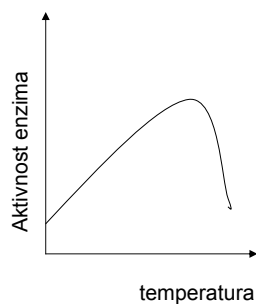


## Mehanizmi djelovanja enzima i regulacija aktivnosti enzima

Boris Mildner

### Aktivnost enzima mijenja se promjenama temperature, pH, inhibitorima te vezanjem malih molekula ili iona

- Temperatura povećava brzinu katalize
- Povećanjem temperature povećava se Brownovo gibanje i interakcije enzima i supstrata su vjerojatnije.
- Prekomjernim povećanjem temperature razara se trodimenzionalna struktura proteina, te dolazi do denaturacije proteina.



## Aktivnost enzima mijenja se promjenama temperature, pH, inhibitorima te vezanjem malih molekula ili iona

Utjecaj pH na enzimsku aktivnost

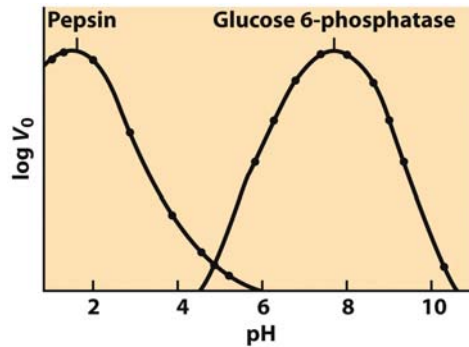


Figure 6-17  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Aktivnost enzima ovisi o pH. pH optimum ukazuje koje su aminokiseline u aktivnom središtu. pH optimum enzima obično je blizu pH vrijednosti okoline u kojoj je enzim aktivan.

## Aktivnost enzima mijenja se promjenama temperature, pH, inhibitorima te vezanjem malih molekula ili iona

- Inhibicija enzima može biti povratna (reverzibilna) ili nepovratna (ireverzibilna)
- Za reverzibilne inhibitore karakteristična je brza disocijacija enzim-inhibitor kompleksa.
- Za ireverzibilne inhibitore disocijacija enzim-inhibitor kompleksa je vrlo spora.

**Aktivnost enzima mijenja se promjenama temperature, pH, inhibitorima te vezanjem malih molekula ili iona**

Reverzibilni inhibitori inhibiraju enzime na tri osnovna načina:

- A) Kompetitivnom inhibicijom
- B) Akompetitivnom inhibicijom
- C) Nekompetitivnom inhibicijom

Tri su osnovna tipa **reverzibilne inhibicije** enzima koji podliježu Michaelis-Menteninoj kinetici

a) Kompetitivna (konkurentna) inhibicija

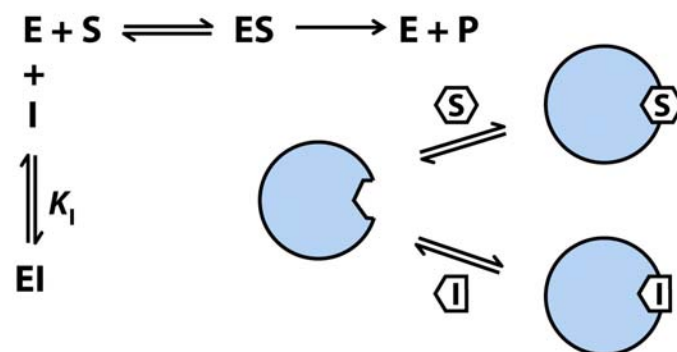


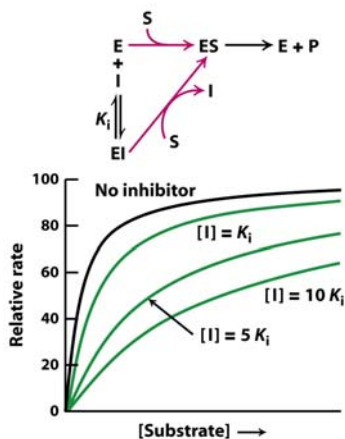
Figure 6-15a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

Kompetitivni inhibitor veže se u aktivno mjesto enzima.

**Kinetika kompetitivnog inhibitora.** Kako se povećava koncentracija inhibitora potrebne su veće koncentracije supstrata da se postigne određena brzina reakcije. Kod dovoljno velike koncentracije supstrata neće biti inhibicije.

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

$$K_{Mi} = K_M (1 + [I]/K_i)$$



$V_m$  je identična bez obzira na prisutnost ili odsustvo inhibitora, a  $K_{Mi}$  se povećava.

