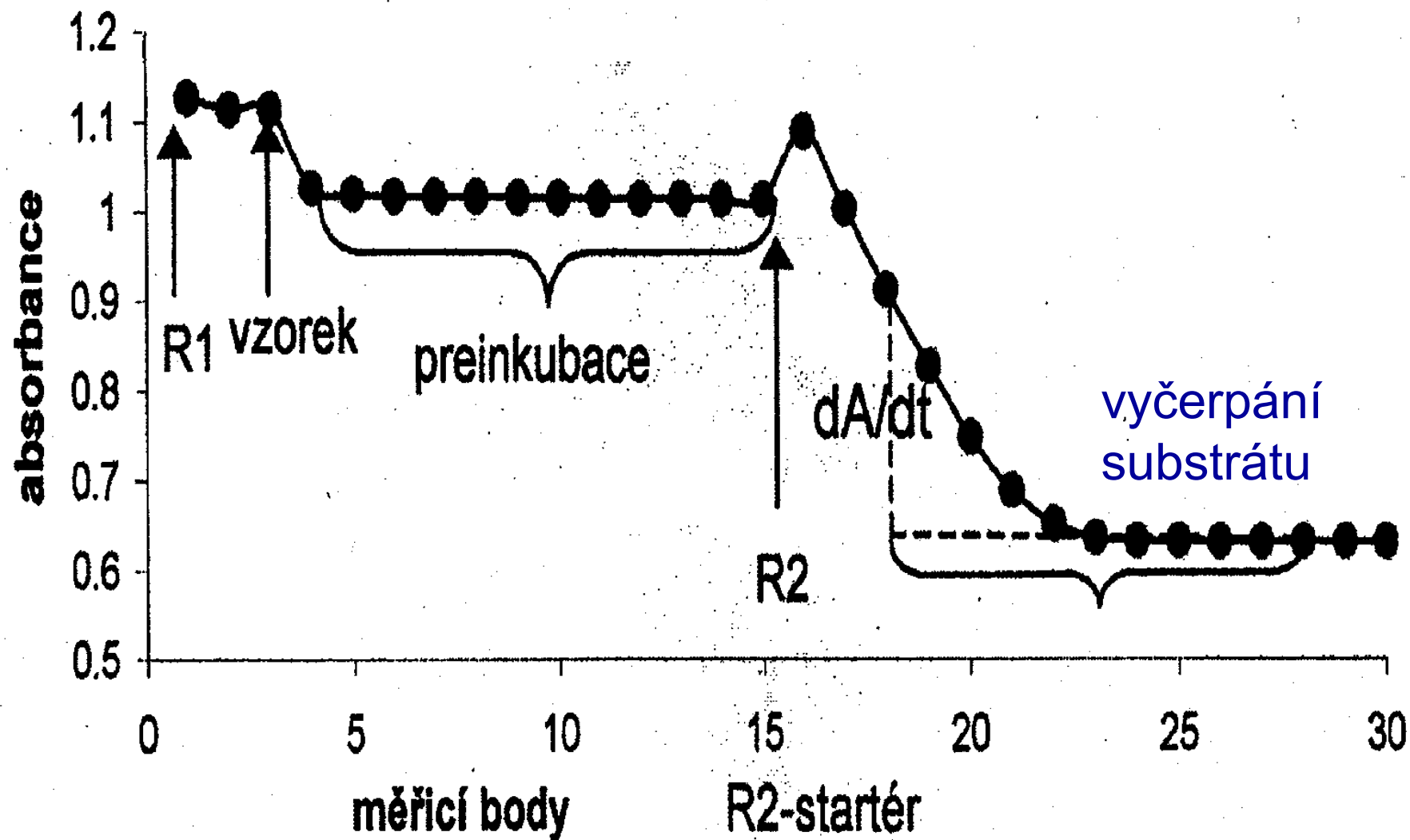
- „end-point“

$$\Delta A / \Delta t = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1}$$

- Měří se [P] po proběhnutí reakce
- Jedno měření
- **nedoporučovány**

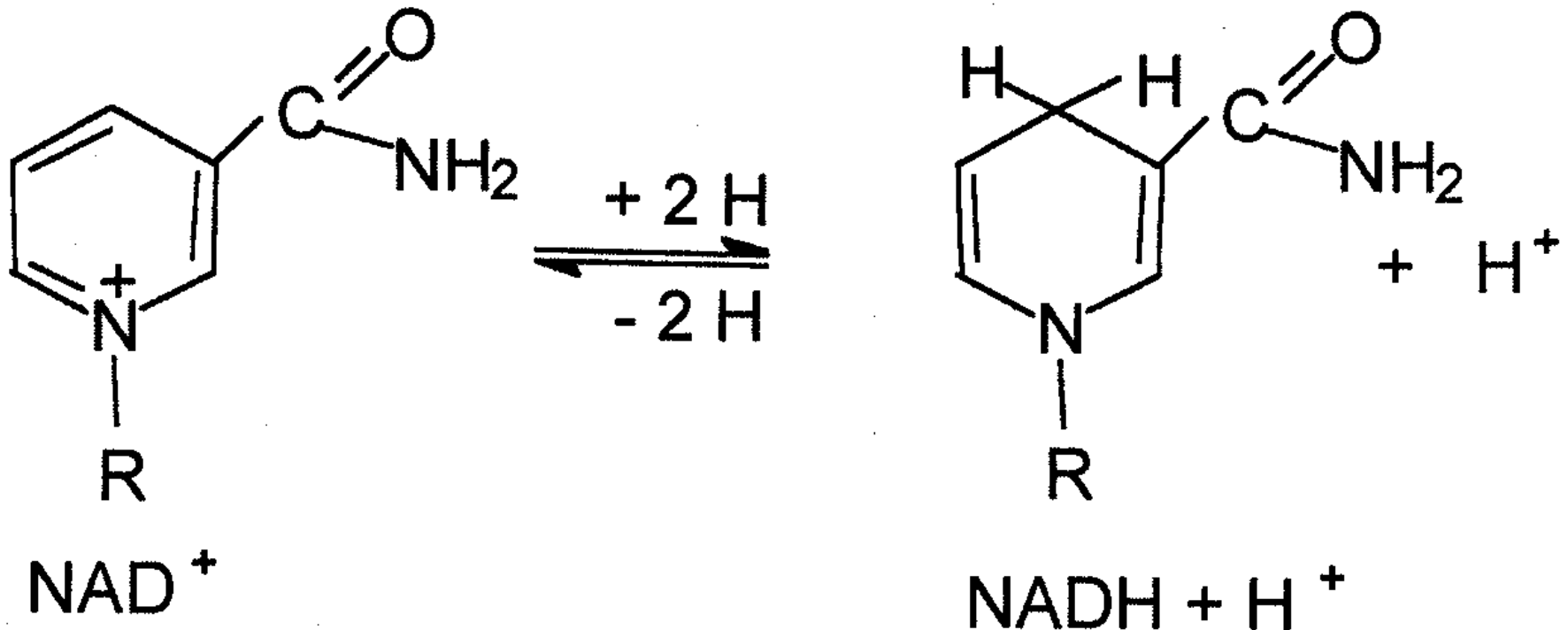
Vliv časového intervalu, ve kterém měříme





Optický test

měříme změny absorbance v UV-oblasti (při 340 nm) způsobené změnami koncentrace redukovaných forem koenzymů $\text{NADH} + \text{H}^+$ nebo $\text{NADPH} + \text{H}^+$



Vyjadřování výsledků měření

- Katalytická aktivita enzymu
 - jednotka katal (kat)
 - definice: $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s}$
- **Katalytická koncentrace aktivity enzymu**
 - jednotka: kat/l
 - používané jednotky: $\mu\text{kat/l}$ a nkat/l
 - jiné jednotky: U/l
 - $1 \mu\text{kat/l} = 60 \text{ U/l}$ $1 \text{ U/l} = 0,0167 \mu\text{kat/l}$
- **Hmotnostní koncentrace**
 - jednotky: $\mu\text{g/l}$, ng/l

Jaké jsou doporučené metody?

