

# Enzymy

V biologických systémech probíhá mnoho různých reakcí. Při pokusech se zjistilo, že rychlost těchto reakcí je při provedení mimo živý systém (tj. *in vitro*) mnohem nižší než *in vivo*. V živých systémech probíhají reakce stokrát až milionkrát rychleji než *in vitro*. Způsobují to **specifické katalyzátory – enzymy**. Ty často umožňují průběh i takových reakcí, které by jinak v podmínkách lidského těla (teplota, pH atd.) prakticky neprobíhaly.

## Biologické katalyzátory

**Katalyzátor** je látka, která **zvyšuje rychlost** chemické reakce, ale nemění chemickou rovnováhu (jen zkracuje čas jejího dosažení). Při reakcích se molekula enzymů nespotřebovává.

### Enzym

Enzym je specifická organická molekula **urychlující** reakce v organismech (působí jako biokatalyzátor). Umožňuje tak průběh reakcí i při relativně nízkých teplotách, neutrálním pH a atmosférickém tlaku, které se v organismech běžně vyskytují. Naprostá většina enzymů jsou proteiny. Výjimku tvoří některé druhy RNA molekul – tzv. ribozymy.

Vedle bílkovinné složky mohou enzymy obsahovat i **nebílkovinnou součást**. Podle její přítomnosti lze enzymy dělit na:

- **jednoduché:**

obsahují jen bílkovinnou část (např. hydrolázy – pepsin, trypsin, ribonukleáza),

- **složené:**

kromě bílkovinné části (tzv. **apoenzym**, sám o sobě je neúčinný) obsahují i nebílkovinnou část – tzv. **kofaktor**. Kofaktor společně s apoenzymem tvoří aktivní molekulu enzymu, tzv. **holoenzym**.

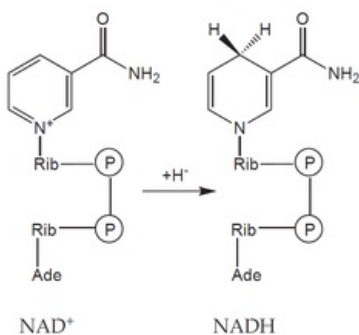
### Kofaktory

Kofaktorem mohou být :

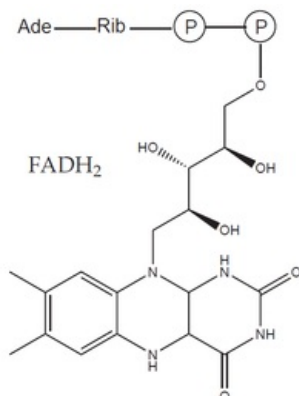
- ionty kovů:  $\text{Zn}^{2+}$  (např. alkoholdehydrogenáza),  $\text{Mn}^{2+}$  (např. argináza),  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,
- organické molekuly: často se jedná o deriváty vitaminů.

Podle charakteru vazby na apoenzym kofaktory dělíme na:

- **koenzymy:** organická molekula neproteinové povahy, na molekulu apoenzymu **vázaná volně** – může se z něho oddělit (např.  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ),



- **prostetické skupiny:** organická molekula neproteinové povahy, na molekulu apoenzymu **vázaná pevně** (např. hem, FAD).



## Multienzymový komplex

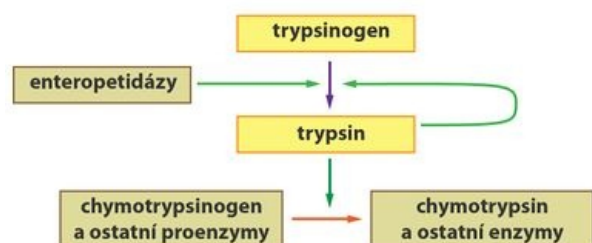
Enzym může být tvořen různým počtem peptidových řetězců. Každý řetězec může obsahovat více **domén** (se stejnou či rozdílnou enzymovou specifikitou). Pokud enzym obsahuje více řetězců (kvarterní struktura), označujeme jej jako **multienzymový komplex**. Jednotlivé podjednotky mívají obvykle různou specifikitu a bývají vzájemně spojeny nekovalentně. Jako příklad multienzymového komplexu lze uvést syntázu mastných kyselin, která katalyzuje syntézu vyšších mastných kyselin v buňkách.

## Zymogeny

Některé enzymy (např. trávicí) jsou tvořeny a sekretovány ve své neaktivní podobě jako tzv. **zymogeny (proenzymy)**. Důvodem je ochrana syntetizujících buněk před štěpením účinkem aktivních forem enzymů. Zymogeny jsou aktivovány až na místě, kde se jejich aktivita požaduje. Aktivace může například probíhat jako tzv. parciální proteolýza, během níž se odštěpí přesně definovaná část molekuly proenzymu.

Uvedeme si dva příklady tohoto procesu:

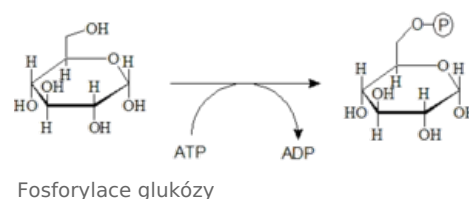
- Hlavní buňky žaludeční sliznice sekretují proenzym **pepsinogen**. HCl přítomná v žaludeční šťávě napomáhá **autoaktivaci** pepsinogenu na aktivní pepsin. Reakce probíhá také autokatalyticky, kdy se na štěpení pepsinogenu podílejí již vytvořené molekuly pepsinu.
- Podobně jako pepsin je i **trypsin** syntetizován v pankreatu jako inaktivní trypsinogen. V tenkém střevě je následně pomocí enzymu **enteropeptidázy** (tvořené buňkami sliznice střeva) odštěpen hexapeptid za vzniku aktivního trypsinu.



