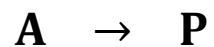


Eno in večsubstratne reakcije



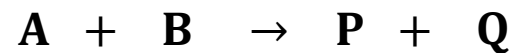
Uni Uni reakcija*



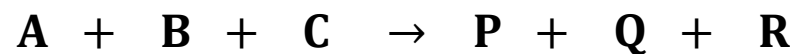
Bi Uni reakcija



Uni Bi reakcija



Bi Bi reakcija



Ter Ter reakcija

*oznake označujejo molekularnost reakcije, ne reda reakcije!

Reverzibilne reakcije

Najenostavnejši reverzibilni mehanizem je reverzibilna Michaelis-Mentenova reakcija:



Hitrost reakcije definiramo v običajni smeri: $v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt}$

nastajanje P iz S nastajanje S iz P

$$v = \frac{k_S[E]_0[S] - k_P[E]_0[P]}{1 + \frac{[S]}{K_{mS}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

Vprašanje:

Kako dolgo poteka reakcija pri ireverzibilnih in reverzibilnih mehanizmih?

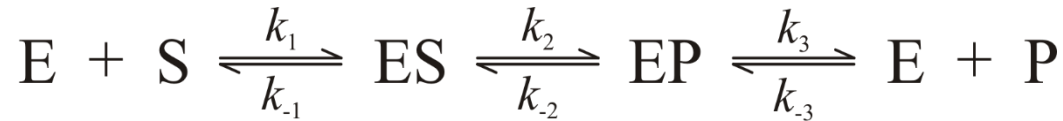
To je splošna oblika Michaelis-Mentenove enačbe za reverzibilne sisteme.

V primeru na zgornji shemi velja: $k_S = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} = \frac{k_2}{K_{mS}}$ $k_P = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2} = \frac{k_{-1}}{K_{mP}}$

V kompleksnejših primerih so izrazi za k_A in k_p kompleksnejši.

Reverzibilne reakcije

Minimalen realističen mehanizem je:



logično je, da sta kompleksa različna – enega tvori S, drugega pa P

Pri eksperimentih *in vitro* za določitev konstant merimo začetno hitrost v prisotnosti le S ali P:

$$v = \frac{k_S[E]_0[S] - k_P[E]_0[P]}{1 + \frac{[S]}{K_{mS}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

$$t = 0 \quad \begin{array}{l} [S] = [S]_0 \\ [P] = 0 \end{array}$$

$$[S] = 0 \quad t = 0 \\ [P] = [P]_0$$

$$v = \frac{k_S[E]_0[S]}{1 + \frac{[S]}{K_{mS}}}$$

$$v = \frac{k_P[E]_0[P]}{1 + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

Mehanizem membranskih uniporterjev

Podoben minimalnem realističnem mehanizmu je t.i. *Izo Uni Uni* mehanizem. Ta mehanizem ni pogost pri topnih encimih, delujejo pa po njem membranski uniporterji, npr. GLUT1.

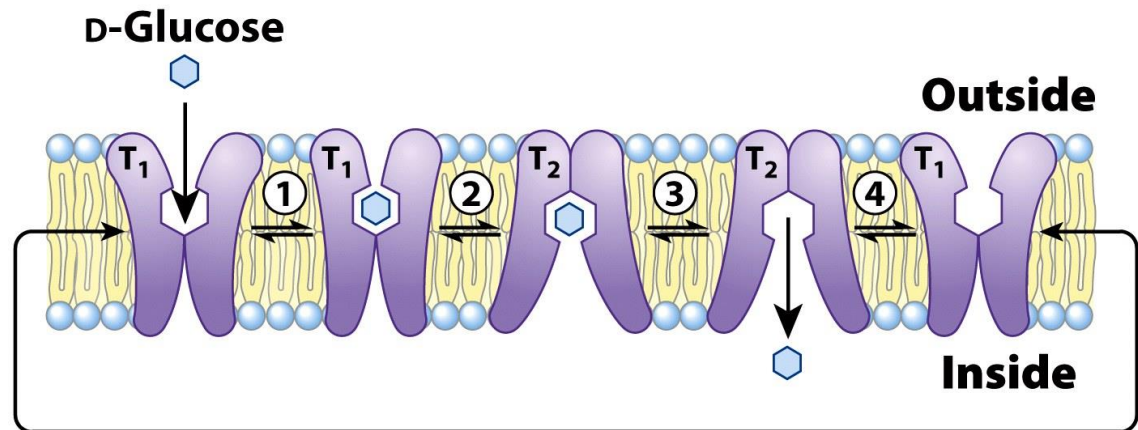
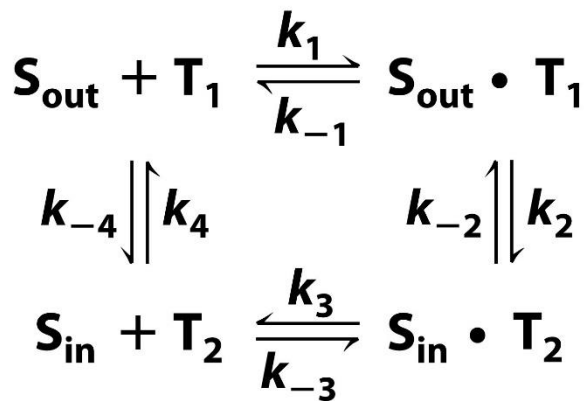
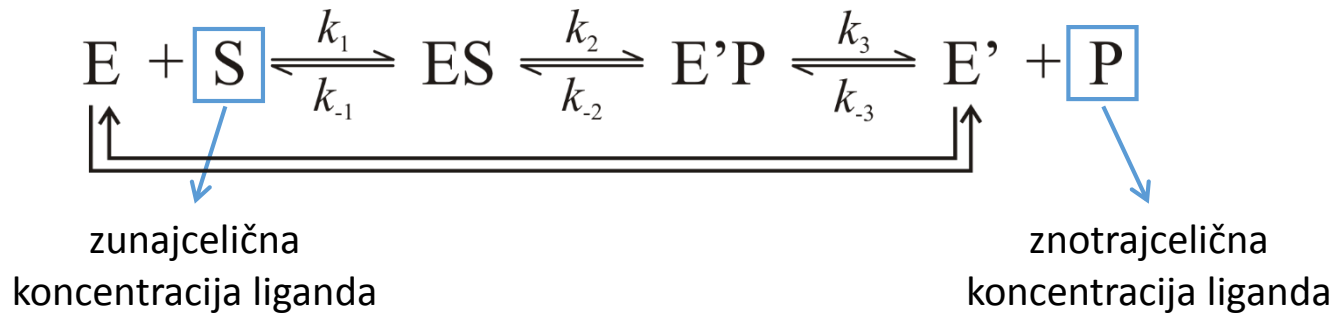


Figure 11-31
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Mehanizem membranskih uniporterjev

Podoben minimalnem realističnem mehanizmu je t.i. *Izo Uni Uni* mehanizem. Ta mehanizem ni pogost pri topnih encimih, delujejo pa po njem membranski uniporterji, npr. GLUT1.

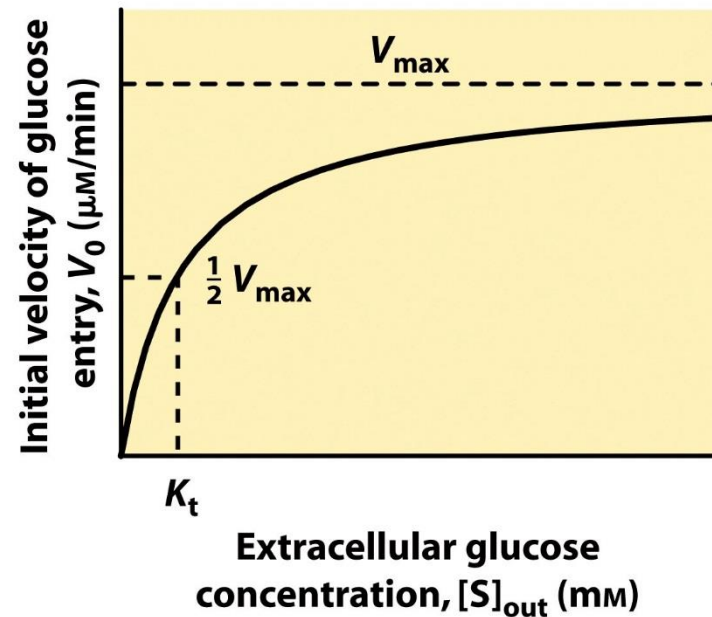
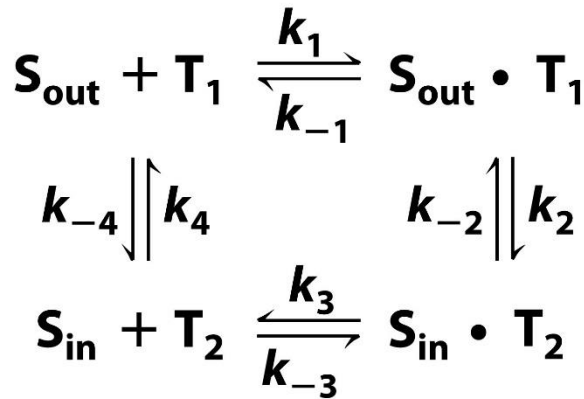
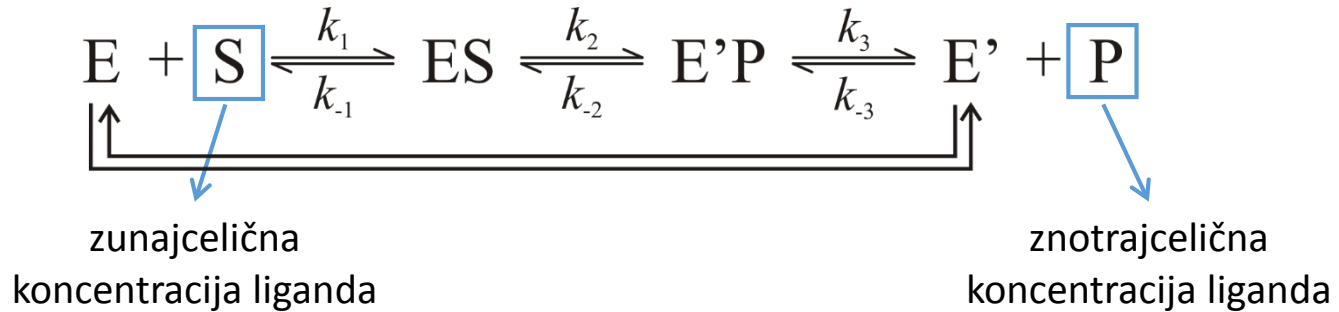
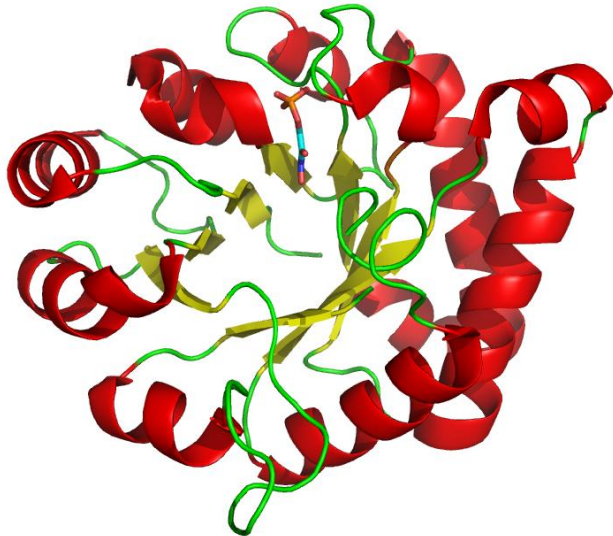
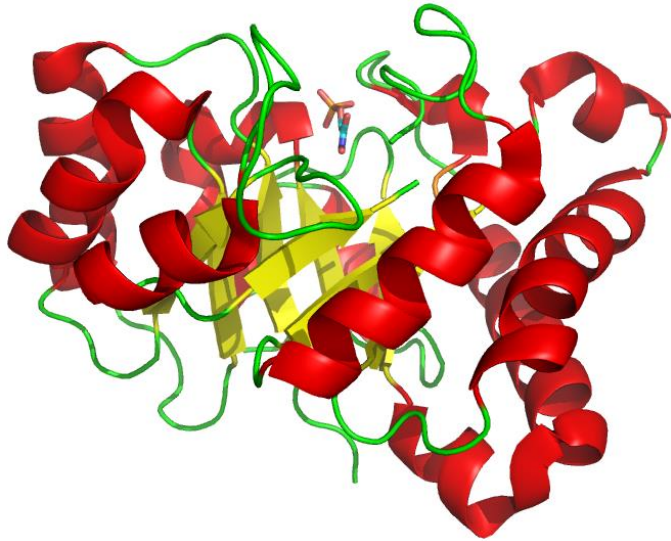


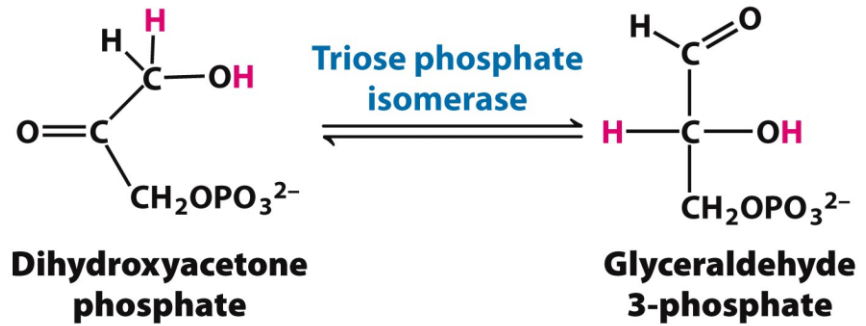
Figure 11-30a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

kako dolgo poteka prenos?

