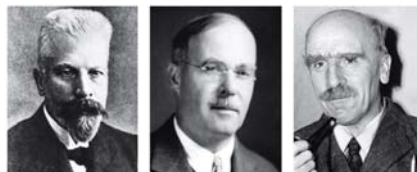


# Osnove biokemije

## Enzimi-1

B. Mildner

## ENZIMI (uvod)



Eduard Buchner,  
1860–1917

James Sumner,  
1887–1955

J. B. S. Haldane,  
1892–1964

Unnumbered & p184  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Dva su osnovna preuvjeta za život:

- a) Organizam se mora sam replicirati;
- b) **Organizam mora katalizirati kemijske reakcije efikasno i selektivno**

Većina enzima su proteini. Katalitička svojstva enzima ovise o funkcionalnoj nativnoj konformaciji proteina. Primarne, sekundarne, tercijarne kao i kvaterne strukture proteinskih enzima bitne su za njihovu katalitičku aktivnost.

## Enzimi su moćni i vrlo specifični katalizatori

- Enzimi su katalizatori u biološkim sustavima. Gotovo svi enzimi su proteini.
- Enzimi su vrlo specifični, a ujedno i jako dobri katalizatori.
- Enzimi povećavaju brzinu reakcije i više od  $10^6$  puta.

## Ubrzanje brzine reakcije nekih enzima

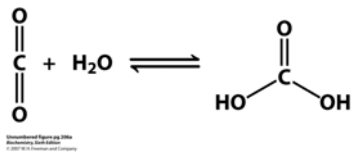
**TABLE 8.1 Rate enhancement by selected enzymes**

| Enzyme                     | Nonenzymatic half-life | Uncatalyzed rate ( $k_{un} s^{-1}$ ) | Catalyzed rate ( $k_{cat} s^{-1}$ ) | Rate enhancement ( $k_{cat} s^{-1}/k_{un} s^{-1}$ ) |
|----------------------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|
| OMP decarboxylase          | 78,000,000 years       | $2.8 \times 10^{-16}$                | 39                                  | $1.4 \times 10^{17}$                                |
| Staphylococcal nuclease    | 130,000 years          | $1.7 \times 10^{-13}$                | 95                                  | $5.6 \times 10^{14}$                                |
| AMP nucleosidase           | 69,000 years           | $1.0 \times 10^{-11}$                | 60                                  | $6.0 \times 10^{12}$                                |
| Carboxypeptidase A         | 7.3 years              | $3.0 \times 10^{-9}$                 | 578                                 | $1.9 \times 10^{11}$                                |
| Ketosteroid isomerase      | 7 weeks                | $1.7 \times 10^{-7}$                 | 66,000                              | $3.9 \times 10^{11}$                                |
| Triose phosphate isomerase | 1.9 days               | $4.3 \times 10^{-6}$                 | 4,300                               | $1.0 \times 10^9$                                   |
| Chorismate mutase          | 7.4 hours              | $2.6 \times 10^{-5}$                 | 50                                  | $1.9 \times 10^6$                                   |
| Carbonic anhydrase         | 5 seconds              | $1.3 \times 10^{-1}$                 | $1 \times 10^6$                     | $7.7 \times 10^6$                                   |

Abbreviations: OMP, orotidine monophosphate; AMP, adenosine monophosphate.  
Source: After A. Radzicka and R. Wofenden. *Science* 267 (1995):90–93.

Table 8-1  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
© 2007 W. H. Freeman and Company

## Enzimi kataliziraju različite vrste reakcija



Ugljična anhidraza katalizira povezivanje  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  u karbonatnu kiselinu.

Ovu jednostavnu reakciju enzim ubrzava gotovo  $10^7$  puta.

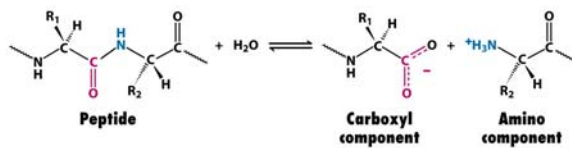
Enzimi su vrlo specifični i u pogledu reakcije koje kataliziraju kao i u izboru reaktanata koje nazivamo **supstratima**.

