

Izražanje in primerjava katalitične učinkovitosti različnih encimov

- K_m
- k_{cat}
- k_{cat}/K_m

Encimi, ki delujejo po Michaelis-Mentenovih zakonitostih:

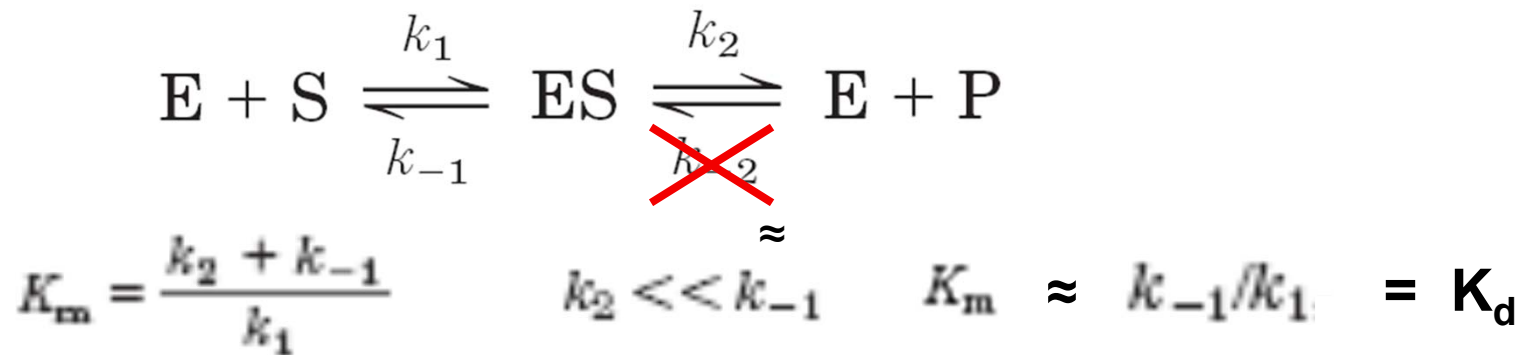
- Sestavljeni so iz ene polipeptidne verige.
- Aktivni center je bodisi en sam, če jih je več, so neodvisni.

(Če imajo encimi več polipeptidnih verig ali več med seboj odvisnih aktivnih centrov, delujejo kot alosterični encimi).

Izražanje in primerjava katalitične učinkovitosti različnih encimov,

K_m

- V_{\max} , K_m eksperimentalno določimo



VELJA: - velika $K_m \rightarrow$ majhna afiniteta encima do substrata
- majhna $K_m \rightarrow$ velika afiniteta encima do substrata

- K_m - odraža afiniteto encima do substrata
- odraža fiziološke razmere - za mnoge encime velja:
 $K_m \approx [S]_{\text{fiziol.}}$

Splošni pomen K_m



-Pomen K_m je odvisen od reakcijskega mehanizma, kot npr. stevilo stopenj reakcije in njihove relativne hitrosti

-Če je v dvostopenjski reakciji $k_2 \ll k_{-1}$, potem je K_m merilo za afiniteto encima do substrata

-V primeru, da je $k_2 \gg k_{-1}$, potem je $K_m = k_2/k_1$.

- Če sta hitrosti obeh stopenj primerljivi $k_2 \sim k_{-1}$, **potem** je K_m kompleksna funkcija treh hitrostnih konstant

Tudi za ta primer velja Michaelis Mentenova kinetika, vendar K_m ne moremo opredeliti le kot merilo za afiniteto encima do substrata.

Pri večstopenjskih reakcijah je K_m še kompleksnejša funkcija, sestavljena iz številnih hitrostnih konstant.

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Vrednosti K_m nekaterih encimov in substratov

TABLE 6-6 K_m for Some Enzymes and Substrates

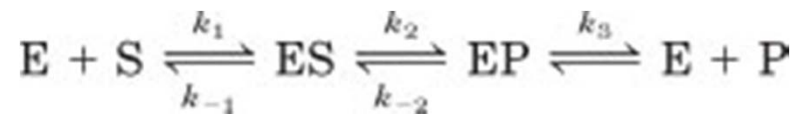
<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	<i>N</i> -Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

Splošni pomen Vmax

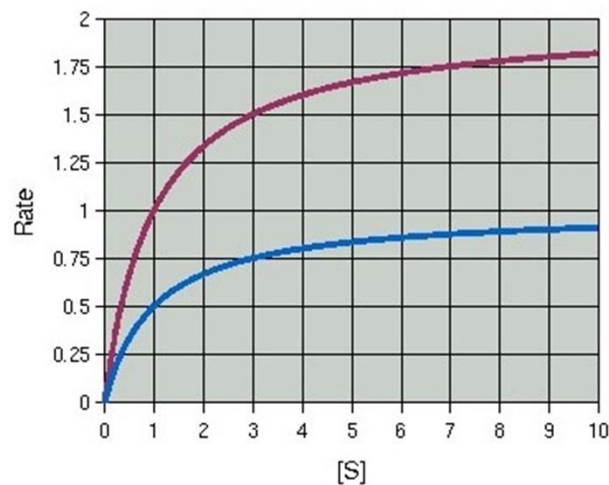


-Če gre za dvostopenjski Michaelis-Mentenov mehanizem, kjer k_2 določa hitrost reakcije: **$V_{\max} = k_2[\text{Et}]$**

-Število reakcijskih stopenj se med encimi razlikuje:



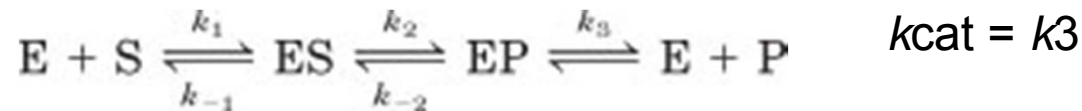
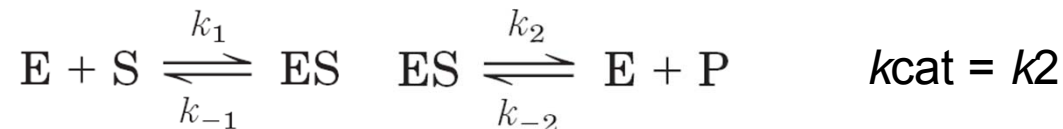
-Če gre za tristopenjski mehanizem, kjer k_3 določa hitrost reakcije: **$V_{\max} = k_3[\text{Et}]$** .



Splošni pomen Kcat

-Bolj splošna hitrostna konstanta, ki opisuje limitirajočo hitrost katerekoli reakcije (ne glede na mehanizem), pri saturacijskih pogojih (vse molekule encima so zasedene)

- Če ima reakcija več stopenj in le ena stopnja odloča o hitrosti, je kcat enaka hitrostni konstanti najpočasnejše stopnje:



- Če več reakcijskih stopenj delno odloča o hitrosti reakcije, je kcat kompleksna funkcija hitrostnih konstant teh stopenj.

-Iz the Michaelis-Mentenove enačbe: **kcat = Vmax/[Et]**

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

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

-Kcat je hitrostna konstanta reakcije prvega reda – ponazarja **pretvorbno število (turnover number) – število molekul substrata, ki jih predela ena molekula encima, ob saturacijskih pogojih, v časovni enoti.**

Pomen K_m v fiziologiji

primer: občutljivost Azijcev na alkohol

- Japonci in Kitajci dosežejo isti učinek alkohola (vazodilatacija, pospešen ritem srca...) že pri nižji koncentraciji zaužitega alkohola kot Evropejci
- Reakcije razgradnje alkohola
 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{H}^+ + \text{NADH}$
encim: alkoholna dehidrogenaza
- $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}^+ + \text{NADH}$
encim: aldehydna dehidrogenaza
- Azijci imajo **aldehydna dehidrogenazo** z višjim $K_m \rightarrow$ (aldehyd v krvi dolgo kroži po telesu); izoencim!
- Izoencimi: katalizirajo isto reakcijo (isti substrat), različne pa so molekulske lastnosti encimov: različna encimska aktivnost (k_{kat} in K_m), različna molekulska masa (M_r). Genski zapis je drugačen, zato druga sekvenca!

Izražanje in primerjava katalitične učinkovitosti različnih encimov,

k_{kat}

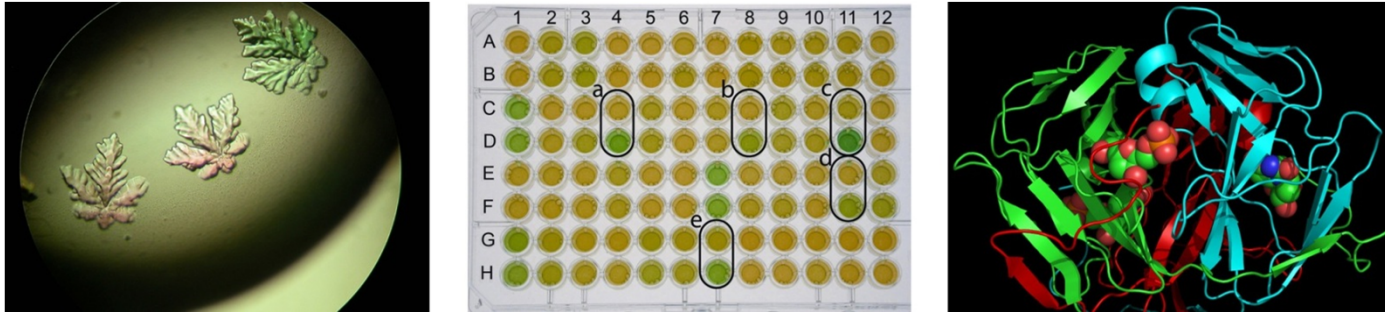


$$V_{\text{max}} = k_2 \cdot [\text{E}]_t$$

$$V_{\text{max}} = k_{\text{kat}} \cdot [\text{E}]_t \quad v_0 = k_{\text{kat}} [\text{ES}]$$

- k_{kat} = hitrostna konstanta najpočasnejše stopnje (v smeri, ki daje produkt!)
- k_{kat} - pretvorbena število: št. molekul substrata, ki se pretvori v produkt na eni molekuli encima v enoti časa (encim je nasičen s substratom)

Primerjava katalitičnih mehanizmov in učinkovitosti encimov



- k_{cat} in K_m sta uporabna za primerjavo različnih encimov z različnimi reakcijskimi mehanizmov.

- k_{cat} in K_m ponazarjata okolje v celici *in vivo*, kjer pri določeni koncentraciji substrata poteka encimska kataliza.

- k_{cat} in K_m vsak posamezno nista dovolj, da bi opredelila kinetično učinkovitost encima.

-Npr. 2 encima imata lahko enak K_{cat} , vendar je hitrost nekatalizirane reakcije pri obeh drugačna, zato vsak drugače vplivata na pospešitev katalizirane reakcije.

