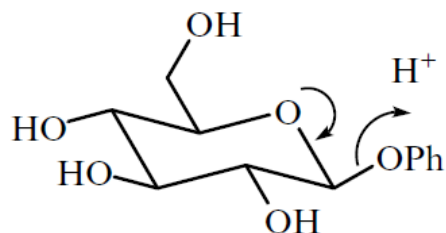


Enzymologie. Jak pracují enzymy – mechanismy.

Bruno Sopko

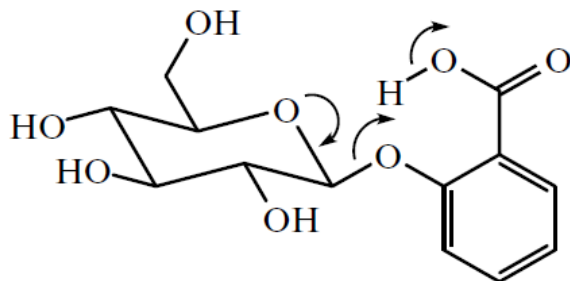
Termodynamický model katalýzy



hydrolýza v kyselém prostředí

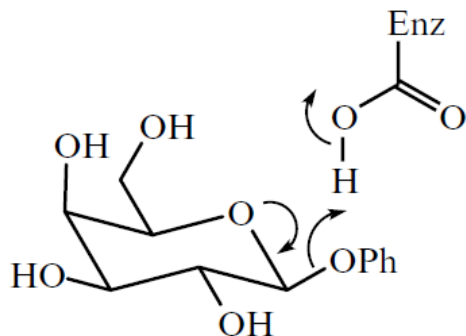
Rychlost hydrolýzy

$$k_{\text{obs}} = 1.9 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1} \text{ in } 0.1 \text{ M HCl}$$



intramolekulární hydrolýza

$$k_{\text{uni}} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$



β -galaktosidáza

$$k_{\text{cat}} = 40 \text{ s}^{-1}$$

Termodynamický model katalýzy

- Rychlost chemické reakce je dána změnou Gibbsovy energie a aktivační energií:

$$k = A \cdot e^{(-E_{\text{act}}/RT)}$$

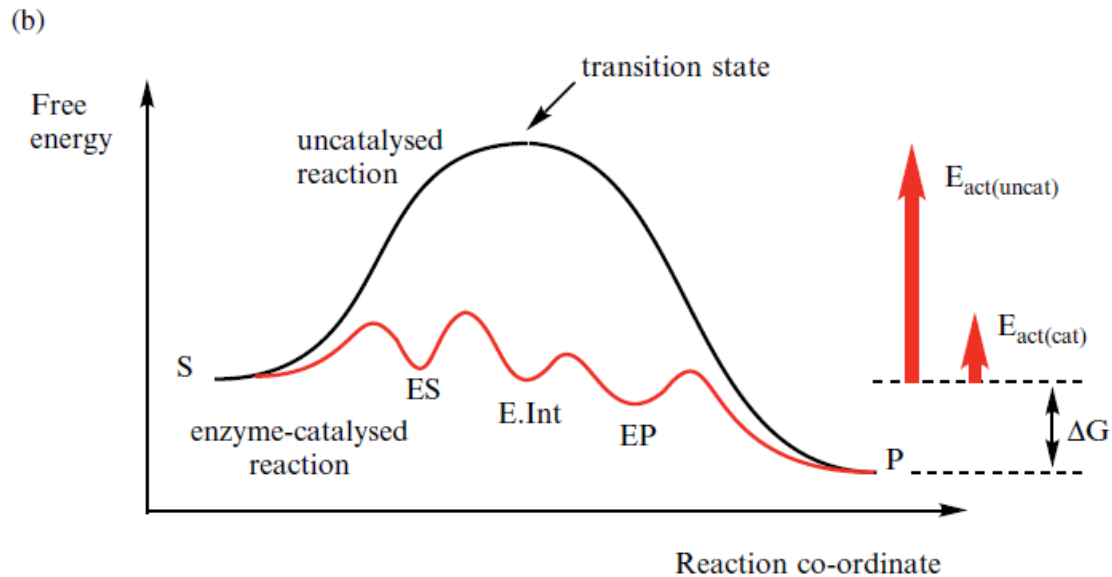
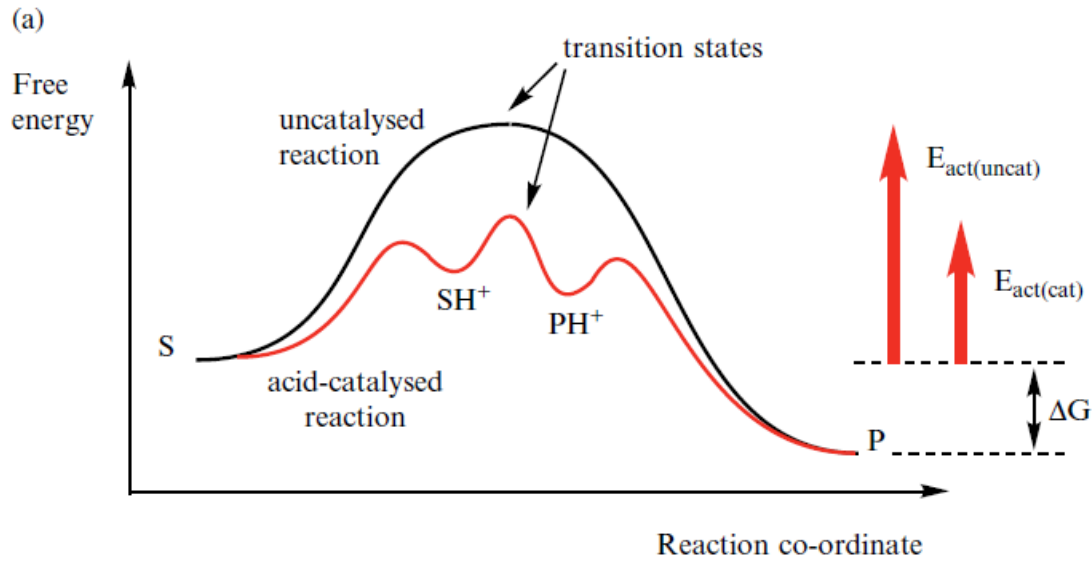
- Tudíž zrychlení reakce pomocí katalýzy může být vyjádřeno:

$$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}} = e^{(E_{\text{uncat}} - E_{\text{cat}}/RT)}$$

