

Hydrolytická chémia

hydrolázy a lyázy závislé od iónov kovov

- prvé popísané metaloenzýmy
- V tejto časti sú najviac popisované kofaktory iónov kovov, ktoré pôsobia ako Lewisove kyseliny

Zabezpečujú:

- aktiváciu nukleofilných centier organických substrátov
- Ionizáciu elektrofilných centier prostredníctvom H_2O alebo OH^-
- Stabilizáciu intermediátov

Hydrolytická chémia

hydrolázy a lyázy závislé od iónov kovov

- Ióny kovov so svojim vysokým stupňom Lewisovej acidity umožňujú priebeh mnohých hydrolytických a kondenzačných reakcií za fyziologických podmienok, ktoré by inak na svoj priebeh potrebovali extrémne nízke hodnoty pH
- Neredox kovy sa využívajú preto, aby boli chránené citlivé funkčné skupiny v proteínoch a nukleových kyselinách, aby neboli degradované oxidáciou
- Preto sú Zn^{2+} a Mg^{2+} ióny bežne používanými Lewisovými kyselinami v hydrolytických reakciách

Prečo používa príroda na hydrolytické reakcie Zn^{2+} a Mg^{2+} ióny - zhrnutie:

- vysokým stupňom Lewisovej acidity = zabezpečenie rýchlych dejov
- Ochrana substrátov pred oxidáciou
- Schopnosť meniť koordinačné číslo (hlavne Zn^{2+} ión) = flexibilita aktívneho centra

Zinok

- Výskyt – sfalerit ZnS
zinkit ZnO
smithsonit ZnCO_3
- Metalotioníny – prenos Zn^{2+} v tele
- ATPázy – prenos Zn^{2+} cez bunčné membrány

Zinok

- V roku 1934 sa zistilo, že zinok je potrebný pre normálny rast a vývoj cicavcov a ľudského organizmu. O jeho prítomnosti v rastlinných a živočíšnych tkanivách sa vedelo už skôr.
- Ľudský organizmus s hmotnosťou 70 kg obsahuje približne 2 g Zn (množstvo Zn v rôznych ľudských organizmoch môže byť v rozmedzí 1,4 až 2,3 g).
- Zinok sa vyskytuje v oxidačnom čísle II v dôsledku svojej elektrónovej konfigurácie ($4s^23d^{10}$).
- Hoci Zn^{II} má elektrónovú konfiguráciu $3d^{10}$, je podobný iónom prechodných kovov.
- Zn^{II} sa zúčastňuje najmä tých metabolických procesov, v ktorých ide o katalytické alebo regulačné procesy, kontrolu pH.

Vplýva i na funkciu žliaz s vnútornou sekréciou. Je súčasťou molekuly inzulínu a zúčastňuje sa jeho syntézy a sekrécie.

Zinok

- V stopových množstvách bol zinok dokázaný prakticky vo všetkých orgánoch (v pečeni, pankrease, hypofýze, oku, vo vlasoch, je súčasťou krvného séra, erytrocytov a leukocytov).
- **Zinok je dôležitý pre správnu funkciu imunitného systému, rast a reprodukciu.**

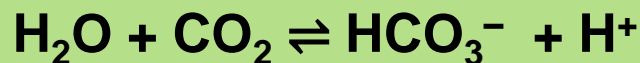
Enzýmy zinku

- **Karboanhydráza (CA)**

- je metaloenzým obsahujúci Zn^{II} , ktorý je prítomný v ľudskom organizme, živočíšnych, rastlinných organizmoch a určitých mikroorganizmoch.

- **katalyzuje štiepenie kyseliny uhličitej na vodu a CO_2 , resp. syntézu tejto kyseliny z uvedených zložiek.**

Katalyzuje hydrolýzu CO_2 cca 10^7 rýchlejšie vzhľadom na nekatalyzovanú reakciu:



- je biologicky veľmi dôležitý enzým, pretože má nevyhnutnú úlohu v procese dýchania (rýchle odstraňovanie CO_2), fotosyntézy, kalcifikácie a dekalifikácie (tvorba a degradácia skeletov obsahujúcich uhličitany) alebo pri kontrole pH.

