



Medicinska --- **biohemija:**

**Lekcija 5:
Regulacija
aktivnosti enzima**

Regulacija aktivnosti enzima

Postoji vise mehanizama kojima se regulisu aktivnosti enzima:

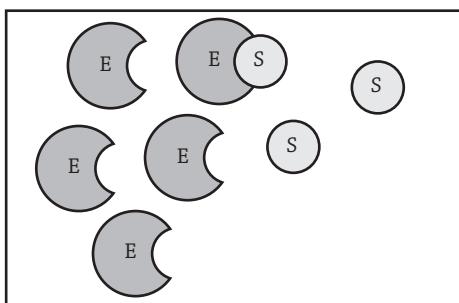
- └─→ Regulacija koncentracije supstrata i proizvoda
- └─→ Postranslaciona kovalentna modifikacija
- └─→ Alosterna modifikacija
- └─→ Regulacija sinteze i razgradnje enzima

Koncentracija supstrata i proizvoda

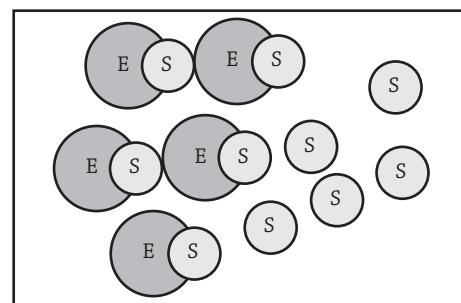
a) **Koncentracija supstrata** - direktno utice na brzinu enzimski katalisane reakcije.
O tome i govori *Michaelis-Menten teorija*.

- Manja koncentracija supstrata [S] - indukuje i manju brzinu hemijske reakcije.
- Veca koncentracija supstrata [S] - indukuje i vecu brzinu hemijske reakcije.

Ukoliko u nekoj enzimski katalisanoj reakciji konstantno povecavamo koncentraciju supstrata, povecavace se i brzina hemijske reakcije. Medjutim u jednom trenutku, pri izrazito velikoj koncentraciji supstrata, brzina hemijske reakcije ce prestati da raste. Tada povecavanje koncentracije supstrata *nece dovesti do rasta brzine*. Razlog ovoga je sto je u toku citave te reakcije koncentracija enzima uvek ista tj. uvek je isti broj cestica enzima. Kada koncentracija supstrata postane izrazito velika, aktivna mesta svih enzima su zauzeta i reakcija se ne moze vrsiti brze od toga. Kazemo da je reakcija postigla **maksimalnu brzinu (V_{max})** i da je doslo do **zasicanja**. Ova pojava se naziva **kinetika zasicanja**.



Koncentracija supstrata je manja i nisu sva aktivna mesta enzima zauzeta. Tako da povecanje koncentracije ce uzrokovati i povecanje brzine.



Koncentracija supstrata je zirazito velika i sva aktivna mesta enzima su zauzeta. Dalje povecanje koncentracije nece dovesti do porasta brzine reakcije.

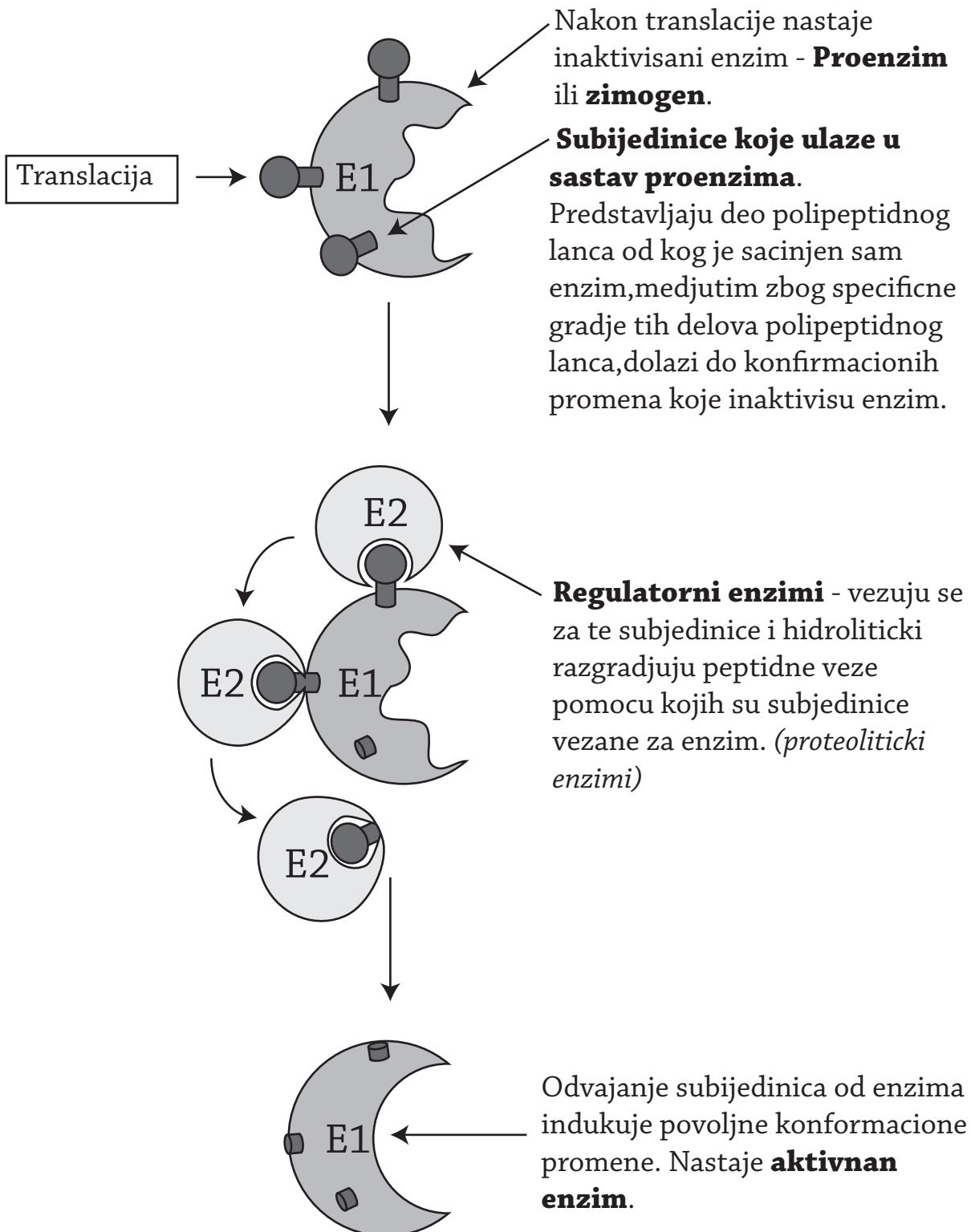
b) **Koncentracija proizvoda reakcije** - svi proizvodi reakcije su **reverzibilni inhibitori** i mogu biti *kompetitivni, nekompetitivni i akompetitivni inhibitori*.

