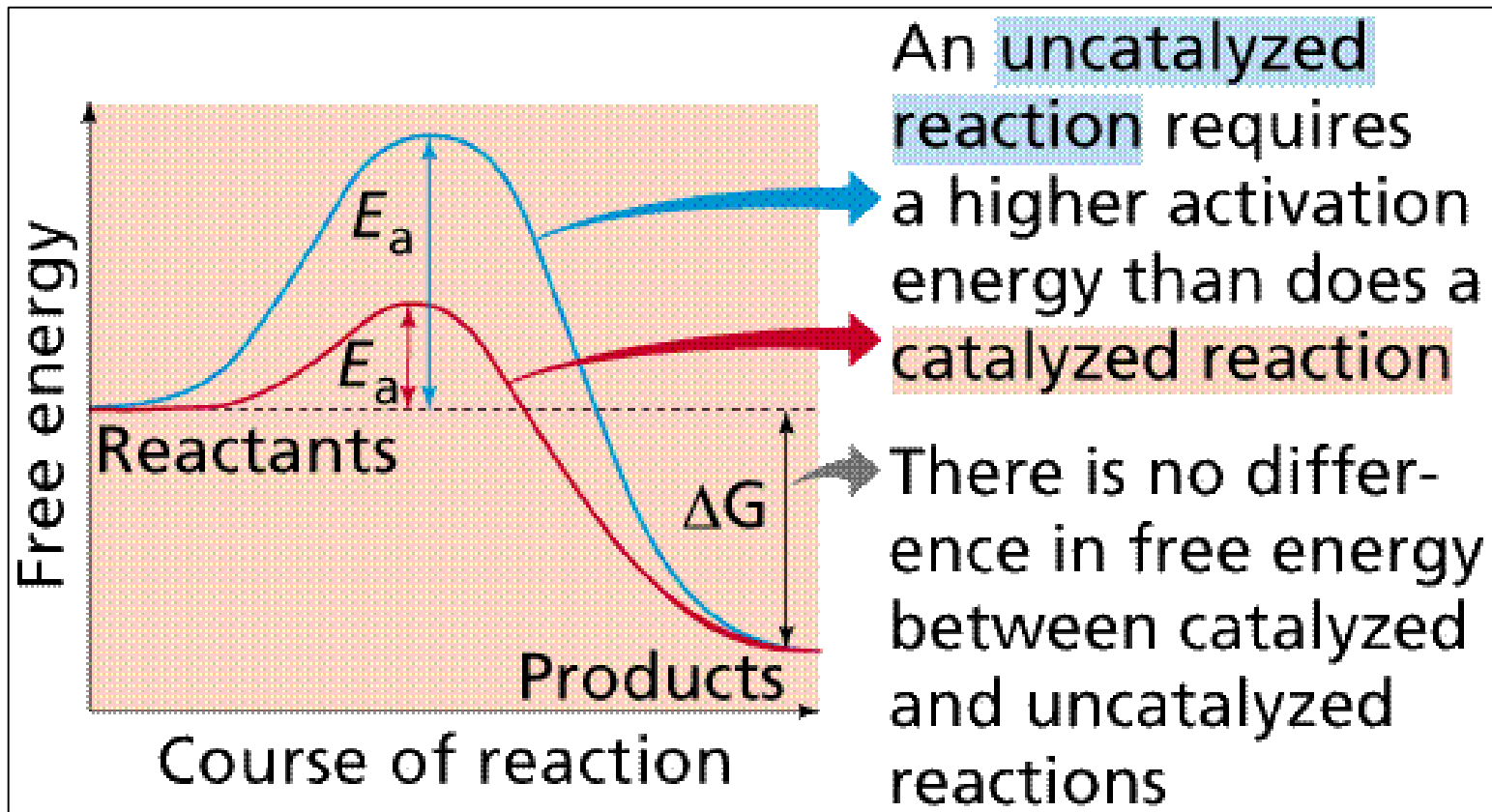


Encimi

Encimi so biološki katalizatorji, ki pospešijo hitrost kemijskih reakcij v bioloških sistemih. Delujejo tako, da znižajo aktivacijsko energijo za pretvorbo reaktantov (imenujemo jih **substrati**) v produkte. **Aktivacijska energija** je energija, ki jo morajo imeti molekule reaktantov, da se lahko pretvorijo v produkte.



Encimi

Encimi so biološki katalizatorji, ki pospešijo hitrost kemijskih reakcij v bioloških sistemih. Delujejo tako, da znižajo aktivacijsko energijo za pretvorbo reaktantov (imenujemo jih **substrati**) v produkte. **Aktivacijska energija** je energija, ki jo morajo imeti molekule reaktantov, da se lahko pretvorijo v produkte.

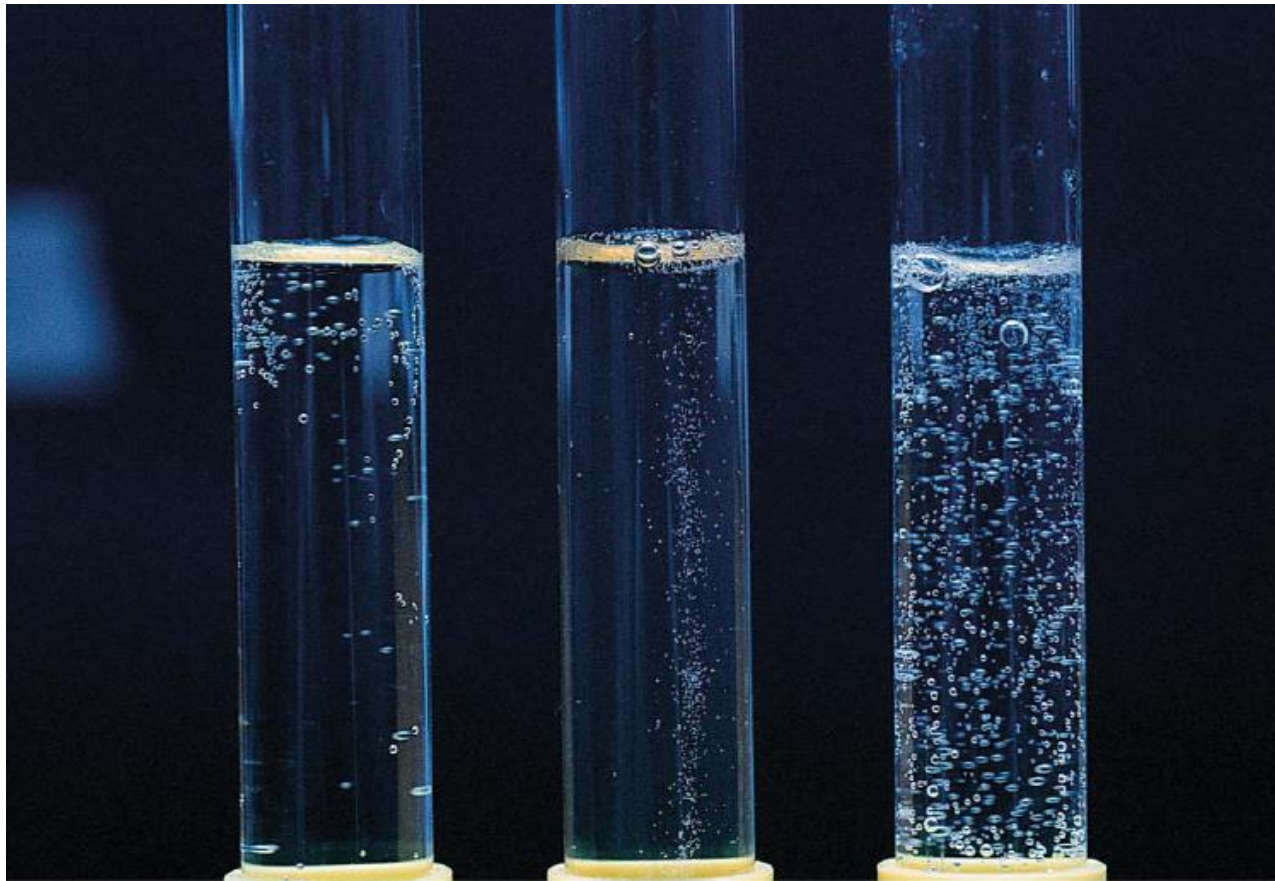
TABLE 6–5	Some Rate Enhancements Produced by Enzymes
Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

Encimi - katalaza

Katalaza je encim, ki ga najdemo v skoraj vseh organizmih, ki živijo v prisotnosti kisika. Vsebuje **hem** kot prostetično skupino. Katalizira reakcijo:



3 % raztopina H_2O_2 .
Mehurčki, ki jih vidimo
v raztopini so mehurčki
nastajajočega O_2 .



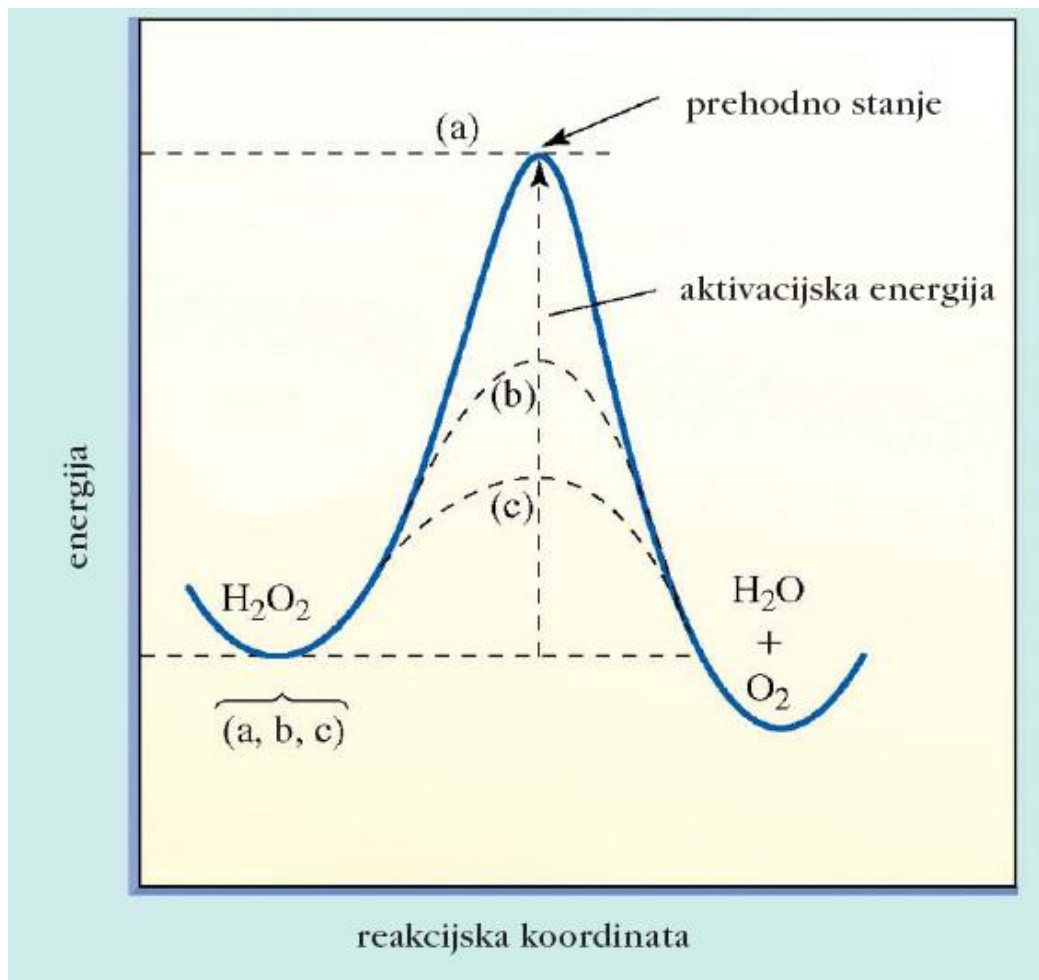
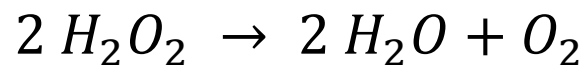
a.) brez dodatkov

b.) + Fe^{3+} sol

c.) + katalaza

Encimi - katalaza

Katalaza je encim, ki ga najdemo v skoraj vseh organizmih, ki živijo v prisotnosti kisika. Vsebuje **hem** kot prostetično skupino. Katalizira reakcijo:



Prehodno stanje je kratko živeča visoko energijska, nestabilna oblika, ki se lahko pretvori v produkte ali pa nazaj v reaktante.

- a.) brez dodatkov
- b.) + Fe^{3+} sol
- c.) + katalaza

Encimi

Reakcije lahko potečejo tudi preko večih vmesnih **intermediatov** – prehodnih metastabilnih stanj (stabilnih dlje kot 10^{-13} s), ki predstavljajo lokalne minime v energetske diagramu poteka reakcije.

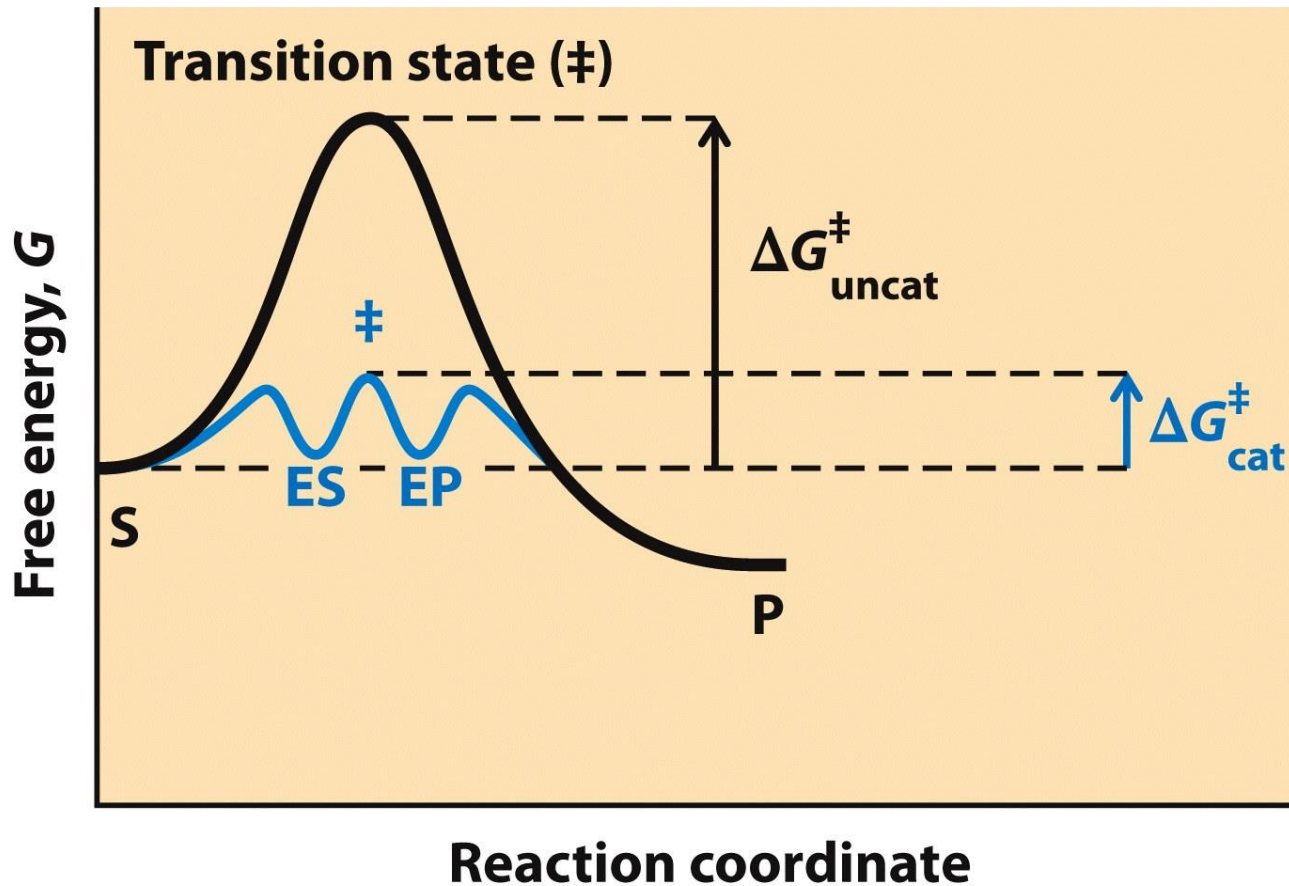
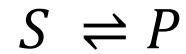


Figure 6-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Encimi

Večina encimov katalizira reakcije v obe smeri. Smer reakcije je v vsakem trenutku odvisna od razmerja koncentracij substratov in produktov.



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

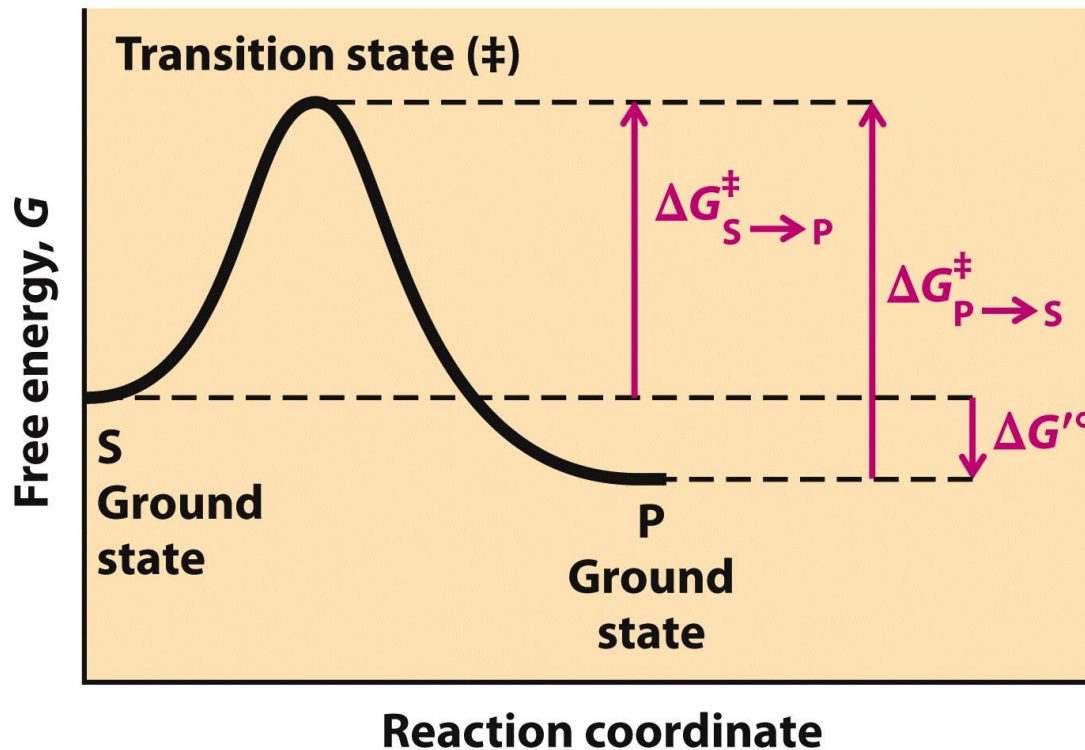


Figure 6-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Encimi - lastnosti

Lastnosti encima kot katalizatorja:

1. Poveča hitrost reakcije tako, da zniža aktivacijsko energijo
2. Med reakcijo se ne porabi in se trajno ne spremeni.
3. Ne vpliva na ravnotežje reakcije, ampak le na hitrost, s katero dosežemo ravnotežje.
4. Z reaktanti običajno tvori začasni kompleks in tako stabilizira prehodno stanje.

Encimi - lastnosti

Nekateri encimi za svoje delovanje potrebujejo še neproteinsko komponento – **kofaktor**.

Kofaktorji so lahko:

- **kovinski ioni**
- **koencimi** – šibko oz. prehodno vezane organske molekule
- **prostetične skupine** – tesno oz. stalno vezane organske molekule (npr. hem)

V primerih encimov, ki za svoje delovanje potrebujejo kofaktorje, encim z vezanim kofaktorjem imenujemo **holoencim**, proteinsko komponento brez kofaktorja pa imenujemo **apoencim**.

Encimi – poimenovanje

Encime običajno imenujemo na osnovi substrata (reaktanta) reakcije, kateremu pripnemo končnico *-aza*.

tirozinaza – oksidacija tirozina

celulaza – hidroliza celuloze

nitrogenaza – fiksacija dušika (pretvorbo N_2 v NH_3)

Komisija za encime (EC) pri IUBMB teži k sistematičnem poimenovanju encimov, tako da bi vsak encim poimenovali glede na reakcijo, ki jo katalizira. Kljub temu so v uporabi še mnoga stara trivialna imena, zlasti v primerih ko je težko definirati substrate in/ali produkte reakcije ali pa so sistematična poimenovanja „nerodna“. Nekaj pogostih trivialnih imen:

katalaza – razgradnja peroksida

tripsin – hidroliza proteinov (peptidaza oz. proteaza)

pepsin – peptidaza iz želodca

katepsin – peptidaza iz lizosoma

Encimi - klasifikacija

EC komisija vsak encim klasificira na osnovi kemijske reakcije, ki jo katalizira. Klasifikacija poteka na štirih nivojih (oblika zapisa 1.1.1.1), od katerih vsak naslednji bolj natančno opiše katalizirano reakcijo.

Primer z wikipedije:

Every enzyme code consists of the letters "EC" followed by four numbers separated by periods. Those numbers represent a progressively finer classification of the enzyme.