Enzym	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
ALP	IFCC metoda	JC ERM 20327
AMS	IFCC metoda	ERM-AD456 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
AST	IFCC/IRMM metoda	JC-ERM 20327
ALT	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD454 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
CK	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD455 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
GGT	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD452 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
LD	IFCC metoda	ERM-AD453 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
LPS		
CHS		
PAMS	IFCC metoda	ERM-AD456 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
ACPP		
CKMB mass		

**AST, ALT, AMS, ALP, CK, LD,
GGT, LPS, CHE**

Aspartátaminotransferáza (AST)

L-aspartát + 2-oxoglutarát \leftrightarrow oxalacetát + L-glutamát

Je obsažena v cytoplasmě a v mitochondriích všech buněk (zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů)

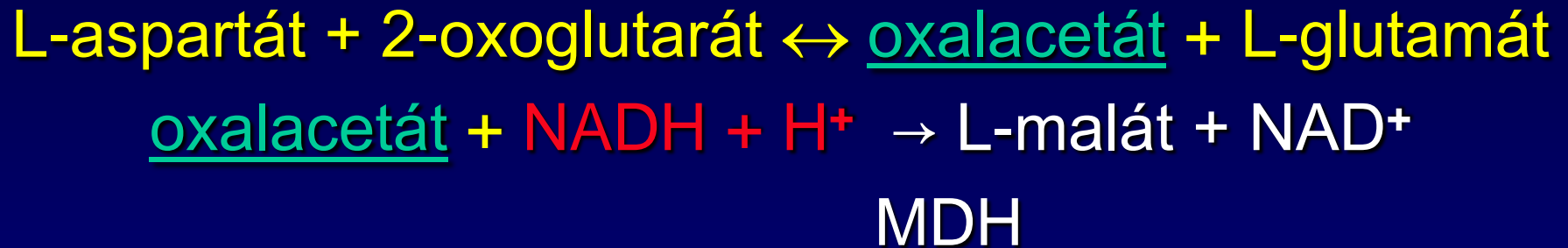
AST

EC 2.6.1.1 L-aspartát: 2-oxoglutarát aminotransferáza

Klinický význam

- onemocnění myokardu (nekróza, AIM)
- jaterní choroby
- onemocnění kosterního svalstva

AST



SPEKTROFOTOMETRICKY - pokles absorbance NADH při 340 nm

- pyruvát + NADH + H⁺ \Rightarrow L-laktát + NAD⁺
- **koenzym: pyridoxal-5-fosfát** + ApoAST \Rightarrow AST*
- doporučuje se předinkubace 10 min při +37°C
- start : 2-oxoglutarát (2 činidlová metoda)
- start : sérum (1 činidlová metoda)

Alaninaminotransferáza (ALT)



Je obsažena v cytoplasmě všech buněk, zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů

ALT

Klinický význam

- onemocnění jater (infekční virová hepatitida, mononukleóza, chronické jaterní choroby,...)
- onemocnění žlučových cest
- dekompenzované srdeční vady (venostáza v játrech)
- poškození svalstva

