

Slide 1

ENCIMATIKA

ENCIMI: osnove, specifičnost encimov, klasifikacija
 ČIŠČENJE ENCIMOV, MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI
 ENCIMSKA KINETIKA: Michaelis-Menten model, V_{max} , K_m ,
 pretvorbena število, katalitična učinkovitost
 EFEKTORJI ENCIMSKEGA DELOVANJA: [E], [S], pH, T,
 inhibitorji, aktivatorji
 MEHANIZMI KATALIZE: kovalentna kataliza, kislinsko-bazna
 kataliza, primer lizocima
 KONTROLA ENCIMSKE AKTIVNOSTI: proteolitska cepitev,
 kovalentne modifikacije

Slide 2

ENCIMI
 Biološki katalizatorji: Encimi (**E**) katalizirajo biokemične
 spremembe substratov (reaktantov; **S**) v produkte (**P**).

Enostavni ali sestavljeni proteini
 Ribocimi: deli RNA z encimsko aktivnostjo (RNaza P in peptidil
 transferaza)

Encimi povečajo hitrost nekataliziranih reakcij za $10^6 - 10^{16}$ krat!
 Navadno encimsko katalizirane reakcije potekajo pri bolj blagih
 pogojih.

Primer	ureaza (razgradnja uree=sečnine)
Katalizirana	hitrost 3×10^4 /sec
Nekatalizirana	hitrost 3×10^{-10} /sec
Razmerje hitrosti	10^{14}

Specifični
 Encimi in njihovo uravnavanje sestavni deli metabolizma, njihovo
 delovanje je regulirano!

Slide 3

- Uporabljajo za delovanje stranske skupine aminokislin (predvsem kisle in bazične)
- Dodatne kemične skupine- **KOFAKTORJI**
 anorganski ioni- Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}
KOENCIMI- kompleksne organske molekule (NAD^+); prenašalci skupin ali kot posebne funkcionalne skupine, na katerih poteka katalitični proces
- Prostetična skupina- koencim se med delovanjem ne loči od encima, vezani kovalentno na encim (npr. hem, FAD)
- HOLENCIM**- kompleten aktivni encim (beljakovinski del + kovinski ion + kofaktor). **AOENCIM**- samo beljakovinski del

Metal Ion	Enzyme	Coenzyme	Entity Transferred	Representative Enzymes Using Coenzymes
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase Catalase Peroxidase	Thiamine pyrophosphate (TPP) Flavin adenine dinucleotide (FAD) Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	Aldehydes Hydrogen atoms Hydride ion (H^-)	Pyruvate dehydrogenase Succinate dehydrogenase Alcohol dehydrogenase
Ca^{2+}	Cytochrome oxidase			
Zn^{2+}	DNA polymerase Carbonic anhydrase Alcohol dehydrogenase	Coenzyme A (CoA) Pyridoxal phosphate (PLP)	Acyl groups Amino groups H atoms and alkyl groups	Acetyl-CoA carboxylase Aspartate aminotransferase Methylglutonyl-CoA mutase
Mg^{2+}	Hexokinase Glucose-6-phosphatase	Biotin (biocytin)	CO_2	Propionyl-CoA carboxylase
Mn^{2+}	Arginase	Tetrahydrofolate (THF)	Other one-carbon groups	Thymidylate synthase
K^+	Pyruvate kinase (also requires Mg^{2+})			
Ni^{2+}	Urease			
Mn	Nitrate reductase			
Se	Citrate lyase, peroxidase			

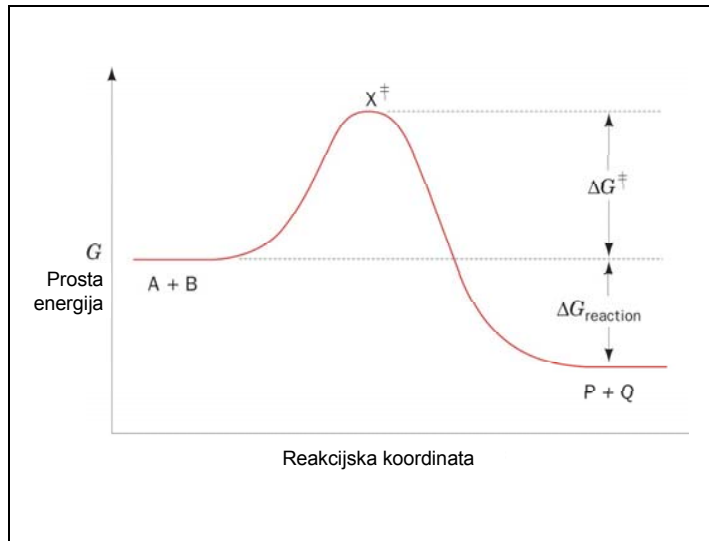
Slide 4

Coenzyme	Reaction Mediated
Biotin	Carboxylation
Cobalamin (B_{12}) coenzymes	Alkylation
Coenzyme A	Acyl transfer
Flavin coenzymes	Oxidation- reduction
Lipoic acid	Acyl transfer
Nicotinamide coenzymes	Oxidation- reduction
Pyridoxal phosphate	Amino group transfer
Tetrahydrofolate	One-carbon group transfer
Thiamine pyrophosphate	Aldehyde transfer

NEKATERI KOENCIMI

- Nekateri začasno asocirani z encimom (=kosubstrat)
- Med katalitskim ciklom so kemijsko spremenjeni, se morajo spremeniti nazaj v originalno stanje (na encimu ali s pomočjo drugih encimov)

Slide 5



Slide 6

Razlika med ΔG in ΔE_a

- Celotna sprememba proste energije reakcije je povezana z ravnotežno konstanto K_r .

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_r \quad (\text{smer reakcije})$$

- Aktivacijska energija je povezana s konstanto hitrosti reakcije:

$$k = k_{\max} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (\text{hitrost reakcije})$$

Pretvorba substrata v produkt poteka preko vmesnih stopenj. Tvorba aktiviranega kompleksa ES^* . V prvem delu pride do prepoznavanja substrata, v drugem delu do njegove pretvorbe:

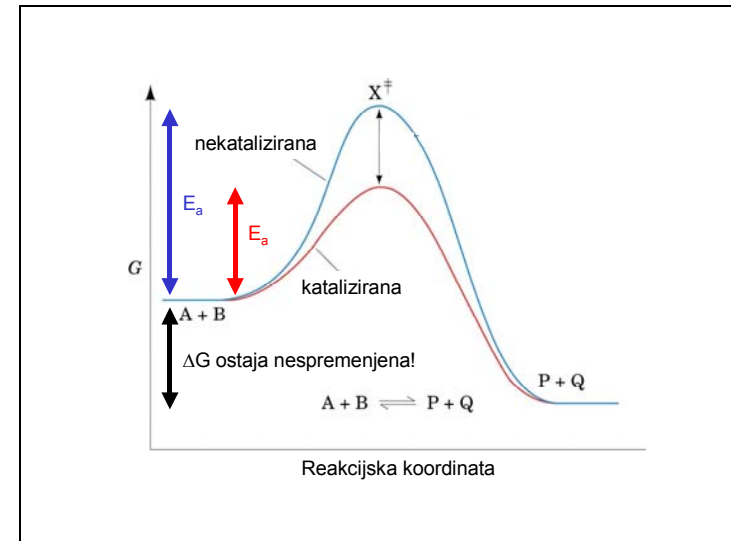


Pogosto imajo encimi večjo afiniteto do prehodnega (aktiviranega) stanja reakcije kot do substrata

