

Enzýmy

(Prednáška 5)

ENZÝMY

Enzýmy, katalyzátory biologických systémov, sú pozoruhodné molekulárne zariadenia, ktoré určujú typy chemických transformácií. Enzýmy sprostredkujú tiež premenu jednej formy energie na inú. Štvrtina génov v ľudskom genóme kóduje enzýmy, čo je dôkazom ich významu pre život. Najvýraznejšie charakteristiky enzýmov sú ich **katalytická sila a špecifickosť**.

Katalýza sa uskutočňuje na špecifickom mieste na enzýme nazývaný **aktívne miesto**.

Takmer všetky známe enzýmy sú proteíny. Proteíny však nemajú absolútny monopol na katalýzu; objav katalyticky aktívnych molekúl RNA poskytuje presvedčivý dôkaz, že RNA bola biokatalyzátorom na začiatku evolúcie. Bielkoviny ako skupina makromolekúl sú vysoko účinnými katalyzátormi pre enormnú rozmanitosť chemických reakcií kvôli ich schopnosti **špecifickej interakcie s veľmi širokým rozsahom molekúl**.

Využitím celého repertoáru intermolekulárnych interakcií, enzýmy spájajú substráty v optimálnej orientácii, čo je nevyhnutné k vytvoreniu a prerušeniu chemických väzieb. Enzýmy katalyzujú reakcie tým, že stabilizujú prechodné stavy, t.j. stavy s najvyššou energiou substrátov v reakčných cestách.

Enzýmy:

- katalyzátory v biologických systémoch
- schopné transformovať jednu formu energie na druhú
- ich základná charakteristika: katalytická sila a špecificita
- takmer vždy - proteín
- katalyzujú množstvo rozdielnych chemických reakcií

ENZÝMY

Enzýmy v porovnaní s nekatalyzovanou reakciou :

(i) výrazne urýchľujú rýchlosť reakcie:

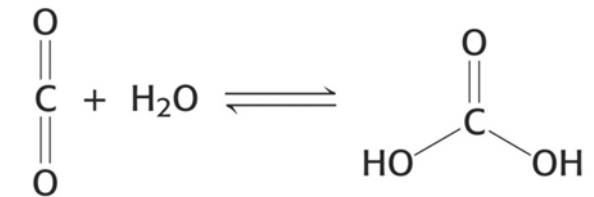
TABLE 8.1 Rate enhancement by selected enzymes

Enzyme	Nonenzymatic half-life	Uncatalyzed rate ($k_{\text{un}} \text{ s}^{-1}$)	Catalyzed rate ($k_{\text{cat}} \text{ s}^{-1}$)	Rate enhancement ($k_{\text{cat}}/k_{\text{un}}$)
OMP decarboxylase	78,000,000 years	2.8×10^{-16}	39	1.4×10^{17}
Staphylococcal nuclease	130,000 years	1.7×10^{-13}	95	5.6×10^{14}
AMP nucleosidase	69,000 years	1.0×10^{-11}	60	6.0×10^{12}
Carboxypeptidase A	7.3 years	3.0×10^{-9}	578	1.9×10^{11}
Ketosteroid isomerase	7 weeks	1.7×10^{-7}	66,000	3.9×10^{11}
Triose phosphate isomerase	1.9 days	4.3×10^{-6}	4,300	1.0×10^9
Chorismate mutase	7.4 hours	2.6×10^{-5}	50	1.9×10^6
Carbonic anhydrase	5 seconds	1.3×10^{-1}	1×10^6	7.7×10^6

Abbreviations: OMP, orotidine monophosphate; AMP, adenosine monophosphate.

Source: After A. Radzicka and R. Wofenden. *Science* 267 (1995):90–93.

- príklad – relatívne jednoduchá reakcia akou je hydratácia CO_2



je urýchlená enzýmom „karbonickou anhydrázou“ ~ miliónkrát. Karbonická anhydráza patrí k narýchlejším enzýmom, ktoré poznáme.

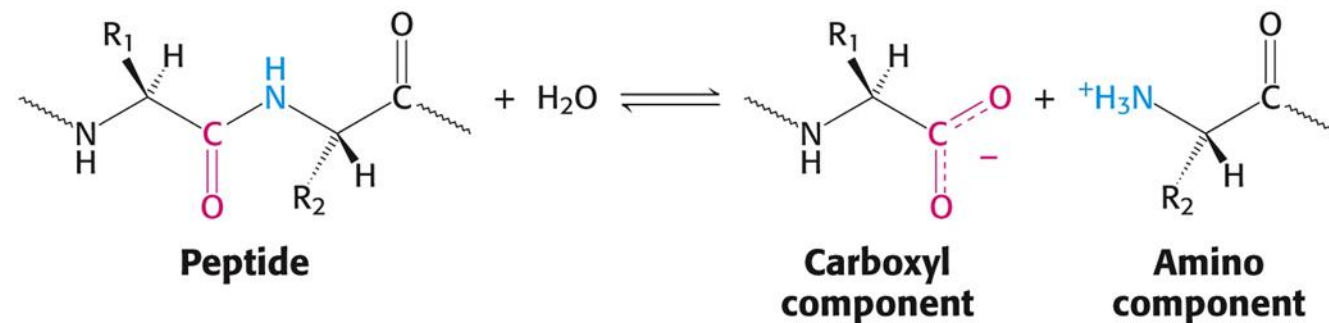
(ii) katalyzujú reakcie pri miernych podmienkach – vodné prostredie, atmosférický tlak, teplota 37°C ,

(iii) katalyzujú reakcie s vyššou špecifitou, zvyčajne bez produkcie tzv. bočných produktov,

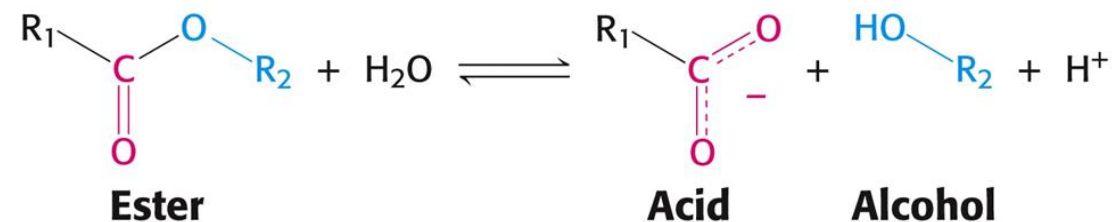
(iv) sú často komplexne regulované.

ENZÝMY

Enzýmy sú vysoko špecifické z hľadiska katalyzovanej reakcie. Ako príklad uvádzam proteolytické enzýmy – proteázy, ktoré hydrolyzujú peptidovú väzbu:

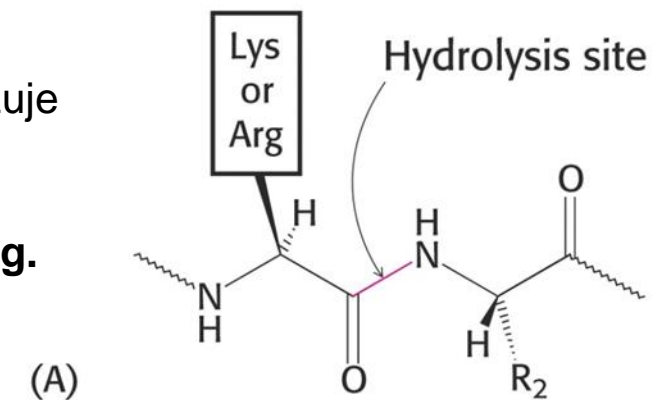


Väčšina proteáz je schopná in vitro katalovať aj inú, ale podobnú, reakciu, a to hydrolyzu esterovej väzby:

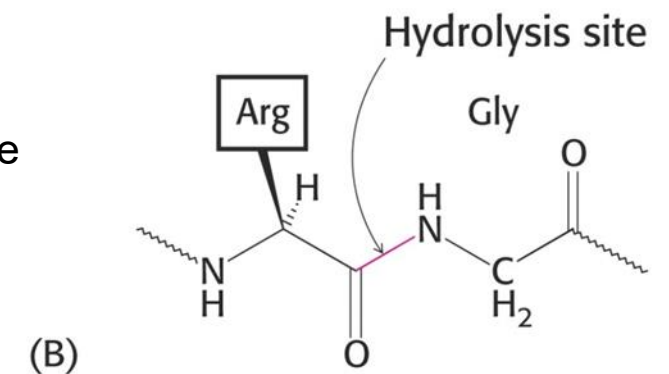


Enzýmy môžu byť vysoko špecifické aj z hľadiska výberu reaktantov, ktoré nazývame **substráty**.

Proteáza **trypsín** hydrolyzuje peptidovú väzbu iba po kladne nabitých aminokyselinách - **Lys, Arg**.



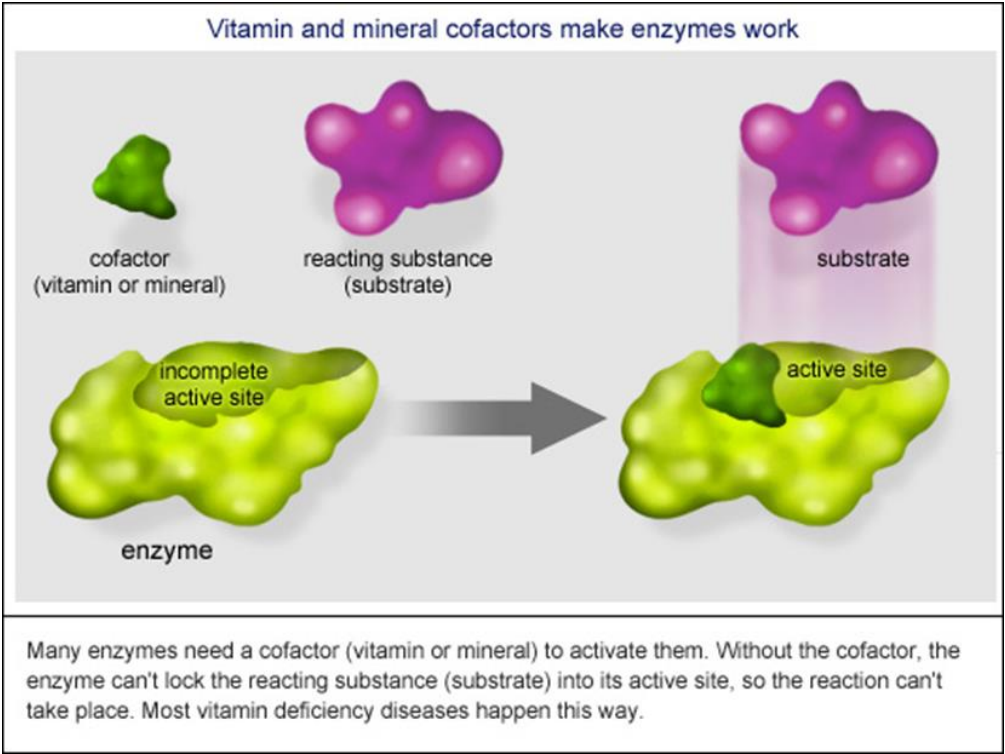
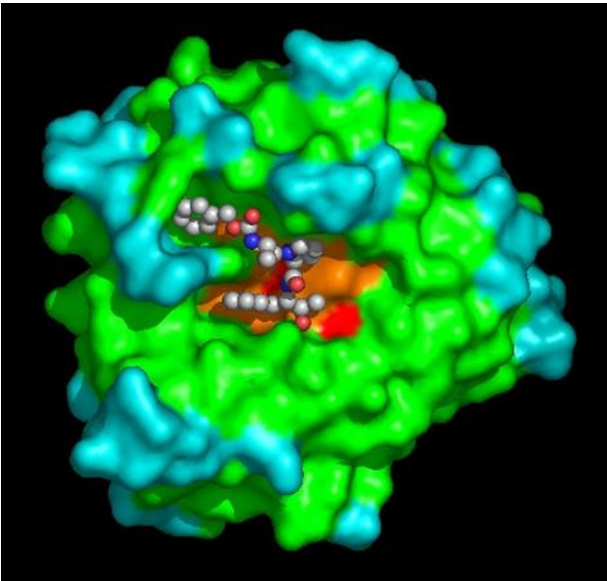
Proteáza **trombín** špecifickejšia a hydrolyzuje peptidovú väzbu iba **medzi Arg a Gly**.