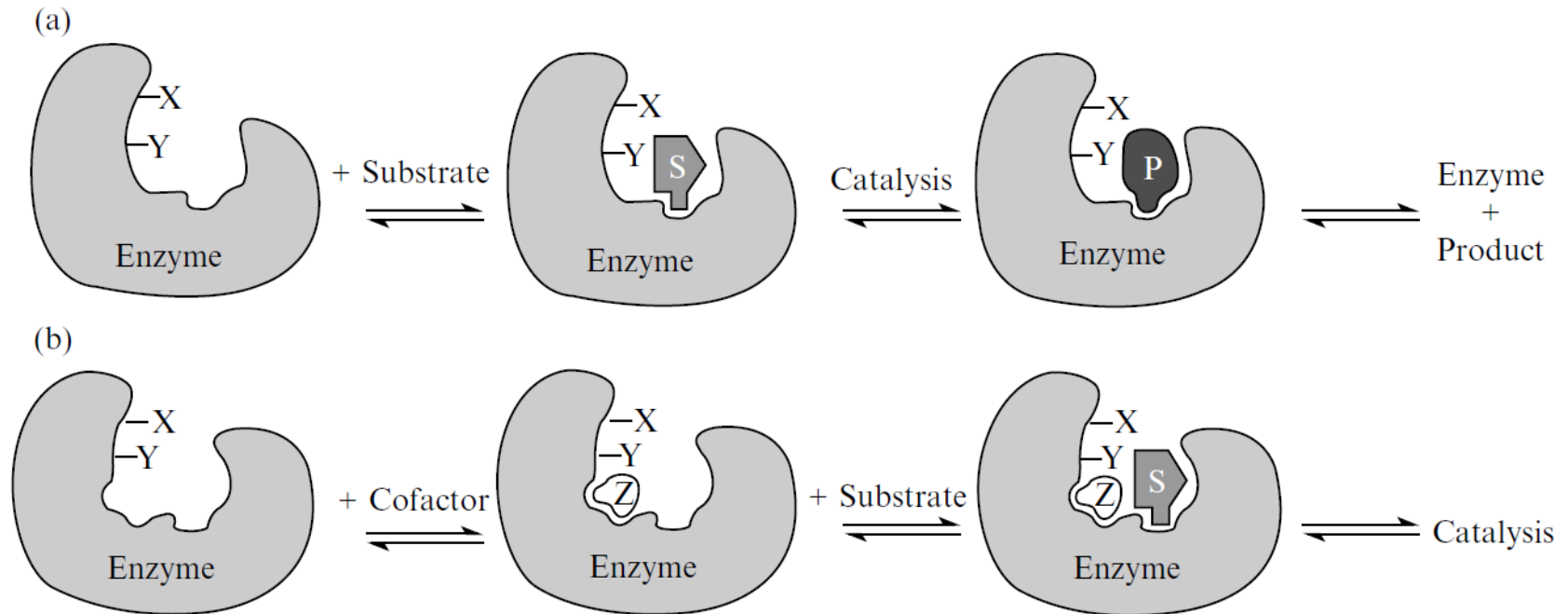
Z předchozí rovnice vyplývá:

Pokud katalýza při 25° C sníží aktivační energii o 10 kJ/mol, rychlost reakce se zvýší 55krát, 40 kJ/mol zrychlí reakci 10⁷ krát

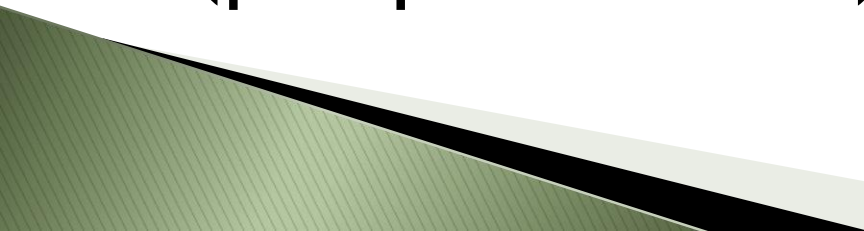
Termodynamický model katalýzy



Průběh enzymem katalyzované reakce



Mechanismy enzymové katalýzy

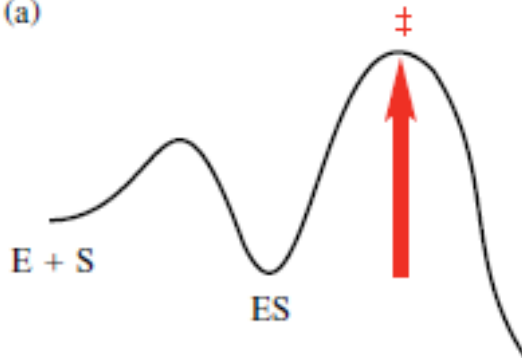
- ▶ efekt vzájemného přiblížení (proximity)
 - ▶ stabilizace přechodných stavů
 - ▶ bazická a kyselá katalýza
 - ▶ elektrostatické působení
 - ▶ nukleofilní nebo elektrofilní katalýza funkčními skupinami enzymu
 - ▶ strukturální flexibilita (přizpůsobivost)
- 

Efekt vzájemného přiblížení (proximity)

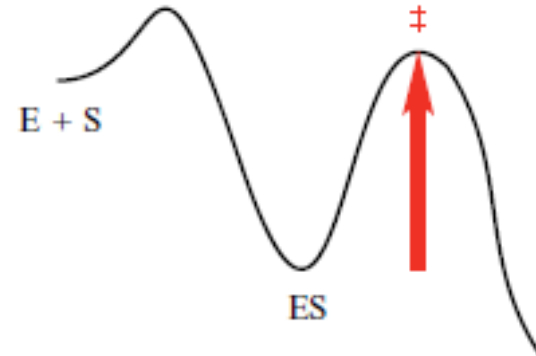
	Ester	k_{rel}	Effective concentration (mol l ⁻¹)	Reference Reaction
(1)		1		
(2)		50	9	$\text{CH}_3\text{COOPh} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{NaOAc}} \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{PhO}^-$
(3)		23,000	4,000	
(4)		150	25	
(5)		1,100,000	2×10^5	
(6)		5×10^{10}	10^{10}	
(7)		1	—	
(8)		1,000,000	490	$\text{CH}_3\text{COOPh} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Et}_3\text{N}} \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{PhO}^-$
(9)		2,500,000	1,300	