Nagomilavanje proizvoda reakcije smanjuje aktivnost enzima sto je kljucno u metabolickim procesima.

Kovalentna modifikacija

Postoje dva tipa posstranslatornih kovalentnih modifikacija:

- **Ireverzibilna posttranslatorna modifikacija** - podrazumeva proteoliticko cepanje polipeptidnih lanaca sa neaktivnog enzima (*proenzim,zimogen*) i prelazak istog u aktivnu formu.



ireverzibilna je reakcija, sto znaci da subjedinice ne mogu ponovo biti vezane za enzim.

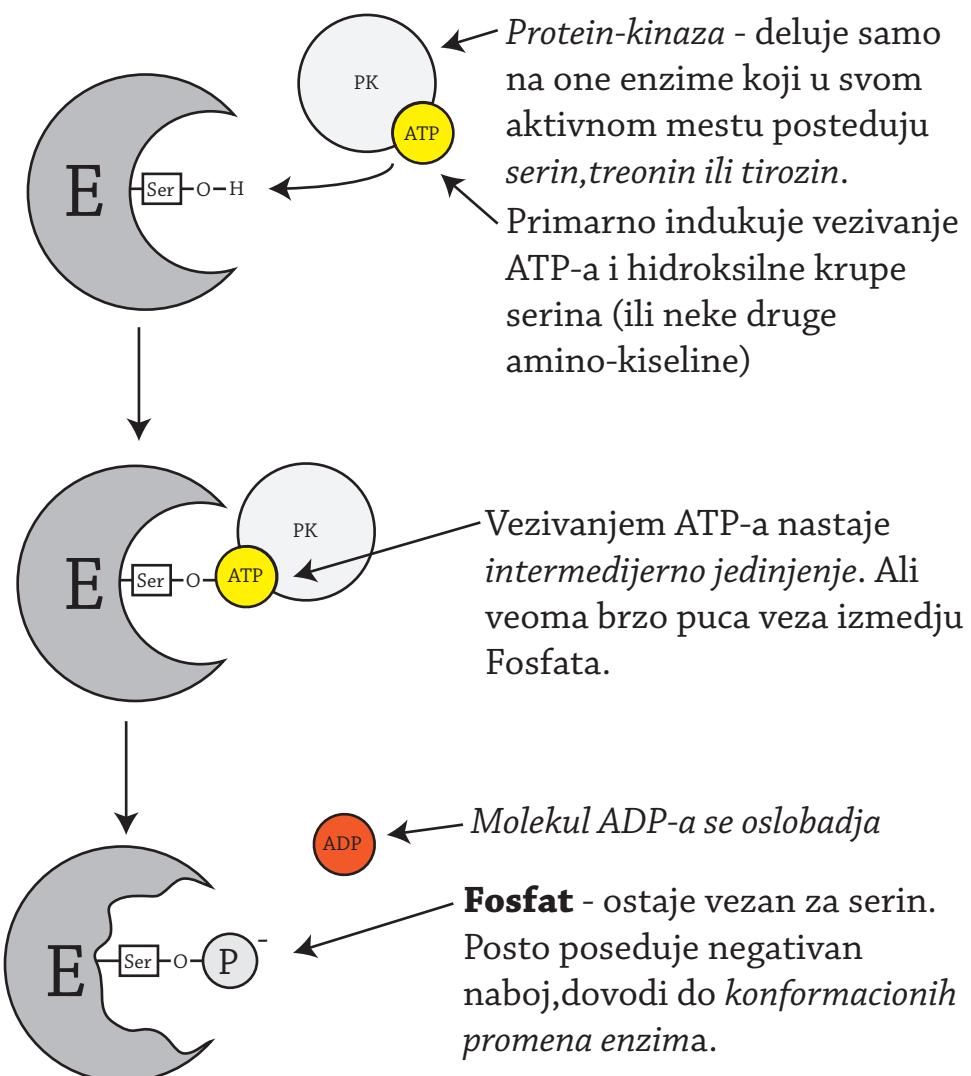
→ **Reverzibilne kovalentne modifikacije** - omogucavaju reverzibilnu promenu aktivnosti enzima.