Na druhej strane, proteáza **papaín** je nešpecifická a hydrolyzuje akúkoľvek peptiovú väzbu.

ENZÝMY

Špecifita enzýmov je dôsledkom presnej interakcie substrátu s enzýmom. Presnosť je dôsledok komplementarity 3D-štruktúry väzobného miesta na enzýme a substrátu.



Katalytická aktivita mnohých enzýmov závisí od prítomnosti malých Molekúl, ktoré sa označujú ako **kofaktory**, aj keď presná rola sa mení podľa kofaktora a enzýmu. Všeobecne sú tieto kofaktory schopné vykonávať chemické reakcie, ktoré nie je možné vykonať pomocou štandardnej sady dvadsiatich aminokyselín.

Apoenzým = enzým bez kofaktora/len proteínová časť

Holoenzým = kompletný, katalytický aktívny enzým

apoenzým + kofaktor = holoenzým

Kofaktory možno rozdeliť do dvoch skupín: (1) kovy a (2) malé organické molekuly nazývané **koenzýmy**. Často pochádzajú z vitamínov, koenzýmy sa môžu k enzýmu viazať buď pevne alebo voľne.

Pevne viazané koenzýmy sa nazývajú **prostetické skupiny**. **Voľne** spojené koenzýmy sú viac ako **kosubstráty**, pretože ako substráty a produkty, viažu sa na enzým a uvoľňujú sa z neho.

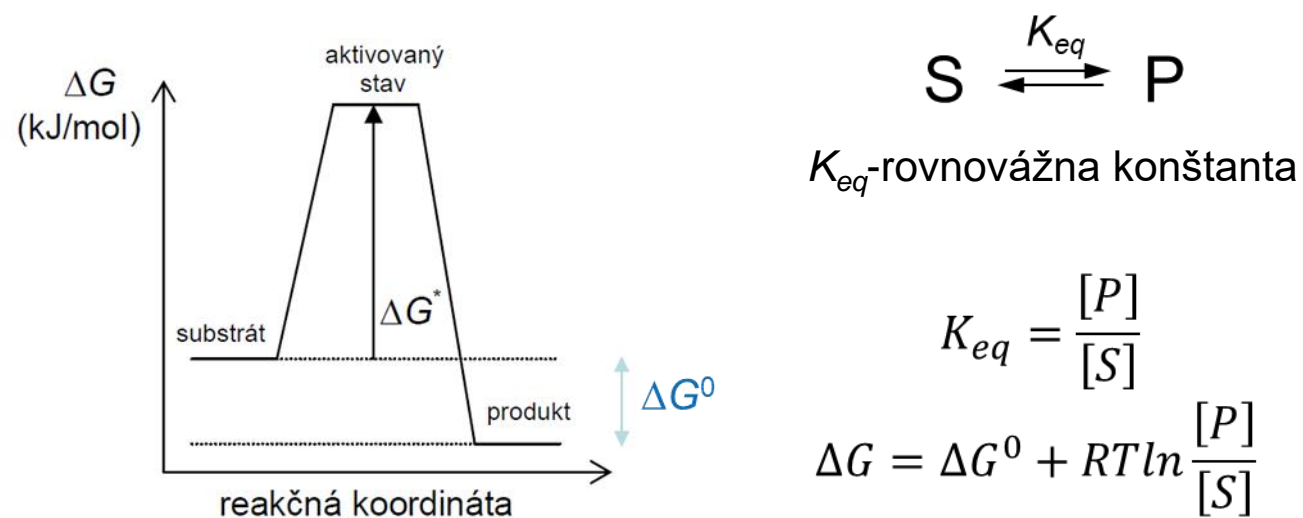
TABLE 8.2 Enzyme cofactors

Cofactor	Enzyme
Coenzyme	
Thiamine pyrophosphate	Pyruvate dehydrogenase
Flavin adenine nucleotide	Monoamine oxidase
Nicotinamide adenine dinucleotide	Lactate dehydrogenase
Pyridoxal phosphate	Glycogen phosphorylase
Coenzyme A (CoA)	Acetyl CoA carboxylase
Biotin	Pyruvate carboxylase
5'-Deoxyadenosyl cobalamin	Methylmalonyl mutase
Tetrahydrofolate	Thymidylate synthase
Metal	
Zn ²⁺	Carbonic anhydrase
Zn ²⁺	Carboxypeptidase
Mg ²⁺	EcoRV
Mg ²⁺	Hexokinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Nitrate reductase
Se	Glutathione peroxidase
Mn ²⁺	Superoxide dismutase
K ⁺	Propionyl CoA carboxylase

TERMODYNAMIKA CHEMICKÝCH REAKCIÍ

Dve termodynamické veličiny, ktoré určujú vlastnosti reakcie:

- 1) rozdiel voľných energií medzi produktom a substrátom
- na obrázku znázornené ako ΔG^0 ,
- 1) energia potrebná na iniciáciu premeny substrátu na produkt
- na obrázku znázornené ako ΔG^* .



- Zmena voľnej energie (ΔG) reakcie hovorí či reakcia prebieha spontánne:

$\Delta G < 0$ – spontánna reakcia (exergonická)

$\Delta G = 0$ – systém je v rovnováhe

$\Delta G > 0$ – neprebieha spontánne (endergonická)

- ΔG reakcie závisí len od rozdielu ΔG produktu a substrátu (nezávisí od molekulárneho mechanizmu) !
- ΔG nehovorí o rýchlosti reakcie !

Jednotky = kilojoule (kJ) a kilocalorie (kcal); 1kJ = 0,239 kcal

ΔG^0 v pH 7 sa označuje $\Delta G^{0'}$

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT \ln \frac{[P]}{[S]}$$

$$0 = \Delta G^{0'} + RT \ln \frac{[P]}{[S]}$$

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln \frac{[P]}{[S]}$$

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K'_{eq}$$

Z hodnoty $\Delta G^{0'}$ je možné určiť hodnotu rovnovážnej konštanty, t.j. pomer koncentrácie produktu a substrátu.

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{0'}/(2.303RT)}$$

$$R = 1.987 \times 10^{-3} \text{ kcal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$$

$$T = 298 \text{ K (25}^\circ\text{C)}$$

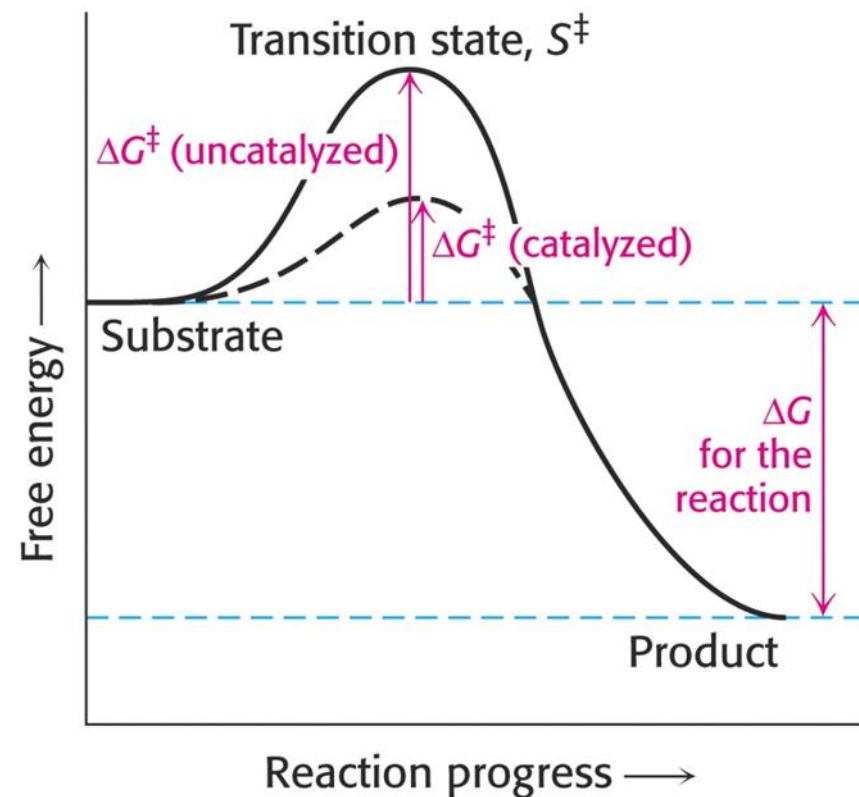
TABLE 8.4 Relation between $\Delta G^{0'}$ and K'_{eq} (at 25°C)

K'_{eq}	$\Delta G^{0'}$	
	kcal mol ⁻¹	kJ/mol ⁻¹
10 ⁻⁵	6.82	28.53
10 ⁻⁴	5.46	22.84
10 ⁻³	4.09	17.11
10 ⁻²	2.73	11.42
10 ⁻¹	1.36	5.69
1	0	0
10	-1.36	-5.69
10 ²	-2.73	-11.42
10 ³	-4.09	-17.11
10 ⁴	-5.46	-22.84
10 ⁵	-6.82	-28.53

Hodnota ΔG závisí od hodnoty $\Delta G^{0'}$ a od pomeru koncentrácie produktu a substrátu. Zatiaľ čo hodnota $\Delta G^{0'}$ je pre dané podmienky (teplota, tlak, pH,...) konštantná, koncentrácia reaktantov môže byť ľubovoľná – inými slovami aj reakcia s pozitívnou hodnotou $\Delta G^{0'}$ môže prebiehať spontánne (ΔG je negatívne) pri vhodnom pomere koncentrácie produktu a substrátu, ktoré nie sú v rovnovážnych podmienkach. Mnoho spontánnych reakcií v bunkách prebieha práve vďaka nerovnovážnemu pomeru [P] a [S].

