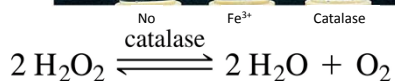
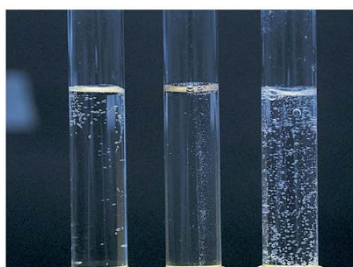


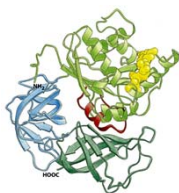
Enzymer: reaktioner, kinetik och inhibering

- Biokatalysatorer
- Reaktion: substrat omvandlas till produkt(er)
- Påverkar reaktionen så att jämvikten ställer in sig snabbare, dvs hastigheten ökar
- Reaktionen är energimässigt fördelaktigt



Lite basalt om enzymer

- Enzymer katalyserar endast någon eller några reaktioner, dvs har en viss aktivitet (enzymaktivitet)
- Enzymer är specifika (även stereospecificitet)
- Enzymer fungerar under givna reaktionsförhållanden
- De allra flesta av cellens reaktioner drivs av enzymer
- Enzymer är proteiner
- Enzymers aktivitet är ofta reglerad av olika molekyler



Enzymklassificering

- Klassificeras i sex grupper beroende på vilken reaktion de katalyserar (IUBMB, EC nummer)
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/iubmb.html>
- Ex. katalas: EC 1.11.1.6
 - 1.11 Acting on a peroxide as acceptor
 - 1.11.1 Peroxidases

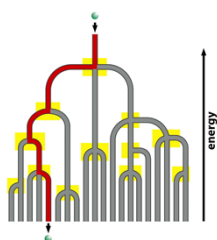
1	Oxidoreductases Electron transport: oxidation, reduction of molecules
2	Transferases Transport of functional groups
3	Hydrolases Hydrolytic reactions: cleavage involving H ₂ O addition
4	Lyases Non-hydrolytic cleavage
5	Isomerases Transformation of one isomer to another
6	Ligases Ligation of molecules during ATP consumption

Varför är enzymer så viktiga? – för oss!

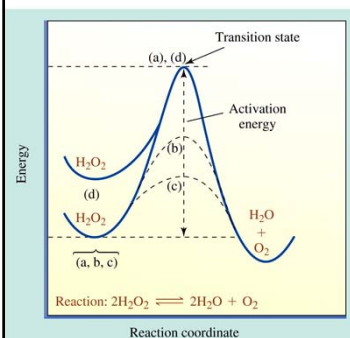
- Tekniska applikationer
- enzymatiska processer är milda, miljövänliga och energieffektiva
- bulkemikalier som används i tvättmedel, bakning, ölbrygning, garvning, papperstillverkning, stärkelse, textil....
- finkemikalier som används i diagnostik, molekylärbiologi, analyser....

Varför är enzymer så viktiga? – för cellen

- Cellernas katalysatorer
- I t.ex. en jästcell föregår 1200 olika biokemiska reaktioner
- De biokemiska reaktionerna är oftast ordnade i metabola vägar, vilka är katalyserade av enzymer
- Enzymerna är nyckelpunkter för att cellerna skall kunna reglera sin funktion i respons till omgivningen



Aktiveringsenergi i kemiska reaktioner



- Ingen katalysator
- med Fe^{3+} katalysator
- med katalasenzym
- Vid högre temperatur

OBS! Jämvikten ändras inte, bara hur snabbt man når dit.

Figure 5-2 Concepts in Biochemistry, 3/e © 2004 John Wiley & Sons

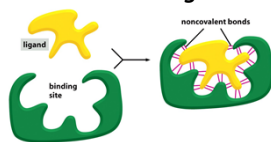
Transition state

- Övergångsform av substratet som omvandlas till produkt
- Enzymer stabiliserar transition state formen, dvs det krävs mindre energi för att molekylerna ska hålla denna form



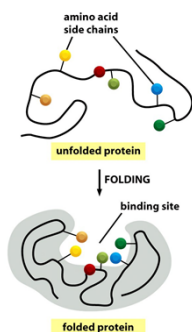
Mekanismer för enzyms aktivitet

- På ytan av den tredimensionella strukturen av ett protein finns fördjupningar
- I dessa fördjupningar kan molekyler binda in - **ligander**
- Den fördjupning som binder substrat/produkt och medger katalys - **aktivt säte**
- Andra säten kan binda **effektorer** som ökar/minskar aktiviteten - **regulatoriska säten**