## Izoenzymy a izoformy enzymů

V organismu existují enzymy zvané **izoenzymy**, které katalyzují stejnou reakci, ale vzájemně se liší svými **fyzikálně-chemickými vlastnostmi** (odlišná afinita k substrátu,  $K_M$ , citlivost k inhibitorům) a také **výskytem v tkáních**. Tyto geneticky podmíněné rozdíly (odlišný sled nukleotidů DNA) například dovolují jistou regulaci podmínek, za kterých bude daná reakce v různých tkáních probíhat.

Názorným příkladem jsou izoenzymy katalyzující přeměnu glukózy na glukóza-6- fosfát (fosforylace glukózy) – **glukokináza** (nacházející se v hepatocytech a  $\beta$ -buňkách pankreatu) a **hexokináza** (lokalizovaná v ostatních buňkách těla). Glukokináza vykazuje **nižší afinitu ke svému substrátu** – glukóze (to vyjadřuje tzv.  $K_M$ , pro glukokinázu je přibližně 10 mmol/l). To znamená, že enzymem katalyzovaná reakce probíhá, pokud hladina glukózy v krvi dosáhne dostatečné výše (obvykle po jídle). Při normální glykémii (mezi jídly) je glukokináza málo aktivní. Játra tak nechávají dostatek glukózy pro ostatní tkáně, které obsahují hexokinázu s hodnotou  $K_M$  kolem 0,1 mmol/l.



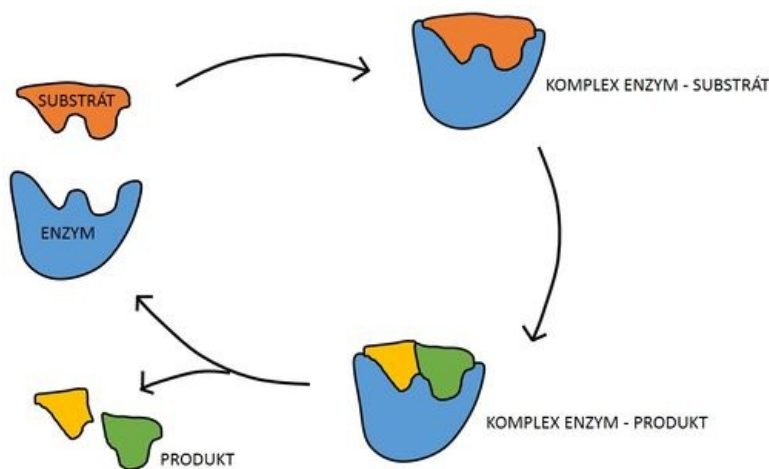
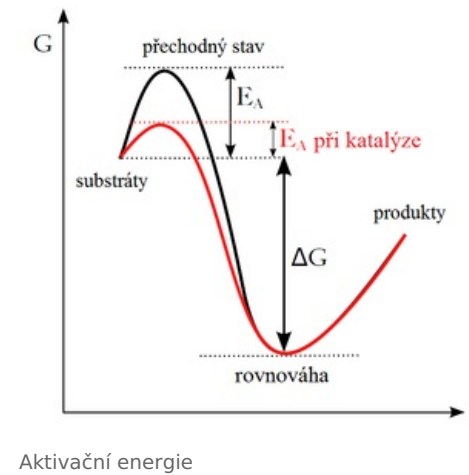
Kromě izoenzymů se v těle vyskytují i **izoformy** enzymů. Tyto mnohočetné formy enzymů pocházejí ze **stejného genu** (stejný sled nukleotidů DNA), ale liší se rozdílnými posttranslačními modifikacemi či alternativním splicingem (sestřihem). Výsledkem je, že tyto enzymy mohou katalyzovat i různé reakce.

## Mechanismus účinku enzymů a faktory ovlivňující enzymovou aktivitu

### Mechanismus účinku enzymů

Enzymy, podobně jako i ostatní katalyzátory, pracují na **principu snížení aktivační energie**.

Během prvního kroku dojde k tvorbě komplexu **enzym-substrát** (E-S). Tato reakce probíhá typicky velmi rychle a je reverzibilní. Následně se substrát za katalýzy enzymem přemění v produkt. Z komplexu E-S tak vzniká komplex **enzym-produkt** (E-P), který se rozpadá za uvolnění produktu. Tato reakce je pomalá a ireverzibilní.



Reakce se tak rozdělí na několik **postupných kroků**, v nichž vzniká jeden nebo několik přechodných stavů E-S (*transition states*). Aktivizační energie potřebná k vytvoření každého meziprojektu a k následné přeměně E-S na E-P je nižší než při přímé přeměně substrátu na produkt, přestože celkové  $\Delta G$  obou reakcí je stejné.

