

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
- společné reakce
- mechanismy regulace enzymatické aktivity
- struktura a funkce koenzymů
- vitamíny

Proč jsou enzymy nezbytné pro existenci života?

- Je možné snadno demonstrovat na příkladu sacharosy...
 - Její oxidace na CO_2 a H_2O je vysoce exergonická, ale...
 - ...neprobíhá právě rychle, zatímco v organismu se energie uvolní během několika málo sekund sázení cukru z stane v polici bez ztráty aniž by byla pozorována jakákoli viditelná konverze na oxid uhličitý a vodu.

Enzymy v biochemických procesech

- Extrémní účinnost katalýzy
- Vysoce specifický účinek – málodky vedlejší produkty
- Silně urychluje chemické reakce o 6-12 rád
- Fungují ve vodném prostředí za relativně mírných podmínek (téma: neutrální pH, při atmosférickém tlaku a teplotách pod 100°C)

Trocha historie...

- Konec 18. století – první popis biokatalýzy (trávení jídla žalude nimi š ávami)
- 1810 - J.L Gay-Lussac zjistil, že kvasinky rozkládají cukr p evážn na ethanol a CO₂
- 19. století – výzkum št pení škrobu slinami a rostlinnými extrakty
- Kolem roku 1850 – L. Pasteur – fermenty (*vis vitalis*)
- pojmenování ENZYMY – Frederick W. Kühne – ecky en=v zyme=kvasinka, n co v kvasinkách katalyzuje reakci kvašení
- 1894 - E. Fischer – zjistil, že glykolytické enzymy rozlišují stereoizomery cukr - hypotéza zámku a klí e
- 1897 – Eduard Buchner – získal bezbun ný extrakt z kvasinek, který syntetizoval ethanol z glukózy
- 1926 – James Sumner krystalizace prvního enzymu – ureasy (katalyzuje hydrolyzu mo oviny na NH₃ a CO₂), prokázal, že jde o protein
- 30. léta – J.B.S. Haldane – d ležitost slabých nevazebných interakcí
- 1963 – zve ejn na první aminokyselinová sekvence enzymu – hov zí pankreatické ribonukleasy A
- 1965 – ur ena struktura lysozymu z vaje ného bílk pomoci 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** – pevn vázané molekul na protein nap . hem v hemoglobinu
- ✓ **vitamíny** – asto prekurzory koenzym ; org. látky pot ebné v malém množství – p ijímány potravou

Kofaktory

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

Cu ²⁺	Cytochrome oxidase
Fe ²⁺ or Fe ³⁺	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K ⁺	Pyruvate kinase
Mg ²⁺	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn ²⁺	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni ²⁺	Urease
Se	Glutathione peroxidase
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
Biocytin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin 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⁺-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/>

Třídy enzymů

1. **Oxidoreduktasy** – katalyzují oxidoreduktivní 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 současné eliminace atomu vodíku a vzniku dvojné vazby
5. **Isomerasy** – katalyzují geometrické nebo strukturní změny uvnitř jedné molekuly - intramolekulární reakce
6. **Ligasy (syntetasy)** – katalyzují silně endergonní sloučení dvou molekul za současné spotřebu energie – formou hydrolyzy fosfátové vazby v molekule ATP
7. **Translokasy** – katalyzují přenos z místa 1 do místa 2

Třídy enzymů – 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	$\text{Pyruvate} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2$
Isomerase	Alanine racemase	$D\text{-Alanine} \rightleftharpoons L\text{-Alanine}$
Ligase	Pyruvate carboxylase	$\text{Pyruvate} + \text{ATP} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{Oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i$

Třídy enzymů – příklady translokásy

EC 7.1 contains enzymes catalysing the translocation of hydrons (hydron being the general name for H⁺ 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).

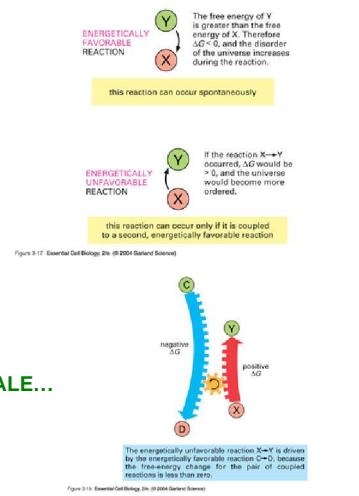
EC 7.4.2.8 protein-secreting ATPase

Reaction: ATP + H₂O + cellular protein[side 1] = ADP + phosphate + cellular protein[side 2]

Systematic name: ATP phosphohydrolase (protein-secreting)

Enzymy - funkce

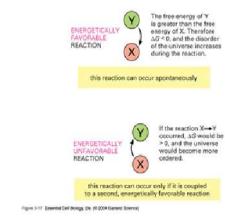
- ✓ biokatalyzátory
- ✓ zv těší reakní rychlost
- ✓ neovlivují reakní rovnováhu
- ✓ energetické spřazení reakcí



- ✓ aktivní místo
- ✓ slabé vazby – velikost enzym
- ✓ komplementarita – zámek-klíč, ALE...

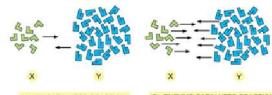
Enzymy - funkce

- ✓ S P
- ✓ zm na Gibbsovy volné energie – G
- ✓ aktivaní energie – G^\ddagger
- ✓ zv těší reakní rychlost
- ✓ neovlivují reakní rovnováhu



- ✓ rovnovážná konstanta
 $G^\circ = -RT \ln K$ & $K = [P]/[S]$
- ✓ rychlostní konstanta
 $v = k[S]$ i $v = k[S_1][S_2]$
- $k = (kT/h) e^{-G^\ddagger/RT}$

Enzymy zvyšují reakní rychlosť ...



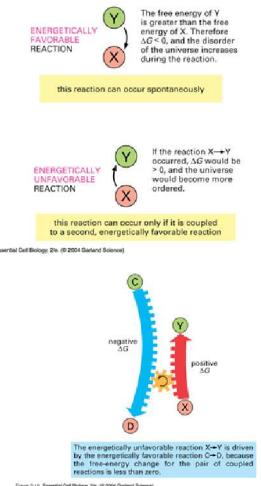
- až 10^{17} krát!
- de facto umožňuje právě některých reakcí v reálném řešení...
- např. ureasa (hydrolyza močoviny):
 - ✓ rychlosť katalyzované reakce: 3×10^4 /sec
 - ✓ reakní rychlosť: 3×10^{-10} /sec
 - ✓ zvýšení – 10^{14} krát!

Funkce enzym

- ✓ biokatalyzátory
- ✓ zv těší reakní rychlosť
- ✓ neovlivují reakní rovnováhu

Jak to dělá?

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



Funkce enzym

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

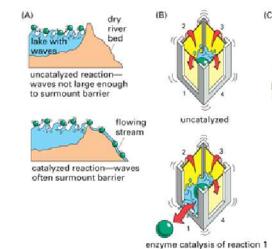
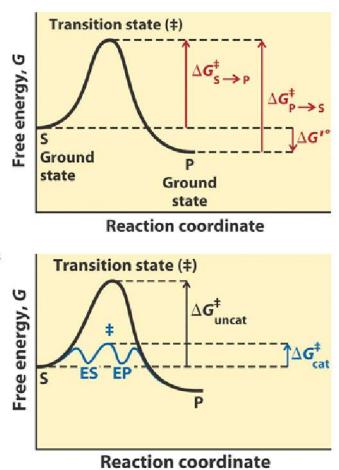
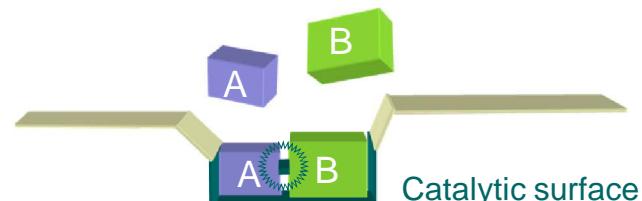


Figure 2-15 Essential Cell Biology, 2nd Ed. (© 2004 Garland Science)



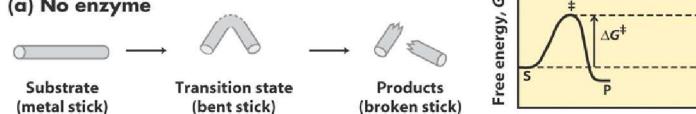
The Nature of Enzyme Catalysis

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

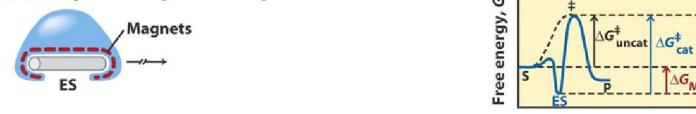


Juang RH (2004) BCbasics

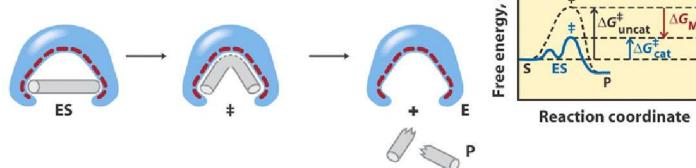
(a) No enzyme



(b) Enzyme complementary to substrate

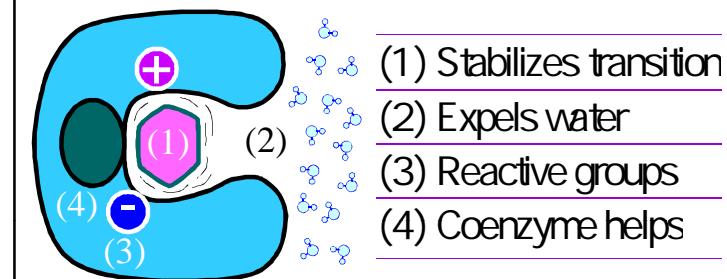


(c) Enzyme complementary to transition state



Active Site Is a Deep Buried Pocket

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



Juang RH (2004) BCbasics

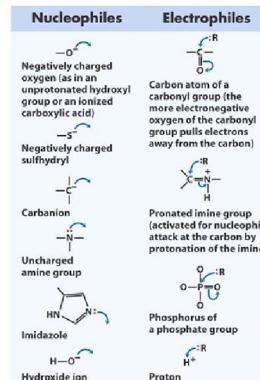
Reaktivní skupiny – "katalytické strategie"

- Acidobasická 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 ₂ H	R-NH ₃ ⁺
Cys	R-SH	R-S ⁻
His	R-C(=CH ₂)NH ₃ ⁺	R-C(=CH ₂)N(H) ⁺
Ser	R-OH	R-O ⁻
Tyr	R-C ₆ H ₄ -OH	R-C ₆ H ₄ -O ⁻

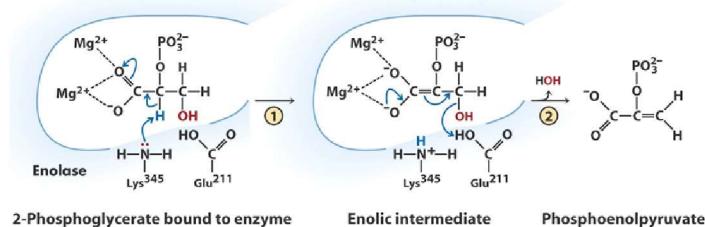
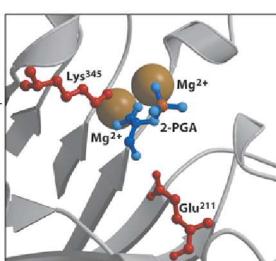
Reaktivní skupiny – "katalytické strategie"

