

*VIŠI NIVOI ORGANIZACIJE
ENZIMSKIH AKTIVNOSTI*

VIŠI NIVOI ORGANIZACIJE: MULTIENZIMSKI KOMPLEKSI

- Enzimi uključeni u metaboličke procese koji su u sekvenci, ili složene biohemijске procese su često organizovani u fizičke agregate:

Primeri:

- triptofan sintetaza,
- sintetaza masnih kiselina,
- primozom
- ribozomi.



Multienzimski kompleksi

- Nekovalntno asosovana grupa enzima koji katalizuju različite faze nekog metaboličkog puta/procesa
- reaktanti se kanališu od jednog enzima ka drugom bez odlaska u okolini rastvarač - povećana efikasnost puta i minimiziraju se sporedne reakcije
- u većini multienzimskih sistema prvi enzim u sekvenci je regulatorni enzim - sprečava se nepotreban utrošak energije i metabolita

Multienzim – protein koji poseduje više od jedne katalitičke funkcije koje vrše različiti delovi polipeptidnog lanca (domeni) ili različite subjedinice, ili oboje.

Multienzimski kompleks - multienzim sa katalitičkim domenima na više od jednog tipa polipeptidnog lanca.

Multienzimski polipeptid - polipeptidni lanac koji sadrži najmanje dva tipa katalitičkih domena.

Katalitički domen – bilo koji deo polipeptidnog lanca koji poseduje katalitičku funkciju; može sadržati jedan ili više strukturnih domena

Multienzimski polipeptid

1. Katalitičke funkcije mogu se nazvati autonomne usled različitih domena
2. Multienzimski polipeptidi sami mogu biti komponente multienzimskih kompleksa
3. Kriterijumi za multienzimski polipeptid:
 - a) Isključuju jedan enzim koji može da katalizuje različite reakcije koristeći isti katalitički centar
 - b) Isključuju regulatorne ligand-vezujuće domene , jer po definiciji moraju imati multiple katalitičke funkcije
 - c) Dva ili više katalitičkih domene moraju biti na jednom polipeptidu

Metode:

- obeležavanje aktivnog mesta,
- SDS PAGE,
- limitirana proteoliza – kod većine su domeni spojeni linker regionima koji su osetljivi na proteaze,
- dokaz da jedan gen kodira nekoliko autonomnih funkcionalnih domena

Nomenklatura

- Katalitički domeni – A,B,C...
- Regulatorni domeni - a,b,c...
- Domeni nepoznate funkcije - x,y,z....
- Multikatalitički polipeptid – (ABC)
- Multienzimski kompleks – (A)(B)(C)

Primeri:

Sisarska aldolaza – (A)4

Triptofan sintetaza iz E.Coli – (A)₂(B)₂

AROM multienzimski polipeptid iz Neurospora crassa - (ABCDE)₂ (tj. enzimi EC 4.6.1.3, EC 4.2.1.10. EC 1.1.1.25, EC 2.7.1.71 i EC 2.5.1.19.)



ZAŠTO MULTIZIMSKI KOMPLEKSI?

- Poboljšana kataliza: smanjuje se vreme difuzije intermedijera u povezanim procesima od jednog do drugog enzima
- Kanalisanje supstrata: usmeravanje supstrata specifičnom enzimu, sprečavanje kompeticije sa ostalim enzimima u rastvoru
- Zaštita hemijski reaktivnih intermedijera od izlaganja vodenoj sredini
- Servis (u slučaju piruvat dehidrogenaze, jedna podjedinica može da prosledi reagens ostalim različitim subjedinicama)
- Koordinisana regulacija
- Koordinisana ekspresija



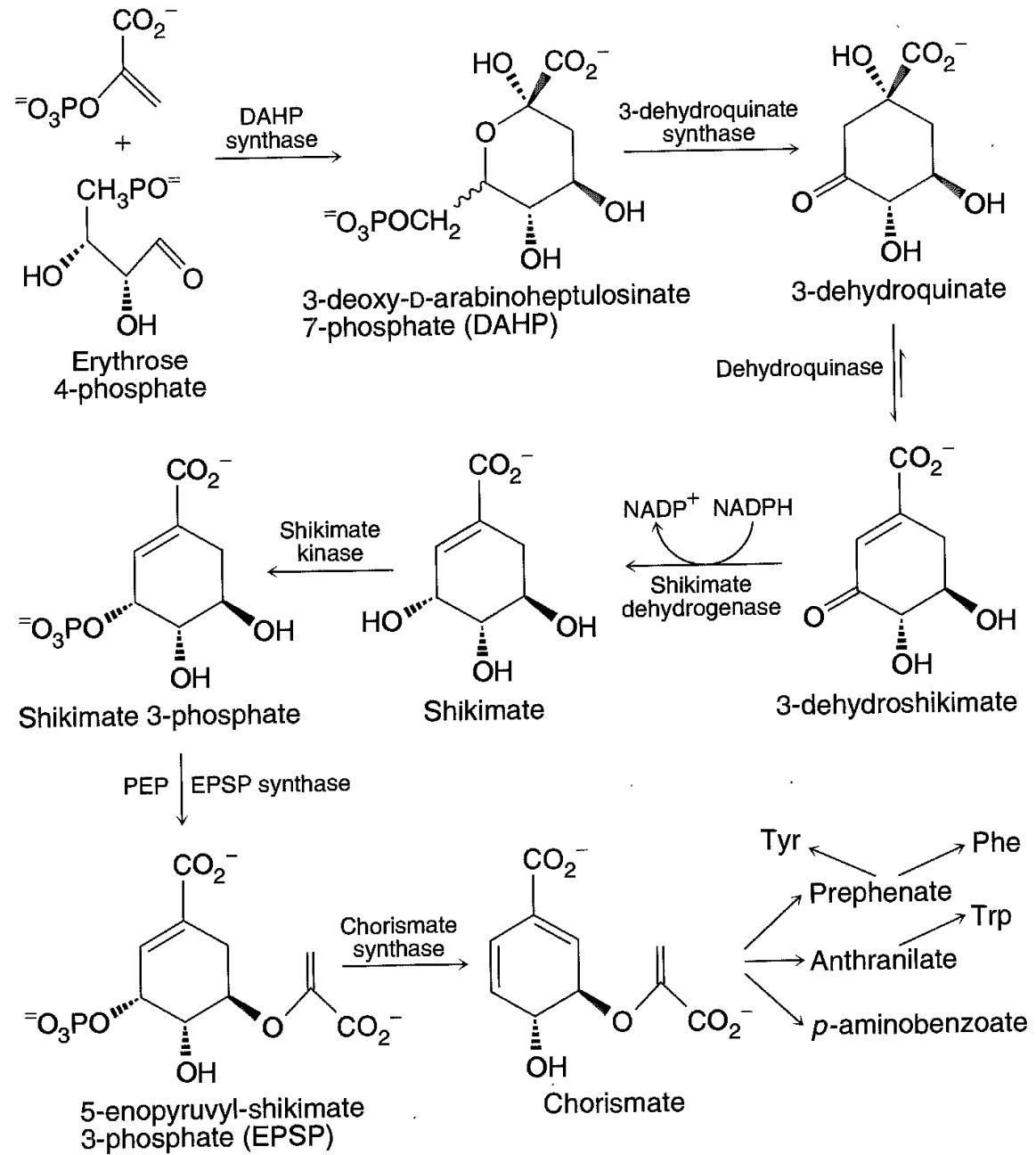
ENZIMI SA VIŠE AKTIVNIH CENTARA

- Arom kompleks (šikamat mehanizam biosinteze aromatičnih jedinjenja)