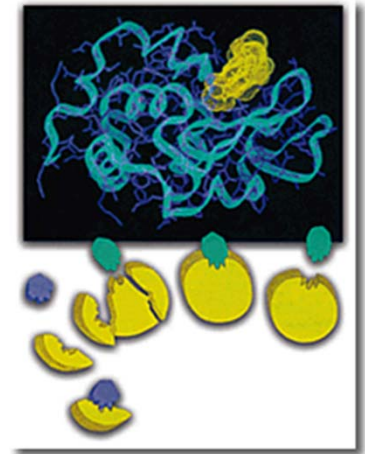
- K_m je pogosto podobna koncentraciji substrata v celici. Če je koncentracija substrata zelo majhna, bo imel tak encim majhen K_m v primerjavi z encimom, ki katalizira reakcijo substrata, ki je prisoten v veliki koncentraciji.

k_{cat}/K_m- najboljši način za primerjavo katalitičnih učinkovitosti encimov

-***k_{cat}/K_m*** – konstanta specifičnosti (specificity constant)

-Ponazarja hitrost pretvorbe $E + S \longrightarrow E + P$.

-Če je $[S] \ll K_m$, $V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]} \longrightarrow V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_t][S]$



-Reakcija drugega reda, saj je V_0 odvisen od koncentracije $[E_t]$ in $[S]$;

- Zgornja omejitev za k_{cat}/K_m je hitrost, s katero se E in S srečata (difuzija)

- Z difuzijo-uravnavana omejitev znaša 10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, zato imajo mnogi encimi k_{cat}/K_m blizu te številke.

-Take encimi imajo “perfektno katalizo” (catalytic perfection).

Kinetična učinkovitost encimov

TABLE 6-7 Turnover Numbers, k_{cat} , of Some Enzymes

<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

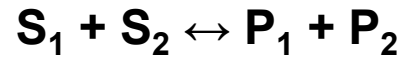
Slabost izražanja encimske učinkovitosti s K_m ali k_{kat} : ni upoštevana neencimska reakcija, ni informacije za koliko encim pospeši reakcijo

Najboljši način za izražanje encimske aktivnosti: k_{cat}/K_m

TABLE 6-8 Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1.1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	1.4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	1.4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	1.8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	1.9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

Michaelis-Mentenova kinetika velja tudi za bi (več) substratne reakcije (velikanska večina reakcij v organizmu je takih!)



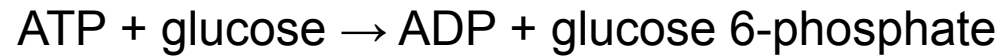
Primer: prenos funkcionalne skupine (fosforilne, amino...) z enega substrata na drug substrat (encimi: transferaze)



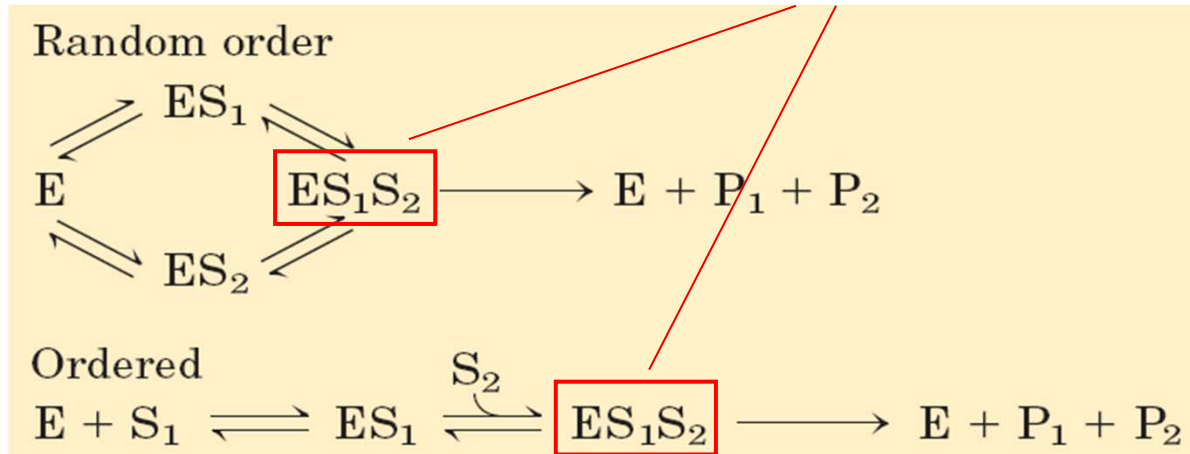
TABLE 6-6 K_m for Some Enzymes and Substrates

<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5

Mehanizem encimsko kataliziranih bisubstratnih reakcij je kompleksen



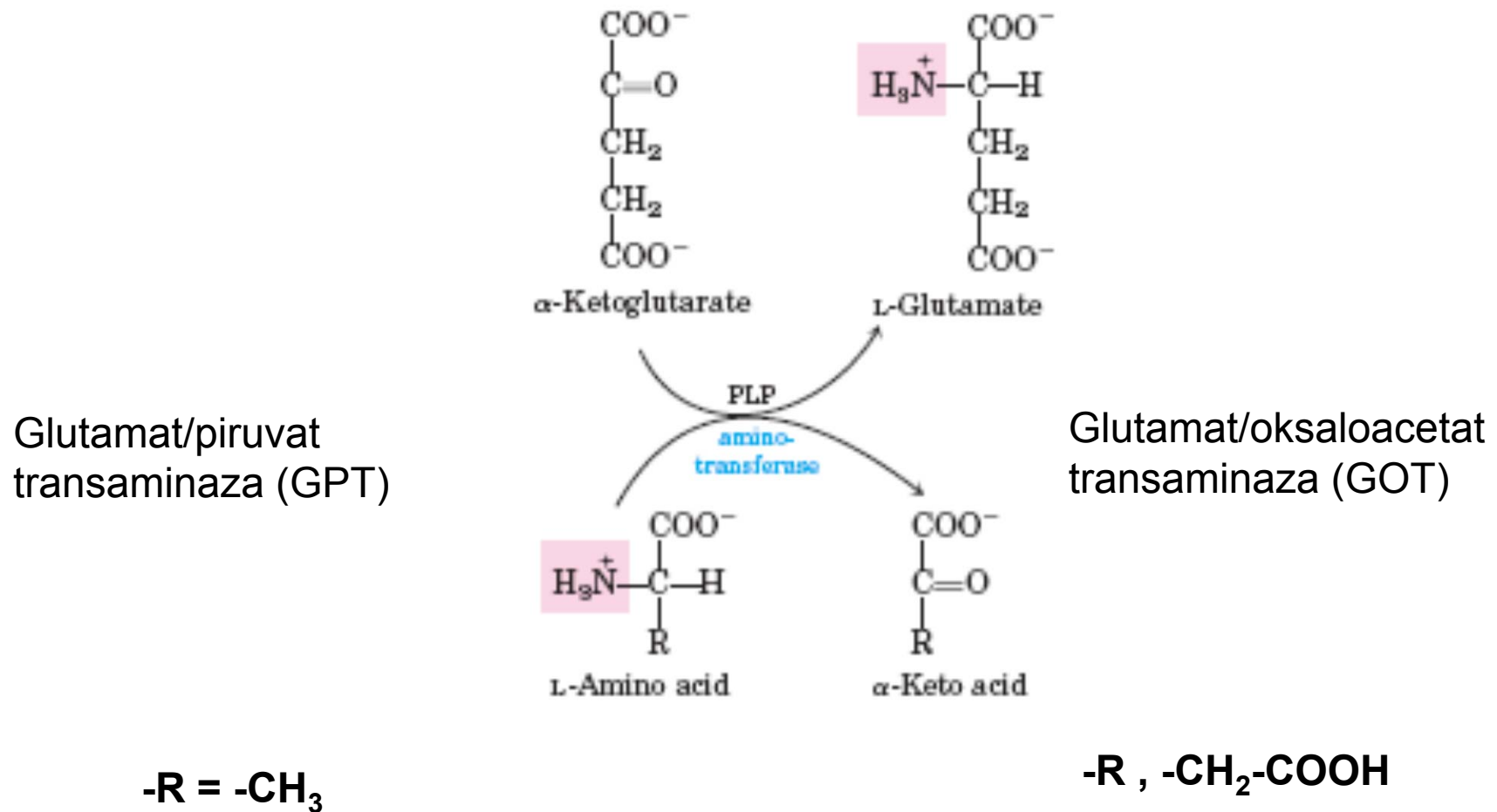
- Mehanizem, ki vključuje **ternarni kompleks**



- Mehanizem brez ternarnega kompleksa (ping-pong mehanizem)

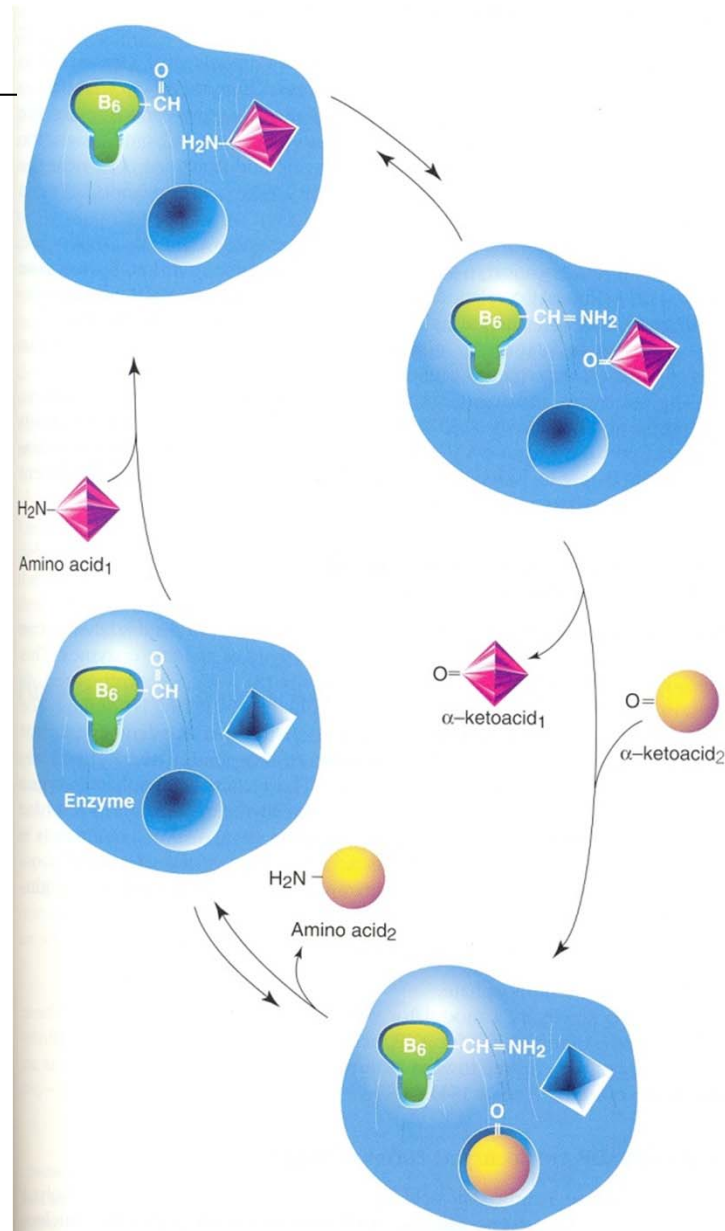
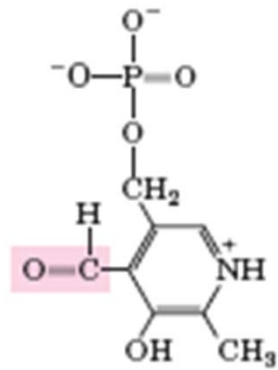