Figure 8-17  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

### Recipročni dijagram kompetitivne inhibicije

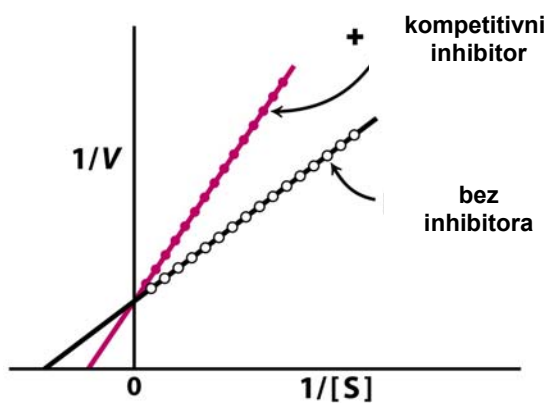
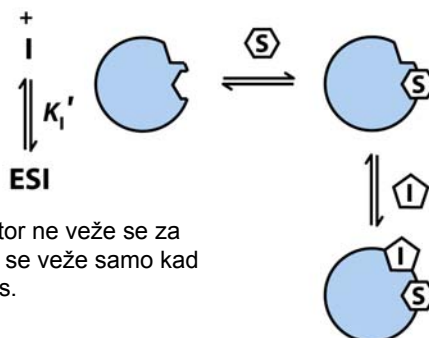


Figure 8-20  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Može se uočiti da dolazi do povećanja  $K_M$  a  $V_m$  se ne mijenja.

## Tri su osnovna tipa reverzibilne inhibicije enzima koji podliježu Michaelis-Menteninoj kinetici

### b) akompetitivna inhibicija



akompetitivni inhibitor ne veže se za slobodni enzim već se veže samo kad postoji ES kompleks.

Figure 6-15b  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

**Akompetitivna inhibicija.** Inhibitor se veže samo kad već postoji ES kompleks.  $V_m$  se ne postiže niti s vrlo visokim koncentracijama supstrata.  $K'_M$  postaju manje kako se koncentracije inhibitora povećavaju.

$$V'_m = \frac{V_m}{1 + [I]/K_i}$$

$$K_{Mi} = \frac{K_M}{1 + [I]/K_i}$$

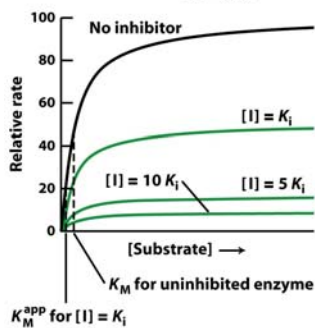
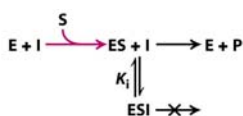


Figure 8-18  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

## Recipročni dijagram akompetitivne inhibicije

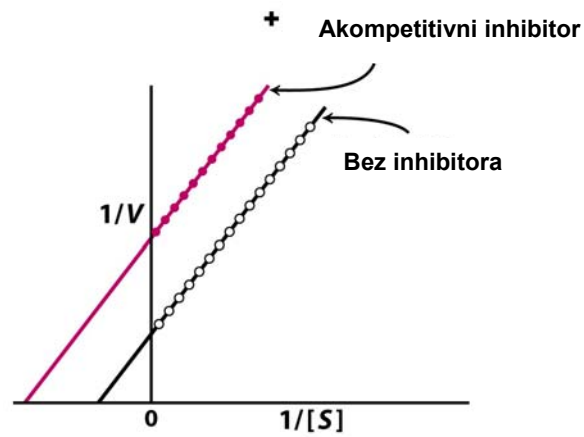
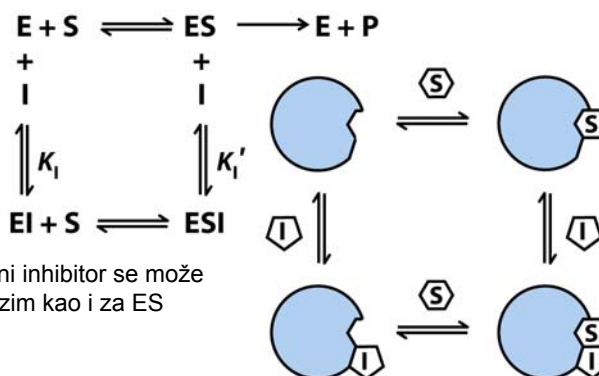


Figure 8-21  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Nagibi pravaca se ne mijenjaju jer se i  $V_m$  i  $K_M$  proporcionalno smanjuju.

## Tri su osnovna tipa reverzibilne inhibicije enzima koji podliježu Michaelis-Menteninoj kinetici

### c) Nekompetitivna inhibicija (inhibicija miješanog tipa)



Nekompetitivni inhibitor se može vezati i za enzim kao i za ES kompleks.

Figure 6-15c  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

**Nekompetitivna inhibicija.** Inhibitor se veže i na enzim ali isto tako i na ES kompleks.  $V_m$  se ne postiže, a  $K_M$  se ne mijenja.

$$K_{mi} = K_M$$

$$V_{mi} = \frac{V_m}{1 + [I]/K_i}$$

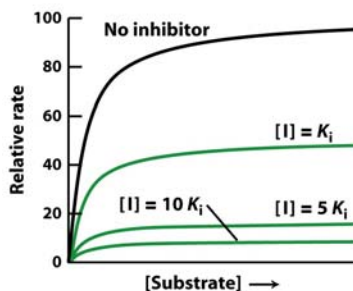
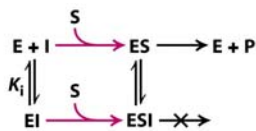