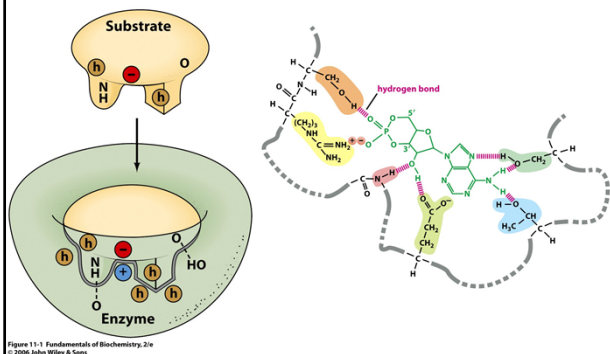


Bindningar viktiga för enzymaktiviteten

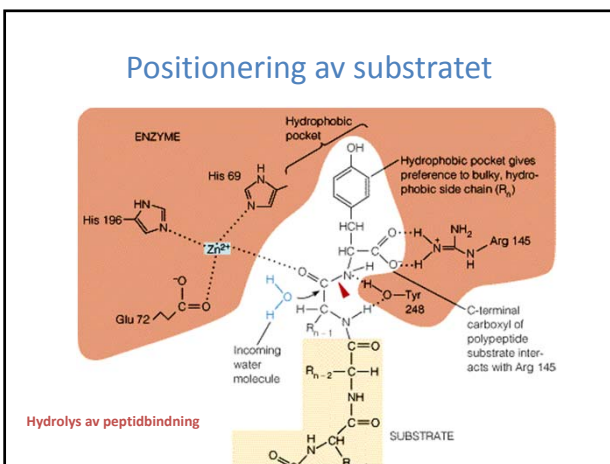
- Icke kovalenta bindningar från aminosyroras sidogrupper
 - Vätebindningar
 - Jonbindningar
 - Hydrofob interaktion
- Dessa bindningar gör så att
 - Substratet hålls i transition state
 - Substratet positioneras så att andra molekyler/substrat kan reagera, t.ex. vatten och kofaktorer



Formen av aktiva sätet ger specificitet



Positionering av substratet



Inbinding till ett säte är en jämviktsprocess

1 **dissociation**

$$A + B \rightleftharpoons A + B$$

dissociation rate = dissociation rate constant \times concentration of AB

dissociation rate = $k_{off} [AB]$

2 **association**

$$A + B \rightleftharpoons A + B$$

association rate = association rate constant \times concentration of A \times concentration of B

association rate = $k_{on} [A] [B]$

3 **AT EQUILIBRIUM:**

association rate = dissociation rate

$$k_{on} [A] [B] = k_{off} [AB]$$

$$\frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = K = \text{equilibrium constant}$$

Jämviktskonstanten är ett mått på hur stark inbindningen är!

För enzymkatalys måste inbindningen vara "lagom" stark

Strukturändringar hos protein

- Flexibilitet i proteinstrukturen
- Strukturen kan ändras vid yttre påverkan, t.ex. inbindning av substrat

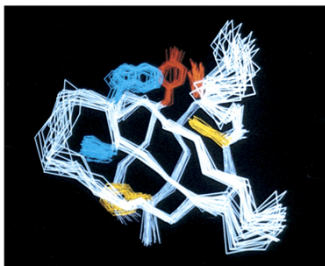
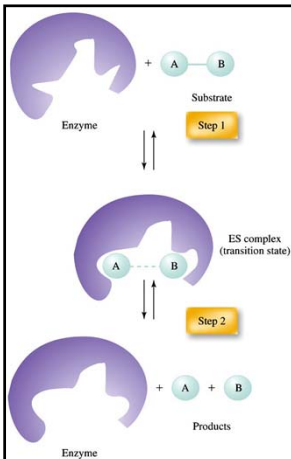


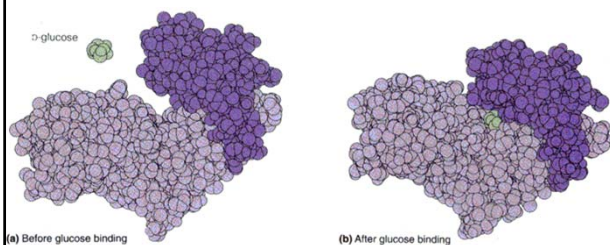
Figure 6-23b Fundamentals of Biochemistry, 5e

