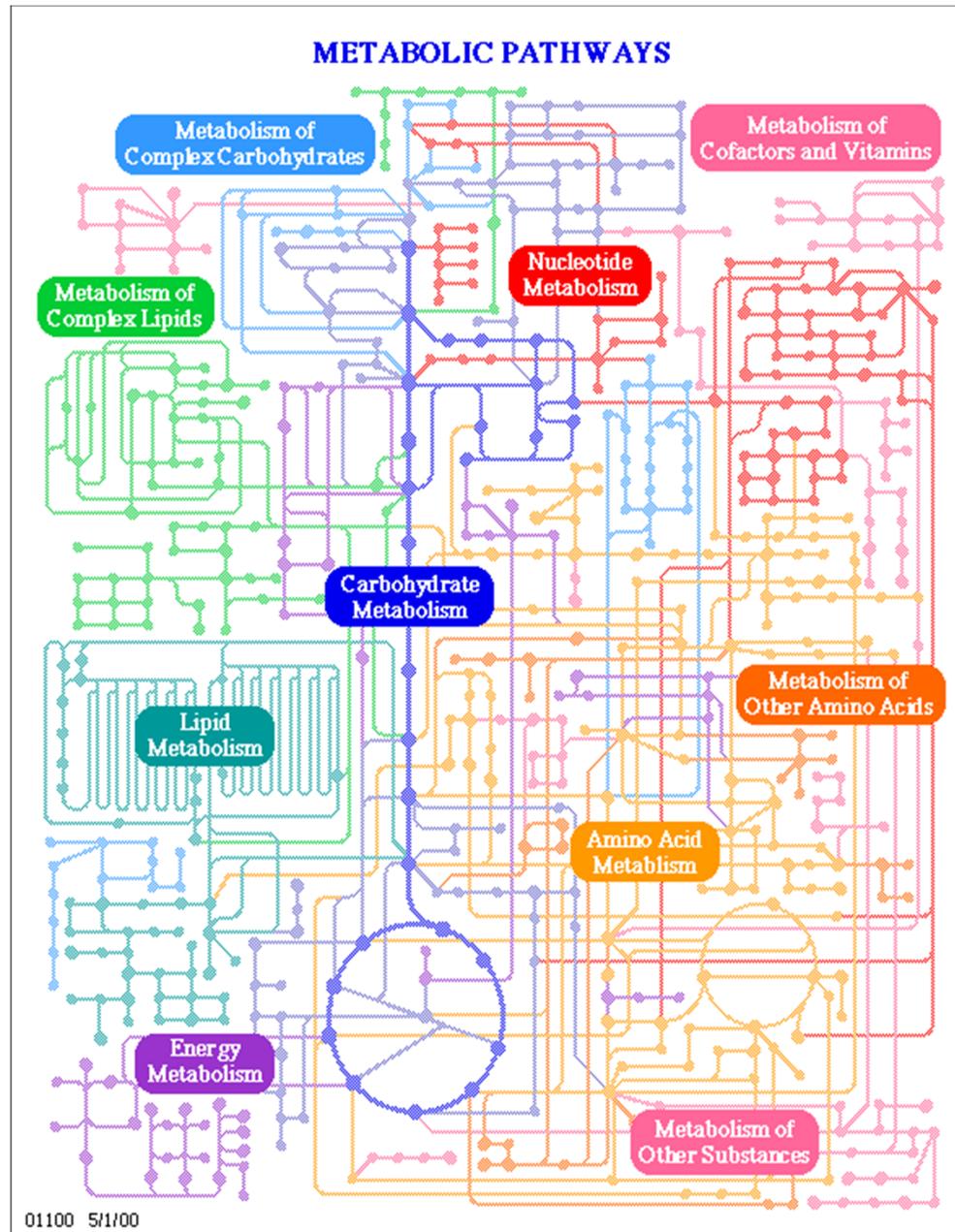


Encimi

- 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

Reakcije vseh metaboličnih poti katalizirajo encimi – pomen regulatorjev



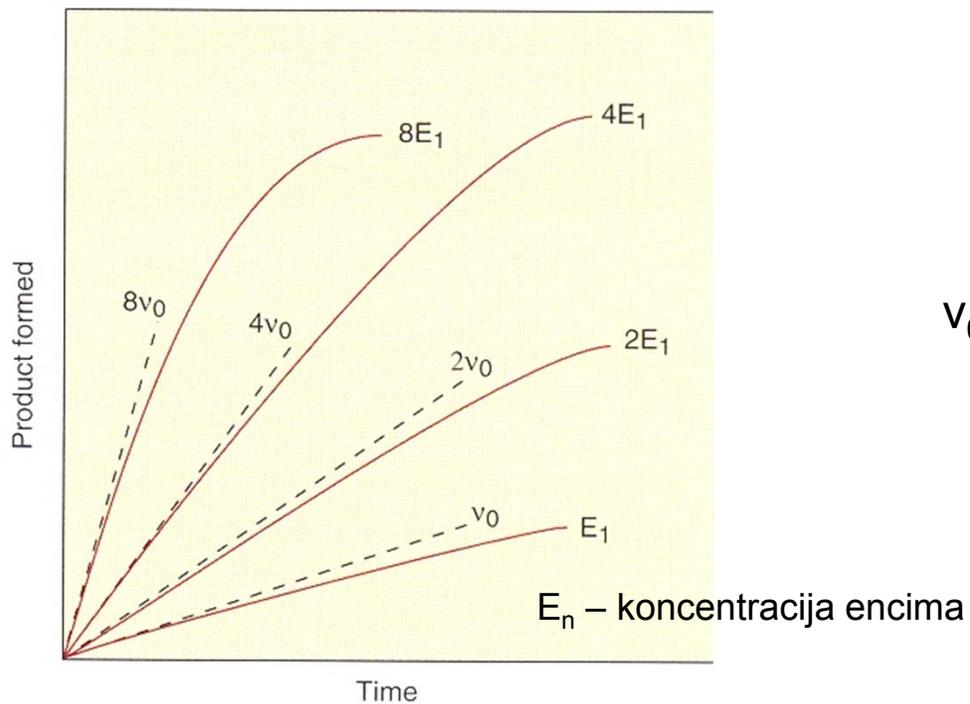
Regulatorni encimi - uravnavanje encimske aktivnosti

- Glede na potrebe celice se encimska aktivnost poveča ali zmanjša – uravnavanje encimske aktivnosti
- Uravnavanje poteka na več ravneh in na več načinov:
 - uravnavanje koncentracije encimov
 - aktivacija encimov s proteolitičnim razcepom (prebava, strjevanje krvi)
 - alosterična modulacija encimske aktivnosti
 - kovalentna modifikacija encima → spremenjena encimska aktivnost
 - sinteza specifičnih proteinskih encimskih inhibitorjev

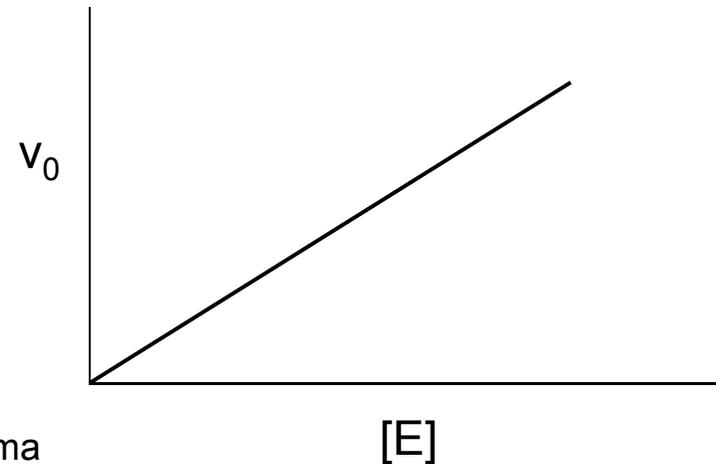
Uravnavanje encimske aktivnosti

- Glede na potrebe celice se encimska aktivnost poveča ali zmanjša – uravnavanje encimske aktivnosti
- Uravnavanje poteka na več ravneh in na več načinov:
 - **uravnavanje koncentracije encimov**
 - aktivacija encimov s proteolitičnim razcepom (prebava, strjevanje krvi)
 - alosterična modulacija encimske aktivnosti
 - kovalentna modifikacija encima → spremenjena encimska aktivnost
 - sinteza specifičnih proteinskih encimskih inhibitorjev

Koncentracija encima vpliva na hitrost reakcije



$$v_0 \propto [E]$$



- Glede na potrebe celice se sintetizira več encima → več substrata se pretvori v produkt v določenem času - višja encimska aktivnost
- Uravnavanje poteka na nivoju celega organizma – počasno
- Konstitutivni in inducibilni encimi

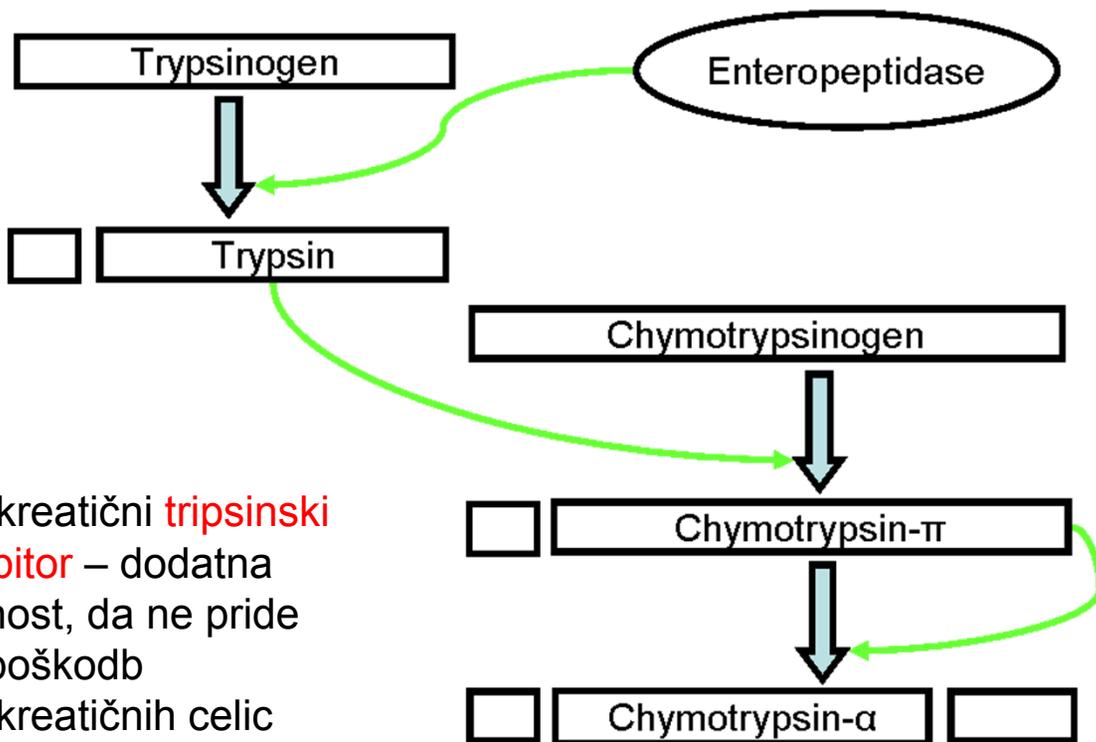
Uravnavanje encimske aktivnosti

- Glede na potrebe celice se encimska aktivnost poveča ali zmanjša – uravnavanje encimske aktivnosti
- Uravnavanje poteka na več ravneh in na več načinov:
 - uravnavanje koncentracije encimov
 - **aktivacija encimov s proteolitičnim razcepom (prebava, strjevanje krvi)**
 - alosterična modulacija encimske aktivnosti
 - kovalentna modifikacija encima → spremenjena encimska aktivnost
 - sinteza specifičnih proteinskih encimskih inhibitorjev

Aktiviranje encima s proteolitičnim razcepom

Z neaktivnega encima (zimogen/proencim/-ogen) se odcepi peptidni del → aktivni encim