- Acidobasická katalýza
- Kovalentní katalýza
- Kovové ionty
- Obvykle kombinace



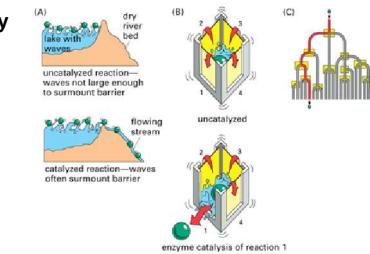
Enolasa

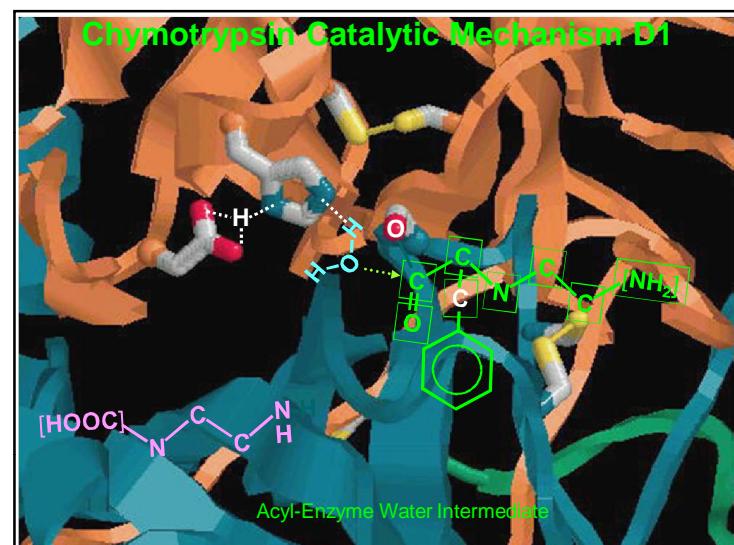
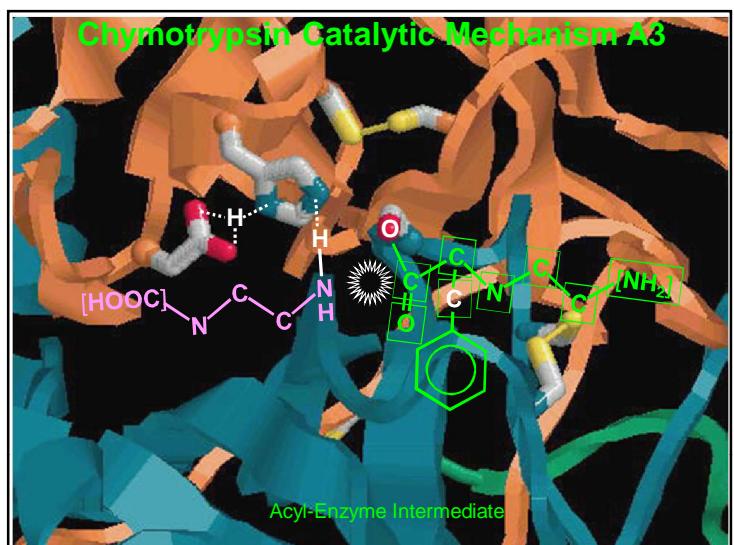
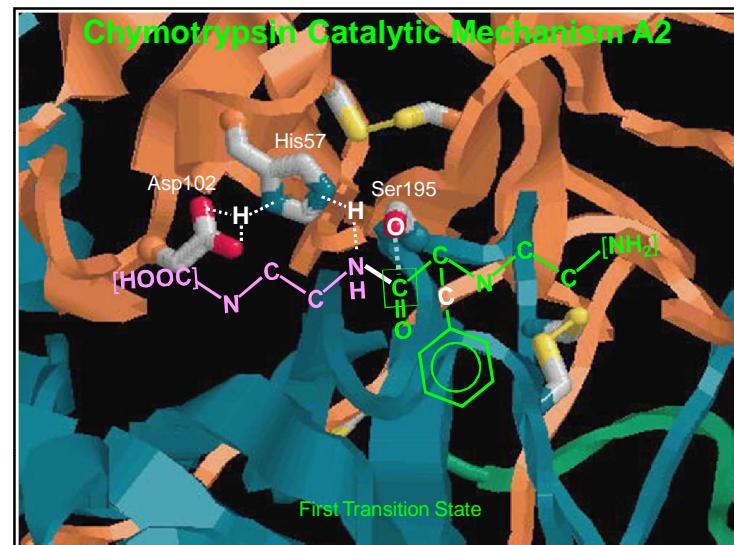
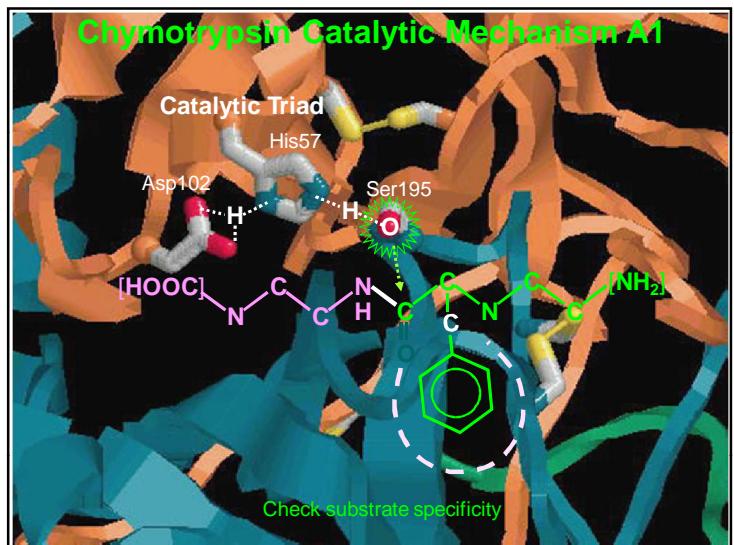
- Fosfopyruvát hydratáza
- EC 4.2.1.11
- adí se mezi lyázy
- Katalýza za účasti kovového iontu

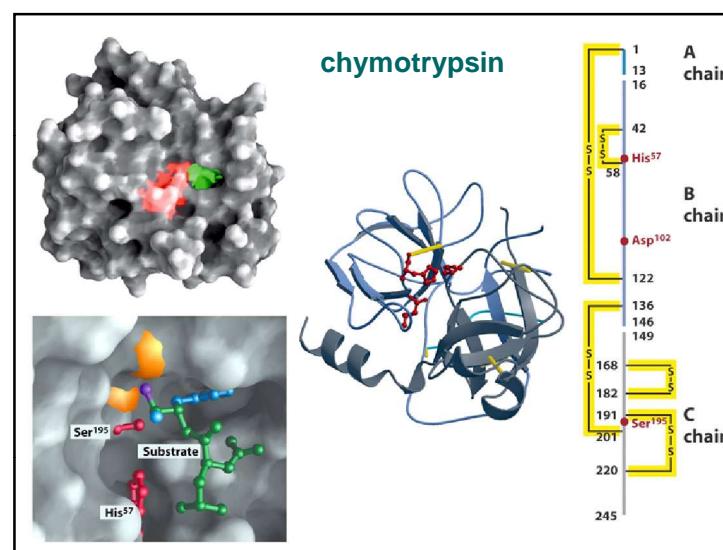
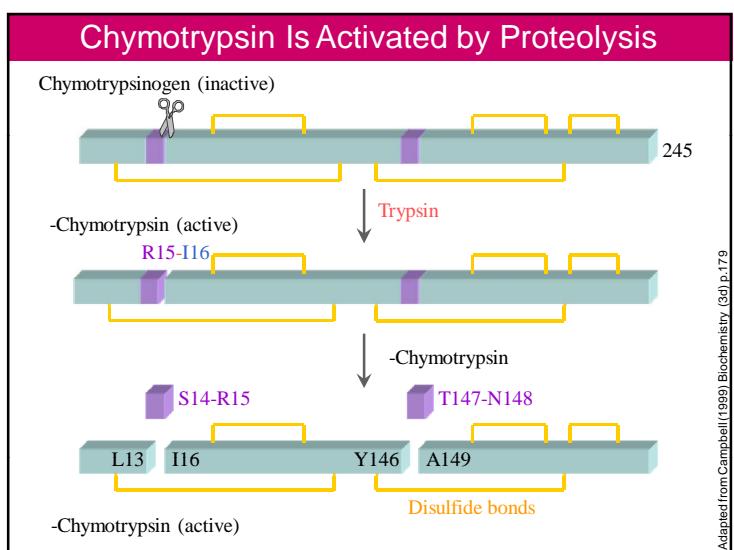
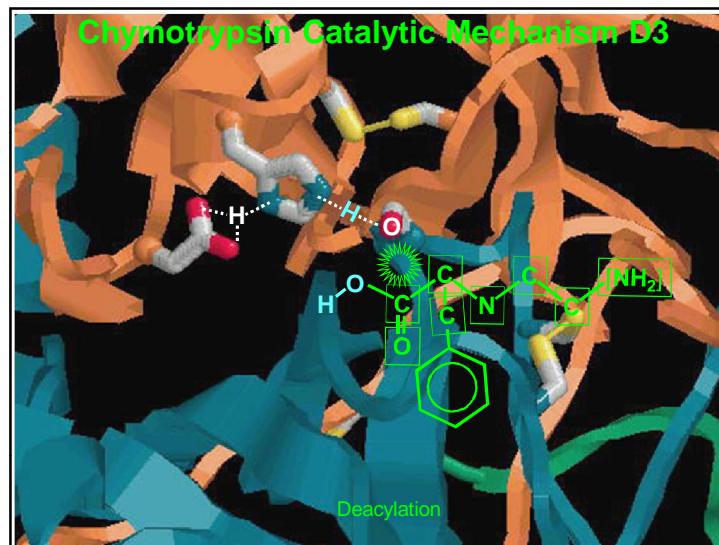
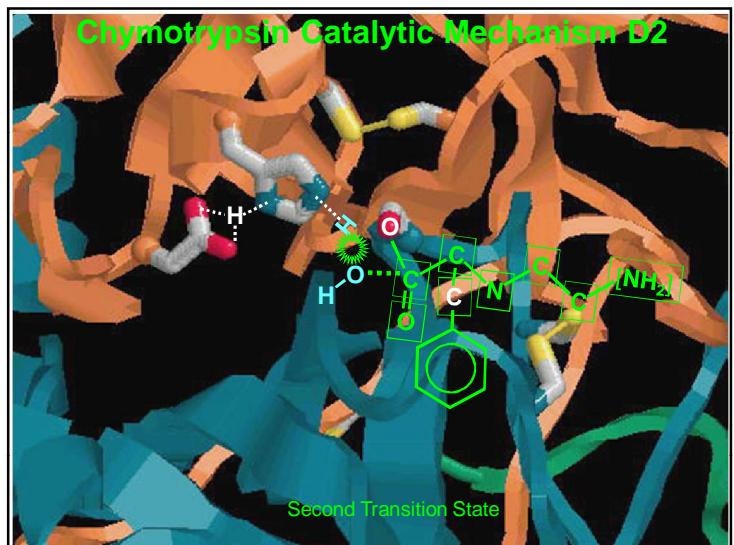