Encimi povečajo reakcijsko hitrost z zmanjšanjem aktivacijske energije E_a

Ne vplivajo na ΔG reakcije

Slide 7

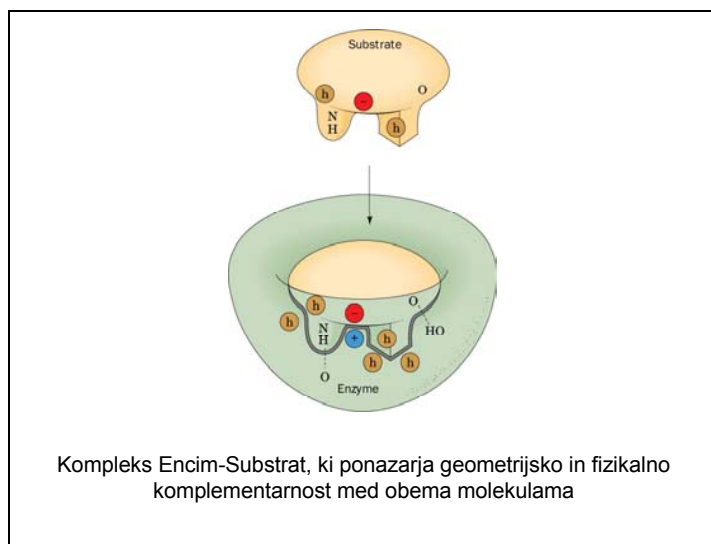


Slide 8

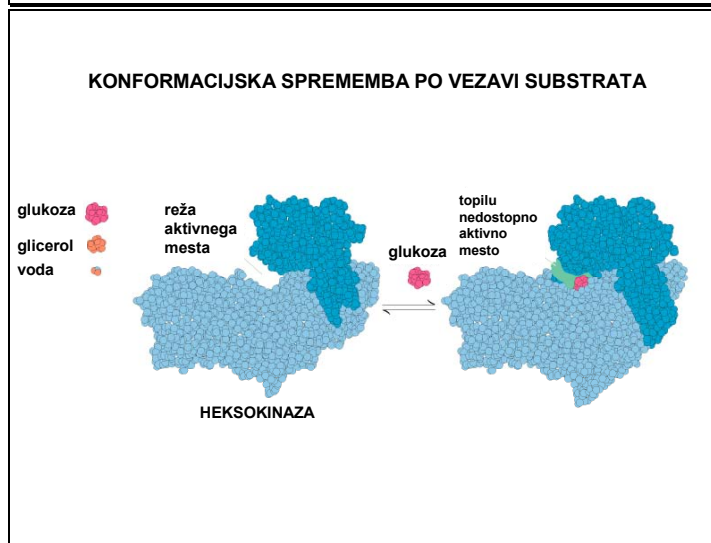
SPECIFIČNOST ENCIMOV

- Encim selektivno "prepozna" substrat v zmesi (samo nekatere reakcije hitrejšje od drugih mogočih v zmesi)
- Encim tvorijo produkte z zelo velikim izkoristkom – (večinoma > 95%)
- Specifičnost zagotavlja struktura encima –prileganje substrata aktivnemu centru encima
- Specifičnost omogoča tudi regulacijo aktivnosti
- Uporaba v biotehnologiji, farmaciji, itd.
- Substrat se veže na encim (običajno večji od S) s šibkimi vezmi: H-vezi, van der Waalsove, ionske, včasih tudi hidrofobne interakcije
- Dva mehanizma vezave:
 - Ključ-ključavnica (Fisher)
 - Inducirano prileganje (induced-fit) (Koshland) sprememba konformacije pri vezavi S (tudi monomerni E!!)

Slide 9



Slide 10



Slide 11

ENCIMSKA NOMENKLATURA

Kriterij delitve: vrsta kemijske reakcije
E.C. (encimska komisija pri IUPAC)

- univerzalni decimalni sistem
- številka E.C in sistematsko poimenovanje

- 1. Oksidoreduktaze **reakcije oksidacije-redukcije**
Donor e⁻ : akceptor e⁻ oksidoreduktaza
Primer: etanol:NAD⁺ oksidoreduktaza
EC 1.1.1.1 alkoholna dehidrogenaza
- 2. Transferaze **prenos funkcionalnih skupin**
Donor skupine: akceptor skupine ime-skupine-transferaza
Primer: Glu:oksalacetat aminotransferaza
- 3. Hidrolaze **hidroliza vezi**
Substrat hidrolaza
Primer: dipeptid hidrolaz)
- 4. Liaze **odstranitev skupin s tvorbo dvojnih vezi**
- 5. Izomeraze **prenos funkcionalnih skupin znotraj molekule**
- 6. Ligaze (sintetaze) **tvorba vezi povezana s hidrolizo ATP**

Slide 12

Enzyme Nomenclature - Mozilla Firefox

http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)

In consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)

Enzyme Nomenclature

Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

World Wide Web version prepared by [G.P. Moss](mailto:g.p.morris@qmul.ac.uk)
Department of Chemistry, Queen Mary University of London,
Mile End Road, London, E1 4NS, UK
g.p.morris@qmul.ac.uk

To SEARCH for information on enzymes on the Database [CLICK HERE](#)

This page contains general information on enzyme nomenclature. It includes links to individual documents, and the number of these will increase as more sections of the enzyme list are revised. It also provides [advice](#) on how to suggest new enzymes for listing, or correction of existing entries.

Historical Introduction

In *Enzyme Nomenclature* 1992 there was an [historical introduction](#). This web version is slightly edited from that in the book.

Printed Version

Published in *Enzyme Nomenclature* 1992 (Academic Press, San Diego, California, ISBN 0-12-227164-5 (hardback), 0-12-227165-3 (paperback)) with Done

start | ENZYME.ppt | 17467arrows | 19% | 23:35 | 17.4.2005

Slide 13

EC Class	Description	Sub-classes	Up to
EC 1	Oxidoreductases		
EC 1.1	Acting on the CH-OH group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.2	Acting on the aldehyde or oxo group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.3	Acting on the CH-CH group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.4	Acting on the CH-NH ₂ group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.5	Acting on the CH-NH group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.6	Acting on NADH or NADPH	sub-subclasses	up to 50
EC 1.7	Acting on other nitrogenous compounds as donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.8	Acting on a sulfur group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.9	Acting on a heme group of donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.10	Acting on diphenols and related substances as donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.11	Acting on a peroxide as acceptor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.12	Acting on hydrogen as donor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.13	Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen (oxygenases)	sub-subclasses	up to 50
EC 1.14	Acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	sub-subclasses	up to 50
EC 1.15	Acting on superoxide radicals as acceptor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.16	Oxidizing metal ions	sub-subclasses	up to 50
EC 1.17	Acting on CH or CH ₃ groups	sub-subclasses	up to 50
EC 1.18	Acting on iron-sulfur proteins as donors	sub-subclasses	up to 50
EC 1.19	Acting on reduced flavodoxin as donor	sub-subclasses	up to 50
EC 1.20	Acting on phosphorus or arsenic as donors	sub-subclasses	up to 50

