

Katalýza a spôsoby regulácie

(Prednáška 5)

KATALYTICKÉ STRATÉGIE

Čo je zdrojom katalytickej sily (efektivity) a špecificity enzýmov? Ukážeme to na dvoch triedach enzýmov: serínových proteázach a karbonických anhydrázach.

Väzobná energia má dve dôležité úlohy: podieľa sa na špecifickosti substrátu a zvyšuje katalytickú účinnosť. Iba zodpovedajúci substrát sa môže zúčastňovať na väčšine alebo všetkých interakciách s enzýmom, a tým maximalizuje väzbovú energiu, čo vysvetľuje substrátovu špecifickosť vykazovanú mnohými enzýmami.

Enzýmy bežne využívajú jednu alebo viac z nasledujúcich stratégií pri katalýze špecifických reakcií:

1. **Kovalentná katalýza.** Pri kovalentnej katalýze obsahuje aktívne miesto reaktívnu skupinu, zvyčajne silný nukleofil, ktorá vytvára dočasne kovalentnú väzbu so substrátom v priebehu katalýzy. Vynikajúcim príkladom tejto stratégie je proteolytický enzým chymotrypsín.

2. **Všeobecná kyslá a bazická katalýza.** Vo všeobecnosti kyslá a bazická katalýza je sprostredkovaná molekulou, inou ako voda, ktorá hrá úlohu darcu alebo akceptora protónov. Chymotrypsín používa histidínový zvyšok ako bazický katalyzátor na zvýšenie nukleofilnosti sily Ser, zatiaľ čo histidínový zvyšok v karbonickej anhydráze uľahčuje odstránenie iónu vodíka z vody viazanej na zinok za vzniku hydroxidového iónu.

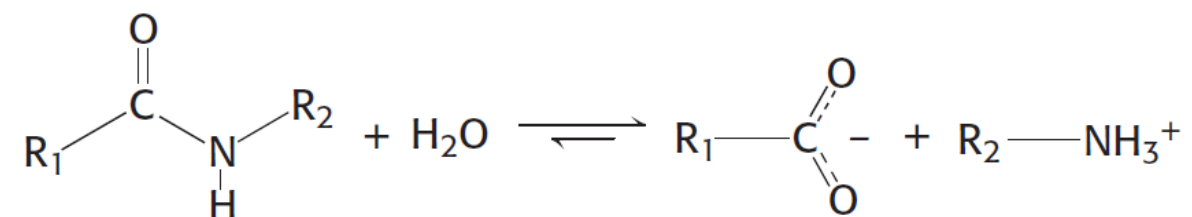
3. **Katalýza pomocou aproximácie.** Mnoho reakcií zahŕňa dva odlišné substráty. V takých prípadoch môže byť rýchlosť reakcie značne zvýšená vďaka priblíženiu týchto dvoch substrátov vo väzobnom mieste enzýmu. Napríklad karboanhydráza viaže oxid uhličitý a vodu na susedných miestach, aby sa uľahčila ich reakcia.

4. **Katalýza pomocou iónov kovov.** Kovové ióny môžu fungovať katalyticky niekoľkými spôsobmi. Kovový ión môže napríklad uľahčovať tvorbu nukleofilov ako je hydroxidový ión priamou koordináciou. Na tento účel slúži zinočnatý ión v karbonickej anhydráze. Alternatívne kovový ión môže slúžiť ako elektrofil, ktorý stabilizuje negatívny náboj na reakčnom medziprodukte. Nakoniec môže kovový ión slúžiť ako most medzi enzýmom a substrátom, zvýšenie väzbovej energie a udržiavanie substrátu v konformácii vhodnej na katalýzu.

PROTEÁZY UĽAHČUJÚ PRINCIPIÁLNE ŤAŽKÚ REAKCIU

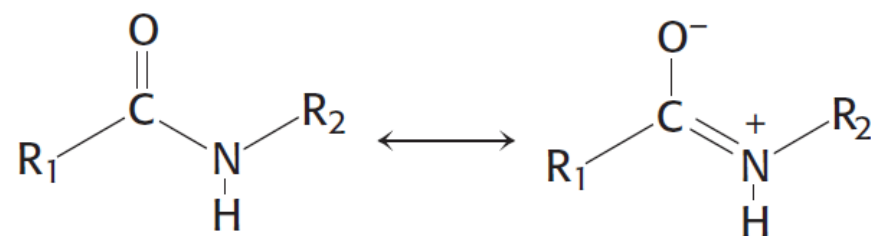
Hydrolýza proteínov je dôležitým procesom v živých systémoch. Proteíny, ktoré „doslúžili“ svojmu účelu a sú nadbytočné, sa musia odbúravať tak, aby ich zložky - aminokyseliny sa mohli recyklovať na syntézu nových proteínov. Proteíny požitie v potrave sa musia hydrolyzovať na malé peptidy a aminokyseliny pre absorpciu v čreve.

Proteázy štiepia proteíny v hydrolytickej reakcii – pridanie molekuly vody k peptidovej väzbe:



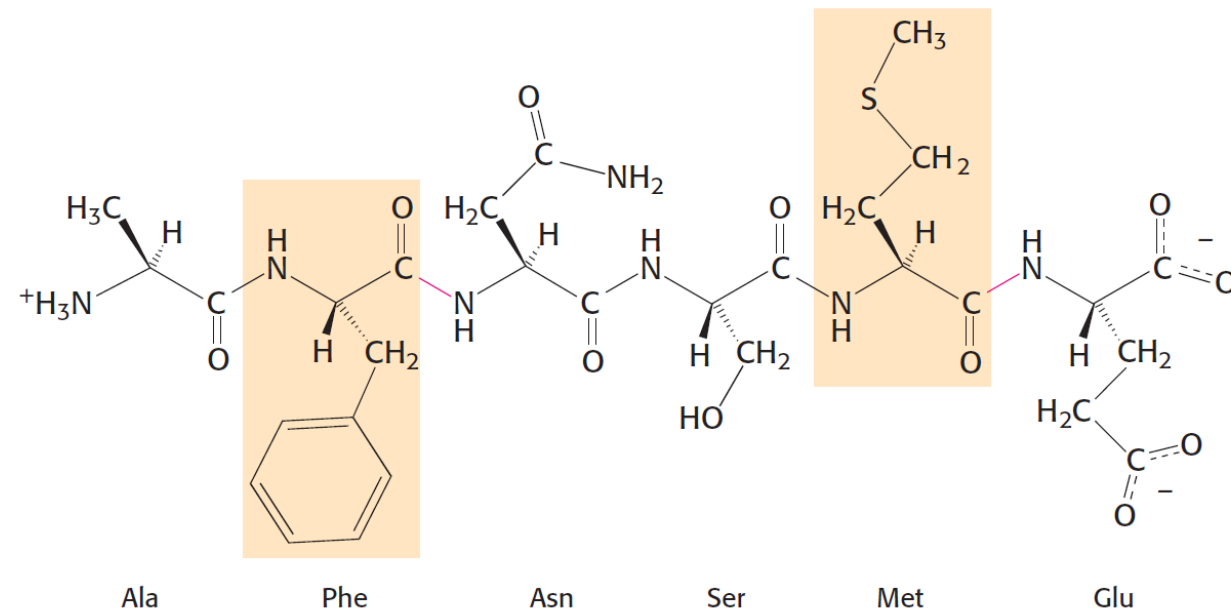
Aj keď je hydrolýza peptidových väzieb termodynamicky výhodná, táto hydrolytická reakcia je extrémne pomalá. V neprítomnosti katalyzátora sa polčas hydrolýzy sa polčas hydrolýzy typického peptidu pri neutrálnom pH odhaduje na 10 až 1000 rokov. Avšak peptidové väzby musia byť hydrolyzované v priebehu niekoľkých milisekúnd pri niektorých biochemických procesoch.

Chemická väzba v peptidových väzbách je zodpovedná za ich veľkú kinetickú stabilitu. Konkrétne rezonančná štruktúra, ktorá zodpovedá za planaritu peptidovej väzby robí tieto väzby odolnými voči hydrolýze.



CHYMOTRYPSÍN

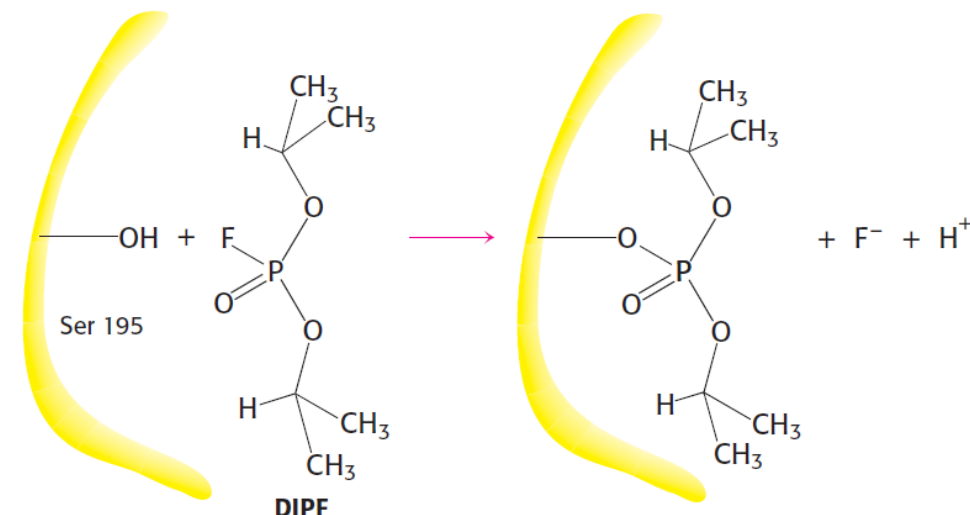
Na štiepení proteínov sa podieľa množstvo proteolytických enzýmov v tráviacom systéme cicavcov a iných organizmov. Jeden z nich týchto enzýmov, proteáz, je chymotrypsín, štiepi peptidové väzby selektívne na karboxylovom konci po veľkých hydrofóbných aminokyselinách, ako je napríklad tryptofán, tyrozín, fenylalanín a metionín. Chymotrypsín je dobrým príkladom využitia kovalentnej katalýzy.



Specificity of chymotrypsin.

Chymotrypsin cleaves proteins on the carboxyl side of aromatic or large hydrophobic amino acids (shaded orange). The likely bonds cleaved by chymotrypsin are indicated in red.

Čo je to za nukleofil, ktorý chymotrypsín používa na interakciu s karbonylovým uhlíkom na substráte?
Ukázalo sa, že chymotrypsín obsahuje veľmi reaktívny Ser, Ser195, ktorý selektívne reaguje s DIPF.

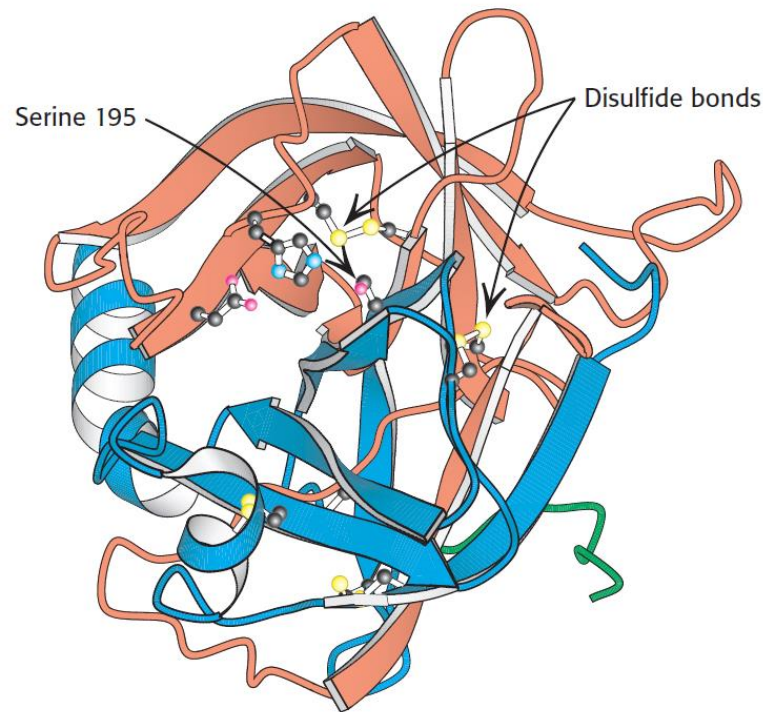


An unusually reactive serine residue in chymotrypsin. Chymotrypsin is inactivated by treatment with diisopropylphosphorofluoridate (DIPF), which reacts only with serine 195 among 28 possible serine residues.

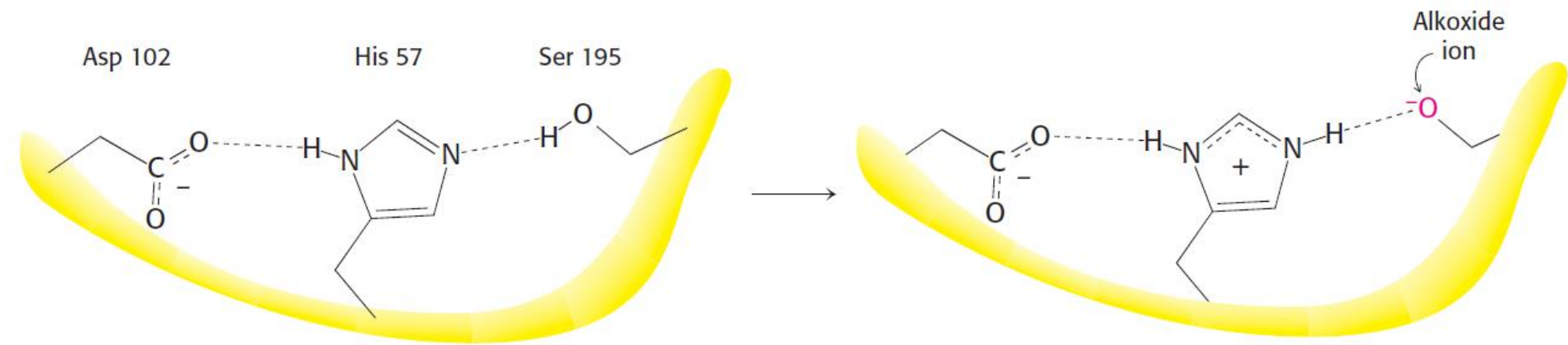
CHYMOTRYPSÍN

Trojrozmernú štruktúru chymotrypsínu vyriešil David Rana v roku 1967. Chymotrypsín je približne sférický a obsahuje tri polypeptidové reťazce spojené disulfidovými väzbami. Je syntetizovaný ako jeden polypeptid, nazývaný chymotrypsinogén, ktorý je aktivovaný proteolytickým štiepením polypeptidu za vzniku troch reťazcov. Aktívne miesto chymotrypsínu, označené serínom 195, leží v štrbine na povrchu enzýmu.

Hydroxylová skupina Ser195 je viazaná k imidazolovému kruhu His57 vodíkovou väzbou. NH skupina tohto imidazolového kruhu tvorí vodíkovú väzbu s karboxylovou skupinou Asp102. Táto konštelácia sa nazýva **katalytická triáda**.

