

EC klasifikacija: **po reakcijah, ki jih katalizira**

Encimski sistemi: so proteini z več kot eno encimsko aktivnostjo

Razvrstitev po organiziranosti:

multiencimski protein - proteini z več katalitičnimi domenami

- kovalentno povezani (**multiencimski polipeptidi**)
- nekovalentno povezani (**multiencimski kompleksi**)

Po organiziranosti in funkciji jih lahko razdelimo:

1. Encimi s kompleksno strukturo (**RNA-polimeraza**)
2. Ohlapna asociacija različnih encimov, katerih stehiometrija se spremija (**glikogenski delci**)
3. Multiencimski proteini s točno določeno strukturo, ki imajo več katalitičnih aktivnosti (**triptofan sintaza, proteasom**)

Izolacija multiencimskih kompleksov

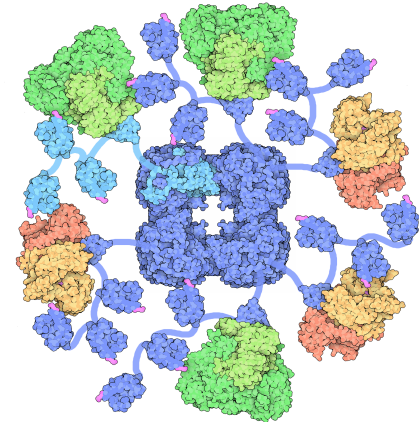
- metabolne poti predstavljajo zaporedje reakcij
- multiencimski sistemi nastanejo preko asociacije proteinov (fuzija genov)
- maščobne kisline sintaza triptofan sintaza in piruvat dehidrogenazni kompleks najbolj preučeni
- težave pri izolaciji:
 - težko določiti število polip. verig
 - tekom izolacije ->disociacija
 - hidroliza verig
 - kot funkcionalni kompleksi v več oblikah



piruvat dehidrogenaza

(poenostavljen prikaz)

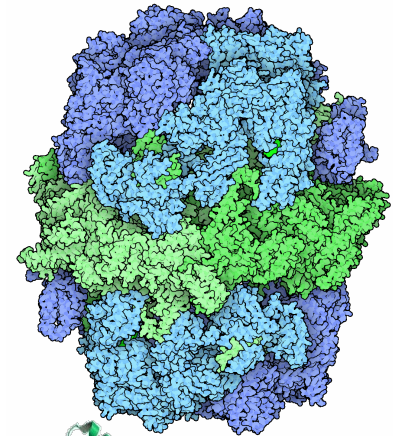
- tri encimske aktivnosti
- povezuje glikolizo s CTKK
- veliko gibljivih delov
- simetrično jedro z repi-modro
- lovijo druge encime (oranžno rumeno, zeleno) v kompleksu
- struktura sestavljena po delih



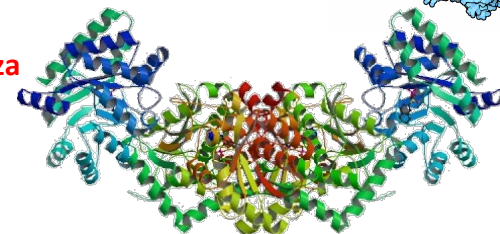
maščobne kisline sintaza

(poenostavljen prikaz)

- iz mk se sintet. lipidi in membrane
- mk predstavljajo vir energije
- 12 verig (iz gliv)
- 6 α (zeleno) 3 β (modro)
- v notranjosti votlina



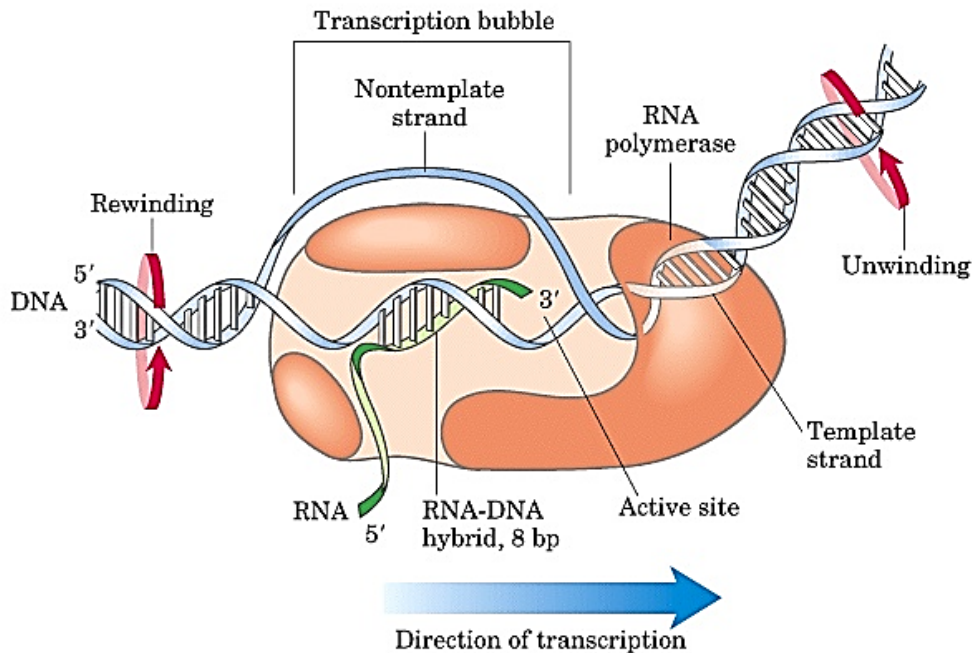
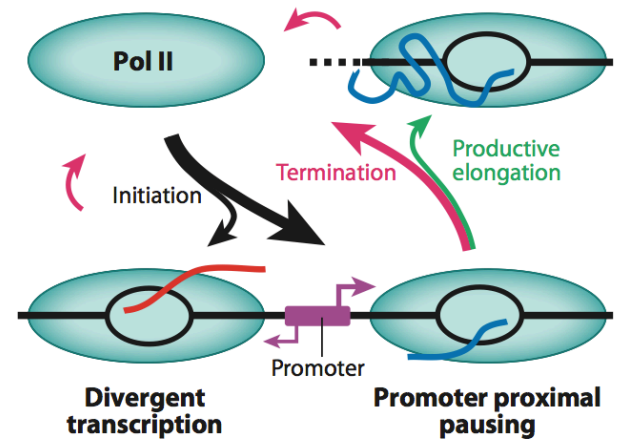
triptofan sintaza