For example, the [tripeptide aminopeptidases](#) have the code "EC 3.4.11.4", whose components indicate the following groups of enzymes:

- *EC 3* enzymes are [hydrolases](#) (enzymes that use [water](#) to break up some other molecule)
- *EC 3.4* are hydrolases that act on [peptide bonds](#)
- *EC 3.4.11* are those hydrolases that cleave off the amino-terminal [amino acid](#) from a [polypeptide](#)
- *EC 3.4.11.4* are those that cleave off the amino-terminal end from a [tripeptide](#)

Encimi – razredi encimov

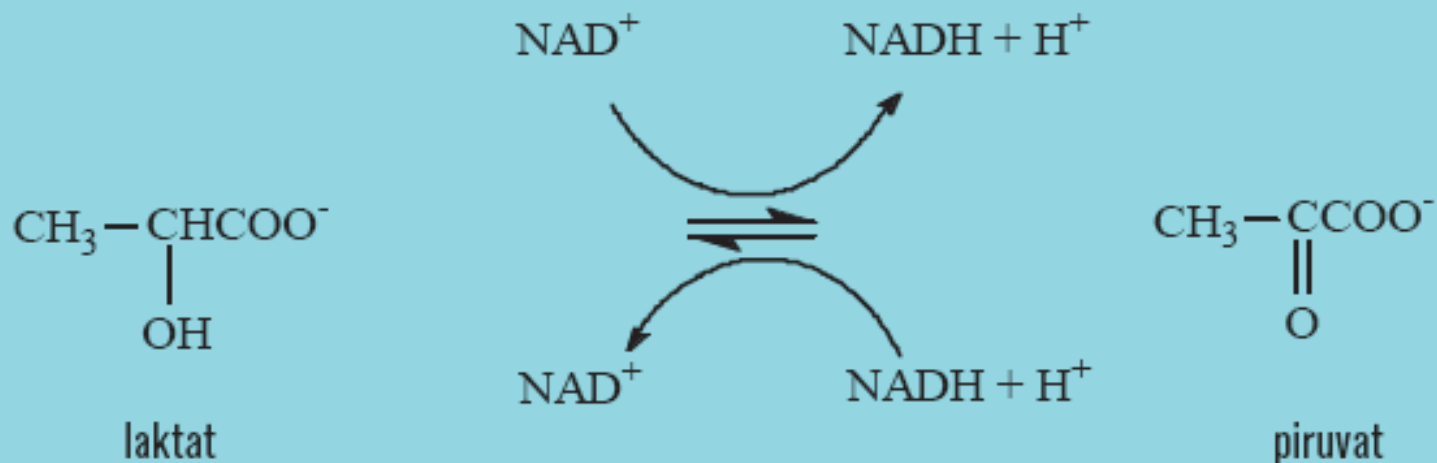
Poznamo šest razredov encimskih reakcij:

klasifikacijsko število	razred encimov	vrsta reakcije, ki jo katalizirajo
1	oksidoreduktaze	prenos elektronov, navadno v obliki hidridnih ionov ali vodikovih atomov
2	transferaze	prenos funkcionalnih skupin z ene molekule na drugo
3	hidrolaze	razcep vezi s hidrolizo
4	liaze	nastanek dvojnih vezi z odvzemom skupin ali adicija skupin na dvojne vezi
5	izomeraze	pretvorba enega izomera v drugega s prenosom skupin znotraj molekule
6	ligaze	z razgradnjo ATP sklopljena tvorba vezi C-C, C-S, C-O in C-N

Encimi – oksidoreduktaze

laktat dehidrogenaza

oksidoreduktaza



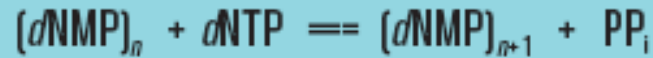
trivialno ime: laktat-dehidrogenaza

sistematično ime: L-laktat: NAD^+ -oksidoreduktaza

klasifikacijska številka: 1.1.2.3

Encimi – transferaze

DNA polimeraza



$[dNMP]_n$ = DNA z n nukleotidi

$[dNMP]_{n+1}$ = DNA z $n+1$ nukleotidi

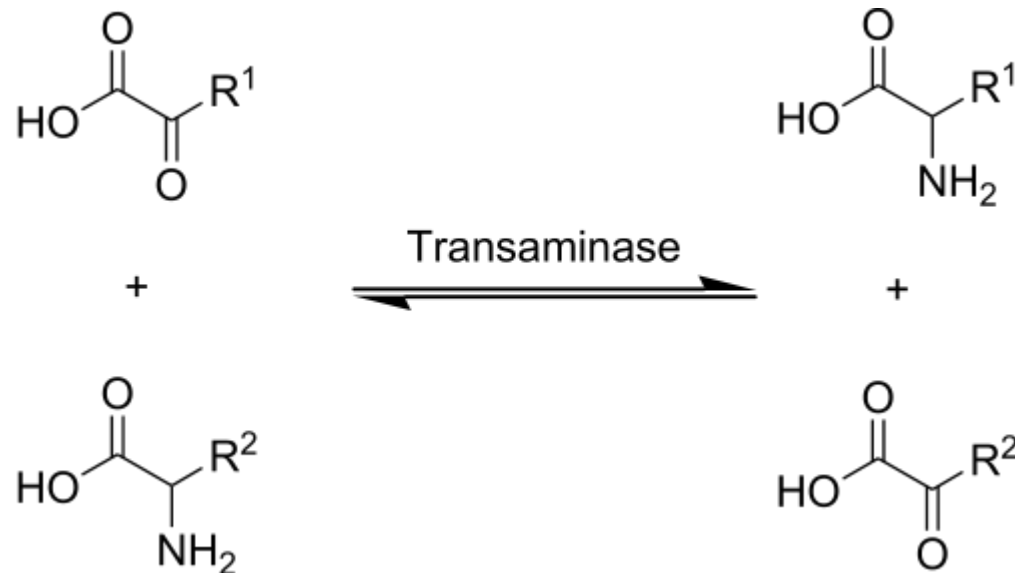
PP_i = pirofosfat

trivialno ime: DNA-polimeraza

sistematično ime: deksinukleozidtrifosfat: DNA-deksinukleotidiltransferaza, ki jo usmerja DNA

klasifikacijska številka: 2.7.7.7

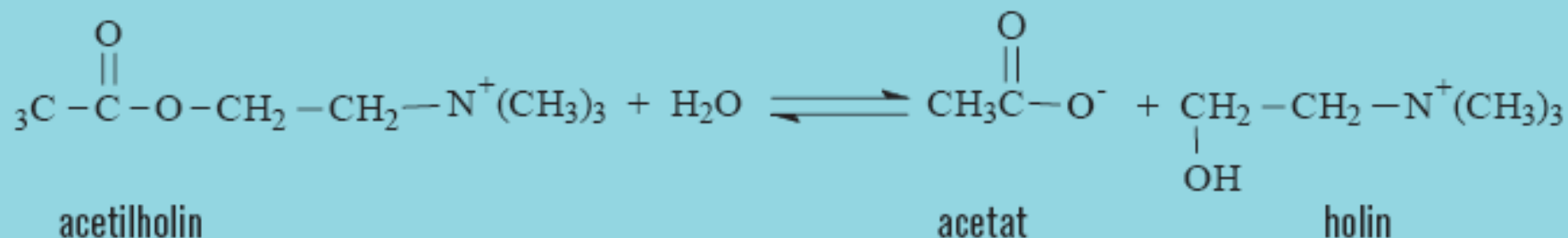
transaminaza



Encimi – hidrolaze

acetilholinesteraza

hidrolaza



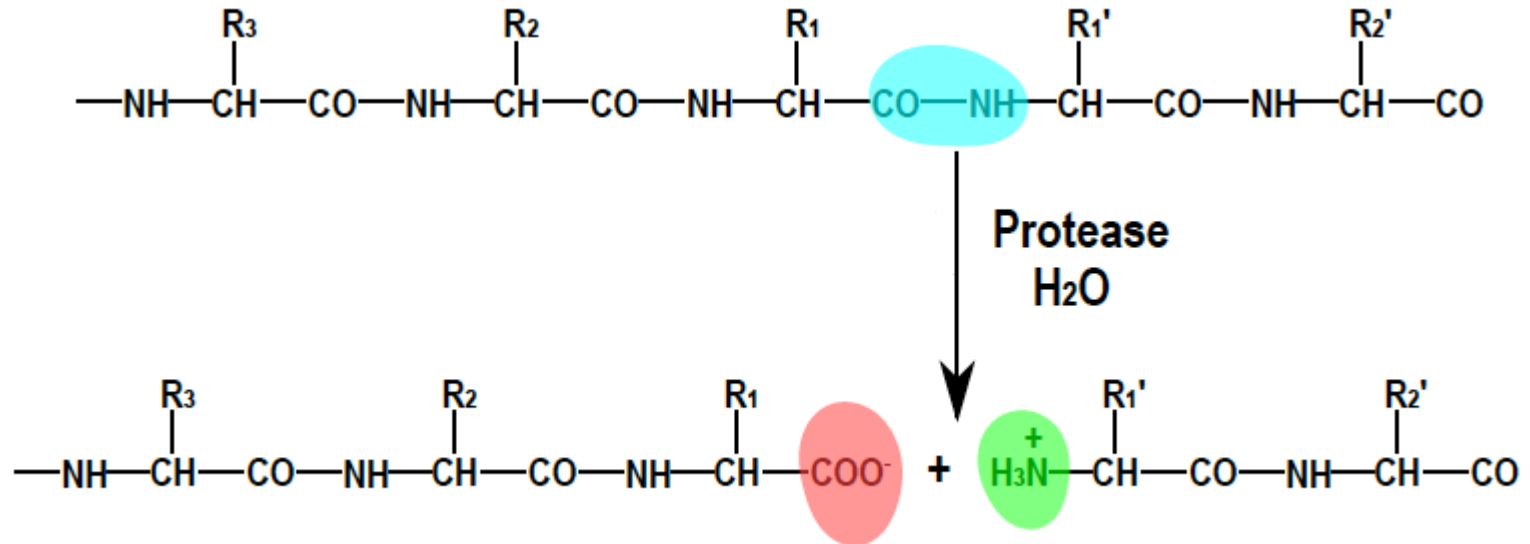
trivialno ime: acetilholinesteraza

sistematično ime: acetilholin-acetilhidrolaza

klasifikacijska številka: 3.1.1.7

Encimi – hidrolaze

peptidaze
(proteaze)

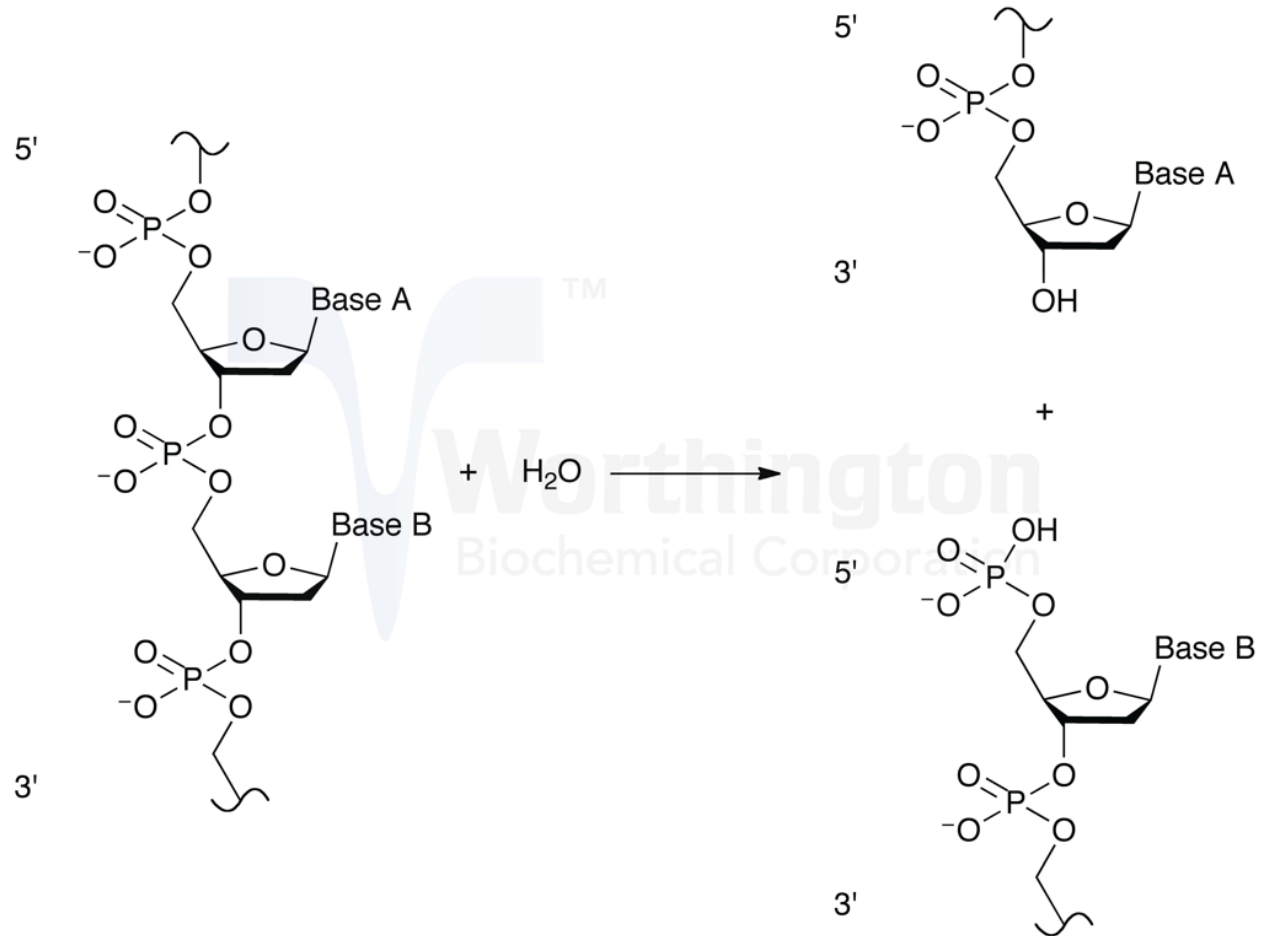


<http://www.intechopen.com/source/html/42100/media/image4.png>

Encimi – hidrolaze

nukleaze

(DNaze, Rnaze)



Deoxyribonucleic Acid

5'-Phosphate nucleotides

Encimi – liaze

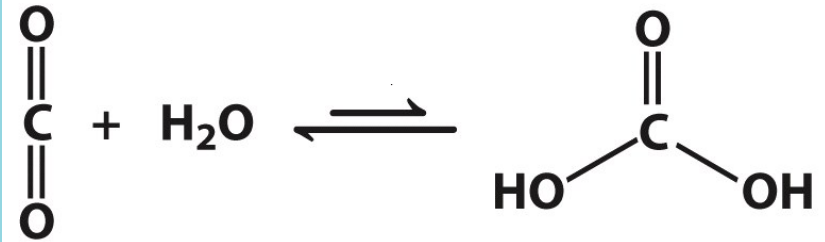
karbonska anhidraza

liaza

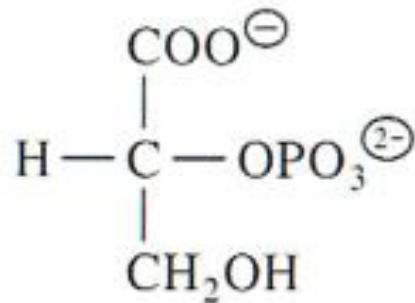


ogljikova kislina

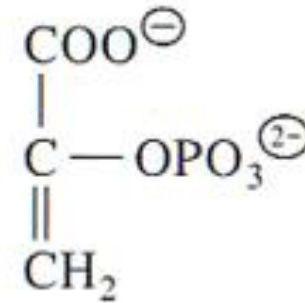
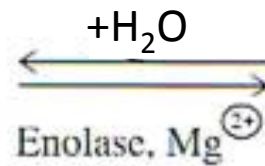
trivialno ime: karboanhidraza
sistematično ime: karbonat-hidroliaza
klasifikacijska številka: 4.2.1.1



enolaza



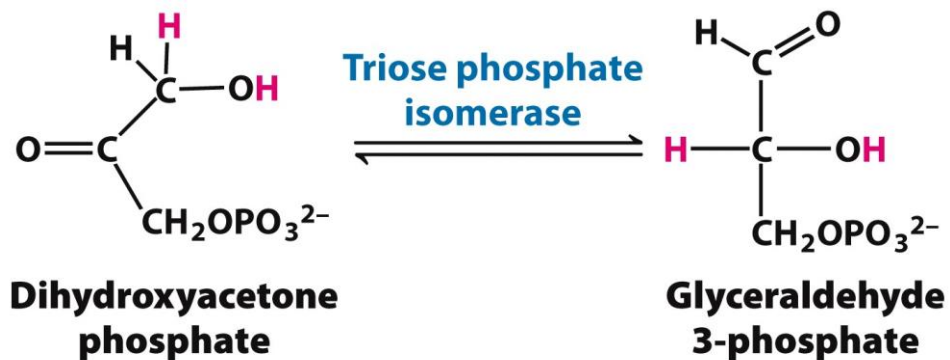
2-Phosphoglycerate



Phosphoenolpyruvate

Encimi – izomeraze

triozafosfat izomeraza



Unnumbered 16 p458c
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

trivialno ime: triozafosfat-izomeraza

sistematično ime: D-gliceraldehid-3-fosfat-ketoizomeraza

klasifikacijska številka: 5.3.1.1

Encimi – ligaze

piruvat karboksilaza

ligaza



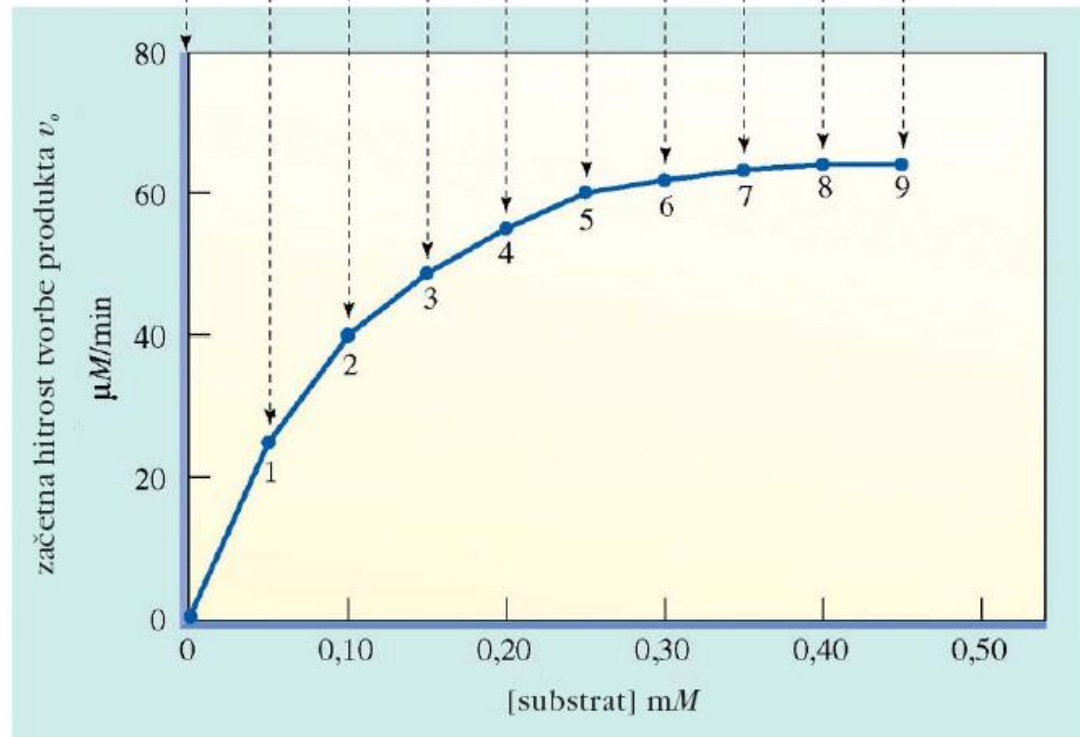
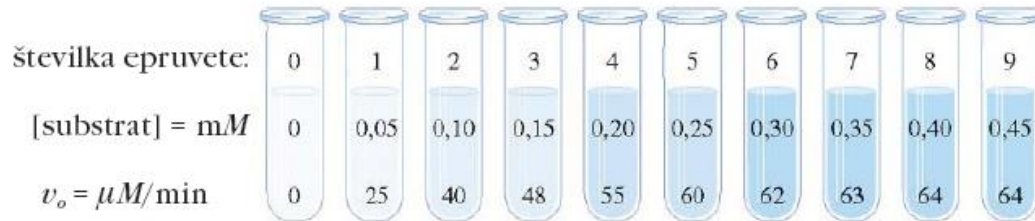
trivialno ime: piruvat-karboksilaza

sistematično ime: piruvat: CO₂-ligaza (ob sproščanju ADP)

klasifikacijska številka: 6.4.1.1

Kinetične lastnosti encimov

Encimi imajo v primerjavi z nebiološkimi katalizatorji nekatere posebne kinetične lastnosti. Najenostavneje njihove kinetične lastnosti zasledujemo v sistemu, kjer uporabimo koncentracije encimov, ki so bistveno nižje od koncentracij substratov. Pod temi pogoji izmerimo začetno hitrost reakcije v_0 , ki je enaka hitrosti razgradnje substratov oz. nastajanja produktov.



Hitrost reakcije se z naraščanjem koncentracije substrata približuje asimptoti. Pride do nasičenja encima s substratom.

Kinetične lastnosti encimov

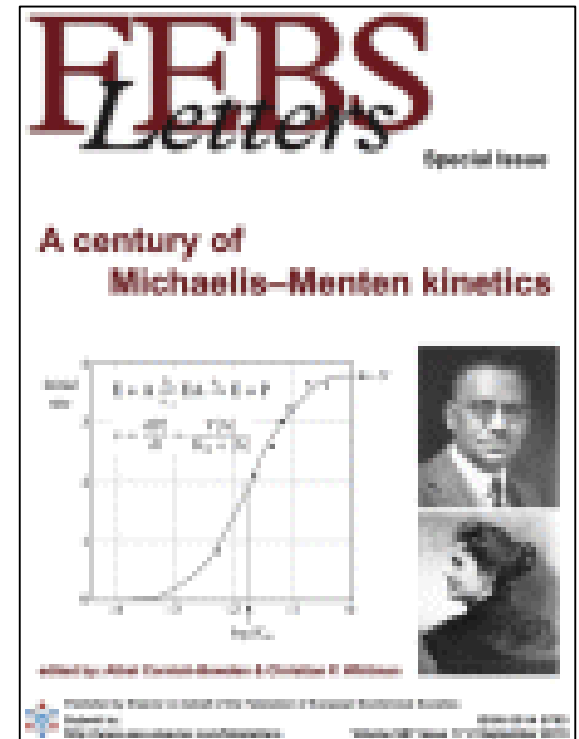
Najenostavnejši sistem encimsko kataliziranih reakcij lahko opišemo z **Michaelis-Mentenovo enačbo**.