<i>E. coli, B. subtilis, S. typhimurium</i>	<i>S. cerevisiae, N. crassa</i>
5 monofunkcionalnih enzima 5 različitih gena	5 aktivnih centara u jednom polipeptidnom nizu 1 gen (arom gen) nastao fuzijom više gena



Phosphoenol pyruvate



AROM kompleks

S. cerevisiae, N. crassa - dimer od dva **pentafunkcionalna polipeptida** koji sadrži enzime koji katalizuju pet sekvenčijalnih reakcija šikimatnog puta (biosinteza aromatičnih proizvoda)

E. Coli, B. subtilis, S. typhimurium - **5 monofunkcionalnih enzima**

1. 3-dehidrokinat sintaza synthase (DHQS); EC=[4.2.3.4](#)

3-deoksi-D-arabino-hept-2-ulosonate 7- fosfat = 3-dehidrokinat + fosfat

2. 3-fosfošikimat 1-karboksivinil transferaza (5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza, EPSPS); EC=[2.5.1.19](#)

3-dehidrokinat = 3-dehidrošikimat + H₂O

3. Šikimat kinaza (SK); EC=[2.7.1.71](#)

3-dehidrošikimat + NADPH = Šikimat + NADP⁺.

4. 3-dehidrokinat dehidrataza (3-dehidrokinaza); EC=[4.2.1.10](#)

ATP + šikimat = ADP + šikimat 3- fosfat

5. Šikimat dehidrogenaza; EC=[1.1.1.25](#)

Fosfoenolpiruvat + 3-fosfošikimat = fosfat + 5-O-(1-karboksivinil)- 3-fosfošikimat



Indol-3-glicerol fosfat-sintaza /fosforibozil antranilat izomeraza (E.coli)

TrpC - bifunkcionalni enzim koji katalizuje 2 koraka u sintezi triptofana

- Fosforibozil antranilat izomerazna aktivnost katalizuje Amadori premeštanje supstrata u karboksifenil aminodeoksi ribloza fosfat
- Indol-glicerol-fosfat-sintazna aktivnost katalizuje zatvaranje prstena ovog proizvoda dajući indol-3-glicerol fosfat

Dva različita domena – dva aktivna mesta su orijentisana na suprotnim starnama i tako sprečavaju direktni transfer karboksifenil aminodeoksi ribloza fosfata.

Aktivnost dva različita monomerna monofunkcionalna konstituenta je ista kao u kovalentnom kompleksu – u ovom slučaju nema katalitičke prednosti fuziranih proteina!

Izolovani sintazni domen je nestabilan ukazujući da domeni stabilišu jedan drugog

Peroksizomalni bifunkcionalni enzim (PBE, *Homo sapiens*)

Monomer sa 2 domena, učestvuje u oksidaciji masnih kiselina u peroksizomima:

- Enoil-CoA hidrataza/3,2-trans-enoil-CoA izomeraze; EC=[4.2.1.17](#) (liaza)/
EC=[5.3.3.8](#) (izomeraza)
- 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; EC=[1.1.1.35](#) (oksidoreduktaza)



Ciklosporin sintetaza

Ciklosporin sintetaza je multifunkcionalni enzim koji sintetiše ciklosporin A (ciklični undekapeptid) neribozomski počevši od aminokiselina

- jedan jedini polipeptidni lanac od 1600 kDa koji katalizuje najmanje 40 reakcionalih koraka !
- Sadrži 11 homologih sekvencionalnih modula za prepoznavanje, aktivaciju i modifikaciju jednog specifičnog supstrata (aminokiseline) i 1 modul za ciklizaciju

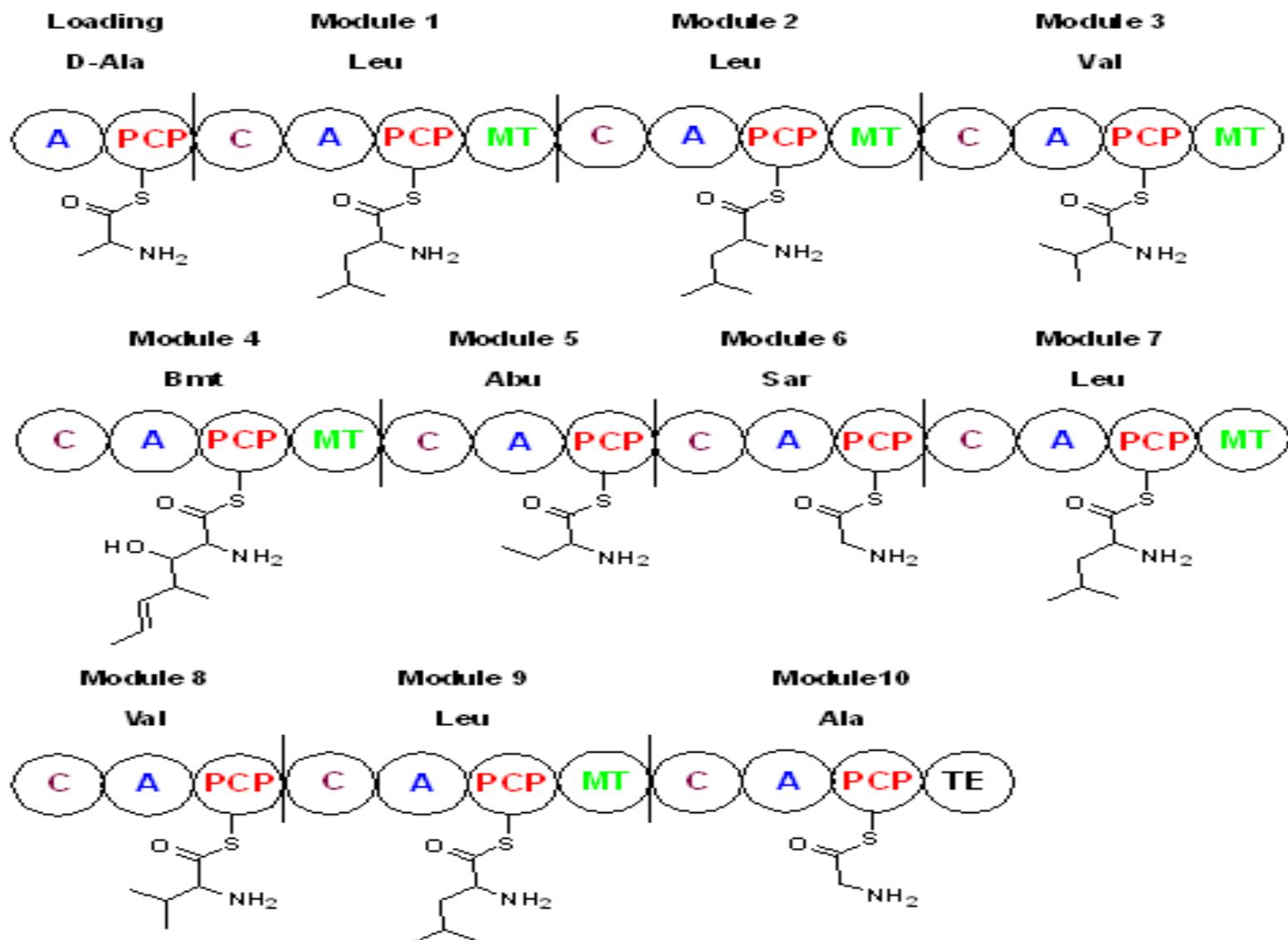
Svaki modul poseduje:

- Adenilacioni domen (A-domain; prepoznavanje, aktivacija),
- Tiolacioni domen (T-domain; kovalentno vezivanje adenilovane aminokiseline na 4-fosfopanteteinsku prostetičnu grupu)
- Kondenzacioni domen (C-domain; elongacioni korak)
- Sedam modula imaju i metiltransferazni domen (M-domain; N-metilacija 7 tioestarski vezanih aminokiselina uz S-adenozil metionin kao donor).

