Faculty
of Science

Palacký University
Olomouc

ENZYMY

Prof. RNDr. Zdeněk DVOŘÁK, DrSc., PhD
Katedra buněčné biologie a genetiky

Buněčná biologie II. (KBB/BB2)

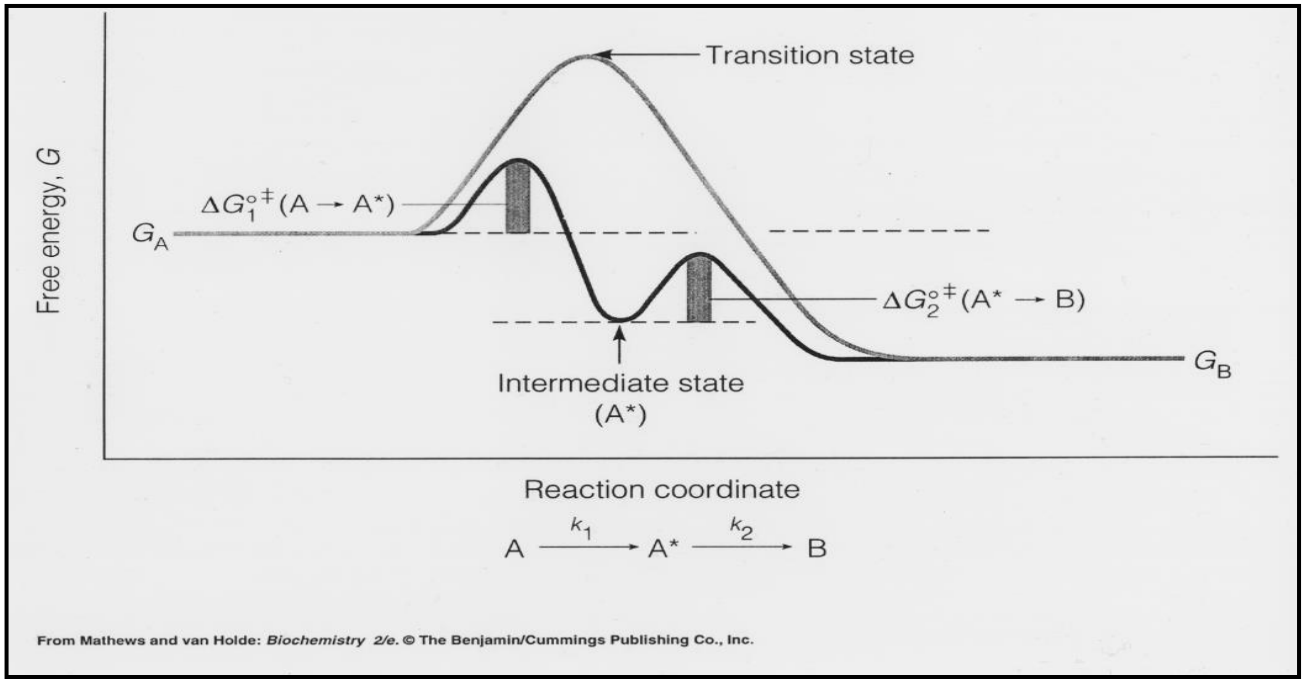
ENZYMY = BIOKATALYZÁTORY

- **Chemické přeměny v organismu**
- **Transformace různých forem energie**
- **Zvýšení reakční rychlosti**
- **Snížení energetické bariéry**

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$

- **Biochemické reakce v organismu mohou probíhat rozumnou rychlostí za fyziologických podmínek**

S = substrát; látka, na kterou působí enzym
E-S = komplex enzym-substrát; přechodný stav
P = produkt



ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI ENZYMŮ

- **SPECIFICITA**

Substrátová specificita

- absolutní specificita = reaguje pouze s jediným substrátem
- stereospecificita = optické izomery (substrát / produkt)
- skupinová specificita = reaguje s podobnými substráty; např. alifatické alkoholy

Katalytická / kinetická specificita = „Linkage specificity" = catalyzuje specifickou kombinaci vazeb

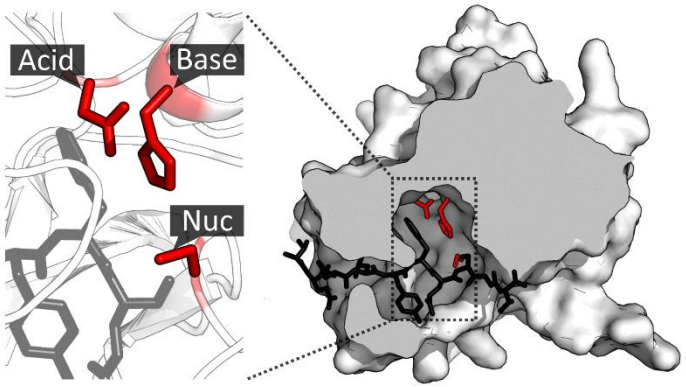
- **Obrovská katalytická síla**

- **Kontrolovaná (regulovaná) činnost v odpověď na potřeby buňky**
  - aktivace
  - inhibice
  - exprese

- **Organizace**
  - multienzymové komplexy
  - enzymové řetězce vázané v membránách

MECHANISMUS ÚČINKU ENZYMŮ

- vazba substrátu do aktivního místa enzymu
- vznik ES komplexu
- vazba kofaktoru
- katalytická událost (reakce)
- uvolnění produktu



AKTIVNÍ MÍSTO

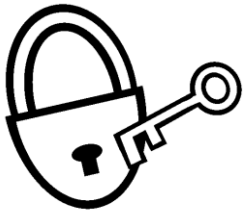
- kapsa nebo kleště (relativně malá část molekuly proteinu) obklopená bočními řetězci aminokyselin (pocházející z jiné části než z lineární sekvence), která:
- pomáhá vazbě substrátu a kofaktoru
- účastní se katalytického procesu
- je důležitá pro konformační změny

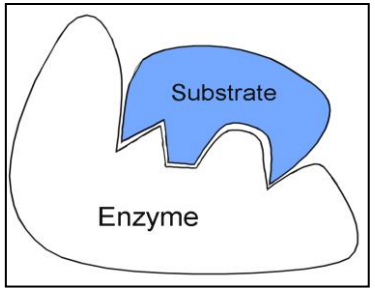
Interakce postranních řetězců aminokyselin v aktivním místě určuje substrátovou a reakční specificitu:

- HYDROFOBNÍ INTERAKCE: Val, Leu, Ile
- ELEKTROSTATICKÉ INTERAKCE: Asp, Glu, Lys, Arg, His
- VODÍKOVÉ MŮSTKY: Ser, Thr, Cys, Tyr