Leonor Michaelis
(1875-1949)



Maud Menten
(1879-1960)



Michaelis-Mentenova enačba

Najenostavnejši sistem encimsko kataliziranih reakcij lahko opišemo z **Michaelis-Mentenovo enačbo**. Reakcijsko shemo za ta sistem zapišemo v obliki:



ES ... kompleks encim-substrat

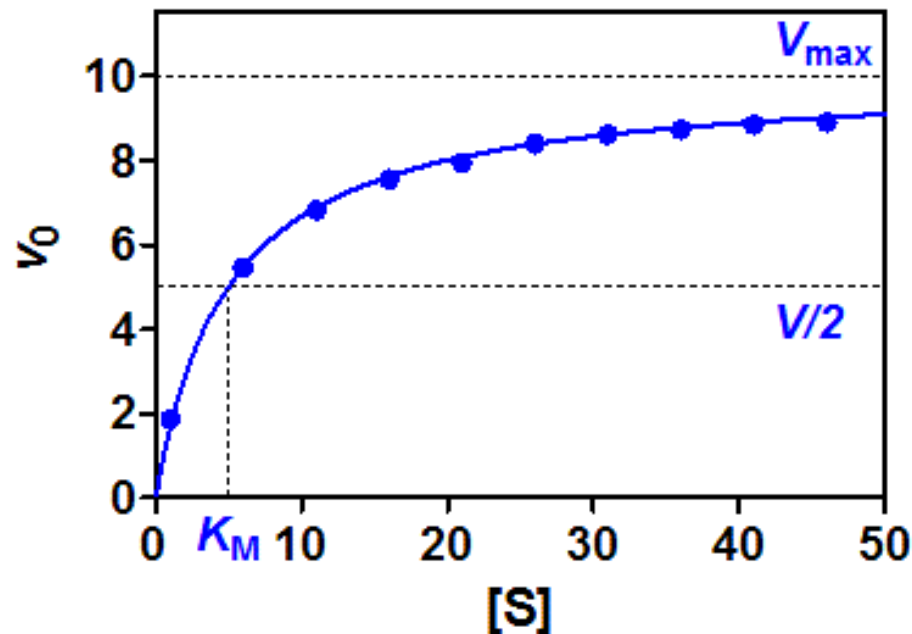
Začetno hitrost reakcije opišemo z enačbo:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Kjer je V_{max} mejna hitrost, K_M pa Michaelisova konstanta.

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

K_M nam pove **afiniteto** encima za substrat.



Michaelis-Mentenova enačba

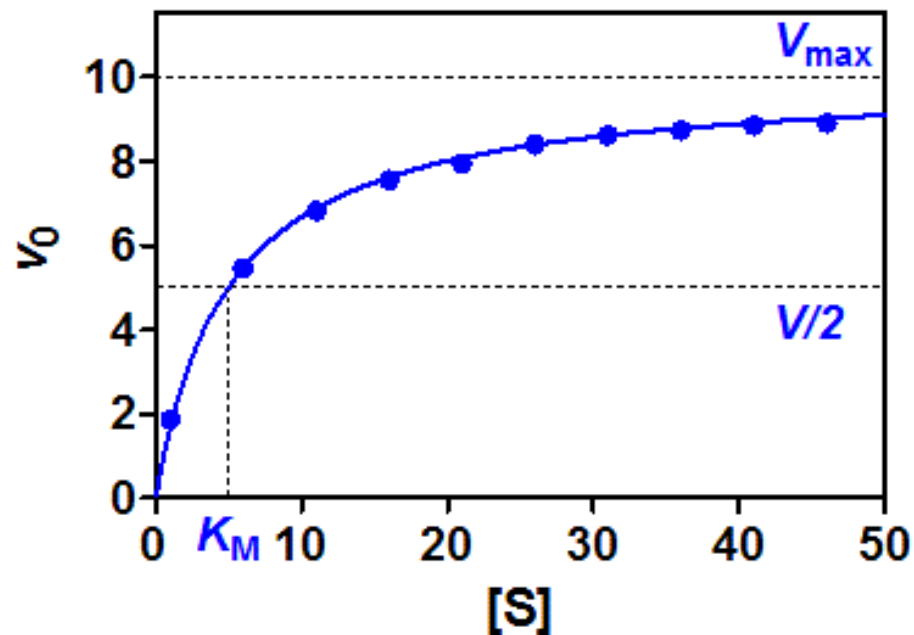


$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

$$[S] \ll K_M \Rightarrow v_0 = \frac{V_{max}}{K_M} [S]$$

$$[S] = K_M \Rightarrow v_0 = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{max}}{2}$$

$$[S] \gg K_M \Rightarrow v_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S]} = V_{max}$$



Iz vrednosti V_{max} lahko določimo še vrednost pretvorbene števila k_3 (k_{cat}) po formuli:

$$V_{max} = k_3[E]_T$$

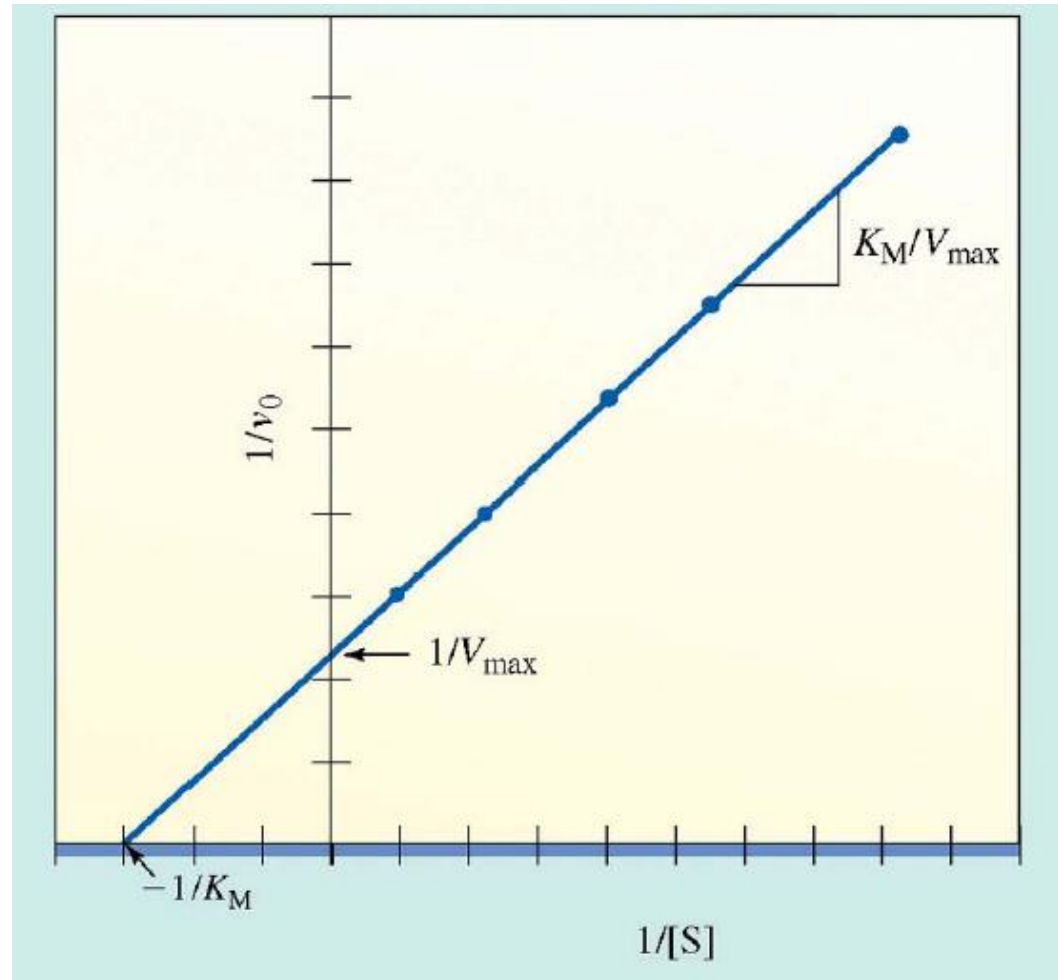
kjer je $[E]_T$ celokupna koncentracija encima v reakcijski zmesi.

Michaelis-Mentenova enačba

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Včasih so se za analizo encimske kinetike uporabljale metode za linearizacijo krivulj. Ena najpopularnejših je bil Lineweaver-Burkov diagram ($1/v_0$ v odvisnosti od $1/[S]$). Te metode so bile statistično nezanesljive in so danes zastarele.

Primeri vrednosti K_M za različne encime in njihove substrate

encim	substrat	K_M (mM)
heksokinaza (iz možganov)	ATP	0,4
	D-glukoza	0,05
	D-fruktoza	1,5
karboanhidraza	HCO_3^-	9
kimotripsin	gliciltirozinilglicin	108
	N-benzoiltirozinamid	2,5
β -galaktozidaza	laktoza	4,0
penicilinaza	benzilpenicilin	0,050
piruvat-karboksilaza	ATP	0,060
	piruvat	0,40
	HCO_3^-	1,0
ribuloza-1,5-bisfosfat-karboksilaza (rubisco)	ribuloza-1,5-bisfosfat	0,028
	CO_2	0,009
ribuloza-1,5-bisfosfat-oksigenaza (rubisco)	ribuloza-1,5-bisfosfat	0,028
	CO_2	0,535

Primeri vrednosti k_3 za različne encime in njihove substrate

encim	substrat	k_3 [s^{-1}]
katalaza	H_2O_2	40 000 000
karboanhidraza	HCO_3^-	400 000
acetilholin-esteraza	acetilholin	25 000
penicilinaza	benzilpenicilin	2000
laktat-dehidrogenaza	laktat	1000
kimotripsin	gliciltirozinilglicin	100
DNA-polimeraza	DNA	15
ribuloza-1,5-bisfosfat-karboksilaza	ribuloza-1,5-bisfosfat + CO_2	3,3
ribuloza-1,5-bisfosfat-oksigenaza	ribuloza-1,5-bisfosfat + O_2	2,4

Konstanta specifičnosti

Če poznamo vrednosti K_M in k_3 za par encim-substrat lahko izračunamo t.i. konstanto specifičnosti, ki velja kot merilo za celokupno učinkovitost encimske katalize.

$$\text{konstanta specifičnosti} = \frac{k_3}{K_M} \quad (M^{-1}s^{-1})$$

Če bi vsak trk encima in substrata privedel do pretvorbe substrata v produkt, bi bila hitrost reakcije omejena le s hitrostjo difuzije molekul v raztopini, ki je za take molekule v območju med 10^8 in $10^9 M^{-1} s^{-1}$. Vrednosti k_3/K_M za nekatere encime se približajo tem vrednostim. Imenujemo jih *popolni encimi*.

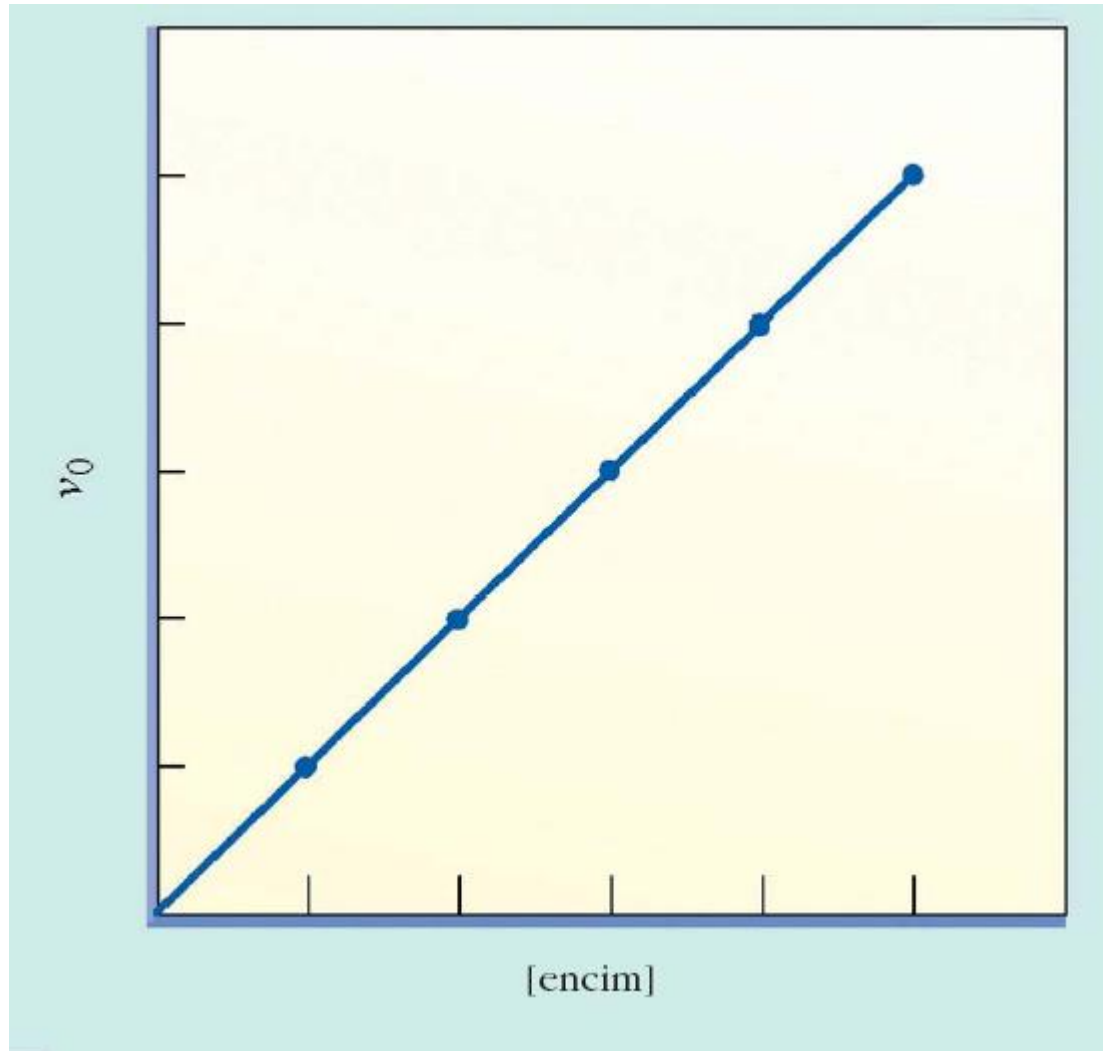
TABLE 6–8

Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 M^{-1}s^{-1}$)

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO ₂	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO ₃ ⁻	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H ₂ O ₂	4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β-Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

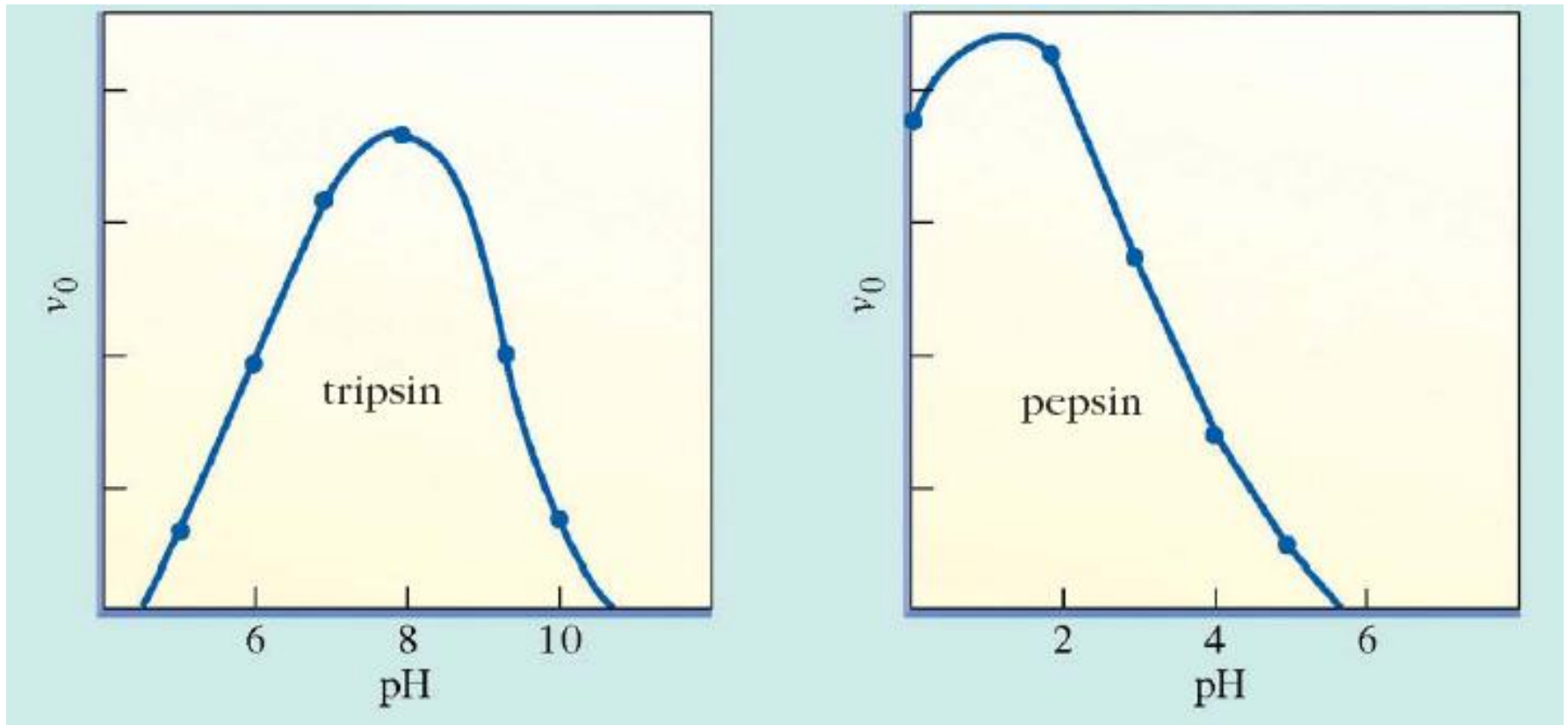
Značilnosti encimskih reakcij

Odvisnost hitrosti reakcije od koncentracije encima



Značilnosti encimskih reakcij

Odvisnost hitrosti reakcije od pH

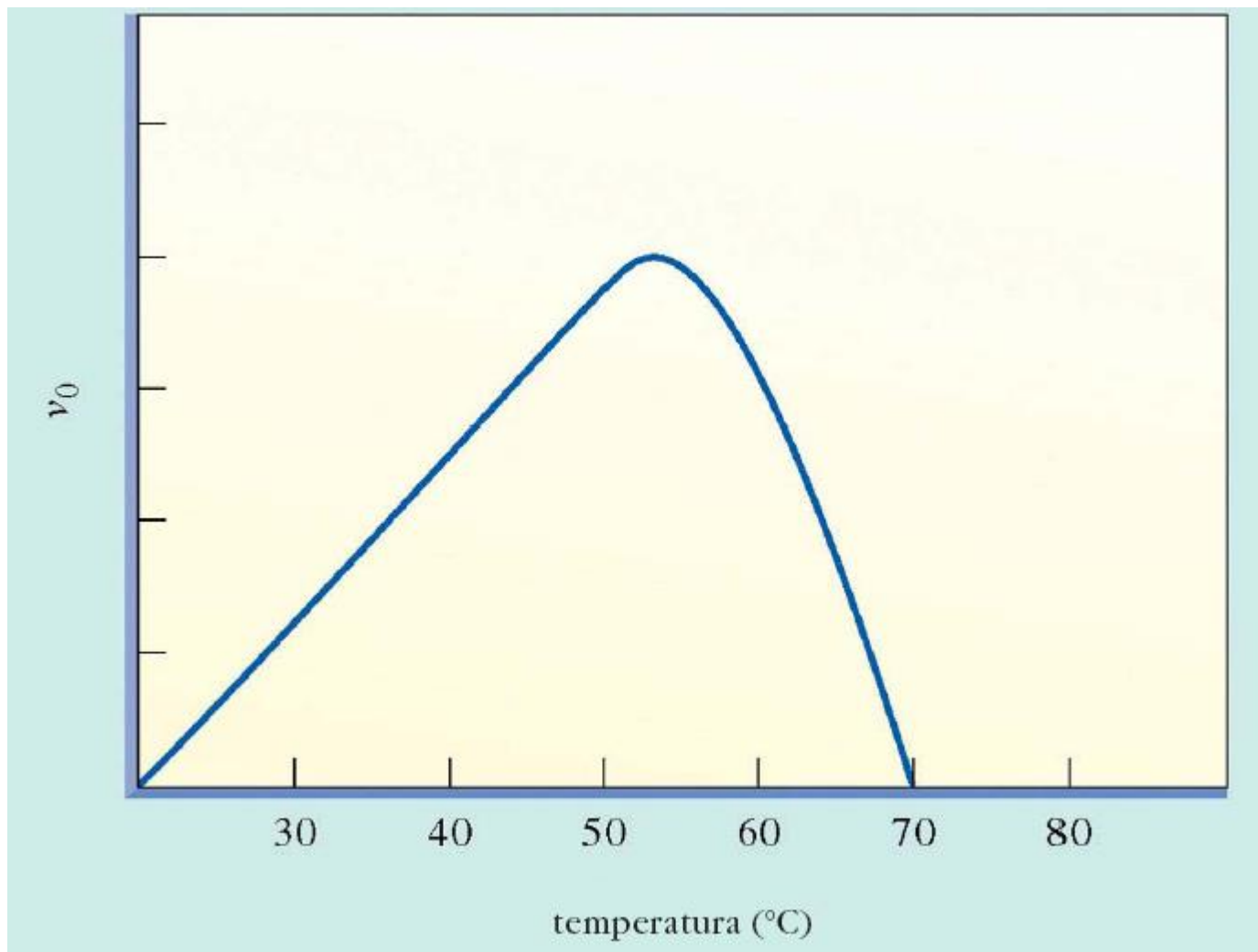


Trypsin – v dvanajstniku

Pepsin – v želodcu

Značilnosti encimskih reakcij

Odvisnost hitrosti reakcije od temperature

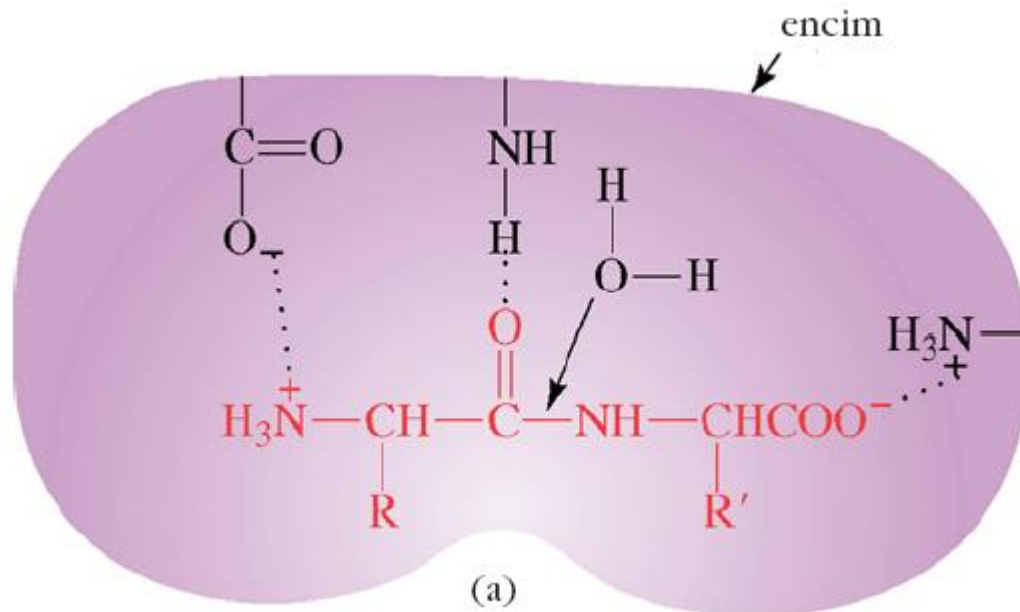


Delovanje encimov – aktivno mesto

Kataliza kemijske reakcije poteka v mestu encima, ki mu rečemo **aktivno mesto** in ima naslednje lastnosti:

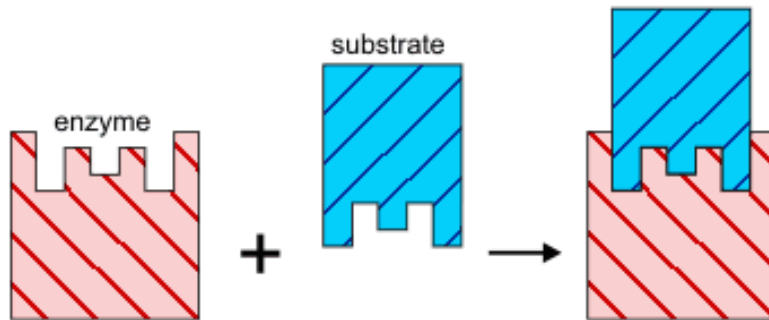
1. Je **specifično** – prepozna le nekatere molekule – substrate. Specifičnost je lahko absolutna – prepozna le točno določen substrat, ali skupinska – prepozna le substrate določenega tipa (npr. peptide, alkohole, itd.)
2. Aktivno mesto predstavlja malo področje v okviru celotne strukture proteina.
3. Substratne molekule se v aktivno mesto vežejo s šibkimi nekovalentnimi reverzibilnimi interakcijami.