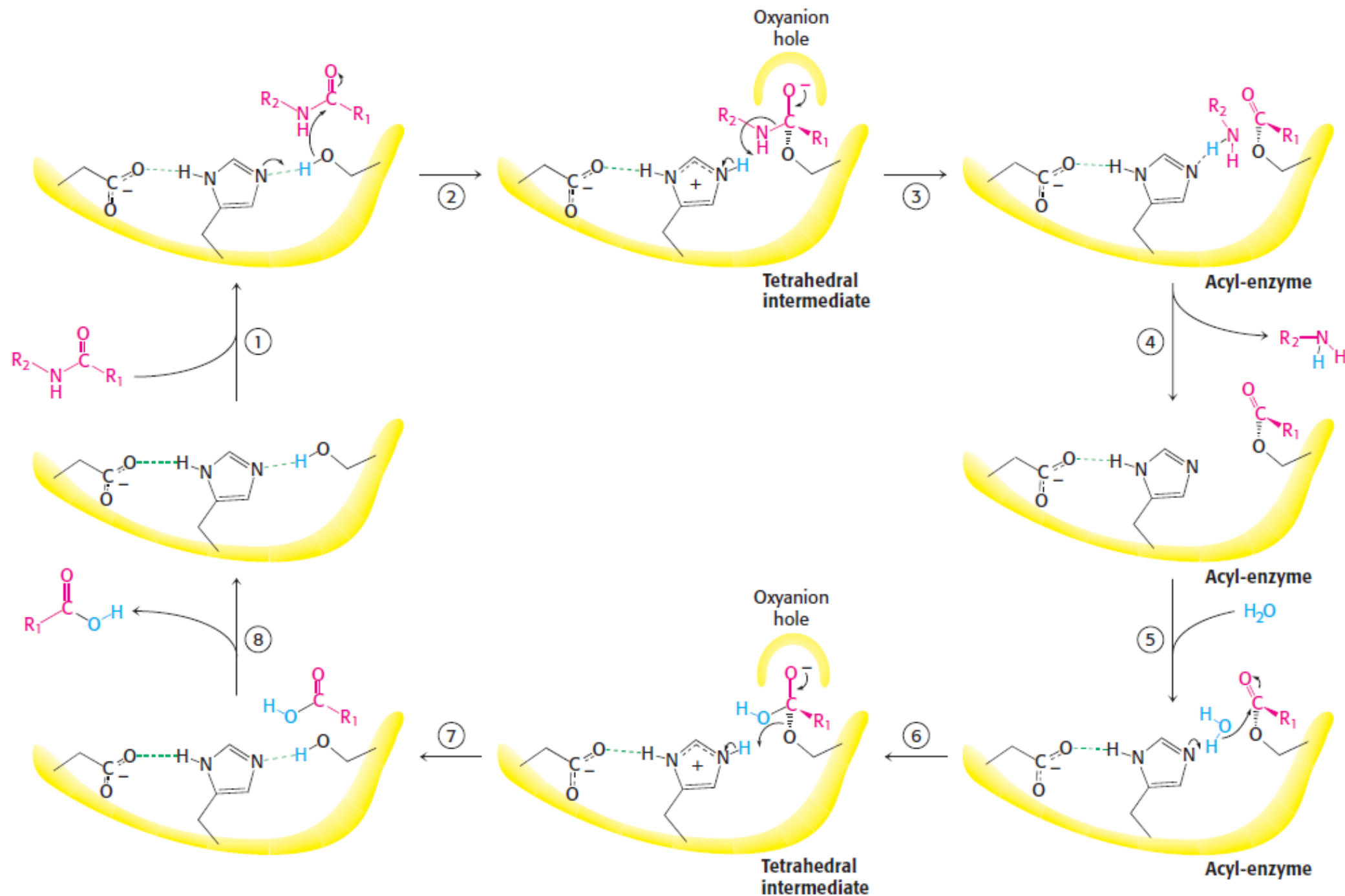


Location of the active site in chymotrypsin. Chymotrypsin consists of three chains, shown in ribbon form in orange, blue, and green. The side chains of the catalytic triad residues are shown as ball-and-stick representations. Notice these side chains, including Ser195, lining the active site in the upper half of the structure. Also notice two intrastrand and two interstrand disulfide bonds in various locations throughout the molecule. [Drawn from 1GCT.pdb.]



The catalytic triad. The catalytic triad, shown on the left, converts serine 195 into a potent nucleophile, as illustrated on the right.

CHYMOTRYPSÍN – KATALYTICKÝ MECHANIZMUS

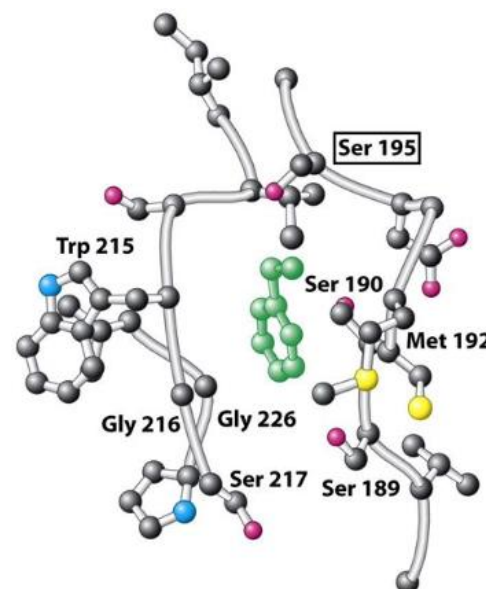
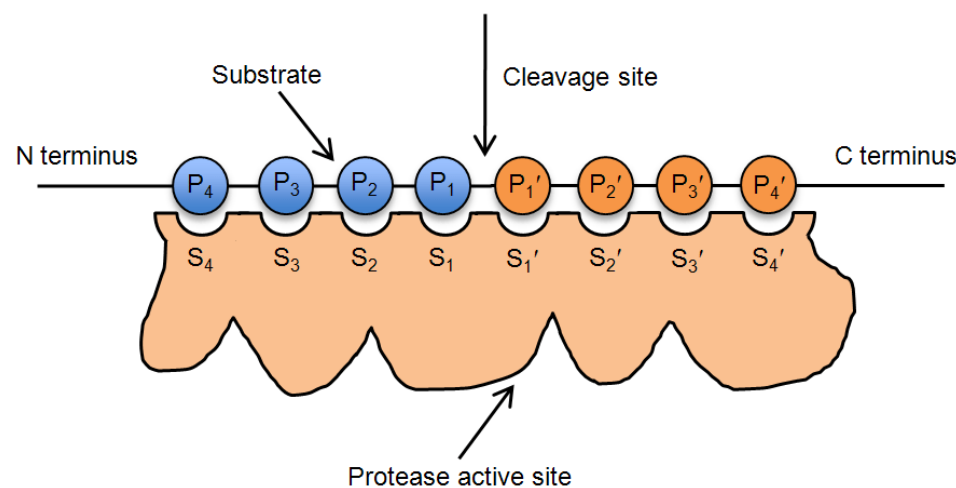


Peptide hydrolysis by chymotrypsin.

The mechanism of peptide hydrolysis illustrates the principles of covalent and acid–base catalysis. The reaction proceeds in eight steps: (1) substrate binding, (2) nucleophilic attack of serine on the peptide carbonyl group, (3) collapse of the tetrahedral intermediate (**vznik kovalentného intermediátu – príklad kovalentnej katalýzy**), (4) release of the amine component, (5) water binding, (6) nucleophilic attack of water on the acyl-enzyme intermediate, (7) collapse of the tetrahedral intermediate; and (8) release of the carboxylic acid component. The dashed green lines represent hydrogen bonds.

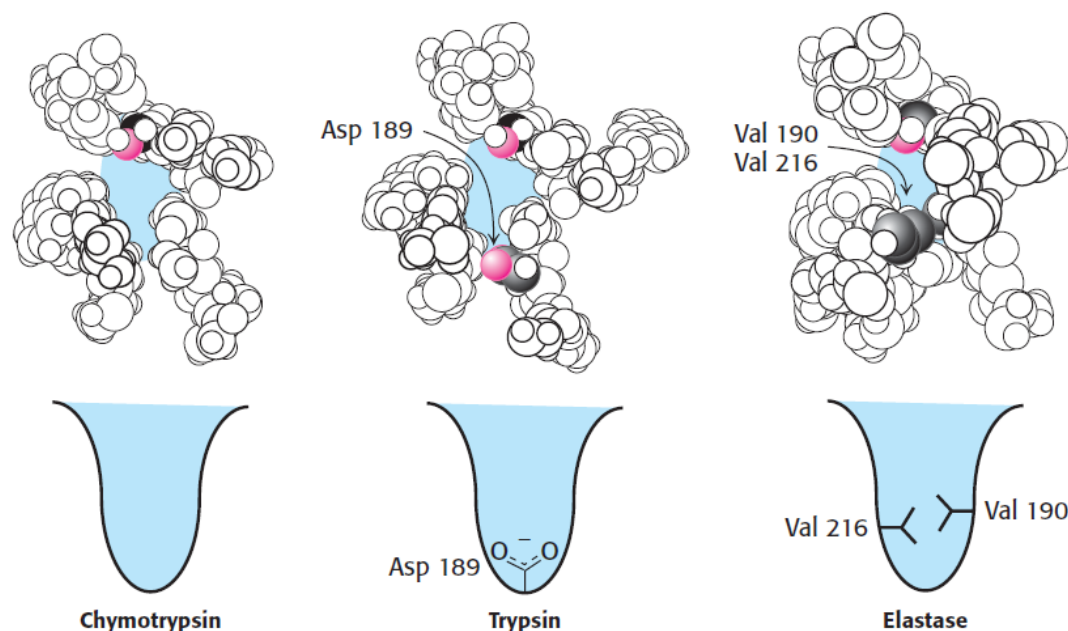
ŠPECIFICITA VÄZBY SUBSTRÁTU DO SERÍNOVÝCH PROTEÁZ A VÝSKYT KATALYTICKEJ TRIÁDY

Nomenklatúra väzobného miesta u proteáz.

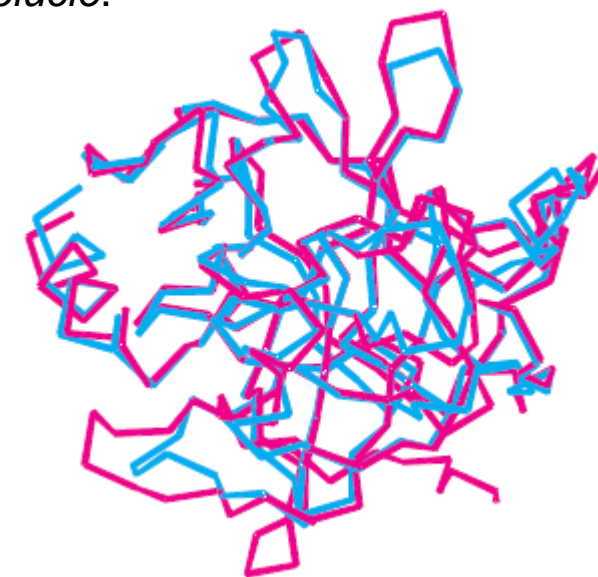


Preskúmanie 3D štruktúry chymotrypsínu s analógmi substrátu a inhibítormi enzýmu odhalili prítomnosť hlbokého hydrofóbného vrečka nazývaného S1 vrečko, do ktorého sa zmestia dlhé nenabité bočné reťazce zvyškov, ako je fenylalanín a tryptofán. Viazanie vhodného bočného reťazca do tohto vrečka/kapsy umiestni susednú peptidovú väzbu do aktívneho miesta na štiepenie. Vlastnosť miesta S1 teda definuje špecificitu substrátu.

The S1 pockets of chymotrypsin, trypsin, and elastase. Certain residues play key roles in determining the specificity of these enzymes. The side chains of these residues, as well as those of the active-site serine residues, are shown in color.



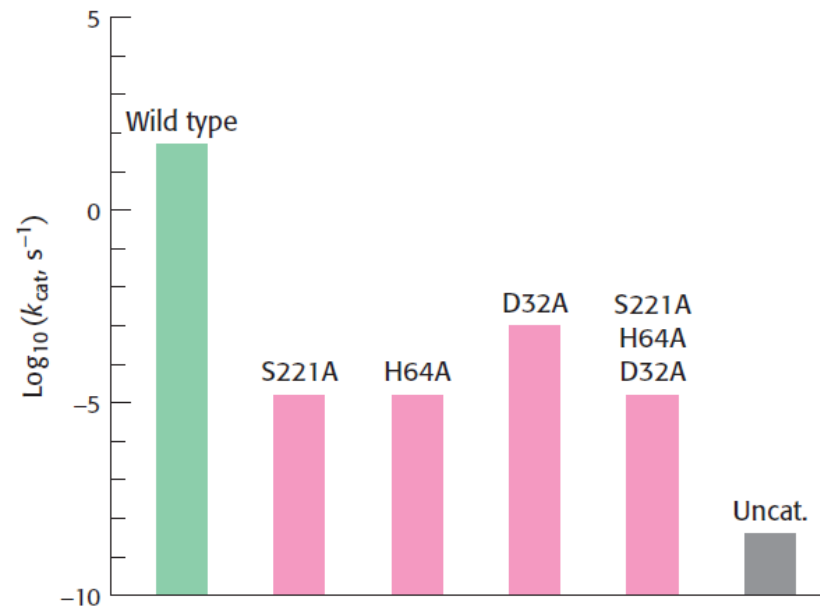
Následne bolo nájdených mnoho ďalších proteínov štiepiacich peptidy, ktoré obsahujú katalytickú triádu podobnú tým, ktoré sa našli v chymotrypsíne. Niektoré, ako napríklad trypsin a elastáza, sú zrejme homológy chymotrypsínu. Sekvencie týchto proteínov sú približne 40% totožné s chymotrypsínom a ich celkové štruktúry sú veľmi podobné. Tieto proteíny majú identický katalytický mechanizmus ako chymotrypsín. Podobná 3D štruktúra a katalytický mechanizmus, avšak rozdielna špecificita poukazujú na ich evolučné príbuzenstvo. Proteázy chymotrypsín, trypsin a elastáza sú príkladom *divergentnej evolúcie*.



Structural similarity of trypsin and chymotrypsin. An overlay of the structure of chymotrypsin (red) on that of trypsin (blue) is shown. Notice the high degree of similarity. Only α -carbon-atom positions are shown. The mean deviation in position between corresponding α -carbon atoms is 1.7 Å. [Drawn from 5PTP.pdb and 1GCT.pdb.]

