

Farmakologia molekularna

ANDRZEJ ŁYSKOWSKI, DR INŻ.
alyskowski@prz.edu.pl, H.237

KONSULTACJE

Łyskowski Andrzej, dr inż.

- Jednostki
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I BIOINFORMATYKI (CB)
stanowisko: adiunkt w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych
pokój: H.237
telefon: 17 865 1649
email: alyskowski@prz.edu.pl

ZAKRES MATERIAŁU

- Podstawy enzymologii.
Podział enzymów.
Metabolizm leków.
- Struktura białek i wykorzystanie zmiany struktury białek do tworzenia nowych leków.
- Mutagenność, kancerogenność - mechanizm działania cytostatyków.
- Molekularna podstawa stanu patofizjologicznego.
Molekularny wpływ leków na te stany.

enzymologia

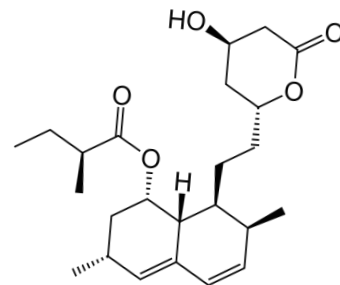
Statyny

Inhibitory reduktazy HMG-CoA, grupa wielofunkcyjnych organicznych związków chemicznych, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych, o różnej budowie chemicznej, mających w formie aktywnej wspólną grupę farmakoforową: łańcuch β -hydroksykwasu.

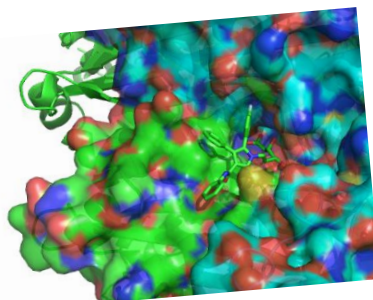
Atrowastatyna

Syntetyczna pochodna:

W 2003 najlepiej sprzedające się lekarstwo w historii 12.4 mld USD sprzedaż firmy Pfizer w USA.



Lovastatin, a compound isolated from *Aspergillus terreus*, was the first statin to be marketed.



enzymologia to...

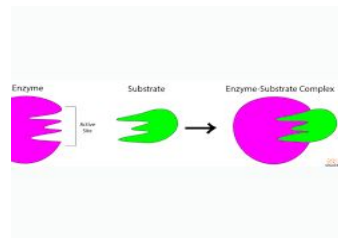
Enzymologia to gałąź biochemii, która bada enzymy, ich strukturę, właściwości, funkcje i sposób, w jaki katalizują (przyspieszają) reakcje biochemiczne.

Enzymy są niezbędne do życia, jakie znamy. Biorą udział w każdej reakcji chemicznej zachodzącej w żywym organizmie. Bez enzymów reakcje te zachodziłyby zbyt wolno, aby podtrzymać życie.

Oto niektóre z kluczowych obszarów badań w enzymologii:

- **Struktura enzymów:** Obejmuje to zrozumienie trójwymiarowej struktury enzymów, a także właściwości chemicznych aminokwasów wchodzących w ich skład.
- **Funkcja enzymu:** Obejmuje zrozumienie, w jaki sposób enzymy wiążą się ze swoimi substratami (cząsteczkami, z którymi reagują) i w jaki sposób katalizują reakcje.
- **Regulacja enzymów:** Jest to badanie, w jaki sposób aktywność enzymów jest kontrolowana w celu utrzymania homeostazy komórkowej.
- **Kinetyka enzymów:** Jest to badanie szybkości reakcji katalizowanych przez enzymy.
- **Zastosowania enzymów:** Obejmuje wykorzystanie enzymów w różnych zastosowaniach przemysłowych i medycznych, takich jak produkcja biopaliw, żywności i farmaceutyków.
- **Badanie enzymologii** doprowadziło do wielu ważnych postępów w nauce i medycynie. Na przykład rozwój leków opartych na enzymach zrewolucjonizował leczenie wielu chorób, takich jak rak i cukrzyca.

[Gemini]



enzymologia

enzym + gr. logos = nauka

Interdyscyplinarna nauka o enzymach, ich strukturze, mechanizmach działania, systematyce i praktycznym zastosowaniu.

Rozwój enzymologii zapoczątkowały w XIX w. badania nad katalityczną aktywnością materiałów biologicznych i wyciągów z nich, wywodzące się z obserwacji trawienia i fermentacji (XVIII w.); termin enzym wprowadził 1877 W.F. Kühne.

- enzymologia porównawcza ustala podobieństwa i różnice między określonymi enzymami u różnych gatunków organizmów, dążąc m.in. do poznania ewolucji enzymów;
- enzymologia strukturalna bada strukturalne aspekty aktywności enzymatycznej;
- enzymologia fizyczna analizuje kinetyczne i termodynamiczne aspekty katalizy enzymatycznej;
- ...

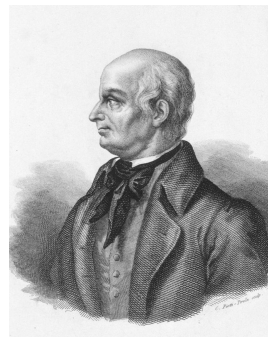
rys historyczny

Lazzaro Spallanzani, włoski naukowiec żyjący w latach 1729-1799, wniósł znaczący wkład, który położył podwaliny pod dziedzinę enzymologii. Choć nie odkrył bezpośrednio enzymów, jego praca utorowała drogę do przyszłych postępów w zrozumieniu trawienia i utorowała drogę do odkrycia enzymów.

Eksperymenty trawienne: Spallanzani przeprowadził liczne eksperymenty pod koniec XVIII wieku, koncentrując się na procesie trawienia. Zaobserwował, że mięso zalane wodą zmiażdżone i rozpuściło się nawet przy braku żołądka, co sugeruje obecność czynników trawiennych wykraczających poza fizyczne rozdrabnianie.

Izolacja pepsyny: Spallanzani wyizolował sok trawienny z żołądka zwierząt, który nazwał "sokiem żołądkowym". Wykazał, że ten sok żołądkowy może rozkładać mięso poza ciałem, co dodatkowo wspierało ideę czynników chemicznych, później znanych jako enzymy, biorących udział w trawieniu.

Kontrowersje i torowanie drogi: Jego odkrycia podważyły dominującą teorię mechanicznego trawienia i wywołały kontrowersje w społeczności naukowej. Jednak praca Spallanzaniego, pomimo początkowego oporu, ostatecznie znacząco przyczyniła się do zrozumienia trawienia i położyła podwaliny pod późniejsze odkrycie enzymów przez innych.



współcześnie

- Wstęp do kinetyki enzymatycznej, enzymologii molekularnej i enzymologii strukturalnej (początek XX wieku)
- Model klucza i zamka jako opis oddziaływań pomiędzy enzymem a substratem (E. Fischer)
- Matematyczny model kinetyki enzymatycznej – wprowadzenie terminu „kompleks enzymsubstrat” jako opis stanu pośredniego (1903 r., V. Henri)
- Uzupełnienie poprzedniego modelu, wprowadzenie równania Michaelisa-Menten do opisu
- Kinetyki enzymatycznej (1913, L. Michaelis, M. Menten)
- Wyznaczenie pierwszej struktury enzymu – ureazy (1926 r., J. Sumner)
- Odkrycie koenzymów - nikotynoamidowych oraz flawinowych (lata 30. XX wieku, H. Euler, O. Warburg)

pojęcia podstawowe

- Enzymy to białka (*lub RNA*), które katalizują reakcje chemiczne w organizmach żywych.
- Enzymy pochodzenia białkowego mają unikalną strukturę, która jest kluczowa dla ich funkcji. Składają się z aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi, a ich struktura jest stabilizowana przez wiązania wodorowe i jonowe oraz oddziaływania hydrofobowe.
- Swoje zadanie realizują poprzez obniżenie energii aktywacji reakcji chemicznej, umożliwiając szybsze przejście z substratu do produktu.
- Pojęcia związane z budową enzymów: apoenzym, holoenzym, kofaktor, koenzym, grupa prostetyczna, miejsce aktywne.
- Enzymy RNA (**rybozymy**) – niektóre cząsteczki RNA są zdolne do katalizowania reakcji chemicznych.

pojęcia podstawowe

- Enzymy działają poprzez wiązanie się z substratem i katalizowanie reakcji chemicznej. Mechanizm działania enzymów obejmuje tworzenie kompleksu enzym-substrat, zmianę struktury substratu, katalizę reakcji chemicznej i uwolnienie produktów.
- Wybrane właściwości związane z działaniem enzymów: moc katalityczna, specyficzność substratowa, regulacja aktywności (nie dotyczą wszystkich enzymów), przekształcanie formy energii.
- Przykłady enzymów: amylaza, pepsyna, trypsyna, lipaza, chymotrypsyna, laktaza etc.
- Enzymy są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Pełnią one wiele ważnych funkcji, takich jak trawienie, synteza białek i DNA, regulację procesów metabolicznych i wiele innych. Choroby związane z zaburzeniami działania enzymów to np. mukowiscydoza (białko CFTR), fenyloketonuria (hydroksylaza fenyloalaninowa), niedobór laktazy.

The Nobel Prize in Chemistry 1989

rybozomy

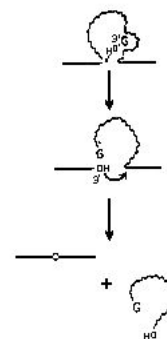
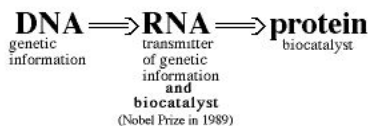
- Odkrycie rybozymów wyjaśniło odwieczną zagadkę co było pierwsze: jajko (DNA) czy kura (białko). Skoro białka (enzymy) potrzebne są do replikacji DNA, transkrypcji i translacji a do powstania białka niezbędny jest kod w postaci DNA, to co powstało pierwsze. Okazało się, że RNA – samo było informacją genetyczną i jednocześnie mogło przeprowadzać reakcje. Z czasem funkcję nośnika informacji przejęło stabilniejsze DNA natomiast funkcje katalityczne – białka. W ewolucji etap przed pojawianiem się DNA i białek nazywany jest światem RNA (hipoteza).



Photo from the Nobel Foundation archive.
Sidney Altman
Prize share: 1/2



Photo from the Nobel Foundation archive.
Thomas R. Cech
Prize share: 1/2



A schematic picture of the self-splitting of RNA-molecules. Previously it was thought that this process, which is crucial for the transcription of the genetic message, required the catalytic activity of proteins (from Ann. Rev. Biochem. 1986 55:606).

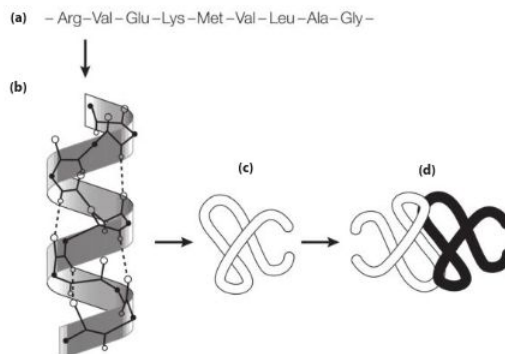
maszynyria komórkowa

- Enzymy [gr. en zýmē 'w zaczynie'], biokatalizatory, dawniej fermenty, białkowe katalizatory reakcji chemicznych w układach biologicznych.*
- są silnie zróżnicowaną pod względem budowy przestrzennej grupą białek;
- wyróżniamy:
 - białka proste i białka złożone
 - białka monomeryczne i białka oligomeryczne
- holoenzym składający się z białkowego apoenzymu aktywnego katalitycznie dopiero po przyłączeniu drobnocząsteczkowego kofaktora;
- enzymy są zbudowane:
 - z co najmniej 100 reszt aminokwasowych,
 - mają masę cząsteczkową powyżej 10 kDa
 - średnicę od 2,5 nm.



budowa enzymów

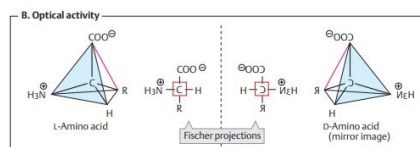
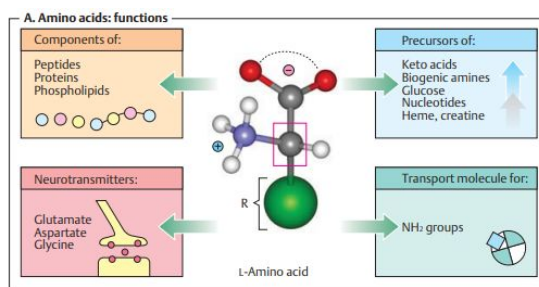
- Łańcuch polipeptydowy o zdeterminowanej genetycznie sekwencji aminokwasów ulega sfałdowaniu, przybierając unikatową strukturę drugo- i trzeciorzędową; uporządkowana i charakterystyczna dla danego enzymu budowa przestrzenna (konformacja) określa rodzaj katalizowanej reakcji chemicznej oraz jej regulację.
- Budowa hierarchiczna:
 - A. Struktura pierwszorzędowa;
 - B. Struktura drugorzędowa;
 - C. Struktura trzeciorzędowa;
 - D. Struktura czwartorzędowa;



budowa

i właściwości aminokwasów

- Wszystkie białka zbudowane są z 20 standardowych aminokwasów.
- Aminokwasy mogą występować w konfiguracji D lub L. W białkach występuje tylko izomer L.
- Właściwości fizykochemiczne aminokwasów są związane z właściwościami ich łańcuchów bocznych. Należą do nich:
 - polarność
 - kwasowość | zasadowość
 - aromatyczność
 - masa cząsteczkowa
 - zdolność do tworzenia wiązań wodorowych | sieciowania
 - reaktywność chemiczna



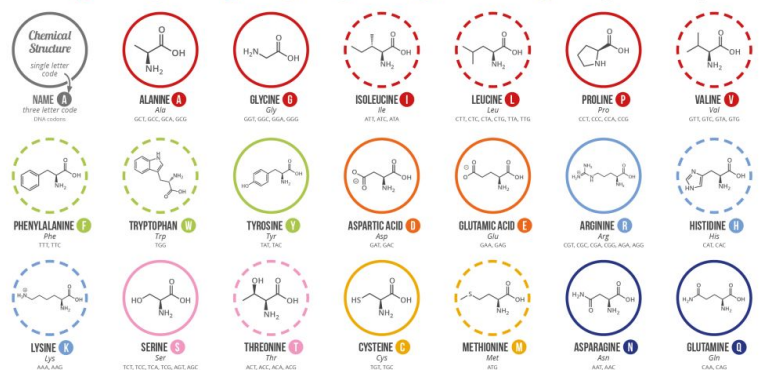
podział aminokwasów

- Alifatyczne
 - Aromatyczne
 - Kwasowe
 - Zasadowe
 - Hydrofilowe
 - Zawierające siarkę
 - Amidowe
 - ...
-
- Średnia masa aminokwasu: 110 Da

A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 500 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE - HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY ENCODES 20. ESSENTIAL AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET, WHILST NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESISED IN THE BODY.

Chart key: ● ALIPHATIC ● AROMATIC ● ACIDIC ● BASIC ● HYDROXYLIC ● SULFUR-CONTAINING ● AMIDIC ○ NON-ESSENTIAL ○ ESSENTIAL



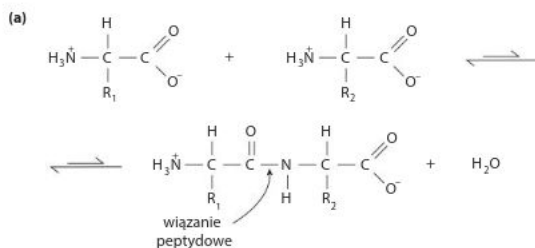
Note: This chart only shows those amino acids for which the human genetic code directly codes for. Selenocysteine is often referred to as the 21st amino acid, but is encoded in a special manner. In some cases, distinguishing between asparagine/aspartic acid and glutamine/glutamic acid is difficult. In these cases, the codes asp (Asp) and glu (Glu) are respectively used.

© COMPOUND INTEREST 2014 - WWW.COMPOUNDINTEREST.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem
Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives license.