## Interakce substrátu a enzymu

Substrát interaguje s molekulou enzymu v oblasti zvané **aktivní místo** (centrum). To je tvořeno následovně:

### ■ Vazebním místem enzymu

Vazebné místo enzymu je prostorově vymezená, malá část molekuly enzymu obsahující přesně rozmístěné funkční skupiny ( $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$ , kyselé a bazické aminokyseliny), jejichž postavení odpovídá struktuře substrátu. Na vazbě mezi enzymem a substrátem se podílejí nevazebné interakce (H-můstky, elektrostatické a hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly). Kovalentní vazby vznikají jen výjimečně.

### ■ Katalytickým místem

Katalytické místo obsahuje další skupiny zodpovědné za **katalytickou aktivitu** enzymu. Tyto skupiny často pocházejí z molekuly kofaktoru. Přesné rozlišení vazebného a katalytického místa je ale obvykle problematické.

Kromě aktivního místa se na povrchu enzymu mohou nacházet i místa **allosterická**, umožňující regulaci aktivity enzymu vlivem různých **efektorů** (inhibitorů nebo aktivátorů).

Původní model interakce mezi molekulou substrátu a enzymu (později nazvaný **teorií zámku a klíče** – *lock and key*) vytvořený německým chemikem Emilem Hermannem Fischerem koncem 19. století předpokládal, že **molekula substrátu přesně zapadá do molekuly enzymu**. Ve 20. století tento model pozměnil americký biochemik Daniel Edward Koshland, Jr., který přišel s tvrzením, že substrát dokáže do jisté míry indukovat **konformační změnu místa**, na něž se váže (případně na sebe působí vzájemně). Přesného tvaru „zámku a klíče“ se tedy dosáhne až po navázání. Ukazuje se, že tato **teorie indukovaného přizpůsobení** (*induced fit theory*) popisuje interakce mezi enzymem a substrátem lépe než původní model.

# Specifita enzymů

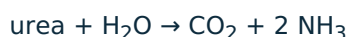
**Enzymová specifita** omezuje rozsah působení určitého enzymu. Rozlišujeme dva typy specifity:

## 1. Substrátová specifita

Enzym působí pouze na **omezenou skupinu substrátů** a pro jiné substráty reakci katalyzovat nebude. Podle rozsahu může být substrátová specifita:

### Absolutní:

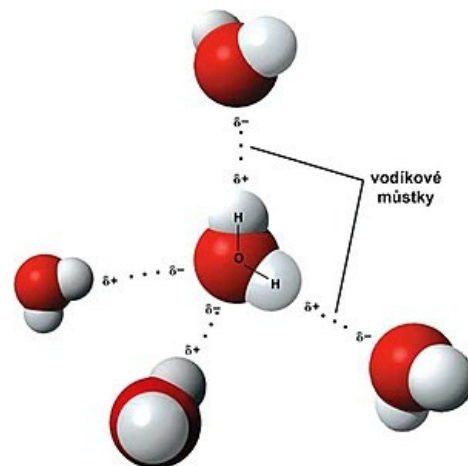
Enzym katalyzuje reakci pouze **jednoho určitého substrátu**, ale již nebude katalyzovat reakce, jichž se účastní například deriváty tohoto substrátu. Příkladem je ureáza katalyzující reakci:



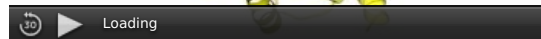
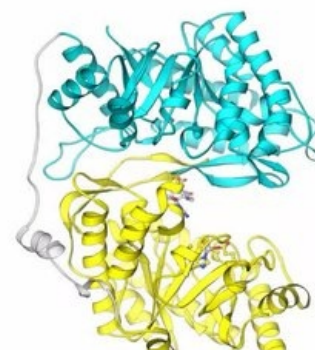
Ureáza však nedokáže katalyzovat hydrolyzu metylmočoviny či thiomčoviny.

### Skupinová:

Jedná se o častější formu specifity. Enzym katalyzuje reakce **několika podobných substrátů** (typicky obsahujících stejné funkční skupiny). Afinita ke každému substrátu může být rozdílná ( $K_M$  se tedy pro jednotlivé substráty liší). Příkladem je *karboxypeptidáza B*, která hydrolyzuje peptidy z jejich karboxy- konce. Preferenčně štěpí peptidové vazby obsahující nabitě aminokyseliny (arginin, lysin).



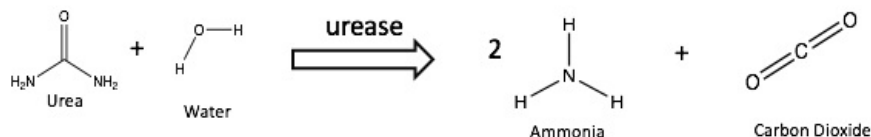
Vodíkové můstky podílející se na vazbě mezi enzymem a substrátem



Substrátová specifita

## 2. Reakční (účinková) specifita

Enzym obecně katalyzuje **jeden typ reakce**. Příkladem mohou být lipázy – enzymy hydrolyzující lipidy.



Ureáza katalyzující reakci - schéma

Mnoho enzymů působí **stereospecificky**. Atakují pouze určité konfigurační izomery substrátů (například jen L- nebo jen D- formu) pravděpodobně kvůli nutnosti vazby substrátu na alespoň tři specifická místa aktivního centra enzymu (který je chirální sloučeninou) – opačný stereoizomer se nenaváže.