Primer bisubstratne reakcije: Transaminacija: encim transaminaza
(koencim piridoksalfosfat)



Transaminacije: Prenos $-NH_2$ skupine z enega na drug substrat

Koencim:
piridoksal-fosfat



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

Modulatorji encimske aktivnosti

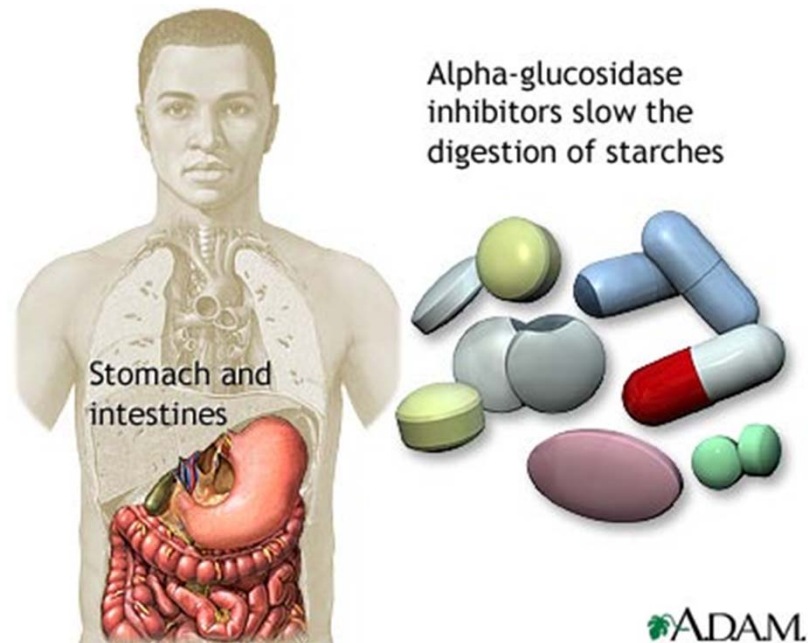
- Aktivatorji – encimska aktivnost ↑
- **Inhibitorji** – encimska aktivnost ↓

Vrste inhibicije:

- reverzibilna inhibicija - kompetitivna
 - akompetitivna
 - mešana (npr. nekompetitivna)
- ireverzibilna inhibicija

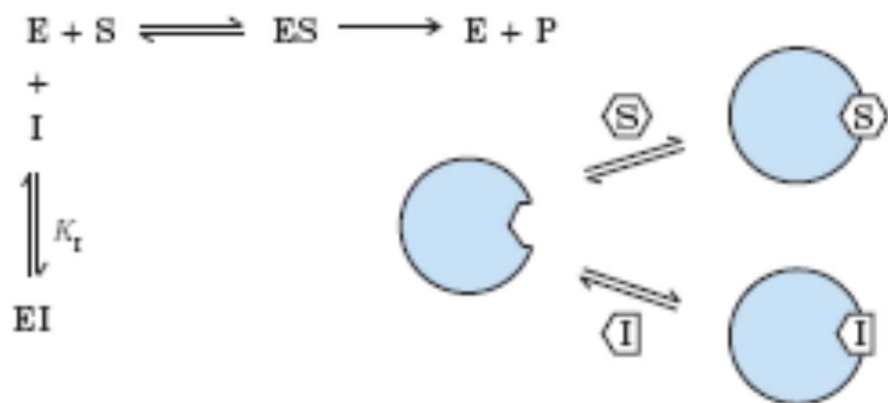
Encimska inhibicija - uporaba

- Inhibitorji encimov – najpomembnejše farmacevtske učinkovine (npr. aspirin inhibira sintezo prostaglandinov)
- Uporaba inhibitorjev pri študiju mehanizma encimskih reakcij
- Uporaba inhibitorjev pri študiju metaboličnih poti
- Inhibitorji so lahko strupi! Kako postopati pri zastrupitvah? Pri reverzibilnih (kompetitivnih) inhibitorjih uvesti substrat v visoki koncentraciji Pri ireverzibilnih inhibitorjih uvesti sredstvo, ki veže inhibitor z večjo afiniteto kot encim,