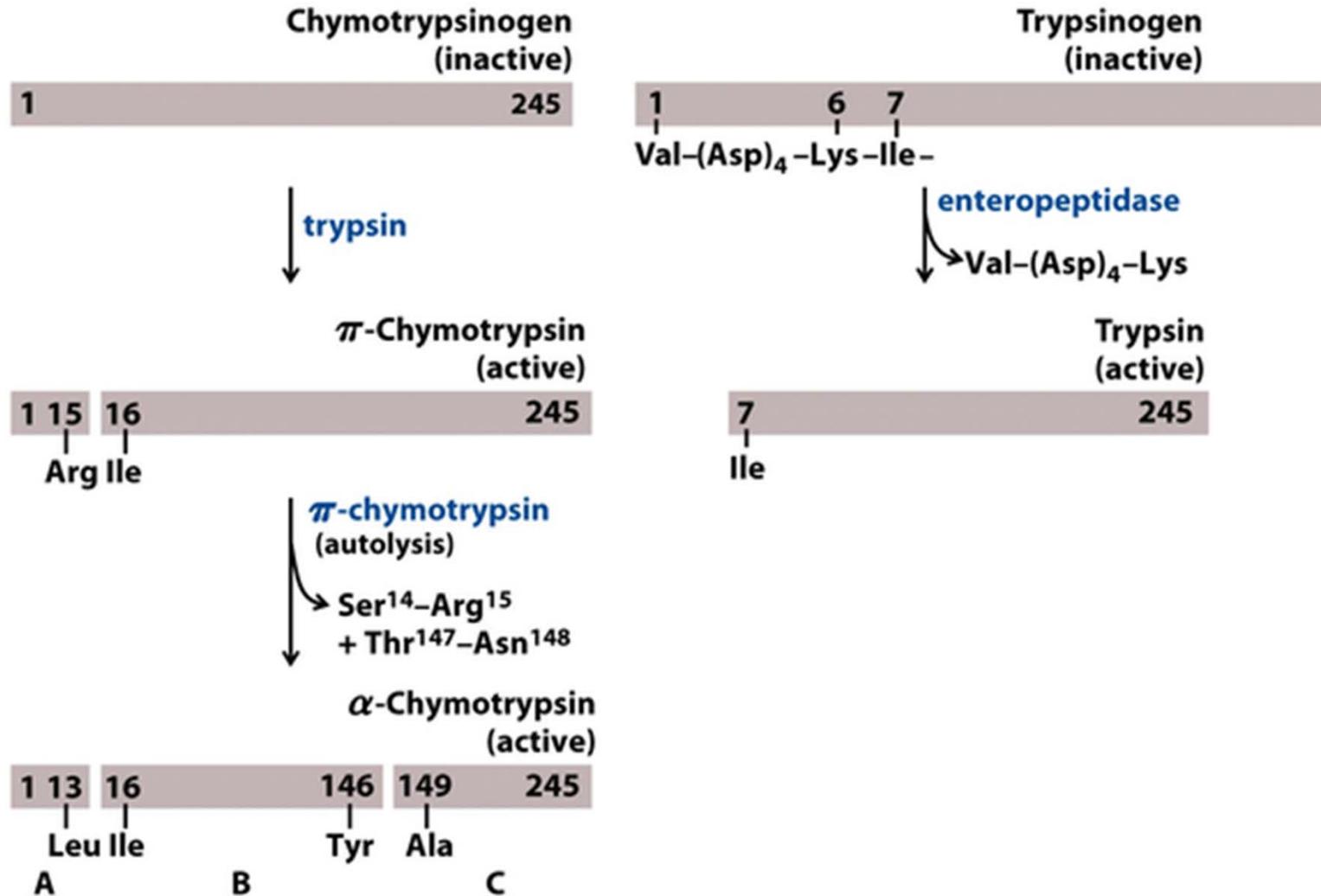
Primer:
aktiviranje prebavnih proteolitičnih encimov
pankreasna tripsina in kimotripsina



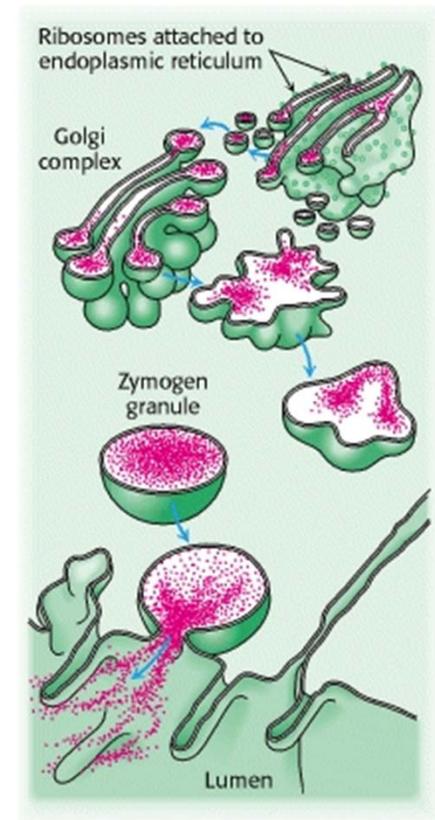
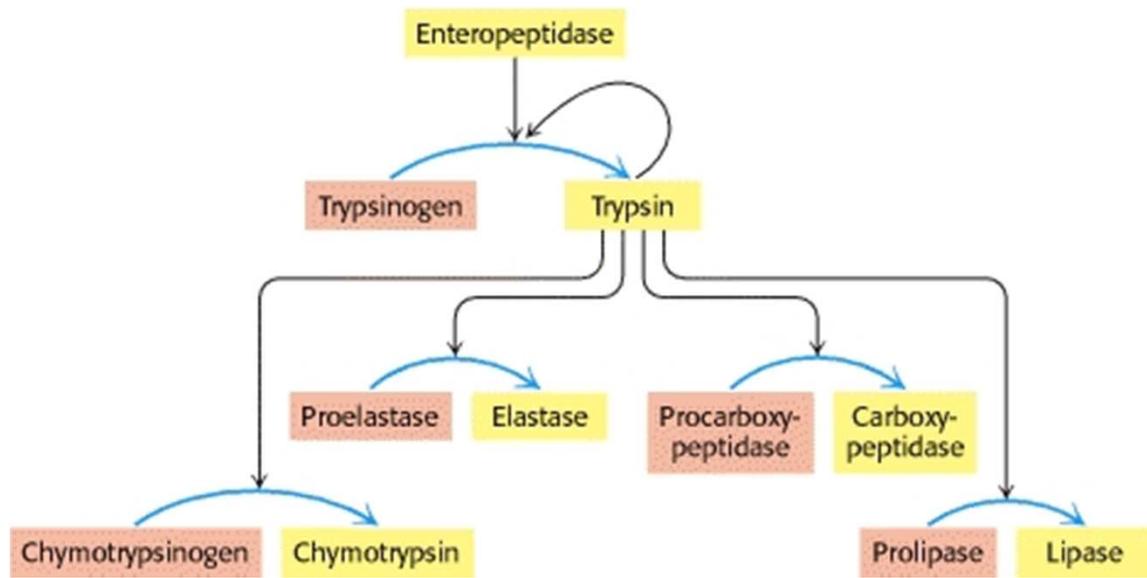
pankreatični **tripsinski inhibitor** – dodatna varnost, da ne pride do poškodb pankreatičnih celic

Akutni pankreatitis:
obstrukcija normalne poti sekrecije iz pankreasa v tanko črevo – cimogeni se aktivirajo v pankreasu, razgrajujejo tkivo – bolečine, lahko tudi usodno

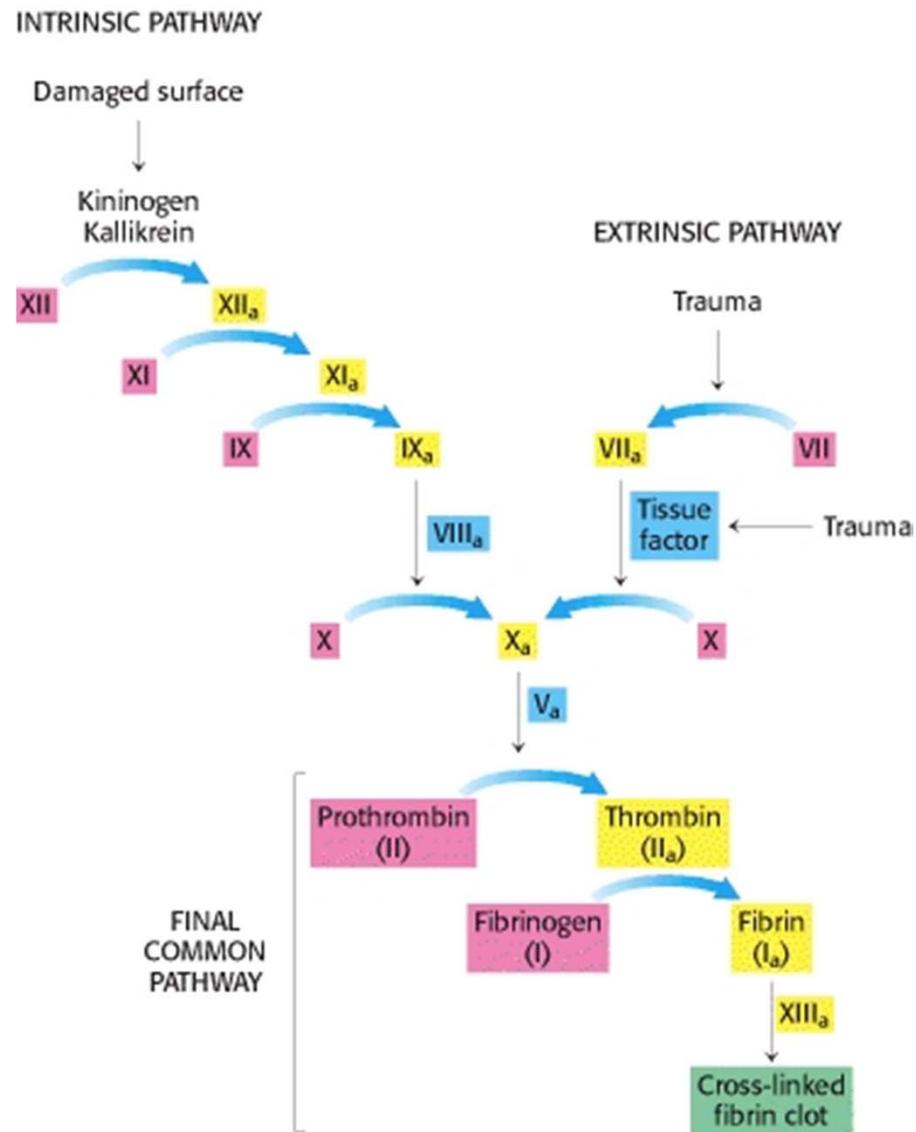
Aktiviranje encima s proteolitičnim razcepom