- bolj značilni za evkarionte kot prokarionte
- preko evolucije do fuzije genov
- čas difuzije produktov
- čas za vzpostavitev novega ravnotežja
- kompartmentizacija
- koordiniranost (kooperativnost, alosterična komunikacija)
- zaščita nestabilnih intermediatov

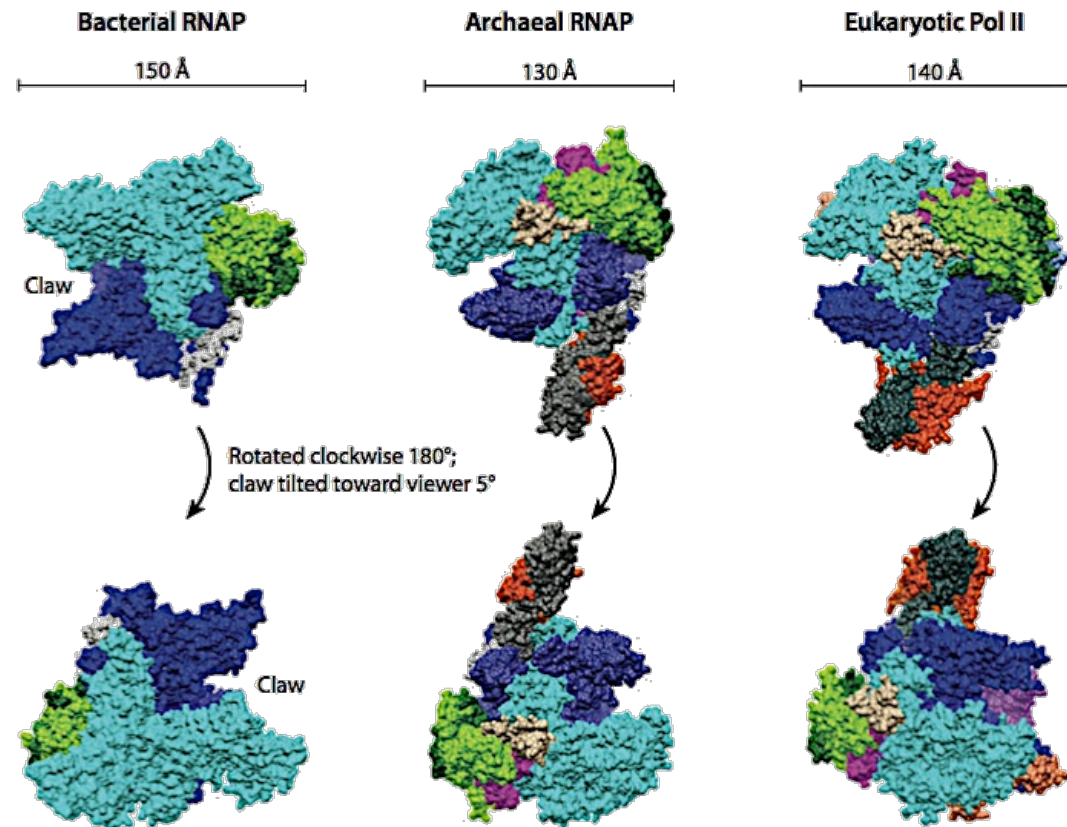
RNA POLIMERAZA

- katalizira transkripcijo
- vključujejo tri mehanistične operacije
 - prepozna in se veže na specifično promotorsko mesto (transkripcija poteka v obe smeri)
 - samo ena smer dovoljuje elongacijo (kopira določen gen)
 - zaključi transkripcijo



RNA POLIMERAZA - zgradba

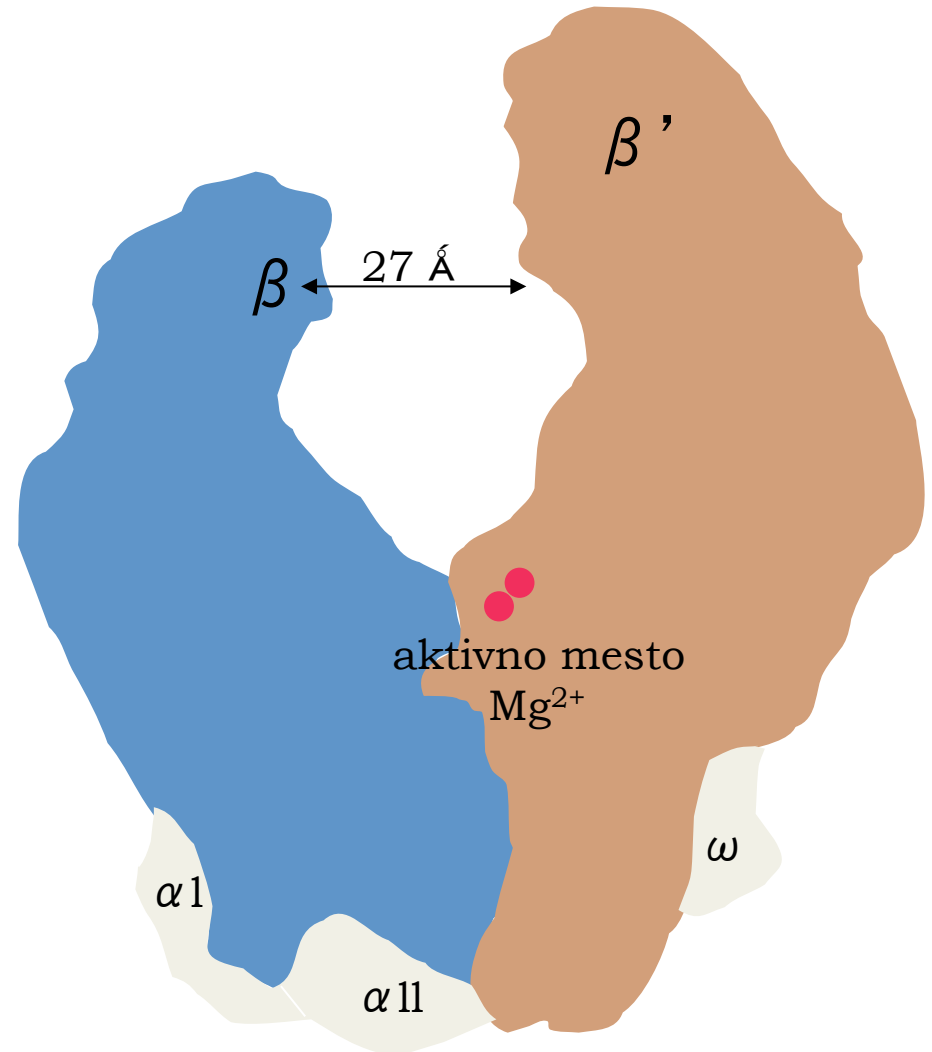
- poznane različne strukture
 - virusna T7 RNAP (enoverižna)
 - bakterijska RNAP
 - RNAP kvasovk
 - RNAP arhej
 - mitohondrijska RNAP
- v bakteriji dve obliki:
 - RNAP osrednji encim ($\alpha_2\beta\beta'\omega$)
 - RNAP holoencim ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$)
 - 400 kDa
 - obe obliki sposobni prepisovati
 - osrednji encim ni specifičen
 - holoencim specifičen (promotor)
 - σ -podenota odgovorna za visoko specifičnost