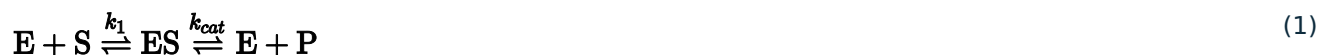
## Faktory ovlivňující enzymovou aktivitu a kinetika jednosubstrátových reakcí

### Koncentrace substrátu

Zkoumání enzymové kinetiky jednosubstrátových reakcí se věnovali Leonor **Michaelis** a Maud Leonora **Mentenová**. V této kapitole se uplatňují zákony obecné kinetiky.

[Podrobnější informace naleznete na stránce Kinetika .](#)

U katalyzovaných jednosubstrátových reakcí předpokládáme, že probíhají ve dvou krocích:



kde  $k_{cat}$  je rychlostní konstanta katalyzované reakce. Nazývá se také **číslo přeměny** (*turnover number*) a udává počet molekul substrátu přeměněných jednou molekulou enzymu za jednotku času (nejčastěji za jednu sekundu). Její hodnoty se pohybují od  $4 \cdot 10^7$  (pro katalázu) do 0,5 (pro lysozym).

### Maximální rychlost katalyzované reakce

Je možné ji vyjádřit jako:

$$v_{max} = k_{cat} \cdot [E]_t \quad (2)$$

kde  $[E]_t$  je celková koncentrace enzymu.

## Rovnice Michaelise a Mentenové

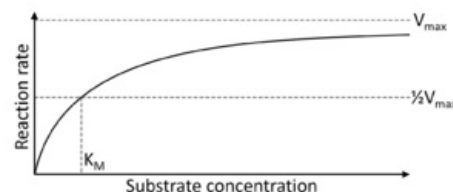
Rovnice popisuje, jak počáteční rychlost  $v_0$  závisí na rychlostní konstantě  $k_{cat}$  a také na tom, kde se rovnováha ES nachází:

$$v_0 = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{k_{cat} \cdot [E]_t \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

Předpokládáme přitom, že **množství enzymu se nemění** (a jeho koncentrace je výrazně nižší než koncentrace substrátu) a také přítomnost jistého pseudo-ustáleného stavu, při kterém se koncentrace komplexu ES mění mnohem pomaleji než koncentrace S a P.

Dosažením rovnice (2) můžeme rovnici (3) přepsat do tvaru:

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$



Graf kinetiky podle Michaelise a Mentenové

$K_M$  (**Michaelisova konstanta**) je experimentálně definována jako taková **koncentrace substrátu, při které se rychlost průběhu enzymaticky katalyzované reakce rovná polovině maximální rychlosti** (vyjadřuje tedy afinitu substrátu a enzymu). Čím je hodnota  $K_M$  nižší, tím je afinita vyšší (stačí totiž nižší  $[S]$ , aby se enzym z poloviny nasýtil).

$$\frac{K_M = [S]}{v = \frac{v_{max}}{2}}$$

Z grafu vyplývá, že závislost rychlosti enzymově katalyzované reakce na koncentraci substrátu má tvar **hyperboly**. Jestliže je koncentrace substrátu malá, křivka změny rychlosti přibližně odpovídá **kinetice 1. řádu** (lineární nárůst). Tento téměř lineární nárůst ale nemůže pokračovat donekonečna kvůli omezenému množství vazebných míst na molekulách enzymu. Při dostatečně vysoké koncentraci substrátu po nasycení vazebných míst všech dostupných molekul enzymů je tak dosaženo **maximální rychlosti** ( $v_{max}$ ). Rychlost se dále nezvyšuje a zůstává přibližně konstantní. Tato část křivky odpovídá **kinetice 0. řádu** (bez závislosti na koncentraci).

$K_M$  lze následně stanovit graficky z hyperboly, ale v praxi se toto stanovení moc často nepoužívá. Přesnější je stanovení s použitím převrácených hodnot  $1/v$  a  $1/[S]$  – tzv. dvojité reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka. Z rovnice (4) pak dostáváme:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{v_{max} \cdot [S]} \quad (5)$$

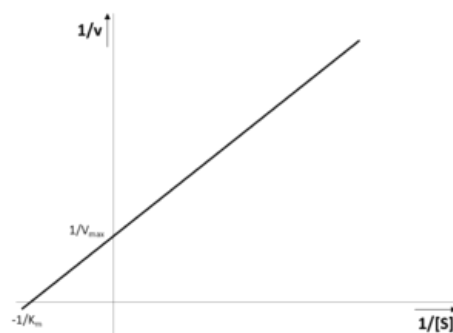
Rovnici také můžeme zapsat v tvaru odpovídajícím rovnici přímky  $y = a \cdot x + b$ :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (6)$$

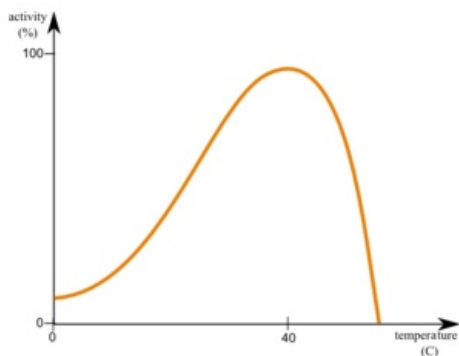
## Teplota

Enzymy mohou být kvůli své proteinové povaze vlivem vysoké teploty **denaturovány** (nastávají konformační změny, s následným zničením aktivního místa). Obvykle k tomu dochází při teplotách kolem 55–60 °C. Rychlost postupně klesá, až se průběh příslušné reakce úplně **zastaví**.