Svi domeni jednog modula su blizu jedan drugom



Sinteza ciklospirina tiotemplatnim mehanizmom



ENZIMI SA VIŠE AKTIVNIH CENTARA - NEKOVALENTNA ASOCIJACIJA RAZLIČITIH AKTIVNOSTI

- Triptofan sintaza, $\alpha_2\beta_2$ tetramer i nalazi se u okviru triptofanskog operona - katalizuje 2 koraka u sintezi triptofana
- kodiran sa 2 gena trpA i trpB:
 - TrpA - aldolno cepanje indol-3-glicerol fosfata do indola i gliceraldehid-3-fosfata
 - TrpB – sinteza L-Trp od indola (koji je kanalisan sa TrpA) i L-Ser

Indol-3-glicerol fosfat + serin -----> Trp + gliceraldehid-3-fosfat ($\alpha_2\beta_2$)

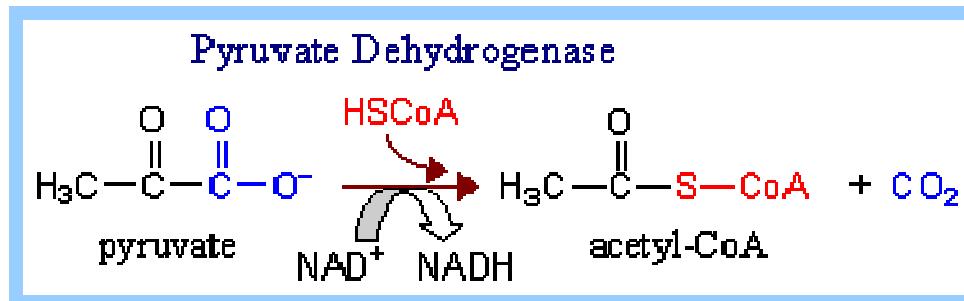
Indol-3-glicerol fosfat -----> indol + gliceraldehid-3-fosfat (α)
indol + serin -----> Trp + gliceraldehid-3-fosfat ($\alpha_2\beta_2$)

- Podjedinice u kompleksu su povezane 25-30 Å dugačkim tunelom - intermedijer indol se ne oslobađa već se tunelom prenosi direktno na sledeću subjedinicu
- Dva nezavisna α/β mesta na kojima paralelno teku reakcije



Kompleks piruvat dehidrogenaze

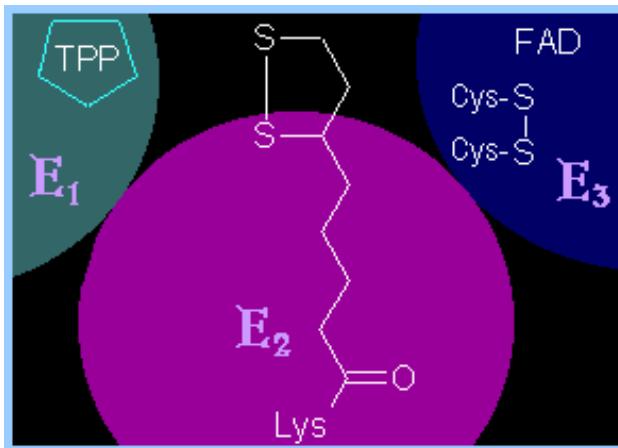
Multienzimski kompleks – konverzija piruvata i CoA do acetilCoA



4 faze katalizovane sa 3 enzima:

- **E1** (piruvat dehidrogenaza) – dekarboksilacija piruvata, uz tiamin pirofosfat kao koenzim, α_2 dimer
- **E2** (dihidrolipoil transacetilaza) – oksidacija acetil jedinice koje se prenosi na lipoamidnu prostetičnu grupu enzima dajući acetolipoamidnu grupu; transfer acetil grupe sa lipoamida na CoA dajući acetilCoA; α_2 dimer
- **E3** (dihidrolipoil dehidrogenaza)- regeneracija oksidovane forme lipoamida, uz FAD prostetičnu grupu

Lipoamid sa E2 reaguje sa hidroksietil-TPP sa E1, a dihidrolipoamid sa E2 posle reaguje sa E3 – brzina interakcija se povećava zahvaljujući blizini sva tri enzima i dugačkoj fleksibilnoj ručici lipoamidne grupe (14 Å)



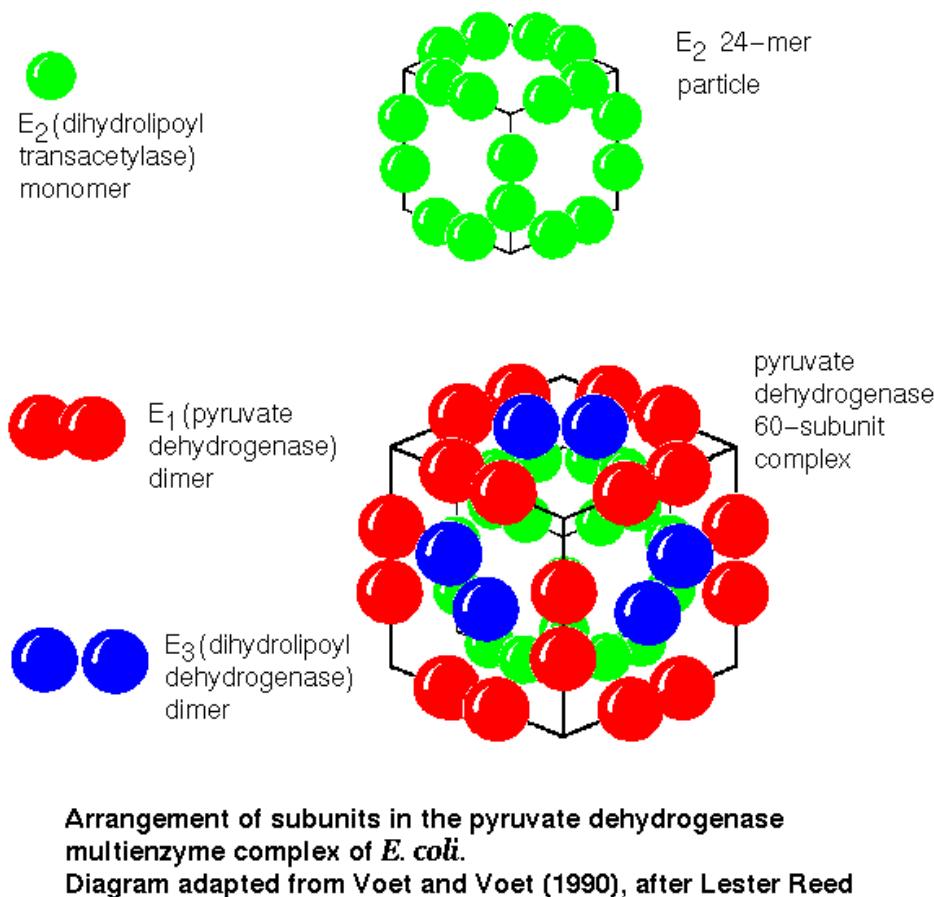
Enzim		Prosteticna grupa
Piruvat dehidrogenaza (a2)	E1	Tiamin pirofosfat TPP
Dihidrolipoil transacetilaza	E2	Lipoamid
Dihidrolipoil dehidrogenaza (a2)	E3	FAD

