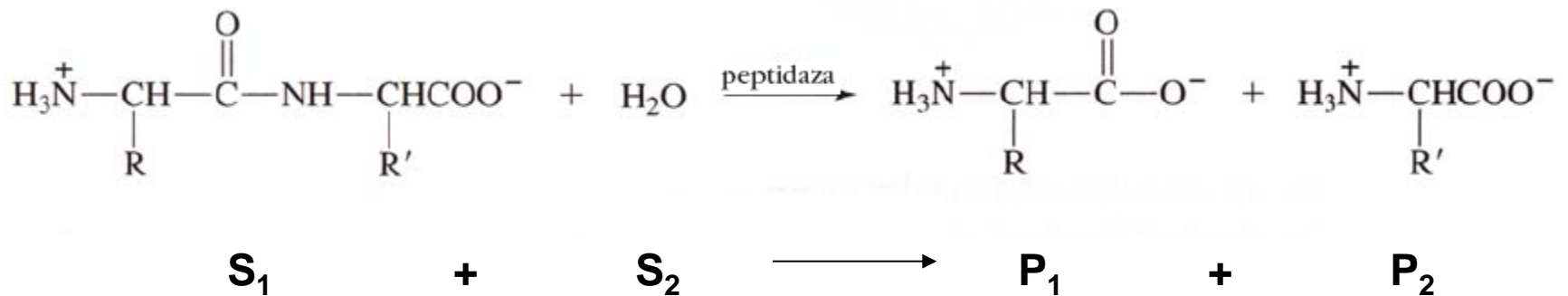
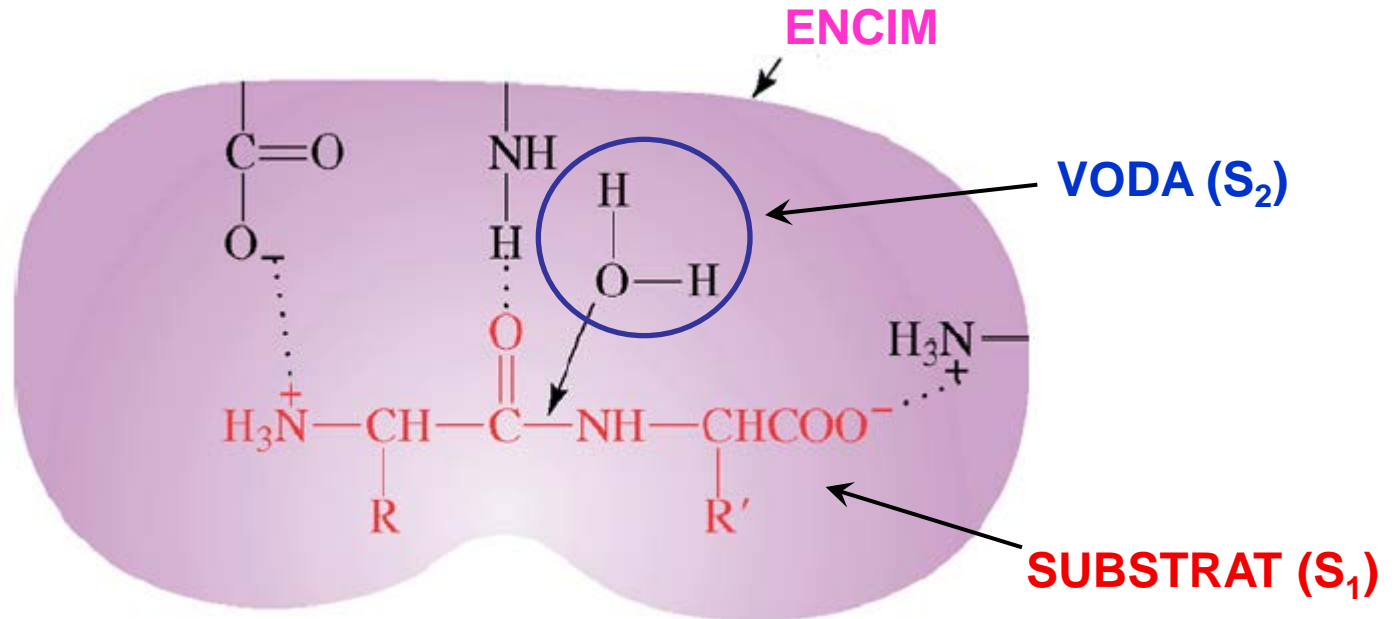


Razgradnja (hidroliza) peptida z encimom peptidazo

Peptidaza 'prime' substrat (dipeptid) z najmanj tremi šibkimi vezmi, mu vsili novo konformacijo v kateri je peptidna vez že 'natrgana' (prehodno stanje!)



Encimi, kofaktorji, koencimi, prostetične skupine

- Encimi (biokatalizatorji) – M_r od 12 000 do 10^6
- Za aktivnost encima pomembna 3D struktura (primarna, sekundarna, terciarna, kvartarna)
- encimi - proteini (sestavljene samo iz polipeptidne verige) → katalitska funkcija
 - proteini + kofaktorji (ioni) → katalitska funkcija
 - proteini + koencimi (kompleksne organske molekule) → katalitska funkcija

koencim ni stalno vezan na proteinski del

prostetična skupina = koencim, trdno vezan na proteinski del molekule

HOLOENCIM = APOENCIM + PROSTETIČNA SKUPINA

encim proteinski del neproteinski del molekule

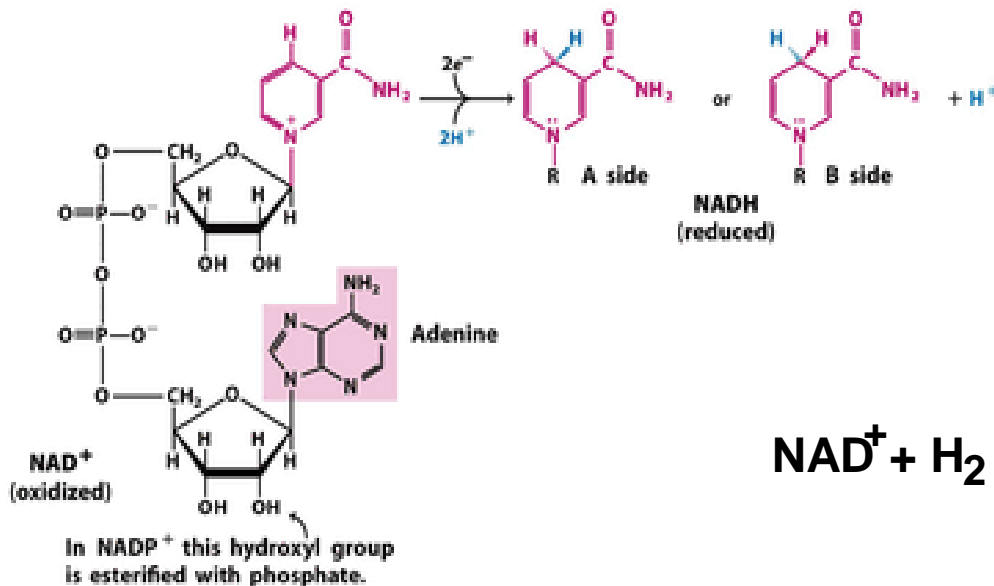
Kofaktorji in prostetične skupine encimov

TABLE 6–1 Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu ²⁺	Cytochrome oxidase
Fe ²⁺ or Fe ³⁺	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K ⁺	Pyruvate kinase
Mg ²⁺	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn ²⁺	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni ²⁺	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn ²⁺	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

PREKURZOR (VITAMIN)	SKUPINA PRENOSA	KOENCIM ALI PROSTETIČN A SKUPINA
tiamin (vitamin B1)	aldehidna skupina	tiamin pirofosfat
riboflavin (vitamin B2)	elektroni in protoni	FMN, FAD
nikotinska kislina (niacin)	hidridni ion (H ⁻)	NAD
pantotenska kislina in druge molekule	acilne skupine	koencim A
piridoksin (vitamin B6)	amino skupine	piridoksal fosfat
vitamin B12	H-atomi in alkilne skupine	(ciano)kobalam in
biotin	CO ₂ (-COOH)	biocitin
folna kislina	skupine z enim C-atomom	tetrahidrofolna kislina
lipojska kislina	elektroni in acilne skupine	lipojska kislina