Triozafosfat izomeraza



PDB 3YPI



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

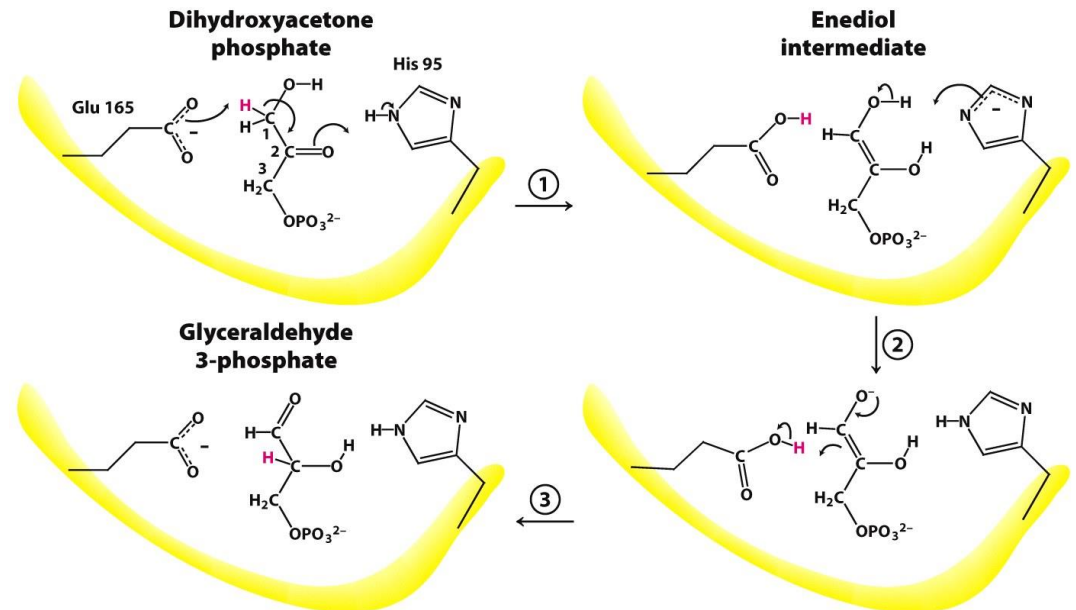
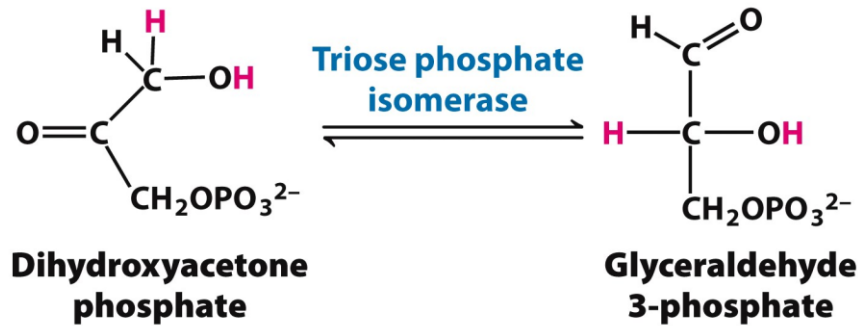


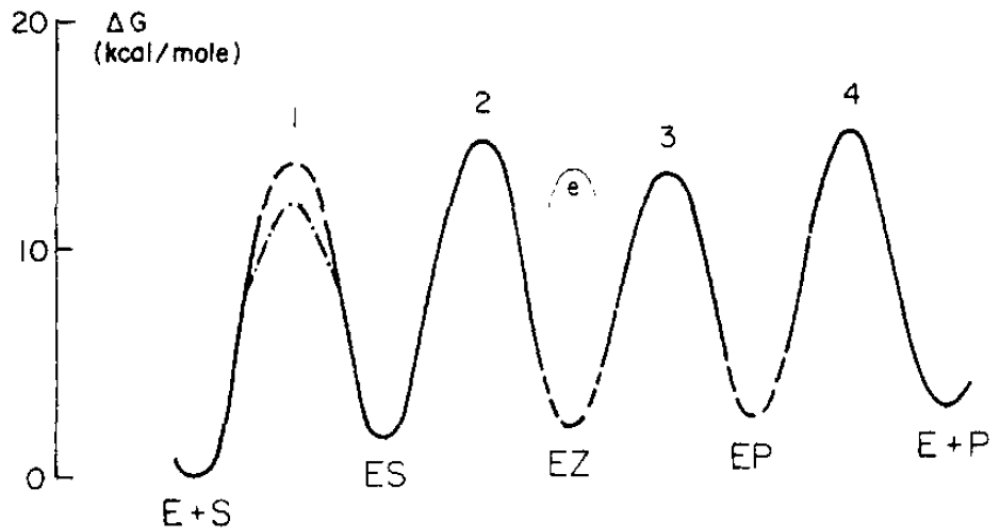
Figure 16.5
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

kislinsko-bazna kataliza

Triozafosfat izomeraza

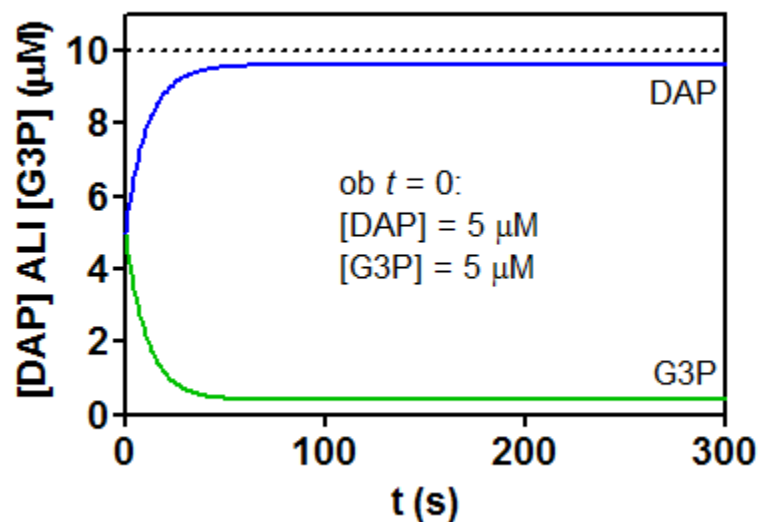
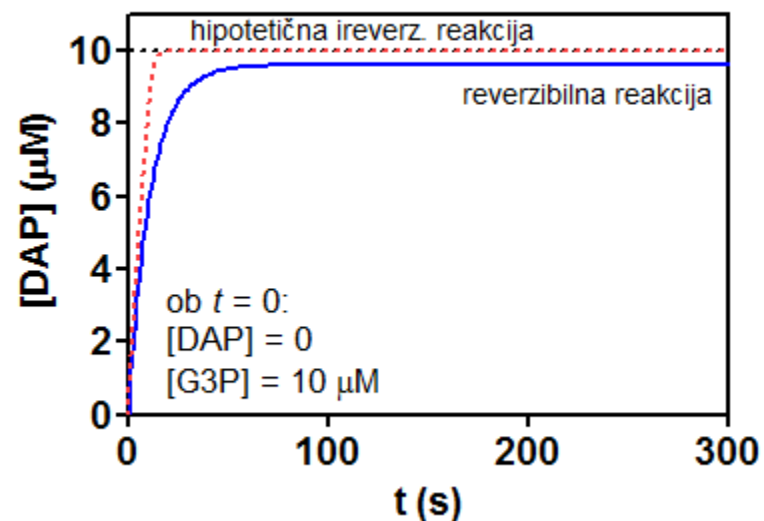
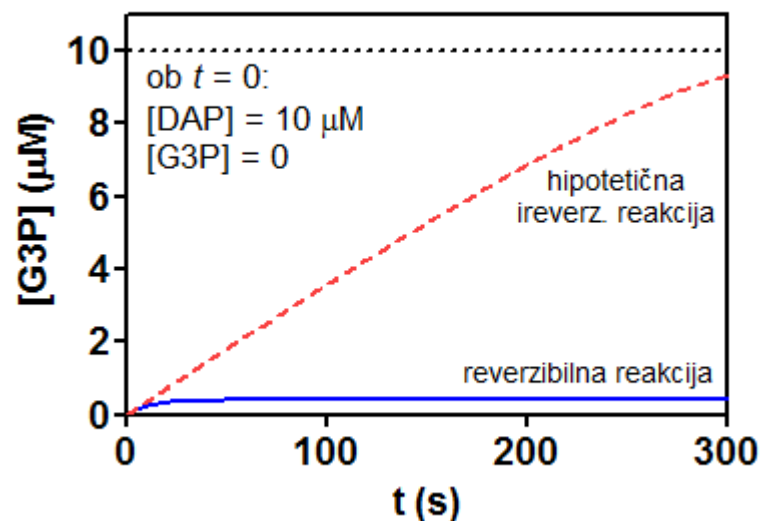


Unnumbered 16 p458c
 Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company



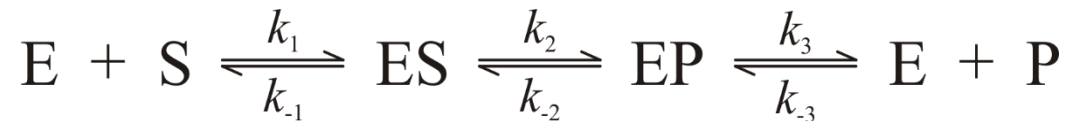
V ravnotežju je razmerje med DAP:G3P enako 96:4

Triozafosfat izomeraza

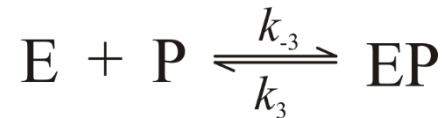


Inhibicija s produktom

Je pogost fenomen pri enosubstratnih in večsubstratnih reakcijah, tako reverzibilnih kot ireverzibilnih. Minimalen mehanizem za pojasnitev tega fenomena je:



Če je reakcija ireverzibilna je $k_{-2} = 0$. P se lahko veže na E, vendar S ne more nastati:



Dobimo enačbo:

$$v = \frac{k_S[E]_0[S]}{1 + \frac{[S]}{K_{mS}} + \frac{[P]}{K_{iP}}} = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{K_{mS} \left(1 + \frac{[P]}{K_{iP}}\right) + [S]}$$

V tem primeru produkt deluje kot kompetitiven inhibitor. Podobno lahko tako P kot S delujeta kot inhibitorja pri reverzibilnih reakcijah.

Večsubstratne reakcije

Kateri razredi encimov katalizirajo pretežno dvo- ali večsubstratne reakcije?

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

*oznake označujejo molekularnost reakcije, ne reda reakcije!

Dvosubstratne reakcije

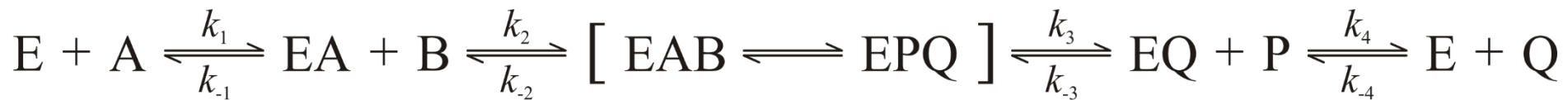
Delimo na:

- tiste, kjer nastane trojni kompleks
 - v naključnem zaporedju
 - v urejenem zaporedju

- tiste, kjer trojni kompleks ne nastane – reakcije s substituiranim encimom (Ping Pong) – potekajo v urejenem zaporedju

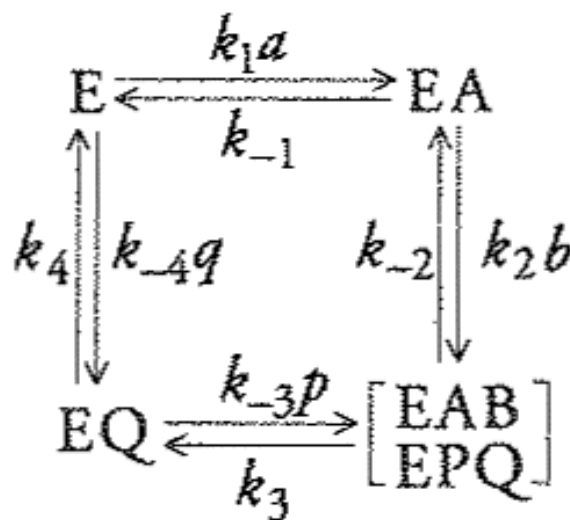
Predstavljeni mehanizmi predstavljajo najenostavnejše primere. V resnici so lahko mehanizmi bolj kompleksni in včasih težko določljivi ali pa se spreminjajo glede na pogoje.

Dvosubstratne reakcije – urejen sekvenčni mehanizem



po Clelandu

Po tem mehanizmu deluje veliko dehidrogenaz, zlasti od NAD^+ odvisnih.

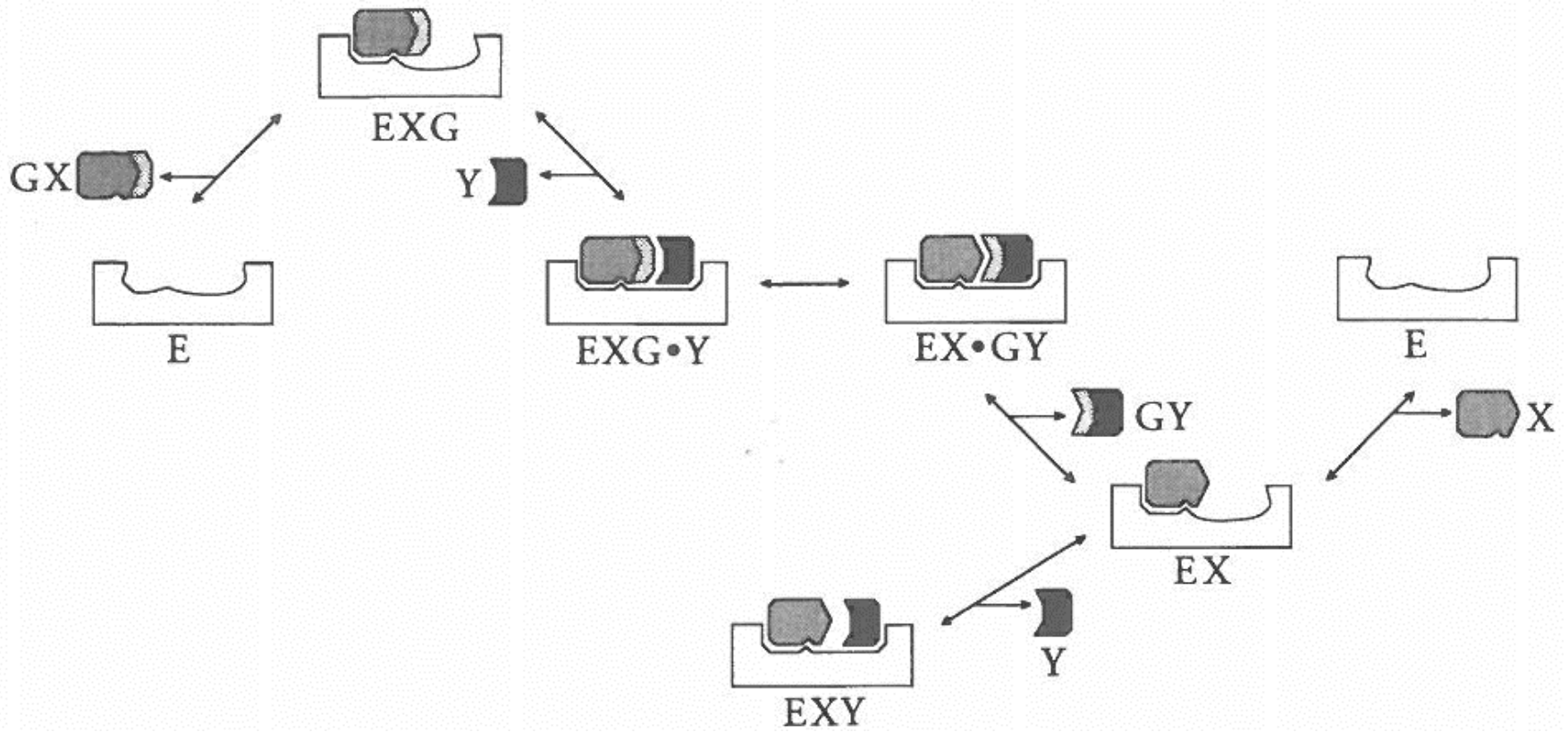


po King-Altmanu

Dvosubstratne reakcije – urejen sekvenčni mehanizem

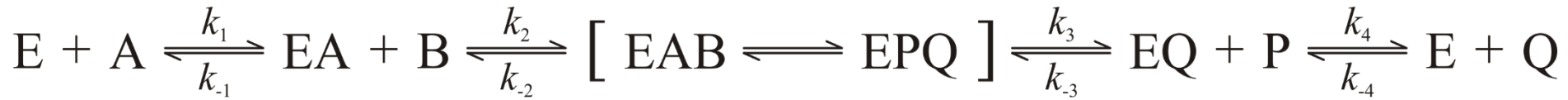
Zakaj poteče vezava v urejenem vrstnem redu?