INTERAKCE ENZYM-SUBSTRÁT

LOCK-AND-KEY MODEL





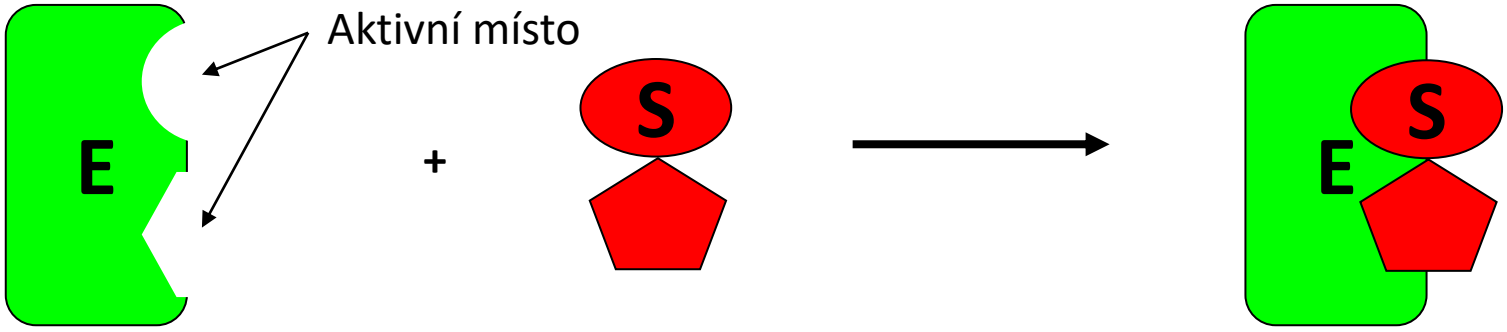
- Fischerův model
- TEMPLATE HYPOTHESIS
- aktivní místo je rigidní
- aktivní místo enzymu je komplementární tvaru substrátu

INDUCED FIT MODEL

- Koshlandův model - teorie indukovaného přizpůsobení
- dominantní model pro enzymatickou katalýzu
- aktivní místo má tvar komplementární substrátu pouze po vazbě substrátu. Enzym a/nebo substrát jsou deformovány vazbou E-S. Substrát je „vtlačen" do konformace přechodného stavu – je podpořena konverze S → P

STABILIZACE PŘECHODNÉHO STAVU

- určuje, která z několika možných reakcí aktuálně proběhne
- reakce je urychlena díky optimální orientaci štěpených vazeb



NOMENKLATURA A KLASIFIKACE ENZYMŮ

TRIVIÁLNÍ – pepsin, thrombin, ptyalin
SYSTEMATICKÉ (popis funkce enzymu)

LAKTÁT DEHYDROGENASA

~ 2500 – 3000 enzymů

substrát **reakce**

1. **OXIDOREDUKTASY** - oxidační (redukční) reakce (*alkohol dehydrogenasa)*
2. **TRANSFERASY** – transfer funkční skupiny z jedné molekuly na jinou (*glukokinasa*)
3. **HYDROLASY** – hydrolytické štepení (*glukosa-6-fosfát fosfatasa*)
4. **LYASY** – odstranění skupin, adici skupin na dvojnou vazbu, štěpení zahrnující rearrangement (*pyruvát dekarboxylasa*)
5. **ISOMERASY** – intramoleculární rearrangement (*triosa-fosfát isomerasa*)
6. **LIGASY** – reakce kde se spojují 2 molekuly (*pyruvát karboxylasa*)

EC 1.1.1.27

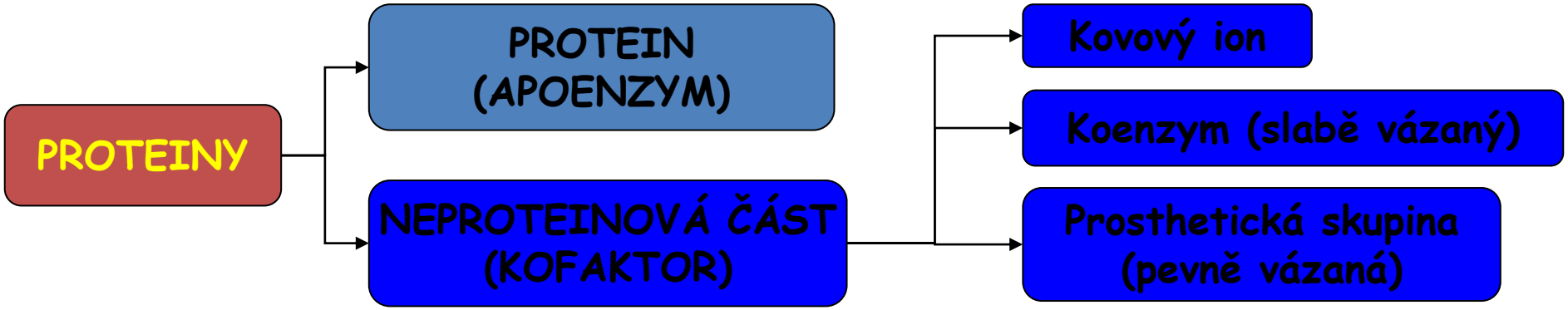
Třída oxidoreduktasa

část molekuly kde probíhá reakce

kofaktor NAD+

pořadí

STRUKTURA A ORGANIZACE ENZYMŮ



RNA

- Ribozymy (ne-proteinové biokatalyzátory)
- některé RNA se mohou chovat jako enzymy

ENZYMY-MONOMERY:

- **jedna doména, která váže substrát i kofaktor**
- ***substrát a kofaktor vázané ve dvou různých doménách***

ENZYMY-OLIGOMERY:

- **katalytické a regulační podjednotky**
- ***identické podjednotky***

MULTIFUNKČNÍ ENZYMY:

- **více katalytických míst v jednom polypeptidovém řetězci (*fatty acid synthase*)**