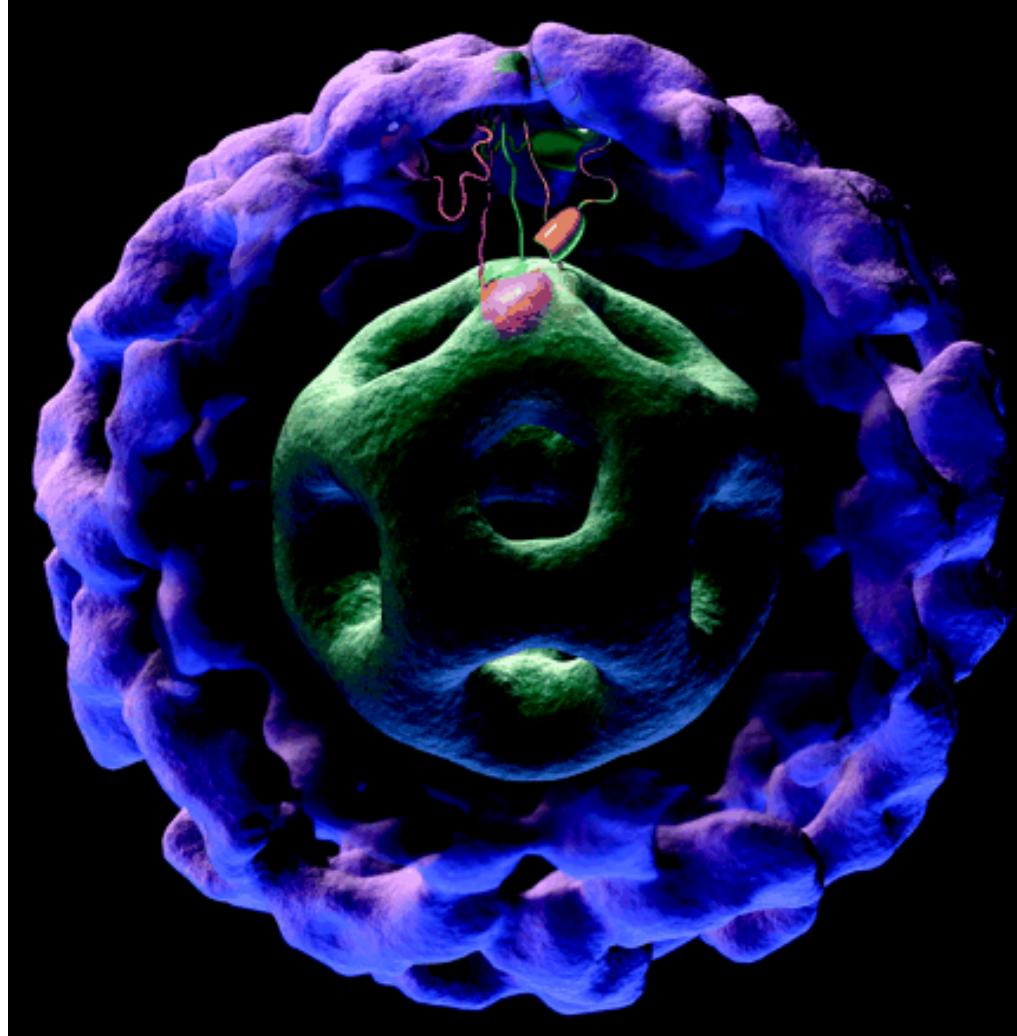
Struktura kompleksa

E2 - homo 24-mer sa kubnom simetrijom

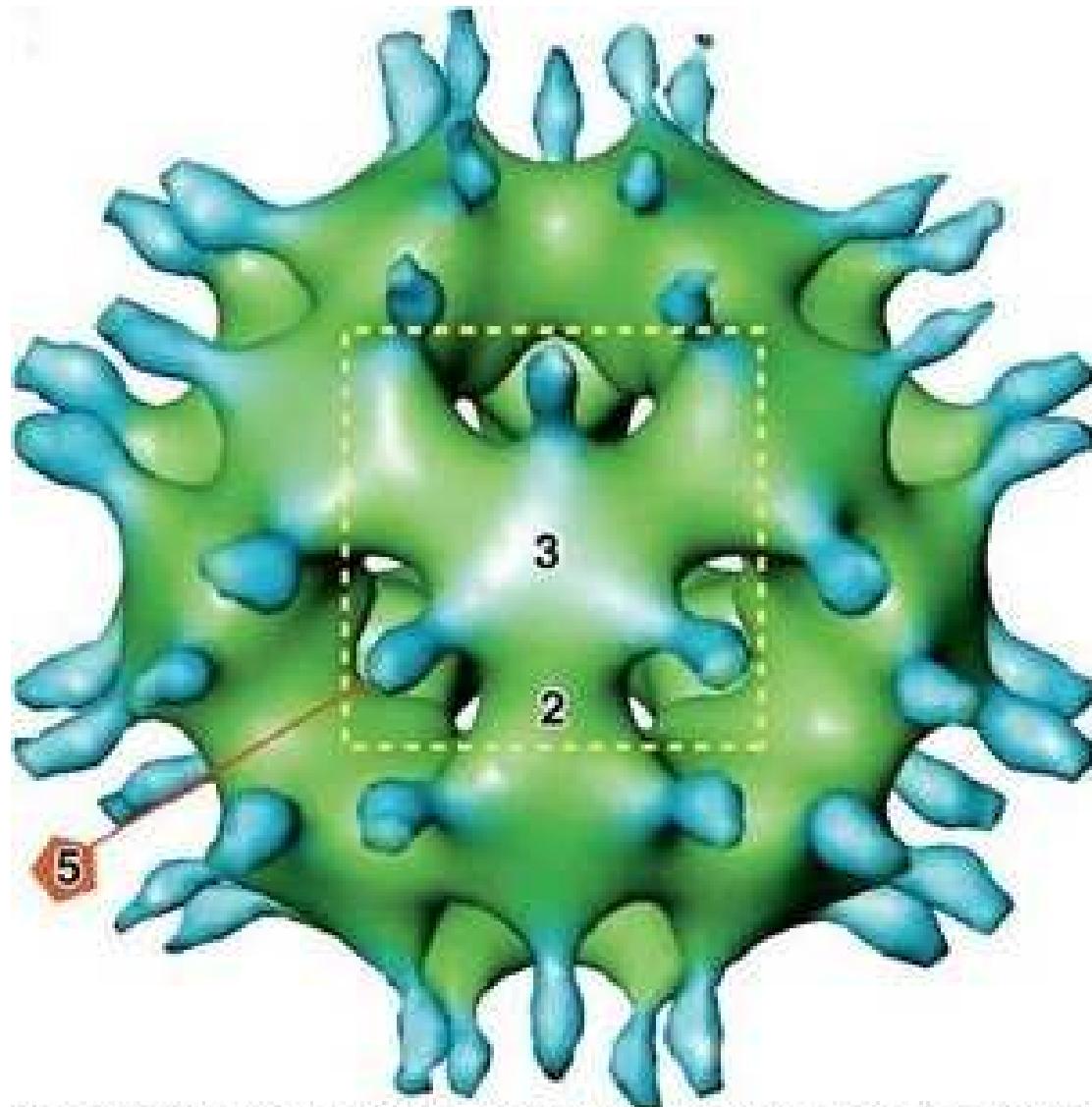
E1 i **E3** – dimeri

Kompleks - kubni aranžman u kome je svaki E3 dimer asosovan na svakoj stranici, dok je E1 dimer je pozicioniran na svakoj ivici kocke