Shematski primer vezave dipeptida v aktivno mesto encima preko šibkih interakcij (prikazanih s prekinjenimi črtami). Molekula vode deluje kot nukleofil, ki hidrolizira peptidno vez.



Delovanje encimov – vezava substrata v aktivno mesto

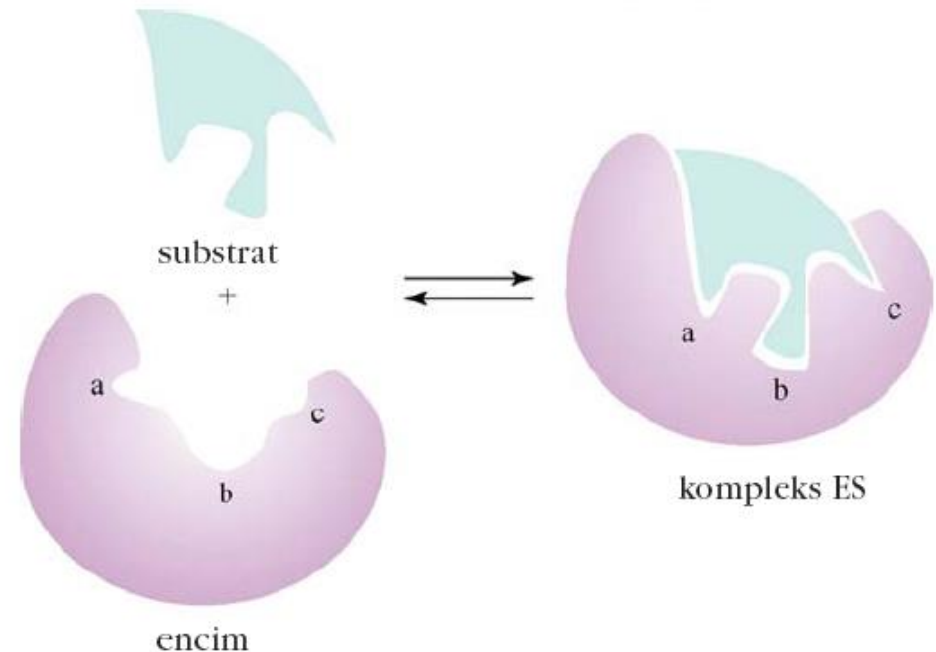
Model ključa in ključavnice



<http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/images/07aa.gif>

Aktivno mesto je že samo po sebi komplementarno strukturi substrata.

Model inducirane prilagoditve

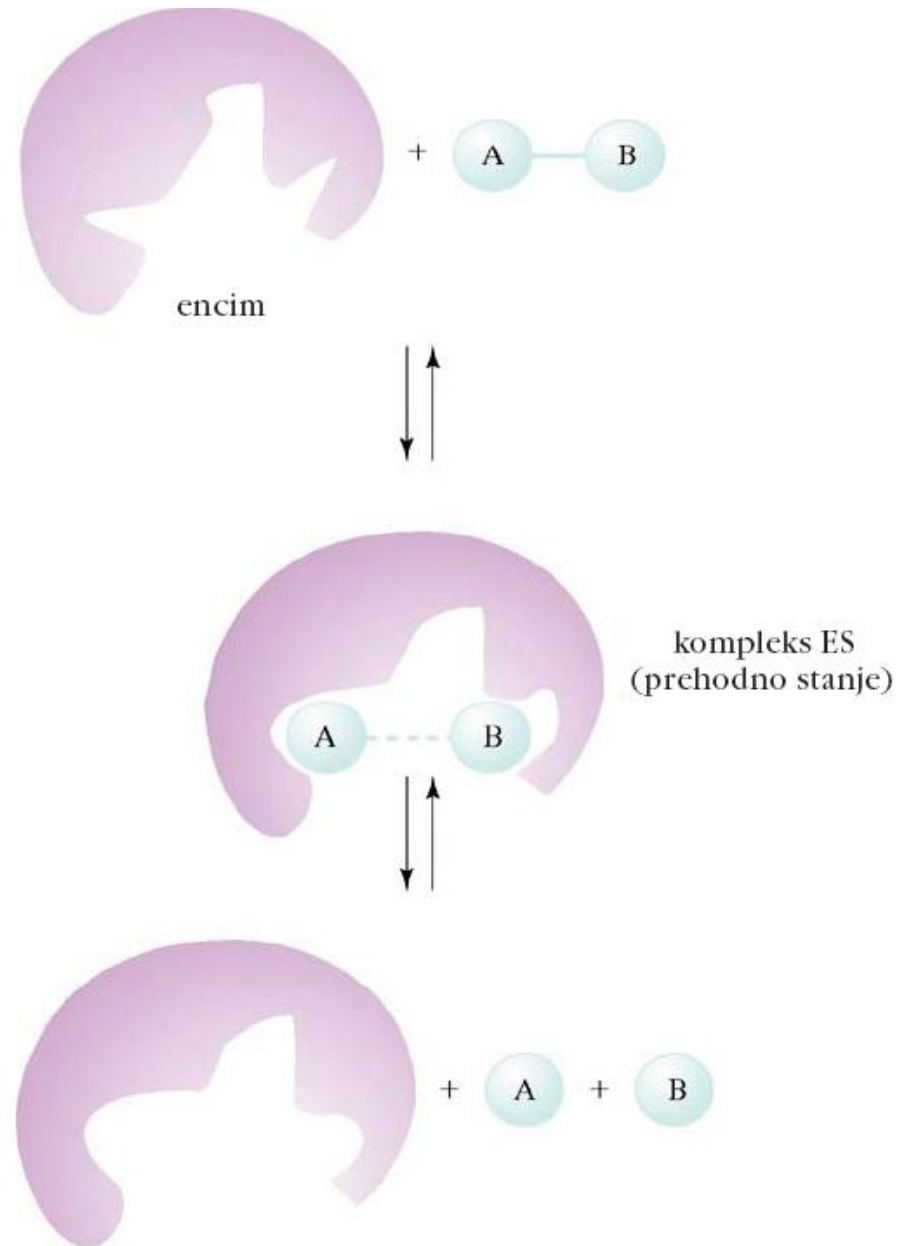


Aktivno mesto se prilagodi obliki substrata.

Delovanje encimov – vezava substrata v aktivno mesto

Model analoga prehodnega stanja

Predpostavlja da substrat ob vezavi v aktivno mesto preide v strukturo prehodnega stanja, ki se stabilizira preko interakcij z encimom.



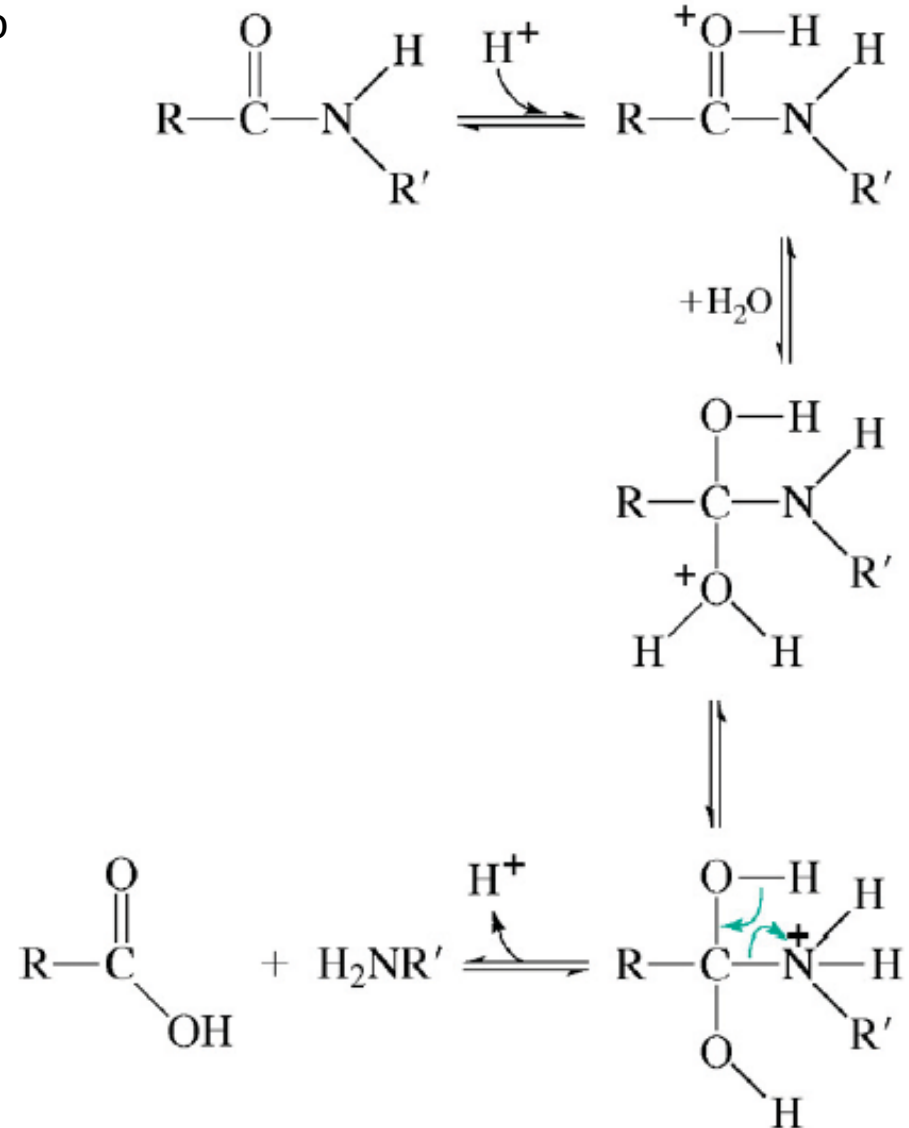
Delovanje encimov – mehanizmi encimske katalize

Kislinsko-bazna hidroliza – funkcionalne skupine ostankov v aktivnem mestu delujejo kot kisline oz. baze pri prenosu protonov.

kislina - donorji H^+ ($-NH_3^+$ in $-COOH$ skupine)

baza - akceptorji H^+ ($-NH_2$ in $-COO^-$ skupine)

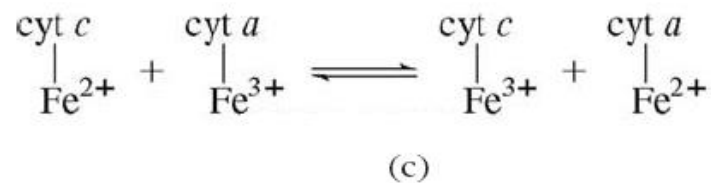
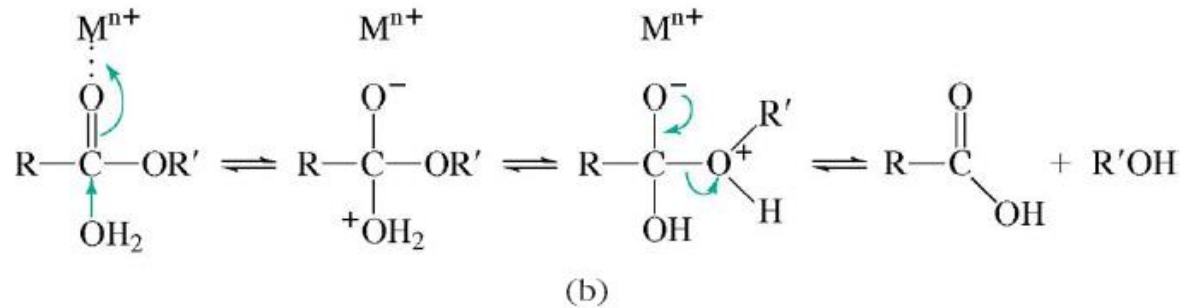
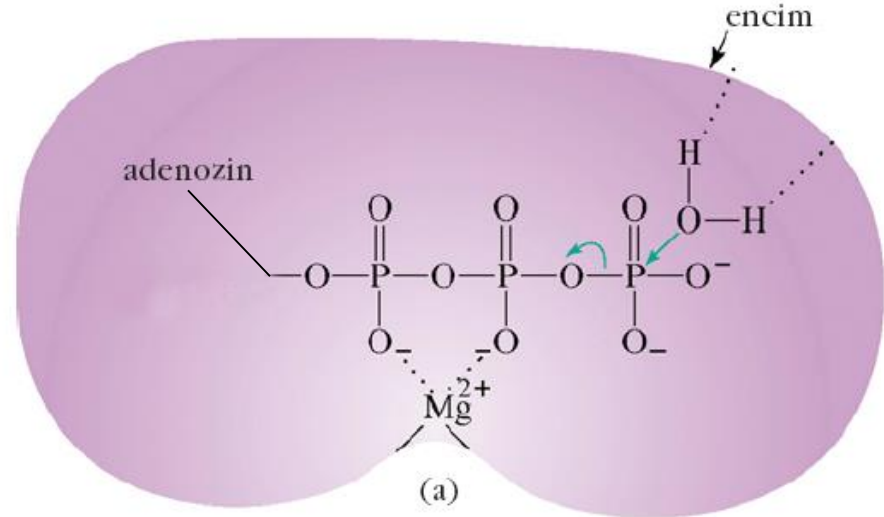
Primer: s kislino katalizirana hidroliza amidne (peptidne) vezi



Delovanje encimov – mehanizmi encimske katalize

Kataliza s kovinskim ionom:

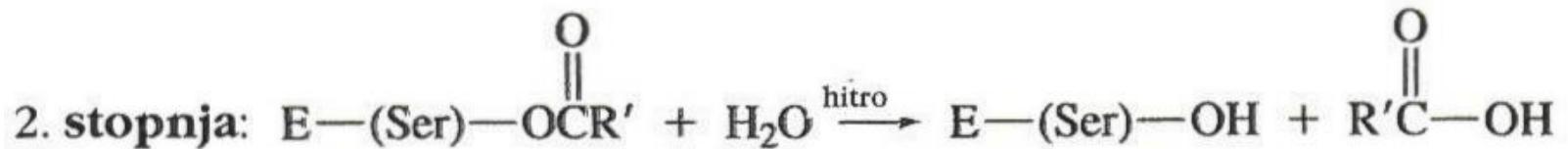
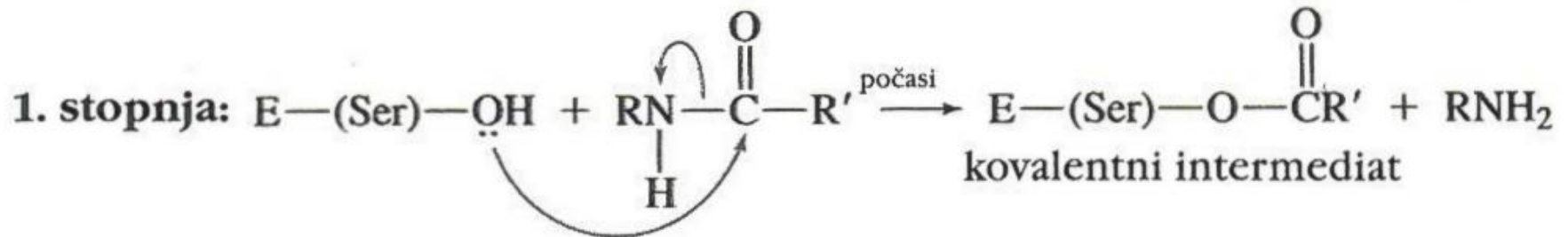
- pomaga pravilno orientirati substrat
- polarizira vez, kjer bo potekla reakcija ali stabilizira negativni naboj intermedijata
- sodeluje pri prenosu elektronov



Delovanje encimov – mehanizmi encimske katalize

Kovalentna kataliza – nukleofilna skupina na encimu s substratom tvori kovalentno povezan intermediat.

Primer: delovanje serinskih peptidaz



Encimi - lastnosti

Nekateri encimi za svoje delovanje potrebujejo še neproteinsko komponento – **kofaktor**.

Kofaktorji so lahko:

- **kovinski ioni**
- **koencimi** – šibko oz. prehodno vezane organske molekule
- **prostetične skupine** – tesno oz. stalno vezane organske molekule (npr. hem)

V primerih encimov, ki za svoje delovanje potrebujejo kofaktorje, encim z vezanim kofaktorjem imenujemo **holoencim**, proteinsko komponento brez kofaktorja pa imenujemo **apoencim**.

Kofaktorji – kovinski ioni

encim

katalaza, peroksidaza, akonitaza in citokrom-oksidaza

alkohol-dehidrogenaza, karboksipeptidaza A, karboksipeptidaza B in DNA-polimeraza

citokrom-oksidaza, protein-lizin-6-oksidaza in superoksid-dizmutaza

heksokinaza, glukoza-6-fosfataza

arginaza

piruvat-kinaza

ureaza

nitrat-reduktaza

karboanhidraza

kovinski ion

Fe^{2+} in Fe^{3+}

Zn^{2+}

Cu^{2+}

Mg^{2+}

Mn^{2+}

K^+

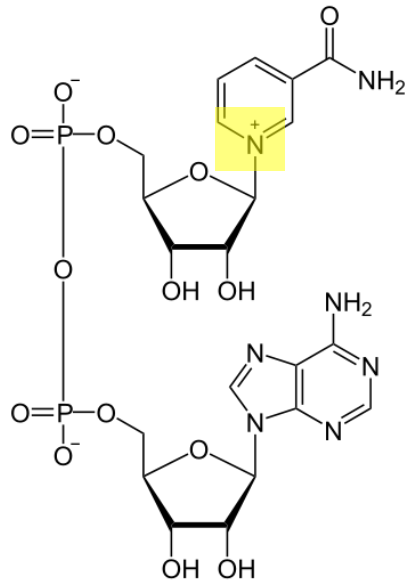
Ni^{2+}

Mo^{4+} in Mo^{6+}

Zn^{2+} , Cd^{2+}

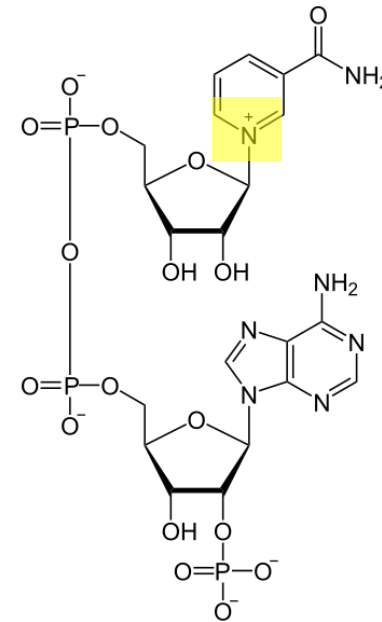
Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:



NAD⁺

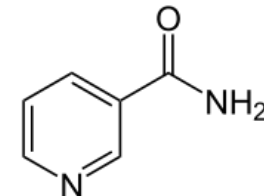
(nikotinamid adenine dinukleotid)



NADP⁺

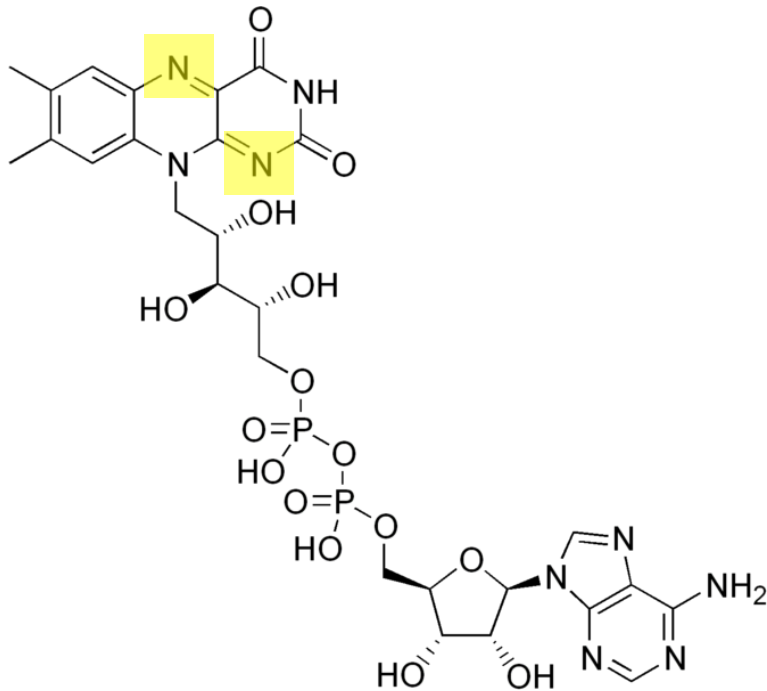
(nikotinamid adenine dinukleotid fosfat)

Sodelujeta v redoks reakcijah – NAD⁺ pretežno v katabolnih, NADP⁺ pretežno v anabolnih. Sintetizirata se iz **niacina** (nikotinamid).