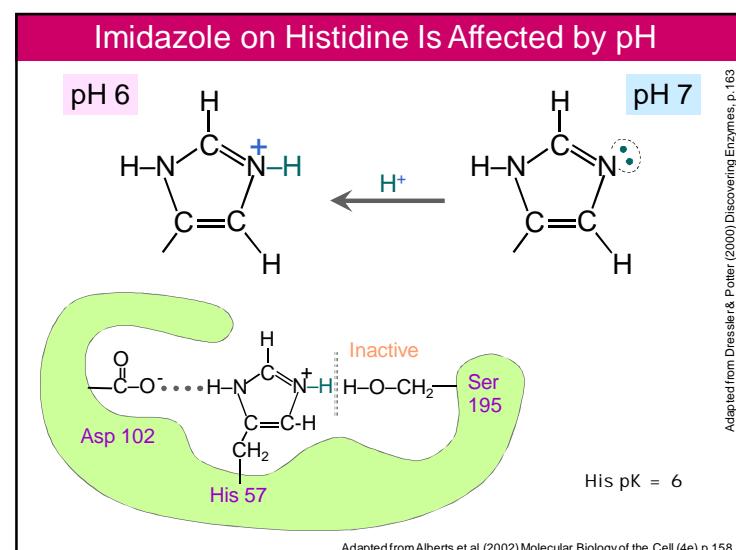
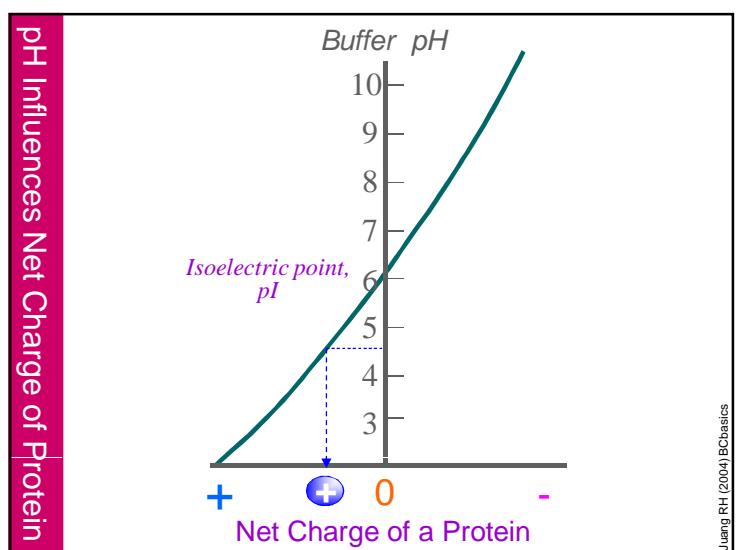
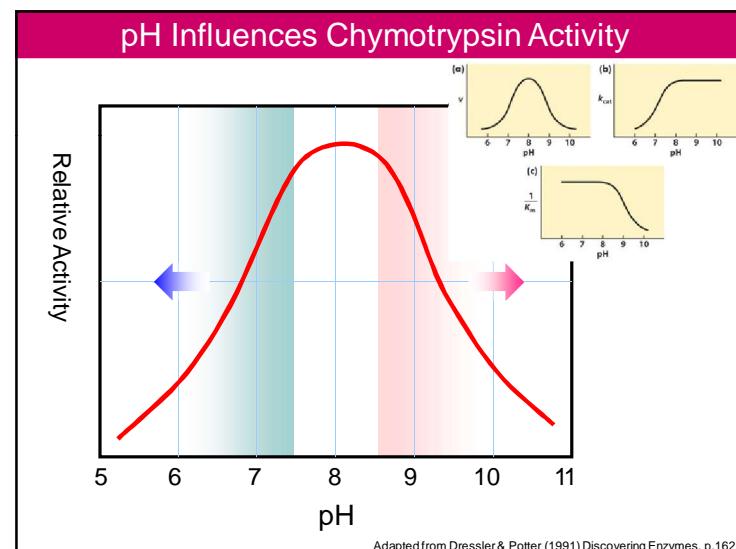
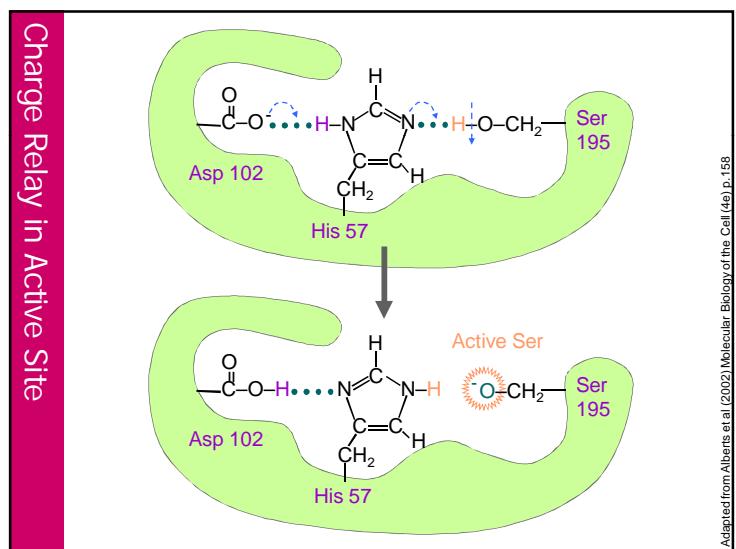
Chymotrypsin

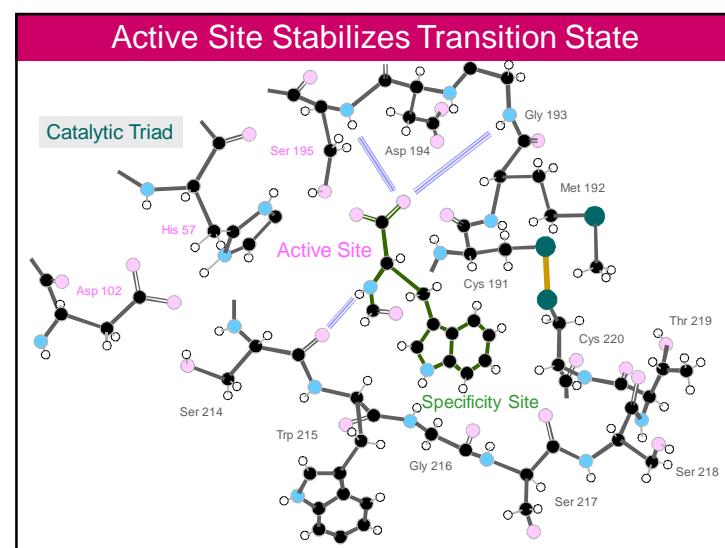
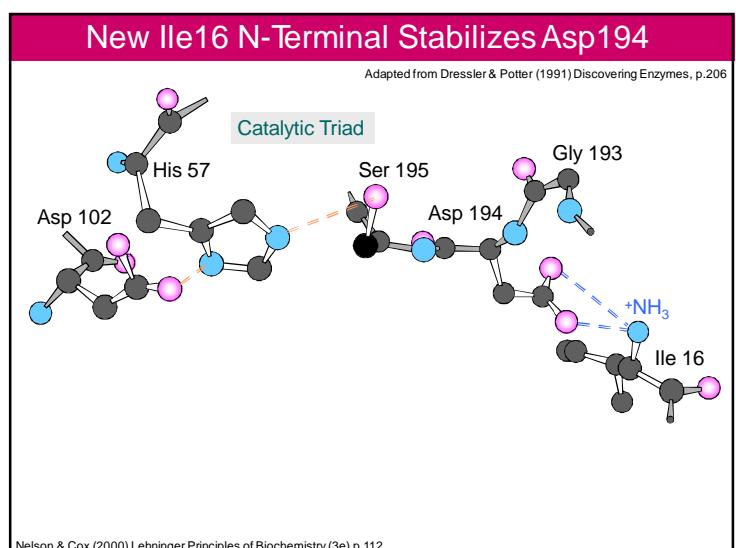
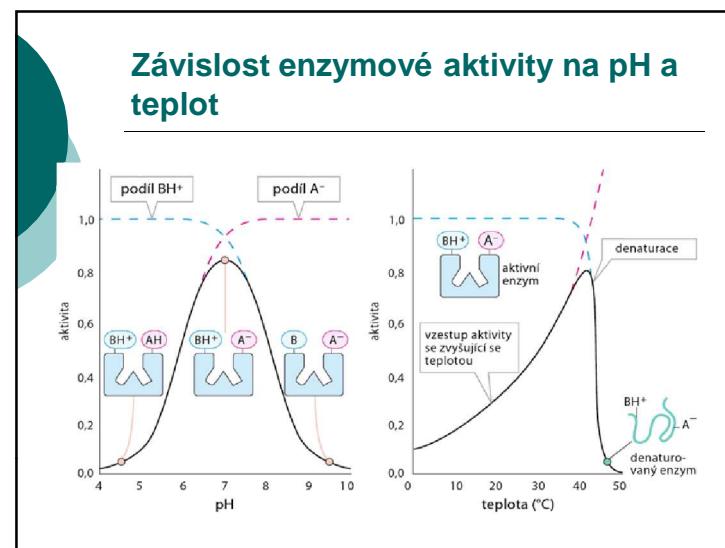
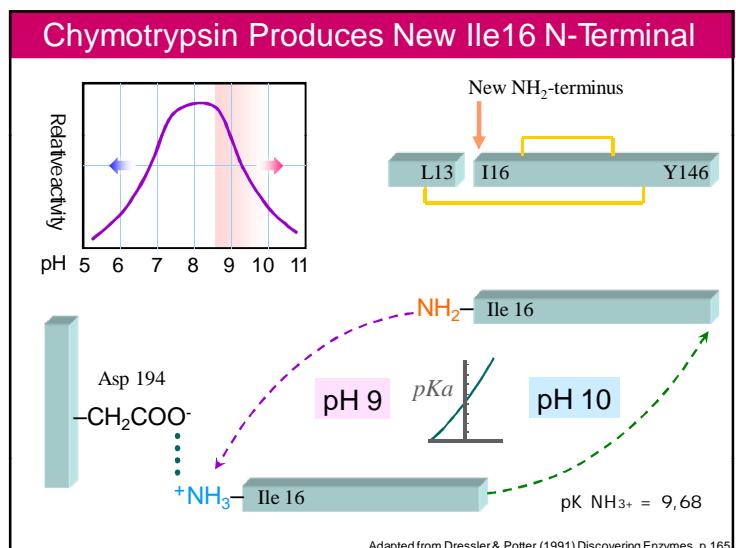
- ✓ EC 3.4.21.1
- ✓ demonstrace obecných principů fungování enzymu
- ✓ enzym štěpící peptidovou vazbu – specifita účinku
- ✓ selektivní snižování energetických barier
- ✓ aktivovaný proteolyticky
- ✓ substrátová specifita
- ✓ stereospecifita
- ✓ pH optimum

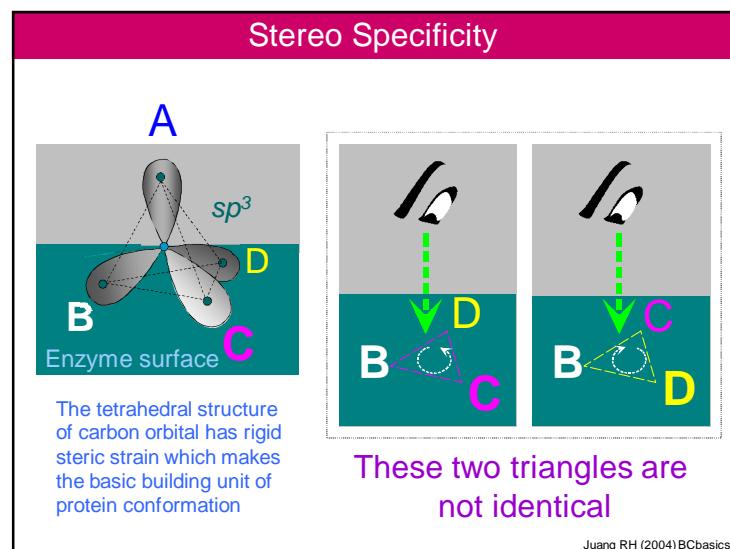
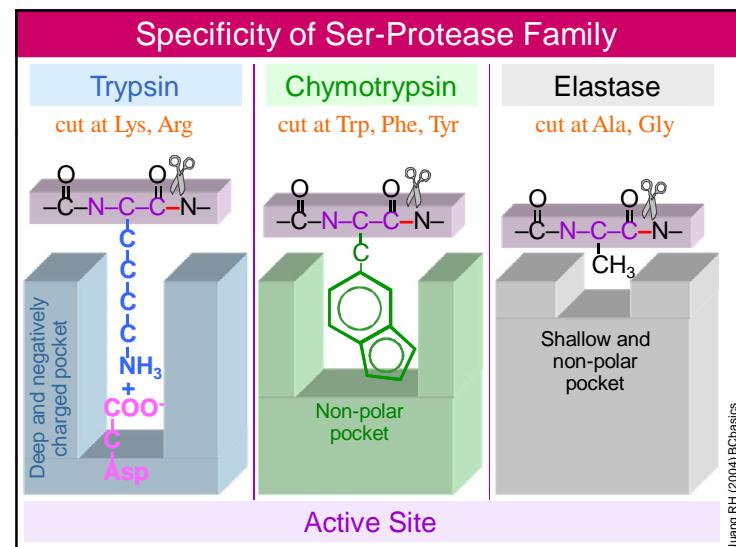
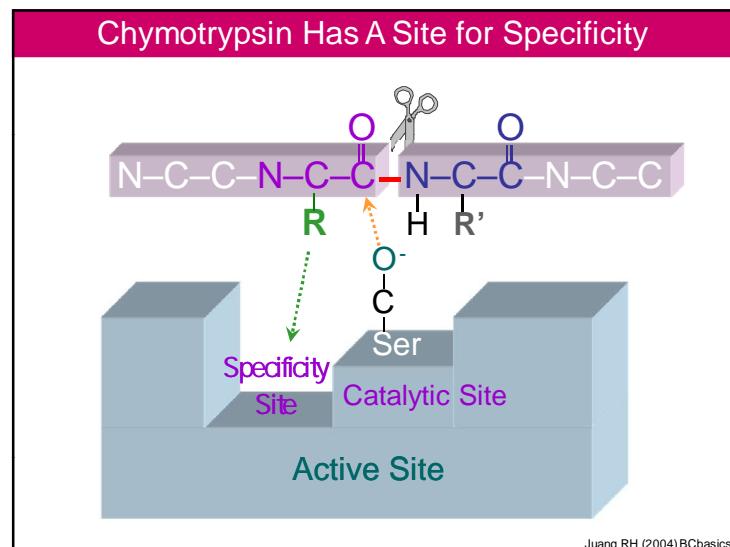