Slide 14

EC Class	Description	Sub-classes	Up to
EC 2	Transferases		
EC 2.1	Transferring one-carbon groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.2	Transferring aldehyde or ketonic groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.3	Acytransferases	sub-subclasses	up to 50
EC 2.4	Cyclo-oxygenases	sub-subclasses	up to 50
EC 2.5	Transferring alkyl or aryl groups, other than methyl groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.6	Transferring nitrogenous groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.7	Transferring phosphorus-containing groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.8	Transferring sulfur-containing groups	sub-subclasses	up to 50
EC 2.9	Transferring selenium-containing groups	sub-subclasses	up to 50
EC 3	Hydrolases		
EC 3.1	Acting on ester bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.2	Glycoylases	sub-subclasses	up to 50
EC 3.3	Acting on ether bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.4	Acting on peptide bonds (peptidases)	sub-subclasses	up to 50
EC 3.5	Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.6	Acting on acid anhydrides	sub-subclasses	up to 50
EC 3.7	Acting on carbon-carbon bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.8	Acting on halide bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.9	Acting on phosphorus-nitrogen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.10	Acting on sulfur-nitrogen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 3.11	Acting on carbon-phosphorus bonds	sub-subclasses	up to 50

Slide 15

EC Class	Description	Sub-classes	Up to
EC 4	Lyases		
EC 4.1	Carbon-carbon lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.2	Carbon-oxygen lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.3	Carbon-nitrogen lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.4	Carbon-sulfur lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.5	Carbon-halide lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.6	Phosphorus-oxygen lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 4.99	Other lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 5	Isomerases		
EC 5.1	Racemases and epimerases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.2	cis-trans-Isomerases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.3	Intramolecular isomerases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.4	Intramolecular transferases (mutases)	sub-subclasses	up to 50
EC 5.5	Intramolecular lyases	sub-subclasses	up to 50
EC 5.99	Other isomerases	sub-subclasses	up to 50
EC 6	Ligases		
EC 6.1	Forming carbon-oxygen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.2	Forming carbon-sulfur bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.3	Forming carbon-nitrogen bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.4	Forming carbon-carbon bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.5	Forming phosphoric ester bonds	sub-subclasses	up to 50
EC 6.6	Forming nitrogen-metal bonds	sub-subclasses	up to 50

Slide 16

MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Vzorčne metode
Kontinuirne metode

spektrofotometrične, spektrofluorimetrične, manometrične, elektrokemijske, polarimetrične...

Encimska enota

količina encima, ki pretvori 1 mol substrata v 1 sekundi (KATAL).

Tudi poljubno definirane enote (razgradnja mola vezi, sprememba mase substrata, sprememba absorpcije v časovni enoti...).

O=P([O-])([O-])c1ccc([N+](=O)[O-])cc1
 $\xrightarrow{H_2O}$
Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1
 $+ P_i$
 $\xrightarrow{OH^-}$
[O-]c1ccc([N+](=O)[O-])cc1

p-nitrofenilfosfat
p-nitrofenol
p-nitrofenolat
 $\lambda=405nm$

Slide 17

ČIŠČENJE ENCIMOV

	V (ml)	E konc. (E.E./ml)	Skupna akt. (E.E.)	Konc.prot. (mg/ml)	Spec. Akt (E.E./mg)	Izk. (%)	Stopnja očiščenja
Homogenat	40	5	200	10	0.5	100	1
Supernatant	20	10	200	6	1.67	100	3.34
Kromatografija 1	10	15	150	1	15	75	30
Kromatografija 2	4	20	80	0.5	40	40	80

Encimska koncentracija število encimskih enot/ml raztopine

Skupna aktivnost skupno (totalno) število encimskih enot v vzorcu

Specifična aktivnost število encimskih enot/mg proteina v vzorcu

Izkoristek skupna aktivnost glede na začetni vzorec

Stopnja očiščenja specifična aktivnost glede na začetni vzorec

Slide 18

MICHAELIS-MENTEN MODEL

Leonor Michaelis in Maude Menten, 1913

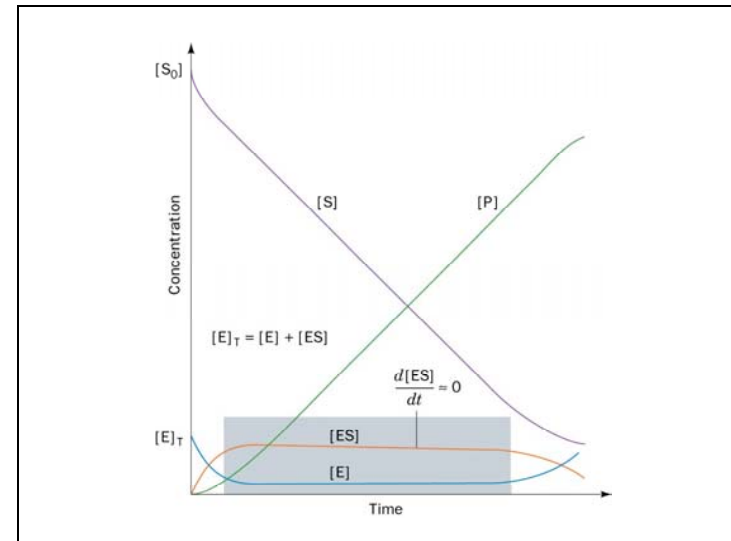
$$E + S \xrightleftharpoons[k_1]{k_2} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

Predpostavke

- [S] >> [E] ; ves E je v kompleksu ES; [ES] je zelo majhna
- Nastanek kompleksa ES je zelo hiter in reverzibilen
- Razpad ES v produkte in prost encim ni reverzibilen
- Pri teh pogojih merimo začetno hitrost reakcije

Enosubstratni model
(Dvosubstratni modeli)

Slide 19



Slide 20

$$E + S \xrightleftharpoons[k_1]{k_2} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

(1) $v_0 = k_3[ES]$ ob naštetih predpostavkah je začetna hitrost v_0 enaka produktu k_3 in [ES]

$v_{+ES} = k_1[E][S]$ hitrost nastajanja kompleksa ES

$v_{-ES} = (k_2 + k_3)[ES]$ hitrost izginjanja kompleksa ES

$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$ ko je vzpostavljeno stacionarno stanje je [ES] stalna in hitrosti v_{+ES} in v_{-ES} enaki

$[ES] = [E][S] / ((k_2 + k_3) / k_1)$ izraz $(k_2 + k_3) / k_1$ je enak novi konstanti-**Michaelis-Mentenova konstanta (K_m)**

(2) $[ES] = [E][S] / K_m$ zaradi prebitka koncentracije prostega S je [S] praktično enaka celotni koncentraciji substrata. Koncentracija prostega encima, [E], enaka totalni encimski koncentraciji [E]_T zmanjšani za koncentracijo ES, [ES]

(3) $[E] = [E_T] - [ES]$
 $[ES] = (([E_T] - [ES])[S]) / K_m$ to dobimo, če vstavimo (3) v (2)

$[ES] = [E_T]([S] / K_m) / (1 + [S] / K_m)$ če preuredimo

(4) $[ES] = [E_T]([S] / ([S] + K_m))$ in še malo preuredimo

Slide 21

(5) $v_0 = k_3[E_T]([S]/([S] + K_m))$ če vstavimo izraz za [ES] iz (4) v (1)

