

BIOCHIMIA

ENZIMELE

Silvia Stratulat
Conferențiar universitar



OBIECTIVELE:

1. Noțiune despre enzime și rolul lor biologic. Asemănările și deosebirile dintre acțiunea enzimelor și a catalizatorilor nebiologici.
 2. Natura chimică a enzimelor. Dovezile naturii proteice a enzimelor.
 3. Structura enzimelor. Centrul activ și centrul alosteric al enzimelor.
 4. Enzimele simple și conjugate. Noțiune de holoenzimă, apoenzimă, cofactor, coenzimă și grupă prostetică.
 5. Funcțiile de coenzime ale vitaminelor și microelementelor. Structura coenzimelor derivate de la vitaminele B₁, B₂, B₆, PP, acidului pantotenic, biotinei, acidului folic și rolul lor ca coenzime.
-



NOȚIUNE DE ENZIMĂ

- ENZIMĂ – de la grecescul “*EN ZYME*”- în drojdii
- Enzime – biocatalizatori de natură proteică
- Măresc V reacțiilor chimice, termodinamic posibile
- E- acționează strict într-o anumită consecutivitate și cu o anumită specificitate



ROLUL BIOLOGIC

□ Digestiv (enzimele digestiei)

□ Metabolic

□ **MEDICAL**

ENZIMODIAGNOSTICUL

ENZIMOTERAPIA



Natura chimică a E

- **E- sunt proteine** și posedă toate proprietățile fizico-chimice specifice acestor molecule (solubilitate, proprietăți osmotice, sarcină electrică netă, denaturare termică)
 - **Dovezile experimentale:**
 1. Sunt alcătuite din AA
 2. Prezintă macromolecule
 3. În apă formează soluții coloidale cu proprietățile sale specifice
 4. Prezintă electroliți amfoliți
 5. Se supun denaturării
 6. **Au fost sintetizate în condiții de laborator din AA (ribonucleaza, lizozima)**
-



Asemănările E cu catalizatorii neorganici

1. catalizează numai reacțiile posibile din punct de vedere energetic
2. nu modifică echilibrul reacțiilor reversibile
3. nu modifică direcția reacției
4. nu se consumă în procesul reacțiilor.



Deosebiriile enzimelor (E) de catalizatorii neorganici

1. Viteza catalizei enzimatică este cu mult mai mare decât a celei nebiologice (1 mg de Fe în componența catalazei poate înlocui o tonă de Fe metalic).
2. **E** posedă specificitate înaltă.
3. **E** catalizează reacțiile chimice în condiții blânde (presiunea obișnuită, temperatura 37C, pH aproape neutru).



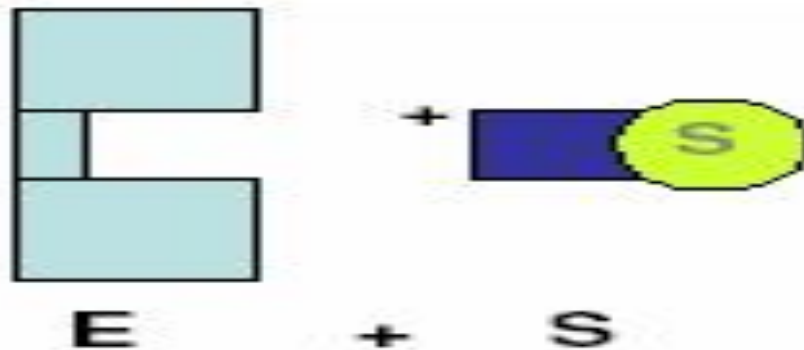
Deosebiriile E de catalizatorii neorganici

4. E catalizează reacțiile fără formarea produselor intermediare – randamentul este de 100%
5. Activitatea E, de aici și reacțiile enzimatice se reglează.
6. Viteza reacțiilor este direct proporțională cu cantitatea E.



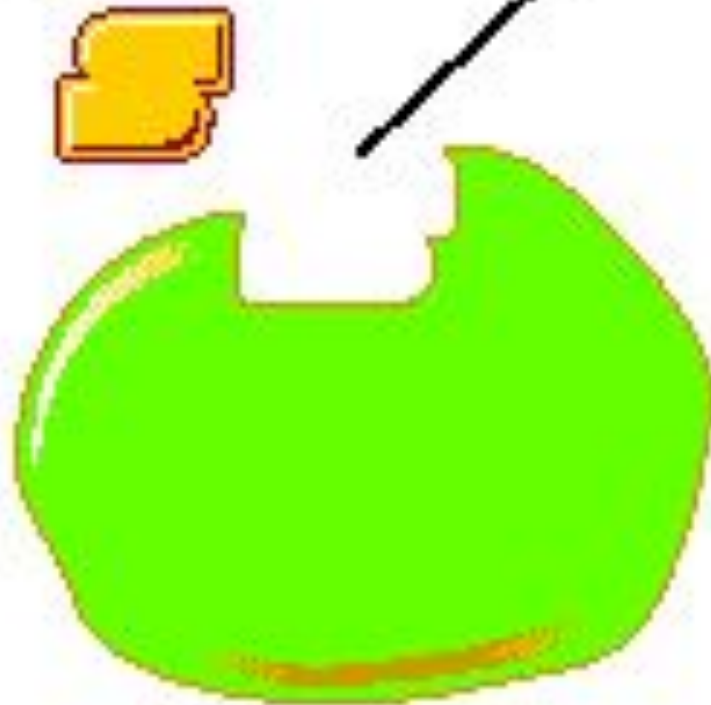
Structura enzimelor (E)

- Masa moleculară a **E** e de mii de ori mai mare decât masa moleculară a substratului (**S**)
- **S** – sau ligandul, substanța asupra căreia acționează **E**
- **E** acționează nu cu toată molecula dar cu un anumit sector – denumit **centrul activ (CA)**
- **CA** - locul care asigură interacțiunea **E** cu **S** și transformarea ulterioară a acestuia în **P**



Substrate

Active site



substrate



**bonds in substrate
are weakened**

products



**active
site**



enzyme

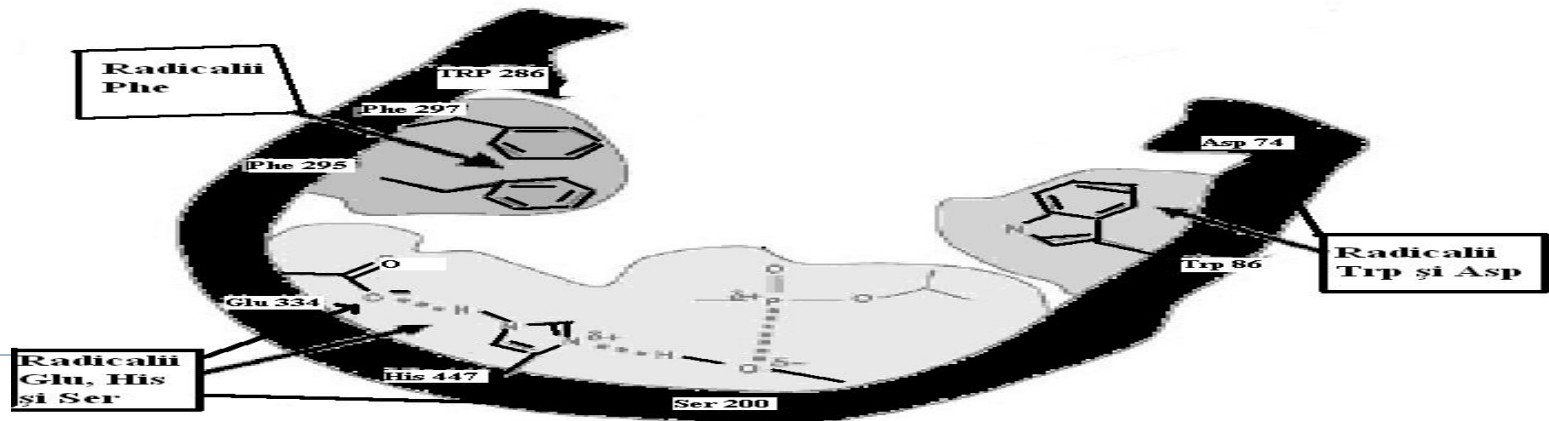
enzyme-substrate

enzyme

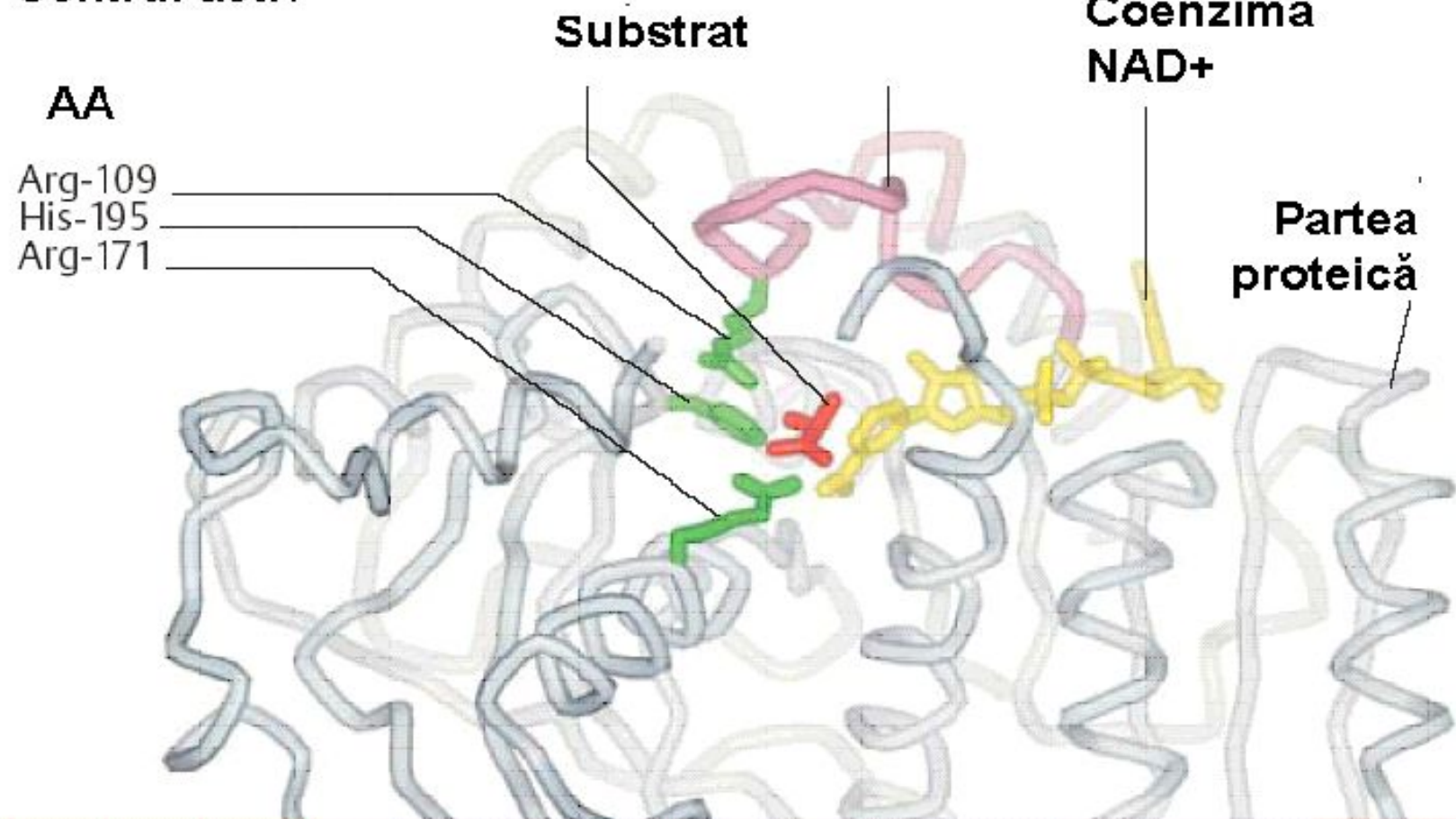


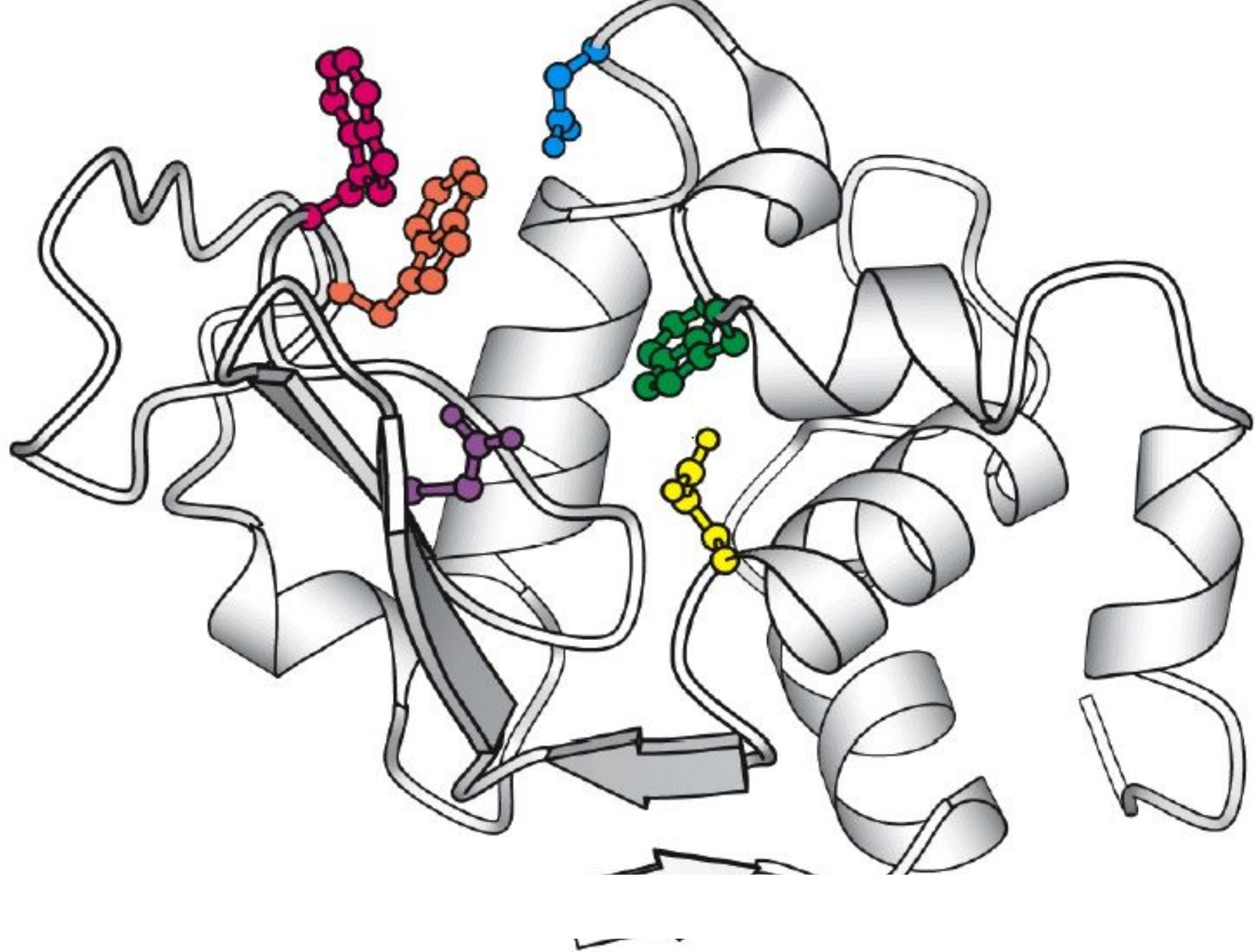
Particularitățile CA

1. este o structură **tridimensională** unică, formată din radicali ai aminoacizilor **distanțați** în catena primară proteică;
2. Posedă grupări funcționale active (-OH, -SH, -NH₂, -COOH, etc.)



Centrul activ





Particularitățile CA

3. Are formă de adâncitură sau cavitate
4. Ocupă o parte relativ mică din volumul **E** și majoritatea resturilor de AA în molecula **E** nu contactează cu **S**
5. **S** relativ slab se leagă cu **E**
6. **CA** este alcătuit din 2 sectoare:
 - Sectorul de contact (de legare)
 - Sectorul catalitic



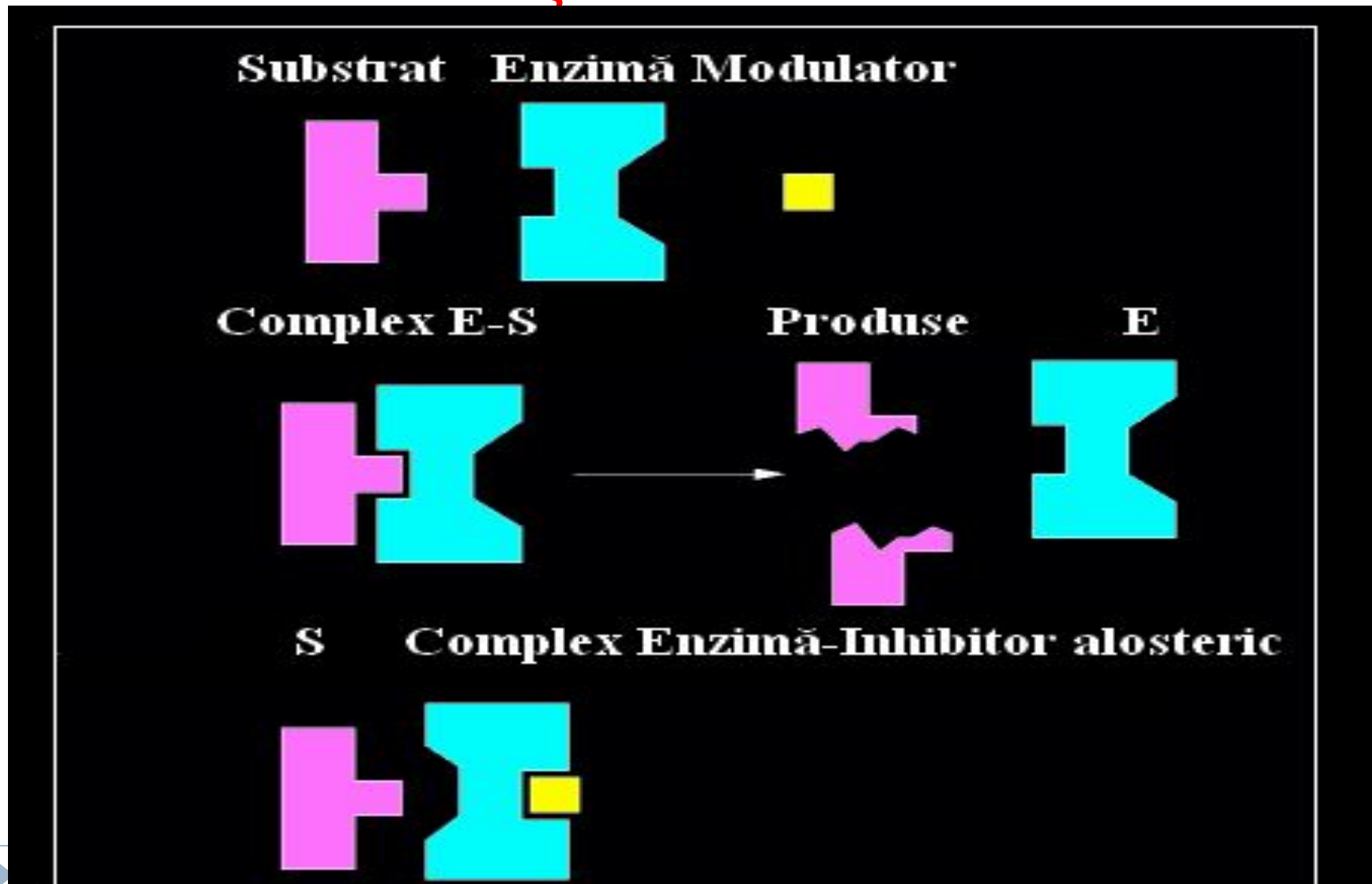
Organizarea funcțională a enzimelor

Centrul alosteric

1. Este centrul reglator
2. Fixează **modulatorul alosteric**
3. Adăugarea modulatorului modifică conformația enzimei și secundar activitatea ei
4. Modulatorul pozitiv – **activator**
5. Modulatorul negativ - **inhibitor**

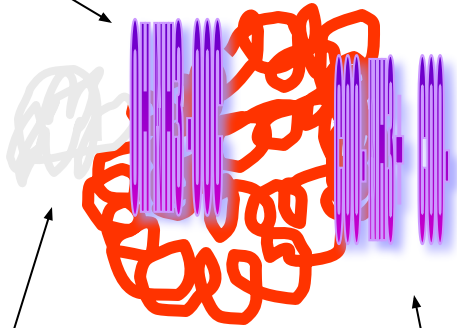
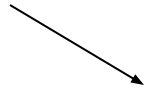


Reglarea alosterică a activității enzimatică



Reglarea alosterică

Centru Alosteric



Modulator



E

Centru Activ



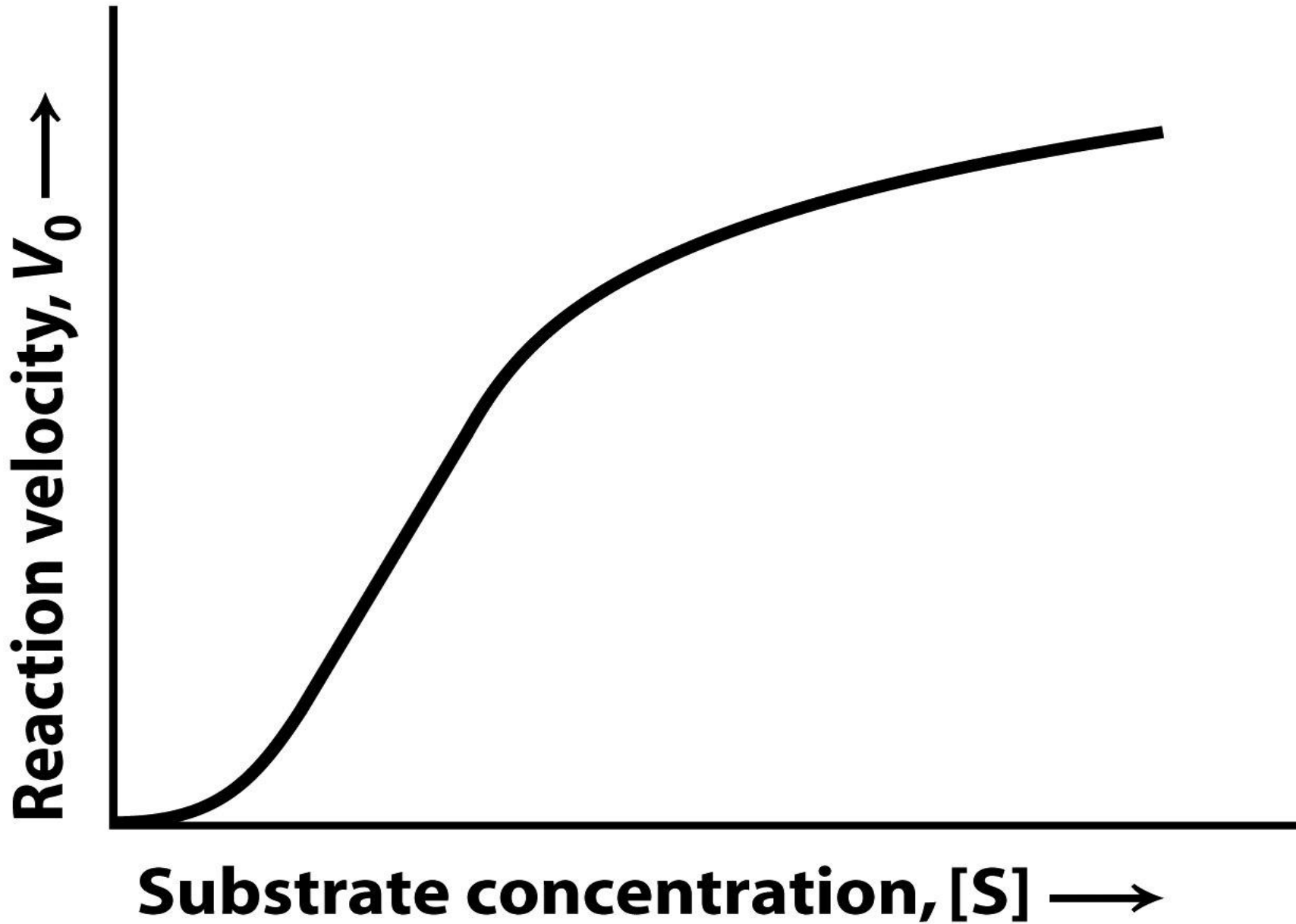
S



Enzime alosterice

- Moleculele enzimelor alosterice sunt mai mari, mai complexe și sunt oligomere pare
- Au cinetica lor – viteza reacțiilor în dependență de c% **S** are formă sigmoidală, dar nu hiperbolică, cauzată de urmările interacțiunii între protomerii ce leagă **S** în mod cooperativ





▶ **Figure 8-14**

Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W. H. Freeman and Company

Structura enzimelor

- Din punct de vedere structural deosebim:
 1. **E simple** – alcătuite numai din AA
(proteazele, lipazele, ribonucleaza)
 2. **E conjugate** - formate din:
 - a. **partea proteică – apoenzimă**
 - b. **partea neproteică**
- HOLOENZIMĂ – partea neproteică
+apoenzima cu activitate catalitică**



PARTEA NEPROTEICĂ A E

□ A: Când componenta neproteică este un ion metalic – este denumită cofactor

În calitate de cofactori apar frecvent cationii unor metale (Fe^{2+} , Mg, Mn sau Zn_2 și, foarte rar, unii anioni).



PARTEA NEPROTEICĂ A E

- B: Când componenta neproteică este o moleculă organică de mici dimensiuni – este denumită **coenzimă**



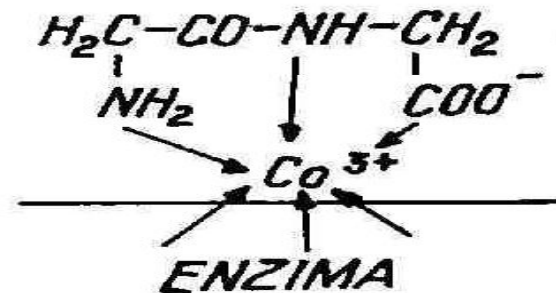
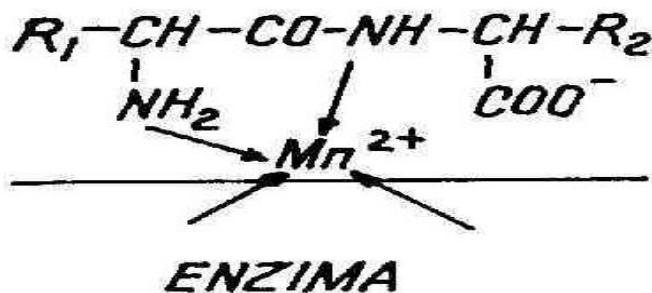
Coenzimele

- Coenzima strâns legată în structura E
 - grupare prostetică (FMN; FAD, biotina, acidul lipoic)
- Coenzima slab legat, ușor disociabilă
 - cosubstrat (NAD; NADP, coenzima A)



Rolul metalelor in cataliza enzimatica

- Sunt componente esențiale ale centrului catalitic (activ);
- Participă la legarea **S** în **CA** al **E** și formarea complexului **ES**;
- Necesare în menținerea structurii **3D** a enzimei;
- Participă nemijlocit la cataliză (în reacții de transfer de electroni)
- Participă la reglarea activității **E**



Ionii de metale –cofactori ai E

- După modul de legare și rolul ionului metalic E sunt:
 - **Metaloenzime** care conțin în calitate de cofactori ioni de metale, strâns legați de apoE
 - Exemple:
 1. Citocromi, peroxidaza, catalaza (Fe)
 2. Citocromoxidaza (Cu)
 3. alcoolDH; carboxipeptidaza (Zn)
 - **E metaloactive** – a căror activitate crește în prezența ionului metalic, care leagă metalul slab. Metalele sunt fixate de apoenzimă prin legături electrostatice la care participă resturile de AA acizi (Asp, Glu) sau bazici (Arg, Lys, His)
-

EXEMPLE DE METALOENZIME

- ***Fe*-enzyme: *hem* (citocromi, catalaze, peroxidaze);**
- ***Cu*-enzyme: citocromoxidaza, superoxid-dismutaza, tiroxin-hidroksilaza;**
- ***Mn*-enzyme: peptidaza, arginaza, izocitrat-dehidrogenaza;**
- ***Co*-enzyme: kobalamin-enzyme;**
- ***Se*-enzyme: glutationperoxidaza**



Coenzimele (CoE)

1. **Sunt parte componentă a centrului activ**
2. **Contribuie la stabilizarea conformației enzimei**
3. **Contribuie la fixarea substratului**
4. **Participă nemijlocit la actul catalitic**



Clasificarea CoE

□ CoE vitaminice

1. Tiaminice
2. Flavinice
3. Nicotinamidice
4. Piridoxinice
5. Folică
6. Cobamidice
7. Biotinice
8. lipoice

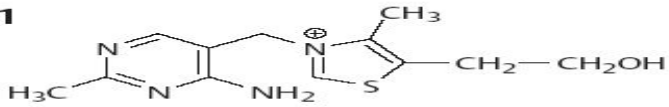
□ CoE nevitaminice

1. hemurile de diversă natură
 2. Nucleotidele
 3. Fosfații monozaharidelor
-

A. Water-soluble vitamins I

* Adult daily requirement

B1



Vitamin

Thiamine

1.5 mg *

Grain
Yeast products
Pork

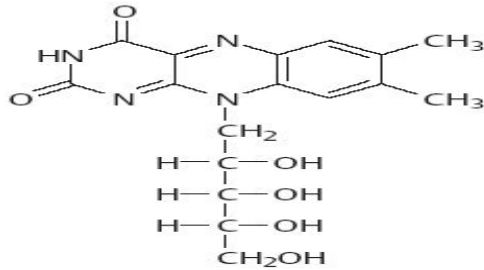
Active form: coenzyme

TPP
Thiamine diphosphate

Function in metabolism

Transfer of hydroxy-alkyl residues

B2



Riboflavin

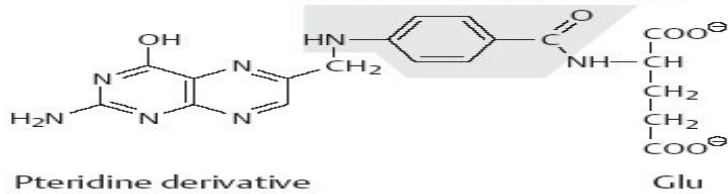
1.8 mg *

Milk
Eggs

FMN
FAD

Hydrogen transfer

4-Aminobenzoate residue



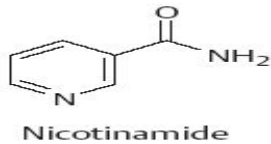
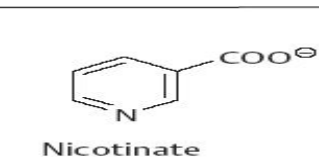
Folate

0.2 mg *

Fresh green vegetables
Liver

THF
Tetrahydrofolate

C₁-metabolism



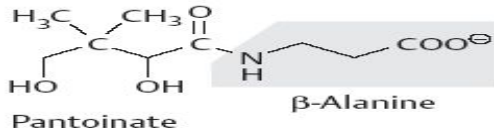
**Nicotinate
Nicotinamide**

20 mg *
(or 1.2 g tryptophan)

Meat, yeast products
Fruit and vegetables

NADP⁺
NAD⁺

Hydride transfer



β-Alanine

Pantothenate

7 mg *
Widely distributed

CoA

Activation of carboxylic acids

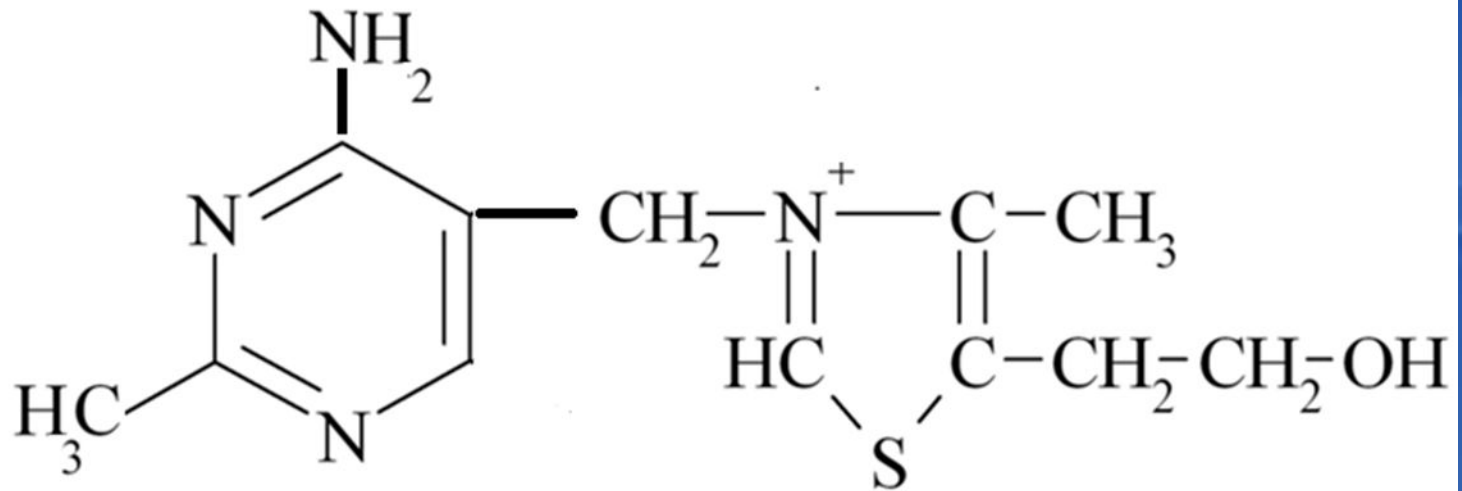
Coenzimele tiaminice

- Derivații vitaminei B1 (tiamina)
- CoE - TMP, TDP (TPP)cocarboxilaza, TTP

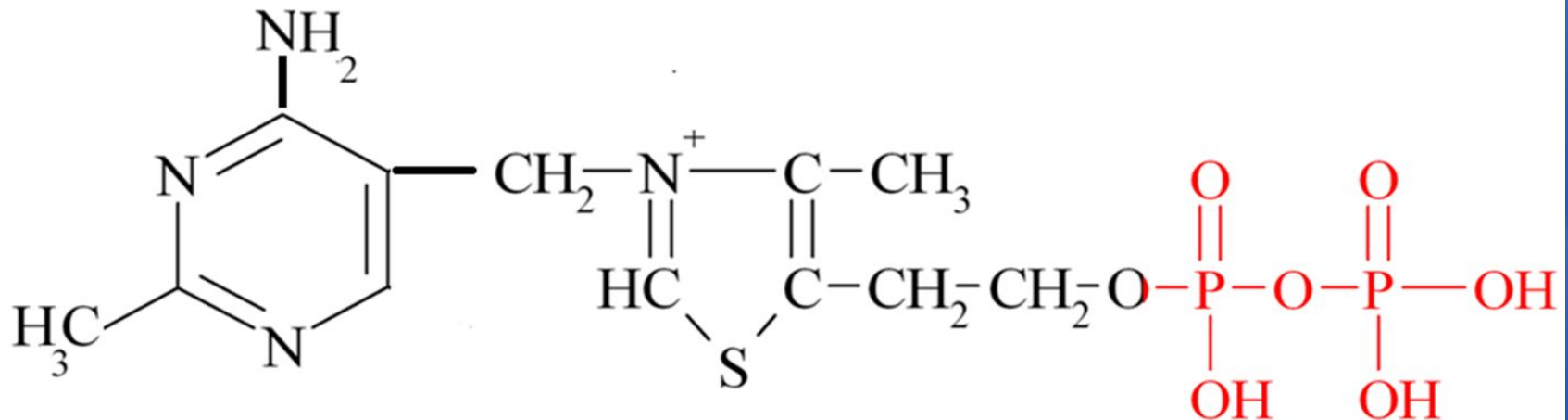
- **Rolul:**
 1. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului
 2. Decarboxilarea oxidativă a α cetoglutaratului
 3. Reacții de transcetolare