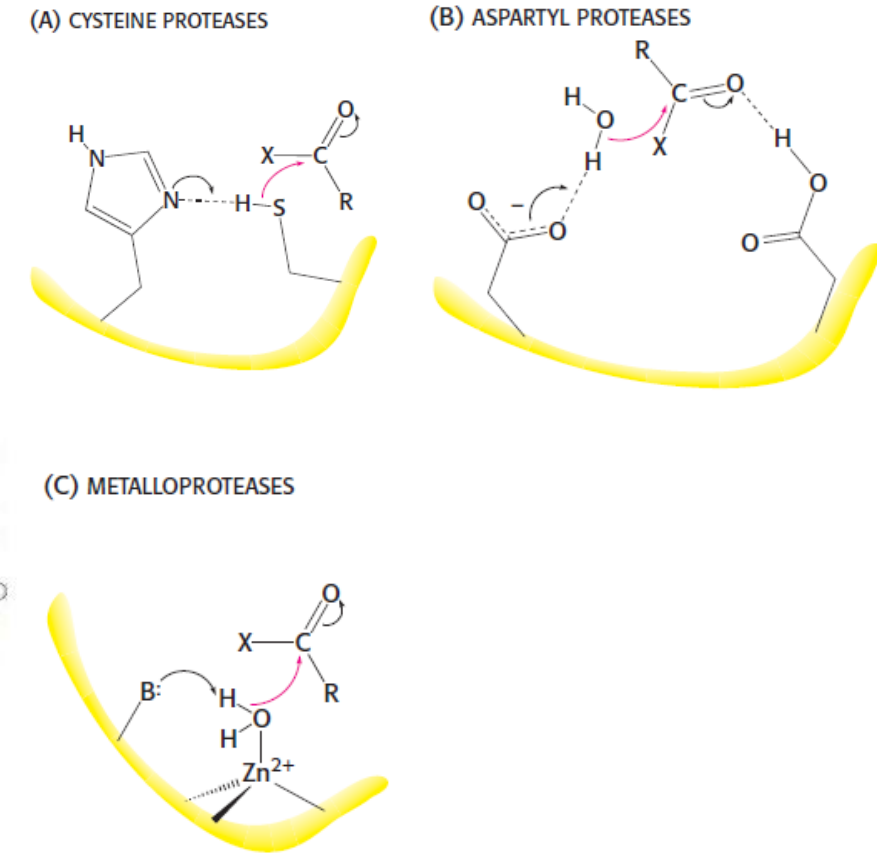
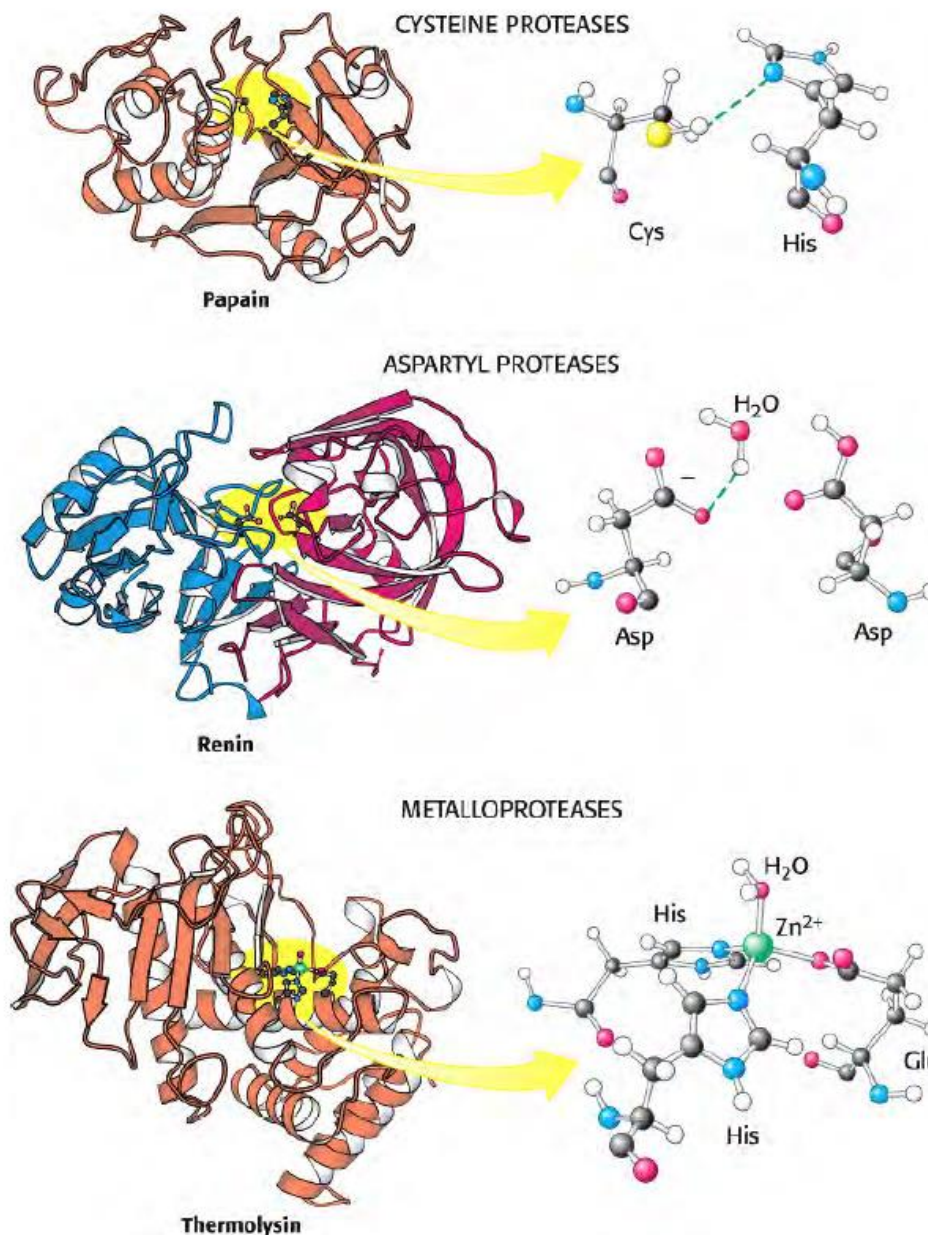
KATALYTICKÁ TRIÁDA

Ako si môžeme byť istí, že mechanizmus navrhnutý pre katalytickú triádu je správny? Jedným zo spôsobov je testovať príspevok jednotlivých aminokyselín ku katalytickej sile proteázy pomocou cielej mutagenézy.



Site-directed mutagenesis of subtilisin. Residues of the catalytic triad were mutated to alanine, and the activity of the mutated enzyme was measured. Mutations in any component of the catalytic triad cause a dramatic loss of enzyme activity. Note that the activity is displayed on a logarithmic scale. The mutations are identified as follows: the first letter is the one-letter abbreviation for the amino acid being altered; the number identifies the position of the residue in the primary structure; and the second letter is the one-letter abbreviation for the amino acid replacing the original one. Uncat. - refers to the estimated rate for the uncatalyzed reaction.

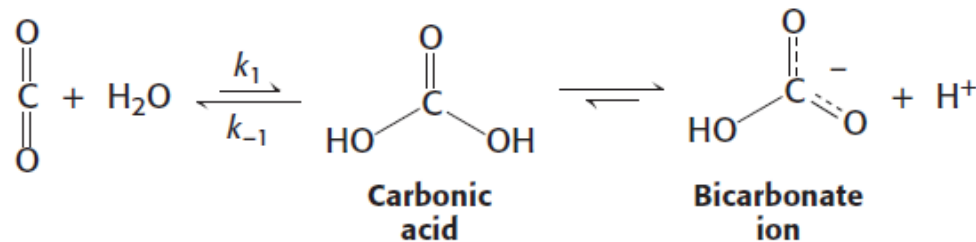
Cysteín, aspartyl a metaloproteázy sú ďalšími skupinami enzýmov, ktoré štiepia peptidy



The activation strategies for three classes of proteases. The peptide carbonyl group is attacked by (A) a histidine activated cysteine in the cysteine proteases, (B) an aspartate-activated water molecule in the aspartyl proteases, and (C) a metalactivated water molecule in the metalloproteases. For the metalloproteases, the letter B represents a base (often glutamate) that helps deprotonate the metalbound water.

KARBONICKÁ ANHYDRÁZA

Oxid uhličitý je hlavným konečným produktom aeróbného metabolizmu. U cicavcov sa tento oxid uhličitý uvoľňuje do krvi a transportuje do pľúc na výdych. V červených krvinkách reaguje oxid uhličitý s vodou. Produkt tejto reakcie je mierne silná kyselina uhličitá, $pK_a=3.5$, ktorá sa prevádza na hydrogenuhličitanový ión (HCO_3^-) a protón.

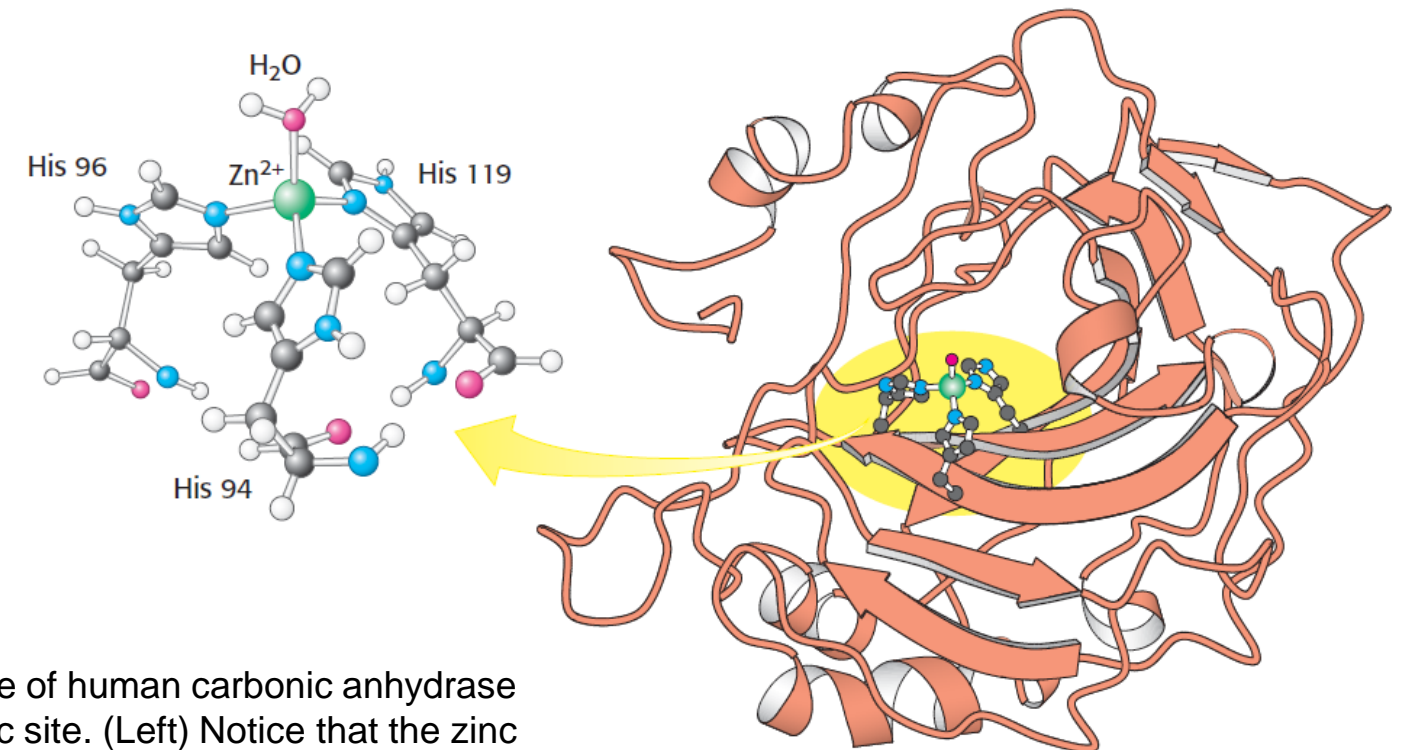


Túto už dosť rýchlu reakciu urýchľuje enzým **karbonická anhydráza**. O dôležitej úlohe týchto enzýmov u ľudí hovoria mutácie, ktoré sa vyskytujú v niektorých karbonických anhydrázach. Zistilo sa, že tieto mutácie sú spojené s osteopetrózou (nadmerná tvorba hustých kostí sprevádzané anémiou) a mentálnou retardáciou.

Existujú 3 typy karbonickej anhydrázy: α , β a γ , ktoré majú výrazne rozdielnu štruktúru, ale identický katalytický mechanizmus. Karbonická anhydráza je príkladom *konvergentnej evolúcie* enzýmu, keď príroda „vynašla“ 3-krát nezávisle ten istý spôsob katalýzy.

Karbonická anhydráza obsahuje viazaný zinkový ión, ktorý je nevyhnutný pre katalytickú aktivitu

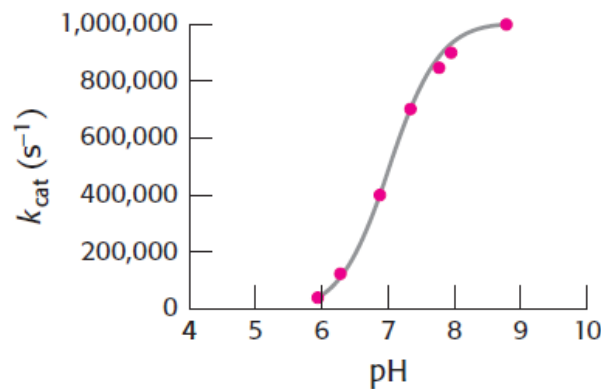
Menej ako 10 rokov po objavení karboanhydrázy v roku 1932, sa zistilo, že enzým obsahuje viazaný zinkový ión. Okrem toho ión zinku sa javil ako nevyhnutný pre katalytickú aktivitu. Tento objav, pozoruhodný v danej dobe, znamenal, že karbonická anhydráza sa stala prvým známym enzýmom obsahujúcim zinok. V súčasnosti je známe, že stovky enzýmov obsahujú zinok. V skutočnosti viac ako jedna tretina všetkých enzýmov obsahuje viazané ióny kovov alebo vyžaduje prídanie takýchto iónov pre aktivitu.



The structure of human carbonic anhydrase II and its zinc site. (Left) Notice that the zinc ion is bound to the imidazole rings of three histidine residues as well as to a water molecule. (Right) Notice the location of the zinc site in a cleft near the center of the enzyme. [Drawn from 1CA2.pdb.]

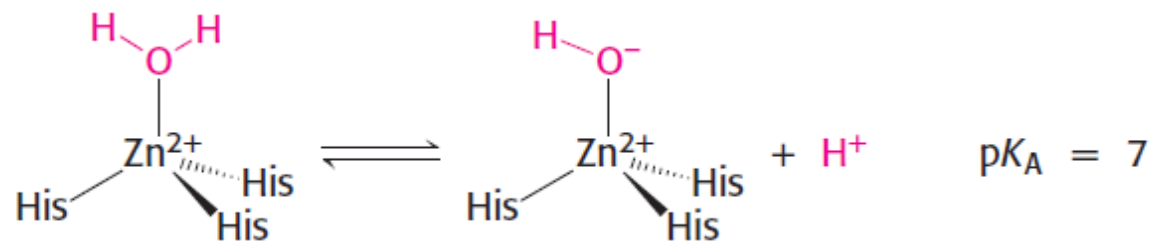
KARBONICKÁ ANHYDRÁZA – KATALYTICKÝ MECHANIZMUS

Ako tento komplex zinku uľahčuje hydratáciu oxidu uhličitého? Hlavná stopa pochádzala z profilu pH enzymaticky katalyzovanej hydratácie oxidu uhličitého. Pri pH 8 reakcia dosahuje takmer maximálnu rýchlosť. Keď sa pH znižuje, rýchlosť reakcie klesá. Stred tohto prechodu je blízko pH 7, čo naznačuje, že skupina, ktorá stráca protón pri pH 7 ($pK_a=7$), hrá dôležitú úlohu v aktivite karboanhydrázy.