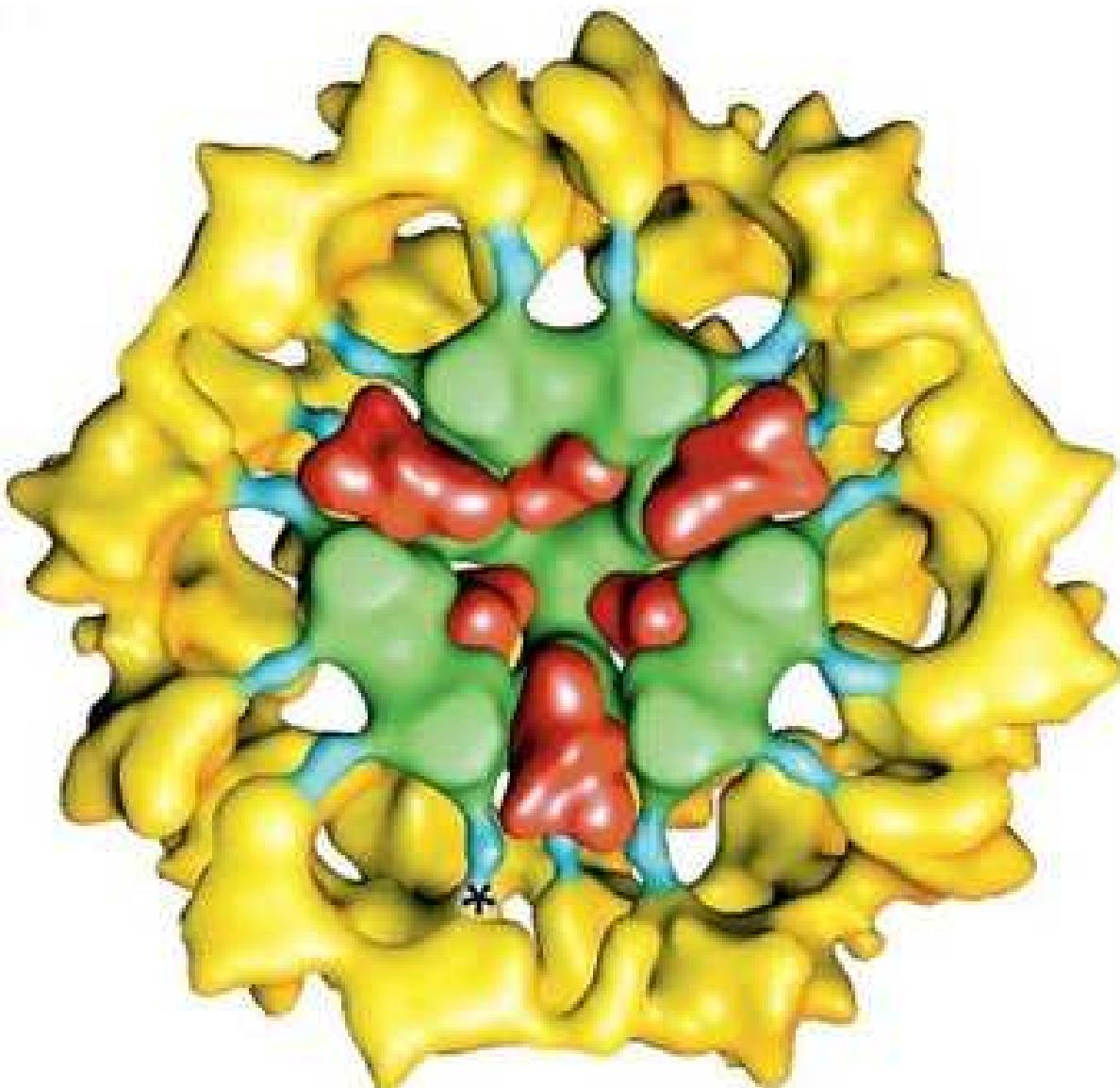




- Sectioned schematic view of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex based on electron cryo-microscopic analysis of an E1E2 sub-complex from *B.stearothermophilus*. Three of the 60 E2 molecules (colored red, green and yellow) are highlighted. The movement of the swinging E2 lipoyl domain in the annular region between the inner core (cyan) of E2 molecules and the outer shell of E1 molecules (purple) is proposed to be a critical feature underlying active site coupling in the complex.



The inner core consists of 60 E2 enzymes arranged in the shape of a pentagonal dodecahedron with one E2 trimer at each of the 20 vertices. A single trimer is outlined by a yellow box. The center of the pentagon shape is indicated by the red pentagon. Note the linker regions projecting upward from the surface of the core structure.

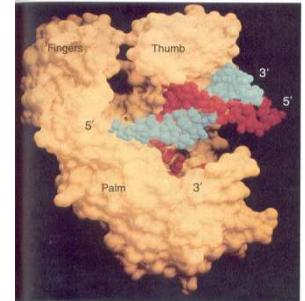


Cationy view of the complete complex showing the outer E1 enzymes (yellow) and the EP-E3 enzymes (red) located in the space between the E2 enzymes of the inner core. [from Zhou, H.Z. et al. (2001) The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 98, 14072-14077.]

with its carboxy-terminal large domain containing the polymerase but not the 3' to 5' exonuclease function [[Freemont86](#)]. The Klenow domain also contains a "thumb" structure that is required for DNA binding, processivity and frameshifts and a J-helix region that regulates both the polymerase and 3' to 5' exonuclease functions [[Minnick96](#) , [Tuske00](#) , [Singh05b](#)]. The Klenow portion undergoes conformational changes on binding template, then again on the subsequent binding of dNTPs [[Dzantiev00](#)].



MULTIFUNKCIONALNI ENZIMI – DNK POLIMERAZE



Multifunkcionalni enzim Pol I :

- DNK polimeraza I E. coli (928 a.k.)
- 324-518 polimerizacija lanca DNK
- 1-320 5'->3' egzonukleazna aktivnost
- 520-928 3'->5' egzonukleazna aktivnost (proofreading egzonukleaza)

Veći domen (Klenov fragment) - polimerazna i 3' → 5' egzonukleazna (proofreading) aktivnost

Manji domen - 5' → 3' egzonukleazna aktivnost

Klenov domen poseduje mali i veliki subdomen – veliki subdomen sadrži polimeraznu aktivnost

- DNK polimeraza (reverzna transkriptaza) HIV virusa, ima i ribonukleazni domen kojim iz DNK-RNK hibrida uklanja RNK tokom procesa replikacije RNK genoma virusa.