Kinetika enzymatických reakcí

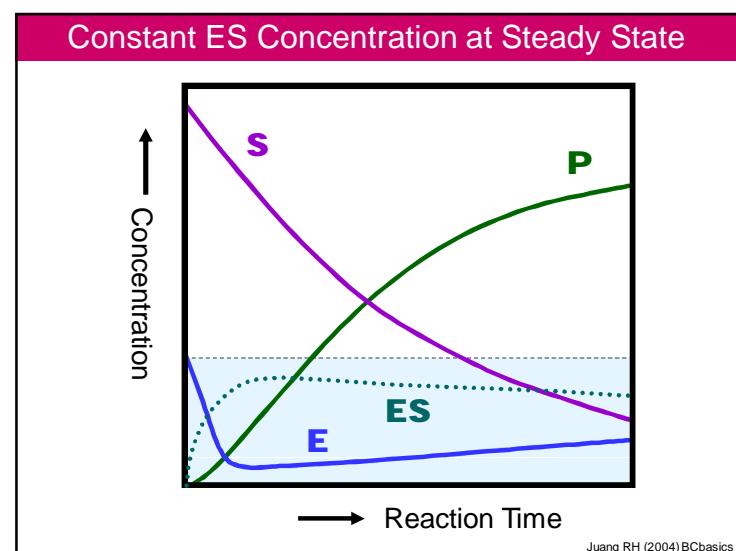
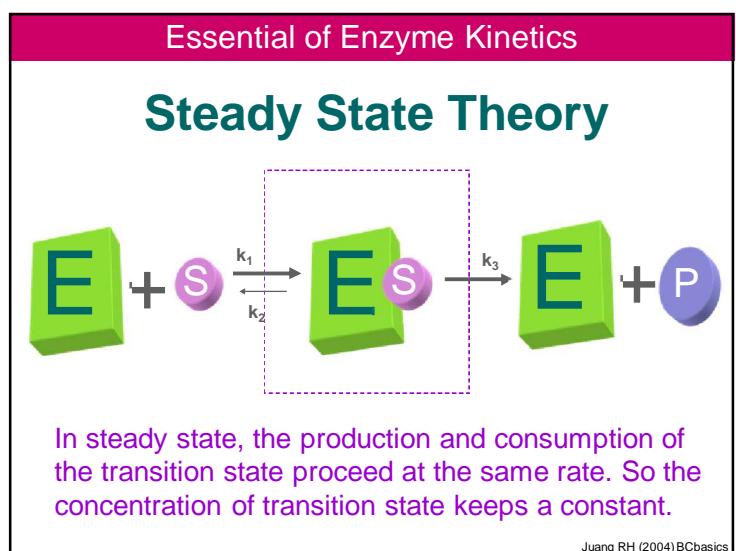
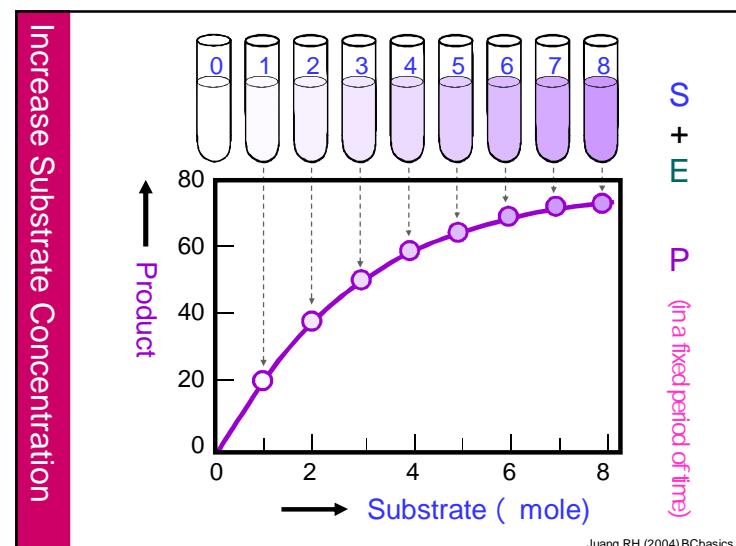
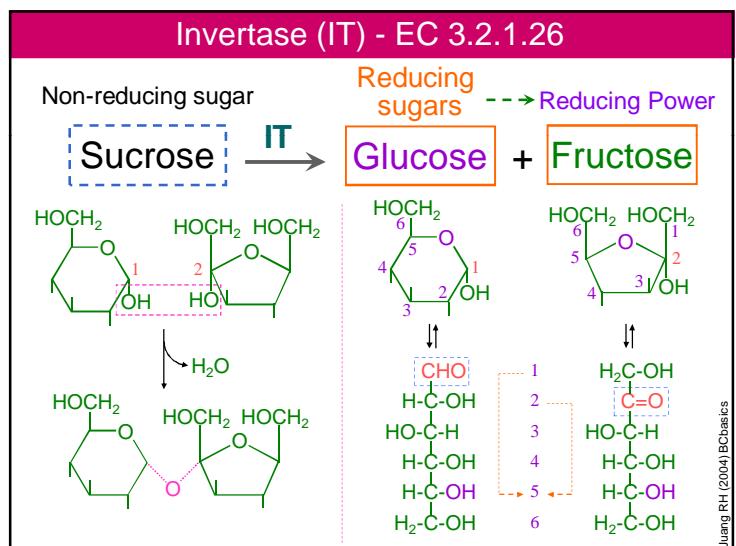
- ✓ invertasa jako příklad sledování enzymové aktivity
- ✓ kinetika Michaelise a Mentenové

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

- ✓ praktické příklady inhibice

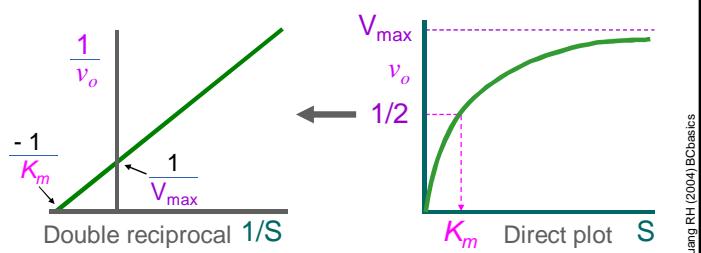
Leonor Michaelis
1875–1949

Maud Menten
1879–1960



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

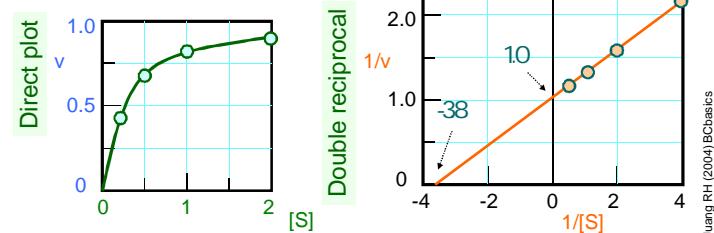


A Real Example for Enzyme Kinetics

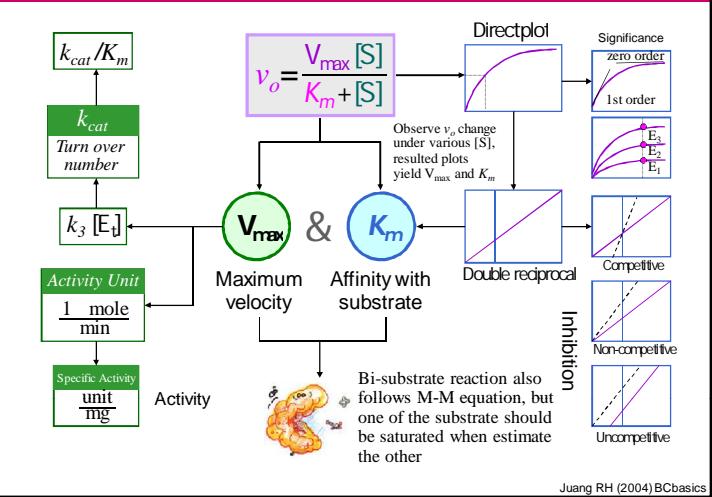
Data no	[S]	Absorbance	Velocity v (mole/min)	Substrate	Product	Velocity	Double reciprocal
				1/S	1/v		
1	0.25	0.21	0.42	4	2.08		
2	0.50	0.36	0.72	2	1.56		
3	1.0	0.40	0.80	1	1.35		
4	2.0	0.46	0.92	0.5	1.16		

(1) The product was measured by spectroscopy at 600 nm for 0.05 per mole

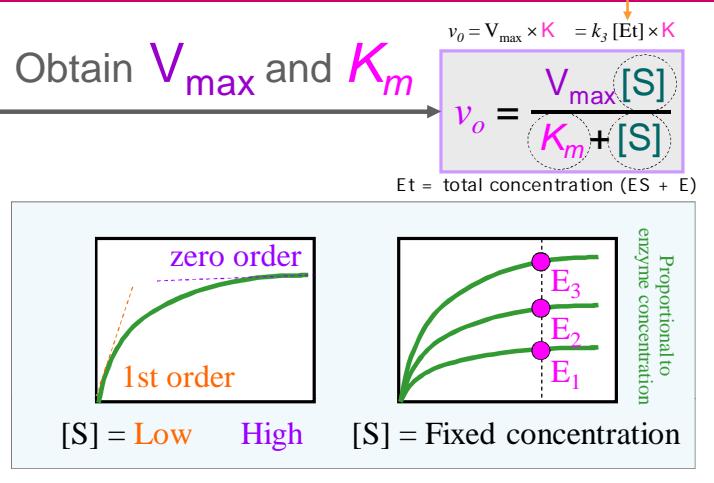
(2) Reaction time was 10 min



Enzyme Kinetics



Significance of Enzyme Kinetics



K_m : «Affinity» with Substrate

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

If $v_o = \frac{V_{max}}{2}$

When using different substrate

$\frac{V_{max} \times V_{max}}{2} = \frac{V_{max}^2}{K_m + [S]}$

$K_m + [S] = 2[S]$

$K_m = [S]$

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 ₂ C-OH	H ₂ C-OH	H ₂ C-OH	

$K_m = 8 \text{ } 8\ 000 \text{ } 5 \text{ } M$

Juang RH (2004) BCbasics

Turn Over Number, k_{cat}

$$E + S \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} ES \xrightarrow{(v_o)} E + P$$

When substrate excess, $k_3 = k_{cat}$ turn over number (t.o.n)

When [substrate] is low

$$v_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{k_3[E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m}$$

Start from M-M eq.
Omit the [substrate]
Substrate specificity

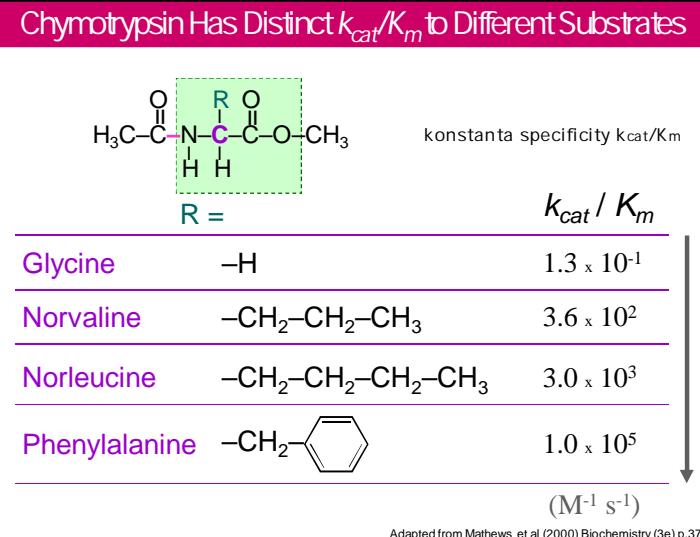
Juang RH (2004) BCbasics

Turn Over Numbers of Enzymes

Enzymes	Substrate	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$
Catalase	H_2O_2	40 000 000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	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