Strukturändringar i enzymet viktigt för aktiviteten



- Strukturändringar hos enzymet efter inbindning av substrat medger transition state konfiguration av substratet

Konformationsändring - hexokinas



(a) Before glucose binding

(b) After glucose binding

Sammanfattning - Generella principer i enzymkatalys

- Många enzymreaktionsmekanismer har paralleller i den organiska kemien
- Enzymmekanismer är specifika
 - Proteinets delar som inte ingår i det aktiva sätet stabiliserar strukturen
 - Det finns substratbindande säte
 - Proteinet kan interagera med andra cellulära beståndsdelar
- I aktiva sätet finns sura, basiska och nukleofila grupper
- Hjälpmolekyler och joner kan ingå i reaktionsmekanismen (kofaktor/koenzym)
- Vatten kan vara exkluderat från det aktiva sätet

Kinetik - hastighetsekvationer

- Reaktion $A \rightarrow P$
- Hastighet $v = k[A]$ (1a ordningen)

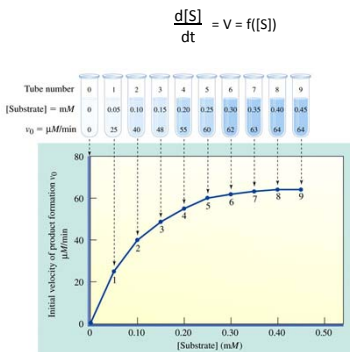
- Reaktion $2A \rightarrow P$
- Hastighet $v = k[A]^2$ (2a ordningen)

- Reaktion $A + B \rightarrow P$
- Hastighet $v = k[A][B]$ (2a ordningen)

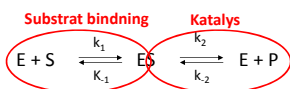
Enzymkinetik



- Bestämning av enzymkinetiska parametrar bidrar till förståelse av enzymets verkningsmekanism
- Det enklaste kinetiksambandet för enzymer



Enzymkinetik



- k_{-2} mycket liten (i början finns lite/inget P)
- [ES] konstant
- Michaelis-Menten ekvation

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Michaelis Menten konstant/Affinitetskonstant

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Turnover number
 $k_2 = V_{\max} / [E_{\text{tot}}] = k_{\text{cat}}$

Turnover number, katalytisk konstant

$$-k_{\text{cat}}$$

- Anger hur effektivt enzymet är
- Hur många molekyler som reagerar per aktivt säte per tidsenhet

Enzyme	Reaction Catalyzed	K_M (mol/L)	k_{cat} (s^{-1})
Chymotrypsin	Ac-Phe-Ala $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$ Ac-Phe + Ala	1.5×10^{-2}	0.14
Pepsin	Phe-Gly $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$ Phe + Gly	3×10^{-4}	0.5
Tyrosyl-tRNA synthetase	Tyrosine + tRNA \rightarrow tyrosyl-tRNA	9×10^{-4}	7.6
Ribonuclease	Cytidine 2',3' cyclic phosphate $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$ cytidine 3'-phosphate	7.9×10^{-3}	7.9×10^2
Carbonic anhydrase	$\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$	2.6×10^{-2}	4×10^5
Fumarase	Fumarate $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$ malate	5×10^{-6}	8×10^2

Michaelis-Menten kinetik – V_{\max} och K_m

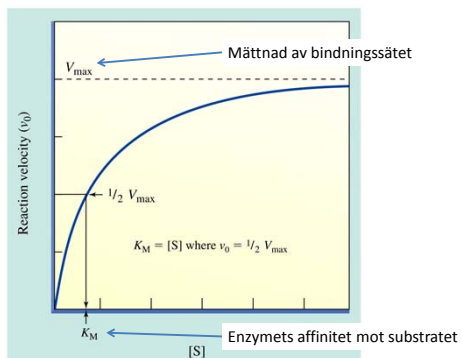


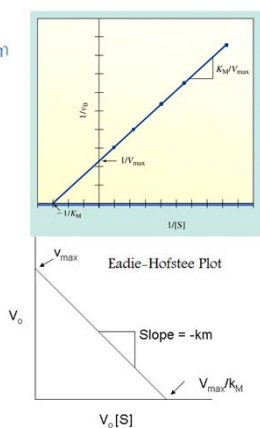
Figure 5-4 Concepts in Biochemistry, 3/e © 2004 John Wiley & Sons