ENZÝMY STABILIZUJÚ PRECHODNÝ STAV

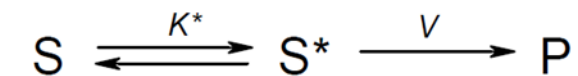
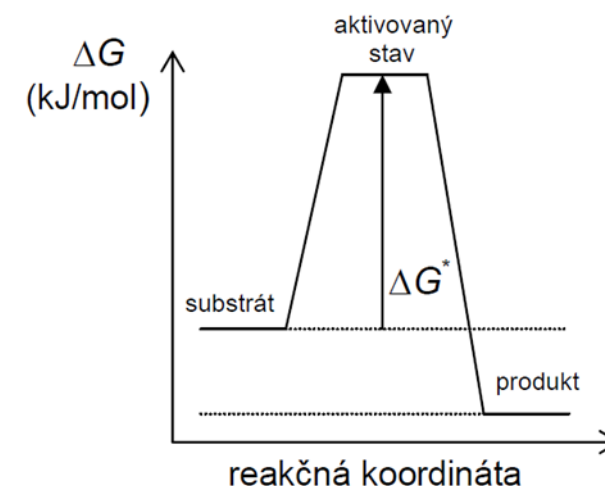
Enzýmy urýchľujú reakcie tým, že znižujú výšku aktivačnej bariéry (znižujú hodnotu ako ΔG^* - vid' predchádzajúci obrázok, resp. ΔG^\ddagger - nasledujúci obrázok)



Katalyzátory, a teda aj enzýmy, neovplyňujú celkovú zmenu ΔG ! ale menia (znižujú) ΔG^* !

Odvodenie vplyvu výšky bariéry (hodnoty ΔG^) na rýchlosť reakcie.*

Predpokladáme, že reakcia premeny S na P prebieha cez aktivovaný (prechodový) stav, S^* , a ten je v rovnováhe so základným stavom, S. Rýchlosť reakcie je určená nevratným krokom: $V = v[S^*]$, v je konštanta. Vyjadríme si $[S^*]$ pomocou $[S]$ a K_{eq} – teda ΔG^* . Výsledkom je rovnica v zelenom rámečku, z ktorej jasne vyplýva súvis medzi V (rýchlosťou reakcie) a hodnotou ΔG^* .

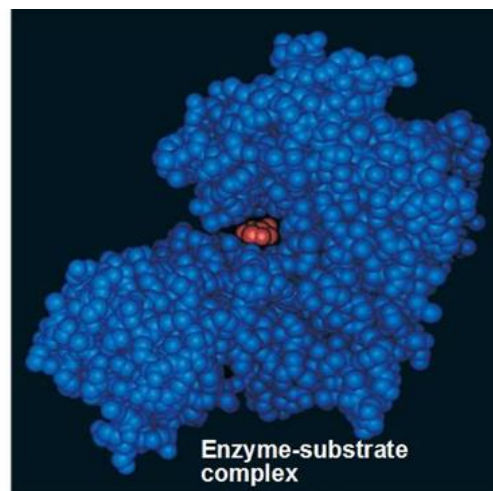
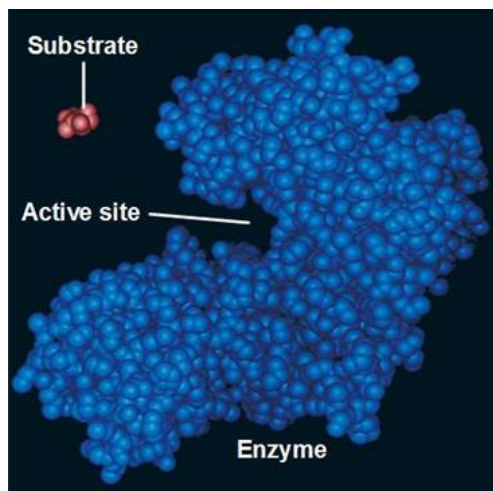


$$[S^*] = [S]e^{-\Delta G^* / RT}$$

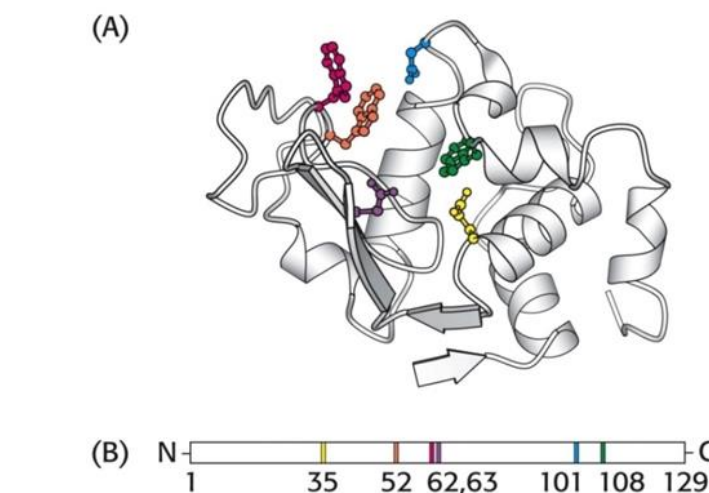
$$V = v[S^*] = \frac{kT}{h} [S]e^{-\Delta G^* / RT}$$

VLASTNOSTI AKTÍVNEHO MIESTA

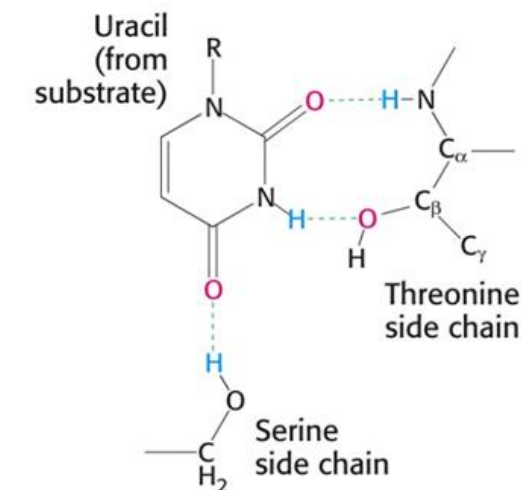
Špecifita enzýmov je dôsledkom presnej interakcie substrátu s enzýmom.
Presnosť je dôsledok komplementarity 3D-štruktúry väzobného miestana enzýme a substrátu.



Aktívne miesto vytvára jedinečné mikro-prostredie

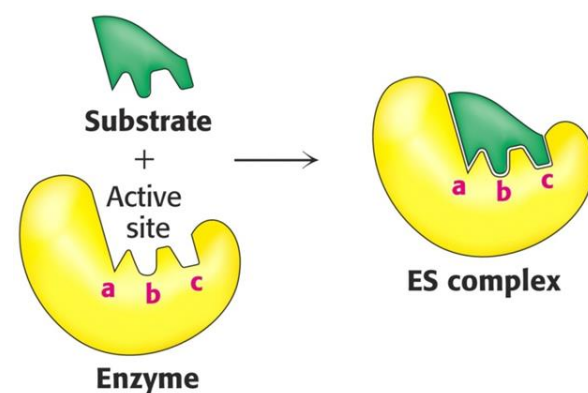


Aktívne miesto zaberá len relatívne malú časť z celkového objemu enzýmu



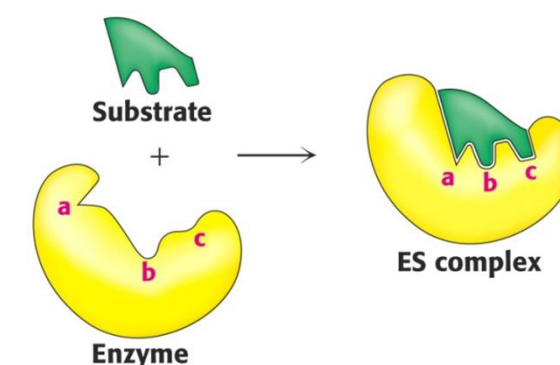
Substráty sa viažu na enzým mnohými slabými interakciami (vodíkové väzby, elektrostatické interakcie, van der Waalsové sily a hydrofóbny efekt)

V snahe vysvetliť špecifitu interakcie enzýmov so substrátmi bol najprv navrhnutý „model zámku a kľúča“, podľa ktorého substrát presne zapadal do väzobného miesta enzýmu. Tento však nevedel vysvetliť istú variabilitu v tvare a veľkosti substrátov, ktoré napriek rozdielnosti taktiež interagovali s enzýmom.



Model kľúča a zámku (Fisher, 1890)

Nová teória, ktorá vedela vysvetliť aj rozdielny tvar/veľkosť substrátov popisuje interakciu substrátu s enzýmom tak, že substrát dotvára tvar väzobného miesta, resp. väzobné miesto sa prispôsobuje substrátu. Tento model sa nazýva „model indukovaného fitu“.



Indukovaný fit (Koshland, 1958)

ENZÝMY – KLASIFIKÁCIA/ROZDELENIE

Existujú tisícky enzýmov, ktoré je potrebné jednoznačne identifikovať. Často sa pre enzýmy používajú tzv. triviálne názvy, ktoré majú príponu „-áza“, napr. ribonukleáza, cytochróm c oxidáza. Tento spôsob je však nedostatočný a nejednoznačný, a preto každý enzým má aj systematický názov, ktorý sa skladá zo 4 čísel.

E.C. Number	Systematický názov
1.x.y.z	Oxidoreduktázy
2.x.y.z	Transferázy
3.x.y.z	Hydrolázy
4.x.y.z	Lyázy
5.x.y.z	Izomerázy
6.x.y.z	Ligázy

<p>1 Oxidoreduktázy</p> <p>- katalyzujú intermolekulové oxidačno-redukčné premeny - oxidoredukčné deje realizujú buď prenosom atómov vodíka (transhydrogenázy) alebo elektrónov (transelektronázy), príp. zabudovaním atómu kyslíka do substrátu (oxygenázy) - majú povahu zložených bielkovín</p> <p>1.1.1.1 <i>alkoholdehydrogenáza</i> 1.1.3.4 <i>glukózaoxidáza</i> 1.11.1.6 <i>kataláza</i></p>	<p>etanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH β-D-glukóza + O₂ → D-glukono-δ-laktón + H₂O₂ 2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂</p>	<p>4 Lyázy</p> <p>- katalyzujú nehydrolytické štiepenie a vznik (pokiaľ nie je energeticky náročný) väzieb C–C, C–O, C–N, apod. Pritom väčšinou zo substrátu odštiepujú alebo doň vnášajú malé molekuly (H₂O, CO₂, NH₃) - majú povahu zložených bielkovín</p> <p>4.2.1.1 <i>karboanhydráza</i> 4.2.1.2 <i>fumaráthydratáza</i> 4.2.1.13 <i>serindeamináza</i></p>	<p>H⁺ + HCO₃⁻ → CO₂ + H₂O L-malát → fumarát + H₂O L-serín → pyruvát + NH₃</p>
<p>2 Transferázy</p> <p>- realizujú prenos skupín (-CH₃, -NH₂, glukózový zvyšok, atď.) v aktivovanej forme z ich donoru na akceptor - patria medzi zložené bielkoviny - zúčastňujú sa mnohých biosyntetických dejov</p> <p>2.3.1.9 <i>acetyl-CoA-acetyltransferáza</i> 2.7.1.1 <i>hexokináza</i> 2.7.7.6 <i>RNA-polymeráza</i></p>	<p>2 acetyl-CoA → CoA + acetoacetyl-CoA ATP + D-hexóza → ADP + D-hexóza-6-fosfát m nukleozidtrifosfát + RNA_n → RNA_{n+m} + mPP_i</p>	<p>5 Izomerázy</p> <p>- realizujú vnútromolekulové presuny atómov a ich skupín, teda vzájomné premeny izomérov - najmenej početná skupina enzýmov väčšinou povahy jednoduchých bielkovín</p> <p>5.1.2.1 <i>laktátracemáza</i> 5.1.3.1 <i>ribulóza-fosfát-3-epimeráza</i> 5.3.1.1 <i>triózafosfátizomeráza</i></p>	<p>D-laktát ↔ L-laktát D-ribulóza-5-fosfát ↔ D-xylulóza-5-fosfát D-glyceraldehyd-3-fosfát → dihydroxyacetónfosfát</p>
<p>3 Hydrolázy</p> <p>- hydrolyticky štiepia väzby, ktoré vznikli kondenzáciou, napr. peptidové, glykozidové, esterové - majú povahu jednoduchých bielkovín</p> <p>3.1.3.9 <i>glukóza-6-fosfatáza</i> 3.4.17.1 <i>karboxypeptidáza A</i> 3.6.1.3 <i>adenozíntrifosfatáza</i></p>	<p>D-glukóza-6-fosfát + H₂O → D-glukóza + monofosfát peptidyl-L-aminkyselina + H₂O → peptid + D-aminokyselina ATP + H₂O → ADP + P_i</p>	<p>6 Ligázy</p> <p>- katalyzujú vznik energeticky náročných väzieb za súčasného rozkladu látky uvoľňujúcej energiu (ATP) - uplatňujú sa pri rôznych biosyntézach - majú povahu zložených bielkovín</p> <p>6.1.1.7 <i>alanyl-tRNA-syntetáza</i> 6.4.1.1 <i>pyruvátkarboxyláza</i> 6.5.1.1 <i>DNA-ligáza</i></p>	<p>ATP + L-Ala + tRNA^{Ala} → AMP + difosfát + L-alanyl-tRNA^{Ala} ATP + pyruvát + CO₂ + H₂O → ADP + monofosfát + oxalacetát ATP + DNA_n + DNA_m → AMP + difosfát + DNA_{n+m}</p>

