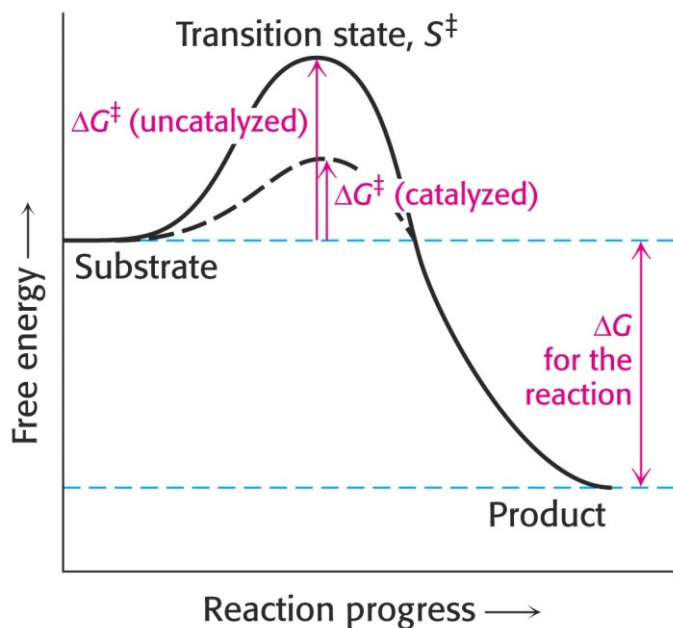


## 13. Enzymy

Průběh chemických reakcí závisí též na schopnosti molekul přiblížit se dostatečně blízko a překonat repulsní energetickou bariéru. K tomu je zapotřebí energie typické pro každou reakci, tzv. **aktivační energie**. Ta vystupuje nejčastěji ve formě kinetické energie molekul projevující se jako teplota. V chemii je běžné urychlovat průběh reakce jejím zvýšením (asi  $3 \times /10^\circ \text{C}$ ). Tímto způsobem ovšem živé organizmy tento problém řešit nemohou (až na výjimky jsou přizpůsobeny nižším teplotám). Jiným způsobem zvýšení rychlosti reakce je **katalýza**. Katalyzátor urychluje průběh reakce snížením aktivační energie (rozložením energeticky náročné interakce do několika dílčích přeměn – transitní stavy), významná je též jeho schopnost orientovat vzájemně reagující částice tak, aby interakce byla usnadněna. není schopen ovlivnit průběh reakce ve smyslu změny rovnovážného stavu. Katalyzátor však neovlivňuje rovnováhu reakce. Posun reakce v žádaném směru je možný zvýšením koncentrace reaktantů (substrátů) nebo odčerpáváním produktů (u anabolických pochodů značně omezeno) nebo dodáním energie ve vhodné formě (v biochemii jako **makroergické sloučeniny**).

Mnoho chemických reakcí využívá katalýzy k usnadnění průběhu reakcí. V biochemických reakcích hraje katalýza zcela zásadní roli,



**Schematické znázornění účinku katalyzátoru na průběh chemické reakce (snížení aktivační energie).**

Pozn.: Energetické minimum vpravo odpovídá koncentračním poměrům pro rovnovážný stav, nikoli samotným produktům!

Mnoho chemických reakcí využívá katalýzy k usnadnění průběhu reakcí. V biochemických reakcích hraje katalýza zcela zásadní roli, všechny reakce v živých organizmech jsou katalyzovány. Téměř výlučně tuto úlohu plní bílkoviny s katalytickou funkcí zvané **enzymy** (jen několik málo reakcí je katalyzováno RNA, tzv. ribozymy – snad jde o vývojový relikv).

Katalýza – Berzelius 1835

#### Chemické katalyzátory

- jsou to látky, jež urychlují chemické reakce
- nemění přitom rovnováhy chemických reakcí
- snižují aktivační energii

Lze tedy předpokládat, že katalyzátor se podílí na tvorbě labilních meziproductů, jejichž vznik je provázen menší spotřebou aktivační energie než je tomu u reakce nekatalyzované

V živých organismech od organismů prokaryotních po eukaryotní probíhá obrovské množství reakcí, z nichž téměř všechny probíhají za účasti biokatalyzátorů, jinak by tyto reakce probíhaly pomalu.

Vzhledem ke komplexnímu charakteru biochemických reakcí plynou na biokatalyzátory některé charakteristické požadavky

- A. Reakce, které katalyzují, probíhají cíleně podle přesného genetického plánu.
- B. Průběh reakcí musí být specifický.
- C. Jejich aktivita musí být přesně regulována podle potřeb organismu.

Proto se biokatalyzátory liší od běžných chemických katalyzátorů:

- 1) Vyšší reakční rychlostí
- 2) Mírnějšími podmínkami reakce – T, pH, tlak.
- 3) Vyšší specifitou.
- 4) Schopnosti regulace

#### Biologické katalyzátory

**Globulární proteiny** – enzymy

**RNA** – ribozymy 1986 Cech, Altman (Nobelova cena)

**TABLE 8.1** Rate enhancement by selected enzymes

Enzyme	Nonenzymatic half-life	Uncatalyzed rate ( $k_{un} s^{-1}$ )	Catalyzed rate ( $k_{cat} s^{-1}$ )	Rate enhancement ( $k_{cat}/k_{un}$ )
OMP decarboxylase	78,000,000 years	$2.8 \times 10^{-16}$	39	$1.4 \times 10^{17}$
Staphylococcal nuclease	130,000 years	$1.7 \times 10^{-13}$	95	$5.6 \times 10^{14}$
AMP nucleosidase	69,000 years	$1.0 \times 10^{-11}$	60	$6.0 \times 10^{12}$
Carboxypeptidase A	7.3 years	$3.0 \times 10^{-9}$	578	$1.9 \times 10^{11}$
Ketosteroid isomerase	7 weeks	$1.7 \times 10^{-7}$	66,000	$3.9 \times 10^{11}$
Triose phosphate isomerase	1.9 days	$4.3 \times 10^{-6}$	4,300	$1.0 \times 10^9$
Chorismate mutase	7.4 hours	$2.6 \times 10^{-5}$	50	$1.9 \times 10^6$
Carbonic anhydrase	5 seconds	$1.3 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^6$	$7.7 \times 10^6$

Abbreviations: OMP, orotidine monophosphate; AMP, adenosine monophosphate.  
Source: After A. Radzicka and R. Wofenden. *Science* 267 (1995):90–93.

***Příklady katalytického působení enzymů – porovnání rychlostních konstant spontánní a katalyzované reakce.***

I tak snadno a rychle probíhající pochod jako je disociace  $\text{CO}_2$  je v organizmech katalyticky urychlena.

Historie poznávání enzymů

Kühn 1878 – „Enzym“ *en zyme* – v kvasnicích

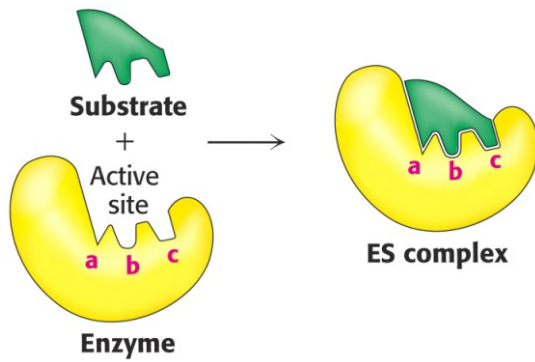
Paster 1860 – fermentace je katalyzována látkami, tuto schopnost však nelze oddělit od živých buněk, které jsou vybaveny tzv. životní silou *vis vitalis*

Liebig – fermenty jsou schopny katalyzovat tyto reakce i mimo živou buňku – spor s Pasterem.

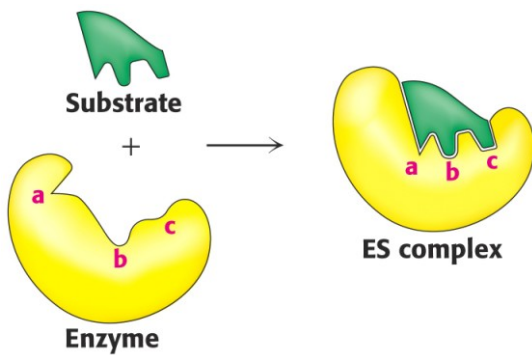
Buchner 1897 – tyto reakce je schopen katalyzovat i samotný extrakt kvasinek

Sumner 1926 – bílkovinná povaha enzymů – ureasa

## Substrátová specifita



Model zámku a klíče



Indukované přizpůsobení

## KLASIFIKACE A TŘÍDĚNÍ ENZYMŮ

### Názvosloví enzymů

- A. Triviální – názvy souvisely s místem výskytu nebo funkcí – trypsin, pepsin
- B. Název substrátu nebo reakce + koncovka asa – amylasa
- C. Systematické názvosloví
  - a. Substrát A + reakce R + asa  
glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

b. Substrát A + substrát B + reakce R + asa

alkohol:NAD:oxidoreduktasa

Systematické názvy jsou však pro praktické použití příliš složité a proto se v dané publikaci používají jenom při prvním představení enzymů.