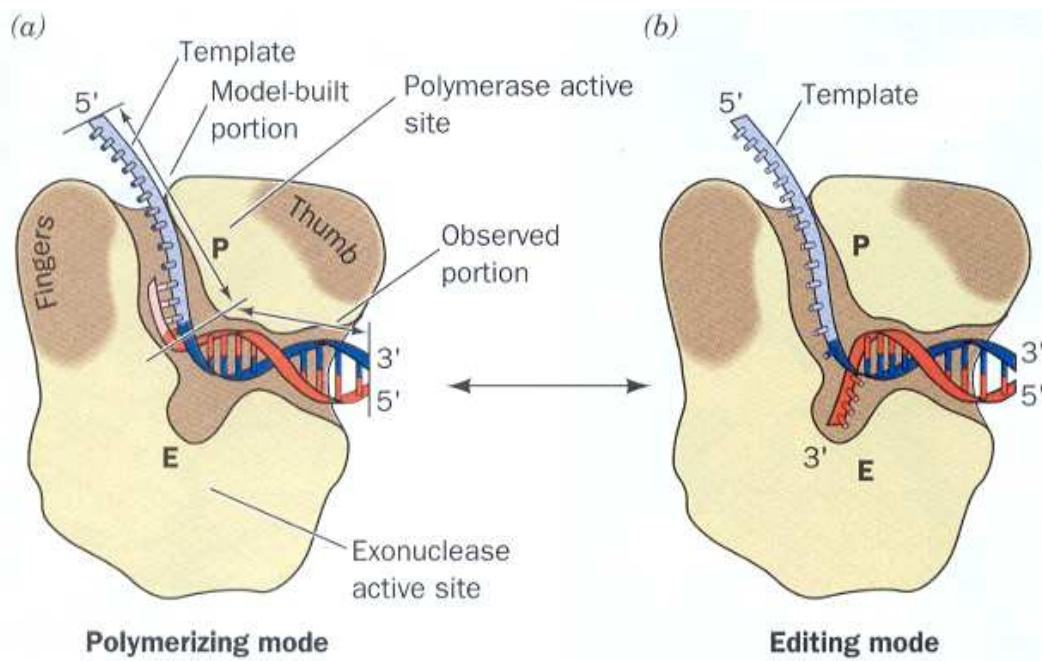
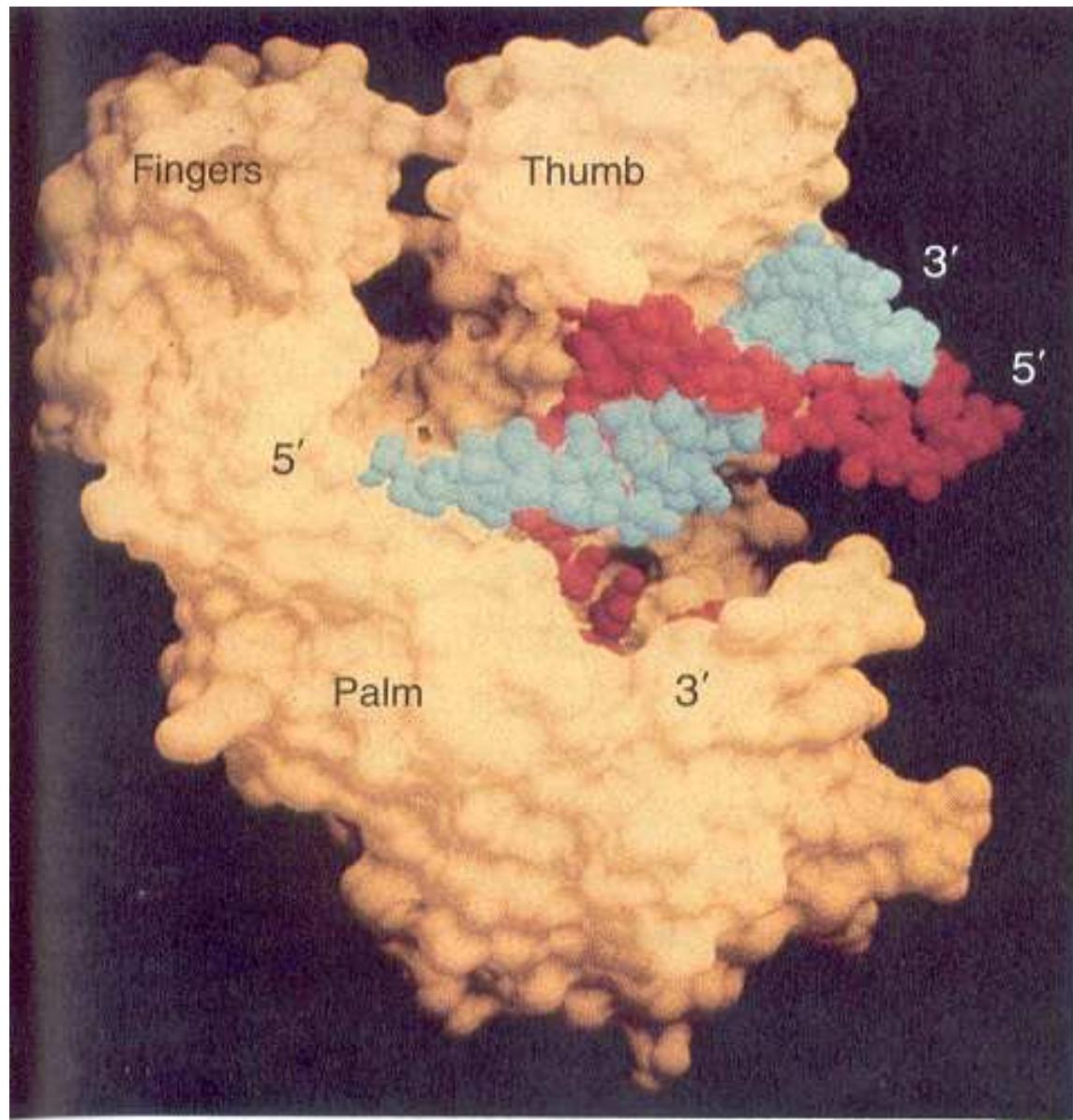


FIGURE 31-12. A schematic model of Klenow fragment with DNA binding to (a) the polymerase active site; and (b) the $3' \rightarrow 5'$ exonuclease active site. The template strand is blue and the primer strand is red with that portion of the DNA that is observed in the crystal structure in darker shades than the portion that was modeled. The $3'$ terminus of the primer strand can shuttle between the polymerase active site (P) and the

$3' \rightarrow 5'$ exonuclease site (E) without dissociating from the enzyme. Any factor that destabilizes double-stranded DNA, such as a mismatched base pair, favors the editing complex and hence promotes excision of the primer strand's $3'$ nucleotide. [After Beese, L.S., Derbyshire, V., and Steitz, T.A., *Science* **260**, 354 (1993).]