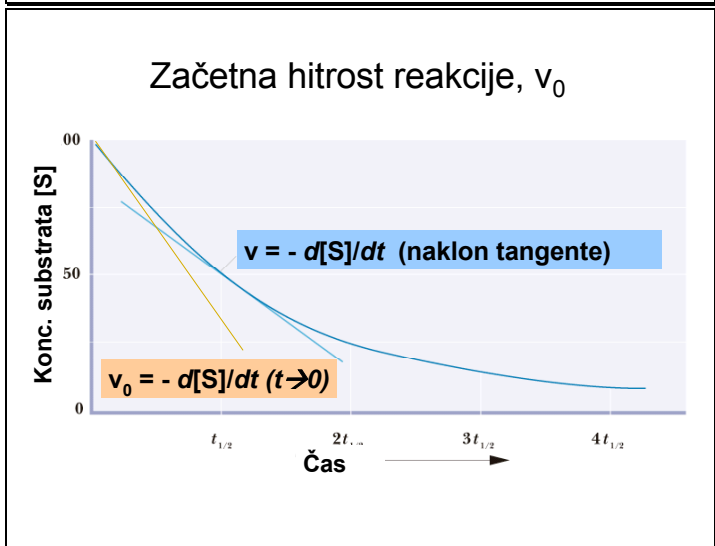
(6) $V_{max} = k_3[E_T]$ pri nasičenju encima s substratom, ko je [S] >> K_m, se razmerje [S]/([S] + K_m) približa vrednosti 1

$v_0 = V_{max} \cdot ([S]/([S] + K_m))$ če vstavimo (6) v (5) dobimo **Michaelis-Mentenovo enačbo**

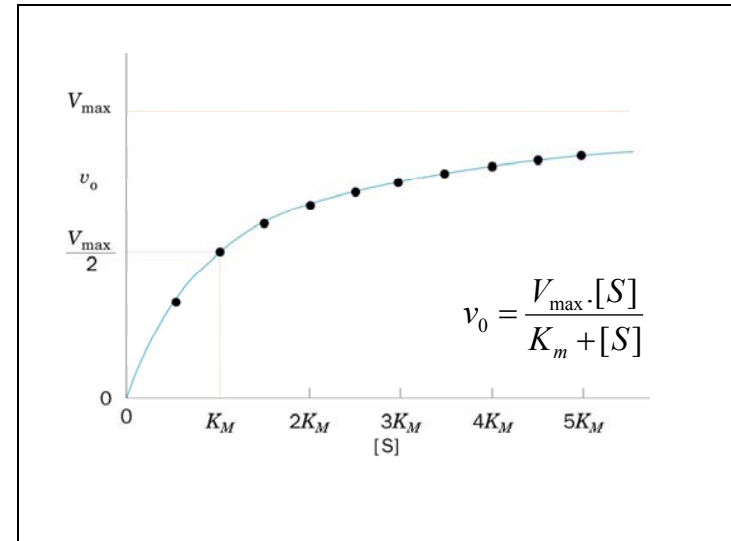
$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Ko je [S] = K_m, potem je v₀ = 1/2 V_{max} - Michaelis-Mentenova konstanta je enaka koncentraciji substrata, ko je začetna hitrost enaka polovični vrednosti največje začetne hitrosti

Slide 22



Slide 23



Slide 24

MICHAELIS-MENTENOVA KONSTANTA (K_m)

- Konstanta K_m (mol/l) – enaka [S] pri 1/2 V_{max}
- K_m izpeljana iz hitrostnih konstant k₁, k₂ in k₃

$$K_m = (k_1 + k_2) / k_3$$

- K_m je le ocena za disociacijsko konstanto E in S
- Majhna K_m pomeni večjo afiniteto S do E; večja K_m pomeni šibkejšo vezavo S in E

NAJVEČJA ZAČETNA HITROST (V_{max})

- V_{max} je konstanta
- V_{max} je teoretična maksimalna hitrost reakcije – vendar je resnično nikoli ne doseže
- V_{max} = k₃ · [E]_t
- v₀ se asimptotično približuje V_{max}

Slide 25

PRETVORBENO ŠTEVILO

Mera za katalitično aktivnost

- k_{kat} , pretvorbno število, je število molekul S, ki jih pretvori 1 mol E v časovni enoti (v sekundi) (pri nasičenju E s S, to je $[S] \gg [E]$)
- Če velja Michaelis-Menten model (nasičenost E z S)
 $\rightarrow k_3 = k_{kat} = V_{max}/E_t$
- Vrednosti za k_{kat} : od manj kot 1/sec - več 10^6 /sec

Enzyme	Substrate	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	9.5×10^{-3}	1.4×10^4	1.5×10^6
Carbonic anhydrase	CO ₂	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO ₃	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
Catalase	H ₂ O ₂	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	N-Acetylglycine ethyl ester	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	N-Acetylvaline ethyl ester	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	N-Acetyltyrosine ethyl ester	6.6×10^{-1}	1.9×10^2	2.9×10^2
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-4}	8.0×10^2	1.6×10^6
	Malate	2.5×10^{-3}	9.0×10^2	3.6×10^5
Superoxide dismutase	Superoxide ion (O ₂ ⁻)	3.6×10^{-4}	1.0×10^6	2.8×10^9
Urease	Urea	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

Slide 26

KATALITIČNA UČINKOVITOST

k_{kat}/K_M

- Ocena za učinkovitost encima
- k_{kat}/K_M je navidezna hitrostna konstanta reakcije 2. reda
- Meri, kako deluje E pri majhni konc. S
- Zgornja meja za k_{kat}/K_M je hitrost difuzije E in S

Enzyme	Substrate	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	9.5×10^{-3}	1.4×10^4	1.5×10^6
Carbonic anhydrase	CO ₂	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO ₃	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
Catalase	H ₂ O ₂	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	N-Acetylglycine ethyl ester	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	N-Acetylvaline ethyl ester	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	N-Acetyltyrosine ethyl ester	6.6×10^{-1}	1.9×10^2	2.9×10^2
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-4}	8.0×10^2	1.6×10^6
	Malate	2.5×10^{-3}	9.0×10^2	3.6×10^5
Superoxide dismutase	Superoxide ion (O ₂ ⁻)	3.6×10^{-4}	1.0×10^6	2.8×10^9
Urease	Urea	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

Encimi katerih k_{kat}/K_M je blizu difuzijsko-kontrolirani hitrosti vezave E in S (10^8 - 10^9 M⁻¹s⁻¹)

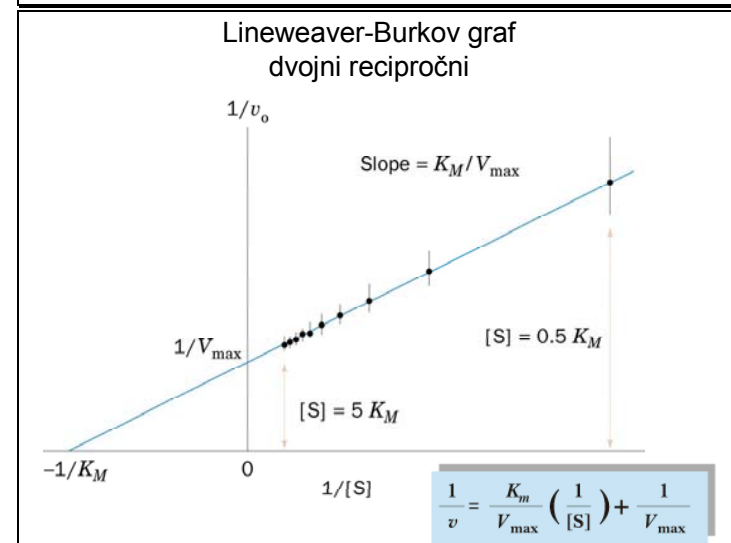
Superoxid dismutaza- razporeditev nabitih skupin na površini encima elektrostatsko vodi substrat do aktivnega mesta

Slide 27

Določanje K_M in V_{max}

- Linearizacija Michaelis-Mentenove enačbe
- Določanje K_M in V_{max} samo s čistimi encimi !
- Dvojni recipročni graf: Lineweaver-Burk
- Hanes-Woolf, Eadie-Hofstee grafi
- Drugi !

Slide 28



Slide 29

Journal of Biological Chemistry
© 1995 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Vol. 270, No. 11, pp. 6701-6705, 1995
Printed in the USA

Oligomeric Structure and Substrate Induced Inhibition of Human Cathepsin C*

(Received for publication, March 23, 1995, and in revised form, June 1, 1995)

Enok Ishenoi, Horis Turkki, Galina Pungertic, Anka Ritanja, and Vito Turk
From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, T. Soderbäck Institute, S-113 87 Stockholm, Sweden and the
Department of Veterinary Medical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala Branch of Center,
Box 501, S-751 23 Uppsala, Sweden

(Revised for publication, March 23, 1995, and in revised form, June 1, 1995)

Enok Ishenoi, Horis Turkki, Galina Pungertic, Anka Ritanja, and Vito Turk
From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, T. Soderbäck Institute, S-113 87 Stockholm, Sweden and the
Department of Veterinary Medical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala Branch of Center,
Box 501, S-751 23 Uppsala, Sweden

Scheme 1.

V naravi je encimov, ki jih lahko opišemo z Michaelis-Mentonovo kinetiko, malo!

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \cdot \frac{3 \cdot [S]^2}{a \cdot K_1^2 + b \cdot [S]^2} + \frac{3 \cdot [S]^2}{a \cdot b \cdot K_1^2} \cdot f \cdot \frac{[S]^2}{a \cdot b \cdot c \cdot K_1^2}$$

Slide 30

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA ENCIMSKO AKTIVNOST

- [S]- pri Michaelis-Menton modelu
- [E]- ↑ [E]..... ↑ aktivnost; $v_0 = k_3[ES]$
- pH
- T
- Efektorji encimskega delovanja:
 - inhibitorji (reverzibilni, ireverzibilni) – zmanjšajo v_0
 - aktivatorji - povečajo v_0

Slide 31

VPLIV pH

pH vpliva na več dejavnikov:

- stabilnost encima (denaturacija, če $10 < \text{pH} < 3$)
- vpliv na aktivno mesto encima
 - protonacija-deprotonacija radikalov
- vpliv na substrat
 - protonacija-deprotonacija funkcionalnih skupin

pH-optimum je rezultat vpliva vseh dejavnikov

Optimum pH of Some Enzymes	
Enzyme	Optimum pH
Pepsin	1.5
Catalase	7.6
Trypsin	7.7
Fumarase	7.8
Ribonuclease	7.8
Arginase	9.7

Slide 32

VPLIV TEMPERATURE

Temperatura vpliva na več dejavnikov:

- **hitrostne konstante reakcije**
- **stabilnost encima (denaturacija $T > 60^\circ\text{C}$)**
- vpliv na stopnjo ionizacije
 - skupin v aktivnem mestu encima
 - funkcionalnih skupin substrata

Temperaturni optimum je rezultat vpliva vseh dejavnikov

$k = A e^{-E_a/RT}$

Arrheniusov zakon

Slide 33

EFEKTORJI ENCIMSKEGA DELOVANJA

INHIBITORJI, AKTIVATORJI

- **reverzibilni**

interakcija z E (ES) z *nekovalentnimi vezmi*
 $E + I \rightleftharpoons EI$

 - kompetitivni (vezava I na E, ne pa ES)
 - nekompetitivni (vezava I na E in/ali ES)
 - antikompetitivni (vezava I samo na ES)
 - mešan tip inhibicije
 - inhibicija s substratom
- **ireverzibilni**

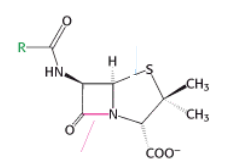
interakcija z E (ES) s *kovalentnimi vezmi*
 $E + I \rightarrow EI$

 - naravne kemijsko reaktivne snovi
antibiotik penicilin
 - toksikanti
Organofosfatne spojine (diizopropilfosforfluoridat, bojni strupi, insekticidi,...)
F-dUMP

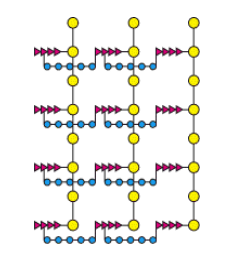
Slide 34

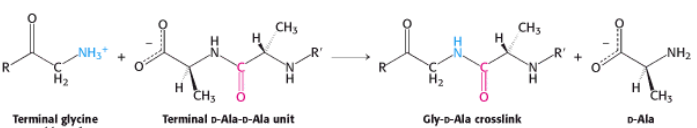
ireverzibilni inhibitorji

PENICILIN



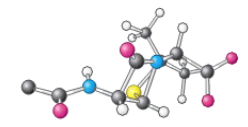
Reaktivna vez v β -laktamskem obroču



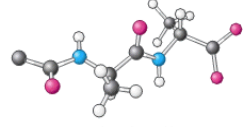


Terminal glycine residue of pentaglycine bridge + Terminal D-Ala-D-Ala unit \rightarrow Gly-D-Ala crosslink + D-Ala

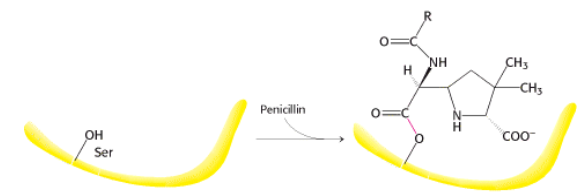
Slide 35



Penicilin

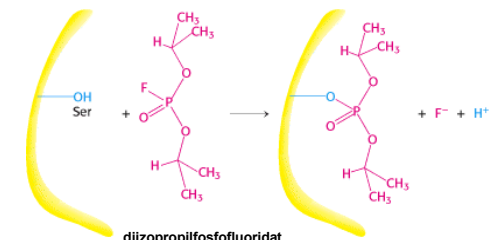


R-D-Ala-D-Ala peptide



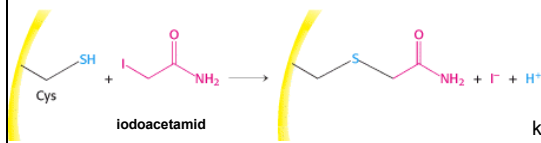
glikopeptid transpeptidaza + Penicilin \rightarrow peniciloini-encimski kompleks
encimsko neaktiven

Slide 36



diizopropilfosforfluoridat
podobna struktura sarin, tabun,
nekateri insekticidi (E600,
paraoxan)

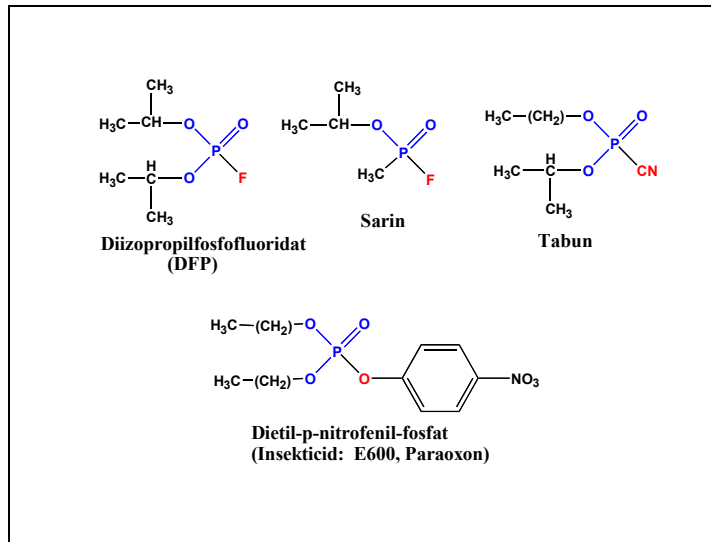
kovalentna modifikacija Ser v aktivnem centru acetilholinesteraze ali serinskih proteinaz



