


NBCM010

# Bioorganická chemie

## Enzymy

Kateřina Hofbauerová

s použitím materiálů z:  
D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, 2008 W. H. Freeman & Co.  
Juang RH (2004) BCbasics



## Enzymy a enzymová kinetika

- enzymy (terminologie)
- klasifikace enzymů
- enzymatická katalýza
- kinetika Michaelise a Mentenové
- inhibice enzymů
- spázané reakce
- mechanismy regulace enzymatické aktivity
- struktura a funkce koenzymů
- vitamíny

## Proč jsou enzymy nezbytné pro existenci života ?

- Je možné snadno demonstrovat na příkladu sacharózy...
  - Její oxidace na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  je vysoce exergonická, ale...
  - ...neprobíhá příliš rychle, zatímco v organismu se energie uvolní během několika málo sekund a cukr zůstane v políci bez změny i několik let, aniž by byla pozorována jakákoliv viditelná konverze na oxid uhličitý a vodu.

## Enzymy v biochemických procesech

- Extrémní účinnost katalýzy
- Vysoce specifický účinek – málokdy vedlejší produkty
- Silně urychlují chemické reakce o 6-12 řádů
- Fungují ve vodném prostředí za relativně mírných reakčních podmínek (téměř neutrální pH, při atmosférickém tlaku a teplotách pod  $100^\circ\text{C}$ )

## Trocha historie...



- Konec 18. století – první popis biokatalýzy (trávení jídla žaludečními šťávami)
- 1810 - J.L. Gay-Lussac zjistil, že kvasinky rozkládají cukr na ethanol a  $\text{CO}_2$
- 19. století – výzkum špenátu škrobu slinami a rostlinnými extrakty
- Kolem roku 1850 – L. Pasteur – fermenty (*vis vitalis*)
- pojmenování ENZYMY – Frederick W. Kühne – řecky *en*=v *zyme*=kvasinka, nicov kvasinkách katalyzuje reakci kvašení
- 1894 - E. Fischer – zjistil, že glykolytické enzymy rozlišují stereoizomery cukru – hypotéza zámku a klíče
- 1897 – Eduard Buchner – získal bezbuněčný extrakt z kvasinek, který syntetizoval ethanol z glukózy
- 1926 – James Sumner krystalizace prvního enzymu – ureasy (katalyzuje hydrolýzu močoviny na  $\text{NH}_3$  a  $\text{CO}_2$ ), prokázal, že jde o protein
- 30. léta – J.B.S. Haldane – důležitost slabých nevázebných interakcí
- 1963 – zveřejnění první aminokyselinové sekvence enzymu – hovří pankreatické ribonukleasy A
- 1965 – určení struktury lysozymu z vaječného bílku pomocí rentgenové analýzy
- 1980 – Thomas R. Cech – katalytické vlastnosti RNA (RNA-enzym = ribozym)
- ½ Nobelovy ceny za chemii v roce 1989

## Enzymy – základní pojmy

- ✓ **enzymy** – biokatalyzátory
- ✓ **kofaktor** – anorganické ionty
- ✓ **koenzym** – komplexní organická i metaloorganické látky

**holoenzym = kofaktor + apoenzym (apoprotein)**

- ✓ **prostetická skupina** – pevně vázané molekuly na protein například hem v hemoglobinu
- ✓ **vitamíny** – často prekurzory koenzymů; org. látky potřebné v malém množství – přijímány potravou

## Kofaktory

**TABLE 6-1** Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

$\text{Cu}^{2+}$	Cytochrome oxidase
$\text{Fe}^{2+}$ or $\text{Fe}^{3+}$	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
$\text{K}^+$	Pyruvate kinase
$\text{Mg}^{2+}$	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
$\text{Mn}^{2+}$	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
$\text{Ni}^{2+}$	Urease
Se	Glutathione peroxidase
$\text{Zn}^{2+}$	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

## Koenzymy

**TABLE 6-2** Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biotin	$\text{CO}_2$	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme $\text{B}_{12}$ )	H atoms and alkyl groups	Vitamin $\text{B}_{12}$
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin $\text{B}_2$ )
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion ( $\text{H}^-$ )	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin $\text{B}_6$ )
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin $\text{B}_1$ )

Note: The structures and modes of action of these coenzymes are described in Part II.

## Enzymy - klasifikace

- ✓ triviální názvosloví (pepsin, trypsin, aj.)
  - ✓ doporučené názvosloví (laktát dehydrogenasa)
  - ✓ EC = Enzyme Commission
  - ✓ systematické názvosloví – klasifikace EC (IUBMB nomenklatura)
    - (L-laktát: NAD<sup>+</sup>-oxidoreduktasa – EC 1.1.1.27)
  - ✓ EC – třída . chemická skupina . podtřída . substrát
  - ✓ EC – sedm základních tříd – novinka od srpna 2018
- <https://www.enzyme-database.org/>

## Třídý enzym

1. **Oxidoreduktasy** – katalyzují oxido-redukční reakce
2. **Transferasy** – katalyzují přenos funkčních skupin např. glykosyl, methyl, fosfátová skupina
3. **Hydrolasy** – katalyzují hydrolytické štěpení kovalentních vazeb substrátu mezi atomy C-C, C-O, C-N a další vazby
4. **Lyasy** – katalyzují nehydrolytické štěpení kovalentních vazeb C-C, C-O, C-N a dalších vazeb za současně eliminace atomu vodíku a vzniku dvojné vazby
5. **Isomerasy** – katalyzují geometrické nebo strukturní změny uvnitř jedné molekuly - intramolekulární reakce
6. **Ligasy (syntetázy)** – katalyzují silně endergonní slučování dvou molekul za současně spotřeby energie – formou hydrolýzy fosfátové vazby v molekule ATP
7. **Translokasy** – katalyzují přenos z místa 1 do místa 2

## Třídý enzym - příklady

Enzyme Class	Example	Reaction Catalyzed
Oxidoreductase	Alcohol dehydrogenase	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{—CH=O} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Transferase	Hexokinase	$\text{Glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$
Hydrolase	Chymotrypsin	$\text{Polypeptide} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Peptides}$
Lyase	Pyruvate decarboxylase	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{—O—C—C—CH}_3 \\ \text{Pyruvate} \end{array} + \text{H}^+ \rightarrow \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H—C—CH}_3 \\ \text{Acetaldehyde} \end{array} + \text{CO}_2$
Isomerase	Alanine racemase	$\text{D-Alanine} \rightleftharpoons \text{L-Alanine}$
Ligase	Pyruvate carboxylase	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{CH}_3\text{—C—C—O}^- \\ \text{Pyruvate} \end{array} + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{\text{ATP}} \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{—O—C—CH}_2\text{—C—C—O}^- \\ \text{Oxaloacetate} \end{array} + \text{ADP} + \text{P}_i$

## Třídý enzym – příklady translokázy

EC 7.1 contains enzymes catalysing the translocation of hydrons (hydron being the general name for H<sup>+</sup> in its natural abundance),  
 EC 7.2 contains those catalysing the translocation of inorganic cations and their chelates,  
 EC 7.3 contains those catalysing the translocation of inorganic anions,  
 EC 7.4 contains those catalysing the translocation of amino acids and peptides,  
 EC 7.5 contains those catalysing the translocation of carbohydrates and their derivatives  
 EC 7.6 contains those catalysing the translocation of other compounds.

Exchange transporters that are not dependent on enzyme-catalysed reactions, such as the exchange of ions across membranes, are not included and pores that change conformation between open and closed states in response to phosphorylation or some other catalysed reaction are classified under EC 5.6 (Macromolecular conformational isomerases).

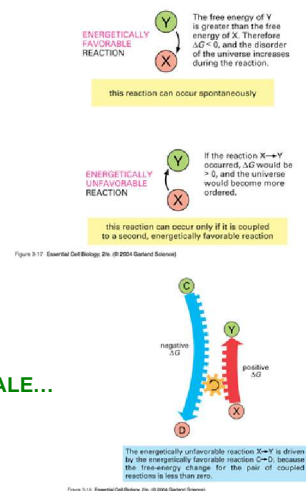
EC 7.4.2.8 protein-secreting ATPase

Reaction:  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{cellular protein[side 1]} = \text{ADP} + \text{phosphate} + \text{cellular protein[side 2]}$

Systematic name: ATP phosphohydrolase (protein-secreting)

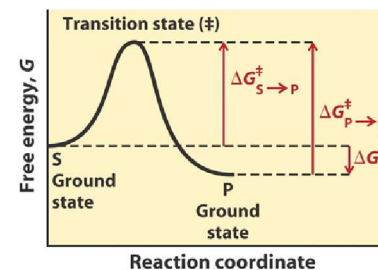
## Enzymy - funkce

- ✓ biokatalyzátory
- ✓ zvyšují reakční rychlost
- ✓ neovlivňují reakční rovnováhu
- ✓ energetické spájení reakcí
- ✓ aktivní místo
- ✓ slabé vazby – velikost enzym
- ✓ komplementarita – zámek-klí, ALE...



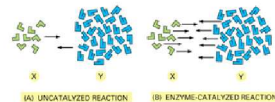
## Enzymy - funkce

- ✓ S → P
- ✓ změna Gibbsovy volné energie –  $\Delta G$
- ✓ aktivní energie –  $G^\ddagger$
- ✓ zvyšují reakční rychlost
- ✓ neovlivňují reakční rovnováhu



- ✓ rovnovážná konstanta
- $$G^\circ = -RT \ln K \text{ \& } K = \frac{[P]}{[S]}$$
- ✓ rychlostní konstanta
- $$v = k[S] \quad i \quad v = k[S][S_2]$$
- $$k = (kT/h) e^{-G^\ddagger/RT}$$

## Enzymy zvyšují reakční rychlost ...



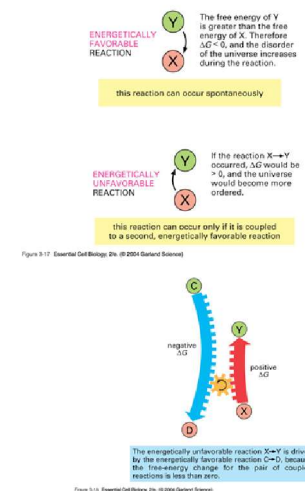
- až  $10^{17}$  krát!
- *de facto* umožňují proběhnutí kterých reakcí v reálném světě...
- např. ureasa (hydrolyza močoviny):
  - ✓ rychlost katalyzované reakce:  $3 \times 10^4/\text{sec}$
  - ✓ reakční rychlost:  $3 \times 10^{-10}/\text{sec}$
  - ✓ zvýšení –  $10^{14}$  krát!

## Funkce enzym

- ✓ biokatalyzátory
- ✓ zvyšují reakční rychlost
- ✓ neovlivňují reakční rovnováhu

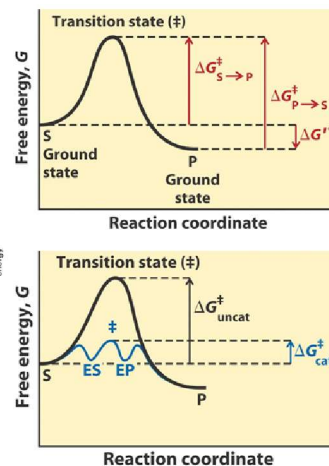
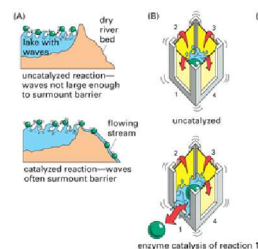
### Jak to dělají?