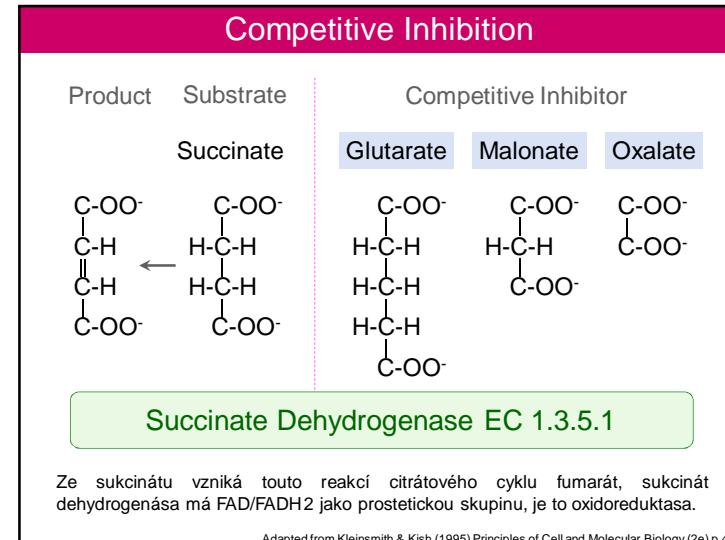
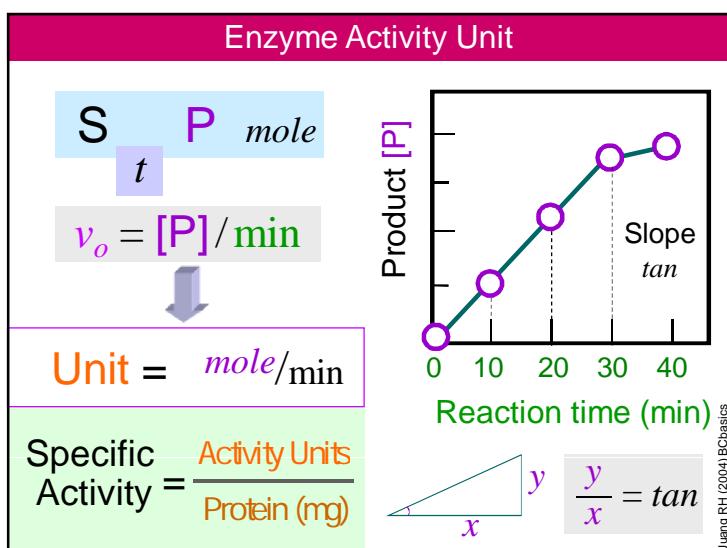
Katalytická účinnost enzym

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

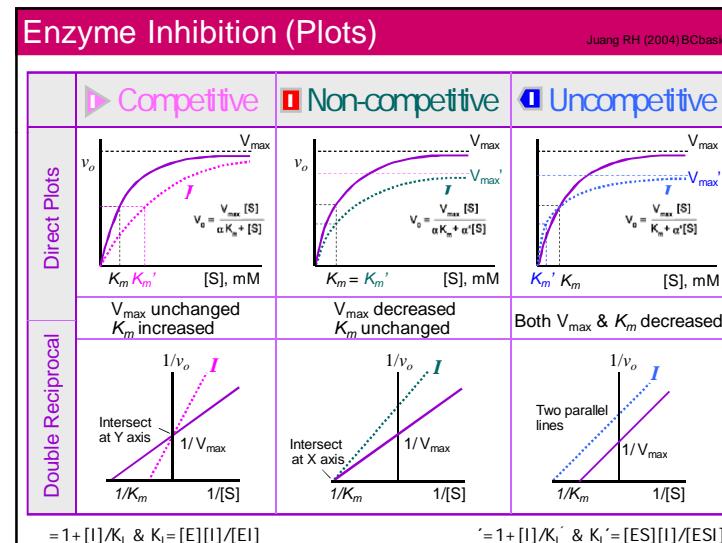
Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

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

Nejlepší cestou pro porovnávání katalytických účinností enzym je konstanta specificity k_{cat}/K_m



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



Inhibice

$= 1 + [I]/K_I \quad K_I = [E][I]/[EI]$
 $= 1 + [I]/K_I' \quad K_I' = [ES][I]/[ESI]$

- MM kinetika
- Kompetitivní inhibice
- Akompetitivní inhibice
- Smíšená inhibice
 - Nekompetitivní inhibice ($='$)

$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$
 $V_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + [S]}$
 $V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + \alpha'[S]}$
 $V_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]}$

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}	αK_m
Uncompetitive	V_{max}/α'	K_m/α'
Mixed	V_{max}/α'	$\alpha K_m/\alpha'$

Sulfa Drug Is Competitive Inhibitor

Domagk (1939)

Para-aminobenzoic acid (PABA)

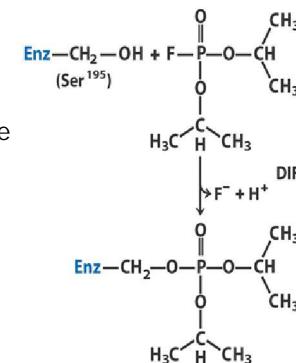
Precursor → → → → → Folic acid → → Tetrahydro-folic acid

Bacteria needs PABA for the biosynthesis of folic acid

Sulfanilamide
Sulfa drug (anti-inflammation)

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

Irreversibilní inhibice



Energetické sprážení

✓ $\text{glc} + \text{P}_i \rightarrow \text{glc-6-P}_i + \text{H}_2\text{O}$
 $(\Delta G_1 = 13,8 \text{ kJ/mol - tj. endergonická})$

✓ $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$
 $(\Delta G_2 = -30,5 \text{ kJ/mol - tj. exergonická})$

Figure 3-17: Essential Cell Biology, 2nd (© 2004 Garland Science)

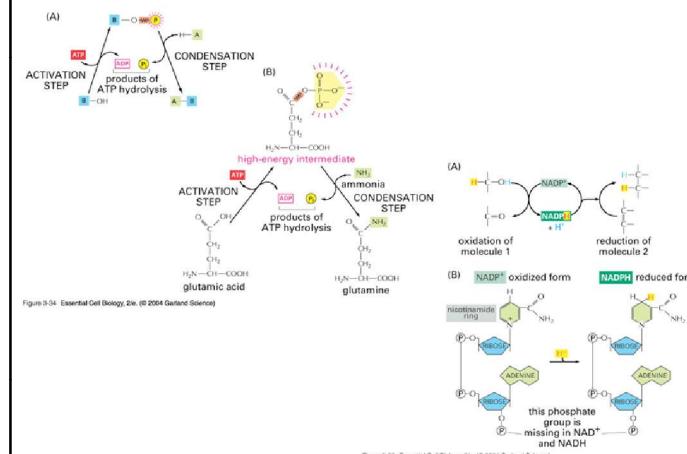
Figure 3-18: Essential Cell Biology, 2nd (© 2004 Garland Science)

✓ $\text{glc} + \text{ATP} \rightarrow \text{glc-6-P}_i + \text{ADP}$
 $(G = G_1 + G_2 = -16,7 \text{ kJ/mol})$

$K_1 = 3,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$
 $K_2 = 2,10^5 \text{ M}$
 $K = 7,8 \cdot 10^2$

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

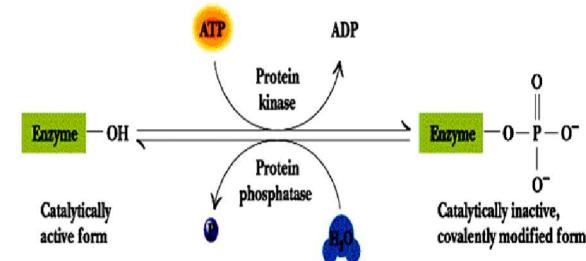
Energetické sprážení



Regulace enzymové aktivity

- Kinetika Michaelise a Mentenové
- Genetická regulace (indukce versus represe)
- Kovalentní modifikace
 - ✓ Kinasy, fosfatasy
 - ✓ Zymogeny, proproteiny, proenzymy
- Modulátory
- Allosterická regulace

Kovalentní modifikace (1)



Transferasy

Protein kinasa a protein fosfataza – změna formy enzymu – aktivní versus inaktivní
V tomto případě je fosforylovaný enzym inaktivní, ale u některých enzymů to může být naopak.

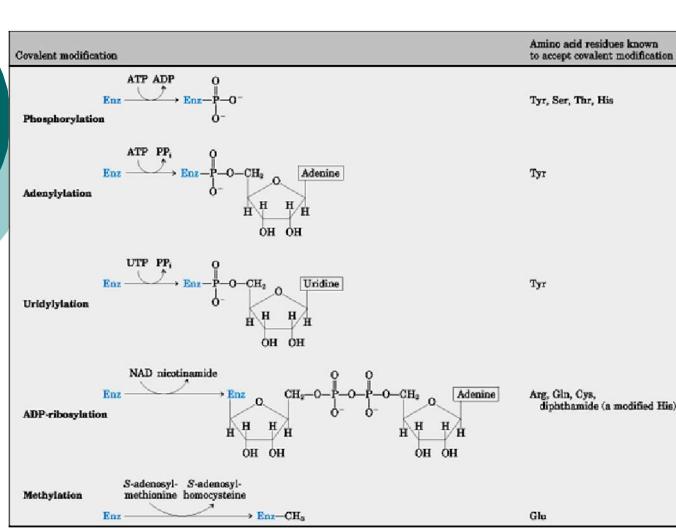
Proč je fosforylace tak efektivní způsobem regulace aktivity proteinů? (1)

1. Fosfát vnáší do molekuly proteinu dva negativní náboje. Při vodní elektrostatické interakce jsou rušeny a vznikají nové. Modifikuje vazbu substrátu, ATP.
2. Fosfátová skupina může tvořit i nebo více vodíkových vazeb. Geometrie fosfátových skupin dává rámci vodíkovým vazbám jednoznamenný smysl.
3. Volná energie fosforylace je vysoká (~ -50 kJ/mol). Fosforylace tak podstatně posunuje konformaciální rovnováhu mezi různými funkčními stavami.

Proč je fosforylace tak efektivní způsobem regulace aktivity proteinů? (2)

4. Fosforylace a defosforylace probíhají obvykle v krátkých časech než sekunda, reaguje se tak rychle na fyziologickou potřebu.
5. Fosforylace obvykle vede k podstatnému zvýšení rychlosti. Kinasa rychle fosforyluje velké množství proteinů.
6. Použití ATP je spojeno s energetickým stavem buňky.

Kovalentní modifikace (2)



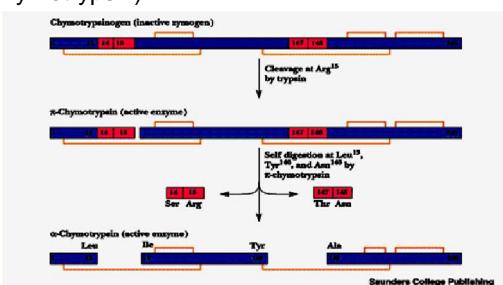
Kovalentní modifikace (3)

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
Myristylation	Myristoyl CoA	Src	Signal transduction
ADP-ribosylation	NAD	RNA polymerase	Transcription
Farnesylation	Farnesyl pyrophosphate	Ras	Signal transduction
γ -Carboxylation	HCO_3^-	Thrombin	Blood clotting
Sulfation	3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate	Fibrinogen	Blood-clot formation
Ubiquitination	Ubiquitin	Cyclin	Control of cell cycle

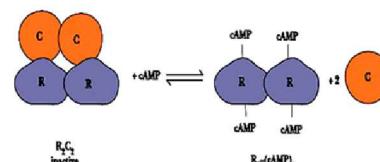
Zymogeny

- **zymogeny** – neaktivní v těle prekurzory proteolytických enzymů
 - **proenzymy** – prekurzory enzymů
 - zymogeny získají specifickou aktivitu pouze jsou-li specifický rozdíl mezi 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, ímž se protein stane aktivním.