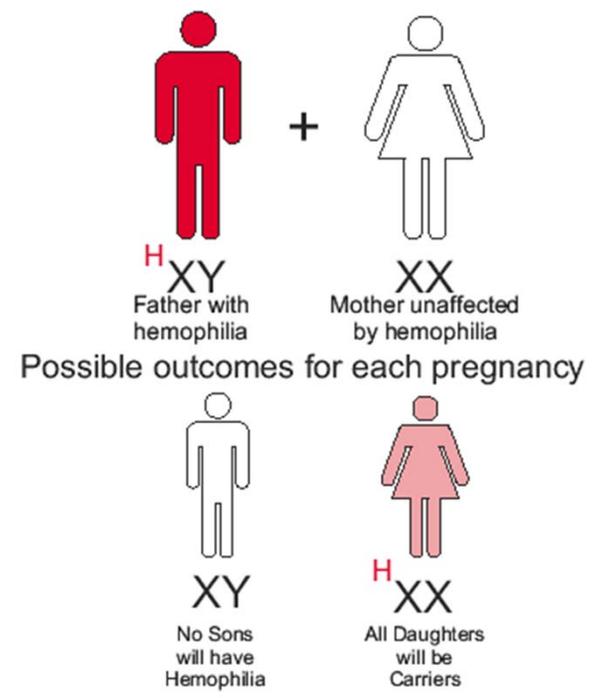
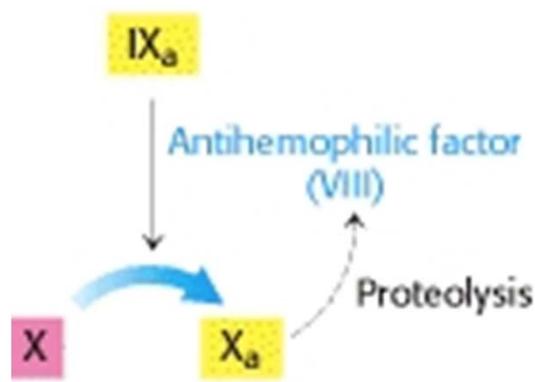
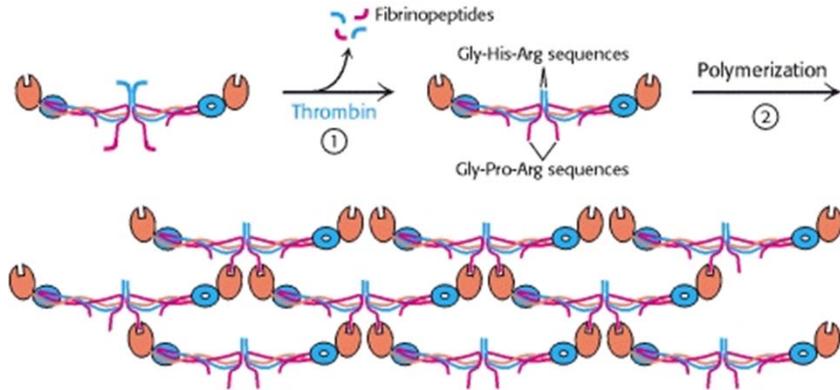
Uravnavana aktivacija in izločanje zimogenov



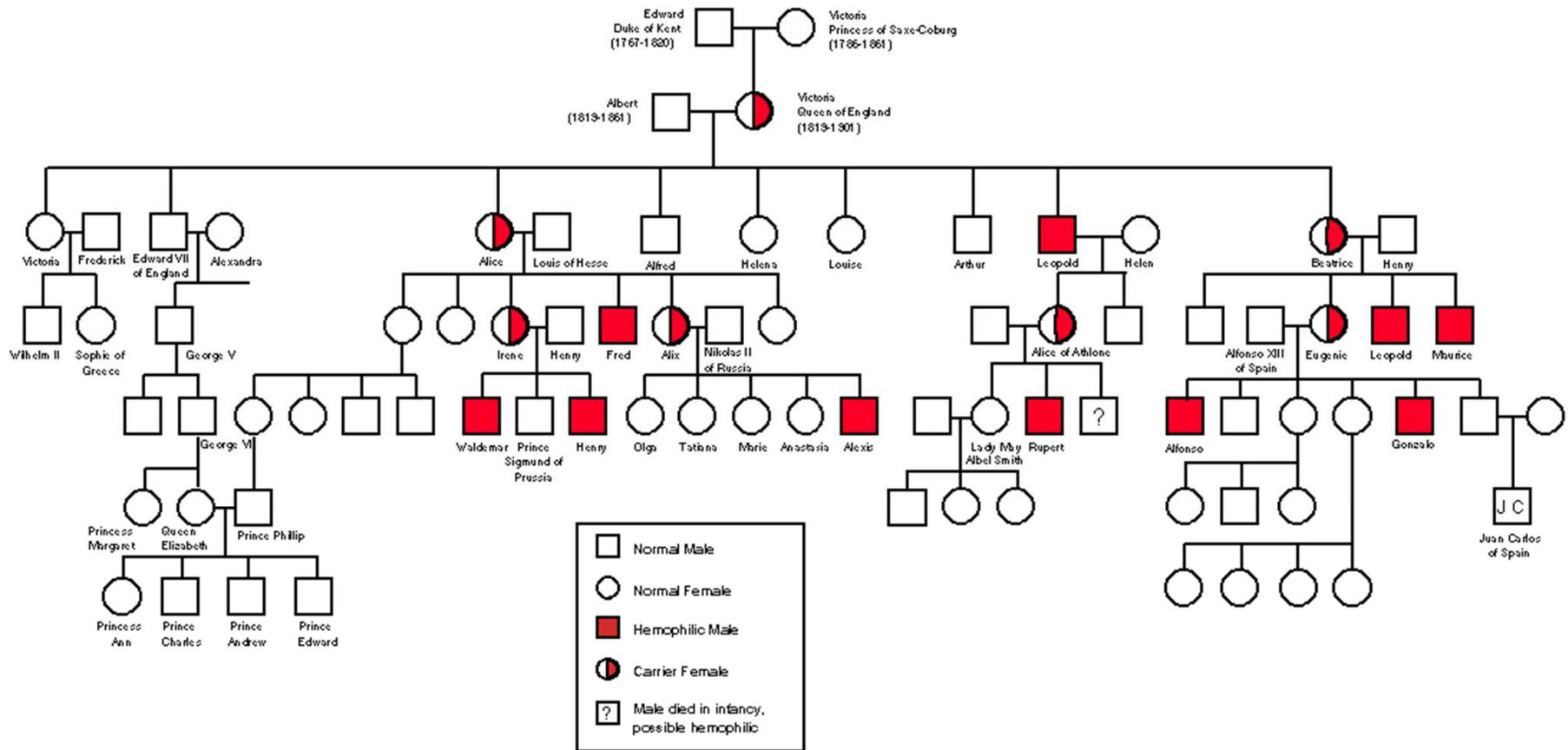
Kaskada v procesu strjevanja krvi



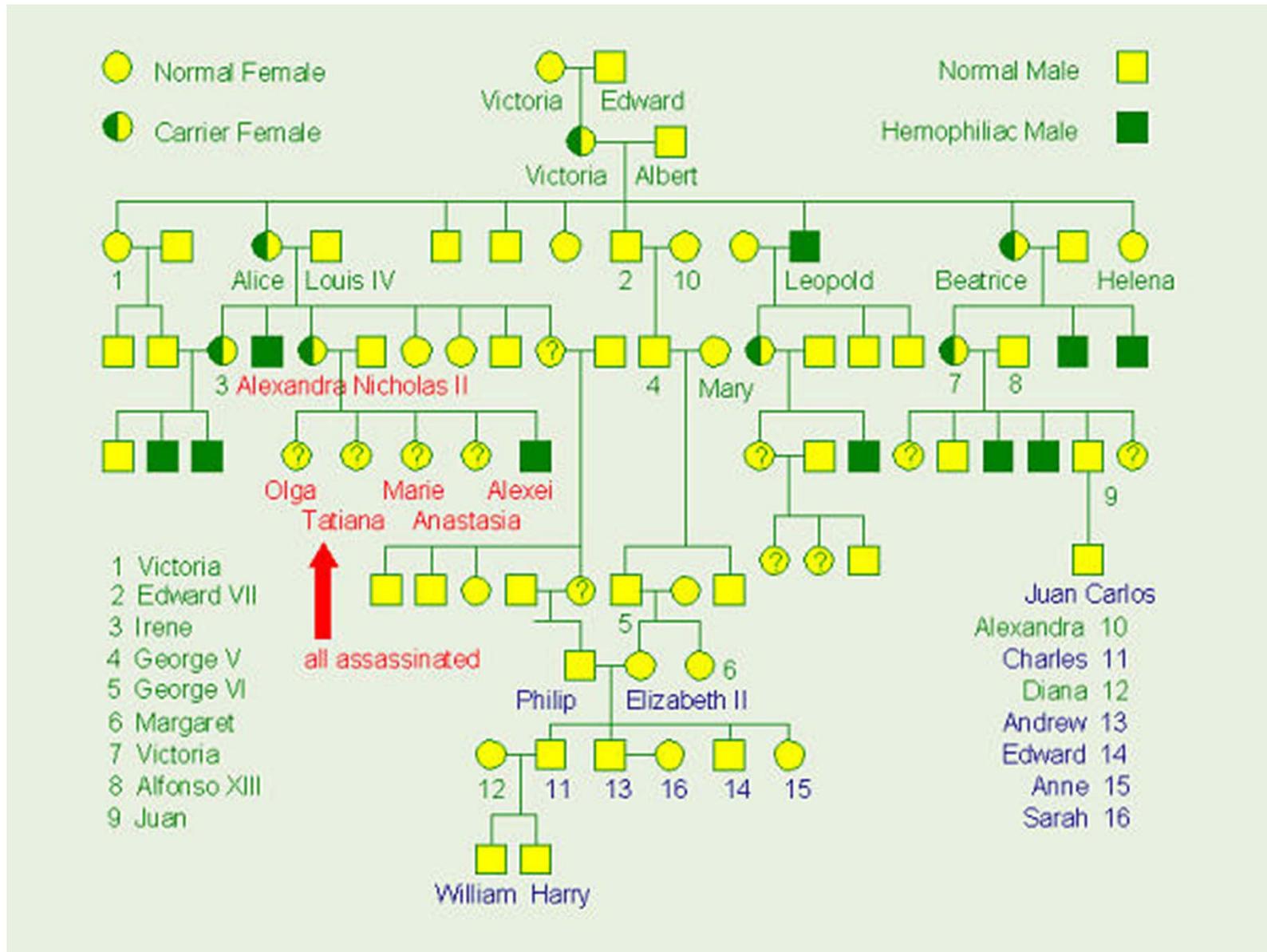
Hemofilija - napaka v procesu strjevanja krvi



Hemofilija – X-vezana recesivna genetsko bolezen



Hemofilija v kraljevih družinah



Uravnavanje encimske aktivnosti

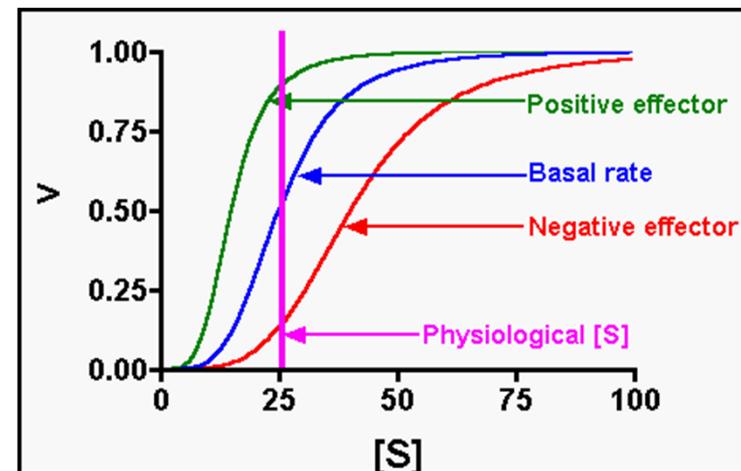
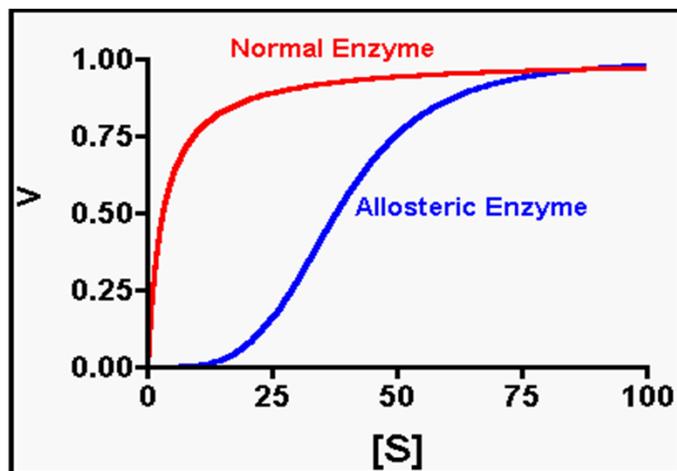
- Glede na potrebe celice se encimska aktivnost poveča ali zmanjša – uravnavanje encimske aktivnosti
- Uravnavanje poteka na več ravneh in na več načinov:
 - uravnavanje koncentracije encimov
 - aktivacija encimov s proteolitičnim razcepom (prebava, strjevanje krvi)
 - **alosterična modulacija encimske aktivnosti (fina regulacija)**
 - kovalentna modifikacija encima → spremenjena encimska aktivnost (“vse ali nič”)
 - sinteza specifičnih proteinskih encimskih inhibitorjev