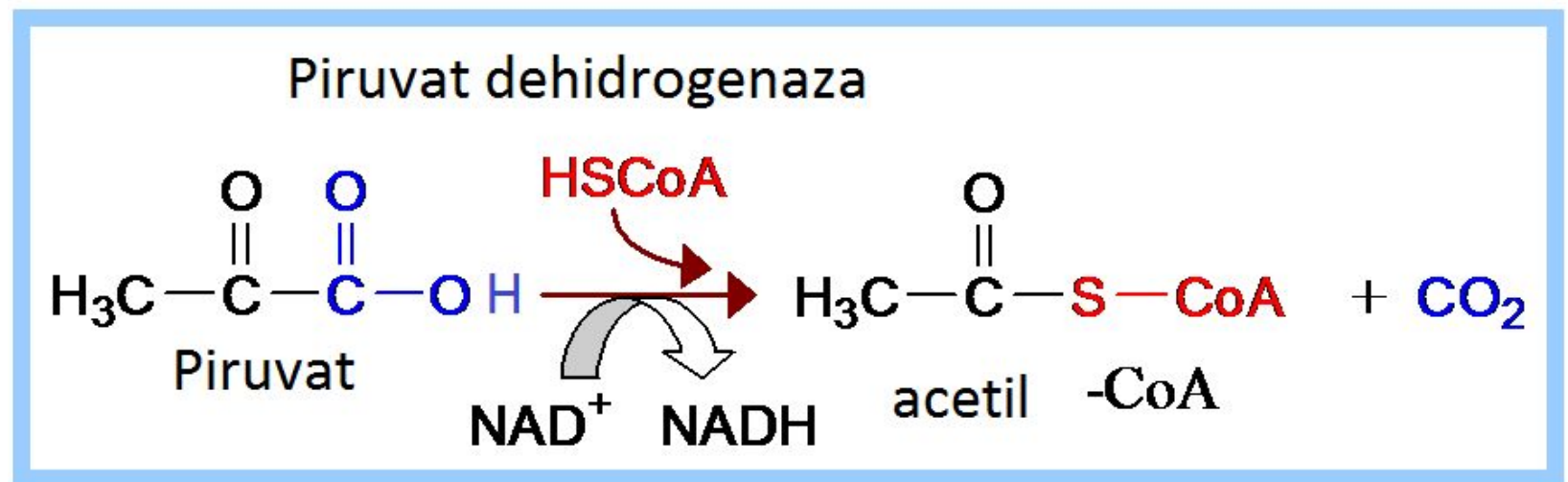
Vitamin B₁: Tiamina



Coenzima - Tiamin pirofosfat – TPP



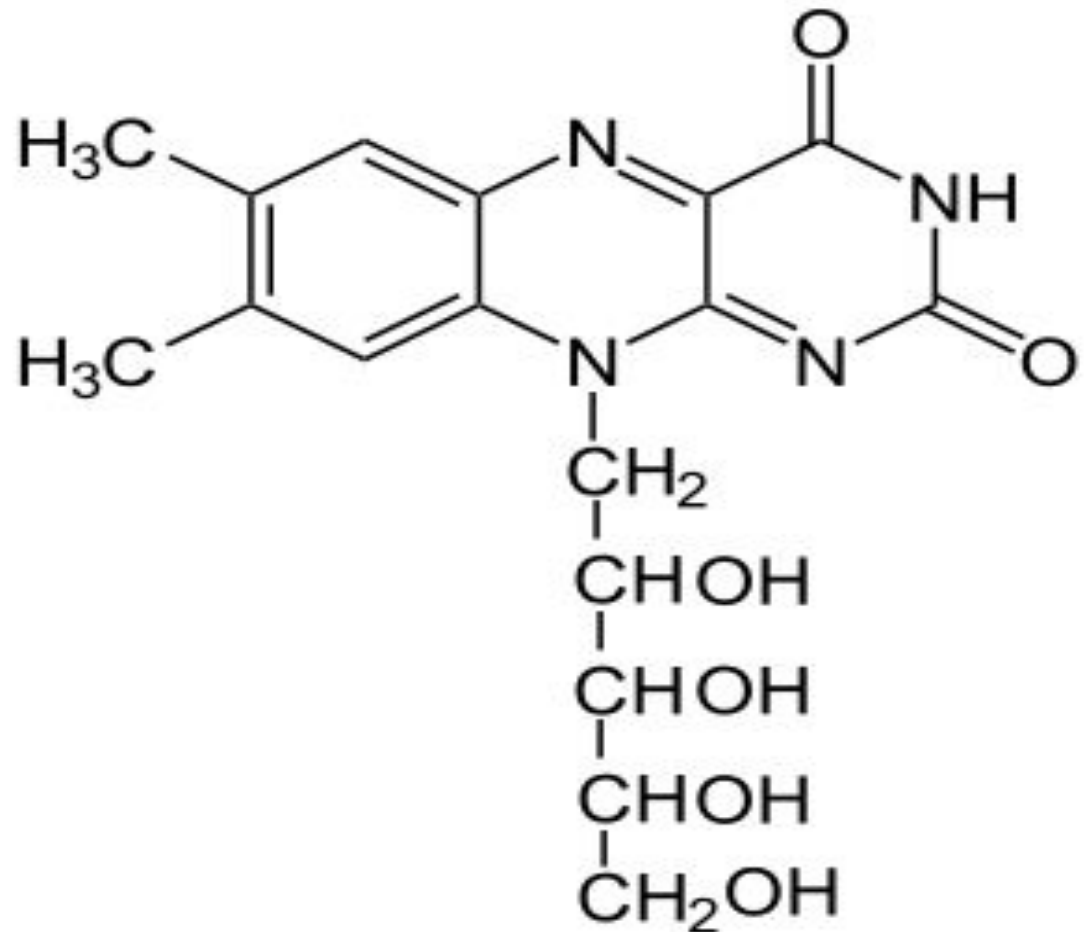
Reacția sumară a decarboxilării oxidative a piruvatului cu participarea TPP (deriv. Vit. B₁)



Coenzimele flavinice

- Derivați ai vitaminei B2 - riboflavina

structură
heterociclică
numita
izoaloxazină

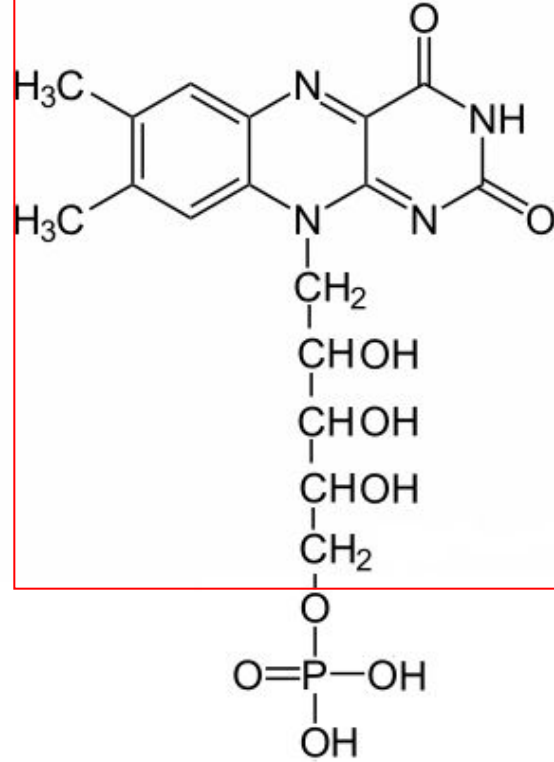
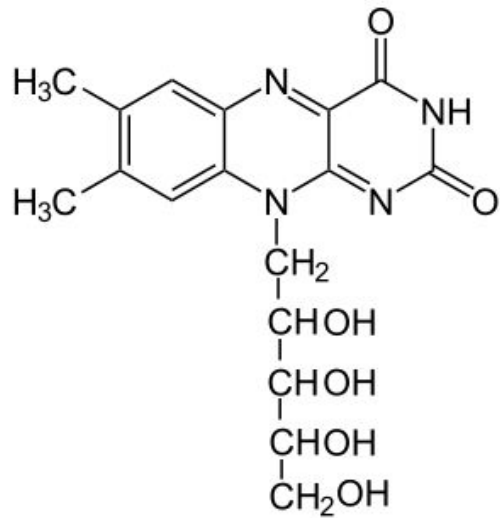


Coenzimele flavinice

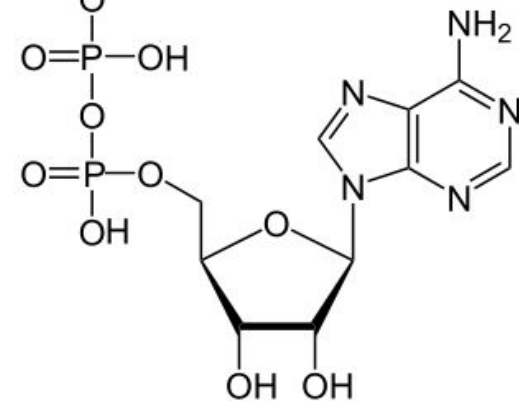
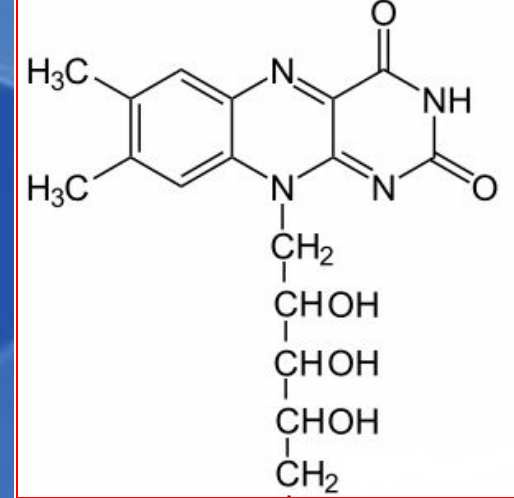
- **CoE- Flavin mononucleotidul (FMN)**
 - **Flavinadenindinucleotidul (FAD)**
 - **Rolul:**
 1. **Participă în reacțiile de oxido-reducere:**
 2. Dezaminarea AA
 3. Degradarea aldehydelor (aldehidDH)
 4. Degradarea purinelor (xantinoxidaza)
 5. Ciclul Krebs (succinatDH)
 6. Oxidarea AG
 7. DOP (dihidrolipoilDH)
-



Vitamina B₂: riboflavina

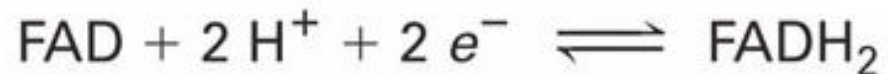
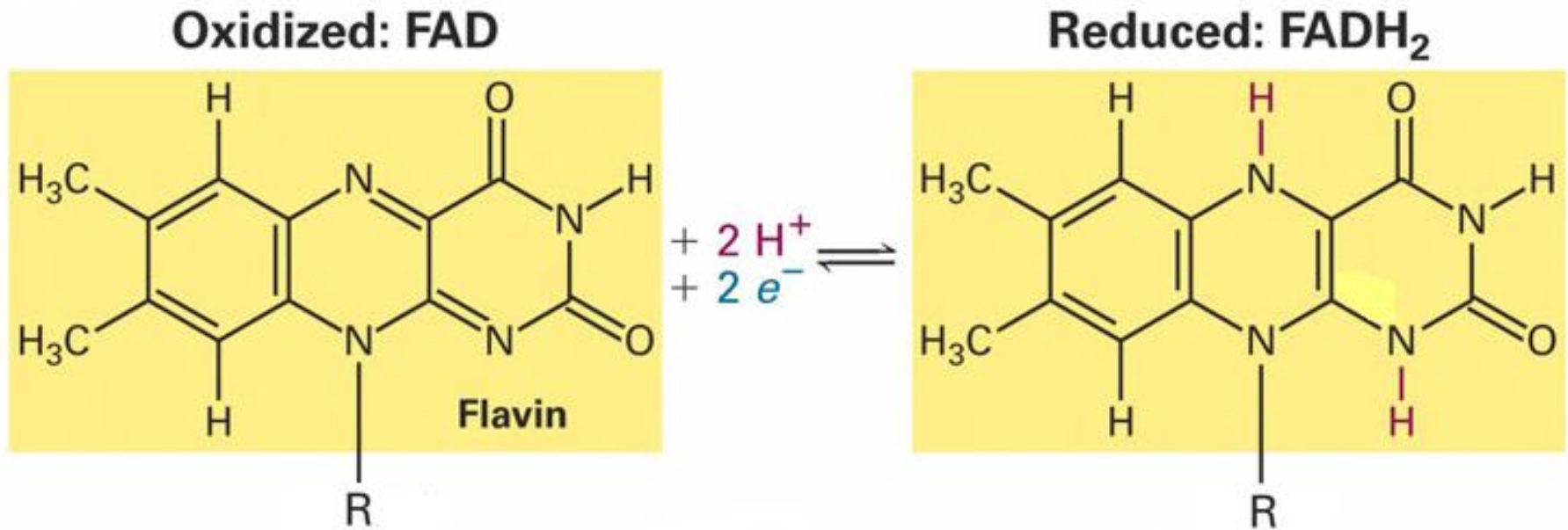


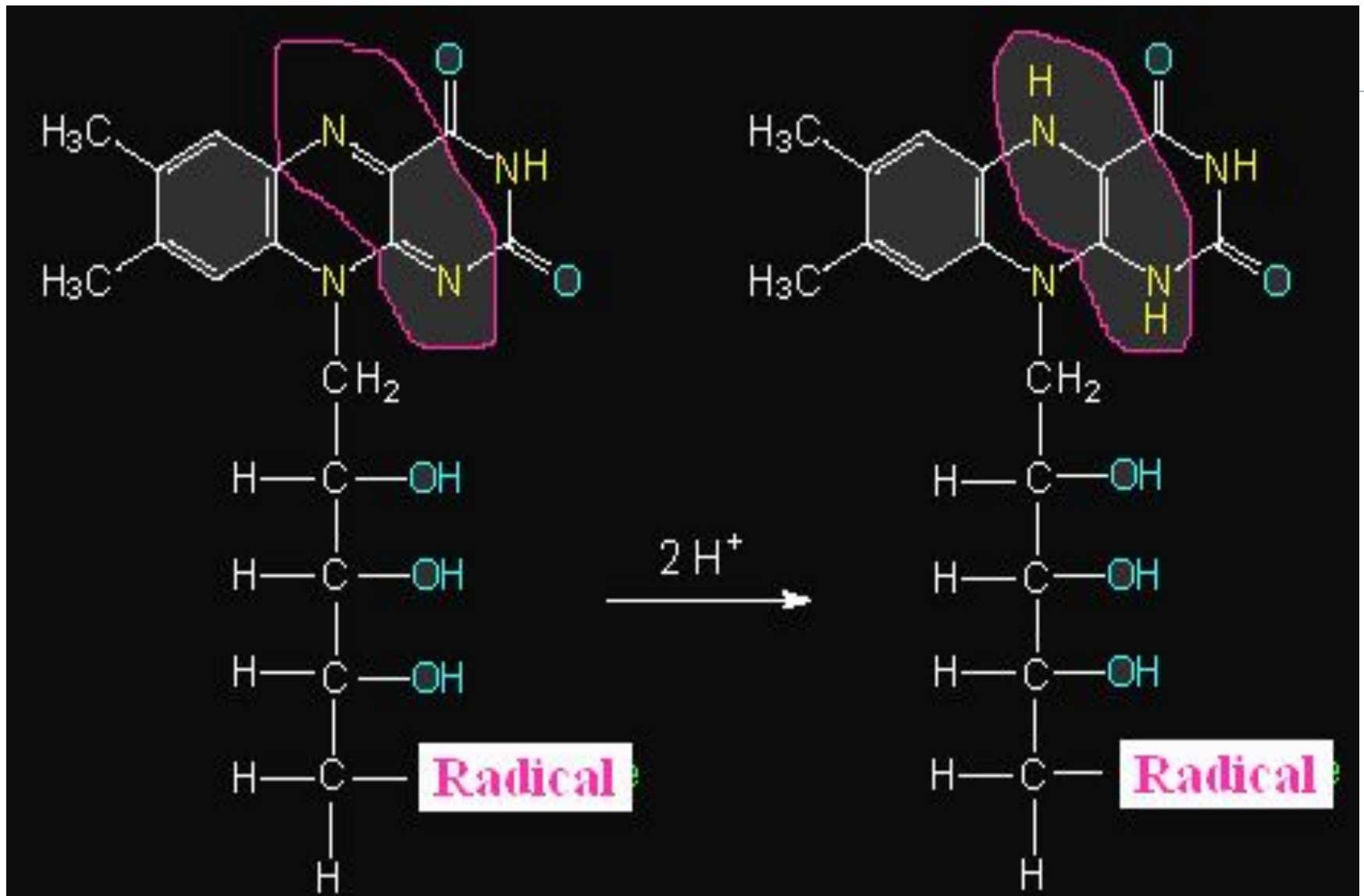
**Coenzima -
Flavin mononucleotidul (FMN)**



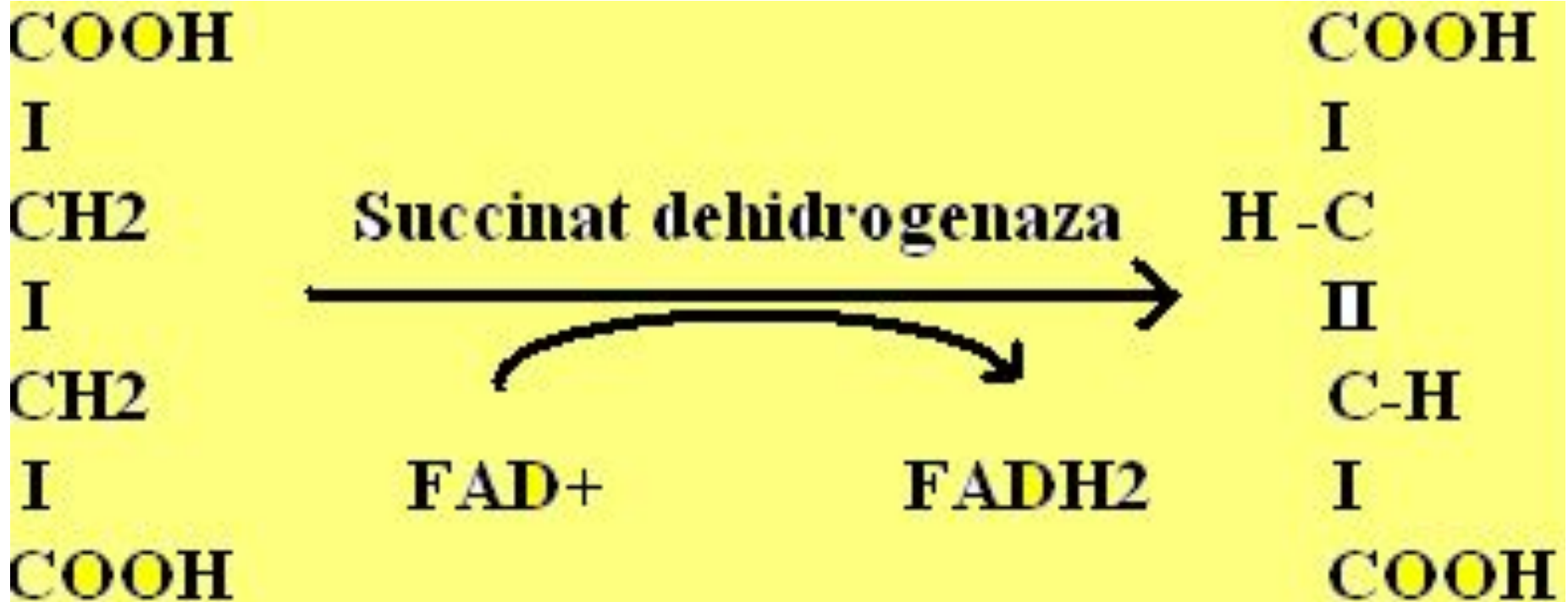
**Coenzim -
Flavin adenin dinucleotidul (FAD)**

Coenzimele flavinice



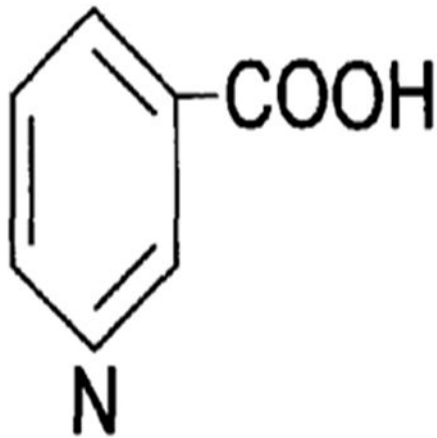


Reacția de dehidrogenare a succinatului cu participarea FAD – derivatul vit. B₂

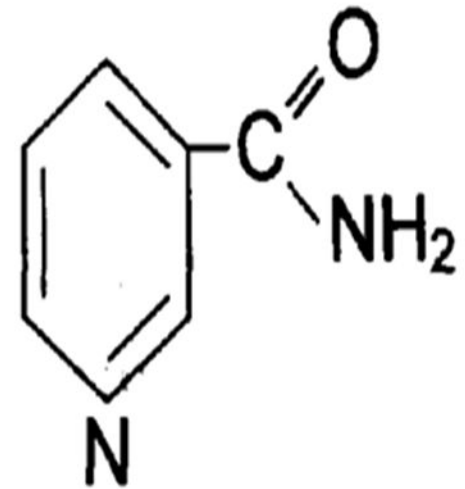


Coenzimele nicotinamidice

- Sunt derivați ai vitaminei PP



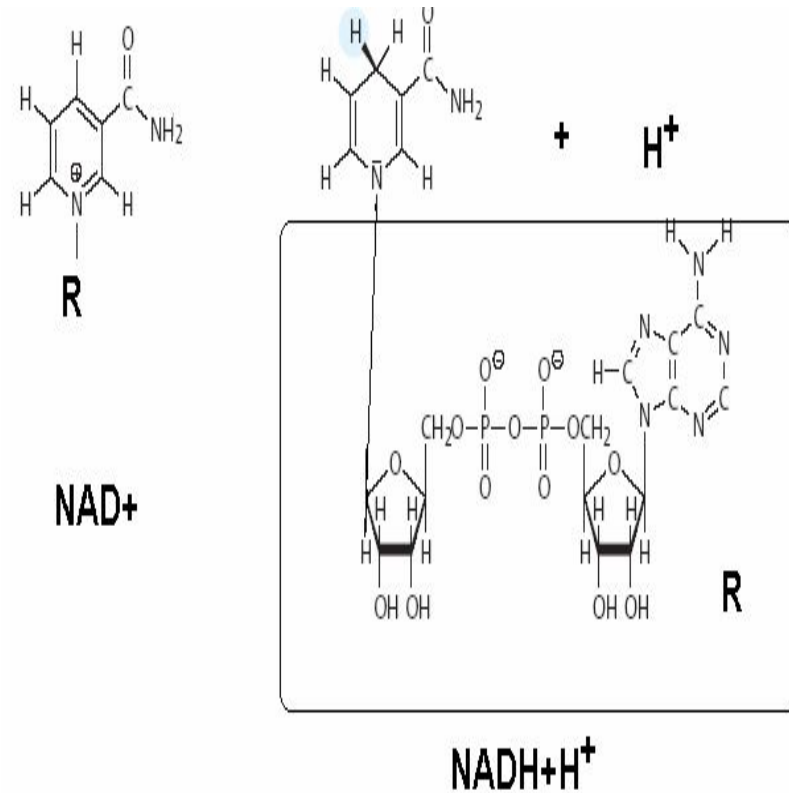
Acid nicotinic



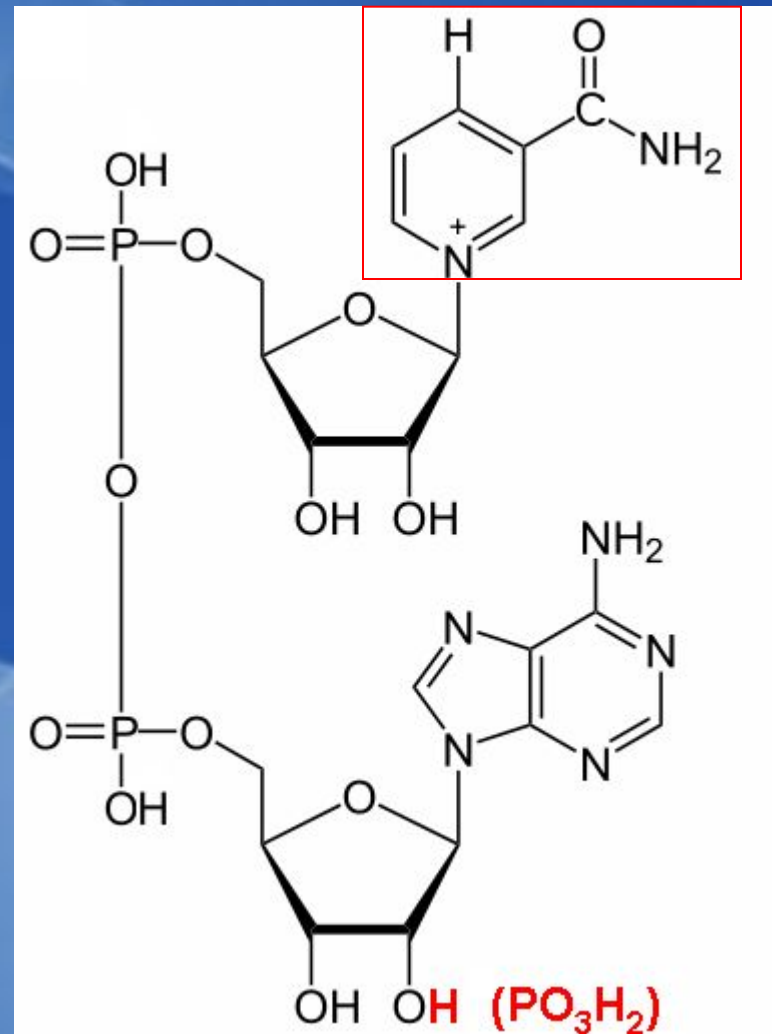
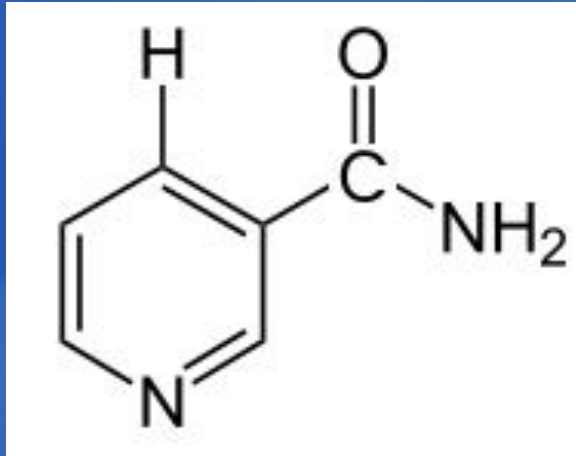
Nicotinamida

Coenzimele nicotinamidice

- CoE - NAD și NADP
- Rolul
- Participă în reacțiile de oxido-reducere (dehidrogenarea S –transferul unui hibrid ion (H^+ și 2 e). Alt proton rămâne în soluție H^+



Vitamina PP: nicotinamida

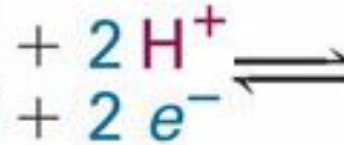


Coenzimele -

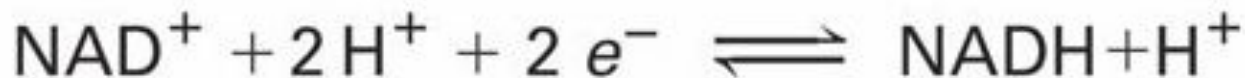
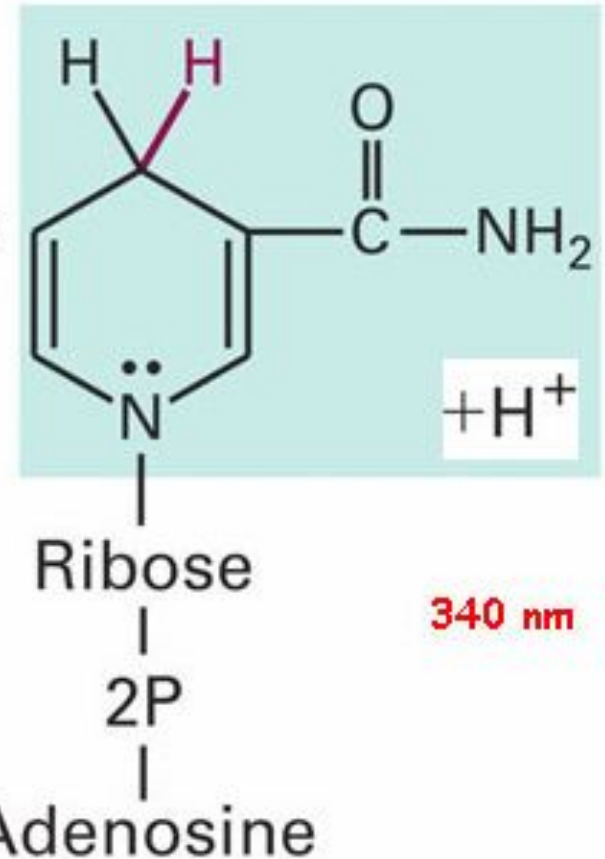
- nicotinamid adenin dinucleotidul (NAD⁺)
- nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (NADP⁺)

Coenzimele nicotinamidice

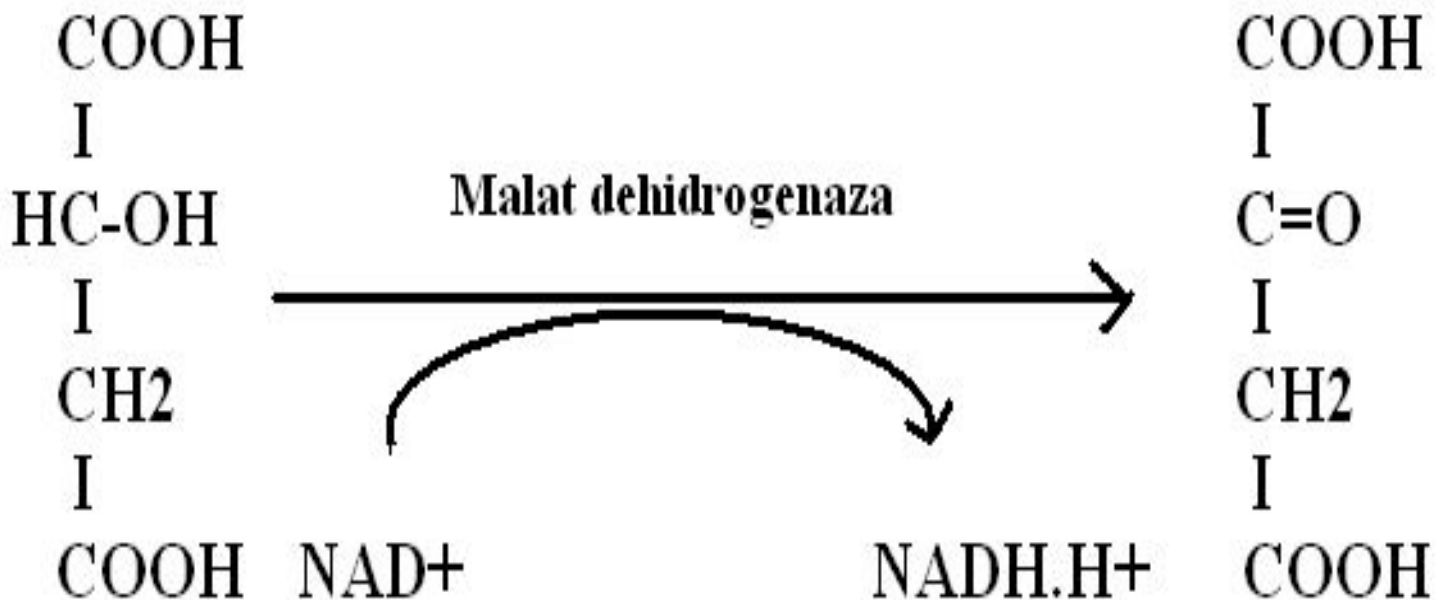
(a) Oxidized: NAD^+



Reduced: NADH

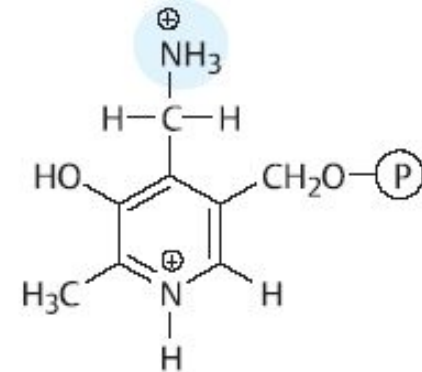
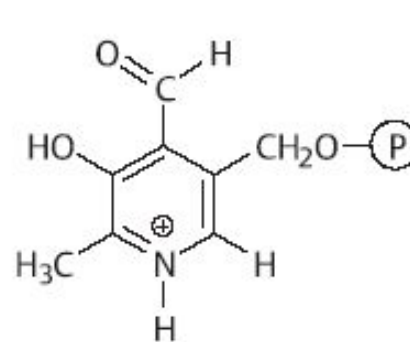


Reacția de dehidrogenare a malatului cu participarea NAD – derivatul vit. PP



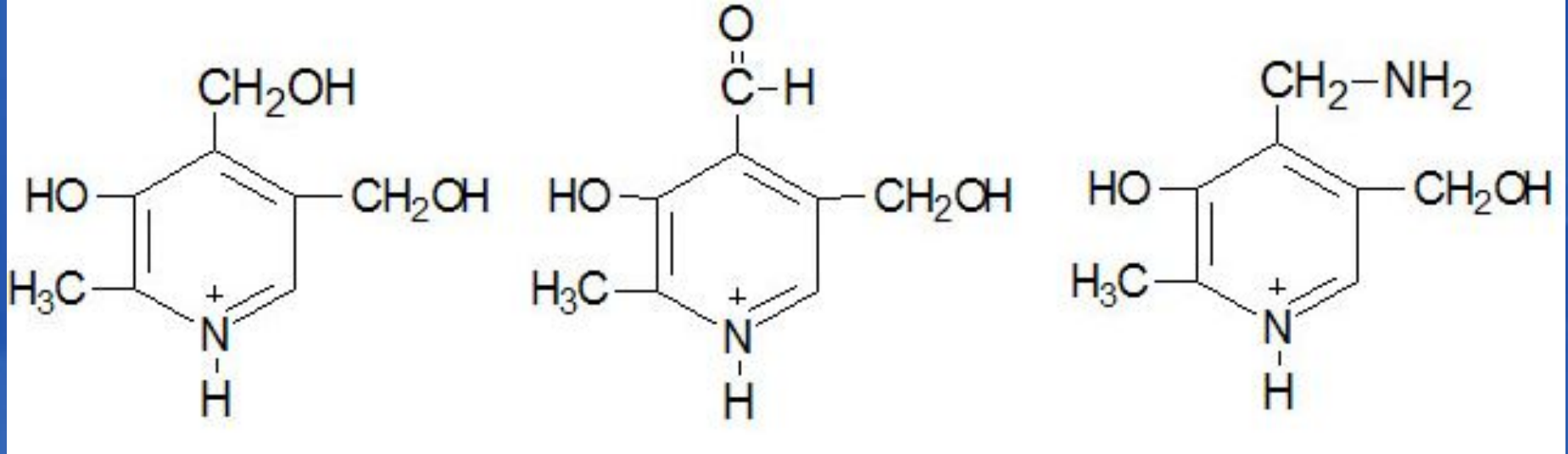
Coenzimele piridoxinice

- Derivați a vitaminei B6
- Co – piridoxalfosfat și piridoxaminfosfat
- Rolul:
 1. Transaminarea AA
 2. Decarboxilarea AA
 3. Transsulfurarea



Vitamina B₆

:

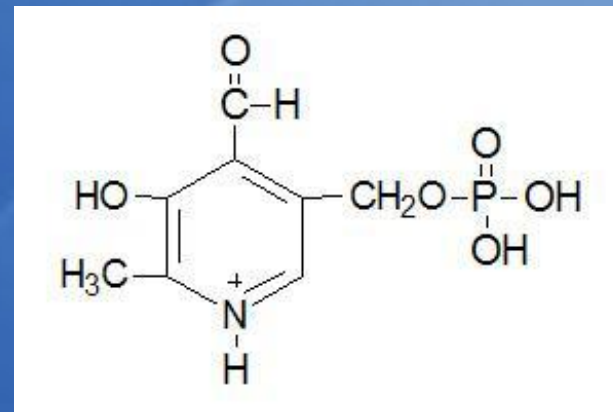


Piridoxina

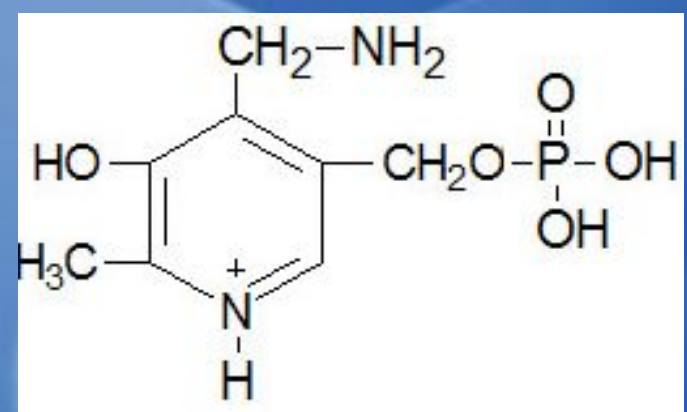
Piridoxal

Piridoxamina

Coenzimele:

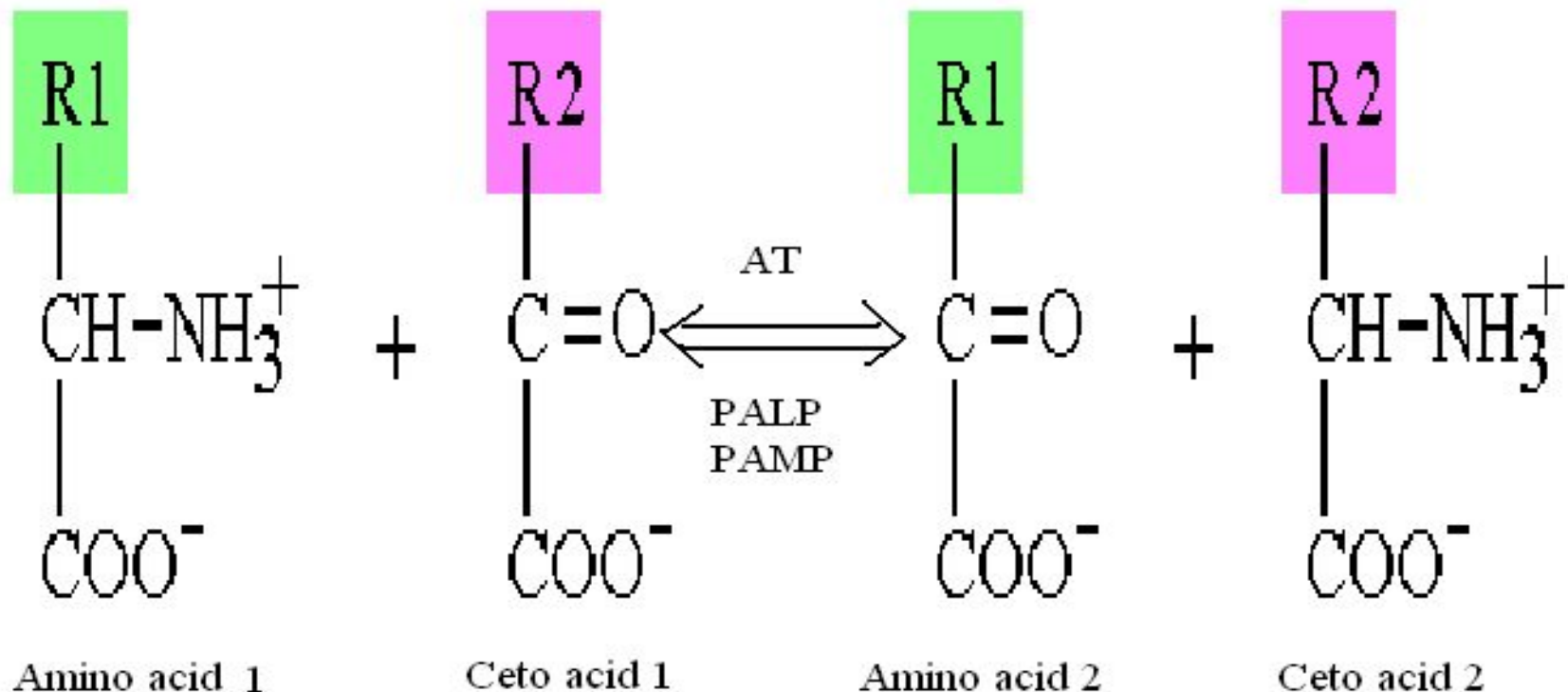


Piridoxal fosfat



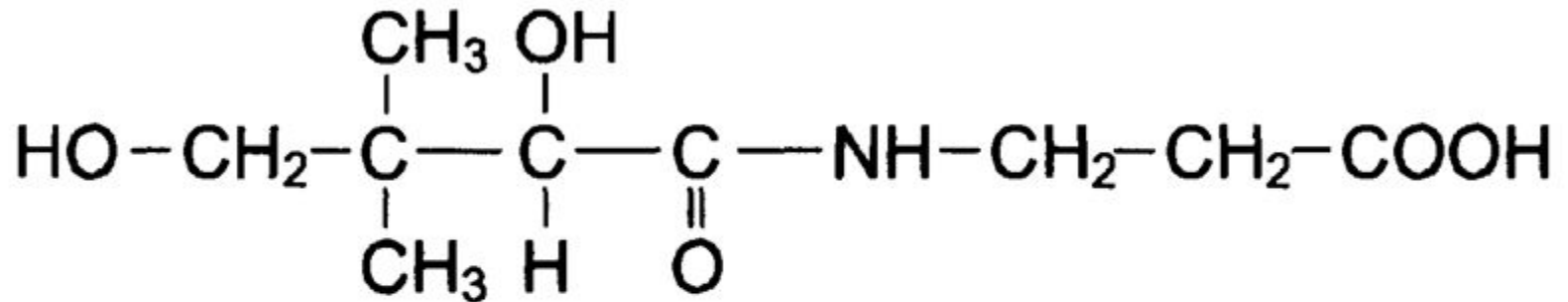
Piridoxamin fosfatul

Reacția de transaminare a aminoacizilor cu participarea PALP și PAMP – derivații vit. B₆



ACIDUL PANTOTENIC

(vitamina B5)



2.4 - dihidroxi
-3,3 dimetilbutirat

β- Ala

Coenzimele acidului pantotenic:

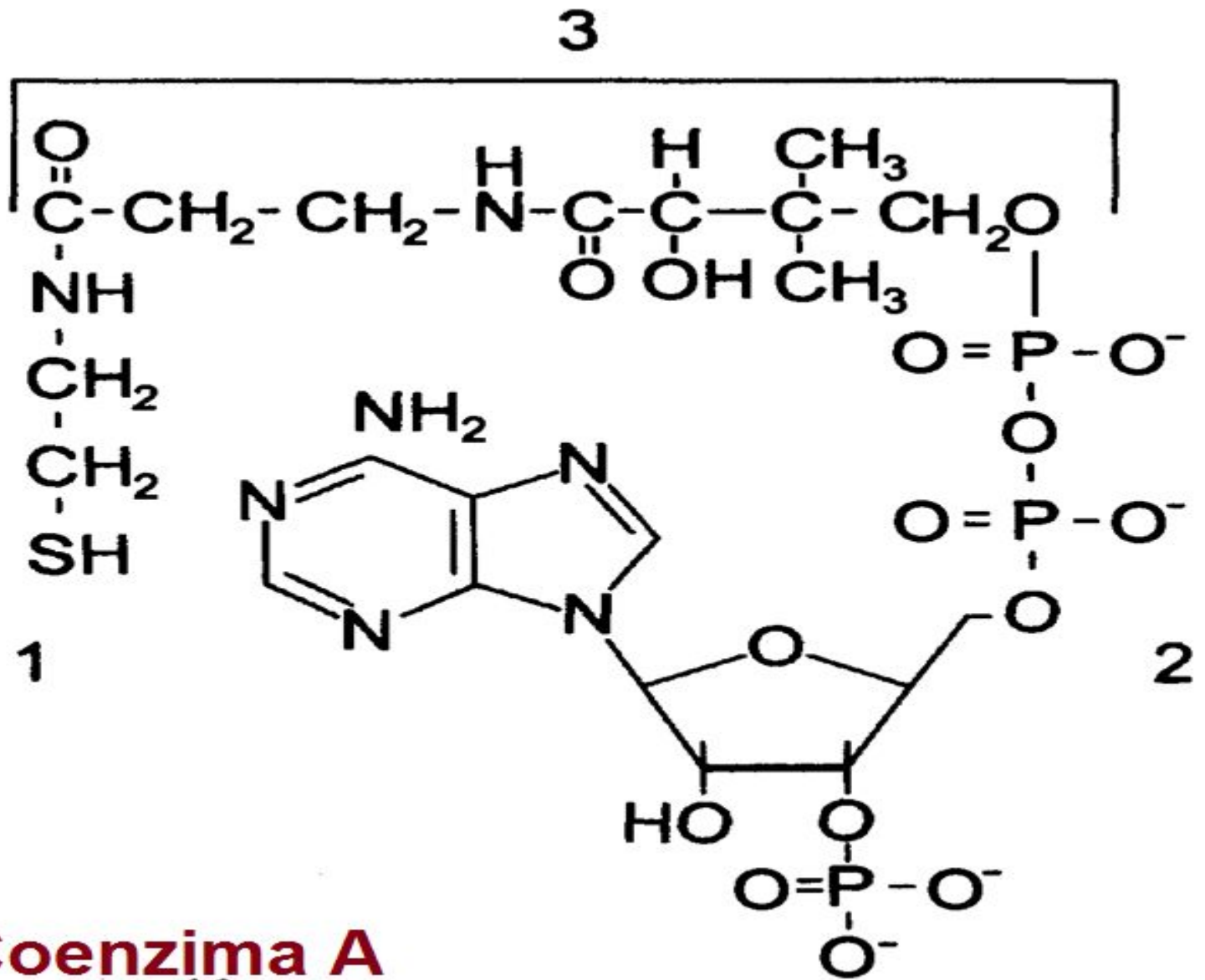
- Coenzima A
- Fosfopantoteina

Rolul metabolic:

Coenzima A - la activarea acizilor grași

Fosfopantoteina – la sinteza acizilor grași



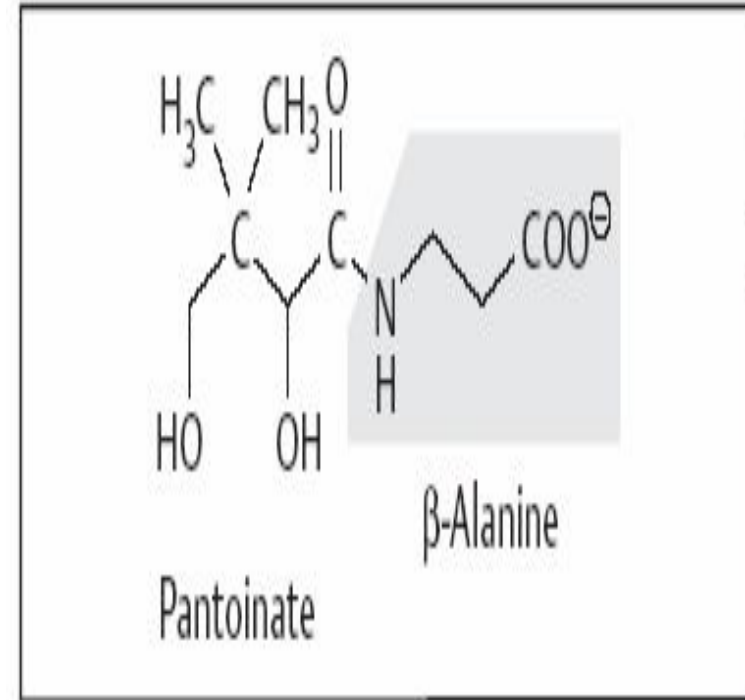


Coenzima A

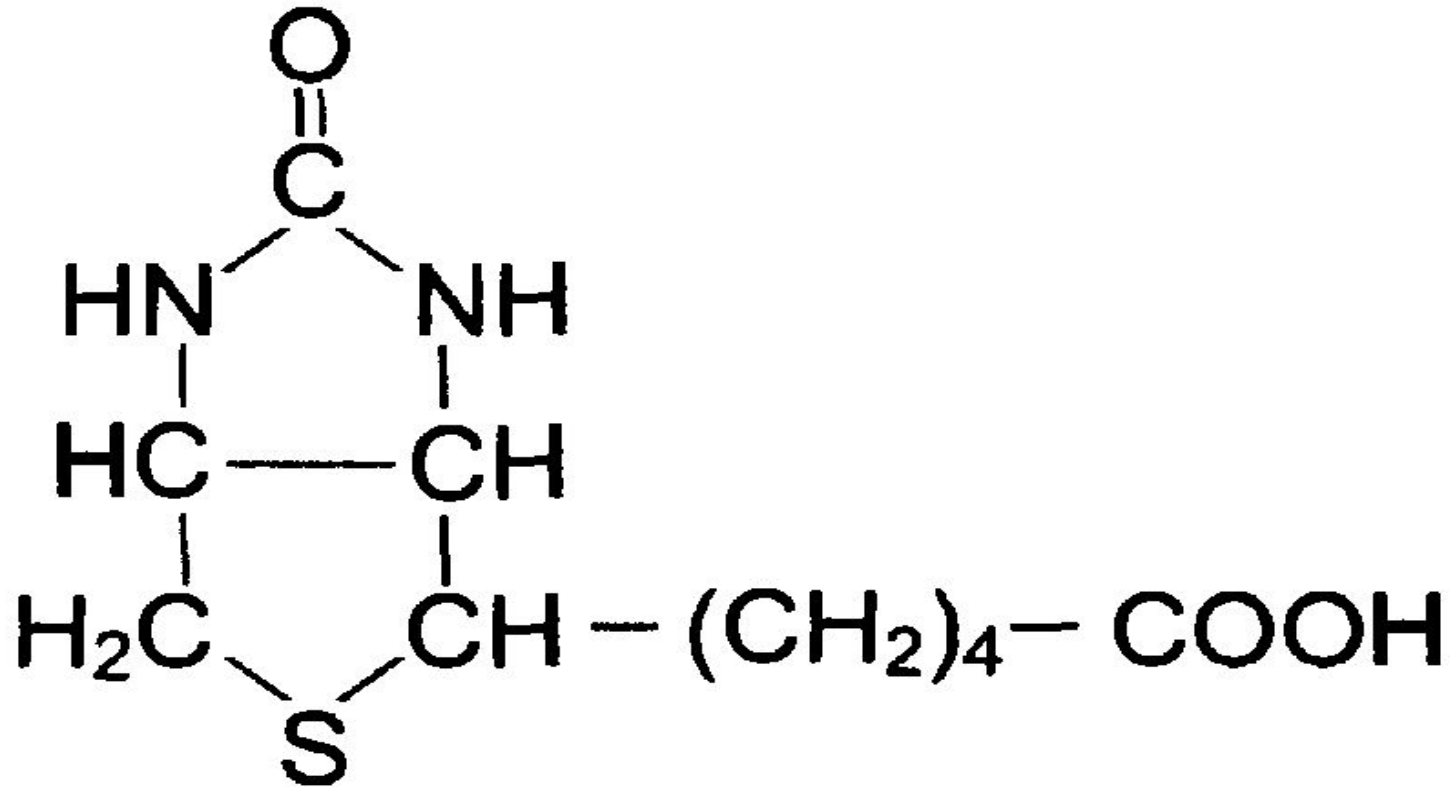


Co pantotenice (B5)- HS-CoA

1. biosinteza AG
 2. biosinteza Col
 3. sinteza corpilor cetonici
 4. Oxidarea AG
 5. Ciclul Krebs
 6. Sinteza aminolevulinatului
 7. DOP
 8. DO a alfa cetogluaratului
- Transferul grupelor acil



Co biotinice – vitamina H

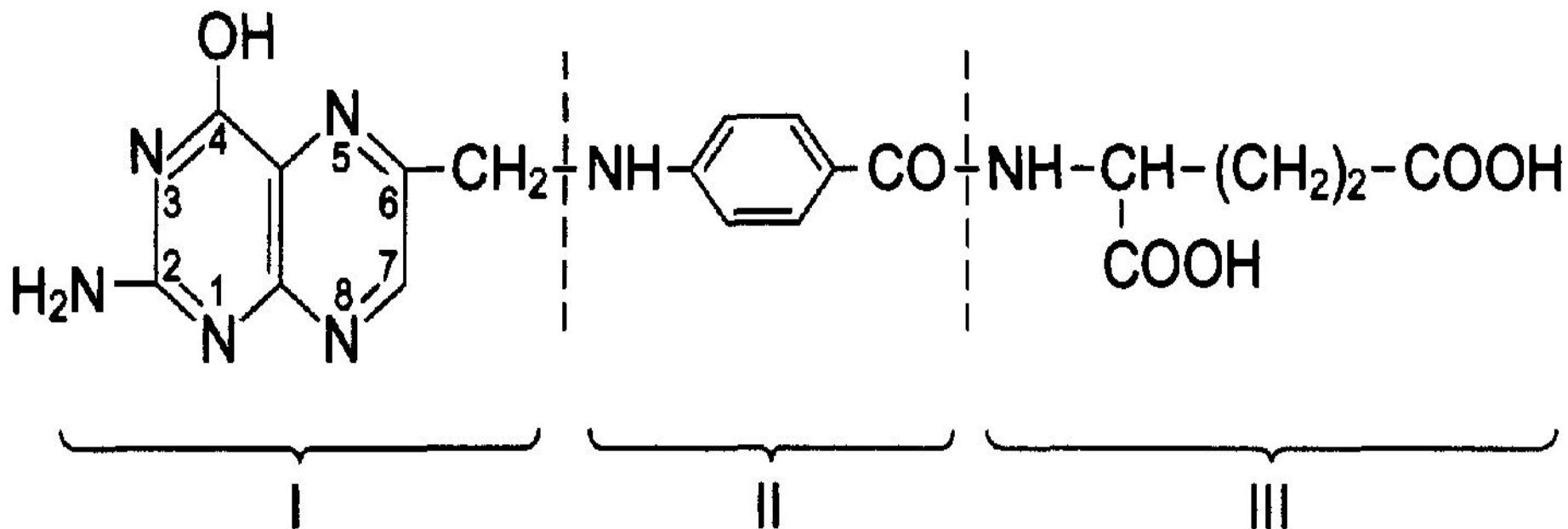


Co biotinice – vitamina H

- **ROL:**
- **Participă în reacțiile de carboxilare a piruvatului, acetil Co A și propionil CoA**
- Gluconeogeneză (I cale –piruvatcarboxilaza)
- Sinteza AG (formarea lui malonil CoA din acetil Co A)
- Oxidarea AG cu număr impar (transformarea propionil-CoA în succinil CoA)
- Intervine în catabolismul Leu



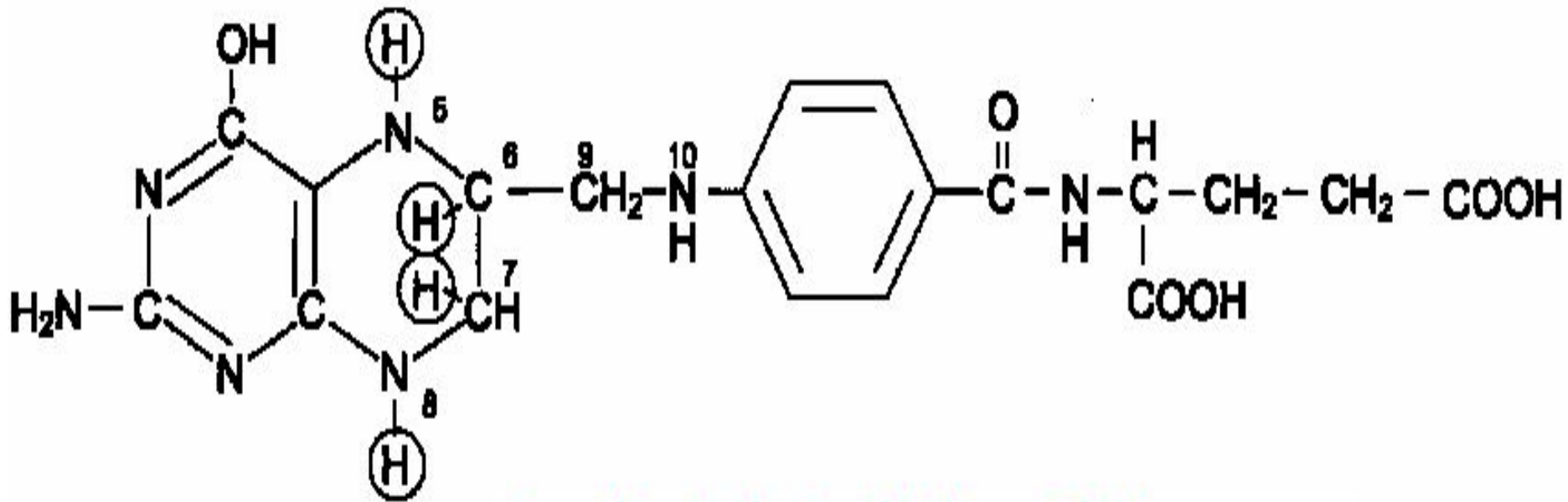
Coenzimele folice – derivat al acidului folic (vitamina Bc sau vitamina B₉)



► **Acidul folic**

Co folice


□ acidul tetrahidrofolic



Acidul tetrahidrofolic



ROLUL THF

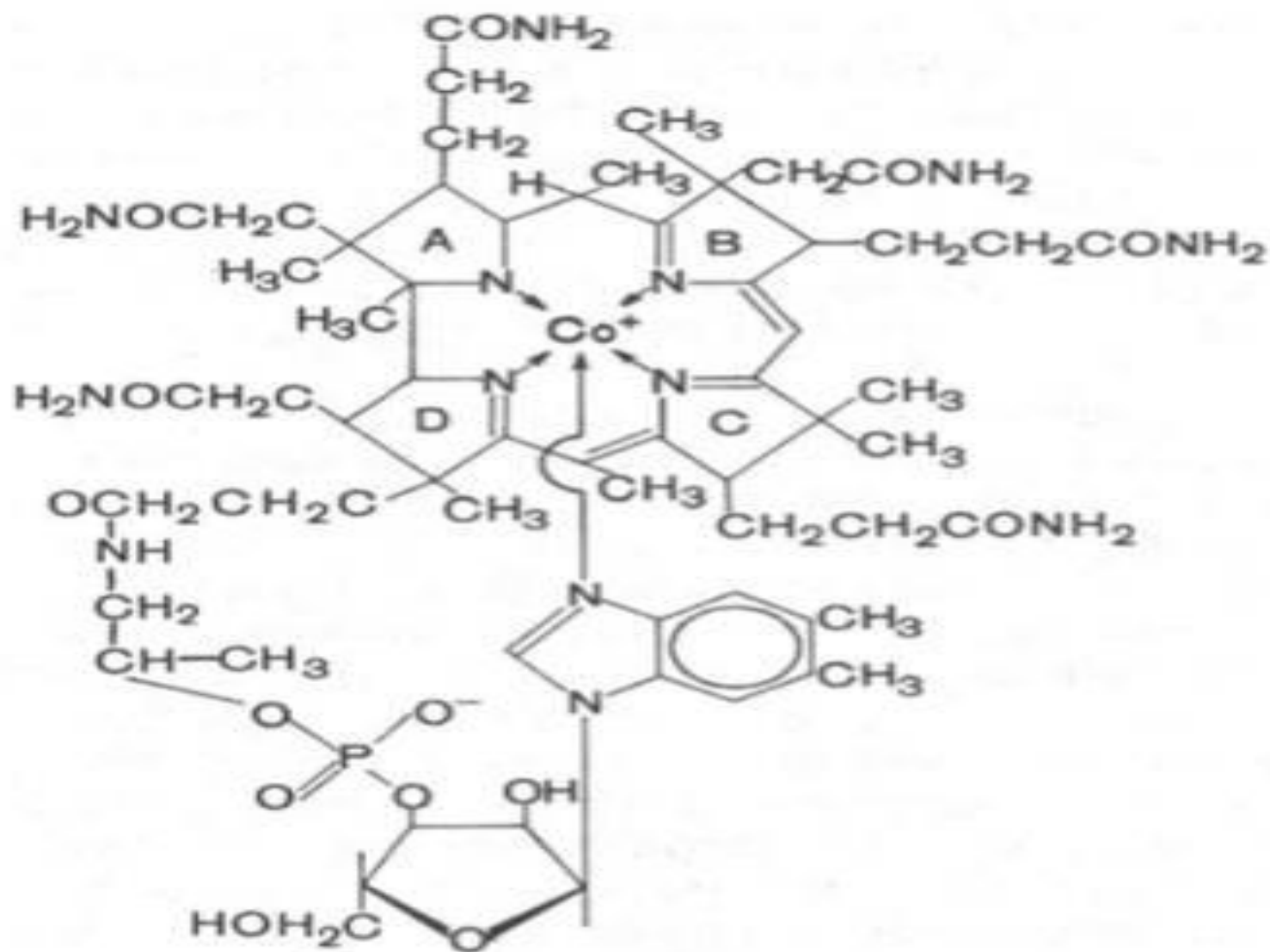
- transportator al unor fragmente cu un atom de carbon (grupări monocarbonice):
 - -metil (-CH₃),
 - -metilen (-CH₂-),
 - -metenil (-CH=),
 - -formil (-COH)
 - -oximetil (-CH₂-OH)
 - -formimino (-CH=NH)
 - THF participă ca coenzimă în reacțiile de biosinteză a serinei, glicinei, metioninei, timinei, sinteza purinelor.
-
- 

Co cobamidice – B12

-ciancobalamina

- Vitamină antipernicioasă pentru om și factor de creștere pentru microorganisme
 - În ficat sunt 3 compuși cobalaminici: metil-; hidroxo- și deoxiadenozil-cobalamină
 - Rolul:
 1. Co pentru unele transmetilaze (homocisteină – metionină)
 2. Co pentru anumite mutaze (izomeraze)-metilmalonil Co A---- succinil CoA
-





Витамин В₁₂ (кобаламин)

-
- ▣ **MECANISMUL DE ACȚIUNE AL ENZIMELOR.**
 - ▣ **CLASIFICAREA ȘI NOMENCLATURA ENZIMELOR.**
 - ▣ **CINETICA REACȚIILOR ENZIMATICE**

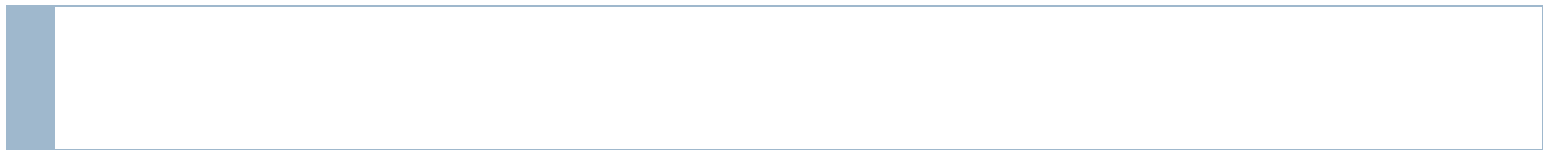


OBIECTIVE

1. Nomenclatura (denumirea) și clasificarea enzimelor. Caracteristica generală a claselor și subclaselor principale de enzime. Numărul de cod al enzimei.
2. Specificitatea enzimelor (tipurile, exemple).
3. Mecanismul de acțiune al enzimelor. Centrul activ al enzimelor și rolul lui în formarea și transformarea complexelor intermediare dintre enzimă și substrat. Rolul modificărilor conformaționale reciproce ale moleculei enzimei și substratului în procesul de cataliză.
4. Cinetica enzimatică. Influența concentrației enzimei și a substratului, a pH-ului și a temperaturii asupra activității enzimatică. Ecuația lui Michaelis-Menten și semnificația coeficientului K_m .
5. Principiul determinării activității enzimelor. Unitățile de activitate a enzimelor (unitatea internațională, katalul, activitatea specifică).



CLASIFICAREA ENZIMELOR



NOMENCLATURA ENZIMELOR

DENUMIREA COMUNĂ:

- Numele substratului (**S**) + sufixul «**aza**»
(glucozidaza, ureaza, lipaza, nucleaza)

sau

- denumirea atât a **S** cât și **tipului de reacție** la care acestea participă + «**aza**»
(lactatdehidrogenaza, alcool dehidrogenaza, piruvatcarboxilaza)

DENUMIREA SISTEMATICĂ:

- Denumirea tuturor **S + tipul reacției chimice + «aza»** - D gliceraldehid 3 fosfat NAD
▶ oxidoreductază

Clasificarea actuală a enzimelor

- Toate E se împart în:
 - **șapte clase,**
 - **clasele în subclase,**
 - **subclasele în subsubclase,**
 - **numărul său de ordin.**
-
- **Ex: LDH - 1.1.1.27**



Clasificarea actuală a enzimelor

- **Ex: LDH - 1.1.1.27**
- **Clasa** reprezintă tipul de reacție, catalizat de enzime
- **Subclasa** – precizează acțiunea E - indică gruparea sau legătura chimică interesată în reacție
- **Subsubclasa** – precizează natura acceptorului care participă la reacții
- **Numărul său de ordin** - poziția E în subsubclasa



Clasificarea actuală a enzimelor

1. Oxidoreductaze
2. Transferaze
3. Hidrolaze
4. Liaze
5. Izomeraze
6. Ligaze (sintetaze)
7. Translocaze



Clasificarea enzimelor.

- catalizează reacții de oxido-reducere;

-catalizează transferuri grupelor funcționale de la un S la altul (metil, amino, acil,);

-catalizează scindări de legături covalente cu adiționarea apei ;

-catalizează ruperea leg. C-C, C-S și C-N; fără adiționarea apei, adiția la legături duble și reacțiile inverse.

-catalizează toate tipurile de transformări în cadrul uneia și aceleași moleculă ;

- catalizează formarea de legături între carbon și O, S, N, cuplate cu hidroliza legăturilor macroergice (utilizarea ATP).

The enzyme classes

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>Ared + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP + P</p> <p>X=A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases



Class	Example (reaction type)	Reaction Catalyzed
1. Oxidoreductases	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (oxidation with NAD ⁺)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \xrightarrow{\text{NAD}^+} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{H} + \text{NADH} + \text{H}^+$ <p style="text-align: center;">Ethanol Acetaldehyde</p>
2. Transferases	Hexokinase (EC 2.7.1.2) (phosphorylation)	<p style="text-align: center;">α-Glucose α-Glucose-6-phosphate</p>
3. Hydrolases	Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) (peptide bond cleavage)	<p style="text-align: center;">C-terminus of polypeptide Shortened polypeptide C-terminal residue</p>
4. Lyases	Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1) (decarboxylation)	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{COO}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{H}$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Acetaldehyde</p>
5. Isomerases	Maleate isomerase (EC 5.2.1.1) (cis-trans isomerization)	<p style="text-align: center;">Maleate Fumarate</p>
6. Ligases	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1) (carboxylation)	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{COO}^- + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{ATP}} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{ADP} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Oxaloacetate</p>

7 clase de Enzime

1. Oxidoreductaze

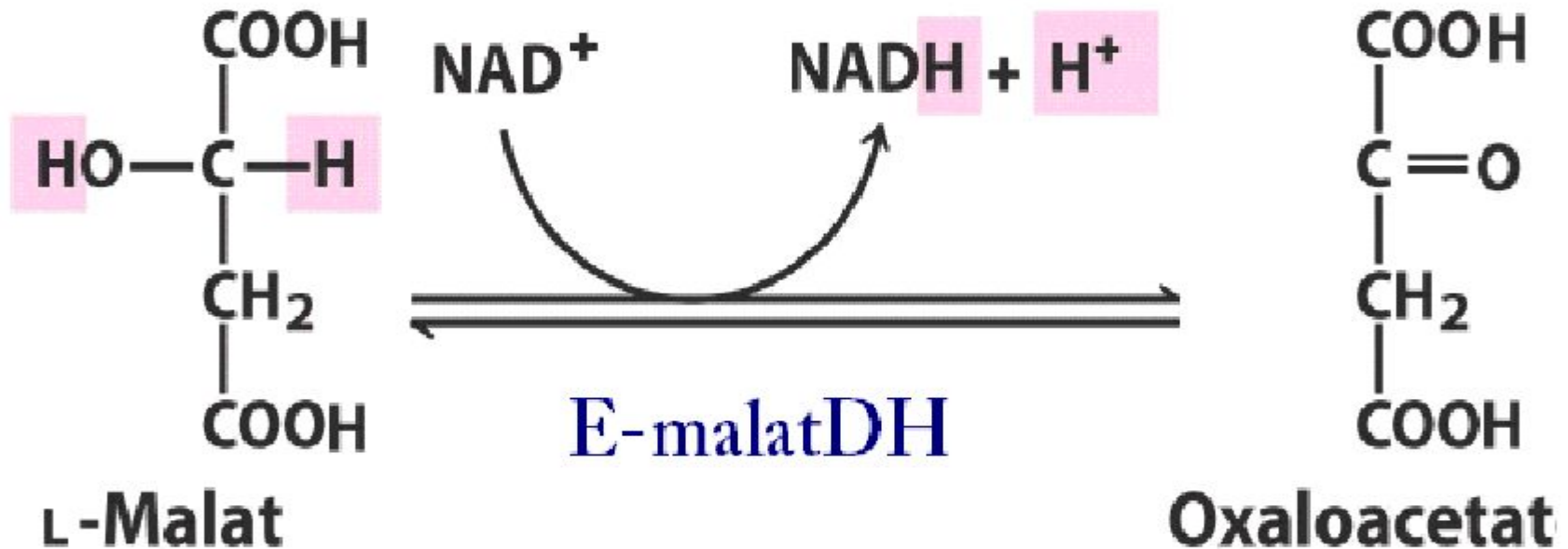
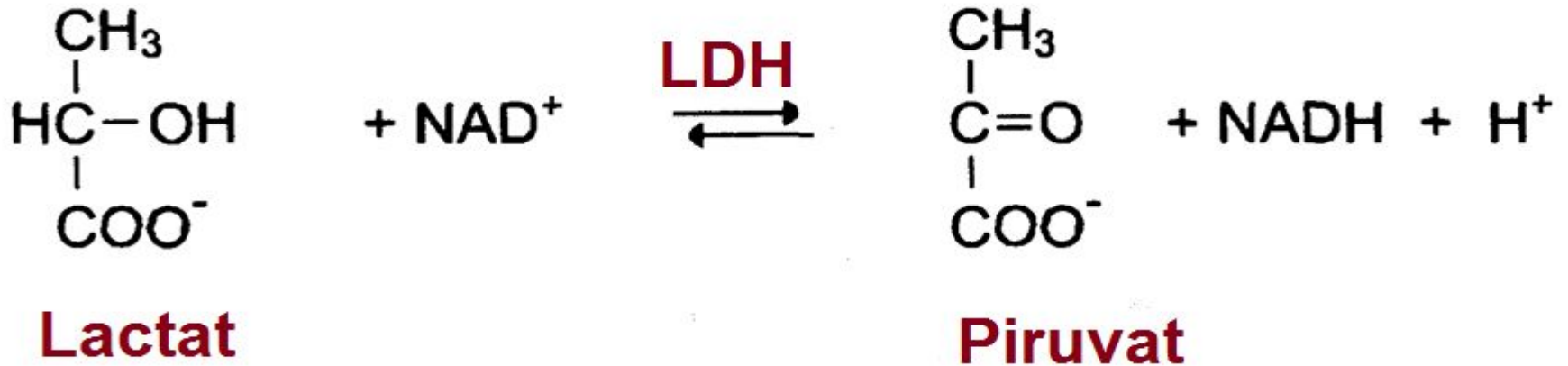
- catalizează reacții de oxido-reducere

SUBCLASELE:

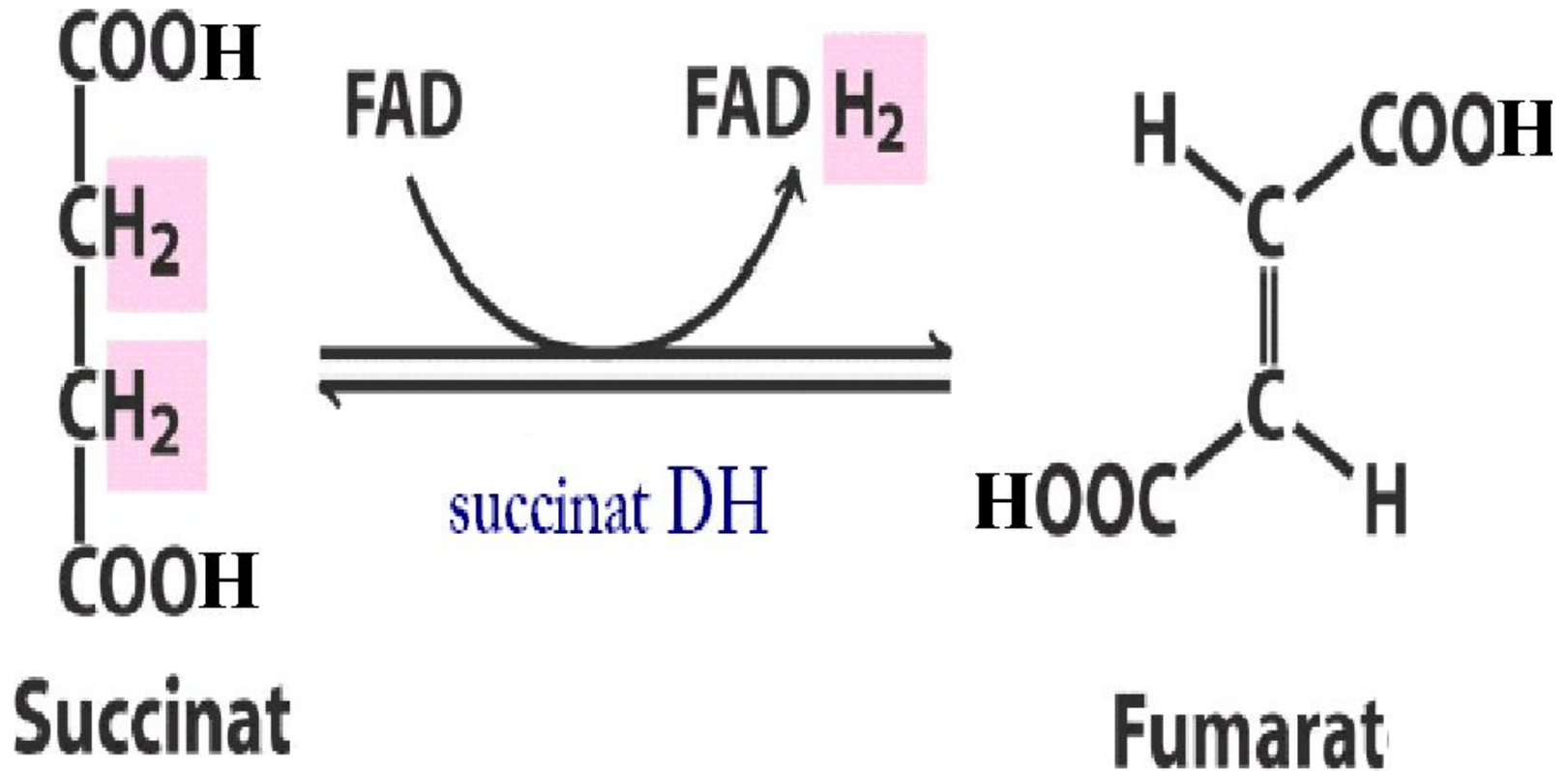
- Dehidrogenaze
- Reductaze
- Oxidaze,
- Peroxidaze,
- Hidroxilaze,



1. Oxidoreductaze



1. Oxidoreductaze



2. Transferaze

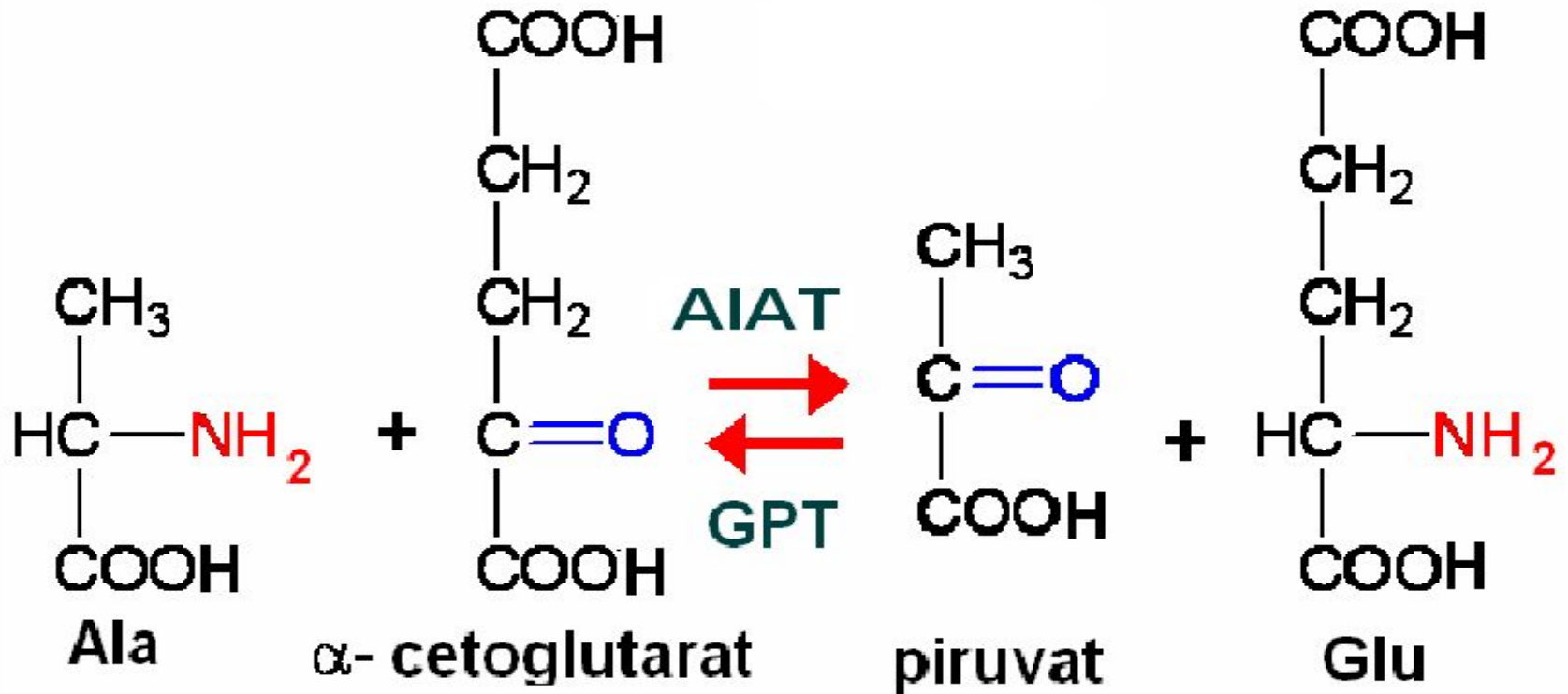
catalizează transferuri grupelor funcționale de la un substrat la altul (metil, amino, acil)