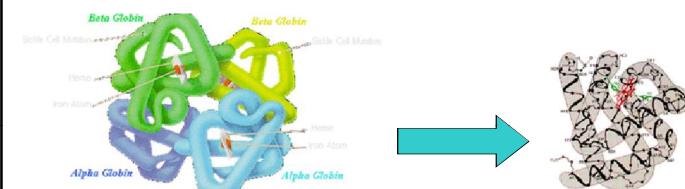


Allosterické proteiny (enzymy)

- Inhibice nadbytkem substrátu
- Odchylky od Michaelis-Menten hyperbolické kinetiky
- Df. protein obsahující dv. (i více) topologicky r. zná vazebná místa, která navzájem interagují
- Kooperativita (positivní i negativní) je modifikace vazebné konstanty substrátu p edchozím navázáním jiné molekuly
- Homotropní versus heterotropní efektor (modulátory)
- Sigmoidní pr. b. h. enzymové kinetiky
- Existence efektor, modulátor (aktivátory vs. inhibitory)
- Dvojfázová odpov. na kompetitivní inhibitory
- Ztráta allosterických vlastností i p. slabé denaturaci
- Kvaterní struktura

Kvaterní struktura – ztráta allosterických vlastností

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



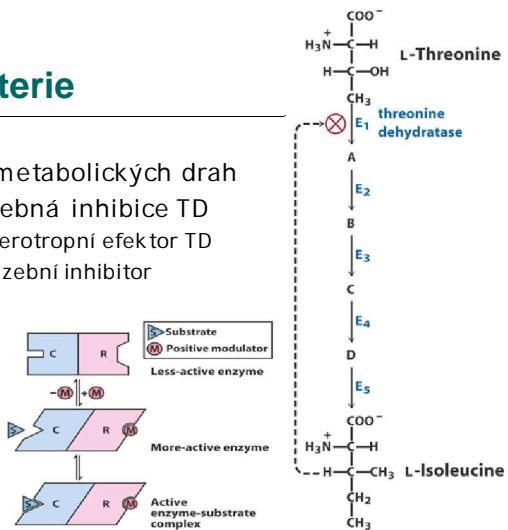
Allosterie

- Regulace metabolických drah
- Zp. tnovazebná inhibice TD
 - Ile je heterotropní efektor TD
 - Zp. tnovazební inhibitor

EC 4.3.1.19

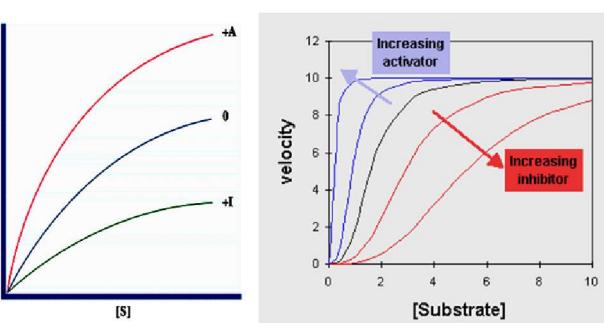
threonin dehydratáza (TD)

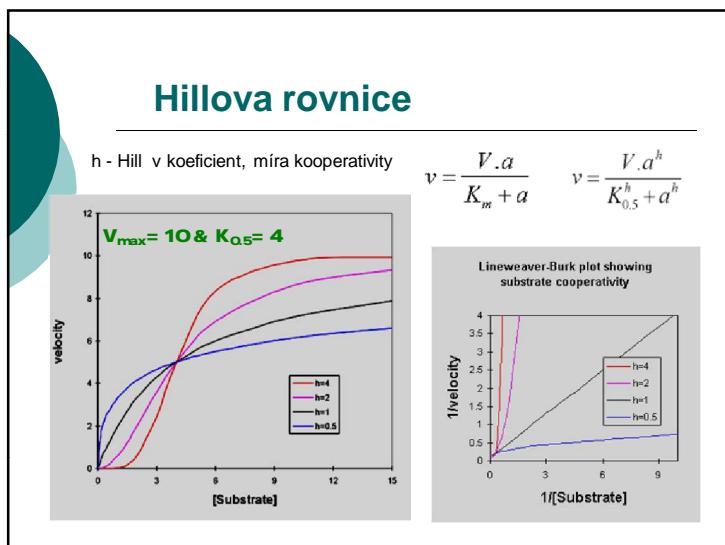
threonin ammonium-lyasa



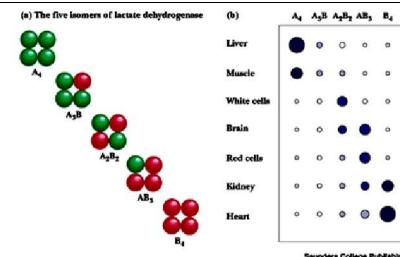
Kinetika & allosterické efekty

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

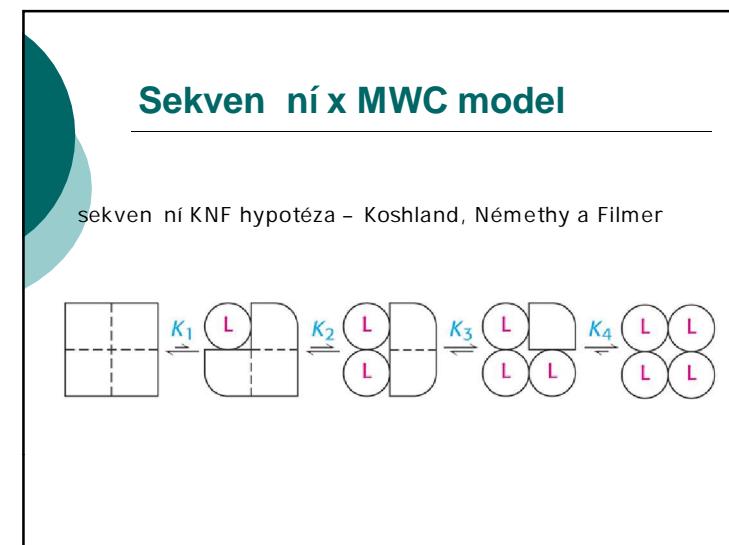
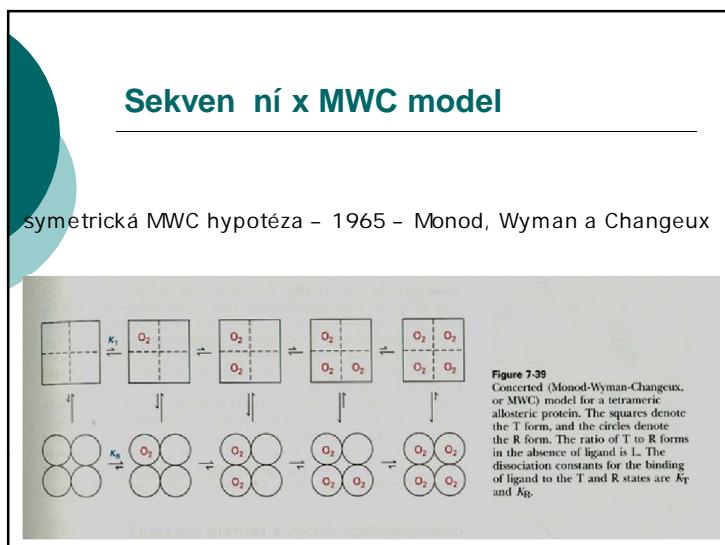


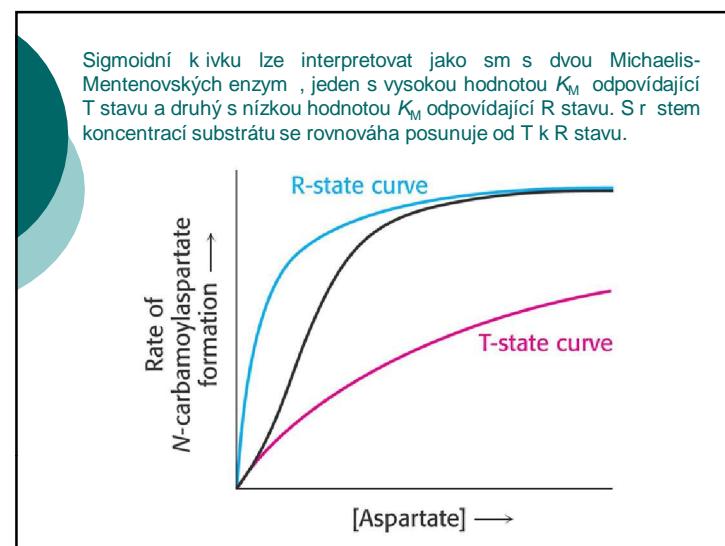
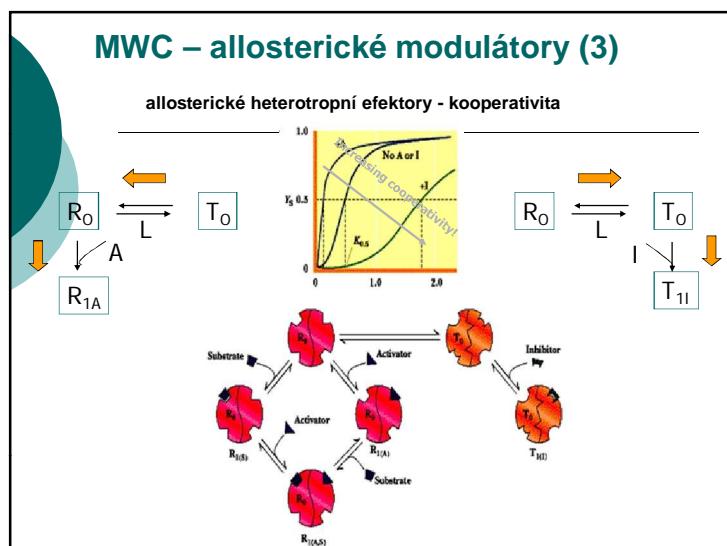
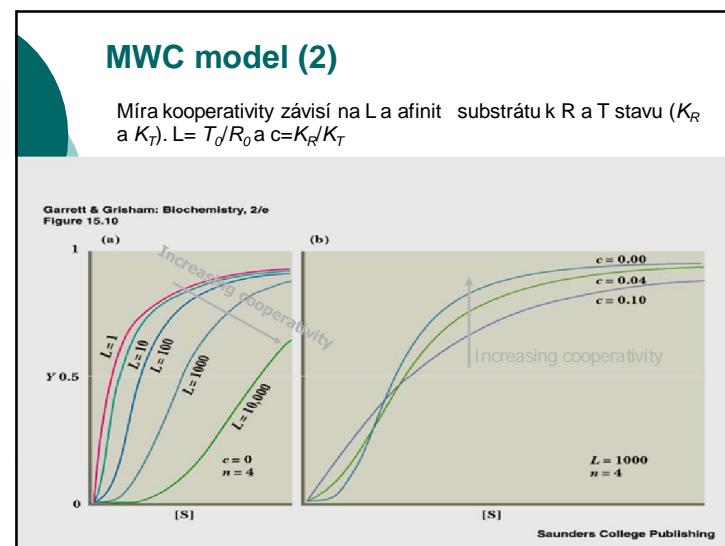
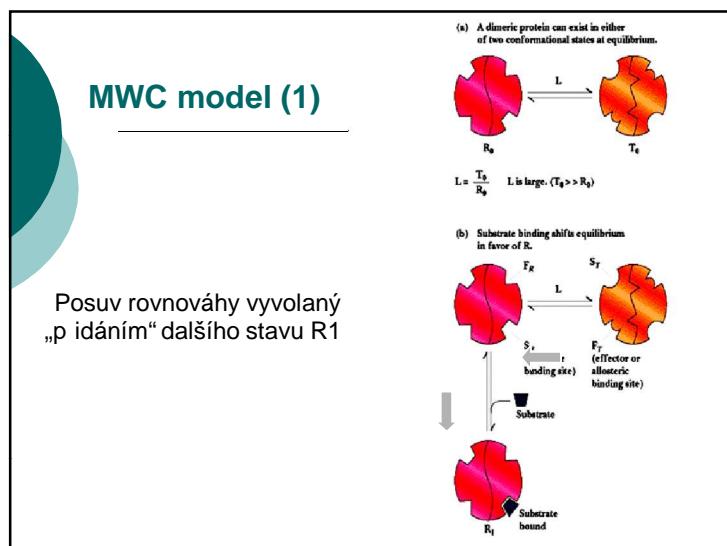


Isoformy enzym



- odlišné kvarterní formy jednoho enzymu; rzné izozymy, jejichž tvorba je regulována
- 5 izozym - nap. laktát dehydrogenáza (LDH) - podílející se na pěti pyruvátu na laktát u posledního kroku spalování glukózy v buňkách za nepřítomnosti kyslíku.