Bacterial RNAP subunit	Archaeal RNAP subunit	Eukaryotic Pol II subunit
β'	A, A'	Rpb1
β	B	Rpb2
α_1	D	Rpb3
α_2	L	Rpb11
ω	K	Rpb6
–	F	Rpb4
–	H	Rpb5
–	E'	Rpb7
–	–	Rpb8
–	–	Rpb9
–	N	Rpb10
–	P	Rpb12

Bakterijska RNA polimeraza - osrednji encim

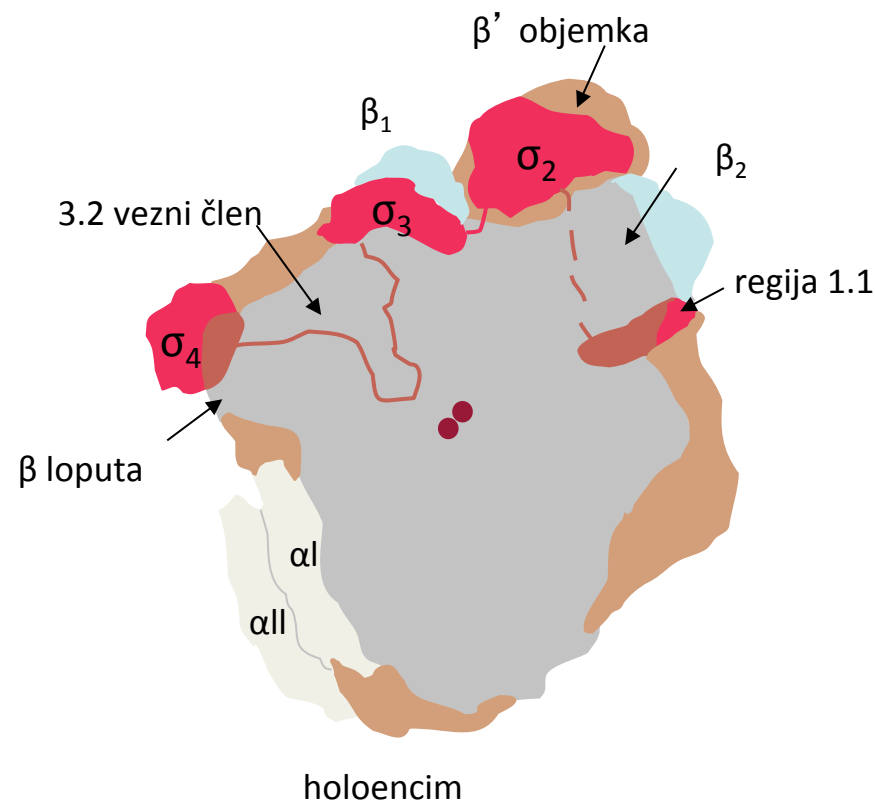
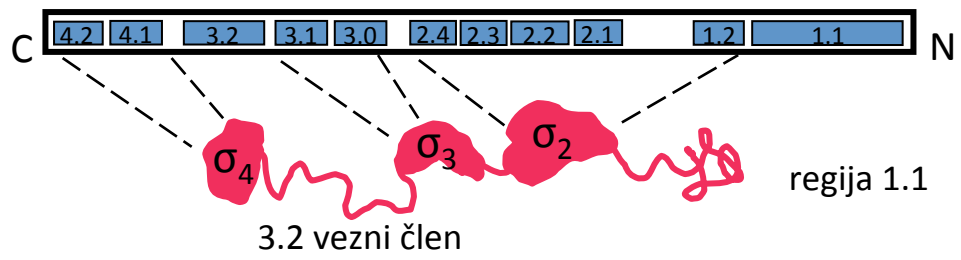
- osrednji encim ($\alpha_2\beta\beta'\omega$)
- brez σ -podenota (sigma)
- oblika klešč (čeljusti)
- 2 Mg^{2+} iona (koord. 3 Asp)
- kanal 27Å bogat z Arg, Lys