Stabilizace přechodných stavů

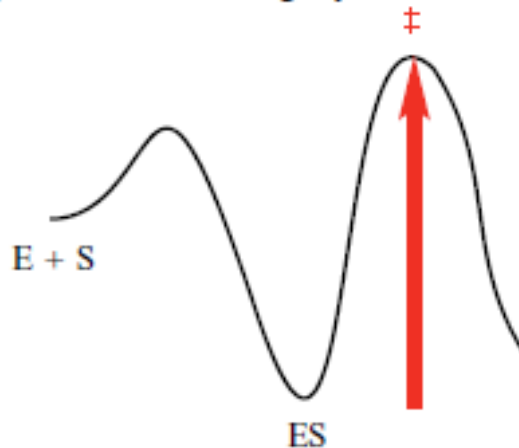
(a)



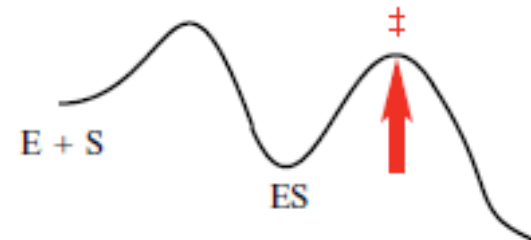
(b) Enzyme binds S and TS more tightly



(c) Enzyme binds S more tightly



(d) Enzyme binds TS more tightly

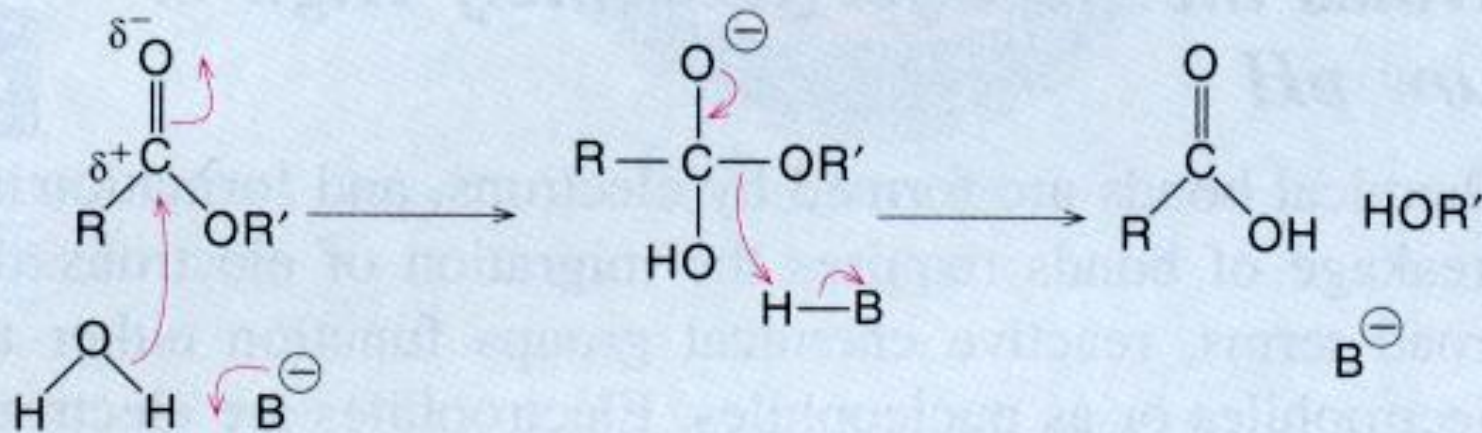


Bazická a kyselá katalýza

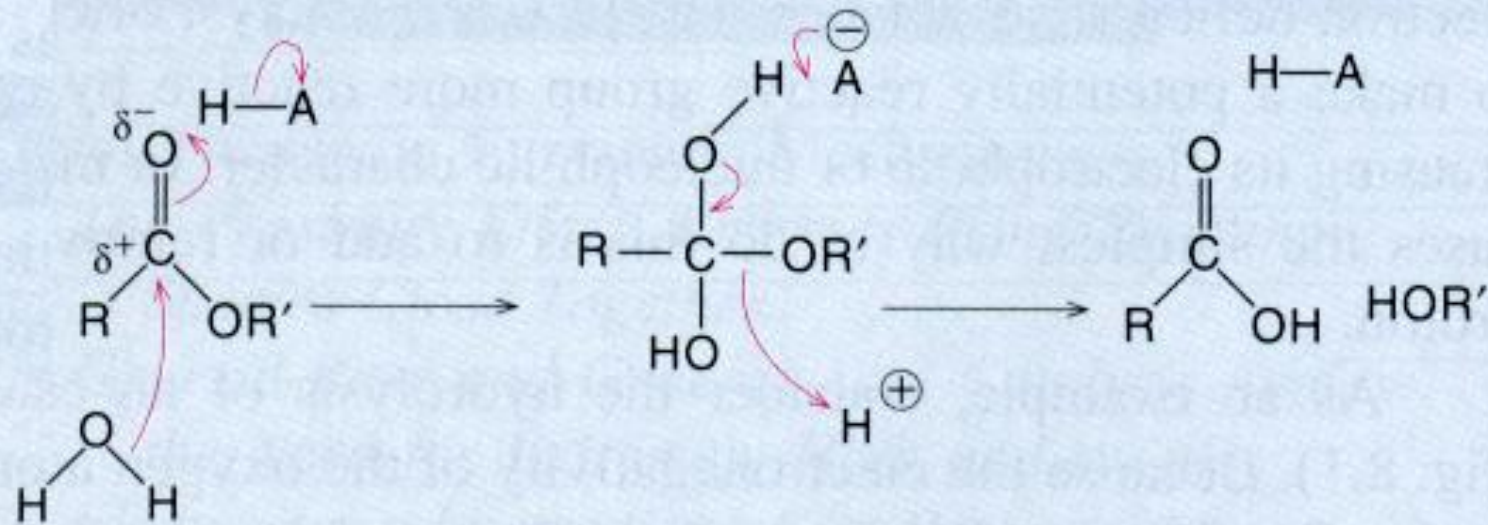
- ▶ tento typ katalysy odstraňuje potřebu použití extrémně vysokého či nízkého pH
- ▶ principem je vytvoření reaktivnějších skupin zvýšením jejich nukleofilicity či elektrofilicity přidáním či odebráním protonu