- ✓ aktivní místo
- ✓ komplementarita – zámek-klí
- ✓ slabé vazby – velikost enzym
- ✓ konformační změny
- ✓ orientace v prostoru
- ✓ energetické spájení reakcí



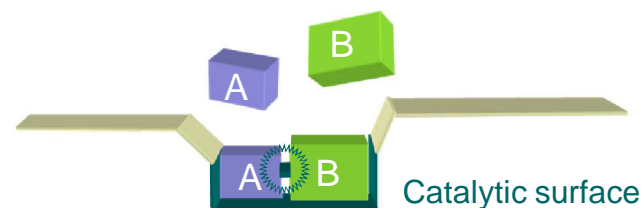
## Funkce enzym

- ✓ biokatalyzátory
- ✓ selektivní snižování energetických bariér
- ✓ aktivační energie
- ✓ slabé vazby – velikost enzymů
- ✓ komplementarita – zámek-klíč

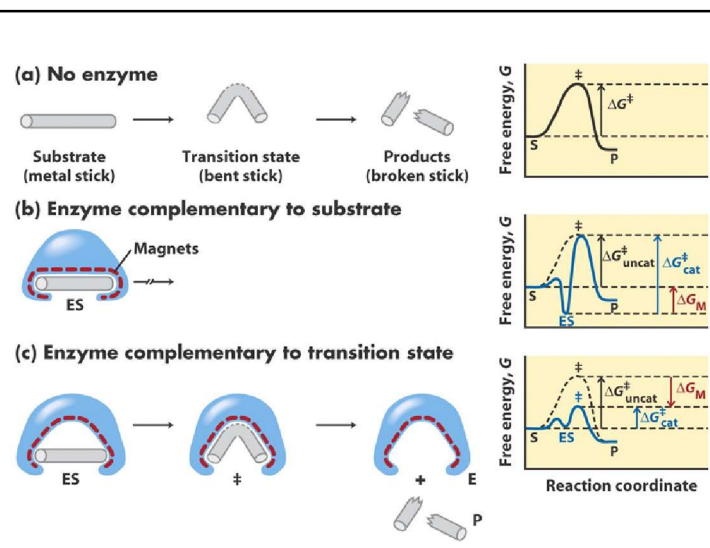


## The Nature of Enzyme Catalysis

Enzyme provides a catalytic surface  
This surface stabilizes transition state  
Transforms transition state to product

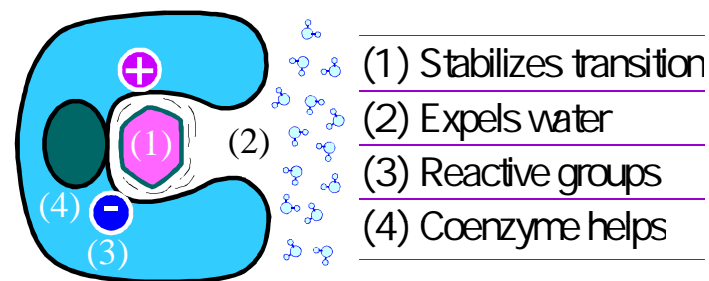


Juang RH (2004) BCbasics



## Active Site Is a Deep Buried Pocket

Why energy required to reach transition state is lower in the active site?



Juang RH (2004) BCbasics

## Reaktivní skupiny – "katalytické strategie"

- Acido-basická katalýza
- Kovalentní katalýza
- Kovové ionty
- Obvykle kombinace

Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-NH^+$	$R-NH_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$R-C(=NH^+)-NH$	$R-C(=NH)-N^-$
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr	$R-C_6H_4-OH$	$R-C_6H_4-O^-$

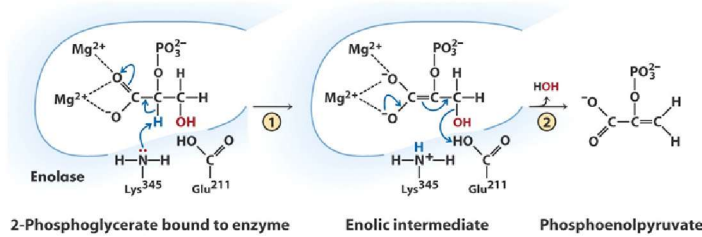
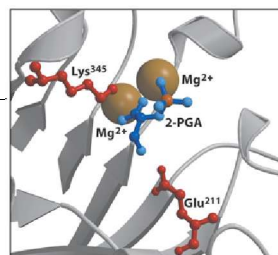
## Reaktivní skupiny – "katalytické strategie"

- Acido-basická katalýza
- Kovalentní katalýza
- Kovové ionty
- Obvykle kombinace

Nucleophiles	Electrophiles
Negatively charged oxygen (as in an unprotonated hydroxyl group or an ionized carboxylic acid)	Carbon atom of a carbonyl group (the more electronegative oxygen of the carbonyl group pulls electrons away from the carbon)
Negatively charged sulfhydryl	
Carbanion	Protonated imine group (activated for nucleophilic attack at the carbon by protonation of the imine)
Uncharged amine group	
Imidazole	Phosphorus of a phosphate group
Hydroxide ion	Proton

## Enolasa

- Fosfopyruvát hydratáza
- EC 4.2.1.11
- adí se mezi lyázy
- Katalýza za účasti kovového iontu



## Chymotrypsin

- ✓ EC 3.4.21.1
- ✓ demonstrace obecných princip fungování enzymů
- ✓ enzym štípe peptidovou vazbu – specifita úniku
- ✓ selektivní snižování energetických bariér
- ✓ aktivovaný proteolyticky
- ✓ substrátová specifita
- ✓ stereospecifita
- ✓ pH optimum

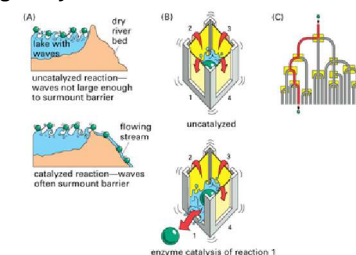
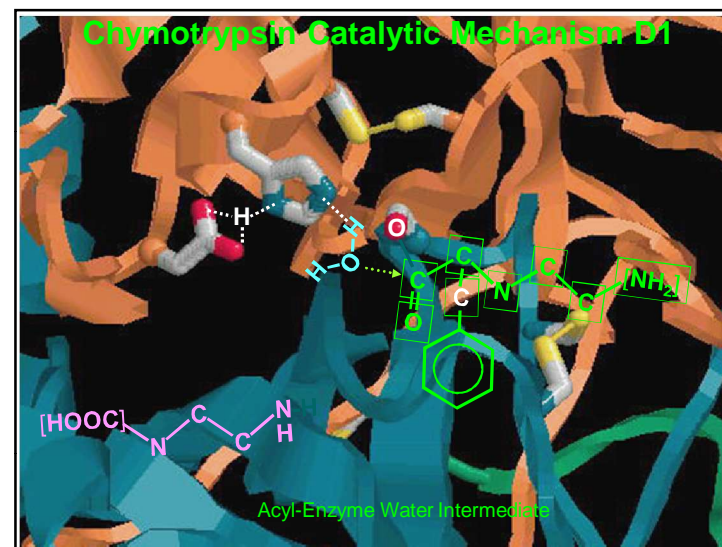
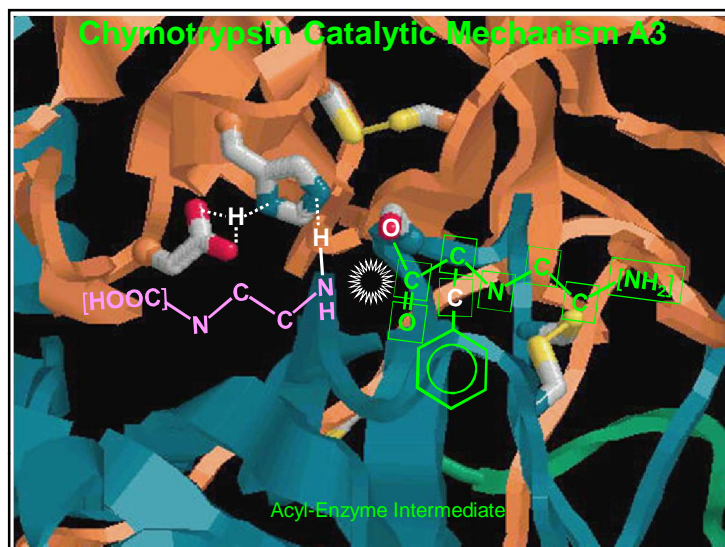
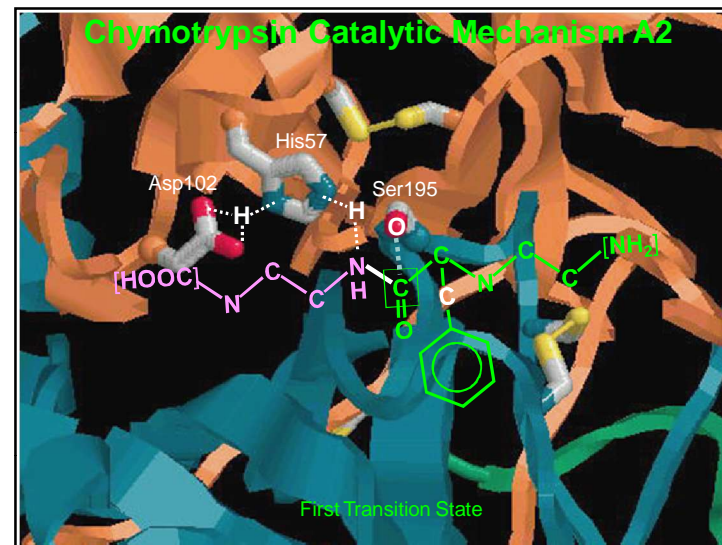
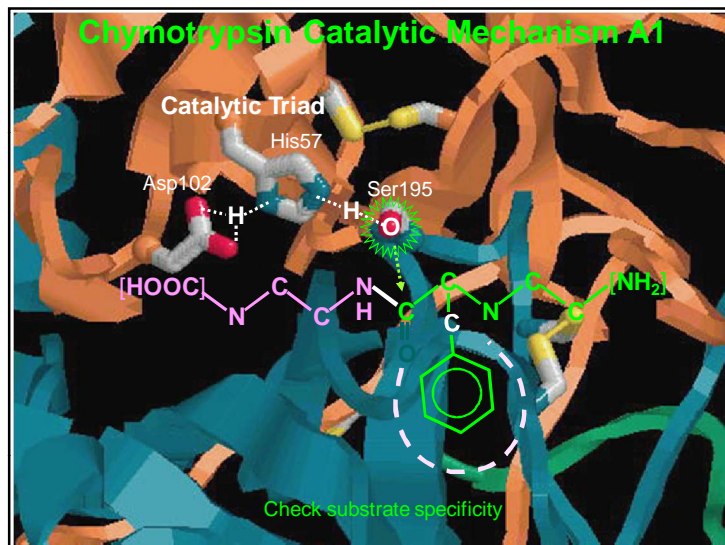
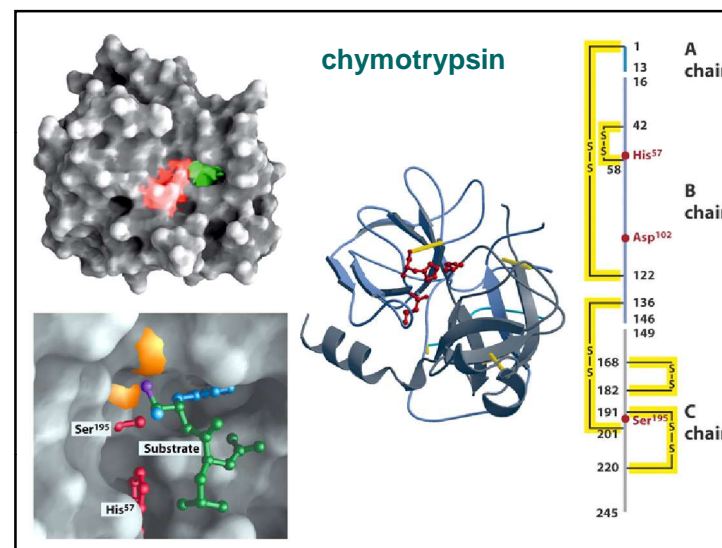
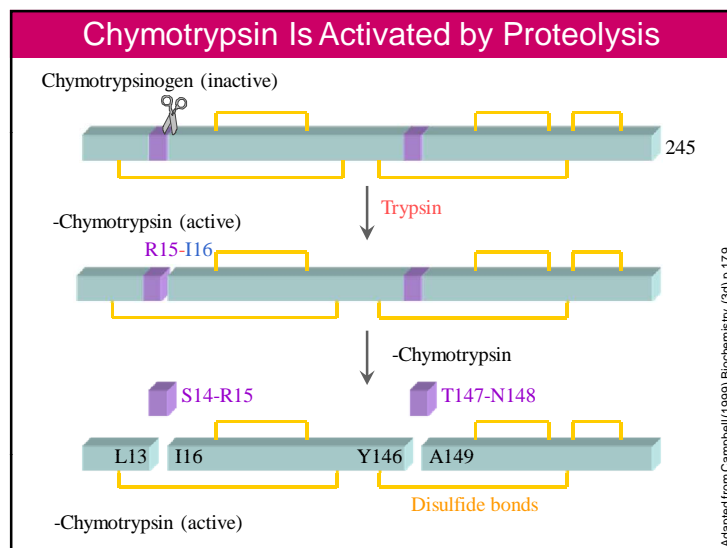
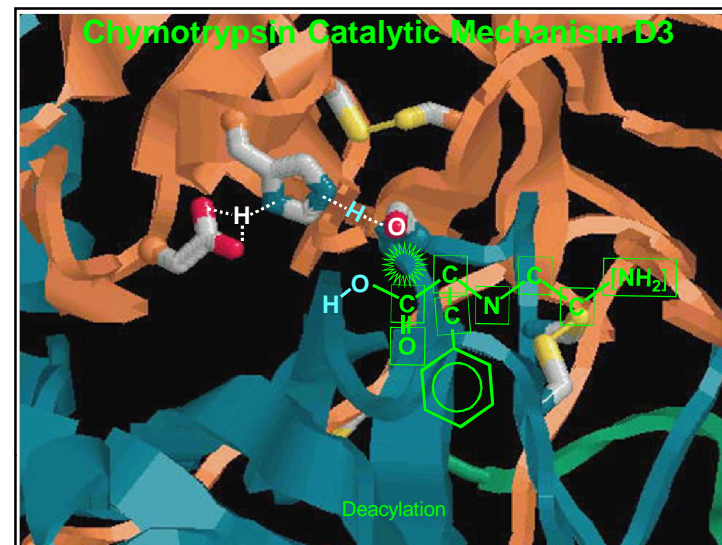
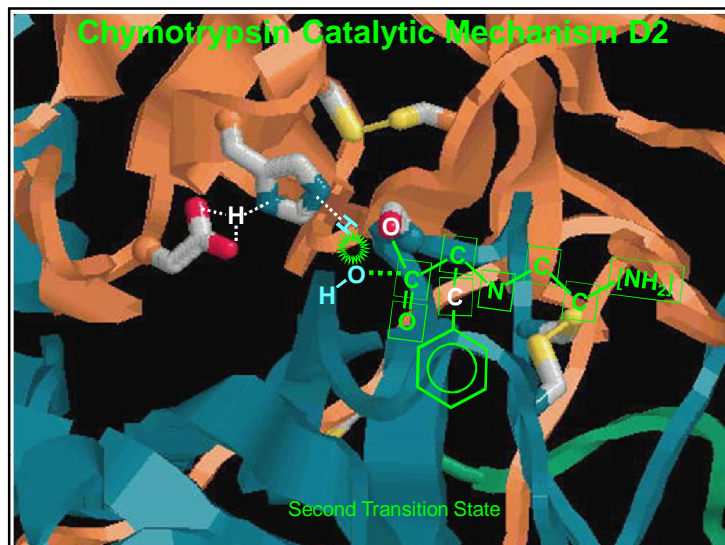