Také nízké teploty snižují aktivitu enzymů a tím i rychlost jimi katalyzovaných reakcí. Enzym má maximální aktivitu při teplotě označované jako **teplotní optimum** (u většiny lidských enzymů se jedná o teplotu kolem 37 °C).

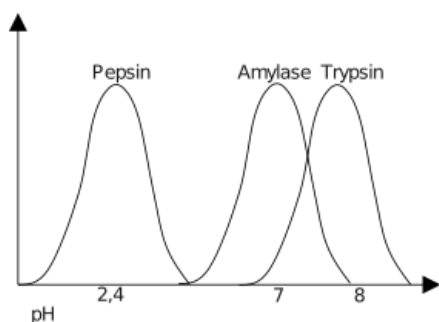


Závislost  $1/v$  na  $1/S$  podle Lineweavera a Burka



## pH (koncentrace $H^+$ )

Podobně jako na změny teploty jsou enzymy citlivé i na výkyvy pH. Extrémní hodnoty (nízké i vysoké) mohou opět vyvolat **denaturaci** molekuly enzymu. Koncentrace  $H^+$  má také významný vliv na ionizaci kyselých a bazických skupin nejen molekuly enzymu, ale i molekuly substrátu. Analogicky jako u teploty se považuje za **pH optimum** taková hodnota pH, při které má enzym maximální aktivitu.



## Názvosloví enzymů

### Triviální názvosloví

Původně užívaný termín **fermenty**, který vycházel z faktu, že enzymy se podílejí na fermentaci (kvašení), se již nepoužívá. Enzymy objevené mezi prvními dostaly obvykle jméno podle svého **zdroje** nebo **metody**, kterou byly objeveny. Jejich názvy tedy bývají bez vztahu k mechanismu reakce, kterou katalyzují. Mnohé jsou zakončeny příponou **-in** – viz pepsin objevený v trávicí šťávě žaludku (*řec. pepsis – trávení*) nebo ptyalin nalezený ve slinách (*řec. ptyalon – slina*).

### Doporučené názvosloví

Zavádí do názvosloví systém a je zároveň jednodušší než systematické názvosloví, proto je často užíváme v běžné praxi. Název vytvoříme spojením:

1. **Substrát + -áza (-asa)** – například amyláza (katalyzující hydrolýzu amylozy);
2. **Typ reakce + -áza** – například dehydrogenáza.

### Systematické názvosloví

Systematické názvosloví zavedla IUB (*International Union of Biochemistry*). Každý enzym má své **EC** (*Enzyme Commission*) **číslo** složené ze čtyř číslic – x.x.x.x. První značí jednu z šesti hlavních enzymových tříd, další dvě podskupinu a podskupinu. Poslední indikuje pořadí enzymu v podskupině (a zcela tak daný enzym charakterizuje). Rozeznáváme těchto **sedm hlavních tříd enzymů**:

1. oxidoreduktázy,
2. transferázy,
3. hydrolázy,
4. lyázy (syntázy),
5. izomerázy,
6. ligázy (syntetázy),
7. translokázy.

### Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy katalyzují reakce, při nichž dochází k oxidaci jedné a k redukci druhé složky. Často využívají kofaktory – např.  $NAD^+$ ,  $NADP^+$ , FAD či hem. Mezi oxidoreduktázy patří:

- oxidázy, peroxidázy,
- oxygenázy – vnášejí do molekuly substrátu kyslík, buď ve formě  $-OH$  (monooxygenázy, nebo také hydroxylázy)



či jako O<sub>2</sub> (dioxygenázy),

- dehydrogenázy – oxidují substrát odebráním H-atomů, jejich název se zkracuje jako DH (př. laktátdehydrogenáza – LDH, alkoholdehydrogenáza – ADH),
- desaturázy.

### Transferázy

Transferázy se podílejí na přenosu různých skupin (amino-, acyl-, methyl-, glykosyl-, fosforyl-, ...). Příkladem transferáz jsou:

- transaminázy (aminotransferázy) – přenášejí -NH<sub>2</sub> skupinu,
- kinázy (fosfotransferázy) – přenášejí fosfátovou skupinu z ATP nebo jiných nukleosidtrifosfátů,
- transaldolázy, transketolázy.

### Hydrolázy

Katalyzují hydrolytické reakce (štěpení vazeb v molekulách prostřednictvím molekuly vody). Mezi hydrolázy patří:

- lipázy, fosfolipázy,
- disacharidázy (sacharáza, maltáza, laktáza),
- proteázy, peptidázy (pepsin, trypsin),
- esterázy,
- fosfatázy.

### Lyázy (syntázy)

Katalyzují odstranění určité skupiny ze substrátu bez hydrolýzy (nehydrolytické štěpení např. vazeb mezi C-C, C-N) a také adiční reakce na dvojnou vazbu a syntézy bez spotřeby ATP. Příkladem lyáz jsou:

- dekarboxylázy,
- aldolázy,
- dehydratázy, hydratázy.

### Izomerázy

Katalyzují změny uvnitř jedné molekuly substrátu (intramolekulární změny). Vzniklý produkt je izomerem výchozího substrátu. Mezi izomerázy patří:

- epimerázy – mění polohu -OH skupiny v molekule,
- mutázy – mění polohu fosfátové skupiny v molekule.