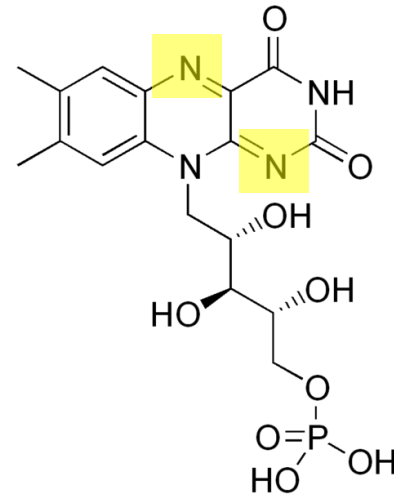
Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:



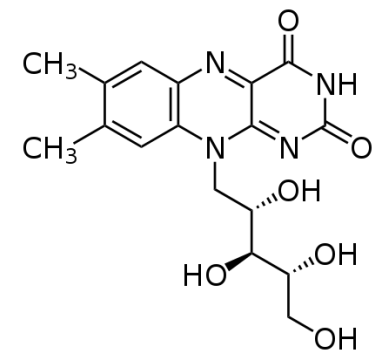
FAD

(flavin adenine dinukleotid)



FMN

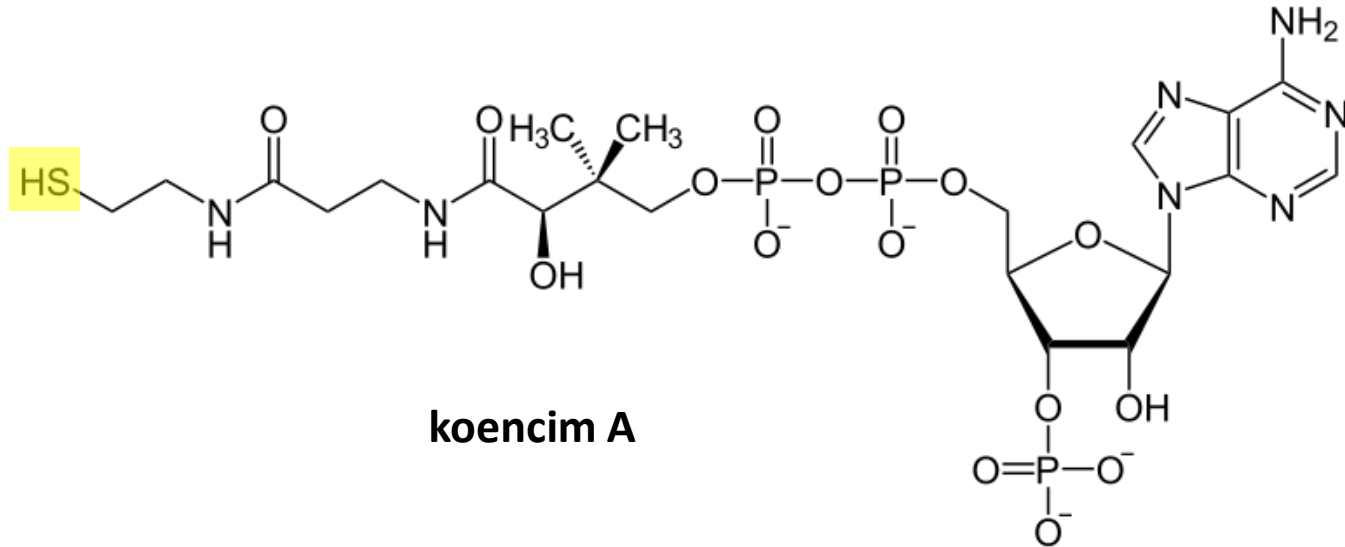
(flavin mononukleotid)



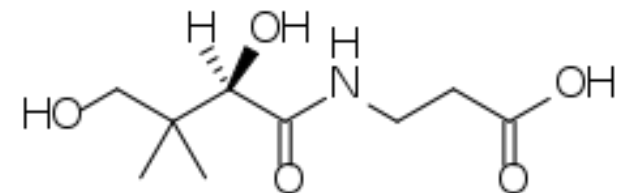
Sodelujeta v reakcijah oksidacije. Sintetizirata se iz **riboflavina** (vitamin B₂).

Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:

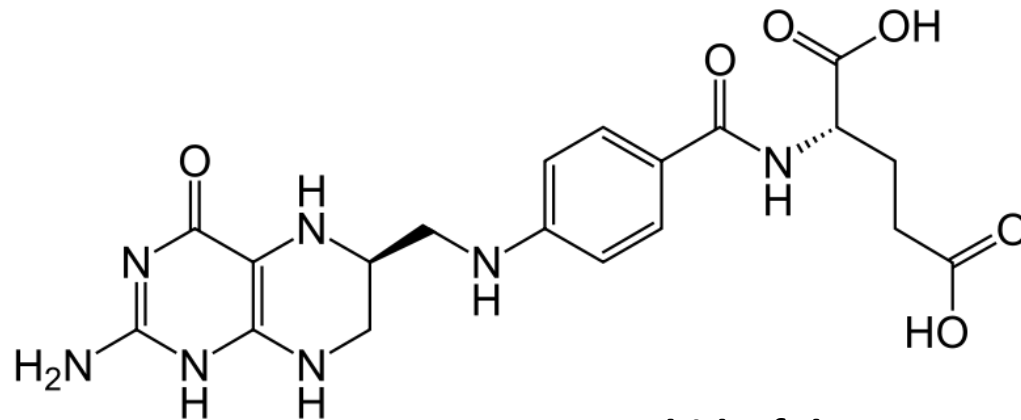


Deluje kot prenašalec vmesnih produktov v razgradnji maščobnih kislin in glukoze. Za njegovo biosintezo je potreben pantotenat (vitamin B5).



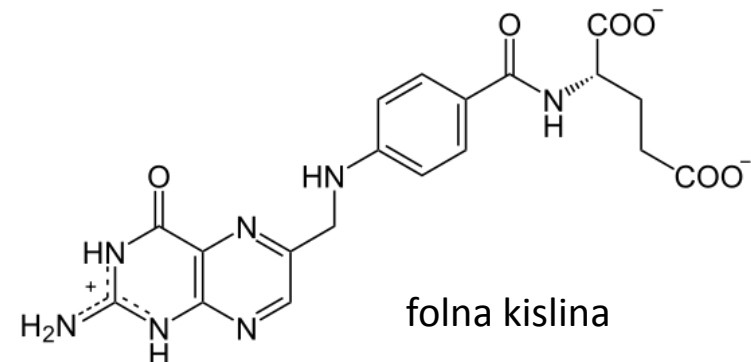
Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:



tetrahidrofolat

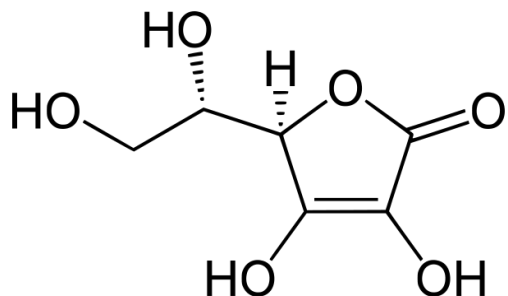
Sodeluje pri reakcijah prenosa metilnih skupin – pomemben zlasti pri sintezi DNA in RNA ter v mehanizmih preprečevanja poškodb DNA. Sintetizira se iz **folne kisline**. Zadosten vnos folne kisline je zlasti pomemben pri nosečnicah. Zaviralci biosinteze tetrahidrofolata (metotreksat) se uporabljajo za zdravljenje raka ter za sprožanje splava pri nosečnicah (npr. pri izvenmaternični nosečnosti).



folna kislina

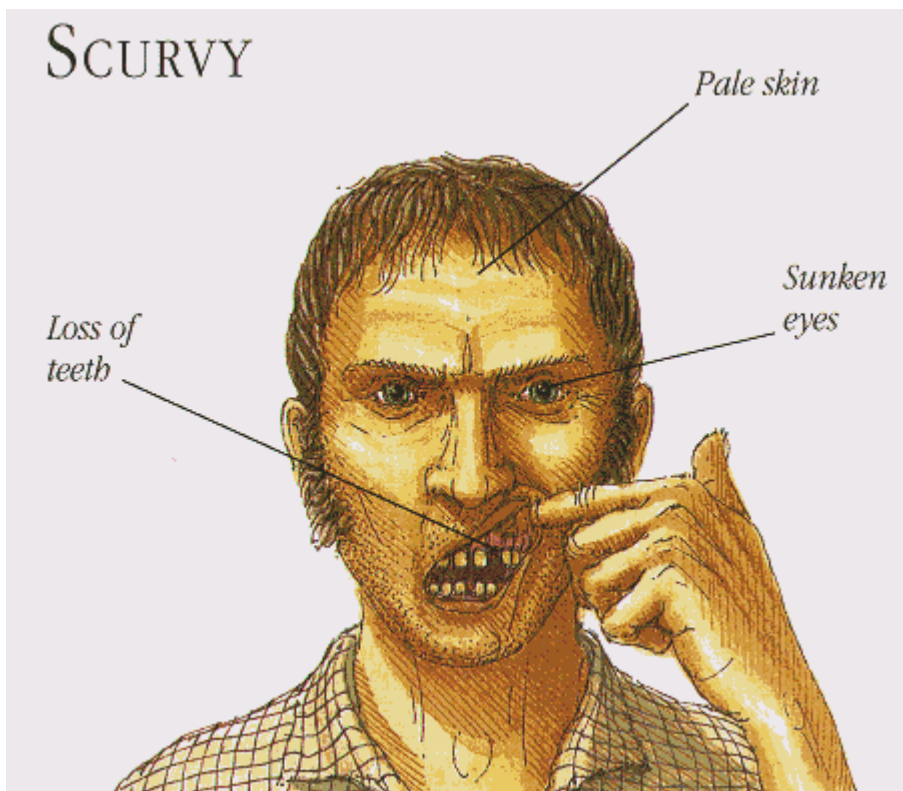
Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:



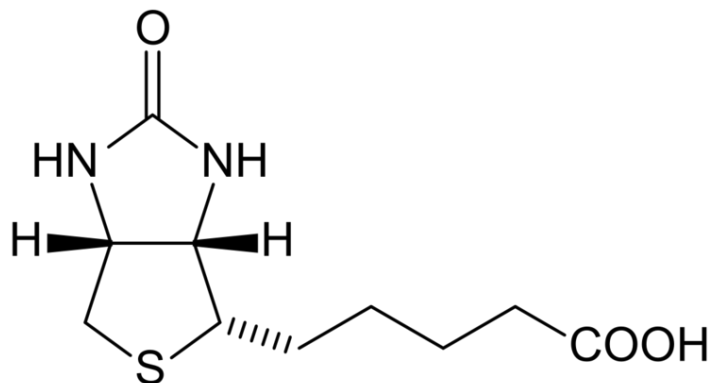
L-askorbinska kislina (vitamin C)

L-askorbinska kislina je pomemben antioksidant in koencim v reakcijah hidroksilacije prolina in lizina v kolagenu. Njeno pomanjkanje povzroča skorbut.



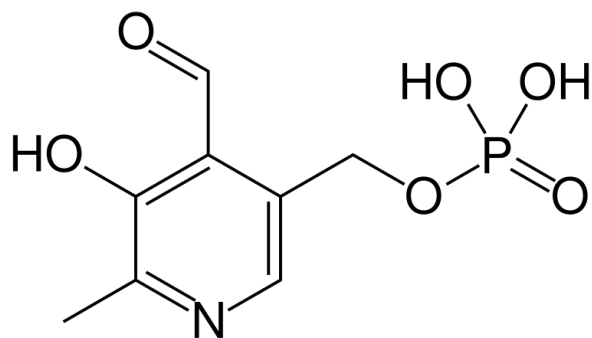
Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:



biotin (vitamin B₇, vitamin H, koencim R)

Sodeluje pri reakcijah karboksilacije (aktivacija in prenos CO₂).

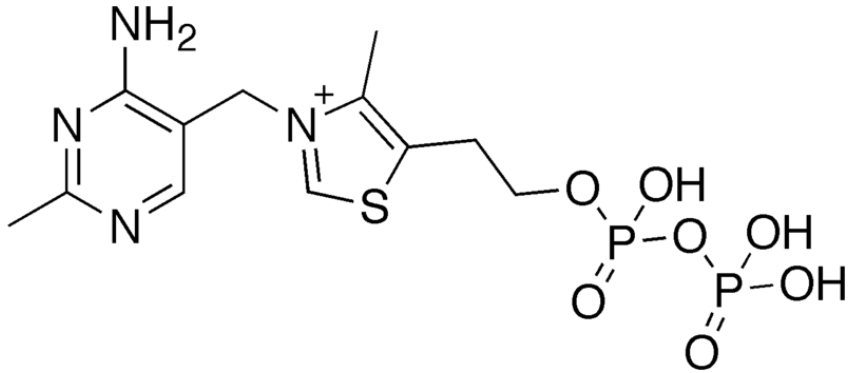


piridoksal fosfat

Sodeluje pri prenosu in amino skupin. Je aktivna oblika **vitamina B₆** (skupno ime za piridoksal, piridoksamin, piridoksin).

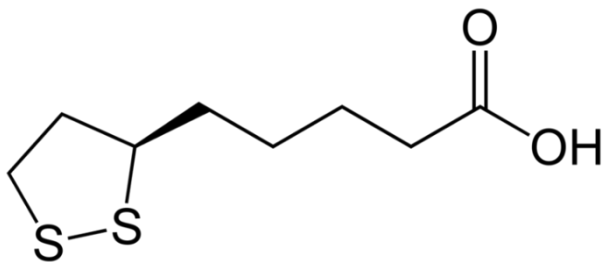
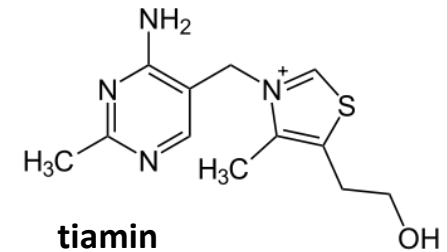
Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:



tiamin pirofosfat

Sodeluje pri reakcijah dekarboksilacije (odstranitev CO₂). Sintetizira se iz **tiamina** (vitamina B₁).

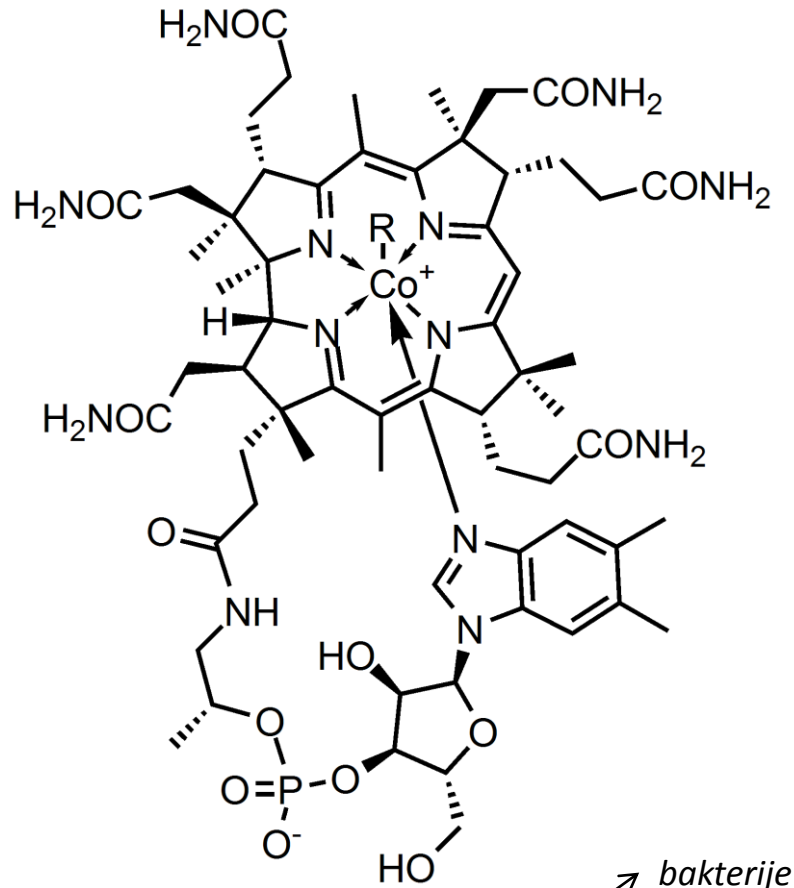


lipojska kislina

Sodeluje pri reakcijah prenosa acilnih skupin. Prekurzor ni vitamin (sintetiziramo jo sami).

Kofaktorji – organske molekule

Večino kofaktorjev ljudje sintetiziramo iz prekurzorjev, ki jih moramo zaužiti s hrano – **vitaminov**. Nekaj primerov pogostejših kofaktorjev ter njihovih prekurzorjev:



R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN

evkarionti

polsintetičen

kobalamin

Sodeluje pri prenosu metilnih skupin. Ena ključnih vlog je regeneracija THF. Drugo ime za vse različne oblike je **vitamin B₁₂**. Osnovna struktura je korinski obroč.

Zaužijemo ga s hrano živalskega izvora ali prehranskimi nadomestki. Pomanjkanje kobalamina se ponavadi izrazi kot pomanjkanje folata.

Uporablja se za zdravljenje zastrupitev s cianidom.

Inhibicija encimov

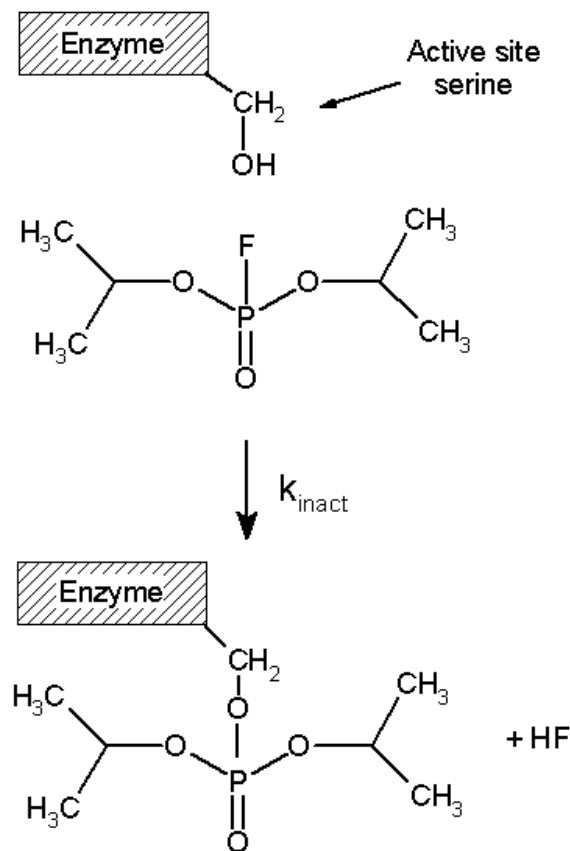
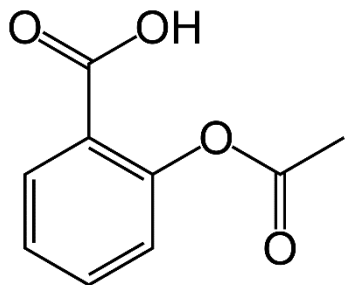
Inhibitorji so molekule, ki se vežejo na encim in s tem zavrejo njegovo delovanje.

V osnovi inhibitorje razdelimo na **ireverzibilne** in **reverzibilne**.

Ireverzibilni inhibitorji (inaktivatorji) tvorijo kovalentno ali zelo močno nekovalentno vez z encimom in ga s tem trajno onesposobijo.

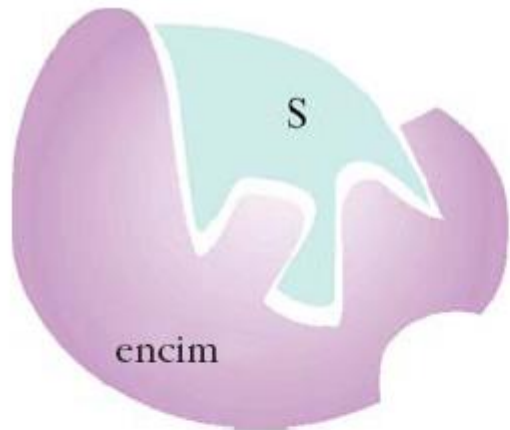
Primer: diisopropil fluorofosfat je živčni strup, ki deluje kot ireverzibilni inhibitor encima acetilholinesteraza (desno).

Aspirin (acetilsalicilna kislina, spodaj) deluje kot ireverzibilni inhibitor encima ciklooksigenaza.



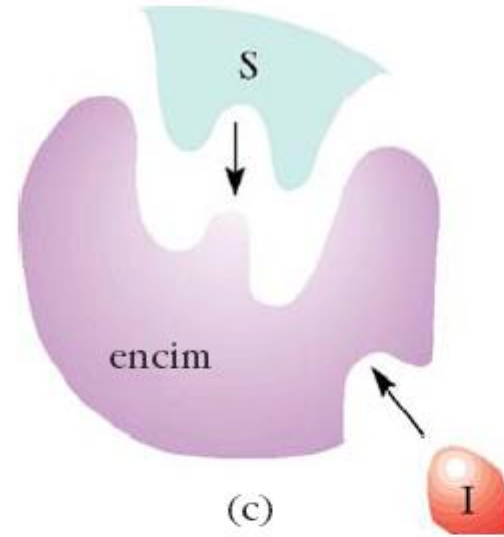
Reverzibilni inhibitorji

Reverzibilni inhibitorji se vežejo na encim, a lahko od njega tudi oddisociirajo. Prisotno je ravnotežje med neinhibirano in inhibirano obliko encima.