### Klasifikace enzymů

IUB – 1961

6 tříd podle typu reakce, kterou katalyzují, dále podtřídy podle vazby, kterou vytvářejí, případně štěpí, dále podle případného kofaktoru a nakonec podle místa uvnitř skupiny

1. třída **oxidoreduktasy** – oxidačně redukční reakce – nejpočetnější třída  
laktatdehydrogenasa

2. třída **transferasy** – přenos skupin  
aspartataminotransferasa

3. třída **hydrolázy** – hydrolytický (za účast  $H_2O$ ) štěpí vazby – početná skupina  
ureasa

4. třída **lyasy** – nehydrolytický (bez účast  $H_2O$ ) štěpí vazby  
karbonatdehydratasa

5. třída **izomerasy** – intramolekulární přesuny atomů či skupin  
glukosa-6-fosfátizomerasa

6. třída **ligasy** – vznik energeticky náročných vazeb nejčastěji za spotřeby ATP  
asparaginsyntethasa

**TABLE 8.3 Six major classes of enzymes**

Class	Type of reaction	Example	Chapter
1. Oxidoreductases	Oxidation-reduction	Lactate dehydrogenase	16
2. Transferases	Group transfer	Nucleoside monophosphate kinase (NMP kinase)	9
3. Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)	Chymotrypsin	9
4. Lyases	Addition or removal of groups to form double bonds	Fumarase	18
5. Isomerases	Isomerization (intramolecular group transfer)	Triose phosphate isomerase	16
6. Ligases	Ligation of two substrates at the expense of ATP hydrolysis	Aminoacyl-tRNA synthetase	29

Číslování enzymů :

alkohol:NAD:oxidoreduktasa (alkoholdehydrogenasa) EC 1.1.1.27

EC 1 – oxidoreduktasy

EC 1.1. – skupina CHOH

EC 1.1.1. – kofaktor NAD

EC 1.1.1.27 – číslo uvnitř skupiny

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>

## Struktura enzymů

- 1) Jednoduché enzymy – složené pouze z proteinu
- 2) Složené enzymy – obsahují nebílkovinou složku – tzv **kofaktor**

**Kofaktor** (neaktivní) + **apoenzym** (neaktivní) ↔ **holoenzym** (aktivní)

### **Kofaktor :**

Kovový ion – tzv metaloenzymy

Zn<sup>2+</sup> - alkalická fosfatasa, alkoholdehydrogenasa

Cu<sup>2+</sup> - tyrosinasa, diaminoxidasa

### Organická látka

A) Kovalentně vázaná – **prostetická skupina**

B) Nekovalentně vázaná - **koenzym**

Jak prostetická skupina, tak koenzym vstupují do enzymové reakce, liší se však způsobem regenerace :

**prostetická skupina** – na těžce enzymové bílkovině, je kovalentně vázaná

**koenzym** – disociuje z dané enzymové bílkoviny a může se regenerovat v jiné enzymové reakci

### Enzymové bílkoviny

Chemickou strukturou a konformací se enzymy neliší od molekul jiných globulárních proteinů. Podle složitosti lze rozlišovat enzymy monomerní, tvořené jedinou podjednotkou, oligomerní, tvořené z více podjednotek a na tzv. multienzymové komplexy, tvořené vlastně několika molekulami enzymu.

## **Koenzymy a prostetické skupiny**

Nebílkovinné součásti enzymů

Apoenzym + koenzym = holoenzym

Pevně (kovalentně i jinak) vázané – typ prostetické skupiny

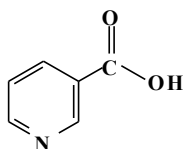
Volně disociabilní – typ druhého substrátu

Koenzymy oxidoreduktáz

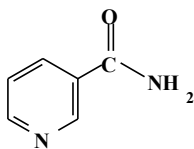


## NIKOTINAMIDOVÉ KOENZYMY

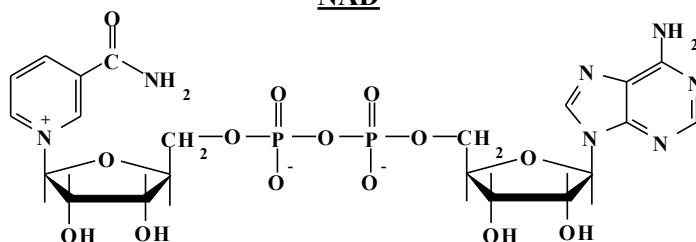
k. nikotinová



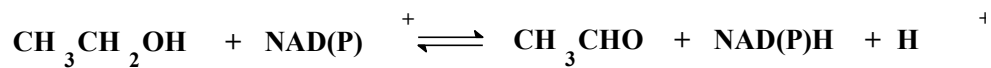
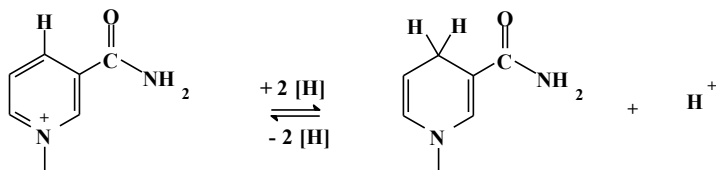
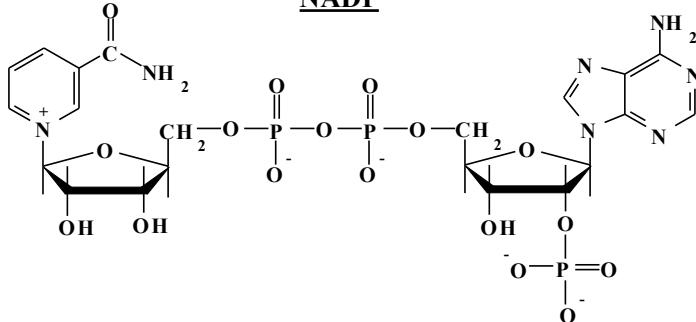
nikotinamid



NAD<sup>+</sup>

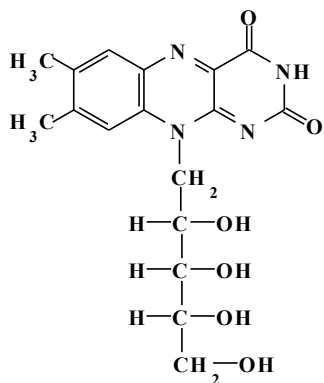


NADP<sup>+</sup>

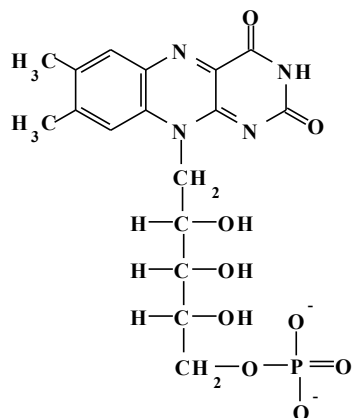


## FLAVINOVÉ KOENZYMY

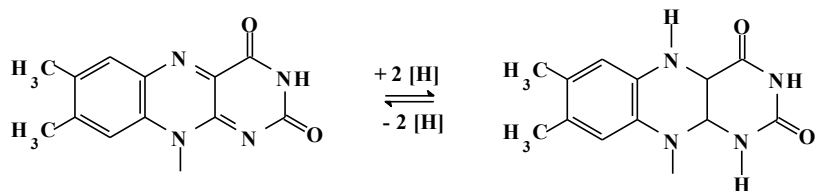
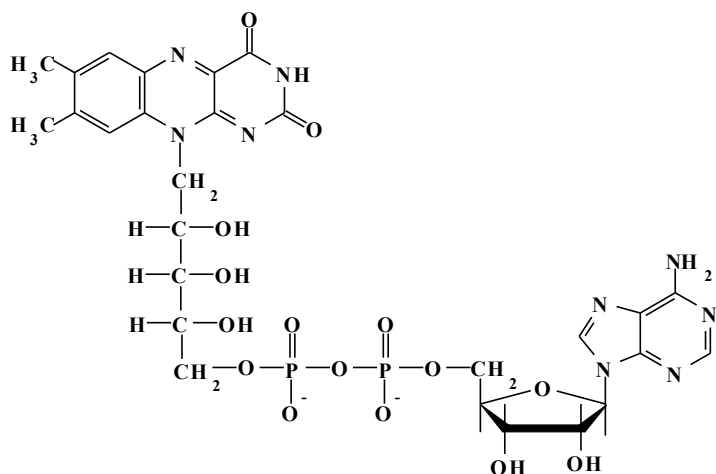
riboflavin