osrednji encim

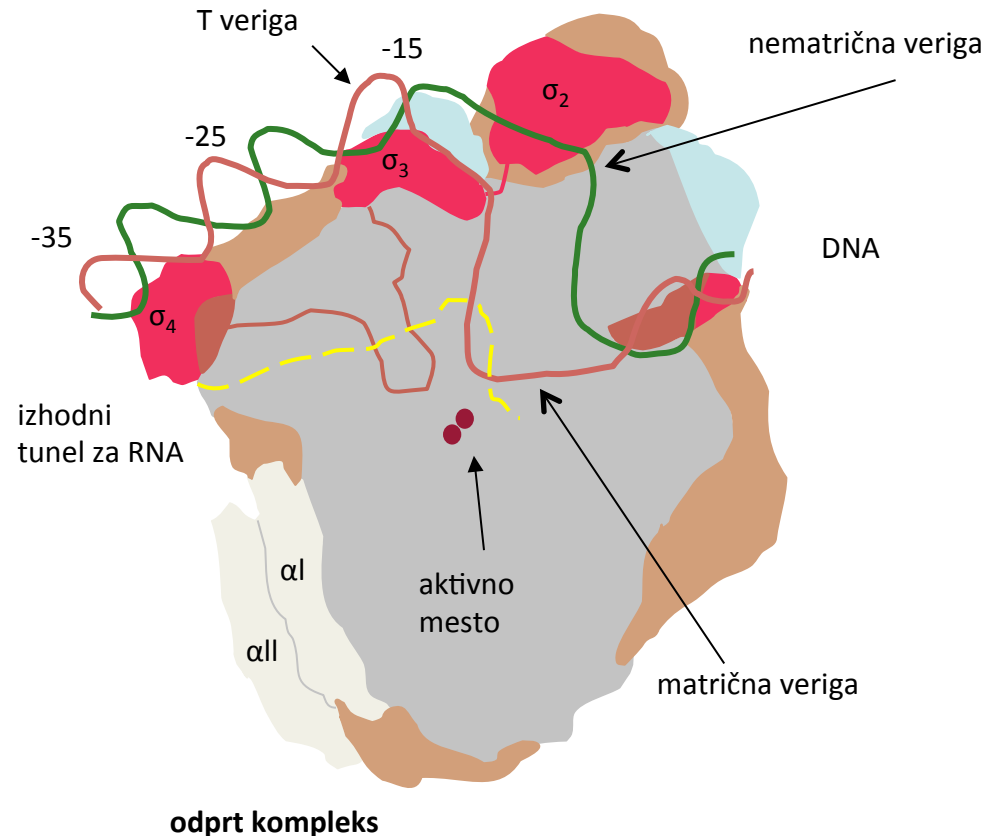
Bakterijska RNA polimeraza - holoencim

- asociacija σ -podenote \rightarrow holoencim ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$)
- globularni deli σ -podenote se se umestijo vzdolž aktivne reže
- konformacijske spremembe
- reža $27\text{\AA} \rightarrow 15\text{\AA}$
- deloma se zakrije + naboj
- prepreči se nespecifična vezava
- promotorska regija
 - $\sigma_2 \rightarrow -10$
 - $\sigma_3 \rightarrow -14, -15$
 - $\sigma_4 \rightarrow -35$



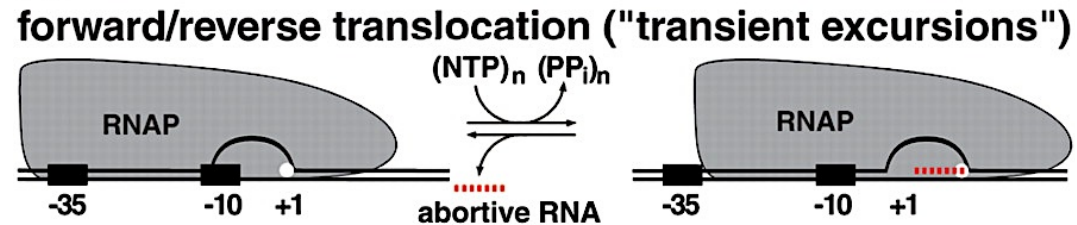
Bakterijska RNA polimeraza - vezava DNA

- z vezavo holoencima na DNA -> **katalitsko neaktivni, zaprt kompleks**
- DNA je na mestu, kjer se transkripcija začne
- proces transkripcije se začne s talitvijo DNA
 - začne na območju okoli -15 bp
 - Trp v bližini mesta -12
 - σ_2 veže nekodirajočo verigo
 - matrična veriga proti aktivnemu mestu
 - izpostavi se mesto +1
 - sega od -12 do +2 mesta
- kompleks se odpre -> **katalitsko aktivni kompleks**
- pripravljeno za transkripcijo
- DNA vstopi in izstopi kot dupleks

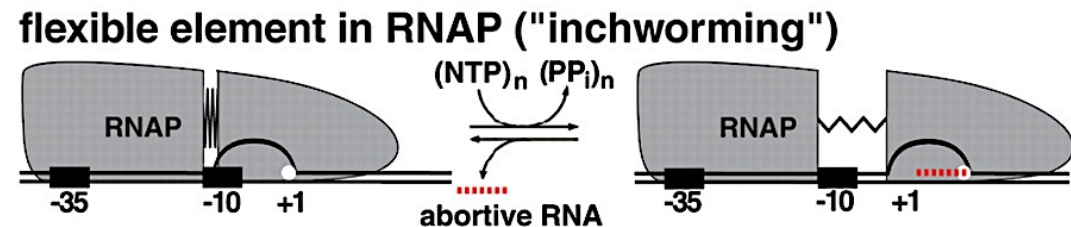


Bakterijska RNAP - iniciacijski -> elongacijski kompleks

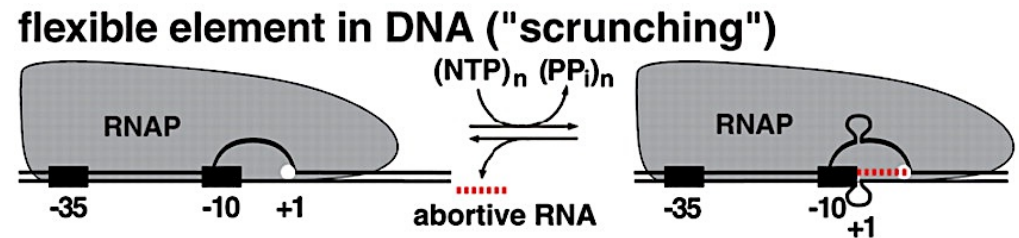
- začetek RNA sinteze s številnimi prekinjenimi, neproduktivnimi cikli (~9-11 baz RNA verige)