Alosterični encimi

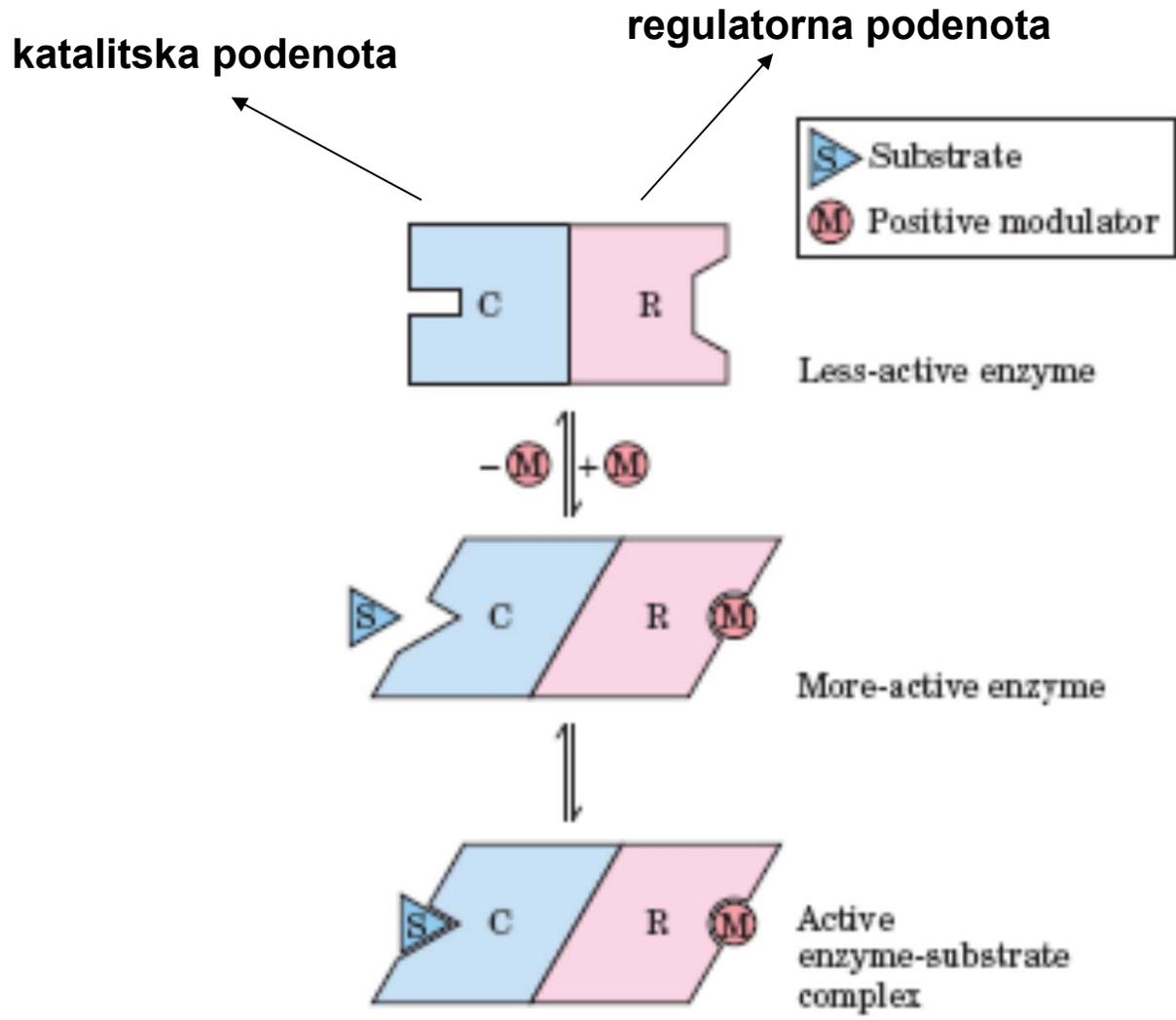
- Alosterični encimi sestojijo iz **več podenot** (multimerni proteini) in imajo **več vezavnih mest (za substrat in/ali modulator)**
- Njihove podenote zavzamejo **različne konformacije**
- Konformacijsko spremembo (prehod v manj ali bolj aktivno obliko) povzroči **modulator (ligand, pri encimih tudi S)**
- Modulatorji so ali **inhibitorji ali aktivatorji**
- Če je normalni ligand obenem modulator – **homotropična modulacija**; če je modulator druga molekula – **heterotropična modulacija**
- Mnogi alosterični encimi imajo **več modulatorjev** – obenem gre za heterotropične in homotropične modulatorje
- Za kooperativno vezavo je značilna **sigmoidna krivulja**
- Sigmoidna krivulja omogoča **občutljiv odgovor** na majhne spremembe koncentracije liganda v okolju

Alosterična modulacija encimske aktivnosti

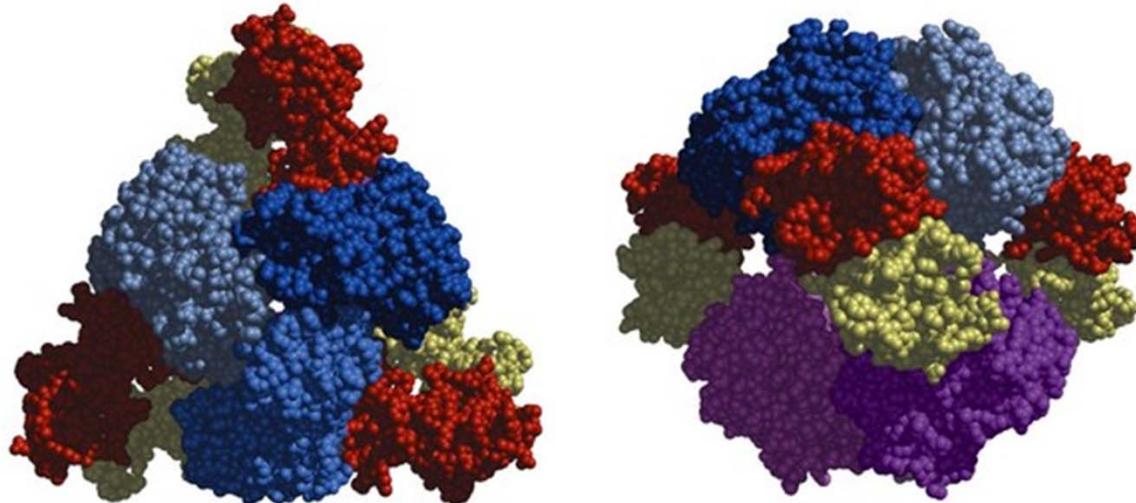
- Alosterični encimi – več podenot (katalitska, regulatorna)
- Aktivnost uravnavajo alosterični modulatorji (majhne molekule)
- Modulatorji se vežejo (šibke interakcije) na regulatorno podenoto → sprememba konformacije regulatorne podenote → sprememba konformacije katalitske podenote → sprememba na aktivnem mestu – spremenjena encimska aktivnost
- Modulatorji so aktivatorji ali inhibitorji
- Modulatorji: substrat (homotropična modulacija) ali druge molekule (heterotropična modulacija)



Interakcije med podenotami pri alosteričnem encimu

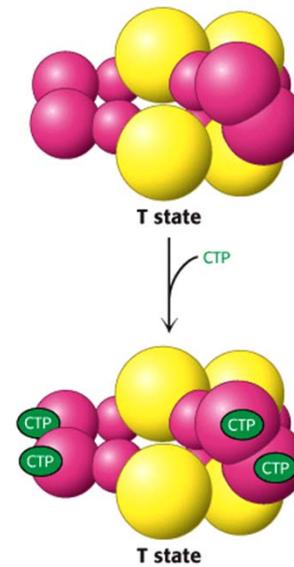
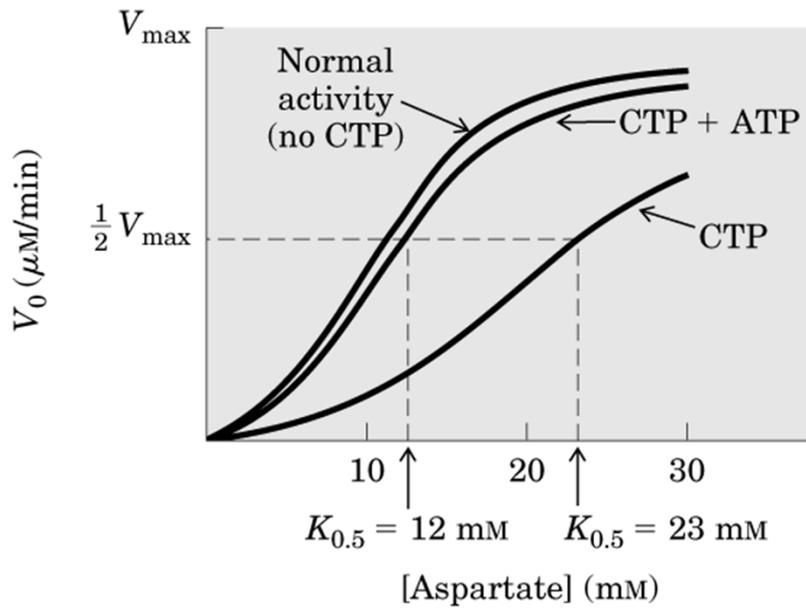
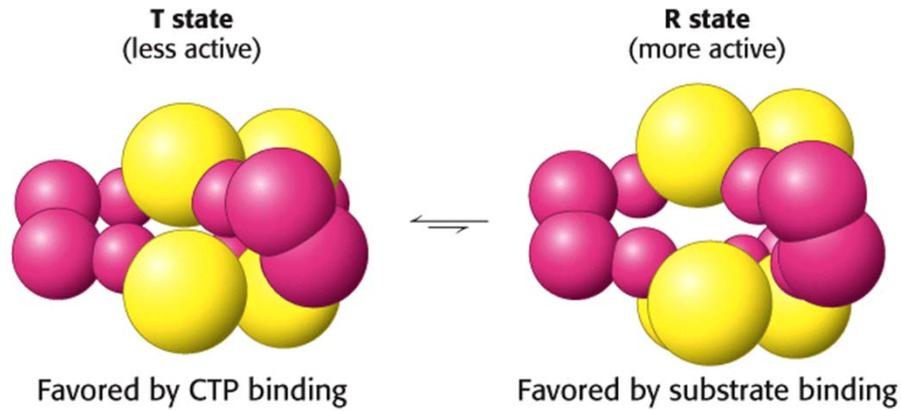


Aspartat transkarbamoilaza (ATCaza) je alosterični encim

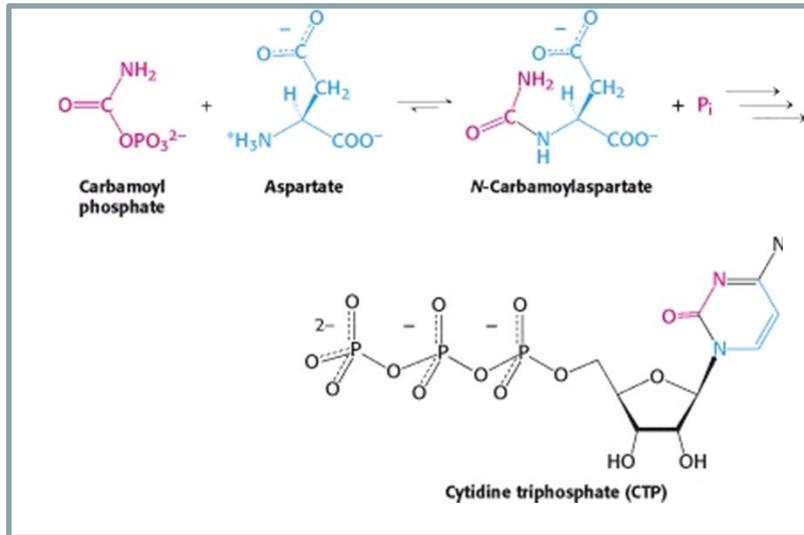


- Sodeluje v zgodnjih stopnjah sinteze pirimidinskih nukleotidov
- Ima 12 polipeptidnih enot, tako regulatorne (rdeča in rumena), kot katalitične (modra in vijolična)
- Alosterični modulatorji se vežejo na regulatorne podenote

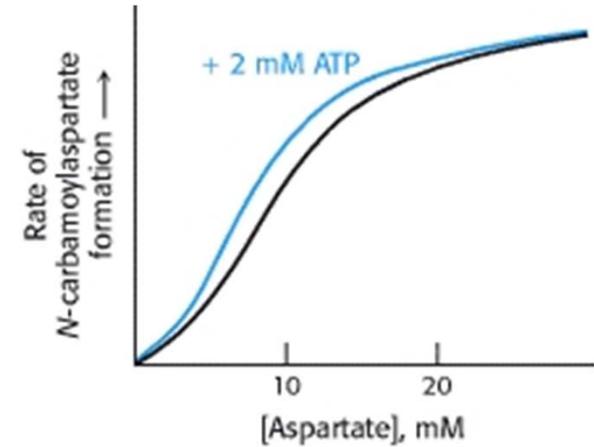
Dve konformaciji ATCase



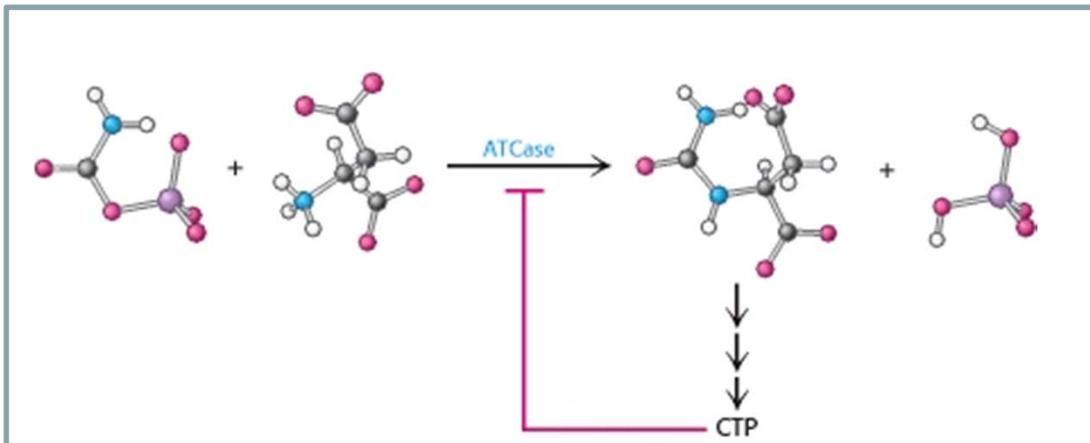
Alosterični regulatorji ATCase uravnavajo ravnotežje za prehod iz T v R obliko



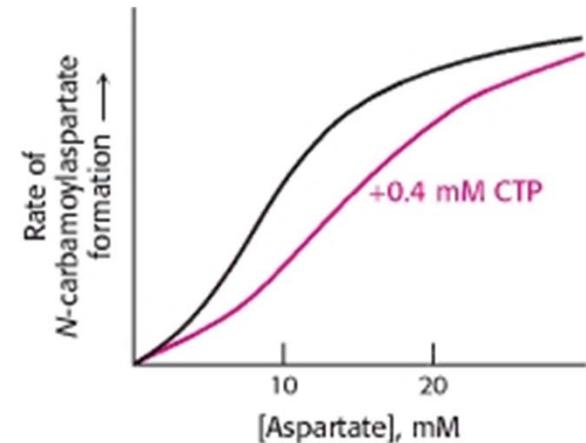
Sinteza CTP



ATP je pozitivni alosterični efektor

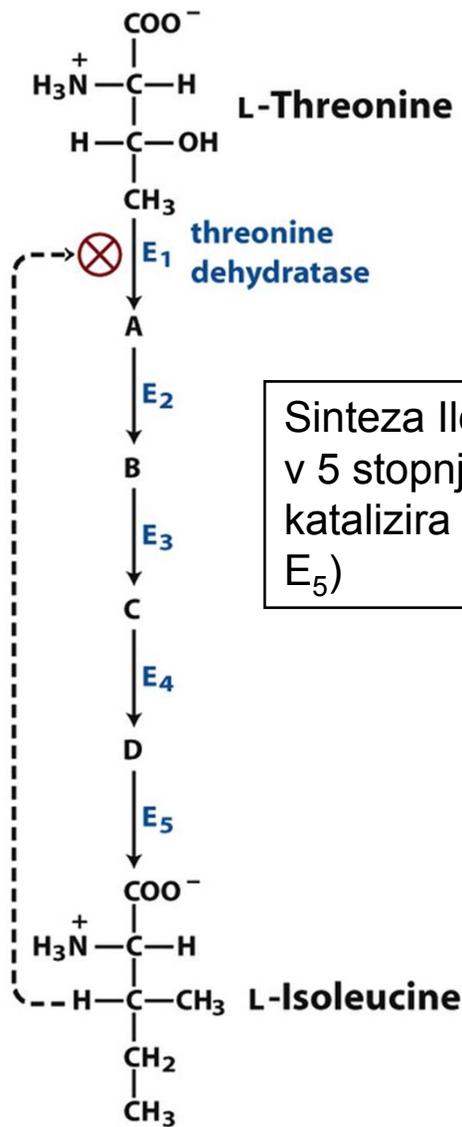


CTP je negativni alosterični modulator lastne sinteze



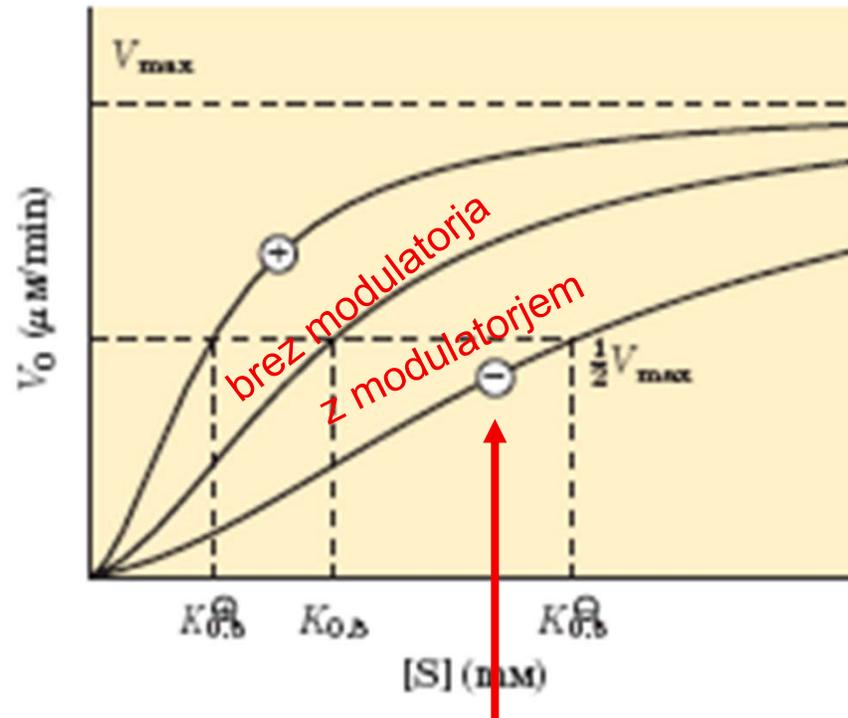
CTP stabilizira T (manj aktivno) stanje

INHIBICIJA S POVRATNO ZVEZO (FEED-BACK INHIBITION)



Sinteza Ile iz Thr poteka v 5 stopnjah, ki jih katalizira 5 encimov (E_1 - E_5)

(Ile)



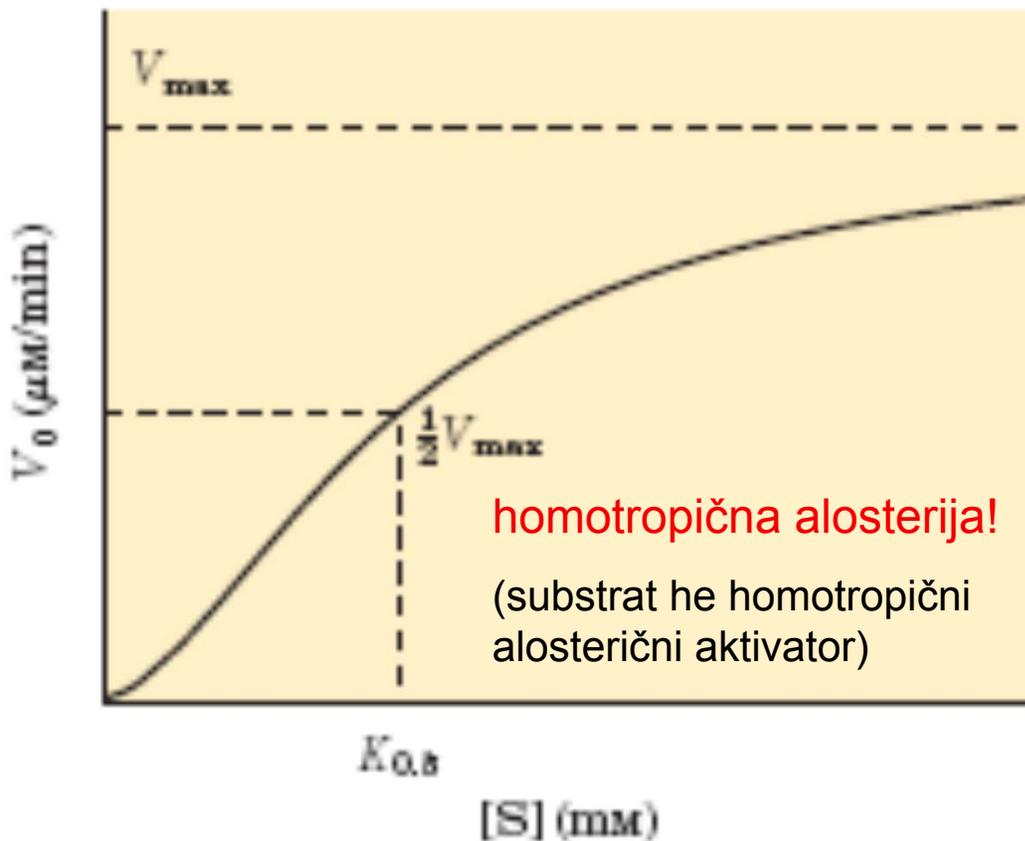
L-izolevcin (Ile) je negativni alosterični modulator E_1 (treonin-dehidrataze, TDH).

K_i za vezavo Ile na alosterično (modulatorsko) mesto TDH določa koncentracijo Ile.