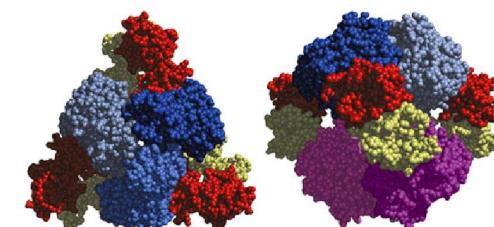
Típíklady allosterických protein

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

Aspartate Transcarbamoylase

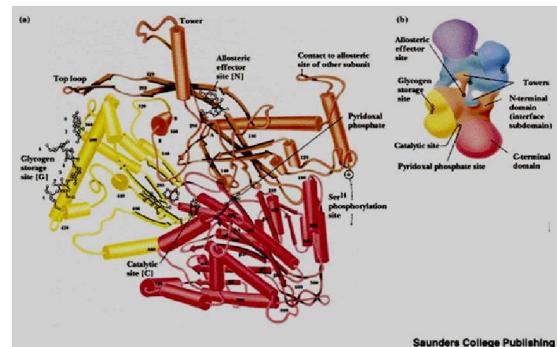
EC 2.1.3.2

- 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.



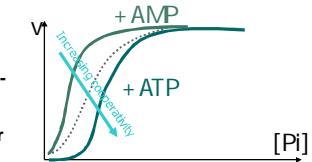
Glykogen fosforyláza (GP)

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



Glykogen fosforyláza – modulátor aktivity

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

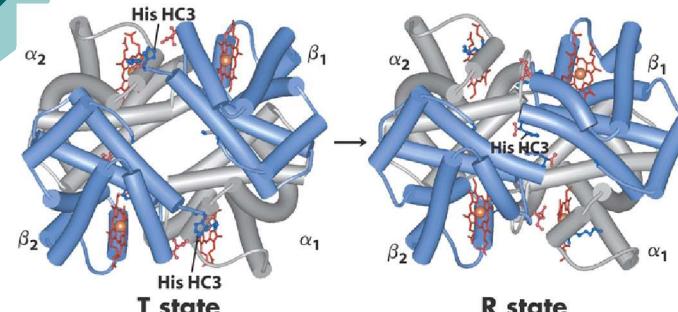


Hemoglobin – p ipomenutí...

- Ligand – substrát
- Vazebné místo pro ligand – aktivní místo
- Transport kyslíku do tkání:
 - Rozpustnost a difuze O₂?
 - Vazba O₂ na protein – AA?
- Železo/m – toxicita (oxidativní poškození)
- Hem
- Protoporfyrin
- Myoglobin vs. hemoglobin

T R p echod

T stav (tense) - stabilní a p evládající konformace deoxyhemoglobinu s výším po ten solných m stk . **R stav (relaxed)** – má signifikantn vyšší afinitu ke kyslíku a navíc vazba kyslíku stabilizuje R stav.

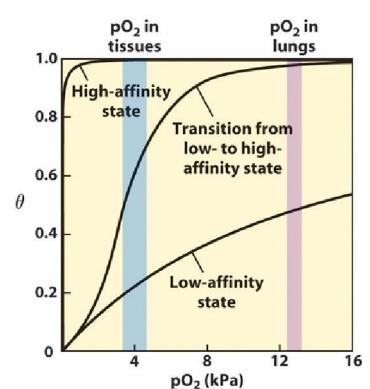


Kooperativita vazby kyslíku na hemoglobin

- Hillova rovnice

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

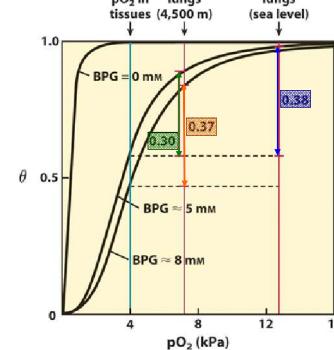
Parciální tlak kyslíku v plících je cca 13,3 kPa, zde hemoglobin váže kyslík nejlépe, p parciálním tlaku kolem 4 kPa – dochází k uvolení kyslíku v tkáních.

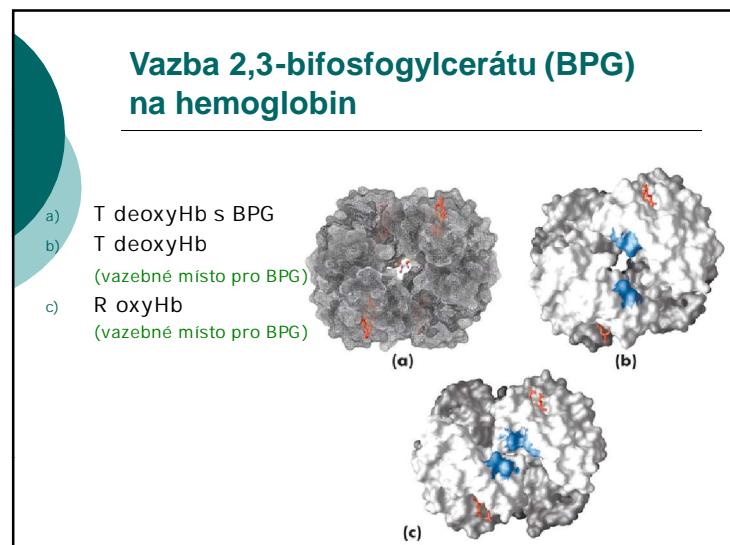


Regulace 2,3-bifosfoglycerátem (BPG)

- Aklimatizace ve vyšších nadmo ských výškách
- Normální hladina – 5 mM

Molekula BPG se váže do kavity mezi beta podjednotkami v T stavu. BPG snižuje afinitu Hb ke kyslíku stabilizuje T stav. BPG má d ležitou roli b hem vývoje plodu. Fetální hemoglobin musí mít vyšší afinitu ke kyslíku než mat in – gama podjednotky místo beta.





- ### Vitaminy a koenzymy
- ✓ malé organické molekuly nezbytné pro vyšší organismy
 (pot eba - g-mg)
 - ✓ slouží stejnemu účelu ve všech org., ale vyšší org. ztratily schopnost jejich syntézy
 - ✓ nap. *E.coli* vs. *H.sapiens*
 - rozdíl 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 (fyllochinon)

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 K₁

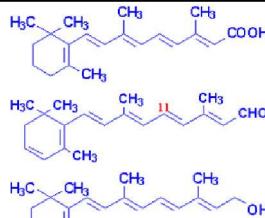
Vitamin A (Retinol)

Vitamin E (α-Tocopherol)

Vitamin D₃ (Calciferol)

Vitamin A

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



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

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

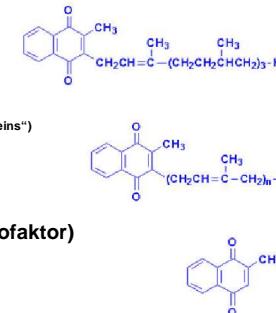
- ✓ hypovitaminóza (jen po dlouhodobém nedostatku – játra):
- ✓ šeroslepost (oslepnutí), zvýšené riziko rakoviny a anemie
- ✓ hypervitaminóza

Vitamin K

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

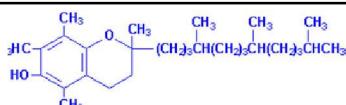
- ✓ posttranskriptivní modifikace
 - karboxylace specifických Glu

(vitamin K – kofaktor)



- ✓ K1 – fylochinon (zelené rostliny)
- ✓ K2 – menaquinon (intestinální bakterie; n=6, 7 i 9)
- ✓ K3 – syntetický menadione (v org. alkylace K1 i K2)
- ✓ deficiency – u dospívajících zádka (K2 – antibiotika!), u novorozenců – hemoragický syndrom

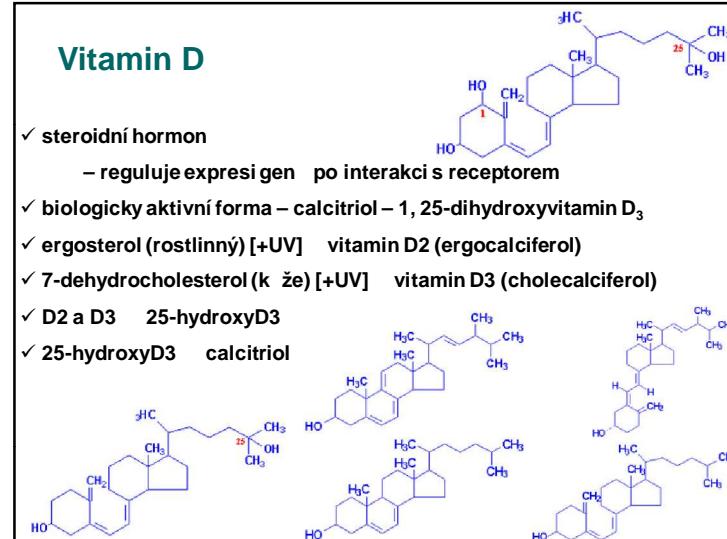
Vitamin E



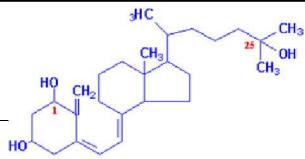
- ✓ směs tokoferolů – nejúčinnější -tokoferol
- ✓ příjem potravou – chylomikrony
- ✓ přirodní antioxidant – odstraňuje volné radikály a molekulární kyslík
- ✓ zabírá zejména peroxidaci polynenasycených MK
- ✓ regenerace – interakcí s vitamínem C i vyloučení žlučí
- ✓ v našich podmírkách je hypovitaminóza velmi vzácná...

Vitamin D

- ✓ steroidní hormon
 - reguluje expresi genů po interakci s receptorom
- ✓ biologicky aktivní forma – calcitriol – 1,25-dihydroxyvitamin D₃
- ✓ 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 – krevnice (u dítětí), osteomalacie (malnutření kostí u dospělých)
- ✓ v našich podmírkách se prakticky nevyskytuje



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

Vitaminy a koenzymy

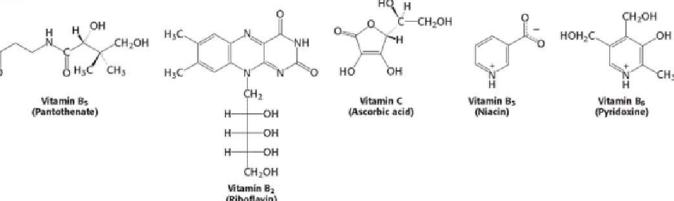
vitaminy rozpustné ve vodě – ažto prekury koenzym

Table 8.9 Water-Soluble Vitamins

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

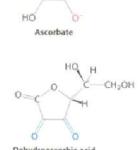
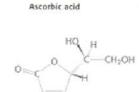
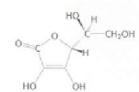
© 2002 by W.H. Freeman and Company.