Figure 8-19  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

Recipročni dijagram nekompetitivne inhibicije  
(inhibicija mješovitog tipa)

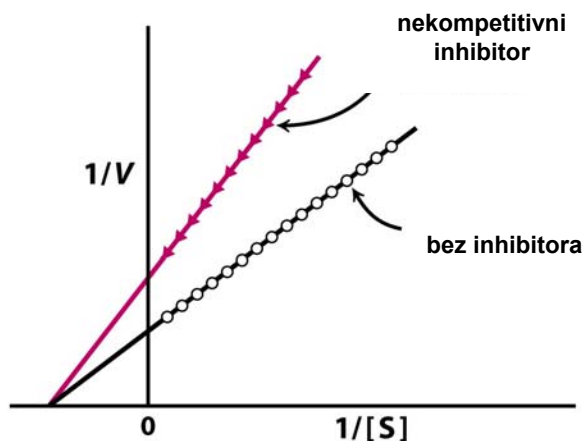


Figure 8-22  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

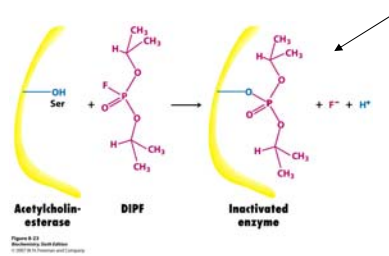
$V_m$  se smanjuje, a  $K_M$  ostaje ista.

**Aktivnost enzima mijenja se promjenama temperature, pH, inhibitorima te vezanjem malih molekula ili iona**

**Ireverzibilne inhibitore možemo podijeliti u četiri skupine:**

- a) reagense za određivanje specifičnih (funkcionalnih) skupina
- b) afinitetne biljege (analogone supstrata)
- c) suicidalne inhibitore
- d) analogone prijelaznih stanja

**Primjeri ireverzibilnih inhibitora – reagensi koji specifično reagiraju s određenom funkcionalnom skupinom**

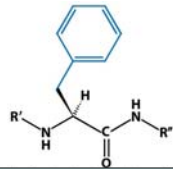


Diizopropilfosfofluoridat (DIPF) specifično reagira s hidroksilnom skupinom serina mnogih enzima (posebica hidrolaza).

**Ovaj reagens se koristi za proučavanje aktivnih mjesta mnogih enzima, posebice serinskih hidrolaza.**

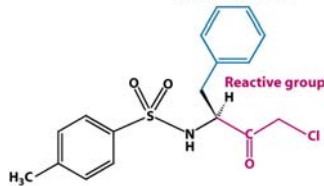


**Primjeri ireverzibilnih inhibitora – primjer afinitetnog biljega (analogon supstrata)**



Prirodni supstrat kimotripsina

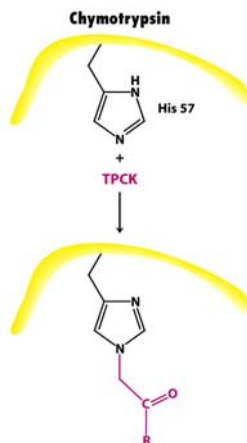
Usporedba struktura prirodnog supstrata za kimotripsin i afinitetnog biljega – tosil-L-fenilalanin klorometil ketona (TPCK)



Tosil-L-fenilalanin klorometil keton

Figure 8-25a  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

**Primjeri ireverzibilnih inhibitora – primjer afinitetnog biljega (analogon supstrata)**



Kada se koristi kao afinitetni biljeg, TPCK se specifično veže za histidin 57 u aktivnom mjestu kimotripsina.

Figure 8-25b  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

## Primjeri ireverzibilnih inhibitora - **Primjer suicidnog inhibitora (penicilin)**

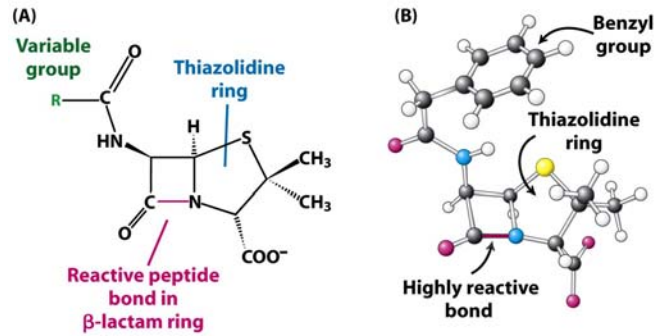


Figure 8-30  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Penicilin ireverzibilno inhibira enzim **glikopeptid transpeptidazu**, enzim koji je odgovoran za sintezu stanične stijenke bakterija

## Primjeri ireverzibilnih inhibitora - **Primjer suicidnog inhibitora (penicilin)**

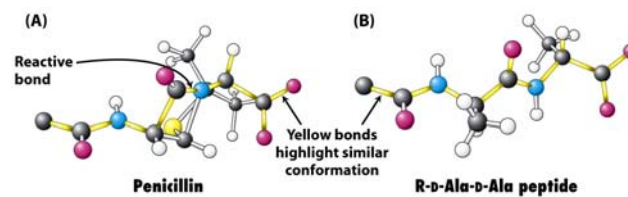


Figure 8-34  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

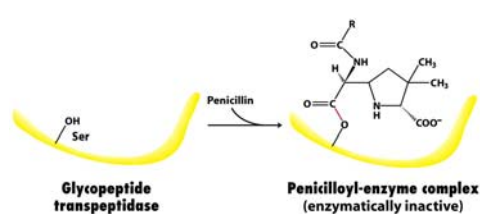


Figure 8-35  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Zbog sličnosti strukture s prirodnim supstratom (B), penicilin (A) ulazi u aktivno mjesto enzima, glikopeptid transpeptidaze, gdje se kovalentno veže i time inhibira glikopeptidnu transpeptidazu.