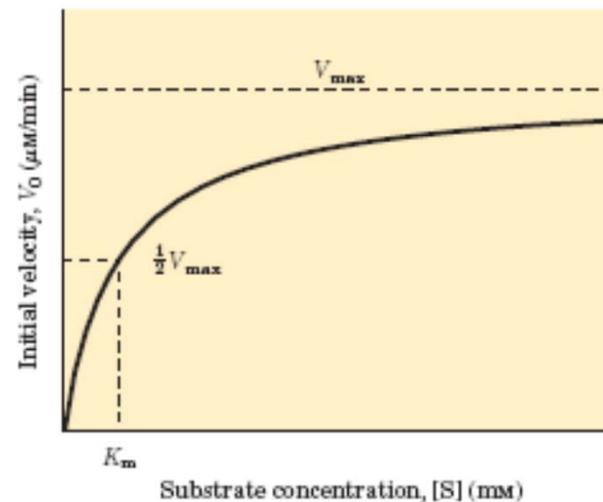
$$K_i = \frac{[TDH] \cdot [Ile]}{[TDH - Ile]}; \quad \frac{K_i}{[Ile]} = \frac{[TDH]}{[TDH - Ile]}$$

Kinetika alosteričnih encimov (sigmoidna krivulja) – primerjava z Michaelis-Mentenovimi encimi (saturacijska krivulja)

Alosterični encim -
več vezavnih mest za substrat



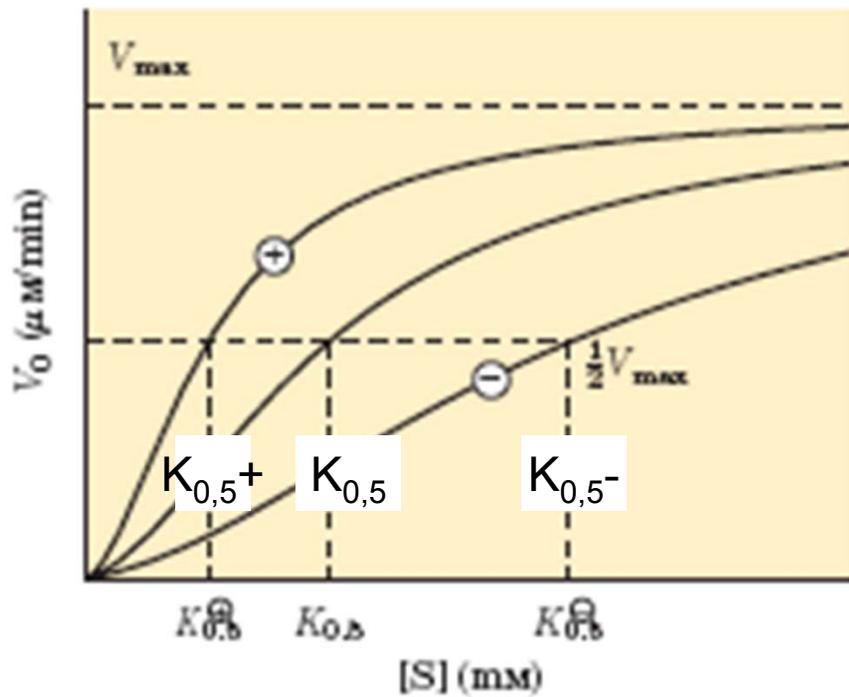
“Michaelis-Mentenov” encim
eno vezavno mesto za substrat
hiperbolična krivulja



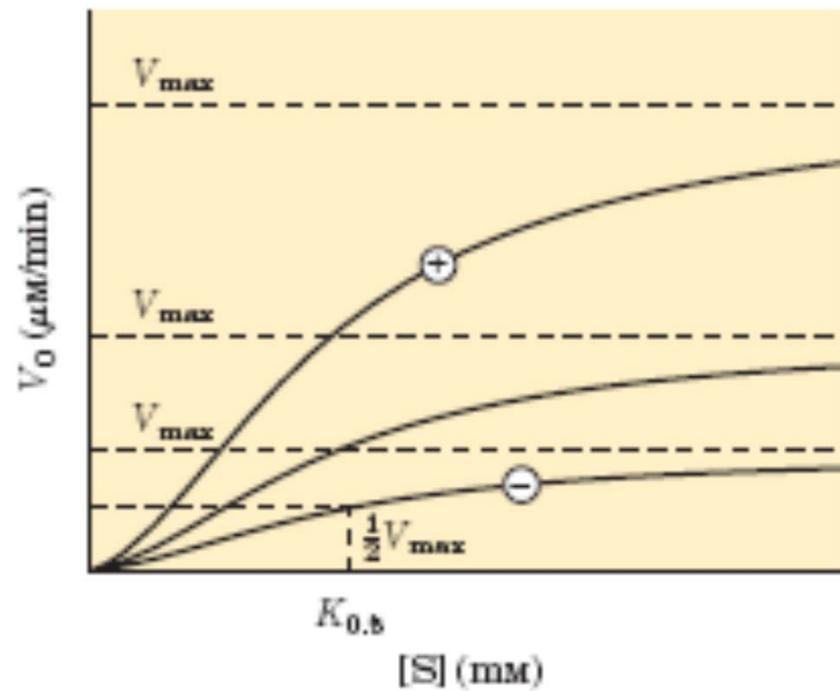
$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]}$$

Dve vrsti modulatorjev alosteričnih encimov

heterotropična alosterija!

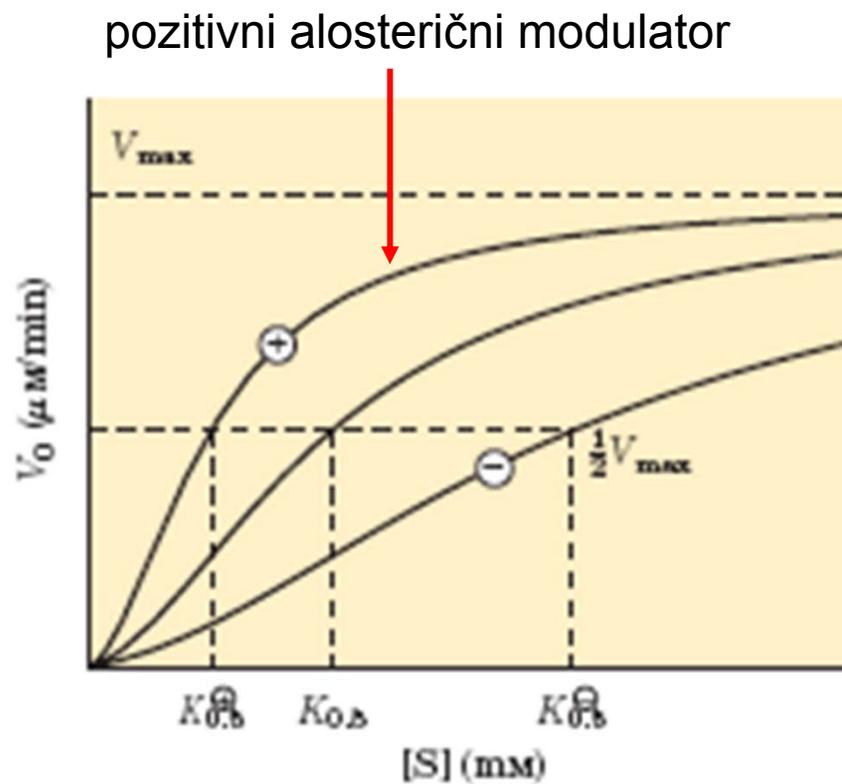
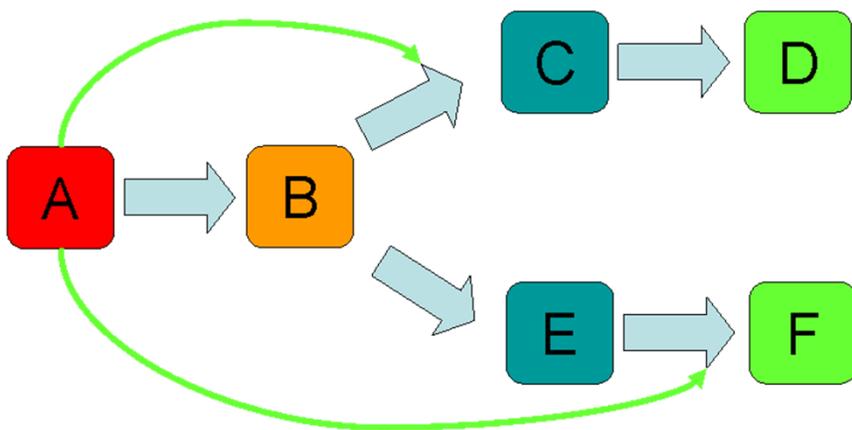


modulatorji vplivajo na K_m



modulatorji vplivajo na V_{max}

**Shema pozitivne alosterične modulacije encimske aktivnosti:
substrat A aktivira encim, ki pretvarja B→C ali E→F**

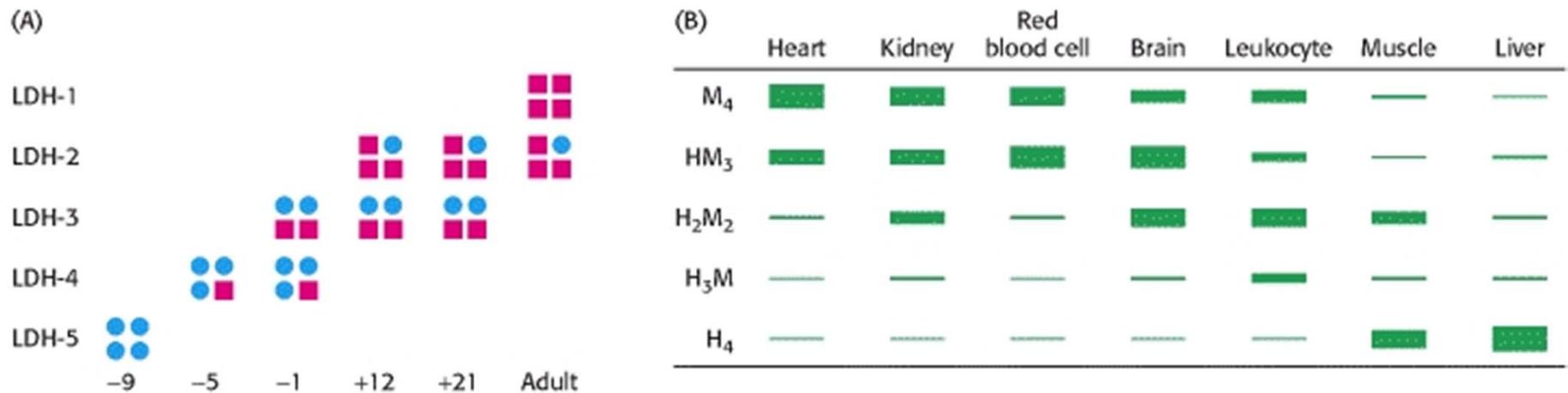


Izoencimi so način uravnavanja v različnih tkivih in razvojnih stanjih

-Izencimi (izocimi) so encimi, ki se razlikujejo v aminokislinskem zaporedju, a katalizirajo isto reakcijo

-Imajo drugačne kinetične parametre in odgovrajajo na različne signale.