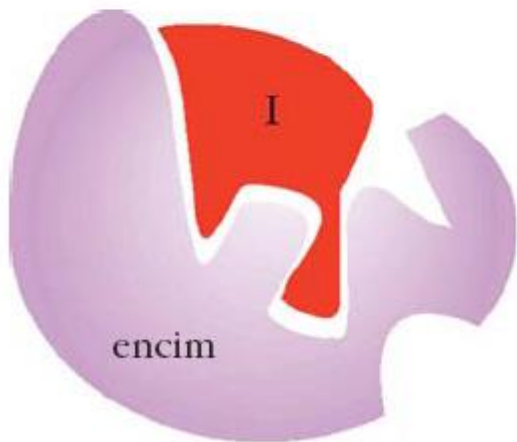
(a)

kompleks ES
(brez inhibitorja)



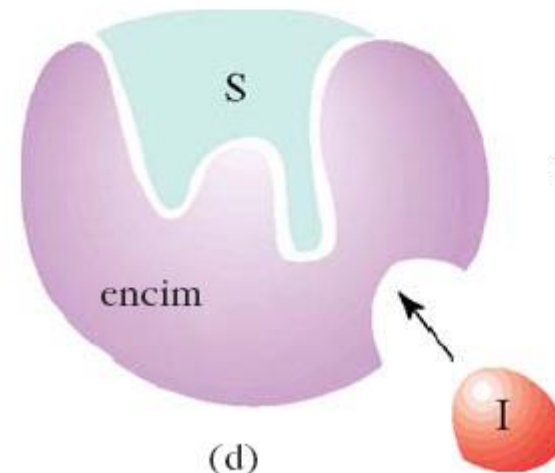
(c)

~~nekompetitivni~~
mešani



(b)

kompetitivni

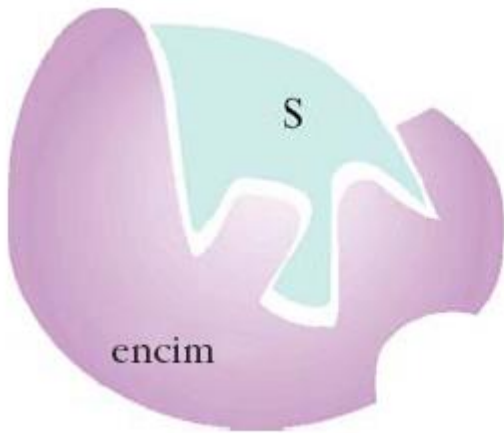


(d)

akompetitivni

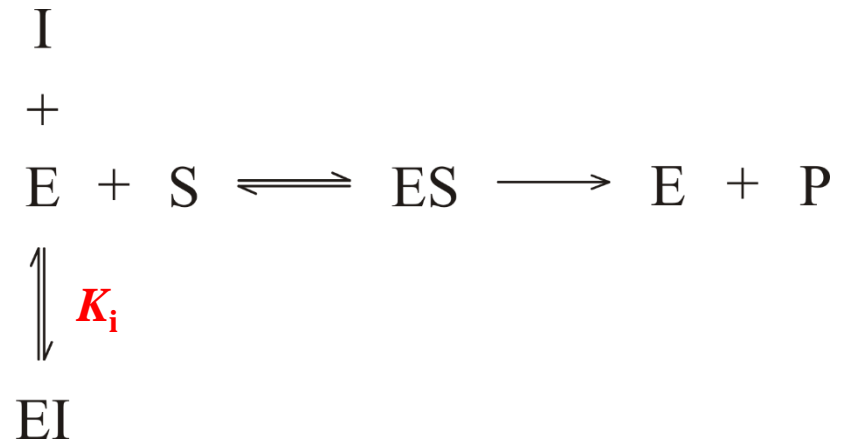
Kompetitivni inhibitorji

Najpogostejša vrsta inhibitorjev v naravi so **kompetitivni inhibitorji**, ki se vežejo v aktivno mesto encima in s tem preprečijo vezavo substrata.



kompleks ES
(brez inhibitorja)

Reakcijska shema:

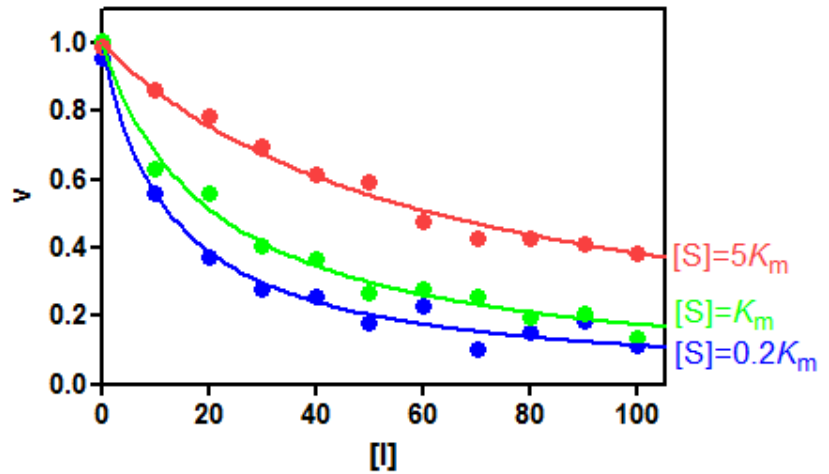
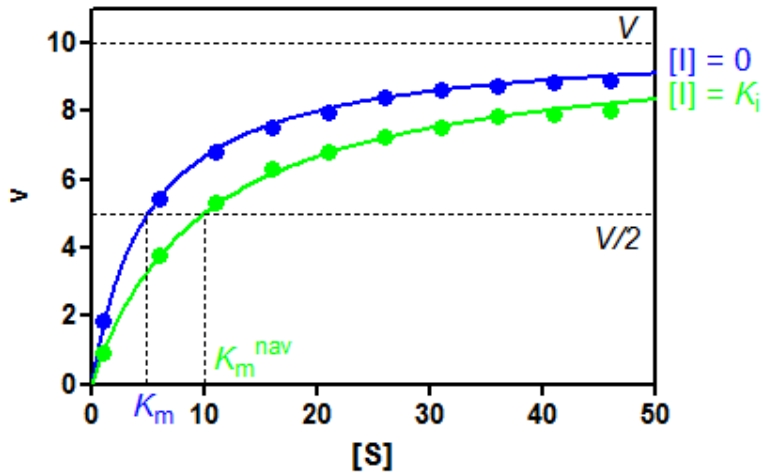


Afiniteto inhibitorja do encima podajamo s **konstanto inhibicije** K_i .

Kompetitivni inhibitorji

Najpogostejša vrsta inhibitorjev v naravi so **kompetitivni inhibitorji**, ki se vežejo v aktivno mesto encima in s tem preprečijo vezavo substrata.

Delovanje inhibitorjev preučujemo tako, da merimo in primerjamo hitrost v prisotnosti in odsotnosti inhibitorja.



$$v = \frac{V^{nav}[S]}{K_m^{nav} + [S]}$$

$$K_m^{nav} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad V = V^{nav}$$

Kompetitivni inhibitorji

Najpogostejša vrsta inhibitorjev v naravi so **kompetitivni inhibitorji**, ki se vežejo v aktivno mesto encima in s tem preprečijo vezavo substrata.

Primer: sukcinat dehidrogenazo inhibirajo analogi substrata malonat, oksalat in pirofosfat.

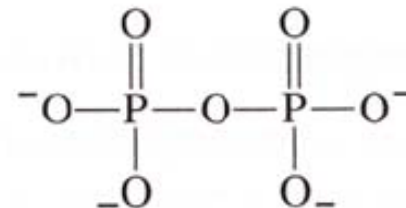
inhibitorji



(a) malonat

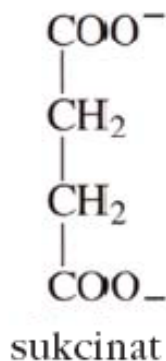


(b) oksalat



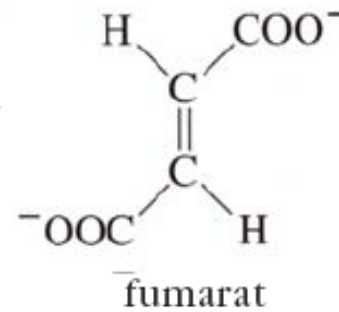
(c) pirofosfat

*reakcija sukcinat
dehidrogenaze*



+ FAD
(oksidirana
oblika)

sukcinat-
dehidrogenaza

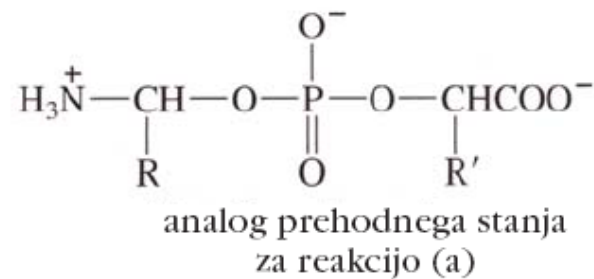
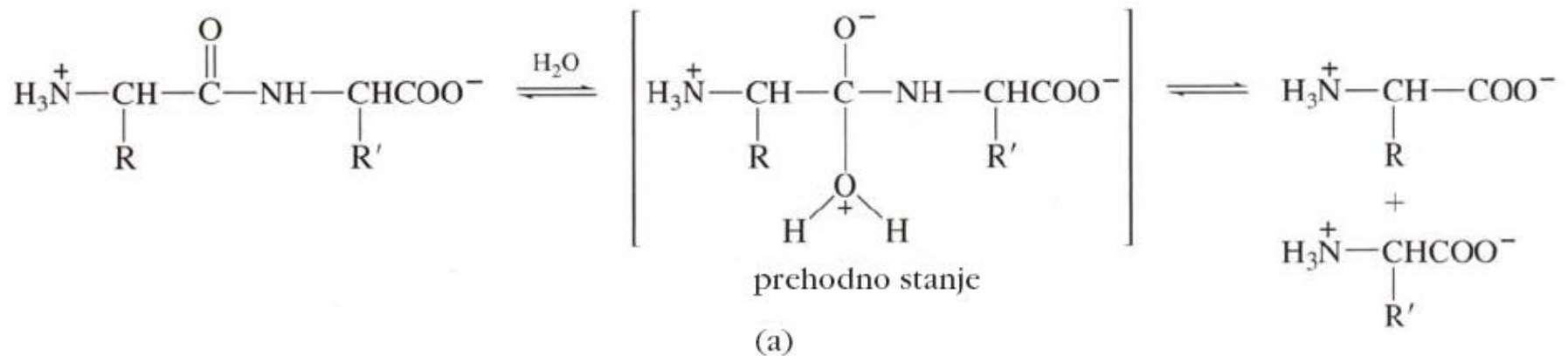


+ FADH₂
(reducirana
oblika)

(d)

Kompetitivni inhibitorji

Kot kompetitivne inhibitorje pogosto srečamo **analoge prehodnega stanja** – tj. molekule, ki imajo strukturo podobno prehodnem stanju, a jih encim ne more kemično pretvoriti.

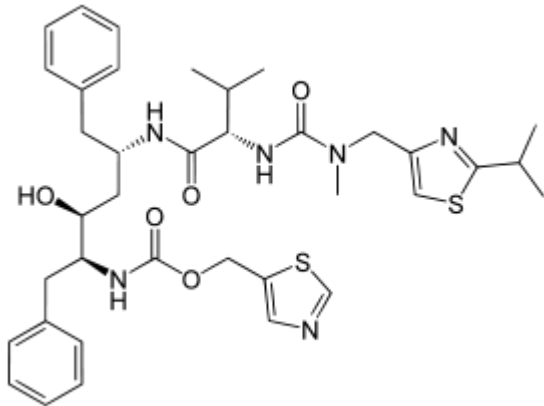


(b)

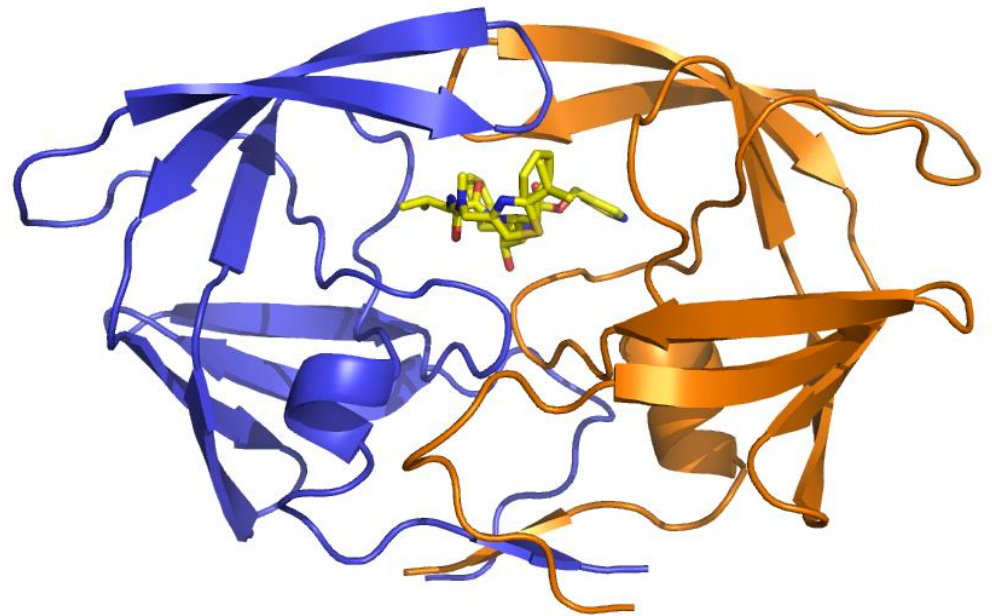
Kompetitivni inhibitorji

Najpogostejša vrsta inhibitorjev v naravi so **kompetitivni inhibitorji**, ki se vežejo v aktivno mesto encima in s tem preprečijo vezavo substrata.

Terapevtski primer: *ritonavir* – inhibitor proteaze HIV-1



struktura ritonavira

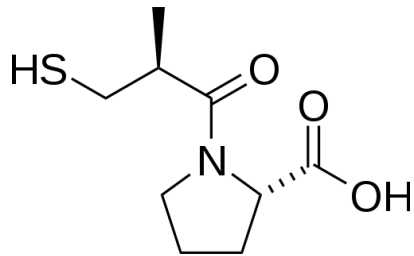


kristalna struktura HIV-1 proteaze z vezanim ritonaviom

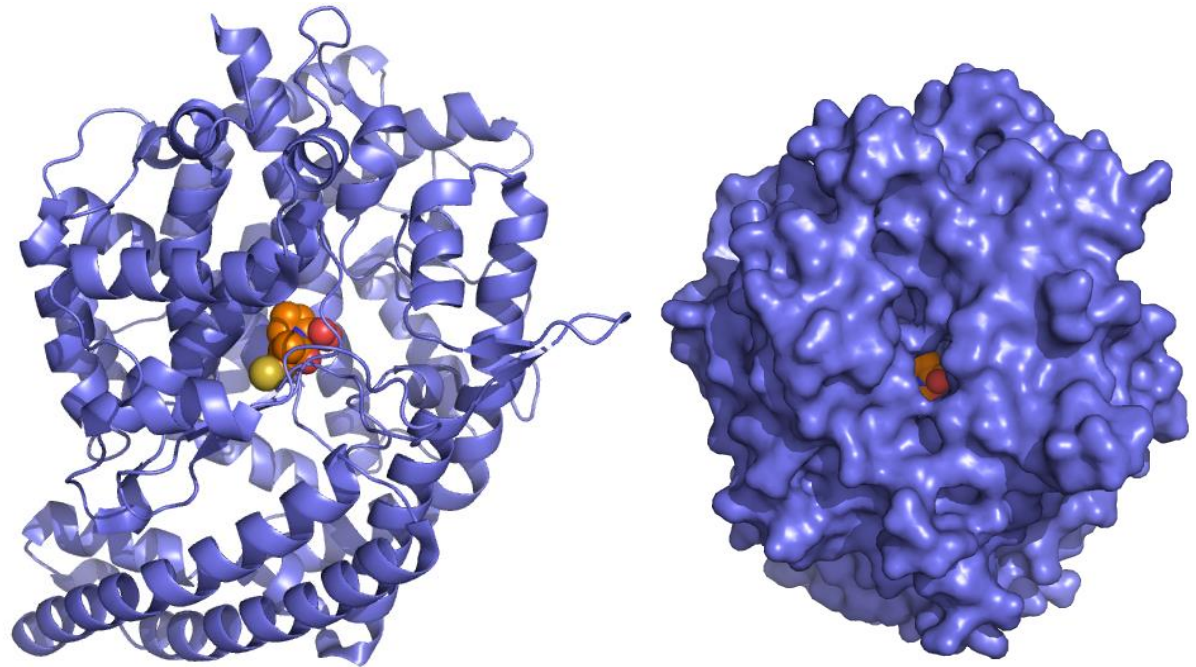
Kompetitivni inhibitorji

Najpogostejša vrsta inhibitorjev v naravi so **kompetitivni inhibitorji**, ki se vežejo v aktivno mesto encima in s tem preprečijo vezavo substrata.

Terapevtski primer: *captopril* – inhibitor angiotenzin pretvarjajočega encima – tarča za zdravljenje povišanega krvnega tlaka



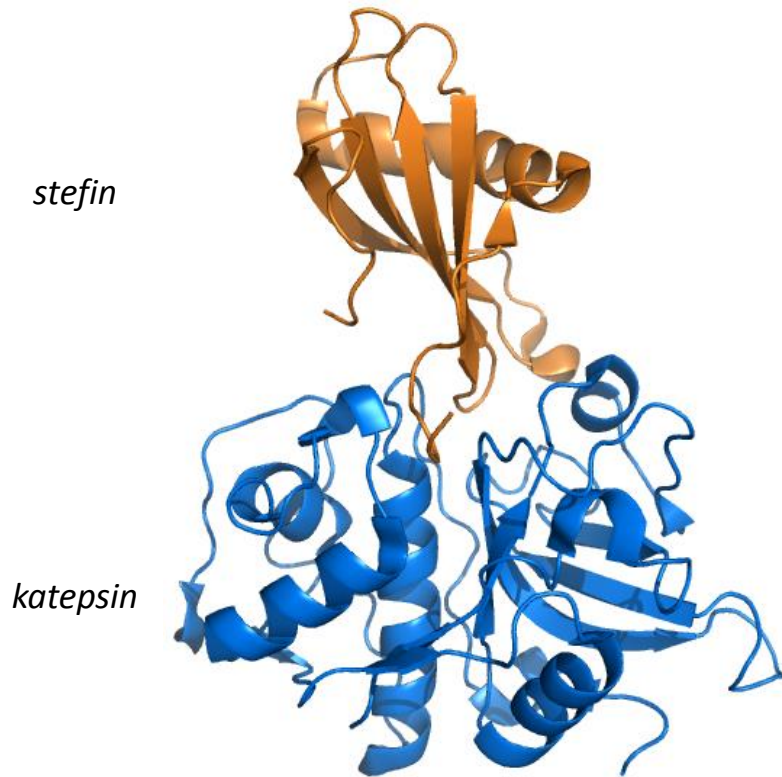
struktura captoprila



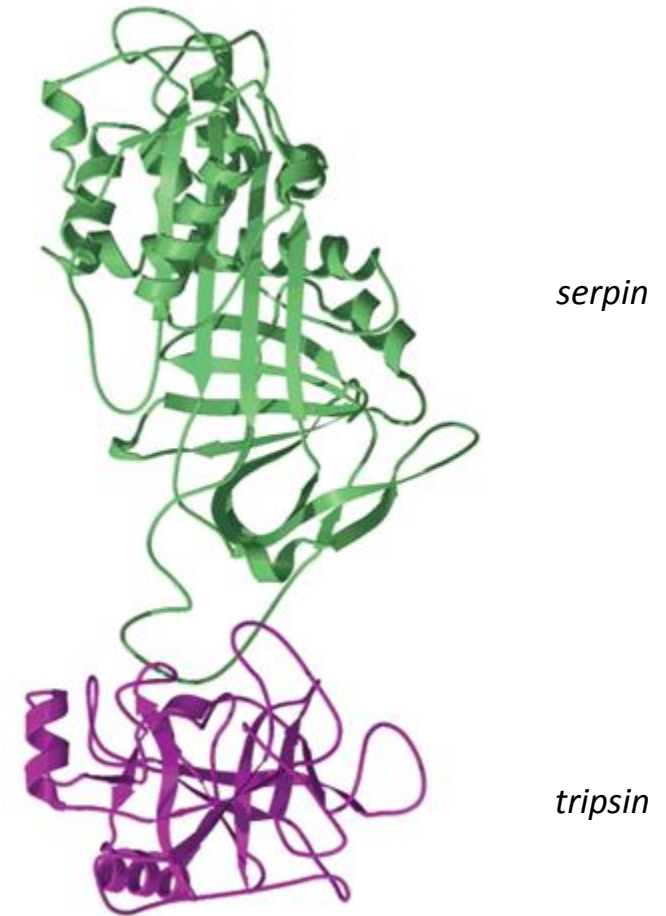
*kristalna struktura ACE in captoprila
(levo v prikazu cartoon, desno molekulska površina)*

Kompetitivni inhibitorji

Kot kompetitivne inhibitorje lahko srečamo tudi proteine – **makromolekulski inhibitorji**.