### Ligázy (syntetázy)

Katalyzují syntetické reakce spojené s hydrolýzou ATP (spřažení exergonické a endergonické reakce). Příkladem ligáz jsou:

- karboxylázy,
- DNA-ligáza.

### Translokázy

Zajišťují přesun látek přes biologickou membránu. Umožňují specifický přestup atomů a molekul. Např.:

- TOM komplex – zajišťuje přechod vnější membránou mitochondrie (translocase of the outer mitochondrial membrane)
- TIM komplex – zajišťuje přechod vnitřní membránou mitochondrie (translocase of the inner mitochondrial membrane)
- ADP-ATP-translokasa – katalyzuje antiport ATP za ADP na vnitřní membráně mitochondrií

## Inhibice enzymů a její význam ve farmakologii

## Inhibice enzymů

Existuje mnoho látek schopných ovlivnit funkci enzymu ve smyslu zvýšení (**aktivátory**) nebo snížení (**inhibitory**) jeho aktivity. Právě inhibice enzymové aktivity patří k jednomu z nejdůležitějších **regulačních mechanismů** v živých systémech. Na inhibici specifických enzymů metabolických drah je založeno i působení mnoha léků. Proto je důležité znát inhibiční mechanismus jejich působení, který má vliv například na možnosti neutralizace jejich účinku. Na základě **vrátnosti efektu** existují dvě hlavní formy inhibice:

1. Reverzibilní inhibice,
2. Ireverzibilní inhibice.

### Reverzibilní inhibice

Reverzibilní (vratná) inhibice může být potlačena. Inhibitor se váže **nekovalentně** (slabými chemickými vazbami) buď do aktivního místa enzymu, nebo mimo něj. Efekt inhibitoru se dá odstranit například zvýšenou nabídkou substrátu nebo dialýzou.

#### Kompetitivní inhibice

Kompetitivní inhibitor **soutěží** s molekulou substrátu o aktivní místo enzymu. Jedná se tedy často o látky strukturně podobné molekule substrátu, ale neschopné podstoupit enzymem katalyzovanou reakci – inhibitor se na enzym jen naváže. Zvýšením koncentrace substrátu lze inhibici vytěsněním inhibitoru z aktivního místa potlačit.

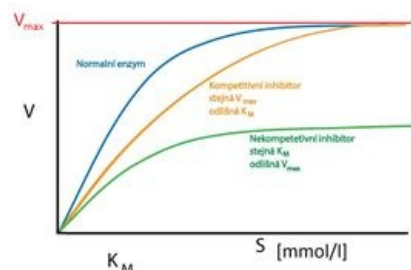
Kompetitivní inhibitor **neovlivňuje**  $v_{\max}$ , jen oddaluje její dosažení (musí dojít k vytěsnění inhibitoru zvýšenou koncentrací substrátu).  $K_M$  se tedy zvyšuje (zdánlivě je snížena afinita enzymu k substrátu).

#### Nekompetitivní inhibice

Při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže **mimo** vazebné místo pro substrát. Toto místo někdy bývá označováno jako modulační. Vazbou změni konformaci enzymu tak, že ovlivní i konformaci aktivního místa. Tím je **znemožněna vazba substrátu**. Inhibice se zvýšením koncentrace substrátu potlačit nedá, protože substrát nemá tendenci k vazbě na místo modulační (nedochází tedy k boji – kompetici o vazebné místo). Tuto inhibici lze zrušit jen odstraněním inhibitoru (např. dialýzou).

Protože žádný z komplexů enzym-inhibitor (případně ani enzym-inhibitor-substrát) není katalyticky aktivní, sníží se celkové množství enzymu dostupného pro substrát. Tím dojde ke **snížení**  $v_{\max}$  reakce.

$K_M$  se v tomto případě **nemění**.



Graf závislosti  $v_{\max}$  na koncentraci substrátu

#### Akompetitivní inhibice

Jedná se o inhibici, při níž se inhibitor váže pouze na **komplex enzym-substrát**. Vzniká tak ternární komplex enzym-inhibitor-substrát.

Dochází ke **snížení**  $v_{\max}$  (obsazené komplexy jsou enzymaticky neúčinné) i  $K_M$ , ale jejich vzájemný poměr se nemění. Inhibitor je při nízké koncentraci substrátu velmi málo účinný, protože nemá dostatek komplexů ES, na které by se mohl navázat.

### Ireverzibilní inhibice

V průběhu této inhibice označované také jako **nevratná** dochází ke **kovalentní modifikaci** molekuly enzymu. Inhibitor se kovalentně naváže do aktivního místa enzymu nebo mimo něj, a proto není možné inhibici odstranit (například dialýzou nebo zvýšením koncentrace substrátu).

*Jako příklad slouží těžké kovy ( $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ , ...) nebo organofosfáty a z nich odvozené nervové plyny jako sarin a tabun.*

Dalším popisovaným jevem je **inhibice nadbytkem substrátu**. Při příliš vysoké koncentraci substrátu totiž dochází k boji o vazebné místo mezi jeho molekulami navzájem. To se na grafu projeví mírným snížením  $v_{\max}$  v oblasti vyšší koncentrace substrátu.