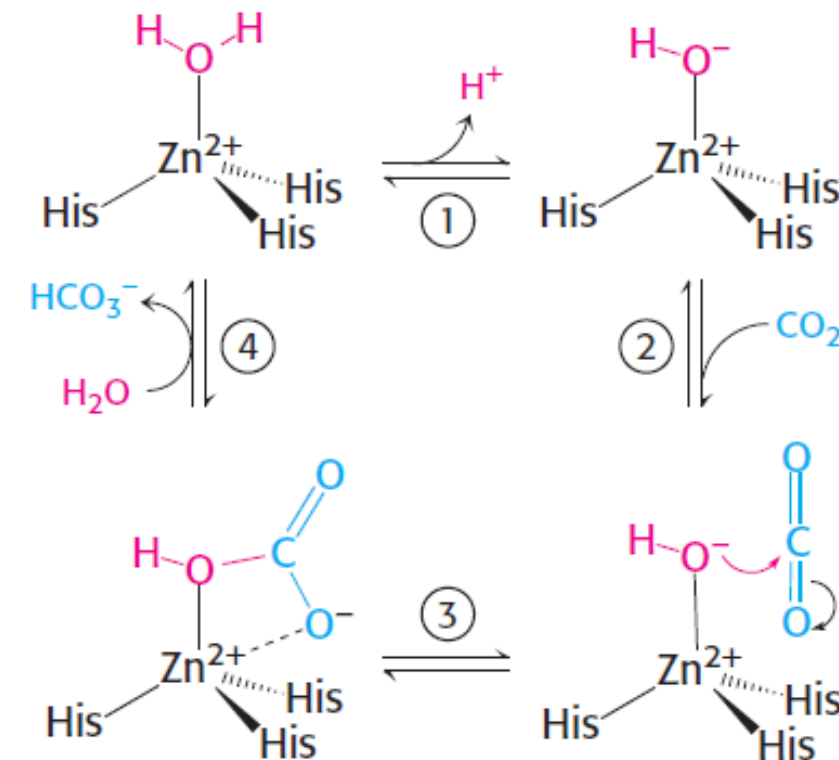
Effect of pH on carbonic anhydrase activity. Changes in pH alter the rate of carbon dioxide hydration catalyzed by carbonic anhydrase II. The enzyme is maximally active at high pH.

Väzba molekuly vody na pozitívne nabitý zinok vedie k poklesu pK_a konštanty molekuly vody z 15.7 na 7



Mechanism of carbonic anhydrase.

The zinc-bound hydroxide mechanism for the hydration of carbon dioxide reveals one aspect of metal ion catalysis. The reaction proceeds in four steps: (1) water deprotonation; (2) carbon dioxide binding; (3) nucleophilic attack by hydroxide on carbon dioxide; and (4) displacement of bicarbonate ion by water.



REGULÁCIA AKTIVITY ENZÝMOV

Enzymatická aktivita je regulovaná 5 základnými spôsobmi:

1. Alosterickou kontrolou
2. Expresiou viacerých foriem enzýmov (izoenzýmy)
3. Reverzibilnou kovalentnou modifikáciou
4. Proteolytickou aktiváciou
5. Kontrolou množstva enzýmu

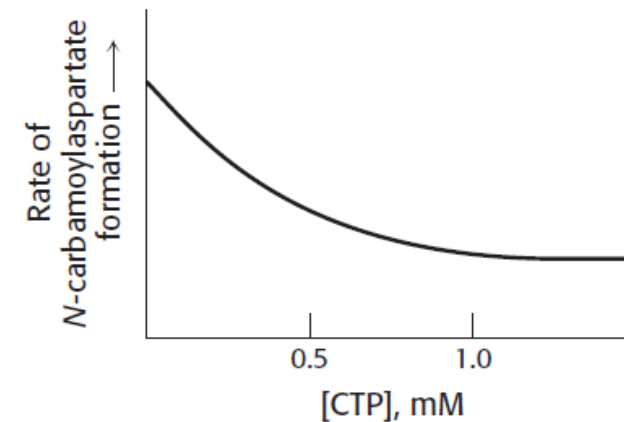
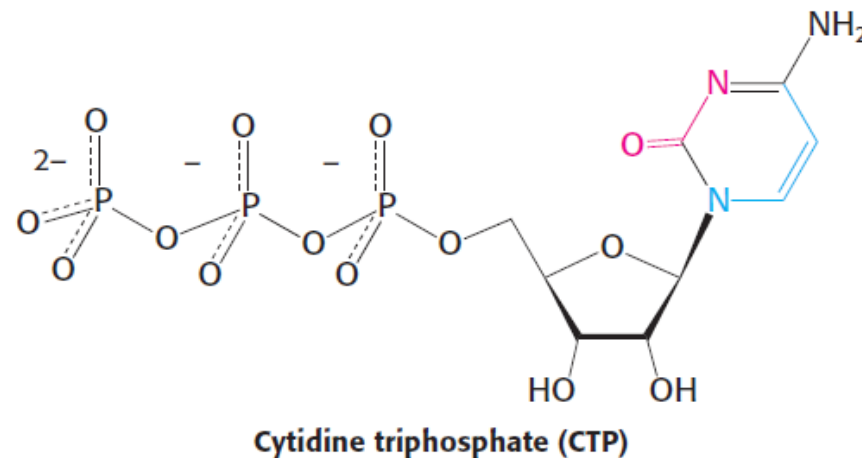
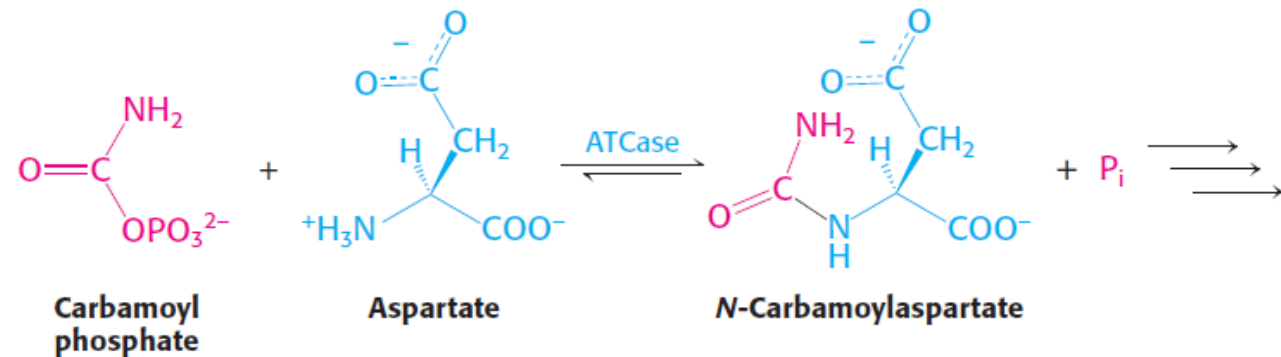
Alosterická kontrola

Alosterické proteíny obsahujú odlišné regulačné miesta a viac funkčných miest. Väzba malých signálnych molekúl na regulačné miesta sú dôležitým prostriedkom kontroly aktivity týchto proteínov. Alosterické proteíny navyše vykazujú vlastnosť *kooperativity*: aktivita v jednom funkčnom mieste ovplyvňuje aktivitu ostatných. Proteíny vykazujúce alosterickú kontrolu slúžia ako prevodníky informácií: ich aktivitu je možné modifikovať v reakcii na signálne molekuly alebo na informácie zdieľané medzi aktívnymi miestami.

Alosterickú kontrolu budeme demonštrovať na jednom z najlepšie preštudovaných alosterických enzýmov – enzým aspartát transkarbamoyláza (ATCáza). Katalýza aspartát transkarbamoylázy - prvého kroku biosyntézy pyrimidínu je inhibovaná cytidín trifosfátom , konečným produktom tejto biosyntézy, čo je typický príklad inhibície spätnou väzbou. V prednáške č.Už sme prebrali iný alosterický proteín - hemoglobín, proteín transportujúci kyslík v krvi.

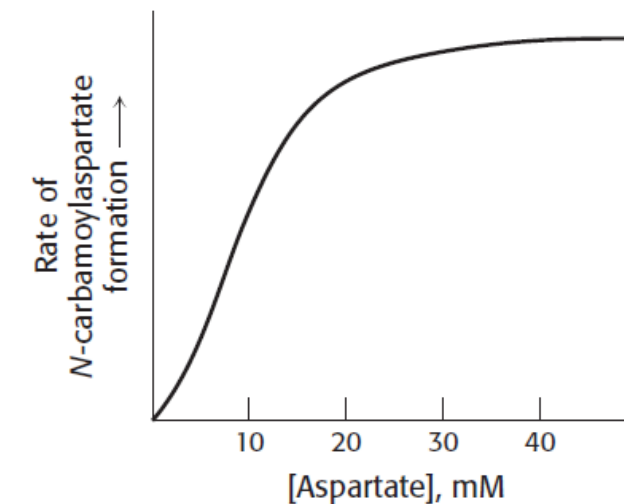
ALOSTERICKÁ KONTROLA – PRÍKLAD ASPARTÁT TRANSKARBAMOYLÁZY

Aspartátkarboxyláza (ATCase) katalyzuje prvý krok v biosyntéze pyrimidínov: kondenzáciu aspartátu a karbamoylfosfátu na N-karbamoyl-aspartát a ortofosfát. ATCase je inhibovaná koncovým produktom tejto dráhy, a to cytidín trifosfátom (CTP). Táto inhibícia je príkladom tzv. spätnej (feedback) inhibície.



CTP inhibits ATCase.

Cytidine triphosphate, an end product of the pyrimidine-synthesis pathway, inhibits aspartate transcarbamoylase despite having little structural similarity to reactants or products.



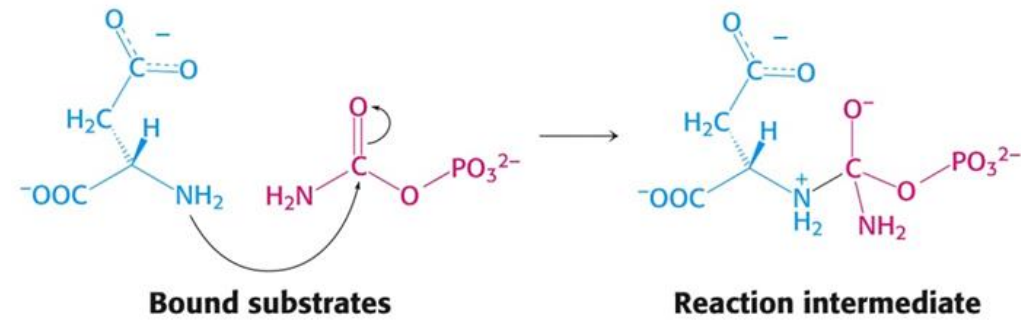
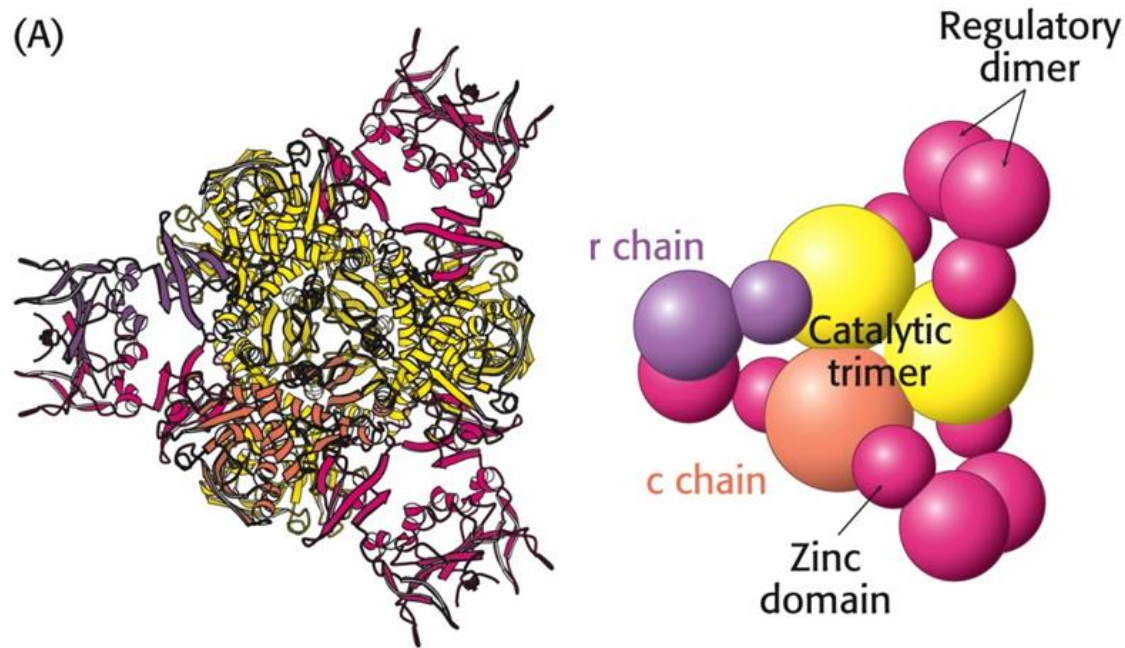
ATCase displays sigmoidal kinetics.

A plot of product formation as a function of substrate concentration produces a sigmoidal curve because the binding of substrate to one active site increases the activity at the other active sites. Thus, the enzyme shows cooperativity.

Inhibičná schopnosť CTP je pozoruhodná, pretože CTP je štrukturálne celkom odlišná molekula od substrátov reakcie. Teda CTP sa musí viazať na miesto odlišné od aktívneho miesta, na ktoré sa substrát viaže. Takéto miesta sa nazývajú **alosterické** alebo **regulačné miesta**. CTP je príkladom alosterického inhibítora. V ATCase (ale to neplatí pre všetky alostericky regulované enzýmy) katalytické miesta a regulačné miesta sú na samostatnom polypeptidovom reťazci.