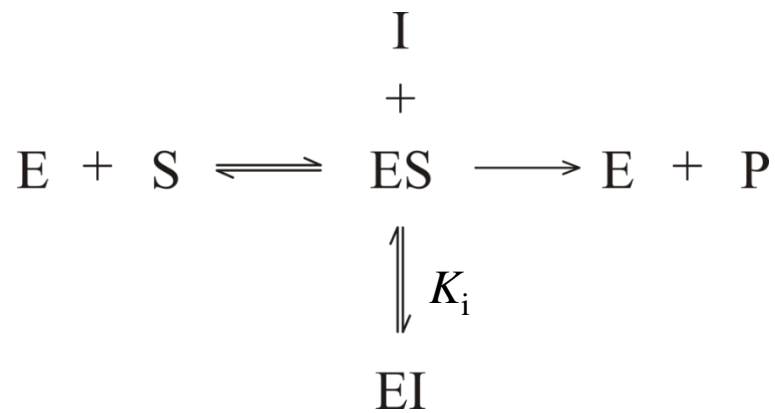
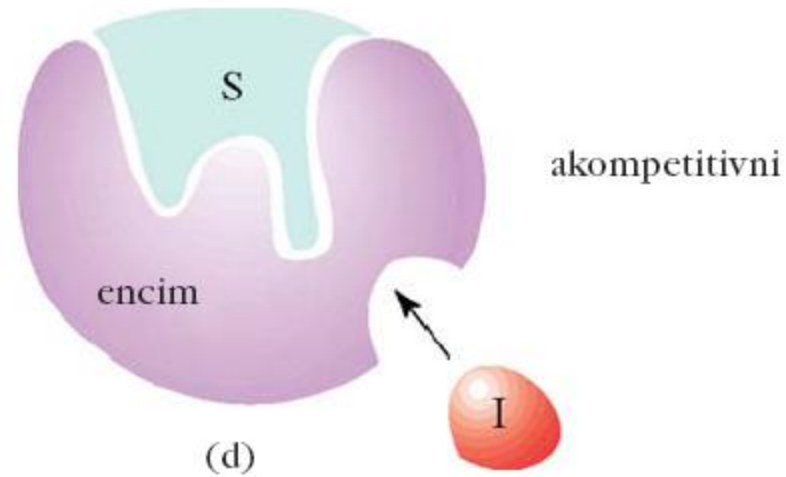
inhibitor stefin A vezan v aktivno mesto lizosomske proteaze iz družine katepsinov



inhibitor serpin vezan v aktivno mesto tripsina

Reverzibilni inhibitorji

Preostali dve obliki inhibicije, akompetitivna in mešana, sta v naravi redki.

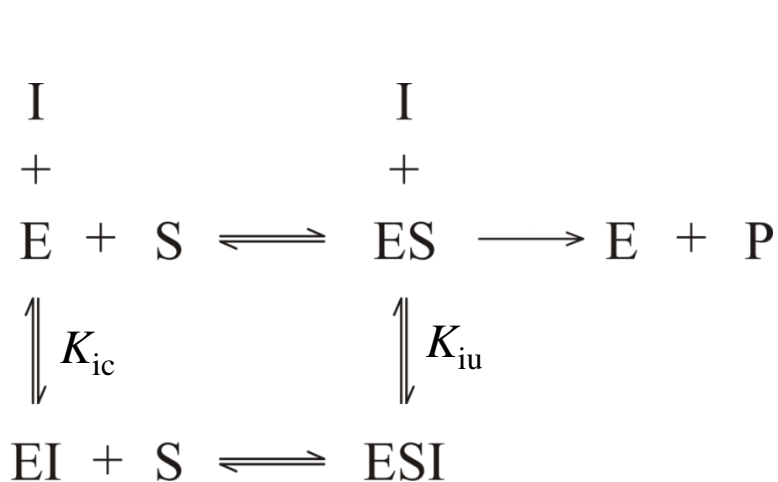
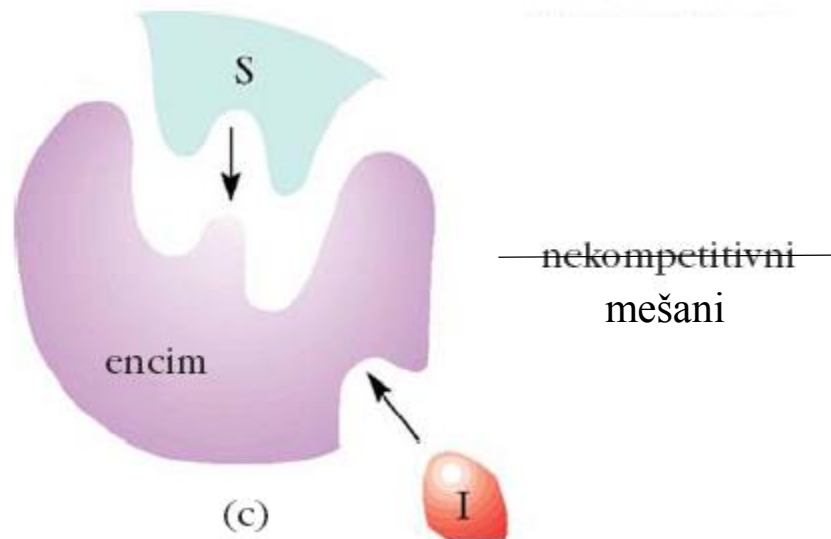


$$K_m^{nav} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$V^{nav} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Reverzibilni inhibitorji

Preostali dve obliki inhibicije, akompetitivna in mešana, sta v naravi redki.



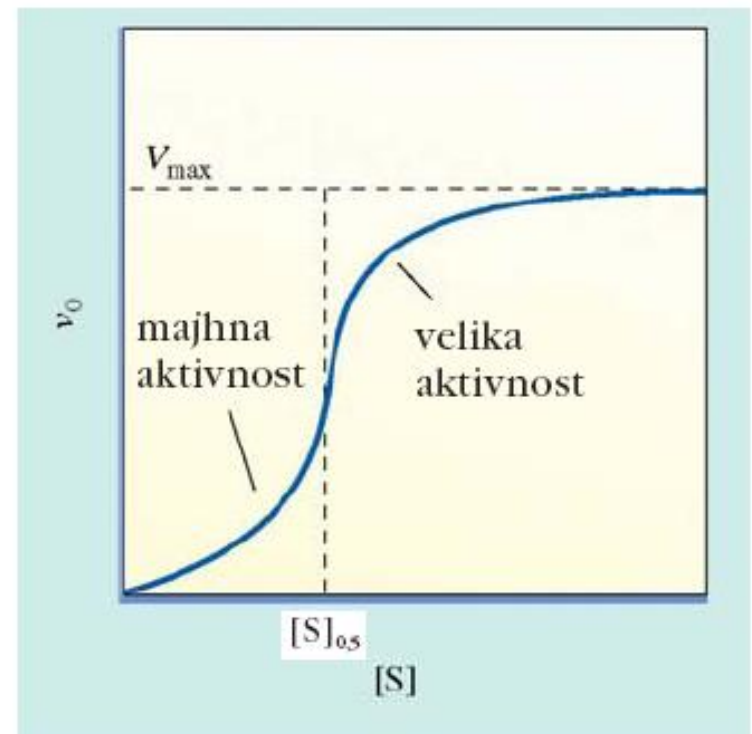
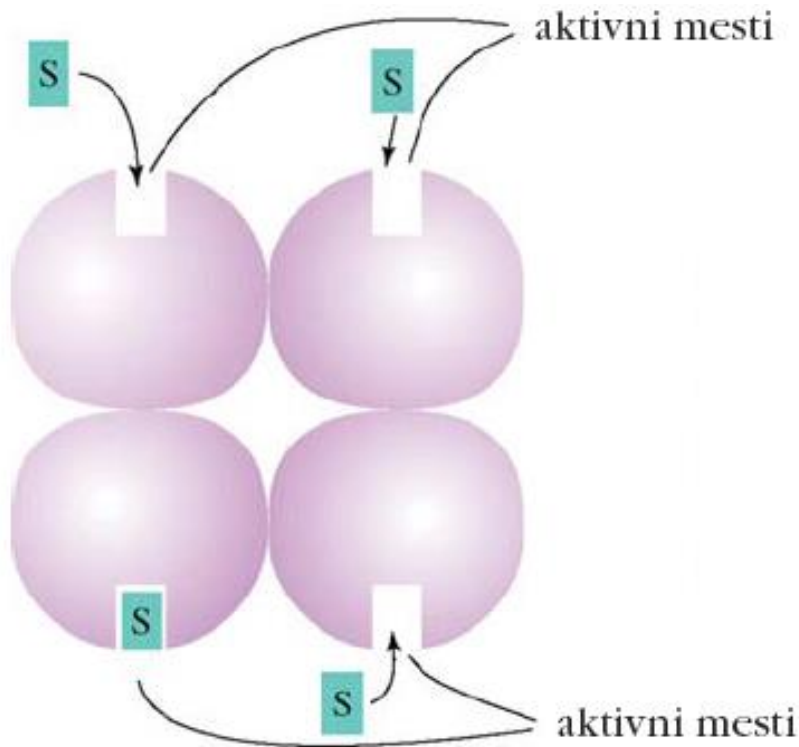
$$K_m^{nav} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \qquad V^{nav} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}$$

Posebni primer: $K_{ic} = K_{iu}$ **nekompetitivni inhibitor**

$$K_m^{nav} = K_m \qquad V^{nav} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}$$

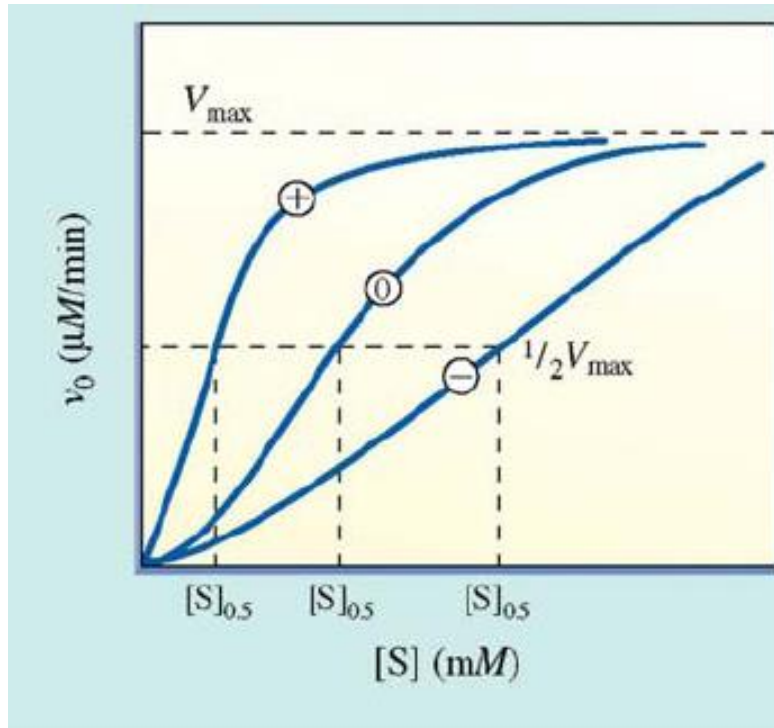
Alosterični encimi

Alosterija (allos – gr. drug, stereos – gr. mesto) pomeni prenos informacije med dvema mestoma (ali več mesti) v proteinu. **Alosterična regulacija** je pogost mehanizem uravnavanja delovanja encimov. Alosterijo so v začetku opisali v oligomernih proteinih. Podobno kot pri vezavi kisika na hemoglobin se pri oligomernih encimih alosterija lahko pokaže kot kooperativnost pri vezavi substrata. Gre za komunikacijo med aktivnimi (katalitičnimi) mesti. Oligomerni encimi, ki kažejo znake kooperativnosti, se ne obnašajo skladno z Michaelis-Mentenovo kinetiko. Krivulje odvisnosti hitrosti od koncentracije substrata so **sigmoidne**.

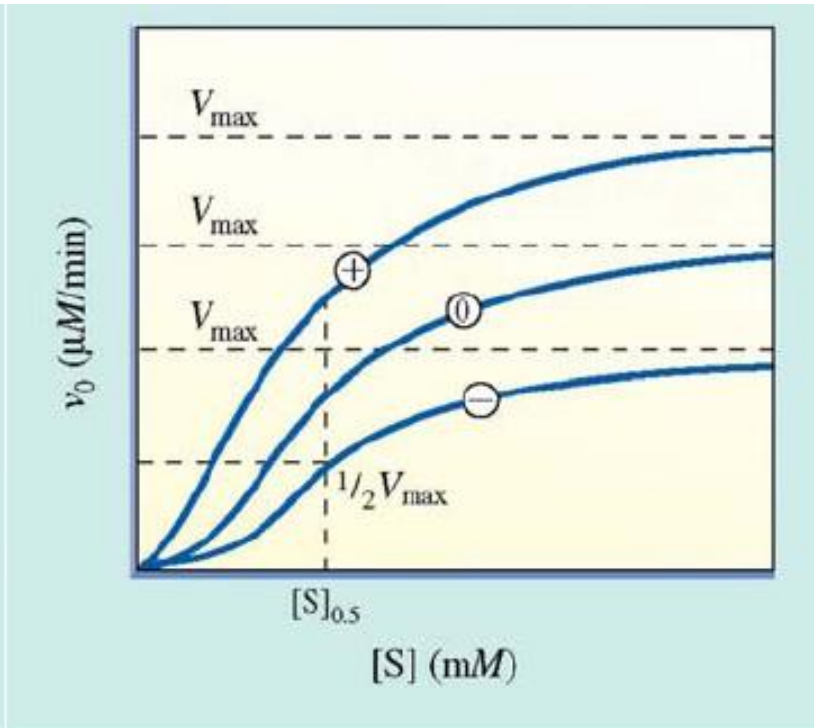


Alosterični encimi

Podobno kot v hemoglobinu so tudi v oligomernih encimih lahko poleg aktivnih mest prisotna tudi **regulatorna (alosterična) mesta**. Vezava modulatorjev (oz. efektorjev) na alosterična mesta lahko poviša aktivnost encima (pozitivni regulatorji) ali jo zniža (negativni regulatorji). Vpliva lahko na afiniteto encima do substrata in/ali katalitično hitrost encima.



(a)

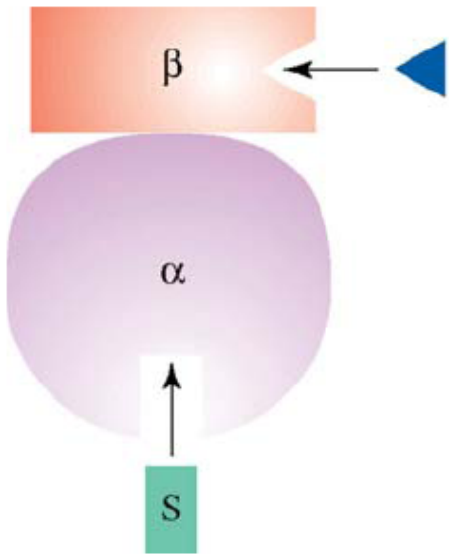


(b)

Alosterični encimi

Alosterični encimi niso nujno sestavljeni iz večih podenot s katalitičnimi lastnostmi.

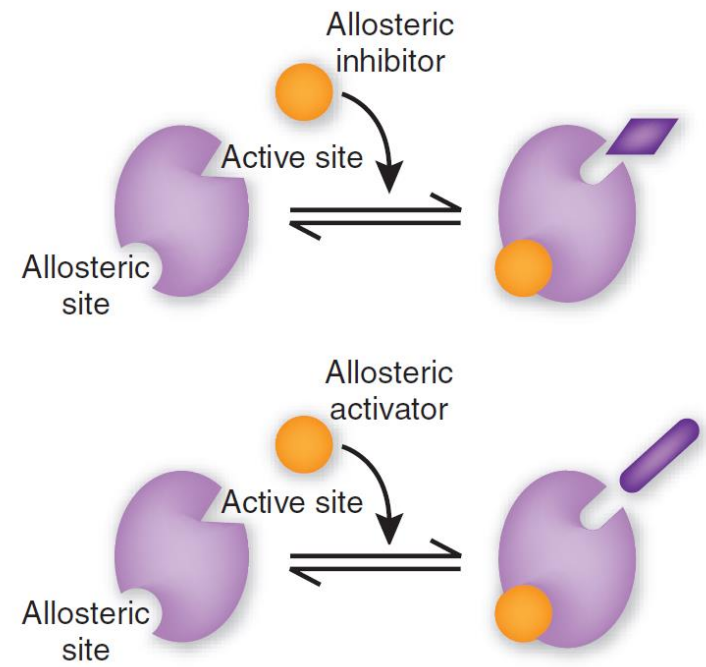
dimer katalitične (α) in regulatorne (β) podenote



1. stopnja: molekula modulatorja se veže na regulatorno podenoto in s tem pošlje sporočilo katalitični podenoti.

2. stopnja: substrat se lažje ali težje veže, odvisno od tega, ali je modulator + ali -.

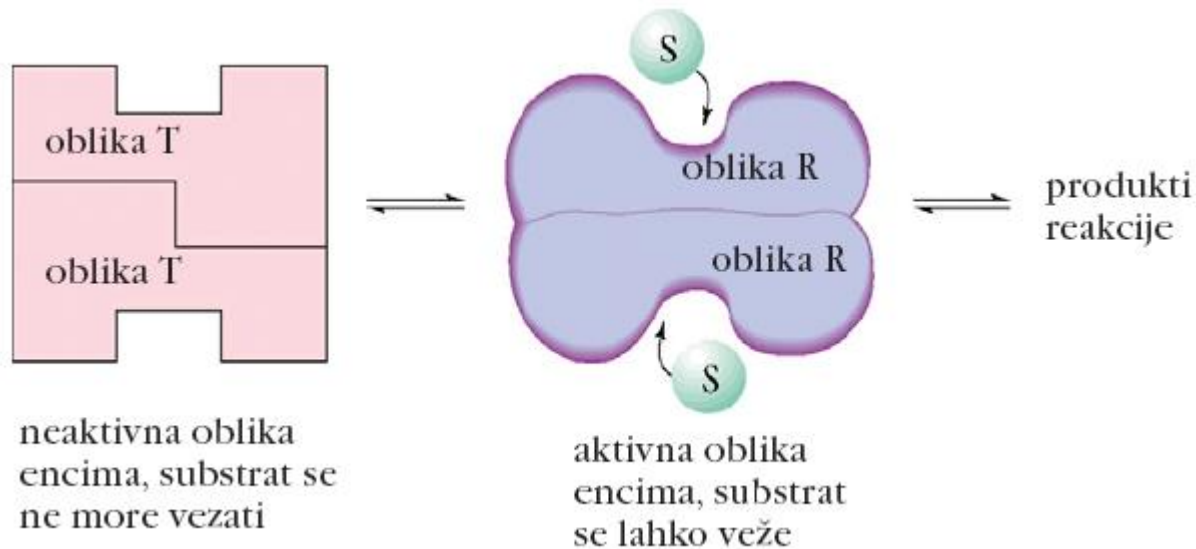
monomer z aktivnim in alosteričnim mestom



Modeli alosteričnega uravnavanja

Najenostavnejši modeli alosteričnega uravnavanja predpostavljajo, da vsaka podenota alosteričnih encimov (oz. proteinov) obstaja v dveh konformacijskih oblikah: **oblika T** (tense) je manj aktivna (ali neaktivna) od **oblike R** (relaxed). Modeli so bili v osnovi postavljeni za pojasnjevanje alosterije v oligomernih encimih, lahko pa jih analogno uporabimo tudi za monomerne sisteme.

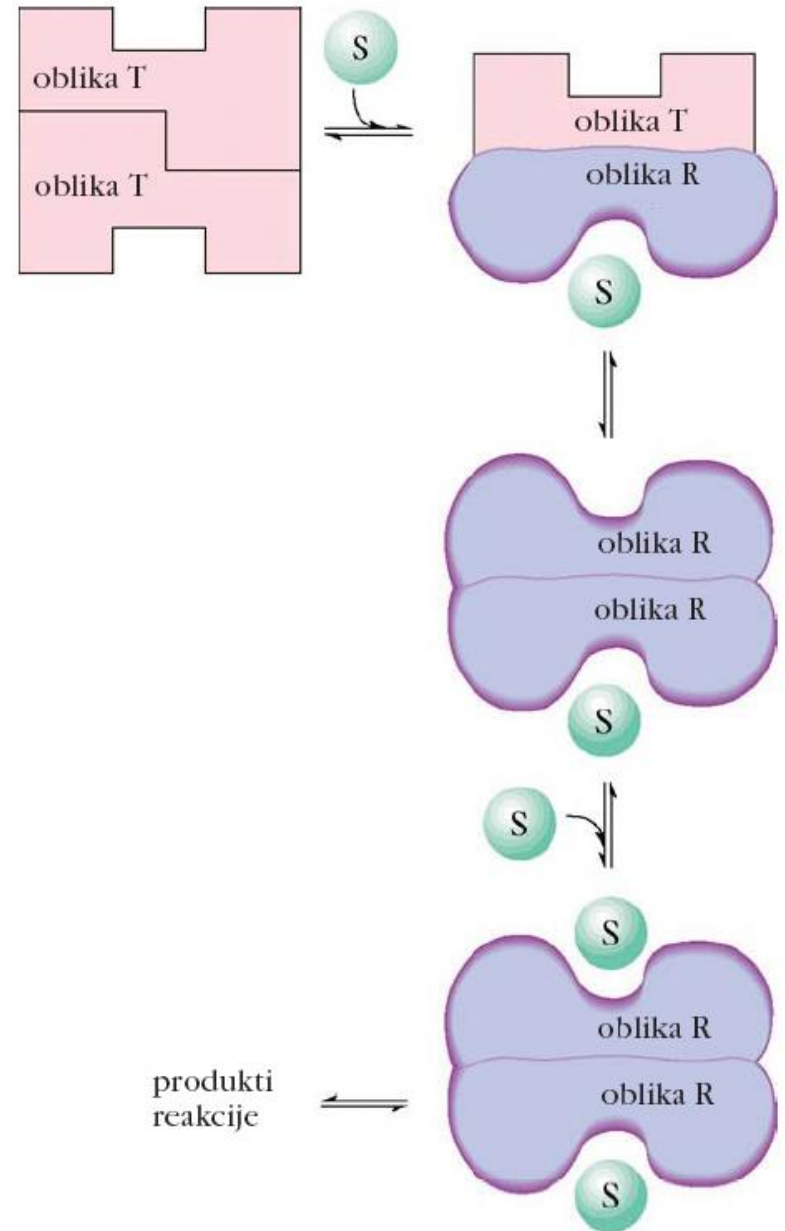
Model MWC (Monod, Wyman, Changeux; 1965)



Modeli alosteričnega uravnavanja

Najenostavnejši modeli alosteričnega uravnavanja predpostavljajo, da vsaka podenota alosteričnih encimov (oz. proteinov) obstaja v dveh konformacijskih oblikah: **oblika T** (tense) je manj aktivna (ali neaktivna) od **oblike R** (relaxed). Modeli so bili v osnovi postavljeni za pojasnjevanje alosterije v oligomernih encimih, lahko pa jih analogno uporabimo tudi za monomerne sisteme.