Vitamins as cofactors – NAD^+ , NADP^+



(a)

Enzyme	Coenzyme	Stereochemical specificity for nicotinamide ring (A or B)	Text page(s)
Isocitrate dehydrogenase	NAD^+	A	624
α -Ketoglutarate dehydrogenase	NAD^+	B	625
Glucose 6-phosphate dehydrogenase	NADP^+	B	560
Malate dehydrogenase	NAD^+	A	628
Glutamate dehydrogenase	NAD^+ or NADP^+	B	680
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	NAD^+	B	535
Lactate dehydrogenase	NAD^+	A	547
Alcohol dehydrogenase	NAD^+	A	547

Vitamins kot prostetične skupine – FMN, FAD

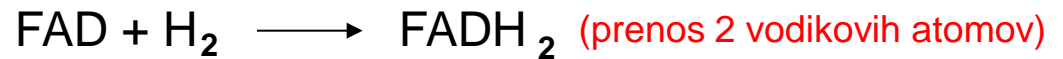
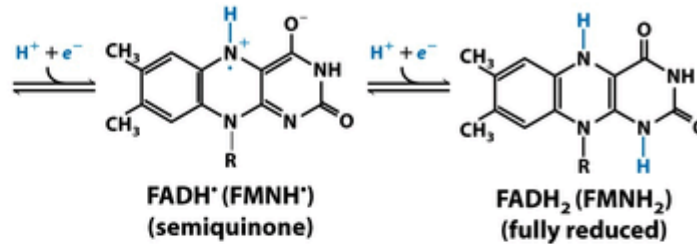
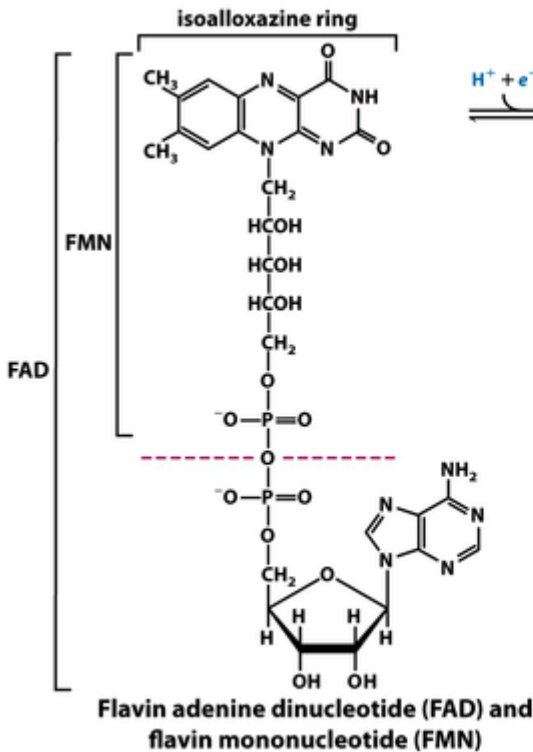


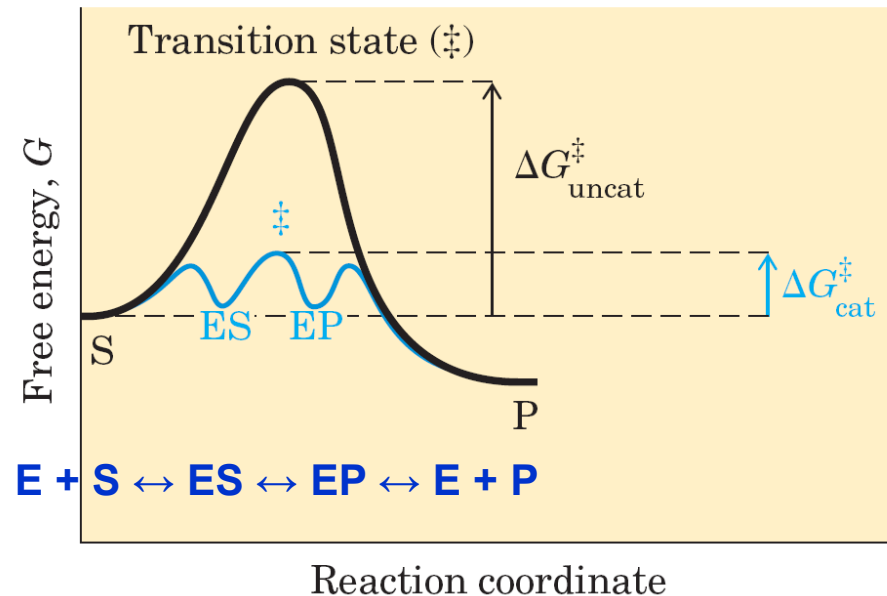
TABLE 13–9

Some Enzymes (Flavoproteins) That Employ Flavin Nucleotide Coenzymes

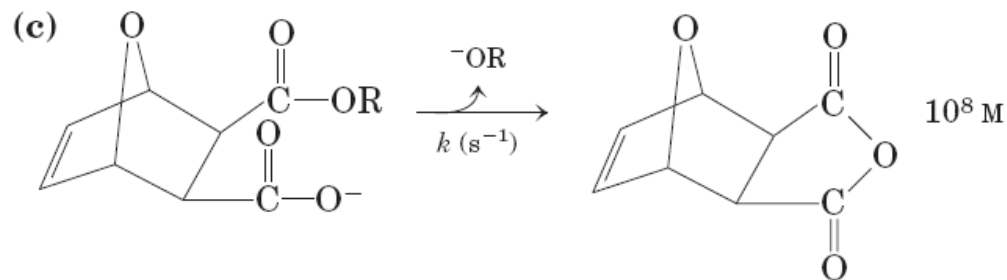
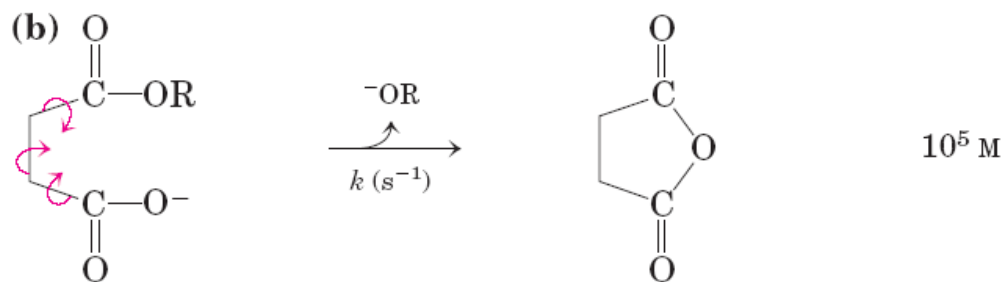
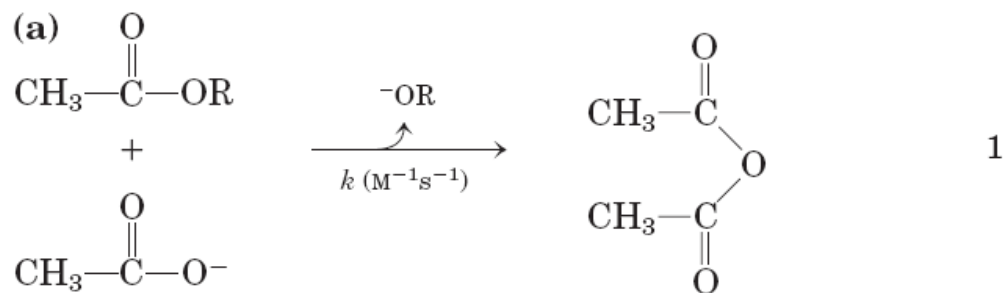
Enzyme	Flavin nucleotide	Text page(s)
Acyl-CoA dehydrogenase	FAD	653
Dihydrolipoyl dehydrogenase	FAD	619
Succinate dehydrogenase	FAD	628
Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	FAD	732
Thioredoxin reductase	FAD	888
NADH dehydrogenase (Complex I)	FMN	712–714
Glycolate oxidase	FMN	787