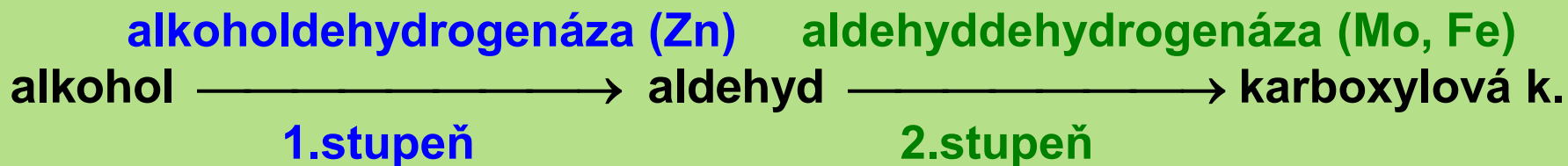
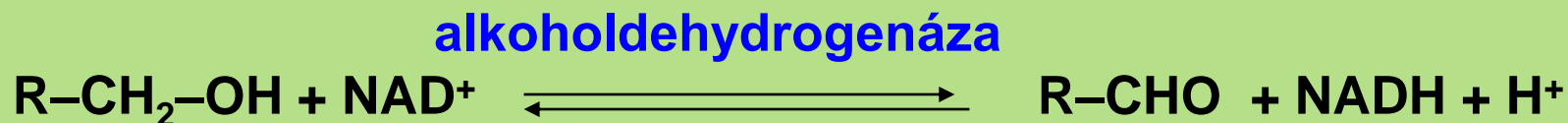
Enzýmy zinku

- **Karboxypeptidáza A (CPA)**
 - katalyzuje hydrolýzu koncovej aminokyseliny reťazca peptidov alebo bielkovín.
 - enzým syntetizovaný v pankrease = **Enzým zažívacieho traktu**
 - V aktívnom centre obsahuje 1 atóm zinku
 - Uprednostňuje štiepenie C-koncového zvyšku peptidu s veľkými aromatickými postrannými reťazcami
 - patrí medzi exopeptidázy
 - Podobný enzým karboxypeptidáza B uprednostňuje štiepenie N-koncových zvyškov peptidov

Enzýmy zinku

- **Alkoholdehydrogenáza**

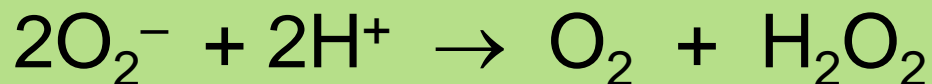
- Katalyzuje oxidačnú konverziu primárnych alkoholov na aldehydy



Enzýmy zinku

ZnCuSOD

katalyzuje disproporcionačnú reakciu („dismutation“) toxického superoxidového aniónu O_2^- na kyslík O_2 a peroxid vodíka H_2O_2 .



Superoxidový anión (superoxide) je biologicky veľmi toxický

- Vid' med'

Enzýmy zinku, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Alkalická fosfatáza

- Izolovaná z *E. Coli*
- Dimérny enzým, ktorý hydrolyzuje množstvo esterov obsahujúcich fosfátovú skupinu
- Hydrolýza monoesterov kyseliny fosforečnej v alkalickom prostredí na kyselinu fosforečnú a alkohol
- Optimálna hodnota pH pre aktivitu je 8 = preto alkalická
- Každá subjednotka obsahuje dva ióny Zn^{2+} (4 Å od seba) a jeden Mg^{2+} ión (vzdialený 5-7Å od dvojjadrového aktívneho centra – nepodieľa sa na katalýze, stabilizuje štruktúru)

Enzýmy zinku, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Alkalická fosfatáza

- Jeden Zn^{2+} je lokalizovaný blízko hydroxylovej skupiny Ser = dochádza k zníženiu $\text{p}K_a$ hodnoty hydroxylu, čo umožňuje nukleofilný atak fosfátu
- Ďalší Zn^{2+} ión stabilizuje negatívny náboj na alkoxidovej skupine
- Vzniká trigonálne-bipyramidálny intermediát s koordinačným číslom 5 na oboch Zn^{2+} iónoch

Enzýmy zinku, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Fialová kyslá fosfatáza

- kyslá, pretože jej optimálna hodnota pH pri katalýze je 4.9-6.0
- Hydrolyzuje ortofosfáty monoesterov na alkohol a kyselinu fosforečnú
- Je široko zastúpená v prírode
- V aktívnom centre obsahuje Fe^{3+} a Zn^{2+} ión – prenos náboja z tyrozinátového zvyšku na Fe^{3+} ión spôsobuje fialové sfarbenie
- FeZn kyslé fosfatázy sa nachádzajú u rastlín
- U stavovcov sú prítomné $\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}$ fosfatázy

Enzýmy zinku, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Trojjadrové enzýmy zinku

- Fosfolypáza C – presúva fragmenty fosfátových esterov z fosfolipidov
- Nukleáza P1 – katalyzuje hydrolýzu jedno-reťazcovej RNA a DNA a tiež odstraňovanie 5-fosfátových skupín

Horčík

Výskyt: prevažne v uhličitanoch

MgCO_3 magnezit

$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ dolomit

- hydratované ióny tohto kovu majú stabilný oxidačný stav, je dobre rozpustný a tvorí komplexy s veľmi rýchlymi výmenami. Preto je jeho transport nekomplikovaný a priamy (jednoduchou difúziou alebo pomocou ionofórov)

Enzýmy horčík

- Hrá úlohu v enzymatických reakciách dvoma spôsobmi:

1. Enzým môže viazať Mg-substrát komplex (b)

Mg-enzým interaguje so substrátom a tento komplex interaguje slabso s ďalším Mg^{2+} iónom (Mg isocitrát v isocitrát lyáze)

2. Mg^{2+} sa priamo viaže k enzýmu (a) a mení jeho štruktúru alebo má katalytickú úlohu

Mg^{2+} ión môže byť nahradený iným kovom avšak to je často spojené so znížením účinnosti a špecifickosti enzýmu voči danému substrátu

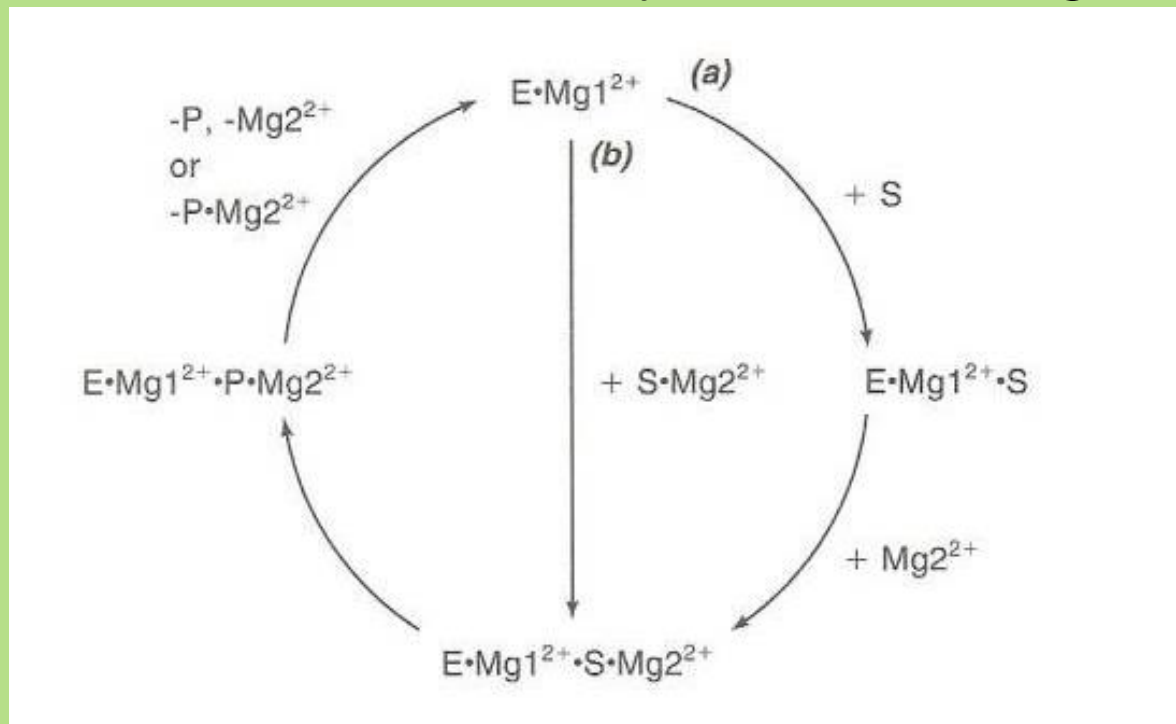
Pozn. Mg^{2+} sa viaže na proteíny slabso, preto sa nie vždy izolujú enzýmy obsahujúce Mg^{2+} spolu s kovom