ASPARTÁT TRANSKARBAMOYLÁZA POZOSTÁVA ZO SEPARÁTNÝCH KATALYTICKÝCH A REGULAČNÝCH SUBJEDNOTIEK

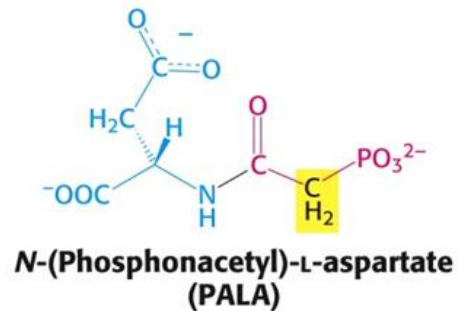
(A)



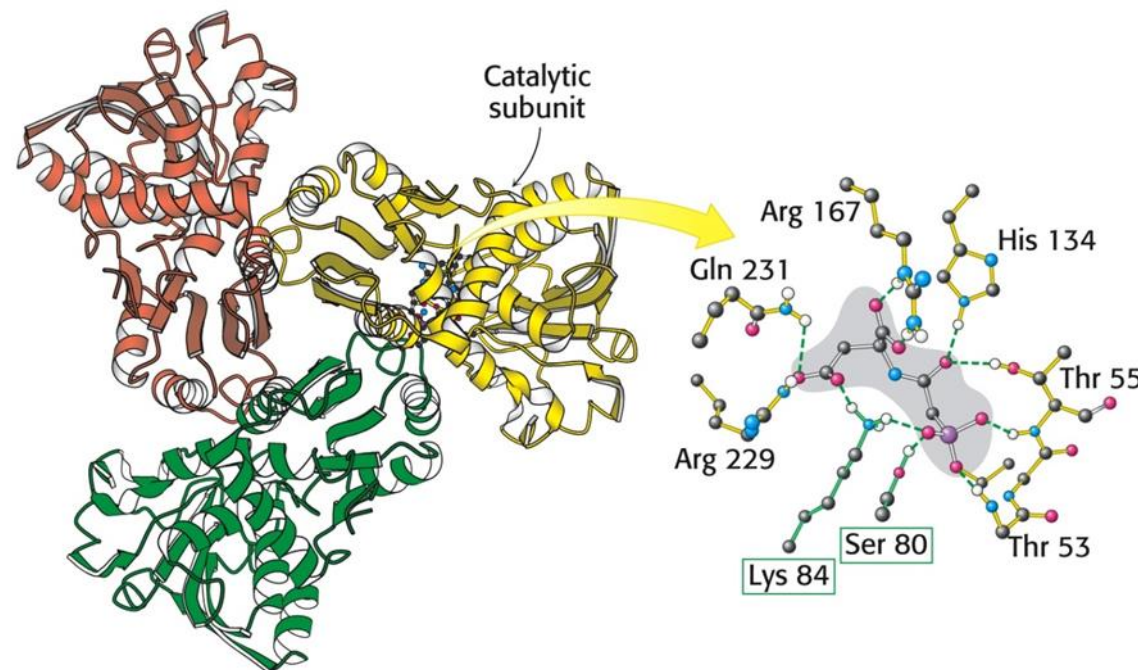
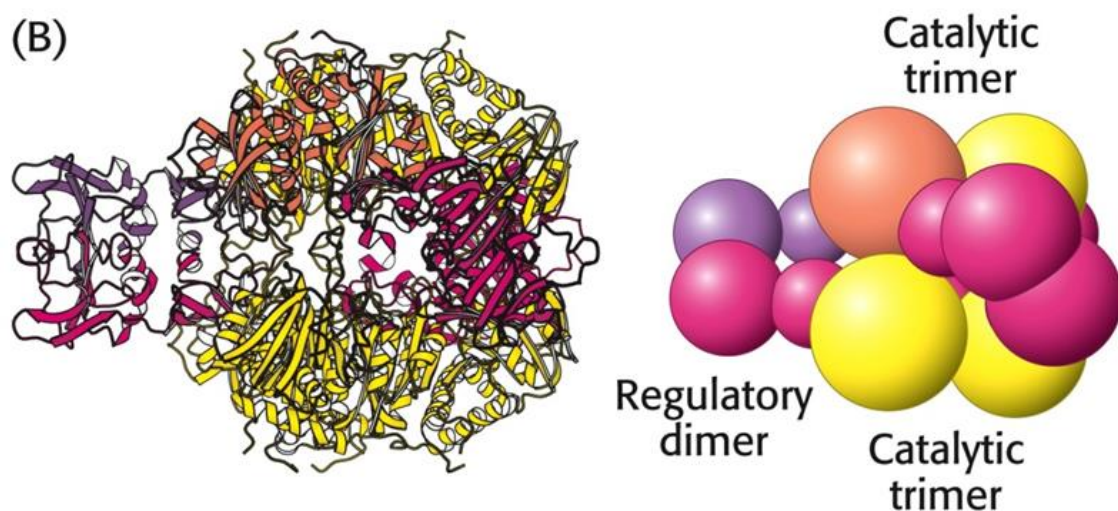
PALA, a bisubstrate analog.

(Top) Nucleophilic attack by the amino group of aspartate on the carbonyl carbon atom of carbamoyl phosphate generates an intermediate on the pathway to the formation of N-carbamoylaspartate.

(Bottom) N-(Phosphonacetyl)-L-aspartate (PALA) is an analog of the reaction intermediate and a potent competitive inhibitor of aspartate transcarbamoylase.



(B)



The active site of ATCase.

Some of the crucial active-site residues are shown binding to the inhibitor PALA (shaded gray). Notice that the active site is composed mainly of residues from one c chain, but an adjacent c chain also contributes important residues (boxed in green).

[Drawn from 8ATC.pdb.]

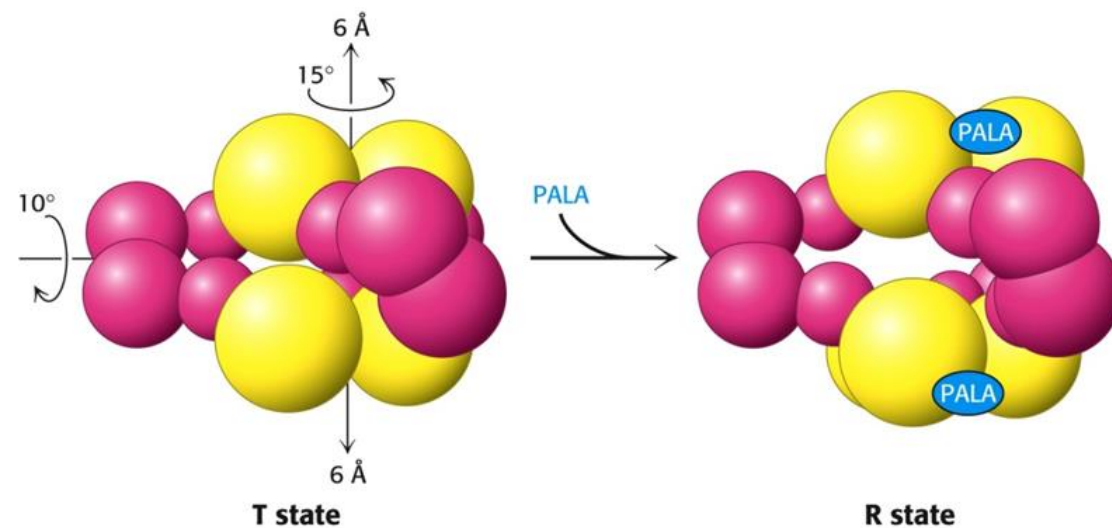
Katalytické podjednotky – majú katalytickú aktivitu a neviažu CTP (2 katalytické triméry)

Regulačné podjednotky – nevykazujú aktivitu a viažu CTP (3 regulačné diméry)

ASPARTÁT TRANSKARBAMOYLÁZA – ALOSTERICKÁ REGULÁCIA

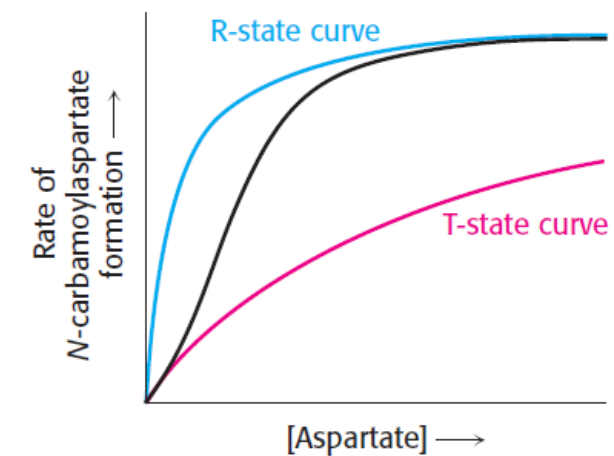
V podstate má ATCase dve odlišné kvartérne formy: forma, ktorá prevláda v neprítomnosti substrátu alebo analógov substrátu a iná, ktorá prevláda, keď substrát alebo jeho analóg je viazaný. Tieto formy nazývame stav **T** (pre napätý stav) a **R** (pre uvoľnený stav) stav, tak ako v prípade dvoch kvartérnych stavov u hemoglobínu.

Ako môžeme vysvetliť sigmoidálnu kinetiku enzýmu vo svetle týchto štrukturálnych pozorovaní? Podobne ako hemoglobín existuje ATCase v rovnováhe medzi stavom T a stavom R. V neprítomnosti substrátu takmer všetky enzýmové molekuly sú v T stave. Stav T má nízku afinitu pre substrát, a teda vykazuje nízku katalytickú aktivitu. Prípadná väzba molekuly substrátu na jedno aktívne miesto v enzýme zvyšuje pravdepodobnosť, že celý enzým sa posúva do stavu R s vyššou väzobnou afinitou pre substrát. Pridanie väčšieho množstva substrátu má dva účinky. Po prvé, zvyšuje sa pravdepodobnosť, že každá molekula enzýmu bude viazať aspoň jednu molekulu substrátu. Po druhé, zvyšuje sa priemerný počet molekúl substrátu naviazaných na každý enzým. Prítomnosť ďalšieho substrátu zvýši frakciu enzýmu v aktívnejšom R stave, pretože rovnováha medzi T a R stavom závisí od počtu aktívnych miest, ktoré sú obsadené substrátom. Táto vlastnosť sa nazýva **kooperativita**, pretože podjednotky navzájom spolupracujú, podobne ako v prípade väzby kyslíka na hemoglobín. Efekt substrátov na alosterické enzýmy sa nazýva **homotrópný efekt** (z gréckeho „homós“ – rovnaký).



The T-to-R state transition in ATCase.

Aspartate transcarbamoylase exists in two conformations: a compact, relatively inactive form called the tense (T) state and an expanded form called the relaxed (R) state. Notice that the structure of ATCase changes dramatically in the transition from the T state to the R State. PALA binding stabilizes the R state.



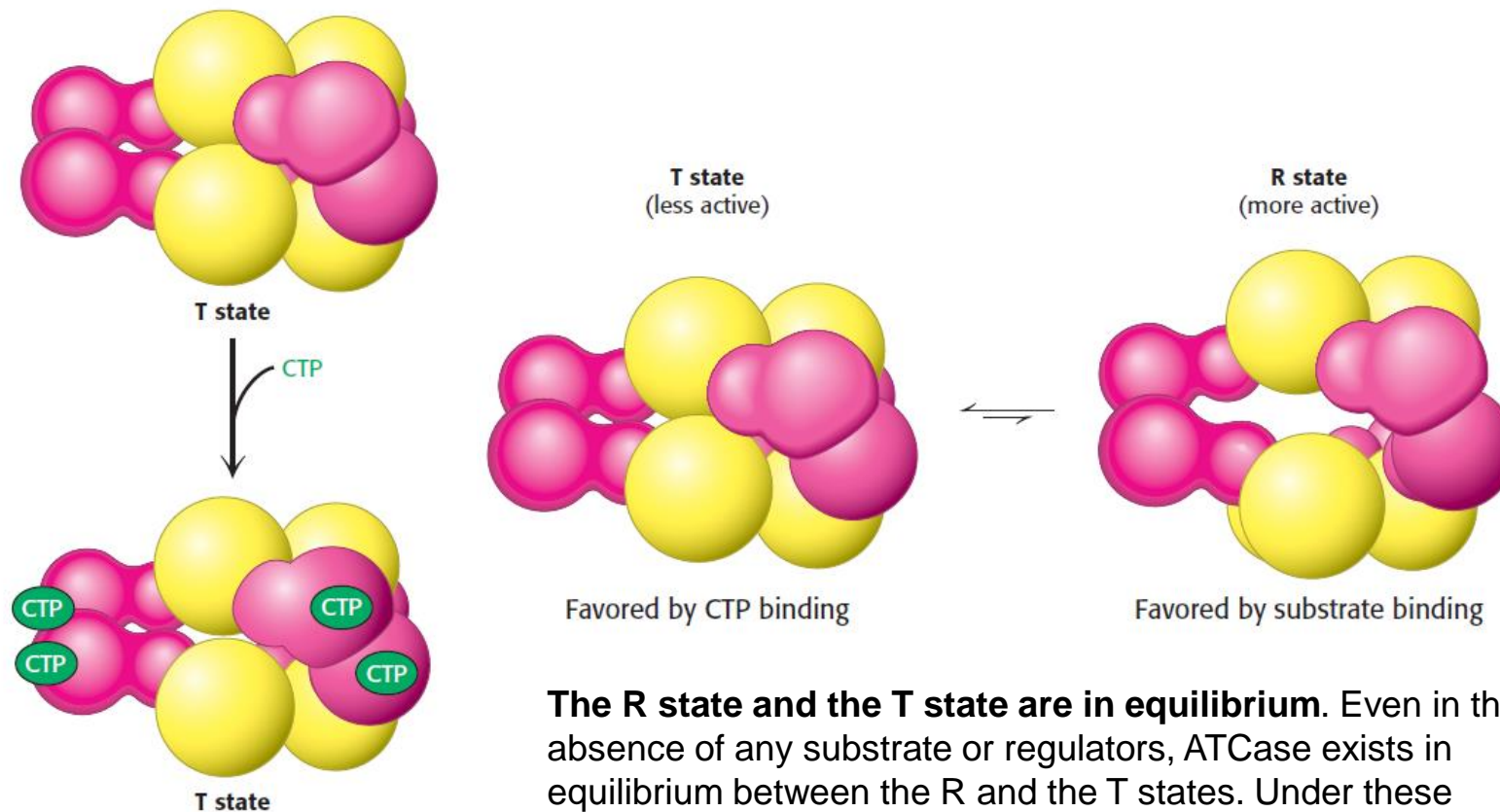
Basis for the sigmoidal curve.

The generation of the sigmoidal curve by the property of cooperativity can be understood by imagining an allosteric enzyme as a mixture of two Michaelis–Menten enzymes, one with a high value of K_M that corresponds to the T state and another with a low value of K_M that corresponds to the R state. As the concentration of substrate is increased, the equilibrium shifts from the T state to the R state, which results in a steep rise in activity with respect to substrate concentration.

ASPARTÁT TRANSKARBAMOYLÁZA – ALOSTERICKÁ REGULÁCIA

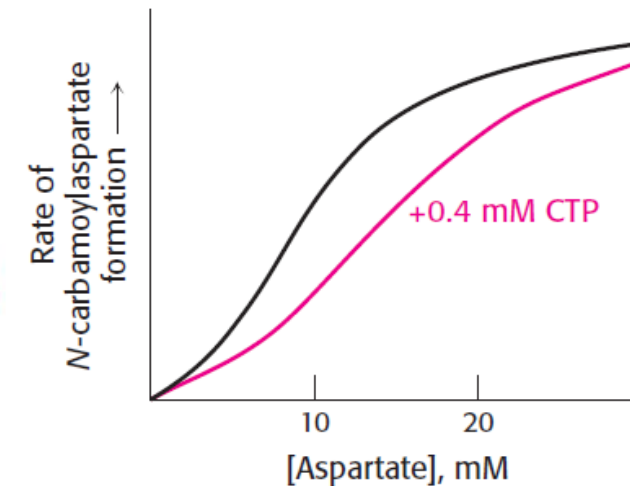
CTP inhibuje aktivitu ATCase. Väzba CTP spôsobí posun rovnováhy medzi T a R stavom k T stavu, čo spôsobí zníženie aktivity enzýmu. ATP, naopak, vedie k zvýšeniu aktivity ATCase – pôsobí ako aktivátor. Efekt nesubstrátovej molekuly na alosterické enzýmy sa označuje ako **heterotrópný efekt**.

Zvýšenie aktivity ATCázy ako reakcia na zvýšenie koncentrácie ATP má dve potenciálne fyziologické vysvetlenia. (1) Vysoká ATP koncentrácia signalizuje vysokú koncentráciu purínových nukleotidov v bunke; zvýšenie aktivity ATCázy bude mať tendenciu vyvážiť množstvo purínov a pyrimidínov. (2) Vysoká koncentrácia ATP naznačuje dostatok energie na syntézu mRNA a replikáciu DNA a vedie tak k syntéze pyrimidínov potrebných pre tieto procesy.