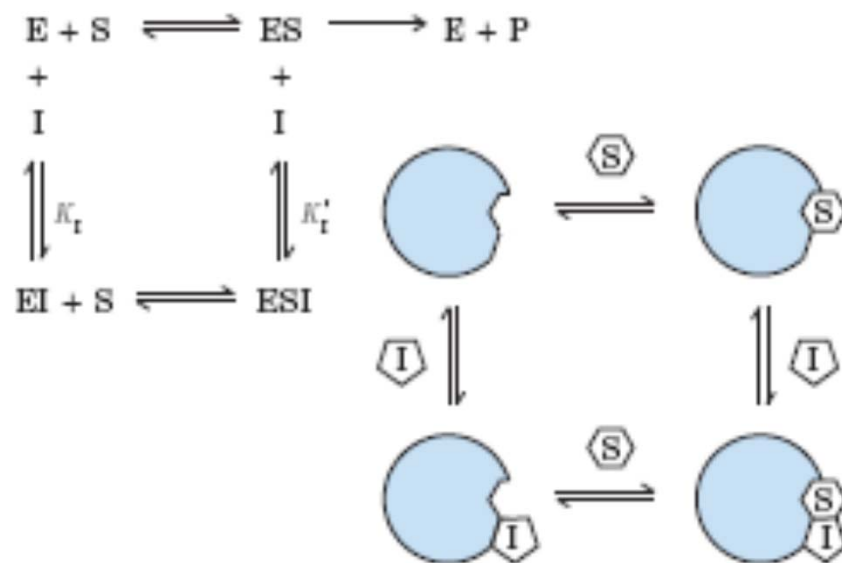


Vrste reverzibilne inhibicije

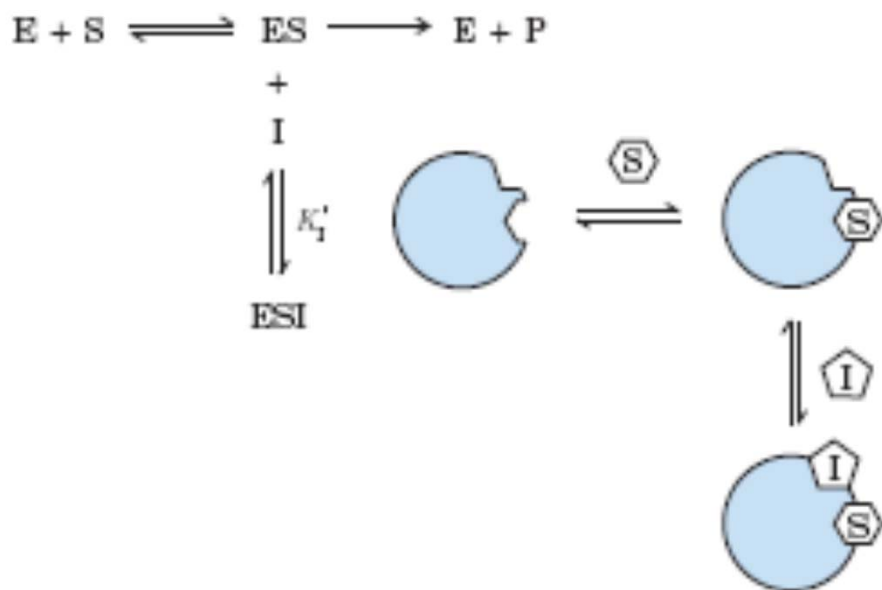
Kompetitivna inhibicija



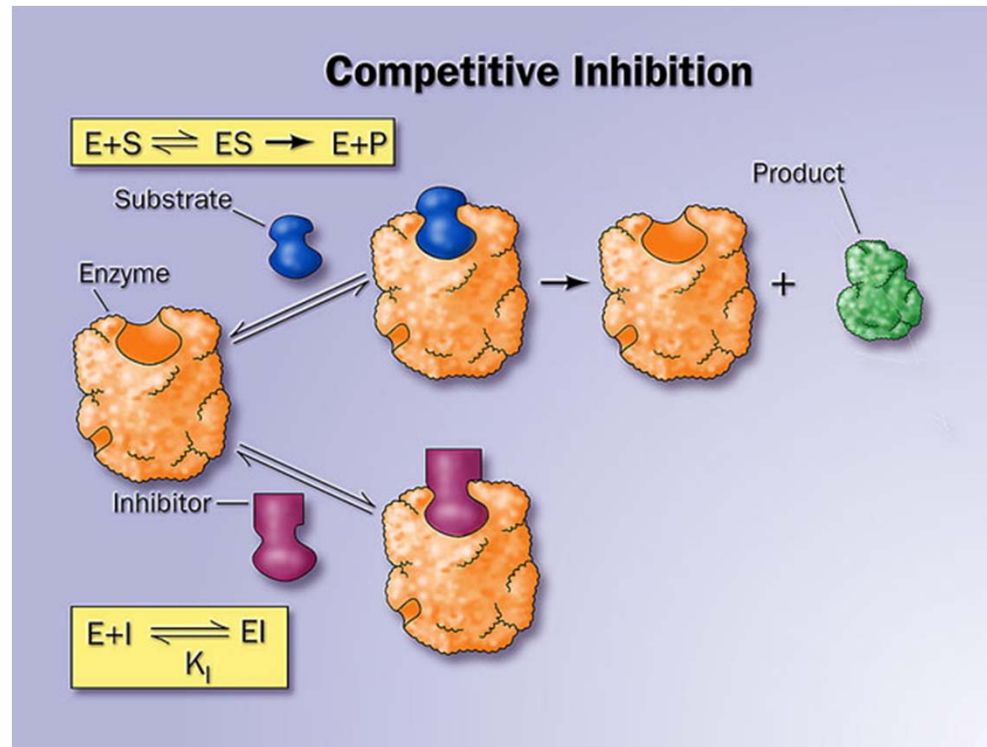
Mešana inhibicija



Akompetitivna inhibicija



Kompetitivna inhibicija

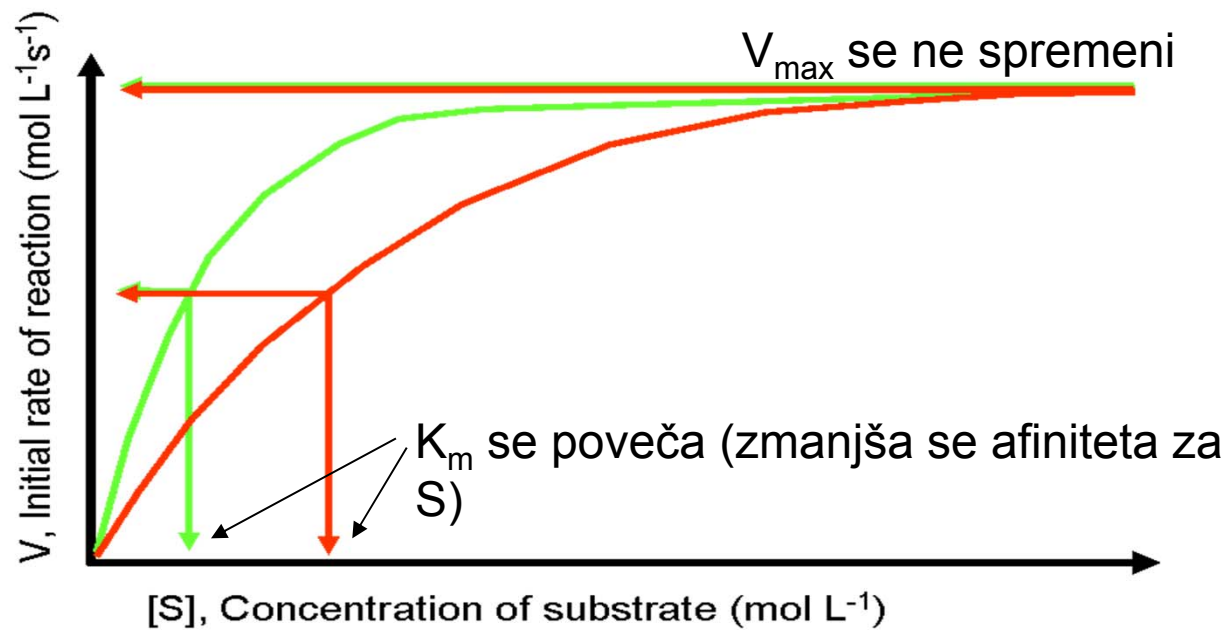


$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + [S]} \quad \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{and} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

S in I sta si podobna in se vežeta na isto mesto, a nikoli sočasno!

Kompetitivni inhibitor vpliva na afiniteto encima do substrata ne pa na maksimalno hitrost.

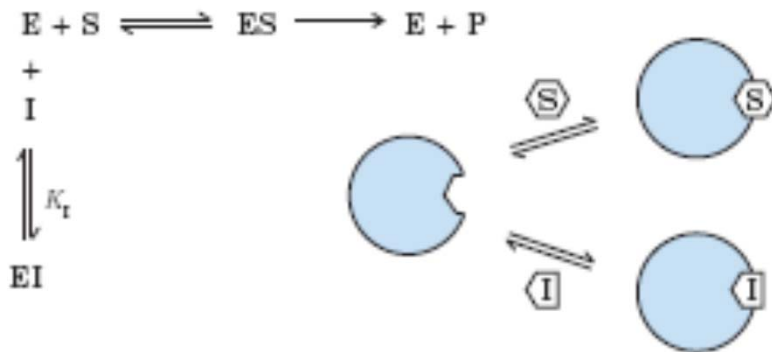
Kompetitivna inhibicija



— brez inhibitorja

— z inhibitorjem

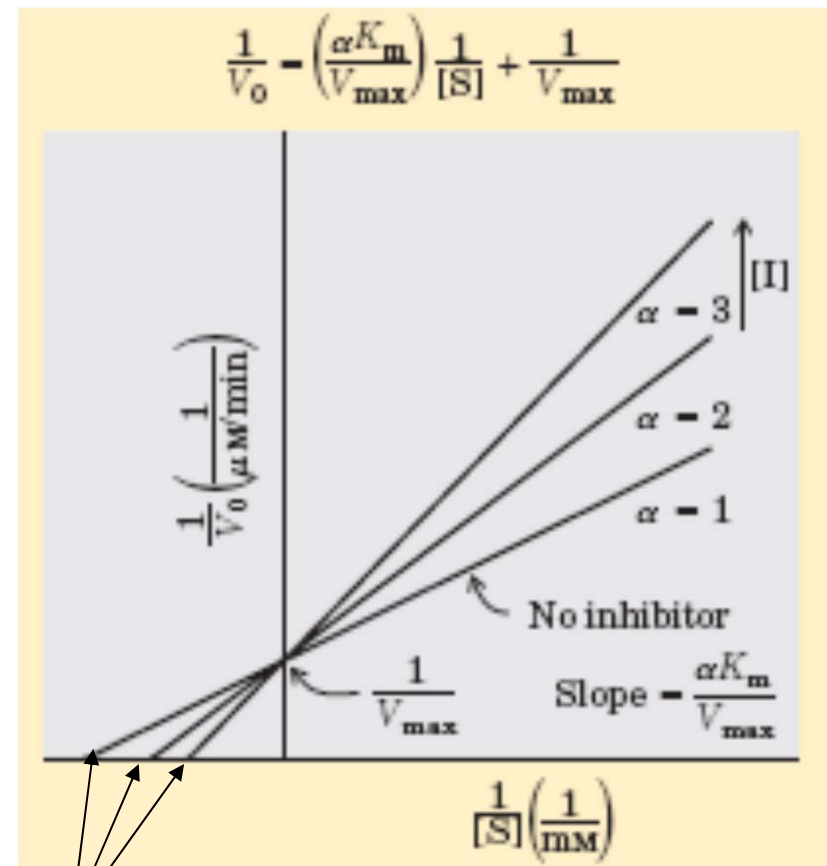
Kompetitivna inhibicija (spremenjena K_m)



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

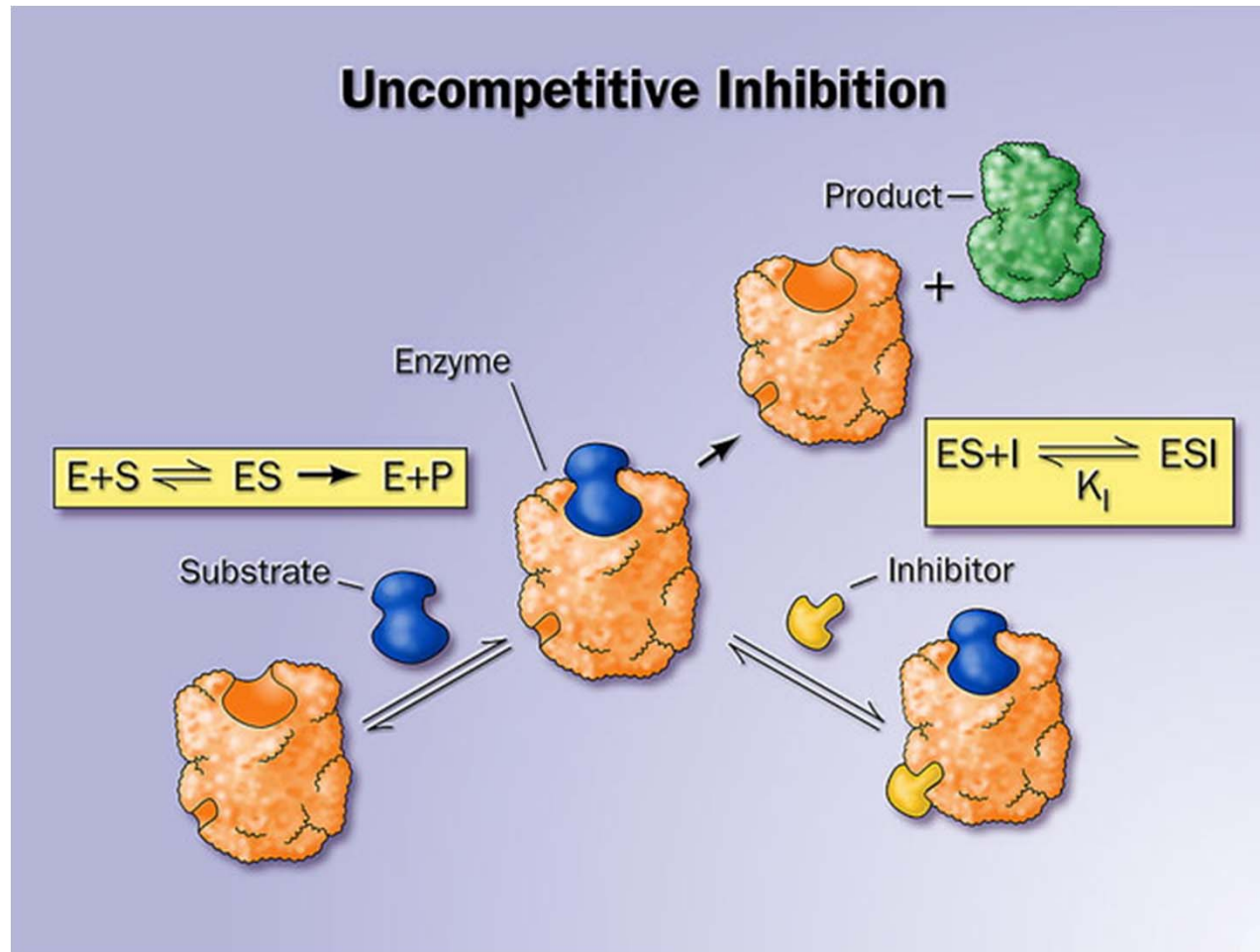
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{and} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

dvojni recipročni diagram

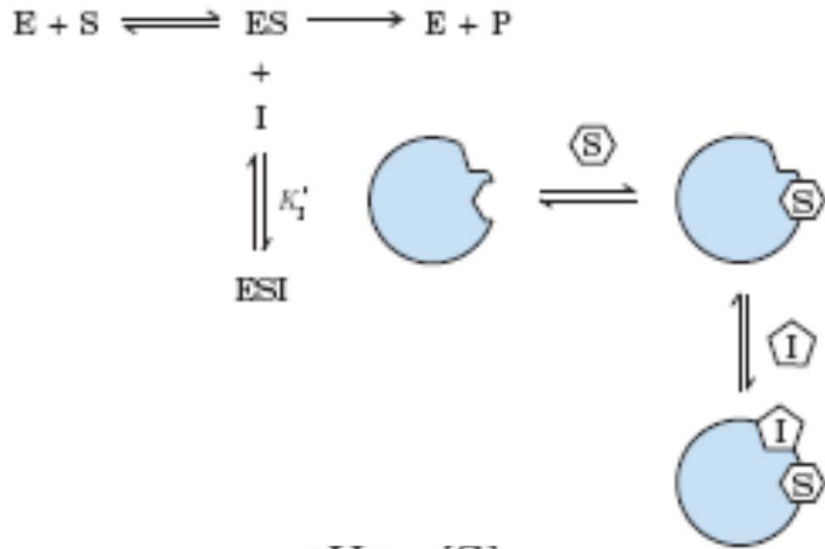


$-1/K_m$

Mehanizem akompetitivne inhibicije



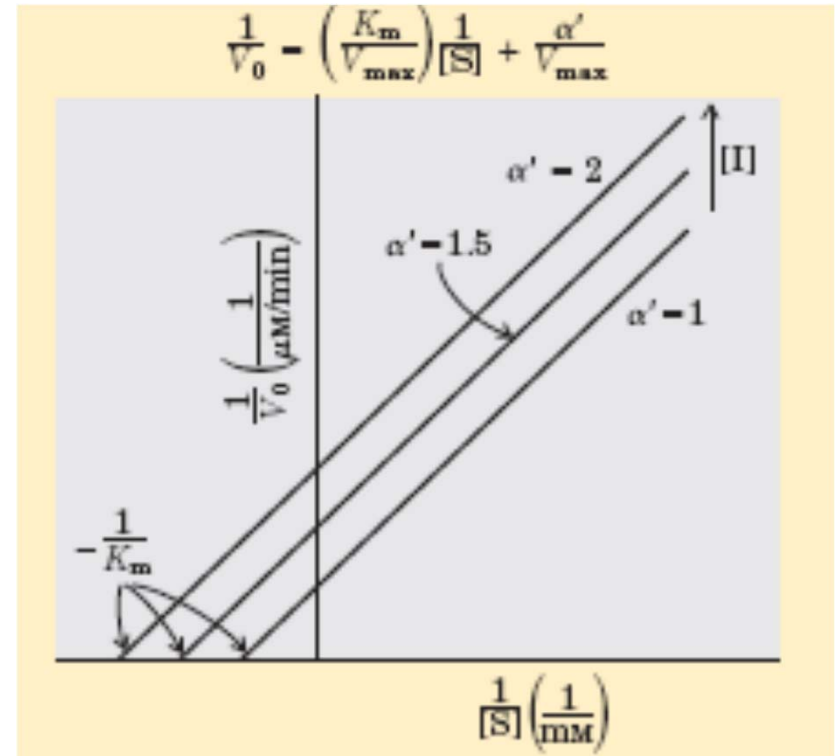
Akompetitivna inhibicija (spremenjena K_m in V_{max})