SUBCLASELE:

- Aciltransferaze
- Metiltransferaze
- Glicoziltransferaze
- aminotransferaze
- Kinaze
-

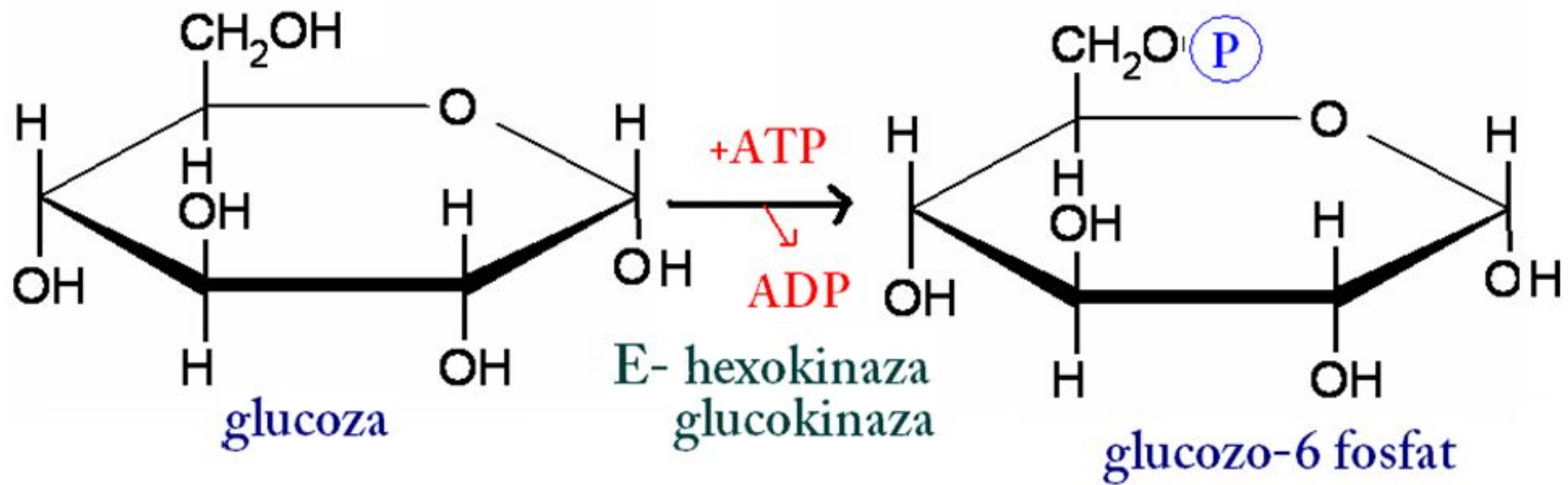


2. Transferaze



E- alanin aminotransferaza (AIAT)
Glutamic piruvic transaminaza (GPT)

TRANSFERAZE:



3. Hidrolaze

catalizează scindări de legături covalente cu adiționarea apei

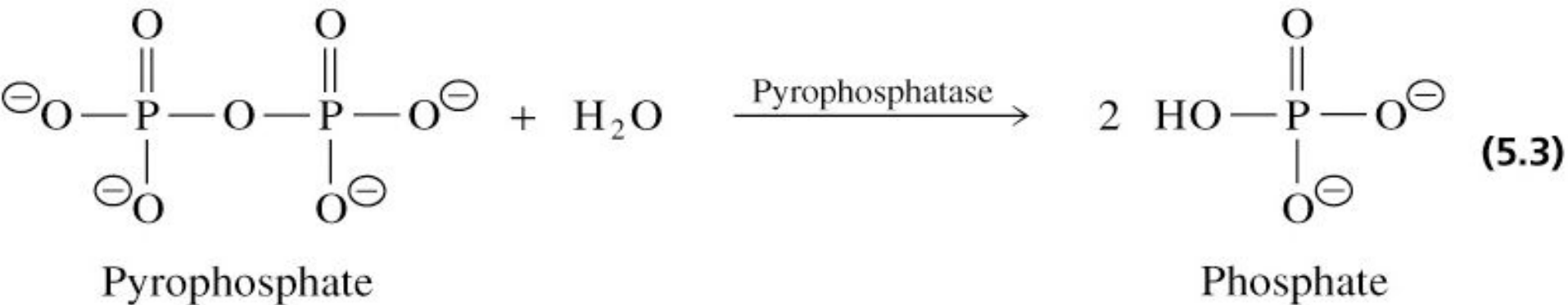
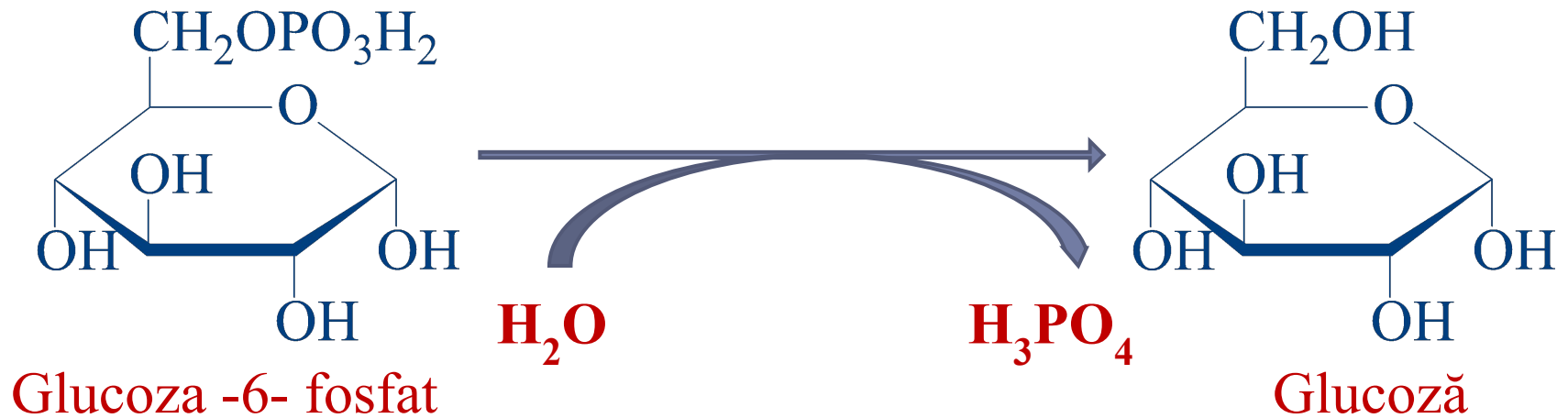
SUBCLASELE:

- Esteraze
- Glicozidaze
- Peptidaze
- Fosfataze
- Tiolaze
- Ribonucleaze

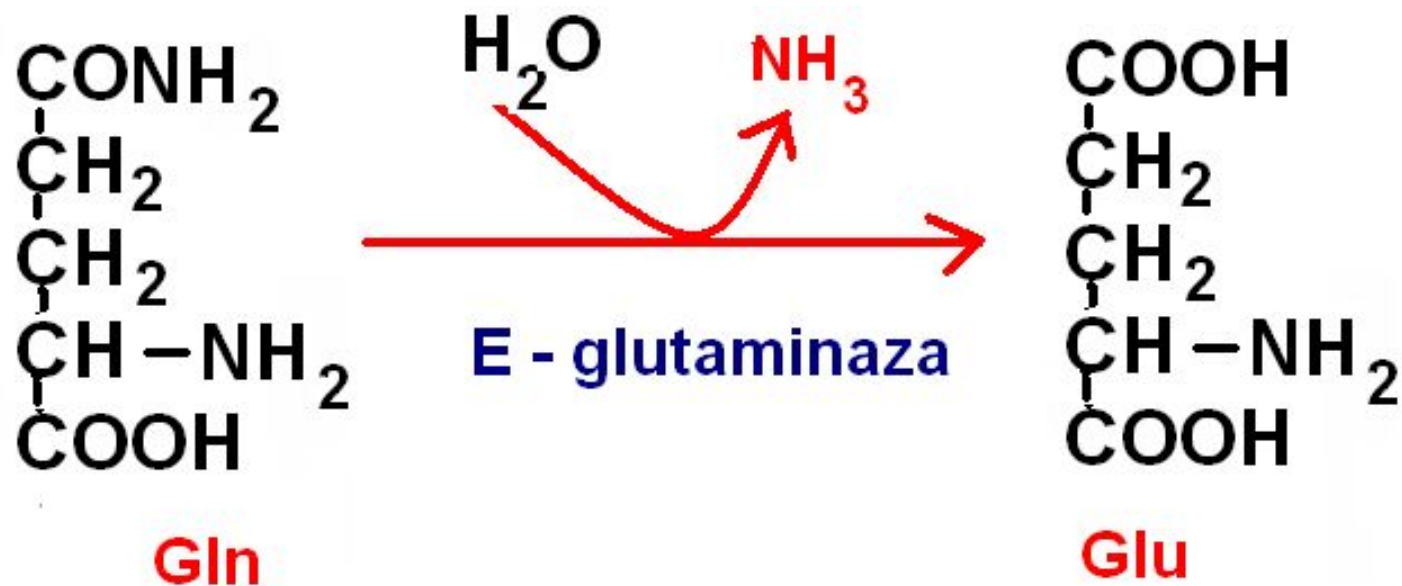
• **EXEMPLE:** lipaza, proteaza, fosfolipaza, esteraza, glicozidaza, fosfataza



3. Hidrolaze



3. Hidrolaze



4. Liaze

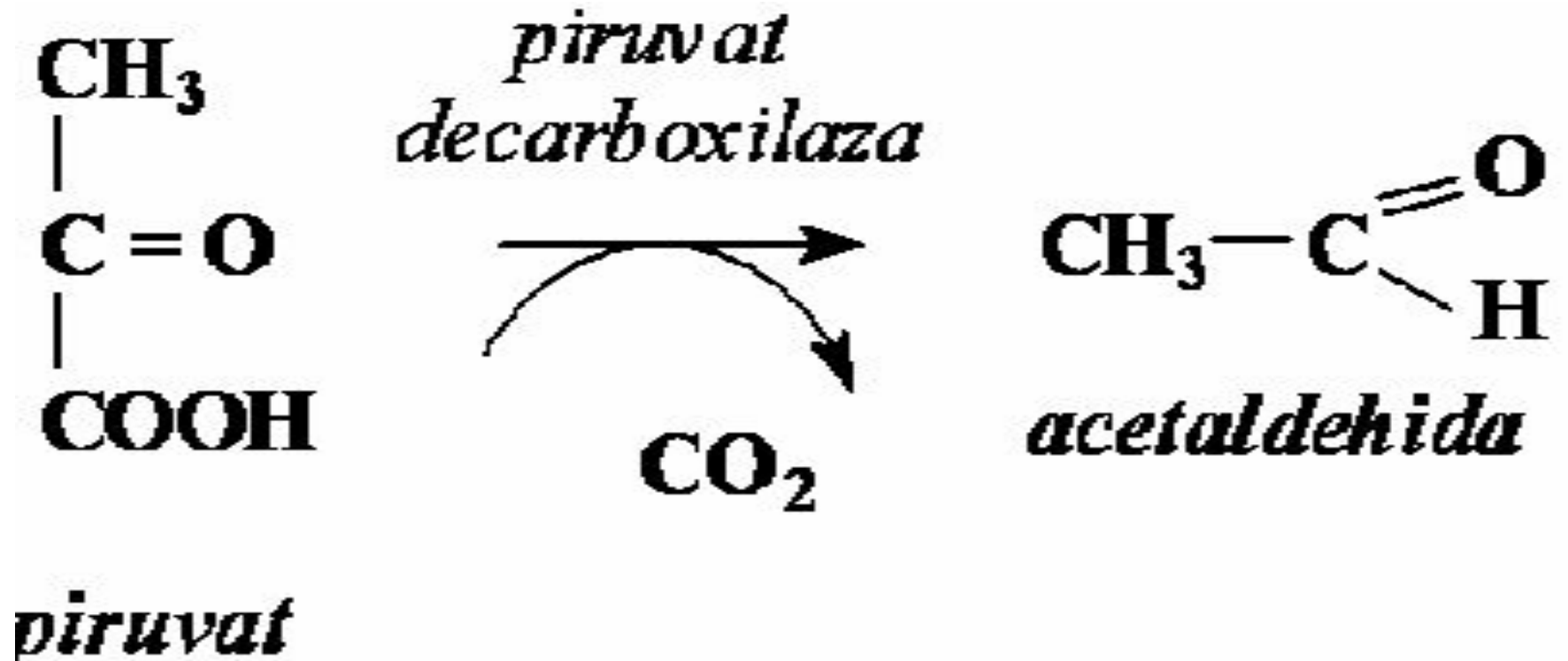
catalizează ruperea leg. C-C, C-S și C-N; fără adiționarea apei, adiția la legături duble și reacțiile inverse.

-SUBCLASELE:

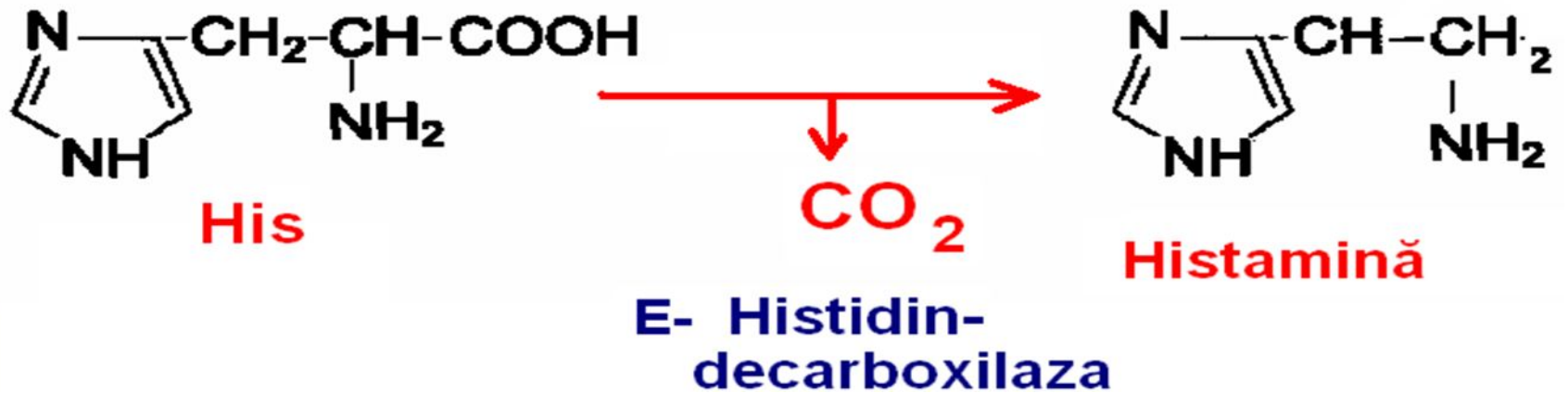
- Decarboxilaze
- Aldolaze
- Hidrataze
- Dehidrataze



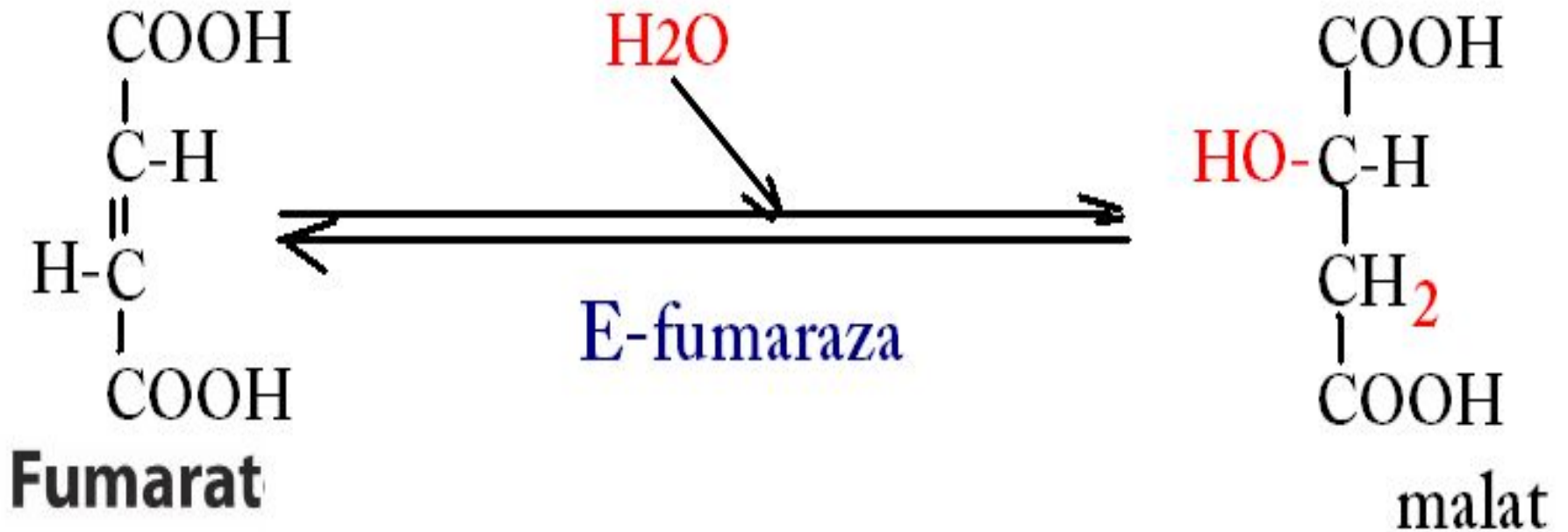
4. Liaze



4. Liaze



4. Liaze



5. Izomeraze

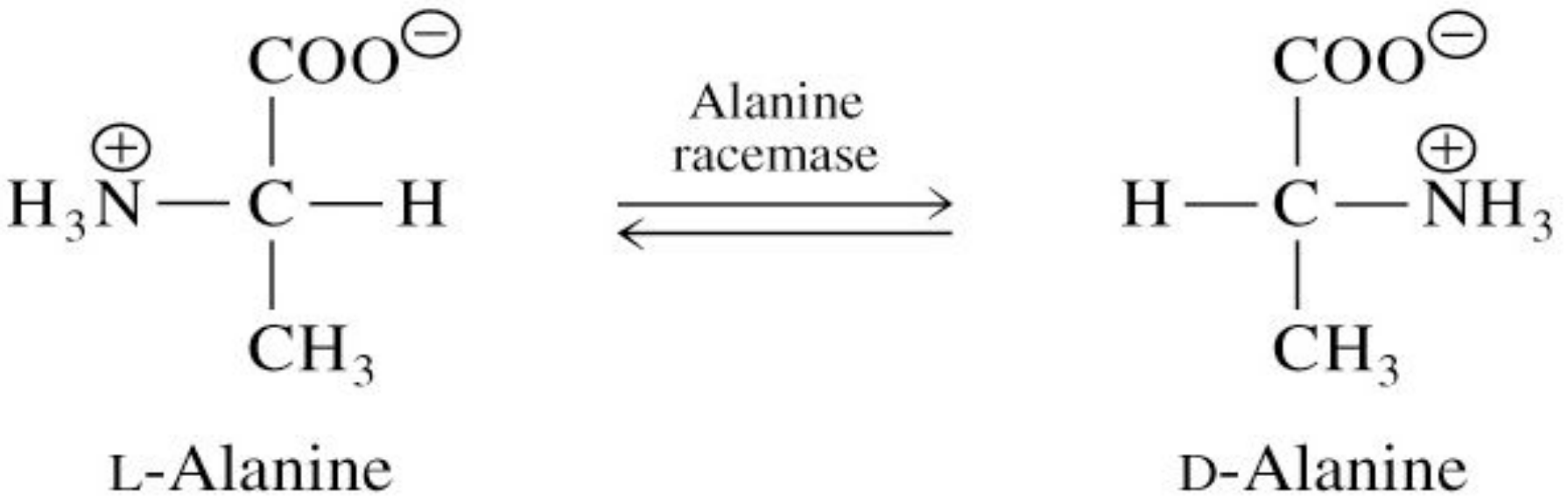
catalizează toate tipurile de transformări în cadrul uneia și aceleiași moleculă

SUBCLASELE:

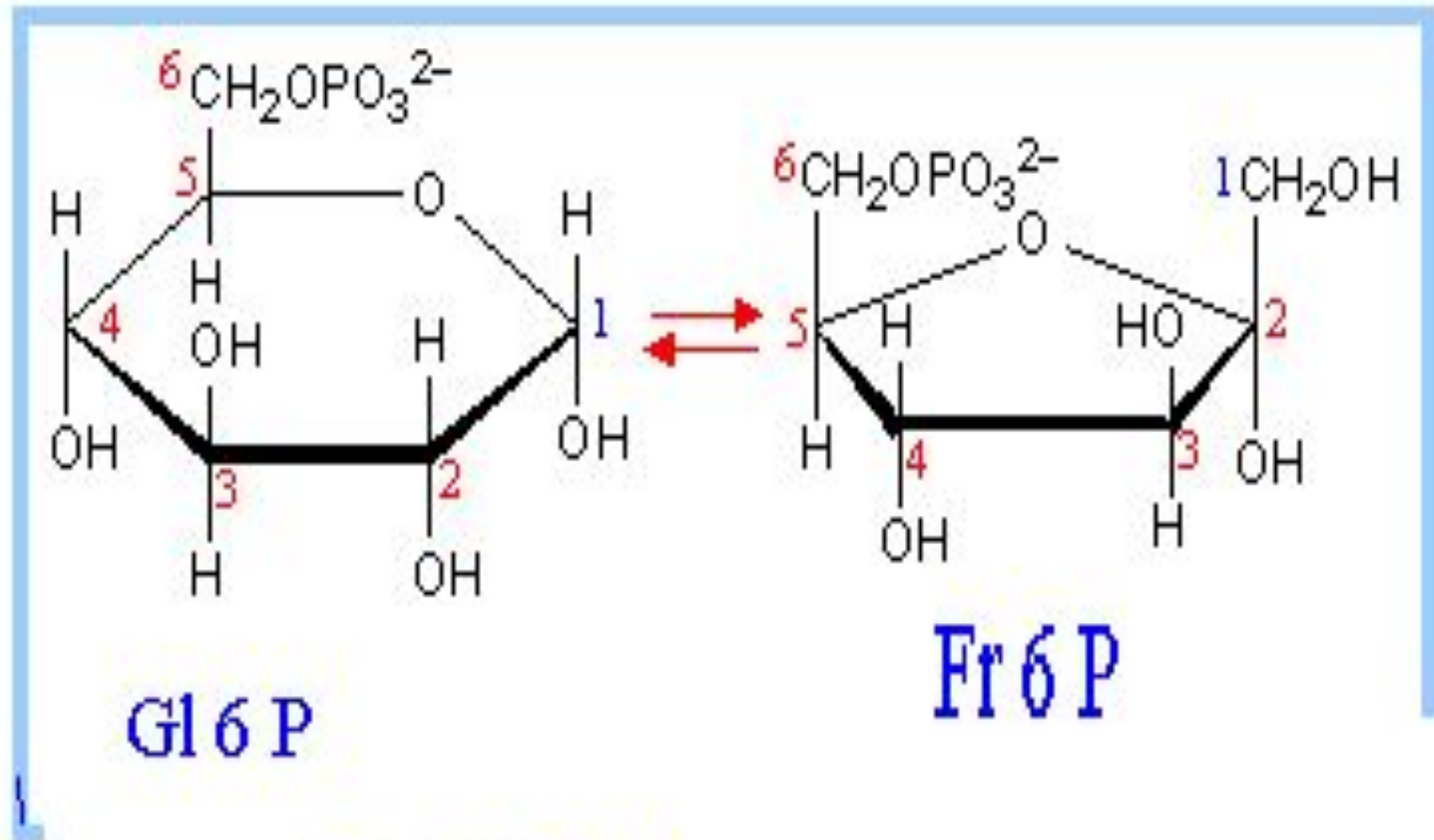
- Racemaze
- Epimeraze
- Izomeraze
- Mutaze



5. Izomeraze

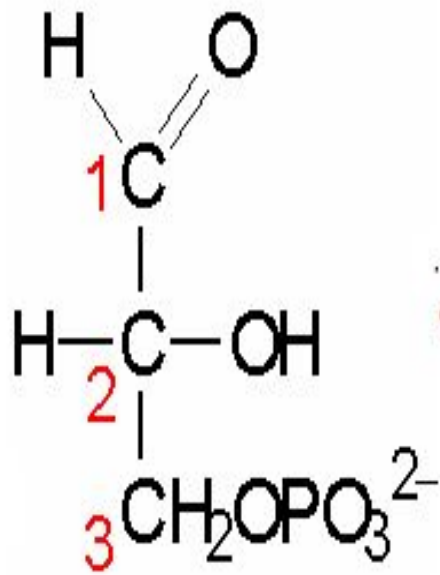


5. Izomeraze



E - Gl 6 P izomeraza

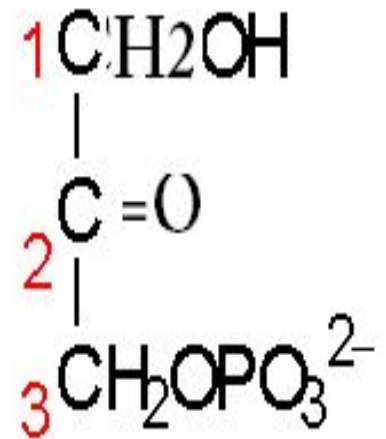
5. Izomeraze



gliceraldehid
3-fosfat



E- triozofosfatizomeraza



dihidroxiaceton
3-fosfat

6. Ligaze (sintetaze)

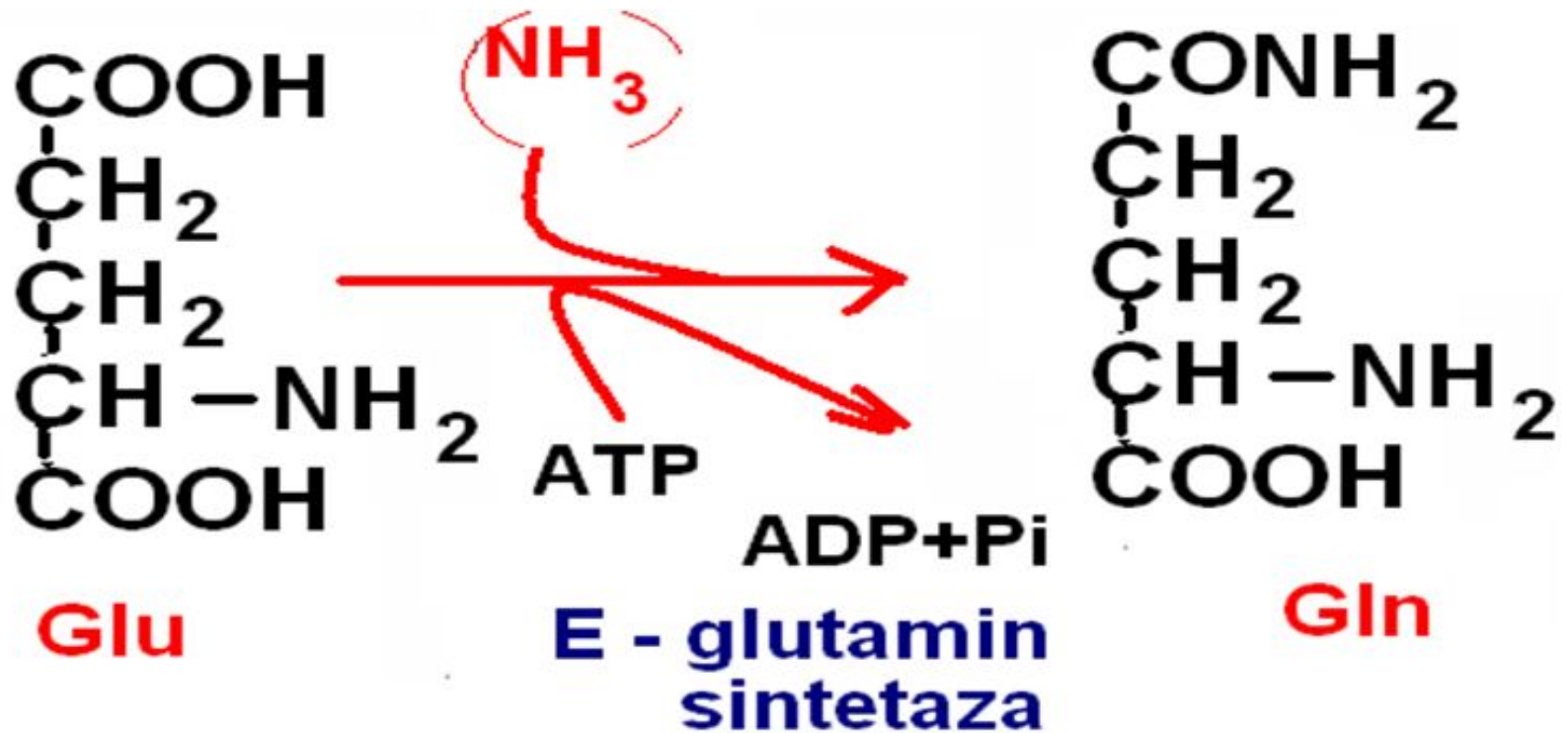
catalizează formarea de legături între carbon și O, S, N, cuplate cu hidroliza legăturilor macroergice (utilizarea ATP).

SUBCLASELE:

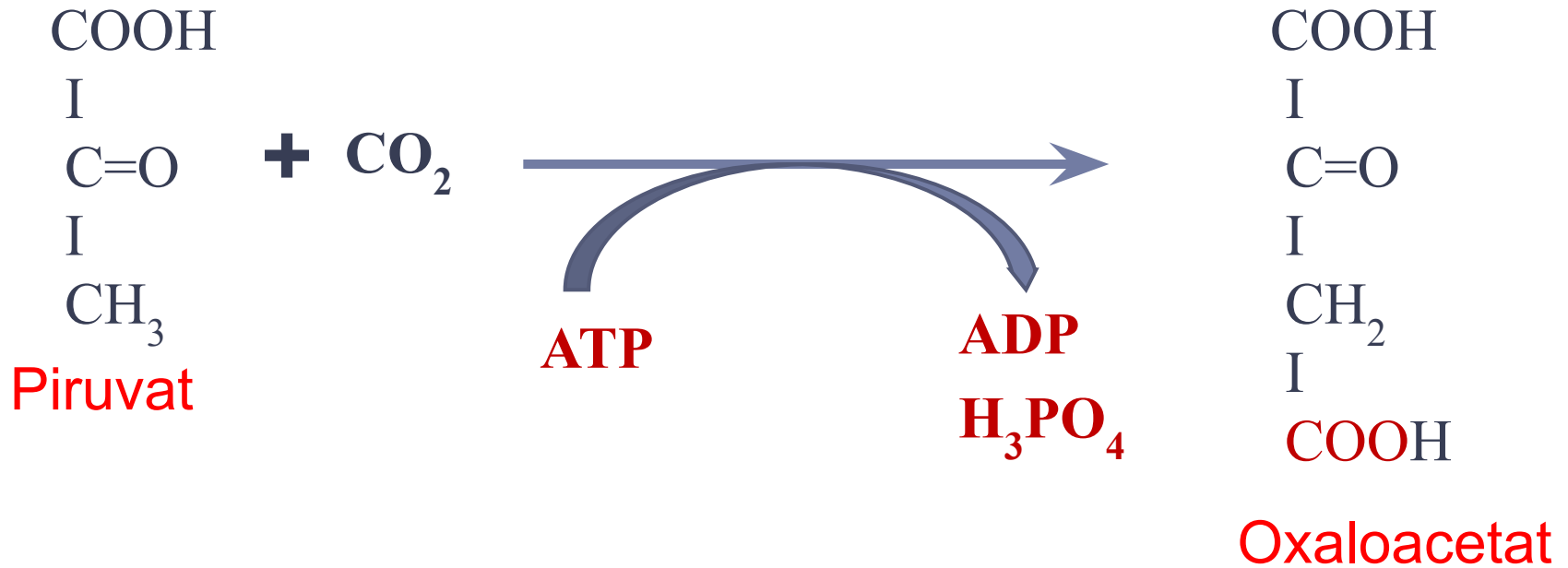
- Sintetaze
- Carboxilaze
-



6. Ligaze (sintetaze)



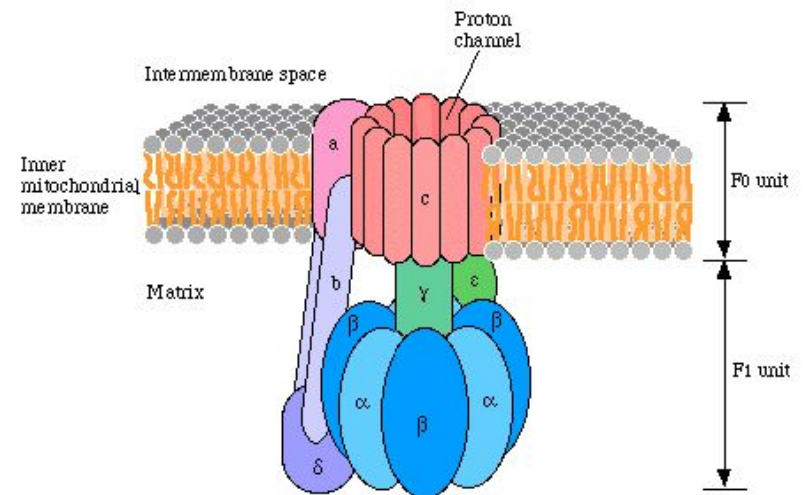
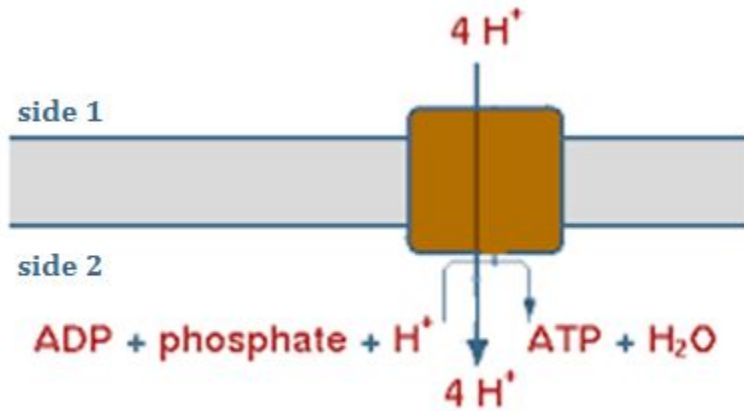
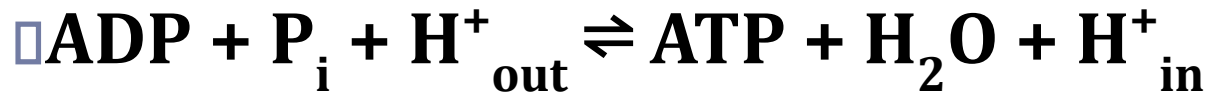
6. Ligaze (sintetaze)



7. Translocaze (2018)

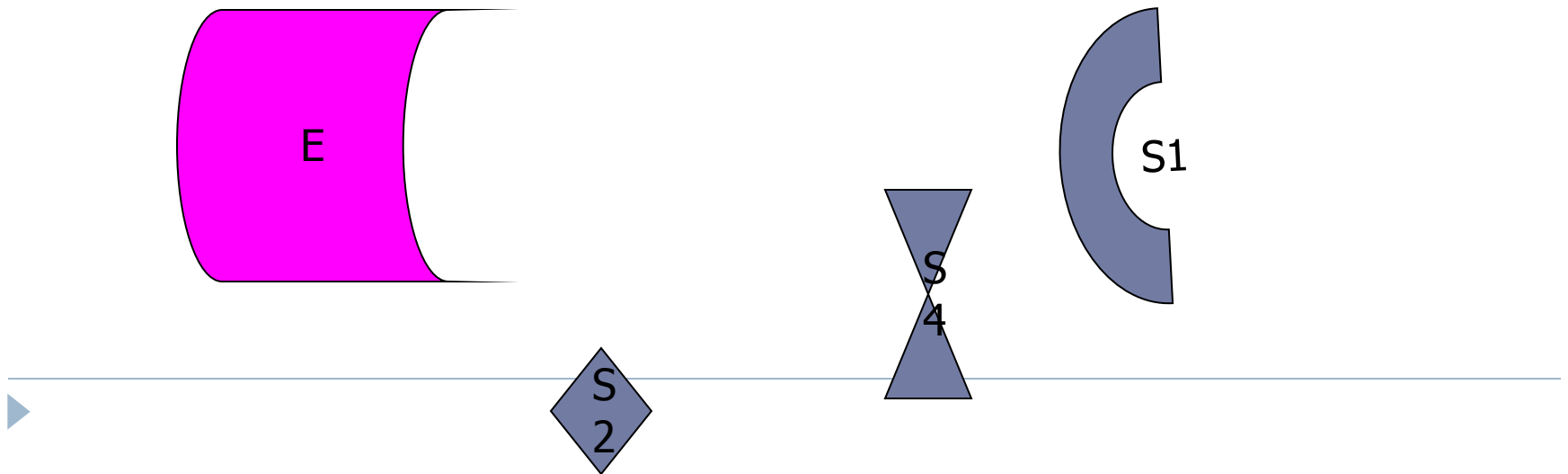
Catalizează transferul ionilor sau moleculelor prin membrane sau separarea lor în (interiorul; între) membrane.