- Aby enzým pracoval v roztoku (*in vitro*) musí byť pridané dostatočné množstvo Mg^{2+}
- Koncentrácie Mg^{2+} sú milimolárne a dostatočné pre ich činnosť *in vivo*

Enzýmy horčíka

- Mnoho metabolických cyklov u vyšších organizmov (citrátový, glykolytický cyklus) sú sprostredkované Mg-enzýmami

Obr. Dva všeobecné mechanizmy pôsobenia Mg-enzýmov



Enzýmy horčíka

Xylóza izomeráza

- Katalyzuje izomerizáciu xylózy
- Kinetické experimenty potvrdzujú, že prvým krokom katalýzy je viazanie Mg^{2+} na jednom mieste, čím sa uľahčí ďalšie viazanie substrátu, správna orientácia a stabilizácia reakčného intermediátu (mechanizmus **a**)
- Druhý kation sa potom naviaže a začína sa konverzia.
- Molekula vody pravdepodobne napomáha v prenášaní protónov medzi hydroxylovým a karbonylovým kyslíkom.

Enzýmy horčíka

Izocitrát lyáza

- Katalyzuje reverzibilné štiepenie izocitrátu na glyoxylát a sukcinát
- potrebný dvojmocný ión Mg^{2+} na podporu aktivity enzýmu.
- Enzým je tetramérny so štyrmi identickými jednotkami
- Substrát je Mg^{2+} -izocitrátový komplex a ďalší nekatalický ión Mg^{2+} bol identifikovaný v aktívnom centre – aktivuje enzým tým, že vyvolá konformačné zmeny na enzýme (mechanizmus **b**)

Enzýmy horčíka

Glutamín syntetáza

- Katalyzuje tvorbu glutamínu z glutamátu a NH_3 za súčasnej hydrolýzy ATP
- Štúdia identifikovali dve centrá (s vysokou a nízkou afinitou, 5.8 Å vzdialené)
- Vysoko-afinitné centrum je katalytickým kofaktorom (chelát MgATP)
- Nizko-afinitné centrum zabezpečuje elektrostatickú stabilizáciu a Lewisovu kyselinu pre katalýzu