## Primjeri ireverzibilnih inhibitora – primjer inhibitora prijelaznog stanja

Reakcija koju katalizira prolin izomeraza:

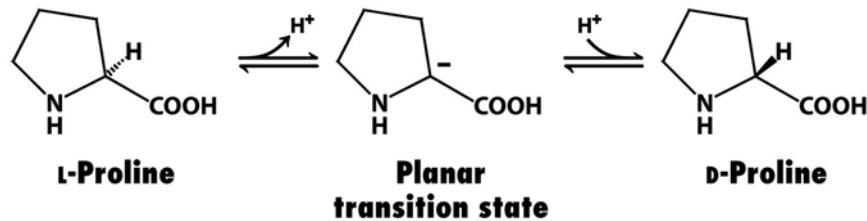


Figure 8-28a  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

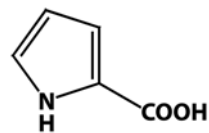
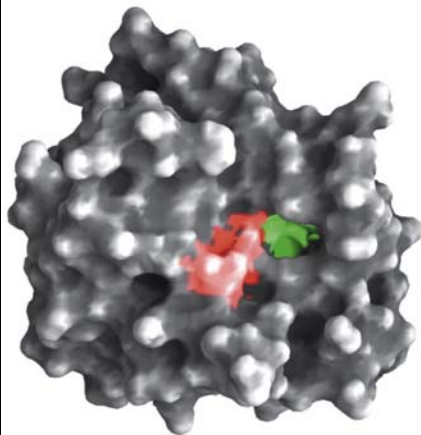


Figure 8-28b  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

## Enzimi koriste nekoliko osnovnih načina za katalizu

- Kovalentna kataliza – aktivno mjesto ima nukleofil koji se privremeno kovalentno povezuje sa supstratom – primjer: kimotripsin Ser 195
- Opća kiselo-bazna kataliza – primjer (1): kimotripsin koristi histidinski bočni ostatak kao bazu kako bi povećao nukleofilnost serina. – primjer (2): ugljična anhidraza (karboanhidraza) koristi histidin za uklanjanje protona s molekule vode koja je vezana na cinkov ion.
- Kataliza uzrokovana približavanjem – mnoge bi-supstratne reakcije koriste približavanje dva supstrata – primjer NMP kinaza
- Kataliza metalnim ionima – primjer cinkovog iona pri katalizi karboanhidraze

**Kimotripsin** – primjer enzima koji koristi kovalentnu katalizu kao i kiselo-baznu katalizu



Džep u koji se vežu aromatske ak prikazan je zelenom bojom. Ključni bočni ostaci u aktivnom središtu prikazani su crveno.

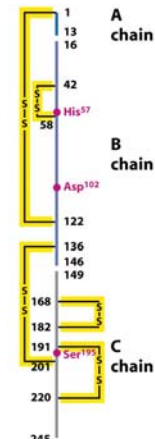


Figure 6-18a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

**Kimotripsin** – primjer enzima koji koristi kovalentnu katalizu kao i kiselo-baznu katalizu

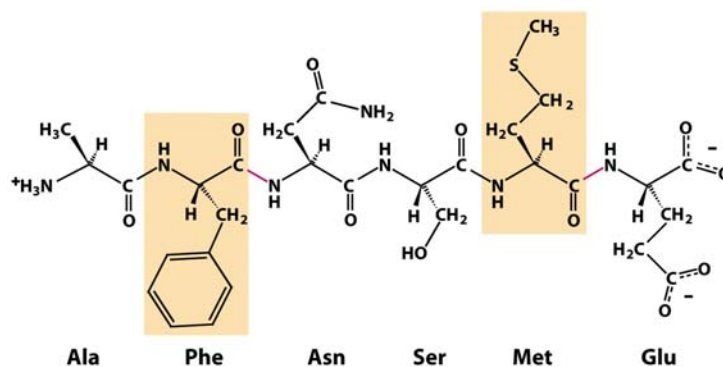


Figure 9-1  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Kimotripsin hidrolizira peptidnu vezu na karboksilnoj strani aromatskih aminokiselina ili aminokiselina koje imaju velike hidrofobne bočne skupine (na slici označene narančastom bojom).

**Kimotripsin** – primjer enzima koji koristi kovalentnu katalizu kao i kiselo-baznu katalizu

Ser<sup>195</sup> nalazi se u aktivnom središtu enzima što se dokazalo s ireverzibilnim inhibitorom (DIPF) koji specifično reagira s hidroksilnom skupinom serina te ireverzibilno inhibira kimotripsin.

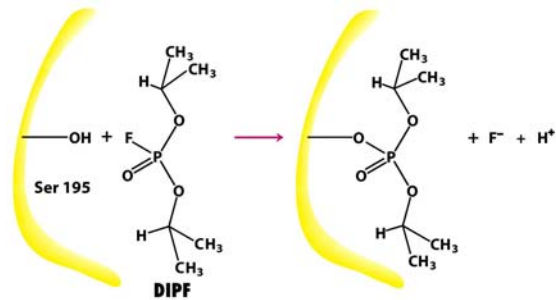


Figure 9-2  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

## Kinetika katalize kimotripsina

Cijepanje kromogenog supstrata moguće je pratiti spektrofotometrom.

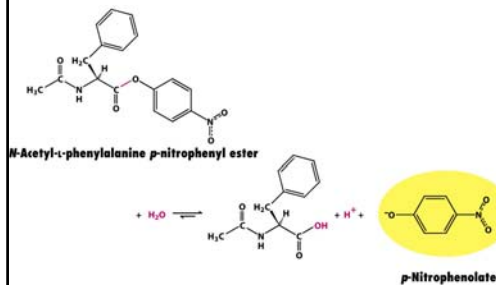


Figure 9-3  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

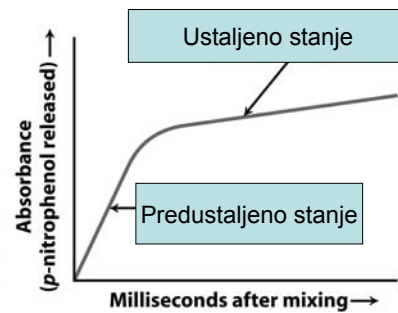


Figure 9-4  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Iz rezultata kinetičkih mjerenja vidljivo je da postoje dvije faze tijekom cijepanja N-acetil-L-fenilalanin p-nitrofenilnog estera.

## Kimotripsin – primjer enzima koji koristi kovalentnu katalizu kao i kiselo-baznu katalizu



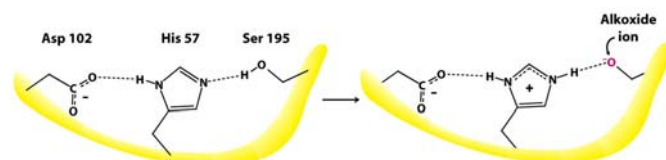
Kovalentna kataliza. **Hidrolaze** provode hidrolizu supstrata u dva koraka:

- reakcijom acilacije kako bi nastao acil-enzim (acilna skupina supstrata kovalentno se veže na hidroksilnu skupinu Ser-195)
- reakcijom deacilacije pri čemu se regenerira slobodni enzim.

## Kimotripsin – primjer enzima koji koristi kovalentnu katalizu kao i kiselo-baznu katalizu

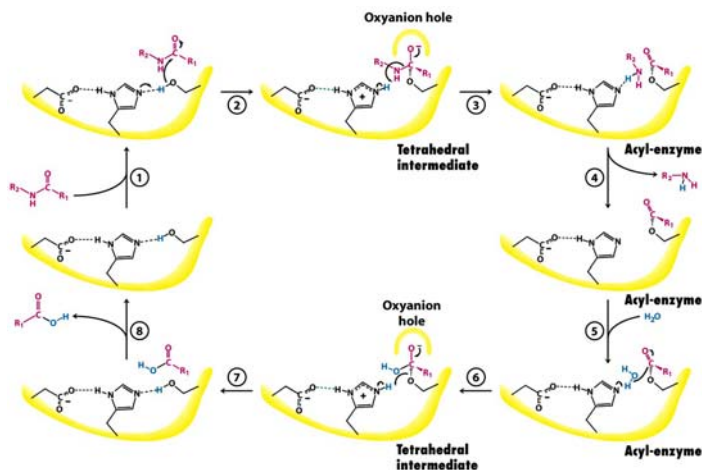
His-57 i njegova uloga u aktivnom mjestu kimotripsina dokazani su afinitetnim biljgom TPCK koji kada je vezan na His 57, inhibira enzim.

Serin195 (dokazan s DIPF) je dio **katalitičke triade** u koju su još uključeni Asp102 i His57.



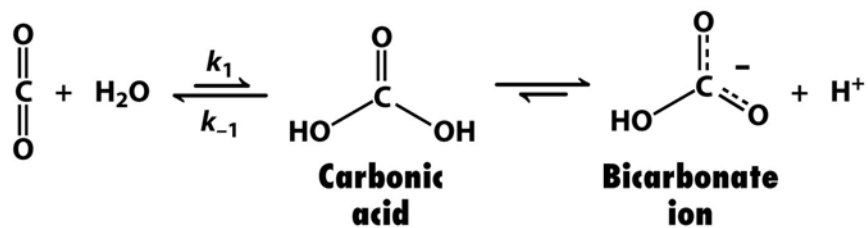
**Katalitička triada pretvara Ser<sup>195</sup> u aktivni nukleofil (alkoksidni ion).**

Hidroliza peptida pomoću kimotripsina. Mehanizam hidrolize peptida ilustrira principe kovalentne i kiselo-bazne katalize.