- Fosforilacija/Defosforilacija
- Acilacija/Deacilacija
- Adenilacija/Deadenilacija
- Uridilacija/Deuridilacija
- Metilacija/Demetilacija

Fosforilacija/Defosforilacija

→ **Protein-kinaze** - predstavljaju enzime koji vrse fosforilaciju. U protein kinaze spadaju:

- Serin -treonin protein-kinaze
- Tirozin kinaza



Te konformacione promene, u zavisnosti od vrste i gradje enzima, mogu biti pozitivnog (povecava aktivnost enzima) ili negativnog (smanjuje aktivnost enzima) karaktera.

→ **Protein-fosfataze** - vrse procese defosforilacije, i takodje u zavisnosti od vrste i gradje enzima mogu imati pozitivan i negativan efekat



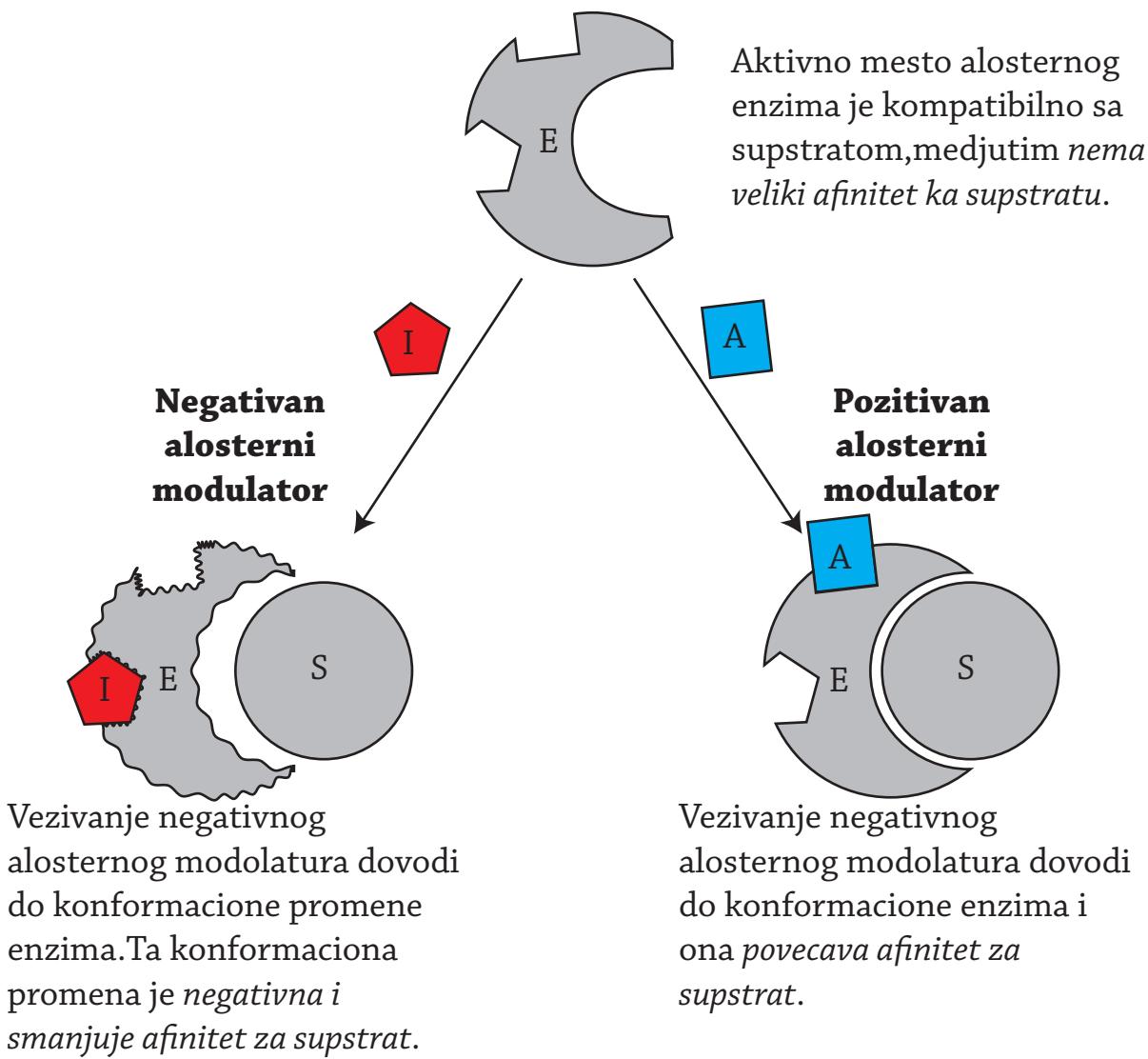
Alosterna modifikacija

Alosterni modulatori - predstavljaju molekule (obično male, redje velike) koji se vezuju za mesto na enzimu razlicito od aktivnog mesta. Vezivanjem moduliraju aktivnost enzima. Postoje dve vrste modulatora:

- **Pozitivni modulatori** - njihovim vezivanjem za enzim, povecava se afinitet enzima ka supstratu.
- **Negativni modulatori** - njihovim vezivanjem smanjuje se afinitet enzima ka supstratu.