- predlagani 3 modeli:
 - premikanje vzdolž DNA
 - fleksibilnost znotraj RNAP (kot črv)
 - **krčenje DNA**, encim ostane nespremenjen
 - za vsak cikel potegne DNA



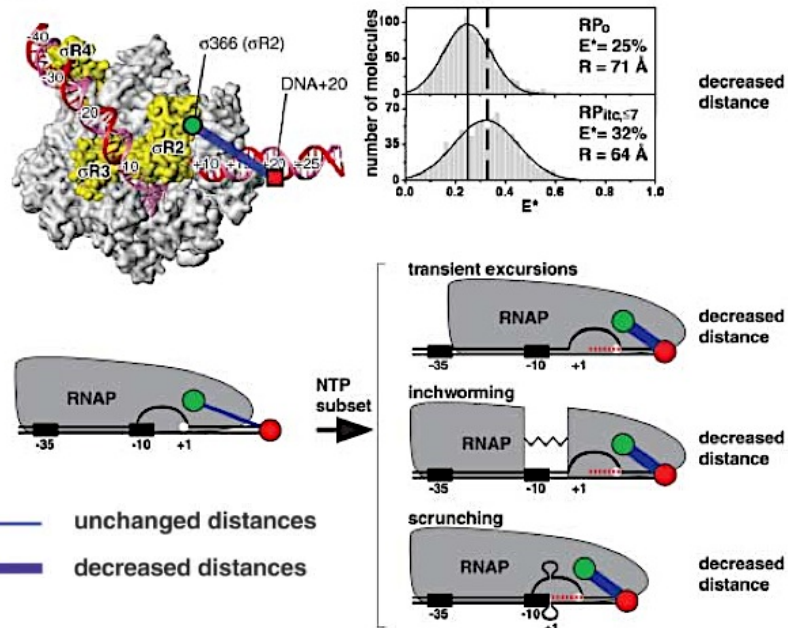
- spremljali premik DNA segmenta ob dodatku nukleotida v RNA verigo



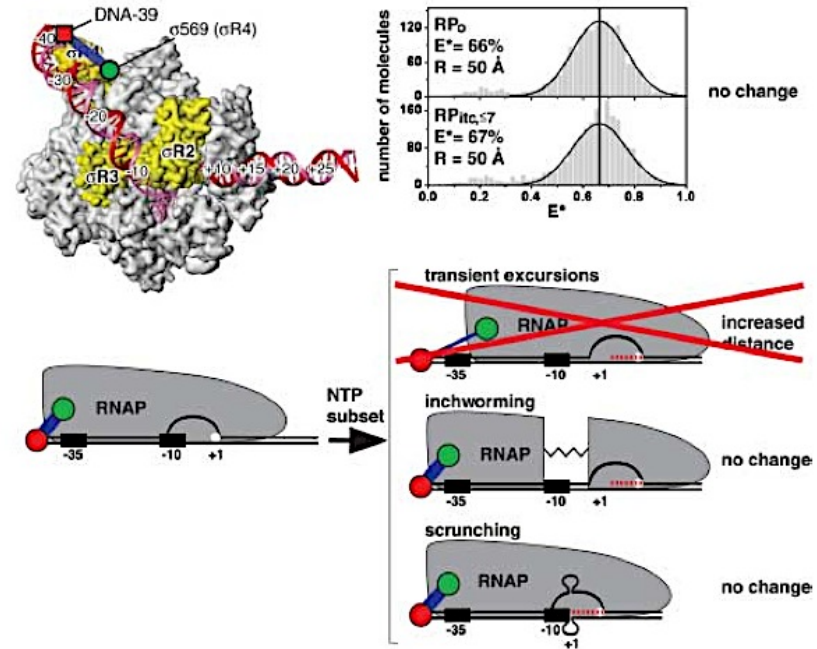
- Fluorescenčni priveski FRET Forster/Fluorescence Resonance Energy Transfer