-Primer: laktat dehidrogenaza



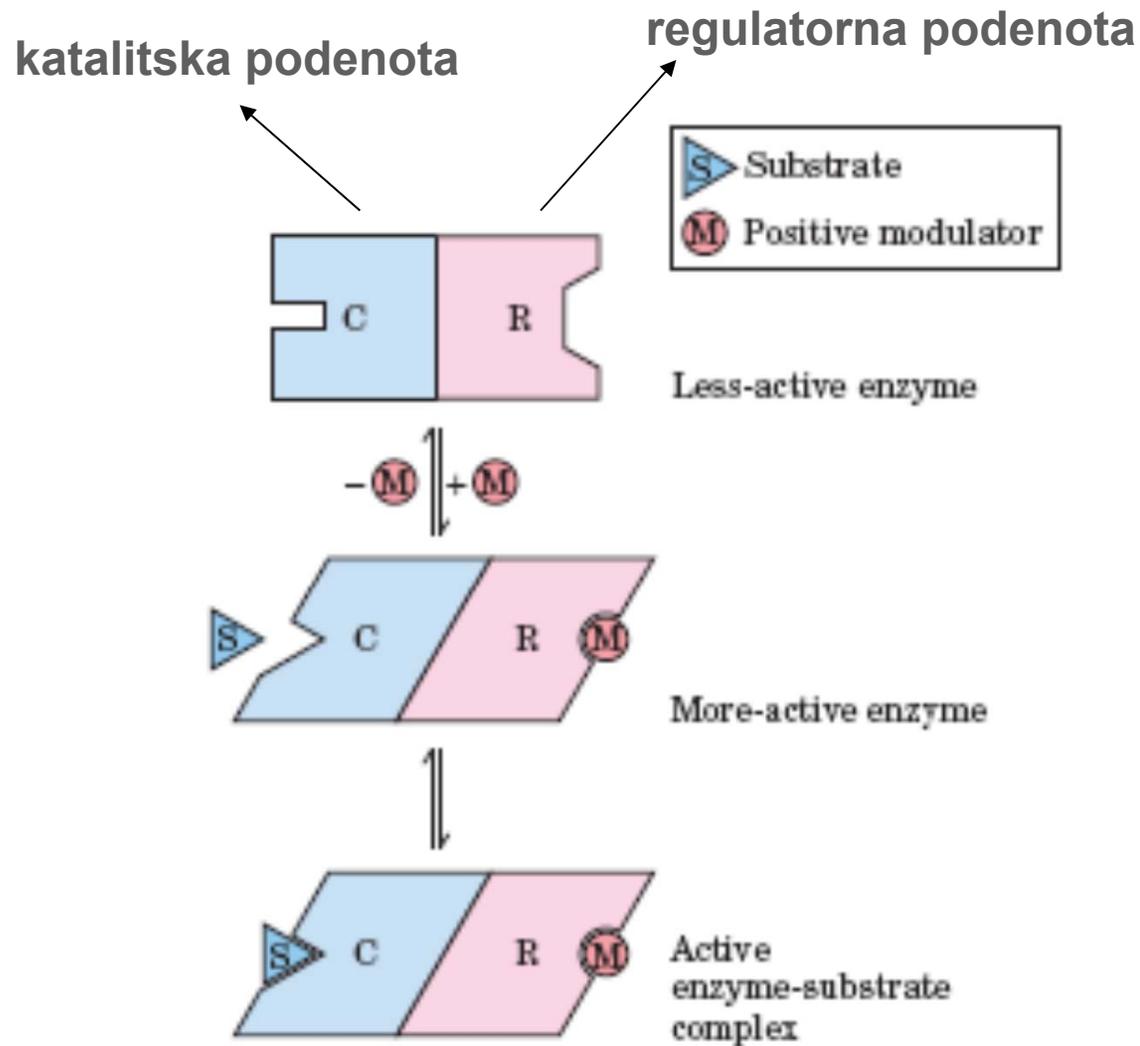
H izocim je izražen v srcu. M izocim je izražen v mišici. H – aerobni pogoji; M – anaerobni pogoji.

H in M imata 75% aminokislin enakih (75% identičnost)

Uravnavanje encimske aktivnosti

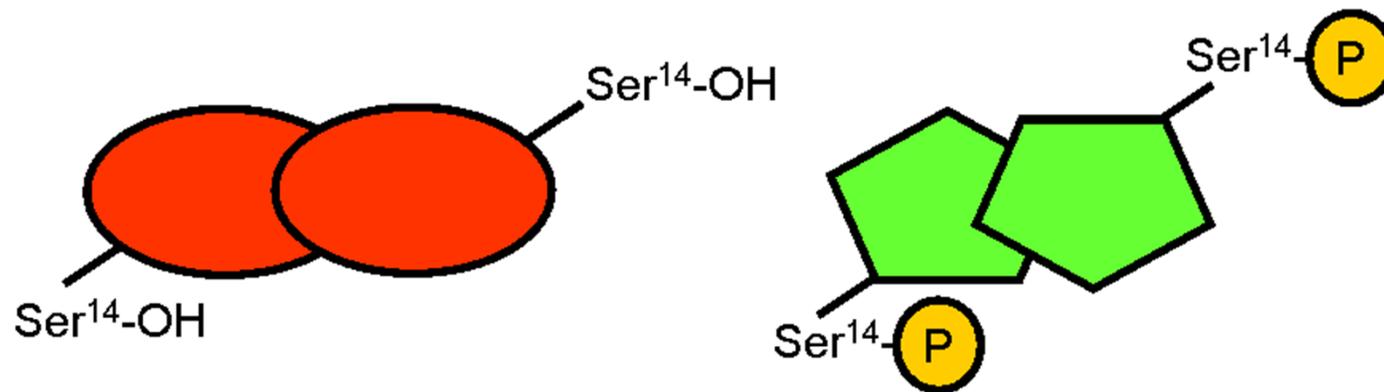
- Glede na potrebe celice se encimska aktivnost poveča ali zmanjša – uravnavanje encimske aktivnosti
- Uravnavanje poteka na več ravneh in na več načinov:
 - uravnavanje koncentracije encimov
 - aktivacija encimov s proteolitičnim razcepom (prebava, strjevanje krvi)
 - alosterična modulacija encimske aktivnosti
 - **kovalentna modifikacija encima → spremenjena encimska aktivnost**
 - sinteza specifičnih proteinskih encimskih inhibitorjev

Regulatorni encim – shematski prikaz aktivacije encima z vezavo aktivatorja M na regulatorno podenoto



Kovalentna modifikacija encima → spremenjena encimska aktivnost

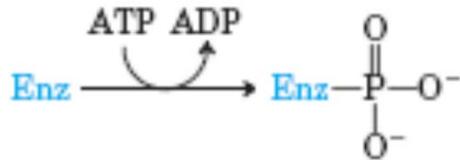
Primer: fosforilacija encima na ostankih serina (Ser)



Vrste kovalentnih modifikacij

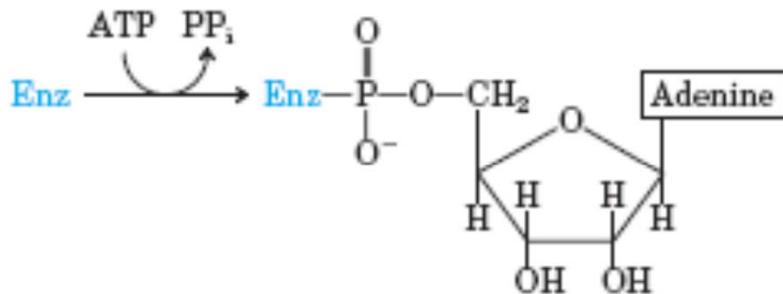
Phosphorylation
(Tyr, Ser, Thr, His)

fosforilacija



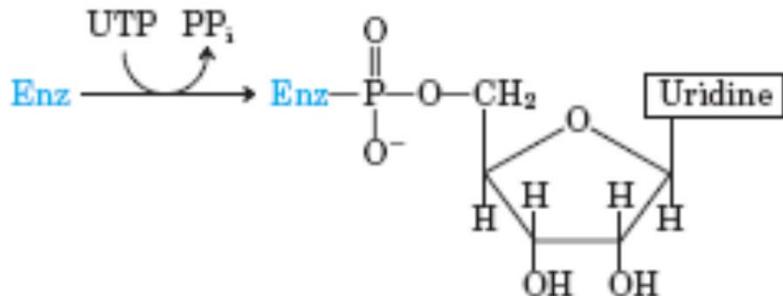
Adenylylation
(Tyr)

adenilacija



Uridylylation
(Tyr)

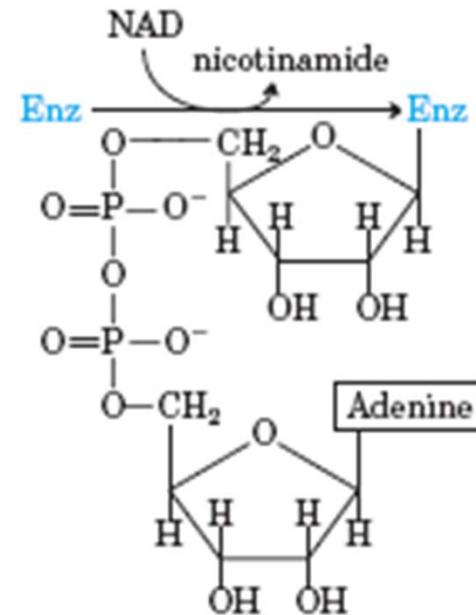
uridilacija



ADP-ribozilacija

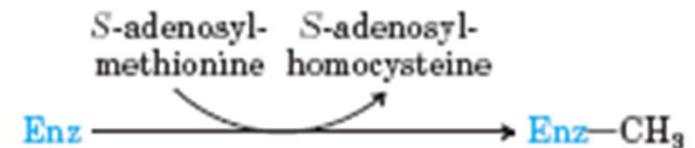
ADP-ribosylation

(Arg, Gln, Cys, diphthamide—a modified His)



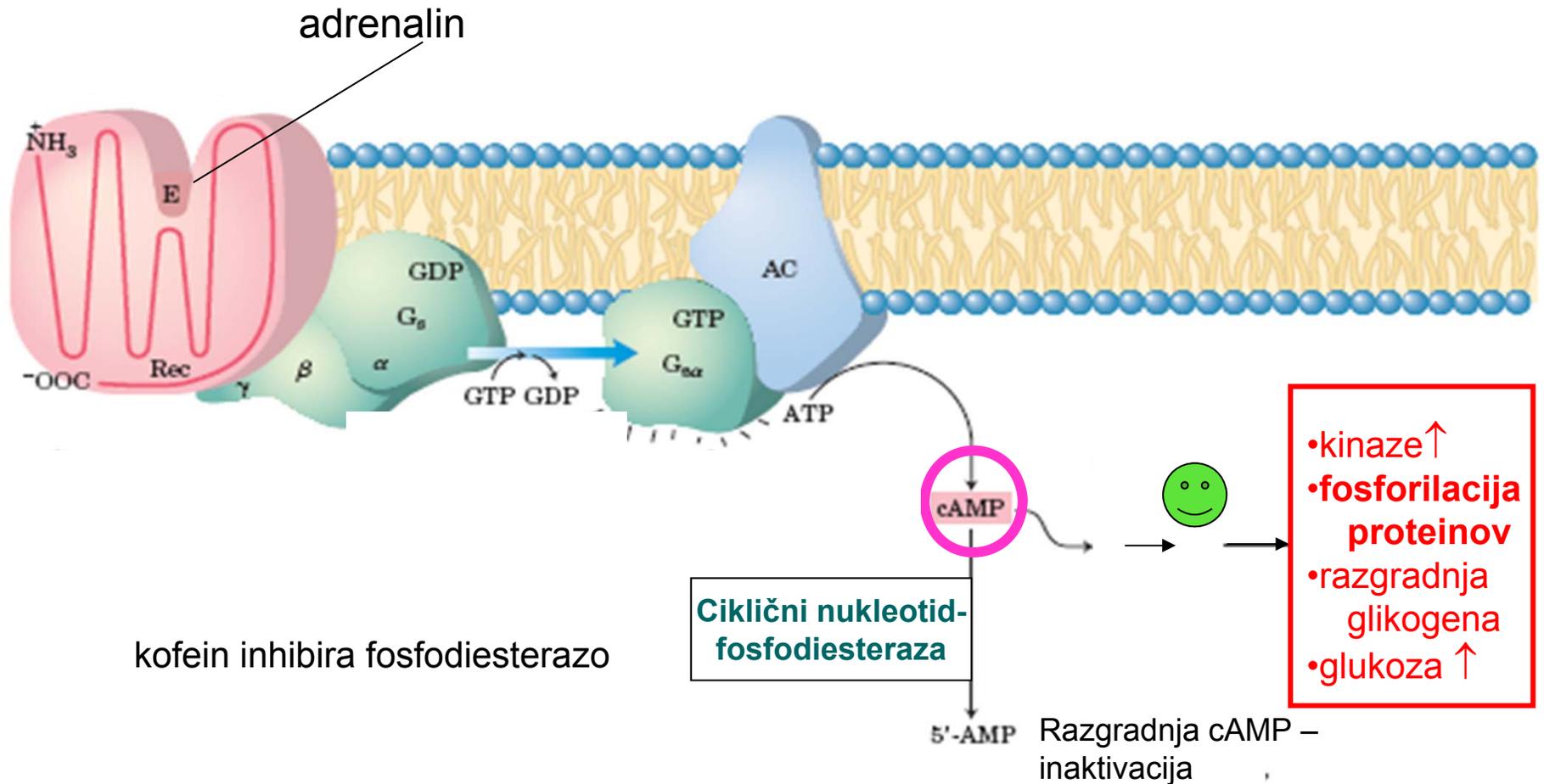
Methylation
(Glu)