Veštački multifunkcionalni enzimi

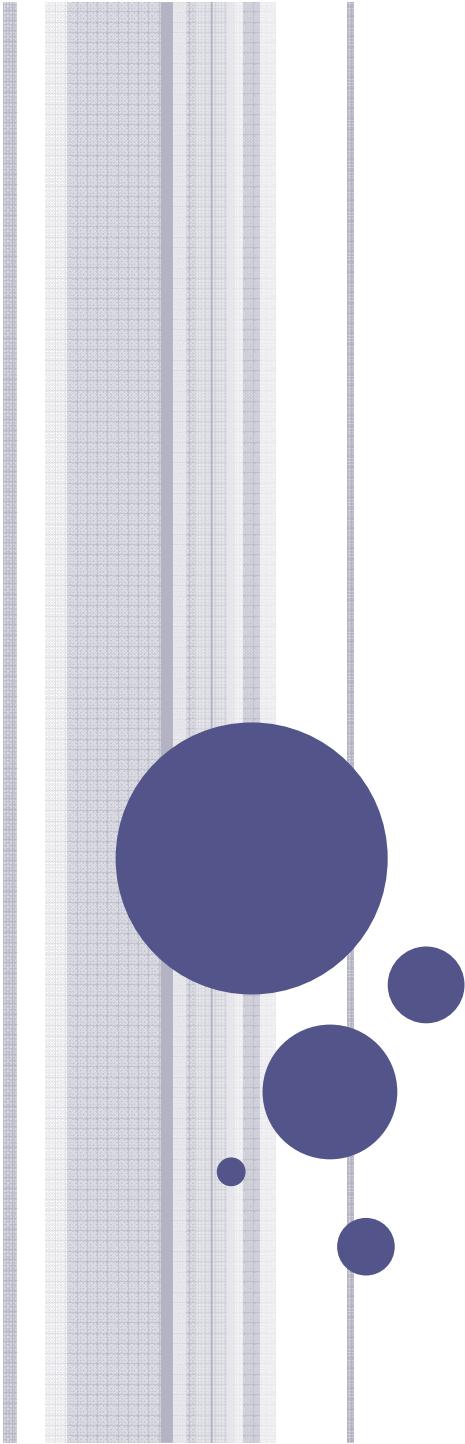
Konstrukcija himera fuzijom domena različitih katalitičkih aktivnosti, najčešće preko fleksibilnog peptidnog linkera

Primeri:

1. Himera sa funkcijom galaktoza dehidrogenaze (iz *Pseudomonas fluorescens*)/ laktat dehidrogenaze (iz *Bacillus stearothermophilus*)
- Kontinualna produkcija laktata bez eksternog dodavanja NADH (recikluje NAD)

2. Ksilan degradirajući enzim – fuziranjem ksilanaznog domena ksilanaze sa bifunkcionalnim enzimom arabinofuranozidaza/ksilozidaza
Pored aktivnosti ksilanaze, arabinofuranozidaze i ksilozidaze, himera je zadobila i aktivnost endoglukanaze, koju ima ksilazni domen !





KONFORMACIONA PROMENA, KOOPERATIVNOST, ALOSTERNA REGULACIJA & MOTORNI PROTEINI

Regulacija metaboličkih puteva

- **Kontrola koncentracije enzima-dostupnost enzima:**

- indukcija/represija sinteze,
- kompartmentalizacija,
- aktivacija zimogena kovalentnom modifikacijom

- **Kontrola aktivnosti enzima –konformacione i strukturne promene:**

- vezivanje alosternog efektora,
- kovalentna modifikacija -fosforilacija/defosforilacija hidroksilnih grupa ostataka (fosfataze, kinaze)

Fosforilacija je jako zgodna:

- fosforil grupa je velika – sterna repulzija, elektrostatiči efekti, pravi mrežu vodoničnih veza,
- same kinaze i fosforilaze mogu biti regulisane



REGULACIJA ENZIMSKE AKTIVNOSTI

Konformaciona promena za :

- Kontrolu aktivnosti regulatornih proteina
- Interkonverziju mehaničkog rada i slobodne energije

○ Regulatorni enzimi

- Prvi enzim u sekvenci
- Enzimi koji katalizuju reakcije pre metaboličkog grana
- Enzimi koji katalizuju najsporiju reakciju na metaboličkom putu
- Odgovaraju sa izuzetnom osjetljivošću na promene u koncentracijama metabolita na način koji se ne podvrgava MM kinetici



Aktivnost većine enzima je regulisana koncentracijom svojih supstrata na MM način

Međutim takva kontrola nije dovoljna za neke metaboličke svrhe

Za povećanje brzine sa $0.1 V$ na $0.9V$ neophodno je povećati S sa $Km/9$ na $9 Km$ (povećanje od 81 put)

Međutim, koncentracija metabolita in vivo varira unutar uskog opsega, a aktivnost specifičnog enzima mora varirati unutar širokog opsega

Zato, pored MM kinetike neophodni su dodatni kontrolni mehanizmi za regulacijuenzimske aktivnosti in vivo



Kontrola aktivnosti enzima

Dva tipa fenomena su odgovorna za regulatorne osobine:

-**kooperativnost** - prividna promena u afinitetu ili aktivnosti enzima/proteina ka supstratu/ligandu kako se menja koncentracija liganda (enzim/protein sastoji od interagujućih subjedinica)

- **alosterija** - vezivanje supstrata /liganda na mestu koje nije supstrat-vezujuće/aktivno mesto a utiče na aktivnost/vezivanje enzima/proteina

Alosterni enzimi:

– monomerni

-multimerni - vezivna mesta ne moraju da budu na istoj podjedinici! (katalitička i regulatorna podjedinica)

Alosterna regulacija - vezivanjem malog molekula (**alosterni modulator** ili **alosterni efektor**)

- **Pozitivni** efekat – aktivacija (stimulacija) enzima
- **Negativni** – inhibicija enzima

-**Homotropni** efekat - alosterni efekat produkuje sam supstrat

- **Heterotropni** efekat - alosterni efekat indukovani metabolitima koji su strukturno različiti od supstrata



KINETIKA I KOOPERATIVNOST

- Kinetika alosternih enzima nije MM tipa
- Sigmoidna zavisnost $v=f(S)$ ukazuje na kooperativne interakcije izmedju podjedinica enzima

Važno: sve jednačine brzina i vezivanja za kooperativne i alosterne enzime su izvedene pod pretpostavkom brzog uspostavljanja ravnoteže (rapid equilibrium)