Na primeru reakcije prenosa skupine: $\mathbf{GX + Y \rightleftharpoons GY + X}$



Ob vezavi prvega substrata pride do konformacijske spremembe, ki omogoči vezavo drugega.

Dvosubstratne reakcije – urejen sekvenčni mehanizem



$$v = \frac{\frac{V_+ ab}{K_{iA} K_{mB}} - \frac{V_- pq}{K_{mP} K_{iQ}}}{1 + \frac{a}{K_{iA}} + \frac{K_{mA} b}{K_{iA} K_{mB}} + \frac{K_{mQ} p}{K_{mP} K_{iQ}} + \frac{q}{K_{iQ}} + \frac{ab}{K_{iA} K_{mB}} + \frac{K_{mQ} ap}{K_{iA} K_{mP} K_{iQ}} + \frac{K_{mA} bq}{K_{iA} K_{mB} K_{iQ}} + \frac{pq}{K_{mP} K_{iQ}} + \frac{abp}{K_{iA} K_{mB} K_{iP}} + \frac{bpq}{K_{iB} K_{mP} K_{iQ}}}$$

mejne
hitrosti

$$V_+ = \frac{k_3 k_4 e_0}{k_3 + k_4}$$

$$V_- = \frac{k_{-1} k_{-2} e_0}{k_{-1} + k_{-2}}$$

konstante
inhibicije
nasprotne
reakcije

$$K_{iA} = k_{-1}/k_1$$

$$K_{iB} = (k_{-1} + k_{-2})/k_2$$

$$K_{iP} = (k_{-1} + k_4)/k_1$$

$$K_{iQ} = k_4/k_{-4}$$

K_{mA}

$$\frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)}$$

K_{mB}

$$\frac{(k_{-2} + k_3) k_4}{k_2 (k_3 + k_4)}$$

K_{mP}

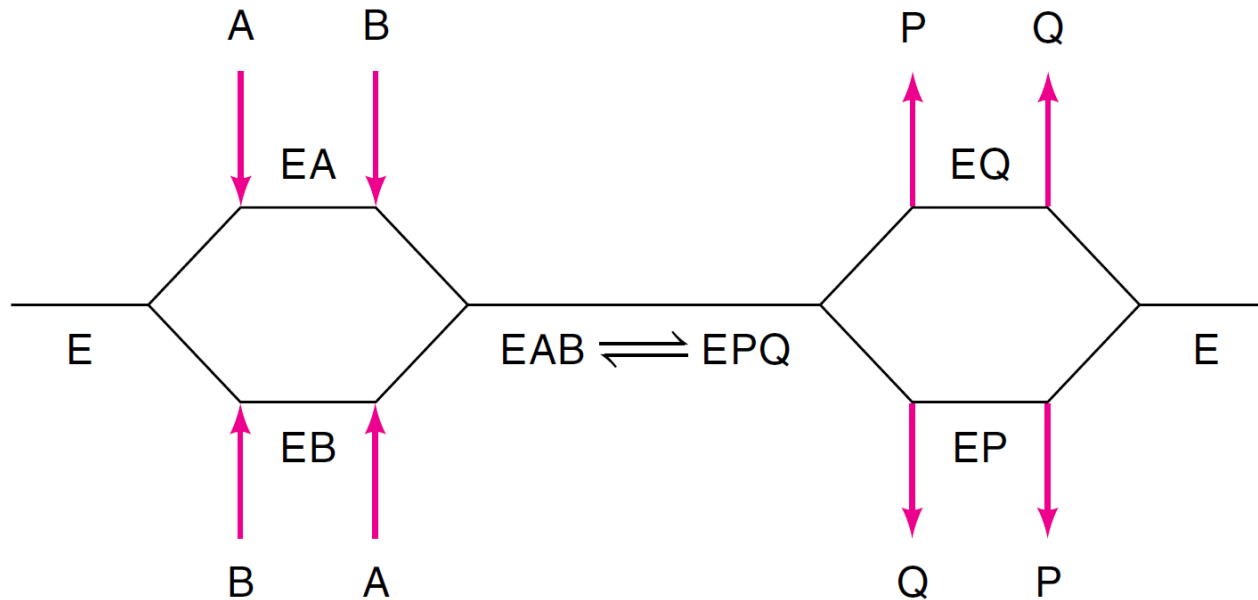
$$\frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{(k_{-1} + k_{-2}) k_3}$$

K_{mQ}

$$\frac{k_{-1} k_{-2}}{(k_{-1} + k_{-2}) k_{-4}}$$

Michaelisove
konstante

Dvosubstratne reakcije – naključni sekvenčni mehanizem



$$v = \frac{\frac{V_{+ab}}{K_{iA}K_{mB}} - \frac{V_{-pq}}{K_{mP}K_{iQ}}}{1 + \frac{a}{K_{iA}} + \frac{b}{K_{iB}} + \frac{p}{K_{iP}} + \frac{q}{K_{iQ}} + \frac{ab}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{pq}{K_{mP}K_{iQ}}}$$

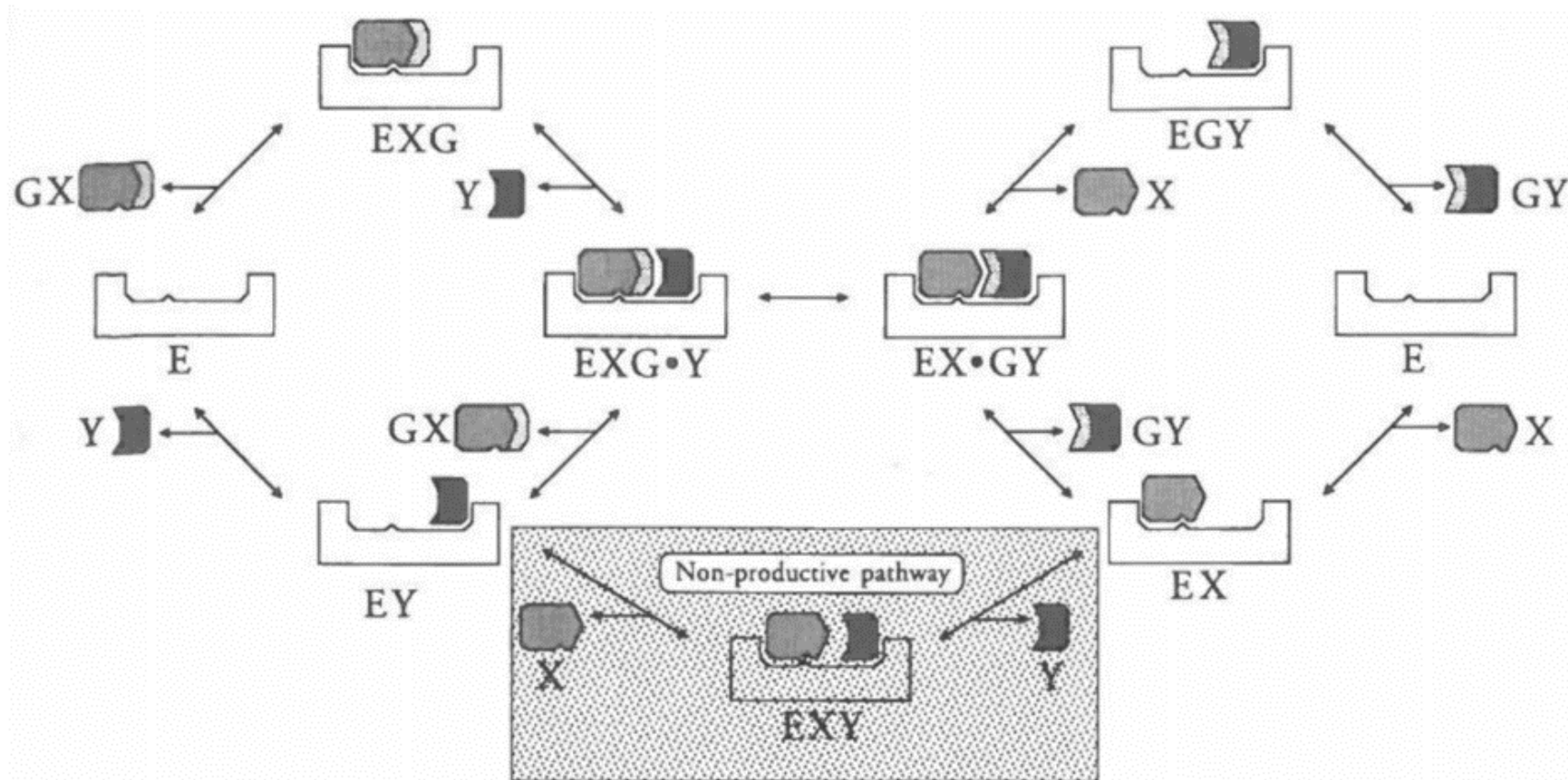
$$K_{iA}K_{mB} = K_{mA}K_{iB}$$

$$K_{iP}K_{mQ} = K_{mP}K_{iQ}$$

Primer: heksokinaza

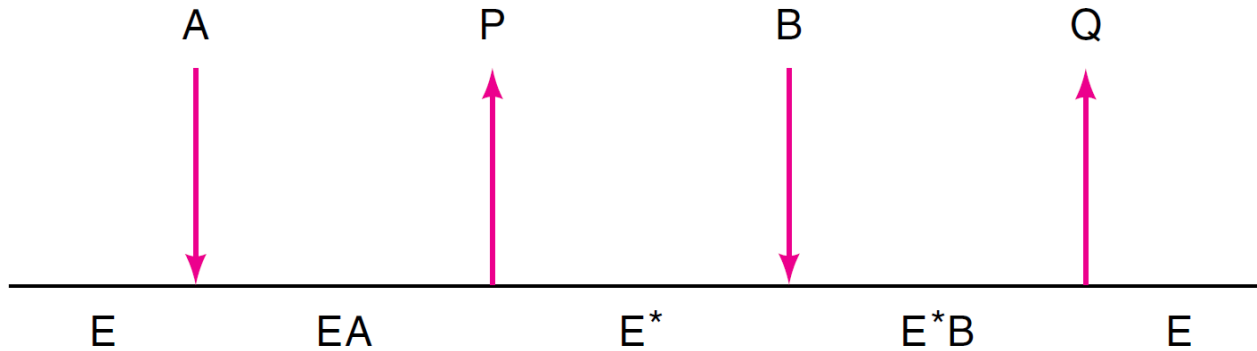
Dvosubstratne reakcije – naključni sekvenčni mehanizem

Na primeru reakcije prenosa skupine: $GX + Y \rightleftharpoons GY + X$



Dvosubstratne reakcije – mehanizem substituiranega encima

Ping Pong mehanizem



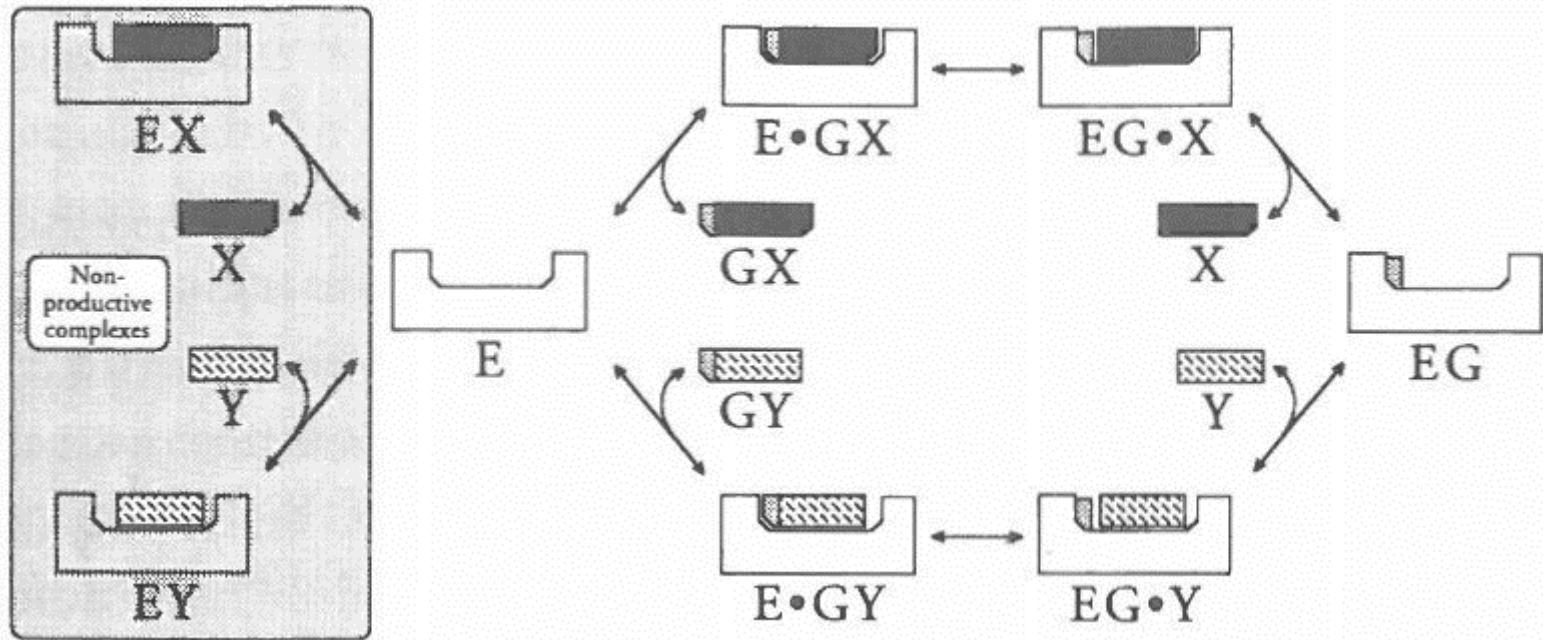
$$v = \frac{\frac{V_+ ab}{K_{iA} K_{mB}} - \frac{V_- pq}{K_{iP} K_{mQ}}}{\frac{a}{K_{iA}} + \frac{K_{mA} b}{K_{iA} K_{mB}} + \frac{p}{K_{iP}} + \frac{K_{mP} q}{K_{iP} K_{mQ}} + \frac{ab}{K_{iA} K_{mB}} + \frac{ap}{K_{iA} K_{iP}} + \frac{K_{mA} bq}{K_{iA} K_{mB} K_{iQ}} + \frac{pq}{K_{iP} K_{mQ}}}$$

Po tem mehanizmu deluje veliko transferaz.