ALT

L-alanin + 2-oxoglutarát \Leftrightarrow pyruvát + L-glutamát

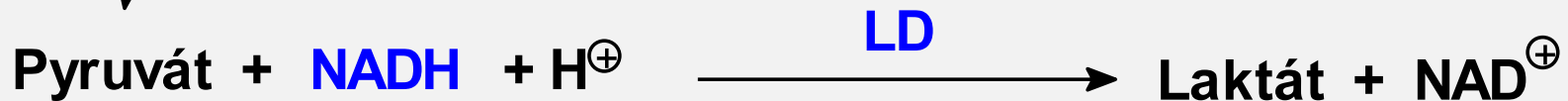
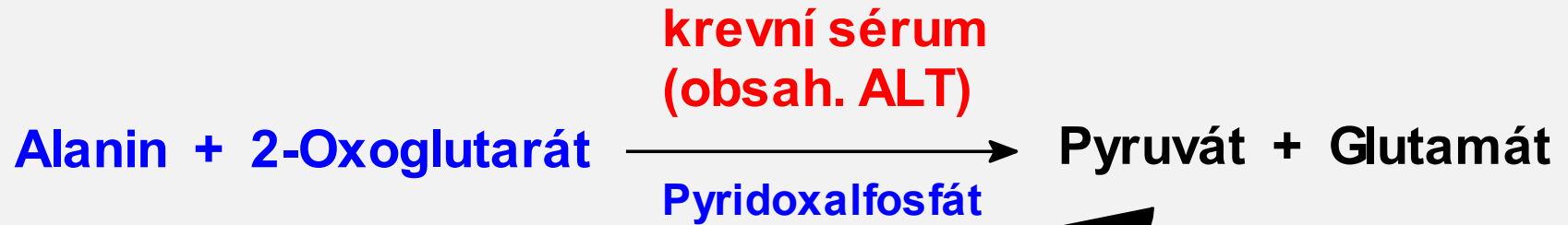
pyruvát + NADH + H⁺ \Rightarrow L-laktát + NAD⁺

LD

SPEKTROFOTOMETRICKY - **pokles absorbance NADH při 340 nm**

- pyruvát + NADH + H⁺ \Rightarrow L-laktát + NAD⁺
- **koenzym: pyridoxal-5-fosfát** + ApoALT \Rightarrow ALT*
- doporučuje se předinkubace 10 min při +37°C
- start : 2-oxoglutarát (2 činidlová metoda)
- start : sérum (1 činidlová metoda)

Metodika stanovení ALT



optický test

při reakci klesá absorbance

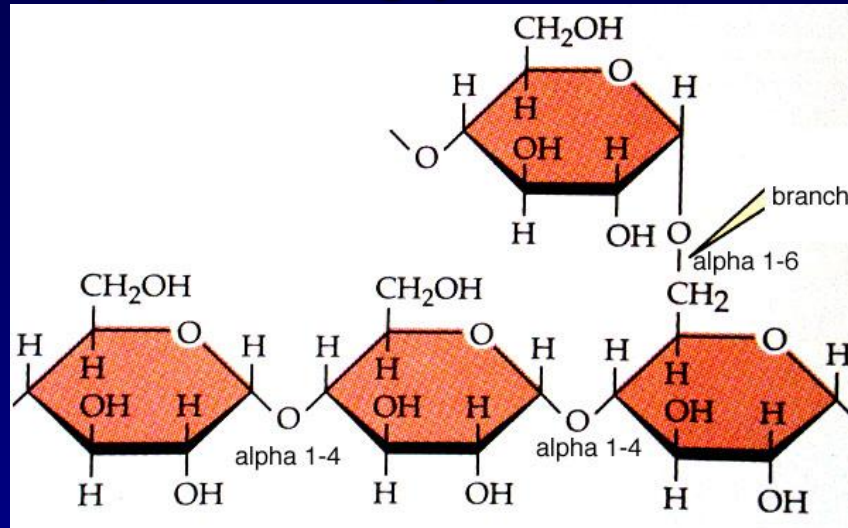
$$\Delta A / \Delta t$$

Legenda:

ložky reakční směsi
vzorek s enzymem

Alfa-amyláza (AMS)

štěpí α -1,4 glykozidické vazby



Polysacharidy \Rightarrow Oligosacharidy \Rightarrow Maltóza

AMS je sekreční enzym vytvářený pankreatem a slinnými žlázami, (část vzniká v játrech, plících)

Sérum obsahuje přibližně stejnou katalytickou koncentraci pankreatického a slinného izoenzymu₃₂

AMS

Klinický význam

- onemocnění pankreatu (akutní pankreatitida)
- onemocnění slinných žláz (parotitis)
- přítomnost makroamylasového komplexu
- onemocnění jater
- ledvinná nedostatečnost

Doporučená metoda IFCC

substrát : **EPS-G7-PNP (EPS)**

4,6-ethyliden(G7)-4-nitrofenyl(G1)- α -(1,4)-D-maltoheptaosid

▶ Maltoheptaosid O- O- O- O- O- O- O 7 glukóz

▶ + α -Glukosidáza

▶ substráty značené 4-nitrofenolem na konci molekuly



▶ na opačném konci molekuly substrátu navázána např. ethylidenová skupina \Rightarrow „blokováný“ substrát



1 molekula EPS

4,6-ethyliden(G7)-4-nitrofenyl(G1)- α -(1,4)-D-maltoheptaosidu



7 molekul glukózy + 1 molekula 4-nitrofenolu

SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE 4-NITROFENOLU
405 nm

Izoenzymy AMS

- SLINNÝ
 - PANKREATICKÝ
(geneticky podmíněný polymorfismus)
- ▶ MAKROAMYLÁZOVÝ komplex = komplexy glykosylovaných izoenzymů s imunoglobulíny a jinými bílkovinami v séru
Mr = 400 000 až 2 000 000
⇒ způsobuje zvýšení hodnot AMS v krevním séru

Metody stanovení

1. **Selektivní INHIBICE** isoenzymů monoklonálními protilátkami, např. stanovení pankreatické AMS
2. ELEKTROFORÉZA
3. CHROMATOGRRAFIE
4. IZOELEKTRICKÁ FOKUZACE
5. INHIBIČNÍ metody

ALP

monoestery kyseliny o-fosforečné + H₂O



alkohol / fenol + fosfátový anion

Vyskytuje se prakticky ve všech tkáních, je součástí buněčných membrán

V séru dospělých zdravých osob převažují jaterní a kostní izoenzymy (přibližně 1:1)

u dětí je zvýšena aktivita kostního izoenzymu,

u těhotných žen je detekovatelný placentární izoenzym a

u osob s krevní skupinou 0 a B jsou přítomny stopy střevního izoenzymu.

Hydrolýza



Transfosforylace (přenos fosfátové skupiny na jiný alkohol za vzniku esteru)



Klinický význam:

- onemocnění jater
- onemocnění žlučových cest
- onemocnění kostí
- fyziologicky zvýšené hodnoty: rostoucí děti a těhotné ženy (max. 3 trimestr těhotenství)
- zánětlivé střevní choroby

Metody stanovení:

Substrát: **4-NITROFENYLFOSFÁT**

4-NITROFENYLFOSFÁT + H₂O → 4-NITROFENOL +
fosforečnan

SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE 4-NITROFENOLU při 405 nm

Izoenzymy ALP

1. **Imunochemicky** (kostní izoALP)
2. ELEKTROFORÉZA
3. INAKTIVAČNĚ - INHIBIČNÍ metody
4. srážení LEKTINEM (kostní izoenzym)

Kreatinkináza (CK)

EC 2.7.3.2 AT:kreatin-N-fosfotransferáza



V cytoplazmě a mitochondriích buněk kosterního svalstva, srdce, mozku a hladké svalovině (Poznámka: erytrocyty neobsahují CK)

v myokardu:	80% CK-MM a 20% CK-MB
v kosterním svalstvu:	98% CK-MM a 2% CK-MB(!)

Klinický význam:

- onemocnění kosterního svalstva
- onemocnění srdečního svalu
(infarkt myokardu – sledování dynamiky)
- onemocnění centrální nervové soustavy (CNS)

Metody stanovení: IFCC (37°C)



Hexokináza



G6PD

SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADPH při 340 nm

Reaktivace: N-ACETYL CYSTEIN (NAC)

Izoenzymy CK

CK se skládá ze 2 podjednotek (dimer; $M_r=40\ 000$):

M (muscle) a **B** (brain)

kombinací vznikají 3 izoenzymy: CK-MM, **CK-MB**, CK-BB

je možné detekovat i **makroenzym**: CK- makro

Izoformy izoenzymů: vznikají odštěpením koncových lysinových molekul

CK-MB1 (žádný lysin) a CK-MB2 (1 lysin)

CK-MM1 (žádný lysin), CK-MM2 (1 lysin) a
CK- MM3 (2 lysiny)