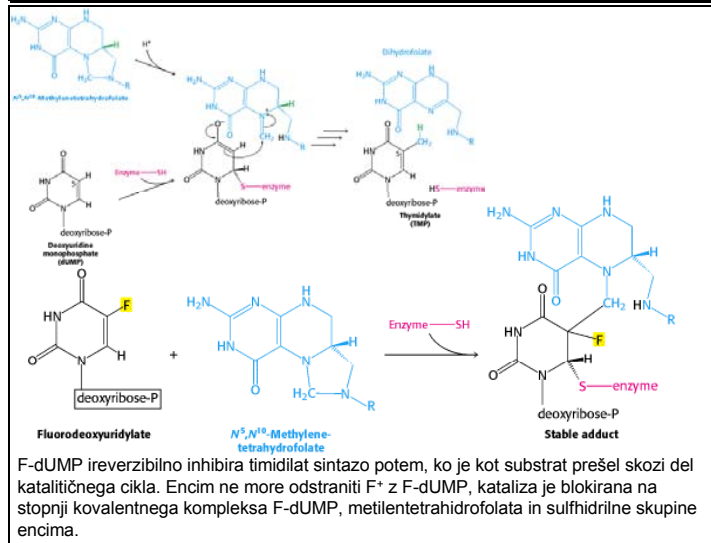
iodoacetamid

kovalentna modifikacija Cys

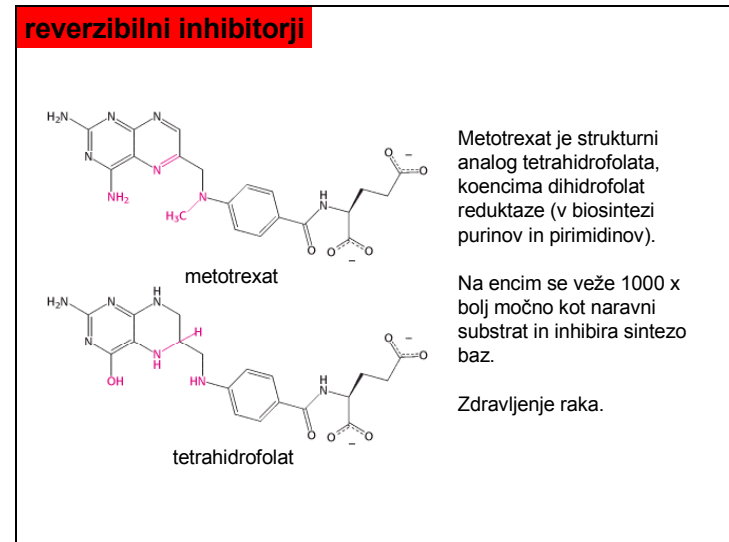
Slide 37



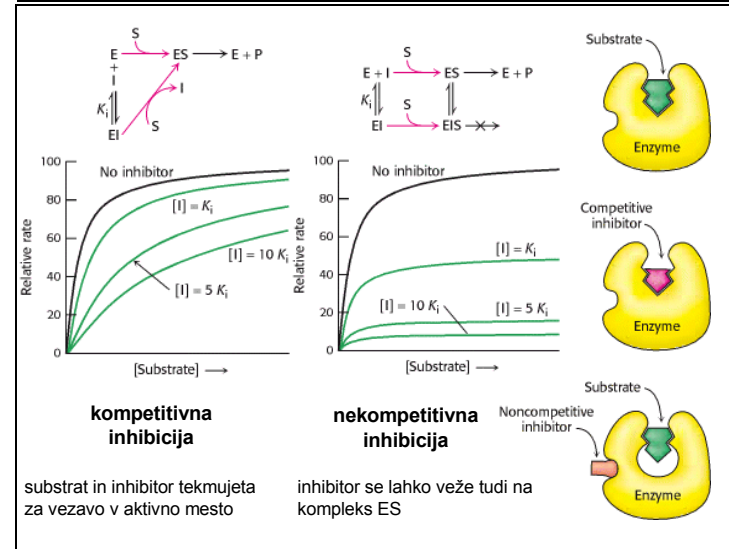
Slide 38



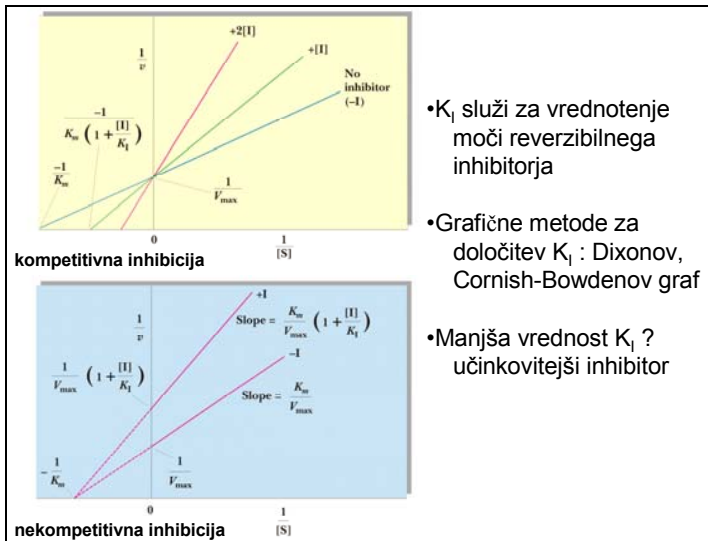
Slide 39



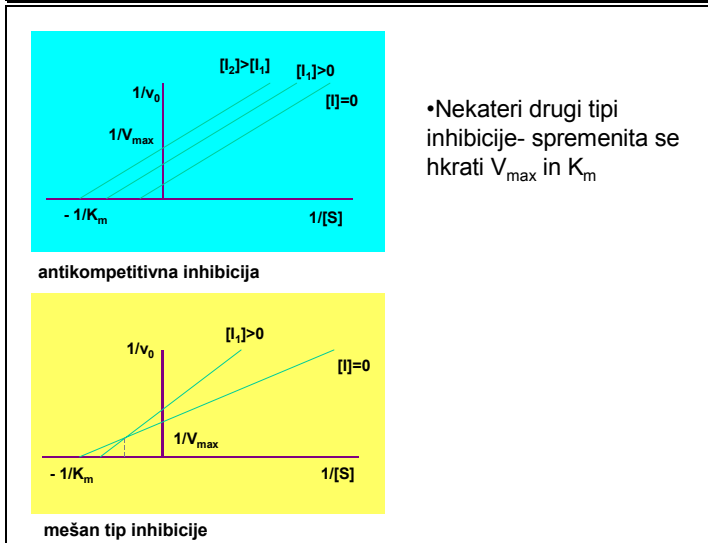
Slide 40



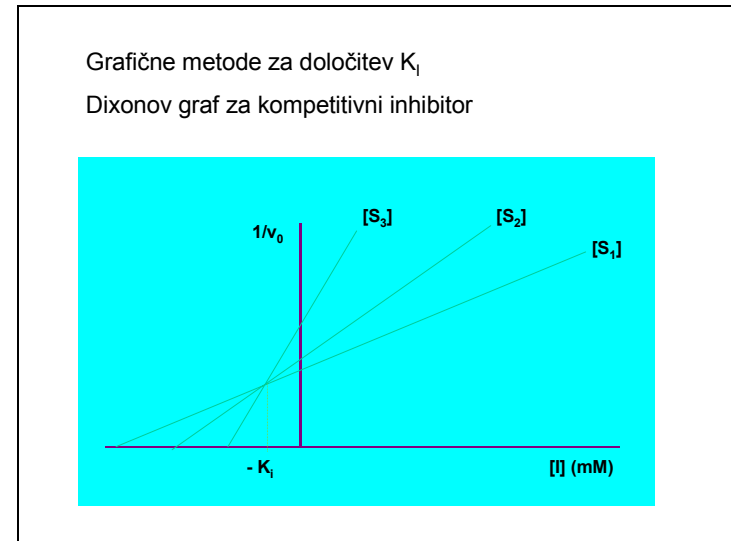
Slide 41



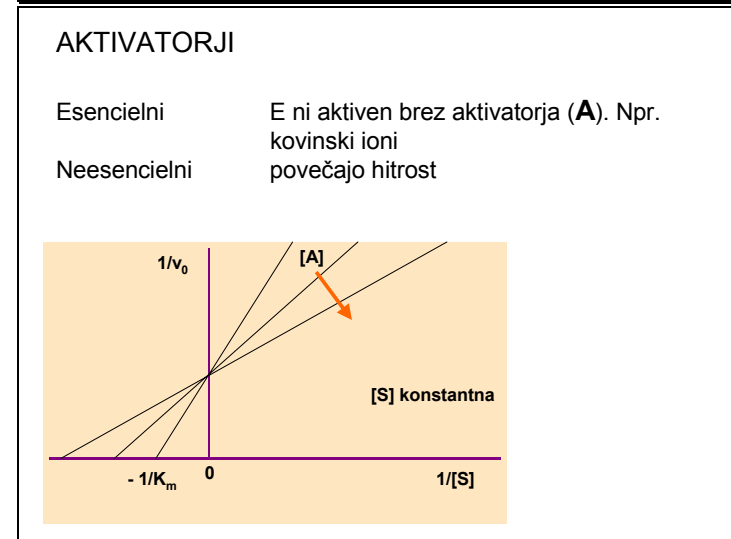
Slide 42



Slide 43



Slide 44



Slide 45

MEHANIZMI KATALIZE

- Kovalentna kataliza
 - Encim in substrat se prehodno vežeta s kovalentno vezjo enkrat ali večkrat v stopnjah reakcijskega nmehanizma
 - Tvorba kovalentne vezi zagotavlja kemijske mehanizme, ki povečajo hitrost katalize
- Splošna kislinsko-bazna kataliza- prenos protona v prehodnem stanju
 - "Specifična" kislinsko-bazna kataliza vključuje H⁺ ali OH⁻, ki difundirata v aktivni center
 - "Splošna" kislinsko-bazna kataliza vključuje druge kisline in baze (ne H⁺, OH⁻)
 - Te druge kisline ali baze olajšajo prenos H⁺ v prehodno stanje
- Kataliza s kovinskimi ioni
 - Okoli 1/3 encimov potrebuje kovinske ione. Metaloencimi (trdno vezani ioni), encimi aktivirani s kovinskimi ioni.
 - Kovinski ioni sodelujejo pri katalizi: vežejo substrat in ga pravilno orientirajo, posredovanje oksidoreduktivnih reakcij, elektrostatska stabilizacija