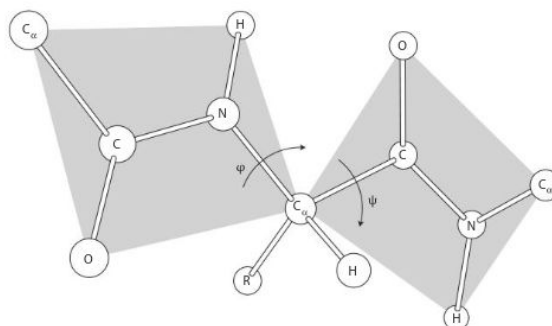
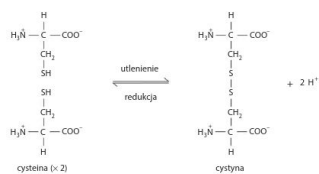


struktura pierwszorzędowa

Liniowa sekwencja aminokwasów
połączonych ze sobą wiązaniami
peptydowymi.



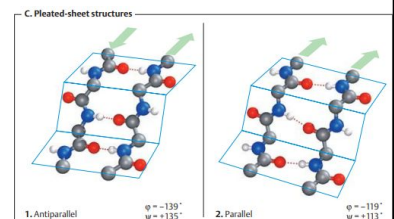
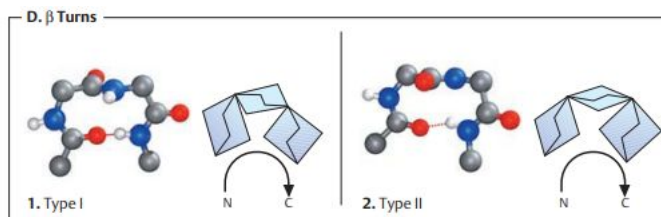
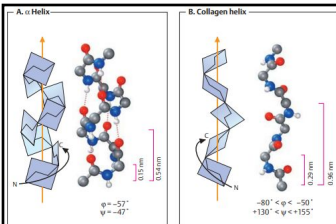
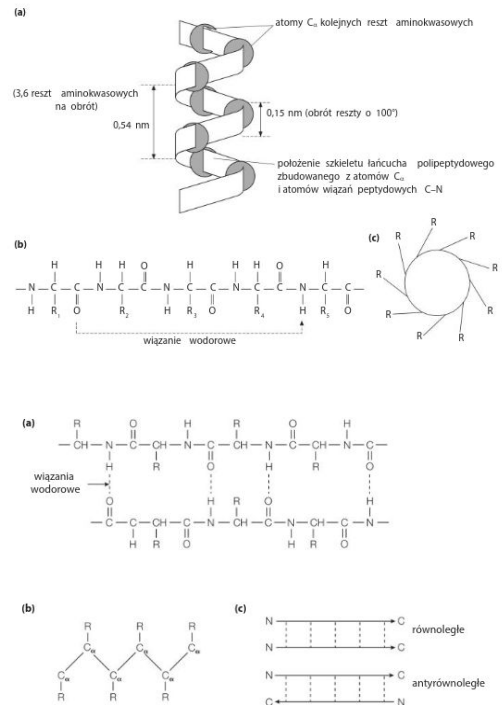
W strukturze pierwszorzędowej występuwać
mogą kowalencyjne wiązania disiarczkowe.



struktura drugorzędowa

Przestrzenna forma łańcucha polipeptydowego.

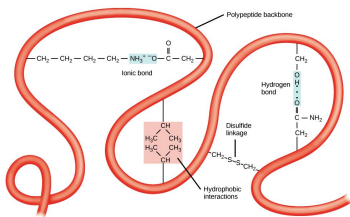
- helisa α
 - (a) model (tylko atomy C_α)
 - (b) schemat wiązań wodorowych
 - (c) przekrój helisy
- struktura β
 - (a) schemat wiązań wodorowych
 - (b) widok w osi płaszczyzny
 - (c) możliwe warianty (równoległy | antyrównoległy)
- pętle i zwroty



struktura trzeciorzędowa

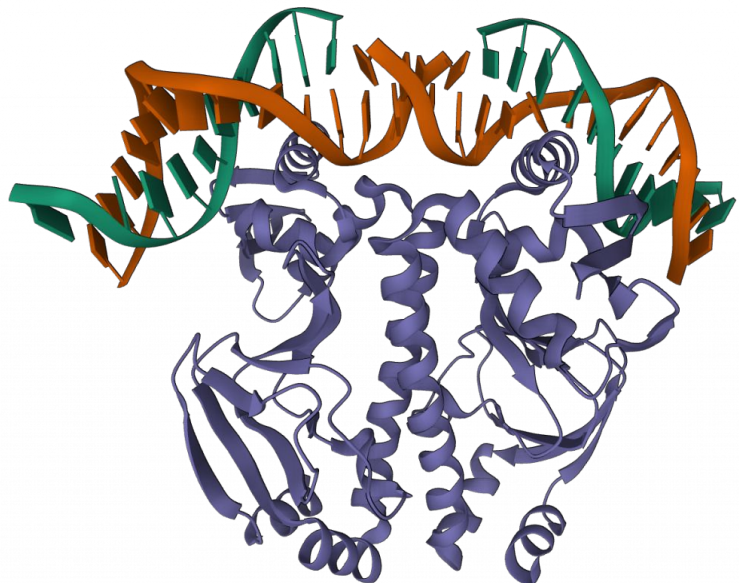
Przestrzenne ułożenie **wszystkich** aminokwasów w białku.

Biologicznie aktywna, natywna konformacja utrzymywana dzięki licznym wiązaniom niekowalencyjnym.

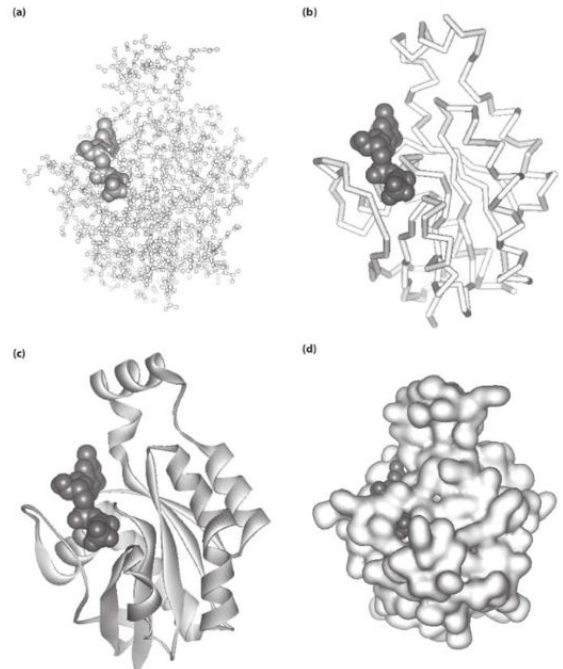
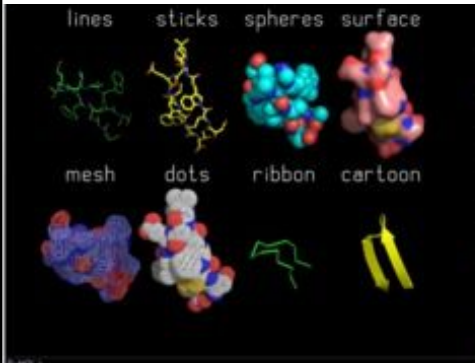


struktura czwarterzędowa

Przestrzenne ułożenie polipeptydowych podjednostek oraz ich kofaktorów.

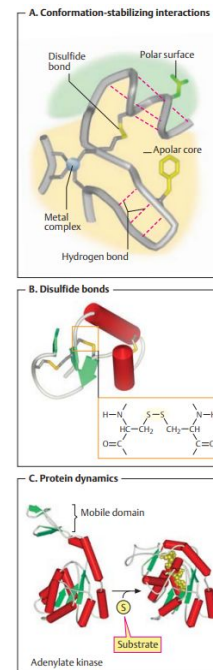


wizualizacja struktury



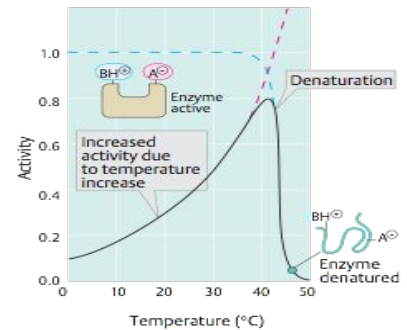
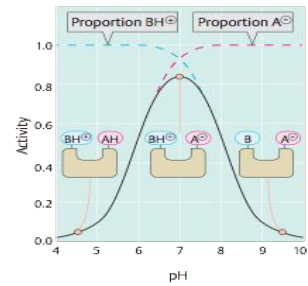
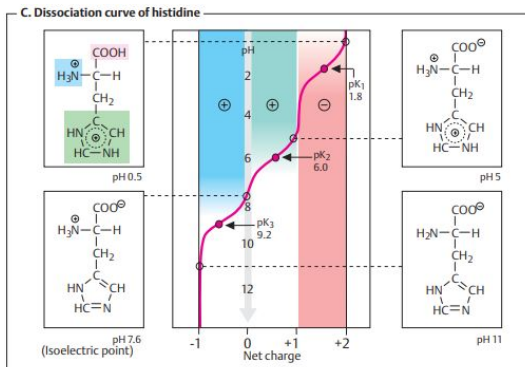
stabilność białka

- Siły elektrostatyczne
 - pary jonowe
 - mostki solne
 - oddziaływania van der Waalsa
- Wiązania wodorowe
- Siły hydrofobowe
- Wiązania disiarczkowe



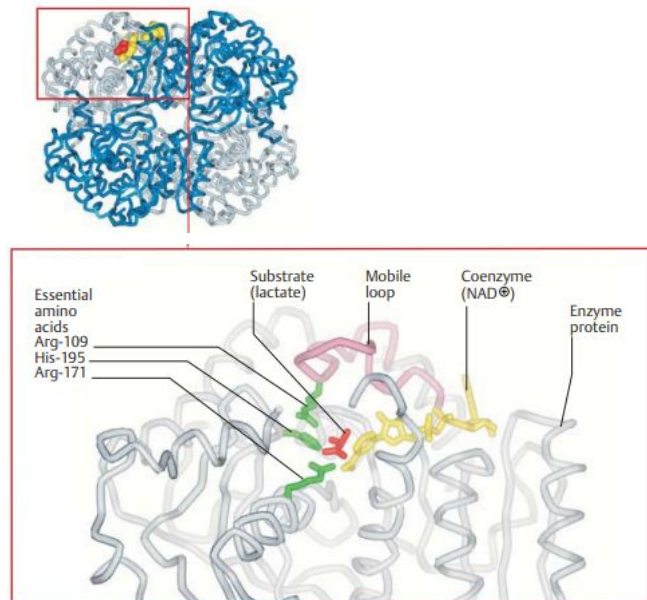
czynniki fizyczne wpływające na stabilność

- Środowisko
- Temperatura (i ciśnienie)



miejsce aktywne

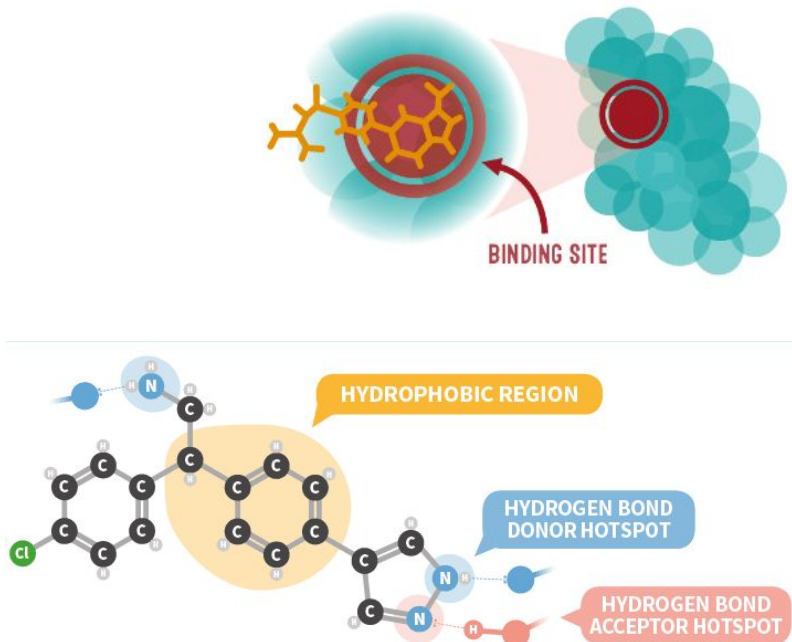
- Część trzecio- lub czwartorzędowej struktury białka odpowiedzialna za aktywność katalityczną nazywa się „miejscem aktywnym” i najczęściej zajmuje 10-20% całej objętości białka
- Miejsce aktywne jest najczęściej hydrofilową szczeliną lub zagłębieniem, w którym znajdują się odpowiednie aminokwasy z odpowiednimi łańcuchami bocznymi wiążące substrat(y) i przeprowadzają reakcję.
- Czasami w miejscu aktywnym wiązany jest dodatkowo kofaktor(y), które uczestniczą (pomagają) w katalizie



interakcje w miejscu aktywnym

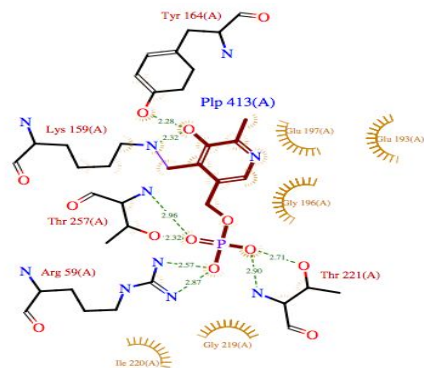
Charakter miejsca aktywnego jest ściśle związany z katalizowaną reakcją chemiczną - parametrami fizykochemicznymi ligandów.

- Ligandem nazywamy substrat lub produkt reakcji chemicznej katalizowanej przez enzym.
- Jedną z podstawowych cech enzymów jest wysoka specyficzność substratowa, która wynika z serii wysoce specyficznych niekowalencyjnych interakcji łączących enzym i substrat.
- Centra aktywne są chiralne, więc naturalna jest wyższa zdolność wiązania jednego enancjomeru nad drugim (jak dłoń i rękawiczka).
- Wyróżnia się 4 podstawowe typy interakcji enzym-substrat wykorzystywane przez enzymy:
 - interakcje elektrostatyczne;
 - wiązania wodorowe;
 - interakcje hydrofobowe;
 - interakcje niepolarne (van der Waalsa);



oddziaływania elektrostatyczne

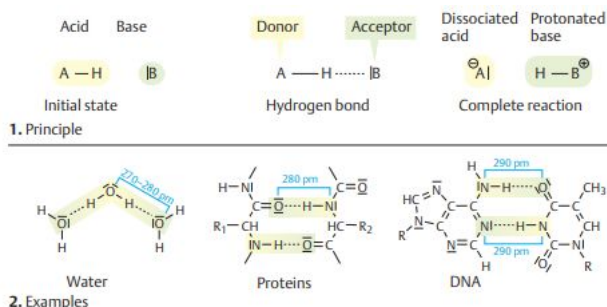
- Oddziaływania elektrostatyczne (40-200 kJ/mol) dotyczą substratów posiadających zjonizowane grupy funkcyjne reagujących z przeciwnie naładowanymi resztami aminokwasów w miejscu aktywnym
- Silniejsze niż wiązania wodorowe
- Mogą rozciągać się na dalsze odległości niż inne niekowalencyjne oddziaływania
- Oddziaływania elektrostatyczne w białkach będą bardzo zależać od pH środowiska (ze względu na amfoteryczność aminokwasów budujących białka)



Schemat oddziaływań w centrum aktywnym aminotransferazy. PDB-ID: 1A3G.

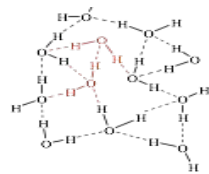
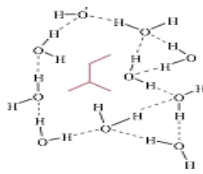
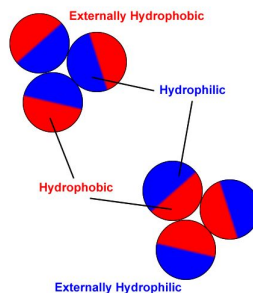
wiązania wodorowe

- Tworzą się pomiędzy donorem wiązania zawierającym wolną parę elektronów i akceptorem zawierającym kwasowy atom wodoru. W ten sposób najczęściej wiązane są substraty polarne. Siła wiązania zależy od natury chemicznej i ułożenia przestrzennego reagujących grup.