Dvosubstratne reakcije – mehanizem substituiranega encima

Ping Pong mehanizem

Na primeru reakcije prenosa skupine: $\mathbf{GX + Y \rightleftharpoons GY + X}$



Dvosubstratne reakcije

Eksperimentalno parametre določamo tako, da merimo začetne hitrosti v odsotnosti produktov. Enačbe se na ta način poenostavijo do oblik:

$$v = \frac{V[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad \text{za mehanizme s trojnim kompleksom}$$

Za naključno tvorbo kompleksa dodatno velja še zveza: $K_{iA}K_{mB} = K_{mA}K_{iB}$

$$v = \frac{V[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad \text{za mehanizme s substituitanim encimom}$$

Če sistem nasičimo z enim od obeh substratov, se enačbe reducirajo na klasično MM kinetiko:

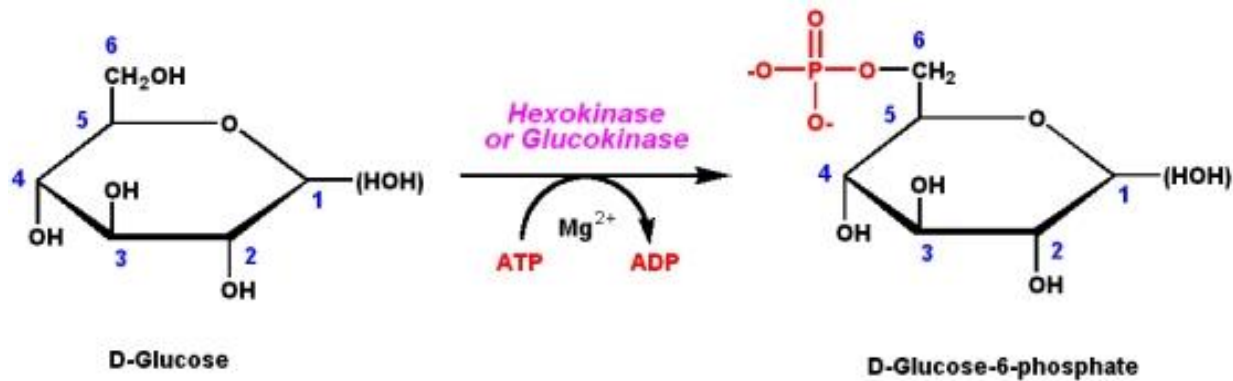
$$v = \frac{V[A]}{K_{mA} + [A]} \quad v = \frac{V[B]}{K_{mB} + [B]}$$

V tem primeru K_{mA} in K_{mB} imenujemo *mejni* Michaelisovi konstanti

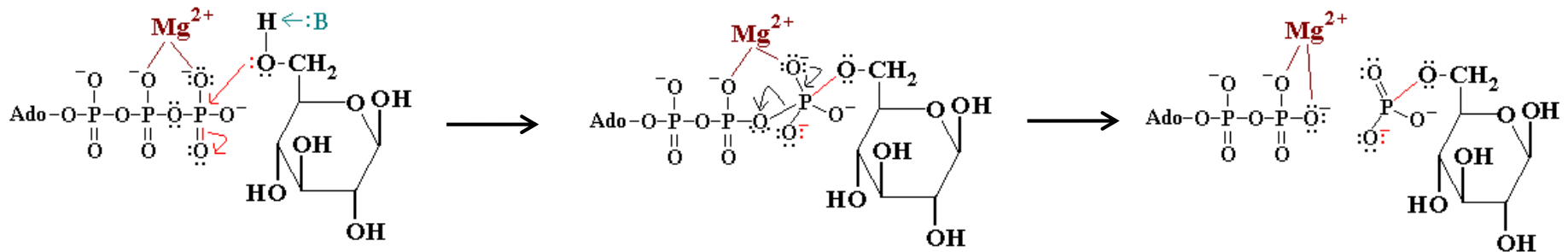
Heksokinaza

Heksokinaza (EC 2.7.1.1) je klasičen primer encima z naključnim Bi Bi mehanizmom.

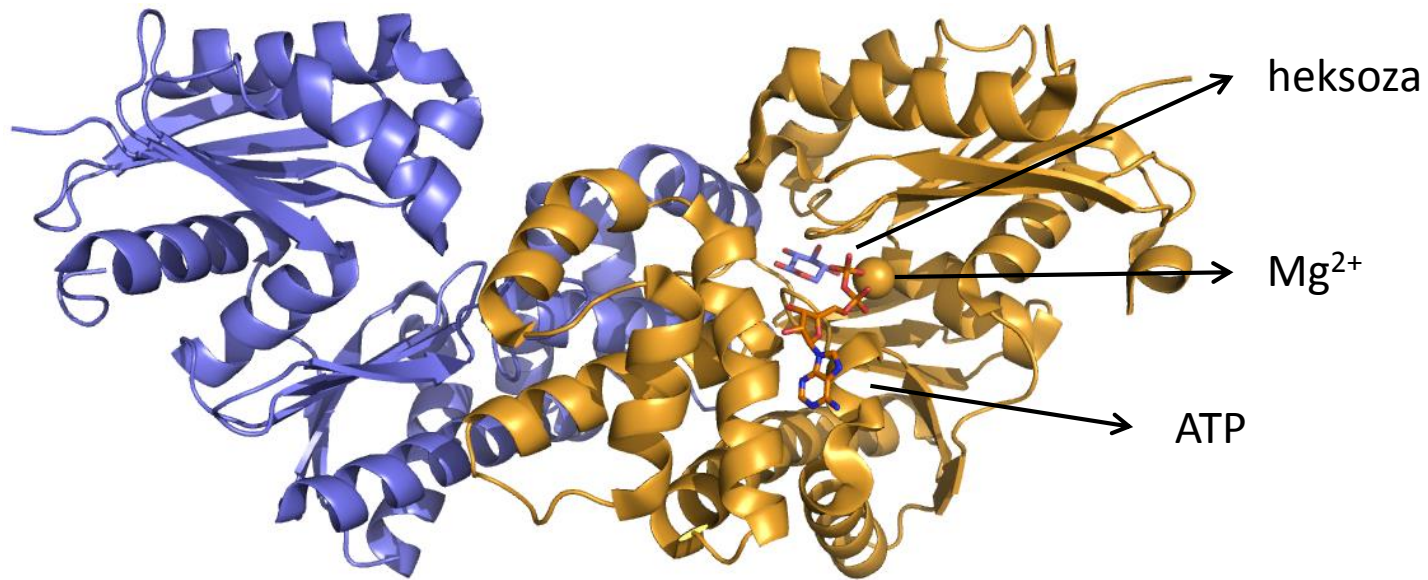
Reakcija heksokinaze:



Katalitični mehanizem heksokinaze:

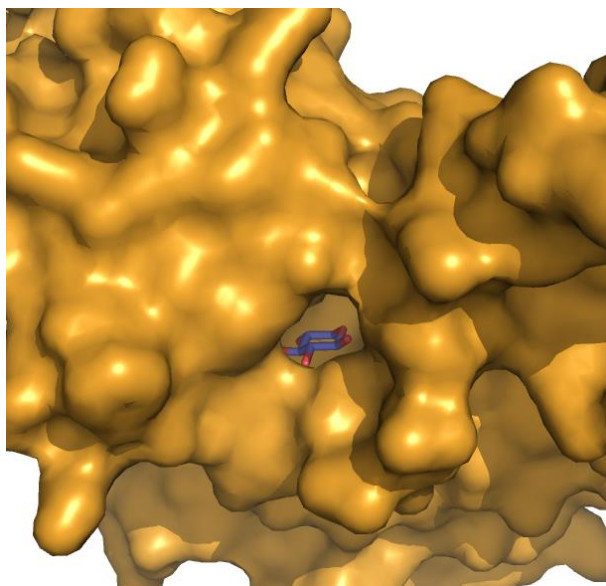


Heksokinaza

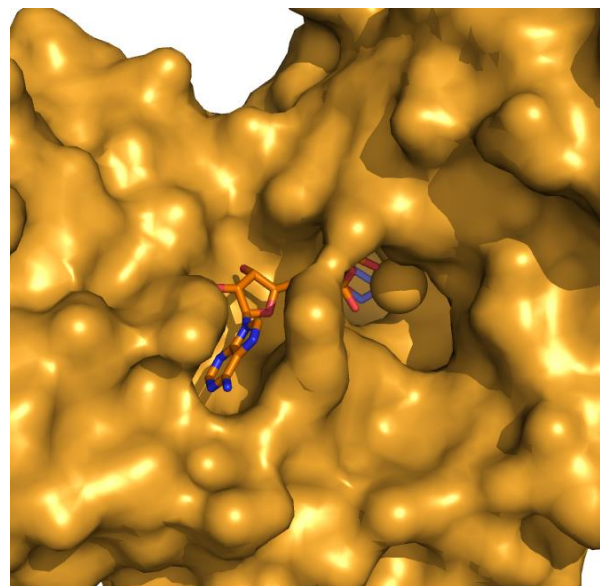


PDB ID 2E2Q

vezavno mesto za heksozo



vezavno mesto za ATP



Malat dehidrogenaza

Malat dehidrogenaza (EC 1.1.1.37) je klasičen primer encima z urejenim Bi Bi mehanizmom.