## Enzime razvrstavamo obzirom na reakciju koju kataliziraju

| Međunarodna klasifikacija enzima |                 |  |
|----------------------------------|-----------------|--|
| Class no.                        | Class name      | Type of reaction catalyzed   |
| 1                                | Oxidoreductases | Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)  |
| 2                                | Transferases    | Group transfer reactions   |
| 3                                | Hydrolases      | Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)  |
| 4                                | Lyases          | Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups                              |
| 5                                | Isomerases      | Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms  |
| 6                                | Ligases         | Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to cleavage of ATP or similar cofactor |

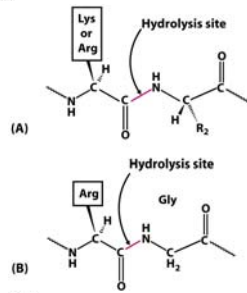
**Table 6-3**  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

**Enzimi kataliziraju različite vrste reakcija, ali svaki pojedinačni enzim katalizira vrlo specifičnu reakciju**



Proteaze *in vivo* hidroliziraju peptidne veze i ovi se enzimi značajno razlikuju po specifičnosti.

Unnumbered figure pg 206b  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company



**Specifičnost enzima.** (A) **tripsin** hidrolizira peptidnu vezu na karboksilnoj strani arginina ili lizina, dok **trombin** (B) hidrolizira peptidnu vezu samo Arg-Gly veze (samo vezu ako je Gly iza Arg u aminokiselinskom slijedu).

Figure 8-1  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Za djelovanje nekih enzima potrebni su **kofaktori**. Kofaktori provode kemijsku reakciju koju nije moguće provesti s uobičajenim aminokiselinama.

**Apoenzim + kofaktor = holoenzim**

Kofaktore možemo podijeliti u dvije skupine:

- **metale**
- **koenzime** (male organske molekule koje mogu biti čvrsto ili slabo povezni s enzimom)

Koenzime čvrsto povezane s enzimom nazivamo **prostetskim skupinama**.

## Za aktivnost nekih enzima potrebni su kofaktori

### Anorganski ioni koji su kofaktori nekih enzima

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

Table 6-1  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

## Za aktivnost nekih enzima potrebni su kofaktori

### Koenzimi koji se koriste kao prenositelji specifičnih atoma ili funkcionalnih skupina

| Coenzyme  | Examples of chemical groups transferred | Dietary precursor in mammals         |
|---|---|--------------------------------------|
| Biotin  | $\text{CO}_2$                           | Biotin                               |
| Coenzyme A  | Acyl groups                             | Pantothenic acid and other compounds |
| 5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme $\text{B}_{12}$ ) | H atoms and alkyl groups                | Vitamin $\text{B}_{12}$              |
| Flavin adenine dinucleotide                           | Electrons                               | Riboflavin (vitamin $\text{B}_2$ )   |
| Lipoate   | Electrons and acyl groups               | Not required in diet                 |
| Nicotinamide adenine dinucleotide                     | Hydride ion ( $\text{H}^-$ )            | Nicotinic acid (niacin)              |
| Pyridoxal phosphate                                   | Amino groups                            | Pyridoxine (vitamin $\text{B}_6$ )   |
| Tetrahydrofolate                                      | One-carbon groups                       | Folate                               |
| Thiamine pyrophosphate                                | Aldehydes                               | Thiamine (vitamin $\text{B}_1$ )     |

Koenzimi se razlikuju od supstrata ne samo zbog toga što su to derivati vitamina, već i zbog toga što jednu vrstu koenzima mogu koristiti različiti enzimi. Enzimi koji koriste istu vrstu koenzima obično kataliziraju slične kemijske reakcije.

