

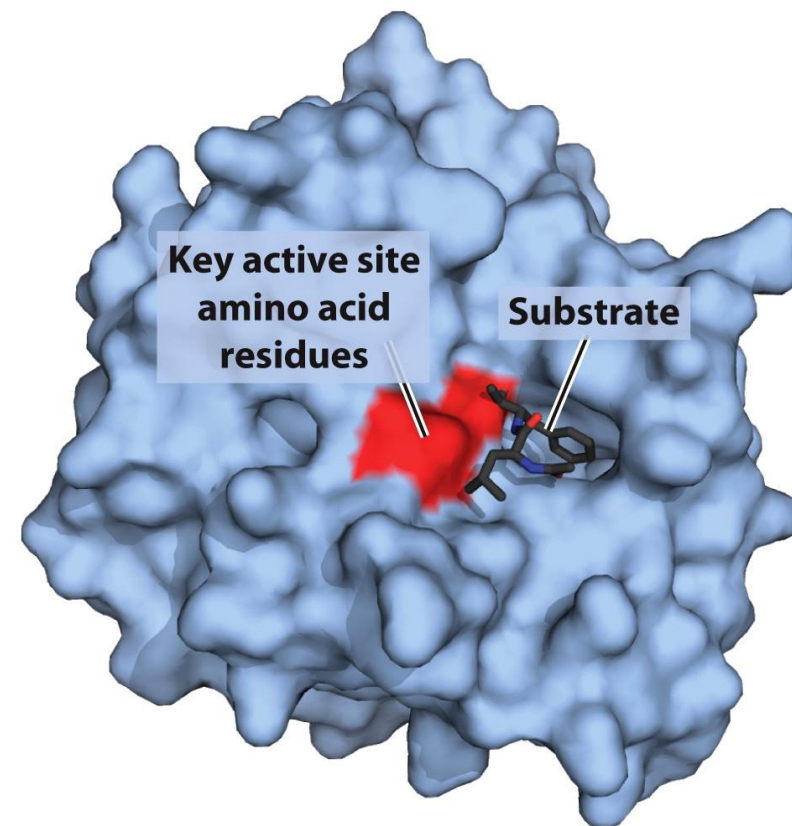


Како дејствуваат ензимите?

ПРОФ. Д-Р НАТАША РИСТОВСКА

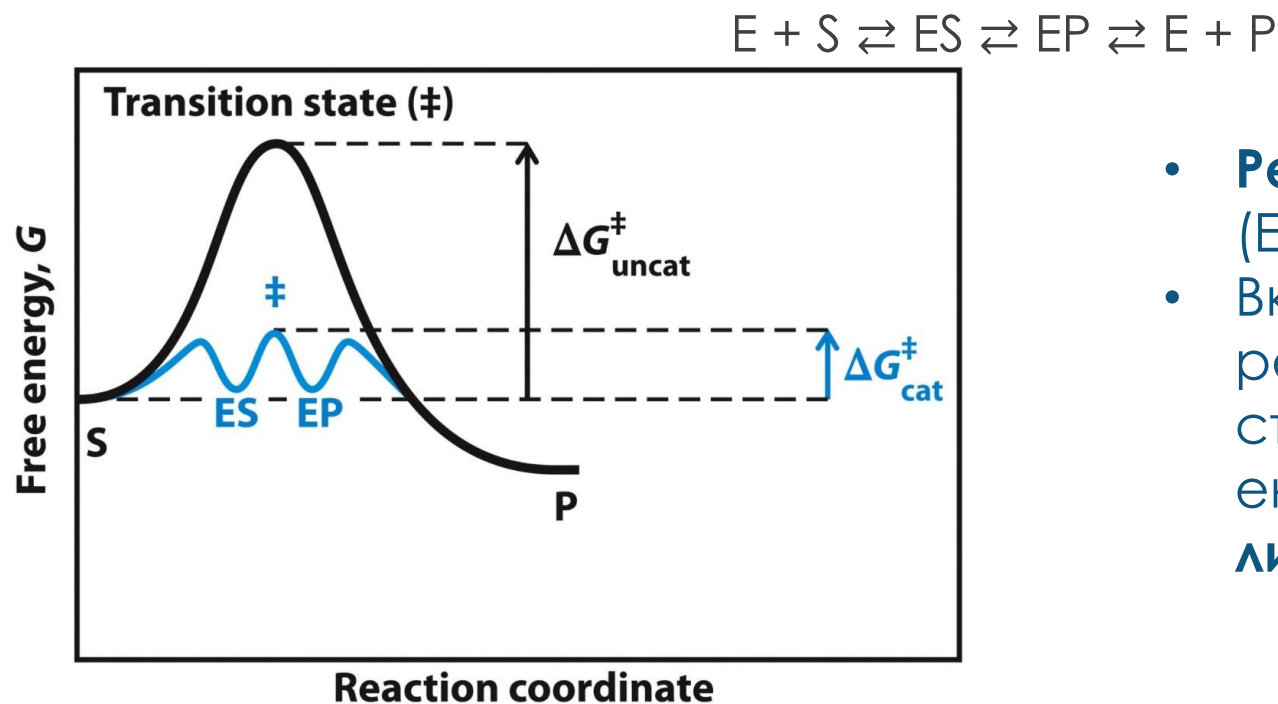
Активен центар на ензимот

- ▶ Ензимски катализираната реакција се одвива во џебот (процеп) на ензимот – **активен центар**.
- ▶ Молекулата сврзана во активниот центар врз која дејствува ензимот е наречена **супстрат**.
- ▶ Супстратот се сврзува за активниот центар на ензимот преку страничните групи на аминокиселинските остатоци.
- ▶ Чарлс Адолф Вурц (1870): ензимо-супстратен комплекс



Ензимите ја забрзуваат реакцијата

- ▶ Ензимите ги забрзуваат реакциите кои во некатализирани биолошки услови се бавни.
- ▶ Причина: Енергијата на активација е пониска кога ензимот ја катализира реакцијата.



- **Реакциони интермедиери** (ES и EP)
- Вкупната брзина на низа реакции е определена од степенот со највисока енергија на активација – **лимитирачки чекор**.

K'_{eq} и $\Delta G'^0$ на ензимски катализирана реакција

- ▶ Ензимите влијаат врз брзината на реакцијата, а не на рамнотежата.
- ▶ Рамнотежата дадена со $S \rightleftharpoons P$ се опишува со **Константа на рамнотежа K'_{eq}**

$$K'_{eq} = [P]/[S]$$

- ▶ Термодинамичката зависност меѓу K'_{eq} и **промената на слободната енергија $\Delta G'^0$** е дадена со изразот:

$$\Delta G'^0 = -2,303 RT \log K'_{eq}.$$

- ▶ Каде R е гасна константа $8,315 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$, T е апсолутна температура 298°K (25°C).

TABLE 6–4 Relationship between K'_{eq} and $\Delta G'^{\circ}$

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 $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\text{eq}}$ (Eqn 6–3).

- ▶ Големата негативна вредност на $\Delta G'^{\circ}$ укажува дека реакцијата ќе се одвива кога односот меѓу продуктите и супстратот е многу поголем од 1.
- ▶ Овој израз не се однесува на брзината на реакцијата.

Брзина на ензимски катализирана реакција

- ▶ **Брзината на реакцијата** е определена со концентрацијата на реактантот и **константата на брзина на реакцијата k** .
- ▶ За $S \rightarrow P$, брзината претставува количество на S што ќе реагира за единица време, изразено:

$$V = k[S]$$

- ▶ Брзината на реакцијата и енергијата на активација, според теоријата за преодна состојба се поврзани со изразот:

$$k = \frac{kT}{h} e^{\frac{-\Delta G'^0}{RT}}$$

- k е Болцманова, а h Планкова константа.
- ▶ Меѓу константата на брзина на реакцијата и енергијата на активација постои обратнопропорционална и експоненцијална зависност.
 - ▶ Помала енергија на активација, поголема брзина на реакцијата.