Alosterni enzimi - predstavljaju enzime cija aktivnost zavisi od alosternih modulatora

- **Monomerni alosterni enzimi** - jednostavniji enzimi koji poseduju samo jedan kataliticki centar. Poznata su samo dva ovakva enzima:
Ribonukleotid-difosfat reduktaza, Piruvat UDP-N-acetil glukozamin transferaza.



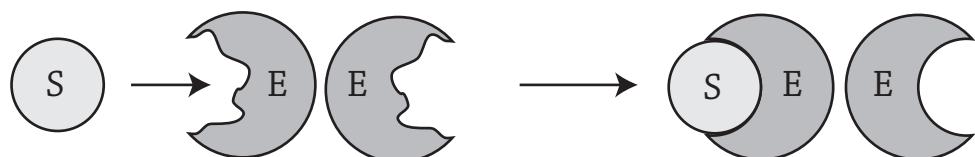
→ **Polimerni alostrni enzimi** - predstavljaju alosterne enzime sastavljeni iz više katalitickih podjedinica. Najveći broj alosternih enzima je polimerno. Svi polimerni alosterni enzimi se mogu javiti u bar dve konformacije:

→ **T (tense) Napregnuta konformacija** - u ovoj konformaciji afinitet za supstrat je nizak.

→ **R (relaxed) relaksirana konformacija** - afinitet za supstrat visok

Kooperativnost - predstavlja ključnu osobinu polimernih proteina. Vezivanje modulatora za jednu kataliticku subjedinicu će indukovati konformacione promene i na drugim katalitickim subjedinicama tog enzima.

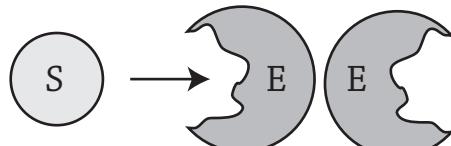
→ **Uskladjeni model** - vezivanje modulatora za jednu kataliticku subjedinicu indukovace konformacione promene svih subjedinica istovremeno.



Napregnuta konformacija (T)
- jedna kataliticka subjedinica
vezuje supstrat.

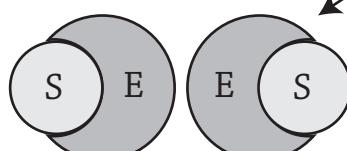
Obe katalitice
subjedinice prelaze u
relaksirano
konformaciono stanje

→ **Sekvencijalni model** - promena konformacije iz T u R se vrši sekvencijalno kroz niz intermedijarnih konformacija.



Napregnuta (T) konformacija

Kataliticka subjedinica
koja nije vezala supstrat
ne prelazi odmah u R
konformaciju, ali dolazi do
konformacionih promena
koje joj olaksavaju da
lakše veze supstrat.



Vezivanje supstrata za drugu subjedinicu,
u potpunosti je prevodi u R konformaciju.

Polimerni alosterni enzimi mogu biti:

→ **Homotropni** - oni cije su katalitickie subjedinice sve iste, a molekuli supstrata su im u isto vreme i modulatori.

Supstrat = Modulator

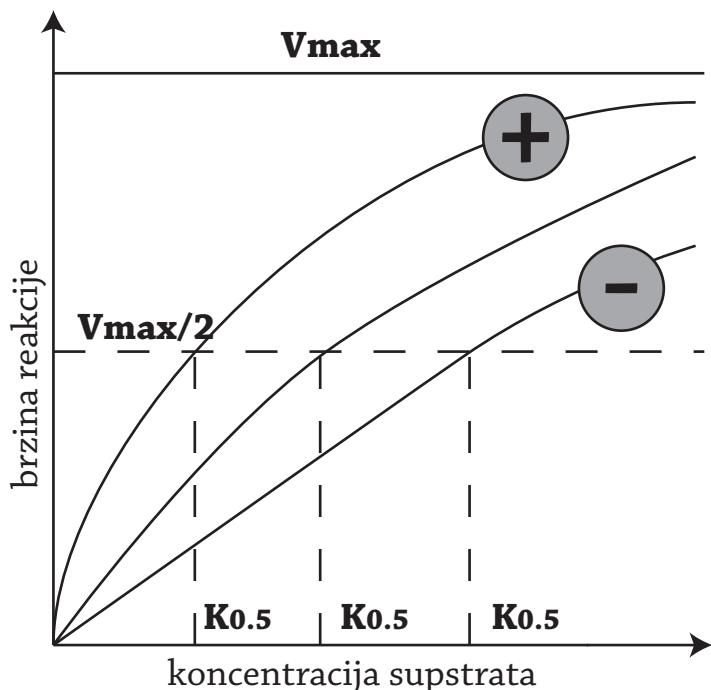
-**Pozitivna kooperativnost** - vezivanje supstrata za jednu kataliticku subjedinicu olaksava vezivanje supstrata za druge katalitickie subjedinice.