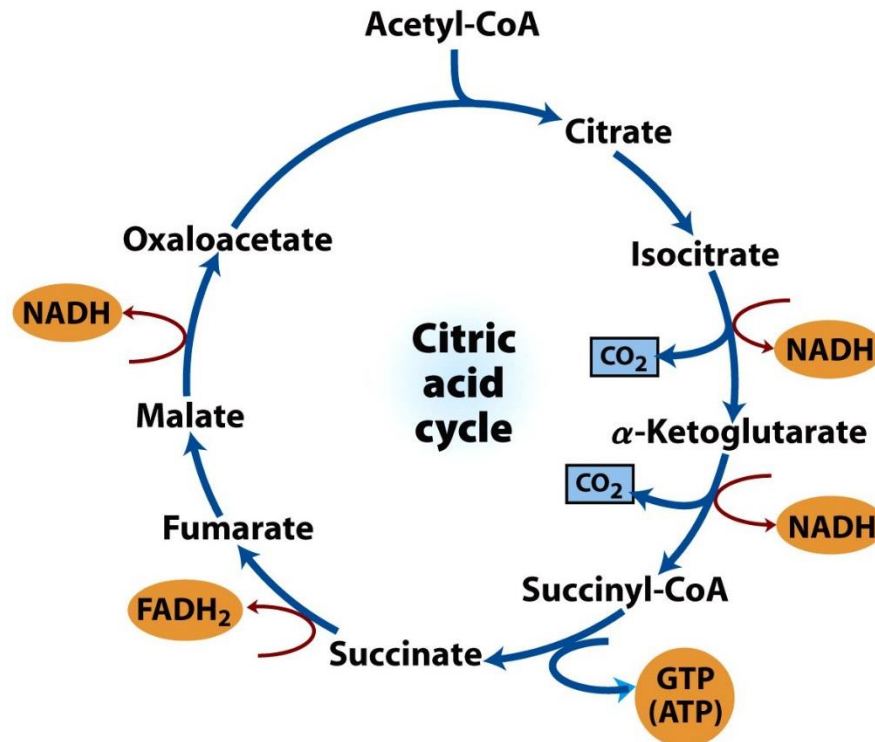
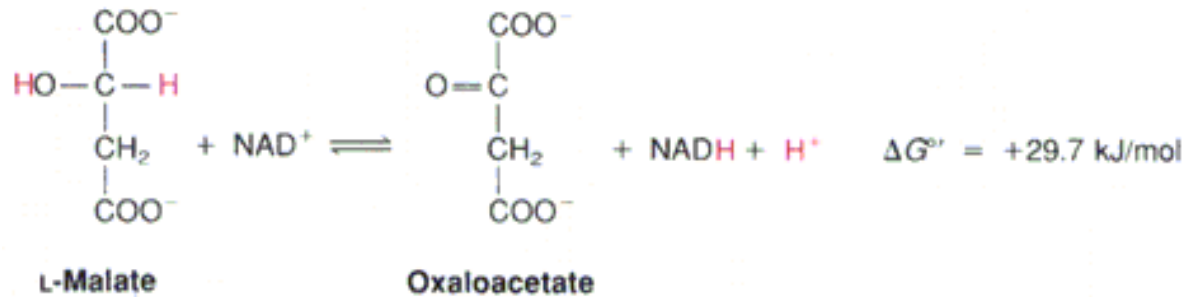
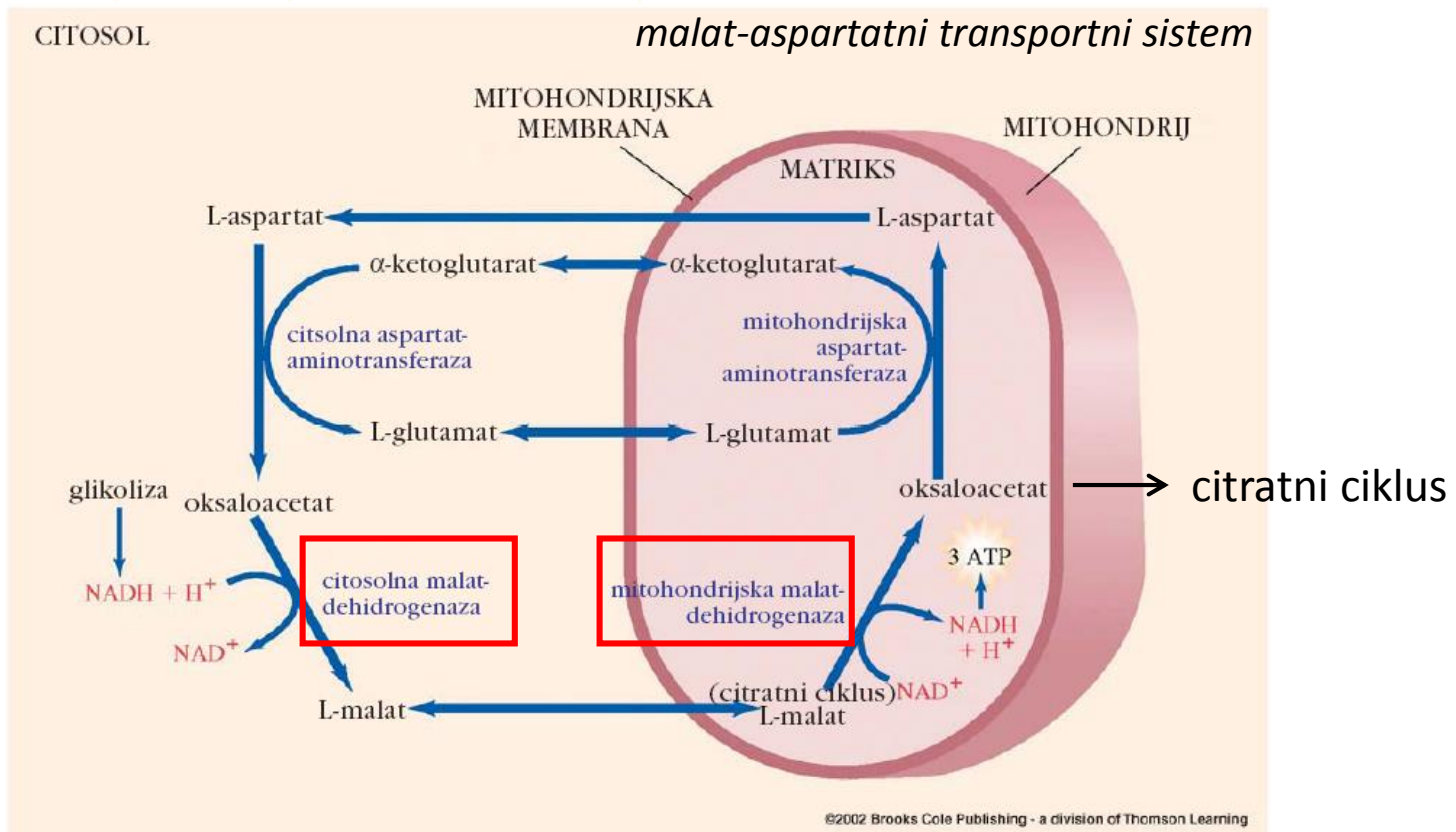
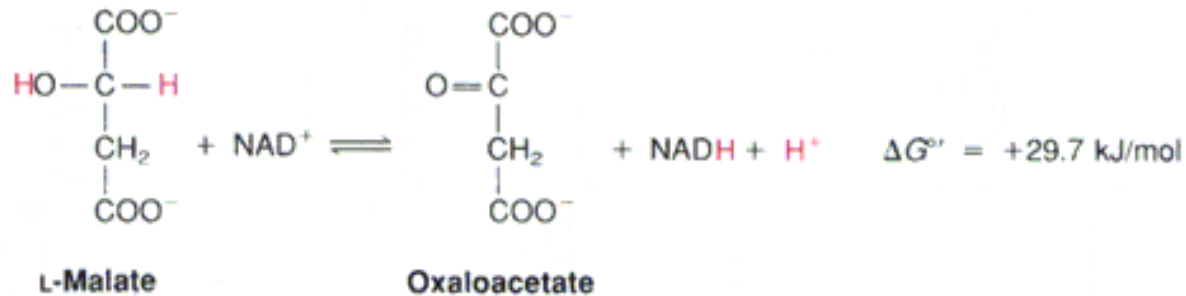


Figure 16-13
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

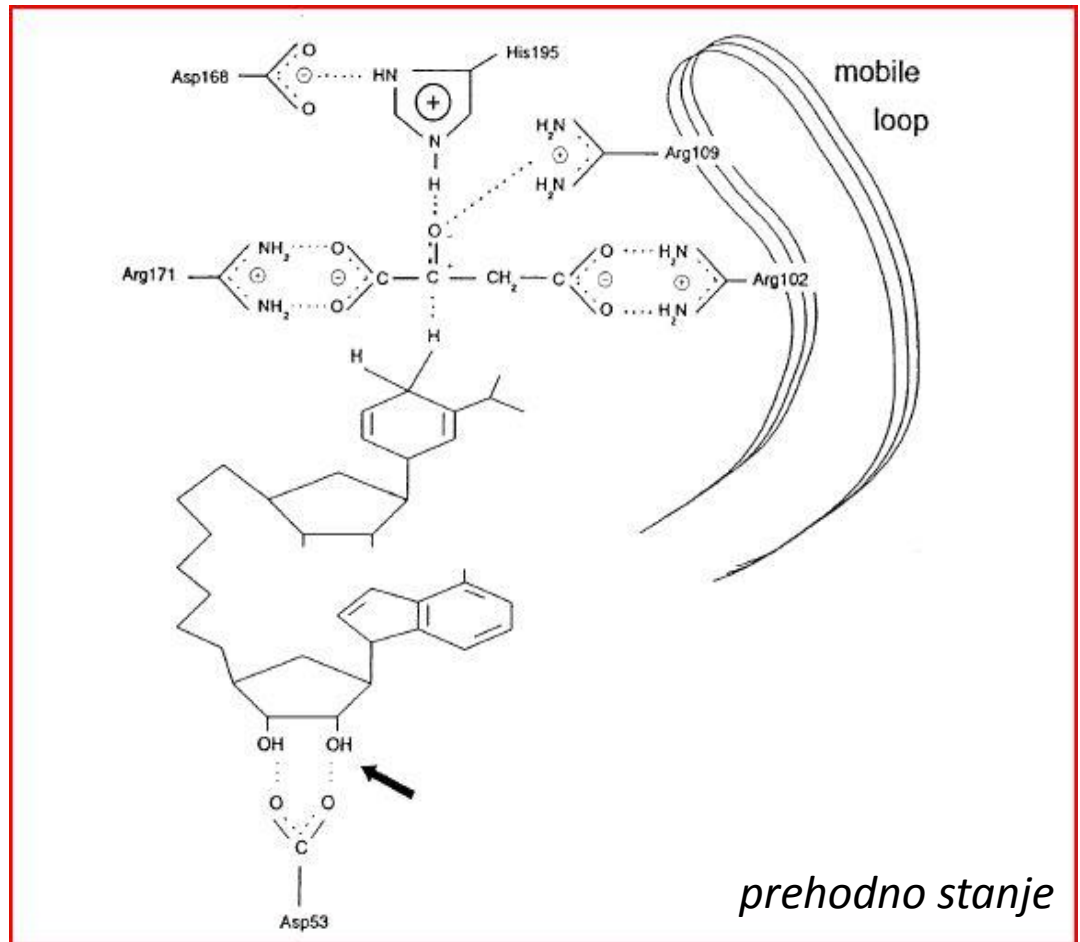
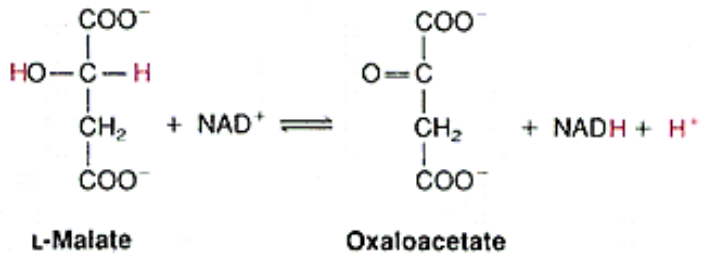
Malat dehidrogenaza

Malat dehidrogenaza (EC 1.1.1.37) je klasičen primer encima z urejenim Bi Bi mehanizmom.



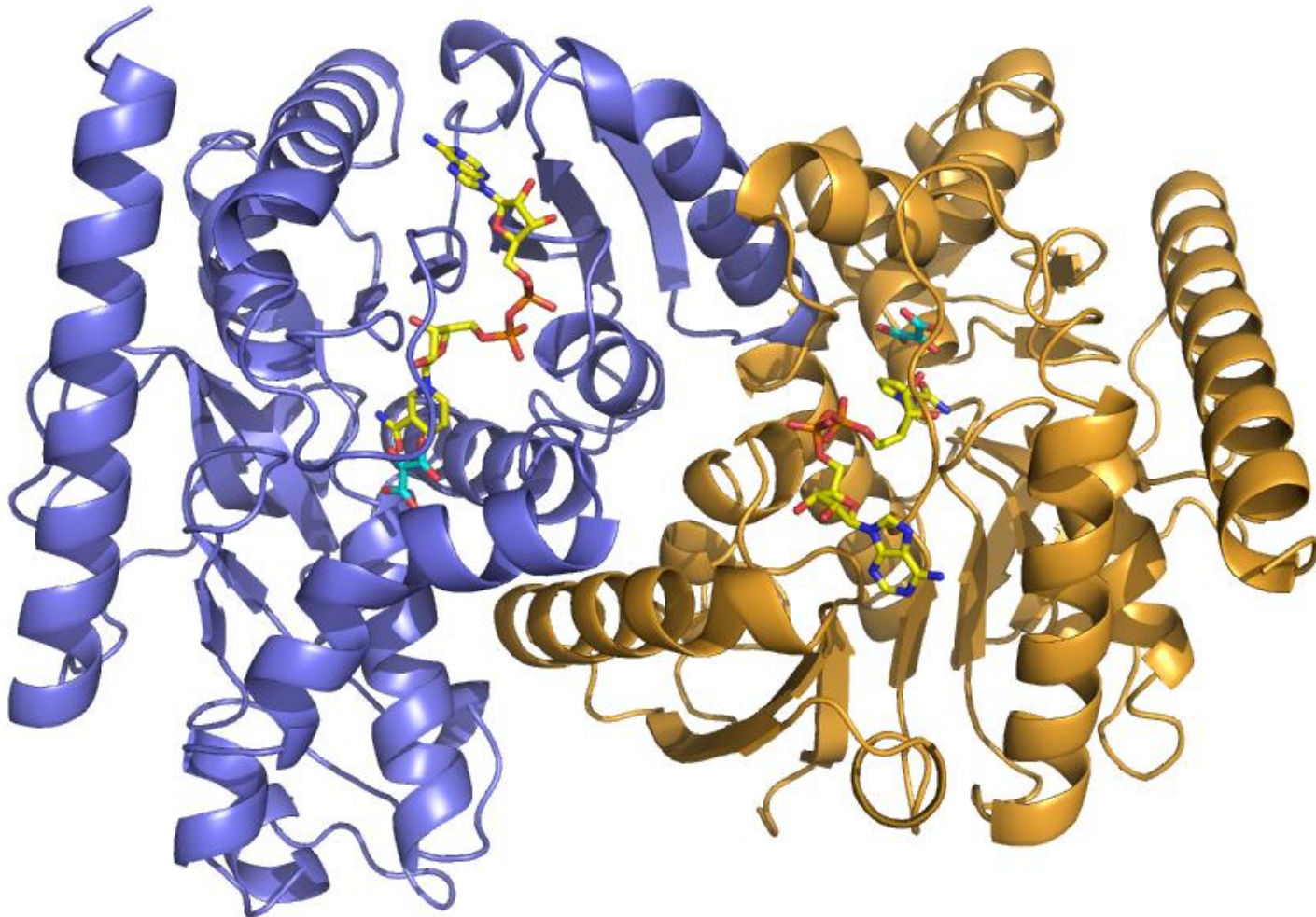
Malat dehidrogenaza

Malat dehidrogenaza (EC 1.1.1.37) je klasičen primer encima z urejenim Bi Bi mehanizmom.