Enzýmy horčíka

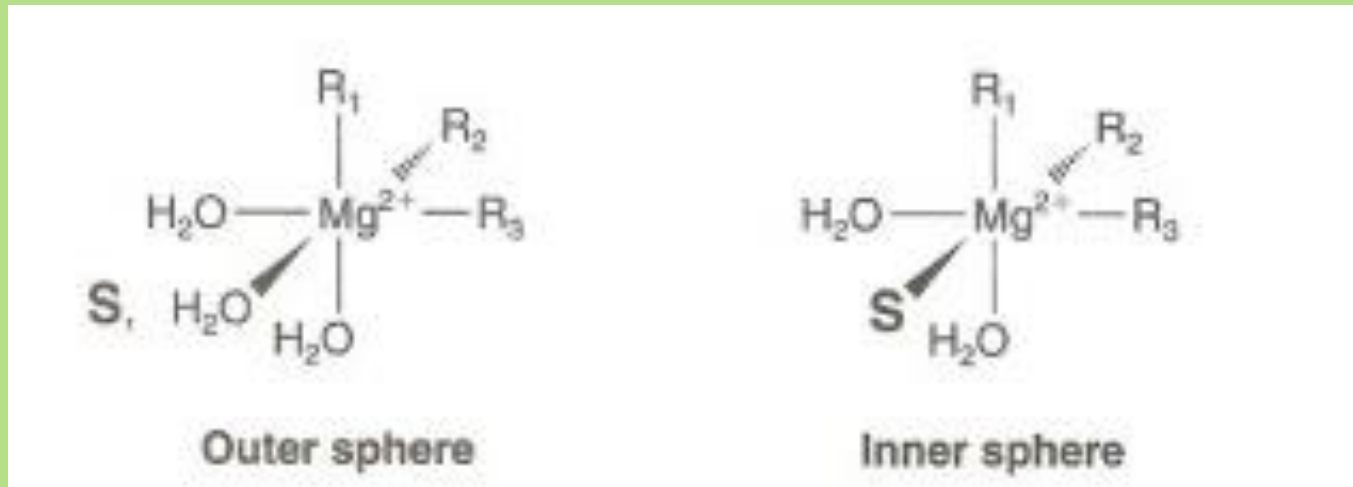
L-aspartáza

- Katalyzuje reverzibilnú deamináciu kyseliny aspartátovej za vzniku kyseliny fumárovej a NH_3
- Nepotrebuje MgATP k substrátu, je potrebný len jeden kovový kofaktor

Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

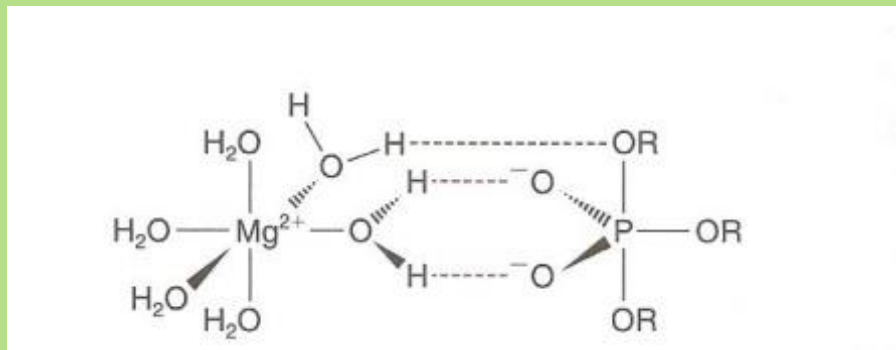
- Mg^{2+} tvorí metal-proteínové komplexy \Rightarrow Mg^{2+} je labilne koordinovaný na proteín
- Hydrolýza NK pomocou štruktúr obsahujúcich Mg^{2+} sa popisuje dvoma mechanizmami:
 - Vonkosféry (outer sphere)
 - Vnútrosféry (inner sphere)

Obr. Porovnanie vnútrošférneho a vonkosférneho modelu aktivácie substrátu



Obr. Stabilizácia tranzitného stavu pomocou tvorby **vonkosférneho** komplexu s hydratovaným Mg^{2+}

Tranzitný stav je stabilizovaný elektrostaticky a zároveň vodíkovými interakciami napr. **Mg-NTP komplex** (NTP = nukleotid trifosfát)



Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

- Prečo?

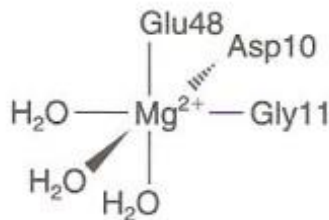
Mg²⁺ má:

- Malý iónový polomer
- vysokú nábojovú hustotu
 - = radšej viažu molekuly vody ako objemné ligandy
 - = uprednostňujú vonkosfére mechanizmy hydrolýzy pomocou Mg-proteínových komplexov

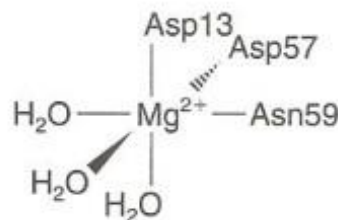
Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Mg²⁺ má:

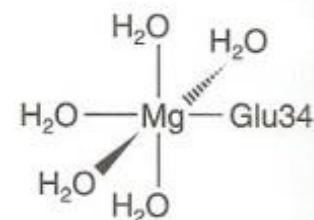
- Variabilný stupeň solvatácia
- od toho závisí, aký počet zvyškov aminokyselín z enzýmu je viazaný na ión kovu =
- optimalizácia väzbovej afinity Mg²⁺ iónu za fyziologických podmienok



Ribonuclease H



Che Y



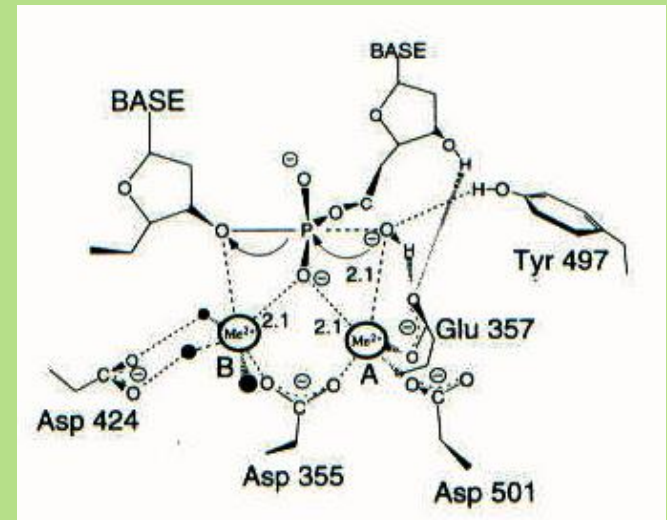
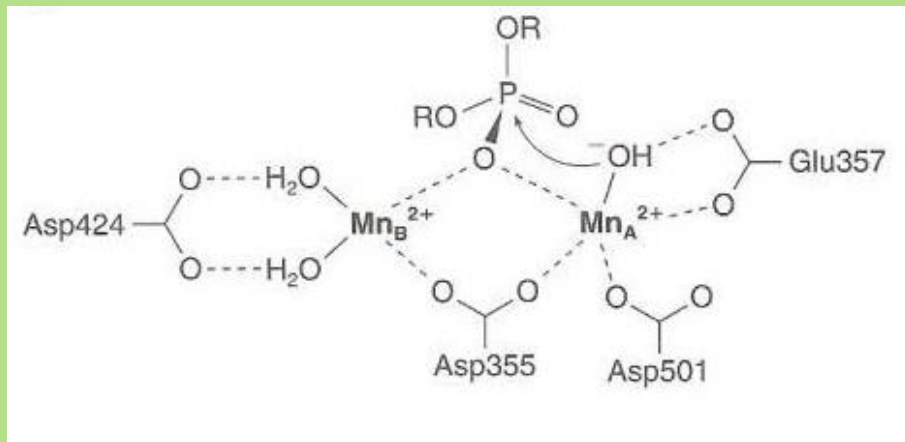
Exonuclease III

Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Mechanický model pre hydrolýzu hlavného reťazca nukleových kyselín fosfodiesterov, zahŕňa dva spôsoby:

1. Model obsahujúci dva ióny kovu
2. Model obsahujúci jeden ión kovu

1. model obsahujúci dva ióny kovu

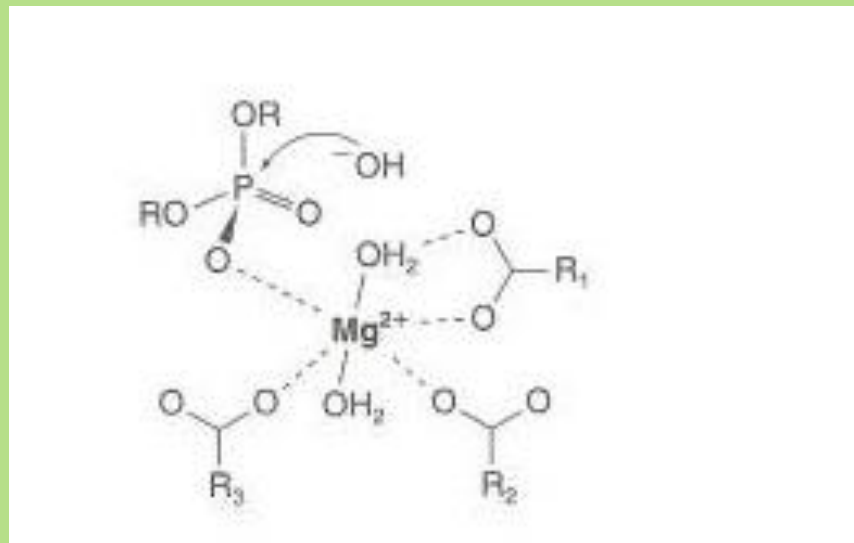


- dva ióny kovu (obvykle Zn^{2+} a Mn^{2+}) vzdialené 4Å sú premostené spoločným substrátom
- jedinečnosť týchto enzýmov oproti ostatným (napr. dvojjadrovým Zn^{2+} enzýmom) – obsahujú spoločnú katalytickú jednotku so substrátom
- príkladom je **Klenow fragment** (obr.), v ktorom **jeden dvojmocný ión** orientuje substrát (reťazec DNA) a tiež orientuje a aktivuje viazanú vodu a **druhý je** poskytnutý (ako Lewisova kyselina) na viazanie substrátu a stabilizáciu negatívneho náboja pre viazanie substrátu. Je esenciálny pre korigovanie reakcie

2. model obsahujúci jeden ión kovu

1. model má však určité nevýhody pre enzýmy Mg^{2+} :

- Mg^{2+} má vysokú hustotu náboja \Rightarrow elektrostatická bariéra pre prítomnosť druhého iónu Mg^{2+}
- aktivácia substrátu deprotonizovanou časticou $\text{Mg}^{2+}\text{-OH}^-$ je málo pravdepodobná vzhľadom na $\text{p}K_a$ molekuly vody v $\text{Mg}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$ častici
- hydrolytické činidlo bude voľná molekula vody prítomná v blízkosti aktívneho centra



Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

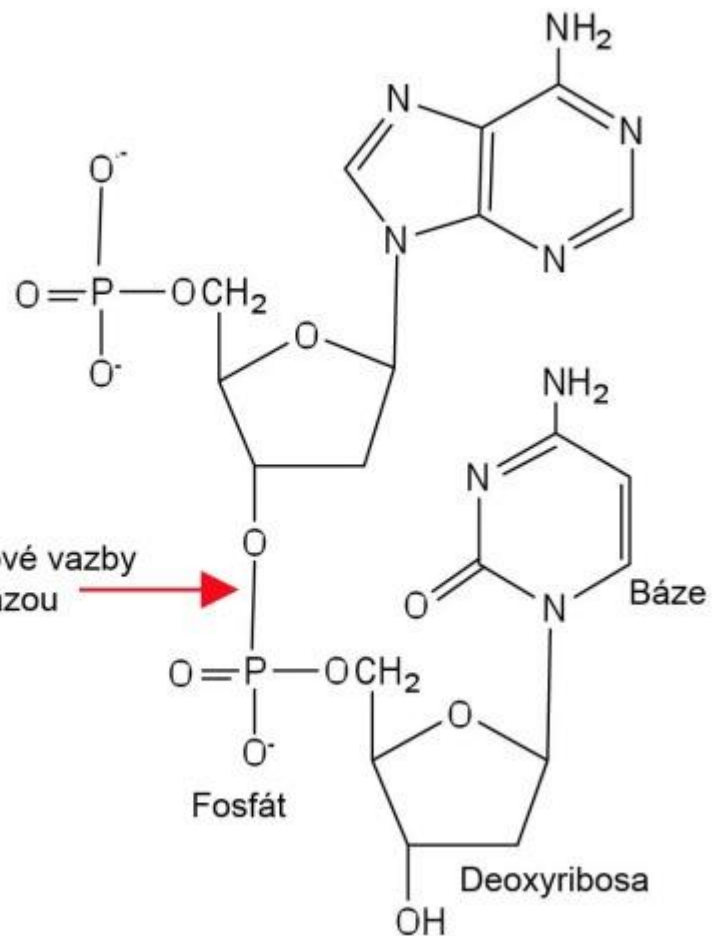
- Endonukleázy
- Exonukleáza
- Polymerázy
- Enzýmy katalyzujúce prenos fosforýlu
fosforylácia a defosforylácia

Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Reštrikčné endonukleázy

- štiepia fosfodiesterovú väzbu (pri krátkej špecifickej nukleotidovej sekvencii, ktorý tento enzým rozpozná) vo vnútri polynukleotidového reťazca DNA na oboch reťazcoch dvojzávitnice.
- Restrikčné endonukleázy produkujú **prokaryotické organizmy, baktérie aj archea** a používajú ich na obranu proti vírusom.
- Cudzia DNA je týmto enzýmom rozpoznaná, kým DNA hostiteľského organizmu je chránená aktivitou enzýmu metyltransferáza, ktorá danú sekvenciu genómu metyluje a tým sa v týchto sekvenciách štiepenie blokuje
- Bol u nich potvrdený proces štiepenia realizovaný pomocou mechanického **modelu 2. typu vnútroférnym modelom aktivácie**

Štěpení fosfodiesterové vazby
restrikční endonukleázou



Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Exonukleáza

- Ich aktivitu možno definovať ako odstránenie nukleotidových fragmentov z 3` alebo 5` konca reťazca nukleovej kyseliny (obvykle jedného reťazca dvojzávitnicového substrátu) hydrolýzou koncového fosfodiesterového spojenia
- Aktivita je spojená s tvorbou Klenowho fragmentu

Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Polymerázy

- Enzýmy, ktoré katalyzujú replikáciu a syntézu reťazcov DNA a RNA z jednoduchých reťazcov alebo dvojítych vzorov polynukleotidov
- Sú multifunčné – zohrávajú aj úlohu exonukleáz prípadne hydrogéntransferáz (odovzdávanie H^+ na β -fosfát) alebo majú aj 3'-5'-exonukleázovú aktivitu, vďaka ktorej sa môže polymeráza "vrátiť" a odbúrať práve syntetizovanú dvojicu nukleotidov
- Podobne, ako iné enzýmy interagujúce s DNA, potrebuje DNA polymeráza pre svoju aktivitu **horečnaté kationy Mg^{2+}** , ktoré stabilizujú záporne nabitú fosfátové skupiny DNA

Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

Enzýmy katalyzujúce prenos fosforýlu fosforylácia a defosforylácia

- Reakcie prenosu fosfátu alebo fosforýlu sú všadeprítomné v biochémii bunky a potrebujú Mg^{2+} ión ako esenciálny kofaktor
- Rozdiely medzi enzýmami v tejto triede sú vzťahované k funkcii Mg^{2+} :
 1. viaže sa s fosfátovou jednotkou di- alebo trifosfátu
 2. viaže sa s postrannými reťazcami enzýmu

Enzýmy horčíka, ktoré katalyzujú hydrolýzu nukleových kyselín

V prvom prípade

- Mg^{2+} počas hydrolýzy ATP (dochádza k tvorbe Mg-NTP komplexu) aktivuje β -fosfát smerom k jeho protonizácii a súčasne uvoľňuje pyrofosfát.
- Mg^{2+} zároveň podporuje elektrostatickú repulziu medzi vstupujúcim nukleofilom a koncovým fosfátom

Mechanizmus nie je úplne jasný, ale vie sa, že na základe hydrolýzy γ -fosfátu sa Mg^{2+} ión koordinuje ku karbonylu Asp57, pričom si ponecháva iba jeden fosfátový ligand.

Keď sa naviaže Asp57 uvoľní sa Thr35.

Tieto zmeny v koordinačnej sfére spôsobia veľké zmeny v konformácii aktívneho centra („effector loop“)