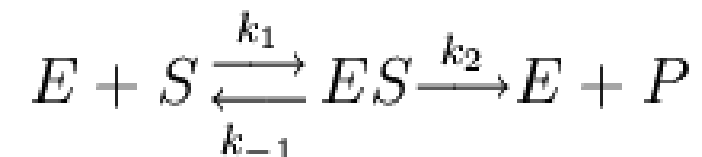
ENZÝMY – KLASIFIKÁCIA/ROZDELENIE

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>A_{red} + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

POPIS KINETICKÝCH VLASTNOSTÍ MNOHÝCH ENZÝMOV – MICHAELIS-MENTENOVA ROVNICA

1913 Leonor Michaelis a Maud Menten – rovnovážny model a ustálený stav enzymovej kinetiky

Rovnica popisujúca interakciu enzýmu, E, so substrátom, S, za vzniku enzým-substrátového komplexu, ktorý sa môže rozpadnúť opäť na enzým a substrát alebo na enzým a produkt, P:



Odvodenie Michaelisovej rovnice, ktorá popisuje závislosť rýchlosti enzymaticky katalyzovanej reakcie, v , od koncentrácie substrátu $[S]$:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - [ES](k_{-1} + k_2) \quad \text{predpoklad rovnovážneho stavu}$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Michaelisova konštanta}$$

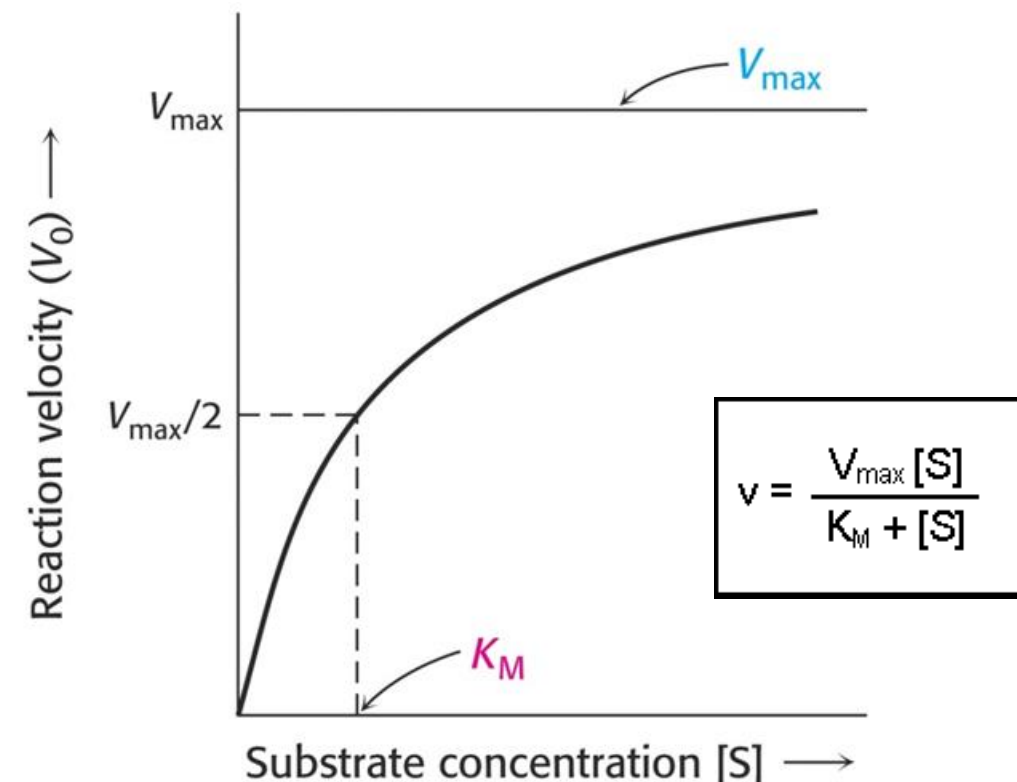
$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$$

$$[ES] = \frac{([E_0] - [ES])[S]}{K_m}$$

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Michaelis-Mentenova rovnica}$$

Grafické znázornenie Michealis-Mentenovej rovnice:



POPIS KINETICKÝCH VLASTNOSTÍ MNOHÝCH ENZÝMOV – MICHAELIS-MENTENOVÁ ROVNICA

Význam jednotlivých parametrov:

- (i) K_m - je „apparent“ disociačná konštanta, ktorá môže byť považovaná ako celková disociačná konštanta všetkých foriem ES. V každom prípade, K_m je koncentrácia, pri ktorej $v = V_{max}/2$
- (ii) k_{cat} – číslo obratu – dolný limit chemických rýchlostných konštánt
 - **jedna medzinárodná jednotka (IU)** – množstvo enzýmu, ktorý katalyzuje tvorbu 1 mikromolu produktu za 1 minútu,
 - **1 katal** – množstvo enzýmu, ktorý katalyzuje premenu 1 mólu substrátu na produkt za 1 sec; t.j.
 $1 \text{ katal} = 6 \times 10^7 \text{ IU}$
- (iii) k_{cat}/K_m - katalytická účinnosť – konštanta špecificity – dolný limit rýchlostnej konštanty asociácie enzýmu a substrátu.

Ďalšie pojmy:

- „katalytická dokonalosť“
- Circé efekt
- multienzýmové komplexy



TABUĽKY S KINETICKÝMI PARAMETRAMI PRE RÔZNE ENZÝMY – PRE PREDSTAVU

TABLE 8.5

K_M values of some enzymes

Enzyme	Substrate	$K_M(\mu\text{M})$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa- <i>N</i> -acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	CO ₂	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	HCO ₃ [−]	1000
	ATP	60
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3
	tRNA	0.4
	ATP	300

TABLE 8.8

Enzymes for which k_{cat}/K_M is close to the diffusion-controlled rate of encounter

Enzyme	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$
Acetylcholinesterase	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	8.3×10^7
Catalase	4×10^7
Crotonase	2.8×10^8
Fumarase	1.6×10^8
Triose phosphate isomerase	2.4×10^8
β -Lactamase	1×10^8
Superoxide dismutase	7×10^9

TABLE 8.6

Maximum turnover numbers of some enzymes

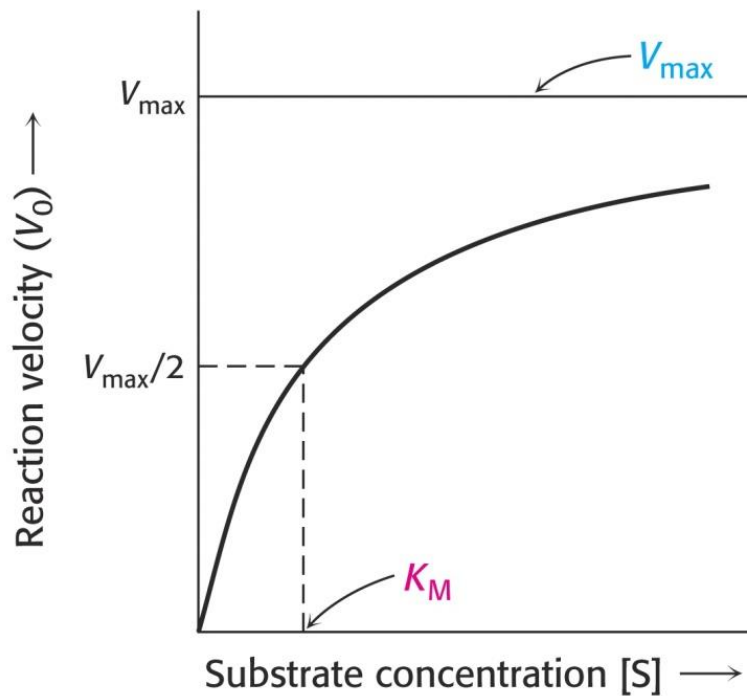
Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 4.5.

TRANSFORMÁCIA MICHAELIS-MENTENOVEJ ROVNICE

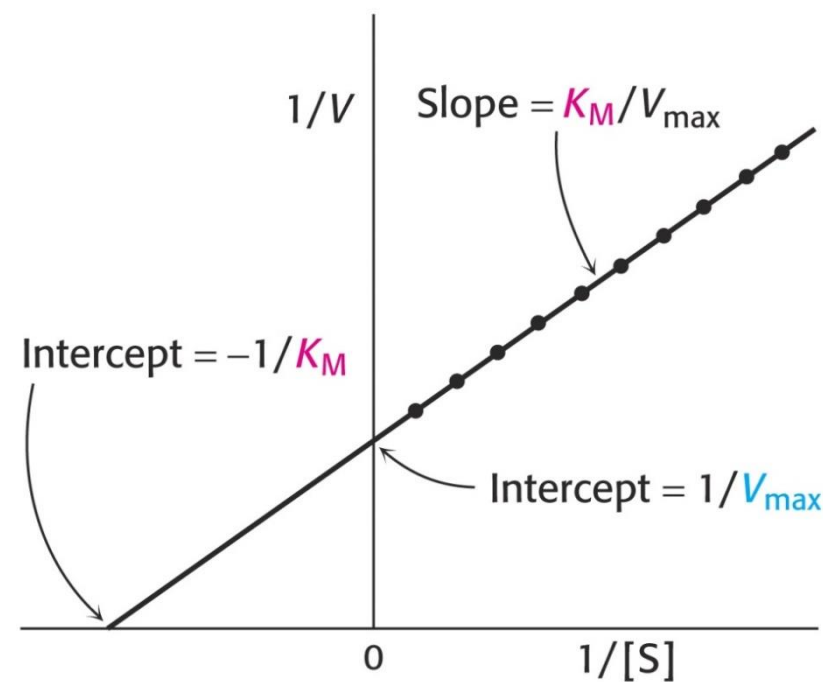
Pre praktické účely, ako aj pre názornosť, sa, predovšetkým v minulosti, hľadali rôzne transformácie hyperbolickej závislosti Michaelis-Mentenovej rovnice na lineárnu závislosť. Jednou z často používaných je tzv. dvojité reciproká závislosť alebo známa skôr Lineweaver-Burkeho závislosť.