Metody stanovení:

1. IMUNOCHEMICKY

CK-MB mass (hmotnostní koncentrace)

CK-MB mass: zvyšuje se asi o 1h dříve než CK-MB aktivita

je kardiospecifický

vyšší analytická citlivost stanovení

2. IMUNOINHIBIČNĚ (nedoporučuje se)

(s protilátkou proti M-podjednotkám CK)

CK-MM	M	M	+ANTI-M	M	M
CK-MB	M	B		M	B
CK-BB	B	B		B	B

Předpoklad: CK-BB v séru nepřítomen (=0)

potom: pokud CK-BB = 0 (nepřítomen)
a CK-MM = 0 (inhibice)

stanovíme aktivitu CK-B (tj. polovinu přítomného CKMB)

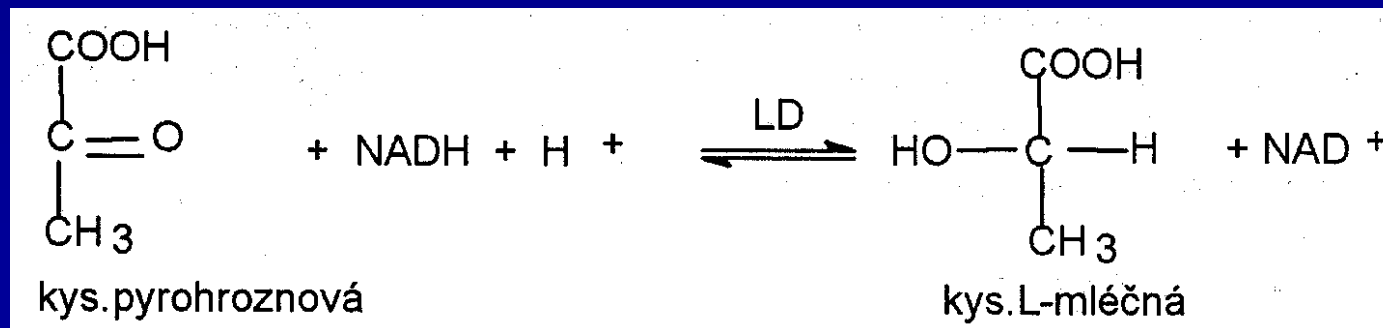
$$CK-MB = 2 \times CK-B$$

Laktátdehydrogenáza (LD)

- Cytoplasmatický enzym, který katalyzuje reakci anaerobní glykolýzy, to vysvětluje přítomnost LD **ve všech tkáních**.



- Zvýšení jeho aktivity v krvi není orgánově specifické



Klinický význam:

- onemocnění srdečního svalu (infarkt myokardu, myokarditida)
- onemocnění svalů
- hemolytická a perniciozní anémie
- onemocnění jaterního parenchymu
- maligní choroby (tumory, leukémie)

Zvýšení jeho aktivity v krvi není orgánově specifické → stanovení dnes slouží spíše k vyloučení onemocnění

Metody stanovení:

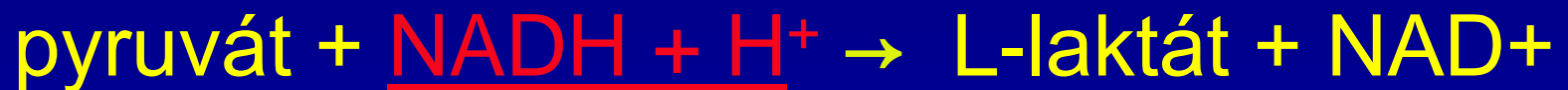
1. IFCC (37°C)

Substrát: L-laktát



SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADH při 340 nm

2. Substrát: pyruvát



SPEKTROFOTOMETRICKY -pokles absorbance NADH při 340 nm

Izoenzymy LD

- Aktivní enzym je tetramér - skládá se ze 4 podjednotek
- Existují 2 druhy podjednotek:
M(muscle/sval) a H (heart/srdce)
- Kombinací vzniká 5 izoenzymů :