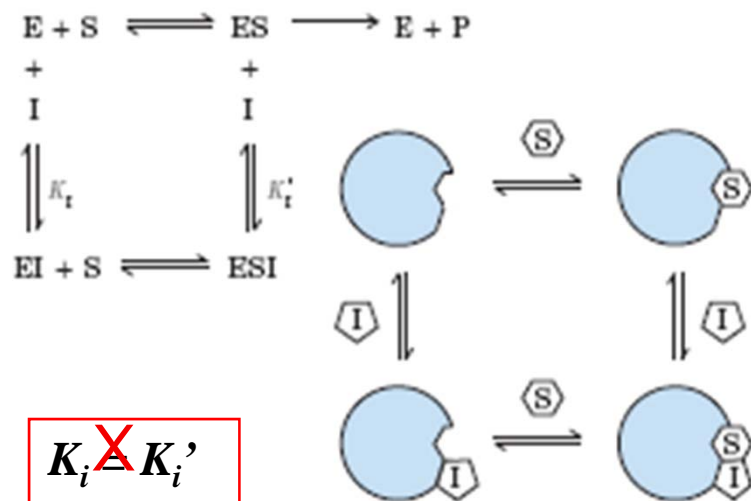
$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \quad \text{and} \quad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

dvojni recipročni diagram



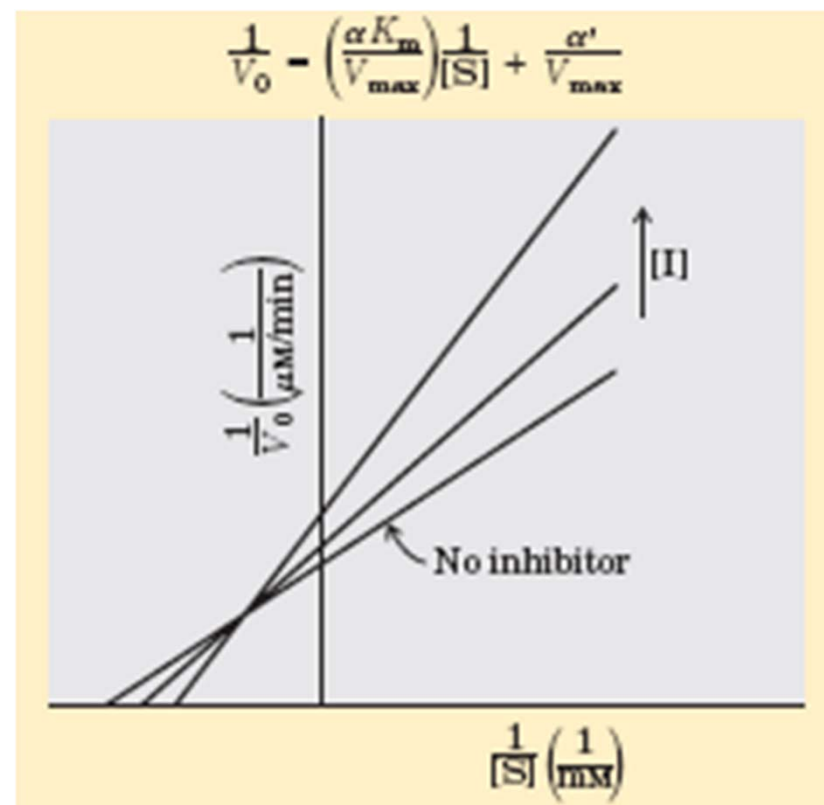
Mešana inhibicija (spremenjena K_m in V_{max})



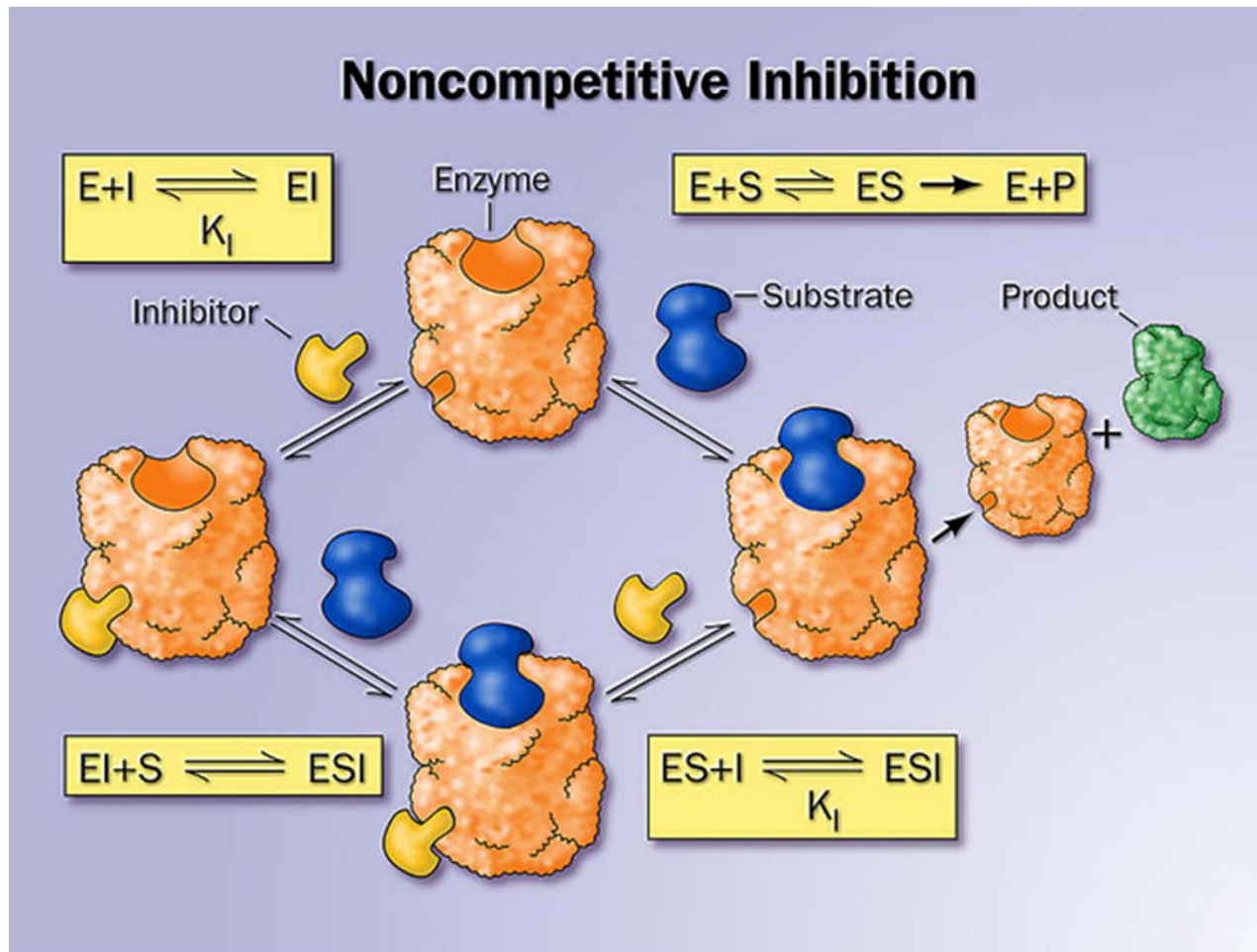
$$\begin{array}{c}
 K_i \neq K_i' \\
 \alpha \neq \alpha'
 \end{array}$$

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

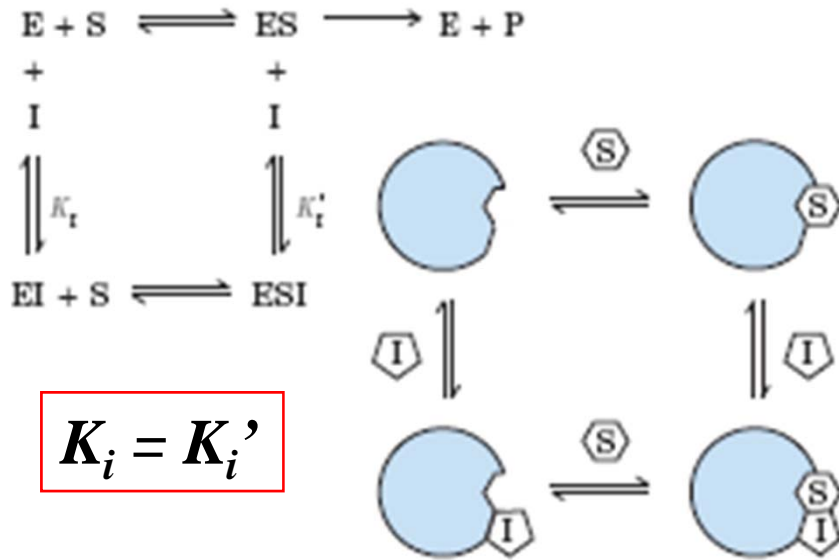
dvojni recipročni diagram



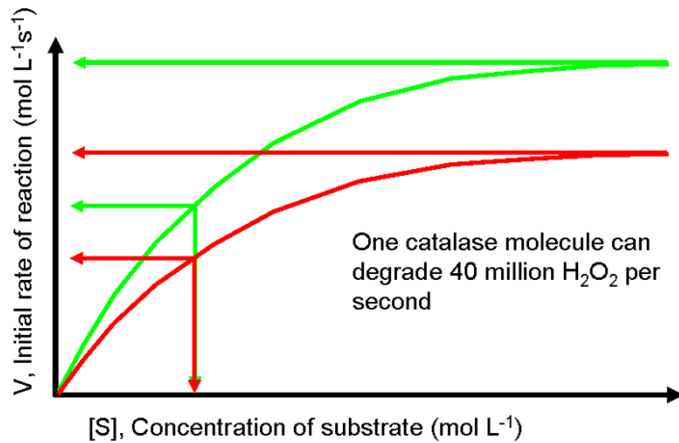
Poseben primer mešane inhibicije: nekompetitivna inhibicija