Bazická a kyselé katalýza

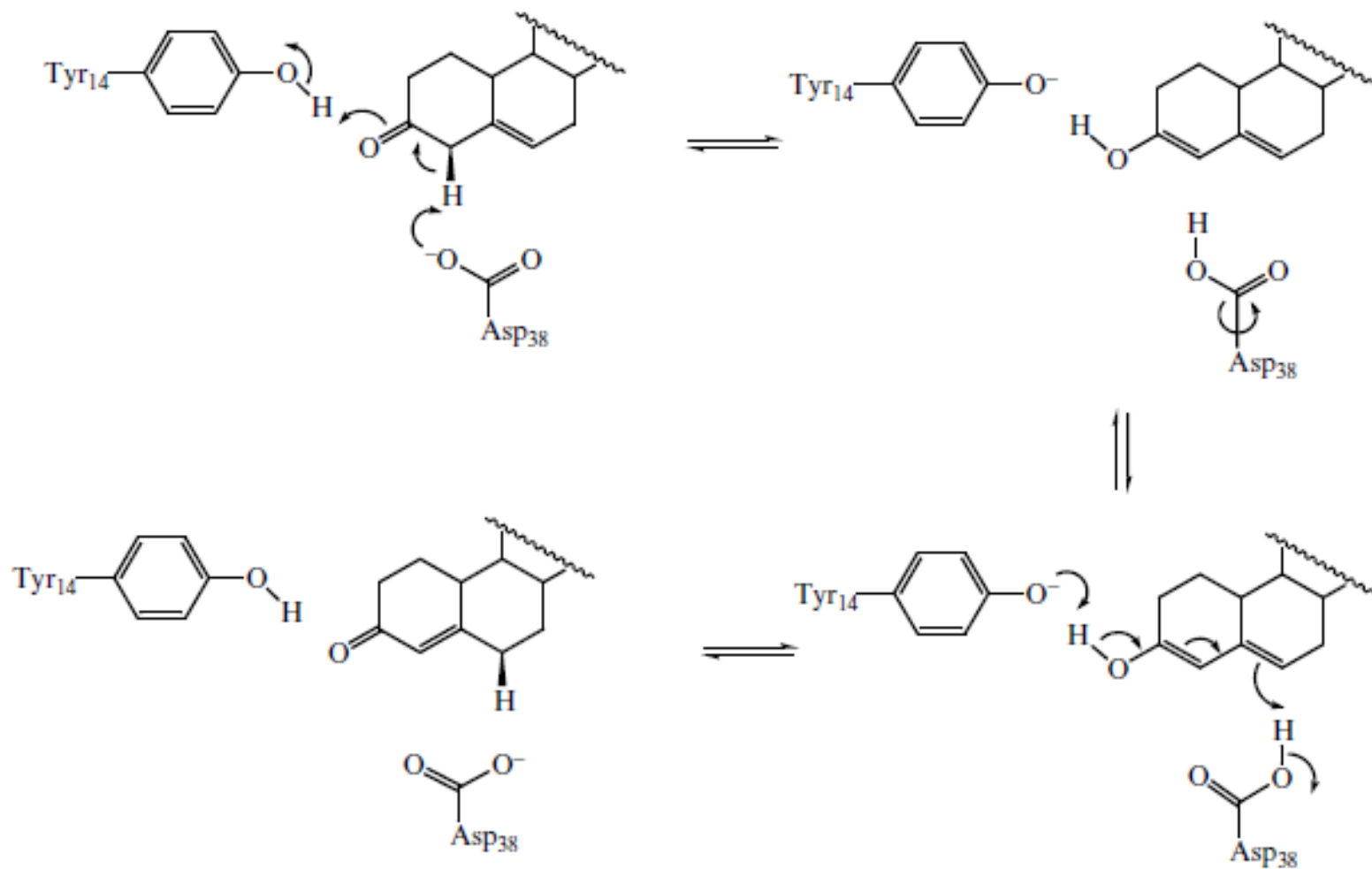
General-base catalysis



General-acid catalysis



Ketosteroid izomeráza – příklad acidobazické katalýzy



Elektrostatické působení

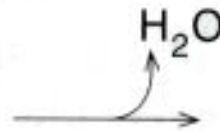
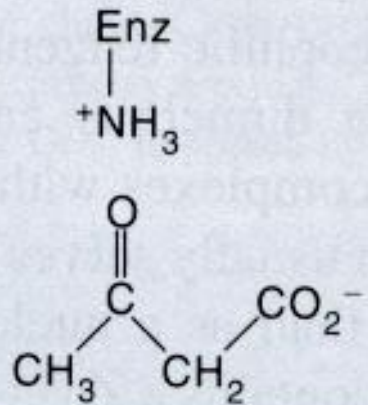
- ▶ stabilizace distribuce elektrického náboje v přechodových stavech během enzymatické reakce
- ▶ změny náboje na atomech substrátu v přechodovém stavu a jejich interakce s náboji atomů enzymu, který substrát obklopuje

Nukleofilní a elektrofilní katalýza

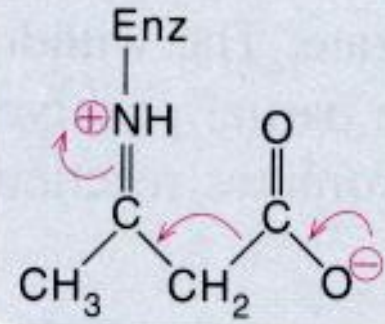
- ▶ enzymatické funkční skupiny mohou působit jako nukleofilní či elektrofilní katalyzátory
- ▶ typické nukleofilní skupiny jsou amino, hydroxyl a thiol aminokyselinových zbytků, ale imidazol (His) či karboxylová skupina (Asp, Glu)
- ▶ elektrofilní katalytická skupina je v enzymu tvořena obvykle komplexem kovového kofaktoru (např. Zn) se substrátem
- ▶ při nukleofilní katalýze se často vytváří ze substrátu meziprodukt, který je kovalentně vázán na nukleofilní katalytickou skupinu

Nukleofilní katalýza – acetoacetát dekarboxyláza

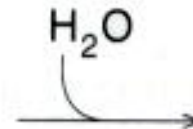
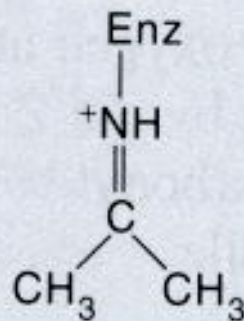
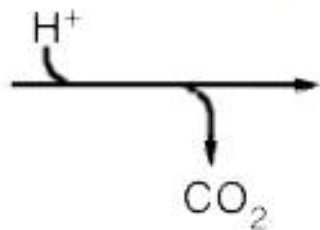
Enz-acetoacetate complex