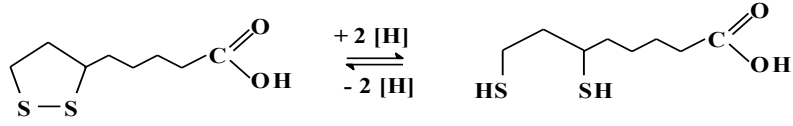
FMN



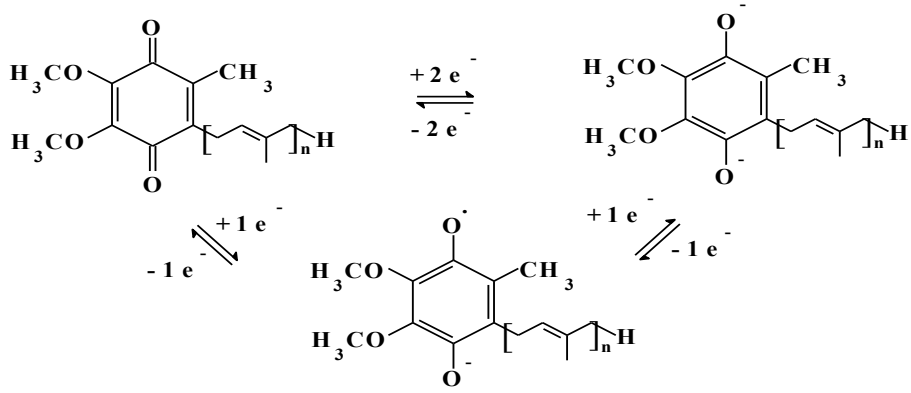
FAD



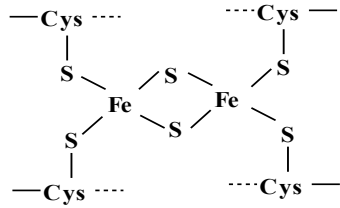
**k.lipoová**



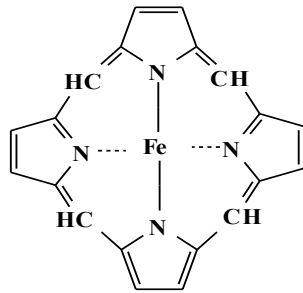
**ubichinon**



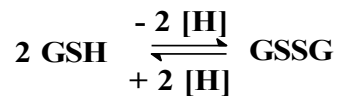
**ferredoxiny**



**hem**

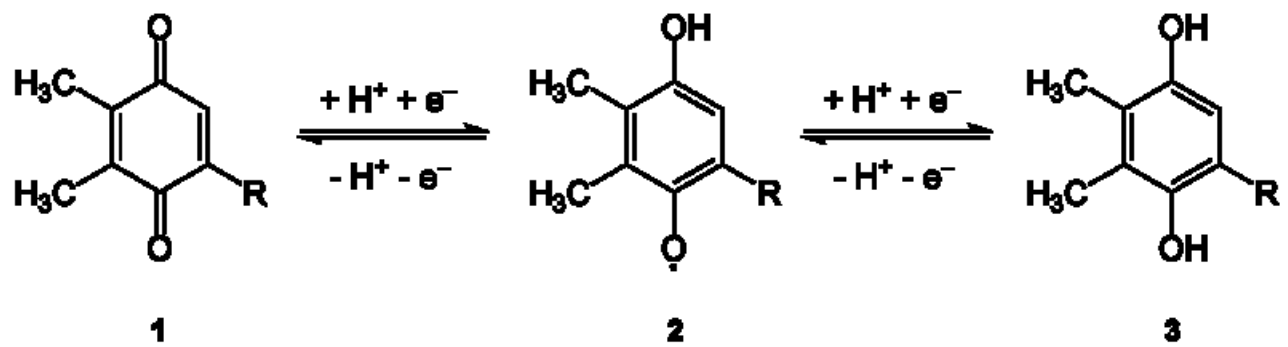


**glutathion**





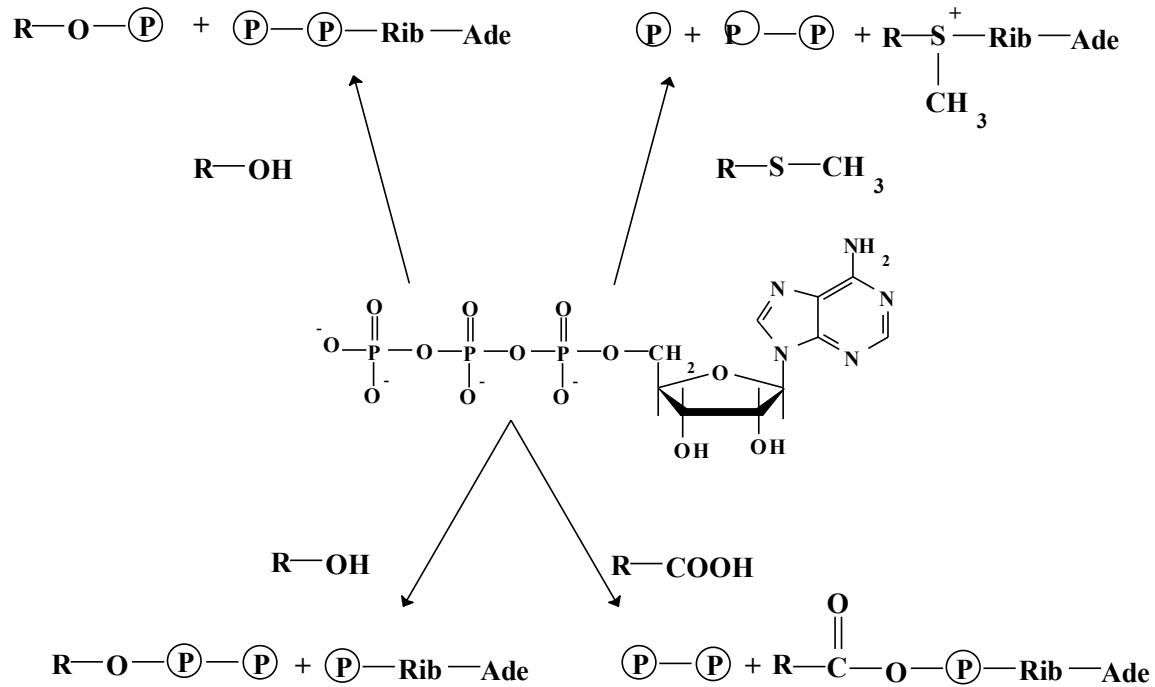
*Plastochinon (PQ<sub>9</sub>)*



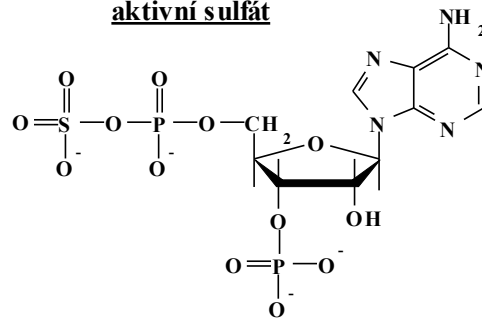
*Redukce plastochinonu*

## Koenzymy transferáz

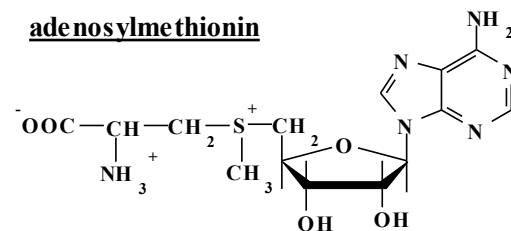
### ATP



### aktivní sulfát

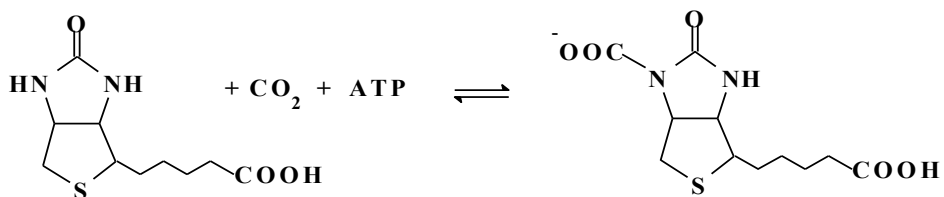


### adenosylmethionin

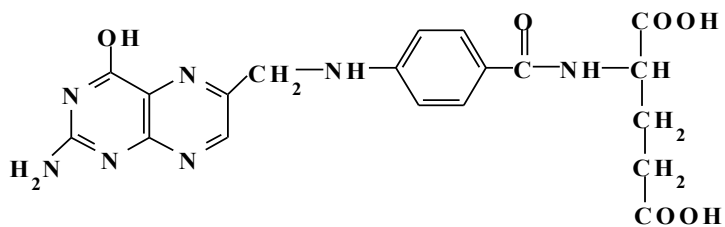




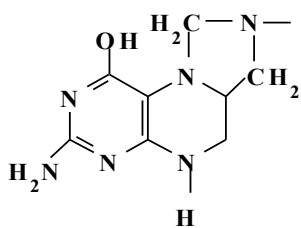
**biotin**



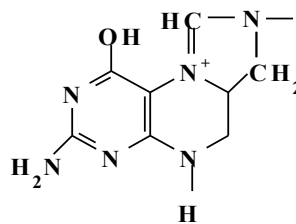
**tetrahydroolistová k.**



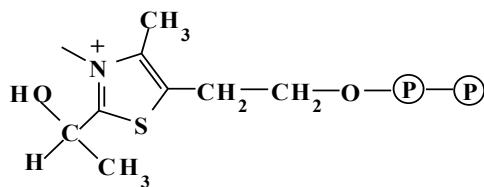
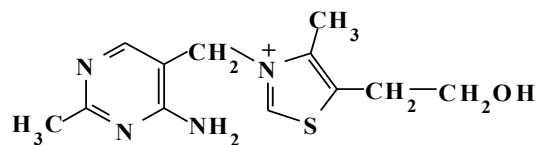
**methyltetrahydroolistová k.**