Ex. : H⁺-transportatorul ATP-aza sau ATP sintaza

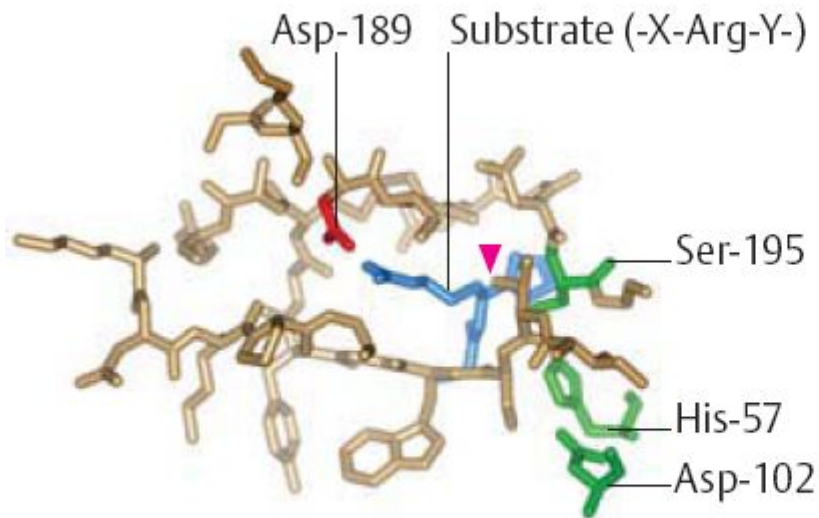


Specificitatea

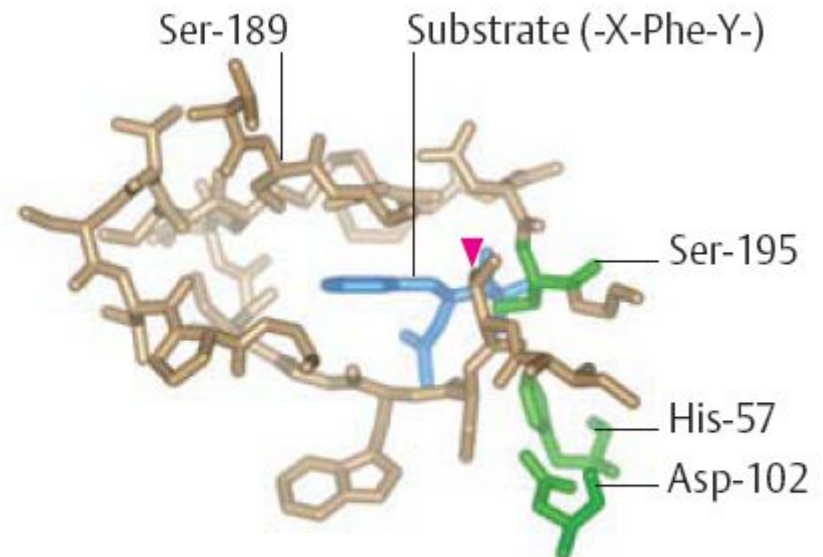
- este capacitatea unei enzime de a selecta dintr-un număr mare de S unul particular,
- este condiționată de complementaritatea conformațională și electrostatică între CA al E și S.



Deci fiecare E catalizează un anumit tip de reactii sau transformarea unui anumit S



1 Trypsin (3.4.21.4)
-X-Y-Arg (Lys)-Z-



2 Chymotrypsin (3.4.21.1)
-X-Y-Tyr (Trp, Phe, Leu)-Z-



SPECIFICITATEA

1. De reacție
2. De substrat:
 - A. Absolută
 - B. Relativă
 - C. stereospecificitate



Specificitatea:

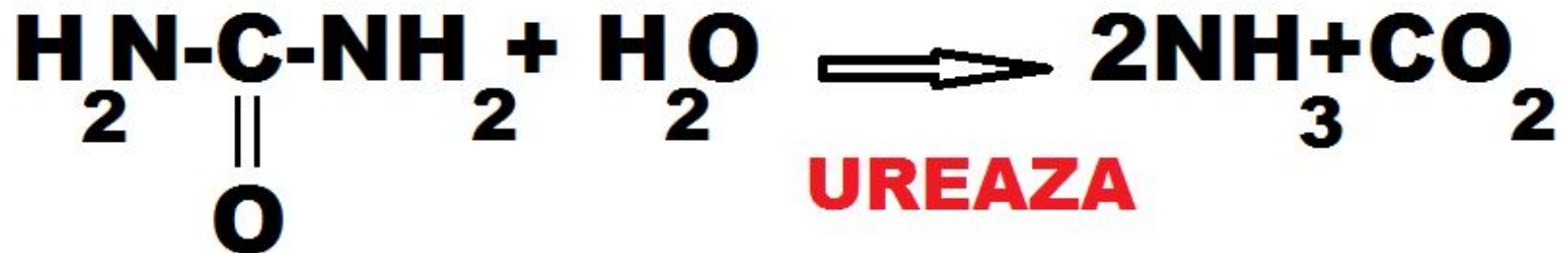
1. Specificitatea de reacție:

enzimele catalizează un anumit tip de reacție ce stă la baza clasificării lor: o reacție redox, un transfer a unei grupe funcționale, formarea unei legături, etc.



2. Specificitatea de substrat a enzimelor

I. Specificitatea absolută de substrat – enzima catalizează transformarea doar a unui singur substrat (ureaza, arginaza, carbanhidraza)



Specificitatea de substrat a enzimelor

II. Specificitatea relativă de substrat –
enzima catalizează transformarea
unei grup numeros de substanțe cu
diferită structură chimică în același
mod

Ex. citocromul P₄₅₀ – hidrolizează
câteva mii de substanțe



Specificitatea de substrat a enzimelor

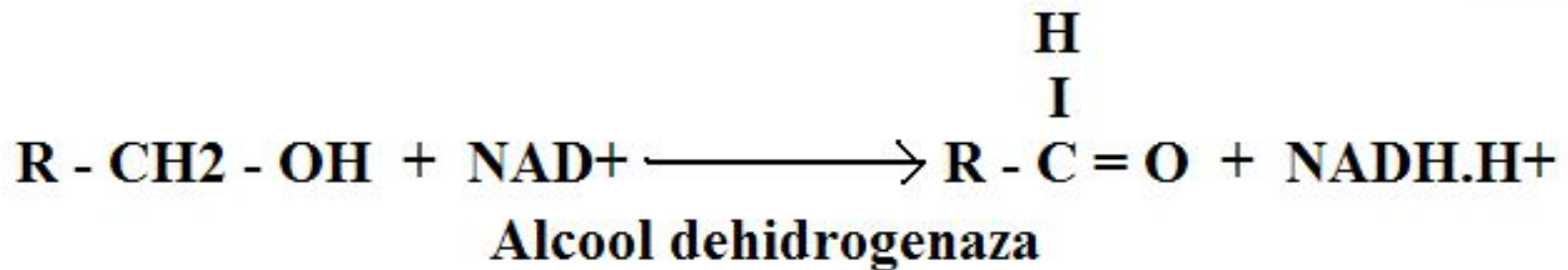
- ▣ **specificitate relativa de substrat** - asigura transformarea unui grup de substante înrudite chimic și se întâlnește în diferite ipostaze:



Specificitatea relativă de substrat a enzimelor

Specificitatea absolută de grup –

E catalizează transformarea unui grup de substrate analogice structural (ADH - unui grup de alcooli monohidroxilici, recunoscind gruparea OH



Specificitatea relativă de substrat a enzimelor

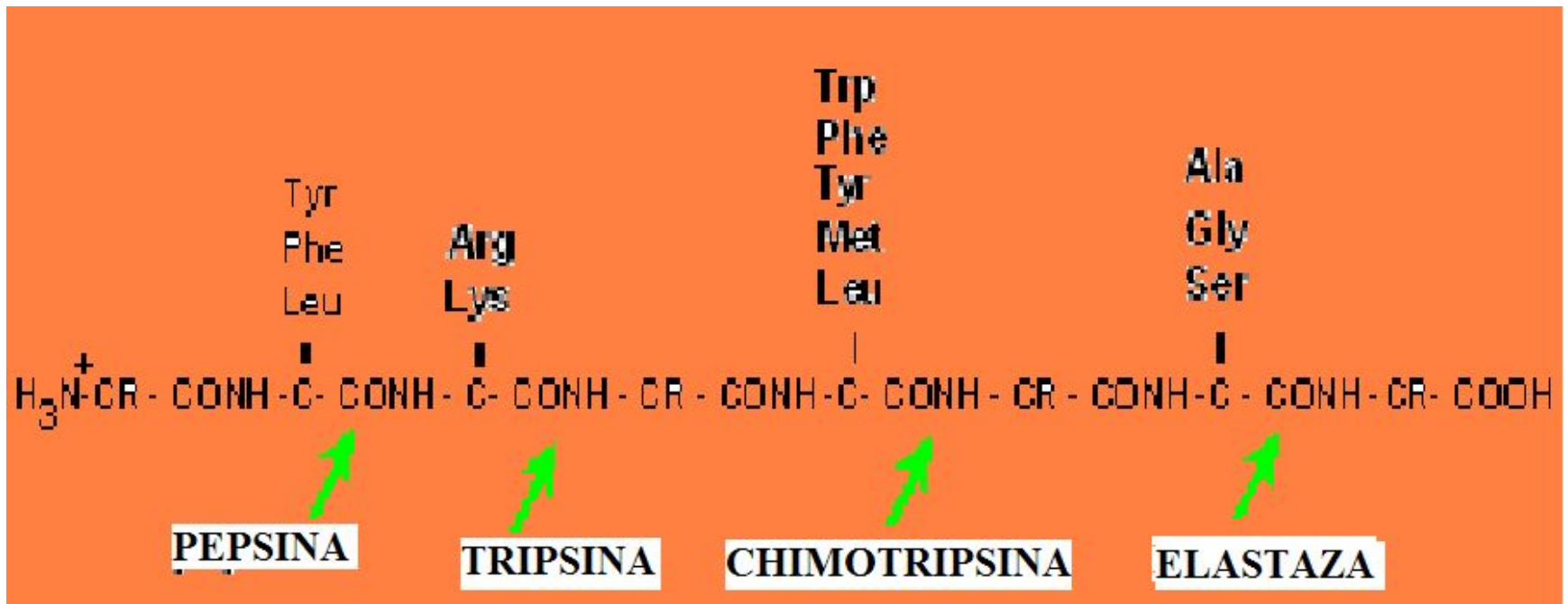
Specificitatea relativă de grup –

enzima catalizează transformarea unei anumite grupe sau legături chimice din diverse substanțe chimice

Ex. pepsina hidrolizează legăturile peptidice formate de grupările carboxilice ale aminoacizilor aromatici – Phe, Tyr și Trp



Specificitatea relativă de grupă



Specificitate stereochemică

- E catalizează transformarea numai a unuia din stereoizomerii posibili (D sau L; sau numai a izomerului cis- sau trans-).
- **Ex: Amilaza** scindează legăturile α 1-4 glucozidice din amidon sau glicogen și nu influențează asupra legăturilor β din celuloză.



Specificitate stereochimică

Hexokinaza – specificitate la D- glucoză

Oxidazele – specificitate la L-AA

Fumaraza – specificitate la izomerii trans-cis



▣ MECANISMUL DE ACTIUNE AL ENZIMELOR



Mecanismul de acțiune al E

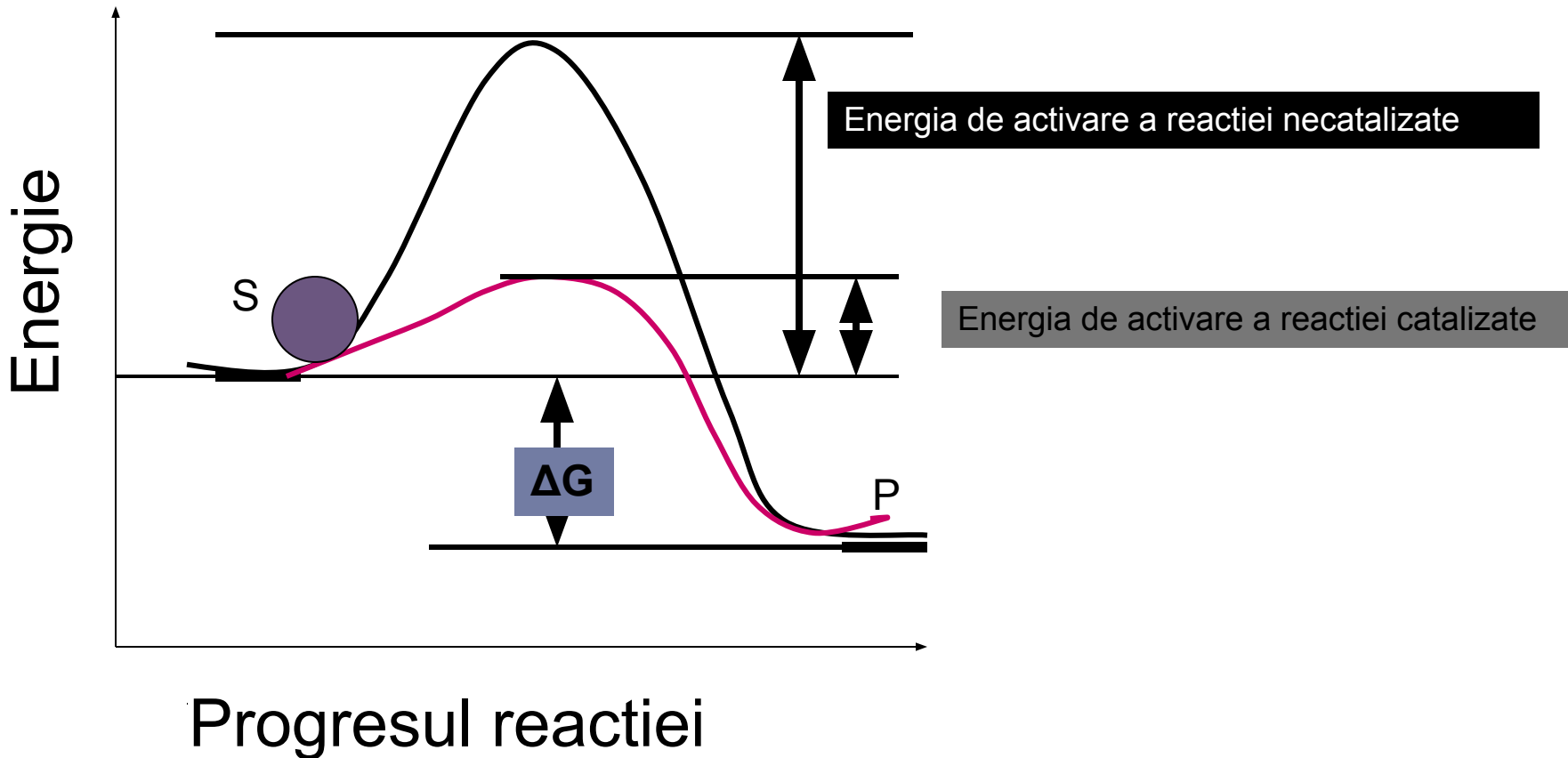
- Pentru decurgerea unei reacții este necesar ca molecula de S și E să contacteze între ele, pentru aceasta e necesar de conștientizarea unei noțiuni ca:
- **Energia de activare** – este energia necesară tuturor moleculelor unui mol de S, care la o anumită t pot să atingă starea de tranziție (corespunzătoare apixului barierii energetice) (KJ/mol; kcal/mol)



Mecanismul de acțiune al E

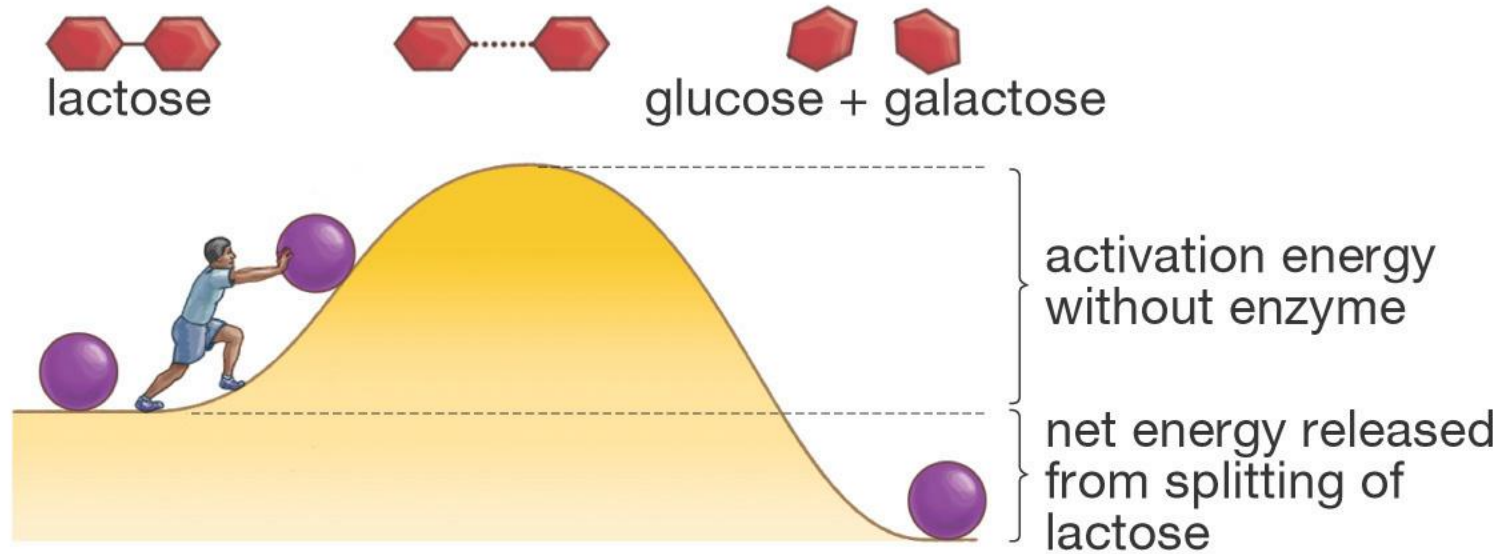
- E - micșorează energia de activare ale reacțiilor chimice.
- Cu cât mai mult scade energie de activare, cu atât mai eficient acționează catalizatorul, și cu atât mai mult se accelerează reacția.



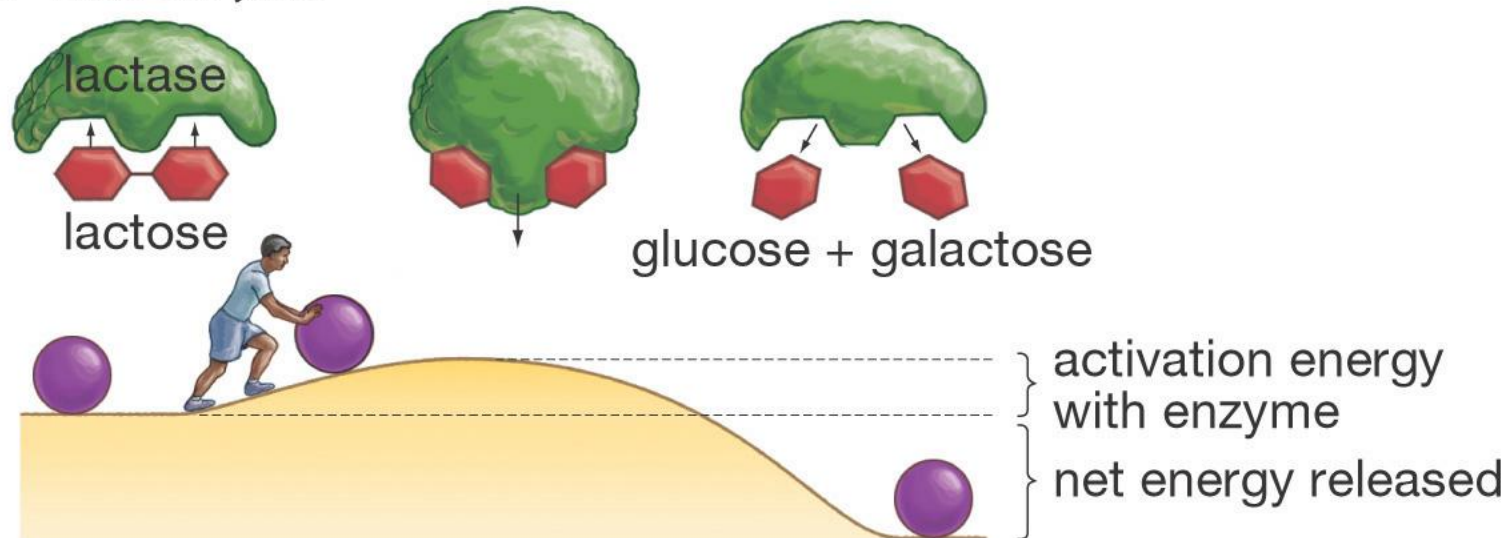


Enzimele **reduc energia de activare** fara sa afecteze energia libera a reactiei (ΔG). Astfel, enzimele **cresc viteza de reactie**.

(a) Without enzyme



(b) With enzyme

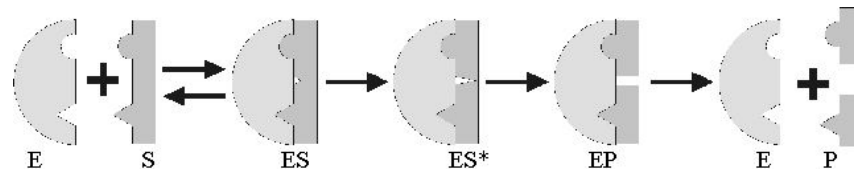


Mecanismul de acțiune al enzimelor

Prima etapă:

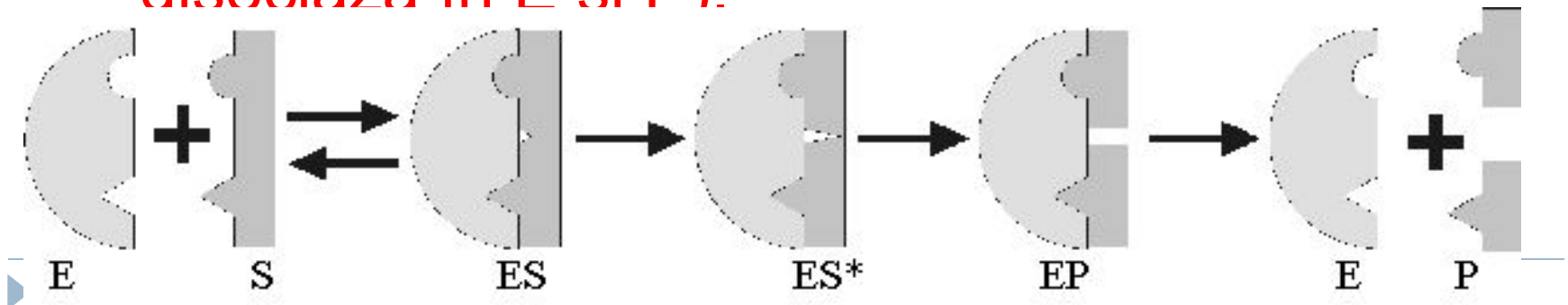
Difuzia S spre E și legarea cu CA al E -
formarea complexului ES

1. de scurtă durată
2. depinde de concentrația substratului și de viteza lui de difuzie spre centrul activ al enzimei.



Mecanismul de acțiune al E

2. Transformarea complexului primar ES în unul sau câteva complexe activate - ES^* , ES^{**} (este cea mai lentă). Are loc dereglarea legăturilor S, ruperea lor sau formarea noilor legături în urma interacțiunii grupelor catalitice ale E.
3. Despărțirea produselor reacției de CA al E și difuzia lor în mediul ambiant (**complexul EP disociază în E și P**).

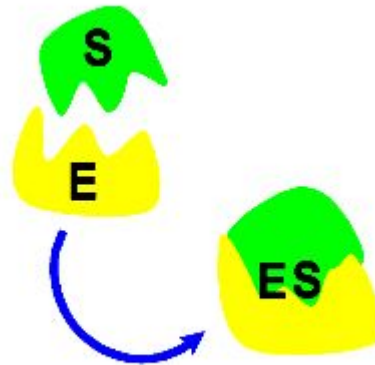


Ipoteza “lacăt-cheie” (Fischer) și “coincidența forțată” (Koshland)

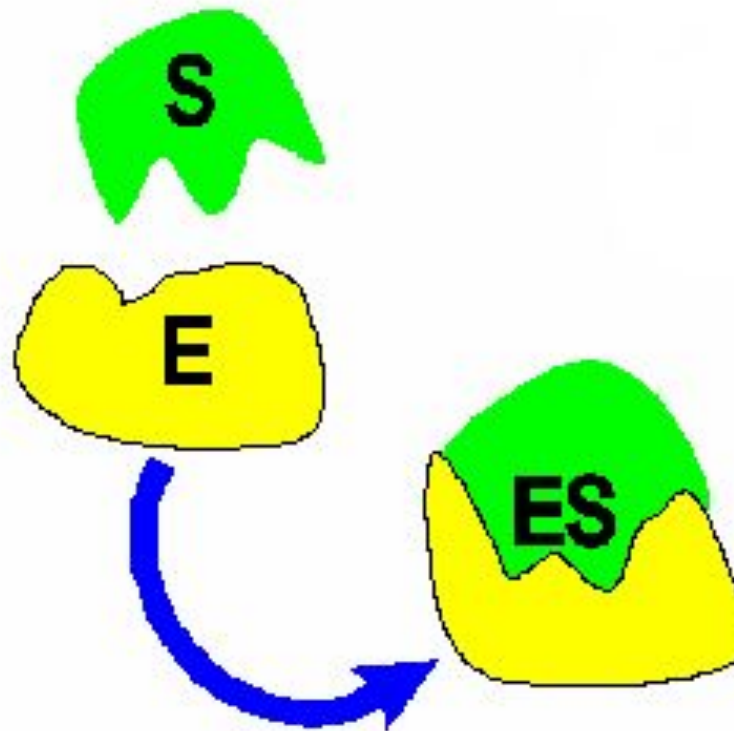
- **Modelul clasic (Emil Fischer)** consideră că potrivirea S cu CA al E este analog cu potrivirea “lacăt-cheie”. Acest model presupune o rigiditate a structurii enzimei în zona CA.
- **modelul Koshland, numit “centrul activ indus” - potrivire indusă**, presupune că CA nu este rigid, că forma acestuia se modifică în momentul legării S.



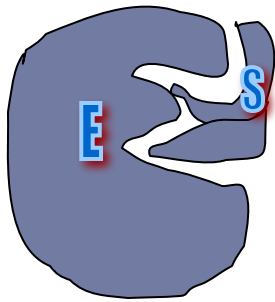
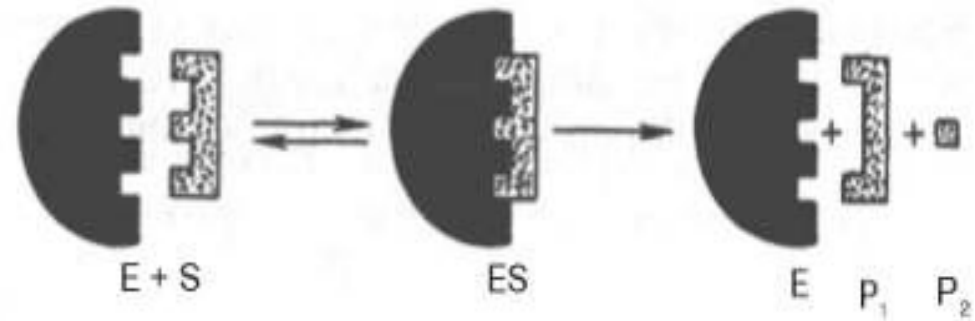
Teoria “cheie-lacăt” - Fisher



Teoria “coincidenței induse” - Koshland



Conceptul clasic "lacă- cheie"

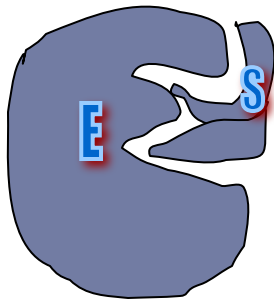


P2

P1



Conceptul coerenței inductive “coincidența forțată” (Kochland)



P2

P1



Mecanismul de acțiune al E

- La nivel molecular acțiunea E poate fi lămurită prin următoarele efecte:
- 1. **Efectul de orientare a substratelor** (CA al E fixează S și le orientează într-un mod convenabil pentru acțiunea gr. catalitice)
- 2. **Efectul de deformare a S** (după unirea în CA molecula S se întinde, se deformează –favorizând scindarea ei)
- 3. **Cataliza acido-bazică** (în procesul fixării S în CA asupra lui acționează grupele electrophile ale sectorului catalitic, are loc redistribuirea densității electronice în S și ruperea legăturilor din S)
- 4. **Cataliza covalentă** – formarea legăturilor covalente între CA și S, complexul ES e foarte instabil, ușor disociază eliberând P reacției



PROPRIETĂȚILE ENZIMELOR



Obiectivele:

1. Cinetica enzimatică. Influența concentrației enzimei și a substratului, a pH-ului și a temperaturii asupra activității enzimaticice.
2. Principiul determinării activității enzimelor. Unitățile de activitate a enzimelor.
3. Inhibiția activității enzimelor (specifică și nespecifică, reversibilă și ireversibilă, competitivă, necompetitivă și noncompetitivă).
4. Reglarea activității enzimelor (proteoliză parțială, reglarea alosterică, autostructurarea cuaternară, reglarea covalentă).
5. Organizarea enzimelor în celulă (ansamblurile enzimaticice, compartimentalizarea). Reglarea activității enzimelor în celulă. Importanța principiului de retroinhibiție.
6. Izoenzimele – particularitățile structurale și funcționale, valoarea lor biomedicală.
7. Deosebirile în componența enzimatică a organelor și țesuturilor. Enzimele organospecifice. Modificarea activității enzimaticice în diferite afecțiuni (enzimodiagnosticul).
8. Metodele de obținere și purificare a enzimelor. Cromatografia de afinitate.
9. Utilizarea enzimelor în practica medicală. Întrebuințarea enzimelor immobilizate în medicină.

CINETICA ENZIMATICĂ

- Studiază viteza reacției enzimatică, luând în considerație factorii fizico-chimici ce o influențează



VITEZA REACȚIEI ENZIMATICE

- reprezintă numărul moleculelor de substrat transformate în produs final pe unitatea de timp (de regulă - μmoli de produs format pe minut)



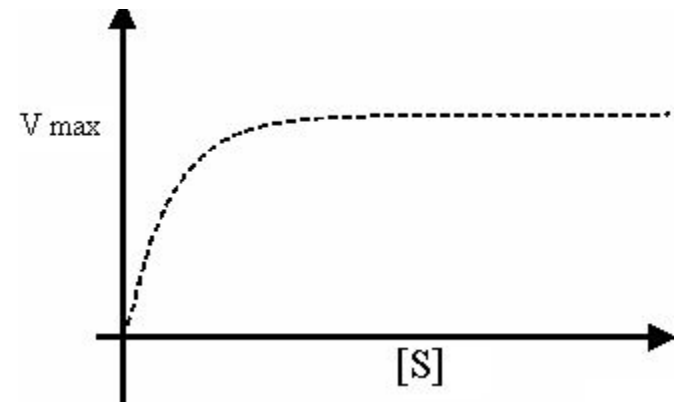
Factorii care influențiază viteza reacției enzimaticе

- Concentrația S
- Concentrația E
- Temperatura
- pH

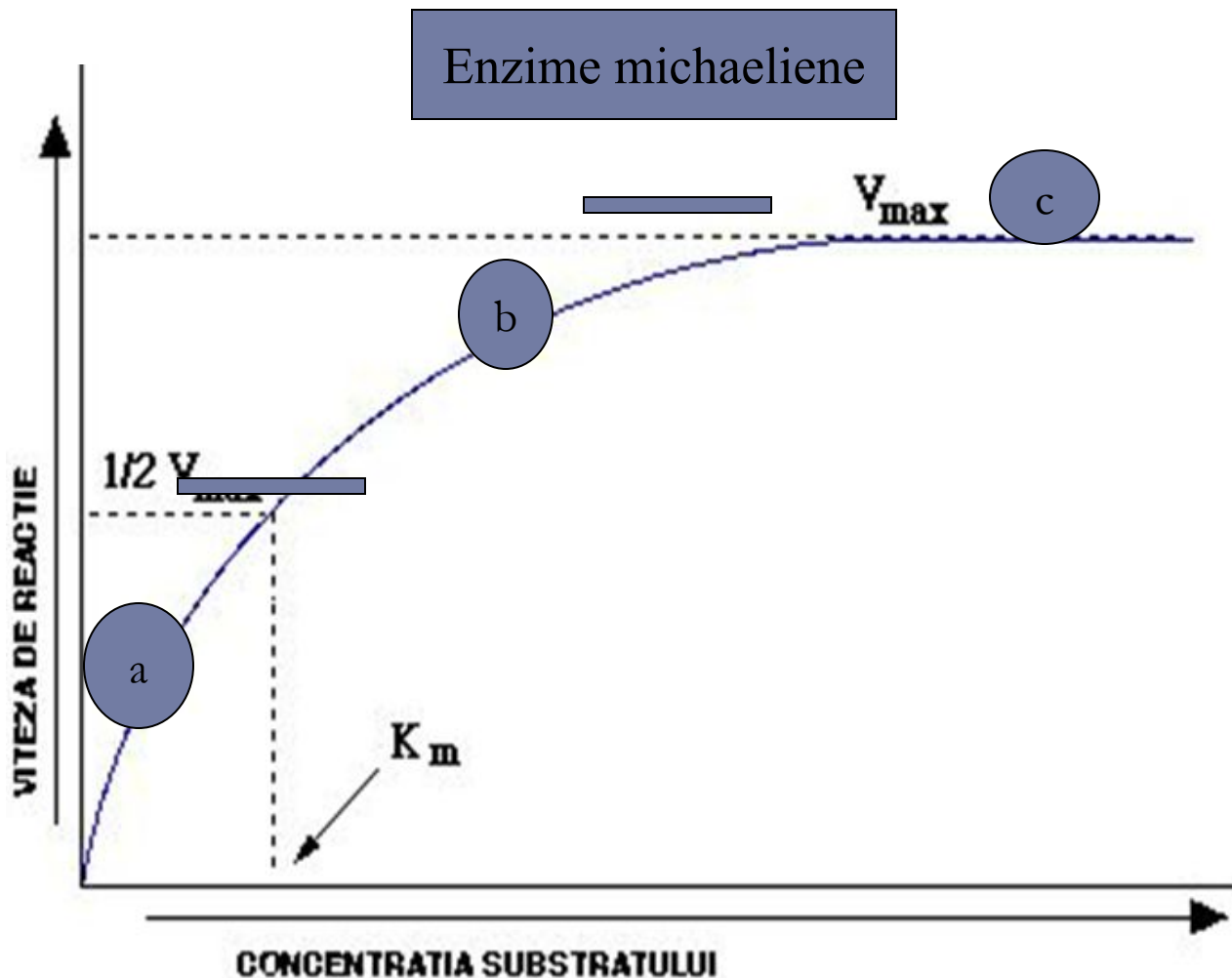


Influența [S] asupra vitezei reacției enzimaticе

- Grafic se reprezintă sub formă de o curbă de tip hiperbolic.
- În perioada inițială a reacției V crește pe măsură ce crește $[S]$.
- La un moment dat când CA al E se ocupă de S – V nu mai crește. Ea rămâne constantă și **corespunde V_{max}** a reacției.
- În cazul E alosterice – curba reprezintă un aspect sigmoid



Influența $[S]$ asupra vitezei reacției enzimatică



- Analiza curbei arată 3 zone:
- Zona “a” - v crește proporțional cu $[s]$
- Zona “b” – creșterea v cu $[s]$ nu este proporțională
- Zona “c” – este atins V_{max} la $[s]$ infinită

- Această curbă este numită curba lui Michaelis-Menten și se exprimă prin ecuația:
-

$$V_0 = V_{\max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

unde:

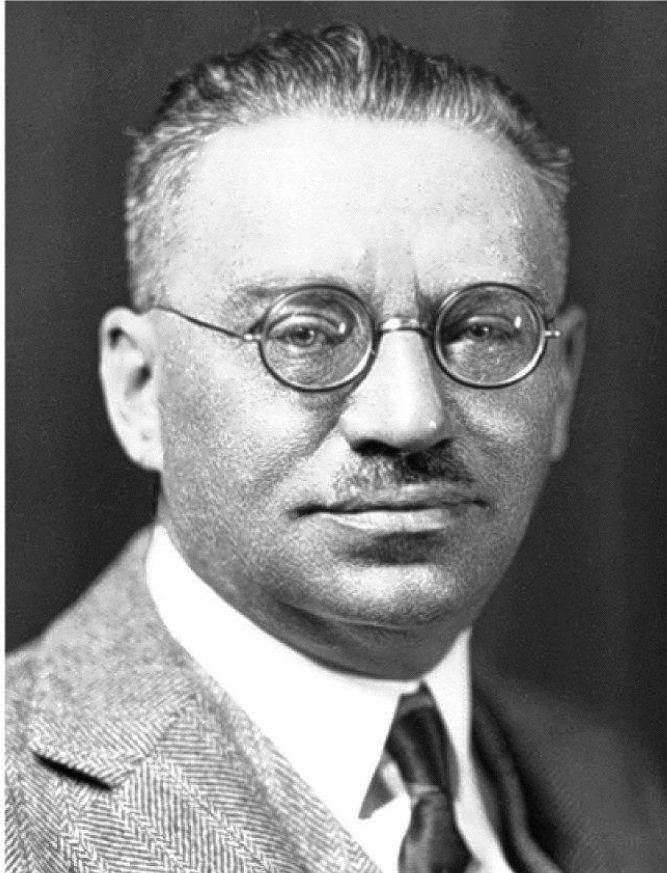
V_0 - V reacției inițiale

V_{\max} - viteza max

K_m - constanta lui Michaelis Menten

$[S]$ - C% S

Această ecuație descrie modul în care viteza reacției variază în funcție de $[S]$



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960



Semnificația lui K_m și V_{max}

K_m -constantă lui Michaelis Menten

- este acea concentrație de S pentru care V de reacție este jumătate din V_{max} .