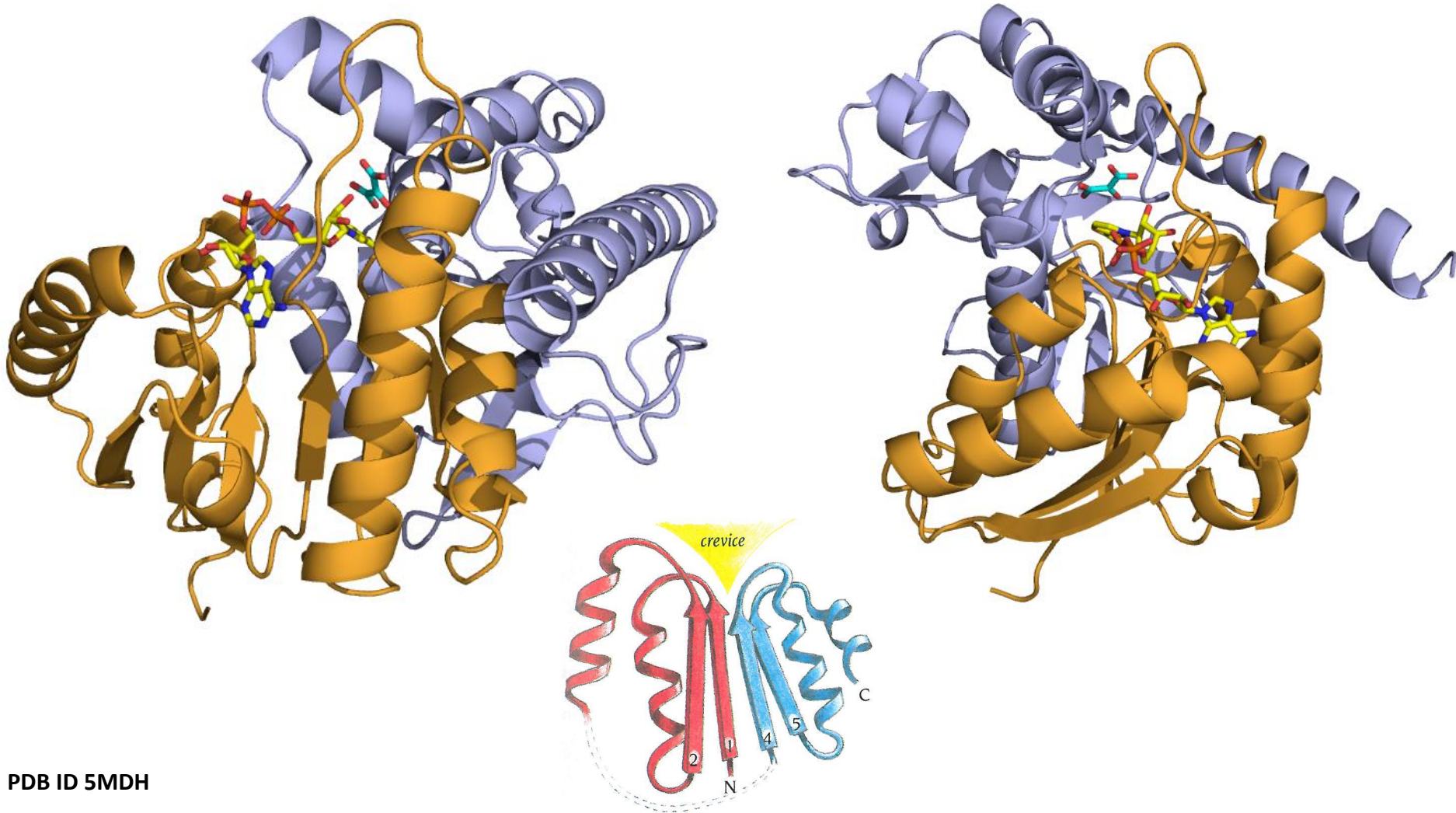
Malat dehidrogenaza

Malat dehidrogenaza je homodimer. Vsak monomer je sestavljen iz dveh domen. Aktivno mesto je med obema domenama. N-končna domena (Rossmannovo zvitje; oranžna) veže NAD(H), drugi substrat pa obe.



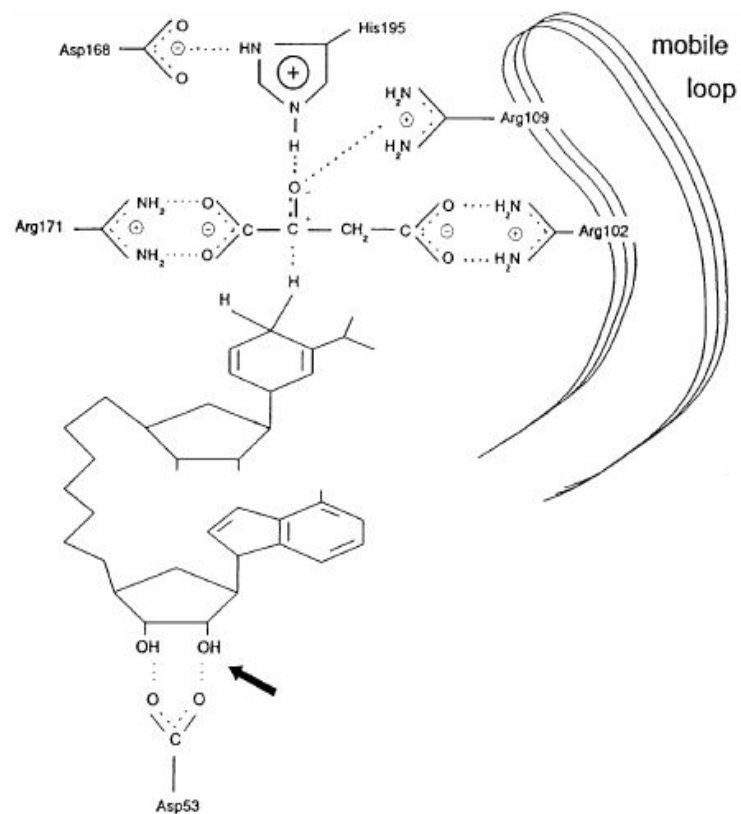
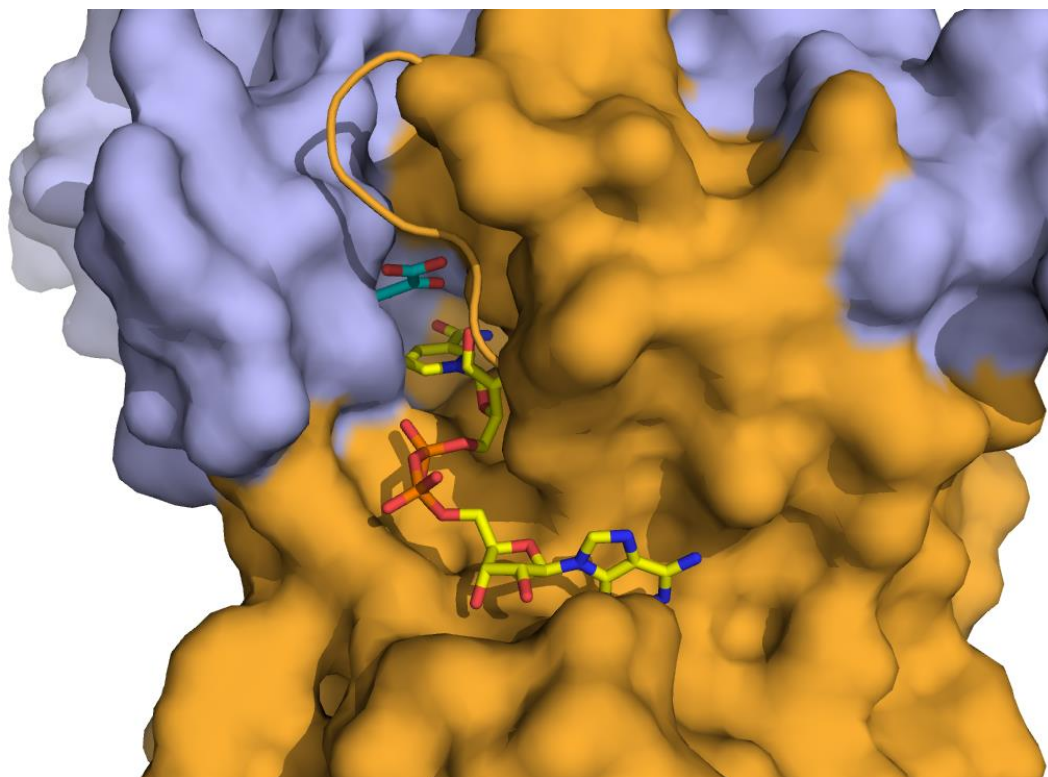
Malat dehidrogenaza

Malat dehidrogenaza je homodimer. Vsak monomer je sestavljen iz dveh domen. Aktivno mesto je med obema domenama. N-končna domena (Rossmannovo zvitje; oranžna) veže NAD(H), drugi substrat pa obe.



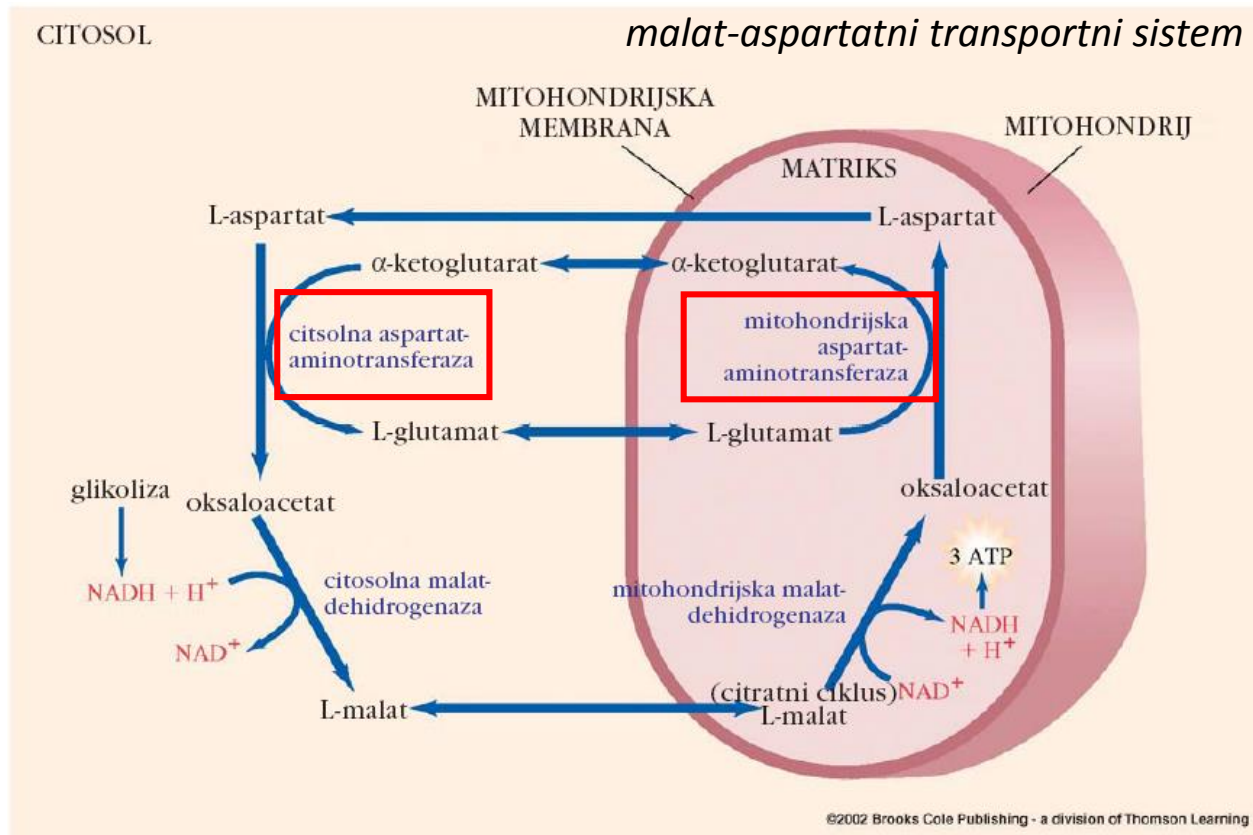
Malat dehidrogenaza

Malat dehidrogenaza je homodimer. Vsak monomer je sestavljen iz dveh domen. Aktivno mesto je med obema domenama. N-končna domena (Rossmannovo zvitje; oranžna) veže NAD(H), drugi substrat pa obe.



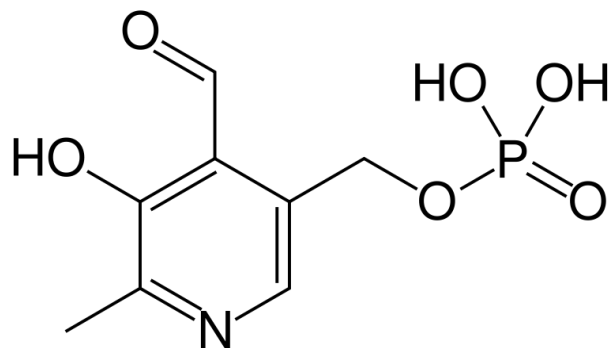
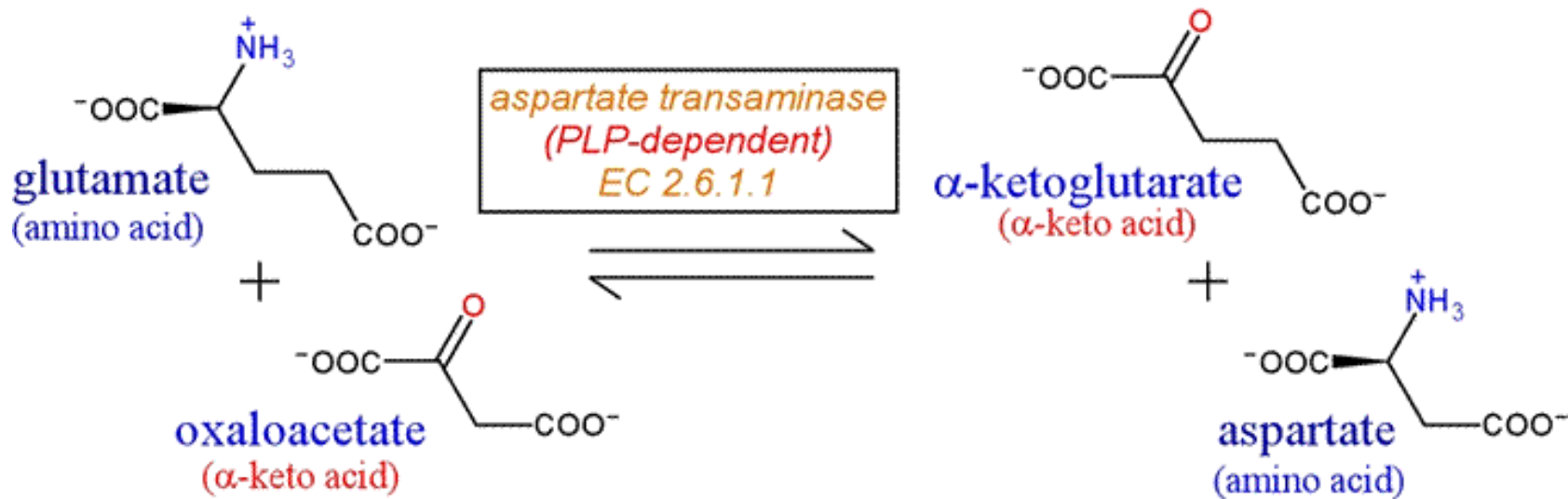
Aspartat transaminaza

Aspartat aminotransferaza (transaminaza; EC 2.6.1.1) je klasičen primer encima s Ping Pong Bi Bi mehanizmom.