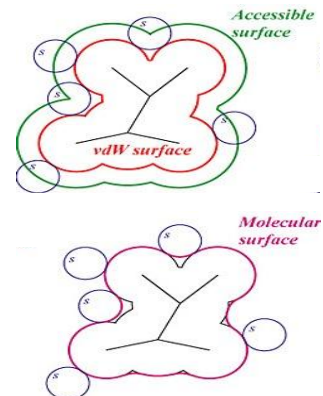
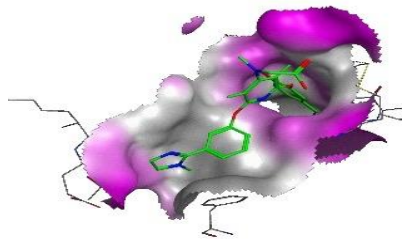
oddziaływania hydrofobowe

- Oddziaływania hydrofobowe (3-10 kJ/mol) polegają na łączeniu się ze sobą grup hydrofobowych, w celu ochrony cząsteczki przed oddziaływaniem na nie cząsteczek wody.
- Niepolarne fragmenty cząsteczek w rozpuszczalniku polarnym (w wodzie) łączą się ze sobą z tego względu, że ogranicza to liczbę cząsteczek wody, otaczających te fragmenty (otoczka hydratacyjna). Jest to efekt termodynamicznie korzystny ponieważ zwiększa entropię układu.
- Hydrofobowe substancje mają tendencję do agregacji i ekstrakcji z roztworów wodnych, dlatego też hydrofobowe substraty (lub zawierające hydrofobowe grupy czy powierzchnie) wiążą się preferencyjnie z hydrofobowymi fragmentami miejsca aktywnego.



oddziaływania van der Waals

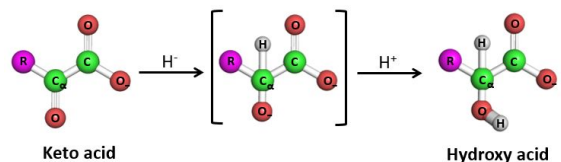
- Oddziaływania van Der Waalsa (0,4 – 4 kJ/mol) – oddziaływania typu trwały dipol – dipol indukowany lub dipol indukowany – dipol indukowany (siły dyspersyjne Londona)
- Spowodowane zachodzącymi w czasie zmianami rozkładu ładunków elektronowych wokół jądra atomu.
- Bardzo słabe oddziaływania działające na bardzo bliskich (lecz optymalnych) odległościach pomiędzy cząsteczkami.
- Duża liczba tego typu oddziaływań (wynikająca z dużej ilości kontaktów pomiędzy atomami) powoduje jednak, że sumarycznie oddziaływania te mogą w dużym stopniu determinować siłę wiązania substratu do enzymu.
- Wynikają z bliskości atomów substratu i miejsca aktywnego. Zazwyczaj kształt miejsca aktywnego jest wysoce komplementarny do kształtu substratu stąd siły te sumują się i dają trwałe wiązanie.



miejsce aktywne - powinowactwo

- Kompleksy tworzące się w miejscu aktywnym charakteryzują różną siłą interakcji.
- 15 kcal/mol to średnia energia oddziaływań
- Zróżnicowanie poziomów energetycznych służy realizacji różnych celów biologicznych.
- Stan przejściowy charakteryzuje się niższą energią niż stan wyjściowy.

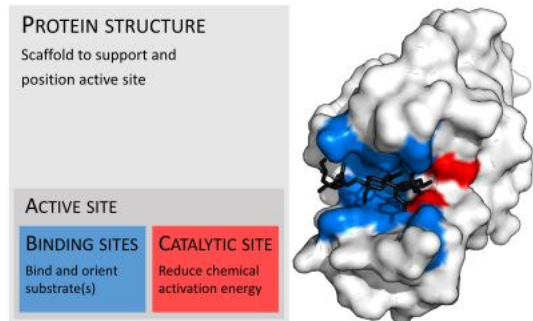
Protein	Ligand	Binding Energy (kcal/mol)	Dissociation Constant (Kd) (Molar)
Antibody	Antigen	-6 to -11 ^{[54]*a}	$\sim 10^{-2}$ to 10^{-8}
Receptor	Hormone	~ -12 ^[42]	$\sim 10^{-9}$
Enzyme	Substrate	-4 to -8 ^[55]	$\sim 10^{-3}$ to 10^{-6}
	Cofactor	-5.5 to -9.5 ^[42]	$\sim 10^{-4}$ to 10^{-7}
	Inhibitor	-10 to -15 ^{[54]*b}	$\sim 10^{-7}$ to 10^{-11}
	Transition state	-16 to -27 ^{[54]*c}	$\sim 10^{-12}$ to 10^{-20}



miejsce aktywne - modele interakcji

Enzymy muszą wiązać swoje substraty, zanim będą mogły katalizować jakąkolwiek reakcję chemiczną. Enzymy są zwykle bardzo specyficzne pod względem wiązanych substratów, a następnie katalizowanej reakcji chemicznej. Specyficzność jest osiągana poprzez wiązanie kieszeni o komplementarnym kształcie, ładunku i właściwościach hydrofilowych/hydrofobowych w stosunku do substratów. Enzymy mogą zatem rozróżniać bardzo podobne cząsteczki substratów, aby być chemoselektywnymi, regioselektywnymi i stereospecyficznymi.

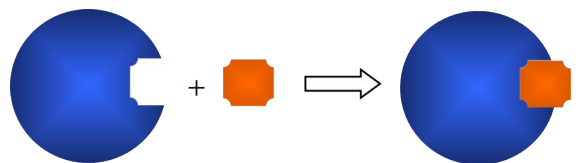
- Zamka i klucza
Lock & key (Emil Fischer, XIX wiek)
- Wymuszone dopasowanie
Induced fit (Daniel Koshland, '50)
- Selekcja konformacyjna
Conformational selection



model zamka i klucza

Aby wyjaśnić obserwowaną specyficzność enzymów, w 1894 r. Emil Fischer zaproponował, że zarówno enzym, jak i substrat posiadają specyficzne komplementarne kształty geometryczne, które dokładnie do siebie pasują [39]. Jest to często określane jako model "zamka i klucza".

Ten wczesny model wyjaśnia specyficzność enzymów, ale nie wyjaśnia stabilizacji stanu przejściowego, który osiągają enzymy.



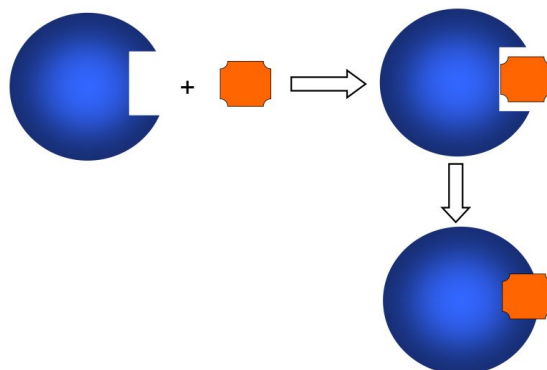
model

wymuszonego dopasowania

W 1958 roku Daniel Koshland zasugerował modyfikację modelu zamka i klucza: ponieważ enzymy są raczej elastycznymi strukturami, miejsce aktywne jest stale przekształcane przez interakcje z substratem, gdy substrat oddziałuje z enzymem.

W rezultacie substrat nie wiąże się po prostu ze sztywnym miejscem aktywnym; łańcuchy boczne aminokwasów tworzące miejsce aktywne są formowane w precyzyjne pozycje, które umożliwiają enzymowi wykonywanie jego funkcji katalitycznej. W niektórych przypadkach, takich jak glikozydazy, cząsteczka substratu również nieznacznie zmienia kształt, gdy wchodzi do miejsca aktywnego.

Miejsce aktywne nadal się zmienia, dopóki substrat nie zostanie całkowicie związany, w którym to momencie określany jest ostateczny kształt i rozkład ładunku. Indukowane dopasowanie może zwiększyć wierność rozpoznawania molekularnego w obecności konkurencji i szumu poprzez mechanizm korekty konformacyjnej.



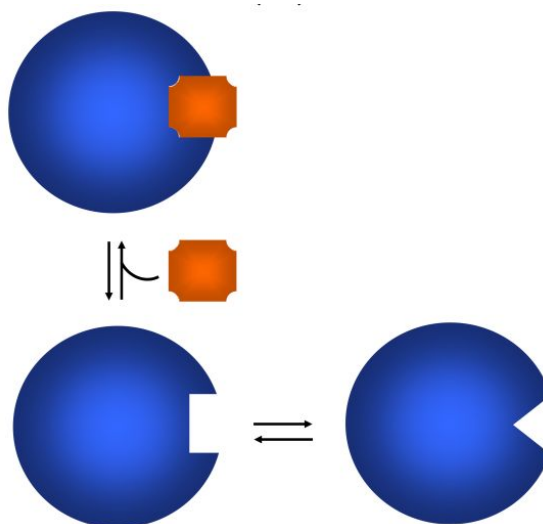
model

selekcji konformacyjnej

Model Monoda-Wymana-Changeuxa (model MWC) opisuje przejścia allosteryczne białek zbudowanych z identycznych podjednostek.

Regulowane białka, takie jak wiele enzymów i receptorów, istnieją w różnych stanach wzajemnie zmiennych pod nieobecność jakiegokolwiek regulatora. Stosunek różnych stanów konformacyjnych jest określany przez równowagę termiczną.

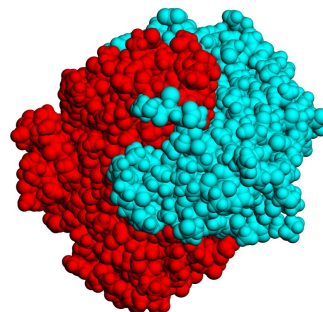
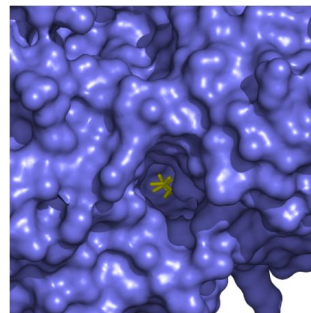
- Substrat/ligand wiąże się do jednej z dostępnych konformacji i ją stabilizuje.
- Wymuszenie dopasowania może być jednym z warunków powstania kompleksu



warunki dopasowania

Geometria kompleksu:

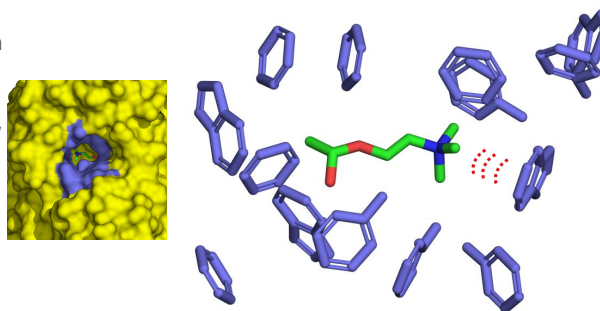
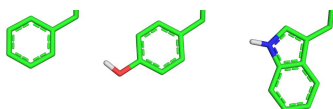
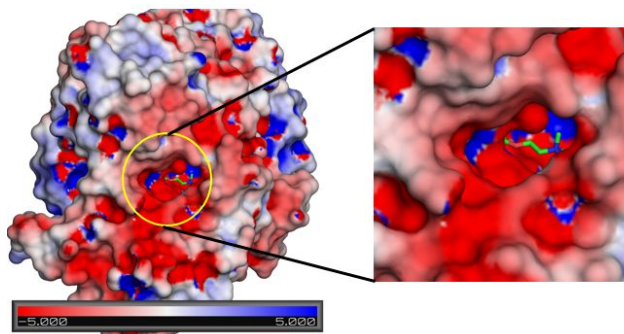
- tworzą ją:
 - wiązania van der Waalsa
 - interakcje niepolarne
- miejsce wiązania dla małych cząstek jest wyraźnym wgłębieniem
- miejsce wiązania dla peptydów/białek ma charakter płaski, odpowiada lokalnej strukturze drugorzędowej partnerów



warunki dopasowania

Ładunek

- tworzą je:
 - interakcje jonowe
 - wiązania wodorowe
 - π
- ładunki przeciwne stabilizują się wzajemnie
- aminokwasy aromatyczne w miejscu aktywnym:
 - nadają unikalny płaski kształt w miejscu aktywnym
 - tworzą obszary niepolarne ze względu na swoją objętość
 - odpowiadają za interakcje polarne poprzez chmury elektronów π

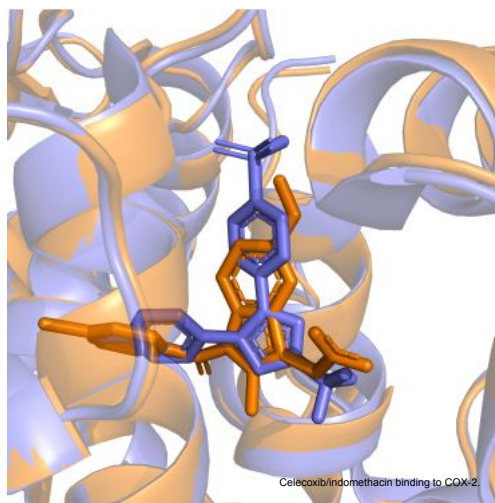


elastyczność miejsca aktywnego

Promiscuity to zdolność enzymu do katalizowania przypadkowej reakcji ubocznej oprócz jego głównej reakcji. Chociaż enzymy są niezwykle specyficznymi katalizatorami, często mogą przeprowadzać reakcje poboczne oprócz swojej głównej, natywnej aktywności katalitycznej.

Te różne aktywności są zwykle powolne w stosunku do głównej aktywności i podlegają neutralnej selekcji. Pomimo tego, że zwykle są fizjologicznie nieistotne, pod nową presją selekcyjną działania te mogą przynosić korzyści, a tym samym skłaniać do ewolucji wcześniejszej aktywności aby stała się nową główną aktywnością.

- Białka sygnałowe
- Ten sam typ ligandu, np. sterole
- Ten sam typ aktywności biologicznej, np. cytochrom P450



miejsce aktywne - kataliza

Elementy katalizy:

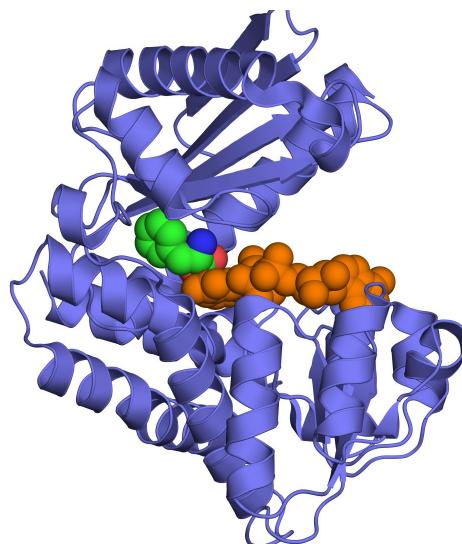
- enzym
- substrat
- kofaktor (z łac. *co-* 'współ-' i *factor* 'sprawca' od *facere* 'czynić') związki chemiczne, które są potrzebne enzymom do katalizowania konkretnych reakcji chemicznych.

Apoenzym i kofaktor tworzą katalitycznie aktywny enzym, nazywany holoenzymem.

Kofaktory można podzielić na:

- grupy prostetyczne – silnie, kowalencyjnie związane z apoenzymami
- koenzymy – luźno, niekowalencyjnie związane
- związki nieorganiczne lub jony metali, np. cynku, żelaza lub miedzi.

Enzymy z kofaktorami są zdolne do przeprowadzania reakcji biochemicznych, dla których przeprowadzania nie wyewoluowały enzymy złożone tylko z 20 aminokwasów białkowych.