-**Negativna kooperativnost** - vezivanje supstrata za jednu kataliticku subjedinicu otezava vezivanje supstrata za druge katalitickie subjedinice.

→ **Heterotropni** - poseduju modulatore koji nisu supstrati i vezuju se za mesta razlicita od aktivnog mesta.

~~**Supstrat = Modulator**~~

Kinetika alosternih enzima



K_{0.5} - predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj se reakcija katalisana alosternim enzimom odvije polovinom maksimalne brzine. Ne može se obeležavati kao Km zato što alosterni enzimi ne podlezu Michaelis-Mentenovoj teoriji. Kriva alosternih enzima je **sigmoidna**, dok je kriva enzima koji podlezu michaelis-mentenu **hiperbolicna**.



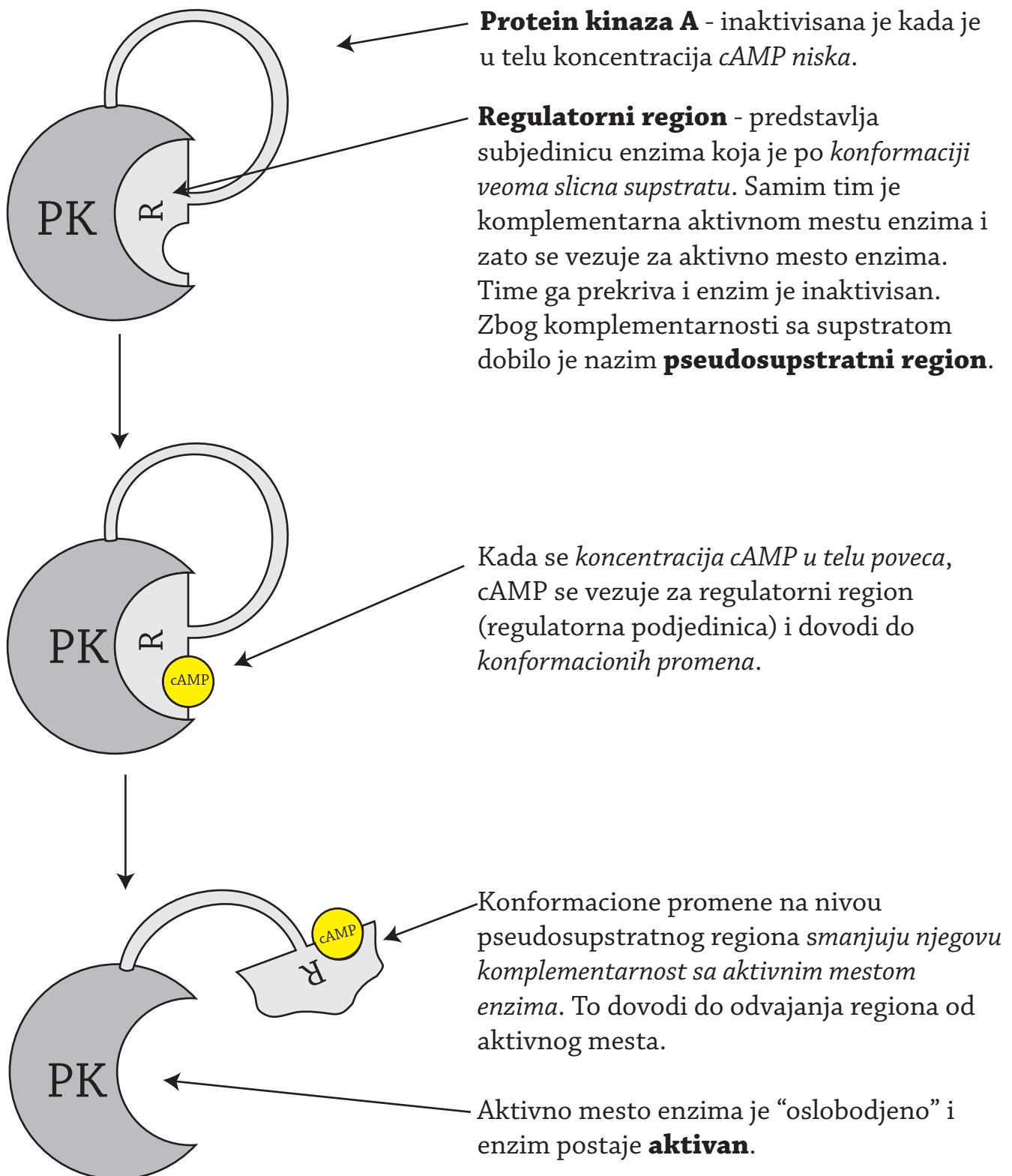
Pozitivan modulator - zbog kooperativnosti izmedju katalitickih subjedinica, vezivanje pozitivnog modulatora za jednu subjedinicu dovodi do povecanja afiniteta prema supstratu svih subjedinica datog enzima. Povecavanjem afiniteta ka supstratu *reakcija se brze odigrava*, samim tim se *smanjuje K_{0.5}*, tacnije smanjuje se koncentracija supstrata koja je potrebna da brzina hemijske reakcije bude polovina maksimalne brzine.