Michaelis-Mentenova závislosť



$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

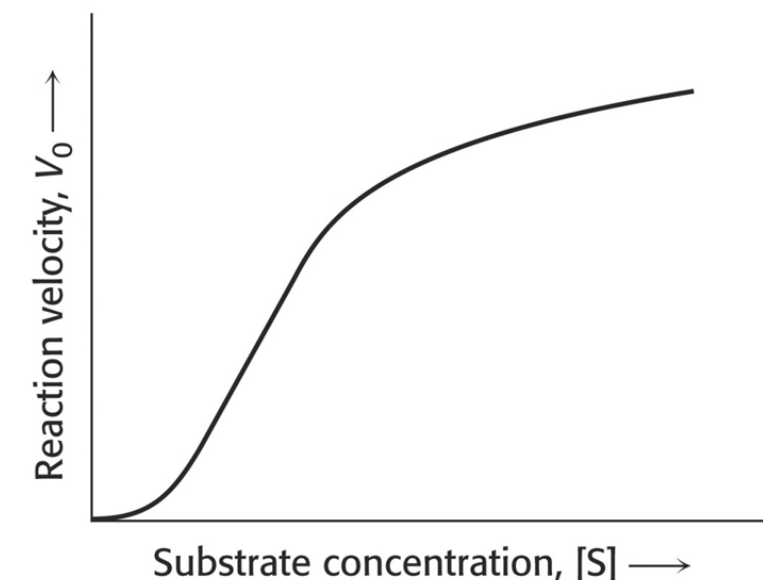
Lineweaver-Burkeho závislosť



$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Je dôležité povedať, že zatiaľ čo kinetické vlastnosti mnohých enzýmov sa dajú popísať Michaelis-Mentenovou závislosťou, existuje skupina tzv. alosterických enzýmov, ktoré sa nesprávajú podľa tejto rovnice.

Ako príklad uvádzam typickú závislosť (ktorá má sigmoidálny tvar), rýchlosti reakcie od koncentrácie substrátu pre alosterické enzýmy.



ENZÝMY MÔŽU BYŤ INHIBOVANÉ ŠPECIFICKÝMI MOLEKULAMI

Enzýmy je možné regulovať zmenou vlastností prostredia alebo pridaním špecifických molekúl. Znižovanie aktivity enzýmov nazývame inhibíciou enzýmov.

Schopnosť špecificky regulovať vlastnosti enzýmov je aj jedným zo základných cieľov vývoja liekov ale aj využitia enzýmov v biotechnologických aplikáciach.

Inhibície delíme na 2 základné skupiny: vratná inhibícia
nevratná inhibícia

Vratná inhibícia je charakterizovaná rýchlou disociáciou komplexu enzým-inhibítor.

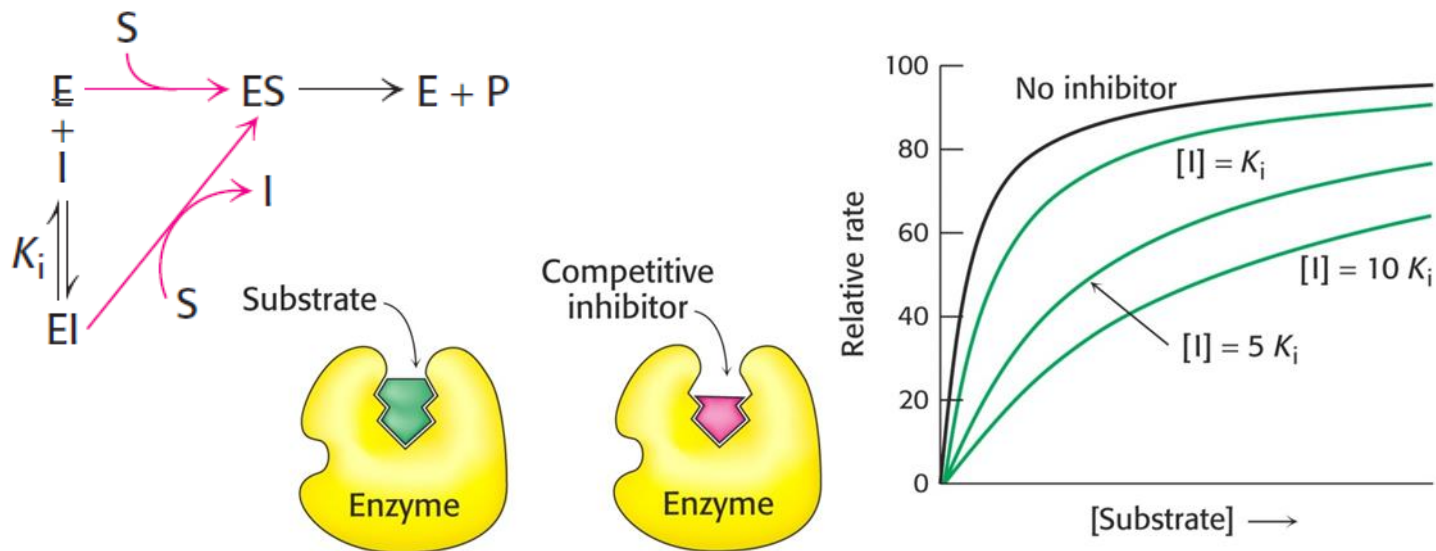
Delíme ju na niekoľko typov: **kompetitívna,**
akompetitívna,
zmiešaná a nekompetitívna inhibícia

Nevratná inhibícia je charakterizovaná tým, že nevratný inhibítor disociuje z enzýmu veľmi pomaly v dôsledku silnej interakcie s enzýmom prostredníctvom nekovalentnej alebo kovalentnej väzby. Najznámejšími príkladmi tohto typu inhibítorov sú penicilín, ktorý inhibuje enzým **transpeptidáza** a aspirín (acylpyrín), ktorý inhibuje enzým cyklooxygenázu.

Nevratné inhibítory delíme na: **reagenty špecifické pre skupiny** (group-specific reagents)
afinitné značky alebo **reaktívne analógy substrátu** (affinity labels or reactive substrate analogs)
samovražedné inhibítory alebo **inhibítory založené na mechanizme** alebo **Trójske kone**
(suicide inhibitors or mechanism-based inhibitors or Trojan horses)

VRATNÁ INHIBÍCIA – KOMPETITÍVNA INHIBÍCIA = V_{\max} sa nemení, K_m sa zvyšuje

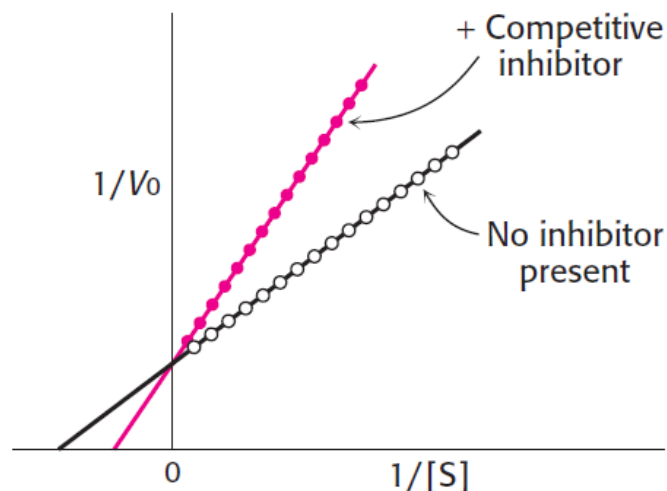
Kompetitívny inhibítor sa často štruktúrne podobá na substrát a viaže sa na aktívne miesto enzýmu. Tým sa zabráni väzbe substrátu do väzobného miesta. Kompetitívny inhibítor znižuje rýchlosť katalýzy znížením podielu molekúl enzýmu, na ktorých je naviazaný substrát. Pri akejkoľvek koncentrácii daného inhibítora, kompetitívna inhibícia sa môže zmierniť zvýšením koncentrácie substrátu. Za týchto podmienok substrát úspešne súťaží s inhibítorom o aktívne miesto.



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

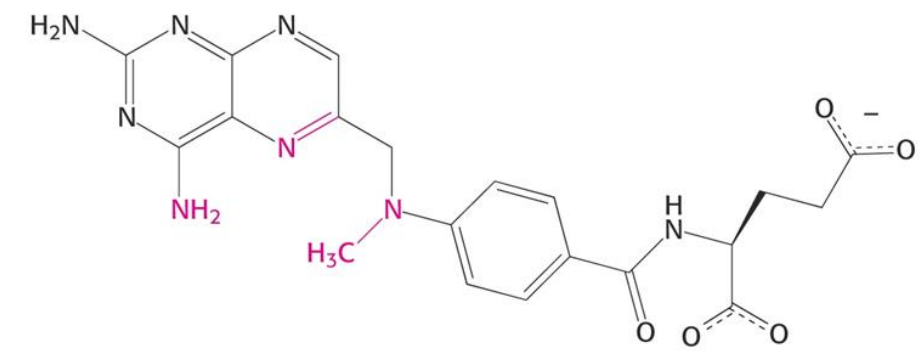
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

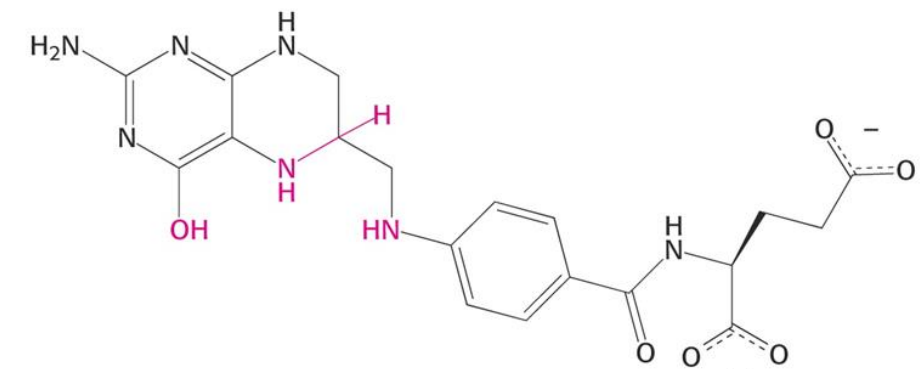


$$\frac{1}{V} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Metotrexát - silný konkurenčný inhibítor enzýmu dihydrofolát reduktázy, ktorý hrá úlohu v biosyntéze purínov a pyrimidínov. Metotrexát je štruktúrny analóg dihydrofolátu, substrátu pre dihydrofolát reduktázu. To z neho robí takého potentného kompetitívneho inhibítora, ktorý sa viaže k enzýmu 1000-krát silnejšie, ako sa viaže prírodný substrát, a takto inhibuje syntézu nukleotidovej bázy. Používa sa na liečburakoviny.