Reakcija se odvija u 8 koraka: 1) vezanje supstrata; 2) nukleofilni napad Ser na peptidnu karbonilnu skupinu; 3) pucanje tetraedarske strukture; 4) otpuštanje novo-nastalog amino-kraja peptida; 5) vezanje vode; 6) nukleofilni napad vode na acil-enzim međuprodukt; 7) pucanje tetraedarskog međuprodukta; 8) otpuštanje novo-nastalog karboksilnog kraja peptida. Crkane veze su vodikove veze.

**Karboanhidraza** – primjer kako se ioni metala (Zn II) koriste u enzimskoj katalizi



Unnumbered figure pg 254  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Struktura karbohidraze II i mjesto vezanja cinka.  $Zn^{2+}$  je vezan za tri imidazolna prstena histidinskih bočnih ostataka kao i za molekulu vode. Mjesto vezanja cinka je blizu aktivnog središta enzima.

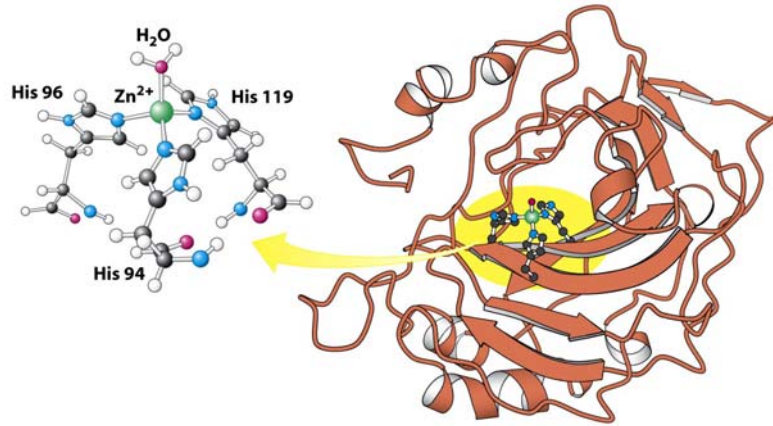
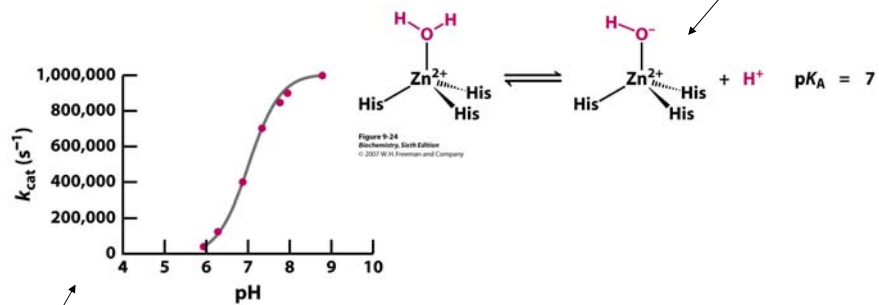


Figure 9-22  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Vežanjem cinka,  $pK_a$  vode smanjuje se s 15,7 na  $pK_a = 7,0$ .



Promjene pH mijenjaju brzinu reakcije karbohidraze II.



### Mehanizam katalize karboanhidraze II.

1) uklanjanje protona iz molekule vode; 2) vezanje  $\text{CO}_2$  za hidroksidni ion; 3) nukleofilni napad hidroksida na  $\text{CO}_2$ ; 4) uklanjanje bikarbonatnog iona s vodom.

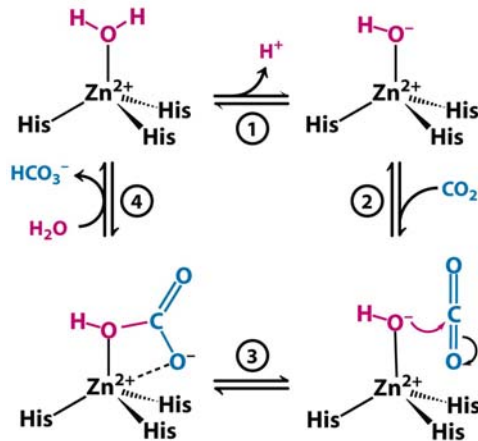
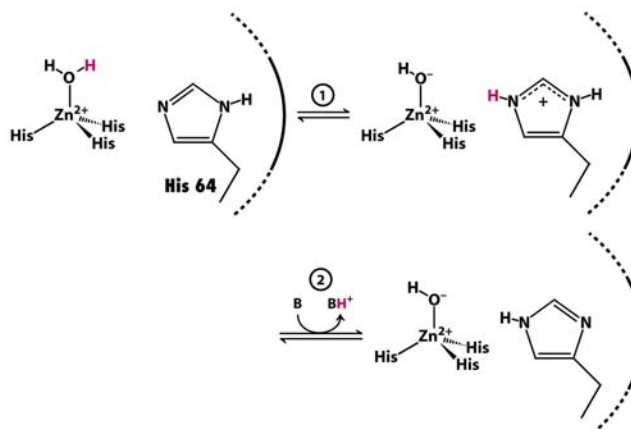