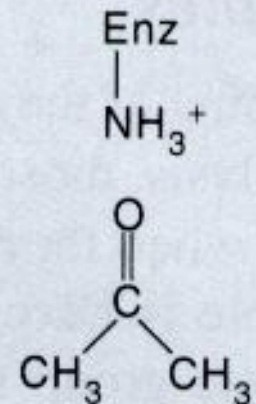
Schiff base intermediates



Schiff base intermediates

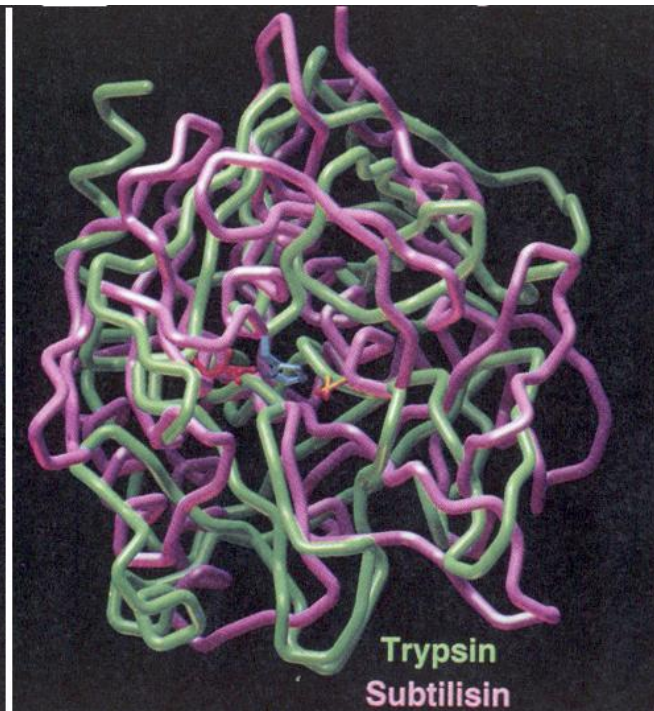
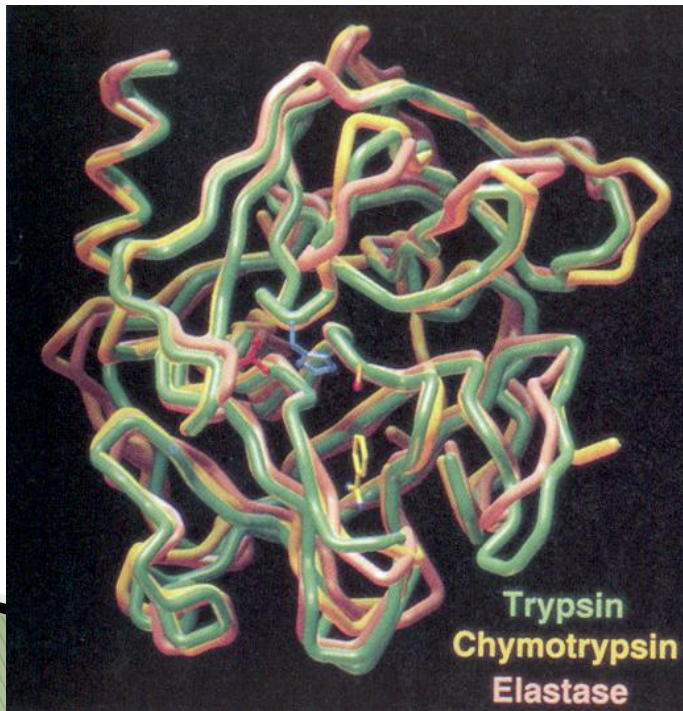