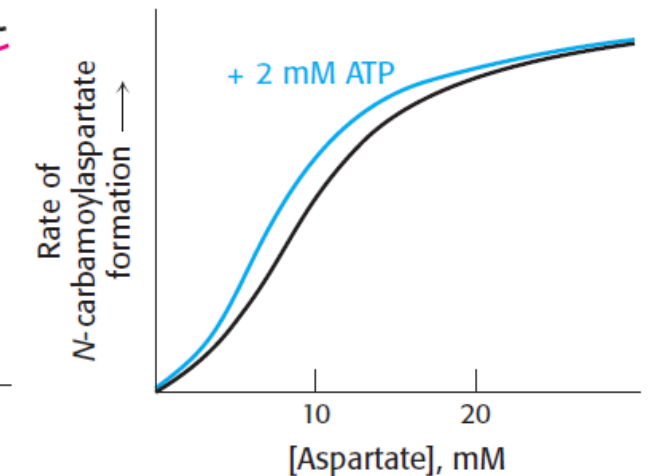


CTP stabilizes the T state. The binding of CTP to the regulatory subunit of aspartate transcarbamoylase stabilizes the T state.

The R state and the T state are in equilibrium. Even in the absence of any substrate or regulators, ATCase exists in equilibrium between the R and the T states. Under these conditions, the T state is favored by a factor of approximately 200.



Effect of CTP on ATCase kinetics. Cytidine triphosphate (CTP) stabilizes the T state of ATCase, making it more difficult for substrate binding to convert the enzyme into the R state. As a result, the curve is shifted to the right, as shown in red.

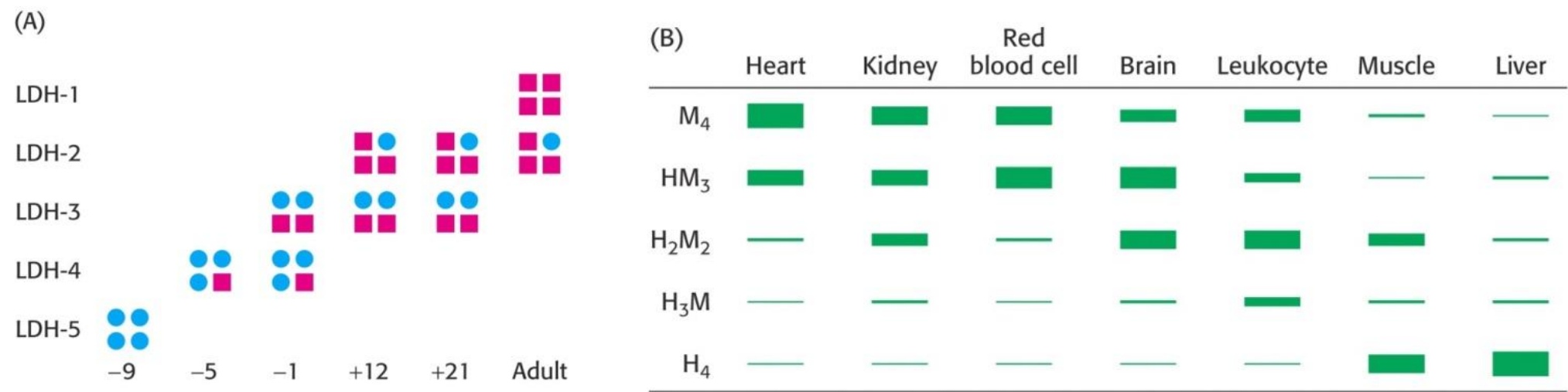


Effect of ATP on ATCase kinetics. ATP is an allosteric activator of ATCase because it stabilizes the R state, making it easier for substrate to bind. As a result, the curve is shifted to the left, as shown in blue.

IZOZÝMY ALEBO IZOENZÝMY (ISOZYMES OR ISOENZYMES)

Izozýmy poskytujú spôsob špecifickej regulácie na úrovni rôznych tkanív a rôznych vývojových štádií. Izozýmy sú enzýmy, ktoré sa líšia v aminokyselinovej sekvencii avšak katalyzujú rovnakú reakciu. Tieto enzýmy zvyčajne vykazujú rôzne kinetické vlastnosti parametre, ako je K_M , alebo reagujú na rôzne regulačné molekuly. Sú kódované rôznymi génmi, ktoré zvyčajne vznikajú duplikáciou génov alebo divergenciou. Izozýmy sa často líšia biochemickými vlastnosťami ako je napr. elektroforetická pohyblivosť.

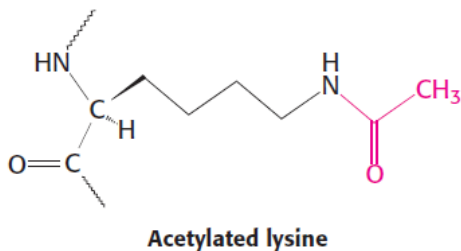
Existencia izozýmů umožňuje jemné ladenie metabolizmu, aby sa splnili potreby daného tkaniva alebo vývojového štádia. Zoberme si príklad laktát dehydrogenázy (LDH), enzýmu, ktorý katalyzuje krok v anaeróbnej glykolýze a syntéze glukózy. Ľudia majú dva izozymové polypeptidové reťazce pre tento enzým: izozým H je vysoko exprimovaný v srdcovom svale a izozým M je exprimovaný v kostrovom svale. Z hľadiska aminokyselinovej sekvencie sú zhodné na 75%. Každý funkčný enzým je tetramerický a existuje všetky rôzne kombinácie dvoch izozymických polypeptidových reťazcov. Izozým H_4 , ktorý sa nachádza v srdci, má vyššiu afinitu k substrátom ako izozým M_4 . Tieto dva izozýmy sa tiež líšia v tom, že vysoká hladina pyruvátu alostericky inhibuje H_4 , ale nie izozým M_4 . Iné kombinácie, ako napríklad H_3M , majú intermediálne vlastnosti. Izozým M_4 funguje optimálne v anaeróbnom prostredí ťažko pracujúceho kostrového svalu, zatiaľ čo izozým H_4 pracuje aeróbnom prostredí srdcového svalu.



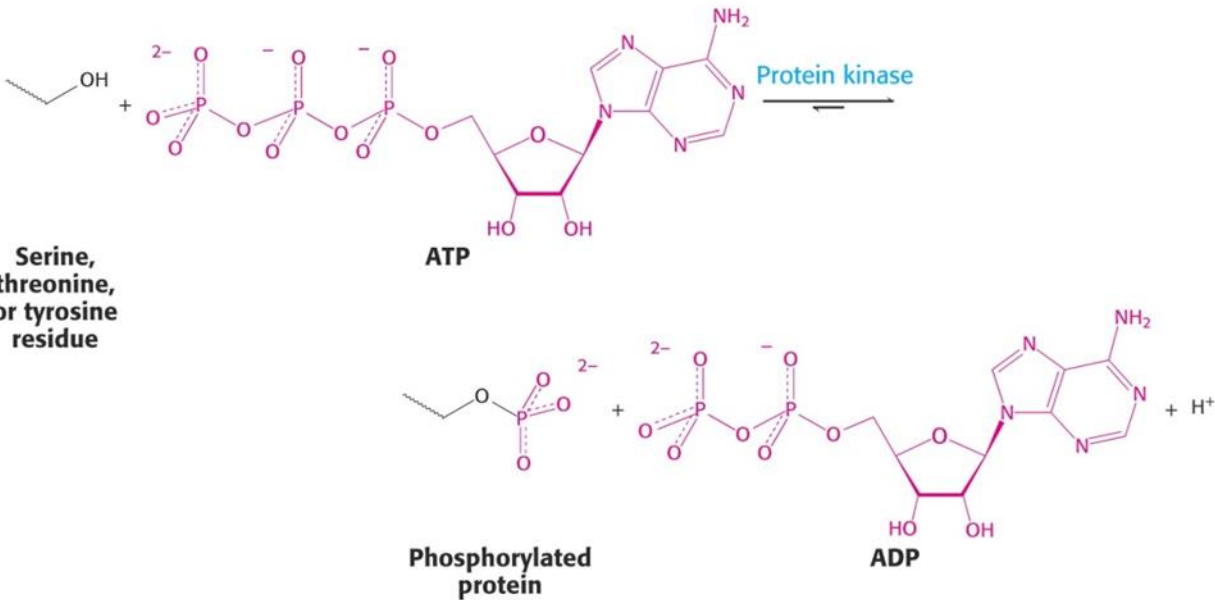
Isozymes of lactate dehydrogenase. (A) The rat heart lactate dehydrogenase (LDH) isozyme profile changes in the course of development. The H isozyme is represented by squares and the M isozyme by circles. The negative and positive numbers denote the days before and after birth, respectively. (B) LDH isozyme content varies by tissue. [(A) After W.-H. Li, Molecular Evolution (Sinauer, 1997), p. 283; (B) after K. Urich, Comparative Animal Biochemistry (Springer Verlag, 1990), p. 542.]

KOVALENTNÁ MODIFIKÁCIA

Kovalentné pripojenie/modifikácia molekuly k enzýmu alebo proteínu môže modifikovať jeho činnosť. V týchto prípadoch poskytuje donorová molekula funkčnú skupinu, ktorá je pripojená. Väčšina úprav/pripojení je reverzibilná. Fosforylácia a defosforylácia sú najbežnejšími prostriedkami kovalentnej modifikácie. Pripojenie acetylových skupín a ich odstránenie je ďalší bežný spôsob kovalentnej modifikácie, napr. históny - proteíny, ktoré sa zúčastňujú zbalenia DNA do formy chromozómu - sú značne acetylované a deacetylované in vivo na lyzínových zvyškoch.



Fosforylácia enzýmov – je jeden z najbežnejších spôsobov kovalentnej modifikácie. Je zabezpečovaný dvoma skupinami enzýmov – kinázami, ktoré pripájajú fosfátovú skupinu a fosfatázami, ktoré túto skupinu odstraňujú hydrolytickým spôsobom. Kinázy ako aj fosfatázy sa líšia stupňom špecificity. Donorom fosfátovej skupiny je zvyčajne ATP. Zvyčajne sú fosforylované Ser a Tyr.



Proteín fosfatázy majú dôležitú úlohu pri riadení/vypínaní signálnych dráh, ktoré sú aktivované kinázami.

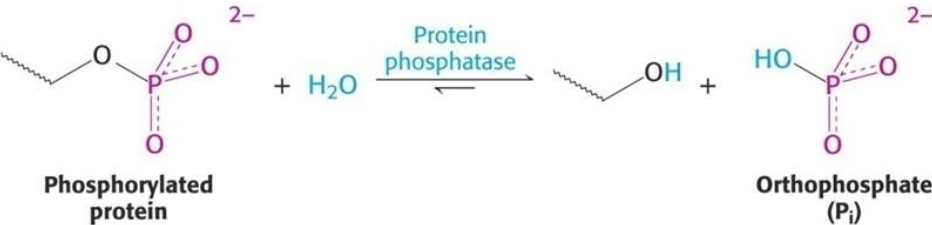


Table 10.1 Common covalent modifications of protein activity

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
γ-Carboxylation	HCO ₃ ⁻	Thrombin	Blood clotting
Sulfation	3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate	Fibrinogen	Blood-clot formation
Ubiquitination	Ubiquitin	Cyclin	Control of cell cycle

Fosforylácia má význam z viacerých dôvodov:

- Fosfátová skupina prináša dva negatívne náboje – zmena elektrostatických interakcií modifikovaného proteínu – zmena viazania substrátu a katalytickej aktivity.
- Fosfátová skupina môže tvoriť 3 a viacero vodíkových väzieb.
- Fosforylácia a defosforylácia môžu prebehnúť za sekundu alebo aj hodiny – čím sa prispôbuje potrebám fyziologických procesov.
- Fosforylácia má často amplifikačný efekt (jedna aktivovaná kináza môže fosforylovať stovky proteínov).
- ATP je odrazom energetického stavu bunky – prepojenie energetického statusu bunky s reguláciou metabolizmu

MNOHO ENZÝMOV JE AKTIVOVANÝCH PROTEOLYTICKÝM ŠTIEPENÍM

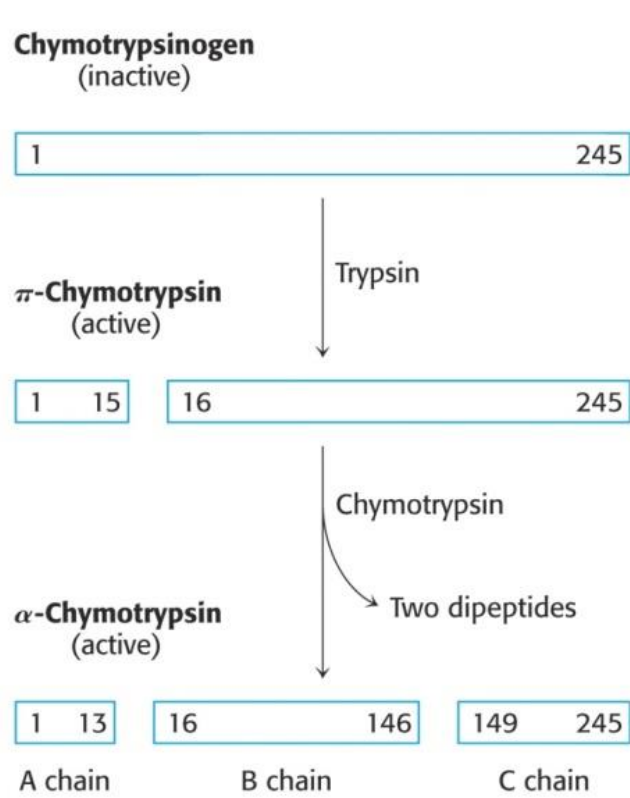
Špecifická proteolýza je bežným prostriedkom aktivácie enzýmov a ďalších proteínov v biologických systémoch. Napríklad:

- 1. **Tráviace enzýmy**, ktoré hydrolyzujú proteíny, sa syntetizujú ako zymogény v žalúdku a pankrease.
- 2. **Zrážanie krvi** je sprostredkované kaskádou proteolytických aktivácií, ktoré zaisťuje rýchlu a zosilnenú reakciu na traumy.
- 3. Niektoré **proteínové hormóny** sú syntetizované ako neaktívne prekursory. Napríklad inzulín je odvodený od proinzulínu proteolytickým odstránením peptidu.
- 4. Proteín kolagén, ktorý je hlavnou zložkou kože a kostí, je odvodený od prokolagénu, rozpustného prekursora.
- 5. Mnoho vývojových procesov je riadených aktiváciou zymogénov. Napríklad v metamorfóze žubrienky na žabu, veľké množstvo kolagénu sa vstrebáva z chvosta v priebehu niekoľkých dní. Podobne sa veľa kolagénu rozpadne v maternici cicavcov po pôrode. Premena prokolagenázy na kolagenázu, aktívnu proteázu, je v týchto procesoch presne načasovaná.
- 6. **Programovaná bunková smrť** alebo **apoptóza** je sprostredkovaná proteolytickými enzýmami nazývané kaspázy, ktoré sú syntetizované v prekursorovej forme ako prokaspázy.