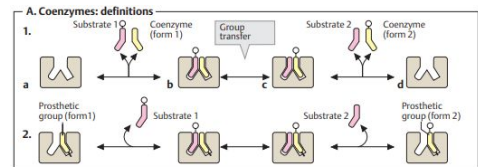
kofaktory

Funkcje:

- transfer grup funkcyjnych
- stabilizacja elektrostatyczna
- transfer protonów
- polaryzacja wiązań chemicznych
- transport substratów
- źródło energii

kofaktory koenzymy redox

Coenzyme	Oxidized form	Reduced form	Type	Transferred	E° (V)
1. NAD(P) ⁺			L	H ⁺	-0.32
2. Flavin mononucleotide (FMN)			P	2[H]	-0.3 to +0.2
3. Flavin adenine dinucleotide (FAD)			P	2[H]	-0.3 to +0.2
4. Ubiquinone (coenzyme Q)			L	2[H]	-0 to +0.2
5. Ascorbic acid			L	2[H]	+0.1



Coenzyme	Oxidized form	Reduced form	Type	Transferred	E°
6. Lipoamide			P	2[H]	-0.29
7. Iron-sulfur cluster			P	1e ⁻	-0.6 to +0.5
8. Heme			P	1e ⁻	0 to +0.5

kataliza enzymatyczna

- Enzymy są niezwykle wydajne w przyspieszeniu reakcji chemicznych.
- Enzymy są wysoce specyficzne.
- Enzymy są stereospecyficzne.
- Enzymy są specyficzne pod względem reakcji, które katalizują.

TABLE 6–5

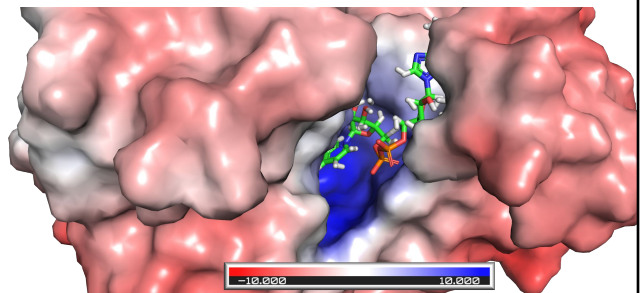
Some Rate Enhancements Produced by Enzymes

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

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

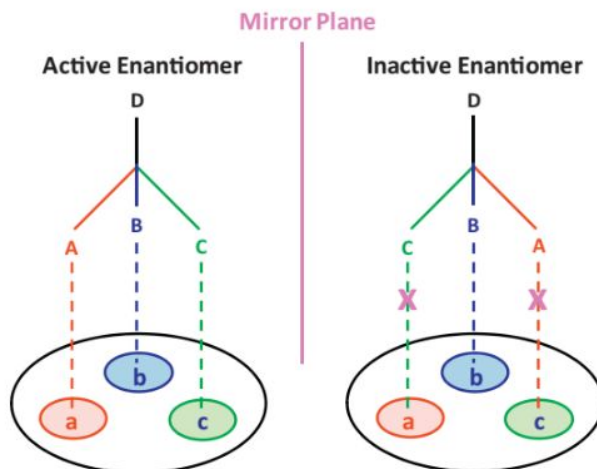
kataliza enzymatyczna

- Enzymy są niezwykle wydajne w przyspieszeniu reakcji chemicznych.
- Enzymy są wysoce specyficzne.
- Enzymy są stereospecyficzne.
- Enzymy są specyficzne pod względem reakcji, które katalizują.



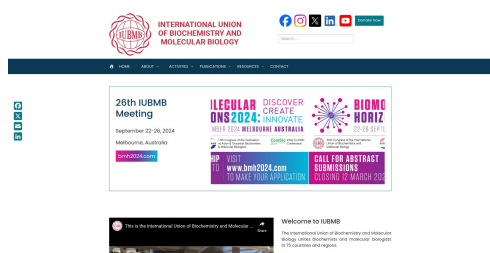
kataliza enzymatyczna

- Enzymy są niezwykle wydajne w przyspieszeniu reakcji chemicznych.
- Enzymy są wysoce specyficzne.
- Enzymy są stereospecyficzne.
- Enzymy są specyficzne pod względem reakcji, które katalizują.



kataliza enzymatyczna

- Enzymy są niezwykle wydajne w przyspieszeniu reakcji chemicznych.
- Enzymy są wysoce specyficzne.
- Enzymy są stereospecyficzne.
- Enzymy są specyficzne pod względem reakcji, które katalizują.



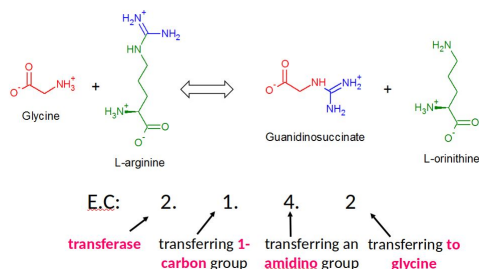
EC 1	[*] Oxidoreductases
EC 1.1	[*] Acting on the CH-OH group of donors
EC 1.2	[*] Acting on the aldehyde or oxo group of donors
EC 1.3	[*] Acting on the CH-CH group of donors
EC 1.4	[*] Acting on the CH-NH ₂ group of donors
EC 1.5	[*] Acting on the CH-NH group of donors
EC 1.6	[*] Acting on NADH or NADPH
EC 1.7	[*] Acting on other nitrogenous compounds as donors
EC 1.8	[*] Acting on a sulfur group of donors
EC 1.9	[*] Acting on a heme group of donors
EC 1.10	[*] Acting on diphenols and related substances as donors
EC 1.11	[*] Acting on a peroxide as acceptor
EC 1.12	[*] Acting on hydrogen as donor
EC 1.13	[*] Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen (oxygenases)
EC 1.14	[*] Acting on paired donors with incorporation or reduction of molecular oxygen
EC 1.15	[*] Acting on superoxide as acceptor
EC 1.16	[*] Oxidizing metal ions
EC 1.17	[*] Acting on CH or CH ₂ groups
EC 1.18	[*] Acting on iron-sulfur proteins as donors
EC 1.19	[*] Acting on reduced flavodoxin as donor
EC 1.20	[*] Acting on phosphorus or arsenic in donors
EC 1.21	[*] Catalysing the reaction X-H + Y-H = X-Y
EC 1.22	[*] Acting on halogen in donors
EC 1.23	[*] Reducing C-C-C group as acceptor
EC 1.97	[*] Other oxidoreductases
EC 1.98	[*] Enzymes using H ₂ as reductant (deleted subclass)
EC 1.99	[*] Other enzymes using O ₂ as oxidant (deleted subclass)
EC 2	[*] Transferases
EC 3	[*] Hydrolases
EC 4	[*] Lyases
EC 5	[*] Isomerases
EC 6	[*] Ligases
EC 7	[*] Translocases

numer EC

Numer EC – numer przypisany każdemu enzymowi według zasad klasyfikacji opracowanej w 1984 roku przez Komitet Nazewnictwa (ang. Nomenclature Committee) Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (ang. International Union of Biochemistry). Numery EC Enzyme Commission (Komisja Enzymatyczna) lub Enzyme Catalogue dzielą wszystkie enzymy na siedem głównych grup ze względu na typ katalizowanej reakcji. Komisja Enzymatyczna przypisała każdemu enzymowi zarekomendowaną nazwę i czteroczęściowy różnicznik numer o strukturze XX.XX.XX.XX

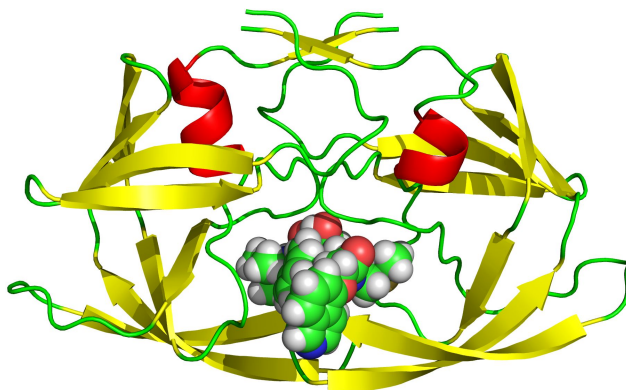
- Pierwsza liczba (1-7) oznaczają klasę enzymu.
- Druga liczba reprezentuje podklasę enzymu.
- Trzecia liczba określa podpodklasę enzymu.
- Czwarta liczba wskazuje, jakie miejsce zajmuje enzym w swojej podpodklasie.

Grupa (klasa)	Katalizator reakcji	Typowa reakcja	Przykłady enzymów wraz z pospolitymi nazwami
EC 1 <i>Oksydoreduktazy</i>	przenoszą ładunki (elektrony i jony H_3O^+ - protony) z cząsteczki substratu na cząsteczkę akceptora	$AH + B \rightarrow A + BH$ (redukcja) $A + O \rightarrow AO$ (utlenianie)	Dehydrogenazy, Oksydazy
EC 2 <i>Transferazy</i>	przenoszą daną grupę funkcjonalną (białową, aminową, itp.) z cząsteczki jednej substancji na cząsteczkę innej substancji	$AB + C \rightarrow A + BC$	Transaminazy, Kinazy
EC 3 <i>Hydrolazy</i>	katalizują rozpad substratu pod wpływem wody (hydroliza); do grupy tej należy wiele enzymów trawiennych	$AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$	Lipaza, Amylaza, Proteazy
EC 4 <i>Lizazy</i>	katalizują rozpad substratu bez hydrolizy	$RCO_2COOH \rightarrow RCOH + CO_2$	Dekarboksylazy, Hydrolazy
EC 5 <i>Izomerazy</i>	zmieniają wzajemne położenie grup chemicznych bez rozkładu szkieletu związku	$AB \rightarrow BA$	Izomerazy, Mutazy
EC 6 <i>Ligazy</i>	katalizują syntezę różnych cząsteczek; powstają wiązania chemiczne	$X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$	Ligazy
EC 7 <i>Translokazy</i>	katalizują ruch jonów i cząsteczek przez błony lub ich rozdział wewnątrz błon	$(1. \text{strona}) AX + B \rightleftharpoons A + X + \rightleftharpoons B (2. \text{strona})$	



kataliza enzymatyczna

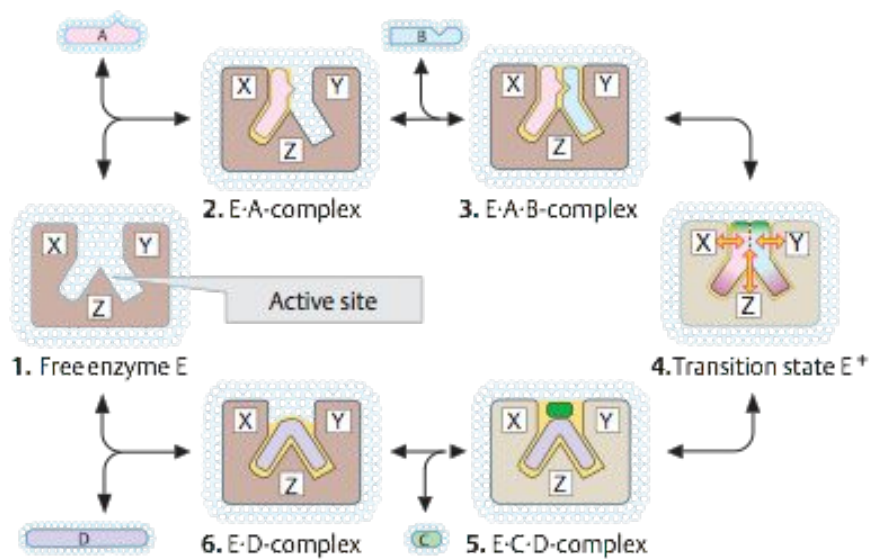
- Mogą być precyzyjnie kontrolowane poprzez:
 - związki małowczątkowe
 - modyfikacje:
 - fosforylację
 - glikozylację
 - degradację (proteoliza)



enzymy

- Kataliza
- Kinetyka
- Inhibicja

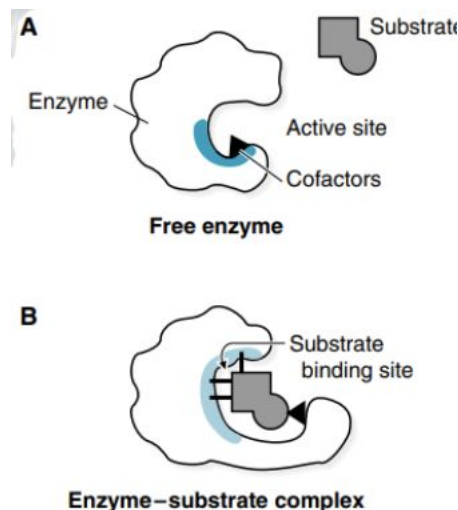
aspekty katalizy enzymatycznej



aspekty katalizy enzymatycznej

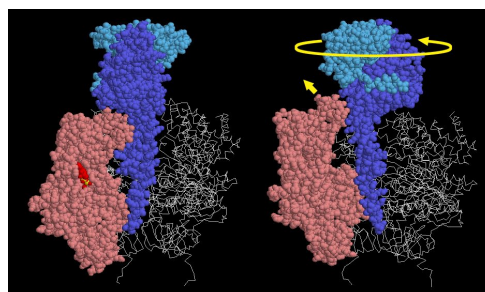
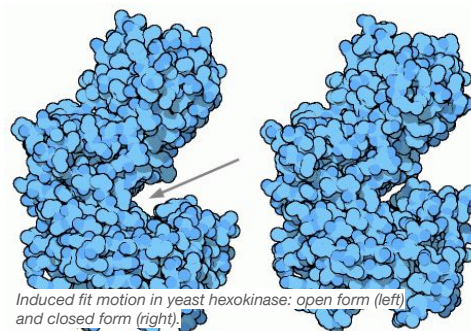
Wiązanie substratu i powstanie kompleksu enzym-substrat (ES)
Substrat(y) wiązane są na powierzchni enzymu bardzo blisko siebie w ściśle określonej konfiguracji. Ogranicza to wszelkie ruchy translacyjne i rotacyjne (substratów), które występowałyby w roztworze.

- Na początku musi dojść do zetknięcia się cząsteczki substratu i enzymu w odpowiedniej orientacji. W gruncie rzeczy proces ten jest losowy natomiast otoczenie chemiczne miejsca aktywnego enzymu może zwiększać prawdopodobieństwo takiego zetknięcia poprzez charakter chemiczny grup tworzących centrum aktywne. Specyficzność będzie zatem tutaj wynikać z komplementarności obu struktur (tj. enzymu i substratu) na poziomie struktury geometrycznej (zawady przestrzenne etc.) jak również obecności określonych grup chemicznych (oddziaływania elektrostatyczne etc.).
- Po zetknięciu, substrat jest „układany” w miejscu aktywnym w odpowiedniej orientacji głównie za pomocą słabych oddziaływań niekowalencyjnych. Na tym etapie nie można wykluczać wstecznej reakcji dysocjacji substratu od enzymu (proces jest bardzo dynamiczny i zależy od warunków otoczenia np. stężenie substratu).
- Jeśli nie dochodzi do dysocjacji (proces mniej prawdopodobny ale nie niemożliwy) substratu z miejsca aktywnego to mamy do czynienia z utworzeniem kompleksu enzym-substrat (ES)



aspekty katalizy enzymatycznej

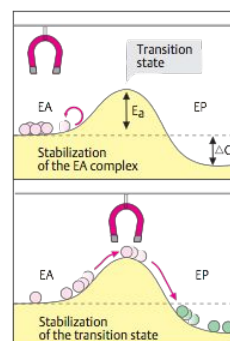
- Miejsce aktywne enzymu niekoniecznie musi być komplementarne do substratu(ów), obserwuje się zmiany pozycji atomów enzymu kiedy związany jest substrat. Zmiana ta powoduje lepsze dopasowanie między substratem i enzymem i powoduje, że reaktywne grupy enzymu ustawiają się w odpowiednim miejscu (tzw. wymuszone dopasowanie).
- Przykładem może być heksokinaza fosforylująca glukozę – związanie glukozy powoduje zmianę konformacji enzymu i zamknięcie cukru w kieszeni tworzącej miejsce aktywne, to z kolei powoduje ustawienie w odpowiednim miejscu grup reaktywnych biorących udział w katalizie
- Jest to dobry przykład zachowania białek jak motory molekularne - gdy pojawiają się te zmiany konformacyjne, wykonywana jest praca mechaniczna, umożliwiającą enzymowi wywieranie siły fizycznej na wiązania w cząsteczce substratu. To ma wpływ na destabilizację substratu, pozwalając mu przyjąć stan przejściowy, w którym naprężenia zostają zwolnione.



aspekty katalizy enzymatycznej

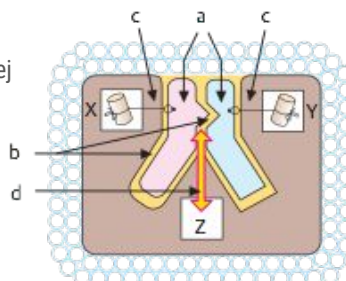
Działanie enzymu wygląda więc jak magnes na obrazku – aby substraty o energii E_a zmieniły się w produkty z energią E_p , muszą przejść wysokoenergetyczny stan przejściowy.