Enz-acetone complex

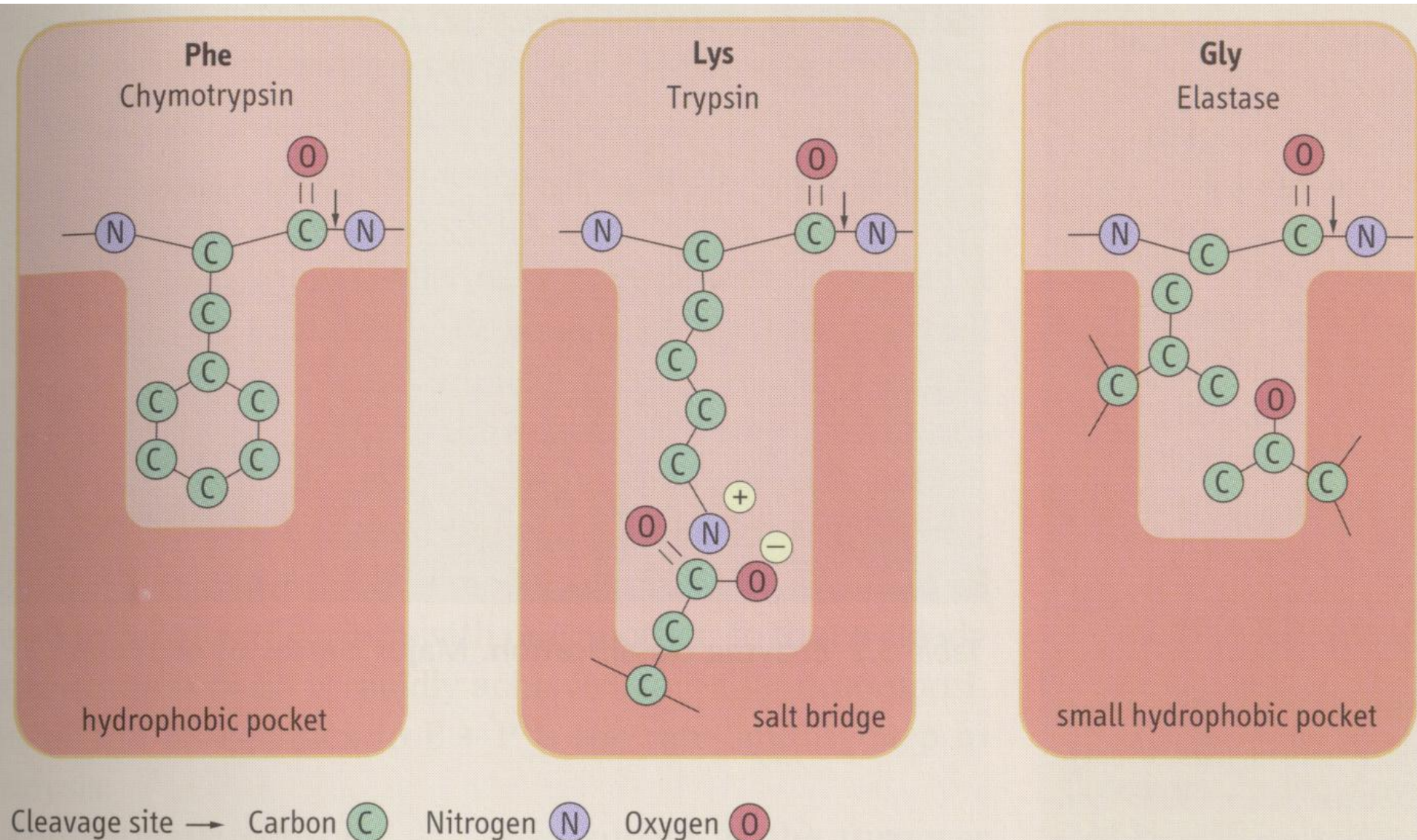


Serinové proteázy – příklady nukleofilní katalýzy

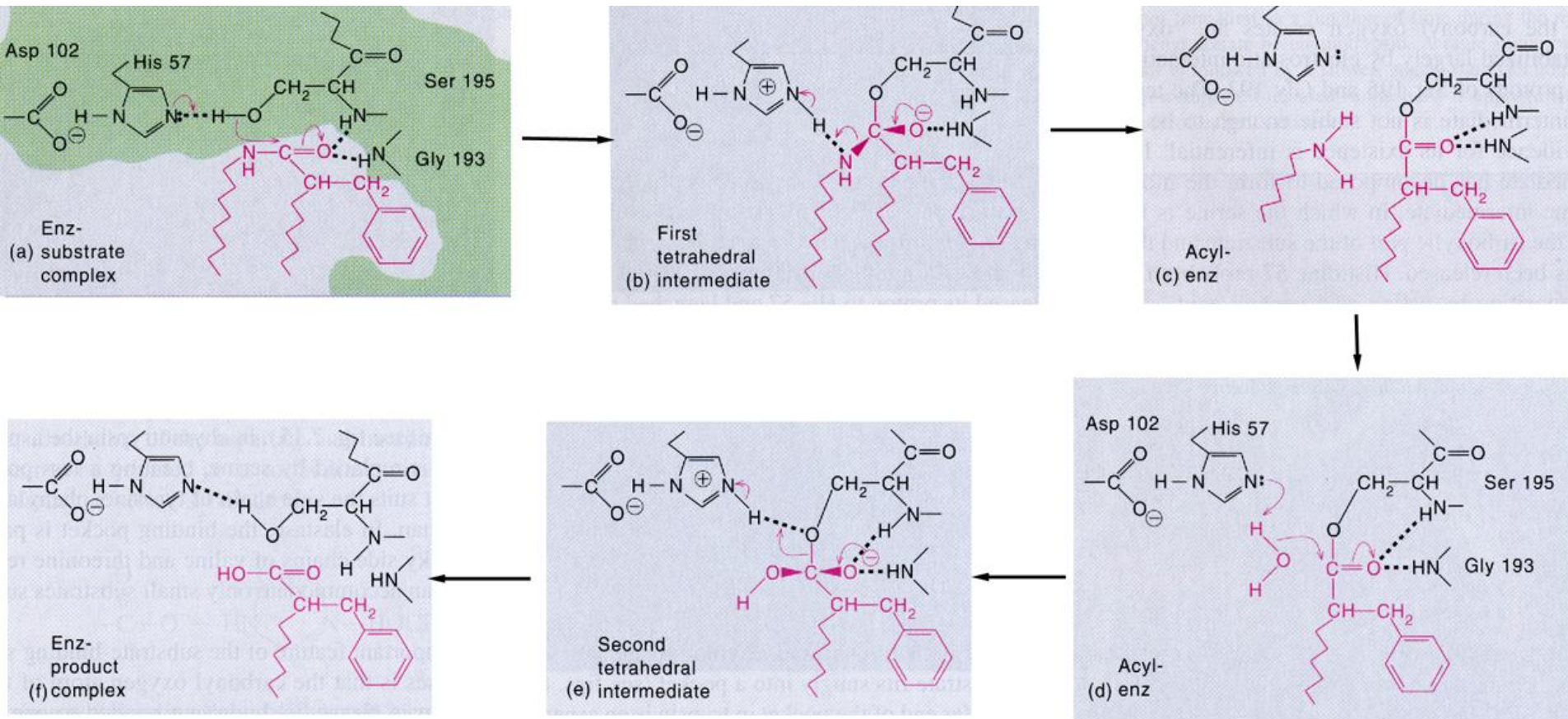
- ▶ serinové proteasy jsou velká rodina proteolytických enzymů, které využívají hydroxylovou skupinu serinu jako nukleofilní katalyzátor
- ▶ nejznámější serinové endoproteázy jsou trypsin, chymotrypsin a elastáza z pankreatické šťávy



Charakteristika vazebného miesta pro substrát v chymotrypsinu, trypsinu a elastáze