Figure 9-25  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

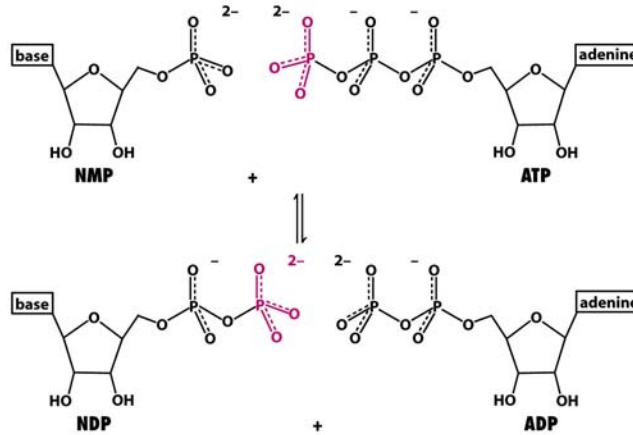
Prijenos protona pomaže da se aktivno središte karboanhidraze II vrlo brzo regenerira.



1) His<sup>64</sup> odvlači i preuzima proton iz molekule vode koja je vezana za cinkov ion; 2) baza (**B**) uklanja proton s histidina, pa je histidin ponovno u ne-protoniranom stanju.

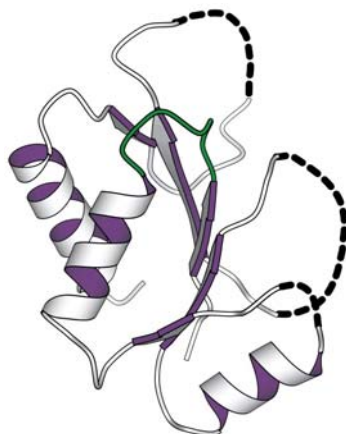
### Primjer katalize približavanjem.

Nukleozid monofosfat (NMP) kinaze kataliziraju prijenos fosforilnih skupina a da pri tome ne dolazi do hidrolize. Tipičan predstavnik je adenilat kinaza.

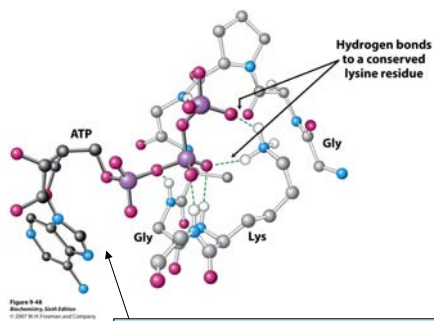


Nukleozid monofosfat kinaze kataliziraju pretvorbu nukleozid trifosfata (ATP) i nukleozid monofosfata (NMP) u dva nukleozid difosfata (NDP i ADP).

### Dio strukture NMP kinaze



P-petlja (zeleno) povezuje  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -lanac



Interakcija ATP s P-petljom

Vežanjem ATP dolazi do inducirane konformacijske promjene enzima, a vezanje NMP dovodi do dodatne promjene konformacije enzima. Katalitički aktivan oblik enzima nastaje samo kada su oba supstrata vezana na enzim. Ovime se također postiže da su oba supstrata blizu i pravilno orijentirana pa može doći do prijenosa fosforilne skupine s ATP na NMP.

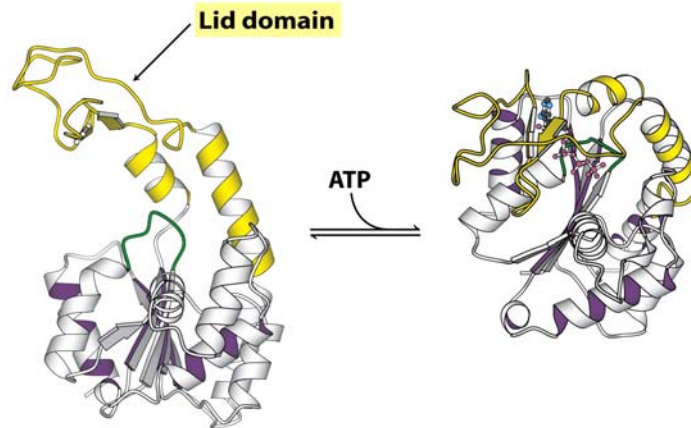


Figure 9-51  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

## Regulacije enzimske aktivnosti

- Alosterički enzimi
- Reverzibilne kovalentne modifikacije
- Sinteza i distribucija enzima
- Hidroliza enzima