Negativan modulator - *smanjuje afinitet prema supstratu*, kako jedne katalitickе subjedinice tako i drugih. Time raste K_{0.5} tacnije potrebna je veća koncentracija supstrata da bi brzina reakcije bila polovina maksimalne.

Protein kinaza A

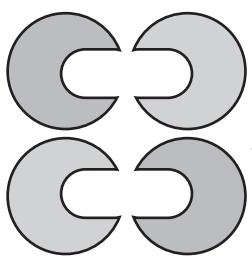
Protein kinaza A - tipican primer heterotropnog alosternog enzima ciji je alosterni modulator **ciklicni adenozin monofosfat (cAMP)**.



*Smanjenje koncentracije cAMP ce indukovati odvajanje cAMP-a od pseudosupratnog regiona, on ce svoju konformaciju vracati u pocetno stanje. Ponovo ce biti komplementaran aktivnom mestu enzima, vezivace se za njega i inaktivisati enzim.

Hemoglobin

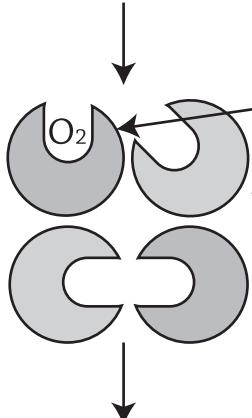
Hemoglobin - tipican primer *homotropnog alosternog enzima*, kojem je supstrat (kiseonik) u isto vreme i alosterni modulator.



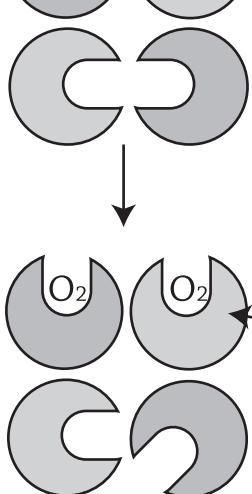
Hemoglobin - sastavljen od 4 subjedinice (2 alfa i 2 beta).

Svaka subjedinica poseduje *hem*, koji je vezan u vidu *prostetske grupe* i ima ulogu da *vezuje kiseonik*.

T (tense) nategnuta konformacija hemoglobina - javlja se u perifernoj krvi. Afinitet subjediniza za O₂ je veoma mali u ovoj konformaciji.

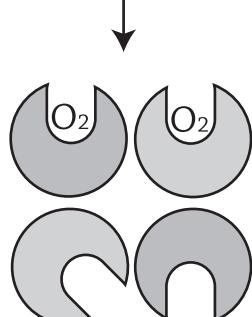


Vezivanje prvog kiseonika za subjedinicu je najteže, jer je afinitet za kiseonik izrazito nizak. Zato se ovo vrši u sredini gde je parcijalni pritisak kiseonika visok (plucna cirkulacija).

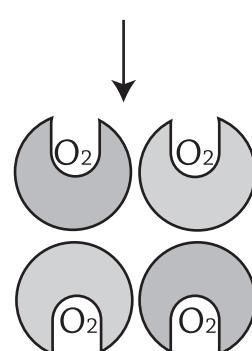


Vezivanje kiseonika za prvu subjedinicu dovodice do konformacionih promena kako te subjedinice tako i drugih subjedinica.

Drugi molekul kiseonika se mnogo lakše vezao za subjedinicu nego prvi. Razlog je to sto konformaciona promena koja nastaje prilikom vezivanja prvog molekula povecava afinitet za kiseonik na drugoj subjedinici (obično izmedju alfa-beta subjedinica). Ovo je moguce zahvaljujući **sonim mostovima** izmedju subjedinica kao i zbog pucanja određenih **jonskih veza**.



Vezivanje drugog molekula kiseonika takodje izaziva konformacione promene na preostalim ne vezanim subjedinicama sto dodatno povecava afinitet ka supstratu.