Bakterijska RNAP - FRET eksperimenti

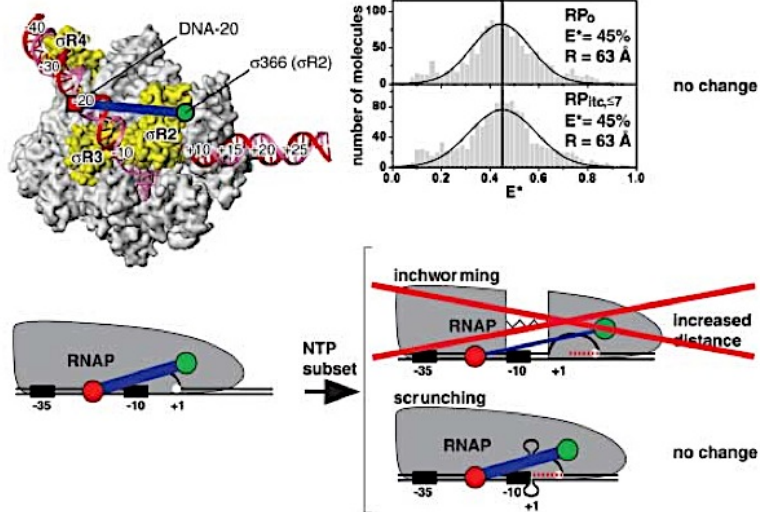
A Premik: srednji konec RNAP proti DNA



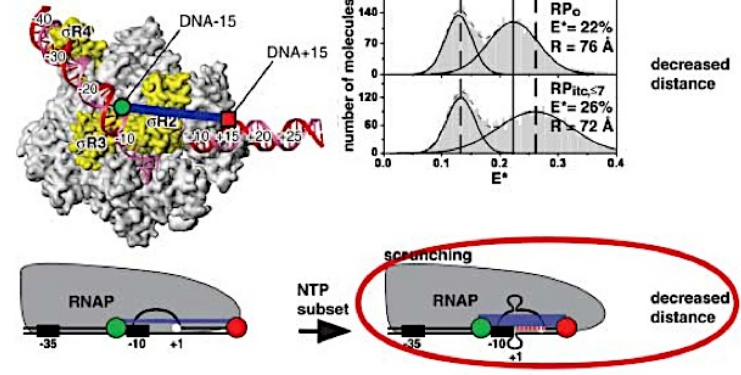
B Premik: zadnji konec RNAP proti DNA



A Premik: ekspanzija/kontrakcija RNAP

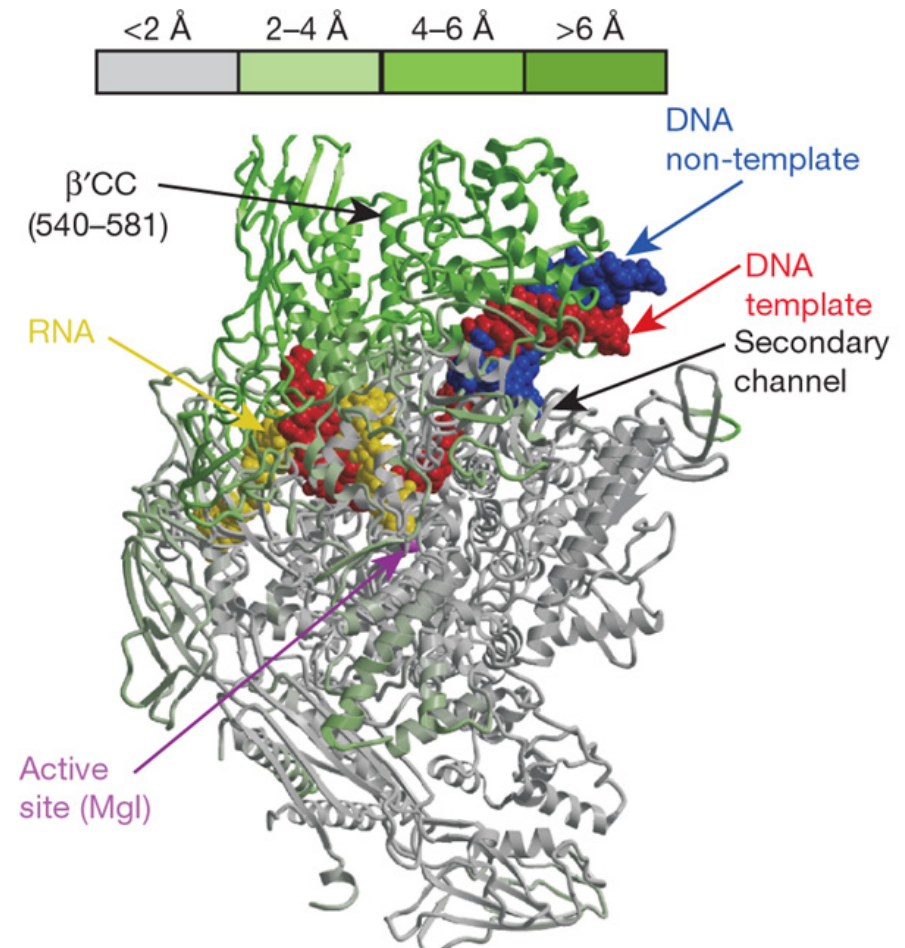


A Premik: ekspanzija/kontrakcija DNA



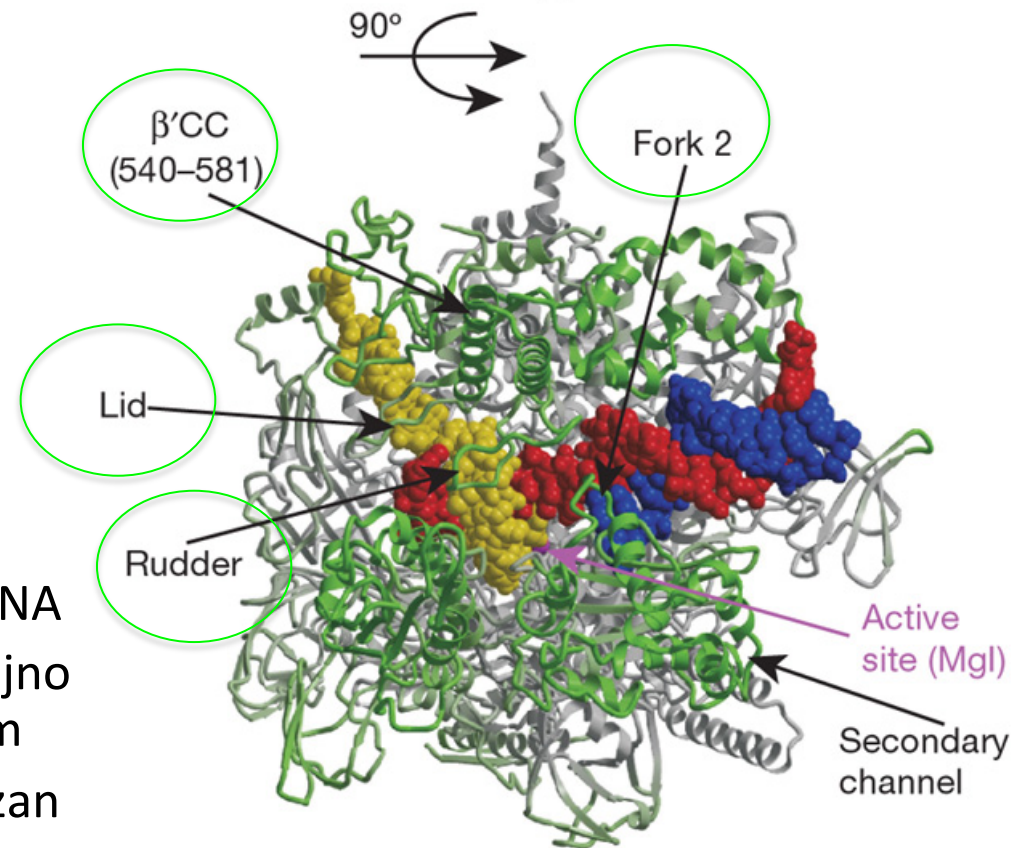
Bakterijska RNAP - elongacijski kompleks $\alpha_2\beta\beta'\omega$ /DNA/RNA