- Elektrostatska kataliza
- Efekti zblíževanja in pravilne orientiranosti
- Preferenčna vezava na prehodni kompleks

Slide 46

NEKATERI PRIMERI KOVALENTNE KATALIZE

Fosforil-encim

Acil-encim

Glukozil-encim

Slide 47

KOVALENTNA KATALIZA

Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDaza)

GAPDaza Gliceraldehid-3P

1,3-diPGlicerat

NAD⁺ **NADH**

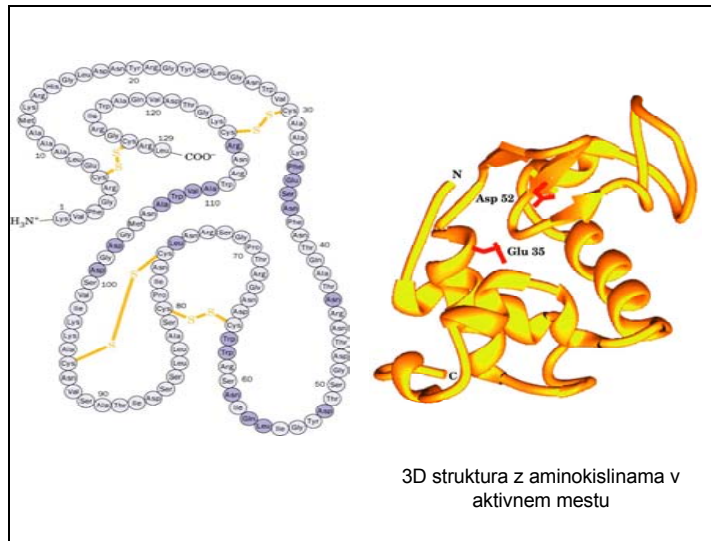
Slide 48

Lizocim- primer mehanizma encimskega delovanja, primer kislinsko-bazne katalize

- Lizocim hidrolizira polisaharidni del peptidoglikanov v bakterijski steni → porušitev bakterijske stene - nespecifična protibakterijska obramba
- Lizocim jajčnega beljaka: 129 ostankov, 4 disulfidne vezi
- Prvi encim z znano kristalno (3D) zgradbo (David Phillips, 1965, x-žarkovna difrakcija)

NAG=N-acetil-glukozamin
NAM=N-acetil-muraminska kislina

Slide 49



Slide 50

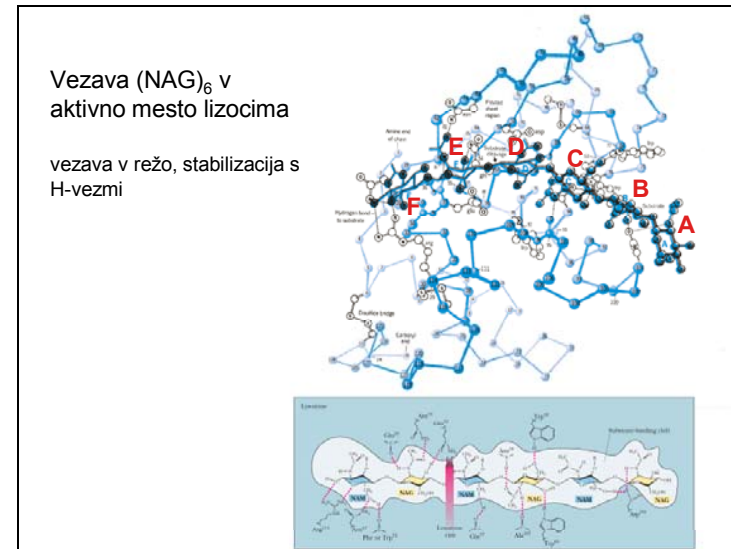
ŠTUDIJ KATALITSKEGA MEHANIZMA

- Naravni substrati v aktivnem mestu niso zadosti stabilni za strukturne študije
- Stabilni substratni analog: (NAG)₃, (NAG)₃
- Prileganje NAG na mesto D zahteva "zvijanje" sladkorne molekule
- Dokaz za stabilizacijo prehodnega stanja z destabilizacijo substrata ("zvijanje" in napetost v vezeh sladkorne molekule)