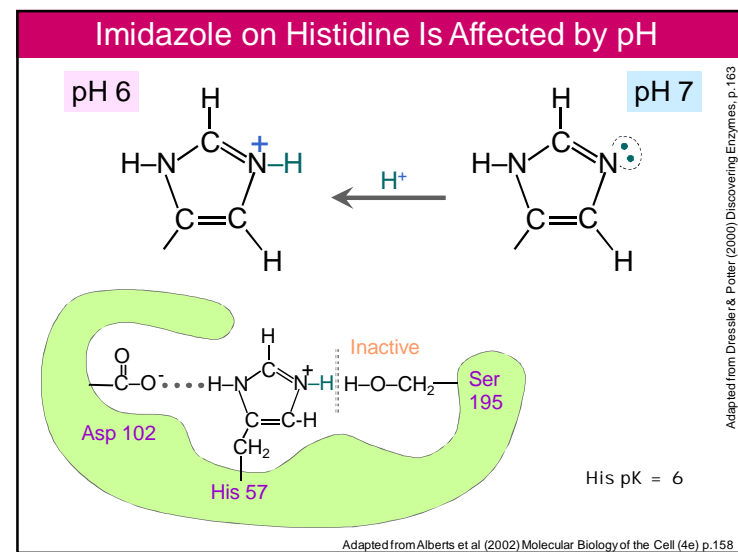
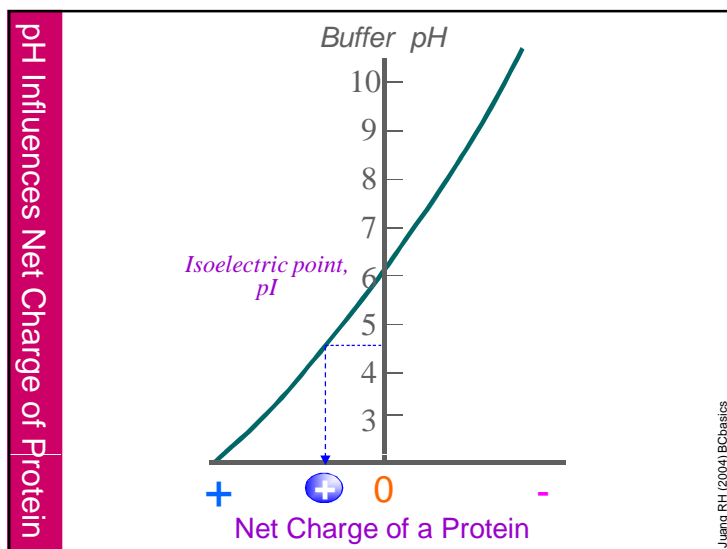
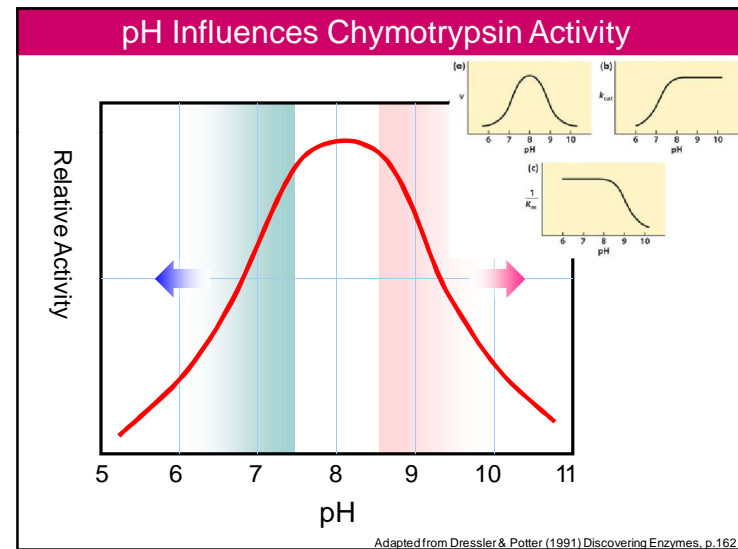
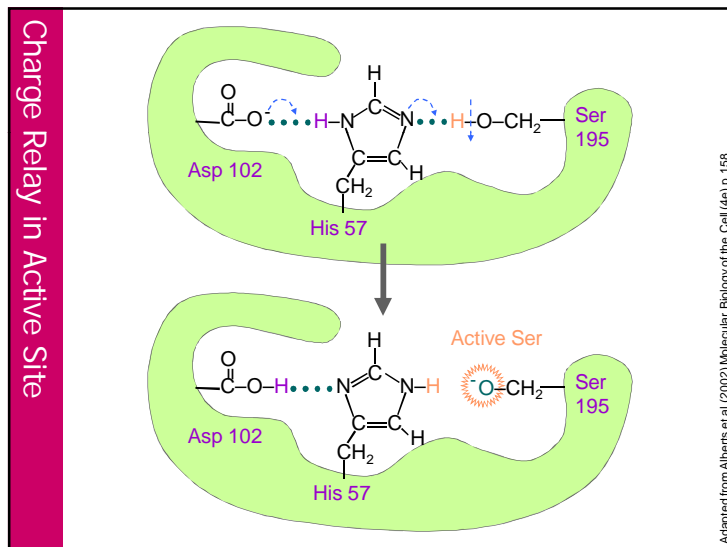
Figure 3-15: Generalized Catalytic Cycle (© 2004 Garland Science)

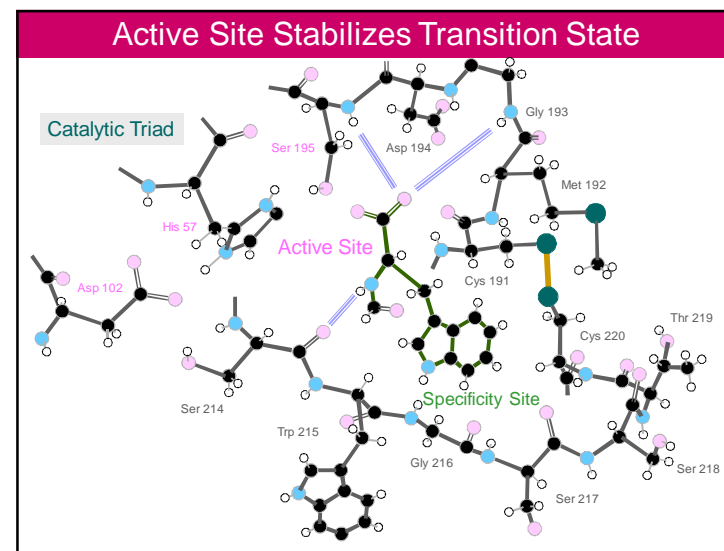
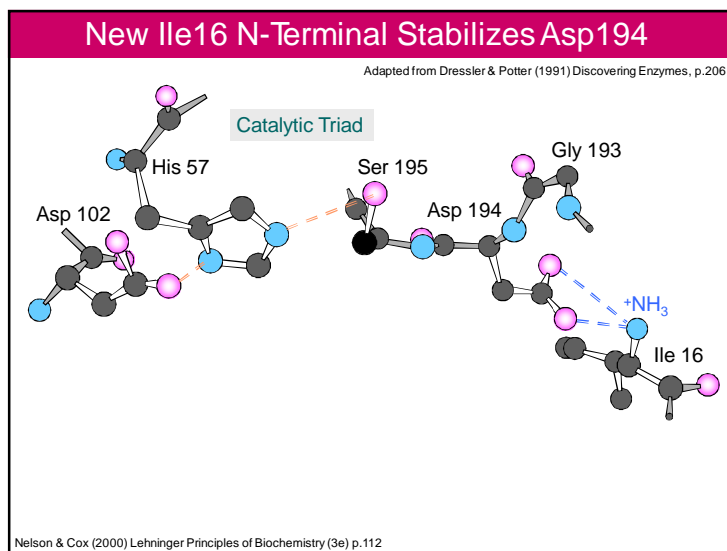
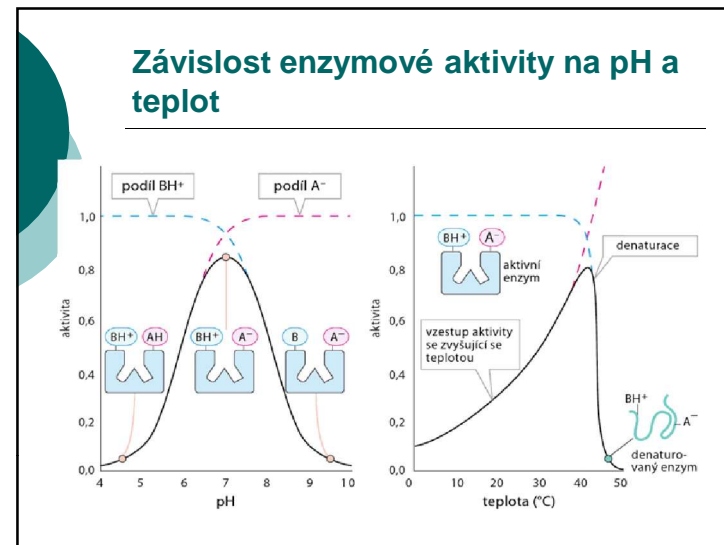
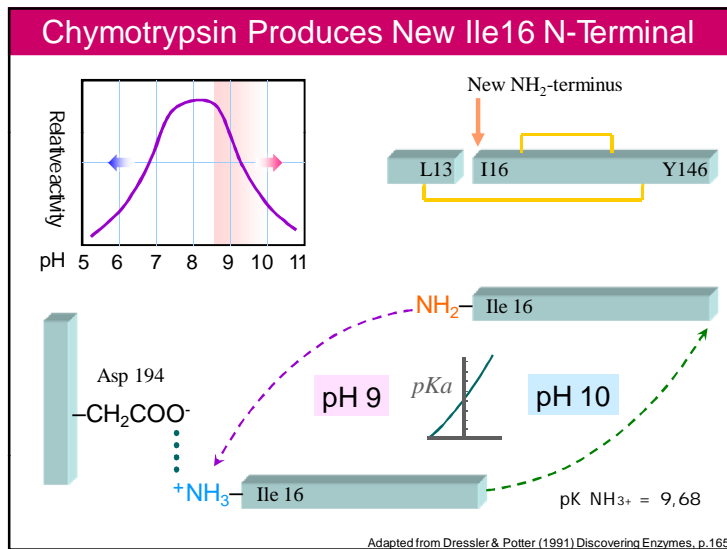