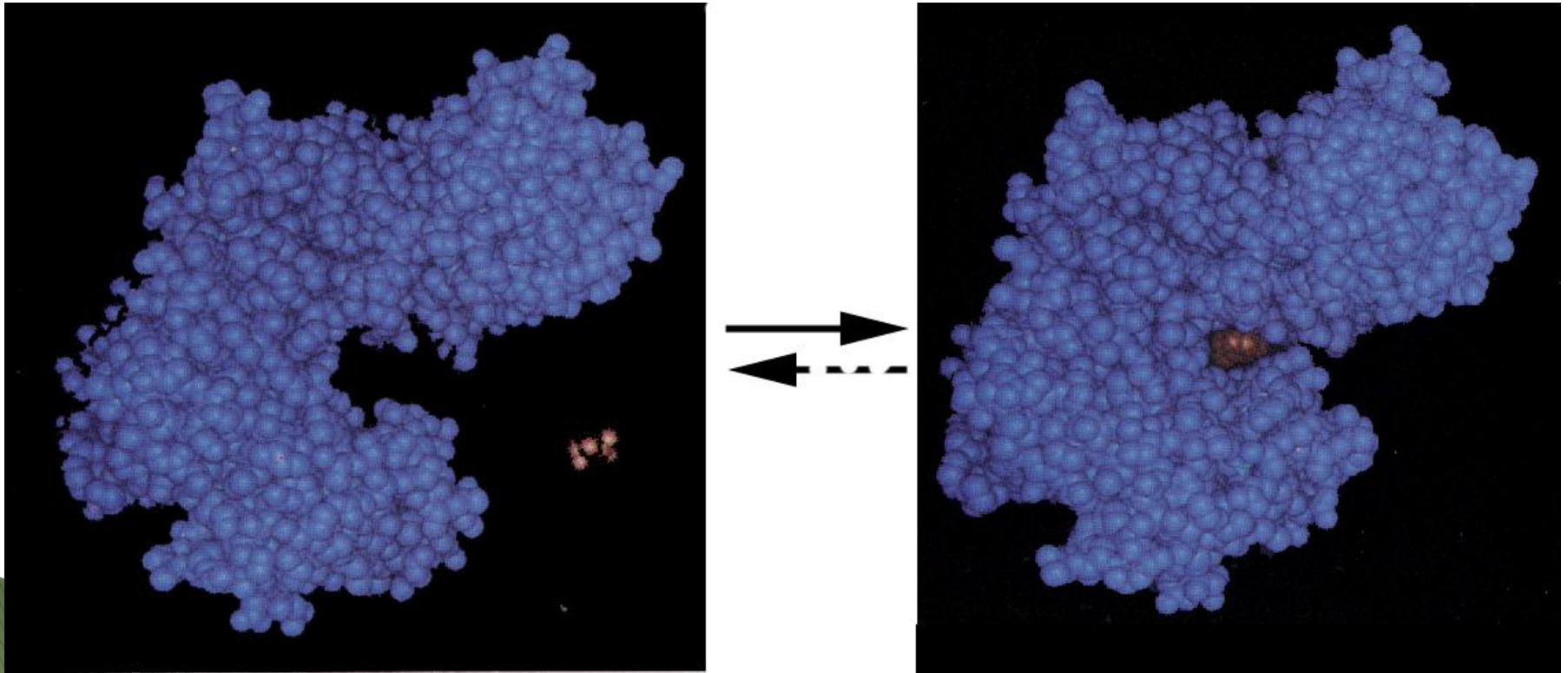


Mechanismus působení chymotrypsinu

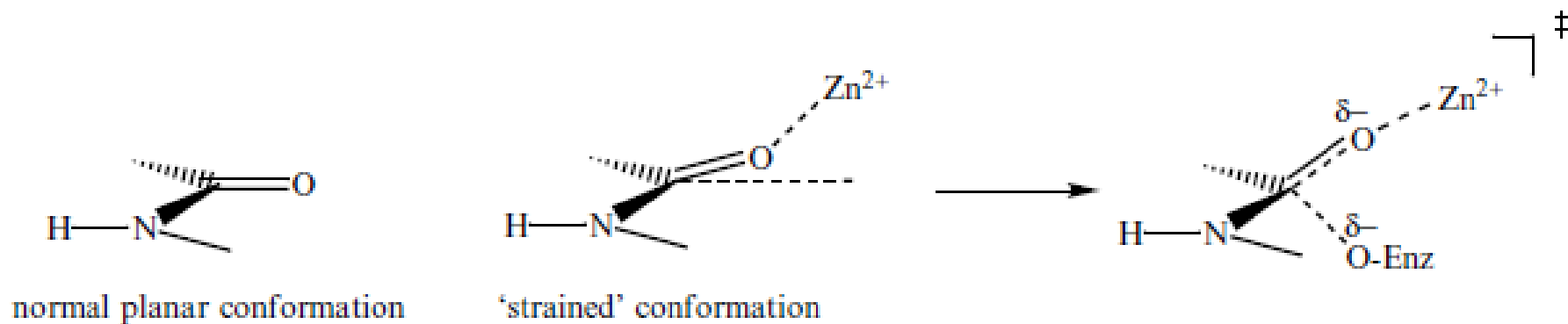
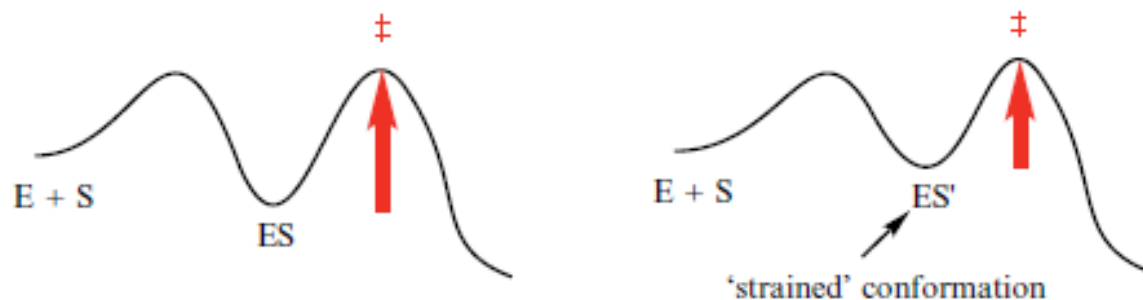


Hexokináza – příklad strukturální flexibility zvyšující specifitu enzymu

Hexokináza katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP na glukózu :