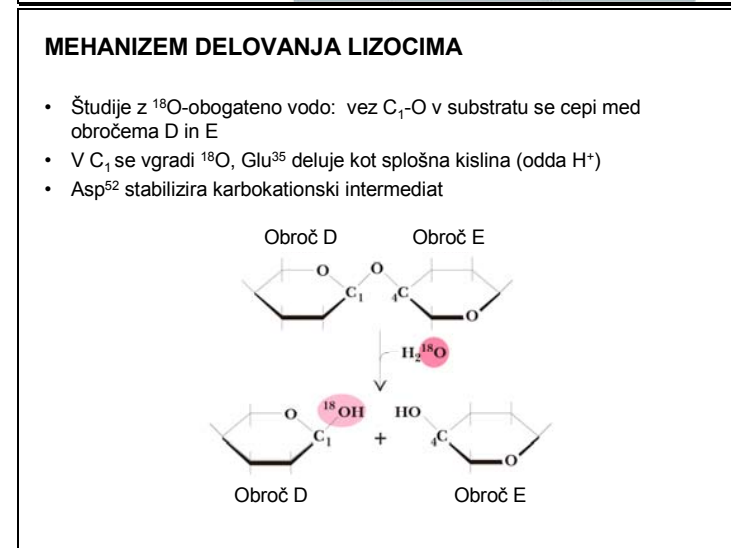
Tri-GlcNAc

substrat

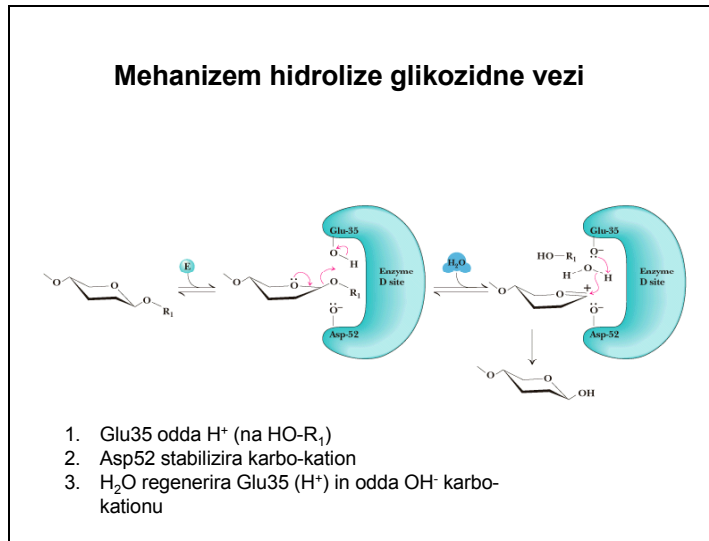
Slide 51



Slide 52



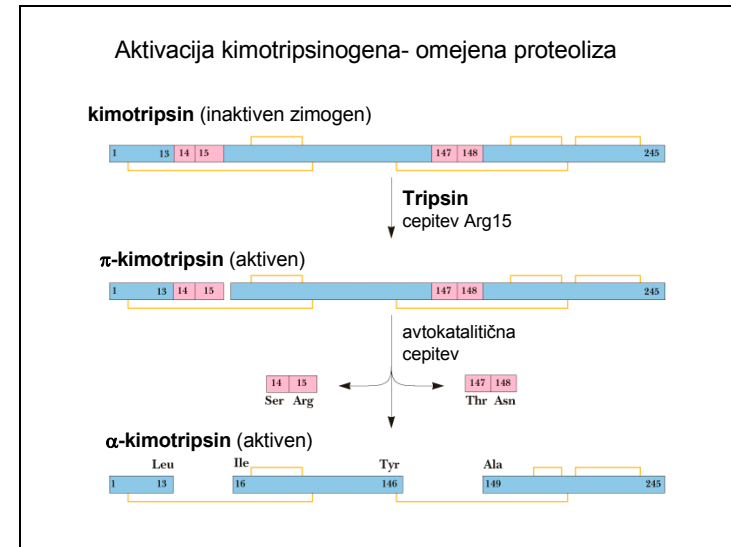
Slide 53



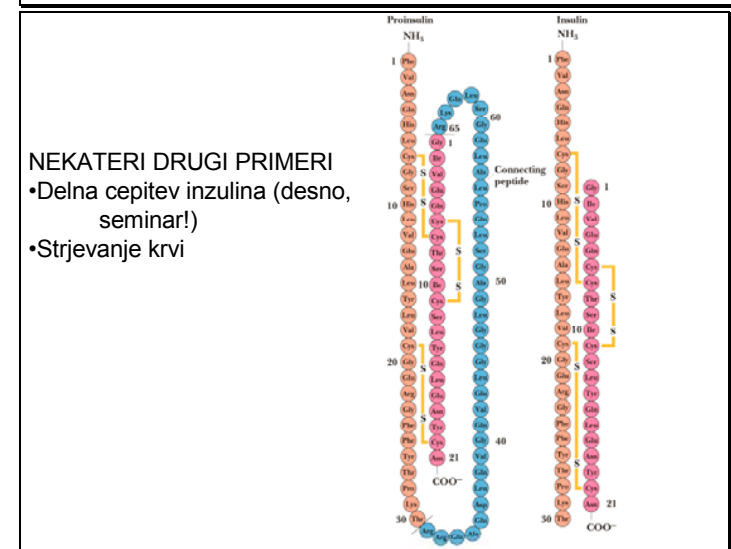
Slide 54

- ### KONTROLA ENCIMSKE AKTIVNOSTI
- Genetična kontrola: regulacija transkripcije (translacije) in razgradnje E
 - Kinetična kontrola:
 - Manjša hitrost zaradi akumulacije P (negativna povratna zveza="feed-back")
 - Hitrost odvisna od dostopnosti S
 - Vpliv I, A, pH
 - Alosterična kontrola (I, A, S)- (glej predavanja Primeri proteinov!)
 - Kovalentne modifikacije E
 - Omejena proteoliza (proencimi, zimogeni)
 - Delovanje specifičnih proteinaz
 - Fosforilacija – defosforilacija (protein-kinaze, protein-fosfataze)
 - ADP-ribozilacija
 - Acetiliranje, itd

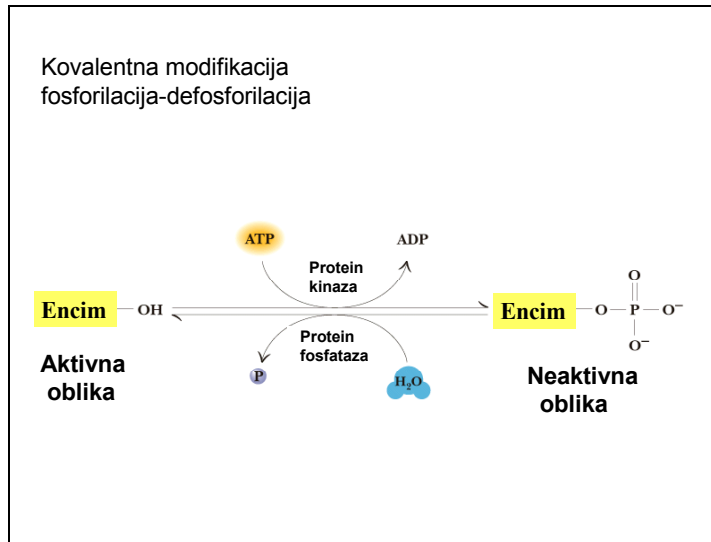
Slide 55



Slide 56



Slide 57



Slide 58