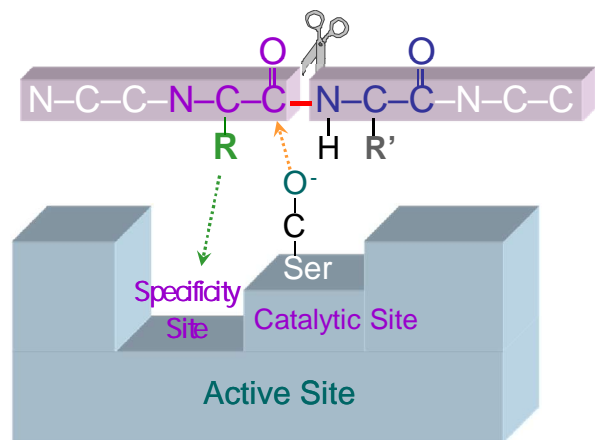






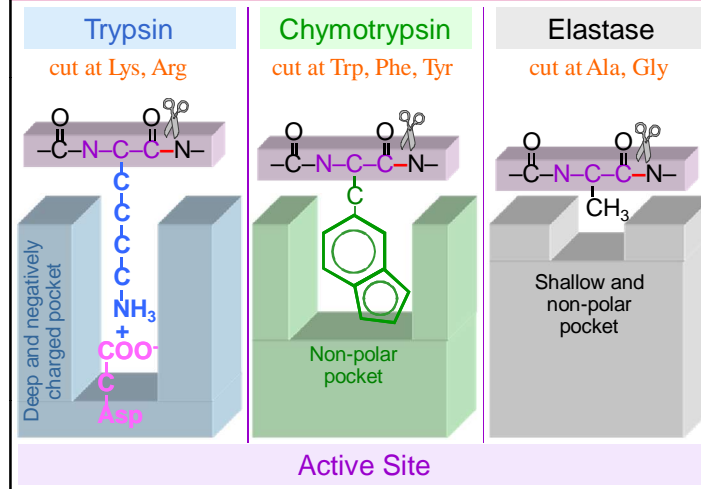


## Chymotrypsin Has A Site for Specificity



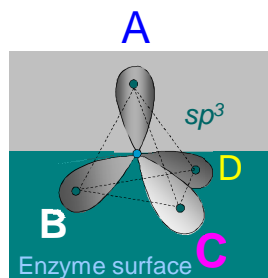
Juang RH (2004) BCbasics

## Specificity of Ser-Protease Family

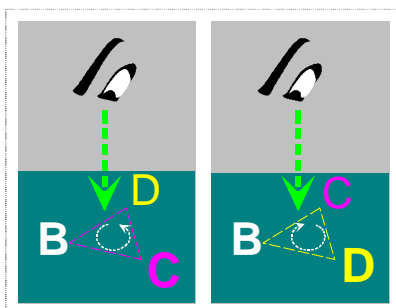


Juang RH (2004) BCbasics

## Stereo Specificity



The tetrahedral structure of carbon orbital has rigid steric strain which makes the basic building unit of protein conformation



These two triangles are not identical

Juang RH (2004) BCbasics

## Kinetika enzymatických reakcí

- ✓ invertasa jako p íklad sledování enzymové aktivity
- ✓ kinetika Michaelise a Mentenové

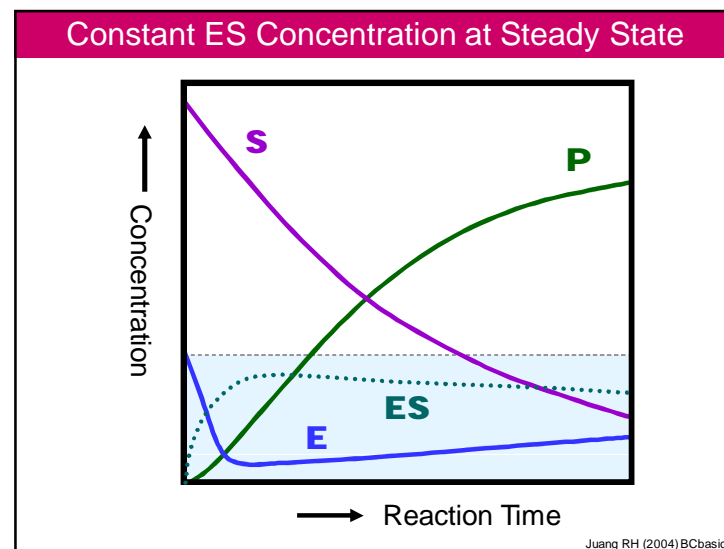
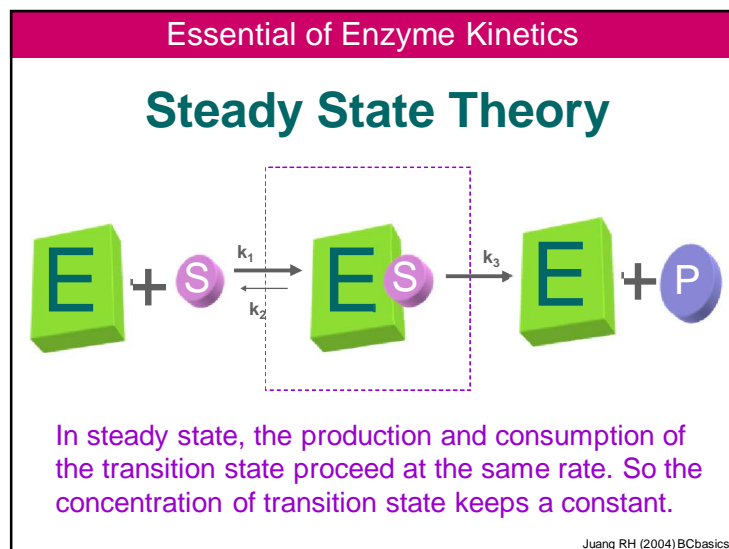
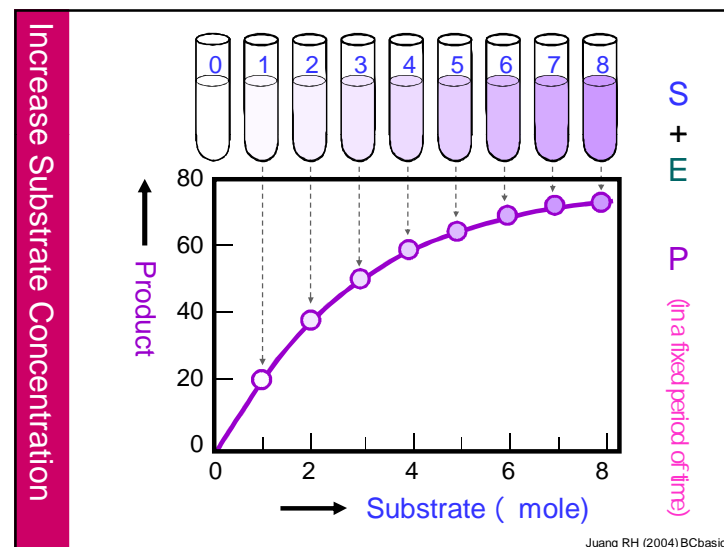
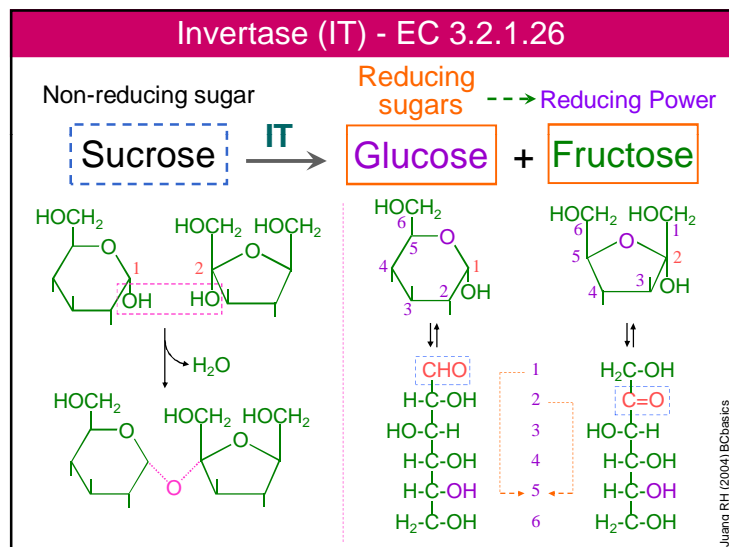
## ✓ inhibice:

- ❖ kompetitivní / competitive
- ❖ akompetitivní / uncompetitive
- ❖ smíšená (spec. nekompetitivní) / mixed (non-competitive)



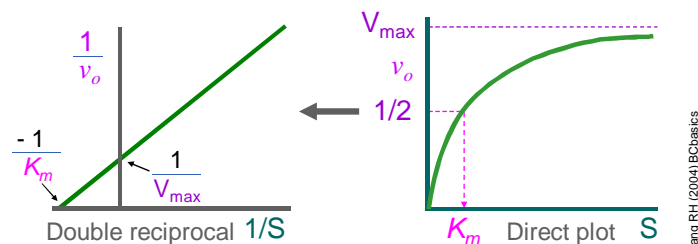
Leonor Michaelis 1875-1949 Maud Menten 1879-1960

- ✓ praktické p íklady inhibice



## An Example for Enzyme Kinetics (Invertase)

- 1) Use predefined amount of **Enzyme**  $E$
- 2) Add **substrate** in various concentrations  $S$  ( $x$ )
- 3) Measure **Product** in fixed **Time** ( $P/t$ )  $v_o$  ( $y$ )
- 4) ( $x$ ,  $y$ ) plot get **hyperbolic curve**, estimate  $V_{\max}$
- 5) When  $y = 1/2 V_{\max}$  calculate  $x$  ( $[S]$ )  $K_m$

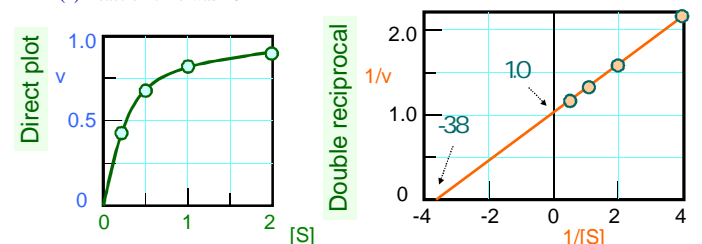


Juang RH (2004) BCbasics

## A Real Example for Enzyme Kinetics

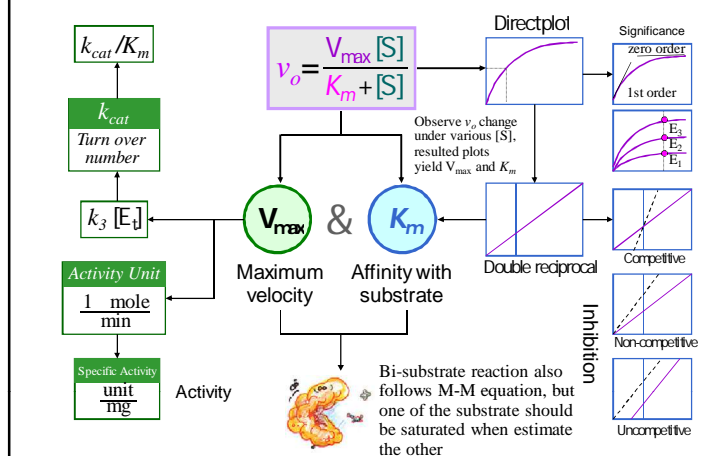
Data	Substrate [S]	Product Absorbance	Velocity $v$ (mole/min)	Double reciprocal $1/S$	$1/v$
1	0.25	0.21	0.42	4	2.08
2	0.50	0.36	0.72	2	1.56
3	1.0	0.40	0.80	1	1.35
4	2.0	0.46	0.92	0.5	1.16

- (1) The product was measured by spectroscopy at 600 nm for 0.05 per mole
- (2) Reaction time was 10 min