Mehanizmi encimske katalize

- Kompleks ES stabilizirajo šibke interakcije
- **Sledi razcep ES in nastanek vezi po različnih mehanizmih, ki vključujejo prehodni nastanek kovalentnih vezi**
 - približanje in orientacija (praktično vedno!)
 - splošna in specifična kislinsko-bazna kataliza
 - kovalentna kataliza
 - kataliza s kovinskimi ioni

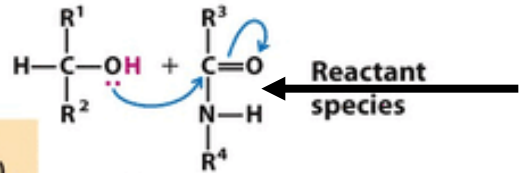


Pospešitev reakcije le zaradi približanja in orientacije

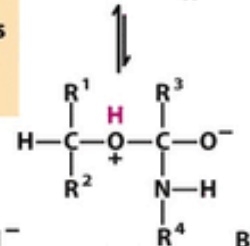


Brez katalizatorja - zaradi zmanjšanja gibljivosti je znotrajmolekulska reakcija hitrejša.

Specifična/splošna kislinsko-bazna kataliza (primer razcepa amida)

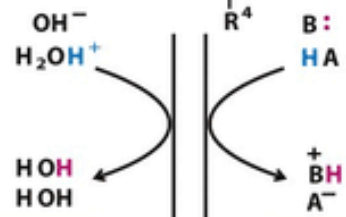


Without catalysis, unstable (charged) intermediate breaks down rapidly to form reactants.



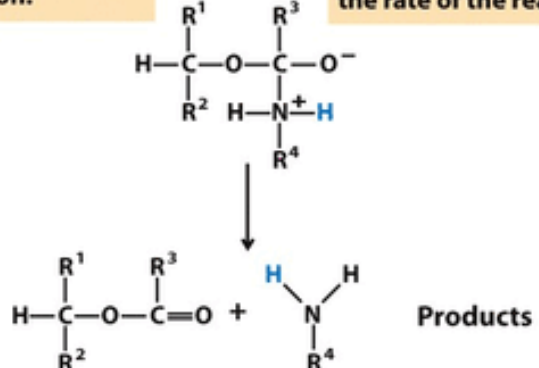
Specifična kataliza – donor protona je voda

Splošna kataliza – donor protona so druge molekule



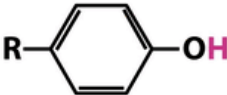
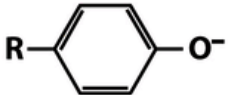
When proton transfer to or from H₂O is faster than the rate of breakdown of intermediates, the presence of other proton donors or acceptors does not increase the rate of the reaction.

When proton transfer to or from H₂O is slower than the rate of breakdown of intermediates, only a fraction of the intermediates formed are stabilized. The presence of alternative proton donors (HA) or acceptors (B:) increases the rate of the reaction.



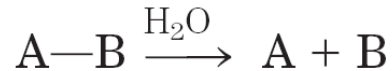
Kislinsko-bazna kataliza

- Specifična - proton donor in proton akceptor je molekula H₂O
- Splošna - proton donor in proton akceptor je druga molekula (šibke organske kisline in šibke baze)
- Večina encimskih reakcij poteka po mehanizmu splošne kislinsko-bazne katalize
- Aktivna mesta encimov vsebujejo aminokislinske ostanke, ki so šibke kisline in šibke baze
- Povečanje hitrosti reakcije za 100 – 100.000 krat

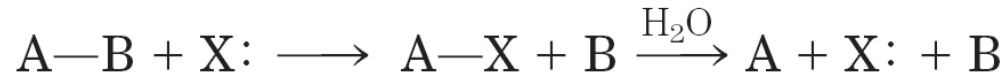
Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	R—COOH	R—COO ⁻
Lys, Arg	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{N}^+ \\ \\ \text{H} \end{array}$	R— $\ddot{\text{N}}\text{H}_2$
Cys	R—SH	R—S ⁻
His	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{C}=\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{HN} \quad \quad \text{N}^+ \\ \quad \quad \quad \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{C}=\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{HN} \quad \quad \text{N}: \\ \quad \quad \quad \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Ser	R—OH	R—O ⁻
Tyr		

Kovalentna kataliza

- Med encimom in substratom nastane prehodna kovalentna vez
- Primer: hidroliza vezi med A in B

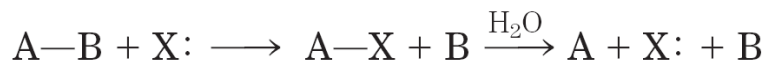


- Katalizator: encim z nukleofilno skupino X: se prehodno kovalentno veže na substrat