LD1	H4
LD2	H3M
LD3	H2M2
LD4	HM3
LD5	M4

Izoenzymy LD



Detekce izo LD na elektroforeogramu

L-laktát + NAD⁺ → pyruvát + NADH + H⁺

NADH + H⁺ + **tetrazoliová sůl** → NAD⁺ + **FORMAZAN**
NBT,INT **nerozpustný**
+ PMS (fenazinmetosulfát)

GGT

Katalyzuje přenos γ -glutamylového zbytku z γ -glutamylpeptidů na jiný akceptor (např. peptid nebo aminokyselinu)

GGT je vázána na cytoplasmatické membrány epitelu žlučových cest, ledvinných tubulů, jater, pankreasu, střeva, erytrocytů, ...)

V krvi dokazatelný enzym je převážně jaterního původu.

Klinický význam:

- onemocnění jater
- obstrukce žlučových cest
- sekundární nádory jater
- monitorování chronického alkoholismu
(poškození jater alkoholem)

1. IFCC (37°C)

Substrát:

γ -L-glutamyl-3-karboxy-4-nitranilid (GLUCANE)



Glygly = GLYCYLGLYCIN

LPS

TRI- a DIACYLGLYCEROLY + H₂O → GLYCEROL + 3-,2 MK

Výskyt: pankreatická lipáza
jaterní lipáza
lipoproteinová lipáza,...

Klinický význam:

- detekce a vyloučení akutní pankreatitidy
(4-6 h, maximum 24h, 8-14 d normalizace)
- chronická pankreatitida (relapsující)
- obstrukce pankreatického traktu

2. Chromogenní

štěpení syntetických substrátů

a) substrát : 1,2-DIGLYCERID

1,2-diglycerid + H₂O → 2-monoglycerid + mastná kyselina

2-monoglycerid + H₂O → **glycerol** + mastná kyselina

glycerol + ATP → glycerol-3-fosfát + ADP

Glycerol-3-fosfát + O₂ → dihydroxyacetonfosfát + **H₂O₂**

2 H₂O₂ + 4-AAP + deriv.fenolu → 4 H₂O + **barevný derivát**

b) substrát : 1,2-o-DILAURYL-rac-GLYCERO-3-
GLUTARIC ACID-(6'-METHYLRESORUFIN) ESTER
DGGR (patent Roche)

DGGR →

1,2-o-DILAURYL-rac-glycerol +
GLUTARIC ACID-6'-METHYLRESORUFIN ESTER

GLUTARIC ACID-6'- METHYLRESORUFIN ESTER ⇒
GLUTARIC ACID + METHYLRESORUFIN
chromogen

SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE METHYLRESORUFINU
při 580 nm

Cholinesterázy (CHE)

hydrolýza

estery CHOLINU + H₂O → CHOLIN + příslušná kyselina

- **Acetylcholinesterázy**

acetylcholin + H₂O → CHOLIN + CH₃COOH

jsou obsaženy v erytrocytech, mozku, plicích,
štěpí přednostně acetylcholin (nervová zakončení)

- **Pseudocholinesterázy** (butyrylcholinesterázy)

pocházejí z ribosomů jaterních buněk → krev
→ sérum a plazma

Klinický význam:

Patologické je především snížení aktivity.

- **poruchy proteosyntézy**
 - těžké hepatopatie
 - hladovění organismu
- **otravy** organofosfáty a karbamáty
(nekompetitivní inhibitory cholinestráz)
- vrozené chyby, atypické varianty

Metody stanovení:

butyrylthiocholin + H₂O → thiocholin + butyrát

thiocholin + DTNB ⇒ 5-merkapto-2-nitrobenzoová kyselina

žluté zbarvení

DTNB = kyselina 5,5' dithio-bis-nitrobenzoová
Ellmanovo činidlo

Enzymy -Tumorové markery

NSE (neuronspecifická enoláza)

cytoplazmatický, glykolytický izoenzym enolázy
(katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát)

TK (thymidinkináza)

enzym podílející se na syntéze DNA
ukazatel buněčné proliferace