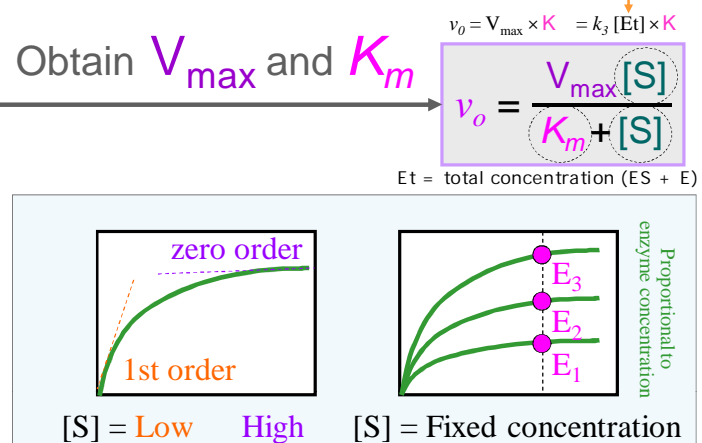
Juang RH (2004) BCbasics

## Enzyme Kinetics



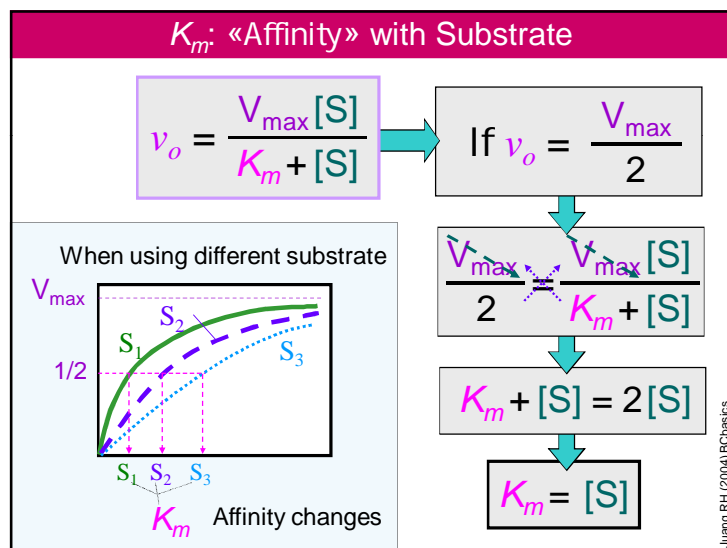
Juang RH (2004) BCbasics

## Significance of Enzyme Kinetics



Juang RH (2004) BCbasics

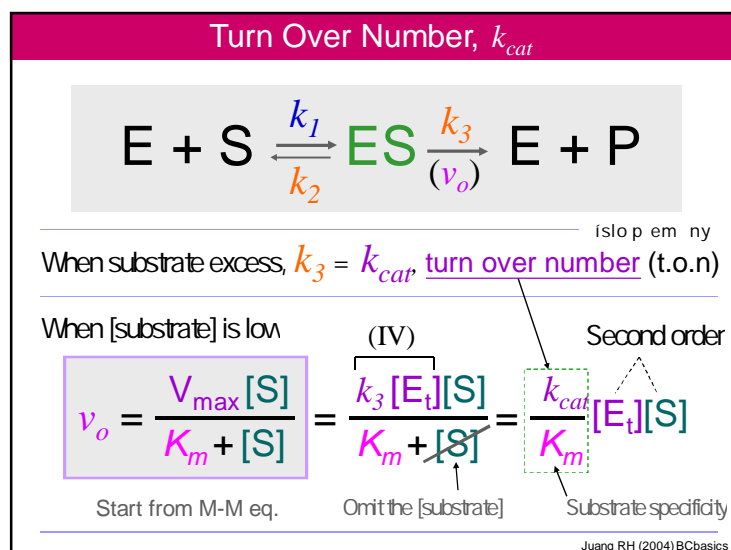




**$K_m$ : Hexokinase (EC 2.7.1.1) Example**

	Glucose + ATP	Glc-6-P + ADP	
number	Glucose	Allose	Mannose Substrate
1	CHO	CHO	CHO
2	H-C-OH	H-C-OH	HO-C-H
3	HO-C-H	H-C-OH	HO-C-H
4	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH
5	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH
6	H <sub>2</sub> -C-OH	H <sub>2</sub> -C-OH	H <sub>2</sub> -C-OH
$K_m$	8	8 000	5 M

Juang RH (2004) BCbasics

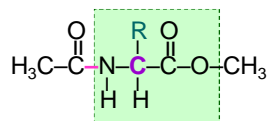


**Turn Over Numbers of Enzymes**

Enzymes	Substrate	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40 000 000
Carbonic anhydrase	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	400 000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	140 000
-Lactamase	Benzylpenicillin	2 000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (ATPase)	ATP	0.4

The number of product transformed from substrate by one enzyme molecule in one second

Adapted from Nelson & Cox (2000) Lehninger Principles of Biochemistry (3e) p.263

Chymotrypsin Has Distinct  $k_{cat}/K_m$  to Different Substrateskonstanta specificity  $k_{cat}/K_m$ 

R =

	R =	$k_{cat} / K_m$
Glycine	-H	$1.3 \times 10^{-1}$
Norvaline	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	$3.6 \times 10^2$
Norleucine	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	$3.0 \times 10^3$
Phenylalanine	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$1.0 \times 10^5$

 $(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ 

Adapted from Mathews et al (2000) Biochemistry (3e) p.379

## Katalytická účinnost enzym

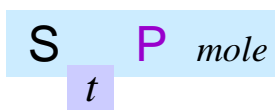
TABLE 6-8 Enzymes for Which  $k_{cat}/K_m$  Is Close to the Diffusion-Controlled Limit ( $10^8$  to  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )

Enzyme	Substrate	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ (M)	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	$1.4 \times 10^4$	$9 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^8$
Carbonic anhydrase	$\text{CO}_2$	$1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^{-2}$	$8.3 \times 10^7$
	$\text{HCO}_3^-$	$4 \times 10^5$	$2.6 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2$	$4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^0$	$4 \times 10^7$
Crotonase	Crotonyl-CoA	$5.7 \times 10^3$	$2 \times 10^{-5}$	$2.8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarate	$8 \times 10^2$	$5 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^8$
	Malate	$9 \times 10^2$	$2.5 \times 10^{-5}$	$3.6 \times 10^7$
$\beta$ -Lactamase	Benzympenicillin	$2.0 \times 10^3$	$2 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^8$

Source: Fersht, A. (1999) Structure and Mechanism in Protein Science, p. 166, W. H. Freeman and Company, New York.

Nejpřesnější cestou pro porovnávání katalytických účinností enzymů je konstanta specificity  $k_{cat}/K_m$ 

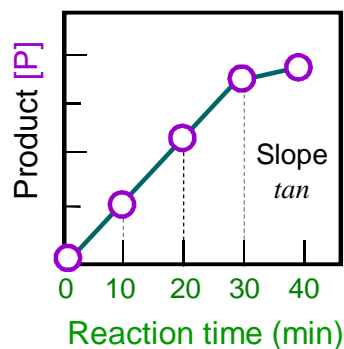
## Enzyme Activity Unit



$$v_o = [\text{P}] / \text{min}$$

$$\text{Unit} = \text{mole/min}$$

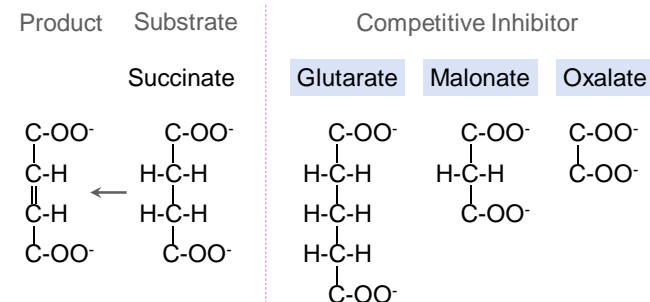
$$\text{Specific Activity} = \frac{\text{Activity Units}}{\text{Protein (mg)}}$$



$$\frac{y}{x} = \tan$$

Jiang RH (2004) BCbasics

## Competitive Inhibition



## Succinate Dehydrogenase EC 1.3.5.1

Ze sukcinátu vzniká touto reakcí citrátového cyklu fumarát, sukcinát dehydrogenáza má FAD/FADH2 jako prostetickou skupinu, je to oxidoreduktasa.

Adapted from Kleinsmith &amp; Kish (1995) Principles of Cell and Molecular Biology (2e) p.49

Enzyme Inhibition (Mechanism)			
Juang RH (2004) BCbasics			
	Competitive	Non-competitive	Uncompetitive
Cartoon Guide	<p>Substrate Inhibitor Compete for active site</p>	<p>Different site</p>	
Equation and Description	$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$ $+ I$ $E/I$ $[I]$ binds to free $[E]$ only, and competes with $[S]$ ; increasing $[S]$ overcomes inhibition by $[I]$ .	$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$ $+ I$ $EI + S \rightleftharpoons EIS$ $[I]$ binds to free $[E]$ or $[ES]$ complex; Increasing $[S]$ can not overcome $[I]$ inhibition.	$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$ $+ I$ $E/S$ $[I]$ binds to $[ES]$ complex only, increasing $[S]$ favors the inhibition by $[I]$ .
$= 1 + [I]/K_i$ & $K_i = [E][I]/[EI]$		$= 1 + [I]/K_i'$ & $K_i' = [ES][I]/[ESI]$	

Enzyme Inhibition (Plots)			
Juang RH (2004) BCbasics			
	Competitive	Non-competitive	Uncompetitive
Direct Plots	<p><math>V_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + [S]}</math></p>	<p><math>V_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}</math></p>	<p><math>V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}</math></p>
Double Reciprocal	<p><math>V_{max}</math> unchanged <math>K_m</math> increased</p>	<p><math>V_{max}</math> decreased <math>K_m</math> unchanged</p>	<p>Both <math>V_{max}</math> &amp; <math>K_m</math> decreased</p>
$= 1 + [I]/K_i$ & $K_i = [E][I]/[EI]$		$= 1 + [I]/K_i'$ & $K_i' = [ES][I]/[ESI]$	

Inhibice	
$= 1 + [I]/K_i$ & $K_i = [E][I]/[EI]$ $= 1 + [I]/K_i'$ & $K_i' = [ES][I]/[ESI]$	
<ul style="list-style-type: none"> <li>MM kinetika</li> <li>Kompetitivní inhibice</li> <li>Akompetitivní inhibice</li> <li>Směšená inhibice               <ul style="list-style-type: none"> <li>Nekompetitivní inhibice ( = )</li> </ul> </li> </ul>	$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$ $v_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + [S]}$ $v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}$ $v_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$

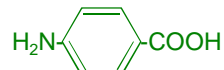
Inhibice		
TABLE 6-9 Effects of Reversible Inhibitors on Apparent $V_{max}$ and Apparent $K_m$		
Inhibitor type	Apparent $V_{max}$	Apparent $K_m$
None	$V_{max}$	$K_m$
Competitive	$V_{max}$	$\alpha K_m$
Uncompetitive	$V_{max}/\alpha'$	$K_m/\alpha'$
Mixed	$V_{max}/\alpha'$	$\alpha K_m/\alpha'$

## Sulfa Drug Is Competitive Inhibitor



Domagk (1939)

Para-aminobenzoic acid (PABA)



Bacteria needs PABA for the biosynthesis of folic acid

Precursor

Folic acid

Tetrahydro-folic acid



Sulfanilamide

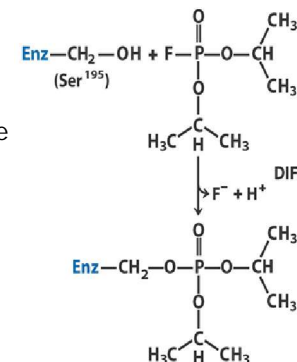
Sulfa drug (anti-inflammation)

Sulfa drugs has similar structure with PABA, and inhibit bacteria growth.

Adapted from Bohinski (1987) Modern Concepts in Biochemistry (5e) p.197

## Ireversibilní inhibice

- Inhibice chymotrypsinu
- DIFP - Diisopropylfluorophosphate
- Klí ová fce Ser<sup>195</sup>
- Suicide/mechanism based inhibitors



## Energetické sprážení

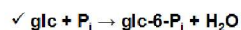
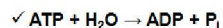
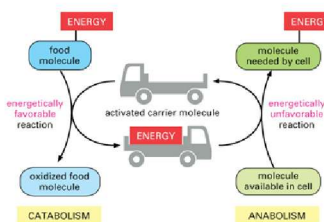
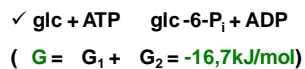
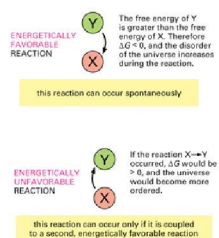

 $(\Delta G_1 = 13,8 \text{ kJ/mol} - \text{tj. endergonická})$ 

 $(\Delta G_2 = -30,5 \text{ kJ/mol} - \text{tj. exergonická})$ 


Figure 3-30: Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

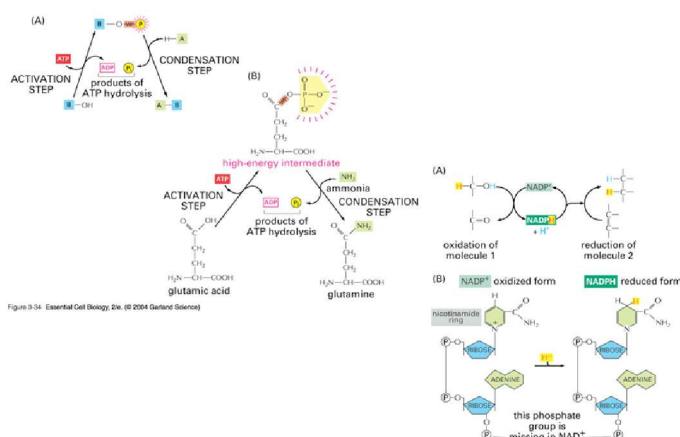


$$K_1 = 3,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 2 \cdot 10^5 \text{ M}$$