Rolą enzymu jest pomoc w pokonaniu tej różnicy potencjałów.



Enzymy osiągają ten cel poprzez:

- zbliżenie i ustawienie substratów we właściwej orientacji,
- usunięcie powłoki hydratacyjnej,
- stabilizację stanu przejściowego,
- kontrolowane przeniesienie grup funkcyjnych.



- a. Przybliżenie kształtu i orientacji przestrzennej substratu/ów.
- b. Wykluczenie wody z miejsca aktywnego.
- c. Stabilizacja stanu przejściowego.
- d. Przeniesienie grup funkcyjnych.

teorie mechanizmu katalizy enzymatycznej

- Hipoteza elektrostatycznej stabilizacji stanu wzbudzonego
W skrócie, mechanizm ten polega na istnieniu silnie naładowanych, odpowiednio rozmieszczonych i odpowiednio zorientowanych ugrupowań, stanowiących miejsce katalityczne enzymu. Grupy te biorą udział w tworzeniu i stabilizacji zdecydowanie polarnego stanu wzbudzonego substratów.
- Wiązania wodorowe o niskiej barierze
Możliwość tworzenia w miejscu aktywnym wiązań wodorowych o znacznie bardziej kowalencyjnym charakterze niż zwykle wiązania wodorowe powstające w roztworze wodnym. Właśnie takie mocne wiązania wodorowe biorą udział w stabilizacji polarnego stanu wzbudzonego; natomiast przyczyną zwiększenia ich mocy oraz przyczyną nadania im charakteru kowalencyjnego jest niska polarność środowiska wnętrza centrum aktywnego enzymów.
- Hipoteza desolvatacji
Oparta o dane wskazujące na głównie hydrofobowy charakter reszt wyścielających kieszeń centrum aktywnego enzymów, zakłada cofanie polaryzacji reaktywnych elementów substratów podczas ich przejścia ze stanu podstawowego w stan przejściowy.

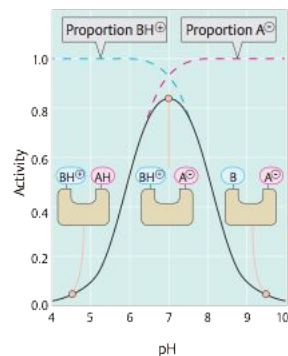
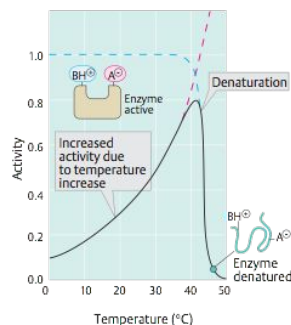
aspekty katalizy enzymatycznej

Aktywność enzymatyczna ma ścisły związek z jego strukturą przestrzenną, tzw. konformacją natywną.

W momencie zniszczenia tej struktury, denaturacji, właściwości enzymatyczne zanikają.

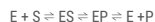
Oddziaływania stabilizujące:

- wiązanie/mostki disiarczkowe,
- wiązania wodorowe,
- tworzenie kompleksów,
- efekty hydrofobowe.



moc katalityczna

Enzymy nie zmieniają równowagi chemicznej reakcji tylko powodują jej przyspieszenie. Równanie najprostszej reakcji enzymatycznej ma postać:



Bariera energetyczna pomiędzy S a P jest energią potrzebną do:

- przemieszczenia reagujących grup,
- tworzenia przejściowych,
- niestabilnych zmian ładunków cząsteczek,
- reorganizacji wiązań i innych przemian niezbędnych do zajścia reakcji.

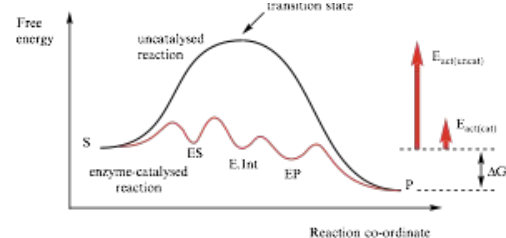
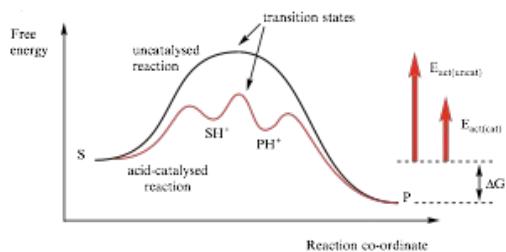
Wszystko to obrazuje pik na wykresie energii związanej z reakcją enzymatyczną

Wierzchołek tego piku jest punktem w którym rozpad kompleksu z enzymem do S i E lub P i E jest równie prawdopodobne – punkt ten nazywamy stanem przejściowym.

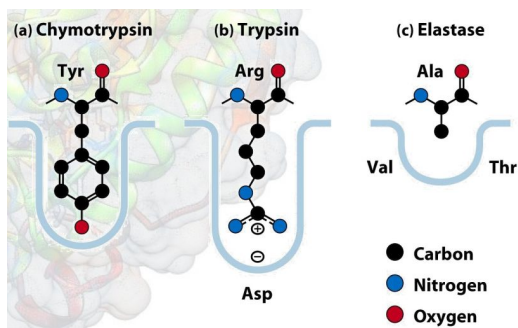
Jest to stan energetyczny a nie żaden pośredni etap reakcji, czy związek pośredni – jest to płynny moment, w którym zrywanie wiązań, tworzenie wiązań czy przenoszenie ładunków dochodzi do takiego momentu, gdzie równie prawdopodobne jest uzyskanie S jak i P.

Różnica między energią (potencjałem) produktu i substratu to energia aktywacji $\Delta G^\ddagger$ – energię tą można obniżyć poprzez dodanie katalizatora – enzymu

Katalizator zwiększa szybkość reakcji poprzez obniżenie energii aktywacji.



specyficzność enzymów



- Każdy enzym jest specyficzny w działaniu i katalizuje tylko jedną lub kilka powiązanych reakcji chemicznych.
- Specyficzność enzymów jest wynikiem unikalnej struktury i kształtu aktywnego miejsca, w którym substrat łączy się z enzymem.
- Aktywne miejsce enzymu ma specyficzne grupy funkcyjne, które oddziałują z substratem i umożliwiają przeprowadzenie reakcji chemicznej.
- Specyficzność enzymów jest kluczowa dla utrzymania homeostazy organizmu, ponieważ każda reakcja musi być przeprowadzana z dokładnością i skutecznością.
- Specyficzność enzymów może być modyfikowana przez zmiany warunków fizycznych i chemicznych, takich jak pH, temperatura, ilość substratu i inhibitorów.
- Przykładem specyficzności substratowej są trzy proteazy: trypsyna, chymotrypsyna oraz elastaza – katalizują tę samą reakcję hydrolizy wiązania peptydowego, lecz dokonują tego na różnych odcinkach łańcucha polipeptydowego substratu.

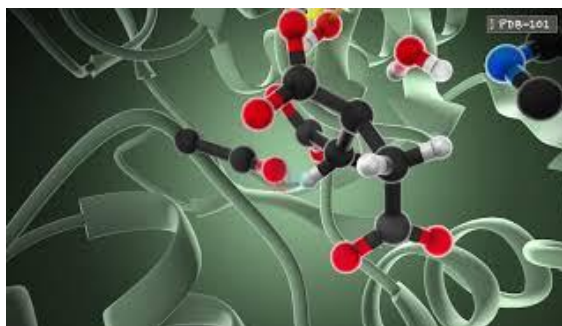
regulacja aktywności enzymatycznej

To które reakcje chemiczne i z jaką szybkością zachodzą w organizmie można regulować na różne sposoby, aby zaspokoić potrzeby metaboliczne komórki. Nie wszystkie enzymy w organizmie człowieka są poddawane regulacji.

- Główne rodzaje regulacji aktywności enzymów:
 - Regulacja allosteryczna: Aktywność enzymu jest kontrolowana przez wiązanie cząsteczki w innym miejscu niż miejsce aktywne enzymu. Wiązanie cząsteczki może aktywować lub hamować enzym.
 - Regulacja izosteryczna: Aktywność enzymu jest regulowana w miejscu aktywnym poprzez związanie określonych aktywatorów/inhibitorów reakcji
 - Modyfikacja kowalencyjna: Aktywność enzymu jest kontrolowana przez dodanie lub usunięcie grupy chemicznej, takiej jak np. grupa fosforanowa, metylowa, ubikwitynowa. Te modyfikacje mogą aktywować lub hamować enzym.
 - Proteolityczna aktywacja niektórych enzymów: proteolityczne odcięcie zbędnego fragmentu białkowego u niektórych enzymów powoduje jego aktywację.
- Reakcje chemiczne zachodzące w organizmie mogą być również regulowane poprzez kontrolę poziomu biosyntezy poszczególnych enzymów (operony, ryboprzełączniki, hormony, degradacja enzymów)
- Występowanie izozymów o różnej aktywności enzymatycznej pozwala kontrolować szybkość niektórych reakcji chemicznych
- Szybkość reakcji chemicznych w organizmie (i nie tylko) może być regulowana również poprzez zmiany stężeń substratów, stosunku stężeń substratów/produkty, zmiany dostępności kofaktorów, wartości pH, temperatury itd.

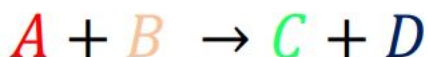
kinetyka enzymów

- Kinetyka enzymatyczna zajmuje się badaniem przebiegu reakcji (przede wszystkim szybkości) biochemicznych z udziałem katalizatorów, którymi w tym przypadku są enzymy.
- Określenie kluczowych parametrów kinetycznych w różnych warunkach pozwala dowiedzieć się jak szybko działa enzym, jak mocno wiąże substraty aby stworzyć kompleks enzym-substrat (ES), który jest kluczowy dla katalizy, ale również jak bardzo specyficzny jest enzym w stosunku do struktury substratu i jak wpływają na jego działanie różne związki: inhibitory i aktywatory katalizy.
- Szybkość reakcji katalizowanej enzymatycznie zależy od szeregu czynników. Najważniejsze to:
 - Stężenie substratu/enzymu/produktu
 - Temperatura
 - pH środowiska
 - Obecność i stężenie kofaktorów
 - Obecność i stężenie aktywatorów
 - Obecność i stężenie inhibitorów

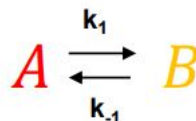


kinetyka enzymów

- Kinetyka enzymatyczna zajmuje się badaniem przebiegu reakcji (przede wszystkim szybkości) biochemicznych z udziałem katalizatorów, którymi w tym przypadku są enzymy.
- Szybkość reakcji chemicznej może być opisywana poprzez określenie jak szybko ubywa substratu lub jak szybko przybywa produktu. Co ważne, nie jest to wielkość stała, ponieważ zmienia się w czasie przebiegu reakcji. Największa jest na początku reakcji, a najmniejsza pod koniec.



$$V = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[B]}{\Delta t} = \frac{\Delta[C]}{\Delta t} = \frac{\Delta[D]}{\Delta t}$$



- Równanie kinetyczne reakcji i stałe szybkości:
- Szybkość powyższej elementarnej reakcji chemicznej można opisać przy wykorzystaniu równania kinetycznego reakcji. Równanie szybkości reakcji (kinetyczne) zależy od stałej szybkości (proporcjonalności) k oraz zazwyczaj od efektywnego stężenia substratów (z wyjątkiem reakcji 0-rzędu).

$$\text{Szybkość reakcji naprzód} = V = k_1[A]$$

$$\text{Szybkość reakcji wstecz (powrotnej)} = V = k_{-1}[B]$$

kryteria podstawowe pomiarów enzymatycznych

Warunki fizykochemiczne:

- o roztwory i siła jonowa
- o pH
- o punkt izoelektryczny
- o temperatura

Aspekty molekularne:

- o substraty
- o kofaktory

Effect	Conditions of inactivation	Protection
Temperature	High temperature Very low temperature (seldom)	Low temperature ($\sim 4^{\circ}\text{C}$)
pH	Extreme (low and high) pH values	pH optimum
Ionic strength	Very high ($>1\text{ M}$) and very low ($<10\text{ mM}$) electrolyte concentrations ^a	Medium electrolyte concentration ($\sim 0.05\text{--}0.2\text{ M}$)
Proteolysis	Contaminations with proteases, not completely removed by purification procedure	Protease inhibitors (cf. Table 2.3) Use of recombinant enzymes
Chemical modification	Contamination with reactive reagents (SH-active compounds)	High purity of all components Avoidance of oxidative conditions Chelating reagents
SH poisoning	Oxidative conditions, promoted by heavy metal ions	SH reagents, mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE)

roztwory i siła jonowa

Lokalizacja komórkowa enzymów wpływa na optymalne warunki pomiaru aktywności:

- o enzymy błonowe
preferują apolarne warunki, np. rozpuszczalniki organiczne.
- o enzymy wewnątrzkomórkowe
preferują warunki zgodne z ich naturalnym środowiskiem, a więc wodne (polarne) roztwory.

Obecność niewielkich ilości rozpuszczalników w warunkach pomiarowych może być jednak konieczna i wynikać z konieczności wprowadzenia do układu badawczego substancji nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczalnych w roztworach wodnych np. substratów reakcji, kofaktorów.

Najczęściej wykorzystuje się:

- o alkohole (etanol, metanol, propanol),
- o aceton,
- o tetrahydrofuran,
- o dimetylosulfotlenek (DMSO).

Należy sprawdzić czy substancje te nie mają charakteru inhibitorów danej reakcji!

roztwory i siła jonowa

Wszystkie odczynniki użyte w czasie badania aktywności muszą być neutralne w stosunku do enzymu oraz wszystkich komponentów reakcji.

Optymalizacji wymagają:

- o stężenia wszystkich komponentów roztworu:
 - objętości enzymu i jego rozcieńczenia,
 - stężenia substratów (możliwa jest inhibicja przy nadmiernym stężeniu jednego z komponentów),
- o oddziaływania pomiędzy komponentami roztworu:
 - mieszaniny składników mogą wpływać na wzajemną rozpuszczalność, np. dwuwartościowe kationy w buforach fosforanowych,
 - poziom redox podlega wpływowi czynników środowiskowych, np. tlen atmosferyczny.
- o poziom siły jonowej roztworu (zazwyczaj ca. 0.1M),

Większość enzymów wykazuje tolerancję w stosunku do warunków prowadzenia reakcji.

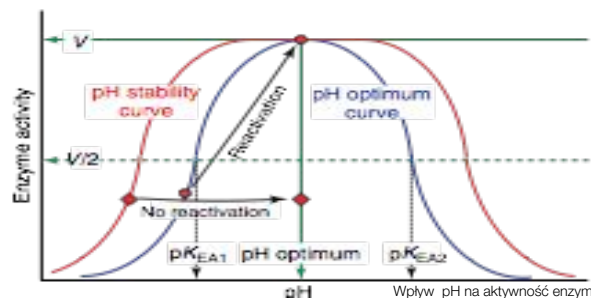
zależność od pH

Zależność od pH roztworu jest związana z:

- o wykorzystaniem przez enzymy naładowanych grup w mechanizmach katalitycznych,
- o enzymy są substancjami amfoterycznymi,

Analizując krzywą stabilności pH należy brać pod uwagę:

- o wpływ pH na stabilność struktury,
- o występowanie punktu izoelektrycznego (IP),
- o odwracalność procesu.



Wpływ pH na aktywność enzymu. Krzywe przedstawiają aktywność enzymu w różnym pH i jego wpływ na: stabilność oraz optymalną aktywność.

Amfoteryczność
[gr. amphóteros 'dwustronny'],
właściwość niektórych związków chemicznych i jonów polegająca na wykazywaniu przez nie zarówno kwasowego, jak i zasadowego charakteru.

pK_a

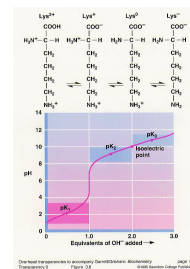
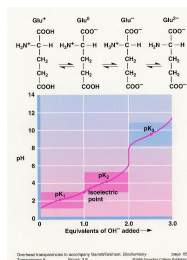
pK_a wartość pH odpowiadająca stanowi, w którym grupa funkcyjna jest w połowie protonowana. Punkt ten można określić wyznaczając punkt przegięcia na krzywej miareczkowania.

Krzywa miareczkowania białka może być traktowana jako wypadkowa krzywych miareczkowania poszczególnych aminokwasów.

Wyznaczenie optymalnego pK_a dla danej reakcji enzymatycznej pozwala wnioskować o aminokwasach biorących udział w mechanizmie reakcji pod warunkiem:

- o iż pojedynczy aminokwas jest związanych z katalizą,
- o środowisko reakcji i miejsca aktywnego nie wpływa na pK_a aminokwasu (możliwe przesunięcia o 1-2 jednostki pH).

Amino acid	pK_a
Aspartic acid	3.86
Glutamic acid	4.32
Histidine	6.09
Cysteine	8.30
Serine	9.15
Tyrosine	10.33
Threonine	10.43
Lysine	10.53
Arginine	12.30



stabilność temperaturowa

Reguła Van Hoff'a
szybkość reakcji enzymatycznej
zwiększa się 2-3 krotnie przy zmianie
temperatury o 10 stopni.

Praktycznie w wyższych temperaturach
enzymy ulegają nieodwracalnej
denaturacji i tracą aktywność.

$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$

Transforming into the logarithm

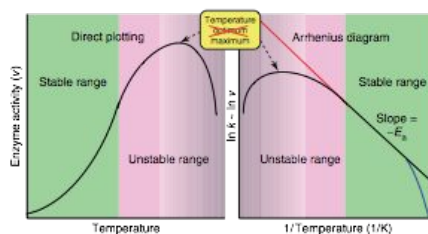
$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.303RT}$$

$$\log \frac{k_1}{k_2} = \frac{E_a}{2.303R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

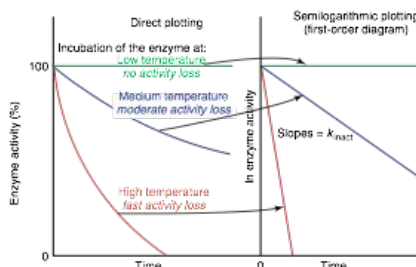
Definitions

- E_a : activation energy
- A : collision factor
- T : absolute temperature
- R : gas constant
- k : catalytic rate constant (can be replaced by the velocity v)



Zależność temperaturowa aktywności enzymatycznej w układzie bezpośrednim i na wykresie Arrhenius'a.

Krzywa eksperymentalna (czarna), teoretyczna (czerwona), fizjologiczna (niebieska).



stabilność temperaturowa

Konsekwencje niestabilności temperaturowej:

- Odstępstwa w obszarze liniowym mogą wynikać ze zmian strukturalnych izoenzymów.
- Enzymy tracą stabilność w wysokich temperaturach.
- Po przekroczeniu maksimum następuje gwałtowna utrata aktywności.

Jak dobrać warunki reakcji:

- Wykres w oparciu o równanie Arrhenius'a powinien znajdować się w zakresie liniowym,
- Energia aktywacji powinna być w zakresie 40-60 kJ mol⁻¹

Temperature (°C)	Reasons in favor	Reasons against
25	Slightly above room temperature Easy to maintain No need for preincubation of the assay mixture Suited especially for thermosensitive enzymes	Low enzyme activities Relatively high enzyme amounts required per assay
30	Only modest tempering necessary Closer to physiological conditions Medium enzyme activity Reasonable enzyme requirement	Preincubation of assay mixture required
37	Physiological temperature High enzyme activities Low enzyme amounts required	Preincubation of assay inevitably Long warming up intervals Risk of incipient inactivation

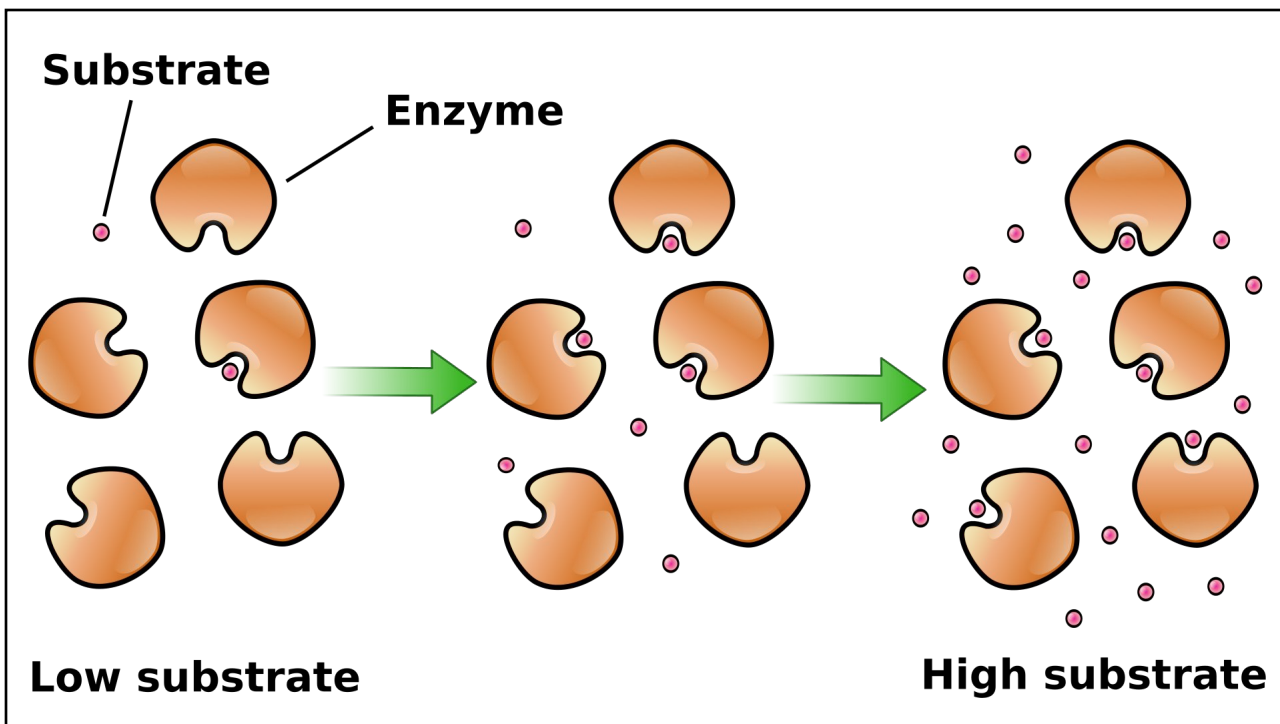
czynniki stabilizujące enzymy

•Kationy metali:

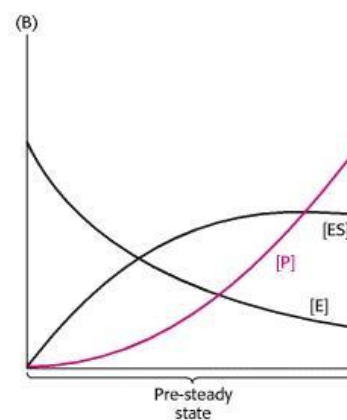
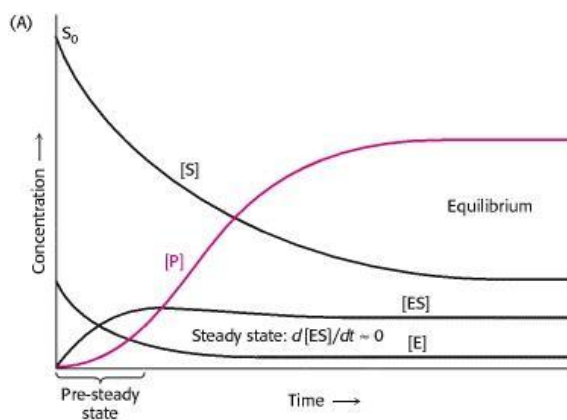
- jedno i dwu wartościowe,

- Związki chelatujące
- Tiole
- Inhibitory proteaz
- Białka pomocnicze
- Antyutleniacze ("pułapki tlenowe")

Monovalent cations	K ⁺ , Na ⁺	Dependent on special enzyme requirements, ~0.1 M	Essential for several enzyme reactions and for protein structure (counterions of surplus charges)
Bivalent cations	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Dependent on special enzyme requirements, ~1 mM	Components of several buffers
Chelate former	EDTA, EGTA	1–2 mM	Cofactors of several enzyme reactions (metalloproteases, kinases, neutralization of di- and triphosphates (e.g., ATP, GTP, ThDP))
Thiol reagents	DTT, DTE, mercaptoethanol	0.1–0.2 mM	Stabilization of protein structure
Protease inhibitors	α ₁ -macroglobulin, leupeptin	~0.5 μg ml ⁻¹	Capture divalent cations to protect from oxidative processes, however also removal of cations essential for catalysis and structure
	E64, calpain inhibitor 1	~0.01 mg ml ⁻¹	Protects SH group from oxidation and formation of –S–S– bridges
	EDTA	1 mM	General protease inhibitors
	Serum albumin	1 mg ml ⁻¹	Inhibitors for serine and cysteine proteases
	GOD/catalase	cf. assay in Section 3.3.1.14	Inhibits serine proteases, unstable in aqueous solution (0.5 h half-life)
	sodium dithionite	~0.1 mM	Inhibits cysteine proteases
Proteins			Inhibit metalloproteases by complexing of divalent cations
Oxygen traps			Protects against denaturation especially in diluted solutions
			Prevent oxidative modifications
			Strong reducing reagent



przebieg reakcji enzymatycznej

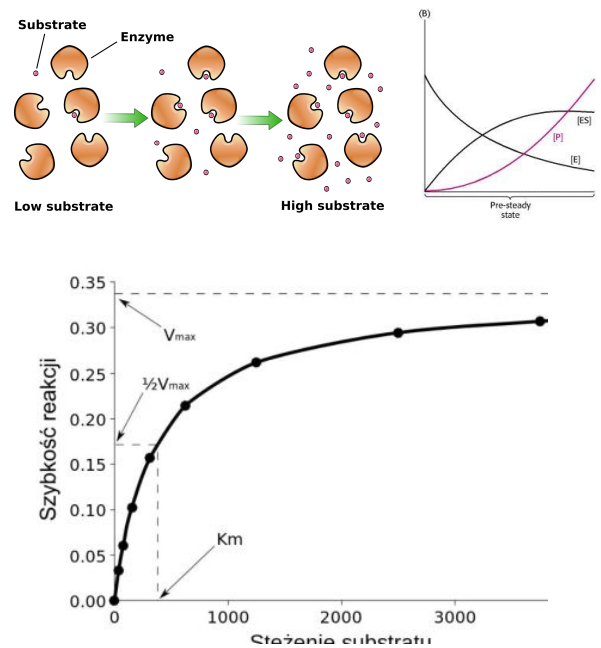


szybkość reakcji enzymatycznej

Szybkość całej reakcji możemy mierzyć eksperymentalnie.

Aby wyznaczyć wartości najważniejszych parametrów kinetycznych reakcji katalizowanych enzymatycznie najczęściej wykonuje się pomiar szybkości (najczęściej szybkości początkowej!) reakcji dla różnych stężeń substratu.

W wyniku takiego eksperymentu wykreślić można następującą zależność ->



model Michaelis-Menten

Leonor Michaelis



Born 16 January 1875
Berlin, German Empire
Died 8 October 1949 (aged 74)
New York City, United States
Nationality German

Maud Leonora Menten

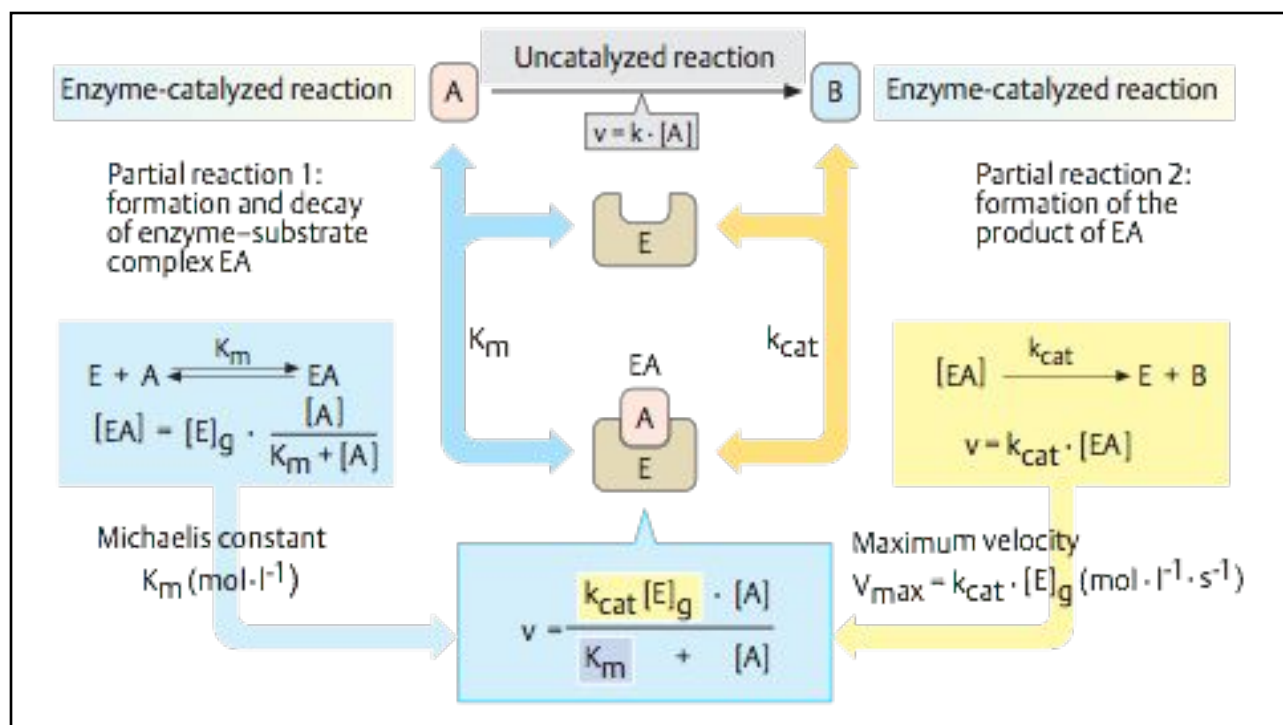


Born 20 March 1879
Died July 17, 1960 (aged 81)
Leamington, Ontario, Canada
Nationality Canadian

Badając eksperymentalnie reakcję enzymatyczną, analizujemy jej początkowy przebieg czyli w momencie gdy czas jest bliski zeru ($t \sim 0$), a szybkość reakcji jest szybkością początkową ($V = V_0$).

W takim momencie reakcji niewiele produktu zdążyło się utworzyć więc reakcja powrotna tworzenia się kompleksu ES od produktu i enzymu jest zaniedbywalna.

W reakcjach egzoenergetycznych łatwiej o spełnienie tego założenia.



Inhibicja

Biologiczne zahamowanie lub opóźnienie procesu enzymatycznego w organizmie.

Podstawowe typy inhibicji:

- allosteryczna
- kompetycyjna
- niekompetycyjna

Szczególnym przypadkiem są inhibitory akompetycyjne, które obniżają zarówno $V_{\max}$ jak K_m .
Ich działanie polega na wiązaniu się do kompleksu enzym-substrat.

Kinetyka enzymów – Inhibicja

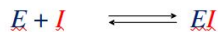
- Aby systemy biologiczne mogły wydajnie i bezpiecznie funkcjonować, muszą być w stanie regulować aktywność enzymów. Częsteczki mające zdolność do hamowania (inhibowania) lub blokowania aktywności enzymów nazywamy inhibitorami.

- Ze względu na siłę wiązania inhibitora z enzymem, wyróżnić możemy inhibicję odwracalną i nieodwracalną:

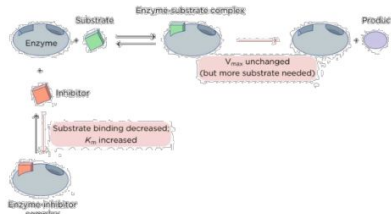
- Inhibicja nieodwracalna – niektóre inhibitory wiążą się z enzymami bardzo mocno (oddziaływania kowalencyjne lub bardzo silne niekowalencyjne). Mają one bardzo duże powinowactwo do enzymów i po związaniu się z nimi, bardzo trudno jest o dysocjację takich kompleksów. Przykładami takich inhibitorów są m.in. penicylina czy aspiryna.



- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksem z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna i mieszana:



- Inhibicja kompetycyjna – w tego typu inhibicji, cząsteczka hamująca aktywność enzymu bardzo często przypomina strukturalnie cząsteczkę substratu przez co konkuruje z nią o dostęp do miejsca aktywnego



Inhibitory kompetycyjne bardzo często mają dużo większe powinowactwo do enzymu niż naturalne substraty. Jednakże, jeśli wystarczająco zwiększymy stężenie substratu to cząsteczki substratu mogą zacząć wypierać inhibitor z miejsca aktywnego enzymu. W tym przypadku zatem zwiększanie stężenia substratu będzie cofać hamujący wpływ inhibitora. Metotreksat (lek przeciwnowotworowy) jest przykładem kompetycyjnego inhibitora reduktazy dihydrofolanowej.

Inhibicja kompetycyjna

- kompetycyjne

Hamowanie kompetycyjne, inhibicja konkurencyjna – współzawodniczenie inhibitora z substratem o miejsce aktywne enzymu. Przy dużych stężeniach substratu inhibitor zostaje wyparty.

Substrat i inhibitor konkurują o miejsce katalityczne (aktywne) w taki sposób, że zwiększenie stężenia jednego z nich powoduje przesunięcie szybkości reakcji na jego korzyść. Jeśli stężenie substratu będzie przewyższać stężenie inhibitora, to szybkość reakcji zmniejszy się nieznacznie albo w ogóle nie ulegnie zmianie. Jeśli przeważać będzie ilość inhibitora w roztworze, to katalizowana reakcja ulegnie zahamowaniu. W przypadku inhibicji kompetycyjnej powinowactwo enzymu do substratu się zmniejsza (stała Michaelisa rośnie).

Inhibicja kompetycyjna

Wiąże się z bezpośrednim oddziaływaniem w obszarze miejsca aktywnego.

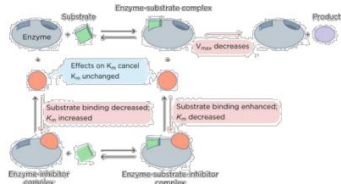
Analogi substratów i analogi stanu przejściowego mają właściwości zbliżone do substratu, są wiązane przez enzym, ale nie zamieniane w produkt, przez co blokują miejsce aktywne, potrzebne jest zwiększenie stężenia substratu aby osiągnąć prędkość maksymalną więc K_m rośnie, natomiast sama wartość V_{max} się nie zmienia. Przez to że inhibitory te konkurują z substratem o miejsce aktywne, zwiększenie stężenia substratu pozwala na usunięcie inhibitora z centrum aktywnego



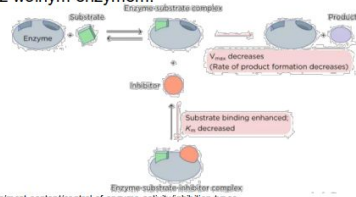
Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksu z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna i mieszana:

- o **Inhibicja niekompetycyjna** – inhibitor niekompetycyjny nie wiąże się z enzymem w miejscu aktywnym, a w miejscu allosterycznym. Bardzo często powoduje to zmianę konformacji białka. Wiązanie inhibitora nie ma jednak wpływu na efektywność wiązania substratu, zaś wiązanie substratu nie ma wpływu na wiązanie inhibitora. Inhibitor może wiązać się do wolnego enzymu lub kompleksu enzym-substrat. Powstały kompleks enzym-substrat-inhibitor jest katalitycznie nieaktywny.



- o Inhibicja akompetycyjna – bardzo rzadki mechanizm hamowania reakcji. Polega na wiązaniu się inhibitora tylko do utworzonego już kompleksu enzym-substrat. Równocześnie inhibitor nie ma zdolności wiązania się z wolnym enzymem.



Inhibicja niekompetycyjjna

- niekompetycyjna

Inhibitor niekompetycyjny wiąże się w zupełnie innym miejscu enzymu niż centrum aktywne i centrum allosteryczne. Jeśli inhibitorem jest duża cząsteczka, zachodzi sytuacja, w której cząsteczka ta wiąże się do domeny białka zawierającej centrum aktywne. Wiązanie to nie wpływa na strukturę części enzymatycznej białka, ale zasłania wejście do centrum aktywnego, przez co enzym jest nieaktywny. W przypadku kiedy inhibitor przyłączy się tak, że będzie zasłaniał centrum tylko częściowo lub w ogóle, reakcja będzie zachodziła, jednakże wolniej. Inhibitory niekompetycyjne nieodwracalne nie wykazują strukturalnego podobieństwa do substratu, zwiększenie stężenia substratu na ogół nie zmniejsza hamowania.

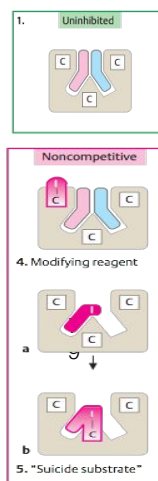
Inhibicja niekompetycyjna

Gdy inhibitor oddziałuje z ważnym dla katalizy elementem/grupą funkcyjną powoduje on zmniejszenie ilości funkcjonalnego enzymu w środowisku.

Wyróżniamy:

- inhibitory odwracalne modyfikujące enzym,
- inhibitory nieodwracalne, samobójcze powodujące trwałą deaktywację enzymu.

W tym przypadku K_m pozostaje niezmienione a V_{max} zmniejsza się.



Kinetyka enzymów – Inhibicja

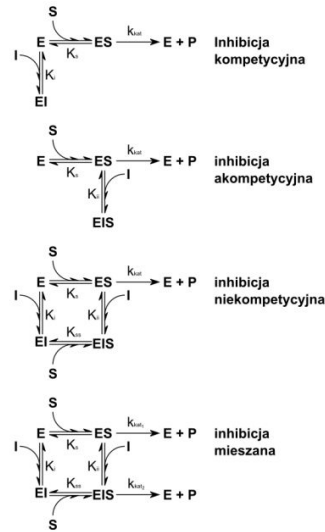
- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksu z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna i mieszana:
 - Inhibicja mieszana – inhibitor może wiązać się z wolnym enzymem oraz kompleksem enzym-substrat (jak w inhibicji niekompetycyjnej), natomiast w tym przypadku ma on różne powinowactwo do obu form (np. lepiej wiąże się z kompleksem ES niż z wolnym enzymem lub odwrotnie). Inhibicja niekompetycyjna jest zatem szczególnym przypadkiem inhibicji mieszanej gdy inhibitor ma identyczne powinowactwo do kompleksów ES oraz ESI.
- Inhibitory poprzez swoje działanie wpływają na parametry kinetyczne reakcji enzymatycznej, którą hamują/blokują. W zależności jednak od mechanizmu inhibicji, parametry V_{max} i K_M zmieniać się będą w inny sposób:

Typ inhibitora	Miejsce wiązania	Ingeruje w wiązanie się substratu?	Wpływ na wartość K_M	Wpływ na wartość V_{max}
Kompetycyjny	Wolny enzym (centrum aktywne)	Tak	Zwiększa	Nie zmienia
Niekompetycyjny	Wolny enzym lub kompleks ES	Nie	Nie zmienia	Obniża
<u>Akompetycyjny</u>	Kompleks ES	Nie	Obniża	Obniża
Mieszany	Wolny enzym lub kompleks ES	Nie	Zwiększa lub obniża	Obniża

Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Inhibicja odwracalna – cechą charakterystyczną inhibitorów odwracalnych jest względna prostota ich dysocjacji z kompleksu z enzymem przez co ich efekt hamujący może być odwracalny. Wyróżniamy cztery rodzaje inhibicji odwracalnej: kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna i mieszana:

- Inhibicja kompetycyjna – w tego typu inhibicji, cząsteczka hamująca aktywność enzymu bardzo często przypomina strukturalnie cząsteczkę substratu przez co konkuruje z nią o dostęp do miejsca aktywnego
- Inhibicja niekompetycyjna – inhibitor niekompetycyjny nie wiąże się z enzymem w miejscu aktywnym, a w miejscu allosterycznym. Bardzo często powoduje to zmianę konformacji białka. Wiązanie inhibitora nie ma jednak wpływu na efektywność wiązania substratu, zaś wiązanie substratu nie ma wpływu na wiązanie inhibitora. Inhibitor może wiązać się do wolnego enzymu lub kompleksu enzym-substrat. Powstały kompleks enzym-substrat-inhibitor jest katalitycznie nieaktywny.
- Inhibicja akompetycyjna – bardzo rzadki mechanizm hamowania reakcji. Polega na wiązaniu się inhibitora tylko do utworzonego już kompleksu enzym-substrat. Równocześnie inhibitor nie ma zdolności wiązania się z wolnym enzymem.
- Inhibicja mieszana – inhibitor może wiązać się z wolnym enzymem oraz kompleksem enzym-substrat (jak w inhibicji niekompetycyjnej), natomiast w tym przypadku ma on różne powinowactwo do obu form (np. lepiej wiąże się z kompleksem ES niż z wolnym enzymem lub odwrotnie). Inhibicja niekompetycyjna jest zatem szczególnym przypadkiem inhibicji mieszanej gdy inhibitor ma identyczne powinowactwo do kompleksów ES oraz ESI.



Kinetyka enzymów – Inhibicja

- Obecnie w medycynie wykorzystuje się szereg leków, których działanie polega na hamowaniu aktywności enzymów:

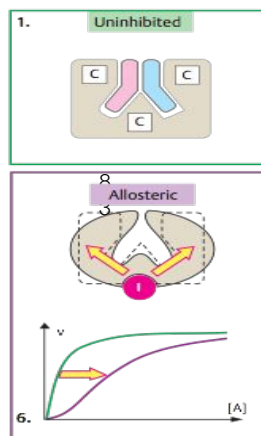
Nazwa leku	Choroba	Enzym docelowy
<u>Acetazolamid</u>	Jaskra	Anhidraza węglanowa
<u>Acyklovir</u>	Opryszczka	Wirusowa polimeraza DNA
<u>Allopurinol</u>	Dna moczanowa	Oksydaza ksantynowa
Aspiryna	Stany zapalne	<u>Syntaza prostaglandynowa</u>
<u>Azydetymidyna</u>	AIDS	Odwrotna transkryptaza HIV
<u>Captopril</u>	Nadciśnienie	Enzym aktywujący angiotensynę
<u>Crixivan</u>	AIDS	Proteaza HIV
<u>Enoximone</u>	Niewydolność serca	Fosfodiesteraza <u>cAMP</u>
<u>Fenelzyna</u>	Depresja	Oksydaza <u>monoaminowa</u>
<u>Fluorouracyl</u>	Nowotwory	<u>Syntaza tymidylanowa</u>
Ibuprofen	Stany zapalne	<u>Syntaza prostaglandynowa</u>
<u>Lowaslatyna i inne statyny</u>	Miażdżyca	<u>Reduktaza HMG-CoA</u>
<u>Metrotrekstat</u>	Ostra białaczka	<u>Reduktaza dihydrofolianowa</u>
<u>Nitecapone</u>	Choroba Parkinsona	<u>Metylotransferaza katecholowa</u>
<u>Pantoprazol</u>	Wrzody żołądka	H ⁺ K ⁺ -ATPaza
Penicylina i jej pochodne	Infekcje bakteryjne	Bakteryjna <u>transpeptydaza</u>
<u>Sorbitol</u>	Retinopatia <u>cykliczowa</u>	<u>Reduktaza aldolowa</u>
<u>Zileuton</u>	Alergia, astma	<u>5-lipooksygenaza</u>

Inhibicja allosteryczna

- allosteryczna

Obniżenie aktywności katalitycznej enzymu w wyniku zmiany jego konformacji spowodowanej przyłączeniem się inhibitora do innego miejsca niż miejsce aktywne. W związku z brakiem współzawodnictwa substratu i inhibitora o miejsce aktywne, zwiększenie stężenia substratu nie może przewyższyć inhibicji. Inhibitor znacznie zmniejsza liczbę obrotów enzymu, nie ma wpływu na liczbę cząsteczek enzymu wiążących substrat.

W przypadku inhibicji allosterycznej obserwuje się brak zmiany wartości stałej Michaelisa (gdyż miejsc wiążących na enzymie dostępnych dla substratu jest tyle samo), przy jednoczesnym pomniejszeniu wartości szybkości maksymalnej (z powodu działania inhibitora, zmniejszającego szybkość reakcji katalizowanej przez enzym).

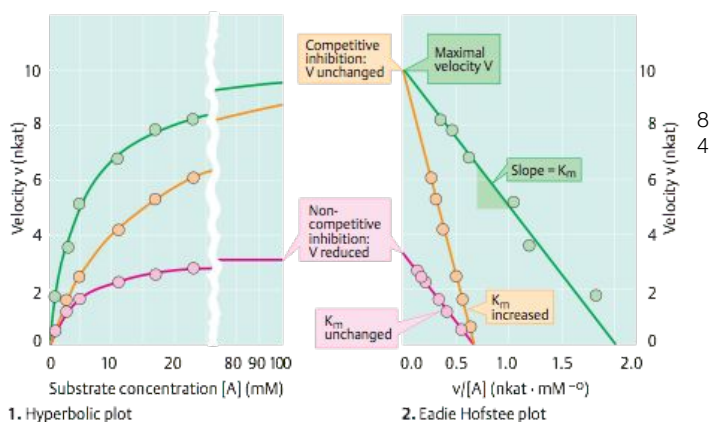


Inhibicja | podsumowanie

• Aktywność enzymu można linearyzować także w postaci wykresu Eadie-Hofstee'a na którym na jednej osi umieszczamy v a na drugiej $v/[A]$. V_{max} odpowiada punktowi przecięcia z osią Y, punkt przecięcia z osią X to V_{max}/K_m , natomiast nachylenie wykresu to K_m . Na tym wykresie dość łatwo rozróżnić z jakim typem inhibicji mamy do czynienia

• Inhibicja kompetycyjna: V_{max} pozostaje bez zmian, rośnie K_m .
Wykresy z inhibitorem i bez spotykają się w wartości V_{max}

• Wykres dla inhibitora niekompetycyjnego jest równoległy do oryginalnego, co oznacza, że K_m się nie zmienia, jednak V_{max} znacząco spada.



Kinetyka enzymów – wyrażanie aktywności enzymów

- Podstawową cechą enzymów jest ich aktywność enzymatyczna/katalityczna. Aktywność tą można mierzyć ilościowo i wyrażać w różnej formie w zależności od potrzeb. Poniżej w tabeli znajdują się najczęstsze formy wyrażania aktywności enzymów oraz najważniejsze parametry definiujące/wpływające na aktywność enzymów:

Parametr	Definicja
Szybkość maksymalna (ang. <i>Maximum velocity</i>)	$V_{max} = k_{kat}[E]_0$ Szybkość maksymalna reakcji wyrażona w jednostce stężenia przez czas (katal albo IU); zależna od stężenia enzymu
Liczba obrotowa enzymu (ang. <i>Turnover number</i>)	$k_{kat} = \frac{V_{max}}{[E]_0}$ Liczba obrotowa enzymu wyrażona w [s ⁻¹] niezależna od stężenia enzymu
Stała katalityczna (ang. <i>Catalytic constant</i>)	k_{kat} [s ⁻¹] Identyczna z liczbą obrotową enzymu
Stała Michaelisa (ang. <i>Michaelis constant</i>)	K_M [M] (stała dysocjacji kompleksu ES rozszerzona dodatkowo o stałą katalityczną k_{kat} W uproszczeniu! jest to miara powinowactwa enzymu do substratu i/lub stężenie substratu przy którym reakcja osiąga 50% V_{max})
Wydajność katalityczna (ang. <i>Catalytic efficiency</i>)	$\frac{k_{kat}}{K_M}$ [M ⁻¹ s ⁻¹] Stała specyficzności enzymu w reakcji; wyższe wartości wskazują na większą specyficzność
Aktywność objętościowa (ang. <i>Volume activity</i>)	Aktywność enzymatyczna (wyrażona w katalach lub IU) na jednostkę objętości (jednostka enzymatyczna przez mililitr)
Aktywność właściwa (ang. <i>Specific activity</i>)	Aktywność enzymatyczna (wyrażona w katalach lub IU) na stężenie białka (enzymu) (jednostka enzymatyczna przez miligram)

Klasyfikacja EC enzymów i nazewnictwo

- Enzymy nazywa się w dwojaki sposób. Pierwszy sposób to dwuczęściowa nazwa enzymu, gdzie część pierwsza, zakończona przyrostkiem "-aza", określa typ katalizowanej reakcji, a druga – substrat(y) reakcji (np. dekarboksylaza pirogronianowa). System nomenklatury EC (ang. *Enzyme Classification*) z kolei jest oparty na czterocłonowym zapisie numerycznym. Podstawą tej klasyfikacji jest typ i mechanizm katalizowanej przez nie reakcji oraz używane substraty.
- Każdy enzym posiada swój kod o postaci: EC xx.xx.xx.xx, gdzie litery x oznaczają cyfry arabskie. Sam numer składa się z 4 członów: pierwszy określa główną klasę, charakteryzującą typ katalizowanej reakcji; drugi określa podklasę, charakteryzującą zazwyczaj rodzaj wiązania lub grupy, której dotyczy reakcja; trzeci określa pod-podklasę, która może zawierać: dokładniejszą specyfikację wiązania, grupę związków do której należy substrat, nazwę donora lub akceptora; czwarty wskazuje na określony enzym przez podanie nazwy substratu reakcji.
- Dla przykładu: kod EC kinazy pirogronianowej wynosi EC 2.7.1.40, gdzie liczby w kolejności świadczą o przynależności enzymu do: klasy 2, czyli transferaz, podklasy 7, czyli enzymów przenoszących grupy fosforanowe, pod-podklasy 1, przenoszących na akceptor z grupą CH-OH. Ostatnia liczba (40) oznacza indywidualny numer kinazy pirogronianowej w obrębie pod-podklasy 1.
- Przykłady nazewnictwa enzymów:

Kod	Nazwa systematyczna	Nazwa potoczna
EC.1.1.1.1	Oksydoreduktaza alkohol:NAD	Dehydrogenaza alkoholowa
EC.2.6.1.2	Aminotransferaza L-alanina:2-oksoglutaran	Aminotransferaza alaninowa
EC.3.1.3.9	Fosforylaza D-glukozy-6-fosforanowa	Glukozy-6-fosfataza
EC.4.1.1.1	Karboksylaza 2-oksokwasów	Dekarboksylaza pirogronianowa
EC.5.3.1.6	Izomeraza D-rybozy-5-fosforanowa	Izomeraza pentozofosforanowa
EC.6.3.4.2	Ligaza UTP:amoniak	Syntetaza CTP
EC.7.4.2.13	ATP fosforylaza (typ ABC, importująca tyrozynę)	Transportaza ABC tyrozyny

Klasyfikacja EC enzymów i nazewnictwo

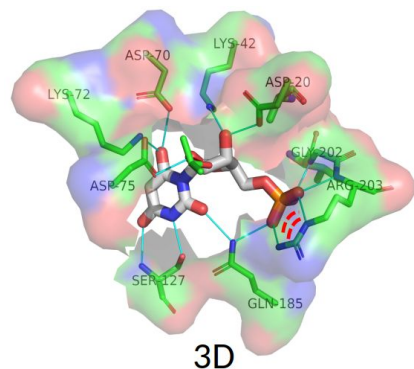
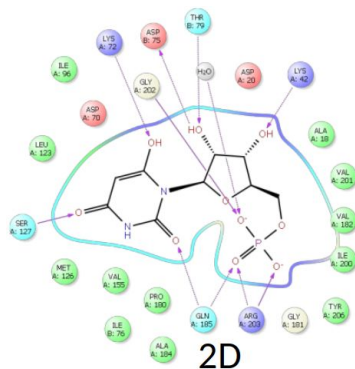
- Zgodnie z przyjętą klasyfikacją EC, enzymy dzielimy na 7 klas:

Klasyfikacja EC	EC1 Oksydoreduktazy	Katalizują odwracalne reakcje redoks, a więc reakcje związane z przenoszeniem elektronów i protonów	$\text{XH}_2 + \text{Y} \leftrightarrow \text{X} + \text{YH}_2$
	EC2 Transferazy	Katalizują odwracalne reakcje przenoszenia grup funkcyjnych z donora na akceptor	$\text{XR} + \text{Y} \leftrightarrow \text{X} + \text{YR}$
	EC3 Hydrolazy	Katalizują nieodwracalne reakcje hydrolizy czyli rozpadu wiązań z jednoczesnym przyłączeniem cząsteczki wody	$\text{XY} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{XH} + \text{YOH}$
	EC4 Liazy	Katalizują niehydrolityczny rozpad wiązań (bez udziału cząsteczki wody)	$\text{X} = \text{Y} \leftrightarrow \text{X} + \text{Y}$
	EC5 Izomerazy	Katalizują reakcje przekształceń strukturalnych w obrębie cząsteczki	$\text{XY} \leftrightarrow \text{YX}$
	EC6 Ligazy	Katalizują syntezę trwałych wiązań kowalencyjnych (np. C-C, C-N, C-S, C-O) z wykorzystaniem wysokoenergetycznych wiązań ATP	$\text{X} + \text{Y} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{XY} + \text{ADP} + \text{P}_i$
	EC7 Translokazy	Katalizują przenoszenie jonów i związków chemicznych przez membrany lub ich rozdział wewnątrz błon	

112

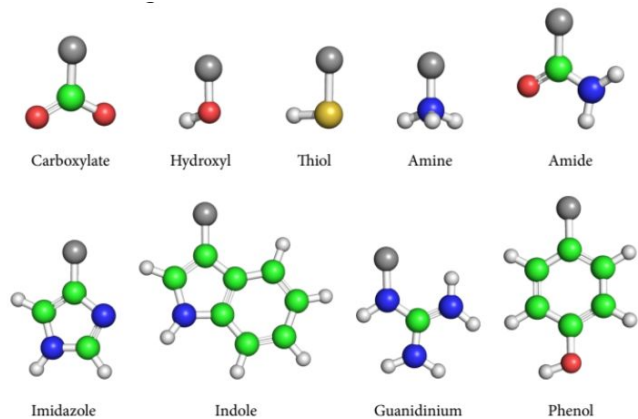
kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Rola miejsca aktywnego:
 - wiązanie substratu/produktu



kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Koordinacja za pomocą właściwości fizyko-chemicznych aminokwasów i związków chemicznych zlokalizowanych miejscu aktywnym (kofaktorów)



kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Poszczególne aminokwasy wykazują różne powinowactwo do miejsca aktywnego w związku z ich zdolnością do konwersji substrat-produkt.

	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	His	Lys	Phe	Ser	Thr	Trp	Tyr
EC 1	•	•	•	●	•	•	●	•	•	•	•	•	•
EC 2	•	•	•	●	•	•	●	•	•	•	•	•	•
EC 3	•	•	•	•	•	•	●	•	•	•	•	•	•
EC 4	•	•	•	•	•	•	●	•	•	•	•	•	•
EC 5	•	•	•	●	•	•	●	•	•	•	•	•	•
EC 6	•		•	•	•	•	●	•		•	•	•	

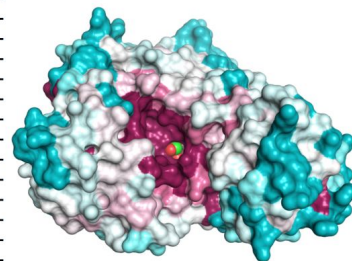
kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Kluczowe aminokwasy w miejscu aktywnym wykazują wysoką konserwację ewolucyjną.
- Wynika to z ich roli w :
 - koordynacji substratu
 - udziału w mechanizmie katalizy

```

DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-
DF-EMDVVA-MVNDTVATMISCY---YED-

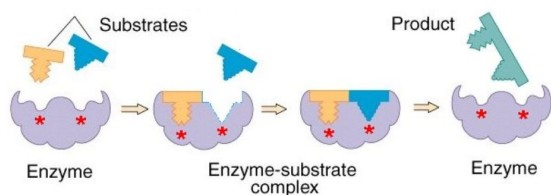
```



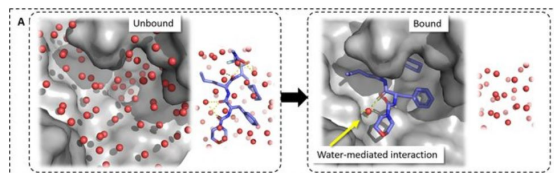
1 2 3 4 5 6 7 8 9
Variable Average Conserved

kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Efekty wywierane przez miejsce aktywne:
 - ograniczenie swobody ruchu substratu
 - niekowalencyjna stabilizacja półproduktów
 - kontrolowany transfer elektronów/protonów/grup funkcyjnych
 - kontrolowane zrywanie i tworzenie wiązań
- Efekty energetyczne:
 - redukcja entalpii (tworzenie kompleksu [ES])
 - wzrost entropii (eliminacja wody z miejsca aktywnego)



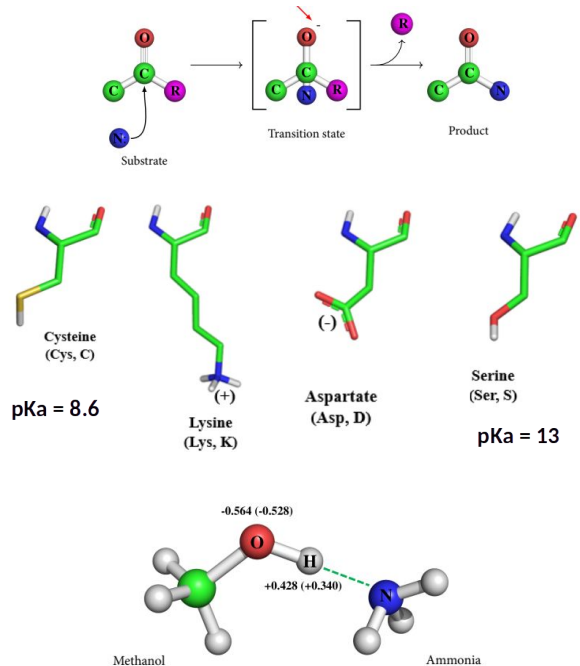
(<https://mybiochemlife.wordpress.com/2013/03/21/enzymes/>)



(Communications Chemistry 3(1):19)

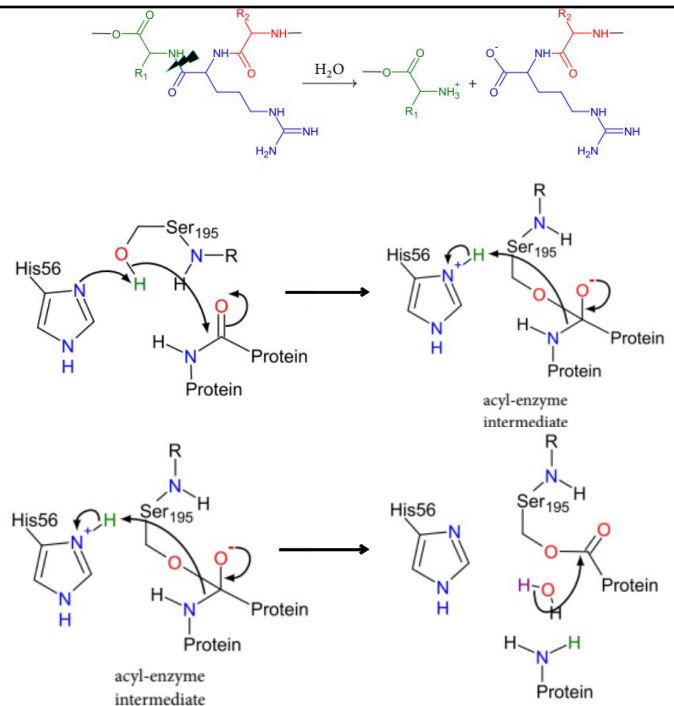
kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Kataliza kowalencyjna i efekty elektronowe:
 - S, O, N wykorzystywane w ataku nukleofilowym
 - Cys, Lys, Asp, Ser (, His, Thr, Glu, Tyr) są wykorzystywane w katalizie kowalencyjnej
 - deprotonacja osiągana jest poprzez efekty polaryzacji ładunku



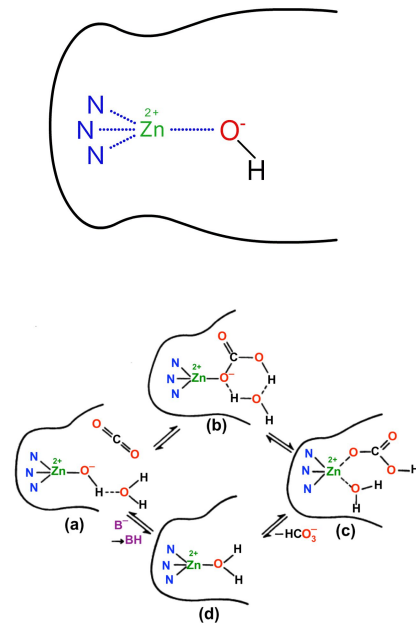
kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Hydroliza wiązań peptydowych
 - Polaryzacja i deprotonacja substratu w trypsynie osiągana jest poprzez atak Ser195 i His56
 -



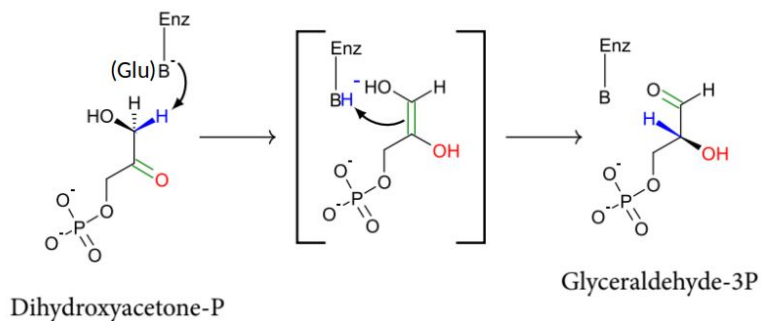
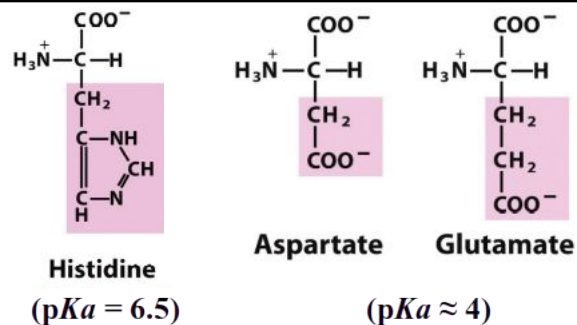
kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Kataliza z wykorzystaniem metali:
 - Zn
 - Cu
 - Mg
 - Mn
 - Fe
 - Co
 - Mo
 - V
 - W
- Reakcje:
 - utleniania i redukcji
 - hydrolizy
 - transferu grup funkcyjnych (fosforanowych, tlenu)
- Metale odpowiadają:
 - transport elektronów
 - stabilizację elektrostatyczną
 - aktywację substratów



kataliza enzymatyczna mechanizmy

- Wykorzystanie równowagi kwasowo zasadowej:
 - wymaga transportu H^+ pomiędzy enzymem i substratem
 - Najczęściej wykorzystywane aminokwasy:
 - histydyna
 - kwas asparaginowy
 - kwas glutaminowy



kataliza enzymatyczna

- Mogą tworzyć skomplikowane kompleksy