Enzymaktivitet

- K_m kan bero på: temperatur, pH, jonstyrka, substrat
- SI-enhet: katal = 1 mol/s
- Vanlig enhet: U (units) = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$
(1 U = 16.67 nanokatal)

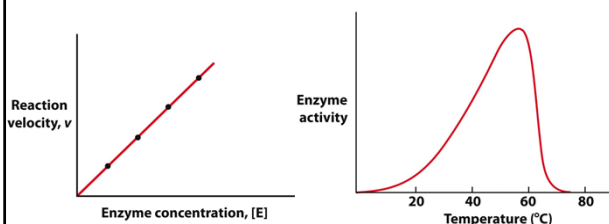
Bestämning av V_{max} och K_m

- Linjärisering av MM-ekvation och linjär regression
 - Lineweaver-Burk $1/v = f(1/S)$
 - Eadie-Hofstee $v = f(v/S)$
- Använd icke-linjär regression direkt på data



Faktorer som påverkar enzymaktivitet

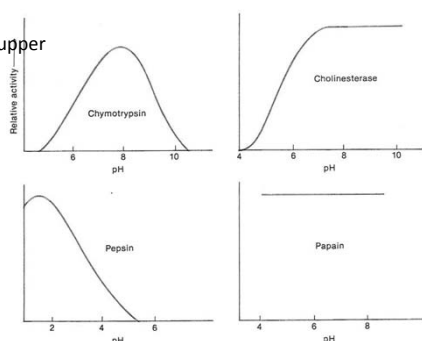
- Enzymmängd, temperatur, pH, och effektorer



Enzymaktivitets pH-beroende

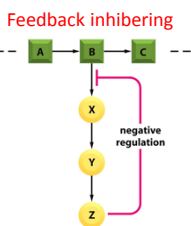
Är enzymberoende

- Tertiärstruktur
- Joniseringsbara grupper



Reglering av enzymaktivitet i cellen

- Inbindning av molekyl/effektor (icke-kovalent)
 - Öka aktiviteten med aktivator
 - Minska aktiviteten med inhibitor
- Modifiering med kovalent bunden grupp
 - Fosforylering, metylering
- Öka produktionen av enzymet
- Öka nedbrytningen av enzymet

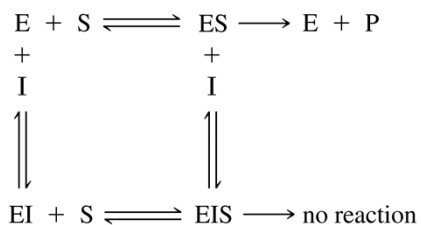


Effektorer för inhibering/aktivering

- Inhibering, minskning av den enzymatiska aktiviteten
 - Inhibitorn kan binda till det aktiva sätet eller ett annat säte (reglerande säte)
 - Inhibitorn är oftast produkten eller en annan molekyl men kan även vara substratet
 - Enzyminhibering viktig mekanism för många läkemedel
- Aktivering, ökning av den enzymatiska aktiviteten
 - Aktivatorn binder oftast till ett annat säte

Inhibering - hämning

- Man inkluderar i kinetikekvationen även [I] och K_i
- Beroende på inhiberingsmekanism ser ekvationen olika ut



Enzyminhibitorer som läkemedel

- Ofta kan orsaken till en sjukdom vara att ett enzym är mycket aktivt – läkemedel är inhibitor
- Bakterier och humana celler har skillnader i vilka biokemiska reaktioner som utförs
 - Enzyminhibitorer som bara inhiberar bakterieceller kan vara intressanta läkemedel, t.ex. antibiotika



Antibiotika - penicillin

- Penicillin inhiberar enzymer som bakterier behöver för att bilda sina cellväggar

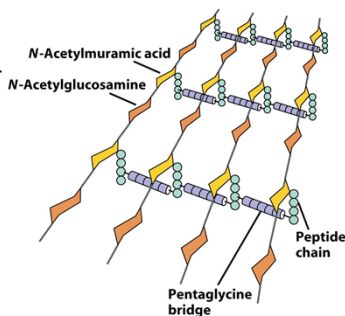
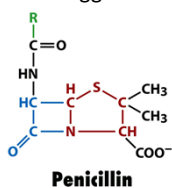


Figure 9-14b Fundamentals of Biochemistry, 2/e © 2006 John Wiley & Sons

Transition-state analoger som inhibitor