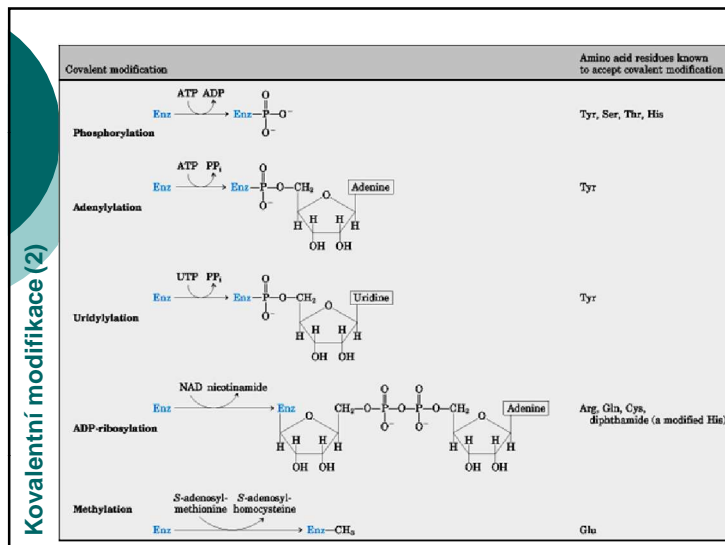
$$K = 7,8 \cdot 10^2$$

## Energetické sprážení









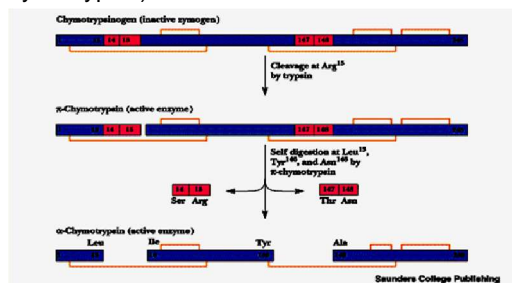
## Kovalentní modifikace (3)

TABLE 10.1 Common covalent modifications of protein activity

Modification	Donor molecule	Example of modified protein	Protein function
Phosphorylation	ATP	Glycogen phosphorylase	Glucose homeostasis; energy transduction
Acetylation	Acetyl CoA	Histones	DNA packing; transcription
Myristoylation	Myristoyl CoA	Src	Signal transduction
ADP-ribosylation	NAD	RNA polymerase	Transcription
Farnesylation	Farnesyl pyrophosphate	Ras	Signal transduction
$\gamma$ -Carboxylation	$\text{HCO}_3^-$	Thrombin	Blood clotting
Sulfation	3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate	Fibrinogen	Blood-clot formation
Ubiquitination	Ubiquitin	Cyclin	Control of cell cycle

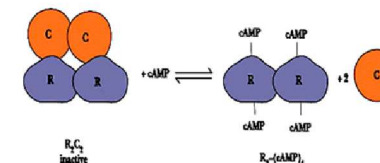
## Zymogeny

- **zymogeny** – neaktivní v tš í prekuzory proteolytických enzym
- **proenzymy** – prekuzory enzym
- zymogeny získají specifickou aktivitu pouze jsou-li specificky rozštěpeny na jednom i více místech (proinsulin → insulin, chymotrypsinogen → chymotrypsin)



## Modulátorové proteiny

- Phosphoprotein phosphatase inhibitor-1 (PPI-1) se váže na fosfoprotein fosfatasu (inhibice)
- Insulin se váže na glucose transporter protein
- Cyclic AMP protein kinase je inaktivní v tetramerní formě. Po navázání cAMP, regulární podjednotky disociují a uvolní katalytické podjednotky, čímž se protein stane aktivním.

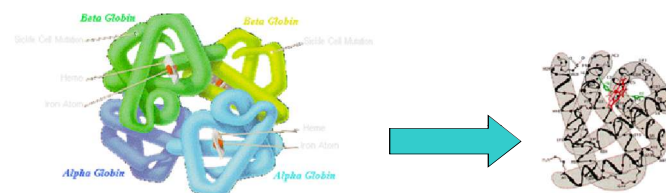


## Allosterické proteiny (enzymy)

- Inhibice nadbytkem substrátu
- Odchylky od Michaelis-Menten hyperbolické kinetiky
- Df. protein obsahující dvě (i více) topologicky rozdílná vazebná místa, která navzájem interagují
- Kooperativita (pozitivní i negativní) je modifikace vazebné konstanty substrátu předchozím navázáním jiné molekuly
- Homotropní versus heterotropní efektory (modulátory)
- Sigmoidní průběh enzymové kinetiky
- Existence efektorů, modulátorů (aktivátory vs. inhibitory)
- Dvojřázková odpověď na kompetitivní inhibitory
- Ztráta allosterických vlastností i při slabé denaturaci
- Kvartérní struktura

## Kvartérní struktura – ztráta allosterických vlastností

- Denaturace – ztráta 3D struktury
- Denaturace – pH, tepelná, chemická (např. močovina)
- Mírná denaturace – ztráta allosterických vlastností
- Allosterický protein – minimálně 2 podjednotky vázané slabými vazbami



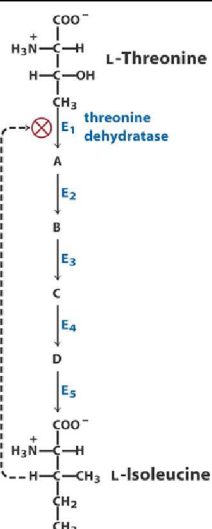
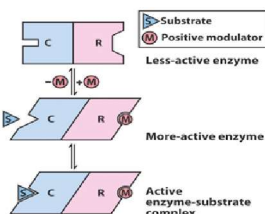
## Allosterie

- Regulace metabolických drah
- Zpětnovazebná inhibice TD
  - Ile je heterotropní efektor TD
  - Zpětnovazební inhibitor

EC 4.3.1.19

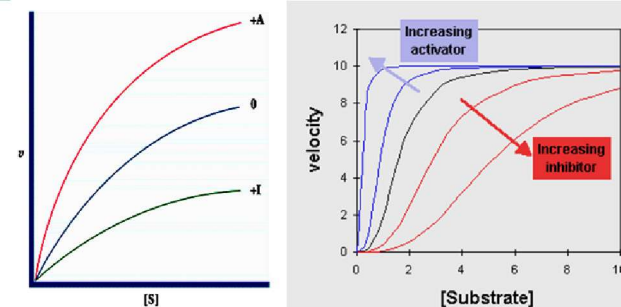
threonin dehydratáza (TD)

threonin ammonium-lyasa



## Kinetika & allosterické efektory

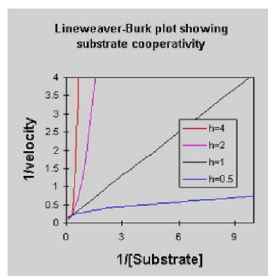
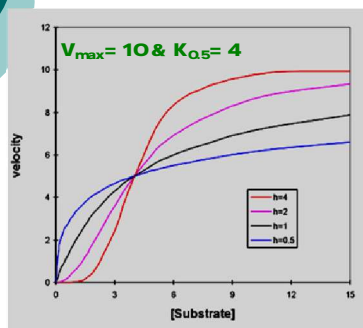
- Allosterické inhibitory x aktivátory
- K-systémy x V-systémy



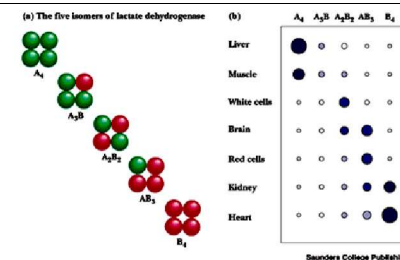
## Hillova rovnice

$h$  - Hill  $v$  koeficient, míra kooperativity

$$v = \frac{V_{\max} \cdot a}{K_{0.5} + a} \quad v = \frac{V_{\max} \cdot a^h}{K_{0.5}^h + a^h}$$



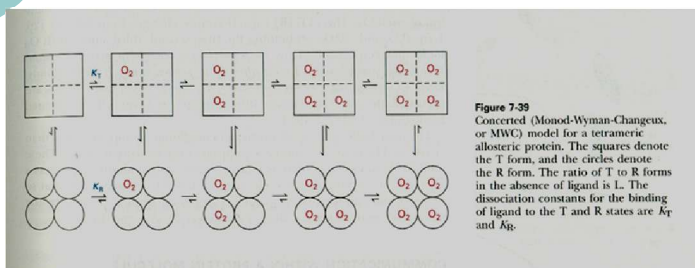
## Isoformy enzym



- odlišné kvaternární formy jednoho enzymu; různé izoenzymy, jejichž tvorba je regulována, mají odlišné aktivity
- 5 izoenzym - např. laktát dehydrogenáza (LDH) - podílejí se na přeměně pyruvátu na laktát u posledního kroku spalování glukózy v buňkách za nepřítomnosti kyslíku.

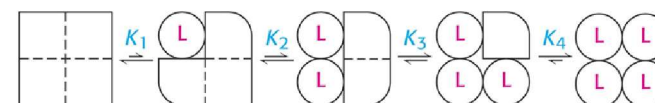
## Sekvenční MWC model

symetrická MWC hypotéza – 1965 – Monod, Wyman a Changeux



## Sekvenční MWC model

sekvenční KNF hypotéza – Koshland, Némethy a Filmer





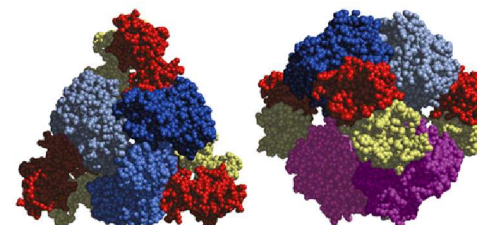
## T i p íklady allosterických protein

- Aspartate Transcarbamoylase
- Glycogen Phosphorylase (GP)
- ... a také hemoglobin ...

## Aspartate Transcarbamoylase

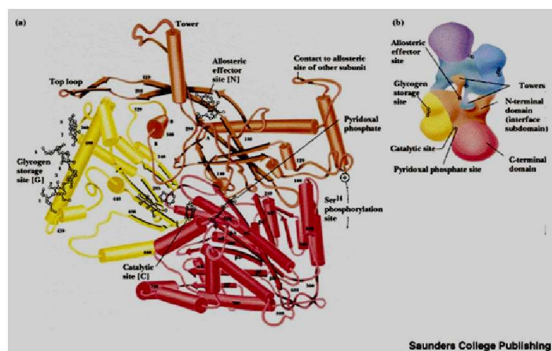
EC 2.1.3.2

- Allosteric enzymes are generally larger and more complex than their non-allosteric counterparts.
- Aspartate transcarbamoylase catalyzes the **first reaction in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides**, and is therefore highly regulated. It is composed of 12 polypeptide chains containing either catalytic or regulatory subunits.



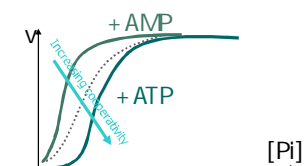
## Glykogen fosforyláza (GP)

- EC 2.4.1.1, odšt ěpuje glc. z neredukujícího konce glykogenu
- homodimer



## Glykogen fosforyláza – modulátory aktivity

- $P_i$  je pozitivní homotropní efektor -  $P_i$  se potom váže lépe
- ATP je zp ětovazební inhibitor a negativní heterotropní efektor. ATP zeslabuje vazbu  $P_i$  - regulace glykolýzy
- Glukosa-6-P je negativní heterotropní efektor (tj. inhibitor) - regulace glykolýzy
- AMP je pozitivní homotropní efektor (tj. aktivátor) zlepšuje vazbu
- GP je regulováno také kovalentní modifikací (fosforylace na Ser)



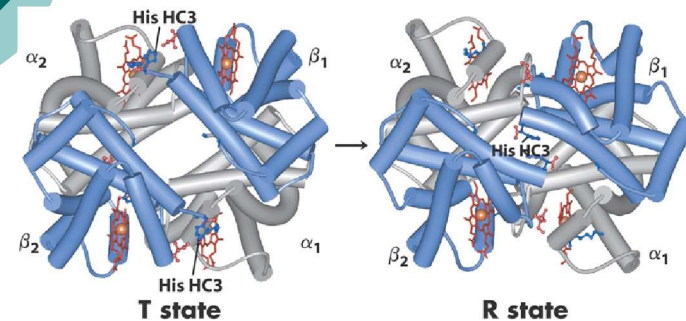


## Hemoglobin – p ipomenutí...

- Ligand – substrát
- Vazebné místo pro ligand – aktivní místo
- Transport kyslíku do tkání:
  - Rozpustnost a difuze  $O_2$  ?
  - Vazba  $O_2$  na protein – AA ?
- Železo/m – toxicita (oxidativní poškození)
- Hem
- Protoporfyrin
- Myoglobin vs. hemoglobin

## T R p echod

**T stav (tense)** - stabilnější a převládající konformace deoxyhemoglobinu s vyšším počtem solných můstků. **R stav (relaxed)** – má signifikantně vyšší afinitu ke kyslíku a navíc vazba kyslíku stabilizuje R stav.