## Enzimom katalizirana reakcija odvija se u **aktivnom mjestu** enzima.

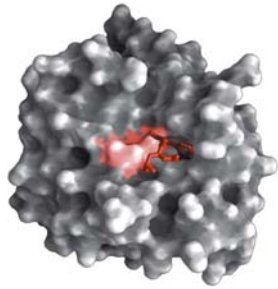
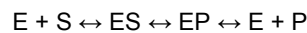


Figure 6-1  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Molekula koja se veže u aktivno mjesto i na koju djeluje enzim nazivamo **supstratom**. Na površini aktivnog mjesta su bočni ogranci amino-kiselina koji vežu supstrat i kataliziraju kemijsku pretvorbu supstrata.

Jednadžbu jednostavne enzimom katalizirane reakcije možemo pisati:



pri čemu su E, S i P enzim, supstrat i produkt, a ES i EP su prijelazni kompleksi enzima sa supstratom odnosno s produktom.

**Funkcija je katalizatora da promijeni brzinu reakcije.**

**Katalizom se ne mijenja ravnoteža reakcije.**

## Termodinamika nam omogućava razumjevanje djelovanja enzima

1. Reakcija će se odvijati spontano (egzergona reakcija) samo ako je  $\Delta G < 0$ .
2. Reakcija se neće odvijati spontano (endergona reakcija) samo ako je  $\Delta G > 0$ .
3. U sustavu koji je u ravnoteži, ukupna promjena koncentracije produkata i reaktanata jednaka je nuli, pa je i  $\Delta G = 0$ .
4.  $\Delta G$  reakcije ovisi o slobodnoj energiji produkata (konačno stanje) minus slobodna energija reaktanata (početno stanje).  $\Delta G$  ne ovisi o putu (molekularnom mehanizmu) pretvorbe.
5.  $\Delta G$  ne pruža informaciju o brzini reakcije.

### Promjena standardne slobodne energije u sprezi je s konstantom ravnoteže reakcije

Za reakciju:  $A + B \leftrightarrow C + D$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (1)$$

U kemiji, promjena **standardne slobodne energije**  $\Delta G^\circ$  definirana je za reakcije koje se provode pri 298 K, parcijalnom tlaku plina od 1 atm (101,3 kPa) i koncentraciji 1 mol dm<sup>-3</sup>. Kako su u biokemiji koncentracije H<sup>+</sup> daleko manje od 1 mol dm<sup>-3</sup>, u biokemiji promjenu slobodne energije definiramo kao **biokemijsku promjenu standardne slobodne energije**,  $\Delta G'^\circ$  kao promjenu slobodne energije pri pH = 7,0.

U ravnoteži,  $\Delta G = 0$  pa jednadžba (1) postaje:

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (2), \text{ odnosno } \Delta G^\circ = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (3)$$

Kako je  $K'_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$  (4). Ako jedn. (4) supstituiramo u jedn. (3) dobivamo:

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq} \quad (5), \text{ odnosno } K'_{eq} = e^{-\Delta G'^\circ/RT} \quad (6)$$

### Promjena standardne slobodne energije u sprezi je s konstantom ravnoteže reakcije (2)

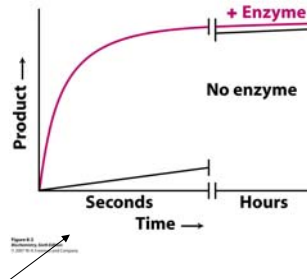
Važno je naglasiti da bez obzira na vrijednost  $\Delta G'^\circ$  reakcije, vrijednost  $\Delta G$  reakcije ovisi o koncentracijama reaktanata i produkata.

## Enzimi mijenjaju brzinu reakcije ali ne i ravnotežu reakcije

| $K'_{eq}$ | $\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol) |
|-----------|------------------------------|
| $10^{-6}$ | 34.2                         |
| $10^{-5}$ | 28.5                         |
| $10^{-4}$ | 22.8                         |
| $10^{-3}$ | 17.1                         |
| $10^{-2}$ | 11.4                         |
| $10^{-1}$ | 5.7                          |
| 1         | 0.0                          |
| $10^1$    | -5.7                         |
| $10^2$    | -11.4                        |
| $10^3$    | -17.1                        |

Note: The relationship is calculated from  $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$  (Eqn 6-3).