Aspartat transaminaza

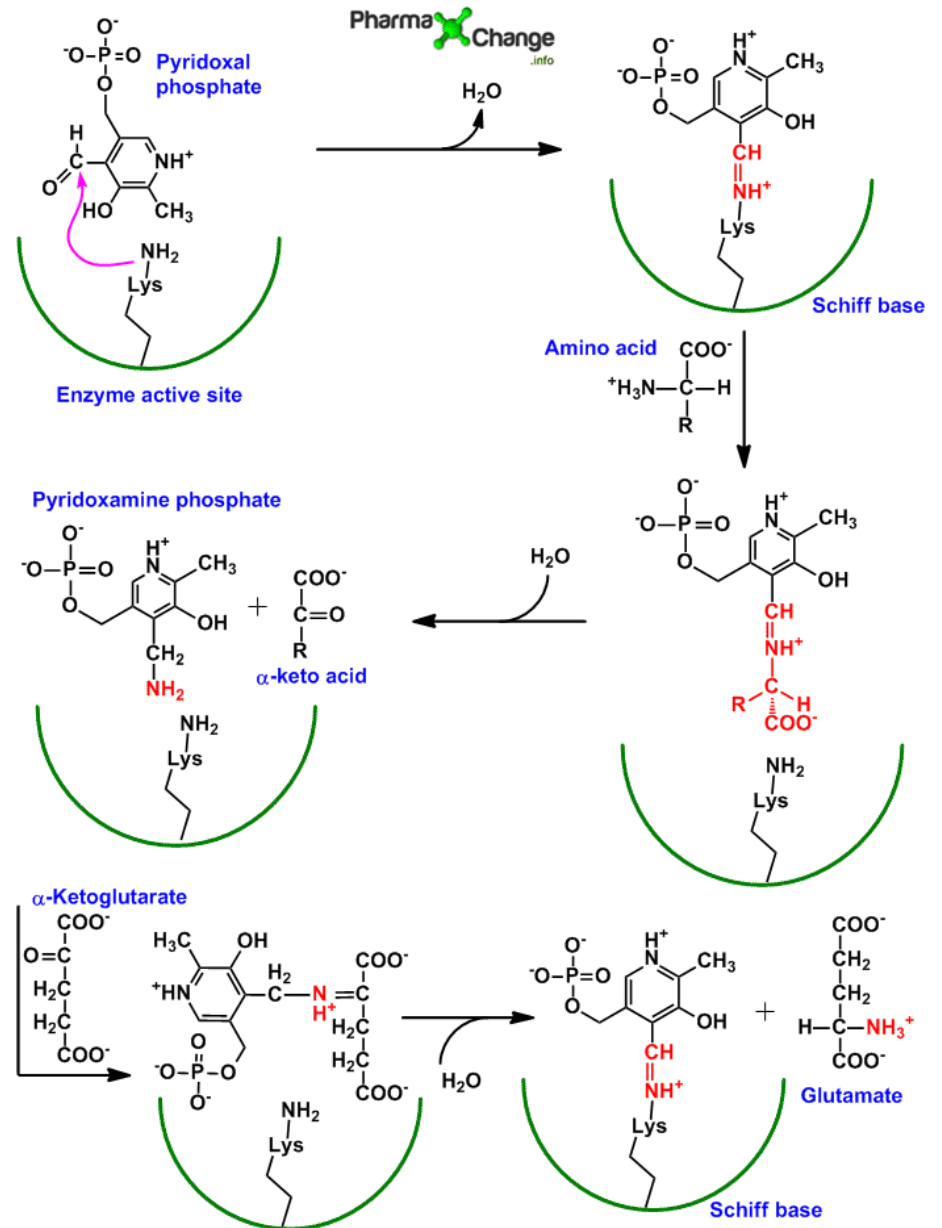
Aspartat aminotransferaza (transaminaza; EC 2.6.1.1) je klasičen primer encima s Ping Pong Bi Bi mehanizmom.



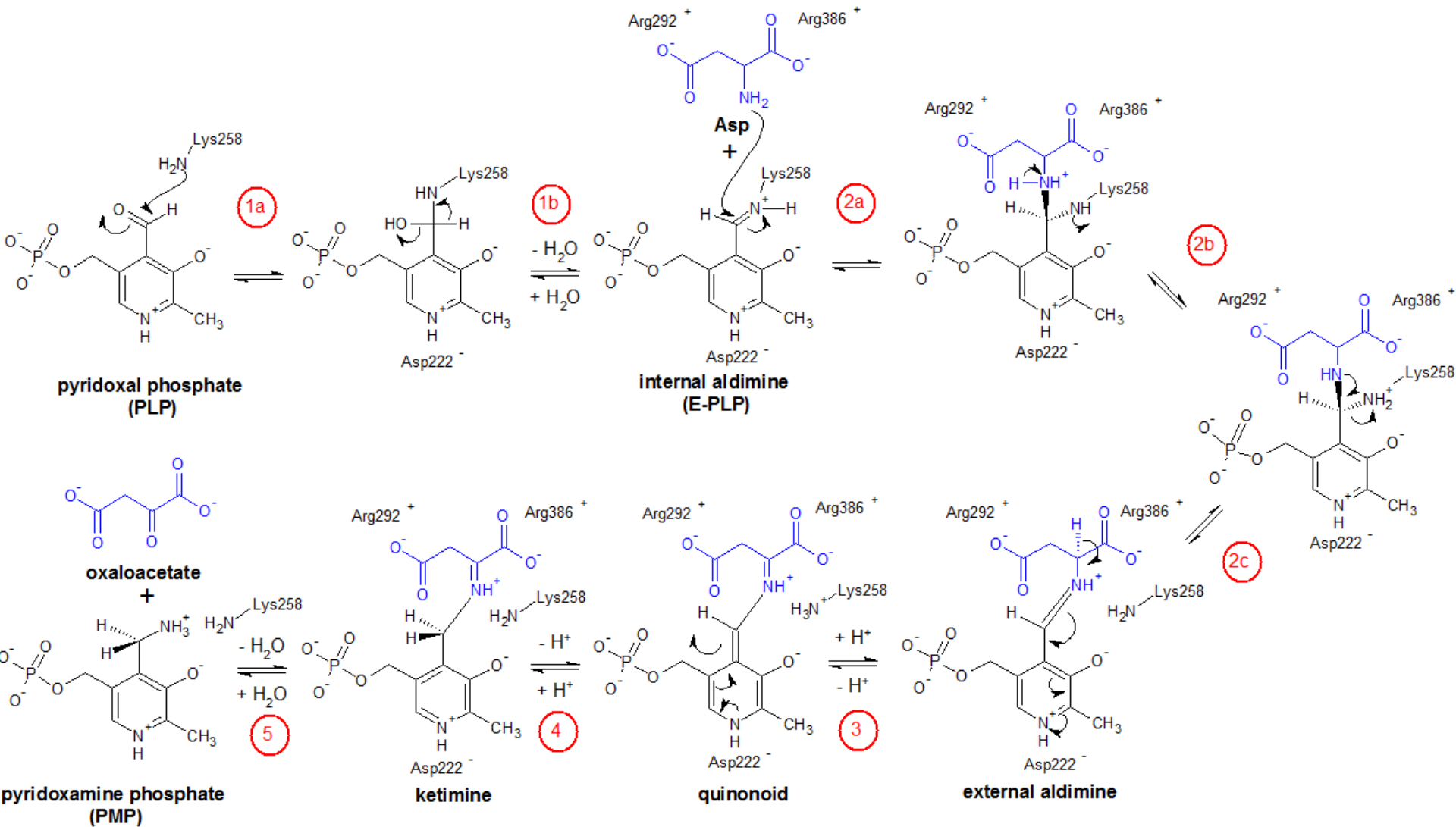
Kot večina transaminaz za delovanje potrebuje piridoksal fosfat (vitamin B6).

Aspartat transaminaza

Splošni mehanizem delovanja od PLP odvisnih transaminaz.