TABLE 6–5 Some Rate Enhancements
Produced by Enzymes

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucosmutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

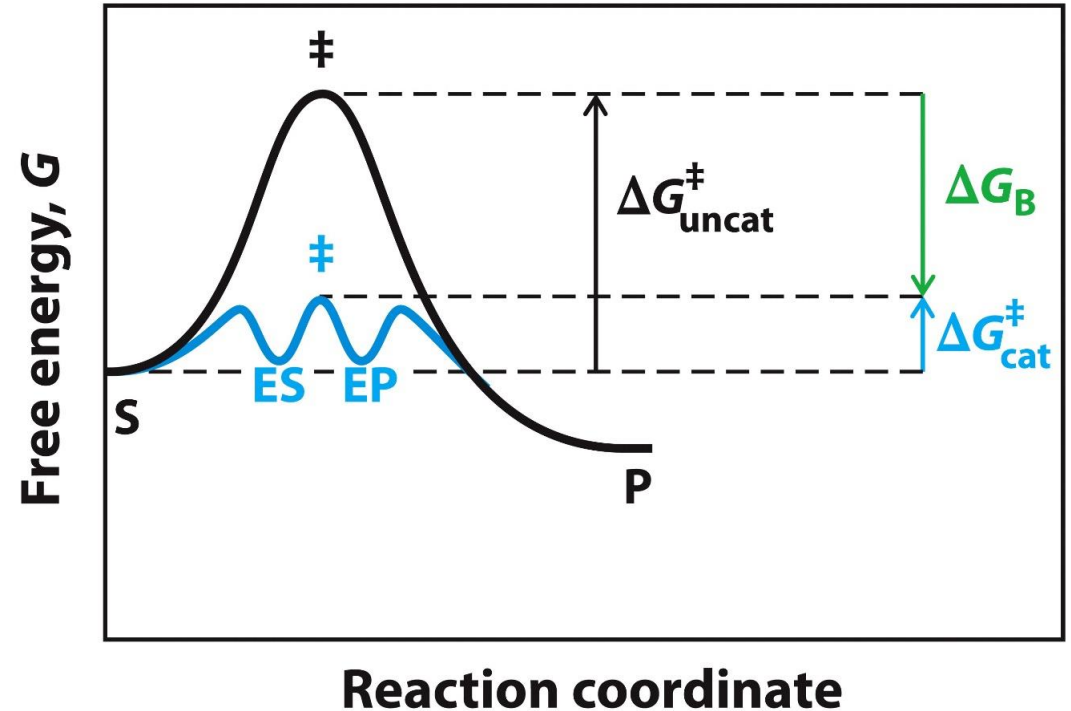
- ▶ Брзината на една хемиска реакција катализирана од ензимите е многу поголема (за неколку реда на величина) од онаа катализирана од неорганските катализатори.
- ▶ **Каталитичка сила** - Ензимите ги забрзуваат хемиските реакции за 5 до 17 реда на величина.

Како функционираат ензимите

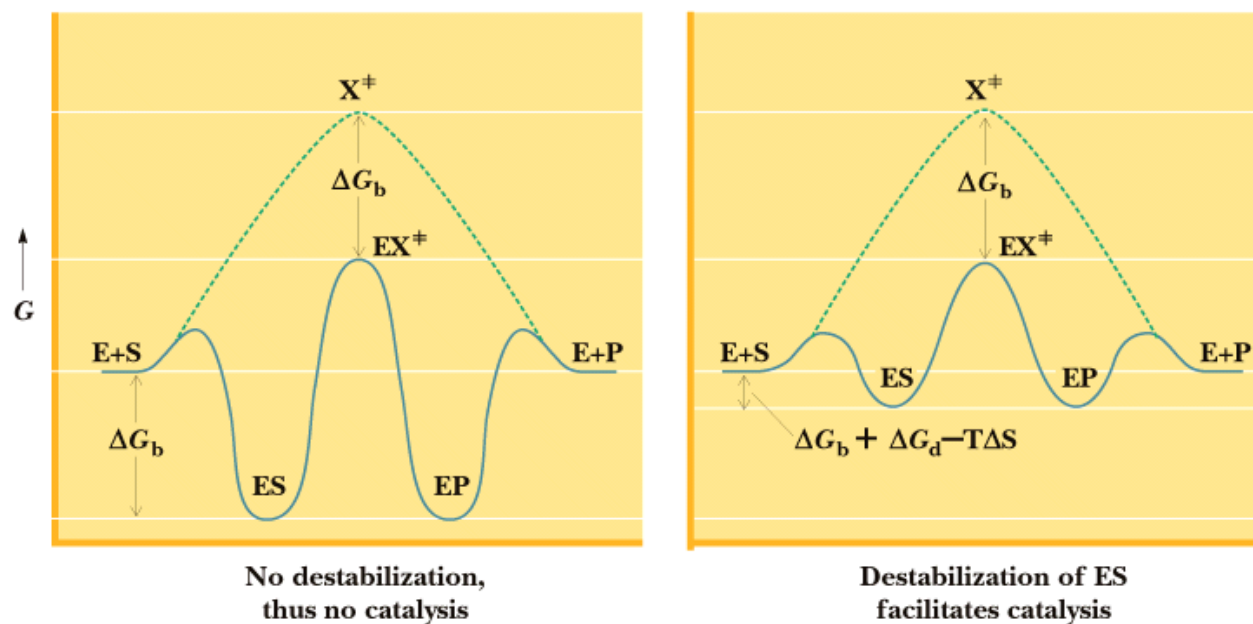
1. При ензимски катализираната реакција доаѓа до **преуредување на ковалентните врски**.
2. Меѓу супстратот и ензимот **постојат и слаби нековалентни интеракции** (јонски и хидрофобни интеракции, водородни врски и сл).
 - ▶ Ковалентните интеракции (преодни и краткотрајни) меѓу ензимот и супстратот во активниот центар ја намалуваат енергијата на активација.
 - ▶ Образувањето на секоја слаба интеракција во ES комплексот е проследено со ослободување на мало количество енергија која ја стабилизира ензим-супстратната интеракција.
 - ▶ Енергијата која се добива од ензим-супстратниот комплекс се нарекува **сврзувачка енергија ΔG_b**

Сврзувачка енергија ΔG_B

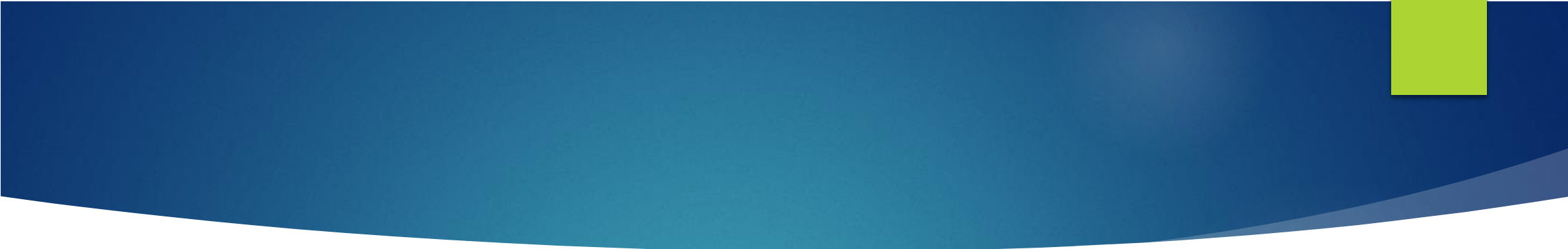
- ▶ Сврзувачка енергија ΔG_B претставува ослободеното количество слободна енергија при образувањето на слабите интеракции во комплексот ES.
- ▶ Само од една слаба интеракција во активниот центар меѓу E и S (ES) се ослободува енергија од 4 до 30 kJ/mol.
- ▶ Вкупната енергија добиена од голем број такви интеракции е доволна за намалување на енергијата на активација за 60 до 100 kJ/mol.