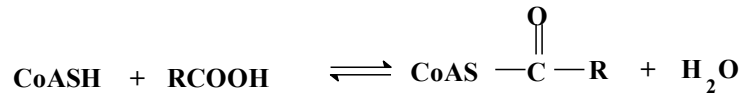
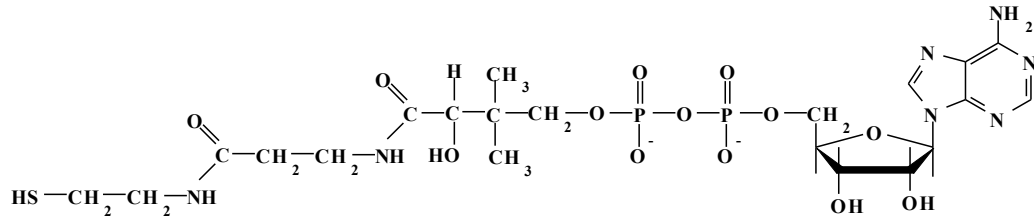
**methenyltetrahydroolistová k.**



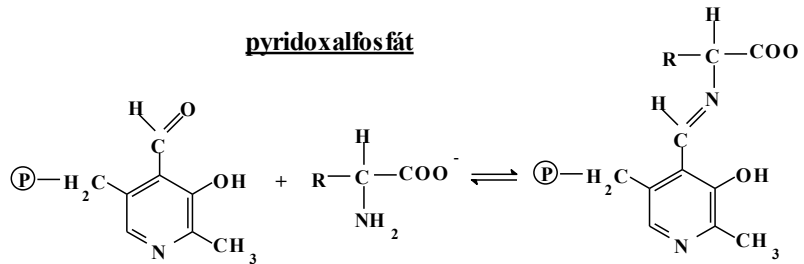
**thiamin**



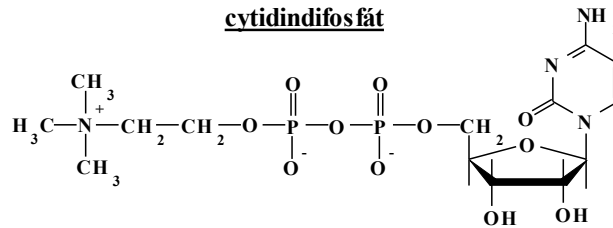
koenzym A - CoA - CoASH



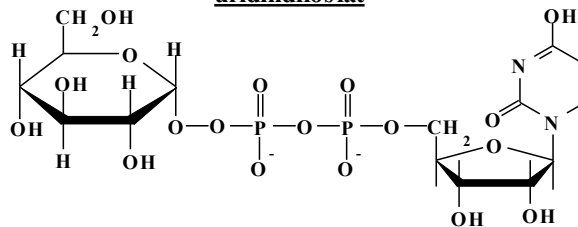
pyridoxalfosfát



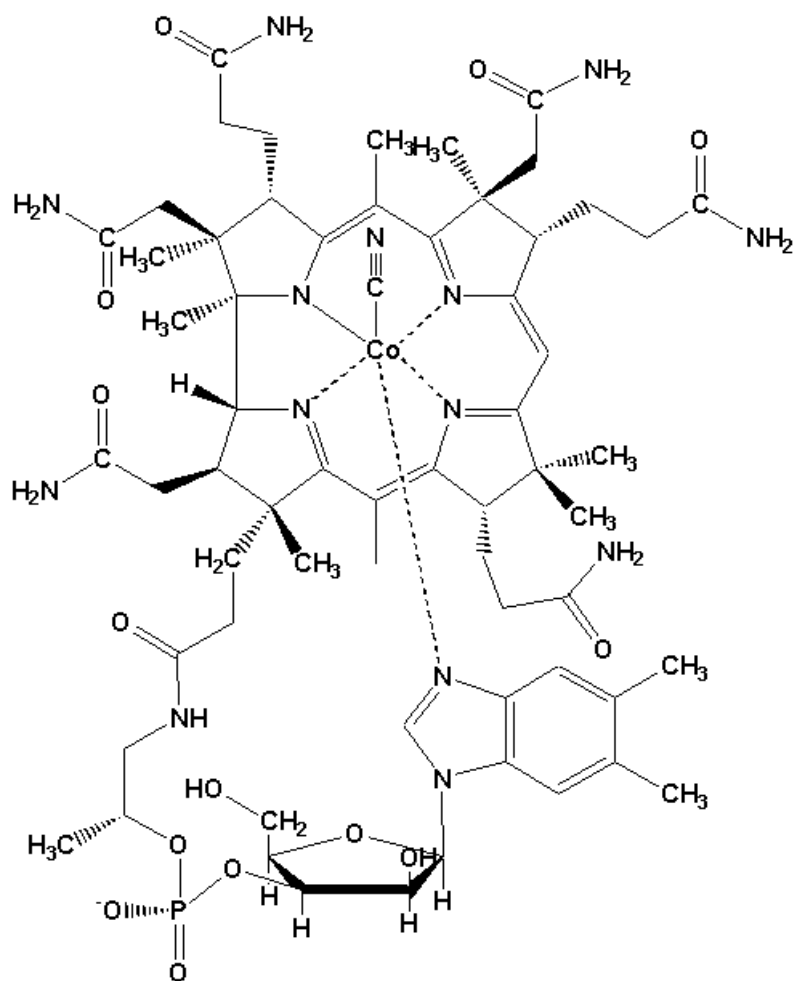
cytidindifosfát



uridindifosfát







**Cyanocobalamin (Vitamin B12)**

### Vyjadřování katalytické účinnosti enzymů

Vzhledem ke skutečnosti, že enzymy jsou většinou přítomny v komplexní proteinové směsi, nelze u konkrétního enzymu přímo stanovit jeho koncentraci. Proto se jejich množství vyjadřuje nepřímou formou **aktivity** tj. rychlosti enzymové reakce – jako množství přeměněného substrátu či vzniklého produktu za časovou jednotku.

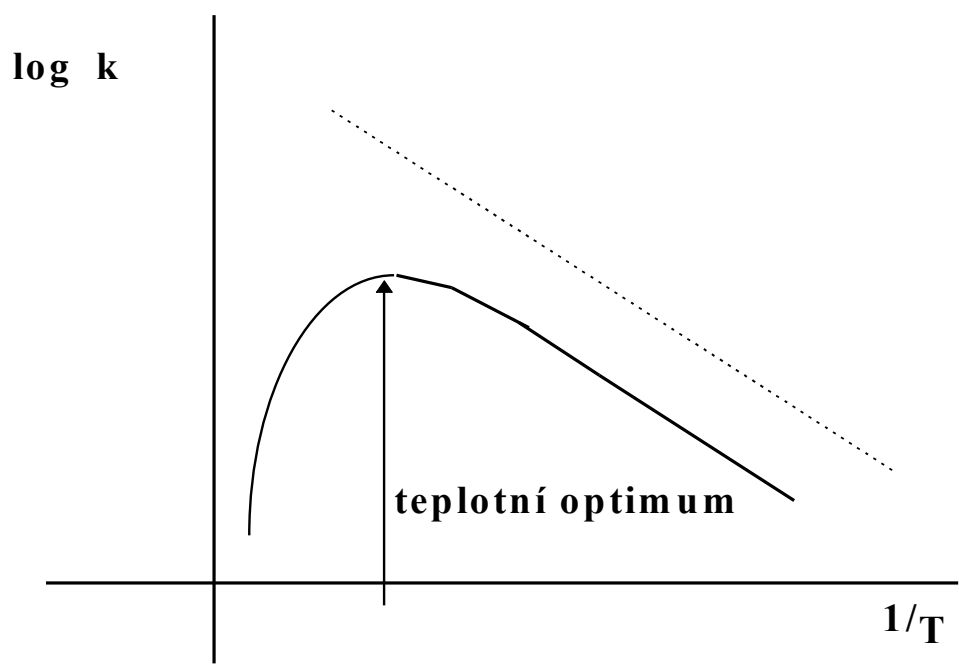
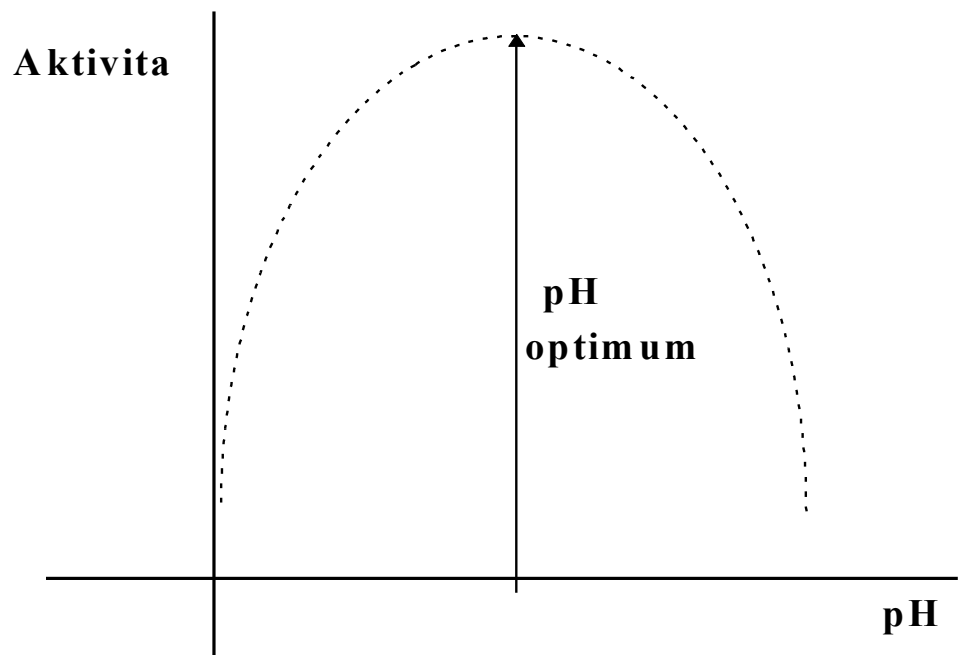
Jednotky aktivity:

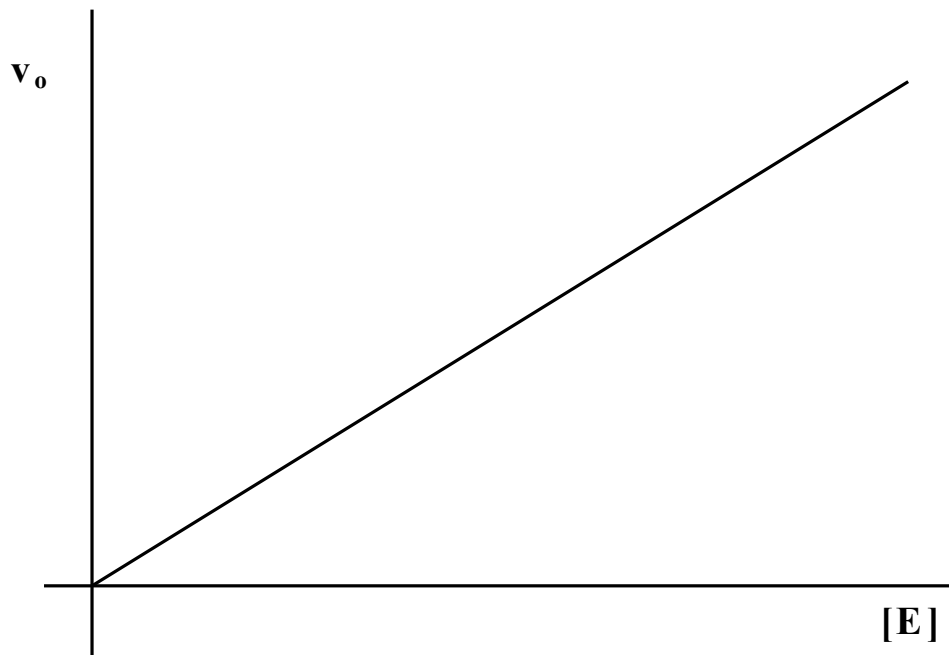
- A) **Smluvní jednotky** – např. u amylasy - množství enzymu, které rozštěpilo za 30 min při 40 °C dané množství škrobu aby ten nedává reakci s jodem
- B) **IU mezinárodní jednotky 1961** – množství enzymu, jež přemění 1 μmol substrátu za 1 minutu za standardních podmínek (pH, T. přebytek substrátu, přítomnost aktivátorů)
- C) **Katal** (podle soustavy SI) 1971 - množství enzymu jež přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu za standardních podmínek (pH, T. přebytek substrátu, přítomnost aktivátorů)

**Specifická aktivita** – aktivita vztažená na celkovou koncentraci bílkoviny (katal/gram)

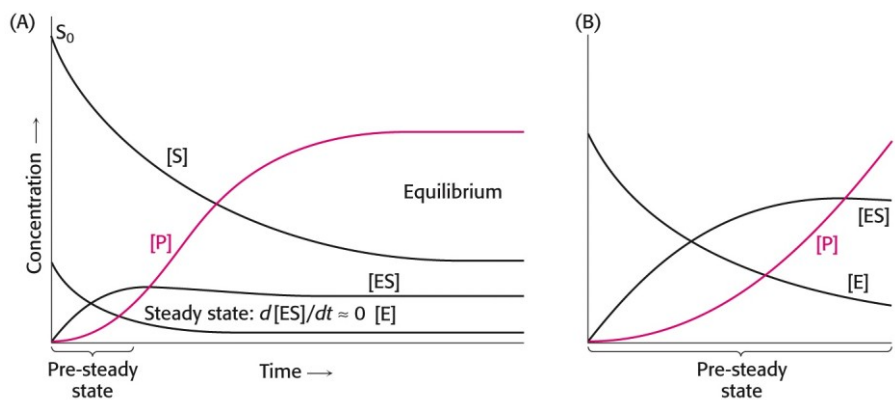
**Číslo přeměny** – množství substrátu přeměněné molem enzymu za časovou jednotku

Rychlost reakce





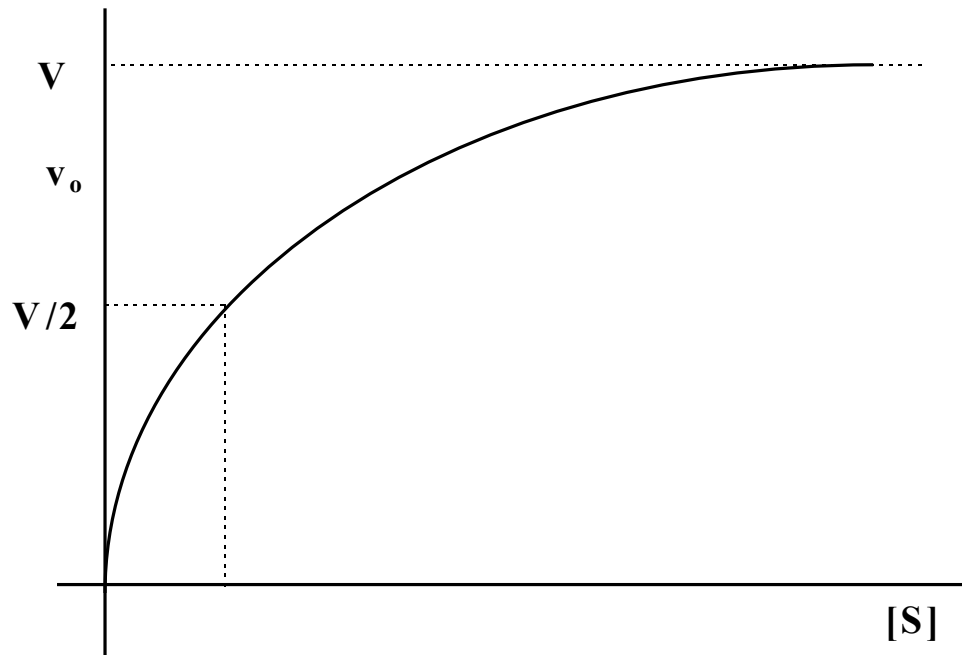
## Kinetika



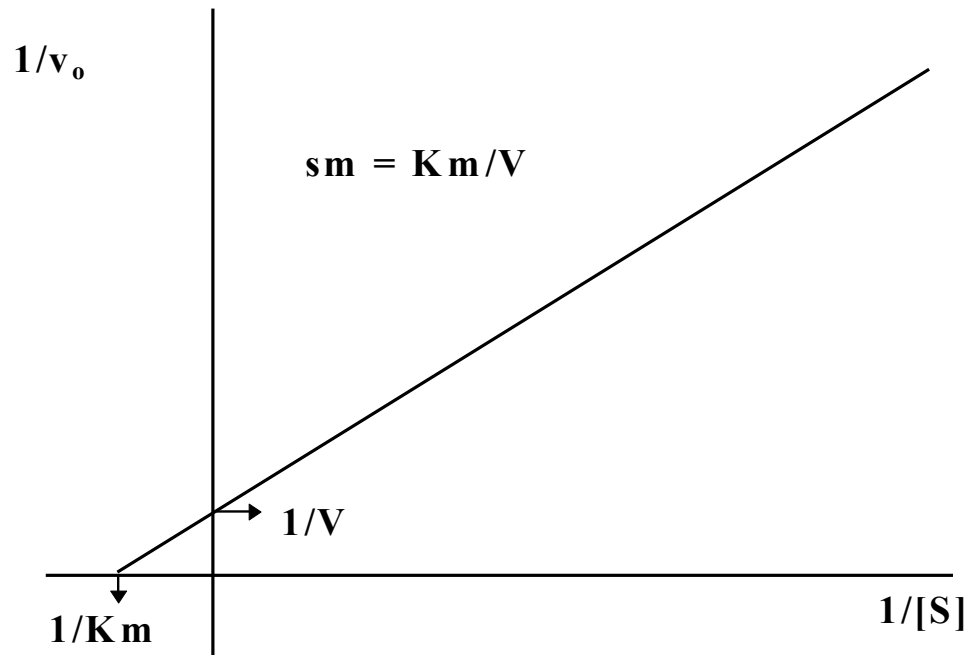
Časový průběh enzymové reakce – prestacionární a stacionární stav.

Za stacionárních podmínek

$$V_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

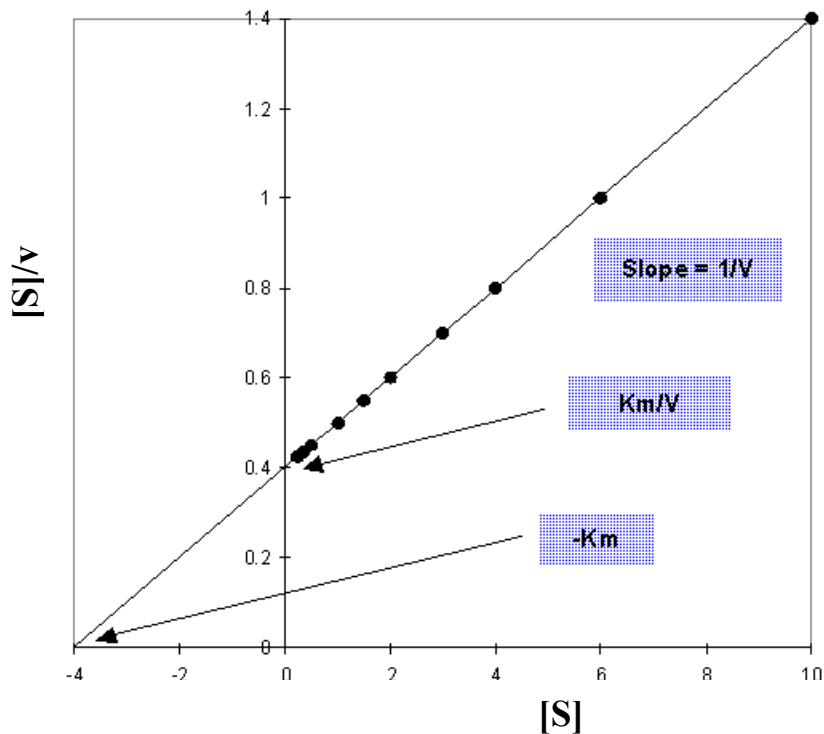


$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{lim} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{lim}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}}$$



Lineweaver-Burk

Jiná vynesení – Hanes –  $[S]/v$  vs.  $[S]$



### Význam nalezených konstant

$K_m$  je mírou afinity enzymu a substrátu (formálně disociační konstantou komplexu ES), není závislá na katalytickém množství (aktivitě enzymu) v pokusu, pokud pracujeme v oblasti lineární závislosti v na  $[E]$  – viz výše. Lze ji tabelovat a užít jako srovnávací parametr. Liší se pro různé substráty téhož enzymu.

$V_{lim}$  je ukazatelem aktivity enzymu, závisí na katalytickém množství enzymu v experimentu. Dá se užít k vyjádření katalytické účinnosti a čistoty enzymu. V těchto případech se vypočítá tzv. specifická aktivita jako poměr  $V_{lim}$  a množství enzymu (typicky v mg bílkoviny neznáme-li jeho  $M_r$ , nebo pracujeme se směsí – homogenát, krevní sérum apod.) Známe-li látkové množství enzymu, pak specifickou aktivitu vztahenou na látkové množství enzymu nazýváme číslem přeměny (TN):

$$V_{lim} / E \text{ ( mol.s}^{-1} / \text{mol) = TN (s}^{-1}\text{) = } k_{cat}$$

TN pak značí počet molů (molekul) substrátu přeměněné 1 molem (molekulou) enzymu za 1 s a jde o tzv. katalytickou konstantu (celkovou rychlostní konstantu katalysované reakce) –

objektivní vyjádření účinnosti enzymu.

**TABLE 8.5**  $K_M$  values of some enzymes

Enzyme	Substrate	$K_M(\mu\text{M})$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa- <i>N</i> -acetylglucosamine	6
$\beta$ -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	$\text{CO}_2$	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	$\text{HCO}_3^-$	1000
	ATP	60
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3
	tRNA	0.4
	ATP	300


**TABLE 8.6** Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5



Jako spolehlivější ukazatel substrátové specificity – preference substrátů – se ukázal poměr  $k_{cat}$  (čím vyšší, tím účinnější katalýza) a  $K_M$  (čím nižší, tím větší afinita enzymu k substrátu).

**TABLE 8.7** Substrate preferences of chymotrypsin

Amino acid in ester	Amino acid side chain	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )
Glycine	—H	$1.3 \times 10^{-1}$
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{—CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3.6 \times 10^2$
Norleucine	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3.0 \times 10^3$
Phenylalanine	—CH <sub>2</sub> — 	$1.0 \times 10^5$

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 7.3.

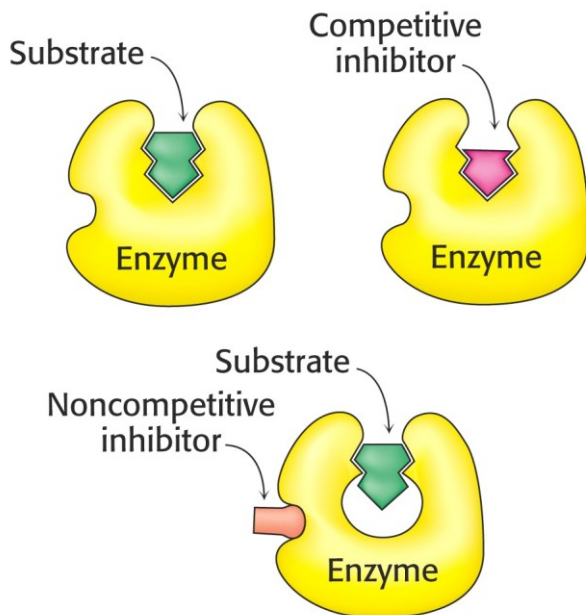
## Ovlivnění rychlosti enzymové reakce

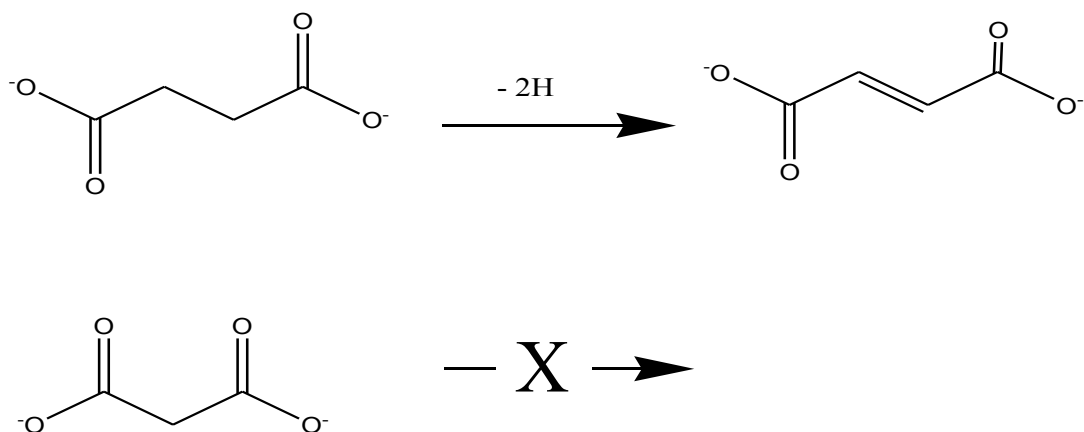
V organismech i laboratorních podmínkách lze ovlivnit rychlost enzymové reakce působením chemických látek – efektorů či modulátorů (pozitivních a negativních), běžně zvaných aktivátory (zvyšují) a inhibitory (snižují rychlost) enzymů. Mají regulační poslání, v laboratoři slouží ke studiu mechanismu působení enzymů. V tomto směru je nejčastější použití inhibitorů.

K tomu slouží především reversibilní inhibitory, jež interagují s enzymem vratně, dají se odstranit např. dialýzou, gelovou chromatografií apod. Inhibitory ireversibilní se vážou pevně a nevratně.

Reversibilní inhibice se dělí na několik typů, z nichž nejvýznamnější je kompetitivní a nekompetitivní,

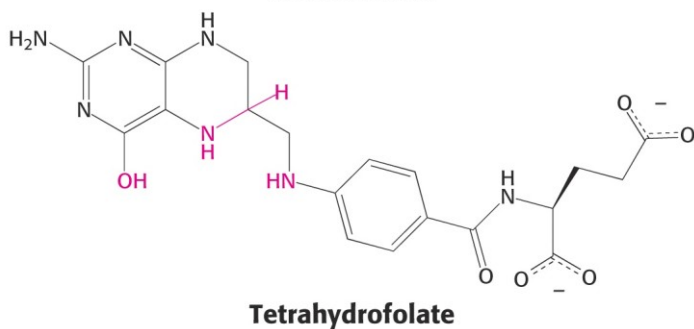
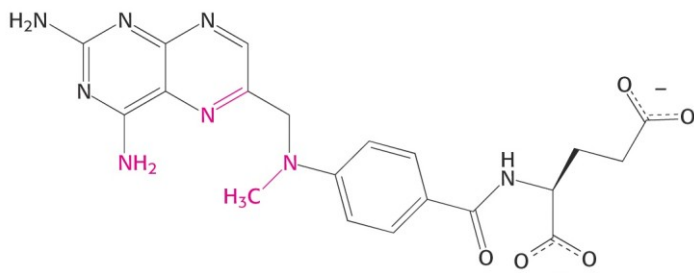
### Kompetitivní inhibice



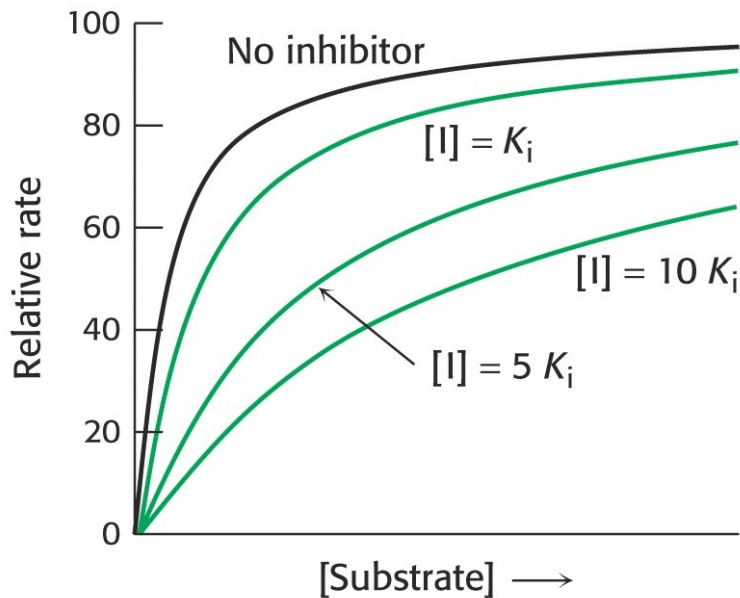
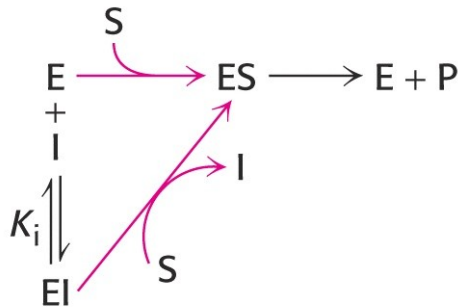


Jantaran (sukcinát) je substrátem enzymu sukcinátdehydrogenasy, vzniká fumarát. Malonát je kompetitivním inhibítorem tohoto enzymu, nelze ho dehydrogenovat. Nutno odlišit od konkurence několika substrátů, které mohou podlehnout enzymové reakci (např. zde deriváty jantaranu).

Podobný strukturální vztah bývá základem inhibičního působení tzv. antimetabolitů, např. methotrexátu a THF (dole), podobně sulfonamidy působí kompeticí s p-aminobenzoátem.



Kompetitivní inhibitor reaguje s volným enzymem a soutěží se substrátem o vazné místo v aktivním centru. Může se navázat pouze na volný enzym. V reakční směsi pak máme kromě E, S a ES ještě formu EI (komplex enzym-inhibitor), který se tvoří vratně mezi volným enzymem a inhibitorem:



Schema reakcí v přítomnosti kompetitivního inhibitoru a jeho vliv na kinetiku enzymové reakce

Zavedeme-li do vztahu Michaelise a Mentenové faktor

$$K_i = [\text{E}] \cdot [\text{I}] / [\text{EI}] \text{ a } [\text{E}]_t = [\text{E}] + [\text{EI}] + [\text{ES}]$$

dostaneme vztah

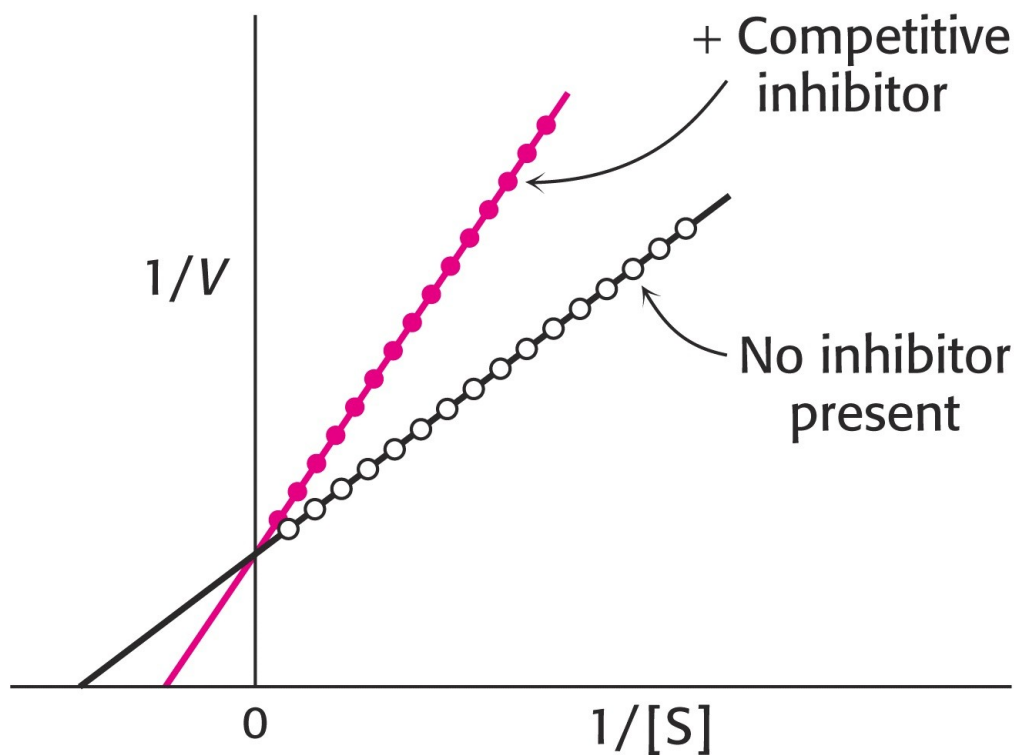
$$v = V_{lim} \cdot [\text{S}] / [K_m (1 + [\text{I}]/K_i) + [\text{S}]], \text{ kde } K_m (1 + [\text{I}]/K_i) = K_{app}$$

a po rektifikaci

$$1/v = 1/V_{lim} + K_{app}/V_{lim} \cdot 1/[\text{S}]$$

Výraz  $K_{app}$  nazýváme zdánlivou Michaelisovou konstantou, je vyšší než skutečná přímo úměrně koncentraci inhibitoru a nepřímo  $K_i$ .

Grafické vzjádření této závislosti vidíme na vynesení dle Lineweavera a Burka

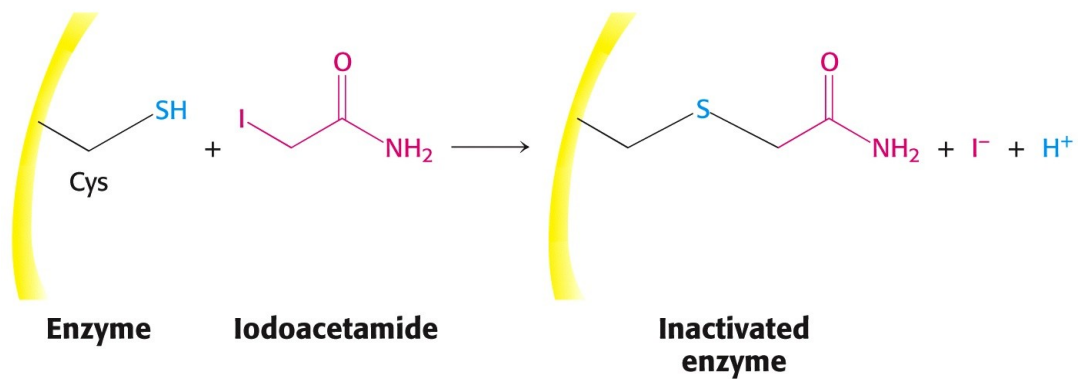
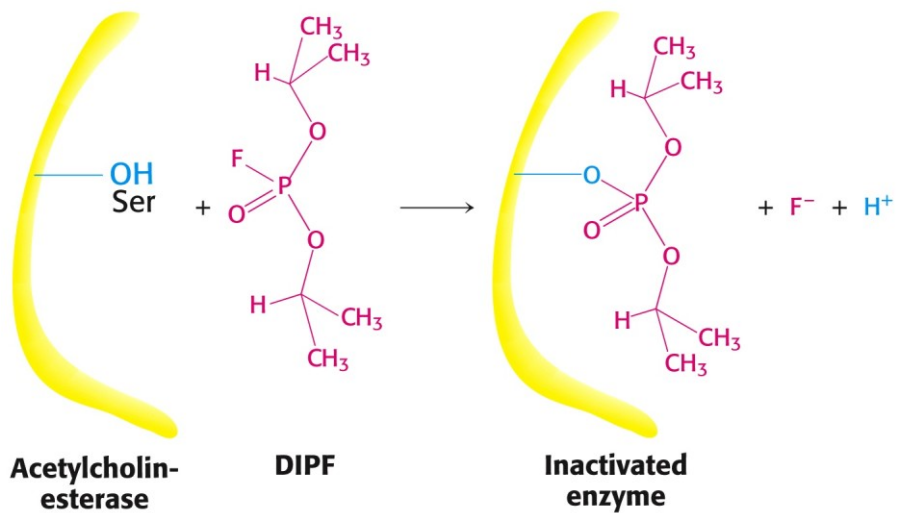


Vidíme, že  $V_{lim}$  se nemění, hodnota  $K_m$  je zvýšena na hodnotu  $K_{app}$ .

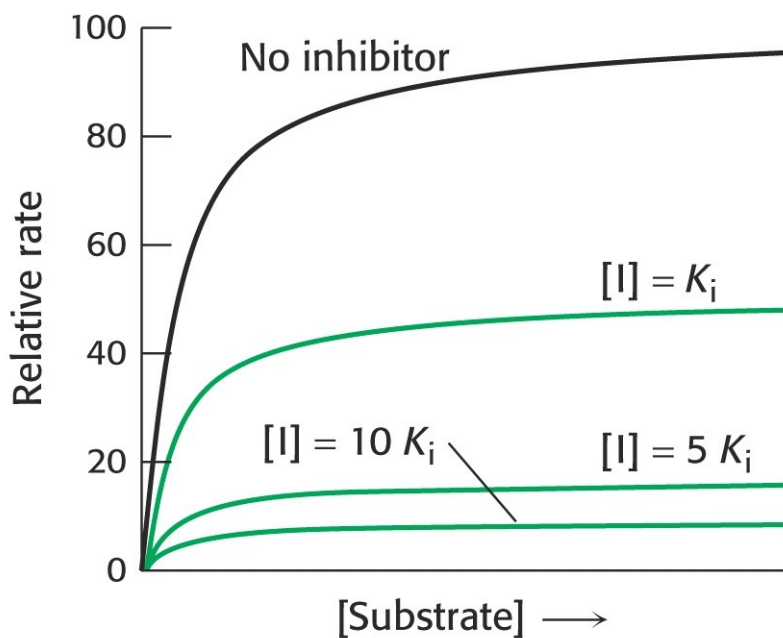
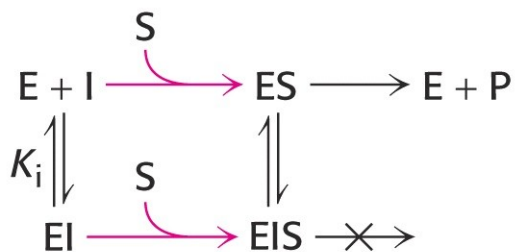
Analogicky se mění i grafy užívané v jiných vyneseních, např. dle Hanese (směrnice =  $1/V_{lim}$  je stejná, průsečíky se vzdalují od 0).

## Nekompetitivní inhibice

Inhibitor není podobný substrátu, váže se jak na volný enzym tak komplex ES. Vytváří komplex EI, jehož koncentrace nezávisí na koncentraci substrátu, ale pouze inhibitoru.

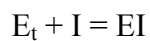


Příklad nekompetitivních inhibitorů serinových hydroláz a sulfhydrylových enzymů.



Schema rovnováh v reakční směsi v přítomnosti nekompetitivního inhibitoru a jeho ovlivnění enzymové kinetiky vyjádřeno graficky.

V reakční směsi pak vzniká komplex EI podle rovnice



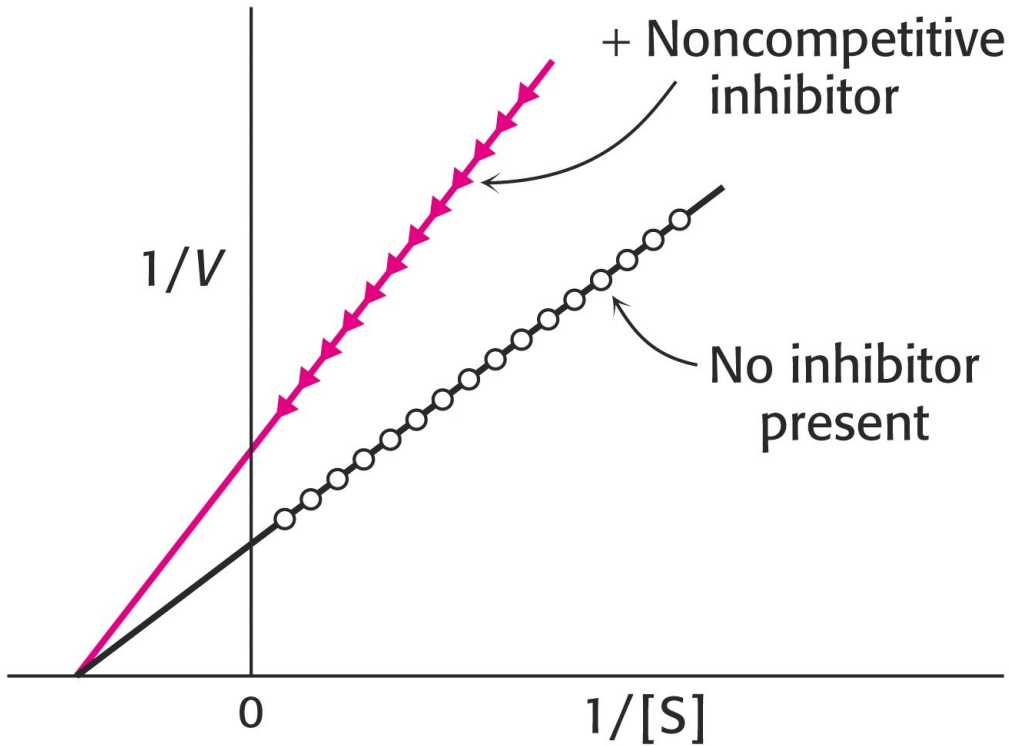
Zavedením do základní rovnice Michaelise a Mentenové pak dostáváme

$$v = V_{lim} (1 + [I]/K_i) \cdot [S] / [K_m + [S]]$$

a po rektifikaci

$$1/v = (1/V_{lim} + K_m/V_{lim} \cdot 1/[S]) \cdot (1 + [I]/K_i)$$

Grafické vyjádření této závislosti je na obrázku dole. Vidíme, že hodnota  $K_m$  se nemění, zvýší se průsečík  $1/V_{lim}$ .

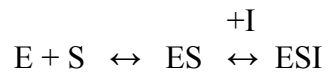


Analogické změny najdeme v jiných vyneseních, u vynesení podle Hanese se zvýší směrnice při zachování průsečíku s osou  $[S]$ .



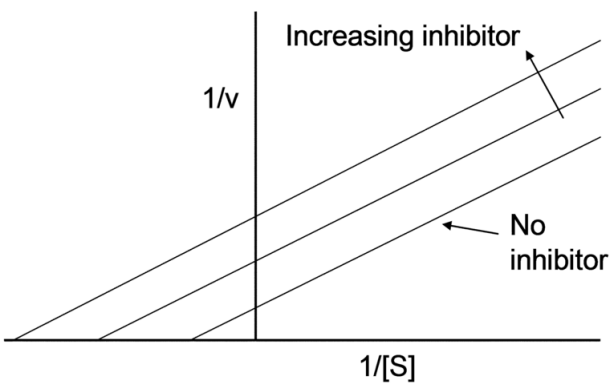
## Akompetitivní inhibice

Inhibitor reaguje s komplexem ES – sekvenční děj



Typické pro vícesubstrátové reakce

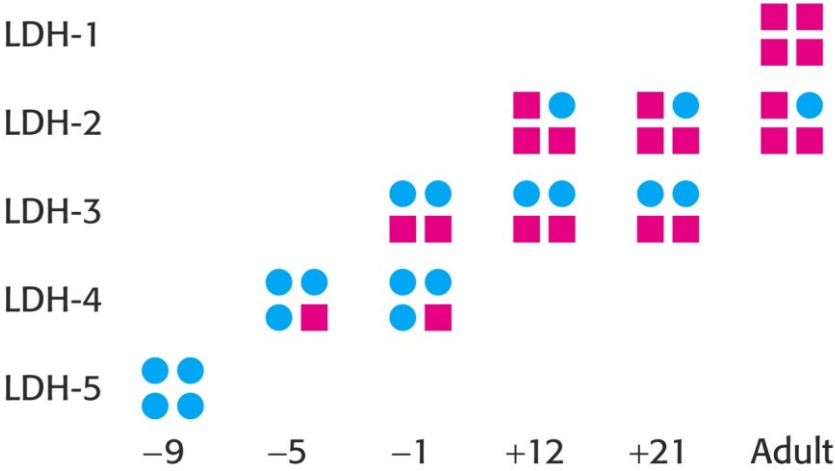
Nejmenší inhibice při nejnižších [S]



Mění se  $K_m$  i  $V_{lim}$ , jejich poměr je stejný

ISOENZYMY

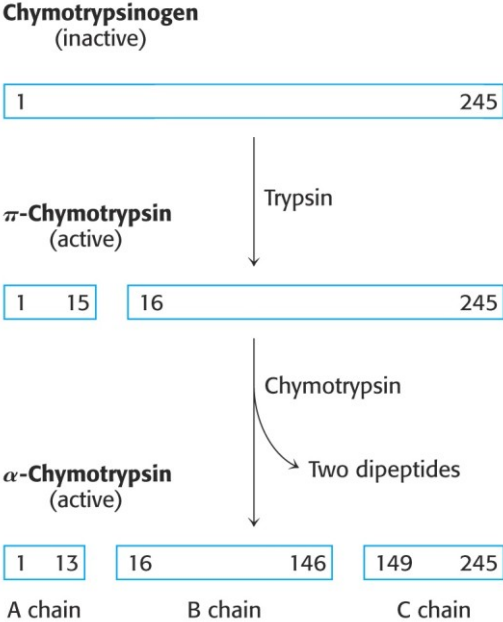
(A)



(B)

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
M <sub>4</sub>	█	█	█	█	█	—	—
HM <sub>3</sub>	█	█	█	█	█	—	—
H <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	—	█	—	█	█	█	—
H <sub>3</sub> M	—	—	—	—	█	—	—
H <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	█	█

Zymogeny - proenzymy



## Organizace enzymů

- enzymy volně rozpuštěné (cytoplasma – glykolýza)
- multienzymové komplexy (zvl. pro anabolické pochody – syntéza MK, ale i katabolické pochody – využití energie)
- membránově vázané enzymy (organizovanost, vektoriální průběh reakcí – využití energie – oxidační a fotosyntetická fosforylace)

### Využití enzymů

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

### Umělé enzymy

- **Synzymy**
- **Abzymy**