- po sintezi 13-15 nukleotidov (7-9 sparjenih z matrično verigo) se DNA/RNA hibrid pretvori v elongacijski kompleks
- σ -podenota oddisocira
- encim zapusti promotorsko mesto
- deluje samo še osrednji encim
- kristal elongacijskega kompleksa (2-6 Å)



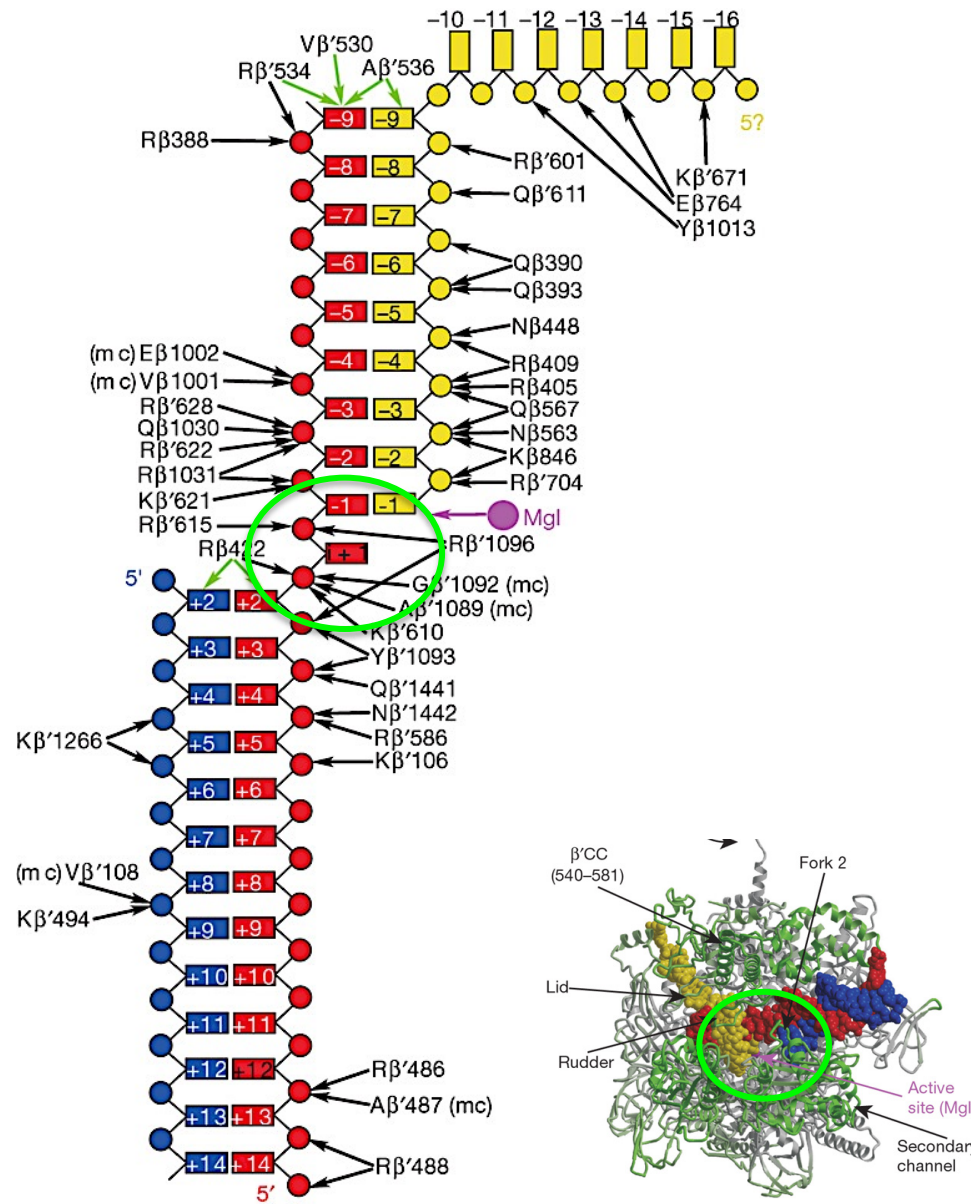
Bakterijska RNAP - elongacijski kompleks $\alpha_2\beta\beta'\omega$ /DNA/RNA

- RNAP *Thermus thermophilus*
- 14 bp DNA
- 9 bp DNA/RNA
- 7 prostih RNA nukleotidov
- DNA potopljena med $\beta\beta'$
- pokrov usmerja nastajajočo RNA
- krmilo pozicionirano med dvojno DNA in DNA/RNA kompleksom
- RNA/DNA kompleks tesno vezan v aktivno mesto
- $\beta'CC$ α -helis ključen za vezavo σ -podenote