TABLE 10.3 Gastric and pancreatic zymogens		
Site of synthesis	Zymogen	Active enzyme
Stomach	Pepsinogen	Pepsin
Pancreas	Chymotrypsinogen	Chymotrypsin
Pancreas	Trypsinogen	Trypsin
Pancreas	Procarboxypeptidase	Carboxypeptidase
Pancreas	Proelastase	Elastase

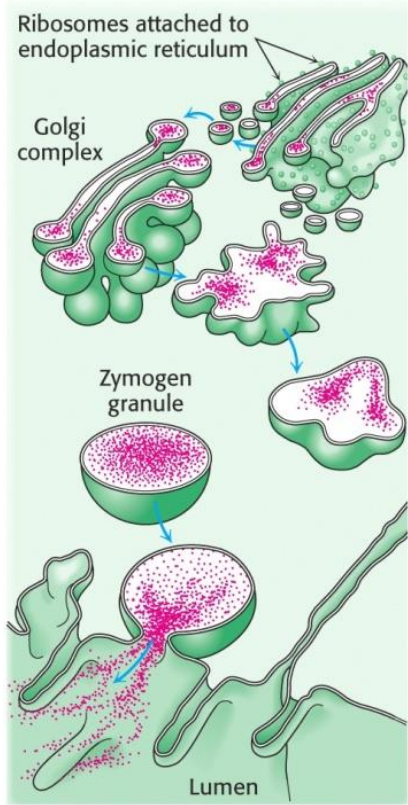
Chymotrypsinogén je aktivovaný špecifickým štiepením jedinej peptidovej väzby.

Chymotrypsín je tráviaci enzým, ktorý hydrolyzuje proteíny v tenkom čreve. Jeho inaktívny prekursor, chymotrypsinogén, sa syntetizuje v pankrease tak, ako niekoľko ďalších zymogénov a tráviacich enzýmov. Aktivácia týchto tráviacich enzýmov nastáva pôsobením enteropeptidázy.



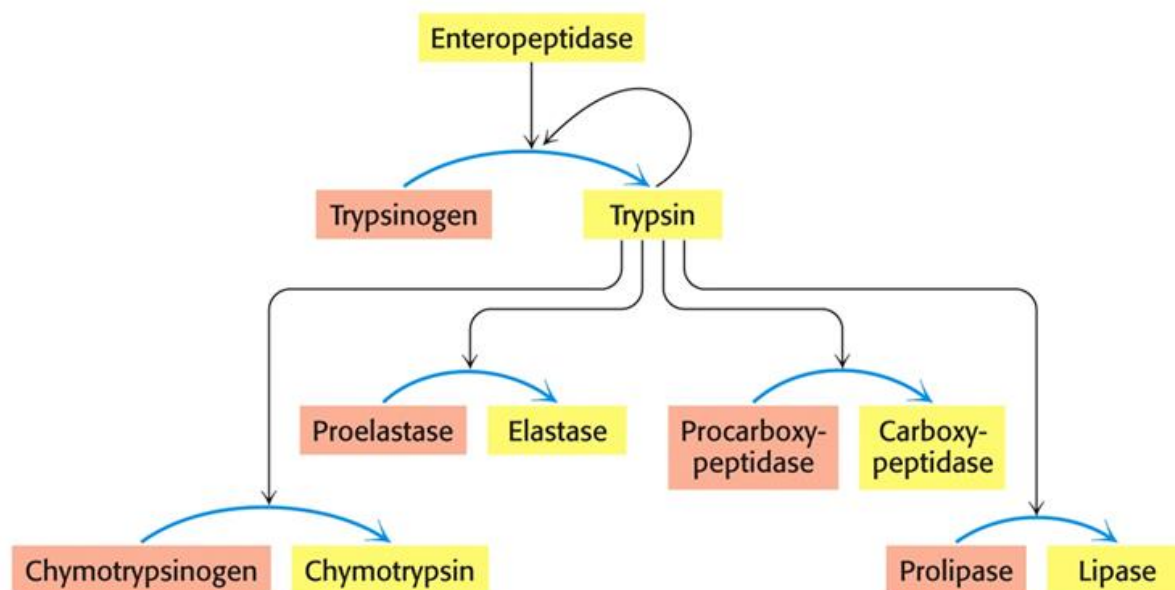
Proteolytic activation of chymotrypsinogen.

The three chains of α -chymotrypsin are linked by two interchain disulfide bonds (A to B, and B to C).



Secretion of zymogens by an acinar cell of the pancreas. Zymogens are synthesized on ribosomes attached to the endoplasmic reticulum. They are subsequently processed in the Golgi apparatus and packaged into zymogen or secretory granules. With the proper signal, the granules fuse with the plasma membrane, discharging their contents into the lumen of the pancreatic ducts. Cell cytoplasm is depicted as pale green. Membranes and lumen are shown as dark green.

REGULÁCIA ENZÝMOV AKTIVOVANÝCH PROTEOLYTICKÝM ŠTIEPENÍM



Zymogen activation by proteolytic cleavage.

Enteropeptidase initiates the activation of the pancreatic zymogens by activating trypsin, which then activates other zymogens. Active enzymes are shown in yellow; zymogens are shown in orange.

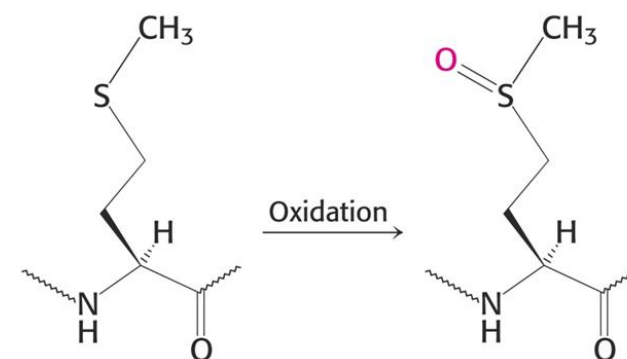
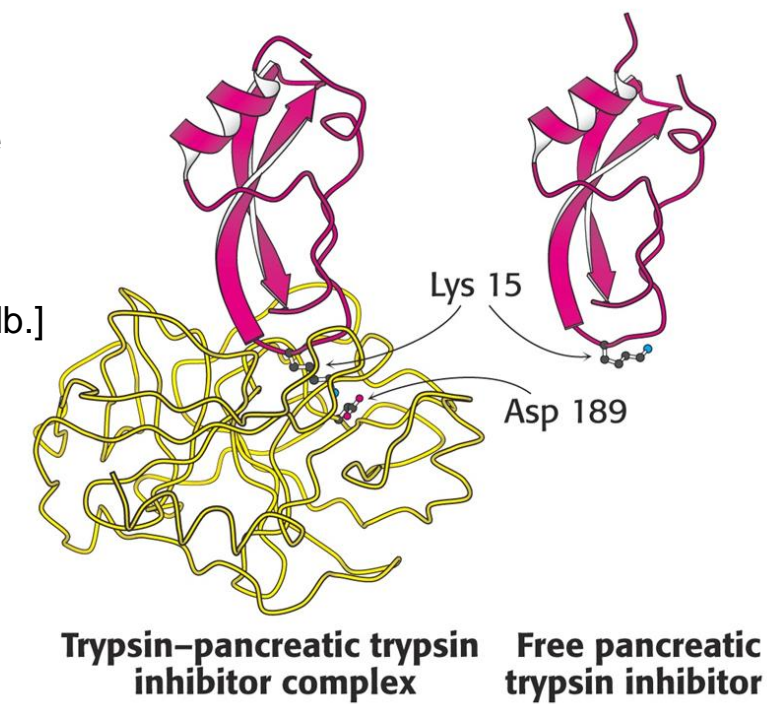
Podobný inhibítor, α_1 -antitrypsín, existuje aj pre elastázu, proteázu nachádzajúcu sa v pľúcnych alvelách. Mutácie, ktoré ovplyvnia vzájomnú interakciu inhibítora a elastázy vedie k poškodeniu pľúc. Túto interakciu dokáže v istých prípadoch poškodiť aj fajčenie cigariet, ktoré vedie k oxidácii Met358 v aktívnom mieste elastázy a zabráni tak vytvoreniu pevného komplexu, čo vedie k chorobe emfyzému, tiež známej ako deštruktívna choroba pľúc.

Niektoré proteolytické enzýmy majú špecifické inhibítory.

Premena zymogénu na proteázu štiepením jednej peptidovej väzby je presný prostriedok na zapnutie enzymatickej aktivity. Avšak, tento aktivačný krok je nevratný, a preto je potrebný iný mechanizmus ako zastaviť proteolýzu. Túto úlohu plnia špecifické inhibítory proteázy. Napríklad inhibítor pankreatického trypsínu, 6 kDa proteín, inhibuje trypsin pomocou veľmi pevnej väzby do aktívneho miesta. Disociačná konštanta komplexu je 0,1 pM, čo zodpovedá štandardnej väzbovej energii viazania cca -75 kJ mol^{-1} . Príčina takejto vysokej stability komplexu spočíva v tom, že inhibítor je veľmi efektívny analóg substrátu trypsínu.

Interaction of trypsin with its inhibitor.

Structure of a complex of trypsin (yellow) and pancreatic trypsin inhibitor (red). Notice that lysine 15 of the inhibitor penetrates into the active site of the enzyme. There it forms a salt bridge with aspartate 189 in the active site. Also notice that bound inhibitor and the free inhibitor are almost identical in structure. [Drawn from 1BPI.pdb.]

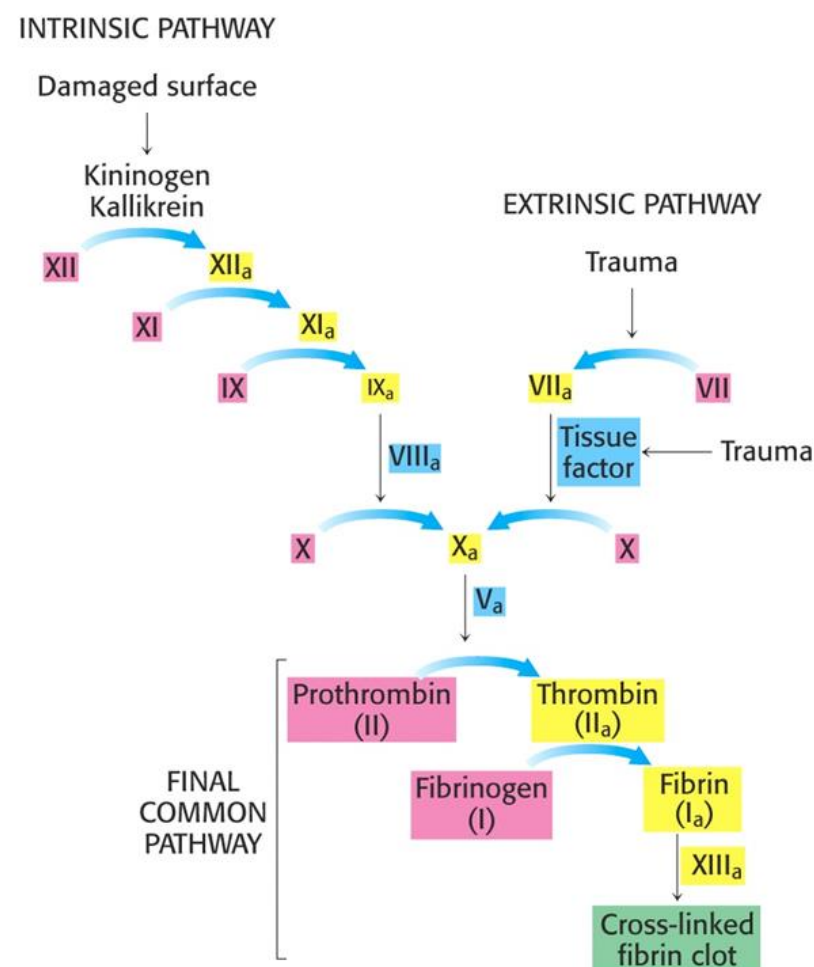


ZRÁŽANIE KRVÍ – INÝ PRÍKLAD AKTIVÁCIE ENZÝMOV PROTEOLYTICKÝM ŠTIEPENÍM

Enzymatické kaskády sa často používajú v biochemických systémoch na dosiahnutie rýchlej reakcie. V kaskáde počiatočný signál iniciuje rad krokov, z ktorých každý je katalyzovaný enzýmom. V každom kroku sa signál zosilňuje. Napríklad, ak signálna molekula aktivuje enzým, ktorý zase aktivuje 10 enzýmov a každý z 10 enzýmov sa aktivuje 10 ďalších enzýmov, po štyroch krokoch bude pôvodný signál zosilnený 10 000-krát. Vytvorenie krvnej zrazeniny je výsledkom kaskády aktivácie zymogénov.

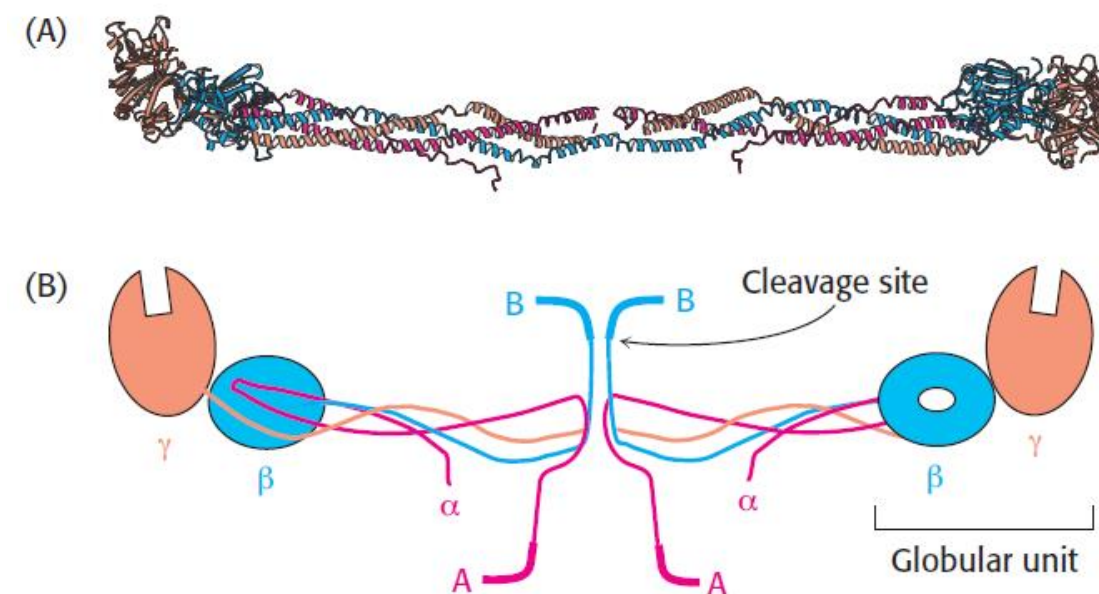
Fibrinogén je transformovaný trombínom na fibrínovú zrazeninu.

Najlepšie charakterizovaná časť procesu zrážania je posledný krok v kaskáde: premena fibrinogénu na fibrín trombínom, proteolytickým enzýmom. Fibrinogén sa skladá z 3 globulárnych jednotiek spojených dvoma extendovanými časťami. Tento 340-kDa proteín obsahuje šesť reťazcov: po dva z α , β a γ . Predĺžené oblasti sú trojvláknové α -helikálne opakujúce sa motívy. Trombín štiepi štyri peptidové väzby arginín – glycín v centrálnej globulárnej oblasti fibrinogénu.