metilacija

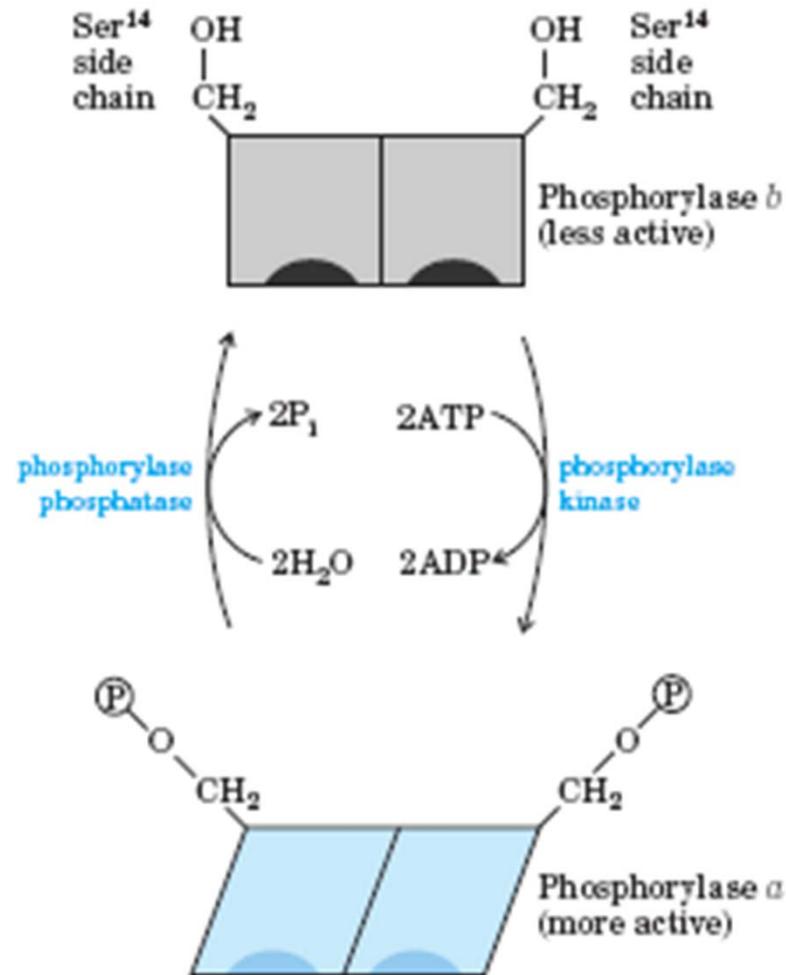


Primer uravnavanja encimske aktivnosti s fosforilacijo

Adrenalin → β -adrenergični receptor → → → cAMP → aktivirana metabolična pot:
koncentracija glukoze ↑



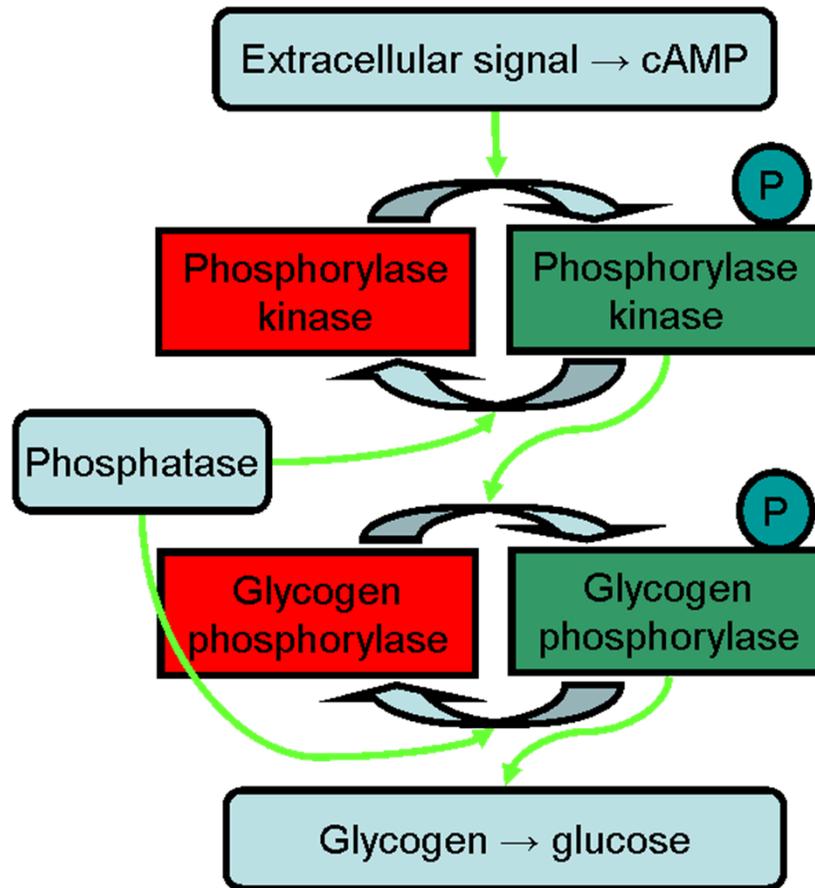
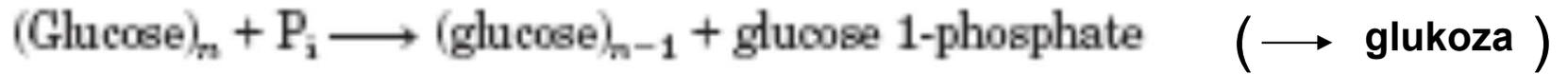
Aktivacija glikogenske fosforilaze s fosforiliranjem



fosforilaze-kinazo
aktivira zunanji signal
(cAMP)

Aktivnost glikogenske fosforilaze je uravnavana s fosforiliranjem / defosforiliranjem encima.
Posledica je povečanje koncentracije glukoze.

Uravnavanje aktivnosti glikogenske fosforilaze



Proteinske kinaze sestavljajo družino proteinov

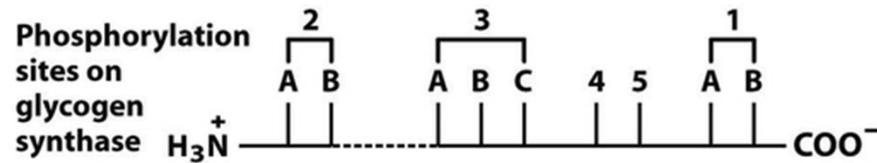
Protein kinase	Consensus sequence and phosphorylated residue*
Protein kinase A	-x-R-[RK]-x-[ST]-B-
Protein kinase G	-x-R-[RK]-x-[ST]-x-
Protein kinase C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Protein kinase B	-x-R-x-[ST]-x-K-
Ca ²⁺ /calmodulin kinase I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca ²⁺ /calmodulin kinase II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)-
Myosin light chain kinase (smooth muscle)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Phosphorylase b kinase	-K-R-K-Q-I-S-V-R-
Extracellular signal-regulated kinase (ERK)	-P-x-[ST]-P(2)-
Cyclin-dependent protein kinase (cdc2)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Casein kinase I	-[SpTp]-x(2)-[ST]-B [†]
Casein kinase II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
β-Adrenergic receptor kinase	-[DE](n)-[ST]-x(3)
Rhodopsin kinase	-x(2)-[ST]-E(n)-
Insulin receptor kinase	-x-E(3)-Y-M(4)-K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I- G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-
Epidermal growth factor (EGF) receptor kinase	-E(4)-Y-F-E-L-V-

Sources Pinna, L.A. & Ruzzene, M.H. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* 1314, 191–225; Kemp, B.E. & Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* 15, 342–346; Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266, 15,555–15,558.

*Shown here are deduced consensus sequences (in roman type) and actual sequences from known substrates (italic). The Ser (S), Thr (T), or Tyr (Y) residue that undergoes phosphorylation is in red; all amino acid residues are shown as their one-letter abbreviations (see Table 3–1). x represents any amino acid. B, any hydrophobic amino acid. Sp, Tp, and Yp are Ser, Thr, and Tyr residues that must already be phosphorylated for the kinase to recognize the site.

[†]The best target site has two amino acid residues separating the phosphorylated and target Ser/Thr residues; target sites with one or three intervening residues function at a reduced level.

Nekateri encimi uporabljajo več različnih regulatornih mehanizmov



Kinase	Phosphorylation sites	Degree of synthase inactivation
Protein kinase A	1A, 1B, 2, 4	+
Protein kinase G	1A, 1B, 2	+
Protein kinase C	1A	+
Ca ²⁺ /calmodulin kinase	1B, 2 □	+ □
Phosphorylase <i>b</i> kinase	2 □	+ □
Casein kinase I	At least nine	+ + + +
Casein kinase II	5	0
Glycogen synthase kinase 3	3A, 3B, 3C □	+ + + □
Glycogen synthase kinase 4	2 □	+ □

Uravnavanje encimske aktivnosti

- Glede na potrebe celice se encimska aktivnost poveča ali zmanjša – uravnavanje encimske aktivnosti
- Uravnavanje poteka na več ravneh in na več načinov:
 - uravnavanje koncentracije encimov
 - aktivacija encimov s proteolitičnim razcepom (prebava, strjevanje krvi)
 - alosterična modulacija encimske aktivnosti
 - kovalentna modifikacija encima → spremenjena encimska aktivnost
 - **sinteza specifičnih proteinskih encimskih inhibitorjev**

Uravnavanje encimske aktivnosti s sintezo specifičnih inhibitorjev

- Značilno za proteinaze, ki morajo biti strogo uravnavane, drugače razpad celic.
- Znani naravni inhibitorji proteinaz - proteini trdno in specifično vezani na izbrani encim – preprečijo njegovo delovanje.
- Inhibicija je uravnavana na genski ravni z regulacijo sinteze inhibitorjev v celici.
- PRIMER 1: α_1 -antitripsin v pljučih. Tobačni dim oksidira ključni Met v tem proteinu, ki zato ne deluje - ne inhibira tripsina. Prevelika aktivnost tripsina v pljučih uničuje pljučno tkivo. Posledica: kronični bronhitis in emfizem pri kadilcih.
- PRIMER 2: pankreatični antitripsin

Regulatorni encimi- poveztek

- Uravnavajo aktivnosti metaboličnih poti.
- Če gre za uravnavanje s povratno zanko, končni produkt reakcije inhibira prvo encimsko stopnjo.
- Aktivnosti alosteričnih encimov so naravnane z reverzibilno vezavo specifičnega modulatorja na regulatorno mesto.
- Modulator je lahko substrat ali drug metabolit.
- Kinetične zakonitosti alosteričnih encimov ponazarjajo kooperativne interakcije med podenotami encima.
- Nekateri regulatorni encimi spreminjajo svojo aktivnost s kovalentno modifikacijo, pri čemer je najpogostejša fosforilacija določenih aminokislinskih ostankov.
- Mnogi proteolitski encimi se sintetizirajo kot prekurzorji(cimogeni), ki se kasneje aktivirajo s proteolitsko cepitvijo.
- Najpomembnejši encimi so uravnavani preko več regulatornih mehanizmov z različnimi efektorji, kar omogoča koordinacijo aktivnosti različnih, med seboj povezanih, signalnih poti.