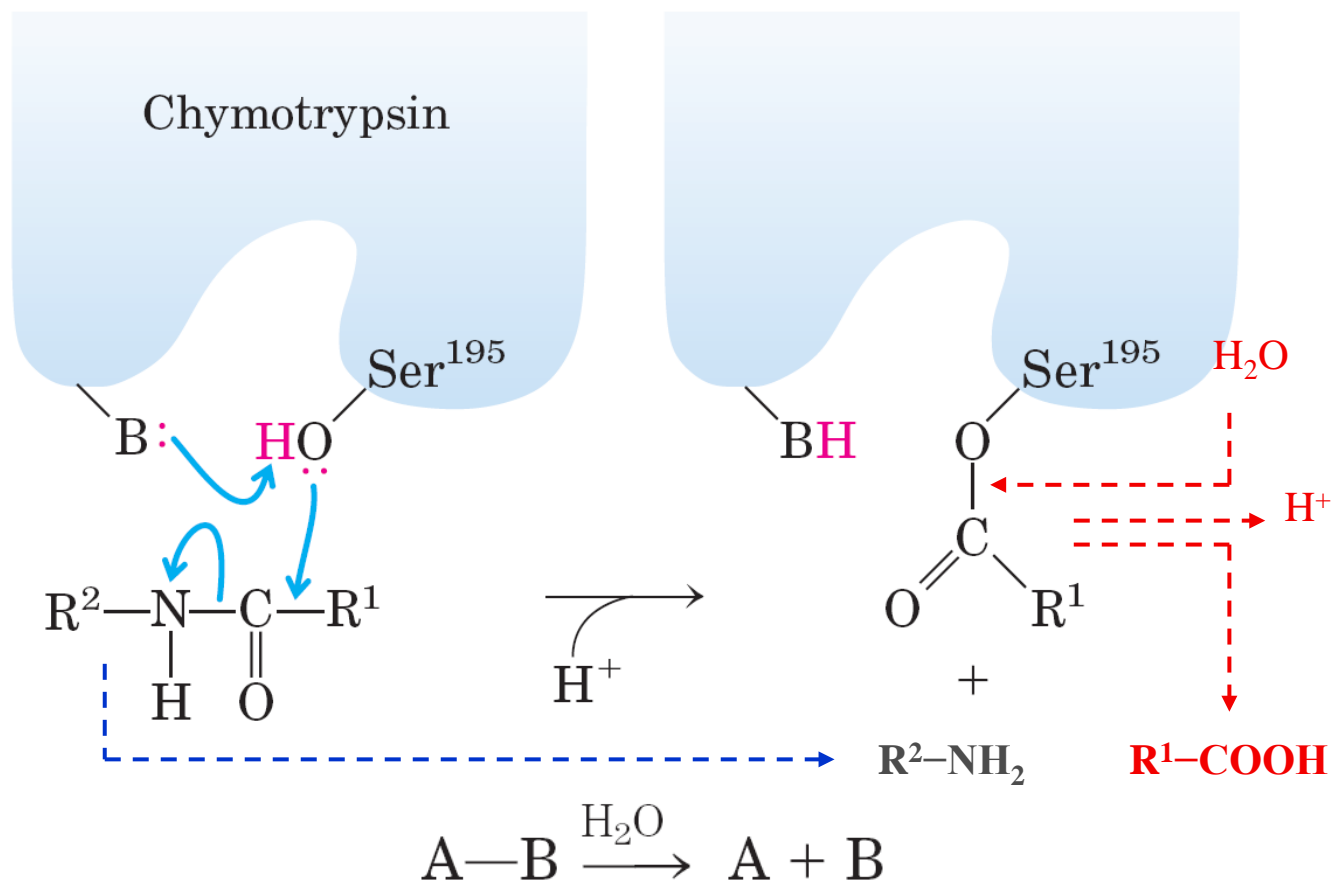


- Sprememba reakcijskega mehanizma: reakcija je hitrejša le, če ta pot (preko prehodne kovalentne vezi) poteka preko nižje energijske bariere kot nekatalizirana reakcija
- Prehodne kovalentne vezi lahko tvorijo nekateri AK ostanki

Primer kovalentne in kislinsko-bazne katalize: razcep peptidne vezi

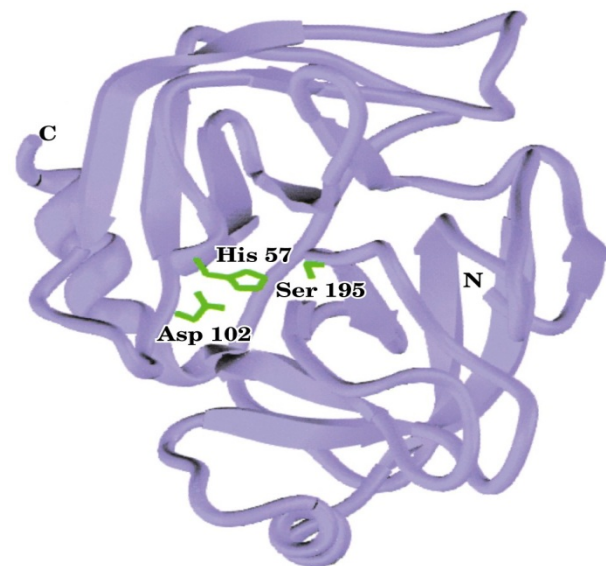
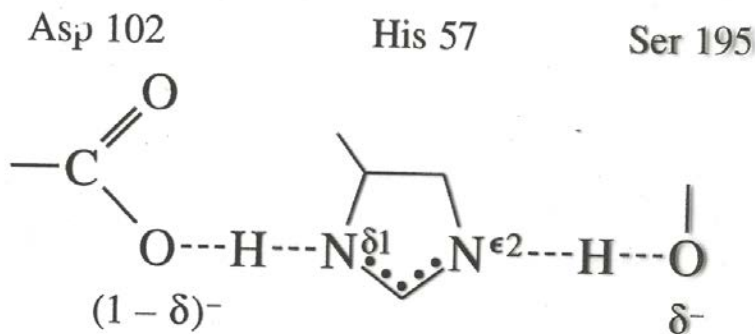


1. stopnja: kovalentna kataliza
2. stopnja: kislinsko-bazna kataliza



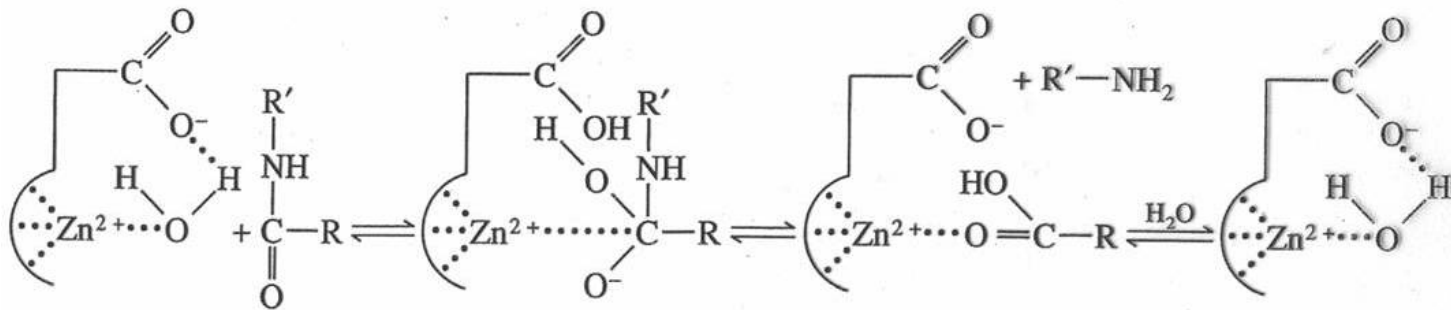
Katalitična 'triada' pri tripsinu (analogno je pri kimotripsinu)

-OH skupina Ser postane veliko reaktivnejša zaradi bližine in orientacije His in Asp (induktivni efekt!)



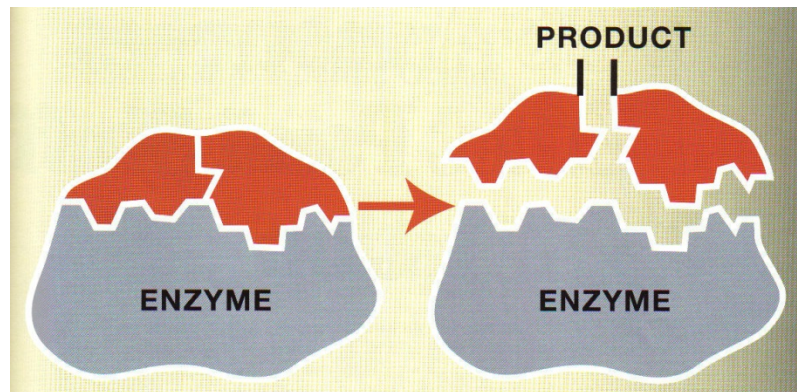
Kataliza s kovinskimi ioni (Primer: metaloproteinaze)

- Kovinski ioni so ali trdno vezani na encim ali prihajajo iz okolja
- Ionske in/ali koordinativne vezi med ionom in substratom orientirajo substrat v položaj za reakcijo in stabilizirajo prehodno stanje
- Lahko pride do izmenjave elektronov med kovinskim ionom in substratom (oksidoredukcijska reakcija)
- Približno ena tretjina encimov potrebuje kovinski ion za svojo aktivnost



Delovanje encimov - povzetek

- Encimi so zelo zmogljivi katalizatorji. Reakcije pospešijo med 10 – 10 x
- Znižajo energijsko bariero in s tem pospešijo reakcijo
- Glavni delež energije za pospešitev reakcije izhaja iz vzpostavitve ⁵ šibkih ¹⁷ vezi (vodikove, hidrofobne, elektrostatske) med substratom in encimom.
- S šibkimi interakcijami se stabilizira prehodno stanje ES
- Vezavna energija prispeva tudi k specifičnosti interakcije med encimom in substratom
- Glavni katalitični mehanizmi so kislinsko-bazični, kovalentni in kataliza s kovinskimi ioni.