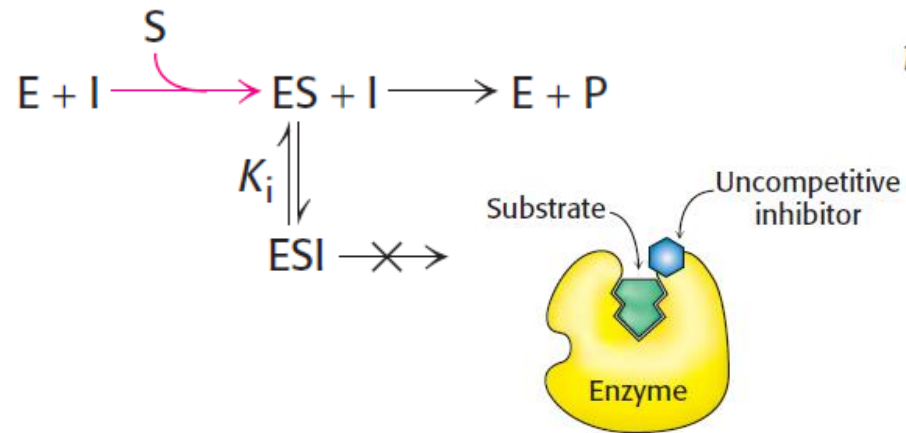
Methotrexate



Tetrahydrofolate

VRATNÁ INHIBÍCIA – AKOMPETITÍVNA INHIBÍCIA = V_{\max} sa znižuje, K_m sa znižuje

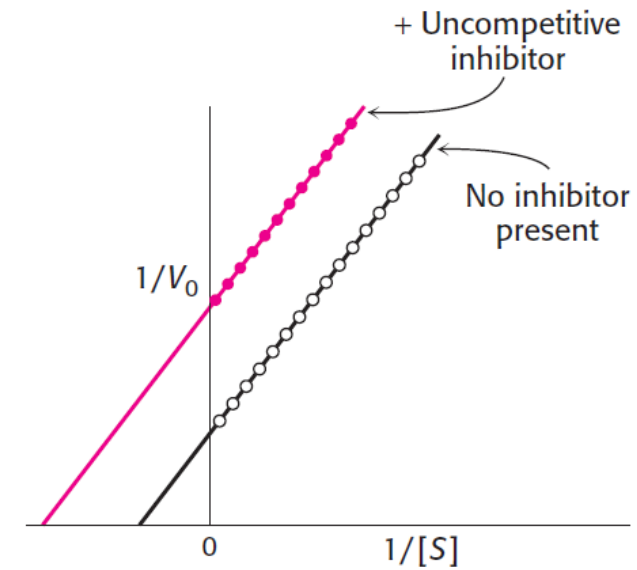
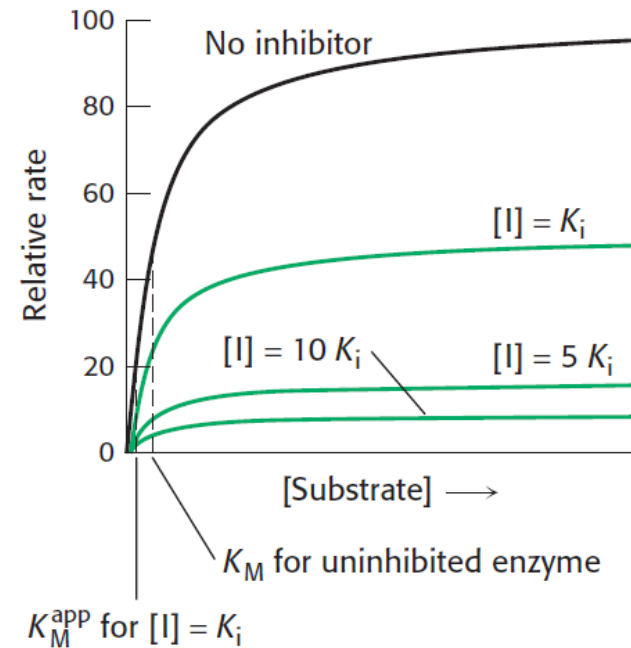
Akompetitívny inhibítor sa viaže iba do ES komplexu.



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

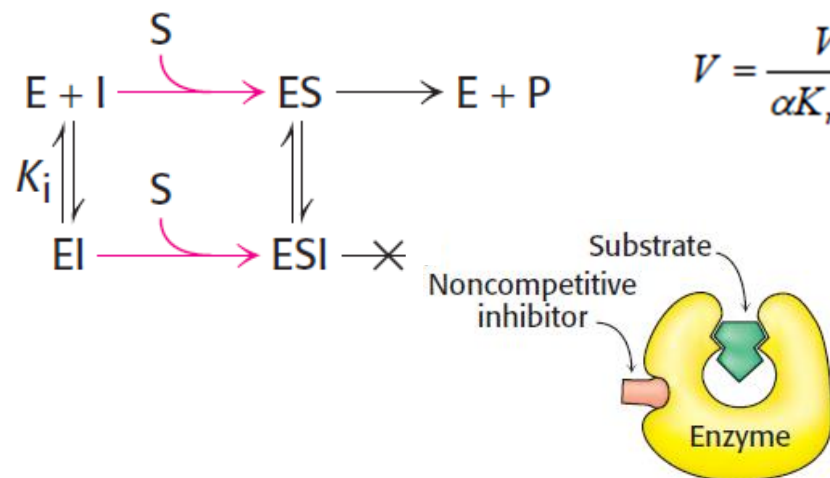
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$$

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

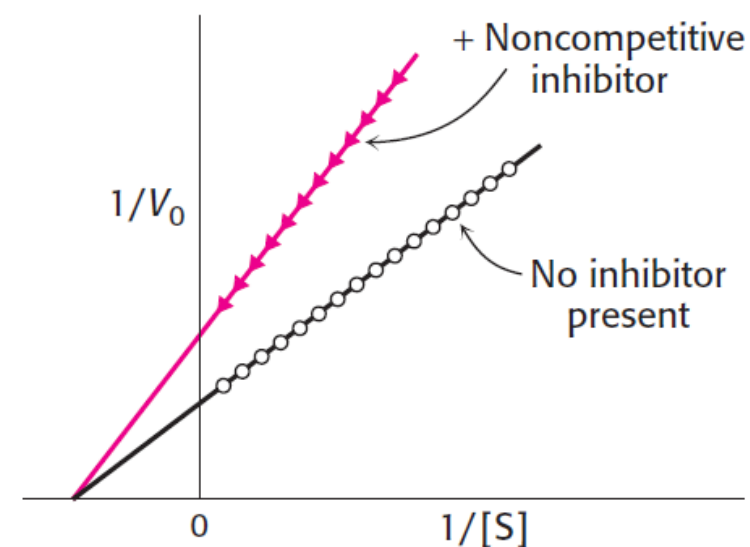
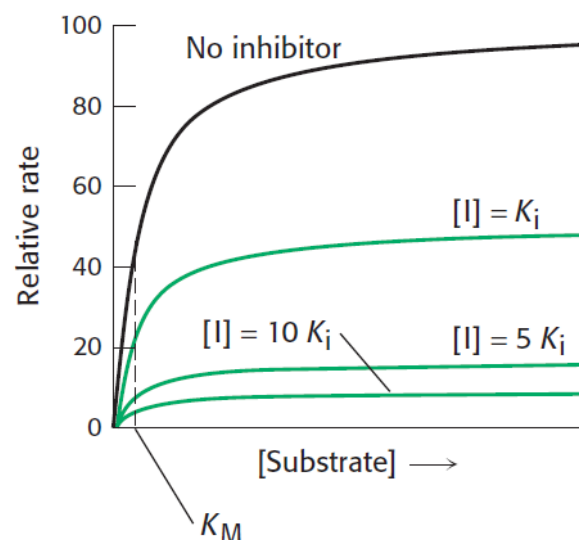


$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

VRATNÁ INHIBÍCIA – ZMIEŠANÁ INHIBÍCIA = V_{\max} sa znižuje, K_m sa zvyšuje



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

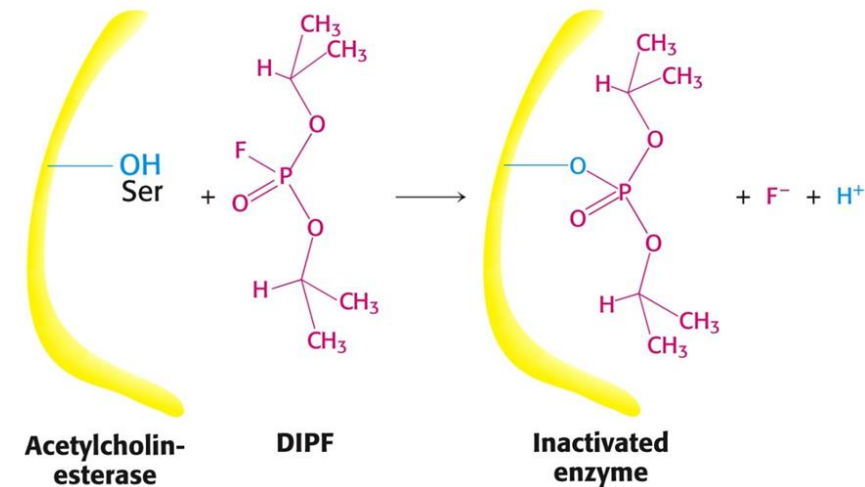
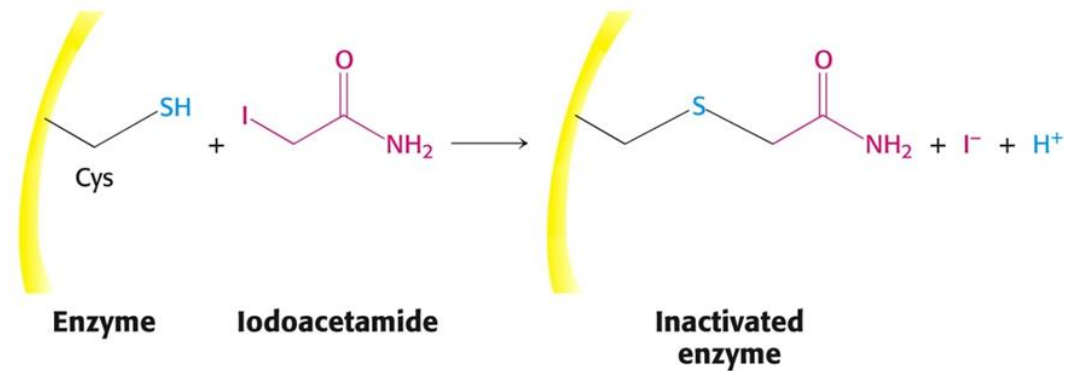


$$\frac{1}{V} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

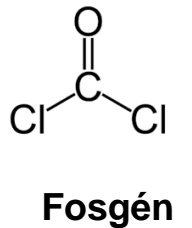
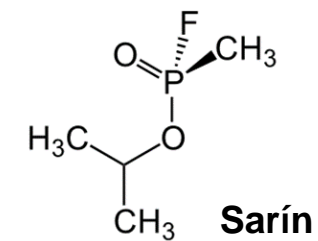
Špeciálny prípad zmiešanej inhibície, $\alpha = \alpha'$: nekompetitívna inhibícia; V_{\max} sa znižuje, K_m sa nemení

NEVRATNÁ INHIBÍCIA – REAGENTY ŠPECIFICKÉ PRE SKUPINY

Reagenty špecifické pre skupiny reagujú so špecifickými bočnými reťazcami aminokyselín. Ako príklad uvádzam DIPF – diizopropylfosfofluoridát, ktorý špecificky reaguje s hydroxylovou skupinou Ser a iódacetamid, ktorý špecificky reaguje so sulfhydrylovou skupinou Cys.

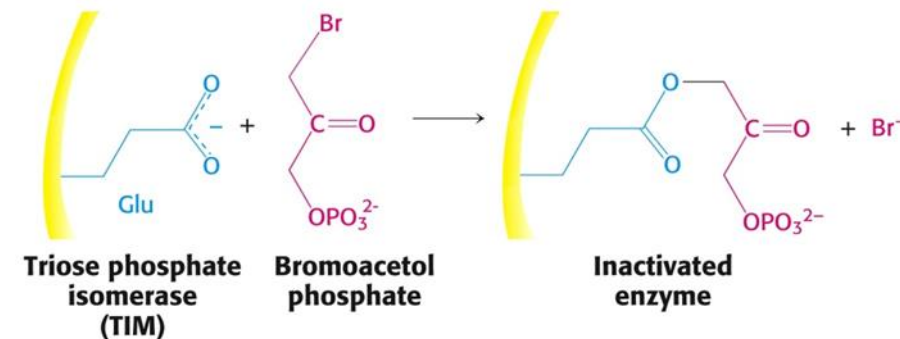
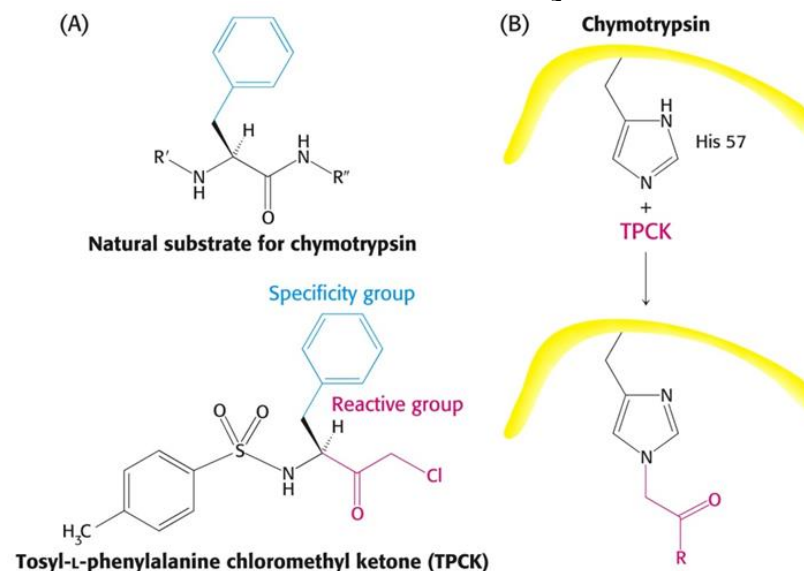


Typickú skupinu takýchto jedov, reagujúcich so Ser, predstavujú bojové plyny ako sarín a fosgén.



NEVRATNÁ INHIBÍCIA – AFINITNÉ ZNAČKY

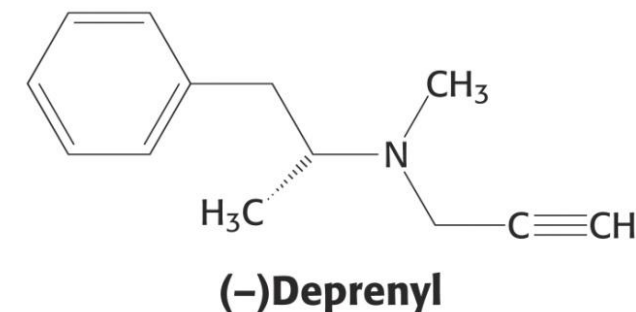
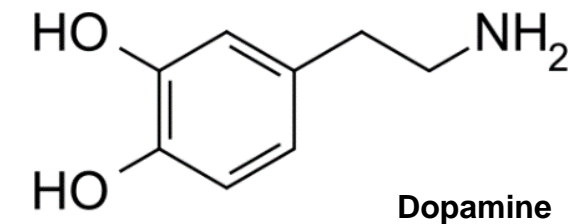
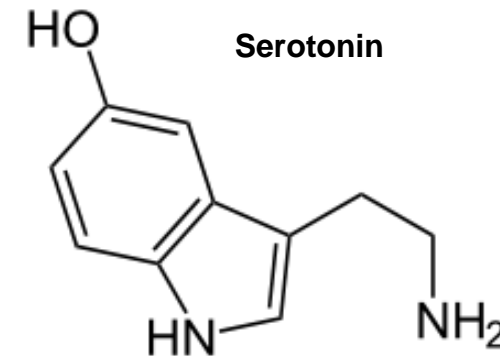
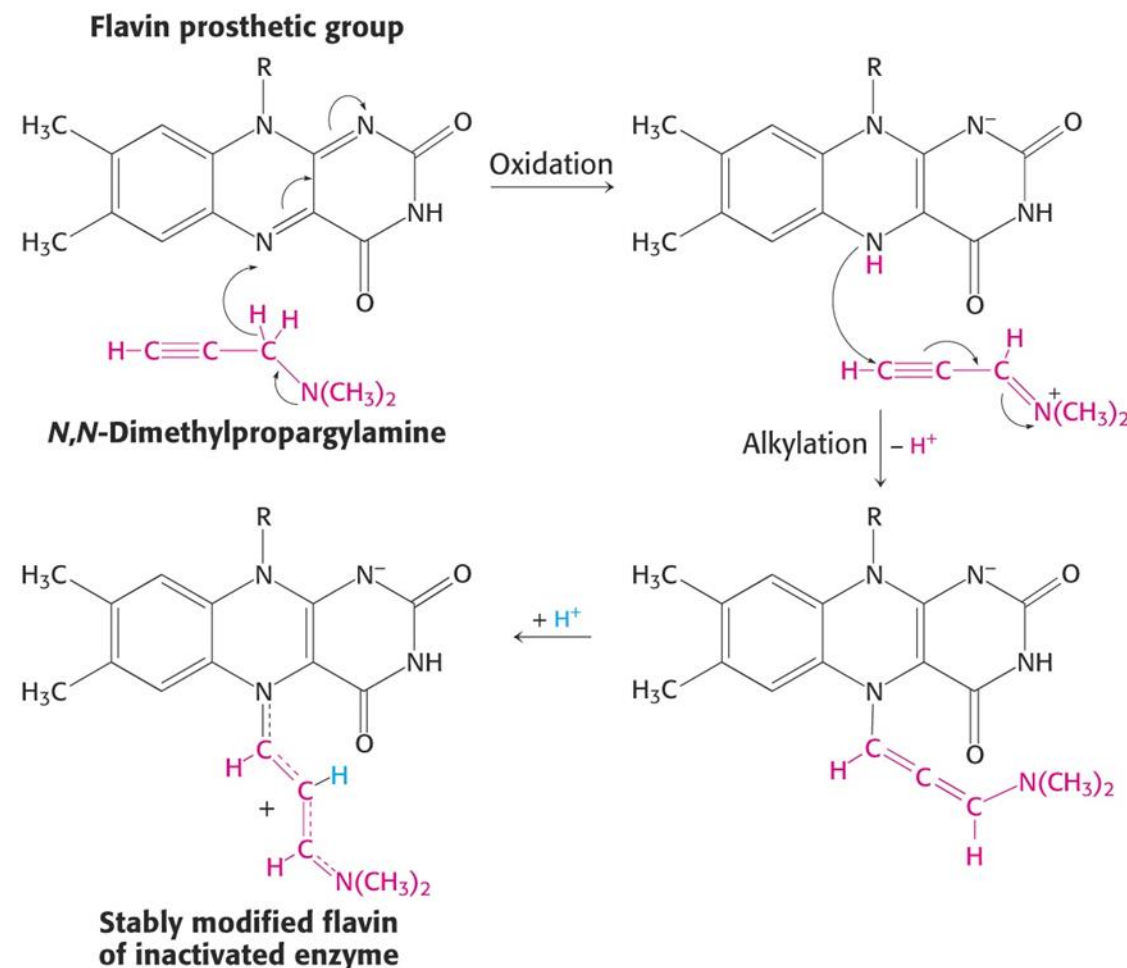
Afinitné značky alebo reaktívne anológy substrátusú molekuly, ktoré sa štruktúrne podobajú substrátu daného enzýmu a ktoré sa kovalentne viažu do aktívneho miesta enzýmu.



NEVRATNÁ INHIBÍCIA – SAMOVRAŽEDNÉ INHIBÍTORY

Samovražedné inhibítory alebo inhibítory založené na mechanizme alebo Trójske kone, sú modifikované substráty, ktoré poskytujú najšpecifickejšie prostriedky na modifikáciu aktívneho miesta enzýmu. Inhibítor sa viaže na enzým ako substrát a na začiatku sa ho normálne prechádza katalytickým mechanizmom. Mechanizmus katalýzy potom vytvára chemicky reaktívny medziprodukt, ktorý inaktivuje enzým kovalentnou modifikáciou. Skutočnosť, že sa enzým zúčastňuje na svojej vlastnej inhibícii silne naznačuje, že kovalentne modifikovaná skupina na enzýme je nevyhnutná pre katalýzu. Jedným príkladom takého inhibítora je N, N-dimetylpropargylamín, inhibítor enzýmu monoaminoxidáza (MAO). Flavín - prostetická skupina monoaminoxidázy oxiduje N, Ndimetylpropargylamín, ktorý zase inaktivuje enzým väzbou na N-5 flavínovej prostetickej skupiny. Monoaminoxidáza deaminuje neurotransmitery ako dopamín a serotonín a znižuje tak ich hladiny v mozgu. Parkinsonova choroba je spojená s nízkymi hladinami dopamínu a depresia je spojená s nízkymi hladinami serotonínu.

Liek (-)Deprenyl, ktorý sa používa na liečbu Parkinsonovej choroby a depresie, je samovražedný inhibítor monoaminoxidázy.



PENICILÍN – SAMOVRAŽEDNÝ INHIBÍTOR

Penicilín, prvé objavené antibiotikum, je príkladom klinicky úspešného samovražedného inhibítora. Penicilín pozostáva z tiazolidínového kruhu kondenzovaného k β -laktámovému kruhu, ku ktorému je pripojená variabilná skupina R peptidovou väzbou. Penicilín interferuje so syntézou bakteriálnej steny *Staphylococcus aureus*. Ako to robí? Bakteriálna stena *S. aureus* pozostáva z lineárnych polysacharidových reťazcov, ktoré sú pospájané krátkymi peptidmi (pentaglycínmi a tetrapeptidmi). Penicilín využíva stratégiu Trojského koňa. Toto antibiotikum je akceptované do aktívneho miesta transpeptidázy pretože sa podobá na D-Ala-D-Ala zvyšky, čo predstavuje normálny substrát. Následne kovalentne modifikuje/inhibuje Ser enzýmu transpeptidáza.

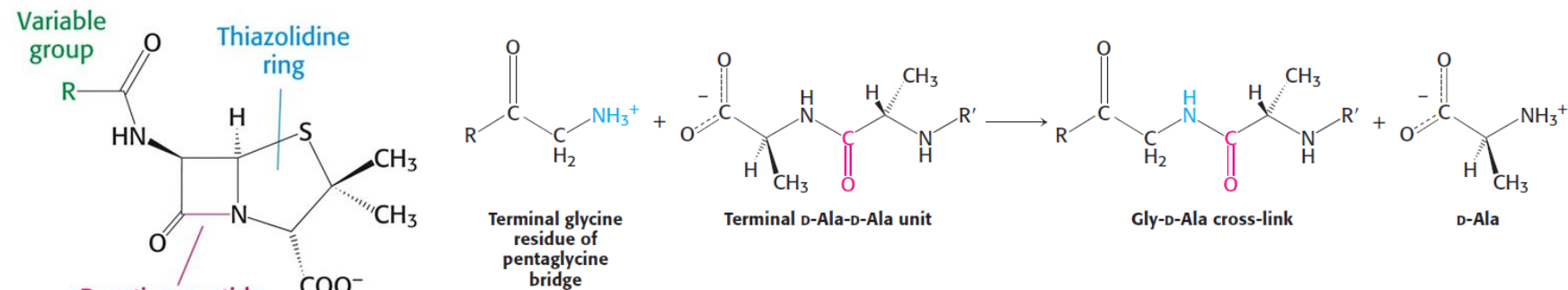


Figure 8.30 Formation of cross-links in *S. aureus* peptidoglycan. The terminal amino group of the pentaglycine bridge in the cell wall attacks the peptide bond between two D-alanine residues to form a cross-link.

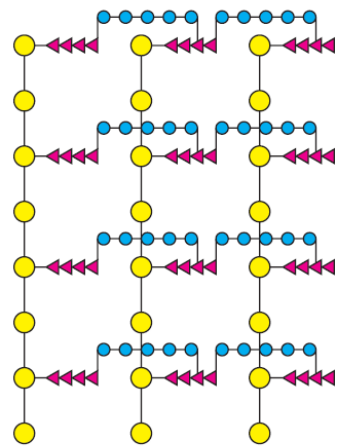


Figure 8.29 Schematic representation of the peptidoglycan in *Staphylococcus aureus*. The sugars are shown in yellow, the tetrapeptides in red, and the pentaglycine bridges in blue. The cell wall is a single, enormous, bag-shaped macromolecule because of extensive cross-linking.

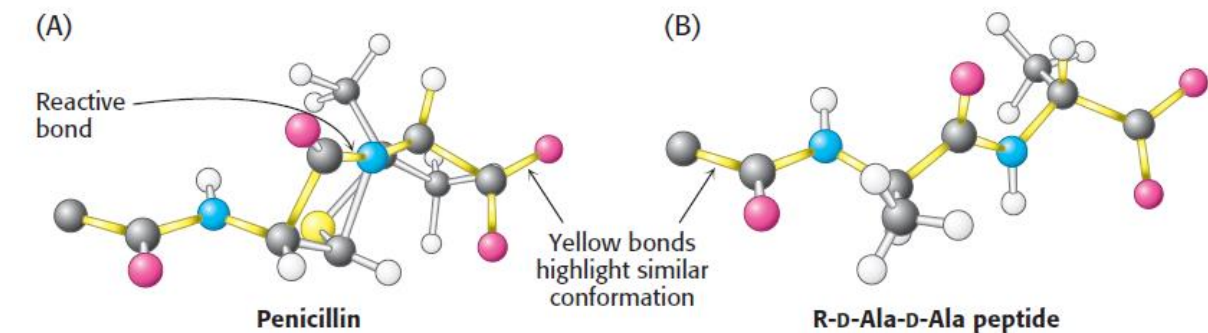
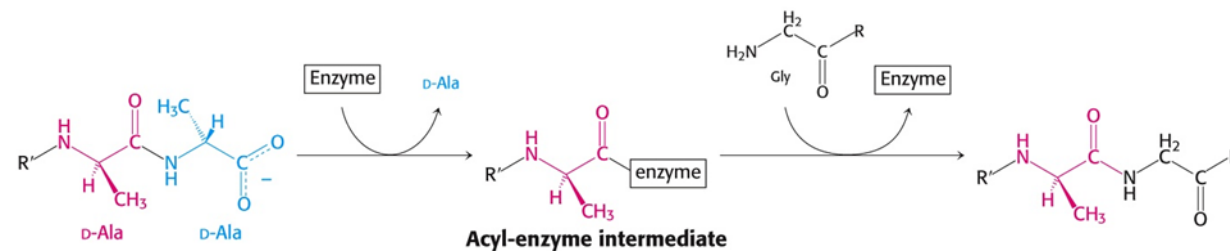


Figure 8.32 Conformations of penicillin and a normal substrate. The conformation of penicillin in the vicinity of its reactive peptide bond (A) resembles the postulated conformation of the transition state of R-D-Ala-D-Ala (B) in the transpeptidation reaction. [After B. Lee. *J. Mol. Biol.* 61:463–469, 1971.]

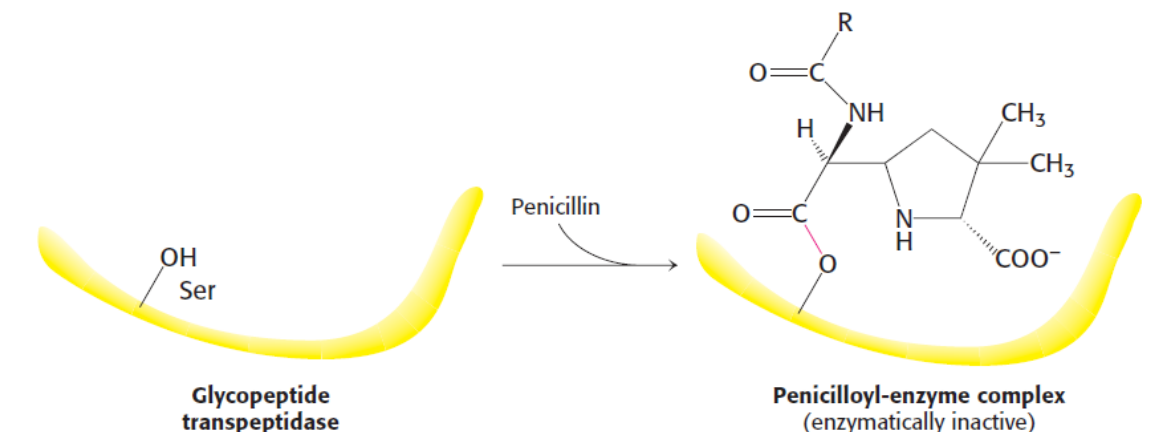
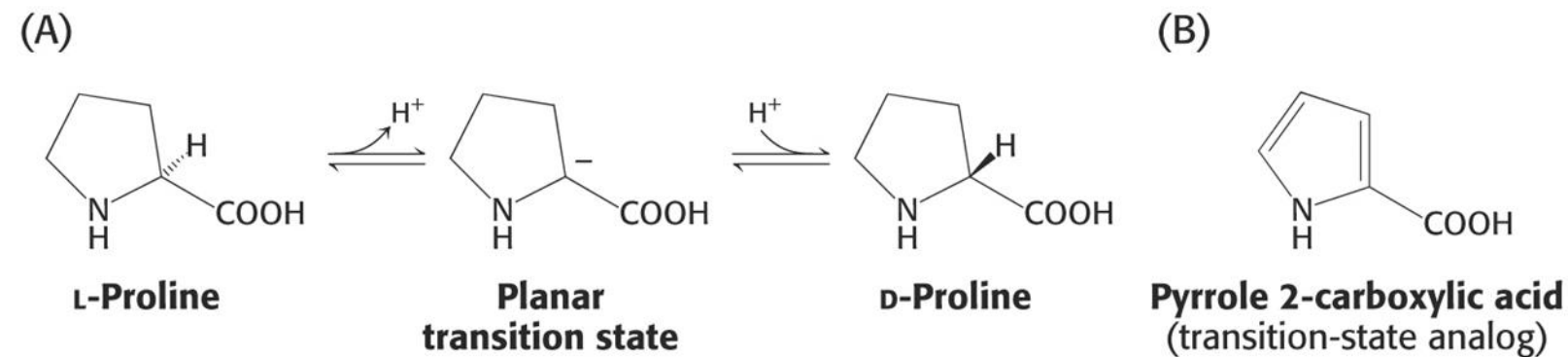


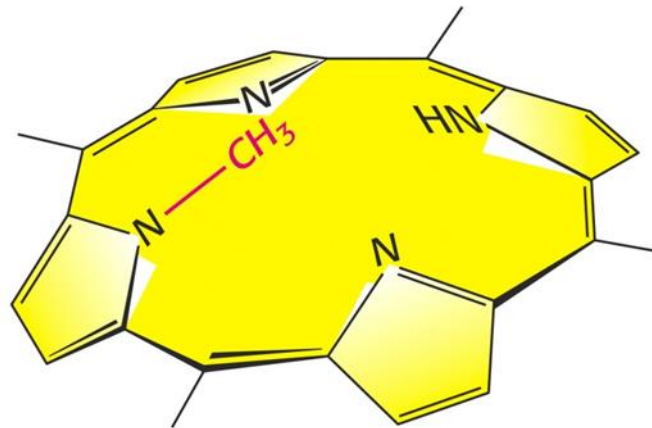
Figure 8.33 Formation of a penicilloyl-enzyme complex. Penicillin reacts with the transpeptidase to form an inactive complex, which is indefinitely stable.

EXPERIMENTÁLNY DÔKAZ, ŽE ENZÝMY STABILIZUJÚ PRECHODNÝ STAV

Linus Pauling (zase tá intuícia!) navrhol v roku 1948, že zlúčeniny podobné prechodnému stavu katalyzovanej reakcie by mali byť veľmi účinné inhibítory enzýmov. Tieto napodobeniny sa nazývajú analógy prechodného stavu. Ako príklad uvádzam inhibítor prolínovej racemázy, enzýmu, ktorý katalyzuje transformáciu L-prolínu na D-prolín. V istej fáze tejto transformácie prolínu, musí existovať v rovinnej konformácii. Analóg takéhoto stavu – pyrrole 2-karboxylová kyselina – sa naozaj viaže 160-krát silnejšie do enzýmu ako jeho substrát.



Iným príkladom sú tzv. katalytické protilátky alebo AbZýmy, ktoré boli vytvorené voči prechodnému stavu definovanej reakcie. Takto bola vytvorená protilátka voči prechodovému stavu porfyrínu pri reakcii, keď sa do porfyrínu vkladá železo vo forme $Fe(2+)$. Túto reakciu katalyzuje enzým ferrochelatáza.



Analóg prechodového stavu porfyrínu pri tvorbe hému.

Príklad ferrochelatázy:

Katalytická protilátka voči analógu porfyrínu počas tvorby hému má $V_{max} = 80$ za hodinu, čo je iba 10x menej ako ferrochelatáza a 2500x viac ako nekatalyzovaná reakcia!

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Základné vlastnosti enzýmov a ich rozdelenie.
- Pojmy rovnovážna konštanta, aktivačná energia a ako ich enzýmy ovplyvňujú.
- Popísať algebraickú a grafickú formu Michaelis-Mentenovej rovnice.
- Popísať typy vratnej inhibície.
- Popísať typy nevratnej inhibície.