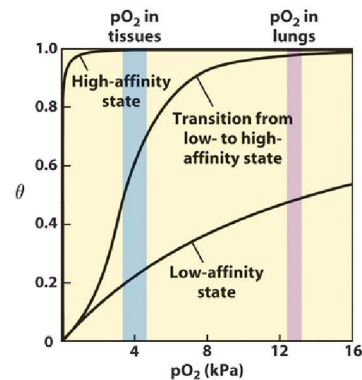


## Kooperativita vazby kyslíku na hemoglobin

- Hillova rovnice

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$$

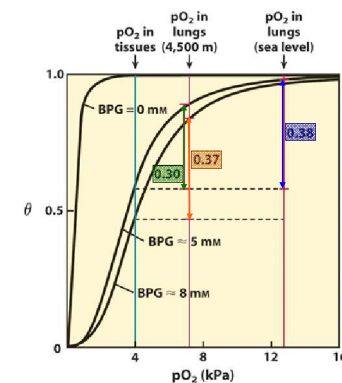
Parciální tlak kyslíku v plicích je cca 13,3 kPa, zde hemoglobin váže kyslík nejlépe, při parciálním tlaku kolem 4 kPa – dochází k uvolnění kyslíku v tkáních.



## Regulace 2,3-bifosfoglycerátem (BPG)

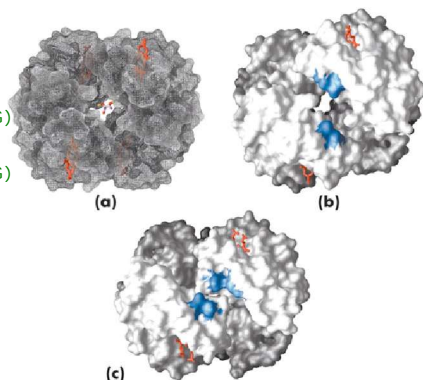
- Aklimatizace ve vyšších nadmořských výškách
- Normální hladina – 5mM

Molekula BPG se váže do kavity mezi beta podjednotkami v T stavu. BPG snižuje afinitu Hb ke kyslíku stabilizuje T stav. BPG má důležitou roli během vývoje plodu. Fetální hemoglobin musí mít vyšší afinitu ke kyslíku než matčin – gamma podjednotky místo beta.



### Vazba 2,3-bifosfoglycerátu (BPG) na hemoglobin

- a) T deoxyHb s BPG  
b) T deoxyHb  
(vazebné místo pro BPG)  
c) R oxyHb  
(vazebné místo pro BPG)



### Vitaminy a koenzymy

- ✓ malé organické molekuly nezbytné pro vyšší organismy  
(potřeba - g-mg)
- ✓ slouží stejnému účelu ve všech org., ale vyšší org. ztratily schopnost jejich syntézy
- ✓ například *E.coli* vs. *H.sapiens*
  - potřeba na glc. + org.solích vs. alespoň 12 potřebných vitamínů
- ✓ hypovitaminosy, avitaminosy, event. hypervitaminosy

### Vitaminy a koenzymy

#### vitaminy rozpustné ve vodě – koenzymy

(WSV – Water Soluble Vitamins)

vitamin B1 (thiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niacin), vitamin B5 (kyselina pantothenová), vitamin B6 (pyridoxin), vitamin B7 (biotin), vitamin H, vitamin B9 (kyselina listová), vitamin B12 (kobalamin), vitamin C (kyselina L-askorbová)

X

#### vitaminy rozpustné v tucích

(FSV – Fat Soluble Vitamins)

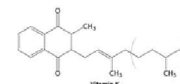
vitamin A (retinol), vitamin D (kalciferol), vitamin E (tokoferol), vitamin K (fylochinon)

### Vitaminy

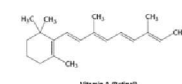
rozpustné v tucích – široké spektrum funkcí

Table 8.10. Fat-soluble vitamins

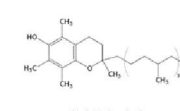
Vitamin	Function	Deficiency
A	Roles in vision, growth, reproduction	Night blindness, cornea damage, damage to respiratory and gastrointestinal tract
D	Regulation of calcium and phosphate metabolism	Rickets (children): skeletal deformities, impaired growth Osteomalacia (adults): soft, bending bones
E	Antioxidant	Inhibition of sperm production, lesions in muscles and nerves (rare)
K	Blood coagulation	Subdermal hemorrhaging



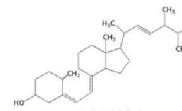
Vitamin K<sub>2</sub>



Vitamin A (retinol)



Vitamin E (α-tocopherol)



Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol)

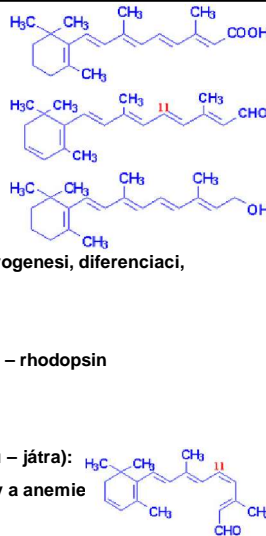
## Vitamin A

- ✓ retinol, (cis-trans) retinal a retinová kyselina
- ✓ provitamin A –  $\beta$ -karoten (antioxidant)

- ✓ retinol a kyselina retinová
  - steroidní/thyroidní hormony
  - kontrola exprese genů ovlivňujících embryogenesi, diferenciaci, organogenesi a vývoj končetin

- ✓ vidění a role vitaminu A – fotoreceptorový protein – rhodopsin
- ✓ rhodopsin – komplex opsinu a cis-retinalu

- ✓ hypovitaminosa (jen po dlouhodobém nedostatku – játra):
- ✓ šeroslepost (oslepnutí), zvýšené riziko rakoviny a anémie
- ✓ hypervitaminosa



## Vitamin K

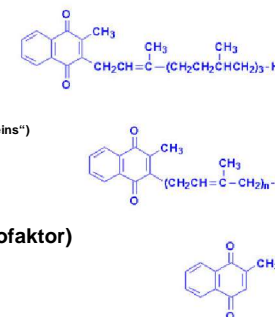
- ✓ srážlivost krve (regulace hladiny „blood clotting proteins“)

- ✓ posttranslační modifikace
  - karboxylace specifických Glu

(vitamin K – kofaktor)

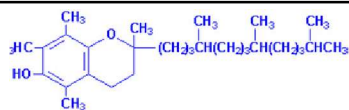
- ✓ K1 – fylochinon (zelené rostliny)
- ✓ K2 – menachinon (intestinální bakterie; n=6, 7 i 9)
- ✓ K3 – syntetický menadione (v org. alkylace K1 i K2)

- ✓ deficecence – u dospělých z ledka (K2 – antibiotika), u novorozenců – hemoragický syndrom



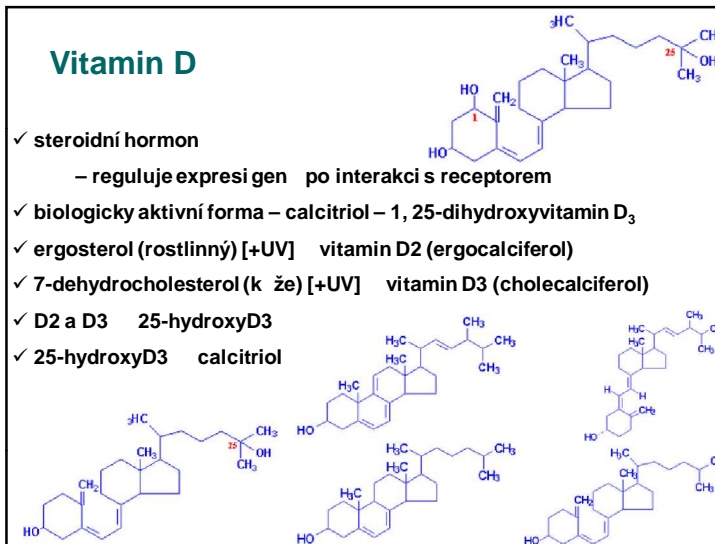
## Vitamin E

- ✓ smíšený tokoferol – nejúčinnější  $\alpha$ -tokoferol
- ✓ přítomnost v potravinách – chylomikrony
- ✓ přírodní antioxidant – odstraňuje volné radikály a molekulární kyslík
- ✓ zabírá zejména peroxidaci polynenasycených MK
- ✓ regenerace – interakcí s vitamínem C i vyloučení žlučiny
- ✓ v našich podmínkách je hypovitaminosa velmi vzácná...

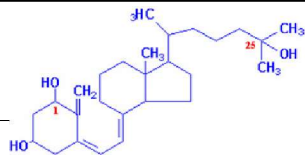


## Vitamin D

- ✓ steroidní hormon
  - reguluje expresi genů po interakci s receptorem
- ✓ biologicky aktivní forma – calcitriol – 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- ✓ ergosterol (rostlinný) [+UV] vitamin D2 (ergocalciferol)
- ✓ 7-dehydrocholesterol (kůže) [+UV] vitamin D3 (cholecalciferol)
- ✓ D2 a D3 → 25-hydroxyD3
- ✓ 25-hydroxyD3 → calcitriol



## Vitamin D



✓ společně s parathyroidním hormonem reguluje koncentraci fosforu a vápníku v séru

✓ hypovitaminosa – křivice (u dětí), osteomalacie (mknutí kostí u dospělých)

✓ v našich podmínkách se prakticky nevyskytuje



Figure 10-20b  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Vitaminy a koenzymy

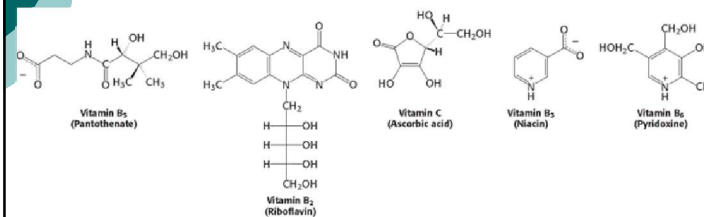
vitaminy rozpustné ve vodě – často prekurzory koenzymů

Table 8.9. Water-Soluble Vitamins

Vitamin	Coenzyme	Typical reaction type	Consequences of deficiency
Thiamine (B <sub>1</sub> )	Thiamine pyrophosphate	Aldehyde transfer	Beriberi (weight loss, heart problems, neurological dysfunction)
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	Flavin adenine dinucleotide (FAD)	Oxidation-reduction	Cheilosis and angular stomatitis (lesions of the mouth), dermatitis
Pyridoxine (B <sub>6</sub> )	Pyridoxal phosphate	Group transfer to or from amino acids	Depression, confusion, convulsions
Nicotinic acid (niacin)	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD <sup>+</sup> )	Oxidation-reduction	Pellagra (dermatitis, depression, diarrhea)
Pantoic acid	Coenzyme A	Acyl-group transfer	Hypertension
Biotin	Biotin-lysine complexes (biocytin)	ATP-dependent carboxylation and carboxyl-group transfer	Rash about the eyebrows, muscle pain, fatigue (rare)
Folic acid	Tetrahydrofolate	Transfer of one-carbon components; thymine synthesis	Anemia, neural-tube defects in development
B <sub>12</sub>	5'-Deoxyadenosyl cobalamin	Transfer of methyl groups; intramolecular rearrangements	Anemia, pernicious anemia, methylmalonic acidosis
C (ascorbic acid)		Antioxidant	Scurvy (swollen and bleeding gums, subdermal hemorrhages)

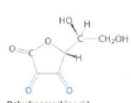
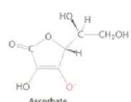
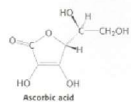
© 2002 by W. H. Freeman and Company

## Vitaminy a koenzymy



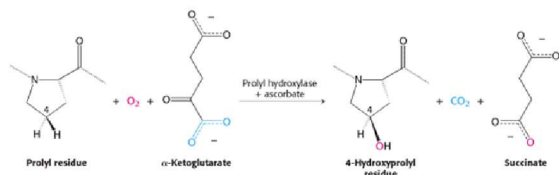
## Vitamin C

- ✓ syntéza z glc. (NE u primát, morčák, kalamita, pták ...)
- ✓ kyselina askorbová – redukční činidlo – antioxidant
- ✓ redukuje  $O_2$ , nitráty, cytochromy A a C (regenerace)



- ✓ nezbytný pro:

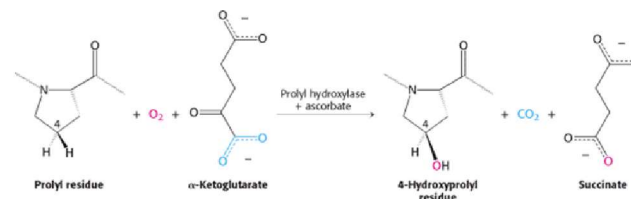
– syntézu kolagenu (hydroxylace prolinu), odbourávání tyrosinu, syntézu adrenalinu, tvorbu žlučových kyselin, atp.