## Allosterická regulace enzymové aktivity

Mnoho regulačních enzymů, které limitují rychlost metabolických drah (tzv. *rate-limiting enzymes*), jsou enzymy **allosterické**. Allosterická regulace jejich aktivity patří k jedné z nejvýznamnějších forem regulace průběhu metabolických drah.

**Allosterický enzym** má na svém povrchu kromě aktivního místa i místo jiné, tzv. allosterické (*řec. αλλος – jiný*), přes které může být ovlivněn **modulátory** (aktivátory či inhibitory). Vazba allosterického modulátoru způsobí **konformační změnu** molekuly enzymu. Tato změna vede k rozdílné afinitě k substrátu a dalším ligandům. Většina



allosterických enzymů je **oligomerních** (jsou složeny z podjednotek). Vazba modulátoru na jednu podjednotku ovlivní prostřednictvím konformační změny aktivitu dalších podjednotek. Rozeznáváme dva základní typy allosterické regulace:

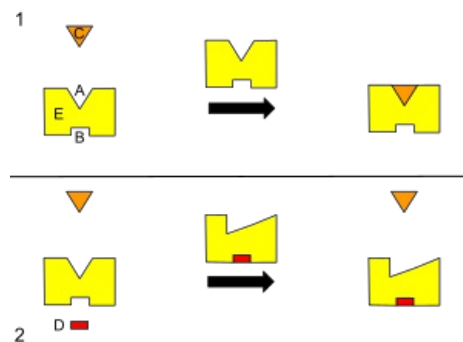
1. Homotropní – modulátor je zároveň i substrátem pro enzym. Známým příkladem je  $O_2$ , což je homotropní allosterický modulátor hemoglobinu.
2. Heterotropní – modulátor a substrát jsou odlišné molekuly. V návaznosti na předchozí příklad by  $CO_2$  byl heterotropním allosterickým modulátorem hemoglobinu.

### Allosterické enzymy vykazují sigmoidální kinetiku

Jako příklad použijeme reakci ovlivněnou homotropně působícím allosterickým aktivátorem. Při nízkých koncentracích substrátu probíhá reakce pomalu, protože je obsazeno jen málo molekul enzymu. Pokud se alespoň na jednu podjednotku enzymu naváže substrát, zvýší to afinitu i ostatních podjednotek. To se na grafu projeví prudkým vzestupem reakční rychlosti. Čím více podjednotek molekula enzymu obsahuje, tím prudší je nástup efektu zvýšení koncentrace substrátu.

Enzym pracuje na principu **vše anebo nic**. Před dosažením jisté koncentrace substrátu reakce téměř neběží, naopak nad danou koncentrací substrátu rychle dosáhne  $V_{max}$ . V tuto chvíli jsou už všechna vazebná místa enzymových podjednotek obsazena.

Tato vlastnost allosterických enzymů je při regulaci metabolických drah velmi výhodná, neboť umožňuje rychle vypnout nebo zapnout průběh reakce a tím i celé metabolické dráhy.



Vazba inhibitoru na molekulu enzymu: A – aktivní místo, B – allosterické místo, C – substrát, D – inhibitor, E – enzym

## Využití enzymů v diagnostice onemocnění

Stanovování aktivit různých enzymů v tělesných tekutinách je v klinické praxi často užíváno při **diagnostice místa a rozsahu tkáňového poškození**. Kromě diagnostického přínosu je významný i prognostický přínos, hodnocený na základě změn hladin příslušných enzymů v čase.

Nejčastěji se měří aktivity enzymů přímo **v plazmě**. Může se jednat o:

1. Enzymy specifické pro plazmu – např. srážecí faktory.
2. Sekreční enzymy, které se v různé míře dostávají do krve – např. pankreatická amyláza či lipáza.
3. Intracelulární enzymy plnící v buňkách různé funkce – do krve pronikají při poškození buněk příslušné tkáně.

Při hodnocení naměřených hladin enzymů je důležité znát jejich:

#### ■ Intracelulární lokalizaci

Některé enzymy se specificky vyskytují jen v určitých kompartmentech buňky a mohou tak sloužit jako jejich **markery**. Příkladem může být **cytochromoxidáza**, která je specifická pro mitochondrie. Podle zastoupení enzymů vyplavených z buněk můžeme také odhadovat míru poškození dané tkáně. Jsou-li v krvi přítomny jen enzymy lokalizované v cytozolu, je poškození mírnější než v případě výskytu i typicky mitochondriálních enzymů.

#### ■ Orgánovou a tkáňovou distribuci

Podobně jako se liší distribuce enzymů v rámci buněčných kompartmentů, různí se i jejich distribuce mezi jednotlivými tkáněmi a orgány. Některé enzymy jsou proto více či méně **orgánově specifické**. Typicky se jedná zejména o různé druhy izoenzymů či izoform enzymů. Příkladem mohou být izoenzymy kreatinkinázy – CK-MB typická pro myokard a CK-MM pro kosterní sval.

### Nejčastěji stanovované enzymy

#### Játra

##### ■ Markery poškození hepatocytů:

1. ALT (alaninaminotransferáza) – lokalizovaná převážně v cytoplasmě,
2. AST (aspartátaminotransferáza) – lokalizovaná převážně v mitochondriích.

Protože AST je zejména mitochondriální enzym, dochází k jejímu uvolnění až při **těžším poškození jaterních buněk**. Podle poměru AST/ALT se tedy dá posoudit závažnost poškození.