Bakterijska RNAP - elongacijski kompleks $\alpha_2\beta\beta'\omega$ /DNA/RNA

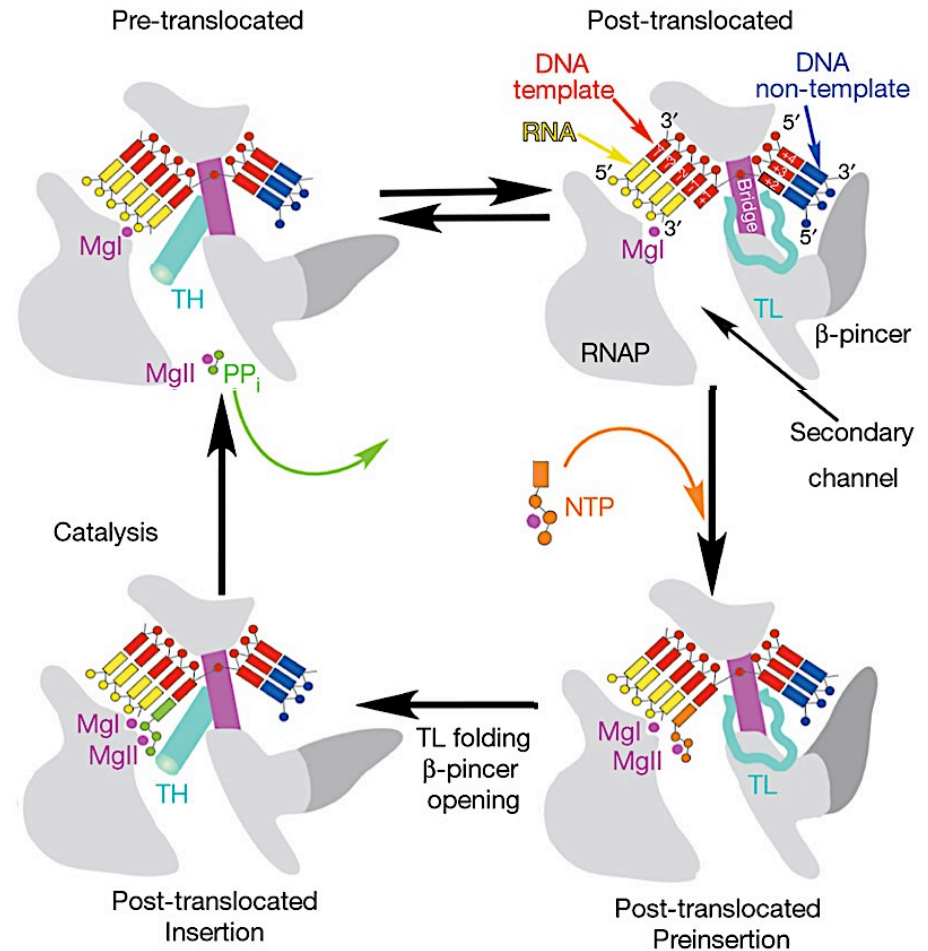
- prikaz kontaktov
 - polarne interakcije
 - vander Waalove interakcije
 - malo hidrofobnih
- prostega mesta v aktivnem mestu je za 1 nukleotid



Bakterijska RNAP - model za vezavo nukleotida v RNA

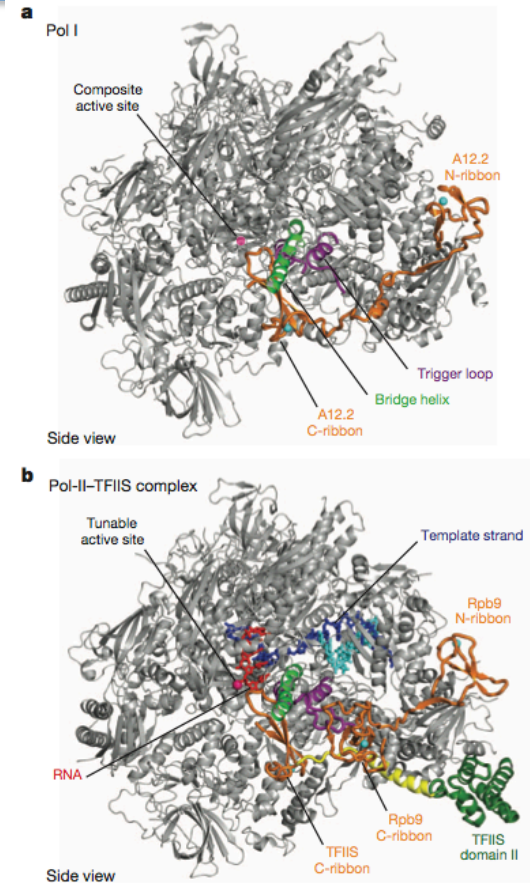
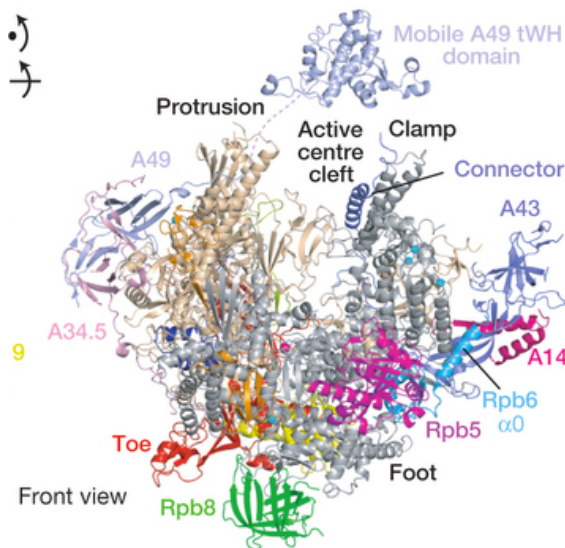
TL trigger loop
TH trigger helix

- elongacijski kompleks (EC) ravnatežju med pre in post translokacijskim stanjem
- NTP seveže v odprt EC
 - tvori neaktivni predinsercijski intermediat
 - stabilizira post-translokacijski EC
- TL (trigger loop) sprožitvena zanka -> TH (trigger heliks)
 - stabilizira katalitično obliko
 - aktivno mesto se zapre
- odstranitev pirofosfata
 - sproži relaksacijo
 - odpre aktivno mesto z značilno nezvito TL zanko
- sprožitvena zanka je centralni element pri katalizi
- tarča elongacijskih faktorjev



RNA polimeraza I *Saccharomyces cerevisiae*

- struktura Pol I 2,8 Å
- 14 podenot (590 kDa)
- dimerizacija Pol I
- razlike med Pol I in Pol II
- značilen povezovalni heliks-most (zeleno)
- regulatorni faktorji prisotni
 - inicijacija prepisovanja
 - proces elongacije
 - kontrola prepisovanja
 - terminacija



RNA polimeraza I *Saccharomyces cerevisiae*