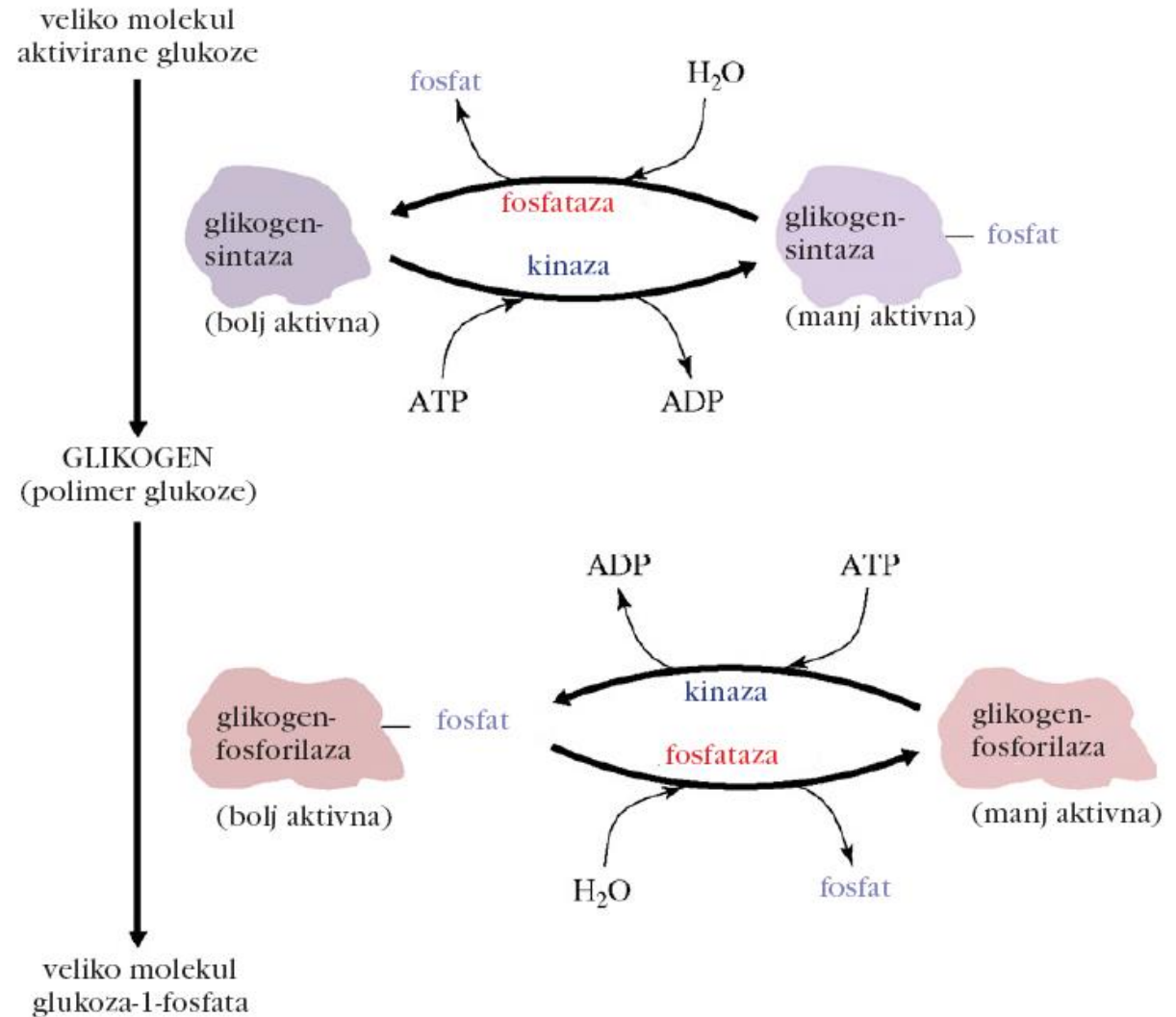
Model KNF – sekvenčni model (Koshland, Nemethy, Filmer; 1966)



Regulacija s kovalentnimi modifikacijami

Eden najpogostejših načinov znotrajceličnega uravnavanja je fosforilacija. Pri tem procesu sodelujejo **kinaze** (dodajajo fosfatno skupino) in **fosfataze** (odstranjujejo fosfatno skupino).

Primer: regulacija encimov v sintezi glikogena.

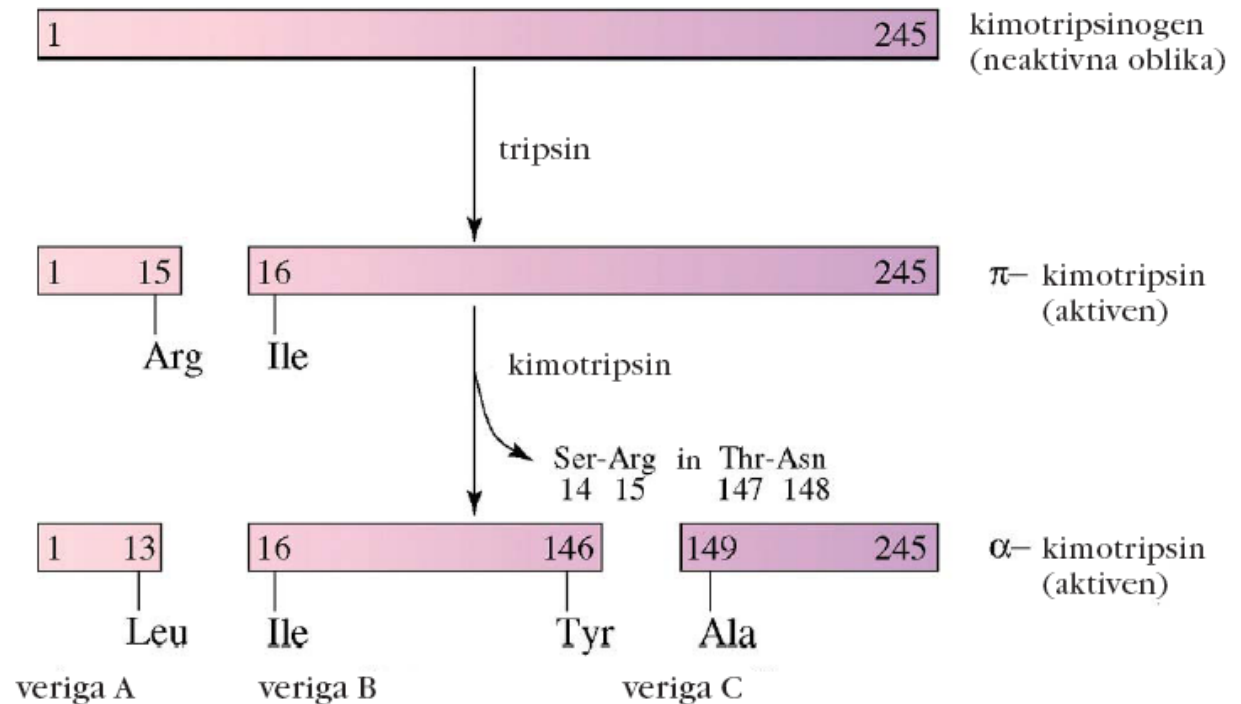


Regulacija s proteolitičnim procesiranjem

Nekateri encimi se sintetizirajo kot neaktivni **cimogeni** in se s proteolitično cepitvijo pretvorijo v aktivno obliko.

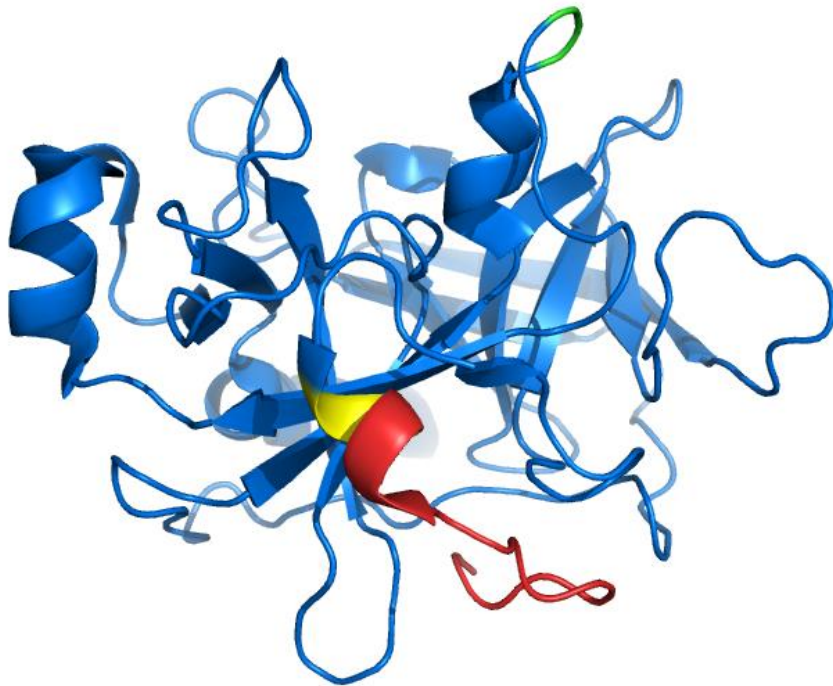
aktivna oblika	cimogenska oblika	mesto sinteze cimogena
π - ali α -kimotripsin	kimotripsinogen	trebušna slinavka
pepsin	pepsinogen	želodec
tripsin	tripsinogen	trebušna slinavka
karboksipeptidaza	prokarboksipeptidaza	trebušna slinavka
elastaza	proelastaza	trebušna slinavka

Primer: aktivacija kimotripsinogena.



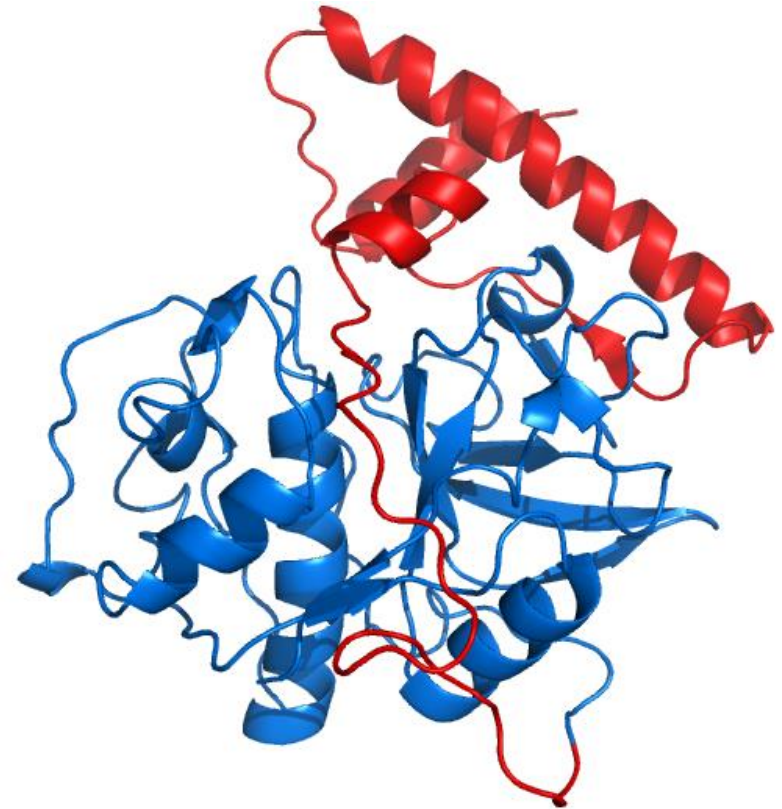
Regulacija s proteolitičnim procesiranjem

Nekateri encimi se sintetizirajo kot neaktivni **cimogeni** in se s proteolitično cepitvijo pretvorijo v aktivno obliko.



kimotripsinogen

(N-končen propeptid je rdeč, izrezana ostanka 14 in 15 rumena, izrezana ostanka 147 in 148 zelena)

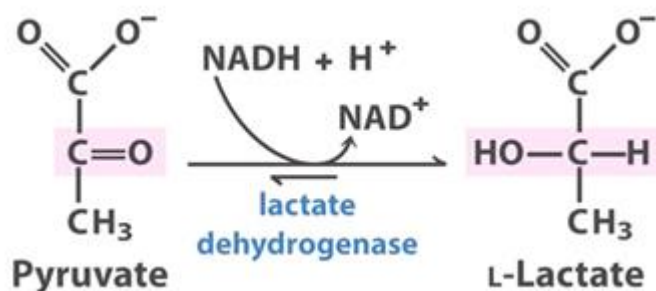


prokatepsin K

Regulacija z izoencimi

Izoencimi so različne oblike med seboj podobnih si encimov, ki katalizirajo isto reakcijo, a imajo različne kinetične lastnosti.

Primer: laktat dehidrogenaza (LDH)

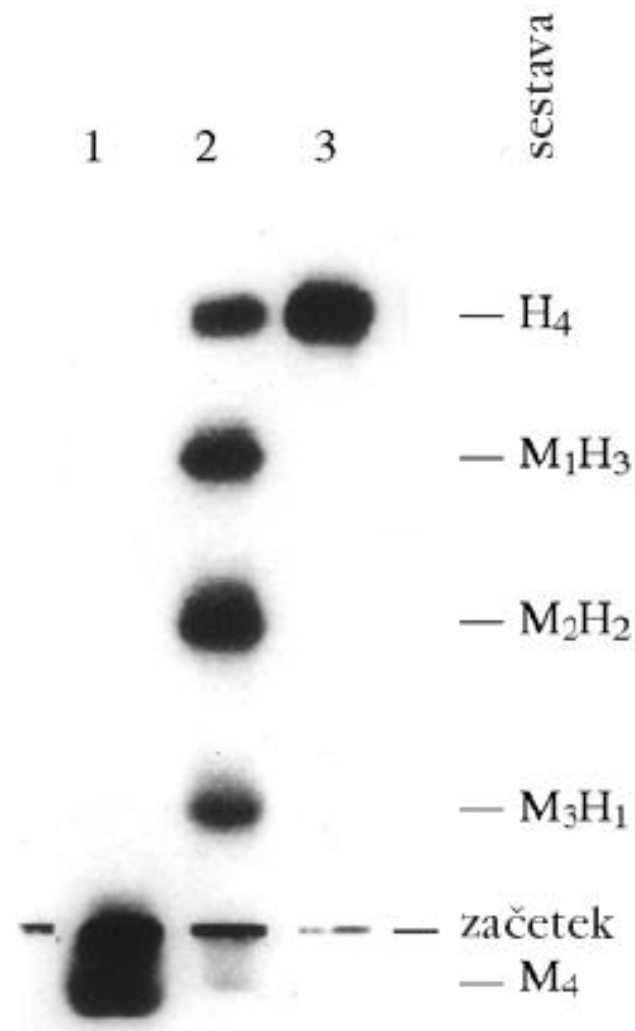


LDH je tetramer, sestavljen iz dveh vrst podenot, M in H, ki sta produkta različnih genov. Oligomerna sestava se med organi razlikuje:

V skeletnih mišicah – M₄

V srčni mišici – H₄

V drugih tkivih zmesi 5 oblik (M₄, M₃H, M₂H₂, MH₃, H₄), katere lahko ločimo z elektroforezo (desno).

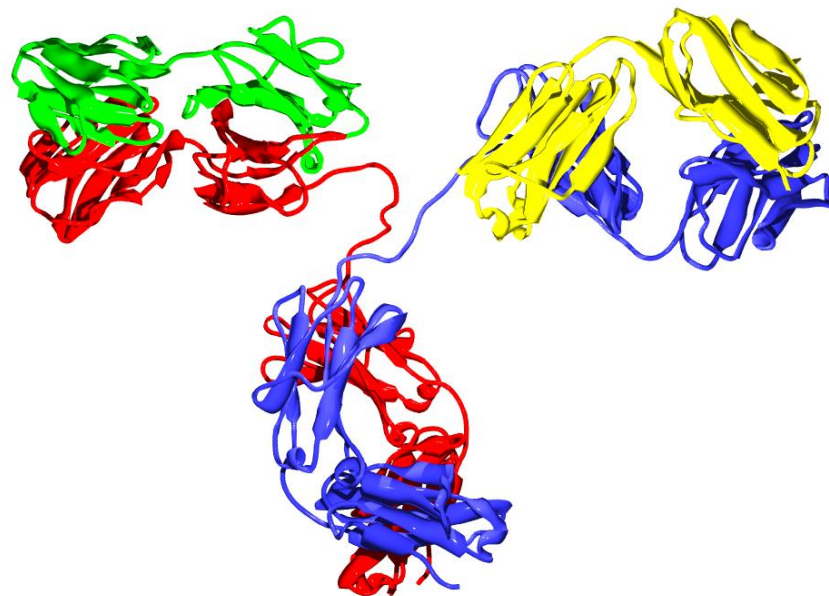
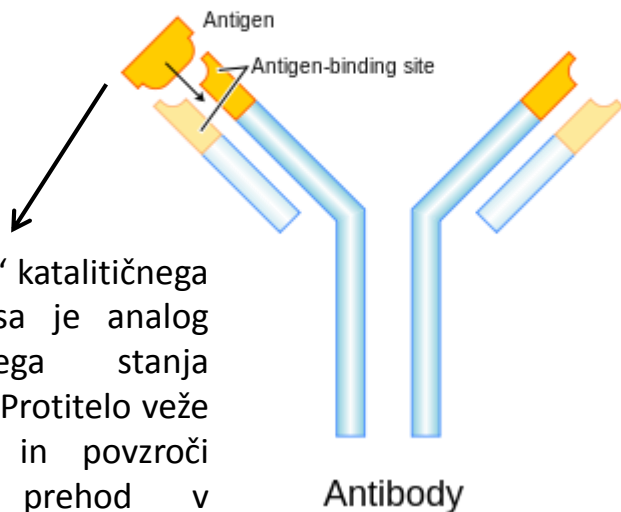


Abcimi

Abcimi oz. **katalitična protitelesa** so protitelesa s sposobnostjo kataliziranja kemijskih reakcij.



Antigens

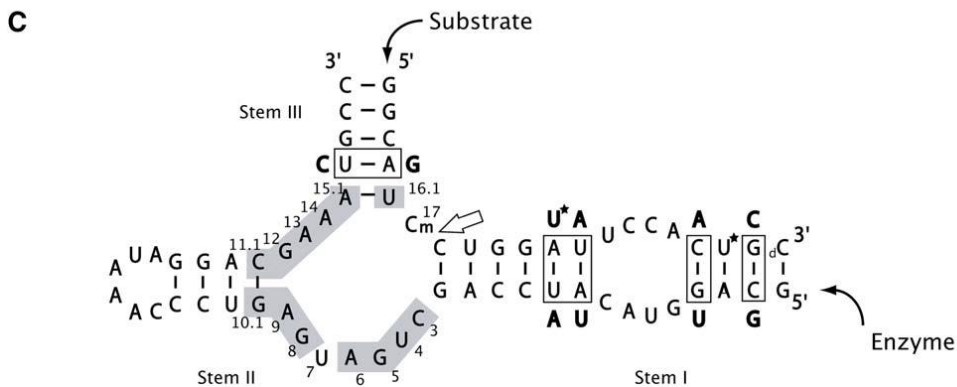
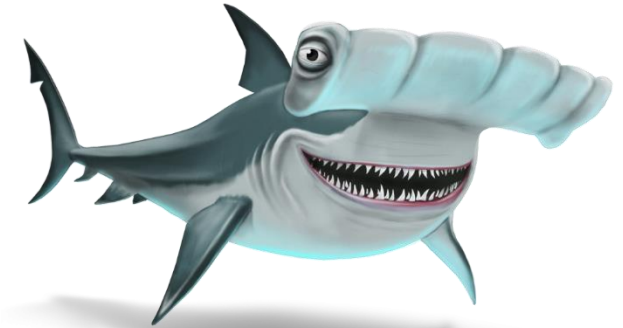
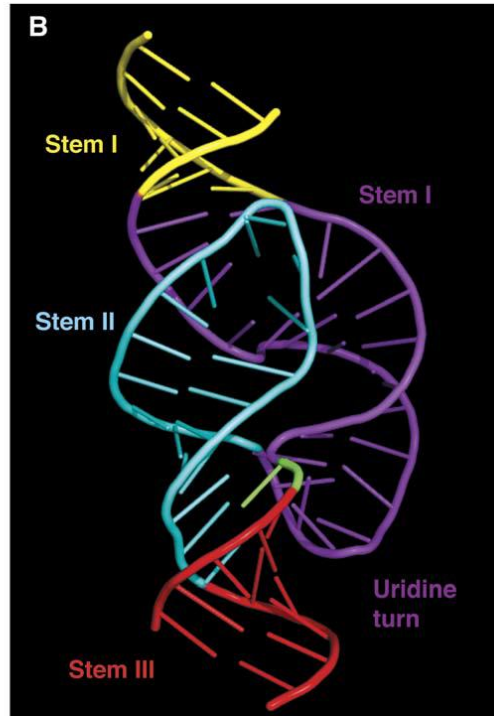
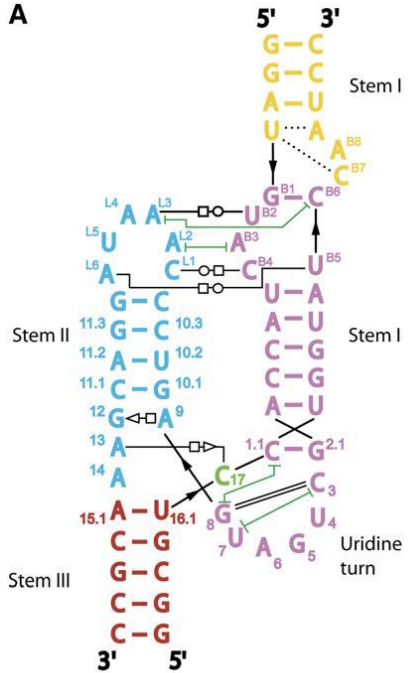


„antigen“ katalitičnega protitelesa je analog prehodnega stanja reakcije. Protitelo veže substrat in povzroči njegov prehod v prehodno stanje. V primerjavi z naravnimi encimi so bistveno slabši katalizatorji.

	$k_{\text{cat}}^{[a]}$	$K_M^{[b]}$	$k_{\text{cat}}/K_M^{[c]}$	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	$[k_{\text{cat}}/K_M]/k_{\text{uncat}}$
nat. enzymes	av 10^5	av 10^{-4}	10^6 – 10^9	10^6 – 10^{17}	10^8 – 10^{29}
cat. antibodies	10^{-2} – 1	av 10^{-4}	10^2 – 10^4	10^3 – 10^6	10^5 – 10^9

Ribocimi

Ribocimi so katalitične RNA molekule. Najbolj znan je ribocim „hammerhead“.



Ribocime najdemo pri:

- samoizrezujočih elementih RNA
- procesiranju molekul RNA (ribonukleaza P)
- sintezi proteinov