Flexibilita enzymu – užití energie napětí vazby

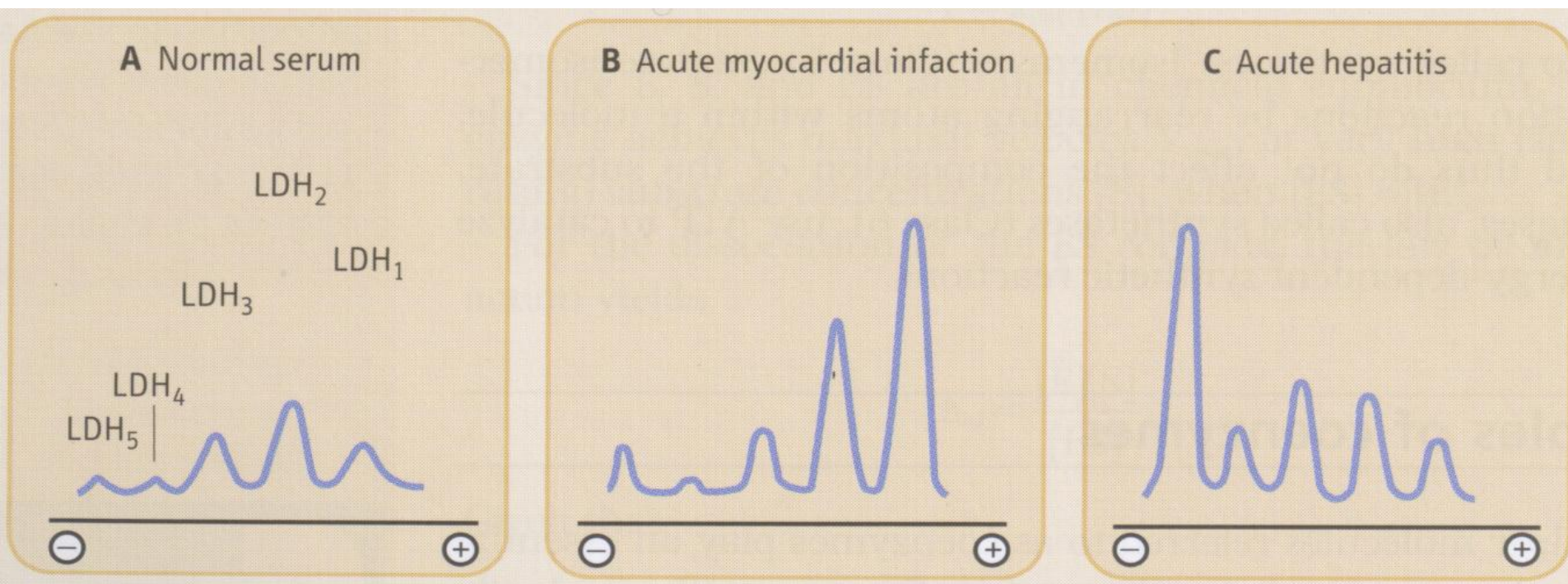


Izoenzymy

- ▶ Izoenzymy jsou enzymy které katalyzují stejnou reakci, ale liší se primární strukturou (sekvencí AK) a/nebo skladbou podjednotek
- ▶ Množství některých tkáňově specifických enzymů v seru má diagnostický význam
- ▶ Typické příklady diagnosticky důležitých sérových izoenzymů jsou CK (infarkt myokardu), GGT (hepatitida) nebo LDH (infarkt myokardu , hepatitida)


LDH izoenzymy

- ▶ LDH katalyzuje přeměnu pyruvátu na laktát (a vice versa) se současnou konverzí NADH a NAD⁺
- ▶ tetramerický enzym z dvou různých podjednotek (H a M)



Klasifikace enzymů

(1972 International Union of Biochemistry)

1. Oxidoreduktázy
 2. Transferázy
 3. Hydrolázy
 4. Lyázy
 5. Izomerázy
 6. Ligázy (syntetázy)
- 

Oxidoreduktázy (EC 1.)

- ▶ katalyzují přenos elektronů z jedné molekuly (reduktant, elektronový donor) na druhou (oxidant, elektronový akceptor)
- ▶ dehydrogenázy katalyzují oxidační reakce při nichž je z reduktantu odstraněn vodík
- ▶ typickými koenzymy jsou nikotinamidové nukleotidy (NADH, NADPH), flavin nukleotidy (FMN, FAD), heminy, koenzym Q (ubichinon) a lipoová kyselina
- ▶ typické enzymy jsou např. alkohol dehydrogenáza, gluksooxidáza, enzymy dýchacího řetězce atd.

Transferázy (EC 2.)

- ▶ katalyzují přenos funkční skupiny (např. methyl, acyl, fosfo, glykosyl atd.) z jedné molekuly (donor) na druhou (akceptor)
- ▶ donorová molekula je často koenzym
- ▶ typické koenzymy transferáz jsou ATP, pyridoxalfosfát (amino skupina), tetrahydrolistová kyselina (formyl), adenysylmethionin (methyl), koenzym A (acetyl) atd.

Hydrolázy (EC 3.)

- ▶ katalyzují hydrolýzu chemické vazby :
$$A-B + H_2O \rightarrow A-OH + B-H$$
- ▶ štěpí např. estery (esterázy, nukleázy, fosfodiesterázy, lipázy, fosfatázy), glykosidické vazby (glykosidázy), peptidické vazby (proteázy a peptidázy)

Lyázy (EC 4.)

- ▶ štěpí vazby C–C, C–O, C–N a jiné další vazby jiným mechanismem než je hydrolýza či oxidace
- ▶ vyžaduje jeden substrát pro reakci v jednom směru, ale dva substráty pro reversibilní reakci (např. adenyl cykláza katalyzuje reakci $\text{ATP} \rightarrow \text{cAMP} + \text{PP}_i$)
- ▶ dekarboxylázy (EC 4.1.1) jsou lyázy štěpící C–C vazbu a uvolňující oxid uhličitý z karboxylové skupiny

Izomerázy (EC 5.)

- ▶ katalyzují reakce, při kterých dochází k strukturální přestavbě substrátu (přesmyky a pod.)
- ▶ např. alanin racemáza katalyzuje přeměnu L-alaninu na jeho enantiomer (optický isomer) D-alanin
- ▶ isomeráza zvaná mutarotáza katalyzuje přeměnu α -D-glukózy na β -D-glukózu
- ▶ UDP-Glc-epimeráza : $\text{UDP-Glc} \rightleftharpoons \text{UDP-Gal}$

Ligázy (syntetázy) (EC 6.)

- ▶ katalyzují syntézu nové vazby, která spojuje dvě molekuly
- ▶ reakce je obvykle doprovázena hydrolýzou ATP nebo jiného podobného trifosfátu
- ▶ biotin je koenzymem pro karboxylázy, které katalyzují karboxylaci (přidání oxidu uhličitého k molekule, tj. syntéze karboxylové skupiny) např. pyruvát karboxyláza

Literatura

- ▶ Baynes, J.W.,Dominiczak, M.H.: Medical Biochemistry, Elsevier 2004
- ▶ Bugg, T.:Introduction to Enzyme and
- ▶ Coenzyme Chemistry, Blackwell Publishing, 2004