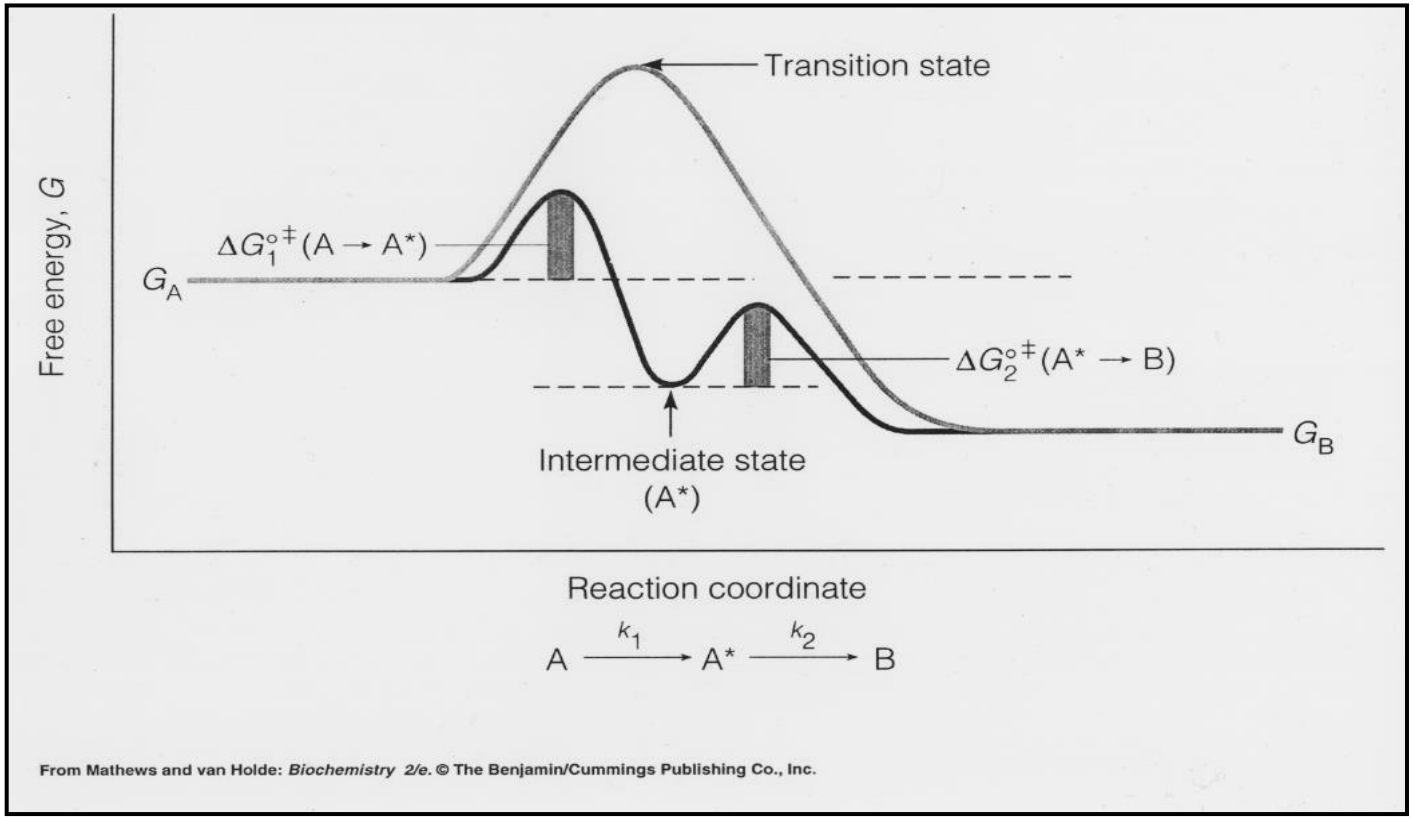
MULTIENZYMOVÉ KOMPLEXY:

- **organizované soustavy několika druhů enzymů (*pyruvate dehydrogenase complex*)**

ISOENZYMY:

- **Katalyzují identické reakce, liší se ve struktuře a vlastnostech – různá afinita k substrátu, různá lokalizace**

ENZYMOVÁ KINETIKA

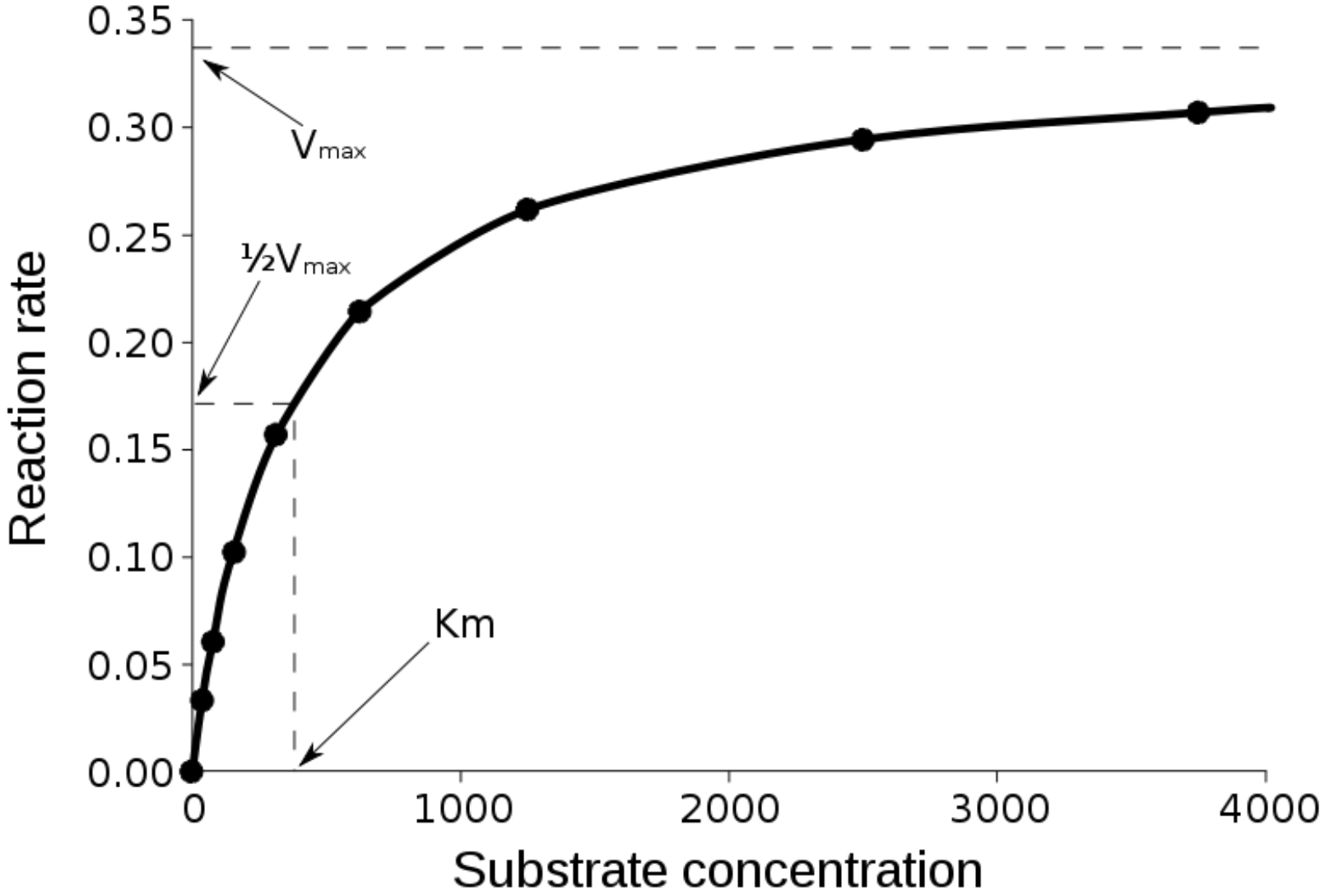


- **snížení aktivační energie reakce**
- **zvýšení rychlosti reakce**
- **nemění se rovnováha**