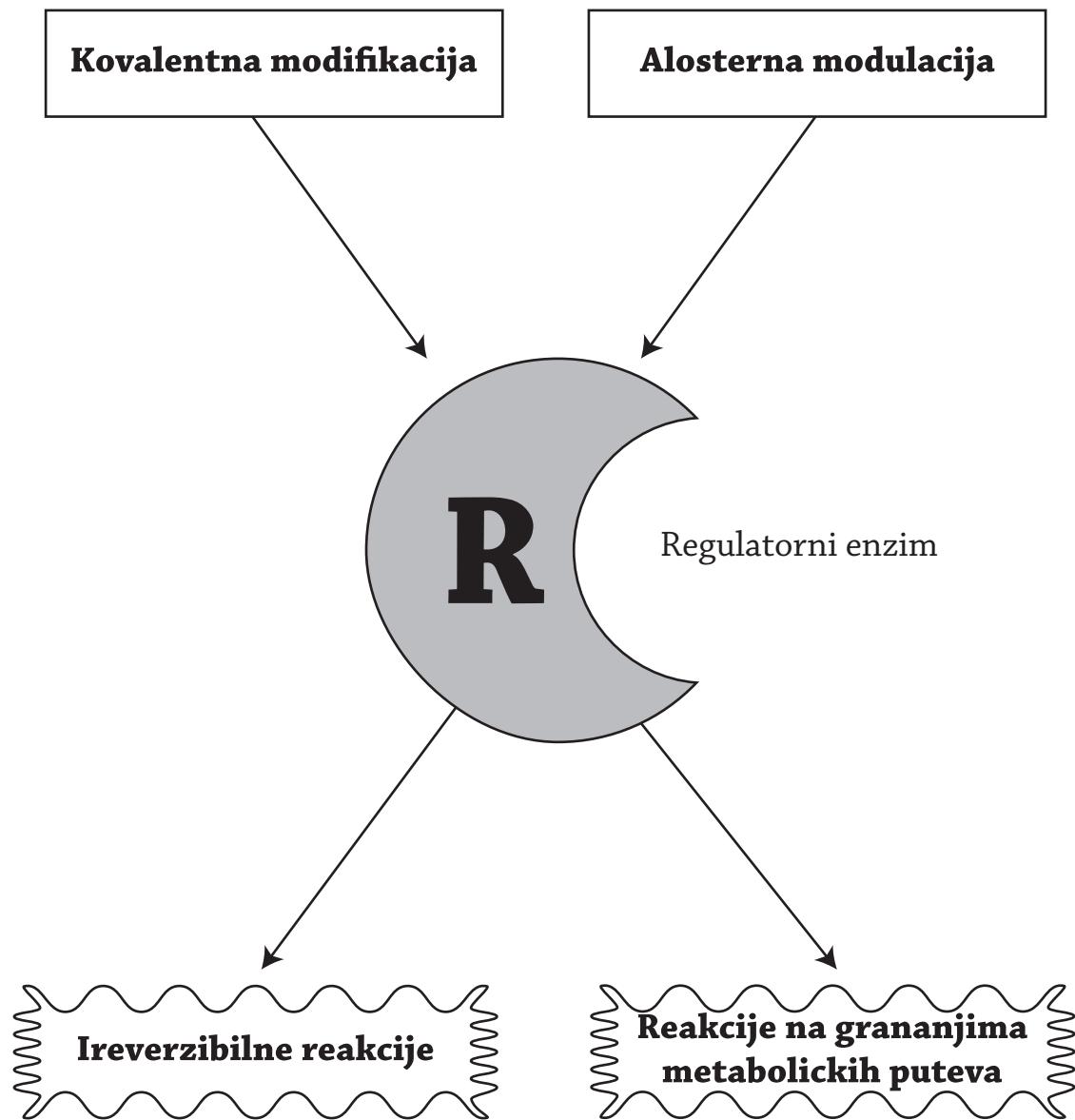


Vezivanje cetvrtoog molekula kiseonika je jos lakše (300 puta lakse od vezivanja prvog).

R (relaxed) opustena konformacija - nastaje vezivanjem sva cetiri molekula kiseonika, i u ovoj konformaciji je afinitet za kiseonik najveći.

*Ovo je primer sekvencijalnog modela kooperativnosti.

Ključni (regulatorni) enzimi - regulisu metabolicke puteve a njihova aktivnost je regulisana kovalentnom modifikacijom i alosternom modulacijom. Svojim reakcijama kontrolisu brzinu citavog metabolickog puta.