##### ■ Markery cholestázy:

1. ALP (alkalická fosfatáza),
2. GGT ( $\gamma$ -glutamyltransferáza) – její zvýšenou aktivitu zaznamenáváme také u chronického alkoholického poškození jater.

## Pankreas

1. Pankreatická amyláza – méně specifická pro postižení pankreatu než pankreatická lipáza.
2. Pankreatická lipáza.

## Svalová tkáň

K odlišení místa poškození se měří aktivity izoenzymů kreatinkinázy:

1. CK-MM – lokalizovaná v kosterním svalstvu;
2. CK-MB – lokalizovaná v myokardu;
3. CK-BB – lokalizovaná v mozku.

Při diagnostice infarktu myokardu se kromě CK-MB měří také hladiny:

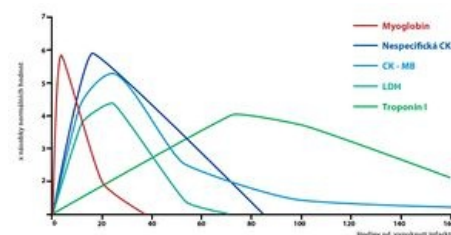
1. Troponinů I a T – v současnosti nejspecifičtější kardiální markery, vrchol jejich koncentrace nastupuje asi 12 hodin po infarktu.
2. Myoglobinu – jako kardiální marker málo specifický, ale vrcholu své koncentrace dosahuje už 2 hodiny po infarktu.

## Kostní tkáň

1. ALP (alkalická fosfatáza) – lokalizovaná v osteoblastech – tzv. kostní frakce, může ale pocházet i z jater (tzv. jaterní frakce), GIT či z ledvin,
2. ACP (kyselá fosfatáza) – lokalizovaná v osteoklastech, může pocházet i z prostaty.

## Isoenzymy laktátdehydrogenázy (LD, LDH)

1. LD-1 – lokalizovaná v buňkách myokardu a erytrocytech.
2. LD-2 – lokalizovaná v RES.
3. LD-3 – lokalizovaná v plicích.
4. LD-4 – lokalizovaná v ledvinách, pankreatu a placentě.
5. LD-5 – lokalizovaná v játrech a kosterním svalu.



Kardiomarkery

## Přehled nejčastěji stanovovaných enzymů

Stanovovaný enzym	Poškození orgánu/tkáně
$\alpha$ -amyláza (AMS), pankreatická lipáza (LPS)	Pankreas
Alkalická fosfatáza (ALP)	Kost, játra, GIT, ledviny, placenta
Kyselá fosfatáza (ACP)	Kost, prostata
Kreatinkináza (CK)	Kosterní sval, srdce
Laktátdehydrogenáza (LD)	Srdce, játra, kosterní sval, ledviny, erytrocyty
Alanin aminotransferáza (ALT)	Játra
Aspartát aminotransferáza (AST)	Játra, srdce, kosterní sval
Gama-glutamyltransferáza (GGT)	Játra

## Přehled kofaktorů enzymů

### Ionty kovů a stopové prvky

Kofaktor	Příklady enzymů
$Zn^{2+}$	Peptidázy, alkoholdehydrogenáza
$Mg^{2+}$	Enzymy závislé na ATP, fosforyláz
$Mn^{2+}$	Superoxiddismutáza, argináza
$Fe^{2+}/Fe^{3+}$	Cytochromy, kataláza, peroxidázy
$Cu^{2+}$	Cytochromoxidáza, aminooxidázy
$Mo^{2+}$	Xantindehydrogenáza

## Organické látky

### Kofaktory oxidoreduktáz

Kofaktor	Výchozí vitamin	Lokalizace/funkce
NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup>	Kyselina nikotinová	Dýchací řetězec, syntéza MK
FAD, FMN	Riboflavin (B <sub>2</sub> )	Dýchací řetězec
Ubichinon/ubichinol		Dýchací řetězec
Hem		Cytochromy

### Kofaktory transferáz

Kofaktor	Výchozí vitamin	Lokalizace/funkce
ATP, GTP	Thiamin (B <sub>1</sub> )	Přenos fosfátového zbytku
TDP (thiamindifosfát)	Thiamin (B <sub>1</sub> )	Přenos uhlíkatých fragmentů (oxidační dekarboxylace)
PALP (pyridoxalfosfát)	Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	Přenos –NH <sub>2</sub> skupin (transaminace), dekarboxylace aminokyselin
THF (tetrahydrofolát)	Folát (kyselina listová)	Přenos jednouhlíkatých fragmentů
CoA (koenzym A)	Pantothenát	Přenos acylů
PAPS (fosfoadenosinfosfosulfát)		Přenos sulfátů
SAM (S-adenosylmethionin)		Methylace
B <sub>12</sub> -komplex	Kobalamin B <sub>12</sub>	Přenos CH <sub>3</sub> skupiny

### Kofaktory lyáz

Kofaktor	Výchozí vitamin	Lokalizace/funkce
PALP (pyridoxalfosfát)	Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	Dekarboxylace

### Kofaktory ligáz

Kofaktor	Výchozí vitamin	Lokalizace/funkce
ATP		
Karboxybiotin	Biotin	Přenos CO <sub>2</sub> (karboxylace)

## Odkazy

### Související články

- Chemie živin
- Chemické reakce v metabolismu
- Přehled energetického metabolismu