Blood-clotting cascade.

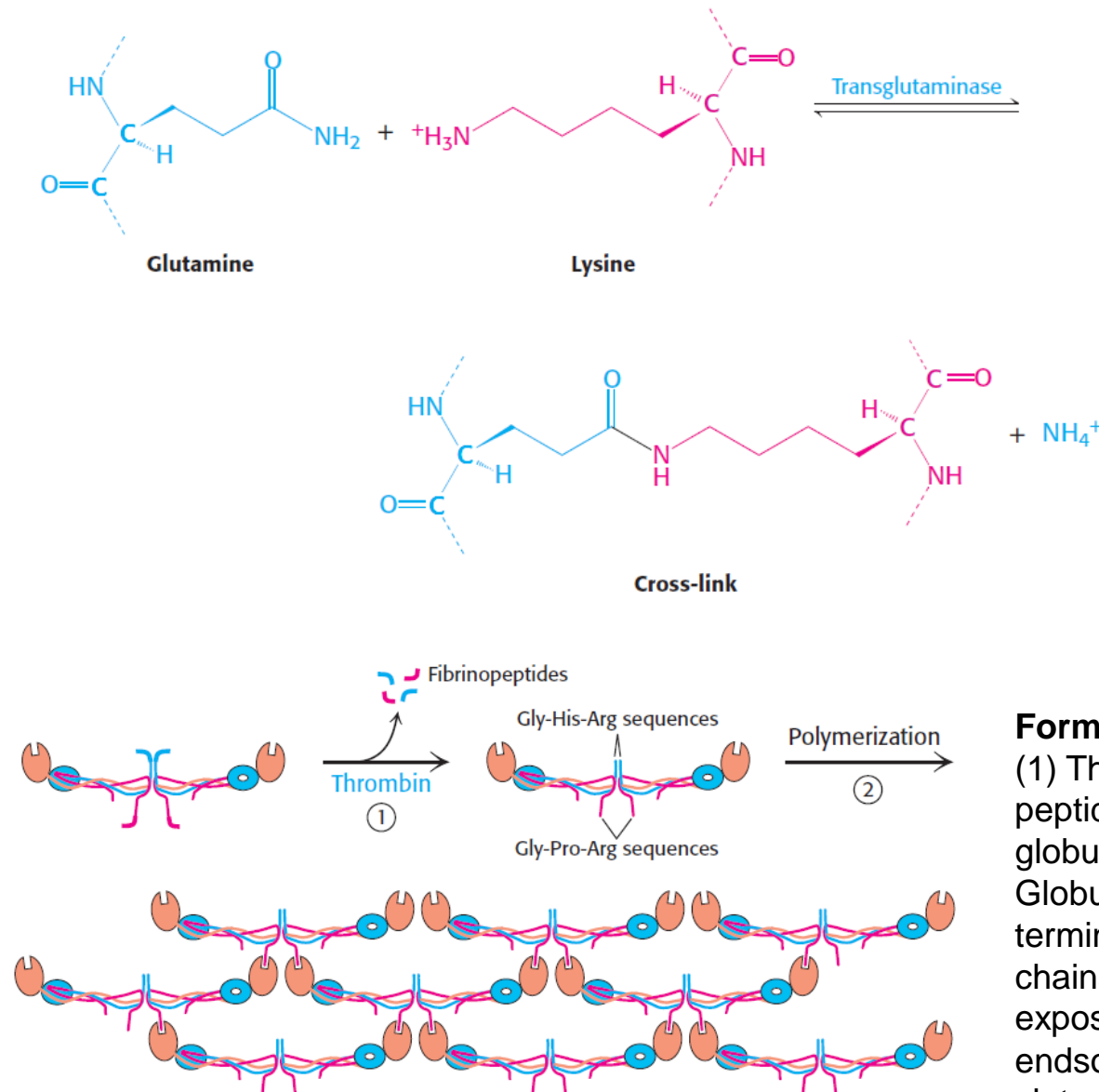
A fibrin clot is formed by the interplay of the intrinsic, extrinsic, and final common pathways. The intrinsic pathway begins with the activation of factor XII (Hageman factor) by contact with abnormal surfaces produced by injury. The extrinsic pathway is triggered by trauma, which releases tissue factor (TF). TF forms a complex with VII, which initiates a cascade-activating thrombin. Inactive forms of clotting factors are shown in red; their activated counterparts (indicated by the subscript "a") are in yellow. Stimulatory proteins that are not themselves enzymes are shown in blue boxes. A striking feature of this process is that the activated form of one clotting factor catalyzes the activation of the next factor.



Structure of a fibrinogen molecule. (A) A ribbon diagram. The two rod regions are α -helical coiled coils, connected to a globular region at each end. The structure of the central globular region has not been determined. (B) A schematic representation showing the positions of the fibrinopeptides A and B. [Part A drawn from 1DEQ.pdb.]

ZRÁŽANIE KRVÍ – POKRAČOVANIE

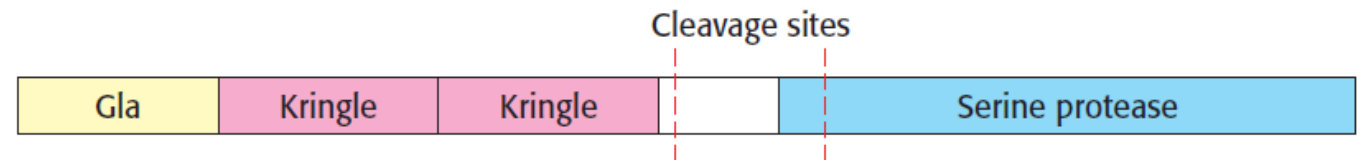
Novo vytvorená „mäkká zrazenina“ je stabilizovaná tvorbou amidovej väzby medzi bočnými reťazcami Lys a Gln v rozdielnych monoméroch:



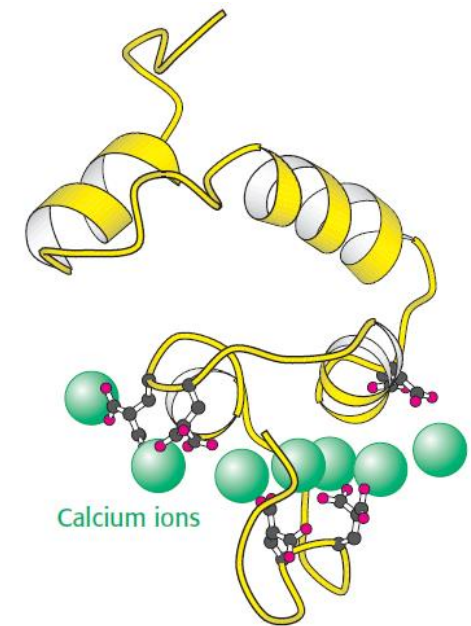
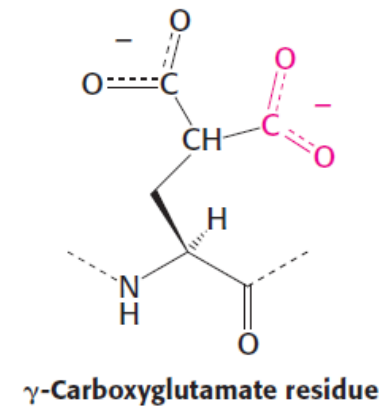
Formation of a fibrin clot.

(1) Thrombin cleaves fibrinopeptides A and B from the central globule of fibrinogen. (2) Globular domains at the carboxyl-terminal ends of the β and γ chains interact with “knobs” exposed at the amino-terminal ends of the β and γ chains to form clots.

Trombín je syntetizovaný ako zymogén nazývaný protrombín. Neaktívna molekula obsahuje štyri hlavné domény so serínovou proteázovou doménou na svojom karboxylovom konci. Prvá doména sa nazýva gla doména (doména bohatá na γ -karboxyglutamát) a druhá a tretia doména sú nazývané kringle domény (pomenované podľa dánskeho pečiva, na ktoré sa podobajú).



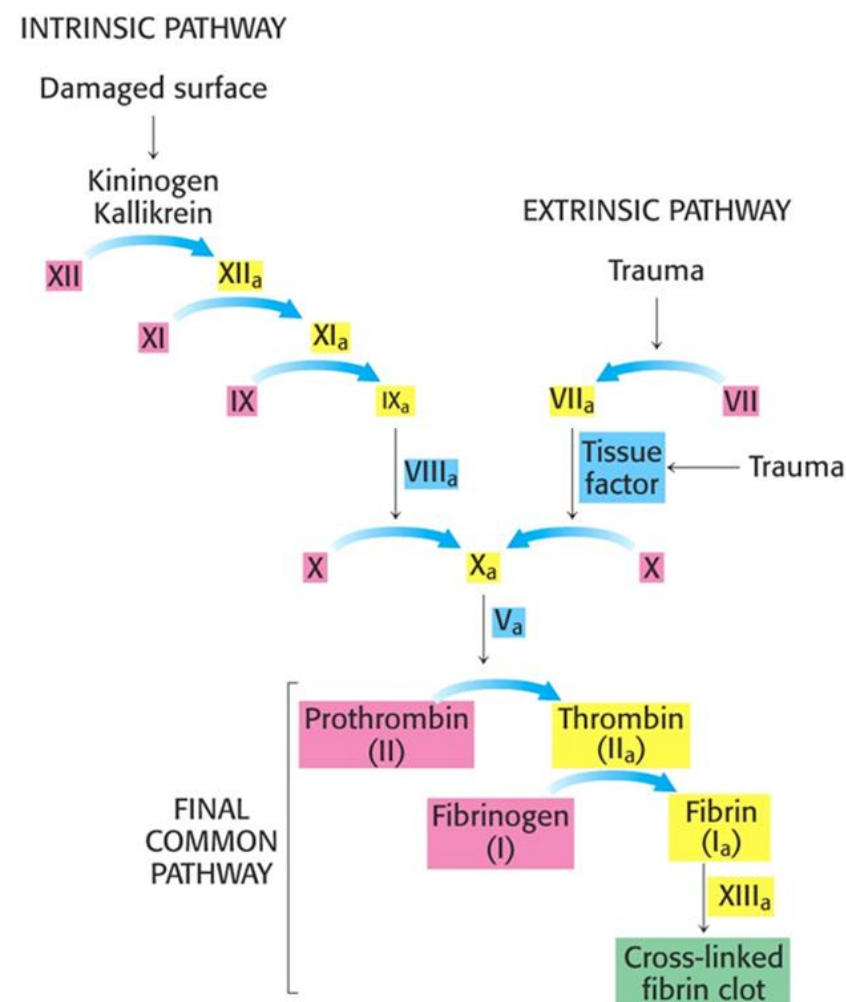
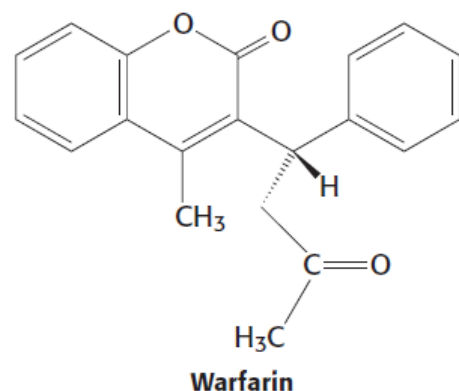
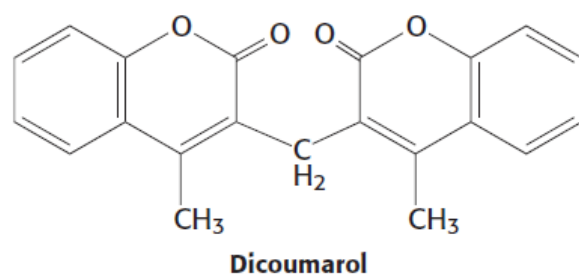
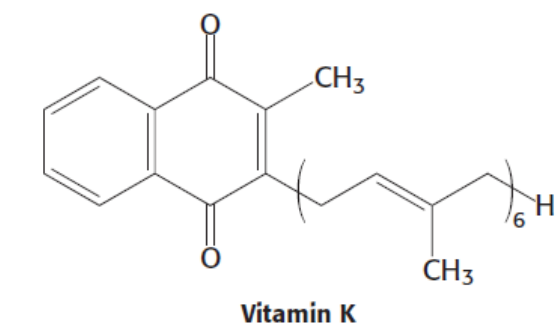
Ukázalo sa, že prítomnosť γ -karboxyglutamátu v N-koncovej doméne protrombínu je kritická. Bez tejto aminokyseliny sa protrombín nedokáže viazať na poškodené miesto. Uchytenie protrombínu je sprotredkované elektrostatickou interakciou γ -karboxyglutamátu s vápenatými kationmi.



The calcium-binding region of prothrombin. Prothrombin binds calcium ions with the modified amino acid γ -carboxyglutamate (red). [Drawn from 2PF2.pdb.]

ZRÁŽANIE KRVI – POKRAČOVANIE

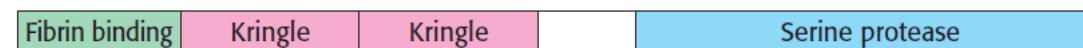
Tvorba γ -karboxyglutamát je uskutočnená v reakcii, ktorá je podmienená prítomnosťou vitamínu K.
Tzv. antagonisti vitamínu K, akými sú Dikumarol a Warfarin, sa používajú na zníženie zrážanlivosti krvi alebo tiež ako jedy na hlodavce.



Medzi krvácaním a trombózou (tvorba krvné zrazeniny v krvných cievach) je tenká hranica. Zrazeniny sa musia vytvárať rýchlo, ale musia zostať obmedzené iba na oblasť zranenia. Aké sú mechanizmy, ktoré obmedzujú zrážanlivosť krvi?
K obmedzeniu zrážanlivosti, resp. jeho kontrole, výrazne prispieva labilita faktorov zrážania. Aktivované faktory sú krátko-žijúce, pretože sú riedené prietokom krvi, odstránené pečeňou a degradované proteázami.
Stimulačné proteínové faktory Va a VIIIa sú štiepené proteínom C, proteázou, ktorá je aktivovaná pôsobením trombínu.
Trombín má teda dvojakú funkciu:
katalyzuje tvorbu fibrínu
a iniciuje deaktiváciu zrážacej kaskády.

Iným faktorom, ktorý prispieva k regulácii zrážanlivosti krvi je inhibítor antitrombín III, ktorý inhibuje nielen trombín, ale aj faktory XIIa, XIa, IXa a Xa.

Antitrombín obmedzuje veľkosť zrazeniny, ale čo sa stane so samotnou zrazeninou. Fibrín je štiepený **plazmínom**. Plazmín je tvorený proteolytickou aktiváciou plasminogenu a to proteázou s názvom **tissue-type plasminogen activator** (TPA). Je zaujímavé, že TPA má podobnú modulárnu štruktúru ako protrombín:



ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Uviesť a popísať základné typy katalýzy.
- Popísať kovaletnú katalýzu na príklade katalytického mechanizmu chymotrypsínu.
- Popísať úlohu katalytickej triády.
- Popísať katalýzu pomocou katiónov kovu na príklade karbonickej anhydrázy.
- Popísať základné spôsoby regulácie aktivity enzýmov.
- Popísať význam kaskádovej aktivácie enzýmov v prípade zrážanlivosti krvi.