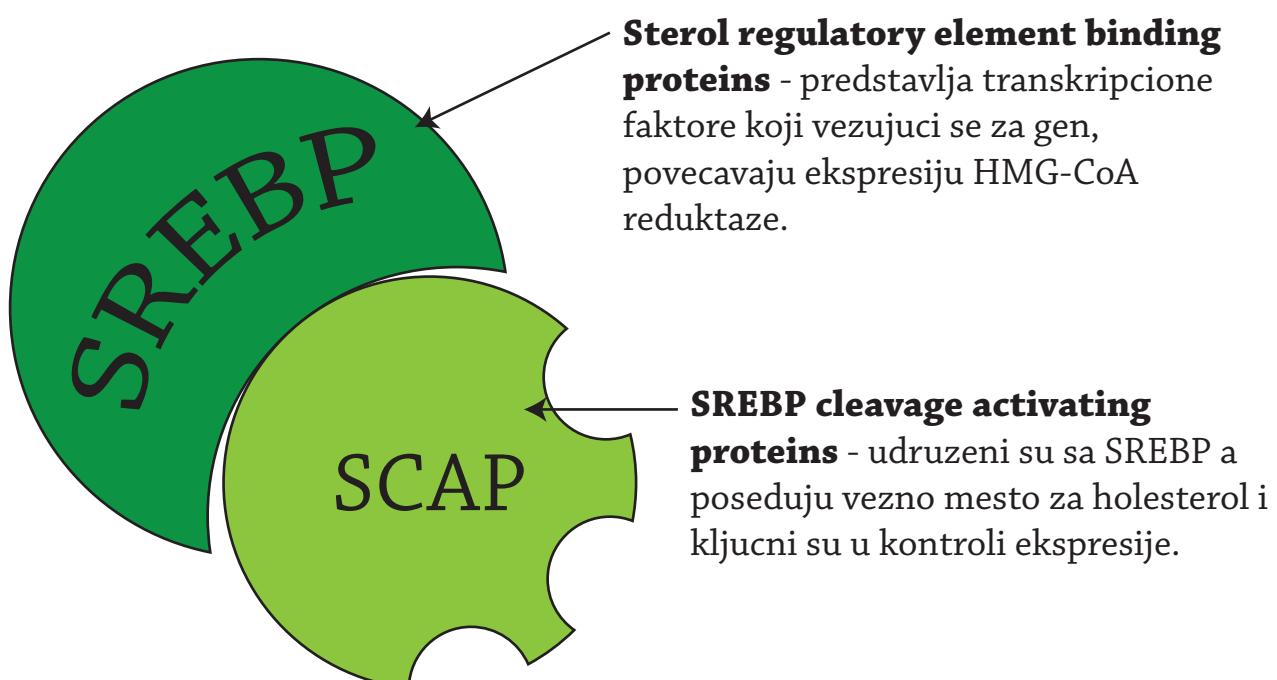
Regulacija sinteze i razgradnje

Ukupna kolicina enzima u celiji regulisana je:

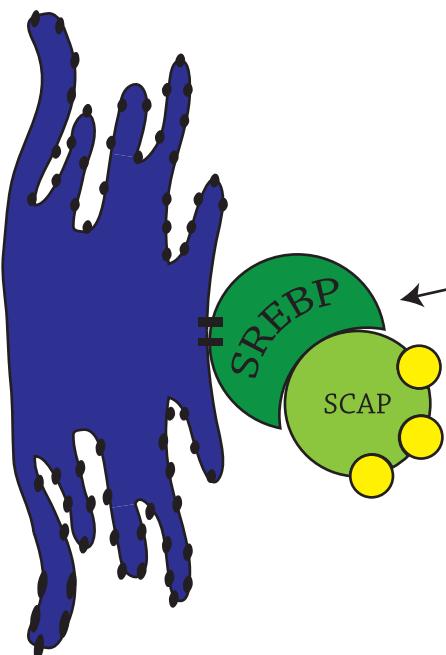
- **Brzinom sinteze enzima** - sinteza enzima se regulise povecanjem ili smanjenjem *transkripcije gena* za dati enzim tj. povecanjem ili smanjenjem *ekspresije gena*. Ovaj tip regulacije je *sporiji* od ostalih, a efekti se vide tek *posle nekoliko sati ili dana*.
 - **Konstitutivni enzimi** - enzimi koji su uvek prisutni u celiji tj. ekspresija gena koji kodiraju ove enzime je konstantna.
 - **Inducibilni enzimi** - oni koji se aktiviraju ili sintetisu samo kada su *potrebni celiji*. Ekspresija gena koji kodiraju inducibilne enzime moze biti indukovana:
 - *Porastom koncentracije supstrata*
 - *Signalima (citokini, hormoni)*
- **Brzinom razgradnje enzima** - razgradnja je takođe regulisana razlicitim mehanizmima.

HMG-CoA Reduktaza - predstavlja ključni enzim u procesu sinteze holesterola. Tako da regulacijom aktivnosti i kolicine ovog enzima regulise se i sinteza holesterola.

Obim sinteze ove reduktaze kontrolisan je pomocu transkripcionih faktora **SREBP** i **SCAP**:

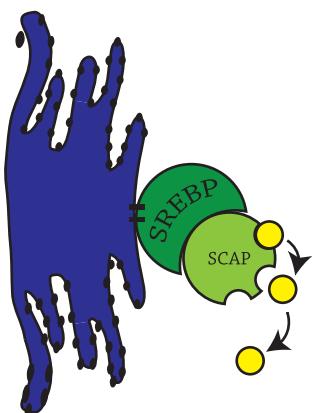


a) Nivo holesterola u celiji visok:

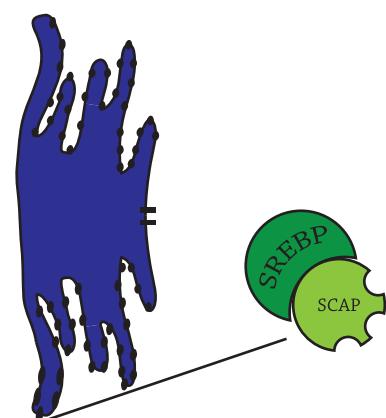


Posto je nivo holesterola u celiji visok, holesterol je vezan za SCAP. To odrzava citav kompleks u **inaktivnom stanju**. Ovakav kompleks je vezan za granulisani endoplazmatski retikulum i "miruje".

b) Nivo holesterola u celiji nizak:



Smanjena koncentracija holesterola u celiji indukuje *oslobadjanje holesterola sa veznih mesta na SCAP-u*.



Odvajanje holesterola na ovom kompleksu izaziva **konformacione promene** i citav kompleks se odvaja od GER-a.



Kompleks zatim intracelularnim transportom odlazi do **goldzijevog aparata**. Tu biva *proteoliticki razgradjen*, a deo SREBP se odvaja i postaje **aktivni transkripcioni faktor**.

Aktivirani transkripcioni faktor odlazi u jedro i vezuje se za *gen koji kodira enzim HMG-CoA reduktazu*, povecava se koncentracija enzima u celiji a samim tim se podstice i povecana sinteza holesterola.

*Brzina razgradnje HGM-CoA takođe zavisi od koncentracije holesterola:

