



# ENZIMI



**2018**

- 
- **Enzimi** su biološki aktivni proteini koji katalitički ubrzavaju hemijske procese u živom organizmu
  - Sinteza u ćelijama → funkcija u ćelijama
  - Sekretiraju se u neaktivnom obliku (proteaze i druge hidrolaze, enzimi koagulacije i fibrinolize), poslije aktivacije svoju funkciju obavljaju u **ekstracelularnoj tečnosti**
-

- 
- Brzina reakcije se povećava  $10^6$ - $10^{12}$  puta
  - Enzimski katalizovane reakcije –  $T < 100$  °C,  $\text{pH} \approx 7.0$
  - Specifičnosti enzima u odnosu na supstrate i proizvode reakcije
  - Katalitička aktivnost mnogih enzima se mijenja kao odgovor na koncentracije supstanci koje nijesu njihovi supstrati.

Regulacija enzimske aktivnosti: alosterna kontrola, kovalentna modifikacija i promjena količine sintetizovanog enzima.

---

---

# SPECIFIČNOST ENZIMA ZA SUPSTRAT

- ✓ **APSOLUTNA**- enzim reaguje samo sa jednim određenim supstratom (fosfoenolpiruvat → piruvat; katalaza – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - ✓ **GRUPNA** – enzim djeluje na jedinjenja koja imaju sličnu hemijsku strukturu (fosfataze, lipaze, pepsin)
  - ✓ **STEREOHEMIJSKA** - enzim djeluje na određeni tip stereoizomernih org. jedinjenja
-

---

# Struktura enzima

- *Apoenzim* – proteinski dio enzimskog molekula
  - *Kofaktori* – mali organski ili neorganski molekuli
  - *Prostetična grupa* – slična kofaktoru, vezana na apoenzim
  - *Holoenzim* – apoenzim + koenzim (prost.grupa)
  - *Supstrati* – molekuli na koje enzimi djeluju
  - *Proizvodi* – molekuli koji nastaju u enzimski katalizovanoj reakciji
  - *Mjesto za vezivanje supstrata* – poseban region na površini enzima koji određuje specifičnost enzima u pogledu supstrata
  - *Aktivni centar* – posebno uređene hemijske grupe koje učestvuju u katalizovanju hemijske reakcije
  - *Alosterni centar* – mjesto na kome se vezuju mali molekuli
-

# Organizacija enzima na ćelijskom nivou

**Prema mjestu djelovanja enzimi se dijele na:**

- **Intracelularne – multienzimski sistemi i multienzimski kompleksi**
- **Ekstracelularne**



**Piruvat dehidrogenazni kompleks – multienzimski kompleks u mitohondrijama, zadužen za:**



**Dezmoenzimi** - enzimi čvrsto vezani za ćelijske strukture (E respiratornog lanca na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani).

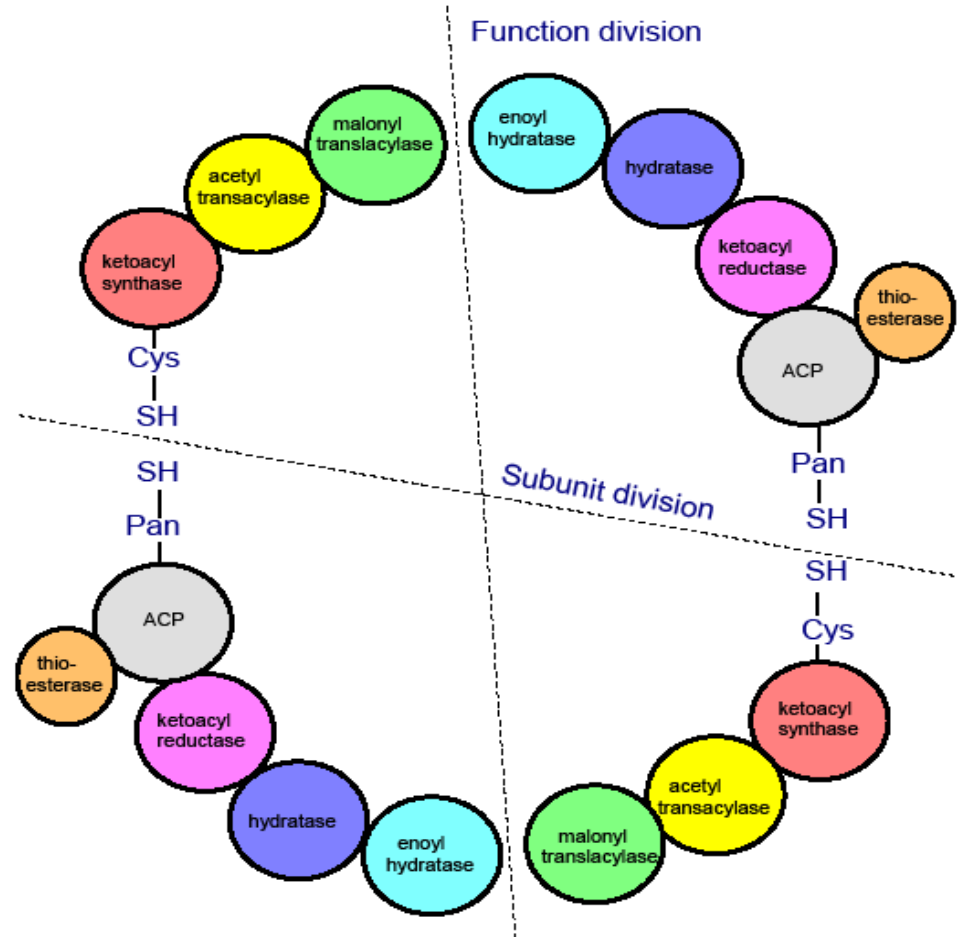
# Enzim – sintaza masnih kiselina

## Dimer

- svaki monomer 7 **domena** sa različitim enzimima
- VIII domen vezuje ACP

## Značaj organizacije ic. E

- Reakcije se brže odvijaju
- Minimalan uticaj vanj. faktora na reakciju
- Regulacija ovih enzima je jednostavnija

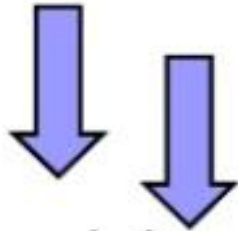


# Klasifikacija enzima

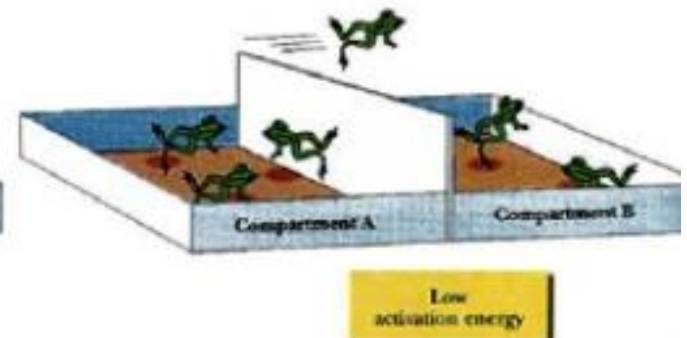
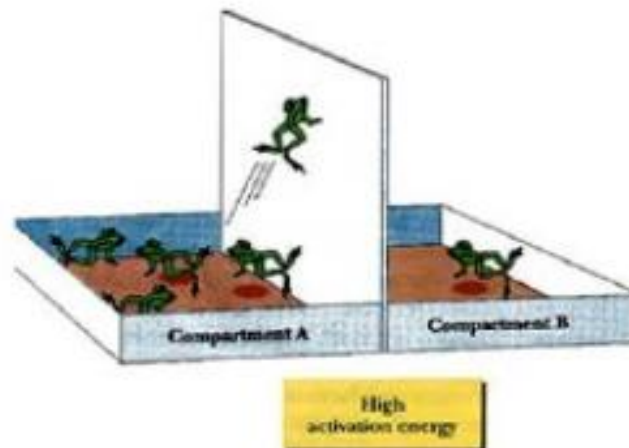
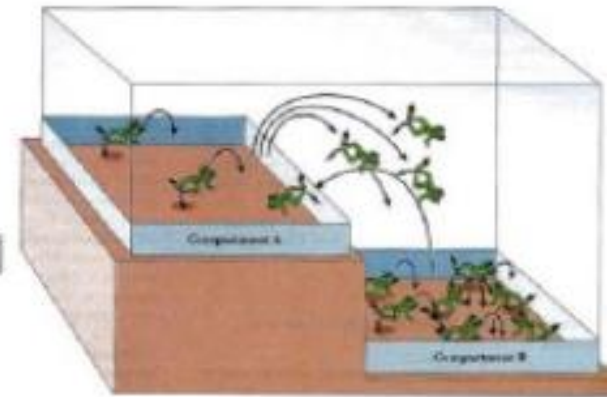
1. **Oksidoreduktaze** – oksido-redukcije (dehidrogenaze, oksidaze, oksigenaze, reduktaze, peroksidaze, katalaze i hidroksilaze)
2. **Transferaze** – prenošenje grupa (aminotransferaze, aciltransferaze, fosforiltransferaze...)
3. **Hidrolaze** – hidroliza- raskidanje veze uz adiciju vode (esteraze, glikozidaze, fosfataze, amidaze...)
4. **Lijaze** – uklanjanje ili dodavanje grupa, pri čemu nastaju ili se uklanjaju dvostruke veze (dekarboksilaze, aldolaze, hidrataze, sintaze)
5. **Izomeraze** – intramolekulska preuređivanja (racemaze, epimeraze, izomeraze, mutaze)
6. **Ligaze** – formiranje veza između dva molekula supstrata (sintetaze i karboksilaze)



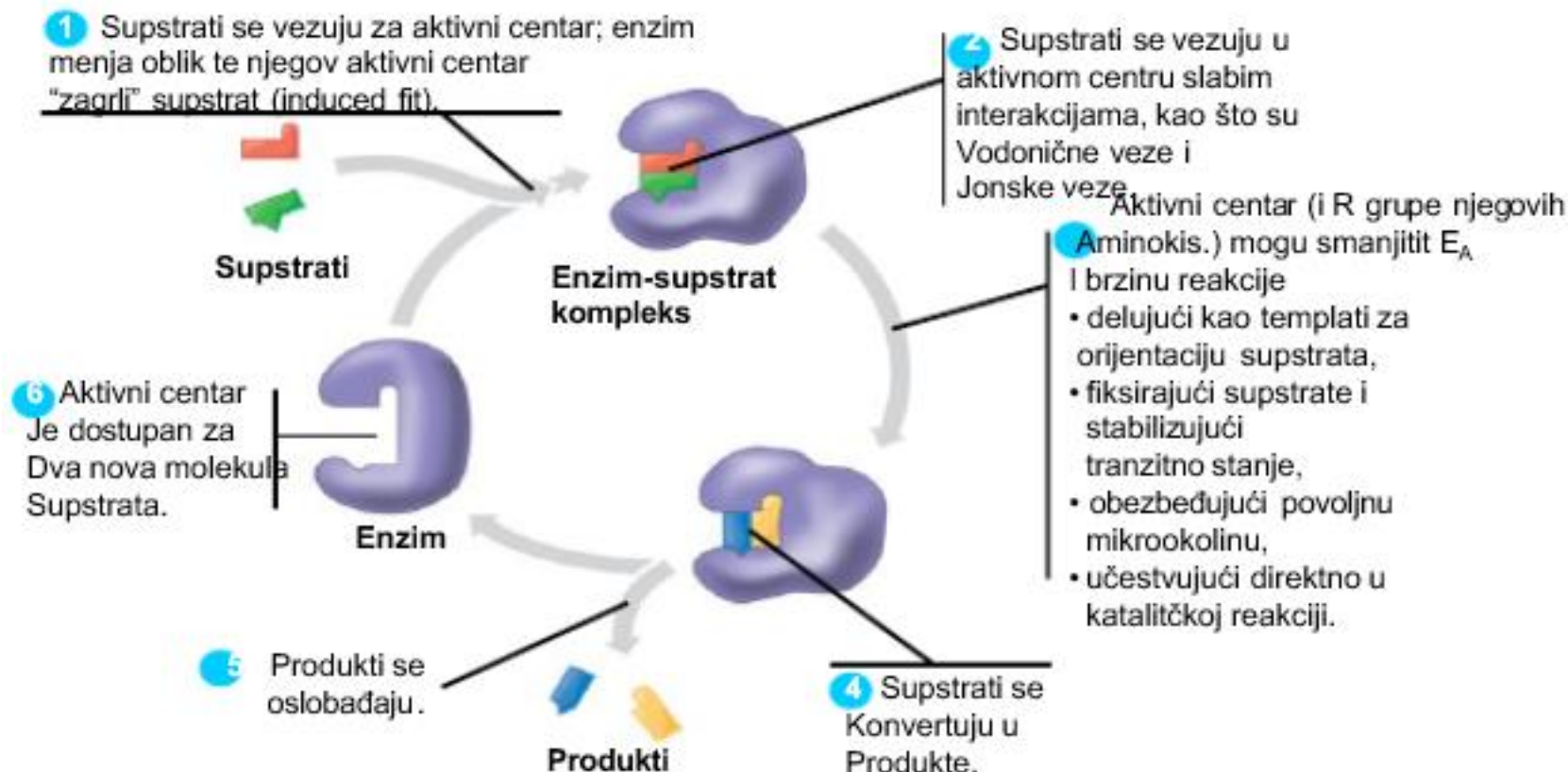
# MEHANIZAM ENZIMSKE KATALIZE



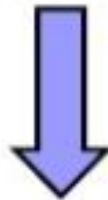
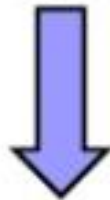
- smanjuju energiju aktivacije
- zaobilaze energetske barijere



## •Katalitički ciklus enzima



# SPECIFIČNOST DELOVANJA ENZIMA



- ❖ Specifičnost prema supstratu
- ❖ Specifičnost prema tipu hemijske reakcije

Obe vrste specifičnosti određuje apoenzim

---

# Izražavanje aktivnosti enzima

- IJ  mol/min/l

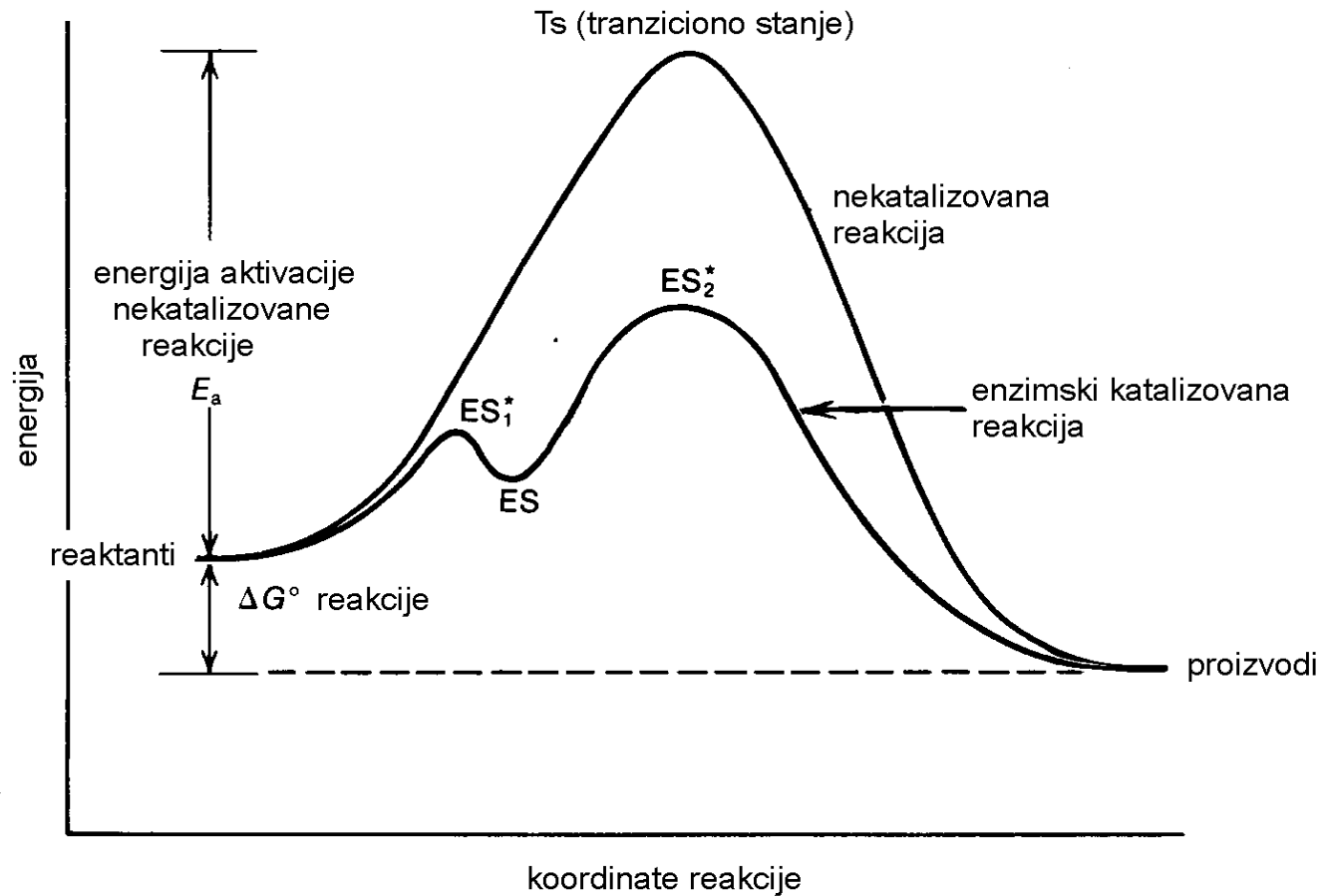
- Katal mol/s

- Specifična aktivnost IJ/mg prot ili  
Kat/mg prot

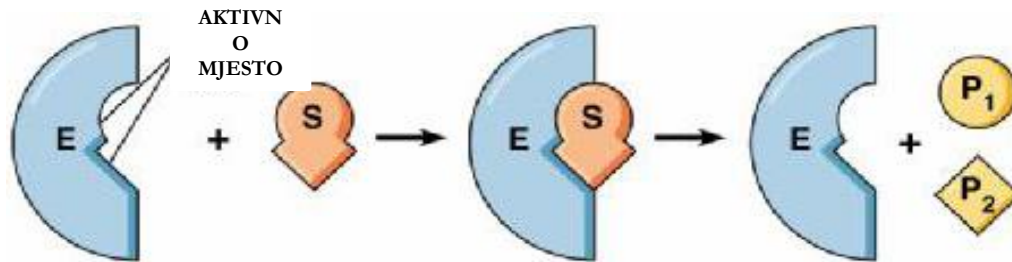
Molarna aktivnost Katal/mol enzima

---

# Enzimski katalizovana i nekatalizovana reakcija

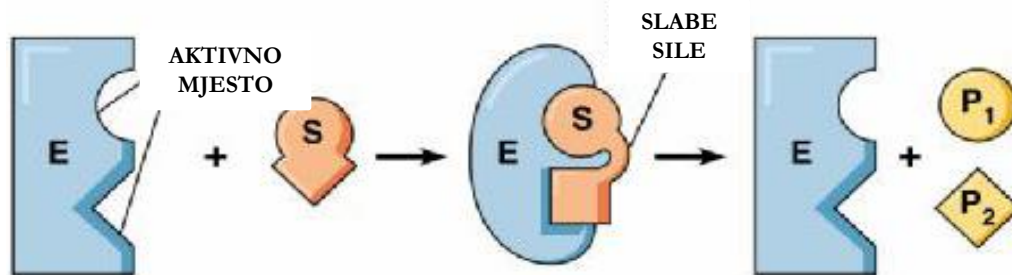


# ENZIMI



*Model ključ-brava (1894, Fischer)*

**MODEL KLJUČ- BRAVA**



*Model indukovanog prilagođavanja (1958, Koshland)*

**MODEL INDUKOVANOG PRILAGOĐAVANJA**

# FAKTORI KOJI UTIČU NA AKTIVNOST ENZIMA

- ❑ Aktivnost enzima označava količinu supstrata koja se u jedinici vremena pod uticajem molekula enzima transformiše u produkt reakcije (pod optimalnim uslovima).
- ❑ Vremenski interval u kome se jedna  $\frac{1}{2}$  od inicijalno prisutnih molekula enzima razgradi jeste **BIOLOŠKO POLUVRIJEME** ili **POLUŽIVOT** ( $t_{1/2}$ ) enzima; zavisi od hemijske strukture i biološke prirode enzima.

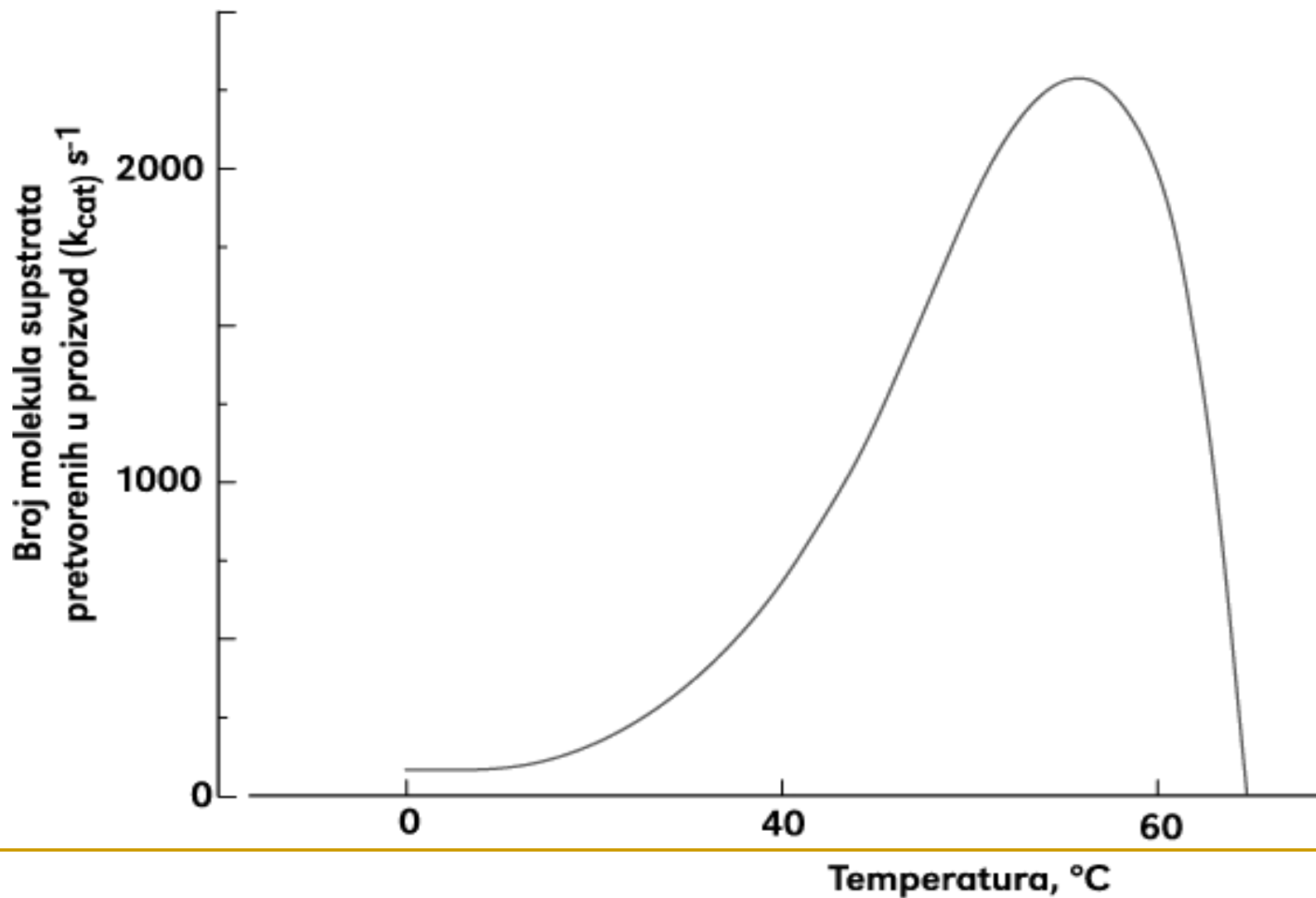
- ✓ *Teperatura*
- ✓ *pH*
- ✓ *Količina (koncentracija) supstrata*
- ✓ *Količina (koncentracija) enzima*
- ✓ *Aktivatori i inhibitori*

# UTICAJ TEMPERATURE

- ✓ Sa stanovišta živih sistema – pogotovu homeotermnih organizama – **povećanje temperature je neprimjenljiva strategija u ubrzavanju hemijskih reakcija, jer ćelije funkcionišu u uskom opsegu temperatura.**
- ✓ Osnovni **razlog za netolerantnost ćelija prema visokim temperaturama jeste, zato što visoke temperature narušavaju sekundarnu, tercijernu i kvaternu strukturu proteina, pa time i njihovu funkciju.** (Izuzetak od ovog pravila čine termofilne bakterije koje žive u okolini podvodnih vulkanskih izvora i tolerišu – zahtevaju – temperature 80°C - 100°C, i ribonukleaza - 100°C nekoliko minuta).

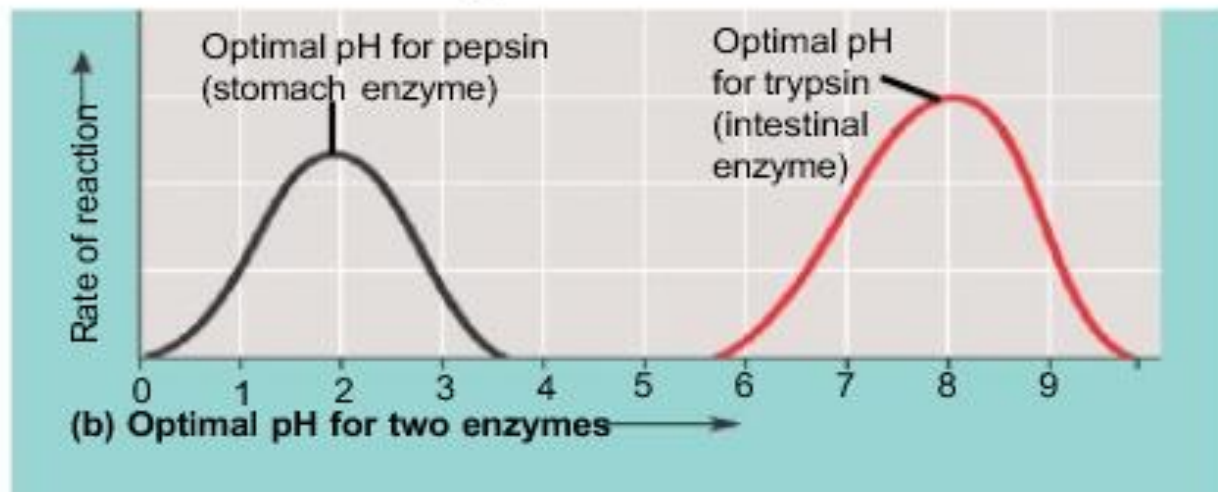
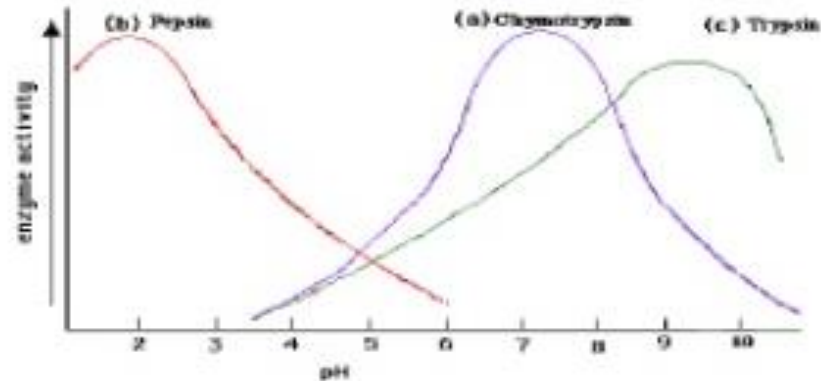


# UTICAJ TEMPERATURE



- Aktivnost enzima na niskim temperaturama postepeno opada – **REVERZIBILAN PROCES**.
- Aktivnost enzima kod povećanja temperaturama postepeno raste do određene temperaturne granice kada se gasi enzimska aktivnost – **IREVERZIBILAN PROCES**.
- U temperaturnom opsegu od  $10^{\circ}$  -  $40^{\circ}$ , za svako povećanje temperature za  $10^{\circ}$  dolazi do **povećanja** enzimске aktivnosti za 1.5-2 puta.
- **Termostabilni enzimi:** ribonukleaza, AF iz placente, LDH1 iz miokarda, arginaza
- **Termolabilni enzimi:** glutamat dehidrogenaza, AF iz kostiju i LDH5 iz skeletnih mišića.

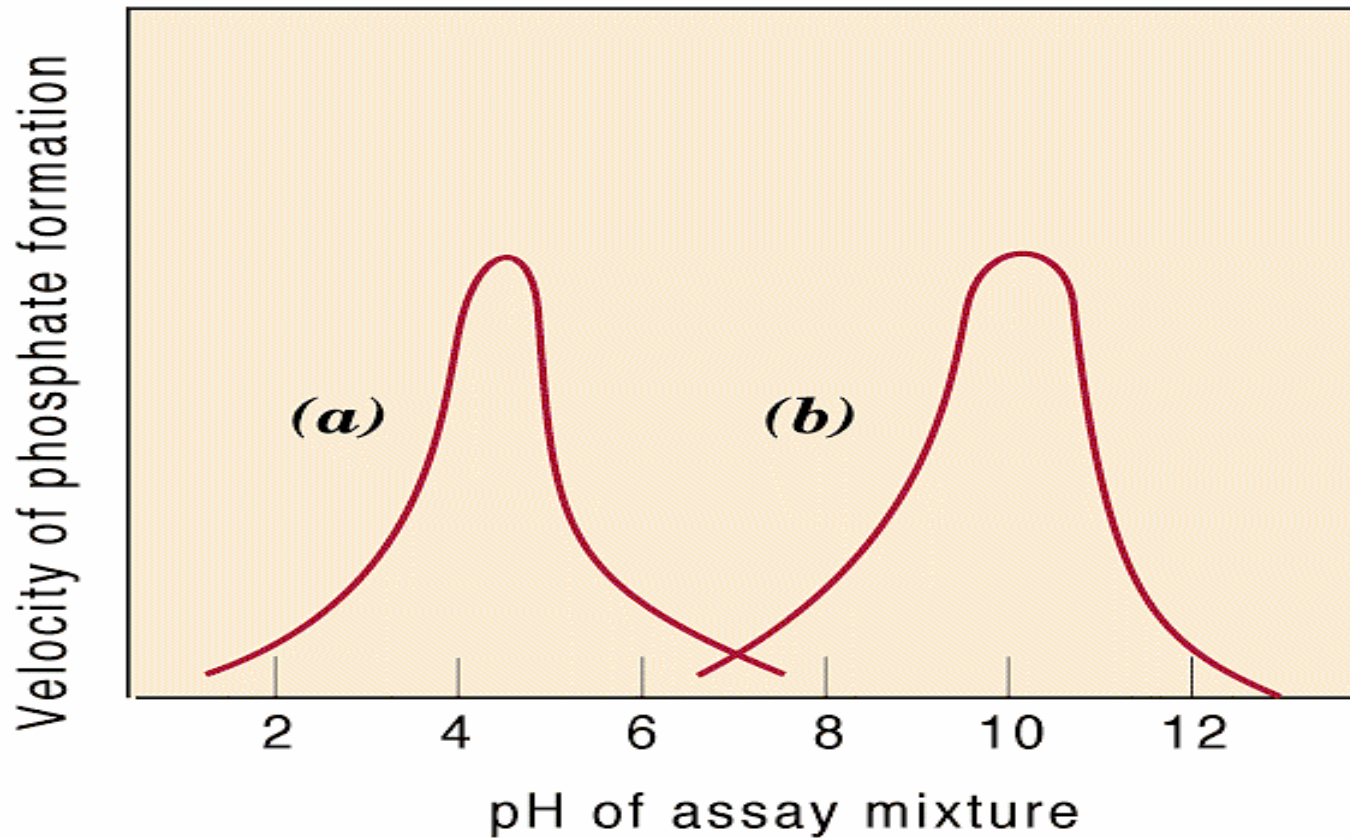
# *Svaki enzim ima optimalni pH*



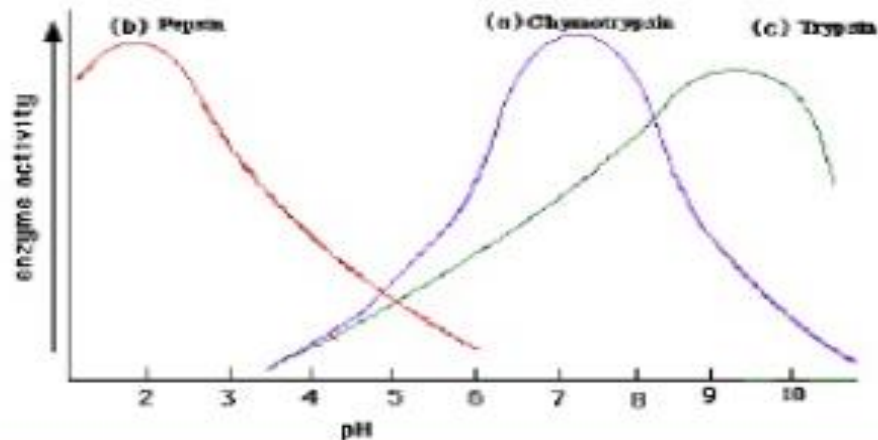
# Uticaaj pH vrednosti

- *Enzimi su aktivni u uskom intervalu vrednosti pH a izvan tog intervala se naglo smanjuje njihova katalitička aktivnost.*
- *Za najveći broj enzima, optimalna pH vrednost se nalazi u intervalu od 4-8.*
- *Kako su enzimi polielektroliti, pH utiče na aktivnost enzima time što:*
  - *direktno utiče na **stepen jonizacije bočnih grupa amino kiselina** (koje ulaze u strukturu AC enzima);*
  - ***stepen jonizacije funkcionalne grupe supstrata i***
  - ***održavanju tercijarne strukture enzima.***
- ***Optimalni pH** je ona vrijednost ove konstante pri kojoj molekuli enzima imaju onu jonsku formu koja je najadekvatnija za kontakt supstrata sa aktivnim centrom enzima.*

*pH zavisnost kisele (a)  
i alkalne (b) fosfataze*



# Uticaj pH NA AKTIVNOST ENZIMA



Pepsin—PH (1,5-2)

Tripsin pH (7,5- 9,9)

Amilaza – PH 8

Kisela fosfataza - PH 5

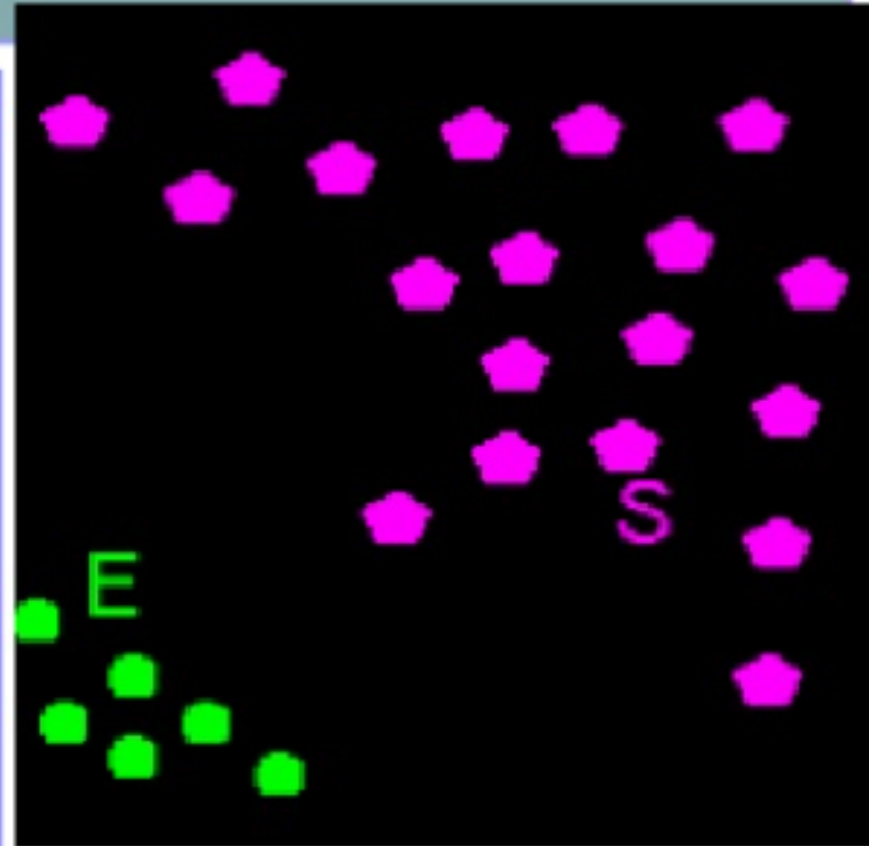
Alkalna fosfataza – (PH 9 – 10,5)

Arginaza- PH 9,7

# Koncentracija enzima

- U prisustvu viška supstrata brzina enzimske reakcije je direktno proporcionalna koncentraciji enzima

$$V = k(E)$$



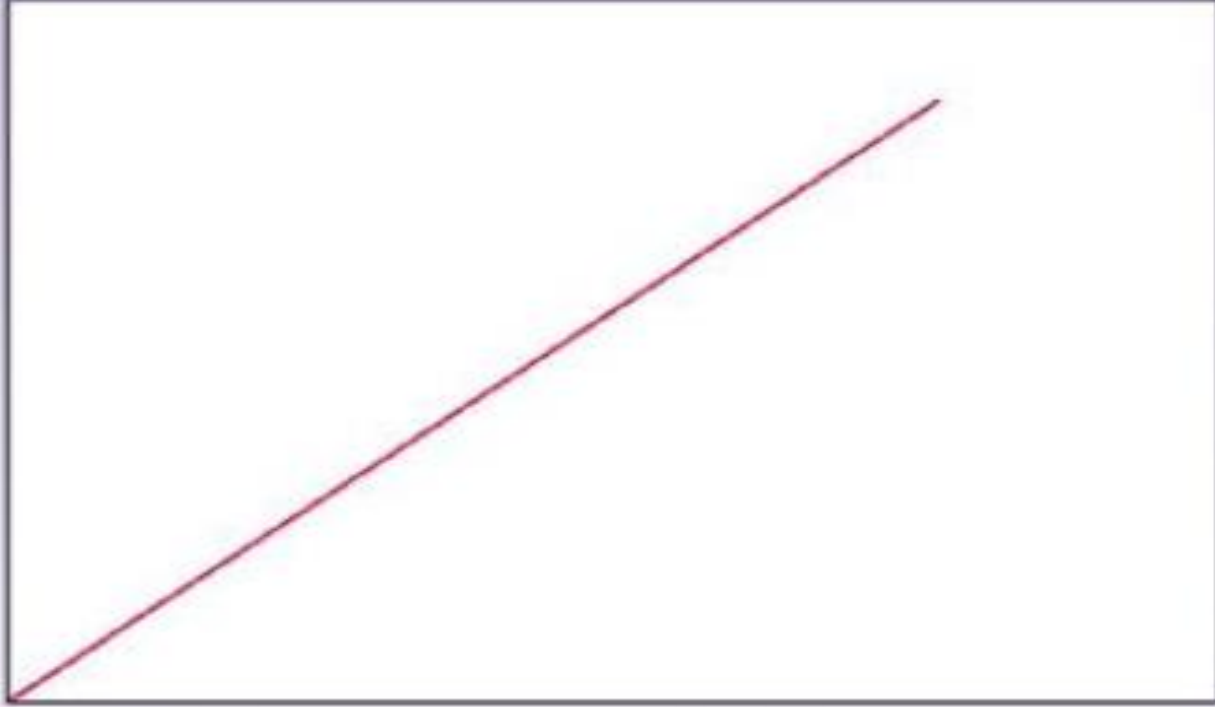
---

## *Uticaj koncentracije enzima*

- Pri optimalnim uslovima brzina hemijske reakcije je direktno proporcionalna koncentraciji enzima (pri višku supstrata)
  - Povećanjem koncentracije E srazmerno se više supstrata transformiše u produkt
  - Grafički odnos C enzima i v reakcije je prava linija
  - Svako odstupanje (od prave) ukazuje na prisustvo inhibitora ili sporednu hem. reakciju
-



Reaction rate  $\uparrow$



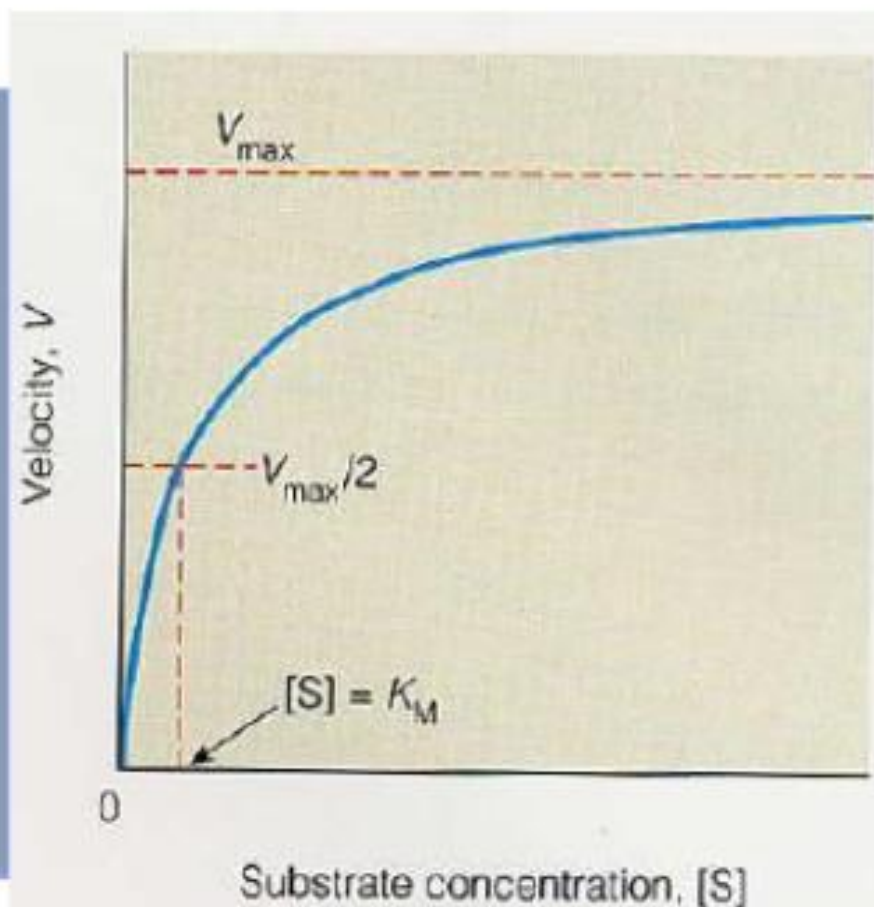
Enzyme concentration  $\rightarrow$   
(excess substrate)

# Koncentracija supstrata

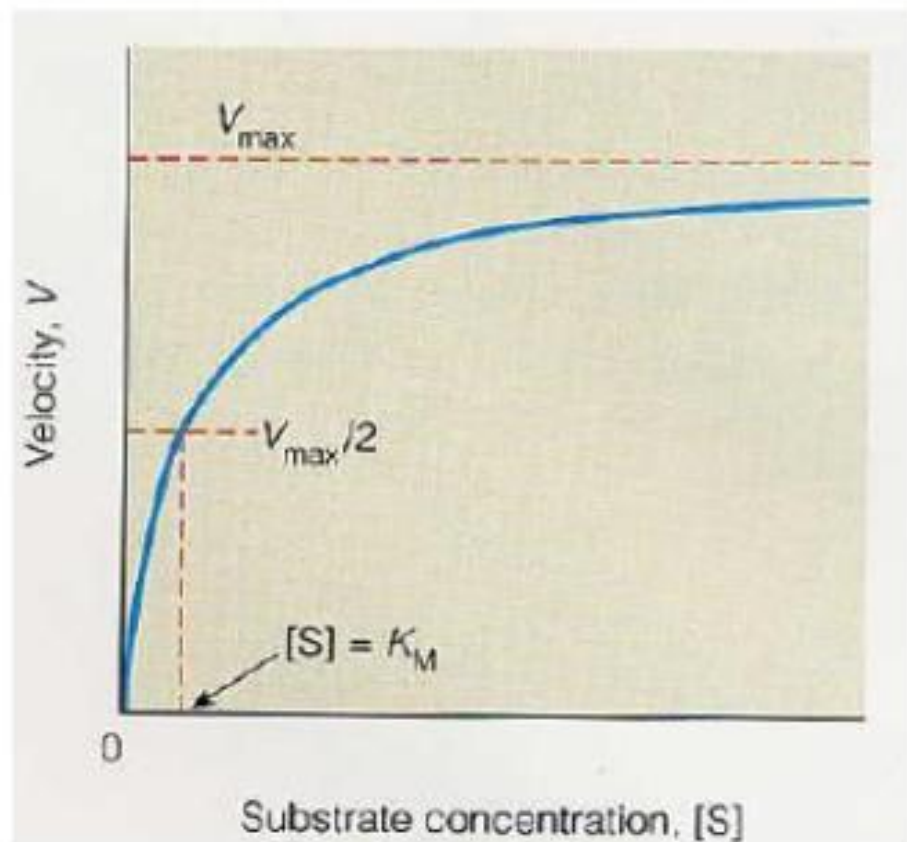
Grafički izraz odnosa koncentracije supstrata (S) i brzine (v), ima izgled hiperbole.

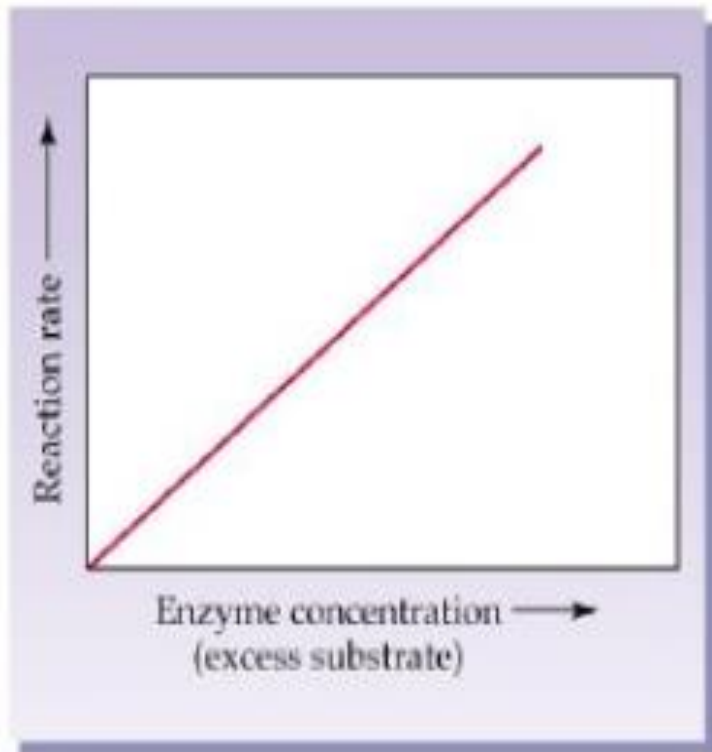
Pri niskim koncentracijama supstrata brzina reakcije se povećava srazmerno porastu koncentracije supstrata.

U prisustvu većih koncentracija supstrata dobija se granična (maksimalna) brzina –  $V_{max}$ .

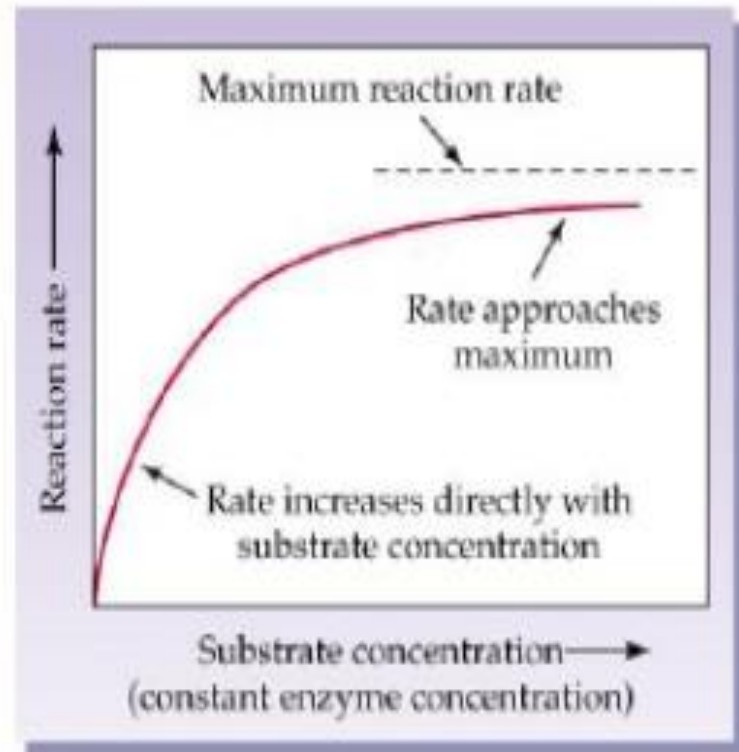


- Ona koncentracija supstrata pri kojoj se postiže  $\frac{1}{2} V_{\max}$  označava se kao  $K_m$  vrednost ili Mihaelis – Mentenova konstanta.
- Ovaj parametar je uvek stalna vrednost za određeni enzim i određeni supstrat
- Ukoliko enzim deluje na različite supstrate imaće za njih različite  $K_m$  vrednosti
- **$1/K_m$  se definiše kao afinitet E prema S**
- Recipročna vrednost  $1/K_m$  predstavlja **afinitet** enzima prema supstratu.





(a)



(b)

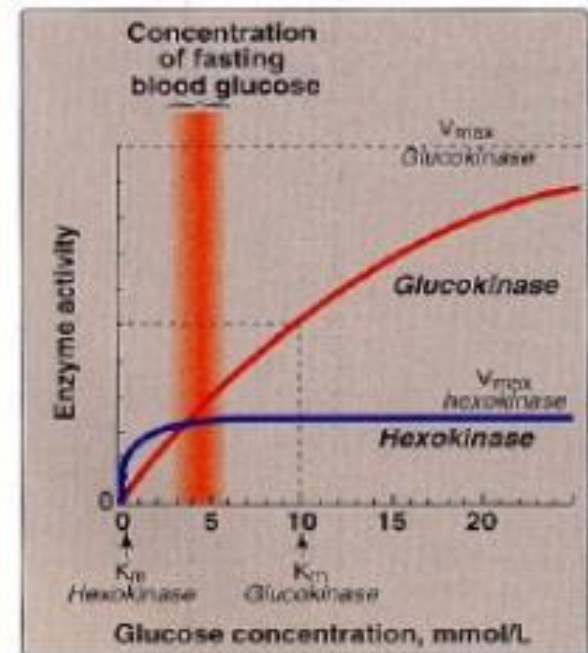
# K<sub>m</sub>

- Ukoliko enzim ima manju vrednost K<sub>m</sub> za neki supstrat utoliko će efikasnije (brže) da vrši njegovo pretvaranje u product.
- Vrednost K<sub>m</sub> se izražava brojem mol ili mmol/l.

heksokinaza

- Glukoza + ATP = glukozo 6-fosfat + ADP  
glukokinaza

- K<sub>m</sub> heksokinaze = 0,1 mmol/l
- K<sub>m</sub> glukokinaze = 10 mmol/l



**Figure 8.13**

Effect of glucose concentration on the rate of phosphorylation catalyzed by *hexokinase* and *glucokinase*.

---

## Značaj $K_m$ i $V_{max}$

- $K_m$  omogućava da se proceni fiziološka koncentracija supstrata u ćeliji
  - Normalno ta konc. treba da bude bliska  $K_m$
  - To znači da većina E u ćelijama nije potpuno zasićena S
-

# ALOSTERNI ENZIMI

## Alosterijski centar

Enzimi koji poseduju alosterijski centar zovu se alosterijski (regulatorni) enzimi

Kada se alosterijski efektor (activator ili inhibitor) veže za alosterijski centar nastaje konformaciona promena enzima koja utiče na katalitički centar pri čemu enzim menja afinitet prema supstratu.





## *Alosterijska regulacija*

- **Alosterijski enzim je:**
- najčešće sastavljen iz više subjedinica (dimer ili polimer)
- pored aktivnog ima i alosterijski centar
- kao alosterijski modulatori mogu da deluju: koenzimi, supstrati, produkti i dr. metaboliti
- vezivanjem aktivatora ili inhibitora enzim menja svoju terciarnu strukturu i afinitet za supstrat
- ispoljavaju sigmoidnu kinetiku
- Imaju izrazitu specifičnost prema alost. efektorima
- Svaka subjedinica može da se nalazi u dva oblika
  - T – tense (mali afinitet za supstrat)
  - R – relaxed (veliki afinitet za supstrat)



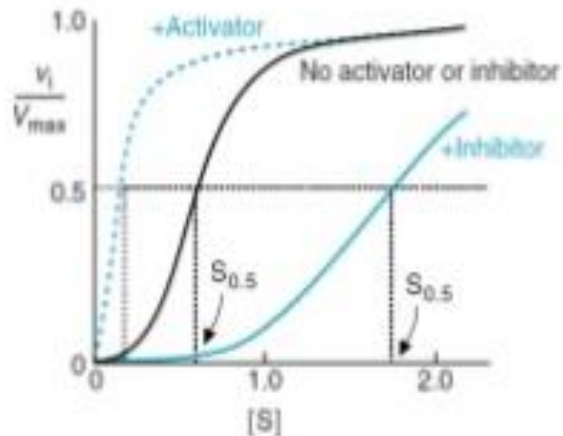
# Alosterna modifikacija enzima

## Alosterno mesto; alosterni modulatori

A model of an allosteric enzyme



Sigmoidalna kriva



K klasa menja  $K_m$   
V klasa menja  $V_{max}$

# AKTIVATORI ENZIMA

- ❖ nespecifični ( temperatura, PH, koncentracija enima i supstrata)
- ❖ specifični ( metali, joni, tiol jedinjenja, HCl, drugi enzimi-protein kinaze, enterokinaza)
  - amilaza ( Cl, Br, J)
  - ksantin oksidaza (Mo)
  - arginaza( Mg, Mn, Co)

# *INHIBITORI ENZIMA*

Nespecifični (inaktivatori)  
( visoka T, kiseline, baze)

Specifični (deluju samo na neke enzime)

a) povratna (reverzibilna) inhibicija

b) ireverzibilna - fluor – enolaza;  
-sarin – acetilholin esteraza  
- CO, cijanidi, vodonik sulfid-  
inhibiraju citohrom oksidazu

prirodni inhibitori (antienzimi):

antitripsin, antitrombin, inhibitor RNaze, DNaze

# Specifični inhibitori

Prema tipu inhibicije specifični inhibitori se dele na

- Kompetitivne ( competitive inhibition)
- Nekompetitivne (noncompetitive inhibition)
- Akompetitivne (uncompetitive inhibition)

# Specifični inhibitori

## ■ Kompetitivna (konkurentna) inhibicija

- strukturalna sličnost supstrata i inhibitora
- veći afinitet E prema S
- nepostojanje apsolutne specifičnosti
- inhibicija je reverzibilna

## ■ Nekompetitivna (nekonkurentna)

- inhibitor i supstrat nisu slične strukture
- povećanjem koncentracije supstrata stepen inhibicije se ne smanjuje
- inhibicija je reverzibilna

(Alosterijska inhibicija: ATP, AMP; sulfhidrilni reagensi, EDTA)

## ■ Akompetitivna

- inhibitor se vezuje samo za ES kompleks
- inhibitor se vezuje za mesto na enzimu koje nije aktivni centar

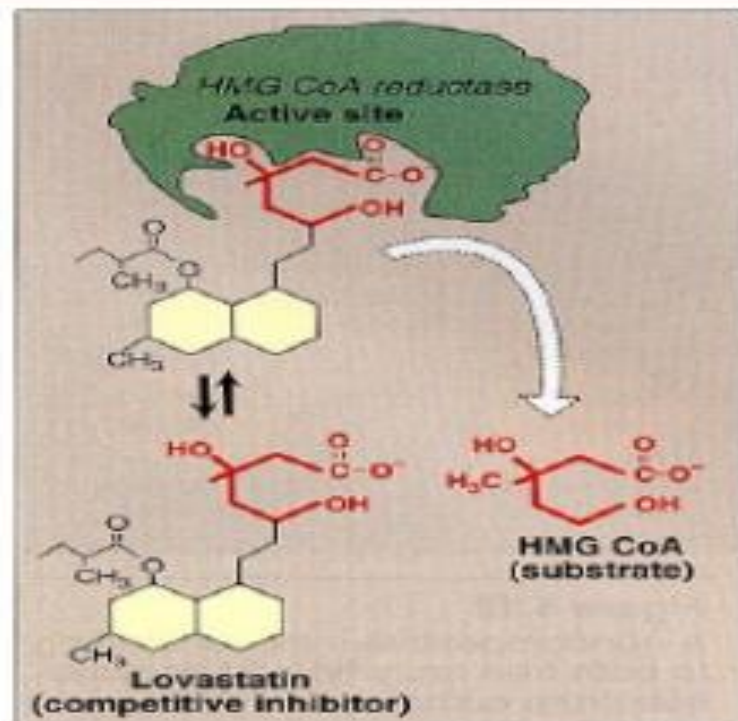
# Kompetitivna inhibicija

---

- inhibitor konkuriše sa supstratom za aktivni centar enzima (tj. katalitički centar)
- inhibitor poseduju strukturnu sličnost sa supstratom
- povećanjem koncentracije supstrata inhibicija se smanjuje
- inhibicija je reverzibilna



# statin-kompetitivni inhibitor HMG CoA reduktaze

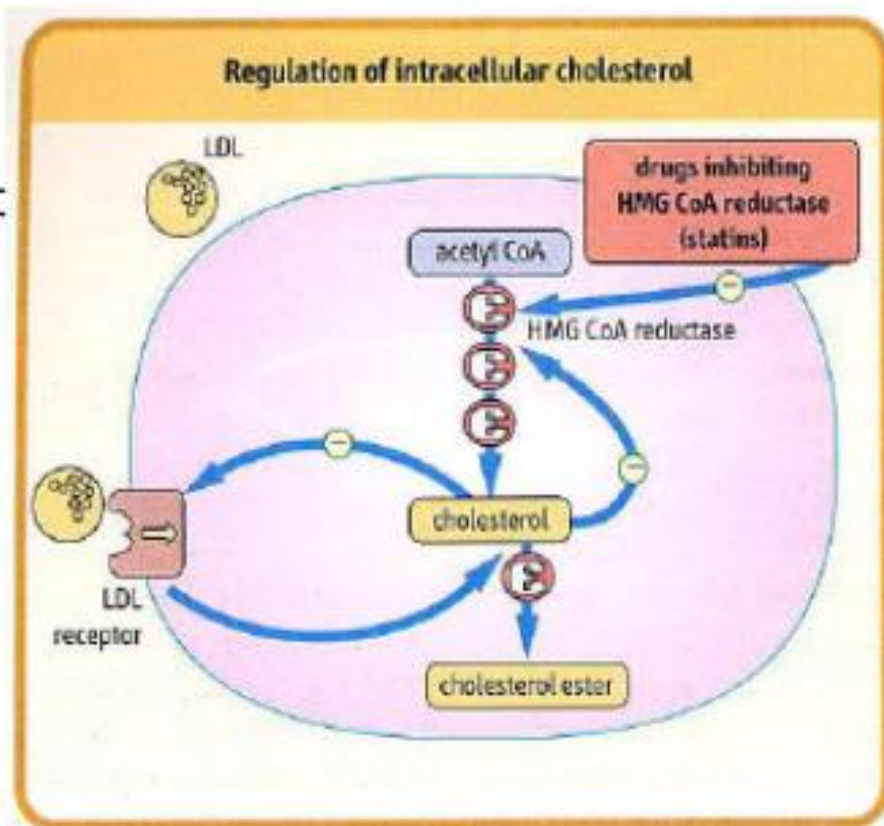


**Figure 5.13**

Lovastatin competes with HMG CoA for the active site of *HMG CoA reductase*.

# regulacija HMG Co reductaze statinima u Th hiperlipidemija

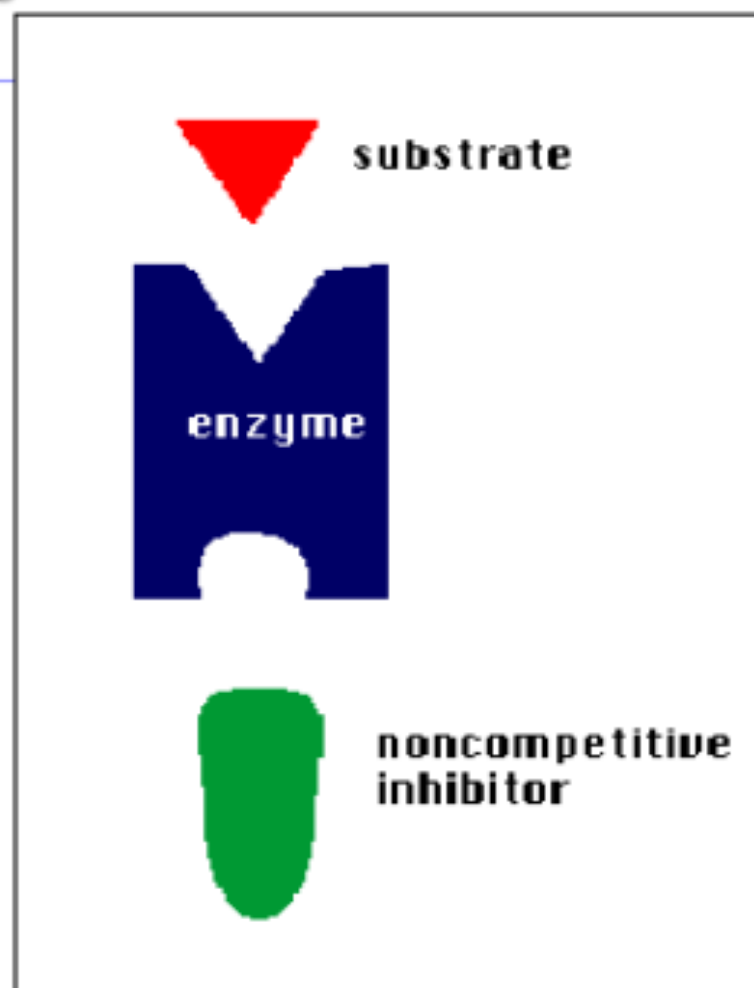
- Inhibicija HMG CoA reductaze statinima dovodi do opadanja holesterola u ćeliji
- Smanjen nivo holesterola u ćeliji aktivira mehanizme koji će višak holesterola preuzeti iz cirkulacije (iz LDL) - ekspresija receptora za LDL raste



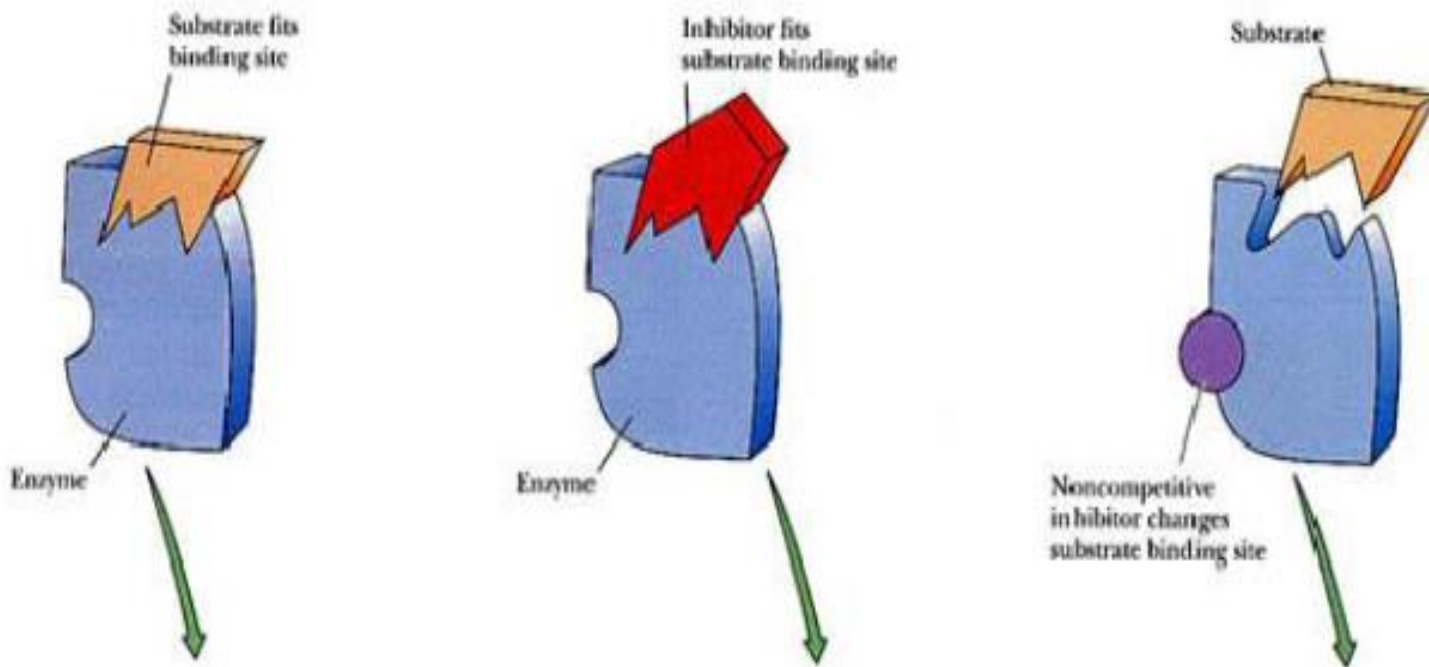


## Nekompetitivna inhibicija

1. inhibitor se vezuje za alosterijski centar slobodanog enzima ili za enzim-supstrat kompleks
2. inhibitor i supstrat nisu slične strukture
3. povećanjem koncentracije supstrata stepen inhibicije se ne smanjuje
4. inhibicija je reverzibilna



## Nekompetitivna inhibicija



■ *Primeri inhibitora enzima korišćenih u terapijske svrhe:*

Inhibitor	target enzim	efekat aplikacije
Allopurinol	xsantin oksidaza	tretman giht-a
Disulfiram	aldehid dehidrogenaza	lečenje alkoholizma
ACE-inhibitor	Angiotenzin konvertujući enzim	lečenje hipertenzije
Trasilol	proteaze	lečenje pankreatita
Metotreksat	dihidrofolat reduktaza	lečenje leukemija
Aspirin	ciklooksigenaza	anti-inflamatorni agens
5-fluorouracil	timidilat sintetaza	antineoplastični agens
Lovastatin	HNG-CoA reduktaza	hipolipemik
Penicilin	transpeptidaza	antibakterijski agens

## Multipli oblici enzima

- ❖ Multipli oblici enzima se dele u dve grupe:
  1. **Genetski uslovljene forme (izoenzimi i aleloenzimi)**
  2. **Postranslaciono modifikovani oblici (izoforme):**
    - agregati (nespecifična holin esteraza, glutamat dehidrogenaza)
    - hemijski modifikovani oblici
    - konformeri ( T i R stanje alosterijskih enzima)

# Aleloenzimi su produkti multiplih alela istog genskog lokusa

- razlikuju se između jedinki iste vrste
- sreću se kod određenih etničkih grupa (genetski polimorfizam)
- rezultat su tačkastih mutacija u genskom lokusu
- koriste se za tipizaciju tkiva
- u sudsko medicinskom veštačenju i kriminalistici
- **Smatra se da se pomoću aleloenzima osoba preciznije identifikuje nego pomoću otiska palca**



---

Za dijagnozu su posebno važni *izoenzimi* - različite molekulske forme istog enzima koji katalizuje istu hemijsku reakciju ali pokazuje tkivnu specifičnost.

Izoenzimi se sintetišu na različitim strukturnim genima.

- Većina ima kvaternernu strukturu
  - Mogu biti homomeri ili heteromeri
  - Izraz su adaptacije ćelija na promenjene biološke uslove
-

# REGULACIJA AKTIVNOSTI ENZIMA

Postoje 2 osnovna načina regulacije aktivnosti enzima:

❖ **genetska kontrola**

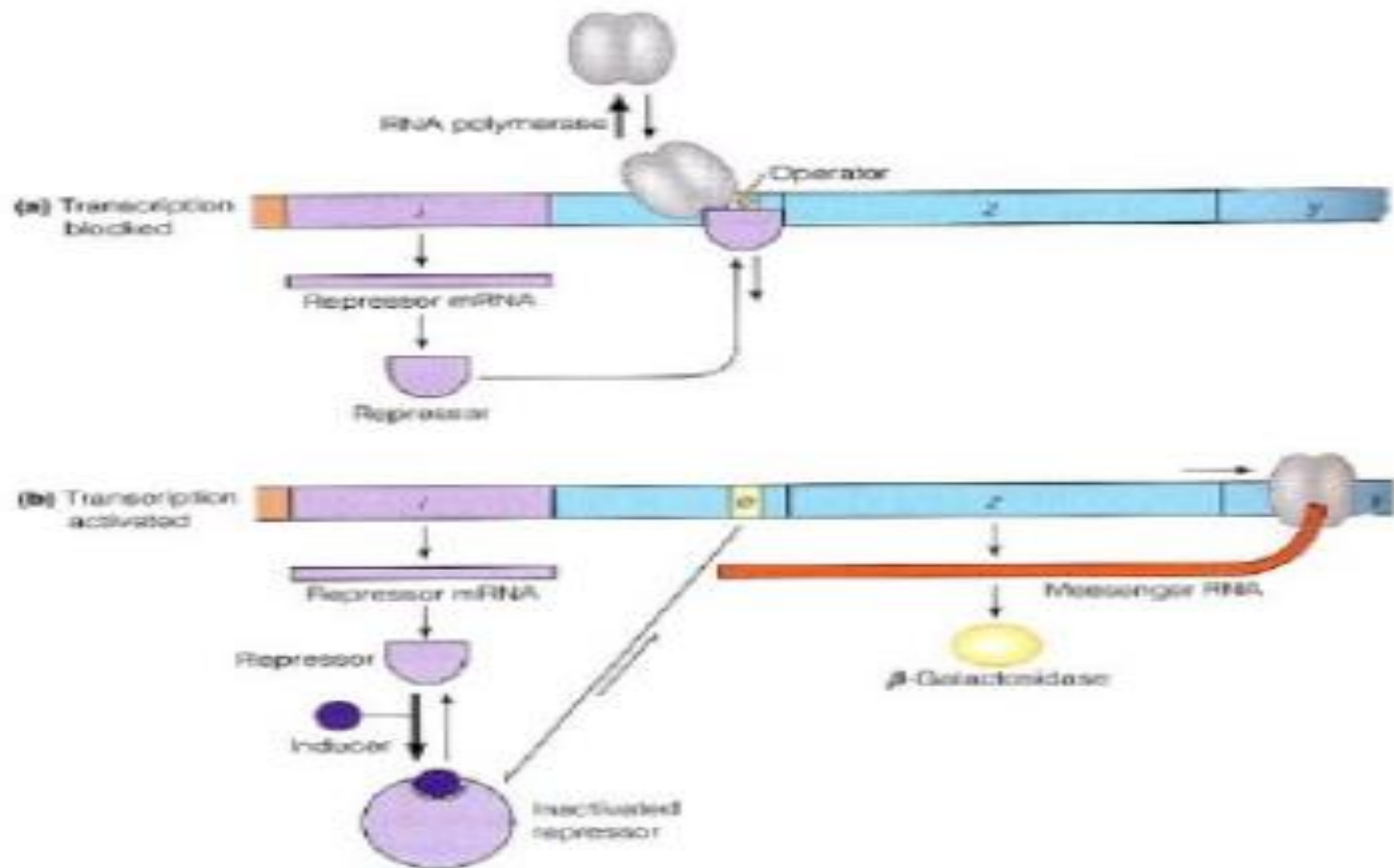
(promena brzine sinteze ili razgradnje enzima)

❖ **posttranslaciona**

(postsintetička) kontrola aktivnosti enzima

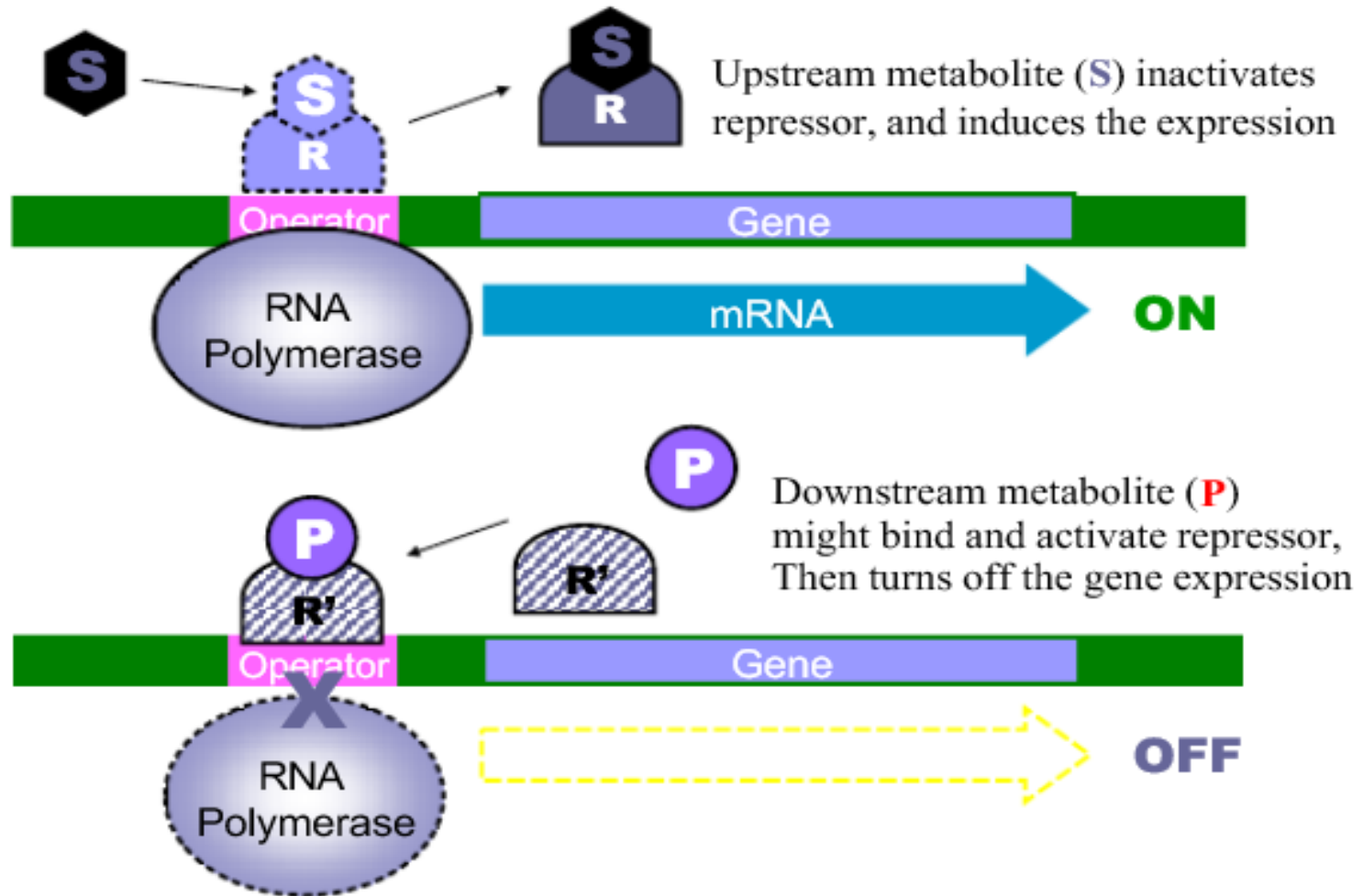
# Genetska kontrola

CHAPTER 25 INFORMATION TRANSFER: TRANSCRIPTION





# Operon Expression Regulated by Its Metabolites



# Posttranslaciona (postsintetička) kontrola aktivnosti enzima

1. **kovalentna modifikacija** (fosforilacija, acetilacija, metilacija, nukleotidacija)
2. **ograničena proteoliza** (proenzimi-zimogeni se aktiviraju specifičnim proteazama pr aktivacija tripsinogena enterokinazom)
3. **asocijacija i disocijacija subjedinica**
4. **promena koncentracije metabolita**
5. **alosterijska regulacija**