Vitaminy a koenzymy



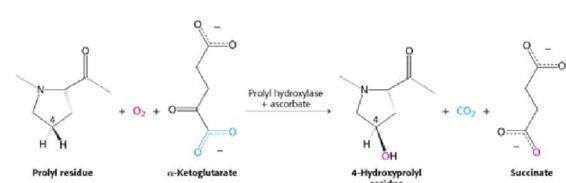
Vitamin C

- ✓ syntéza z glc. (NE u primát, mor at, kalo, pták ...)
- ✓ kyselina askorbová – redukční inidlo – antioxidant
- ✓ redukuje O₂, nitráty, cytochromy A a C (regenerace)



✓ nezbytný pro:

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



Vitamin C

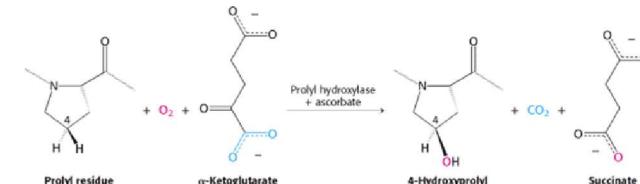
- ✓ nedostatek vitamínu C – kurd je (skorbut)

– podkožní hemoragie, svalová slabost, kůže huká, zdušené dásny, vypadávanie zub

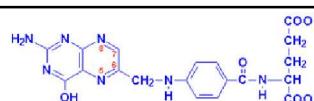
- ✓ hydroxyprolin stabilizuje triple-helix kolagenu

- ✓ Jacques Cartier (1536) – popis príznak

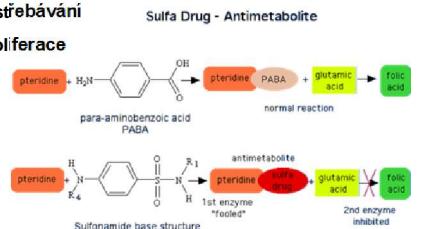
Some did lose all their strength, and could not stand on their feet. . . . Others also had all their skins spotted with spots of blood of a purple colour: then did it ascend up to their ankles, knees, thighs, shoulders, arms, and necks. Their mouths became stinking, their gums so rotten, that all the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



Kyselina listová – B₉



- ✓ živočichové nejsou schopni syntetizovat PABA (paraminobenzoová kyselina) i spojovat Glu-pteridin
- ✓ sulfonamidy – antivitamíny (antimetabolity)
- ✓ nedostatek – megaloblastická anémie, makrocytická anémie (tvorba erythrocytů)
- ✓ chronicky alkoholici, poruchy vstřebávání
- ✓ v těhotenství vyšší příjem – proliferačné

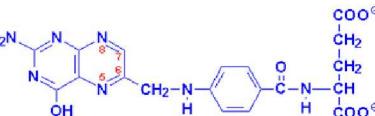


C. Doherty, c. 2002

Kyselina listová – B₉ (folacin)

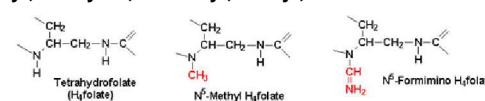
- ✓ aktivní forma – tetrahydrofolát

(H₄-folát)



- ✓ přenos skupin:

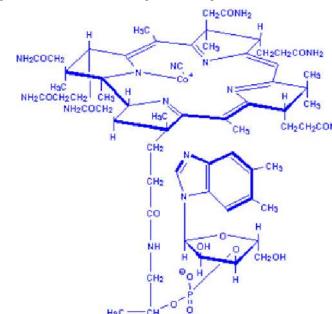
methyl, methylene, methenyl, formyl, formimin



Biosyntéza Ser, Met, Gly, cholinu, purinových nukleotidů, dTMP

Vitamin B₁₂ - kobalamin

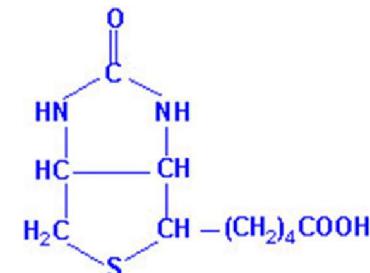
- ✓ korinový kruh – koordinace kobaltu
- ✓ syntetizován výlu n mikroorganismy, skladován v játrech
- ✓ koenzym methylmalonyl-CoA mutasy a methionin synthasy
- ✓ metabolismus MK a AA
- ✓ v játrech zásoba až na 6 m síc
- ✓ megaloblastická anemie



Biotin

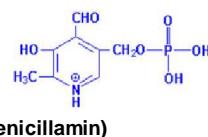
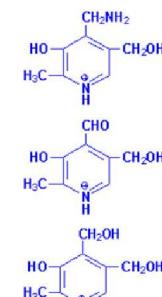
- ✓ hojn rozší en v potrav + syntetizován st evními bakteriemi
- ✓ nedostatek – z idka, s výjimkou dlouhodobého užívání antibiotik i nadm rné konzumace syrových vajec (bílek – avidin)

- ✓ koenzym karboxylas



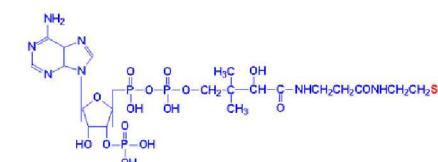
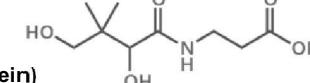
Vitamín B₆

- ✓ pyridoxal, pyridoxamin a pyridoxin
- ✓ aktivní forma – pyridoxal fosfát
(konverze - pot eba ATP)
- ✓ koenzym enzym v metabolismu AA
(transamina ní reakce)
- ✓ pot eba závislá na množství konzumovaných protein (1,4-2,0 mg/den)
- ✓ zvýšená spot eba b hem laktace a t hotenství
- ✓ projevy nedostatku vzácné (alkoholici)
- ✓ nedostatek vyvolaný interakcí s léky (isoniazid, penicillamin)



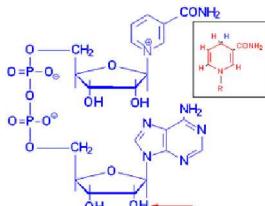
Vitamín B₅ – kyselina pantothenová

- ✓ -alanin + kyselina pantoová
- ✓ sou ást CoA a ACP (Acyl Carrier Protein)
- ✓ cca 70 enzym pot ebuje CoA i ACP jako koenzym
- ✓ v potrav rozší ena (celozrnné obiloviny, maso, zelenina)
- ✓ nedostatek – jen vzácn



Vitamín B₃ - niacin

✓ kyselina nikotinová a nikotinamid

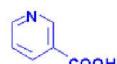


✓ aktivní forma NAD⁺ i NADP⁺

✓ koenzymy mnoha oxidoreduk. ních enzym

✓ striktn. vztato nejde o vitamín (neú. inná syntéza z tryptofanu)

✓ projevy nedostatku:



✓ pellagra (váhový úbytek, dermatitidy, deprese a demence)

– populace odkázané na kukuici (chudá na niacin), léky

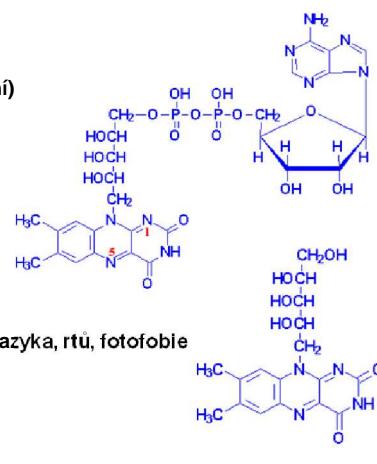
✓ kyselina nikotinová – snižuje hladinu cholesterolu v krvi

(snižení tvorby VLDL - very-low-density lipoprotein a LDL - low density lipoprotein)

Vitamín B₂ - riboflavin

✓ isoalloxazin + ribitol

(termostabilní, fotonestabilní)



✓ FAD, FMN – flavoproteiny

✓ redoxní reakce

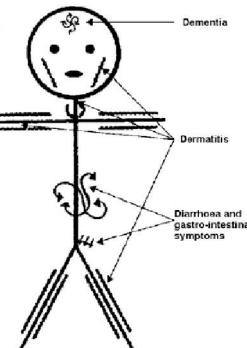
✓ 1,2 – 1,7 mg/den

✓ projevy nedostatku – alkoholici

✓ nedostatek – nezhoubný: zánět jazyka, rtů, fotofobie

Pelagra

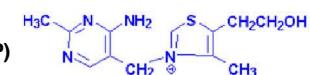
- ervené / lombardské malomocenství
- italsky - *pelle agra* znamená doslova "drsná kůže".
- velká citlivost na světlo, agresivita, nespavost, slabost, vypadávání vlasů, prýsky, silná ataxie, poruchy srdečního rytmu a také demence, a hlavně edevším rozsáhlé ervené vyrážky. U neléčené pellagry nastává smrt v těsnou za ty i až před třetí.
- forma avitaminózy, způsobená nedostatkem niacínu (vitamin B₃) a proteinů (zejména proteinů obsahujících tryptofan) v potravách
- Tryptofan (který má zdroj značného niacínu) je obsažen především v mase, vejcích a také v sóji



Vitamín B₁ - thiamin

✓ aktivní forma – thiamidinpyrofosfát (TPP)

✓ pyrimidin + thiazol + methylenový můstek



✓ koenzym – pyruvát a -ketoglutarát dehydrogenas a transketolas

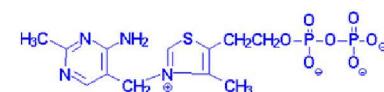
✓ projevy nedostatku – redukce produkce energie buňek

✓ beri-beri (hodně sacharidů málo TPP)

✓ výpraprost, anorexie, otoky, svalové a nervové degenerativní změny

✓ Wernickeho encefalopathie (u alkoholiků)

✓ zdroj neloupaná zrna a maso



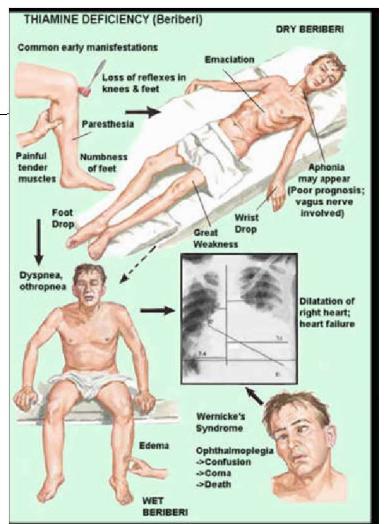
Beri-beri

onemocní způsobené nedostatkem thiaminu - vitaminu B₁

mokrá beri-beri zasahuje kardiovaskulární systém i jiné části organismu

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

infantilní (dětská) beri-beri se objevuje v těsnou dřívěj v rozvojových zemích



Koenzymy

✓ koenzymy oxidoreduktas

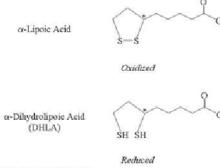
(NAD⁺, NADP⁺, FAD, FMN, kyselina lipoová)

✓ koenzymy transferas

(ATP, CoA, kyselina lipoová, biotin, kyselina listová, pyridoxalfosfát)

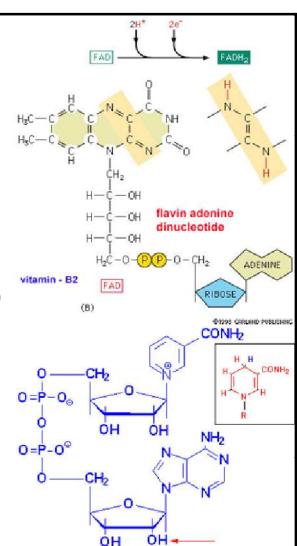
✓ koenzymy lyas a isomeras

(pyridoxalfosfát)



FAD & NAD(P)⁺

- ✓ prostetická skupina x koenzym
- ✓ UV absorpcie (adenin – 260nm/nicotin 340nm)
- ✓ FAD – tzv. 1-4 adice (oxidovaná forma)
- ✓ FADH₂ – redukovaná forma
- ✓ chinon – (semichinon) – hydrochinon
- ✓ FAD oxidace dvojných vazeb
- ✓ NAD⁺ / NADH – ztráta aromaticity (UV absorpcie)
- ✓ NAD⁺ / NADP⁺
- ✓ NADH odevzdává vodík enzym m dých. et zce
- ✓ NADPH dodává vodík pot ebny p biosyntéze mastných kyselin
- ✓ NAD oxidace alkohol na aldehydy (nap. beta oxidace)
- ✓ NAD – vitamín B3 (niacin), FAD – vitamín B2 (riboflavin)



Koenzym A

- ✓ 3'-fosfoadenosindifosfát – kyselina pantohenová – -merkaptoethylamin
- ✓ p enos acyl

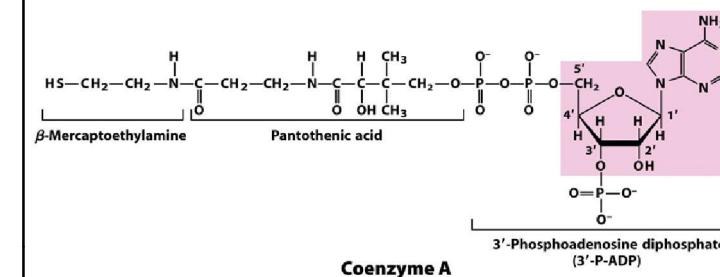


Figure 8.38 part 1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H.Freeman and Company