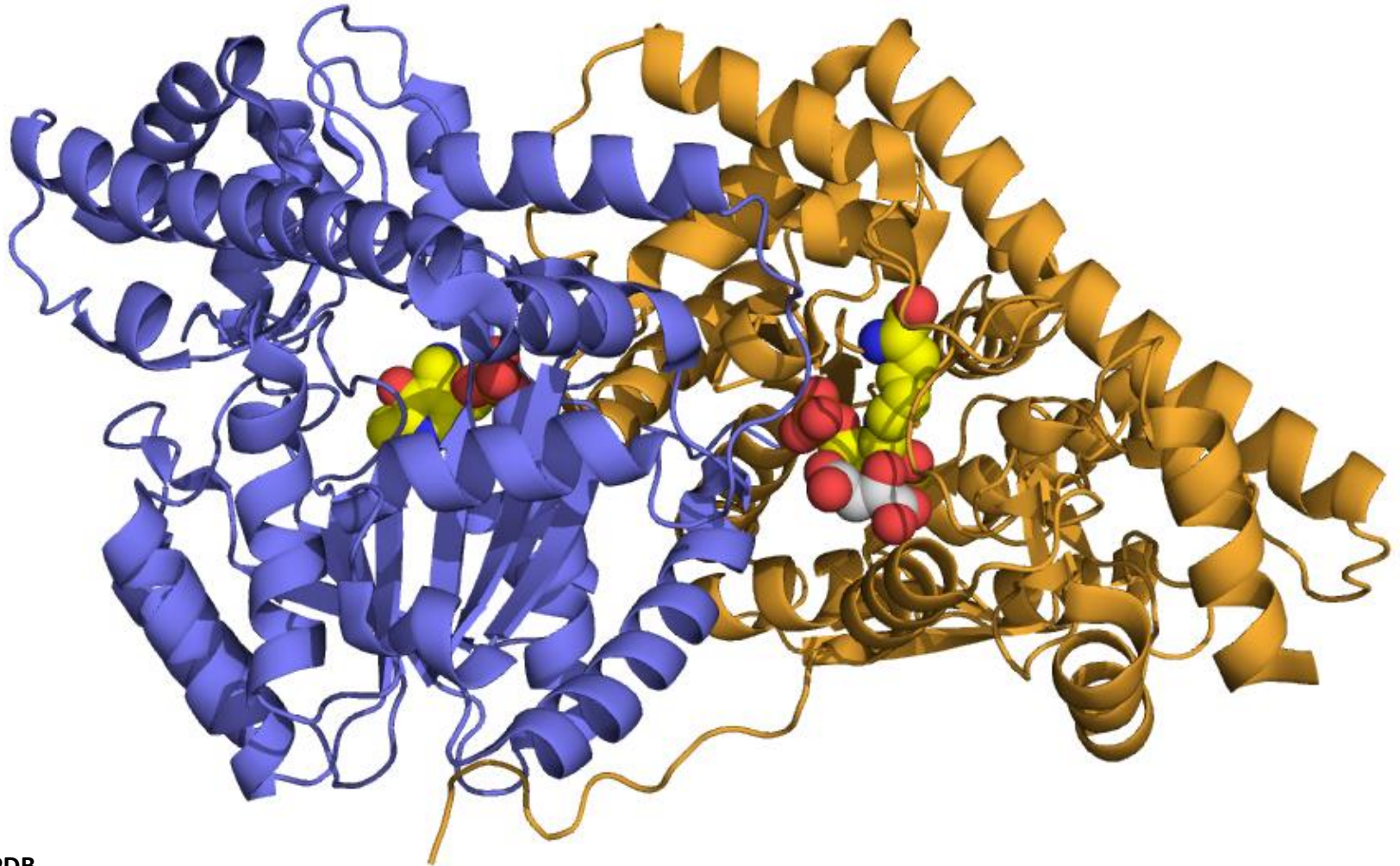


Aspartat transaminaza



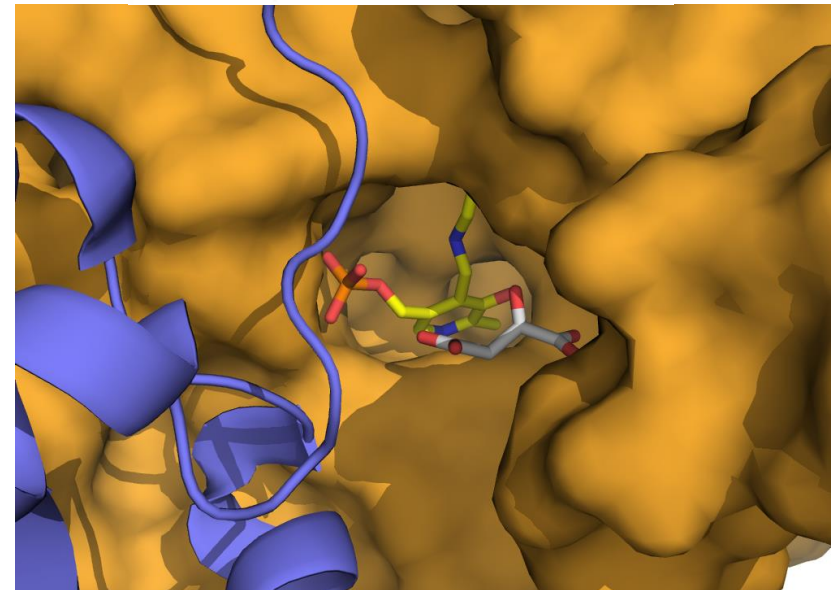
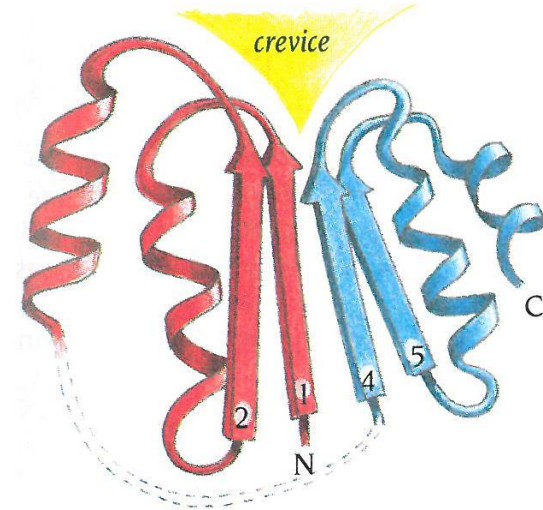
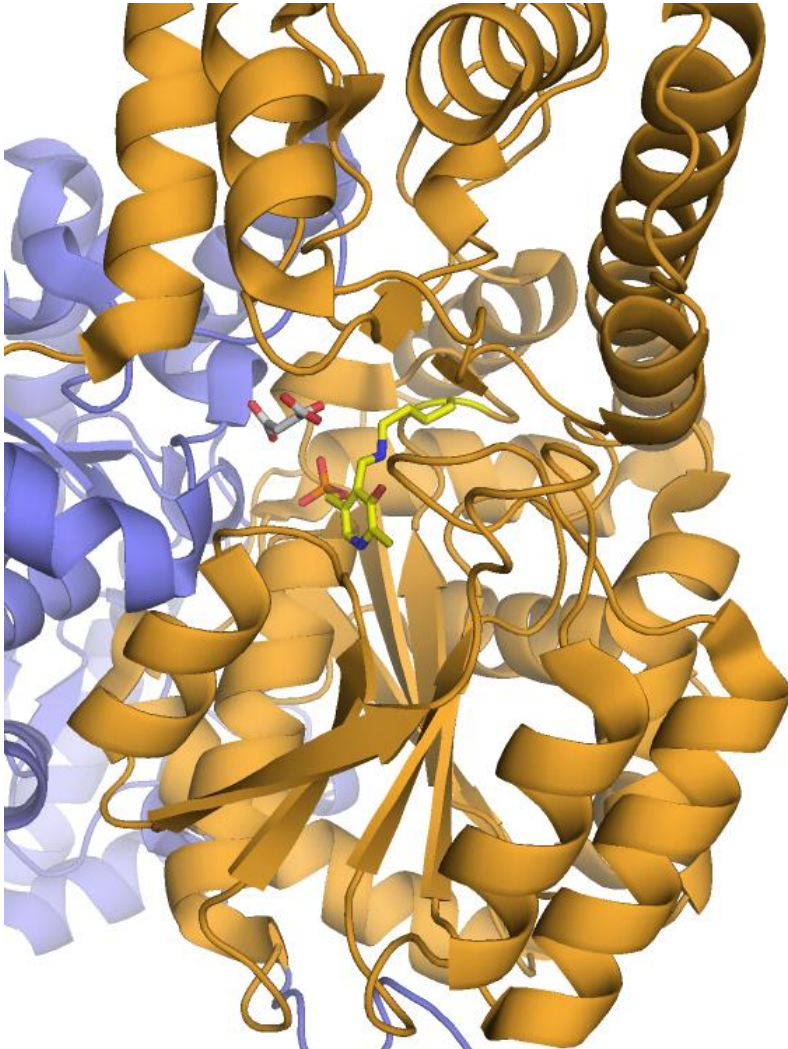
Aspartat transaminaza

Encim je homodimer. Vsak monomer vsebuje dve domeni, aktivno mesto je med obema domenama, na običajnem mestu domene $\alpha\beta\alpha$ sendviča. Aktivno mesto delno ograjuje tudi zanka z druge podenote.



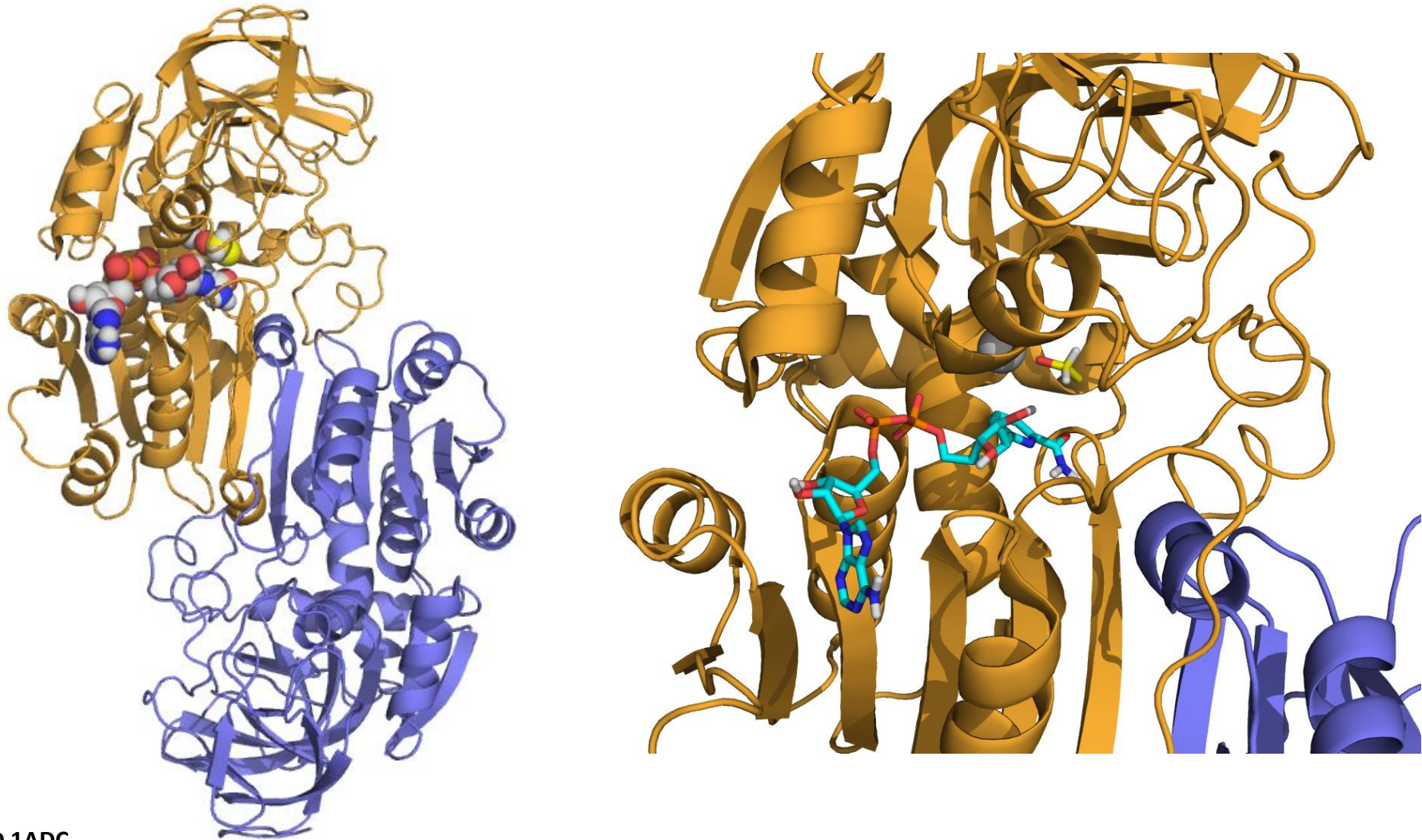
Aspartat transaminaza

Encim je homodimer. Vsak monomer vsebuje dve domeni, aktivno mesto je med obema domenama, na običajnem mestu domene $\alpha\beta\alpha$ sendviča. Aktivno mesto delno ograjuje tudi zanka z druge podenote.



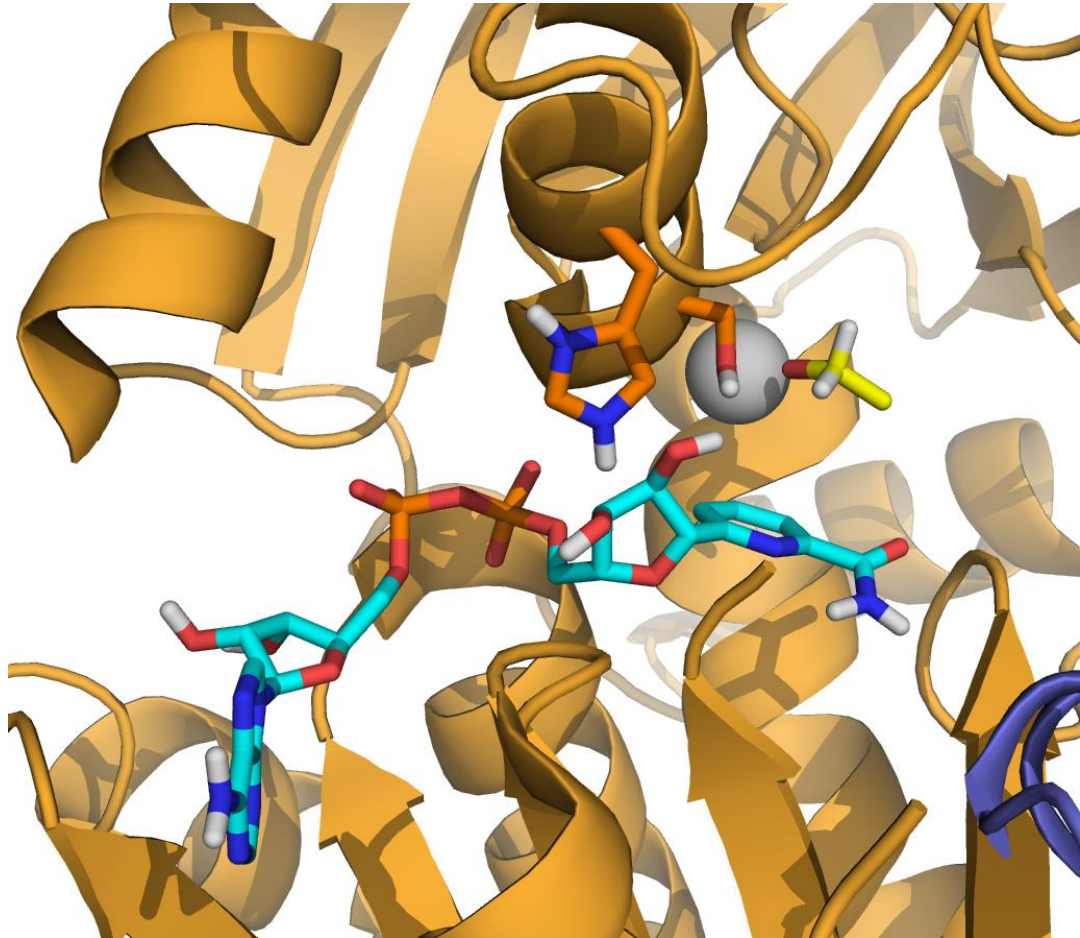
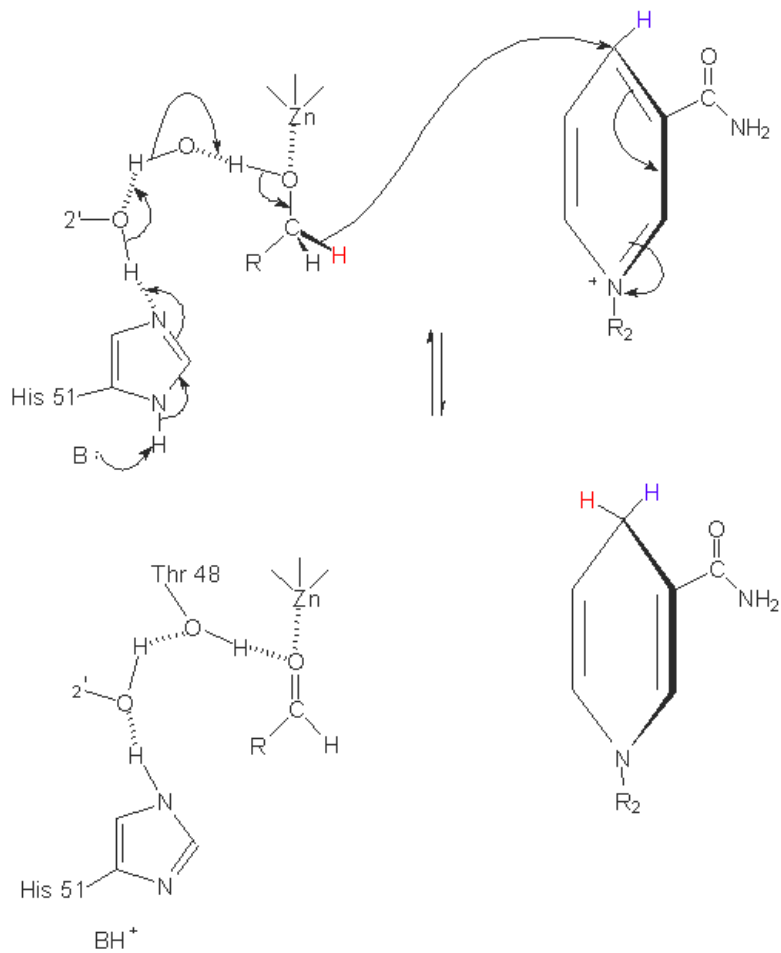
Alkohol dehidrogenaza

Od NAD odvisna alkohol dehidrogenaza (EC 1.1.1.1) katalizira oksidacijo alkoholov do aldehydov oz. ketonov (in obratno).



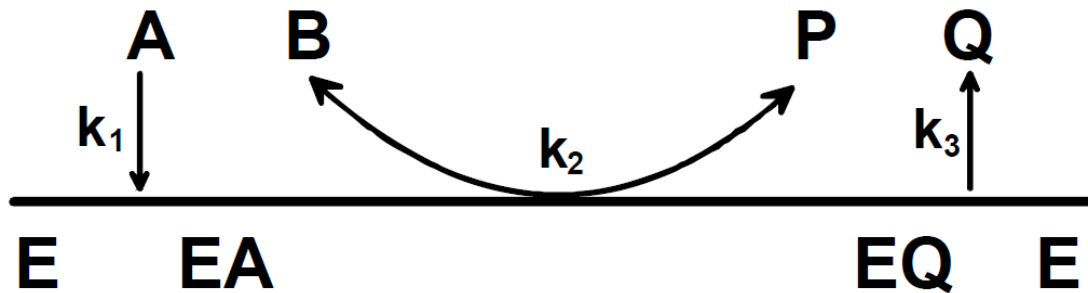
Alkohol dehidrogenaza

Od NAD odvisna alkohol dehidrogenaza (EC 1.1.1.1) katalizira oksidacijo alkoholov do aldehydov oz. ketonov (in obratno).



Alkohol dehidrogenaza

Za alkohol dehidrogenazo so prvotno postavili t.i. Theorell-Chance mehanizmu, obliko urejenega Bi Bi mehanizma, kjer trojni kompleks praktično ne obstaja.



Kasnejše študije so pokazale, da najverjetneje vezava substratov lahko poteka v naključnem vrstnem redu, sproščanje produktov pa poteka v urejenem zaporedju.