Encimi

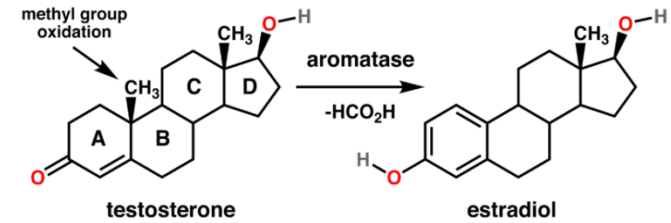
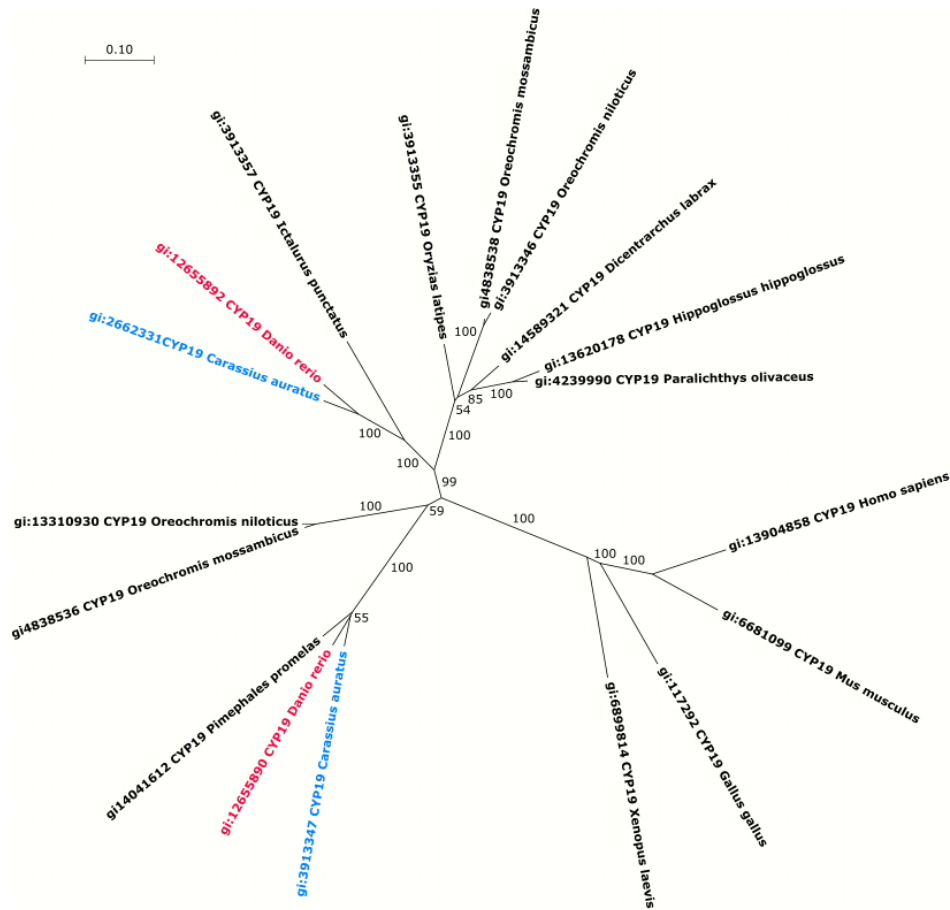
- Splošne lastnosti - osnove delovanja, specifičnost, energijski vidik nekatalizirane in encimsko katalizirane reakcije
- Kofaktorji, koencimi in prostetične skupine
- Mehanizmi encimske katalize
- **Klasifikacija encimov**
- Encimska kinetika
- Encimska inhibicija
- Uravnavanje encimske aktivnosti (biokemijskih reakcij)
- Encimi v medicinski diagnostiki in biotehnologiji

Poimenovanje (nomenklatura) encimov

- Končnica **-aza** k substratu ali k reakcijski aktivnosti, npr. ureaza, DNA-polimeraza ...
- Opis široke funkcije telesne tekočine, ki vsebuje določen encim, npr. pepsin (iz grščine prebava), lizocim (liza – razgradnja bakterijske celične stene) ...
- Zmešnjava: en encim ima več imen ali več encimov isto ime 😊
- Sistematska klasifikacija encimov v 6 razredov glede na vrsto reakcije, ki jo katalizirajo; razredi razdeljeni na podrazrede ... Vsak encim točno definiran s 4 številkami, npr. EC 2.7.1.1 (EC, Enzyme Commission number)
- EC številka – numerična klasifikacija encimov glede na kemijsko reakcijo, ki jo katalizirajo. EC številka ne specificira encima ampak encimsko katalizirano reakcijo. Encim, ki katalizira reakcijo pri različnih species (npr. encim miši, človeka, kvasovke, etc.) imajo isto EC številko)



Različna poimenovanja – primer aromataze



Citokrom P450, družina 19, poddružina A, polipeptid 1

Simboli: [CYP19A1](#); ARO; ARO1; CPV1; CYAR; CYP19; MGC104309; P-450AROM

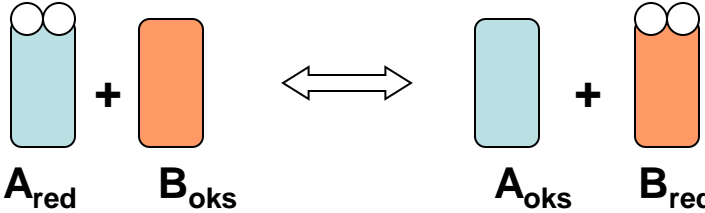
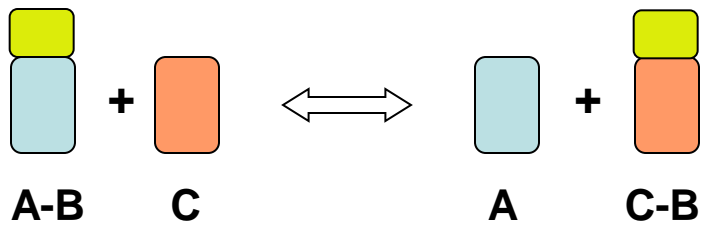
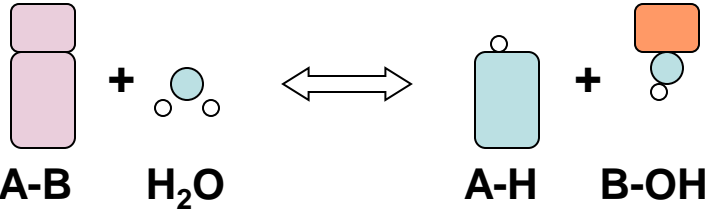
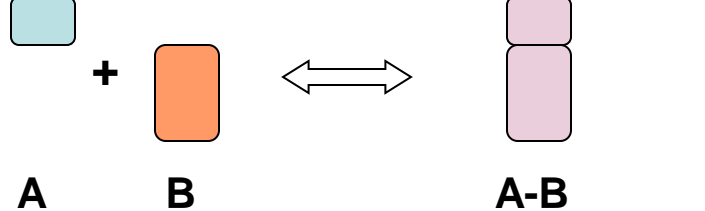
Zunanje ID: [OMIM: 107910](#) [MGI: 88587](#) [HomoloGene: 30955](#) [GeneCards: CYP19A1](#) [Gene](#)

EC številka: [1.14.14.1](#)

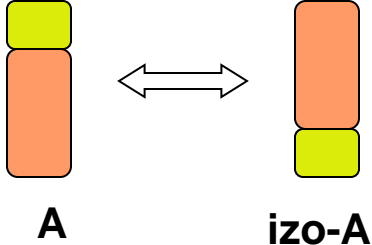
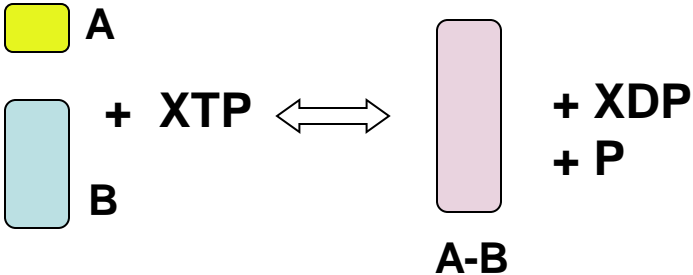
Sistematska klasifikacija encimov - 6 razredov

- 1. oksidoreduktaze** – prenos elektronov (tudi kot hidridni ion H^- in H atom)
- 2. transferaze** – prenos skupin z ene na drugo molekulo
- 3. hidrolaze** – prenos skupin na H_2O
- 4. liaze** – adicija na dvojno vez/nastanek dvojne vezi
- 5. izomeraze** – prenos skupin znotraj molekule → druga izomerna oblika
- 6. ligaze** – nastanek kovalentnih vezi C-C, C-S, C-O in C-N (kondenzacijske reakcije ob porabi energije ATP)

Klasifikacija encimov

razred	vrsta reakcije	pomembni podrazredi
<p>1. oksidoreduktaze</p>		<p>dehidrogenaze oksidaze peroksidaze oksidgenaze (monooksigenaze, dioksidgenaze)</p>
<p>2. transferaze</p>		<p>C₁-transferaze glikozil-transferaze amino-transferaze fosfo-transferaze (kinaze)</p>
<p>3. hidrolaze</p>		<p>esteraze (fosfataze) glikozidaze peptidaze amidaze</p>
<p>4. liaze (sintaze)</p>		<p>nastanek/izguba dvojne vezi C-C liaze C-O liaze C-N liaze C-S liaze</p>

Klasifikacija encimov (nadaljevanje)

razred	vrsta reakcije	pomembni podrazredi
5. izomeraze	 <p style="text-align: center;">A izo-A</p>	epimeraze <i>cis-trans</i> izomeraze intramolekularene transferaze
6. ligaze (sintetaze) poraba energije!!	 <p style="text-align: center;">A + XTP A-B + XDP + P</p>	C-C ligaze C-O ligaze C-N ligaze C-S ligaze

Primer 1

razred

podrazred

1. oksidoreduktaze	dehidrogenaze oksidaze peroksidaze oksigenaze (monooksigenaze, dioksigenaze)
-----------------------	--

- Dehidrogenaze – odvzem atomov vodika H z molekule substrata
- Oksidaze – oksidacijska reakcija, kjer je akceptor elektronov kisik O, nastane H₂O (citokrom oksidaza v dihalni verigi)
- Peroksidaze – oksidacijska reakcija, kjer je akceptor elektronov H₂O, nastane H₂O₂
- Oksigenaze – kisik O se vgradi v molekulo substrata, nastane –OH ali –C=O
 - monooksigenaze – 1 atom O v substrat (hidroksilaze, oksidaze z mešano funkcijo)



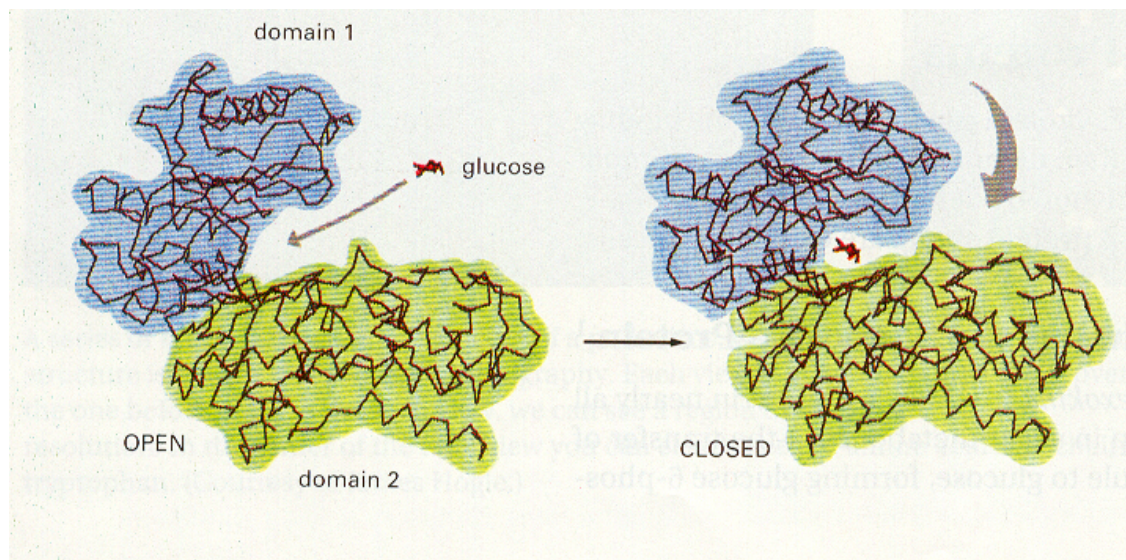
Monooksigenaze pogosto vsebujejo v aktivnem centru hemeski del - citokrom P450 kot akceptor elektronov (aromataza CYP19 je monooksigenaza)

Primer 2



- EC 2.7.1.1.
- Prva. št. - razred transferaze (2)
- Druga št. - podrazred, kjer so encimi fosfotransferaze (7)
- Tretja št. - fosfotransferaze, ki imajo –OH kot akceptor fosforilne skupine (1)
- Četrta št. - akceptor fosforilne skupine je glukoza (1)

- **Trivialno ime:** heksokinaza – še vedno največ uporabljamo.
- **Sistematično ime:** ATP:D-heksoza-6-fosfotransferaza



Več primerov encimsko kataliziranih reakcij v:

R.Boyer: Temelji biokemije 2005

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

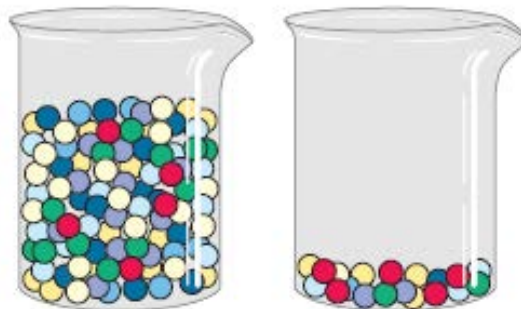
Klasifikacija encimov in njihova vloga

Encimi

- Splošne lastnosti - osnove delovanja, specifičnost, energijski vidik nekatalizirane in encimsko katalizirane reakcije
- Kofaktorji, koencimi in prostetične skupine
- Mehanizmi encimske katalize
- Klasifikacija encimov
- **Encimska kinetika**
- Encimska inhibicija
- Uravnavanje encimske aktivnosti (biokemijskih reakcij)
- Encimi v medicinski diagnostiki in biotehnologiji

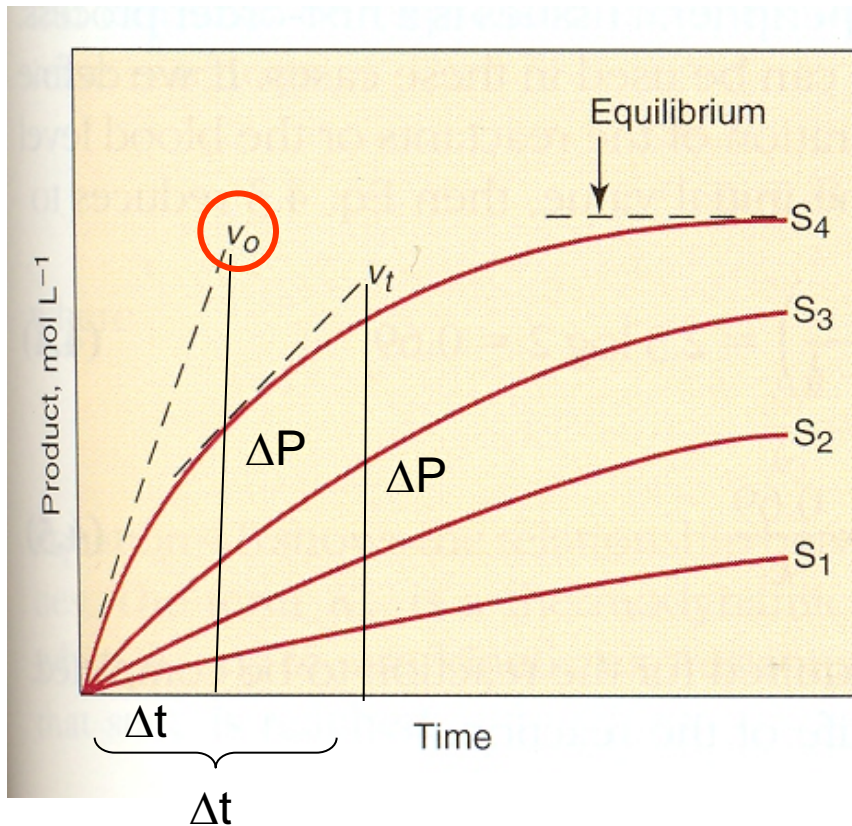
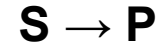
Encimska kinetika

- Obravnava hitrost, s katero se spreminjajo reaktanti v produkte $S \rightarrow P$
- Hitrost podaja spremembo koncentracije substrata/produkta v časovni enoti (mol/s) $\rightarrow v = -d(S)/dt = d(P)/dt$
- **Hitrost encimske reakcije je merilo za aktivnost encima**
enote za aktivnost: **U = 1 μ mol/min ali katal (kat) = 1 mol/s**
- Specifična aktivnost encimskega pripravka: hitrost na št. encimskih enot/mg proteina, npr. μ mol/min/mg



Hitrost encimske reakcije je merilo za **aktivnost encima**

Koncentracija substrata vpliva na **začetno hitrost encimske reakcije**



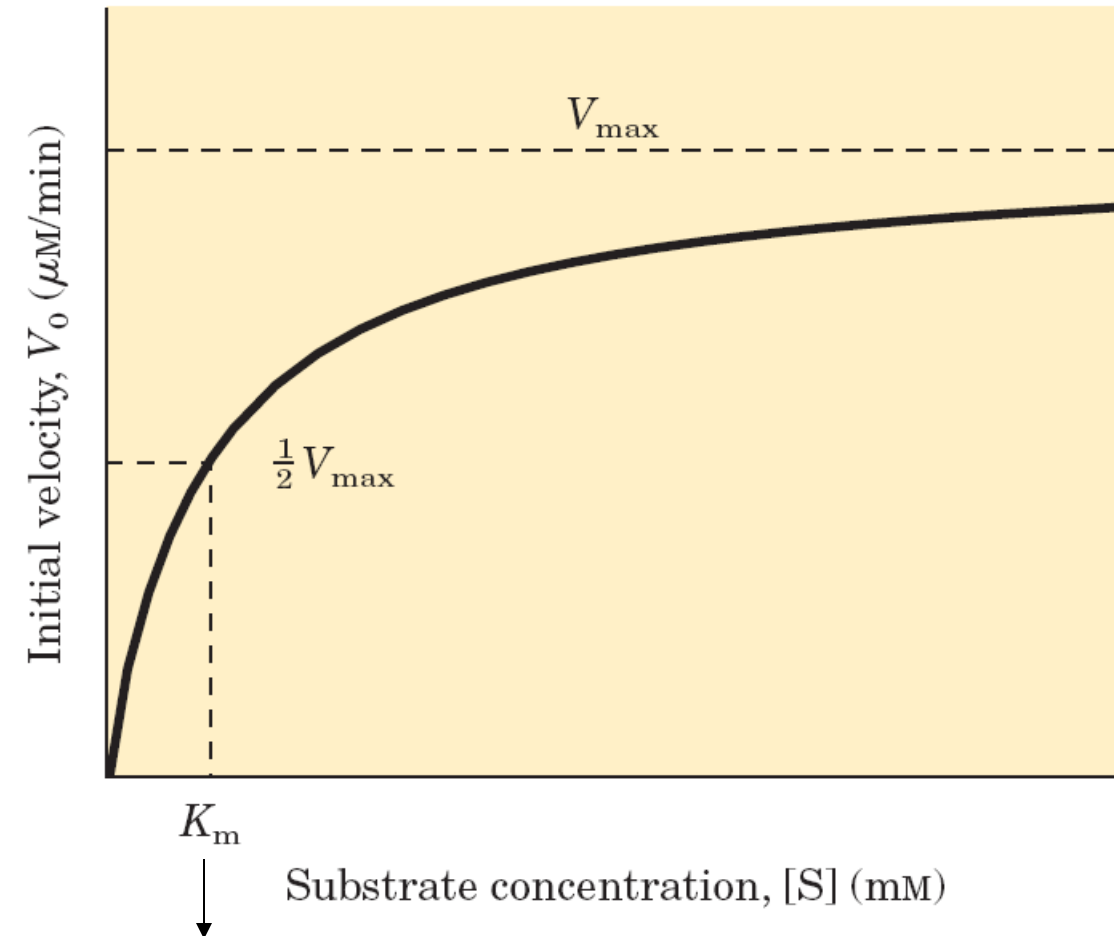
$$v = \frac{d(P)}{dt}$$

$$v = \frac{\Delta(P)}{\Delta t}$$

koncentracija substrata se s časom spreminja
→ **začetna hitrost (v₀)** je hitrost v času t = 0 in je karakteristična za reakcijo

$$S_4 > S_3 > S_2 > S_1$$

Vpliv koncentracije substrata Na začetno hitrost encimske reakcije



→ maksimalna hitrost V_{max}

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]}$$

Michaelisova konstanta K_m

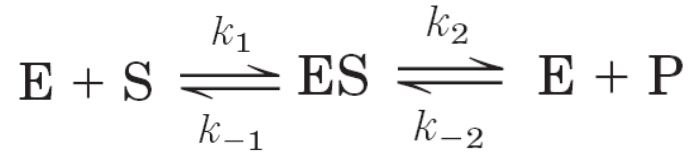
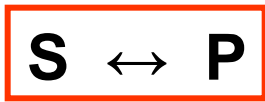
Michaelis-Mentenova kinetika



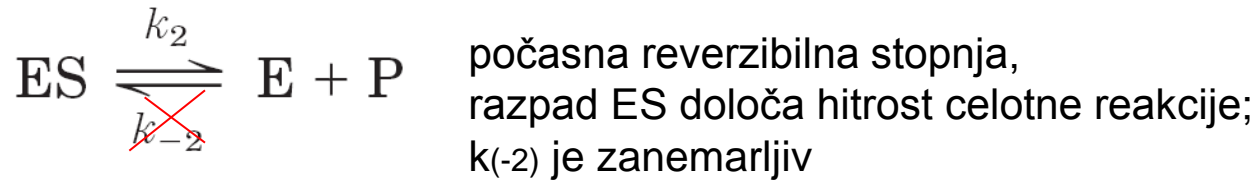
Leonor Michaelis,
1875–1949



Maud Menten,
1879–1960



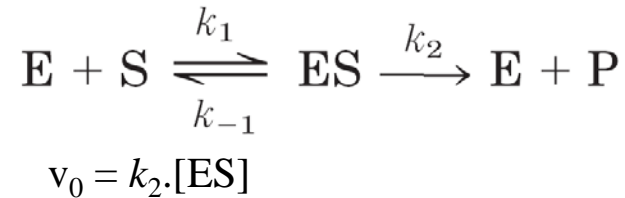
- Ključnega pomena za encimsko katalizo je nastanek kompleksa ES (L. Michaelis in M. Menten 1912)



$$v_0 = k_2 \cdot [\text{ES}]$$

- Z večanjem koncentracije S se vse več encima nahaja v obliki kompleksa ES, encim postaja nasičen s substratom, zato saturacijska kinetika!
- (ES) je konstantna po preteku nekega časa, stacionarno stanje

Izpeljava Michaelisove konstanta K_m



hitrost nastanka ES = $k_1([\text{E}_t] - [\text{ES}])[\text{S}]$

hitrost razpada ES = $k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}]$

V stacionarnem stanju sta ti dve hitrosti enaki!

$$k_1([\text{E}_t] - [\text{ES}])[\text{S}] = k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}]$$

$$k_1[\text{E}_t][\text{S}] - k_1[\text{ES}][\text{S}] = (k_{-1} + k_2)[\text{ES}]$$

$$k_1[\text{E}_t][\text{S}] = (k_1[\text{S}] + k_{-1} + k_2)[\text{ES}]$$

$$[\text{ES}] = \frac{k_1[\text{E}_t][\text{S}]}{k_1[\text{S}] + k_{-1} + k_2} \quad \longrightarrow \quad [\text{ES}] = \frac{[\text{E}_t][\text{S}]}{[\text{S}] + \underbrace{(k_2 + k_{-1})/k_1}_{K_m}}$$

Michaelis-Mentenova enačba

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}_t][\text{S}]}{[\text{S}] + (k_2 + k_{-1})/k_1} \rightarrow K_m$$

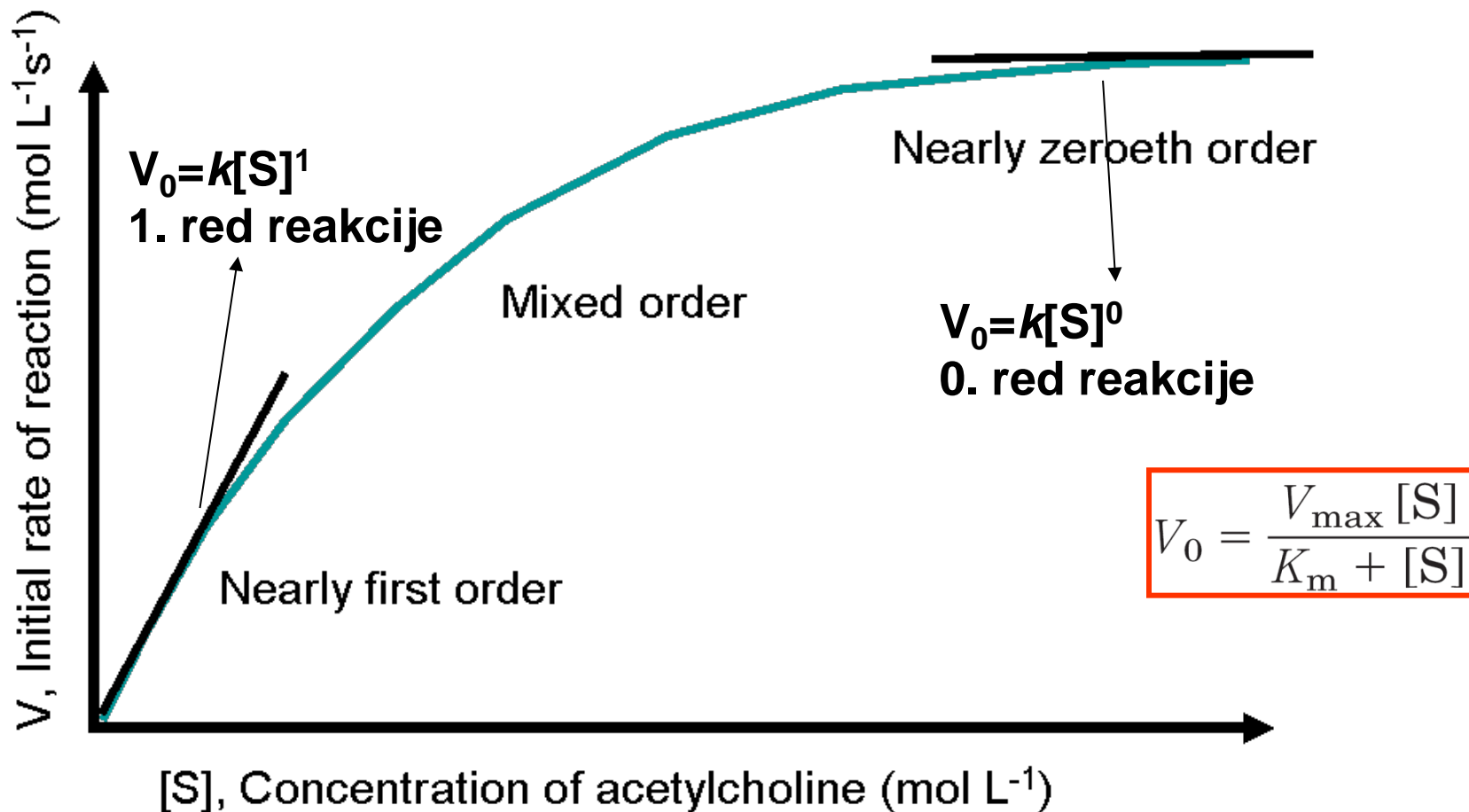
$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}_t][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

$$V_0 = k_2[\text{ES}]$$

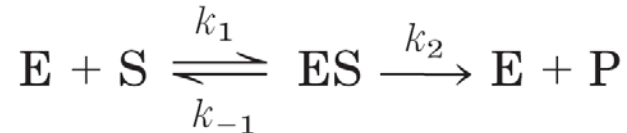
$$V_0 = \frac{k_2[\text{E}_t][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \rightarrow V_{\max}$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

Odvisnost začetne hitrosti v_0 od koncentracije substrata S ($v_0=k.[S]^n$)



Vpliv koncentracije substrata na začetno hitrost encimske reakcije



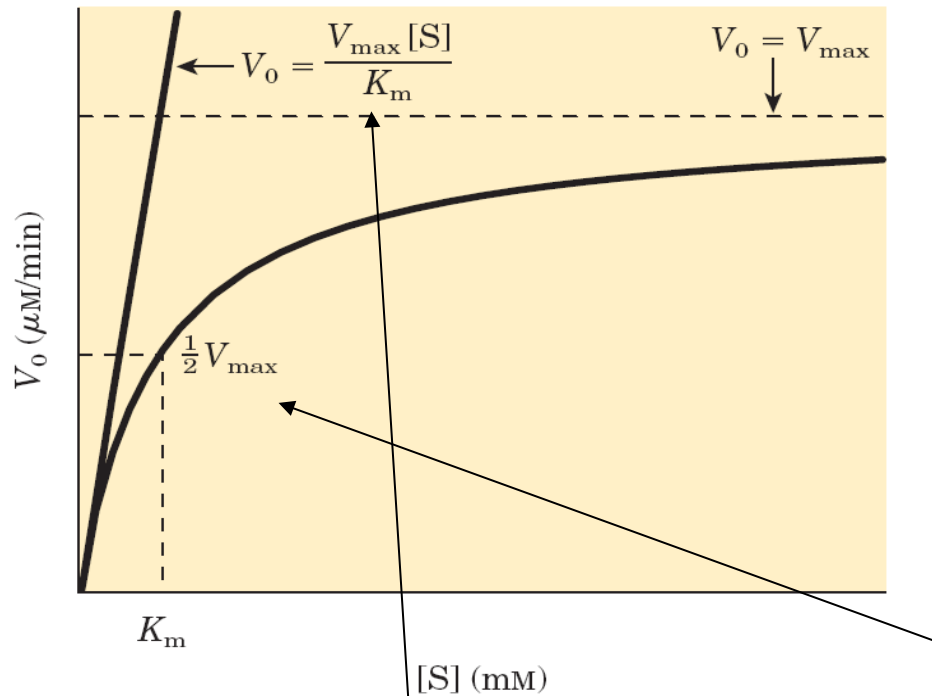
Opis krivulje podaja Michaelis-Mentenova enačba

$$V_0 = \frac{V_{\max} [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

Predpostavke pri izpeljavi Michaelis-Mentenove kinetike in namen

- V začetku je koncentracija P zanemarljivo majhna, ni reakcije $\text{P} \rightarrow \text{S}$ ($k_{-2} = 0$)
- Razgradnja ES določa hitrost celotne reakcije $v_0 = k_2[\text{ES}]$
- Težko je izmeriti $[\text{ES}]$ ($v_0 = k_2([\text{ES}])$), zato določimo K_m in V_{\max} , s katerima okarakteriziramo encimsko aktivnost

Odvisnost začetne hitrosti od koncentracije substrata – grafična določitev konstant K_m in V_{max}



$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = [S], \text{ when } V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$$

$$[S] \ll K_m \rightarrow V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Transformacija Michaelisove enačbe v dvojno recipročno enačbo (Lineweaver-Burk)

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