Како сврзувачката енергија придонесува за забрзување на реакцијата

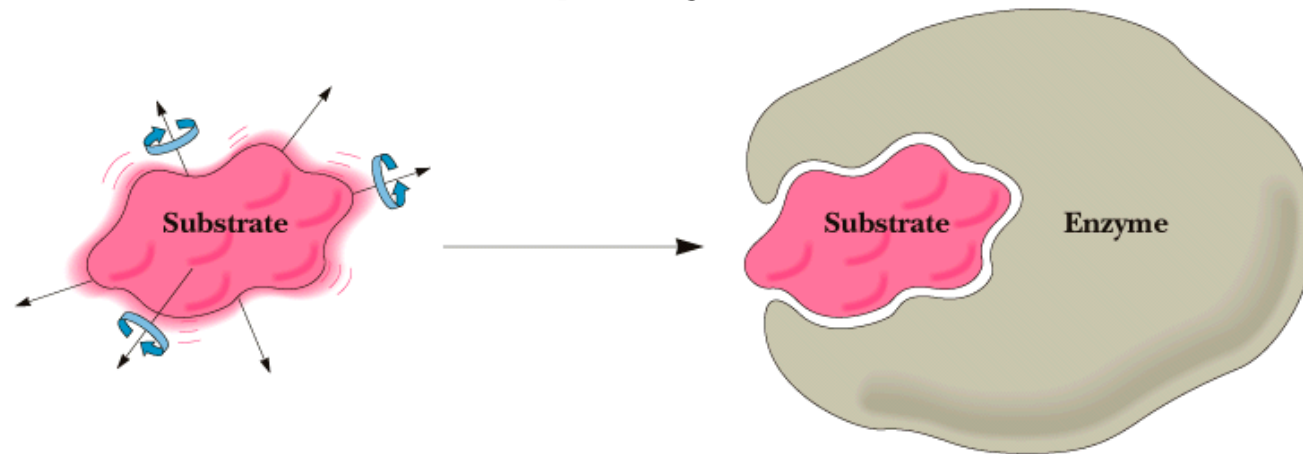


- Сите фактори кои го стабилизираат образувањето на преодниот комплекс $EX^\ddagger$ и влијаат на намалување на енергетската бариера меѓу ES и $EX^\ddagger$ ја забрзуваат реакцијата.
- За дадена енергија на $EX^\ddagger$, зголемувањето на енергијата на ES (негова дестабилизација) ја забрзува реакцијата.

- 
- ▶ Сврзувачката енергија може да се користи за совладување на сите фактори кои имаат удел во $\Delta G^\ddagger$ (бариерата на реакцијата), така што:
 1. ја намалува ентропијата (слобода на движење на молекулите) при образување на ES
 2. го дестабилизира ES со
 - ▶ Десолватација
 - ▶ Деформација, промена на електронската конфигурација на супстратот
 - ▶ Образување на конформациона состојба на ензимот со соодветната ориентација на каталитичките функционални групи

Сврзувачката енергија ја намалува ентропијата

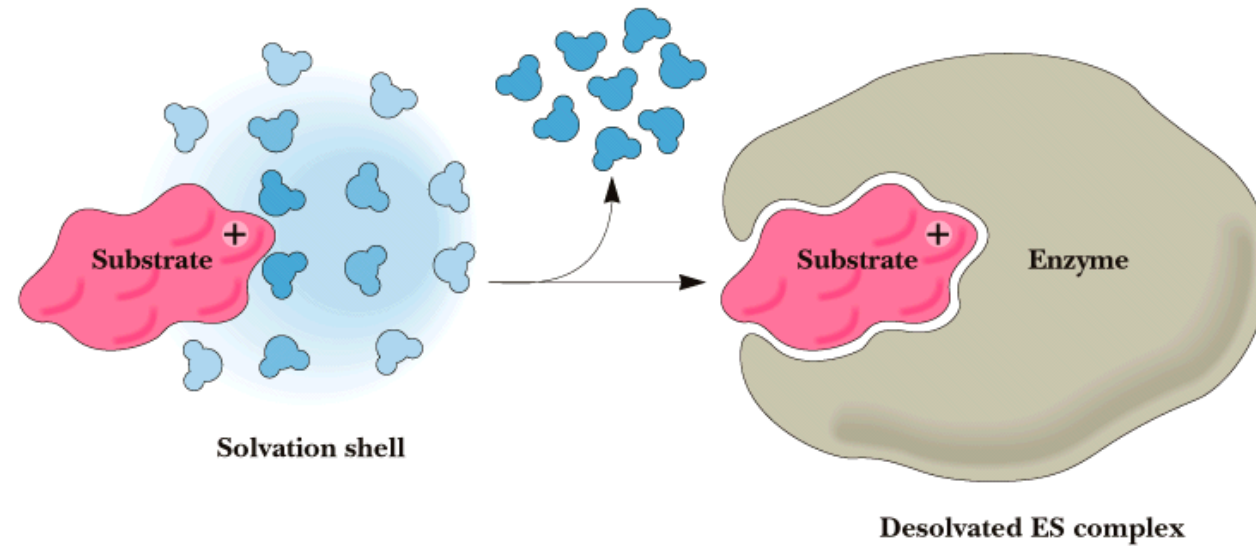
- ▶ Сврзувачката енергија добиена при сврзувањето на супстратот со ензимот овозможува **правилна ориентација на супстратот** за успешен судир со молекулата на ензимот.
- ▶ Реакцијата се забрзува како резултат на **ограниченото движење на супстратот** и ES - **намалена ентропија**.



Substrate (and enzyme) are free to undergo translational motion. A disordered, high-entropy situation

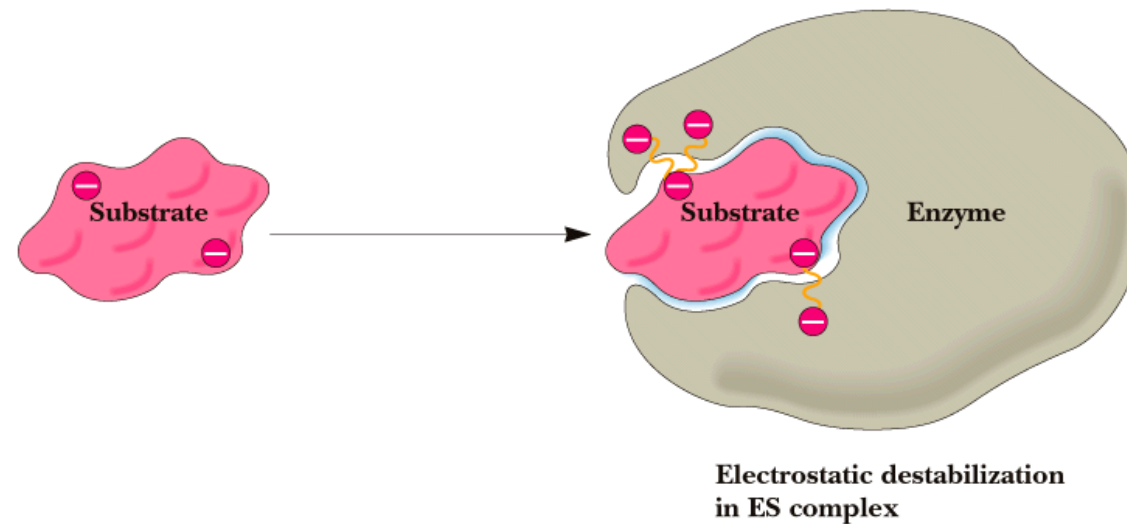
The highly ordered, low-entropy complex

Дестабилизација на ES со десолватација на супстратот



- Образувањето на слаби врски меѓу супстратот и ензимот (сврзувачка енергија) предизвикува десолватација на супстратот.
- Поголемиот дел или сите водородни врски меѓу супстратот и водата се заменуваат со слабите интеракции ензим-супстрат во ES.

Дестабилизација на ES со промена на конфигурацијата на супстратот



- Сврзувачката енергија од слабите интеракции во преодната состојба на реакцијата, термодинамички ја олеснува прераспределбата на електрони потребна за да реагира супстратот.

Дестабилизација на ES со промена на конформацијата на ензимот

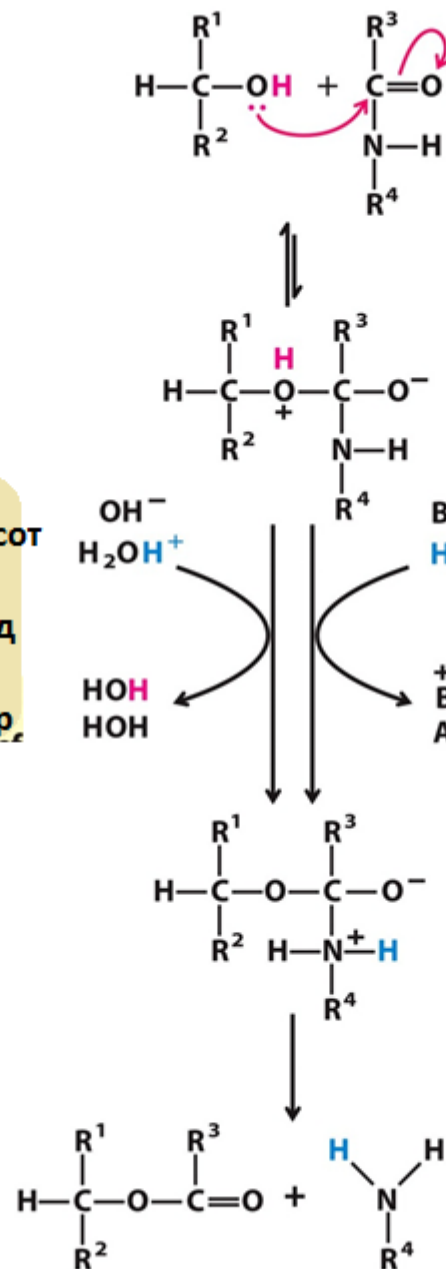
- ▶ Сврзувањето на супстратот со ензимот индуцира промена на конформацијата на ензимот.
- ▶ Даниел Кошланд (1958): **механизам на индуцирано прилагодување** (мрежа од спрегнати движења низ целиот ензим).
- ▶ Промена на конформацијата може да биде:
 - ▶ На мал дел од ензимот близу до активниот центар.
 - ▶ На сите домени.
- ▶ Индуцираното прилагодување овозможува:
 - ▶ **Специфичните функционални групи** на ензимот да се доведат во правилна положба да ја катализираат реакцијата.
 - ▶ Да се образуваат дополнителни слаби врски во преодната состојба.

ТИПОВИ НА КАТАЛИЗА

- ▶ Правилно ориентираните каталитички функционални групи на ензимот го помагаат раскинувањето и образувањето на врските.
- ▶ Механизмот на раскинување и образување на врски подразбира постоење на:
 - ▶ Преодни ковалентни интеракции меѓу ензим и супстрат,
 - ▶ Пренос на група на супстрат,
 - ▶ Пренос на група од супстрат.
- ▶ Типови на катализа:
 - ▶ Општа киселинско-базна катализа
 - ▶ Ковалентна катализа и
 - ▶ Катализа со јони на метал.

Киселинско-базна катализа

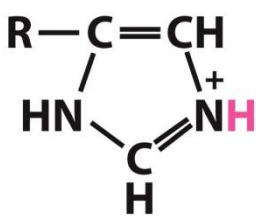
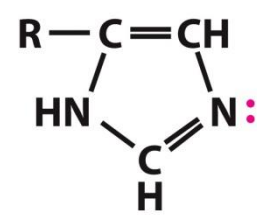
Специфична киселинско-базна катализа, кога преносот на протони меѓу водата и интермедиерот е побрзо од разложувањето на нестабилниот интермедиер.



Во отсуство на катализатор, фаворизирано е разложувањето на нестабилниот интермедиер.

Општа киселинско-базна катализа, кога во преносот на протони учествуваат слаби протон-донори и акцептори

- ▶ Пренос на протони се најчестите биохемиски реакции, катализирани од најголемот дел ензими.
- ▶ Ензимите во активниот центар содржат правилно ориентирани групи од страничните низи на **аминокиселинските остатоци** кои може да дејствуваат како протон донори (HA) или акцептори (B:).

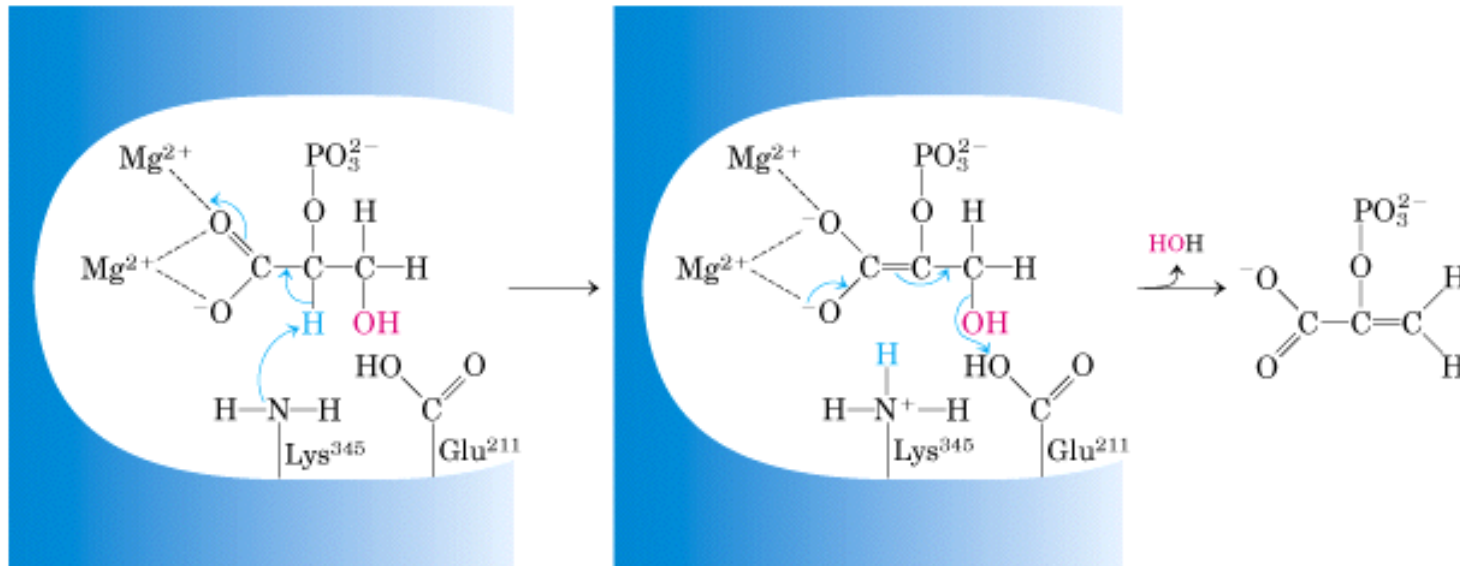
Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_2$	$R-NH_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His		
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr		

Ковалентна катализа

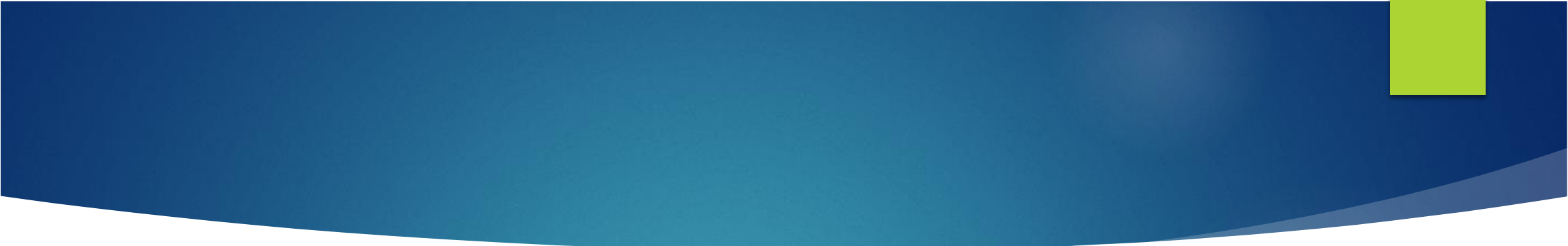
- ▶ Во ковалентната катализа се образува ковалентна врска меѓу супстратот и ензимот.
- ▶ Ковалентен катализатор – ензим со нуклеофилна група X:
 - ▶ Некои странични низи на аминокиселинските остатоци,
 - ▶ Ензимски кофактори
- ▶ Доаѓа до промена на патот на реакцијата, која е катализирана само ако енергијата на активација е пониска од таа во некатализираната реакција.

Катализа со метални јони

- ▶ Металните јони учествуваат во оксидо-редукционите реакции.
- ▶ Катализата со метални јони се одвива на два начини:
 - ▶ Со јони на метали цврсто сврзани во ензимот (кофактор)
 - ▶ Со јони на метали од растворот, сврзани со слаби врски за супстратот.
- ▶ Ензимите може да содржат еден или повеќе метални јони.

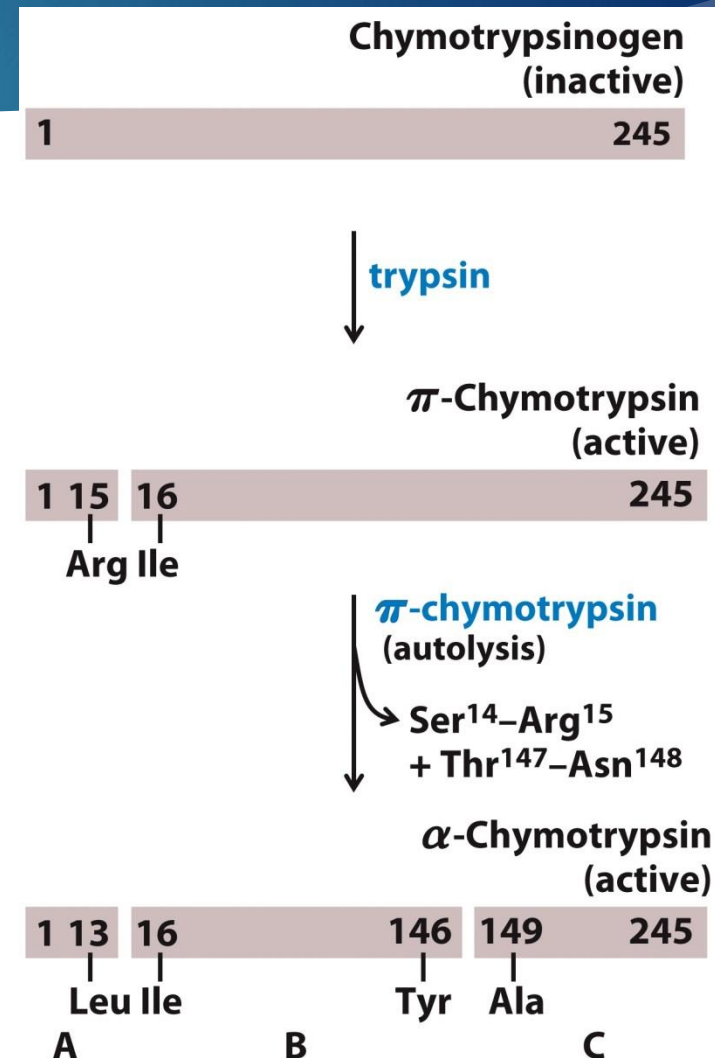


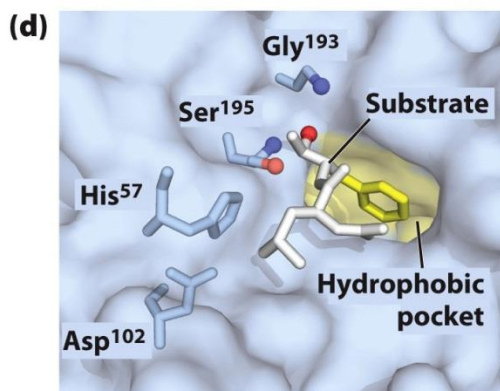
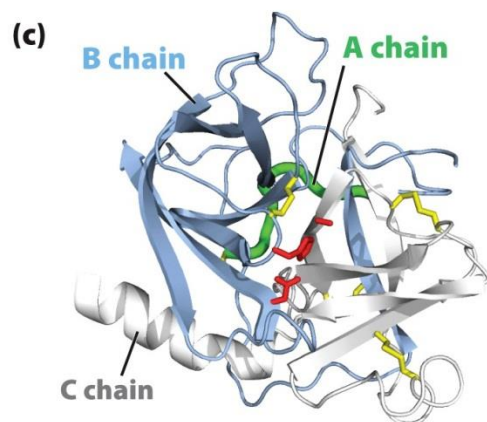
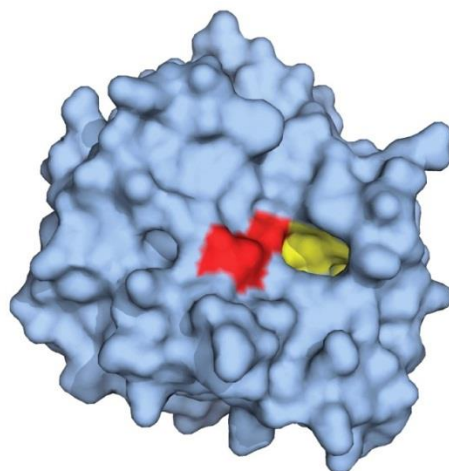
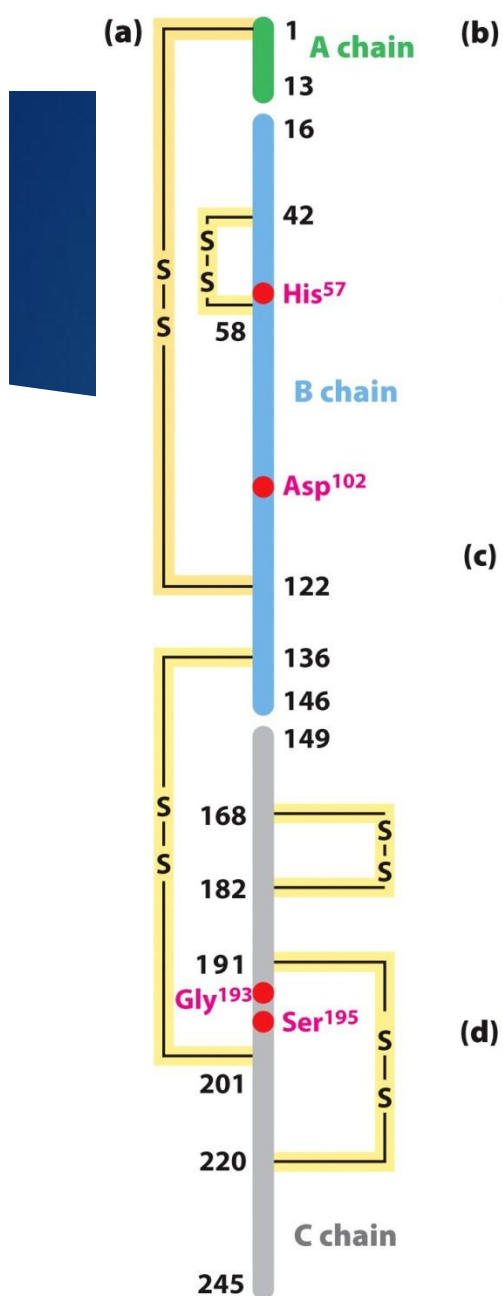
Механизам на ензимското дејство

- 
- ▶ За објаснување на механизмот на ензимско дејство, потребно е познавање на:
 - ▶ Сите супстрати, кофактори, продукти и регулатори.
 - ▶ Редоследот на образување на преодните интермедиери.
 - ▶ Структурата на секој интермедиер и секоја преодна состојба.
 - ▶ Брзината на претворба меѓу интермедиерите
 - ▶ Структурната врска на ензимот со секој интермедиер
 - ▶ Енергетскиот придонес од сите групи кои реагираат и заемодејствуваат во интермедиерните комплекси и преодни состојби.
 - ▶ Кај повеќето ензими за забрзувањето на реакцијата се комбинираат повеќе типови на катализа.

Химотрипсин

- ▶ Се вбројува во **серин протеази**: го катализира хидролитичкото разложување на пептидните врски (фактор 10^9).
- ▶ Специфичен е за пептидните врски од С крајот на ароматичните аминокиселински остатоци (Trp, Phe, Tyr).
- ▶ Химотрипсинот примарно се синтетизира во неактивна форма на **химотрипсиноген** (зимоген) кој се активира со протеолитичко раскинување.

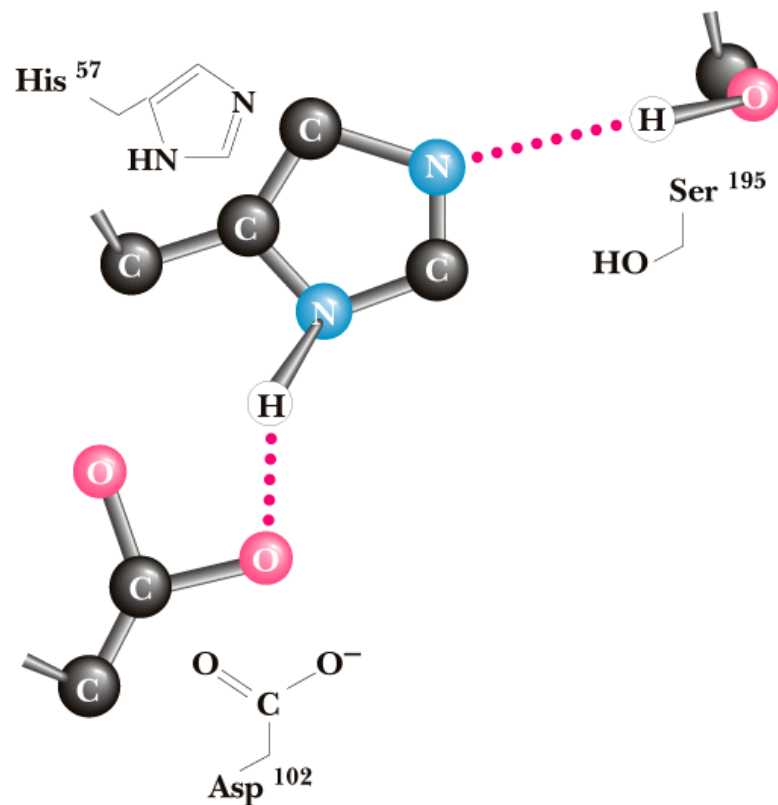




Структура на химотрипсин

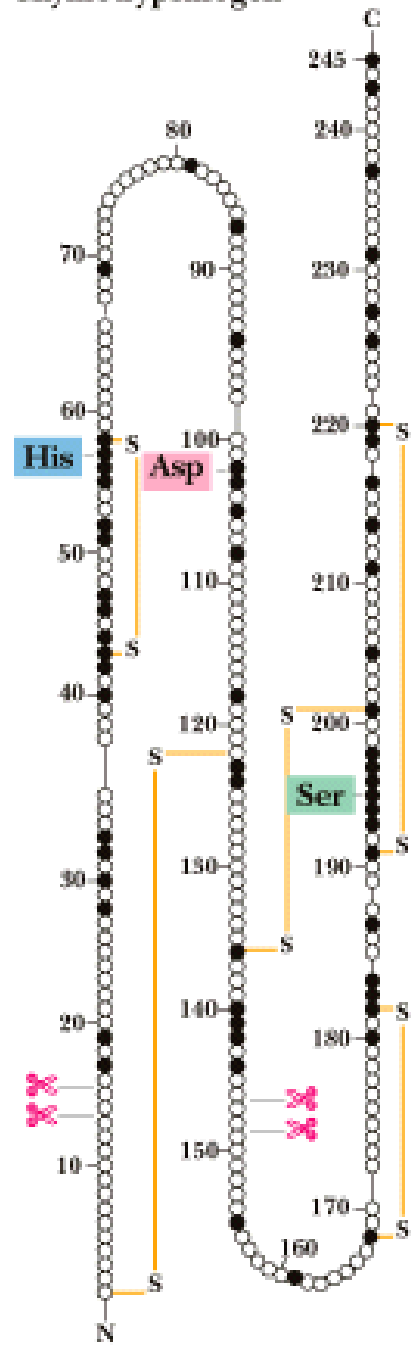
- ▶ Протеинот е составен од три полипептидни низи, поврзани со дисулфидни врски.
- ▶ Најважните аминокиселински остатоци на активниот центар се **Ser¹⁹⁵** (формира ковалентна врска со пептидот), **His⁵⁷** (улога во општата киселинско-базна катализа) и **Asp¹⁰²** (правилно го ориентира His⁵⁷).

Каталитичка тријада

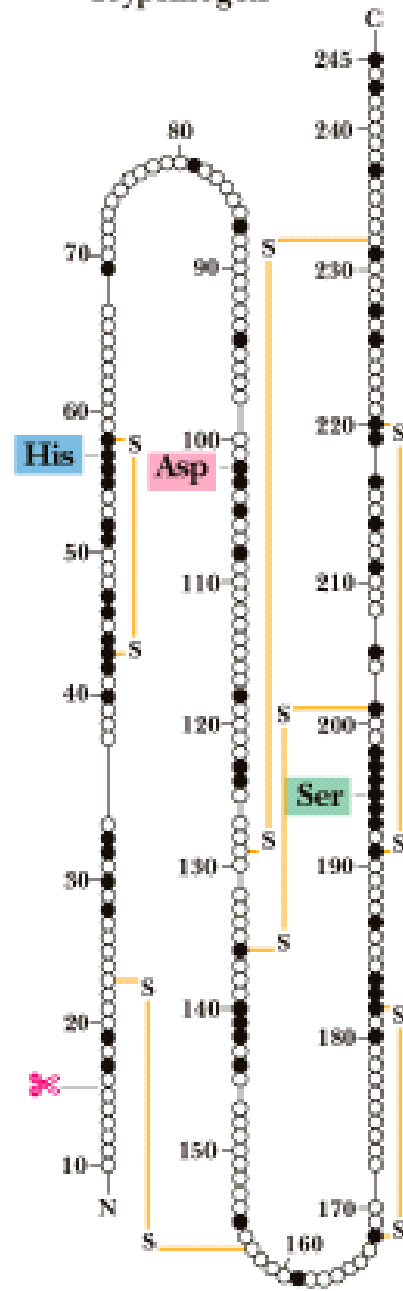


- ▶ Во химотрипсинот, Ser¹⁹⁵ е поврзан со His⁵⁷ и Asp¹⁰² преку мрежа од водородни врски – **каталитичка тријада**.
- ▶ Серин протеазите: трипсин, химотрипсин, еластаза, тромбин, плазмин, се хомолози со различни аминокиселински секвенци, но идентична каталитичка тријада.

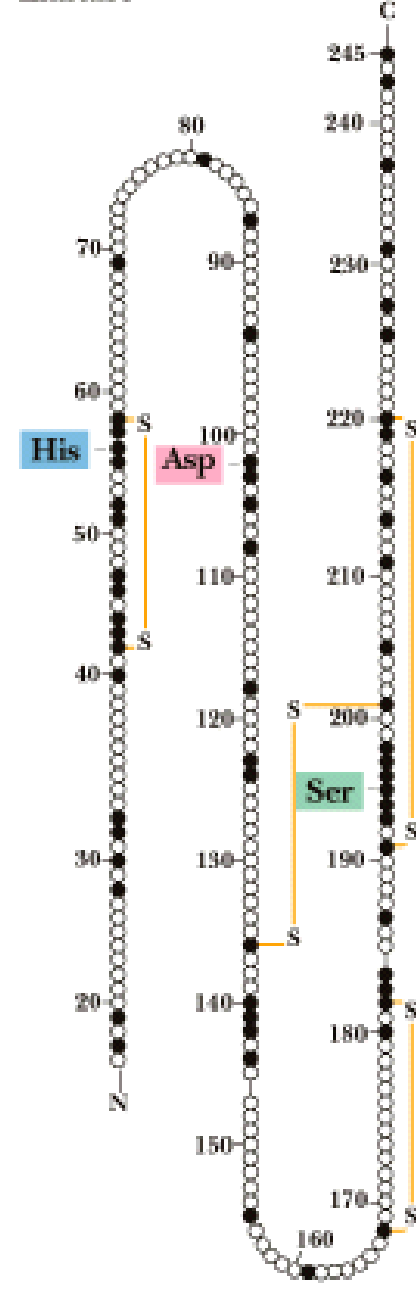
Chymotrypsinogen



Trypsinogen



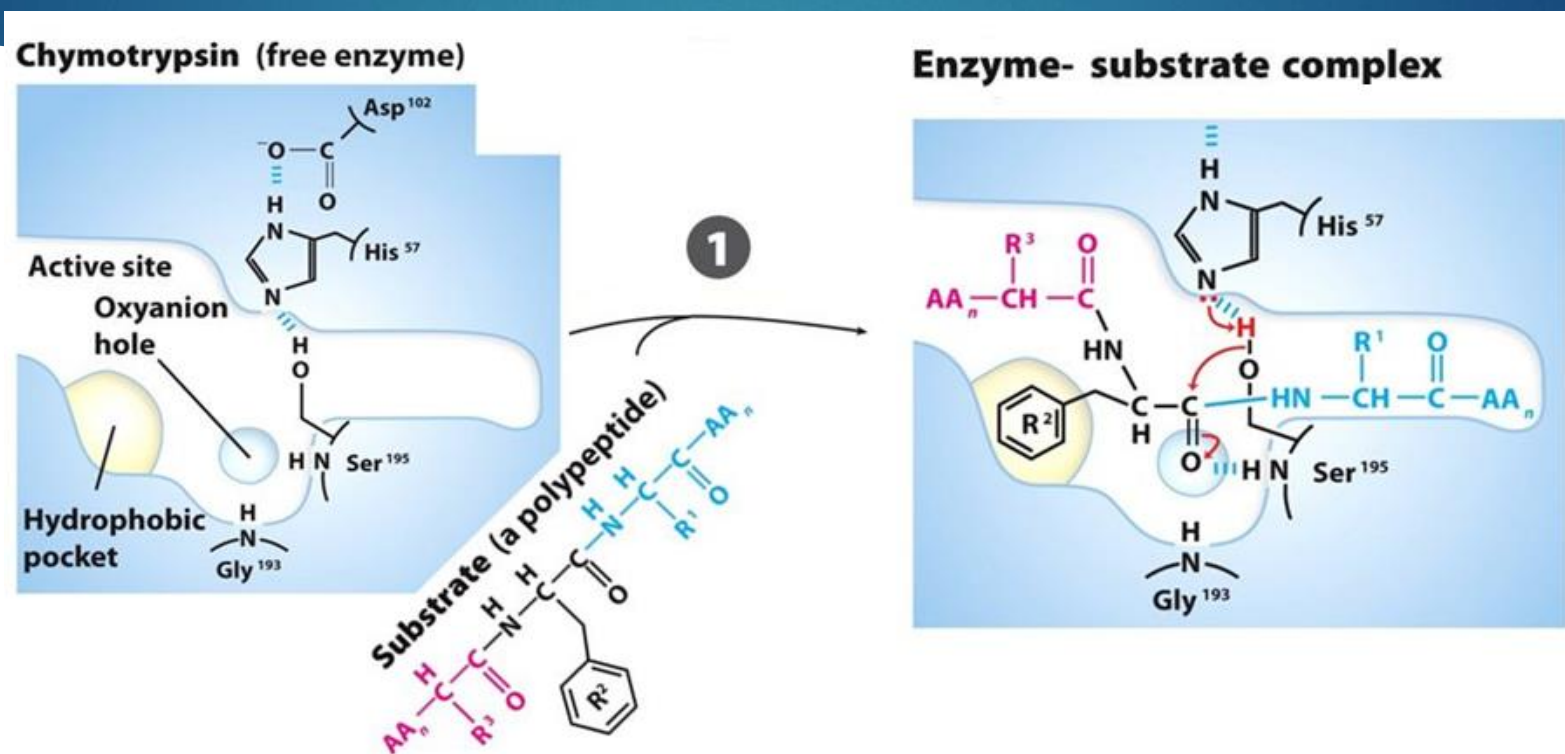
Elastase



Хидролиза на пептидната врска

- ▶ Хидролитичкото раскинување на пептидната врска се одвива во две фази:
- ▶ **Ацилација** (чекори 1-3): формирање на ковалентен интермедиер ацил-ензим (**ковалентна катализа**).
- ▶ **Деацилација** (чекори 4-7): се обновува слободниот ензим (се вклучува молекула вода, пример за **општа киселинско-базна катализа**).

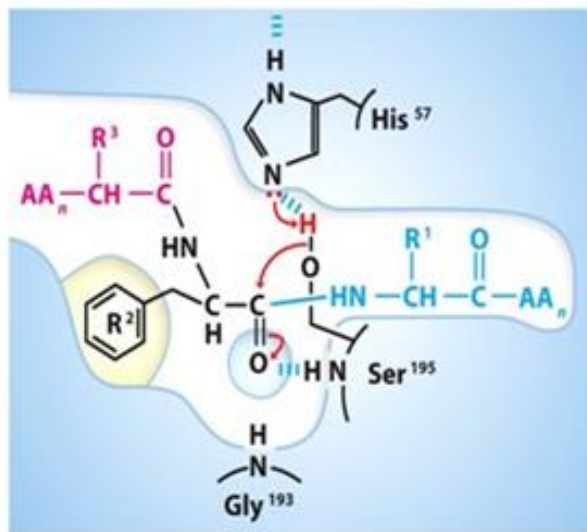
Чекор 1: Образување на ES комплекс



- ▶ Страничната низа (ароматична група) од аминокиселинскиот остаток соседен на пептидната врска што се кине, се сместува во **хидрофобниот џеб**.
- ▶ Пептидната врска е позиционирана за атак.

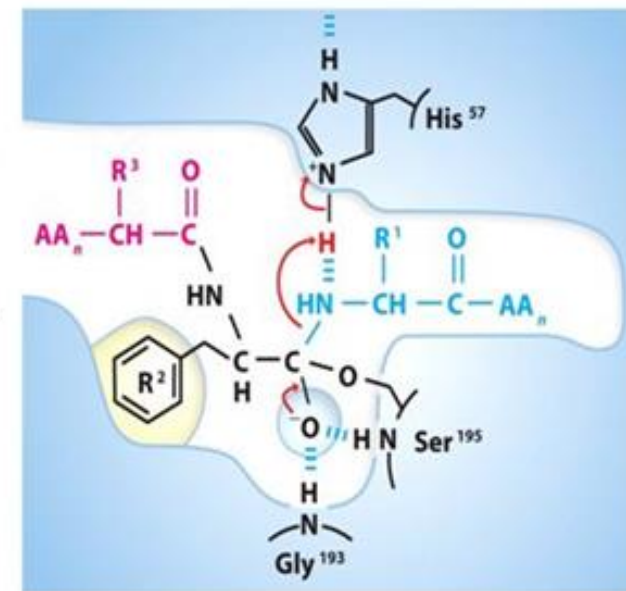
Чекор 2: Нуклеофилен атак

Enzyme- substrate complex



2

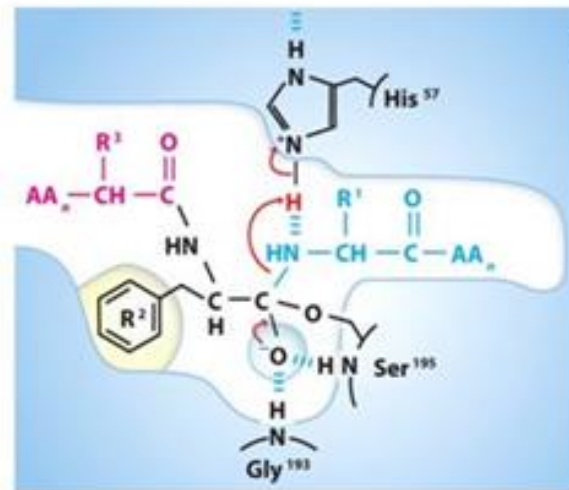
Short-lived intermediate* (acylation)



- ▶ Алкоксидниот јон на Ser¹⁹⁵ врши нуклеофилен атак на карбонилниот С атом од пептидната врска.
- ▶ Добиениот тетраедарски ацил-ензим интермедиер има негативен полнеж на карбонилниот О атом од супстратот, кој се стабилизира преку водородна врска со N-H од Gly¹⁹³ во оксианјонската дупка.

Чекор 3: Раскинување на пептидната врска

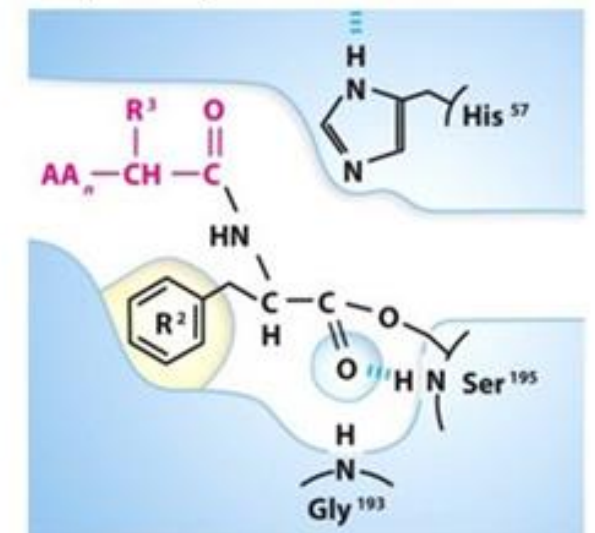
Short-lived intermediate* (acylation)



Product 1



Acyl-enzyme intermediate

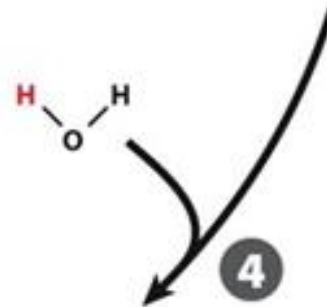
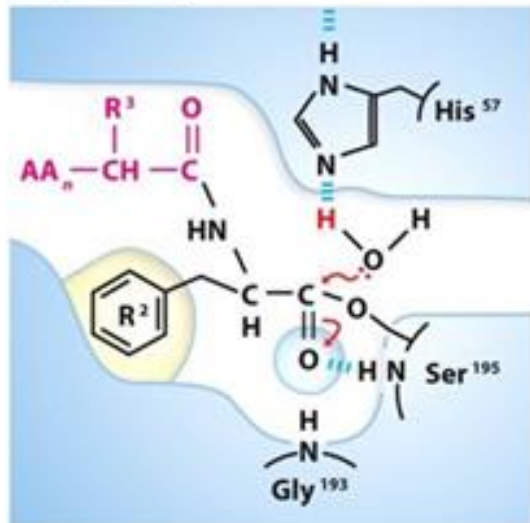


- ▶ Тетраедарскиот интермедиер брзо се распаѓа.
- ▶ Со раскинување на пептидната врска се добива продукт 1 и ацил-ензим интермедиер.
- ▶ Заминувањето на amino групата е олеснето со протонирање од страна на His⁵⁷.

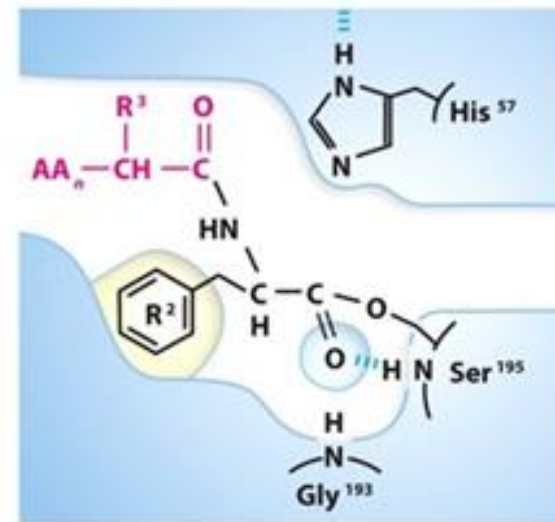
Чекор 4: Општа базна катализа

- ▶ Водата при општа базна катализа се депротонира до OH^- јон (силен нуклеофил).

Acyl-enzyme intermediate



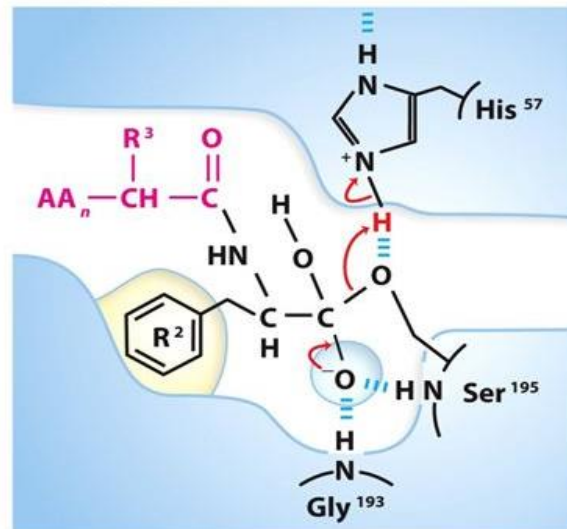
Acyl-enzyme intermediate



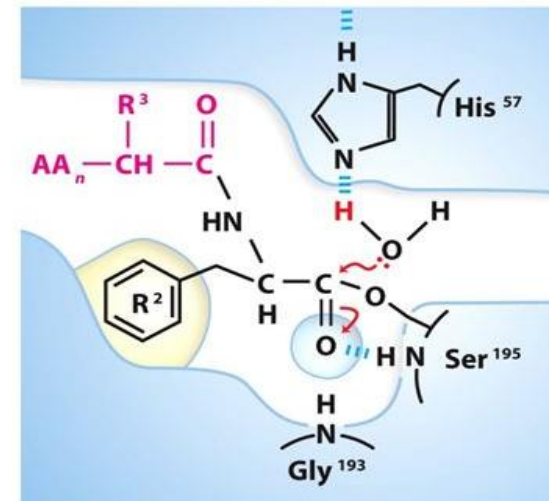
Чекор 5: Нуклеофилен напад од OH^-

- ▶ Хидроксидниот јон врши нуклеофилен напад на карбонилниот С атом од естерската врска на ацил-ензим интермедиерот (деацилација).
- ▶ Се образува краткотраен тетраедарски интермедиер, каде карбонилниот О со негативен полнеж повторно се стабилизира во оксианјонската дупка.

Short-lived intermediate *
(deacylation)



Acyl-enzyme intermediate

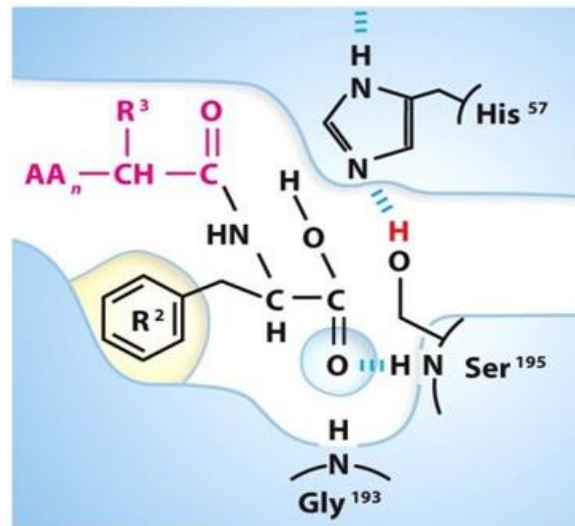


5

Чекор 6: Раскинување на ковалентната врска од ES

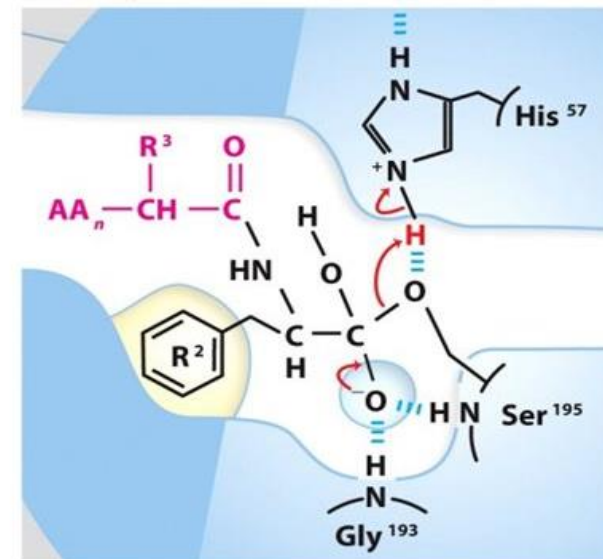
- ▶ Тетраедарскиот интермедиер брзо се распаѓа.
- ▶ Се образува комплекс на ензимот со продуктот 2 EP.

Enzyme-product 2 complex



6

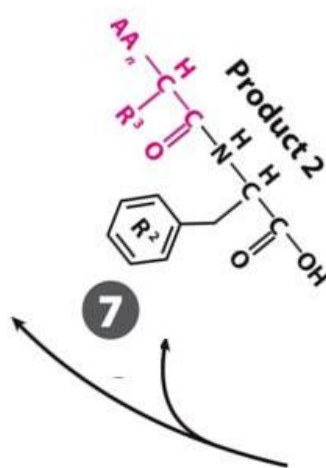
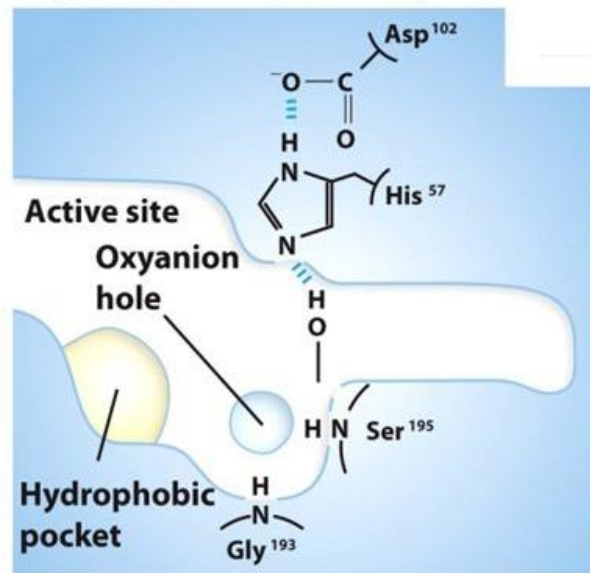
Short-lived intermediate* (deacylation)



Чекор 7: Дисоцијација на продуктот

- Со дифузија на вториот продукт од активниот центар, се обновува ензимот.

Chymotrypsin (free enzyme)



Enzyme-product 2 complex