## Neki regulatorni enzimi kontroliraju svoju aktivnost reverzibilnim kovalentnim modifikacijama

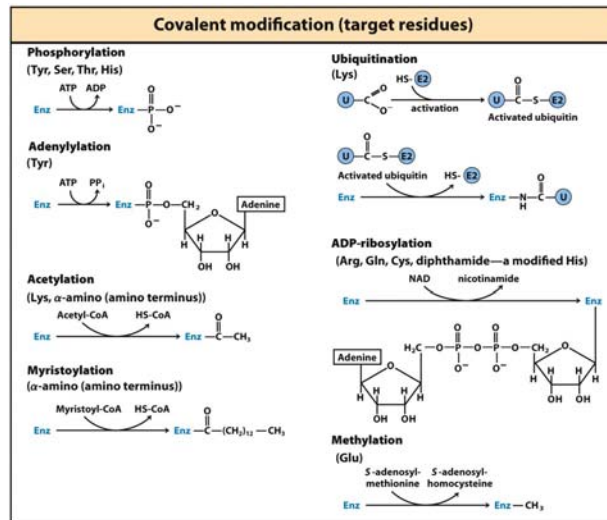


Figure 6-35  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

## Fosforilacije enzima su najčešće kovalentne modifikacije. Različite kinaze imaju definirana mjesta fosforilacije

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 <sup>2+</sup> /calmodulin kinase I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca <sup>2+</sup> /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 <sup>†</sup>
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.

<sup>†</sup>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.

Table 6-10  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Jedan regulatorni enzim može se fosforilirati na nekoliko različitih mjesta. Primjer višestrukih regulatornih fosforilacija glikogen sintaze.

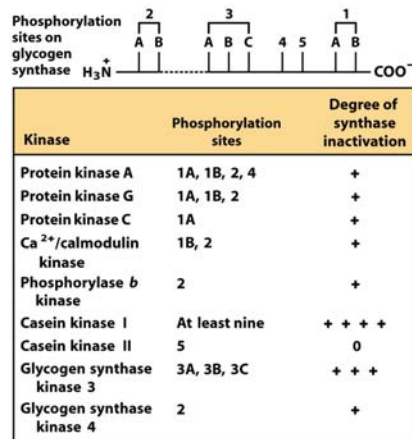


Figure 6-37  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Izoenzimi su enzimi koji imaju različitu aminokiselinsku sekvencu (primarnu strukturu, pa prema tome i gene) a kataliziraju identične reakcije. Reguliraju specifičnost pojedinih tkiva kao i stupanj razvoja tih tkiva.

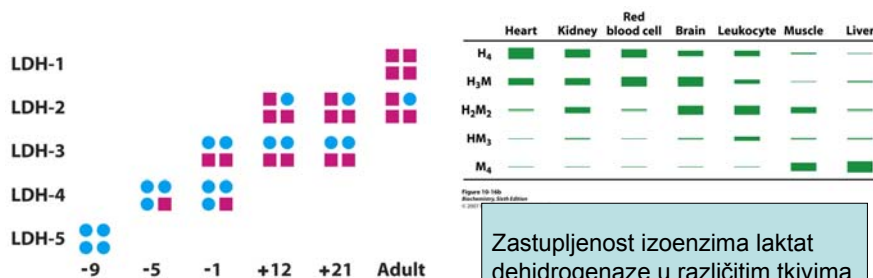


Figure 10-10a  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Zastupljenost izoenzima laktat dehidrogenaze u različitim tkivima odraslih štakora.

Zastupljenost izoenzima laktat dehidrogenaze u srcu štakora tijekom razvoja. H izoenzim (izoenzim u srcu) je prikazan kvadratićima, a M (izoenzim u mišićima) kružićima.

## Specifičnim proteolitičkim cijepanjem aktiviraju se mnogi enzimi

**TABLE 10.3** Gastric and pancreatic zymogens

Site of synthesis	Zymogen	Active enzyme
Stomach	Pepsinogen	Pepsin
Pancreas	Chymotrypsinogen	Chymotrypsin
Pancreas	Trypsinogen	Trypsin
Pancreas	Procarboxypeptidase	Carboxypeptidase
Pancreas	Proelastase	Elastase

Table 10-3  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Enteropeptidaza inicira nastajanje tripsina što uzrokuje kaskadu aktivnih enzima koji nastaju iz pripadajućih zimogena. Aktivni enzimi prikazani su žutom, a neaktivni (zimogeni) narančastom bojom.

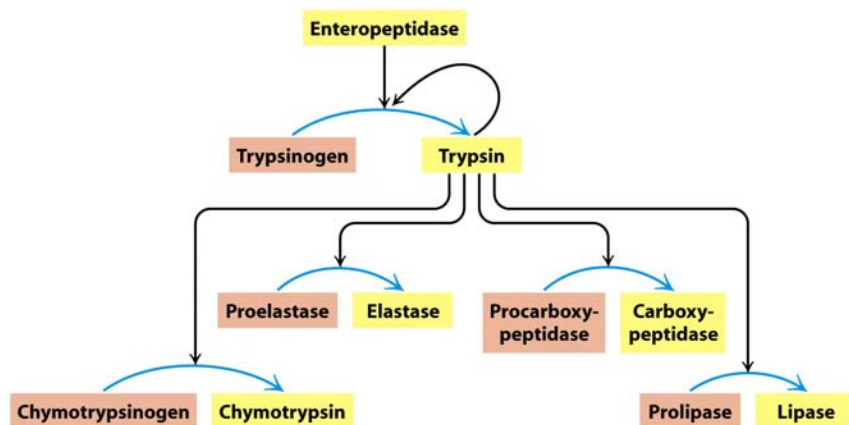


Figure 10-23  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
 © 2007 W. H. Freeman and Company