## Vitamin C

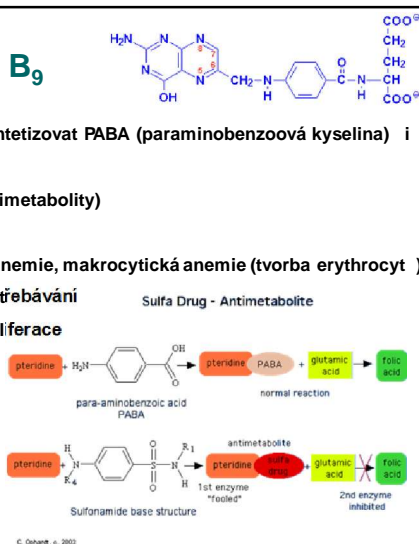
- ✓ nedostatek vitamínu C kurd je (skorbut)
  - podkožní hemoragie, svalová slabost, křečové žíly, zduřelá dásně, vypadávání zubů
- ✓ hydroxyprolin stabilizuje triple-helix kolagenu
- ✓ Jacques Cartier (1536) – popis příznaků

Some did lose all their strength, and could not stand on their feet. . . . Others also had all their skins spotted with spots of blood of a purple colour: then did it ascend up to their ankles, knees, thighs, shoulders, arms, and necks. Their mouths became stinking, their gums so rotten, that all the flesh did fall off, even to the roots of the teeth, which did also almost all fall out.



## Kyselina listová – B<sub>9</sub>

- ✓ živočišné nejsou schopni syntetizovat PABA (paraminobenzoová kyselina) a spojuvat Glu-pteridin
- ✓ sulfonamidy – antivitamíny (antimetabolity)
- ✓ nedostatek – megaloblastická anémie, makrocytická anémie (tvorba erytrocytů)
- ✓ chronická alkoholická onemocnění, poruchy vstřebávání
- ✓ v těhotenství vyšší potřeba – proliferace



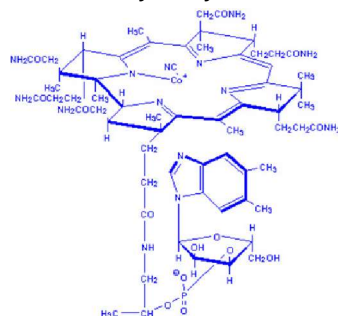


## Vitamin B<sub>12</sub> - kobalamin

- ✓ korinový kruh – koordinace kobaltu
- ✓ syntetizován výlučně mikroorganismy, skladován v játrech

- ✓ koenzym methylmalonyl-CoA mutasy a methionin synthasy
- ✓ metabolismus MK a AA

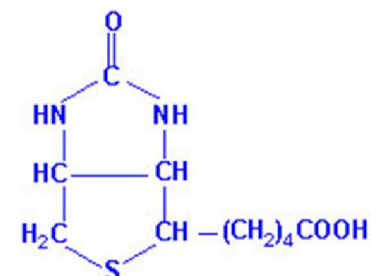
- ✓ v játrech zásoba až na 6 měsíců
- ✓ megaloblastická anémie



## Biotin

- ✓ hojně rozšířen v potravě + syntetizován střevními bakteriemi
- ✓ nedostatek – ztráta, s výjimkou dlouhodobého užívání antibiotik i nadměrné konzumace syrových vajec (bílek – avidin)

- ✓ koenzym karboxylas



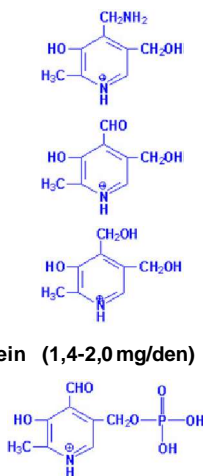
## Vitamin B<sub>6</sub>

- ✓ pyridoxal, pyridoxamin a pyridoxin
- ✓ aktivní forma – pyridoxal fosfát  
(konverze - potřebuje ATP)

- ✓ koenzym enzymů v metabolismu AA  
(transaminace reakce)

- ✓ potřeba závislá na množství konzumovaných proteinů (1,4-2,0 mg/den)
- ✓ zvýšená potřeba během laktace a těhotenství

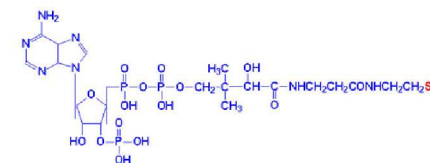
- ✓ projevy nedostatku vzácné (alkoholici)
- ✓ nedostatek vyvolaný interakcí s léky (isoniazid, penicilamin)



## Vitamin B<sub>5</sub> – kyselina pantothenová

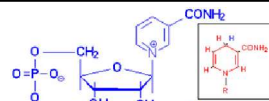
- ✓ -alanin + kyselina pantoová
- ✓ součást CoA a ACP (Acyl Carrier Protein)
- ✓ cca 70 enzymů potřebuje CoA i ACP jako koenzym

- ✓ v potravě rozšířená (celozrnné obiloviny, maso, zelenina)
- ✓ nedostatek – jen vzácn

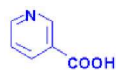


## Vitamín B<sub>3</sub> - niacin

- ✓ kyselina nikotinová a nikotinamid
- ✓ aktivní forma NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>
- ✓ koenzymy mnoha oxidoredukčních enzymů
- ✓ striktně vzato nejde o vitamín (neúspěšná syntéza z tryptofanu)



- ✓ projevy nedostatku:
- ✓ pellagra (váhový úbytek, dermatitidy, deprese a demence)
  - populace odkázané na kukuřici (chudá na niacin), léky

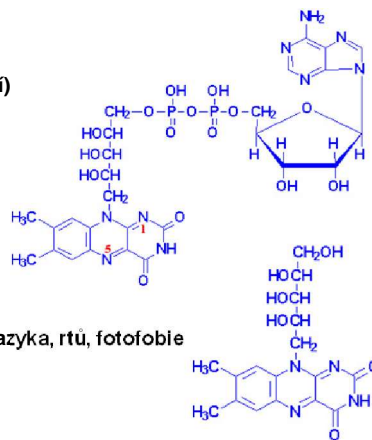


- ✓ kyselina nikotinová – snižuje hladinu cholesterolu v krvi  
(snížení tvorby VLDL - very-low-density lipoprotein a LDL - low density lipoprotein)



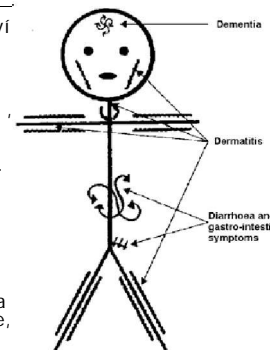
## Vitamín B<sub>2</sub> - riboflavin

- ✓ isoalloxazin + ribitol  
(termo- a fotonestabilní)
- ✓ FAD, FMN – flavoproteiny
- ✓ redoxní reakce
- ✓ 1,2 – 1,7 mg/den
- ✓ projevy nedostatku – alkoholici
- ✓ nedostatek – nezhojbný: zánět jazyka, rtů, fotofobie



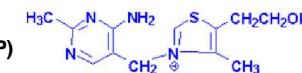
## Pellagra

- ervené / lombardské malomocenství
- italsky - *pelle agra* znamená doslova "drsná kůže"
- velká citlivost na světlo, agresivita, nespavost, slabost, vypadávání vlasů, průjmy, silná ataxie, poruchy srdce, nízká inteligence a také demence, a hlavně především rozsáhlé červené vyrážky. U neléčené pellagry nastává smrt v řádově několika letech.
- forma avitaminózy, způsobená nedostatkem niacinu (vitamin B<sub>3</sub>) a proteinů (zejména proteinů obsahujících tryptofan) v potravě
- Tryptofan (který může být ložem na niacin) je obsažen především v masě, vejcích a také v sóji

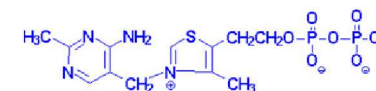


## Vitamín B<sub>1</sub> - thiamin

- ✓ aktivní forma – thiamidinpyrofosfát (TPP)
- ✓ pyrimidin + thiazol + methylenový mostek
- ✓ koenzym – pyruvát a -ketoglutarát dehydrogenas a transketolas
- ✓ projevy nedostatku – redukce produkce energie buňkou
- ✓ beri-beri (hodně sacharidů málo TPP)
- ✓ vyčerpanost, anorexie, otoky, svalové a nervové degenerativní změny
- ✓ Wernickeho encefalopatie (u alkoholiků)



- ✓ zdroj neloupaná zrna a maso



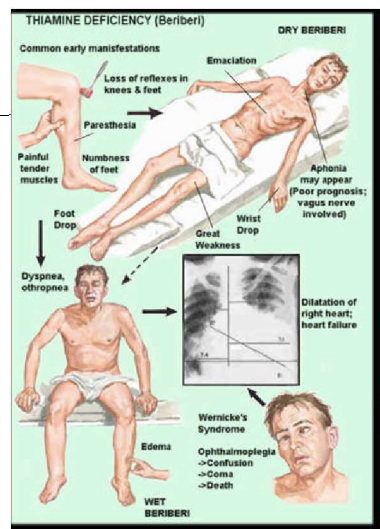
## Beri-beri

onemocnění způsobené nedostatkem thiaminu - vitamínu B<sub>1</sub>

mokrá beri-beri zasahuje kardiovaskulární systém i jiné části organismu

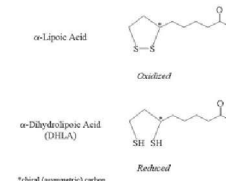
suchá beri-beri a Wernicke-Korsakov v syndrom postihují nervový systém

infantilní (dětská) beri-beri se objevuje v těsnosti u dětí v rozvojových zemích



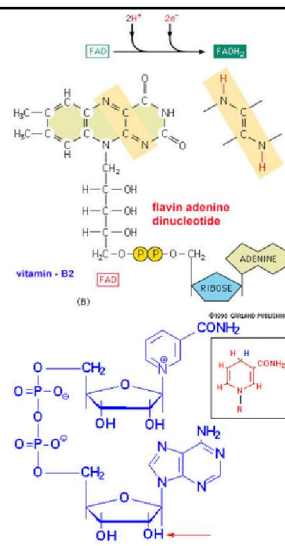
## Koenzymy

- ✓ koenzymy oxidoreduktas (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD, FMN, kyselina lipoová)
- ✓ koenzymy transferas (ATP, CoA, kyselina lipoová, biotin, kyselina listová, pyridoxalfosfát)
- ✓ koenzymy lyas a isomeras (pyridoxalfosfát)



## FAD & NAD(P)<sup>+</sup>

- ✓ prostetická skupina x koenzym
- ✓ UV absorpce (adenin – 260nm/nikotin 340nm)
- ✓ FAD – tzv. 1-4 adice (oxidovaná forma)
- ✓ FADH<sub>2</sub> – redukovaná forma
- ✓ chinon – (semichinon) – hydrochinon
- ✓ FAD oxidace dvojných vazeb
- ✓ NAD<sup>+</sup> / NADH – ztráta aromaticity (UV absorpce)
- ✓ NAD<sup>+</sup> / NADP<sup>+</sup>
- ✓ NADH odevzdává vodík enzymům dých. et zce
- ✓ NADPH dodává vodík potřebný i biosyntéze mastných kyselin
- ✓ NAD oxidace alkoholů na aldehydy (např. beta oxidace)
- ✓ NAD – vitamín B3 (niacin), FAD – vitamín B2 (riboflavin)



## Koenzym A

- ✓ 3'-fosfoadenosindifosfát – kyselina pantothenová – -merkptoethylamin
- ✓ přenos acyl

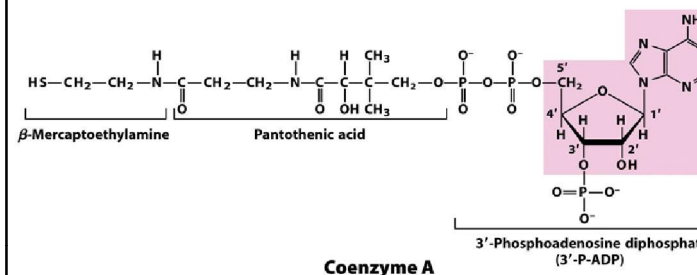


Figure 8-38 part 1  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company