K_m reflectă afinitatea E pentru S și anume cu cât K_m este mai mică cu atât afinitatea este mai mare și invers.

V_{max} - reflectă capacitatea catalitică maximă a E



Ecuatia lui Lineweaver-Burk:

- Din curba lui Michaelis Menten nu poate fi determinată V_{\max} (deoarece nu se pot atinge c% infinite ale substratului).
- Se procedează la linearizarea ecuației, obținându-se ecuația lui Lineweaver- Burk:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Diagrama lui Lineweaver- Burk:

Ecuția Lineweaver Burk

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Michaelis-Menten Equation}$$

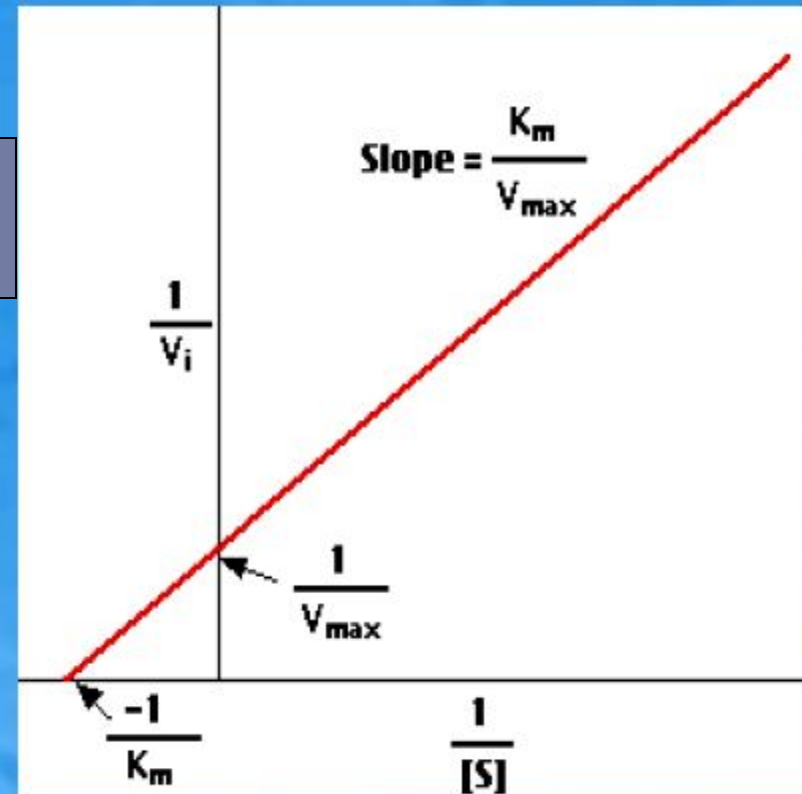
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

Reciproca ecuatiei
Michaelis-Menten

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

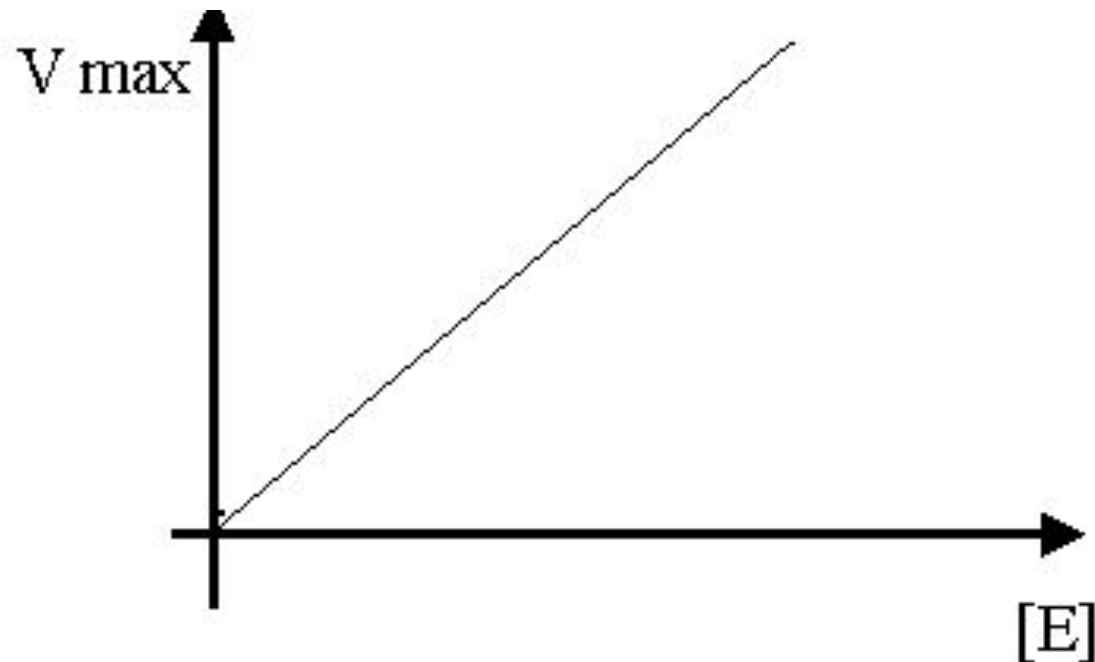
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \begin{array}{l} \text{Slope} = K_m / V_{\max} \\ \text{y Intercept} = 1 / V_{\max} \end{array}$$

Lineweaver-Burk Plot

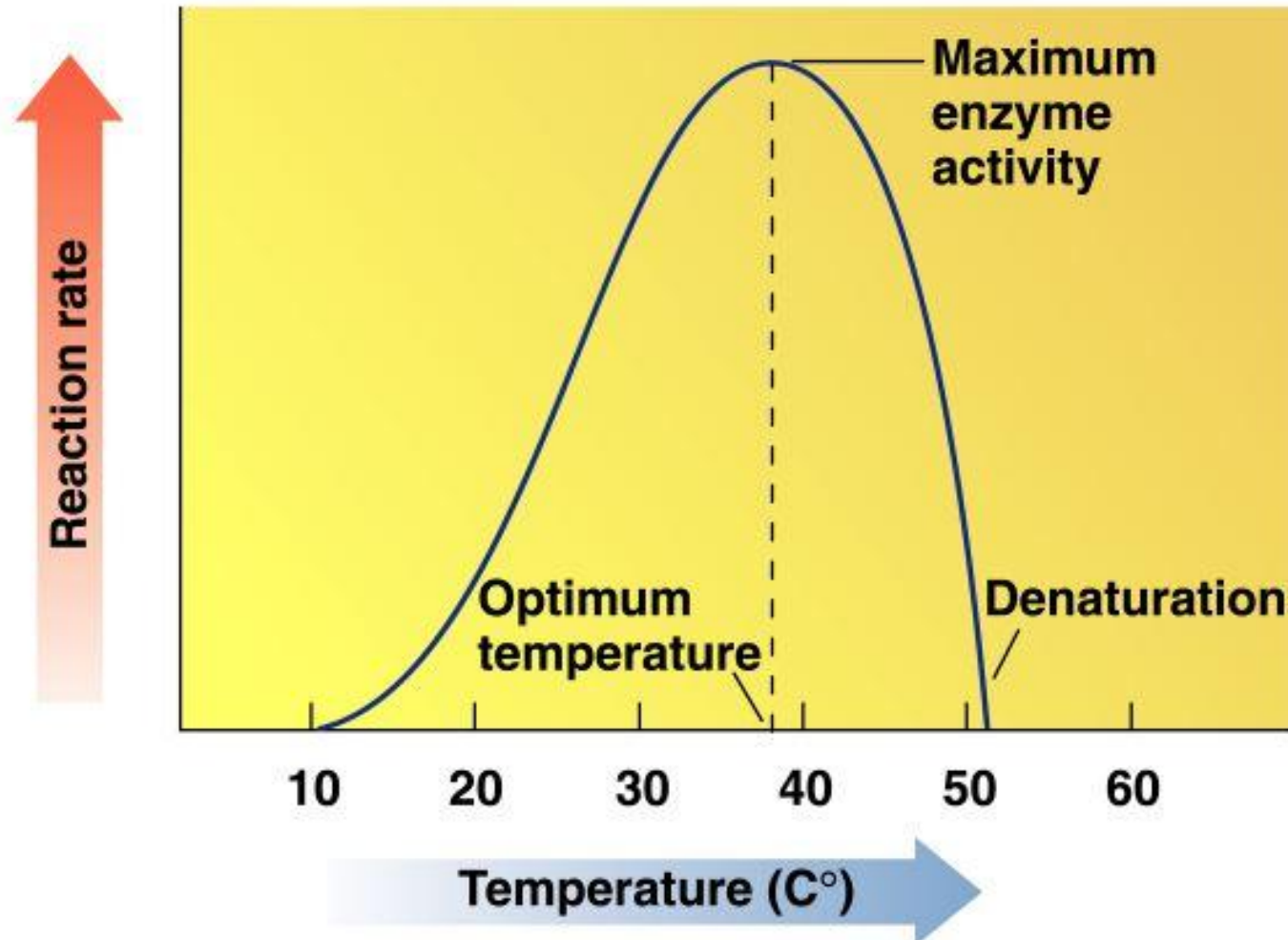


Influența [E] asupra vitezei reacției

- În condiții standard 2 mol de E într-o anumită perioadă de timp vor transforma de 2 ori mai multe molecule de S decât 1 mol de E (relație direct proporțională).

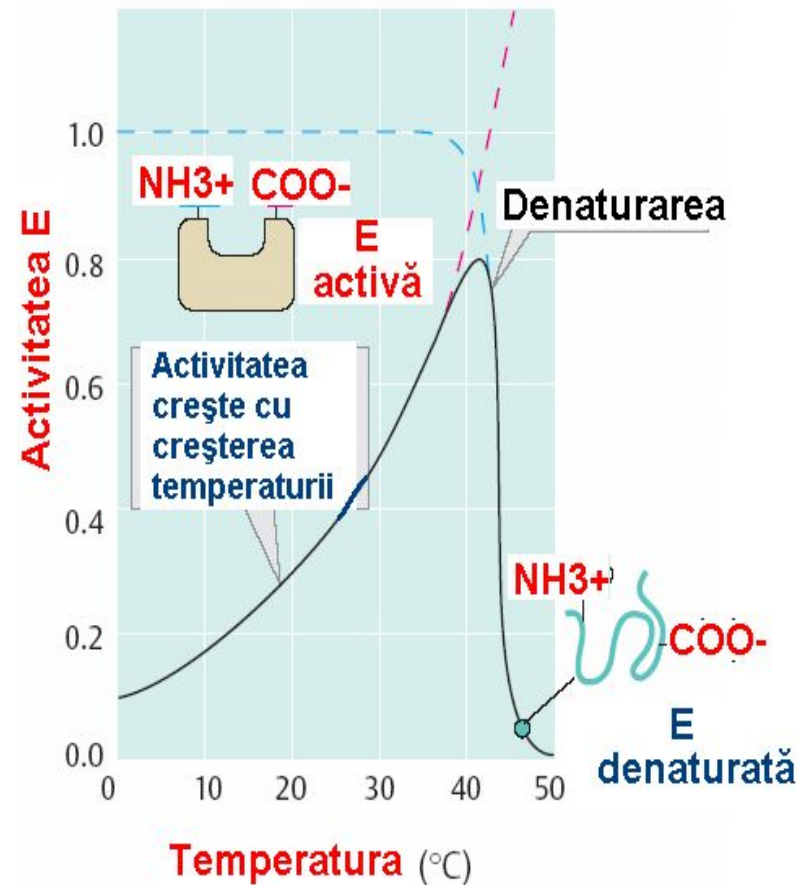


Influența t° asupra vitezei reacției



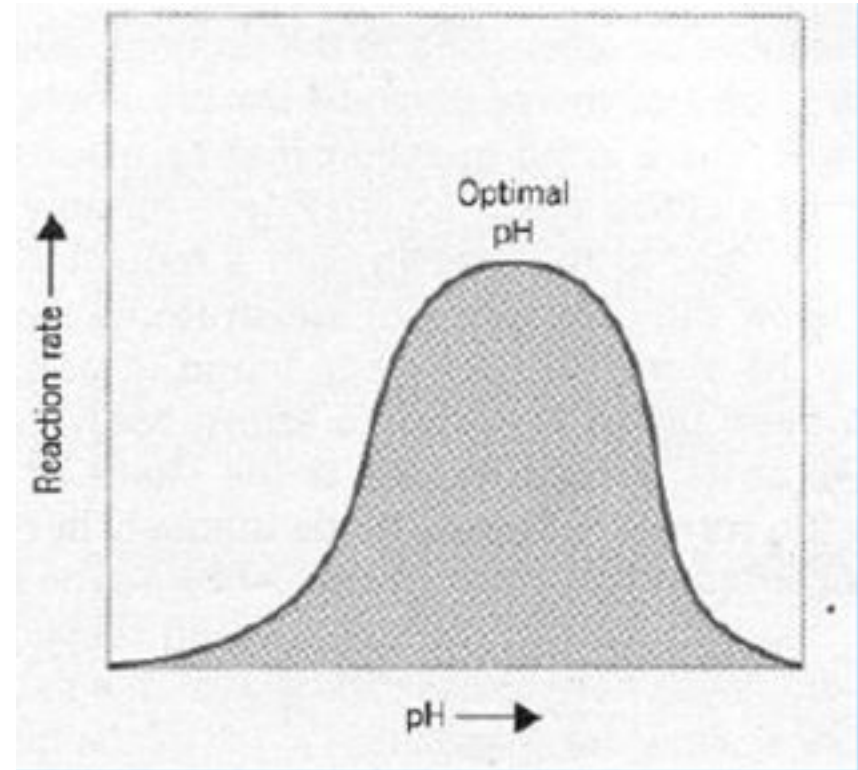
Termolabilitatea (t°)

- Unele E a microorganismelor termofile sunt active la t de 80°C
- La t joase E se inactivează (excepții: catalaza: activitate max la $t=0^\circ\text{C}$)



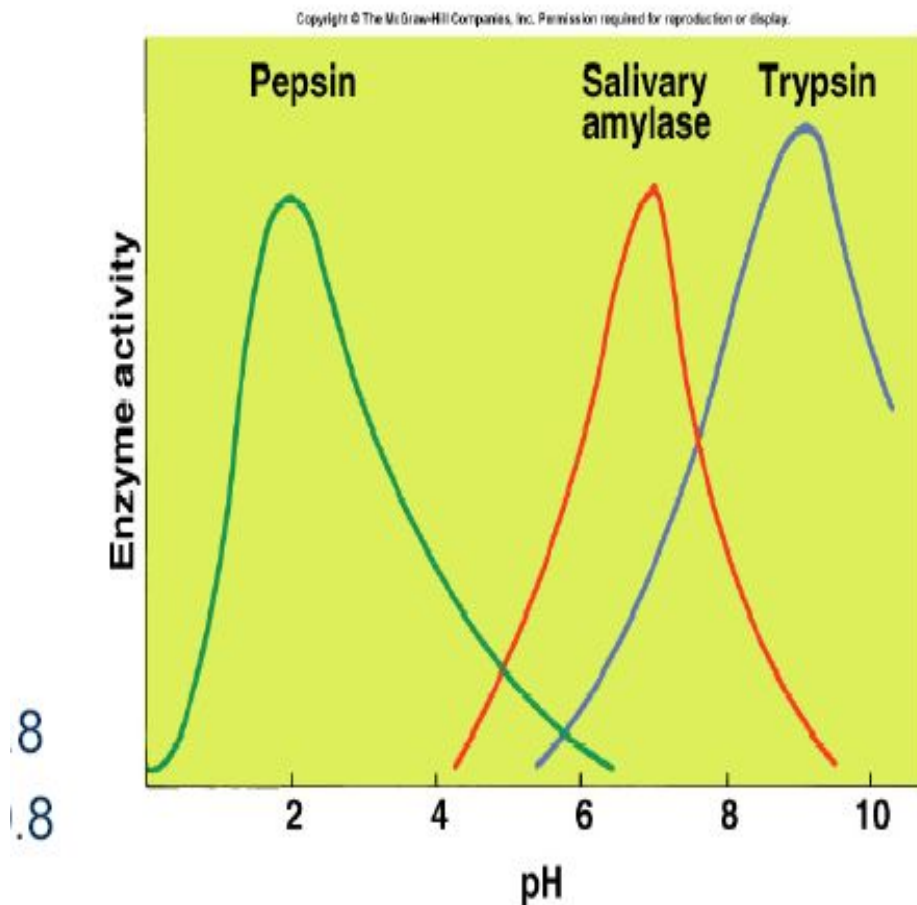
Influența pH asupra vitezei reacției

- **Fiecare E are pH optim** propriu (manifestă activitate max).
- Majoritatea E celulare au pH-ul optim- 6-8 (7,4)
- excepții: hidrolazele acide lizozomale pH= 5;
- MAO din membrana MC externa pH= 10.



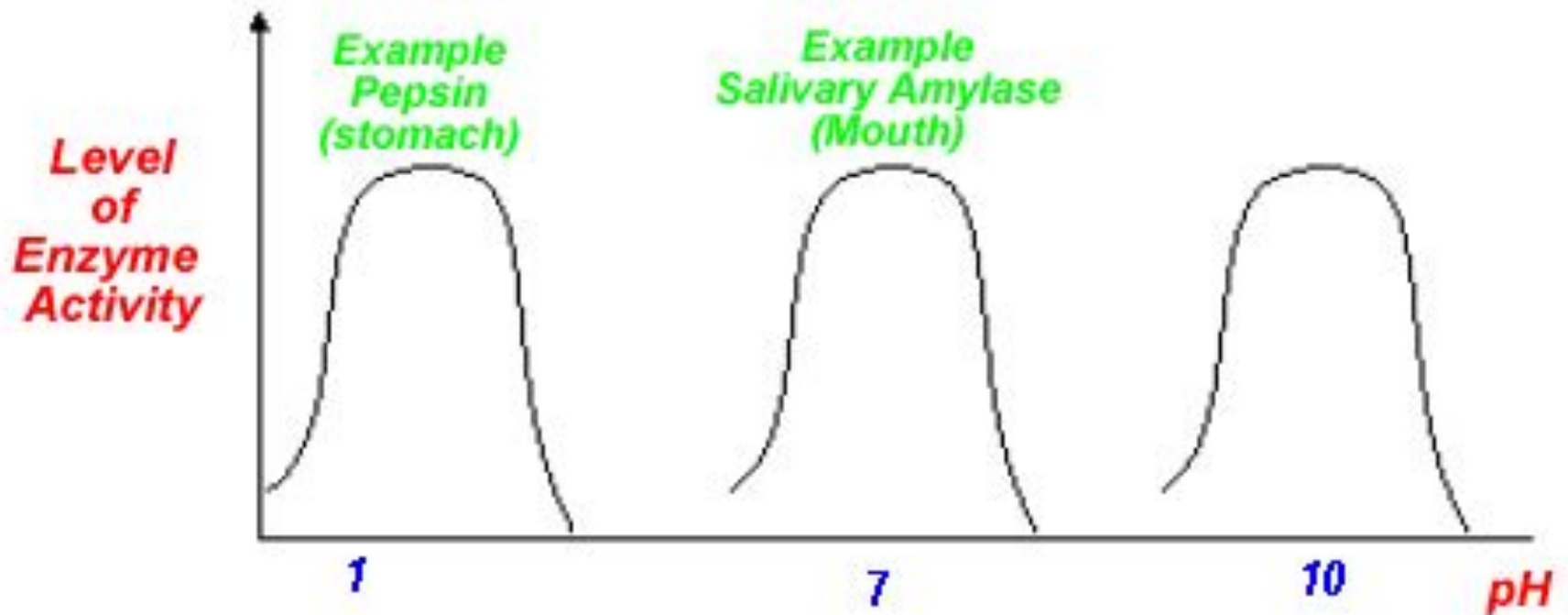
Acțiunea pH asupra activității enzimatică

- La E digestive pH optim este cel al sediului lor de acțiune:
 1. Pepsina – pH 1,5 – 2,
 2. Amilaza pancreatică - pH 7,2,
 3. Tripsina - pH 7,8-8,0



Acțiunea pH asupra activității enzimatică

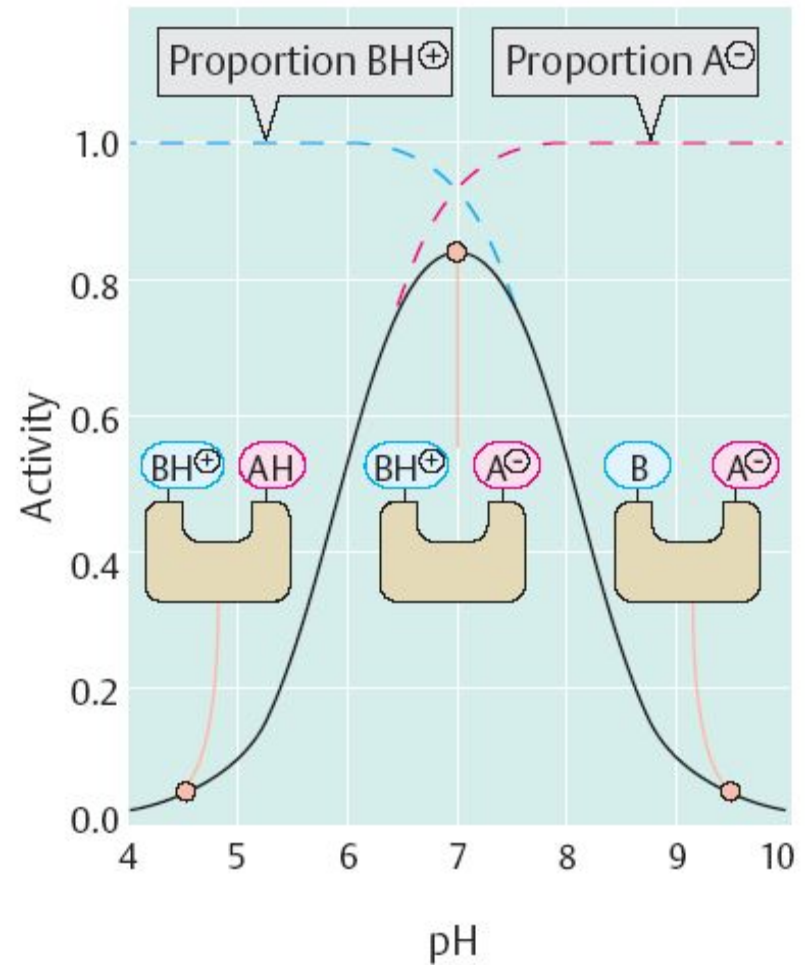
Enzyme Activity and pH



Acțiunea pH asupra activității enzimaticе

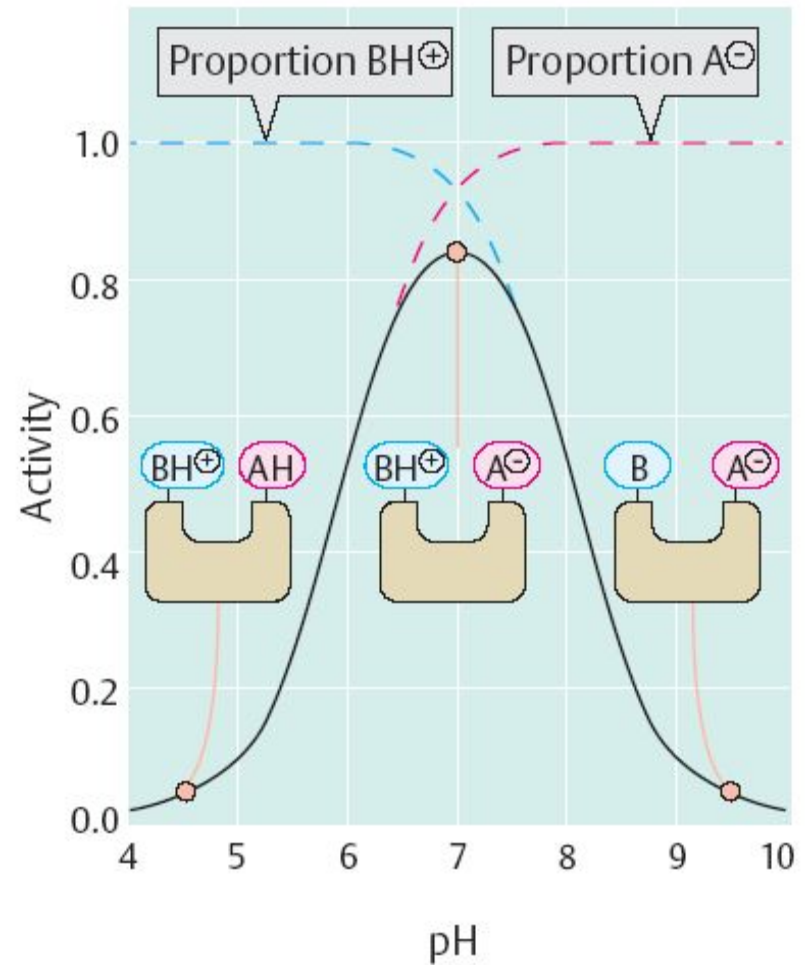
□ pH optim e dependent de:

1. gradul de ionizare a grupelor funcționale,
2. afinității E față de S,
3. stabilității E.



Acțiunea pH asupra activității enzimatică

Centrul activ al enzimelor conține grupe ionizabile, acide sau bazice, deci modificarea pH-ului are ca efect modificarea gradului de disociere și, implicit, modificarea vitezei de reacție.



Influenta efecturilor enzimaticilor

- **Efectorii enzimatici** sunt substante cu structuri chimice variate care aduse in mediul de reactie pot influenta activitatea enzimei care catalizeaza reactia
- Efectorii enzimatici pot fi **activatori** sau **inhibitori**.



Inhibitorii enzimatici

- Inhibitorii enzimatici sunt compusi care influenteaza negativ activitatea enzimelor pe care o pot anula definitiv sau temporar
- Ei pot afecta situsul catalitic al enzimei sau orice alta regiune a moleculei, astfel influentand legarea substratului de enzima
- Actiunea inhibitorilor enzimatici este importanta pentru controlul proceselor biochimice, pentru a intelege mecanismele de actiune a unor medicamente, droguri, otravuri, pentru a urmari etape dintr-un proces metabolic.



Inhibiția enzimatică

□ Deosebim:

1. inhibiție nespecifică (T, pH, agenții denaturării)

2. inhibiție specifică

□ Inhibiția poate fi **reversibilă și ireversibilă.**

□ **Inhibiție reversibilă** - inhibitori se fixează slab, necovalent de E

□ **Inhibiție ireversibilă** - I covalent se fixează de E cu formarea **EI nedisociabil.**



EXEMPLE DE INHIBITORI IREVERSIBILI

- **Compușii organofosforici (Diizopropilfluorfosfatul)** (toxina neuroparalitică) se fixează de OH-Ser în CA a **acetilcolinesterazei** (scindează acetilcolina) cu formarea E neactive.

În rezultat se menține efectul acetilcolinei în permanență ce duce la paraliză musculară și moarte. Înlăturat prin adăugarea reactivatorului.

- **ionii metalelor grele (Hg, Pb)** inhibă gruparea SH a multor E;

- **acidul iodacetic**- inhibă ribonucleaza
-



Inhibiție ireversibilă

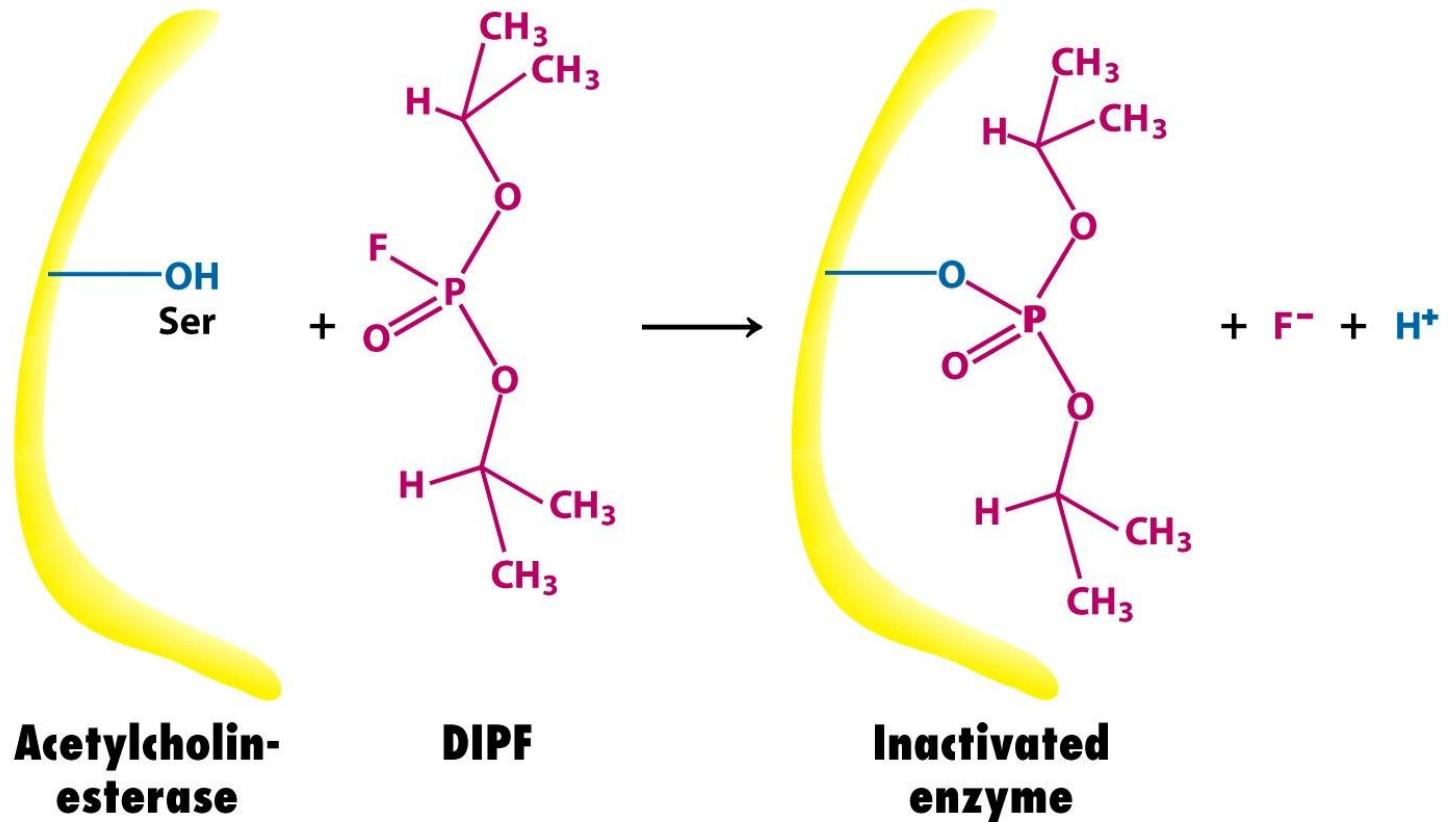
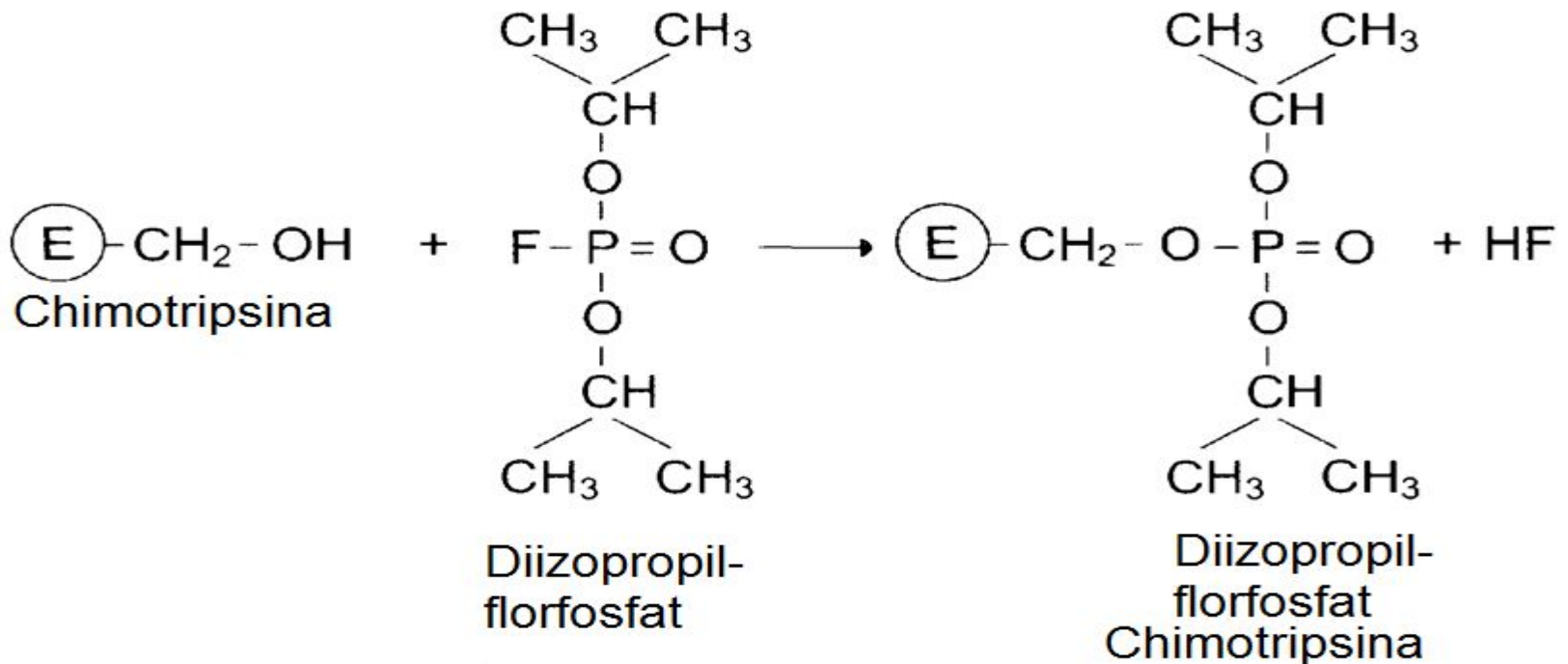


Figure 8-23
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

INHIBIȚIE IREVERSIBILĂ

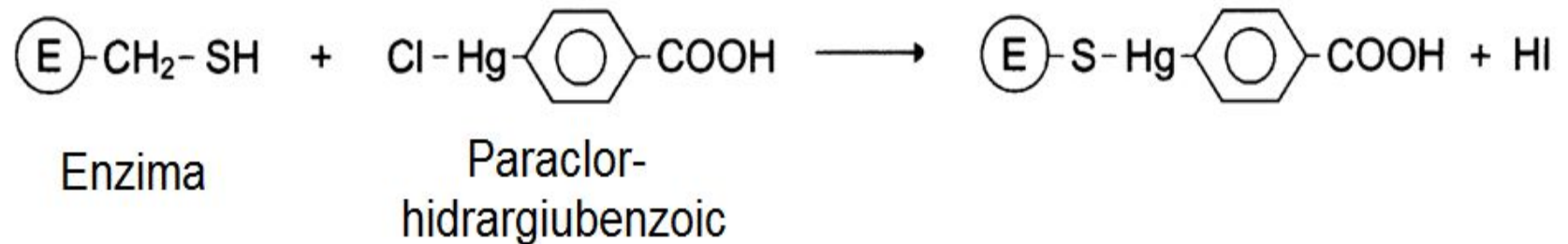
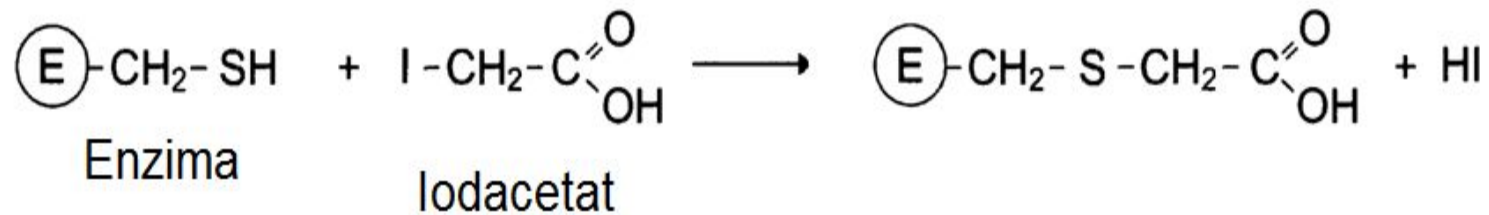


Exemple:

Diizopropilfluorfosfatul se fixează de OH-serinei în CA a proteinazelor



INHIBIȚIE IREVERSIBILĂ



Tipuri de inhibiție reversibilă

□ Deosebim:

1. Inhibiție competitivă
2. Inhibiție necompetitivă (noncompetitivă)
3. Inhibiție uncompetitivă
4. Inhibiție alosterică



Inhibiția competitivă

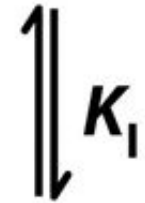
- **I** se aseamănă după structură cu **S**.
- Apare o competiție dintre **I** și **S** pentru **CA**.
- Nu e posibil simultan fixarea **S** și a **I** în **CA**.
- **E** va fixa pe acel competitor care se află într-o concentrație mai mare.
- **E+I ---- EI**
- Este o inhibiție reversibilă- **I** poate fi înlăturat cu adăugarea în exes a **S**.