Table 6-4  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company



**Enzimi ubrzavaju brzinu reakcije.**  
Pretvorba supstrata u produkt postiže se znatno brže u reakciji koju katalizira enzim

## Energetska stanja za nekataliziranu reakciju

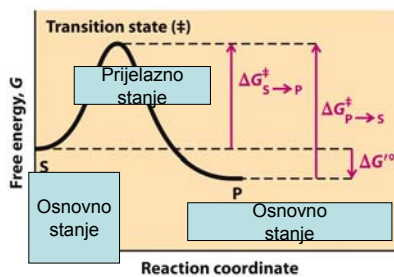


Figure 6-2  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Promjene  $\Delta G'^{\circ}$  u nekataliziranoj reakciji

U reakciji  $S \leftrightarrow P$  i  $S$  i  $P$  nalaze se u osnovnim stanjima. Razlika u slobodnim energijama osnovnih stanja  $S$  i  $P$  određuje ravnotežu reakcije. Ako je razlika negativna, tj.  $\Delta G'^{\circ} < 0$ , ravnoteža je u smjeru nastajanja  $P$ .

Povoljna ravnoteža reakcije ne znači da će se reakcija  $S \rightarrow P$  odvijati u nekom detektabilnom vremenu.

Da se molekula pretvori iz  $S$  u  $P$  ona mora prijeći energetska barijeru prijelaznog stanja.



## Enzimi omogućavaju stvaranje prijelaznog stanja

Razlika u slobodnim energijama reaktanata i produkata određuje ravnotežu reakcije.

Razlika u slobodnim energijama između prijelaznog stanja i supstrata naziva se slobodnom energijom aktivacije ili energijom aktivacije,  $\Delta G^\ddagger$ .

Energija aktivacije,  $\Delta G^\ddagger$ , ne uzima se u izračun ukupne slobodne energije reakcije, budući da se energija, koja bi se trebala pribrojiti da se postigne prijelazno stanje, ponovno oslobađa kada se prijelazno stanje pretvara u produkt.

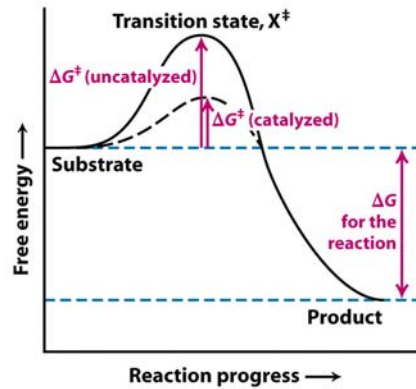


Figure 8-3  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

**Osnova katalize je stabilizacija prijelaznog stanja.**

## Usporedba energija aktivacije nekatalizirane i enzimom katalizirane reakcije

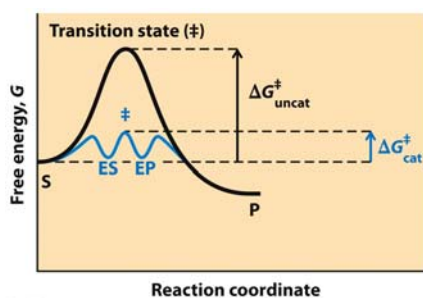


Figure 8-2  
Lehninger Principles of Biochemistry, 5th Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Katalizom se smanjuje energija aktivacije reakcije. Enzimi ne mijenjaju ravnotežu reakcije – **bilo koji enzim koji katalizira reakciju u smjeru  $S \rightarrow P$ , katalizira i reakciju u smjeru  $P \rightarrow S$** . Enzimi samo ubrzavaju reakciju u određenom smjeru.

**Onaj prijelaz, iz jednog međuprodukta u drugi međuprodukt, koji ima najveću energiju aktivacije je korak koji određuje brzinu reakcije.**

## Brzina reakcije i ravnoteža reakcije imaju točne termodinamičke definicije

Za reakciju  $S \leftrightarrow P$ ,  $K'_{eq} = [P]/[S]$  pa je  
 $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$  pri čemu  $R = 8,315 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  
 $T = 298 \text{ K (25 }^{\circ}\text{C)}$ .

Brzina reakcije određena je koncentracijom reaktanta (ili reaktanata) i konstantom brzine reakcije  $k$ . Za jednomolekularnu reakciju brzina reakcije  $v$  je:

$v = k[S]$  U ovoj reakciji brzina reakcije ovisi samo o **S** i ove reakcije nazivamo **reakcijama prvog reda**. Konstanta  $k$  ima jedinicu  $\text{s}^{-1}$ .

Ako brzina reakcije ovisi o koncentracijama dva različita supstrata, reakcija je **drugog reda** i konstantu brzine reakcije izražavamo kao  $\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ , te je  $v = k[S_1][S_2]$ .

Iz teorije o prijelaznim stanjima poznato je da je konstanta brzine reakcije povezana s energijom aktivacije:

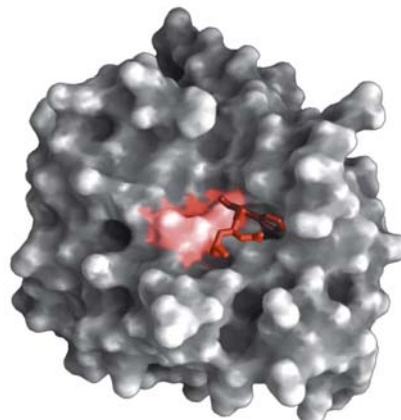
$$k = \infty e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT}$$

Važno je ovdje uočiti da je konstanta brzine reakcije,  $k$ , **obratno eksponencijalno proporcionalna energiji aktivacije  $\Delta G^{\ddagger}$** .

## Nastanak enzim-supstrat kompleksa prvi je korak u enzimskoj katalizi

U reakciji koja je katalizirana enzimom, nastaju reakcijska prijelazna stanja. Prijelazno stanje može biti bilo koji spoj kojem je životni vijek duži od molekularne vibracije  $\sim 10^{-13}$  sekunde). **ES** i **EP** možemo nazvati prijelaznim stanjima. Prijelaz **S** u **P** ovisi o brzini pretvorbe prijelaznog stanja.

- Sposobnost da vrše katalizu, enzimima omogućava vezanje supstrata u povoljnu orijentaciju kako bi se olakšalo nastajanje prijelaznog stanja.



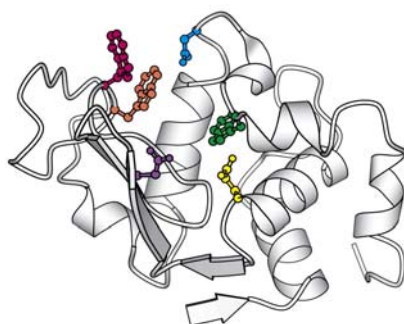
Vezanje supstrata u aktivno mjesto enzima.

### Aktivna mjesta enzima imaju neke zajedničke karakteristike

1. Interakcijama enzima i supstrata u aktivnom mjestu dolazi do stvaranja prijelaznog stanja supstrata.
2. Aktivna mjesta imaju strukturu ždrijela ili udubljenja.
3. U aktivnim mjestima nastaje jedinstven mikrookoliš koji omogućava nastanak i razgradnju prijelaznog stanja.
4. U aktivna mjesta enzima, supstrati se vežu mnogobrojnim nekovalentnim vezama, a ponekad i kovalentnim vezama.
5. Specifičnost vezanja supstrata u aktivno mjesto ovisi o preciznom rasporedu atoma u aktivnom mjestu.

### Aktivno mjesto nastaje nabiranjem malobrojnih aminokiselinskih ostataka iz različitih dijelova primarne strukture

(A)



**(A) Struktura aktivnog mjesta lizozima.**  
Aminokiselinski ostaci u aktivnom mjestu prikazani su različitim bojama.

(B) N 1 35 52 62,63 101 108 129 C

Figure 6-7  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

**(B) Primarna struktura lizozima.** Aminokiseline koje su u aktivnom mjestu su obojane.

## Specifičnost vezanja supstrata u aktivno mjesto

Model "kjuča i brave"

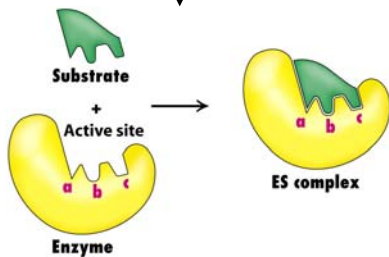
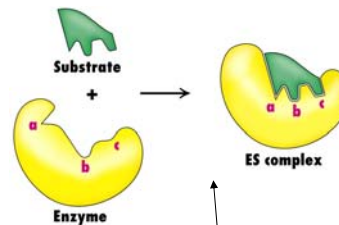


Figure 6-4  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company



Model inducirane prilagodbe

## Specifičnost vezanja supstrata u aktivno mjesto

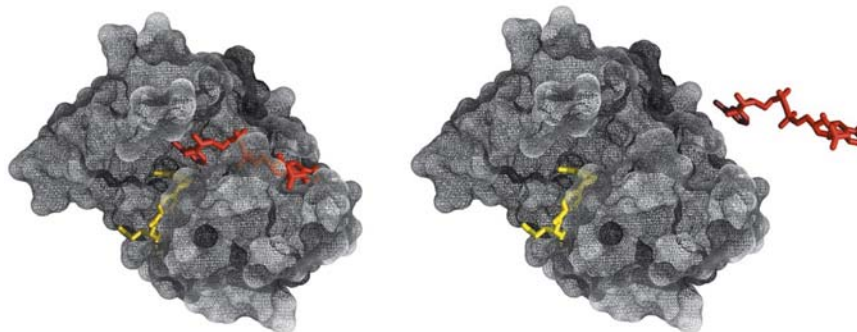


Figure 6-4  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

Supstrat inducira specifičnu prilagodbu u terciarnoj strukturi aktivnog mjesta.

## Energija vezanja između enzima i supstrata važna je za katalizu

Enzimi mogu preurediti kovalentne veze supstrata jer katalitičke funkcionalne skupine enzima mogu stvarati privremene kovalentne veze sa supstratima.

Enzimi također rade nekovalentne interakcije sa supstratima.

Što enzime razlikuje od drugih katalizatora je mogućnost stvaranja specifičnih ES kompleksa. Stvaranjem slabih veza između enzima i supstrata oslobađa se dio slobodne energije. Energija koja se dobije od enzim – supstrat interakcija nazivamo energijom vezanja  $\Delta G_B$ . *Energija vezanja je glavni izvor energije zbog kojeg dolazi do smanjenja energije aktivacije reakcije.*

**Slabe nekovalentne interakcije odgovorne su:**

a) za katalizu reakcije - **energija vezanja doprinosi brzini i specifičnosti reakcije;**

b) slabe interakcije optimalne su u prijelaznom stanju supstrata - *aktivna mjesta enzima komplementarna su prijelaznim stanjima supstrata tijekom pretvorbe supstrata u produkt.*

## Uloga energije vezanja u katalizi

**Energija vezanja supstrata smanjuje energiju aktivacije pa dolazi do ubrzanja reakcije.**

Slabe sile koje nastaju između enzima i supstrata stvaraju energiju vezanja  $\Delta G_B$  i time se omogućava ubrzanje reakcije. Energija aktivacije katalizirane reakcije jednaka je razlici između energije aktivacije nekatalizirane reakcije i energije vezanja prijelaznog stanja za enzim.

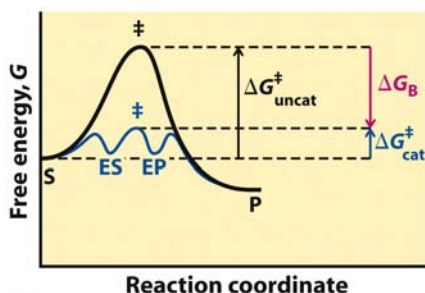


Figure 6-6  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Enzim mora biti komplementaran prijelaznom stanju reakcije, što znači da **do optimalnih interakcija između enzima i supstrata dolazi samo u prijelaznom stanju reakcije.**

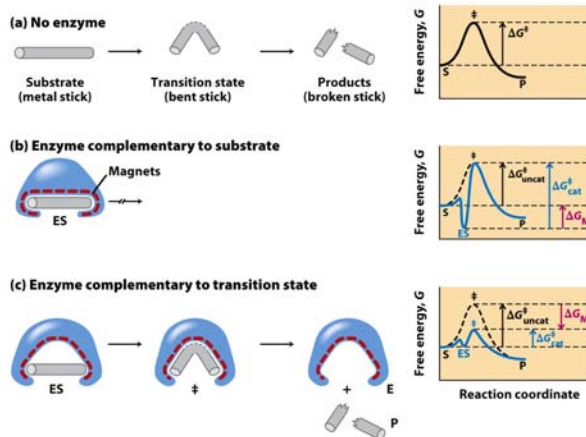


Figure 6-5  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

## Energija vezanja doprinosi specifičnosti reakcije

Ista energija vezanja koja doprinosi ubrzanju reakcije doprinosi i specifičnosti enzim-supstrat reakcije.

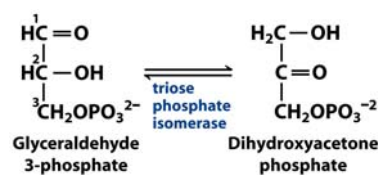
Energija vezanja doprinosi:

1) smanjenju entropije molekule supstrata (smanjuje se sloboda gibanja supstrata u otopini);

2) dolazi do desolvatacije supstrata (interakcijama enzima i supstrata istiskuju se sve molekule vode, te nastaju čvršće nekovalentne veze u specifičnom (hidrofobnijem) mikrokolišu)

3) energija vezanja omogućava da specifične veze nastaju samo u prijelaznom stanju pa ne dolazi do "krivih" promjena na molekuli supstrata (specifičnost prema supstratu).

4) energije vezanja omogućavaju induciranu promjenu u konformaciji enzima.



Uncolored 6.2191  
© 2008 W. H. Freeman and Company

## Analozi prijelaznog stanja dobri su inhibitori

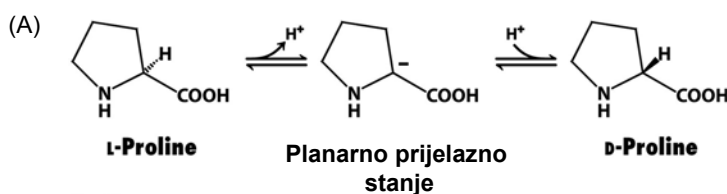
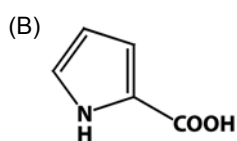


Figure 8-28a  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

(A) Izomerizacija L-prolina u D-prolin, što katalizira prolin racemaza, uključuje planarno prijelazno stanje.



Pirol-2-karboksilat  
(analog prijelaznog stanja)

(B) Pirol-2-karboksilat (planarna molekula) je analog prijelaznog stanja i odličan je inhibitor prolin racemaze.

## Specifične skupine doprinose katalizi reakcije

Katalizu u enzimskim reakcijama potpomažu:

- 1) kiselo-bazna kataliza;
- 2) kovalentna kataliza (prijelazna kovalentna veza između enzima i supstrata);
- 3) Kataliza s ionima metala

Bočni ogranci aminokiselina koji mogu sudjelovati u kiselo-baznoj katalizi

| Amino acid residues | General acid form (proton donor)    | General base form (proton acceptor)             |
|---------------------|-------------------------------------|---|
| Glu, Asp            | R-COOH                              | R-COO <sup>-</sup>                              |
| Lys, Arg            | R-NH <sup>+</sup> H                 | R-NH <sub>2</sub>                               |
| Cys                 | R-SH                                | R-S <sup>-</sup>                                |
| His                 | R-C(=CH)-NH <sup>+</sup> H          | R-C(=CH)-NH                                     |
| Ser                 | R-OH                                | R-O <sup>-</sup>                                |
| Tyr                 | R-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH | R-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O <sup>-</sup> |

Figure 6-9  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company