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Substrate binding **Catalytic step**

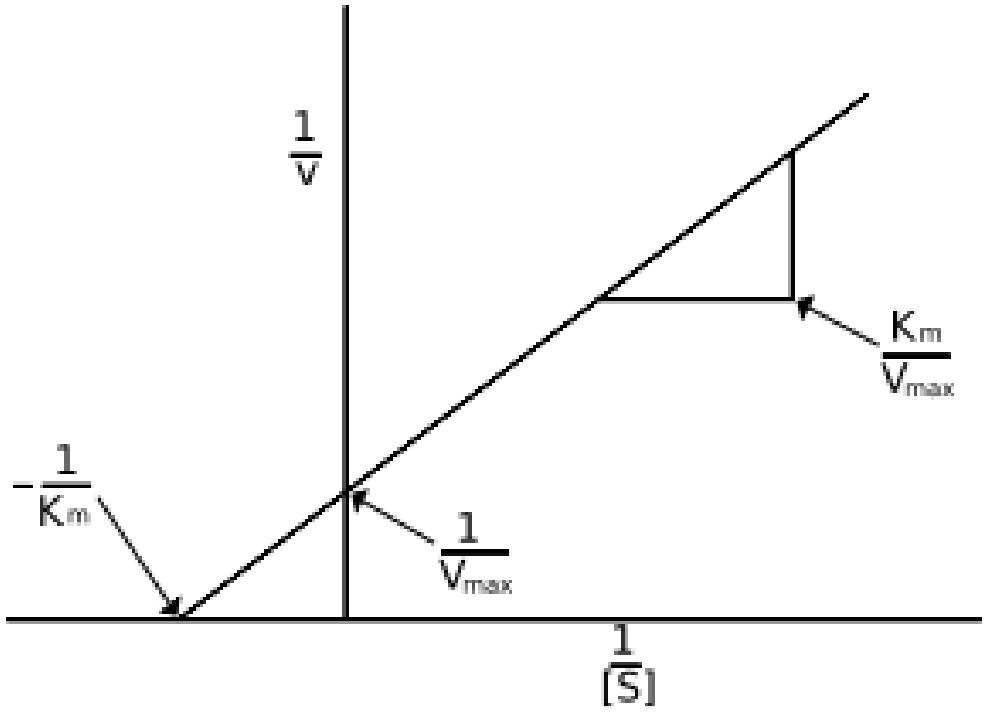
KINETIKA MICHAELISE-MENTEOVÉ



KINETIKA MICHAELISE-MENTEOVÉ

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

Lineweaver-Burk Plot



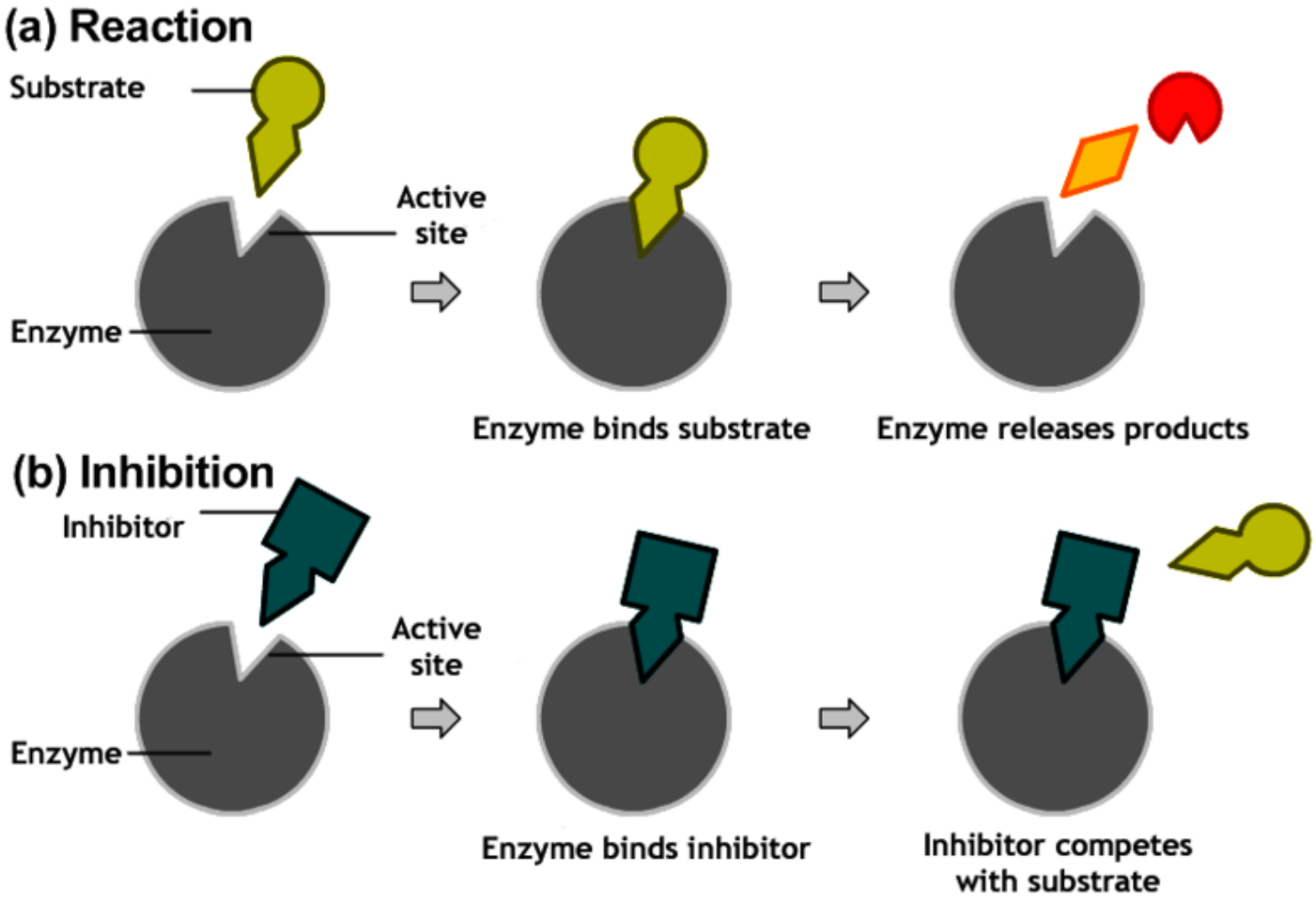
Michaelisova konstanta K_m

- affinita substrátu k enzymu
- mechanismy fyziologických regulací (glykolýza: glukokinasa vs. hexokinasa)
- příčiny farmakokinetických interakcí
- terapie intoxikací methanol, ethylenglykol

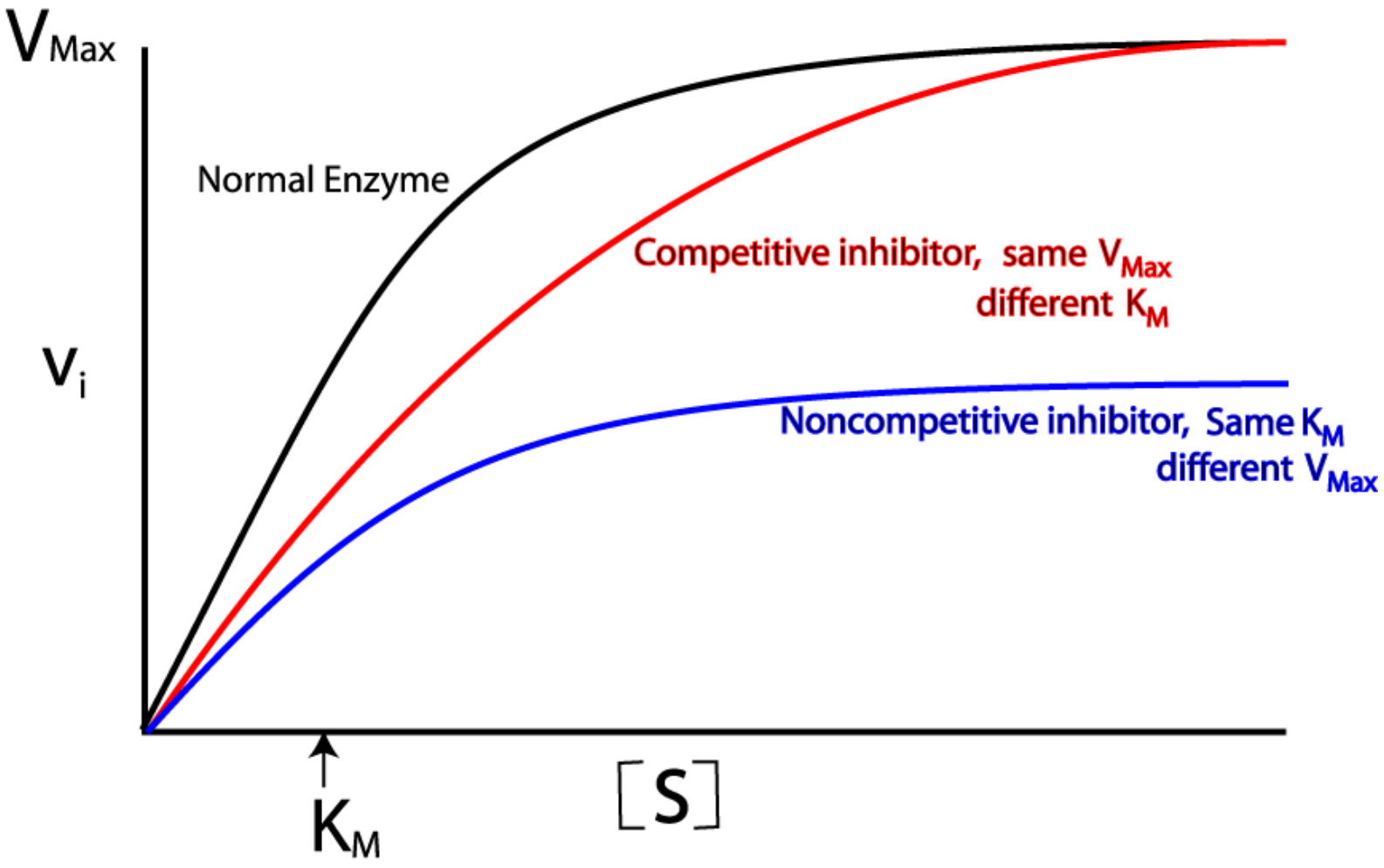
- graficky se lépe určí pomocí tzv. dvojnásobně reciprokého zobrazení

INHIBICE ENZYMOVÉ AKTIVITY

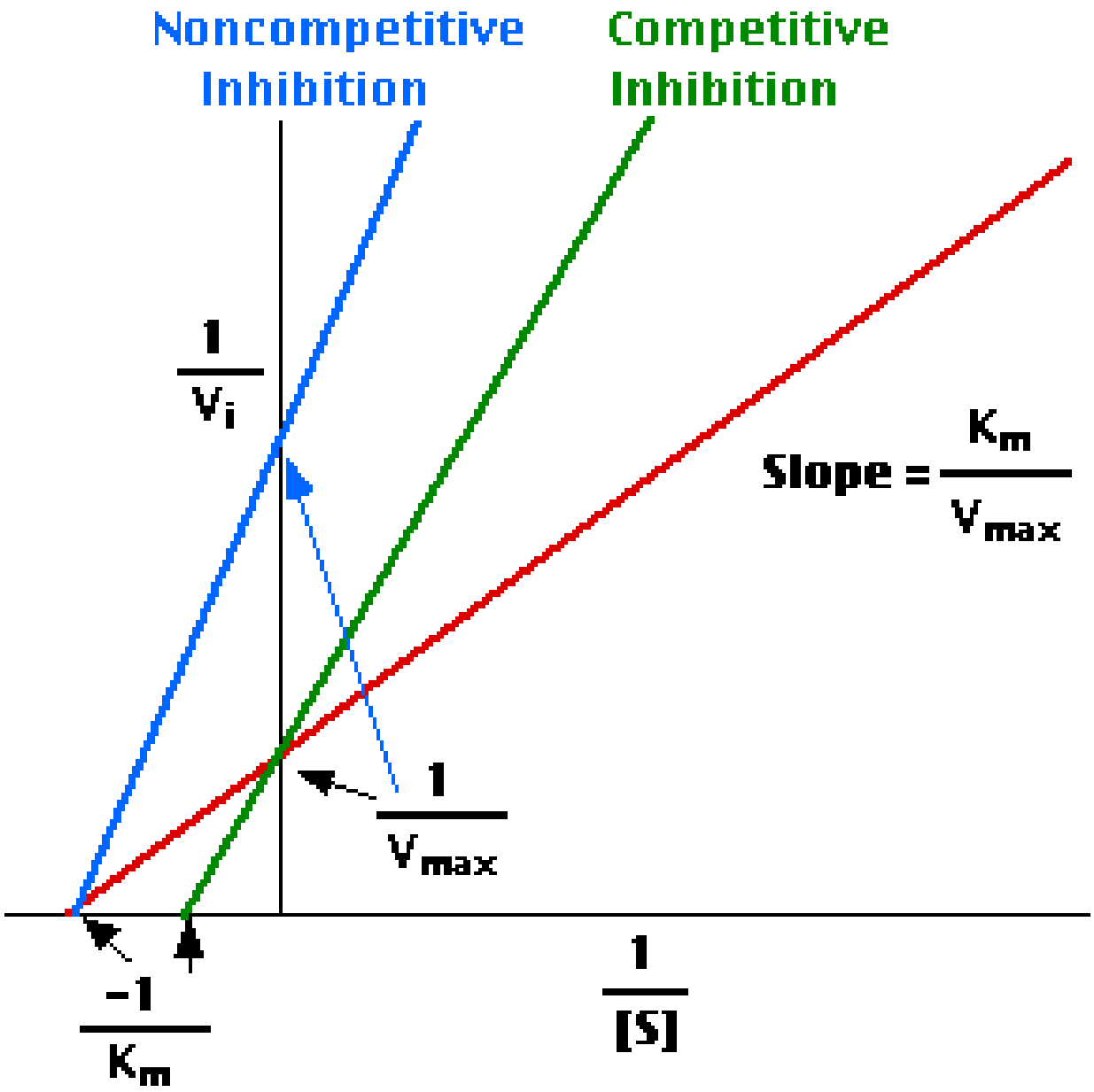
REVERSIBILNÍ (kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní)
IRREVERSIBILNÍ



INHIBICE ENZYMOVÉ AKTIVITY



INHIBICE ENZYMOVÉ AKTIVITY



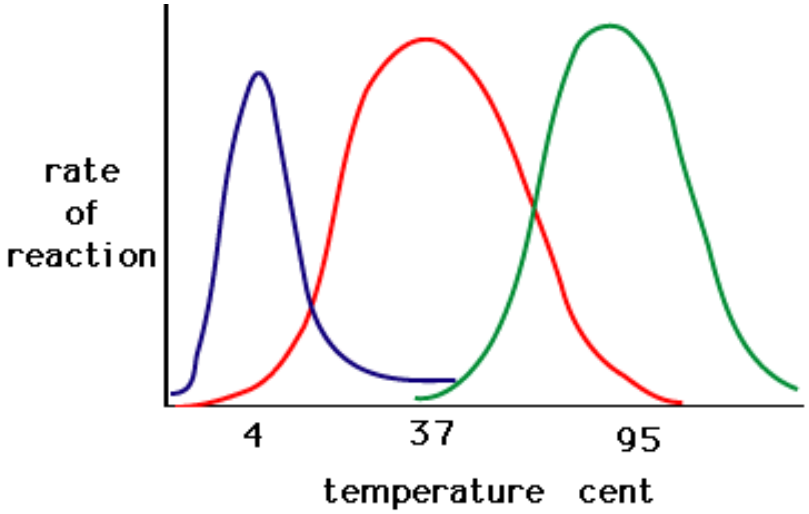
FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLIVY

- denaturační vlivy – těžké kovy, extrémy pH, reaktivní činidla, teplota, UV záření, radiace, oxidace atd.

- vliv pH – většina enzymů fyziologické pH 7,4
- trávící enzymy – kyselé pH; alkalická fosfatasa ALP – alkalické

- vliv teploty – platí zákony termodynamiky; od určité teploty nastává denaturace;
- „*inverse U-shaped curve*"; termostabilní enzymy – např. bakteriální polymerasy atd.

- vliv složení pufru – iontová síla, přítomnost kofaktorů, iontů atd.

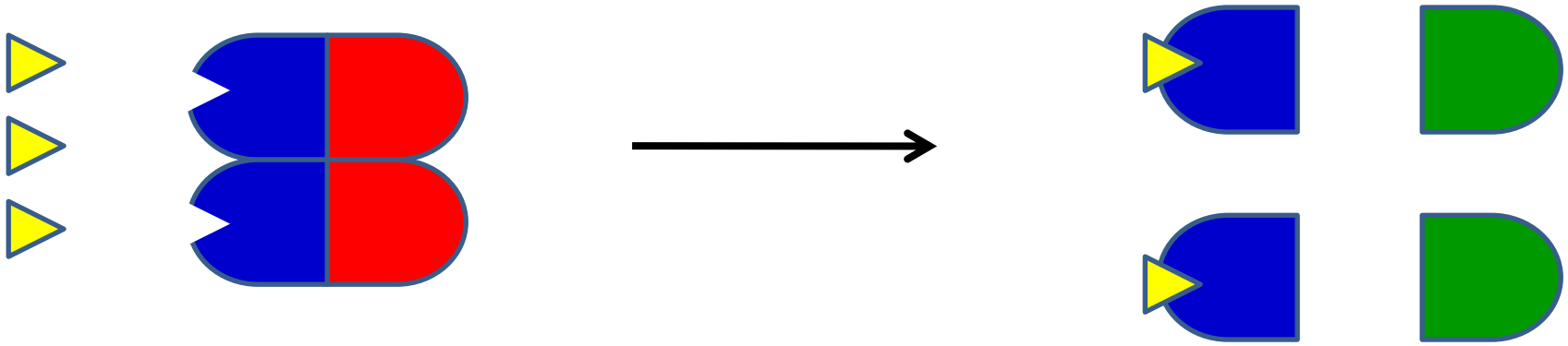


SUBSTRÁTY, AKTIVÁTORY A INHIBITORY

- přítomnost více substrátů – kompetitivní děje

- inhibitory – různé mechanismy, významné u lékových interakcí (ketokonazol, troleandomycin, diethydithiokarbamát, omeprazol)

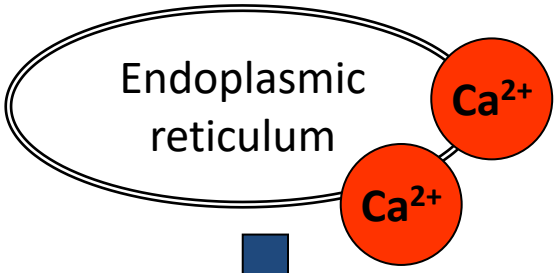
- allosterické efektory (inhibitory x aktivátory) – např. PKA
- většinou malé molekuly intermediárního metabolismu (cAMP, AMP, GDP atd.)
- mohou být i cizorodé látky – léčiva, xenobiotika

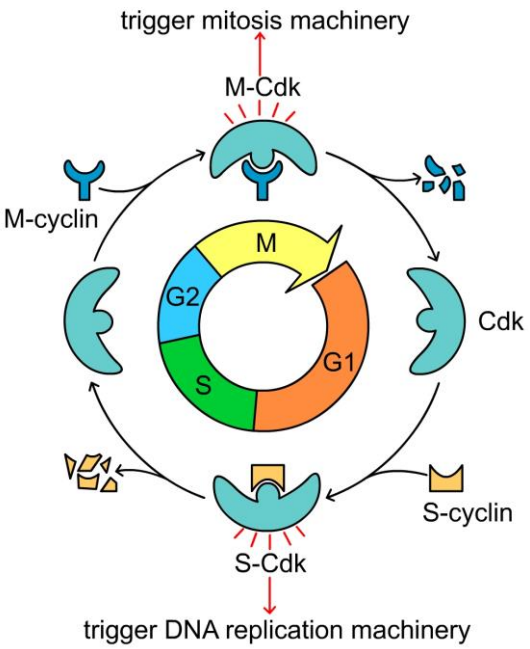


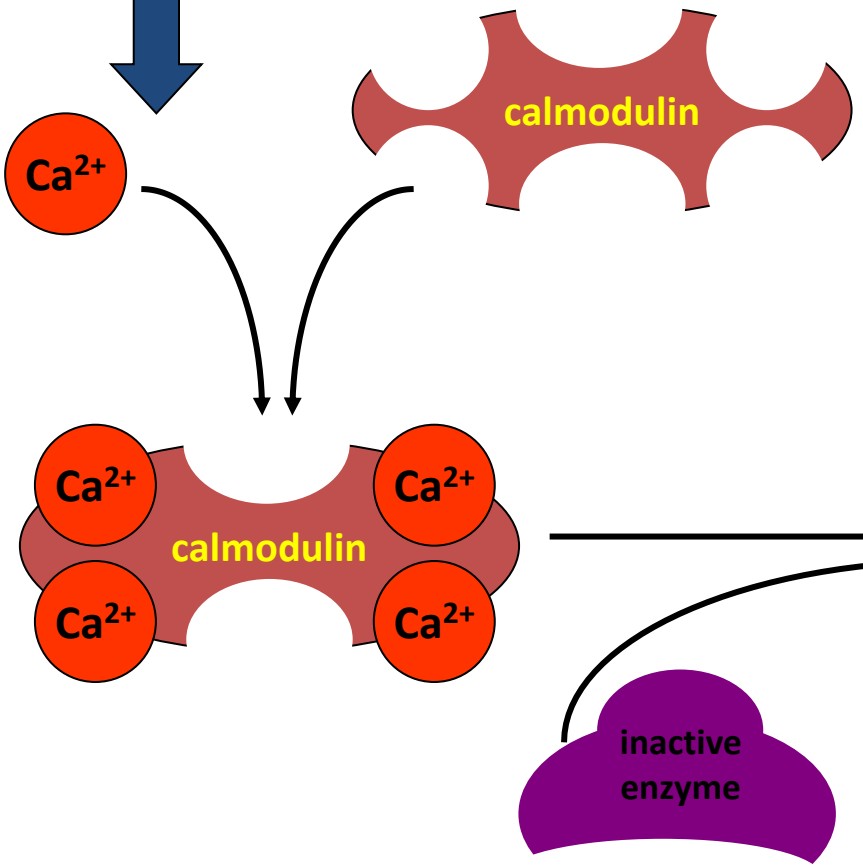
- 2 katalytické a 2 regulační podjednotky
- aktivátor se váže na regulační podjednotku a heterodimer disociuje
- katalytická podjednotka je takto aktivována

AKTIVACE INTERAKCÍ S JINÝM PROTEINEM

- **kalmodulin dependentní k.**
- **cyklin dependetní k.**







KOVALENTNÍ MODIFIKACE ENZYMU

- změna chemického složení proteinu-enzymu; pevná kovalentní vazba
- jedná se o tzv. post-translační děj
- vnesením/odtržením funkční skupiny se mění konformace proteinu-enzymu a jeho vlastnosti – např. katalytická aktivita, stabilita, susceptibilita k degradaci

- **fosforylace (protein kinasy) *vs.* defosforylace (protein fosfatasy)**
- fosforylace reziduí – Ser, Thr, Tyr
- **regulace esenciálních dějů – buněčný cyklus, diferenciace, metabolismus**

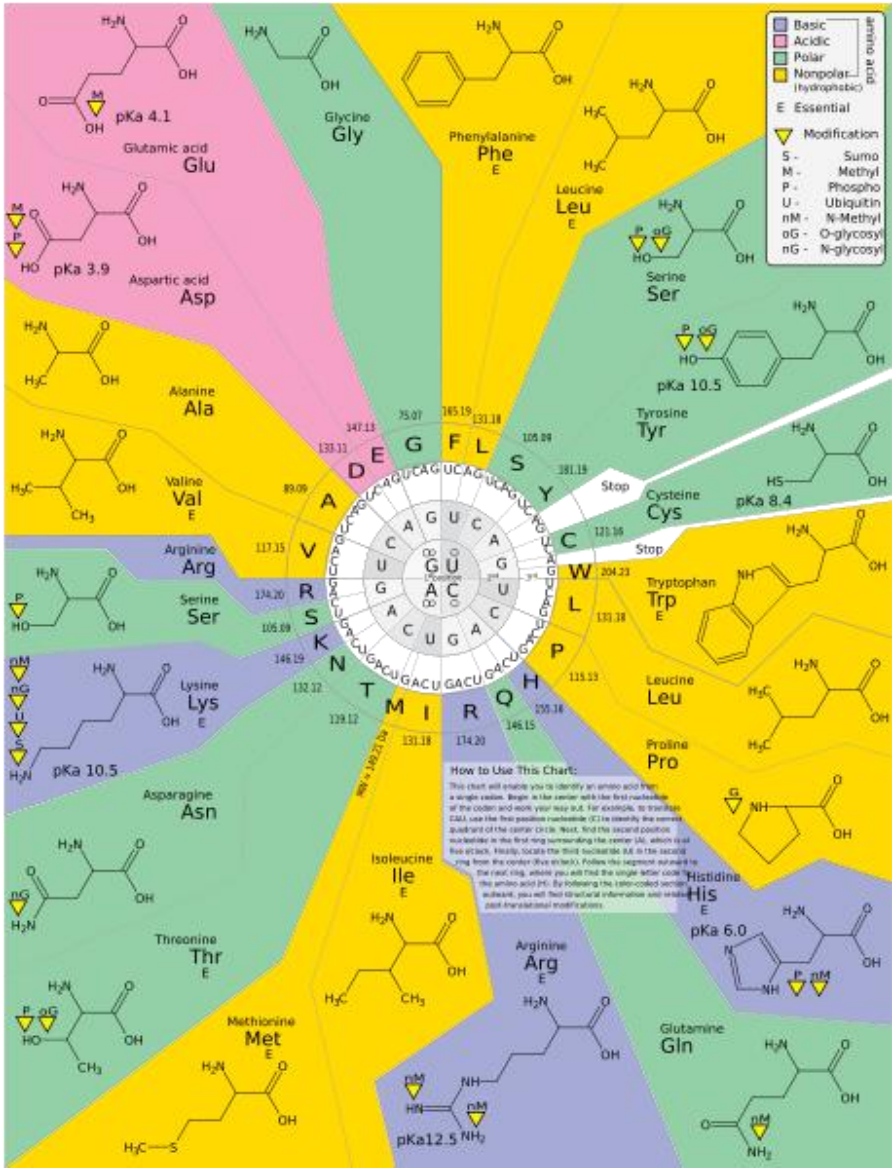
Kinasy
protein kinasy A,C (PKA, PKC)
mitogeny-aktivované protein kinasy MAPKs (JNK, p38, ERK1/2)
cyklin-dependentní kinasy (CDK2, CDK9)
tyrosin kinasy (insulinový receptor)
kalmodulin dependentní kinasy

Fosfatasy
funkční opak protein kinas
serin-threoninové (PP1 (a,b,c), PP2, PP2C, PP3, PP4 atd.)
tyrosinové PTP1B
duální atd.

KOVALENTNÍ MODIFIKACE ENZYMU

- acetylace (N-terminus; Lys)
- ubiquitinace, SUMOylace (Lys)
- glykosylace (*N-; O-*)
- Asp, OH-Lys, Thr, Ser

- palmitoylace
- myristoylace
- pegylace
- prenylace
- glutamylace
- biotinylace
- citrulinace



PROTEOLYTICKÁ AKTIVACE

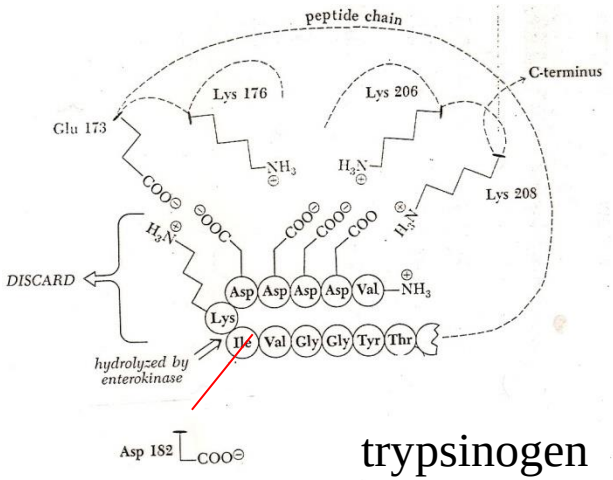
Proteinasy (proteasy)

- **trávící enzymy**
- **hemokoagulační kaskáda**

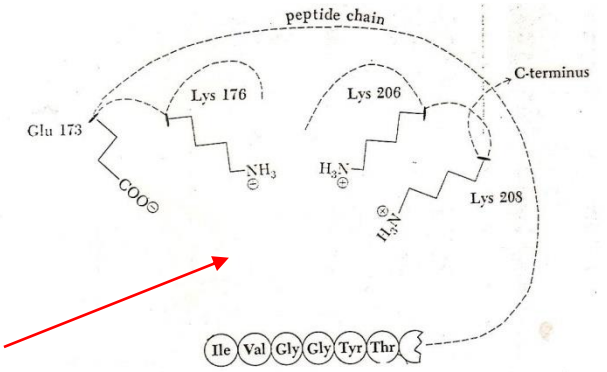
1. Syntéza a sekrece: proenzymy (zymogeny)
2. Aktivace: štěpení několika peptidových vazeb a/nebo odstranění krátkého peptidu → otevření aktivního místa

pepsinogen $\xrightarrow{HCl}$ pepsin + 41 AA

trypsinogen $\xrightarrow{\text{enteropeptidasa}}$ trypsin + 6 AA



trypsinogen



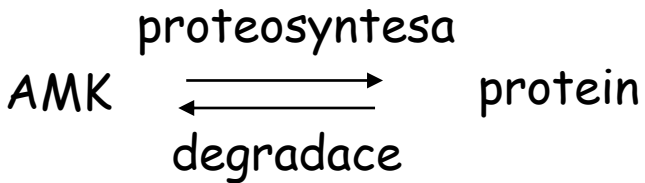
trypsin

substrát (polypeptid)

3. Inhibice: proteinové inhibitory
→ interakce s proteasou v aktivním místě
→ a1-anti trypsin – ochrana buněčných stěn
→ mutanti, kuřáci – pomalá sekrece z jater
poškození
→ emfyzém

REGULACE MNOŽSTVÍ ENZYMU: INDUKCE, DEGRADACE

- rovnováha mezi syntézou a degradací proteinů - turnover proteinu



DEGRADACE ENZYMŮ

Lysosomální proteasy - cathepsiny, collagenasa, dipeptidasy

- většina extracelulárních proteinů, „long-lived" proteins

Proteasomy

- abnormální proteiny, „short-lived" proteins
- ubiquitinace - cytosolický protein ubiquitin – kiss of death
- navázání Ubi-*COOH* na protein (Lys) jej předurčuje k degradaci v proteasomu
- Degradační signály: oxidace (Lys, Trp, His, Cys); PEST-sequence (Pro, Glu, Ser, Thr); NH_3-terminus AMK: Arg, Lys, Asp, Phe

INDUKCE ENZYMŮ

- transkripční mechanismus - syntéza mRNA a proteinu *de novo*
- indukce genové exprese - úloha transkripčních faktorů, cytokinů, receptorů
- fyziologický význam – buňka syntetizuje enzym dle svých aktuálních potřeb
- induktory exprese enzymů jsou často jejich substráty