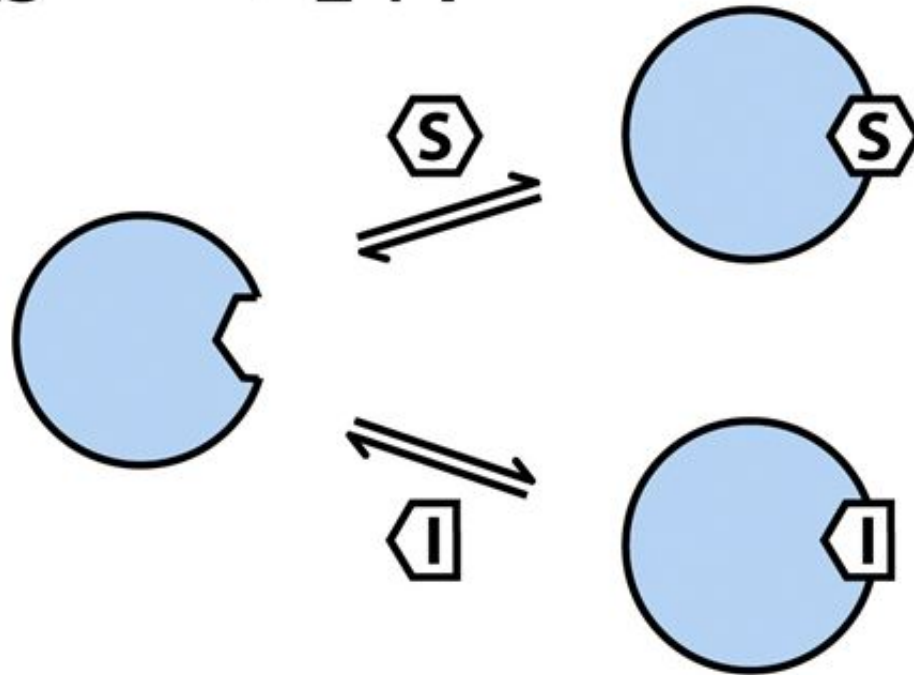
Inhibiția competitivă



+
I

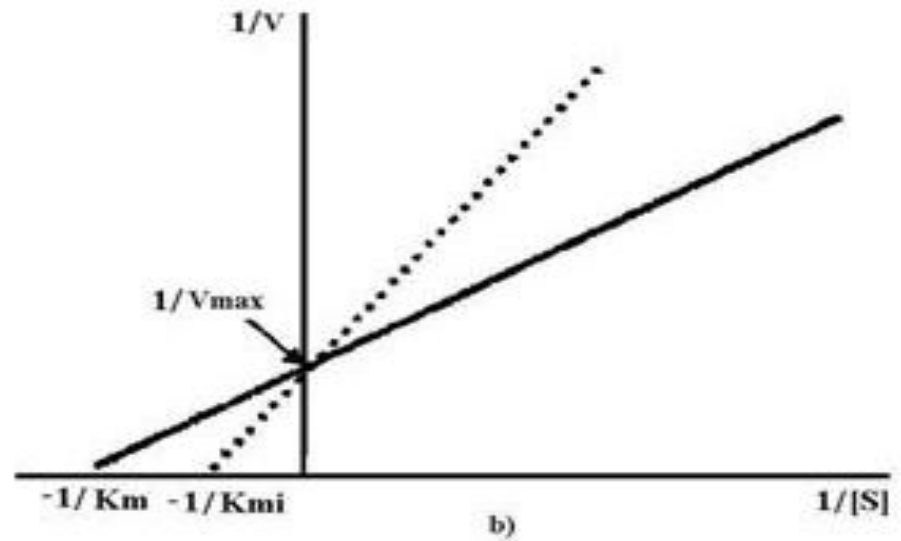
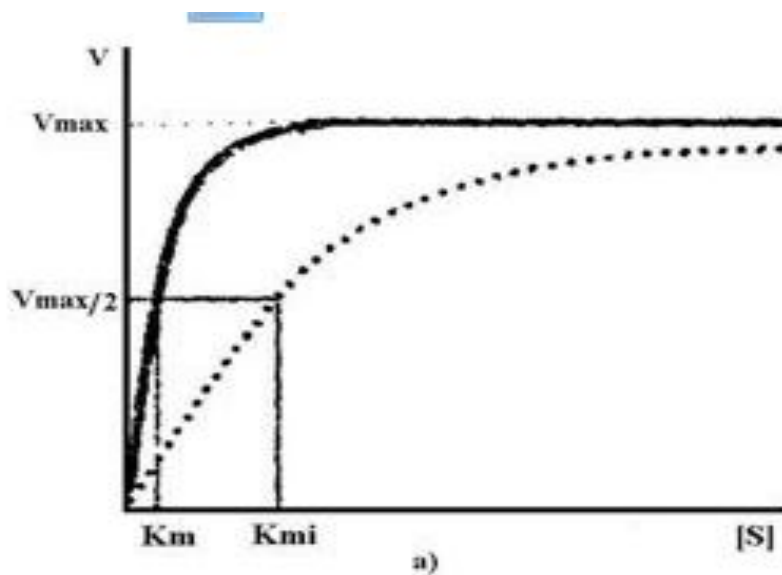


EI



Inhibiția competitivă

- Viteza de reacție atinge V_{max} ca și cum I nu ar fi prezent, dacă se mărește suficient de mult $[S]$
- nu modifică V_{max} ,
- dar crește mult K_m , micșorând afinitatea E pentru S .



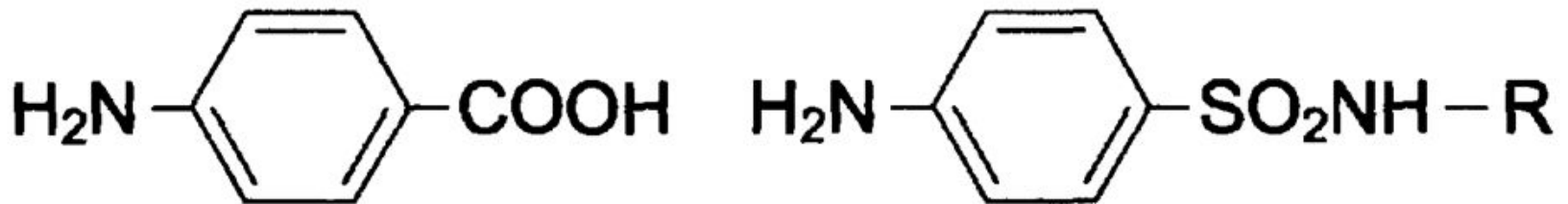
Exemple de I competitivi:

- inhibiția SDH cu malonat (SDH -oxideaza succinatul in fumarat). Malonatul inhibă aceasta E datorită asemănării cu S.



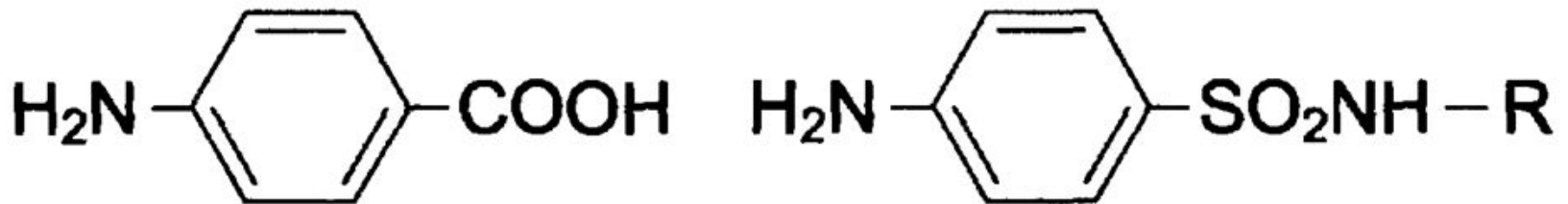
Exemple de I competitivi:

- **Sulfamidele** –substituie acidul p-amino-benzoic din a. folic, indispensabil pentru creșterea microorganismelor, împiedicând dezvoltarea lor (antibacteriană)



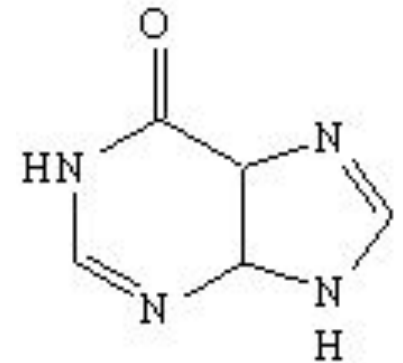
Exemple de I competitivi:

- **Sulfamidele** –substituie acidul p-amino-benzoic din a. folic, indispensabil pentru creșterea microorganismelor, împiedicând dezvoltarea lor (antibacteriană)

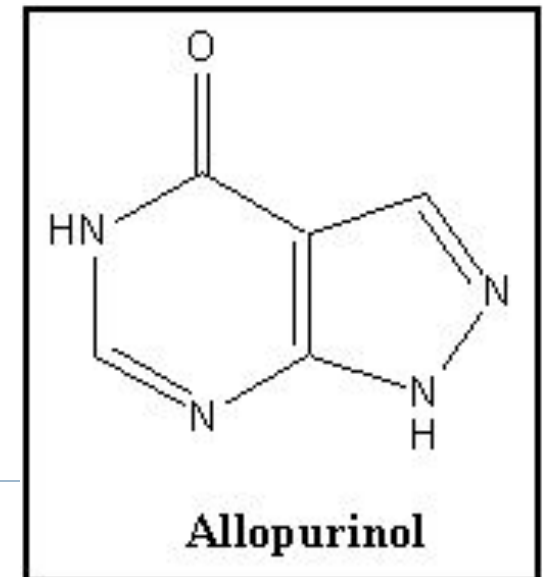


Exemple de I competitivi:

- Alopurinol – administrat în tratamentul gutei
- analog structural al hipoxantinei – inhibă xantinoxidaza și împiedică transformarea hipoxantinei în xantină și în acid uric. Hipoxantina și xantina (sunt mai solubile) nu se depun în țesuturi și sunt excretate ca produși finali ai purinelor.



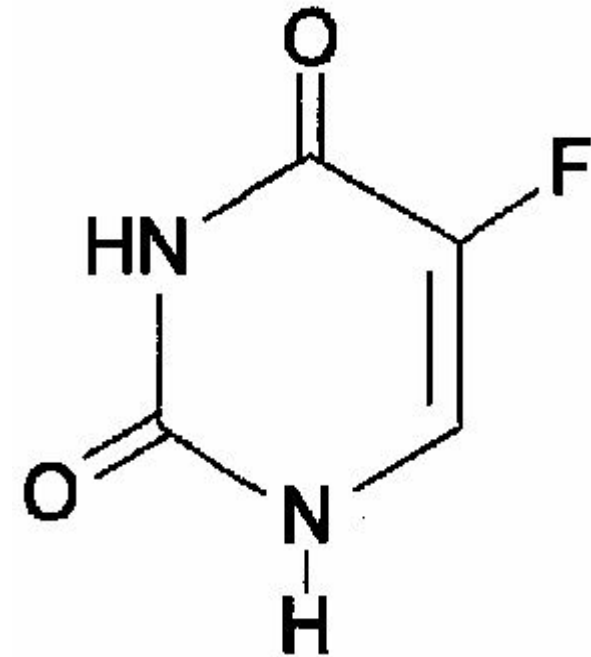
Hypoxanthine



Allopurinol

Exemple de I competitivi:

- 5 fluoruracilul - Inhibitorul timidilat sintazei
- Metotrexatul - inhibitorul dihidrofolatreductazei
 - Astfel se inhibă sinteza ADN (utilizate pentru a diminua rata de creștere a celulelor canceroase)



5 fluoruracil

Inhibiția necompetitivă

- Inhibitorul nu se aseamănă ca structură cu S
- I și S se leagă simultan cu E dar locusurile sunt diferite (I nu se leagă în CA)
- $E+S+I \rightleftharpoons ESI$
- Acest tip de inhibiție nu se înlătură prin exces de substrat.
- I necompetitivi scad V_{max} dar nu afectează K_m



Inhibiție necompetitivă

Mixed inhibition

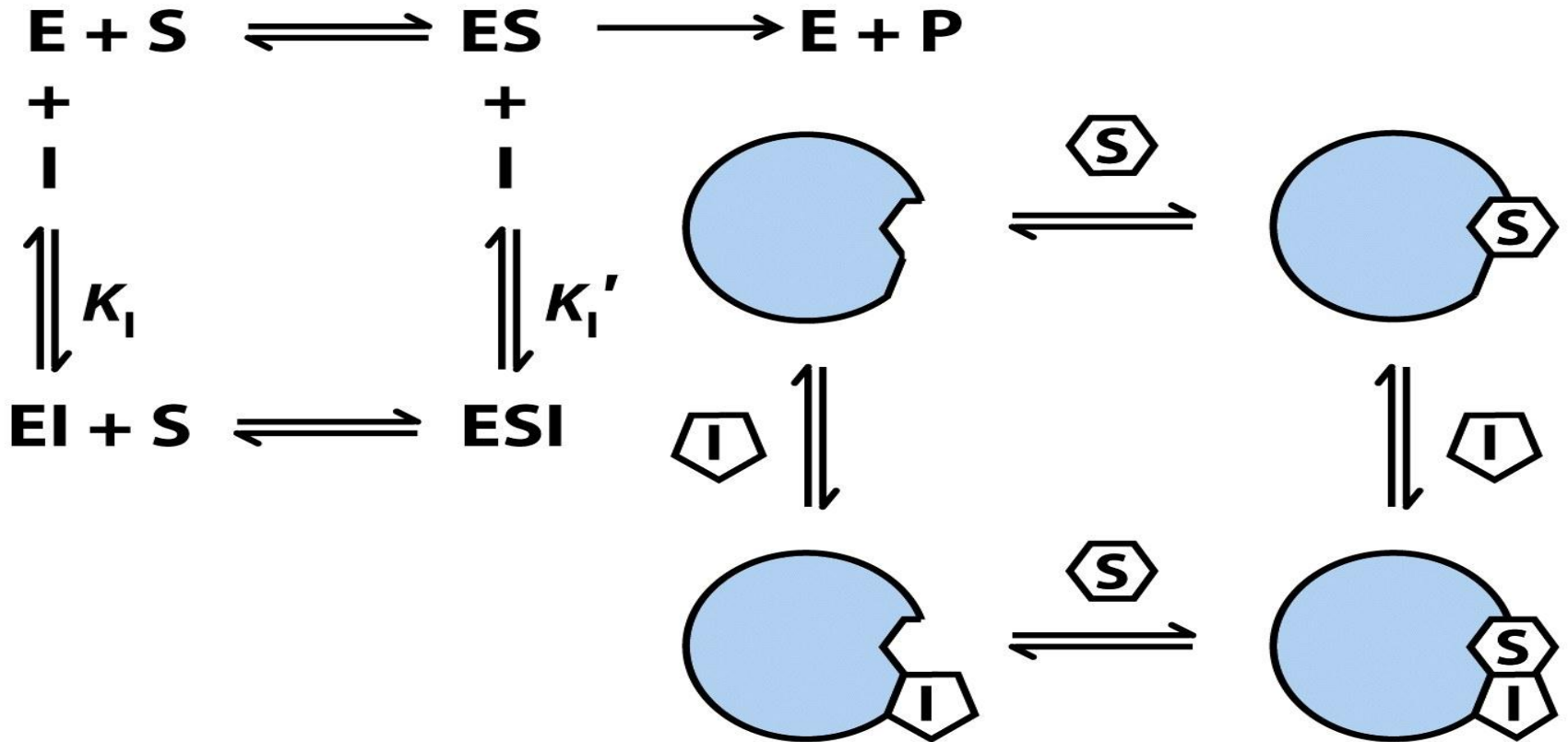


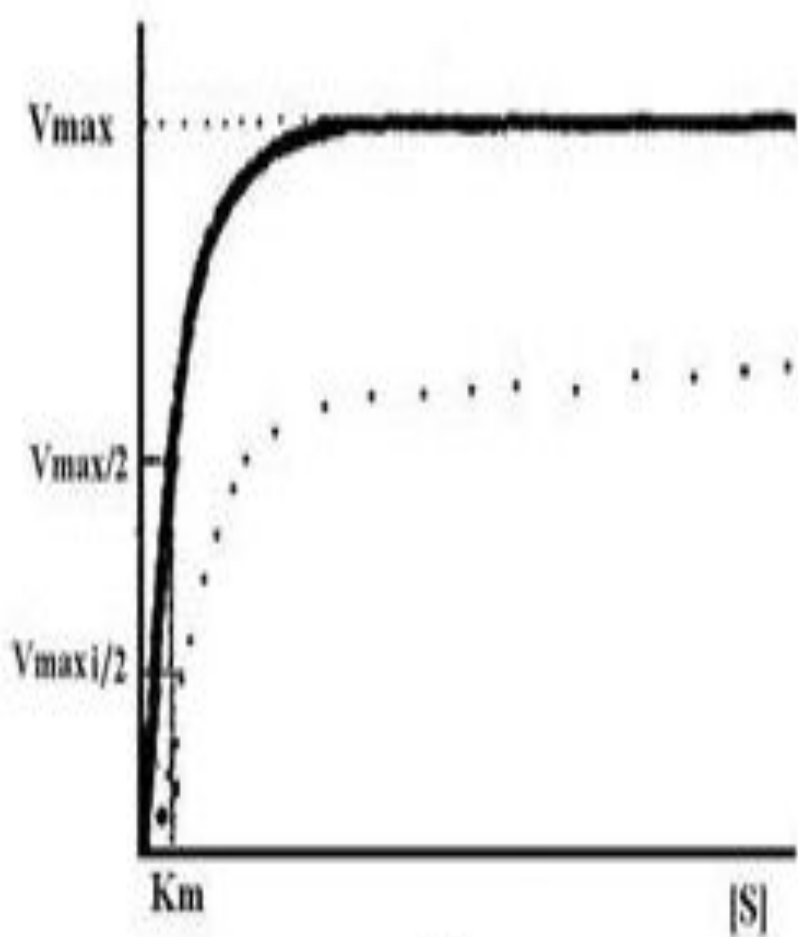
Figure 6-15c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Inhibiție necompetitivă

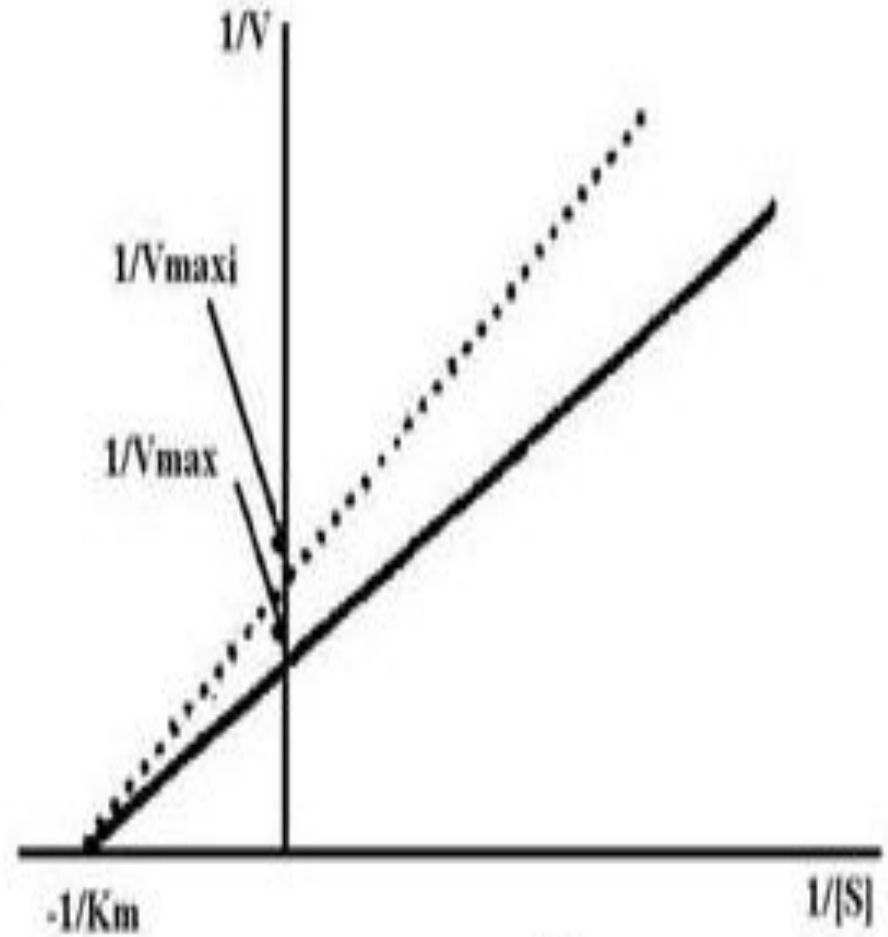
- În cazul inhibiției necompetitive, I chiar dacă nu se leagă la centru activ al E acționează asupra acesteia deformând-o încât nu mai poate forma cES la viteza normală,
- iar cES format nu se mai descompune cu viteza normală pt a forma P



Inhibiția necompetitivă



a)



b)

Tipuri de inhibitori necompetitivi:

- cianurile, CO se fixează cu Fe³⁺ din citocromoxidază ---se întrerupe LR
- inhibitori ai grupelor -SH libere ale enzimei: acid iod acetic, p-clormercuribenzoat;
- metale grele: argint, mercur, plumb, ce actioneaza la nivelul grupelor -SH ale enzimei;
- agenti de chelatare: EDTA.



Inhibiția necompetitivă

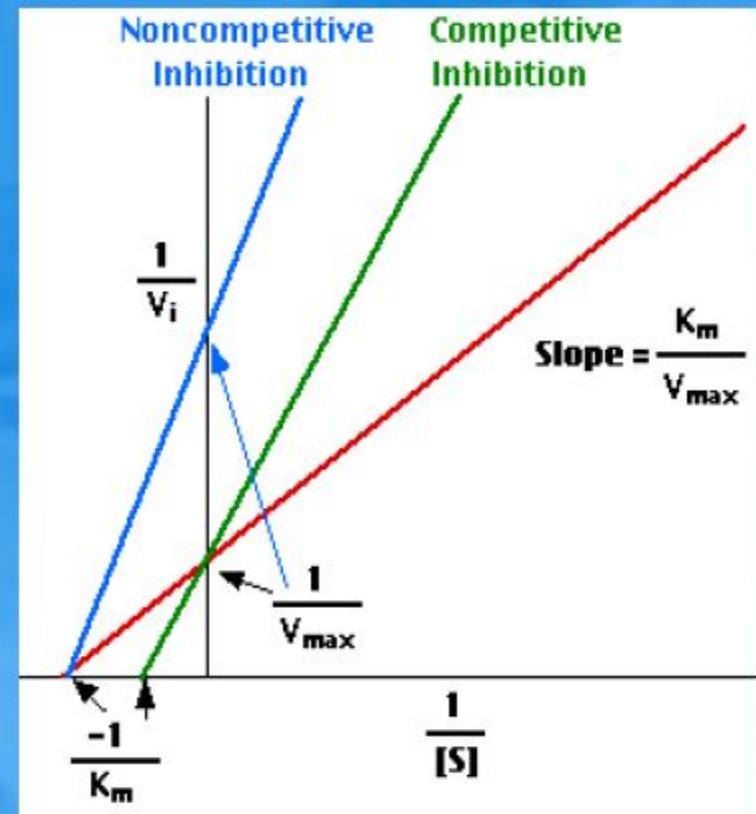
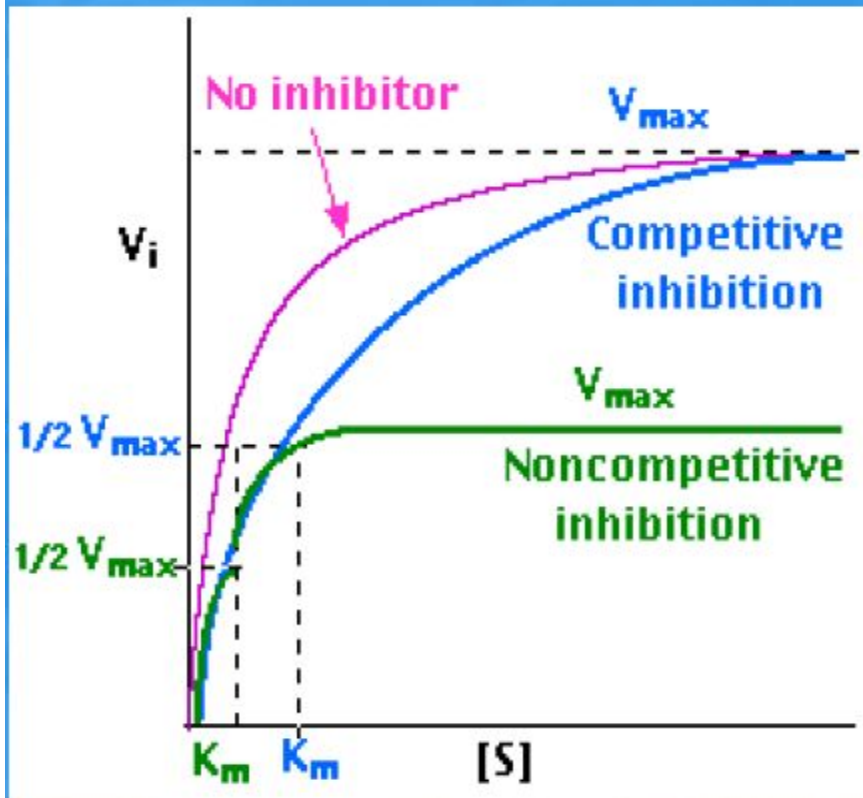
- I poate fi înlăturat de substanțe care îl leagă – numite reactivatori



TABEL COMPARATIV INHIBITORI REVERSIBILI

Inhibitor competitiv	Inhibitor necompetitiv
-are analogie structurală cu substratul	- nu are analogie structurală cu substratul
-se leagă în același loc cu substratul (conpetiționează pentru centrul activ)	-se leagă în alt loc decât substratul (nu conpetiționează pentru centrul activ)
- scade afinitatea substratului pentru enzimă (crește KM)	- nu modifică afinitatea substratului pentru enzimă (KM = constant)
- la concentrații mari ale substratului se înlătură inhibiția (Vmax = constant)	- la concentrații mari ale substratului nu se înlătură inhibiția (Vmax scade)
Ex. Acizi dicarboxilici pentru SDH (acidul malonic inhibă CK) Sulfonamida pentru FH2-sintetaza (Ab -blochează sinteza de acid folic necesar bacterii) Metotrexat pentru FH2 reductaza (citostatic- inhibă sinteza de ADN)	Ex. Ioni ai metalelor grele (Ag⁺, Hg⁺) (se leagă de grupările -SH din afara centrului activ al enzimelor- otrăvire)

Efectul inhibitorilor asupra vitezei de reactie



Inhibiția uncompetitivă –

- $E + S \rightleftharpoons ES + I \rightleftharpoons ESI$
- I se combina cu complexul ES formand un complex ESI ce nu poate genera P dorit
- Reducerea $[ES]$ creste afinitatea aparenta e E pt S
- Inhibitorii uncompetitivi scad K_M si V_{max}

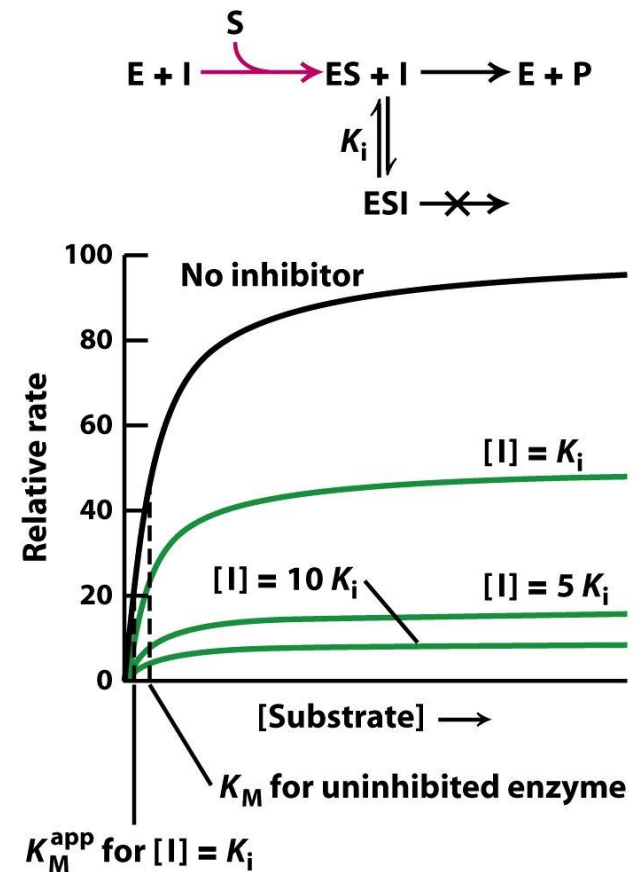


Figure 8-18
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Inhibiția uncompetitivă –

Uncompetitive inhibition

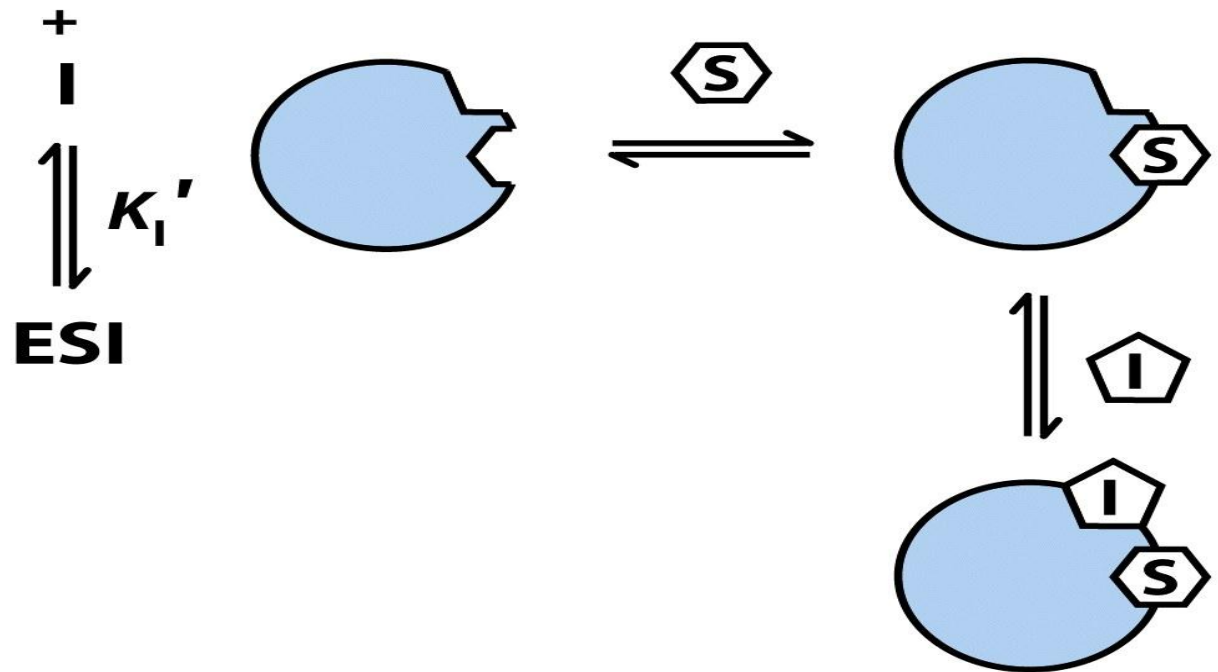


Figure 6-15b

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Inhibiția uncompetitivă

Lineweaver- Burk

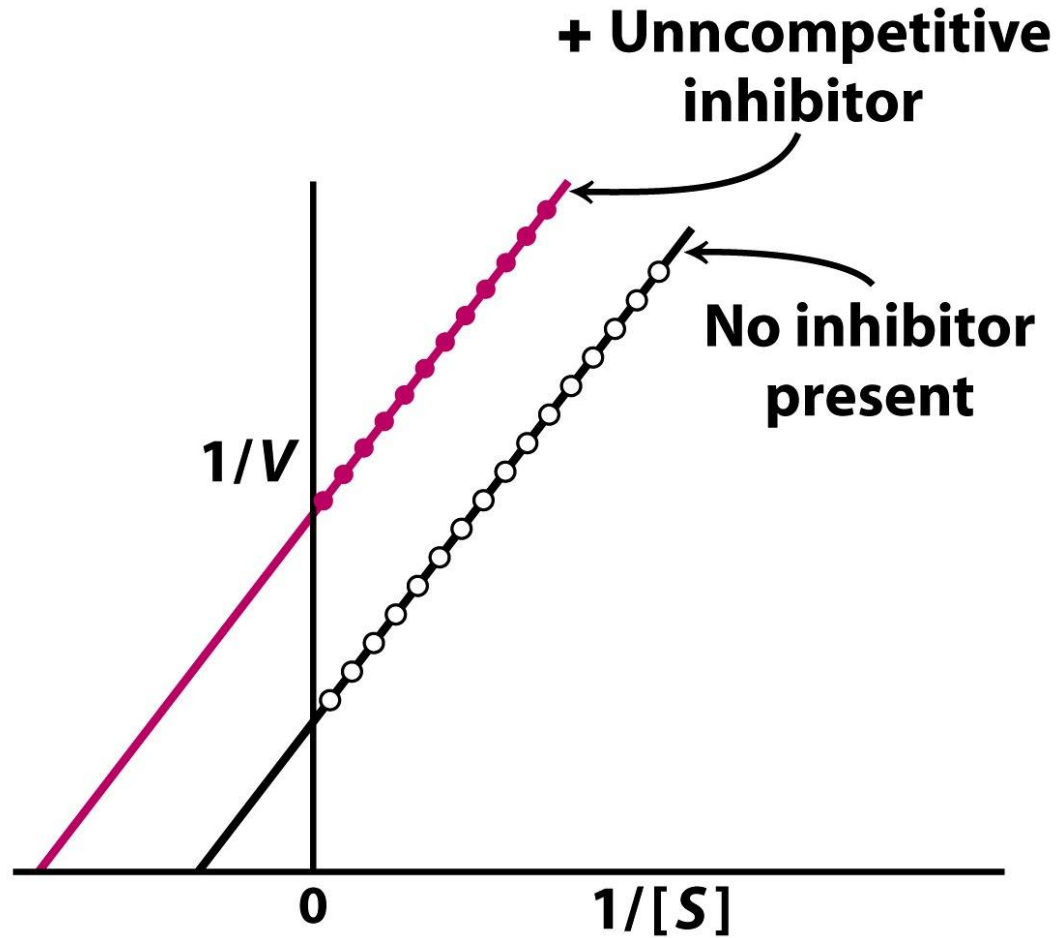


Figure 8-21
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Alte tipuri de inhibiție

- ▣ **inhibiția prin modificarea covalentă a moleculei E** - prin fosforilare pe baza ATP-ului.
- ▣ Unele E fosforilate pierd activitatea de exemplu enzima glicogensintaza
- ▣ **Inhibiția prin exces de S** – în CA se fixează simultan surplus de S – ce nu poate fi transformat. Este o inhibiție reversibilă – înlăturarea S



REGLAREA ACTIVITATII ENZIMELOR



Mecanismele de activare a E

Sunt : 1. **nespecifice**: temperatura , iradierea
2. **specifice**

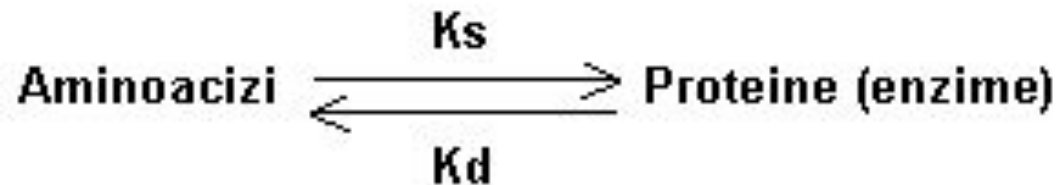
□ Se activează la:

1. majorarea concentrației S cînd este insuficient
2. majorarea cantității E
3. introducerea Co cînd sunt insuficiente
4. Introducerea ionilor metalelor Fe, Cu



I. REGLAREA CANTITATIVA

Functie de dinamica SINTEZA/DEGRADARE




- Enzime inductibile $K_s > K_d$
- Enzime represibile $K_d > K_s$
- Enzime constitutive $K_s = K_d$



II. REGLAREA CALITATIVA

Mecanismele de activare a E

- Deosebim următoarele tipuri de reglare a activității enzimaticice:
 1. **Reglare covalentă - proteoliza limitata**
 2. **Reglare covalentă – fosforilare/ defosforilare**
 3. **Autostructurarea cuaternară**
 4. **Alosterică**
-
- 

II. REGLAREA CALITATIVA

II.1. Reglarea alosterica (necovalenta)



Enzime alosterice. Efectori alosterici

- Sunt proteine oligomere alcătuite din mai multe subunitati identice sau diferite, in numar par
- Reactiile catalizate sunt endergonice si ireversibile; imprima sensul unic al cailor metabolice din care fac parte
- Intervin in prima etapa a unui lant de reactii, asigurand controlul intensitatii procesului si ireversibilitatea lui
- Fiecare monomer poseda un centru activ; fixarea S pe una din subunitati influenteaza legarea lui pe celelalte prin fenomenul de cooperativitate

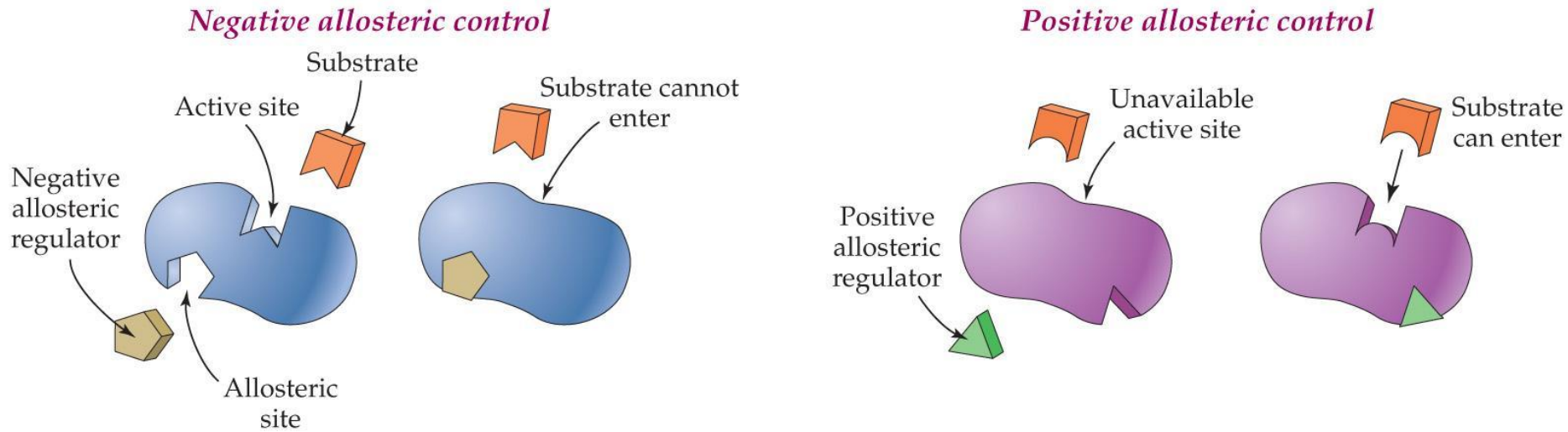


Enzime alosterice. Efectori alosterici

- Pe langa centri activi, monomerii prezinta si centri alosterici de care se vor lega efectorii alosterici
- Efectorii alosterici sunt compusi cu masa moleculara mica, fara analogie cu S si care activeaza reactiile enzimatice (efectori pozitivi) sau le inhiba (efectori negativi)
- Efectorii alosterici sunt prezenti la locul de actiune al E variind doar concentratia lor
- E alosterice sunt inhibitate de produsul de reactie prin retroinhibitie sau inhibitie feedback

II. REGLAREA CALITATIVA

II.1. Reglarea alosterica de tip heterotrop



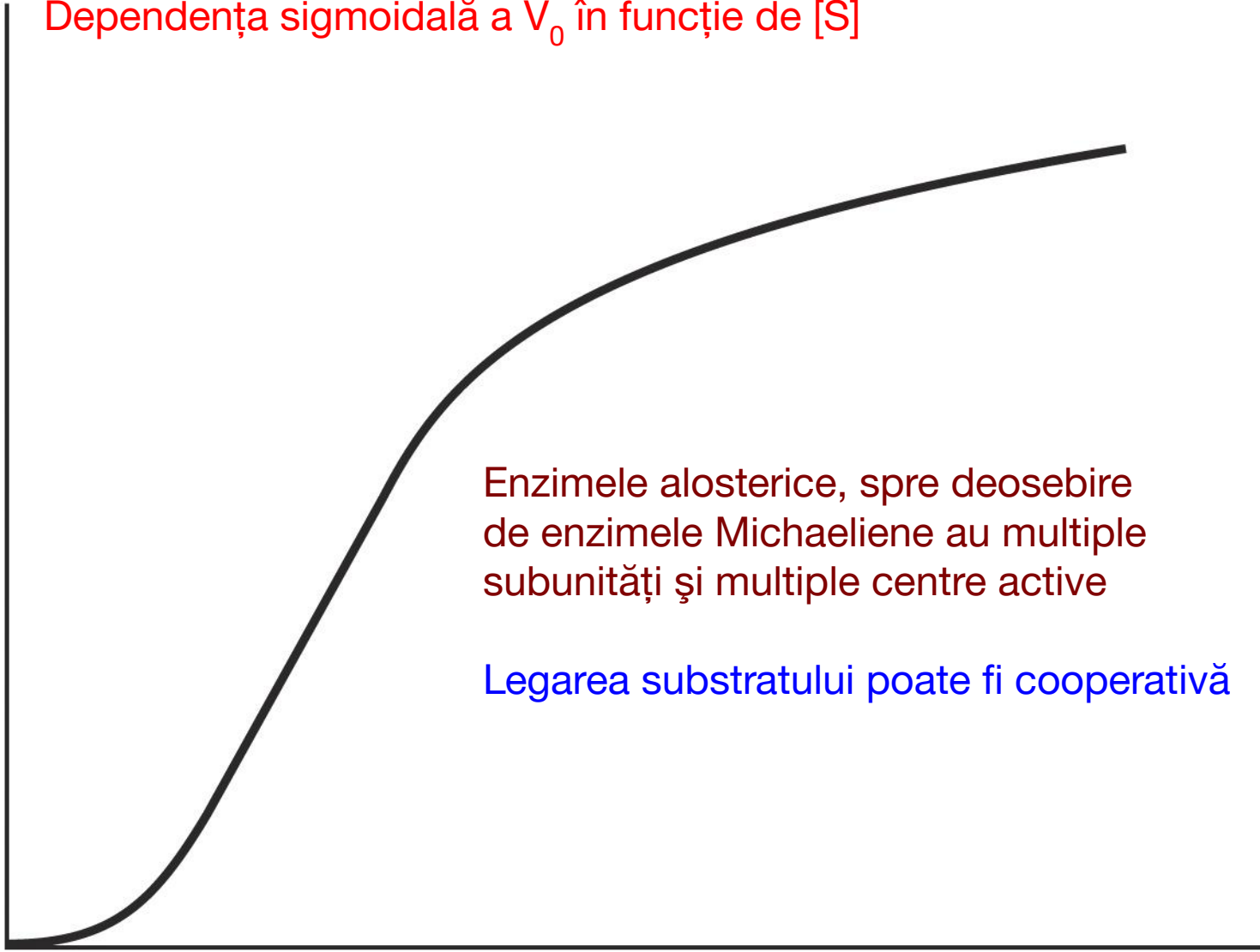
Copyright © 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.



Cinetica enzimelor alosterice („ne-Michaeliene“)

Dependența sigmoidală a V_0 în funcție de $[S]$

Reaction velocity, V_0 \longrightarrow



Enzimele alosterice, spre deosebire de enzimele Michaeliene au multiple subunități și multiple centre active

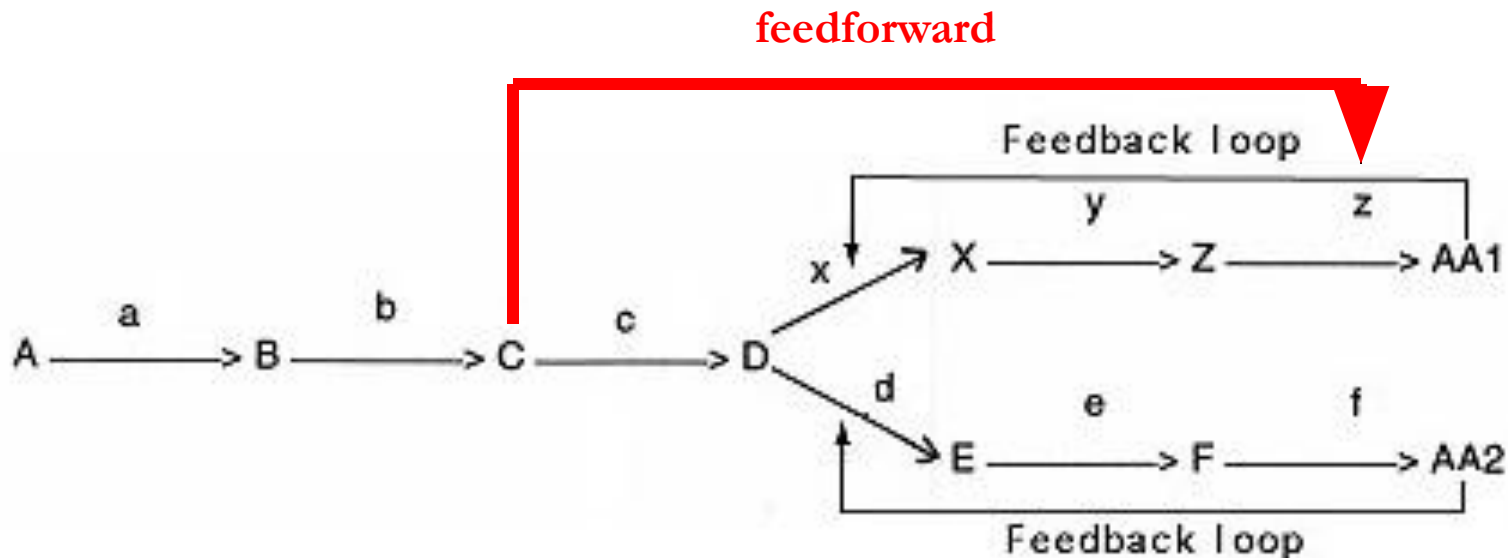
Legarea substratului poate fi cooperativă

Substrate concentration, $[S]$ \longrightarrow

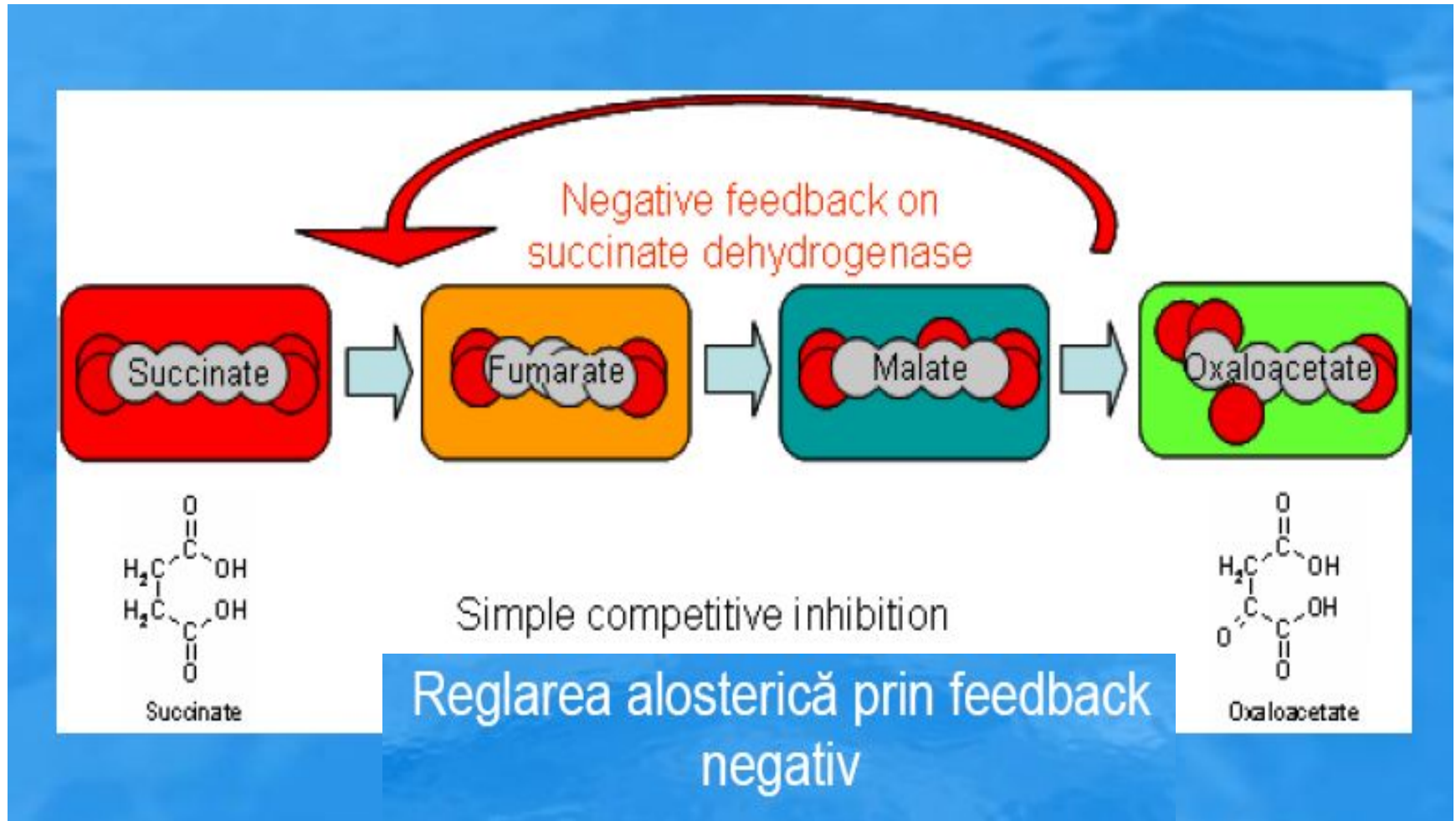
Tipuri de reglare alosterică

în funcție de poziția relativă a efecteurului față de E în calea metabolică:

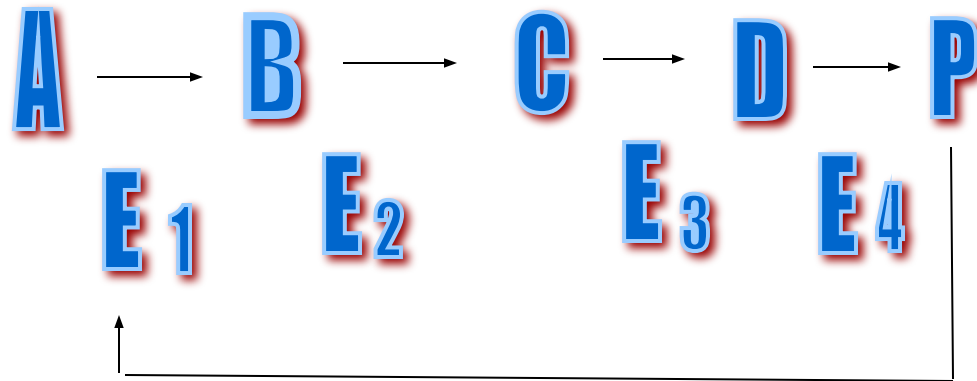
-feedback și feedforward-
-pozitivă (activare) și negativă (inhibiție)-



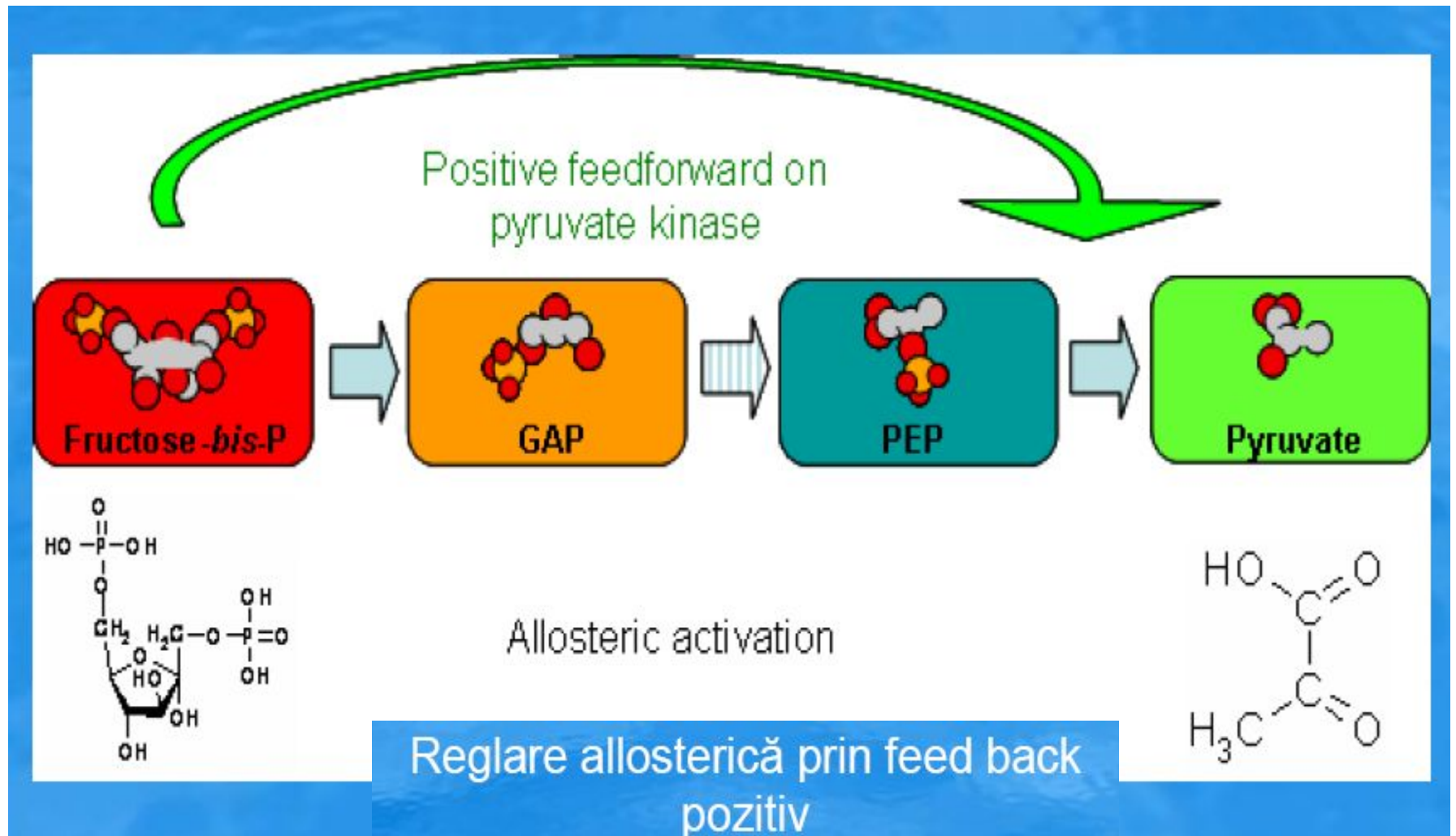
Reglarea activitatii enzimatice



Retroinhibiție



Reglarea activitatii enzimatice



Reglarea covalentă - Proteoliză limitată

- Unele enzime (proteine) se sintetizează în forma neactivă de precursor – proenzime (zimogeni)

Exemplu:

- 1) enzimele digestiei: pepsinogenul, chimotripsinogenul, tripsinogenul, proelastaza, procarboxipeptidaza - scindeaza proteinele în stomac și duoden.
- 2) coagularea sângelui e determinată de cascada de reacții cu activitate proteolitică;



Proteoliză limitată

- -este scindarea unui sector al catenei în rezultatul căreia E se restructurează și se formează CA.

H+

Pepsinogen $\xrightarrow{\text{-----}}$ pepsină
-42AA



Importanța biologică a prezenței formelor neactive

- Zimogenii sunt produse la locurile de sinteză (mucoasa gastrică pentru pepsinogen, pancreasul pentru toate celelalte), **activările se produc la locul de acțiune** (stomac, intestin subțire)
 1. Protejază de proteoliză proteinele celulelor producătoare de E.
 2. Este o forma de rezervă a E, care rapid pot fi activate și intervin în reacție.
-



Reglarea covalentă - fosforilare-defosforilare

- unele E sunt active în forma fosforilată, iar altele în forma defosforilată.

Ex.:

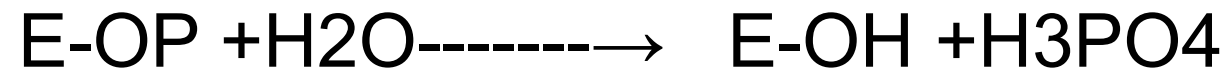
glicogen fosforilaza – activă în forma fosforilată;

glicogen sintaza – este activă în forma defosforilată



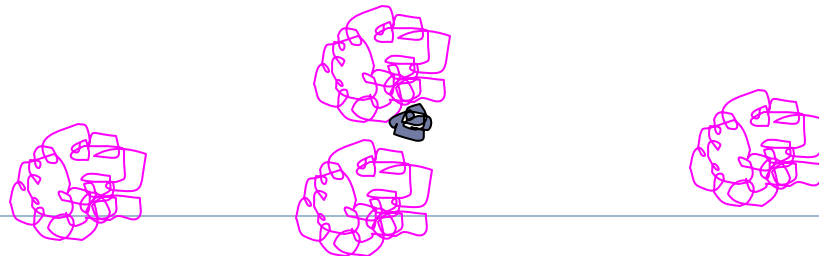
Reglarea covalentă - fosforilare-defosforilare

- Reacțiile de fosforilare sunt catalizate de **kinaze** specifice.
- $E-OH + ATP \longrightarrow E-O-P + ADP$
- Defosforilarea are loc sub acțiunea **fosfotazei** specifice



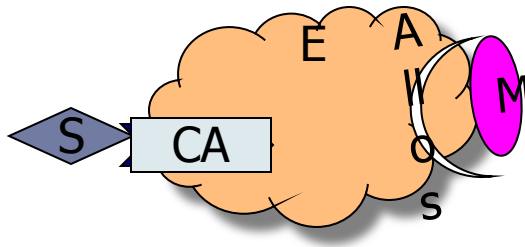
Autostructurarea cuaternară

- Este caracteristică E ce posedă structură cuaternară
- Fiecare protomer în parte nu e activ
- La asamblarea lor – se modifică conformația fiecărui protomer și corespunzător se modifică și conformația CA, devenind astfel favorabil pentru fixarea și transformarea S
- Ex: **proteinkinaza A**




Reglarea alosterică

Modulator pozitiv



Izoenzimele- izoE

- forme moleculare multiple ale E, ce catalizează aceeași reacție chimică, dar diferă prin structură, proprietăți fizice, chimice și cinetice
 - Diferite forme de izoE se pot găsi:
 1. împreună (LDH din ficat);
 2. în țesuturi diferite (fosfotaza acidă în prostată și hematii);
 3. sau în diferite compartimente ale aceleiași celule (MDH MC și Cit)
-
- 

IzoE diferă între ele prin:

1. sarcina electrică (ce permite separarea lor prin electroforeză);
2. V max de cataliză,
3. sensibilitatea față de modulatorii allos;
4. pH-optimum de acțiune;
5. termolabilitate, au afinitate diferită față de S.



STRUCTURA IZOE

Sunt E oligomere, cu structură cuaternară, alcătuite din cel puțin 2 protomeri diferiți

- Ex. LDH (lactat – piruvat)
- Prezintă un tetramer, alcătuit din 2 tipuri de subunități (H – inimă; M- mușchi) în diferite raporturi; **codificate de gene diferite.**
- HHHH – inimă; HHHM; HHMM; HMMM; MMMM – mușchi



B. Isoenzymes

Lactate dehydrogenase M

RYLMGERLGVHPLSCHGWVVGEGHGDSSVPVWWSGMNVAGCSLKTLPDLGTD..

1. Gene

Lactate dehydrogenase H

RYLMAEKLG IHPSSCHGW I LGEHGDSSVAVWSGV NVAGVSLQELNPEMGTD..

LDH1 (H₄)

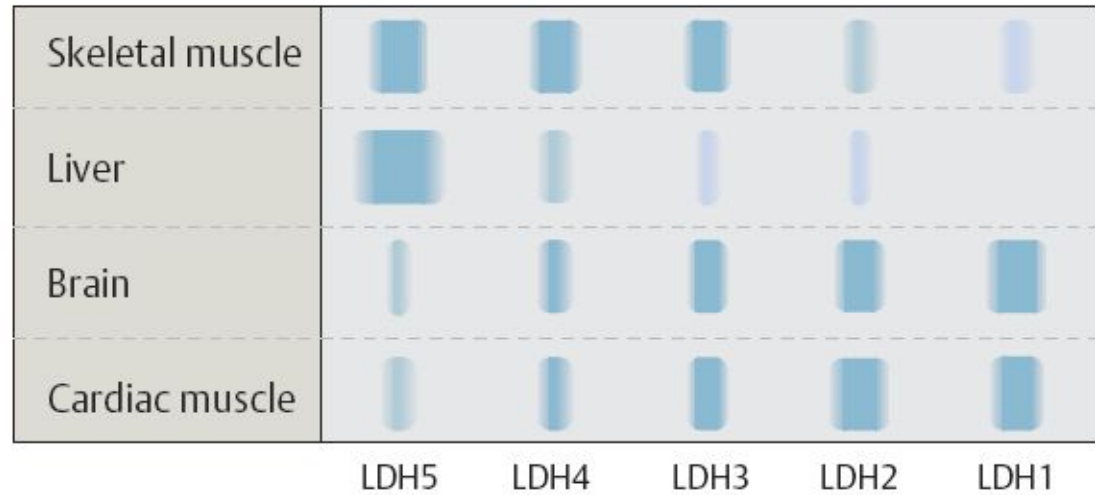
LDH2 (M₁H₃)

LDH3 (M₂H₂)

LDH4 (M₃H₁)

LDH5 (M₄)

2. Forms

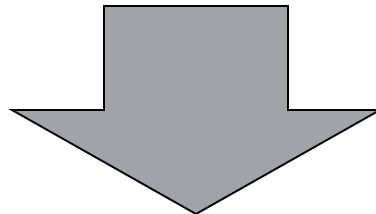


3. Separation by gel electrophoresis

Izoformele lactat dehidrogenazei (LDH)

- LDH-1 (4H) - in inima
- LDH-2 (3H1M) - in sistemul reticuloendotelial
- LDH-3 (2H2M) - in plamani
- LDH-4 (1H3M) - in rinichi
- LDH-5 (4M) - in ficat si muschiul striat

(H este tipul de monomer intalnit in inima, iar M este monomerul caracteristic izoenzimei hepatice si musculare)



Rol in diagnosticul medical
indicand distrugeri celulare

ROLUL izoenzimelor

1. În controlul metabolic (faciliteaza adaptarea metabolismului in diferite țesuturi.)

Ex: in miocard predomina H4 (inhibată de piruvat) - orientează oxidarea piruvatului pe cale aeroba.

M4 este activată de catre piruvat și orientează transformarea piruvatului pe cale anaerobă spre lactat.

2. În diagnosticul unelor stări patologice (variația diferitor forme de izoE)



LDH

- Norma- 100-190U/L
- Creșterea de LDH 1 și LDH2:
 1. infarctul miocardic
 2. anemia hemolitică/ megaloblastică
- LDH5 crescut - afecțiuni hepatice, necroza hepatică



Exemple de izoenzime:

1. Creatinfosfokinaza -2 tipuri de monomeri:
M-Muscle și B –brain
2. LDH
3. MDH
4. Aldolaza
5. Fosfataza alcalină
6. Fosfataza acidă



Creatinfosfokinaza (CPK)

CPK – M₂	Mușchi scheletic	Miodistrofii
CPK – MB	Mușchi cardiac	Miocardio- patii
CPK – B₂	Creier	Ischemii cerebrale



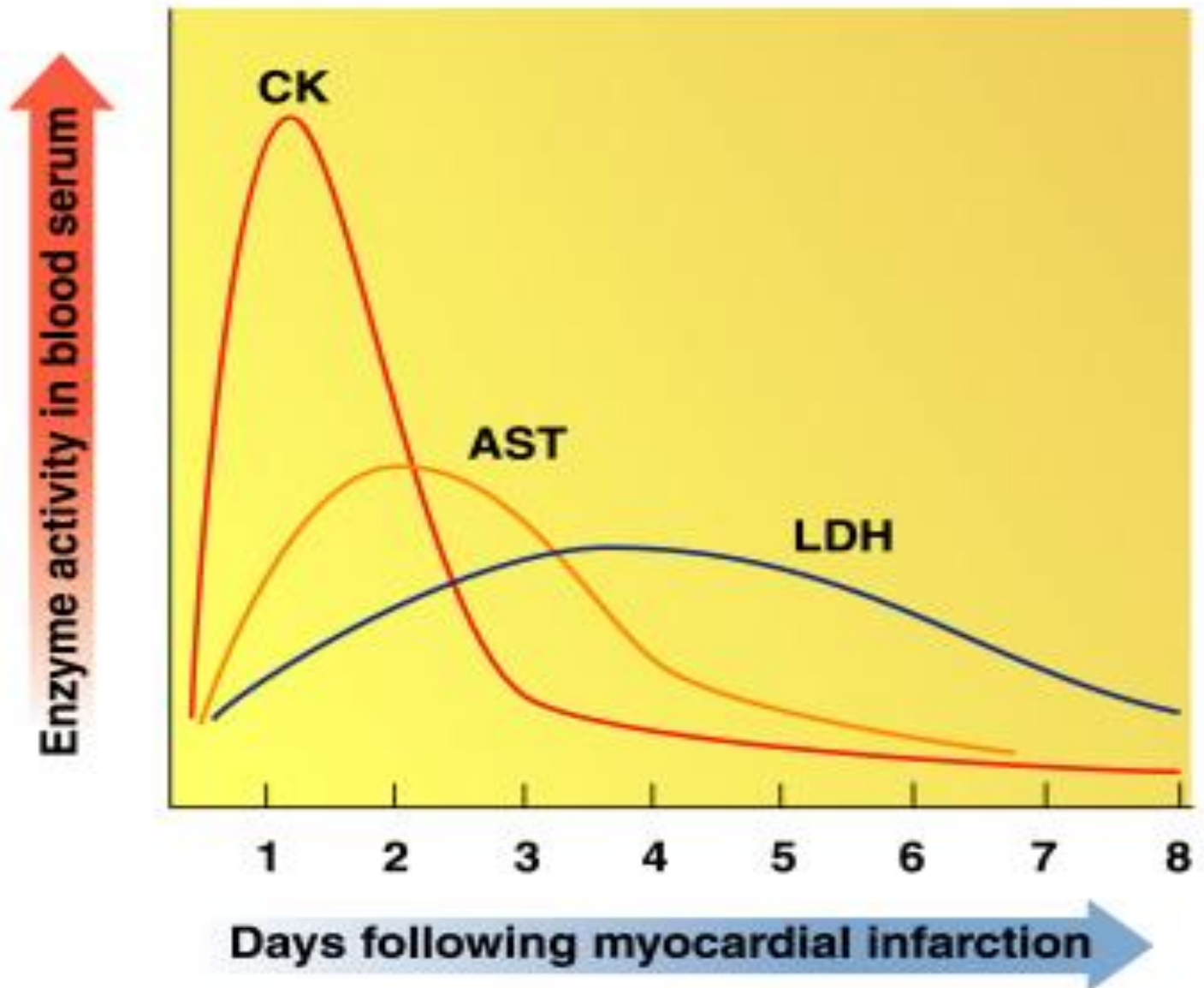


Table 21.4 Serum Enzymes Used in Diagnosis of Tissue Damage

Condition	Diagnostic Enzymes Elevated
Heart attack, or liver disease (cirrhosis, hepatitis)	Lactate dehydrogenase (LDH) Aspartate transaminase (AST)
Heart attack	Creatine kinase (CK)
Hepatitis	Alanine transaminase (ALT)
Liver (carcinoma) or bone disease (rickets)	Alkaline phosphatase (ALP)
Pancreatic disease lipase (LPS)	Amylase, cholinesterase
Prostate carcinoma	Acid phosphatase (ACP)

Sistemele polienzimaticice

- Fiecare celulă a organismului conține setul său specific de E.
- Unele se găsesc în toate celulele, altele sunt prezente doar în anumite celule sau anumite compartimente celulare.
- Funcția fiecărei E, nu este izolată, ci strins legată de funcția altor enzime.
- Astiel din E aparte se formeaza sisteme polienzimaticice sau conveiere.



Tipurile de organizare a sistemelor polienzimatice

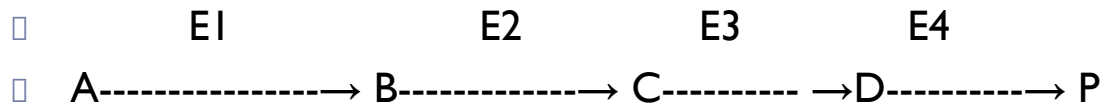
Se cunosc următoarele tipuri de organizare a sistemelor polienzimatice:

1. - funcțională,
2. - structural-funcțională
3. - mixtă.



Organizarea funcțională

- enzimele sunt asociate în sistemul polienzimatic cu ajutorul metaboliților, care difuzează de la o enzimă la alta.
- produsul reacției primei E servește drept S pentru E următoare etc.
- Ex.: glicoliza. Toate enzimele participante la glicoliza sunt în stare solubilă, legătura se face doar prin intermediarii metabolici.



Organizarea structural-funcțională

- E sunt fixate prin legături slabe pe o proteină “centrală”, care poate fi chiar una din E.
- Proteina centrală dispune de un “braț” care fixează S și îl duce la E1, care îl transformă în P1;
- P1 devine S2, brațul îl preia și îl duce la E2, care îl transformă în P2.
- Avantajul este că brațul duce de fiecare dată S la E corespunzătoare, potrivindu-l cu mare exactitate pe CA, ceea ce asigură în ansamblu o viteză mai mare decât cea corespunzătoare acțiunii E neasociate.



Organizarea structural-funcțională

- **Ex.- complexul polienzimatic piruvatdehidrogenazic**, constituit din 3 E și 5 Co
- **sintetaza acizilor grași** constituită din 7 E legate structural de PPA, care în ansamblu îndeplinesc funcția de sinteza a AG.
- E se pot aranja în lanț, fixându-se de MB.
Ex.enzimele LR, care participă la transferul de H^+ și e.



Tipul mixt de organizare

- reprezintă o îmbinare a ambelor tipuri de organizare, adică o parte din sistemul polienzimatic are organizare structurală, iar cealaltă parte - organizare funcțională.
- Ex.- ciclul Krebs, unde o parte din enzime sunt asociate în complex structural (complexul 2-oxoglutaratdehidrogenazic), iar altă parte se leagă funcțional prin metaboliții de legătură.



Unitățile de măsurare a activității E

1. **1 UI** – cantitatea de E care catalizează transformarea unui μmol de S într-un minut în condiții standard
2. **1 Cat (catal)** – cantitatea de E care catalizează transformarea unui mol de S într-o secundă în condiții standard ($1\text{U.I.} = 16,67 \text{ nkat}$)

Condițiile standard - pHul $\sim 7,0$; $t = 25^\circ\text{C}$;

$p = 1 \text{ atm}$;

C substratelor – 1 M.



□ **1 cat = 6 · 10⁷ UI**

□ **1 UI = 16.67 · 10⁻⁹ cat**



Unitățile de măsurare a activității E

- **Activitatea specifică** – reprezintă numărul de unități enzimatică per mg de protein-enzimă
- $AS = \text{Nr UI/mg proteină}$
- Este expresia purității unei enzime



Metodele de separare și purificare ale E

- 1. Dializă**
- 2. Salifiere**
- 3. Cromatografie**
- 4. Gel-filtrare**
- 5. Electroforeză**

**Cea mai eficientă –
cromatografia de afinitate**



Metodele de determinare a activității E

**Viteza reacției este proporțională
cu**

- 1. Viteza consumului substratului**
- 2. Viteza formării produsului**
- 3. Viteza transformării coenzimei**

**Cantitatea substanței respective
se determină colorimetric.**



Deosebirea privind componența enzimatică a organelor și țesuturilor.

Enzimele organospecifice.

Enzimele indicatorii – sunt localizate intracelular:
în citoplasmă (LDH, aldolaza),
în MC * glutamatdehidrogenaza),
în lizosomi (β -glucoronidaza, fosfataza alcalină).
Acestea E în normă în plasmă se găsesc în c% foarte mici.
La afecțiunile celulare activitatea acestor E în plasmă este brusc mărită.



INFARCTUL MIOCARDIC

CK (CK MB)

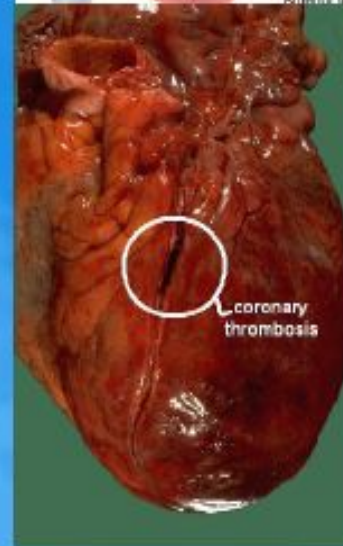
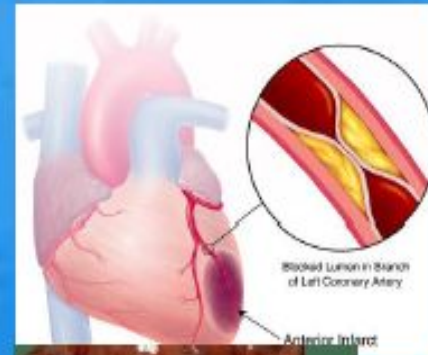
ASAT

LDH

Alți markeri de infarct

Troponina

Mioglobină



CPK total



șoc cardiogen cu hipoxie musculară
electroconversie
efort fizic intens
inj.i.m cu penicilină, xilină, diazepam
miopatii
hipotiroidism

CPK total > dublul valorilor superioare

CPK MB > 5% din totalul activității CPK

ASAT



boli musculare
boli hepatice
infarct pulmonar

LDH



anemia megaloblastică
anemiile hemolitice
boli musculare
stază hepatică

Utilizarea E în practica medicală

Preparatele farmaceutice contemporane sunt asociate și conțin ca regulă următoarele enzime:

- tripsină,
- chimotripsină,
- lipază,
- amilază,
- pancreatină,
- bromelaină,
- papaină,
- rutină (vit. P).



Utilizarea E în practica medicală

Efectele

exercitate de preparatele enzimaticice

- 1. De substituție (E digestive)**
- 2. Fibrinolitică și trombolitică**
- 3. Antiedematică**
- 4. Analgezică**
- 5. Antiinflamatoare**
- 6. Imunomodulatoare**



Terapia cu enzime

- Enzimele sunt agenți terapeutici unici ce produc efecte importante și specifice.
 - Motivele care au limitat folosirea largă a enzimelor ca medicație e:
 - - distribuție redusă în organism, dependența de dimensiuni, sarcina și de fenomenele de glicozilare (prin glicozilare proteinele sunt recunoscute de receptori și fixate în anumite locuri
 - - posibilitate mică de dirijare extrahepatică, ficatul avînd tendință de a capta și reține proteinele străine;
 - - inactivarea lor sub acțiunea proteazelor digestive în cazul administrării orale, iar proteazele tisulare le scurteaza de asemeni acțiunea;
 - - potentialul lor antigenic, anticorpii formați pot genera reacții de hipersensibilizare adesea grave și pot inactiva enzima.
-



Tehnici propuse pentru optimizarea proprietăților terapeutice ale enzimelor.

- prin **N-acilare** a fost crescută semiviata asparaginazei, folosită în leucemie
- metode de obținere a **enzimelor imobilizate**.

De ex. prin reticularea enzimei, ce conduce la agregate insolubile, prin adsorbție pe polimeri sintetici ori prin atașare covalentă, sau prin incorporare într-un gel în cursul polimerizării.

- Aceste preparate caștiga rezistența la enzimele proteolitice și sunt mai puțin imunoactive dar pot fi alterate proprietățile farmacocinetice.
- Asemenea avantaje au dovedit conjugatii cu polietilenglicol (PEG) ai arginazei, ai glutaminasparaginazei sau ribonucleaza, enzime cu efect antitumoral.



Tehnici propuse pentru optimizarea proprietăților terapeutice ale enzimelor.

- **incapsularea enzimelor in lipozomi** - microsferă cu membrana bistratificată lipido- proteică, in hematii umane sau in alti transportori celulari.
- Noile forme obținute prezintă un potențial de țintire tisulară.
- De ex. in cazul unor boli genetice cauzate de deficitul unor enzime lizozomale se impune o terapie de substituție, enzima trebuind țintit direct in lizozomi.