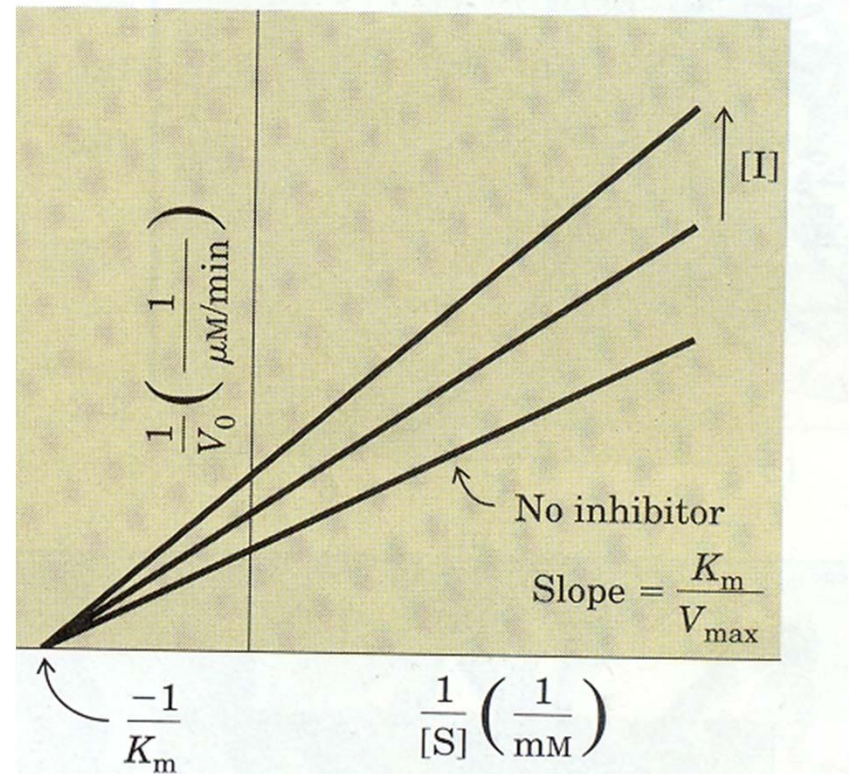
Nekompetitivna inhibicija - spremenjena V_{max} , K_m pa ne!



$$K_i = K_i'$$

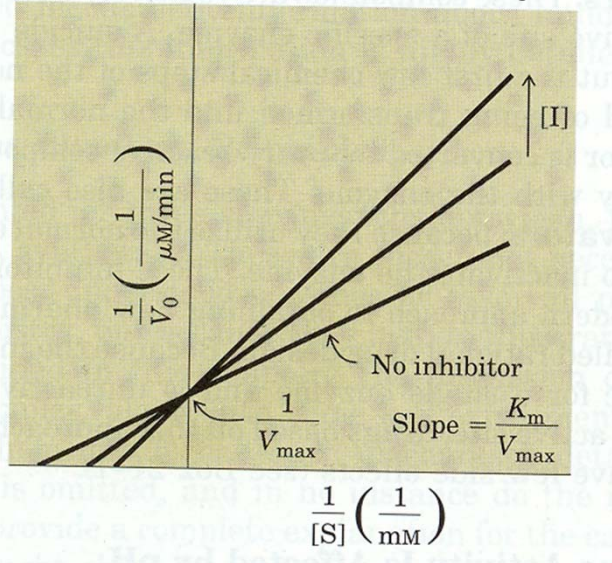


dvojni recipročni diagram

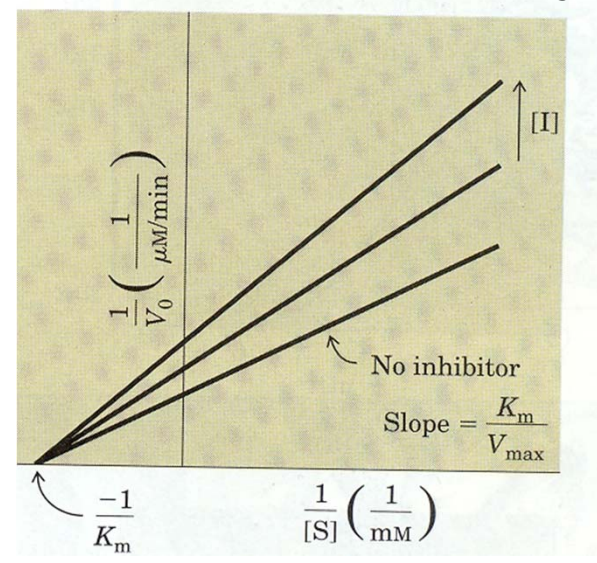


Diagnostični diagrami za različne vrste inhibicij

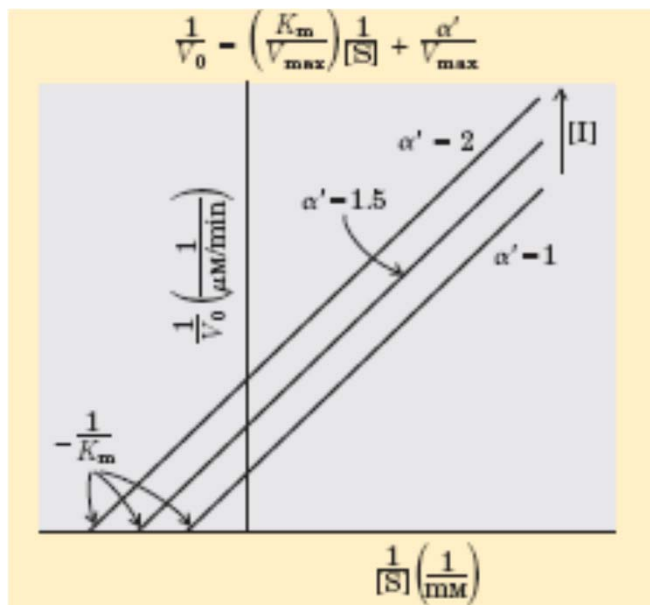
Kompetitivna inhibicija



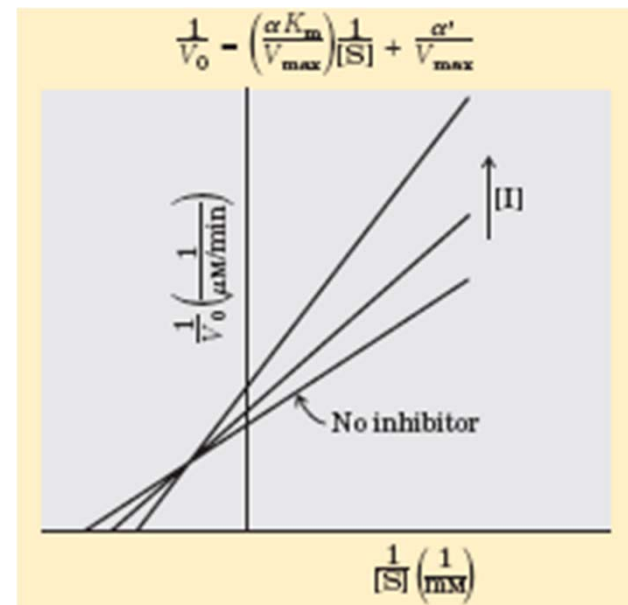
Nekompetitivna inhibicija



Akompetitivna inhibicija



Mešana inhibicija



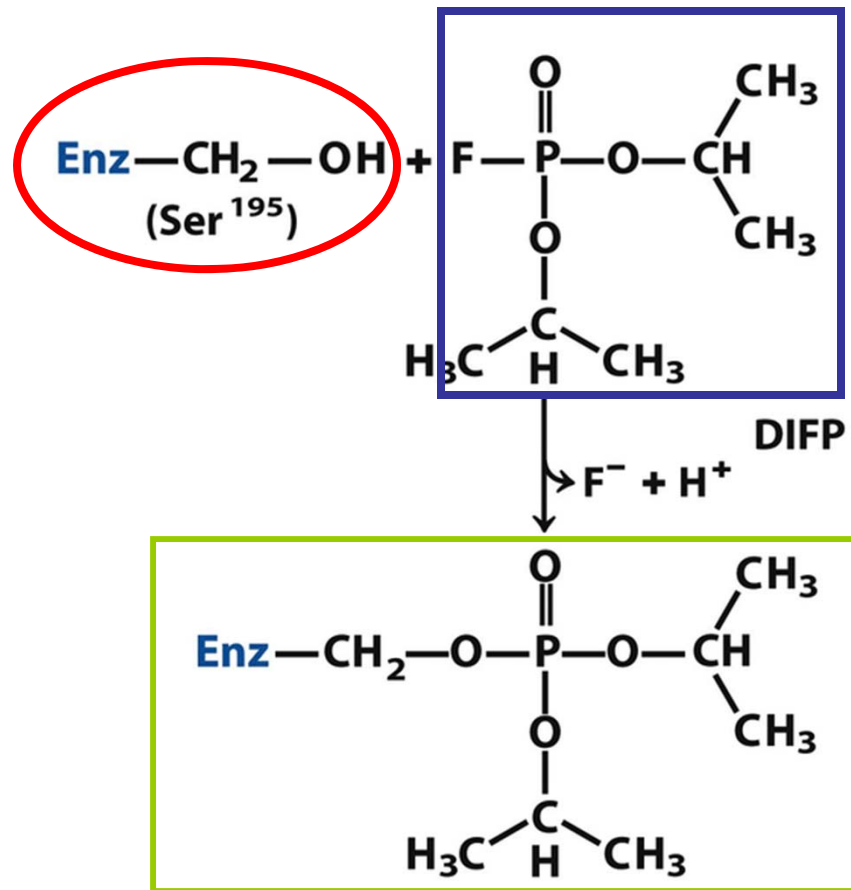
Kinetični parametri reverzibilnih inhibicij

Inhibitor type	Apparent V_{\max}	Apparent K_m
None	V_{\max}	K_m
Competitive	V_{\max}	αK_m
Uncompetitive	V_{\max}/α'	K_m/α'
Mixed	V_{\max}/α'	$\alpha K_m/\alpha'$

Akompetitivna in mešana inhibicija – za encime z več substrati!

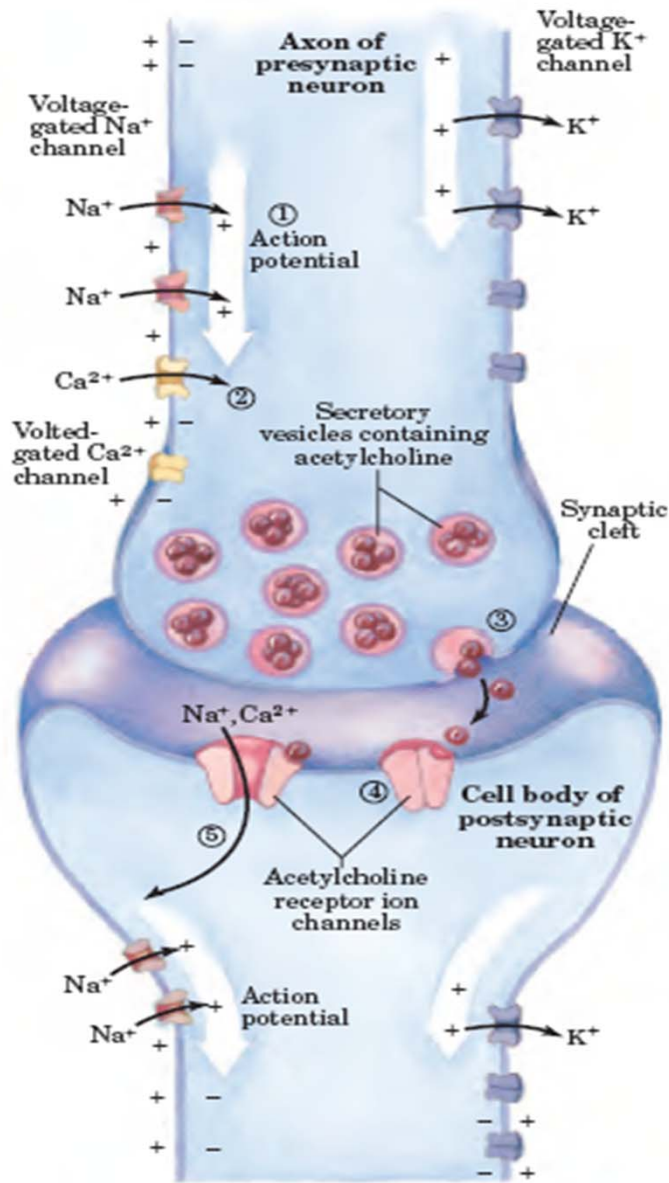
Ireverzibilna inhibicija – inhibitor se ireverzibilno veže v aktivnem mestu encima

Primer: reakcija kimotripsina ali acetilholin-esteraze (v aktivnem mestu je Ser) z diizopropilfluorofosfatom (DIFP)

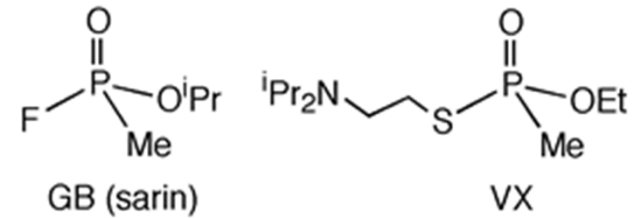
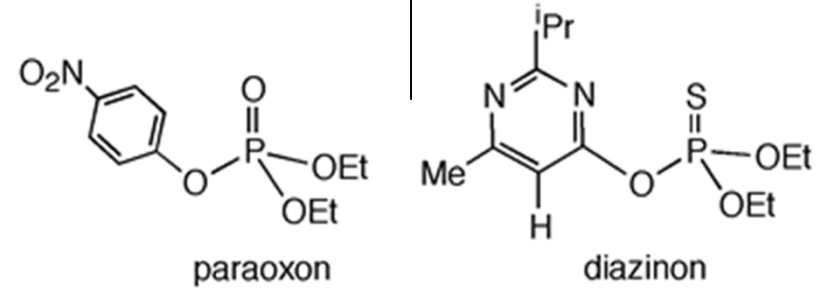


Encim je trajno okvarjen!

Spojine, kot so nekateri pesticidi, se ireverzibilno vežejo na encim acetilholin-esterazo (AChE), ki hidrolizira nevrottransmitor acetilholin



pesticid



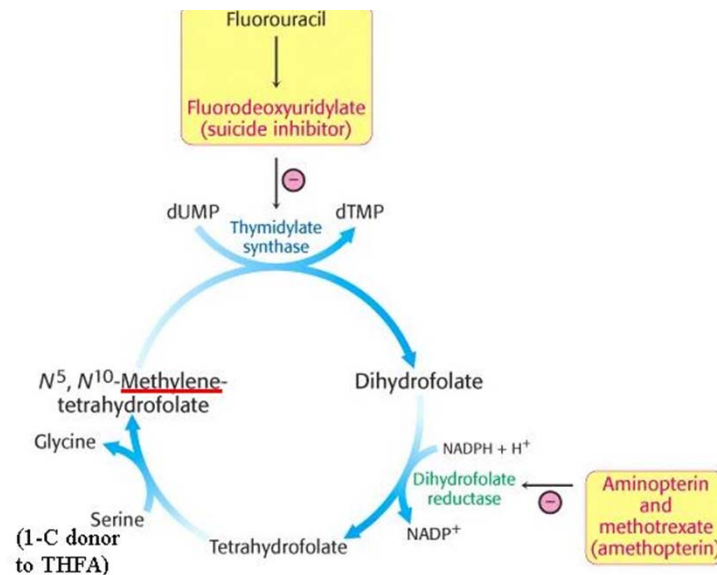
živčni bojni strup

acetilholin + voda → očetna kislina + holin,

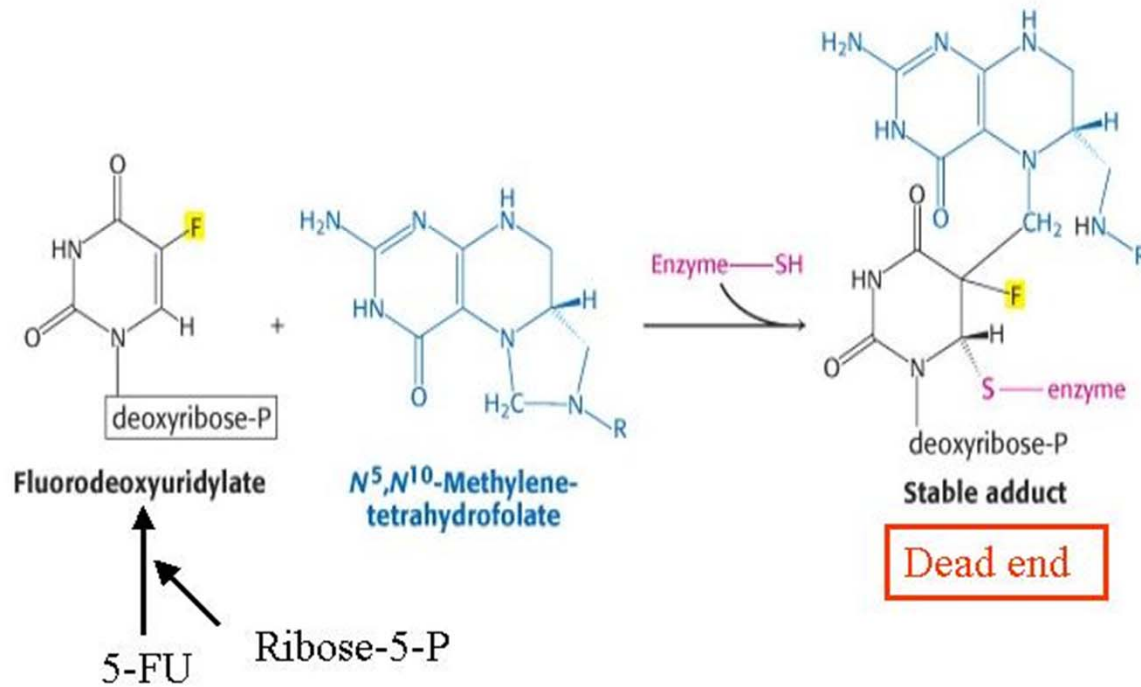
encim = AChE

Samomorilski inhibitorji

- Nereaktivni, dokler se ne vežejo v aktivni center encima. Nekaj encimskih ciklov reakcije se tudi ob samomorilskem inhibitorju lahko odvrti normalno, toda namesto običajnega produkta nastaja izredno reaktivna snov, ki se ireverzibilno veže na encim.
- Samomorilska inaktivacija je z mehanizmom reakcije pogojena inaktivacija.
- Pomen v farmacevtski industriji: racionalno načrtovanje zdravil
- Dobra učinkovina je tista, ki je specifična za en encim in je neaktivna, dokler se ne veže na aktivno mesto . S tem je zdravilo zelo učinkovito, z malo stranskimi učinki.



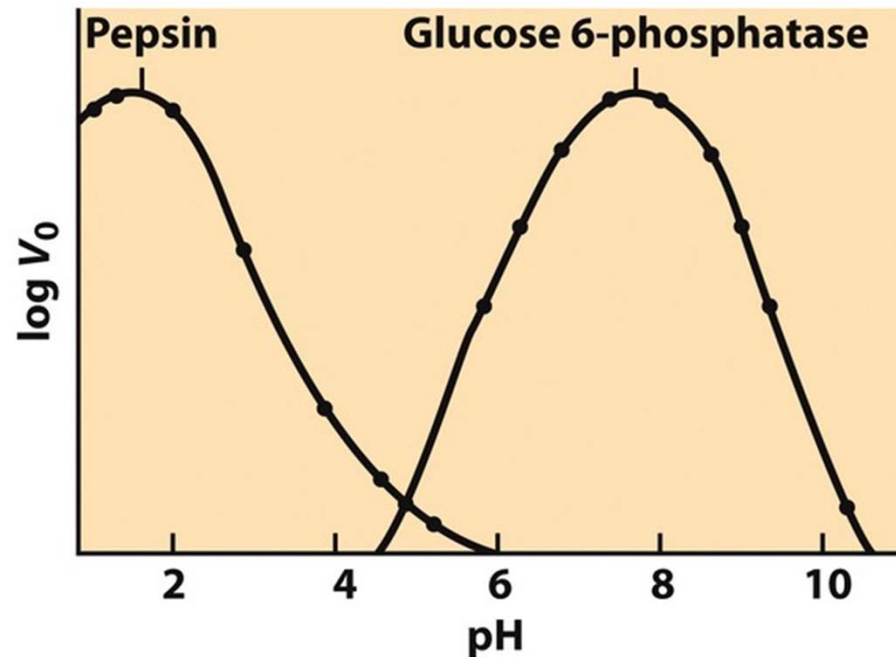
Terapija raka – 5-fluoro uracil, samomorilski inhibitor dihidrifoat reduktaze



Na encimsko aktivnost vplivajo zunanje razmere

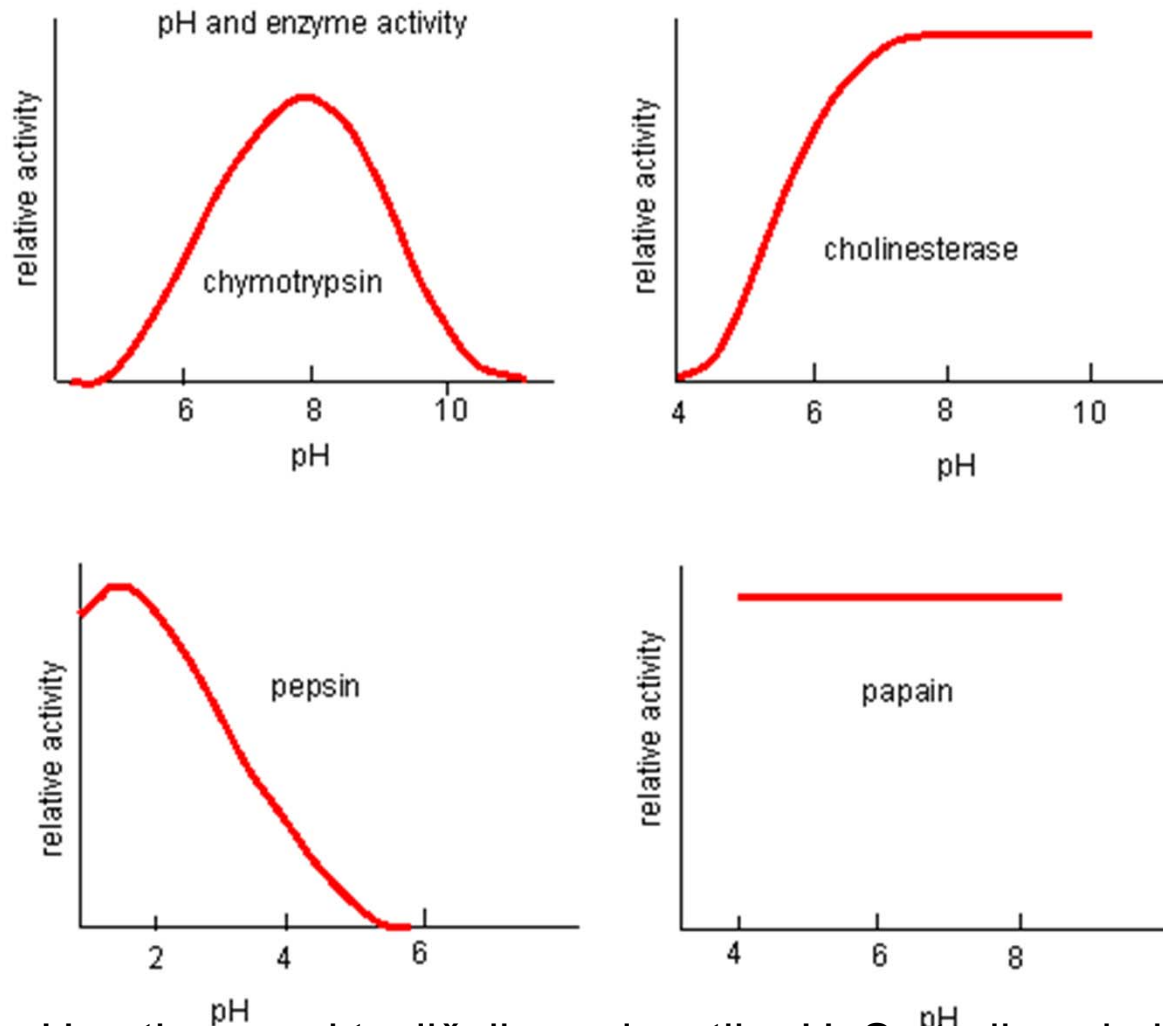
- V_{\max} , K_m – eksperimentalno določimo, karakteristični za encim, odvisni od zunanjih razmer.

- pH
- temperatura
- ionska moč



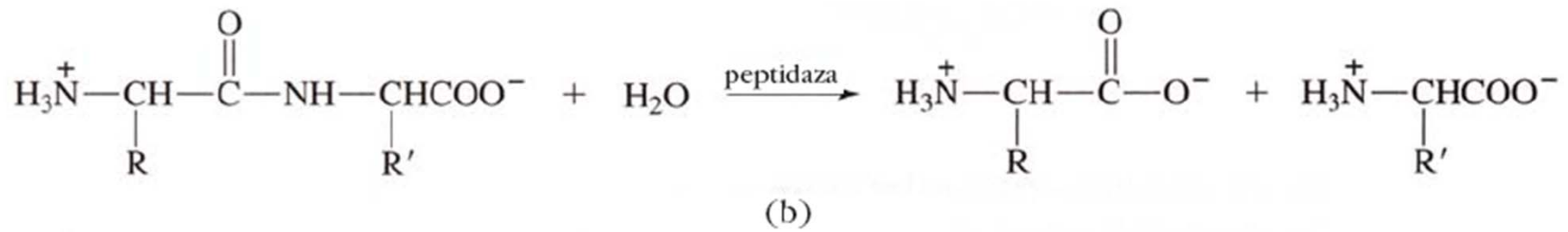
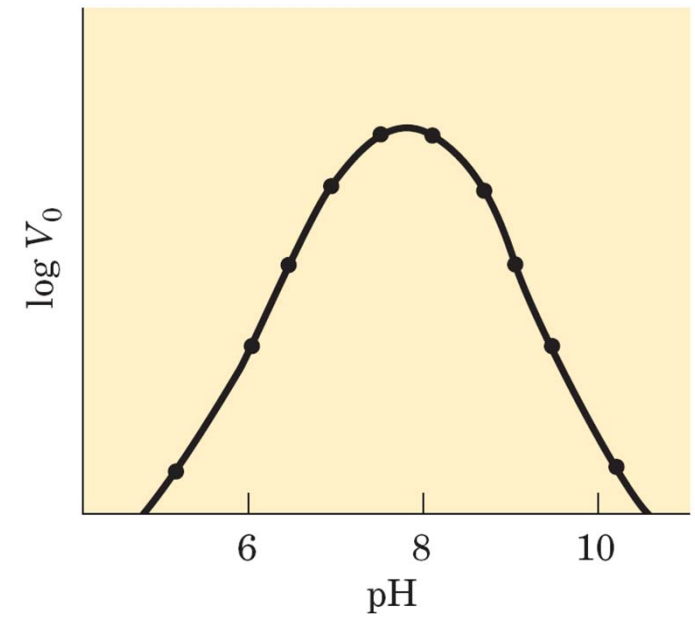
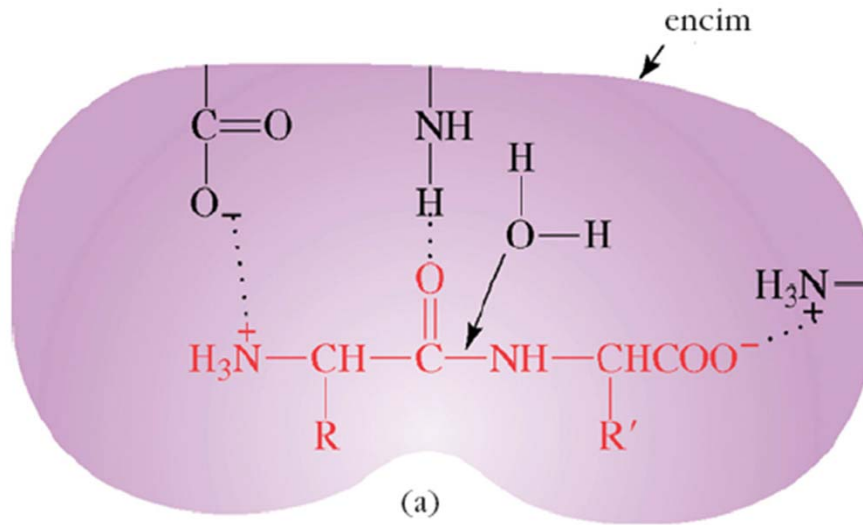
Pepsin ima največjo aktivnost pri nižjem pH kot večina ostalih encimov.

Vpliv pH na encimsko aktivnost (v_0)

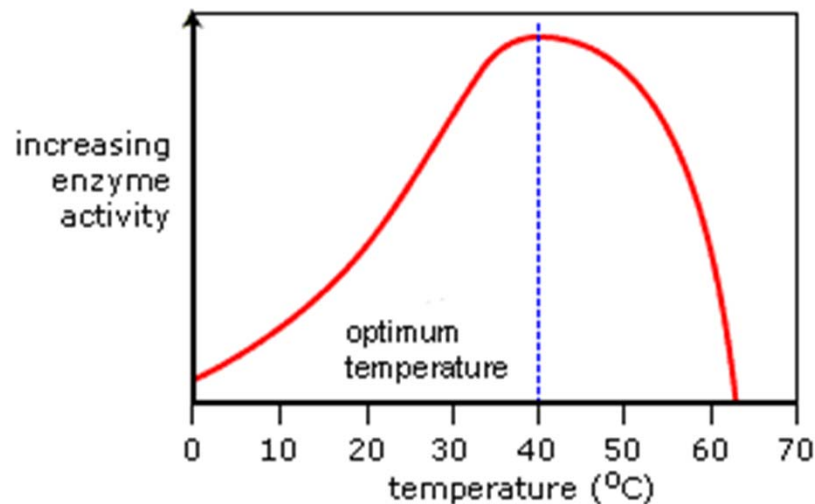


Encimi imajo pH optimum pri različnih vrednostih pH. So tudi encimi, ki imajo enako aktivnost v širokem pH območju.

Kimotripsin ima pH optimum pri pH 8



Vpliv temperature na encimsko aktivnost (V)



Sprva z naraščanjem temperature narašča hitrost reakcije večja kinetična energija molekul, več uspešnih trkov.

Z naraščajočo temperaturo pa se povečuje tudi verjetnost za denaturacijo encima – rušijo se šibke vezi, ki vzdržujejo terciarno strukturo. Ko se ves encim denaturira, s povečevanjem temperature encimska aktivnost strmo pade.

Encimi v organizmu delujejo POD svojim temperaturnim optimumom – aktivnost je sicer manjša, a je tudi verjetnost za denaturacijo encima manjša.

Encimska kinetika - povezetek

- K_m in V_{max} imata pri različnih encimih različni pomen.
- k_{kat} opisuje hitrost določujočo stopnjo encimsko katalizirane reakcije pri saturacijskih pogojih – pretvorbena število (turnover number).
- Razmerje k_{kat}/K_m je dobro merilo katalitične učinkovitosti encima.
- Michaelisova kinetika (enačba) velja tudi za nekatere bisubstratne reakcije (npr. reakcije z mehanizmom ping-pong)
- Reverzibilna inhibicija je lahko kompetitivna, akompetitivna ali mešana. Nekompetitivna inhibicija je poseben primer mešane inhibicije.
- Pri kompetitivni inhibiciji substrat in inhibitor tekmujeta za isto vezavno mesto.
- Pri akompetitivni inhibiciji se inhibitor lahko veže le na kompleks ES, na drugo mesto kot S.
- Pri mešani inhibiciji se inhibitor lahko veže na encim in na ES, na drugo mesto kot S.
- Pri ireverzibilni inhibiciji se inhibitor za stalno veže na encim. Samomorilski inhibitorji so substrati, ki z delovanjem encima tvorijo produkte, le-ti pa se ireverzibilno vežejo na encim.
- Večina encimov ima optimum pH (ali območje optimalnega pH) in optimum temperature, kjer je encim najbolj aktiven.