Alosterija

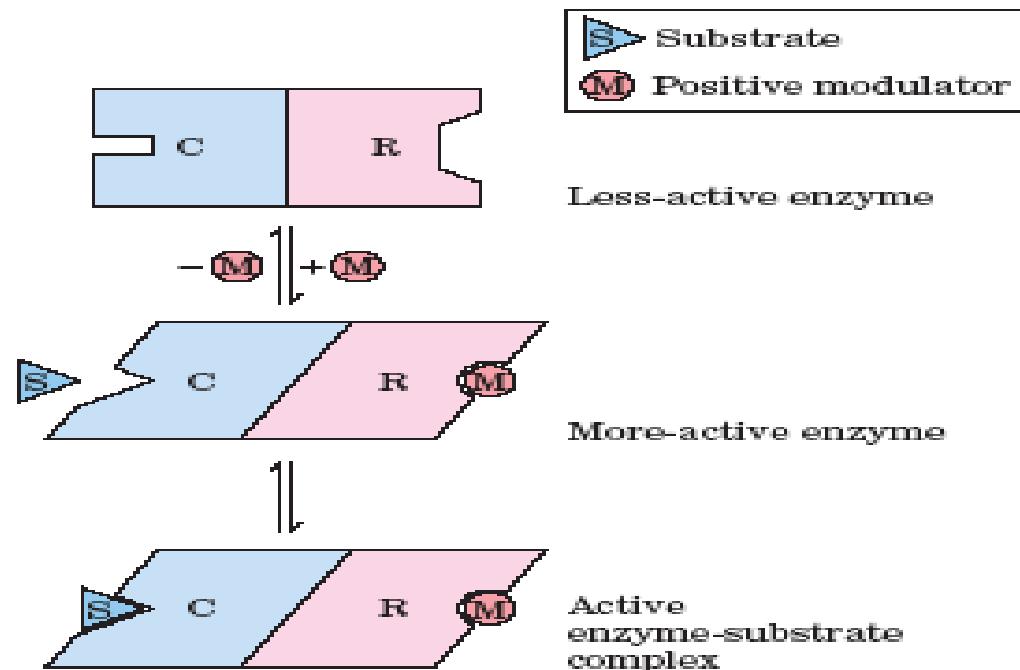
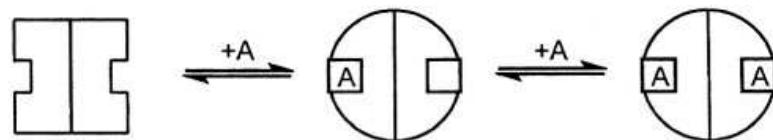
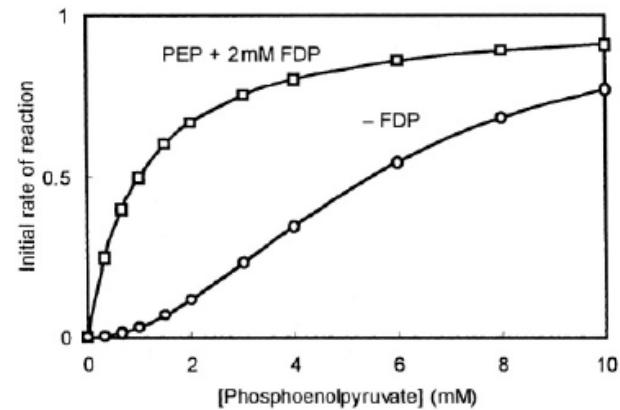


FIGURE 6–26 Subunit interactions in an allosteric enzyme, and interactions with inhibitors and activators. In many allosteric enzymes the substrate binding site and the modulator binding site(s) are on different subunits, the catalytic (C) and regulatory (R) subunits, respectively. Binding of the positive (stimulatory) modulator (M) to its specific site on the regulatory subunit is communicated to the catalytic subunit through a conformational change. This change renders the catalytic subunit active and capable of binding the substrate (S) with higher affinity. On dissociation of the modulator from the regulatory subunit, the enzyme reverts to its inactive or less active form.

LDH iz srca – kooperativnost i alosterija



- Vezivanje prvog supstrata indukuje konformacionu promenu celog dimernog molekula I povećave njegov afinitet za drugi supstrat – kooperativnost, sigmoida
- Sigmoidna kinetika se ukida prisustvom FDP – alosterija, hiperbola

Aspartat transkarbamoilaza

Karbamoil fosfat + aspartat -----> N-karbamoil aspartat + fosfat

C_6R_6 - 2 seta C_3 u kompleksu sa 3 seta R_2

- ◆ Heterotropno inhibirana CTP-om – kad se CTP utroši i ćelijski CTP pul opadne, on disosuje sa enzima i deinhibira ga
- ◆ Heterotropno aktivirana ATP-om – kad je koncentracija ATP veća od CTP enzim se aktivira da sintetiše pirimidine i obrnuto (koordinisana sinteza purina i pirimidina)

Disosovane katalitičke subjedinicezadržavaju katalitičku aktivnost, ali nemaju kooperativnost i neosetljive su na CTP i ATP



ASPARTAT TRANSKARBAMOILAZA

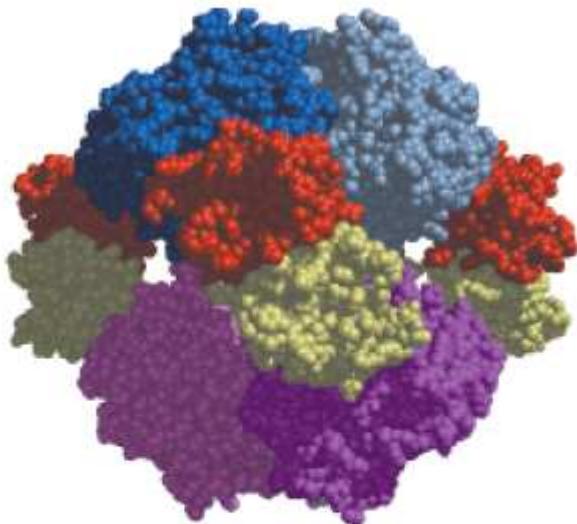
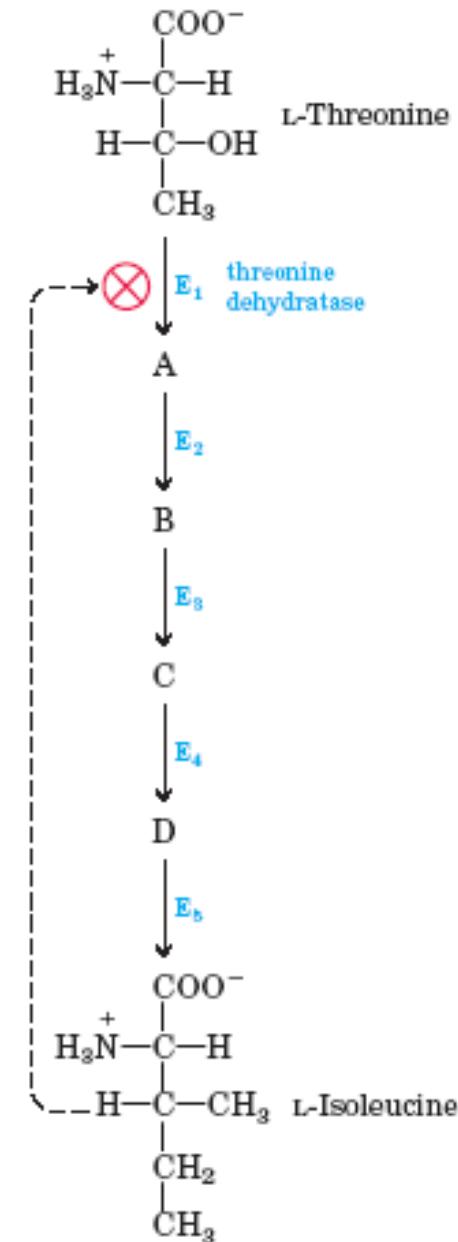


FIGURE 6-27 Two views of the regulatory enzyme aspartate transcarbamoylase. (Derived from PDB ID 2AT2.) This allosteric regulatory enzyme has two stacked catalytic clusters, each with three catalytic polypeptide chains (in shades of blue and purple), and three regulatory clusters, each with two regulatory polypeptide chains (in red and yellow). The regulatory clusters form the points of a triangle surrounding the catalytic subunits. Binding sites for allosteric modulators are on the regulatory subunits. Modulator binding produces large changes in enzyme conformation and activity. The role of this enzyme in nucleo-



FEEDBACK INHIBICIJA

- Heterotropna alosterna inhibicija treonin dehidrataze krajnjim proizvodom metaboličkog puta konverzije treonina u izoleucin (Ile)
- Nekovalentno i reverzibilno vezivanje alosternog modulatora (Ile)
- Specifično vezivanje



Nekooperativno vezivanje



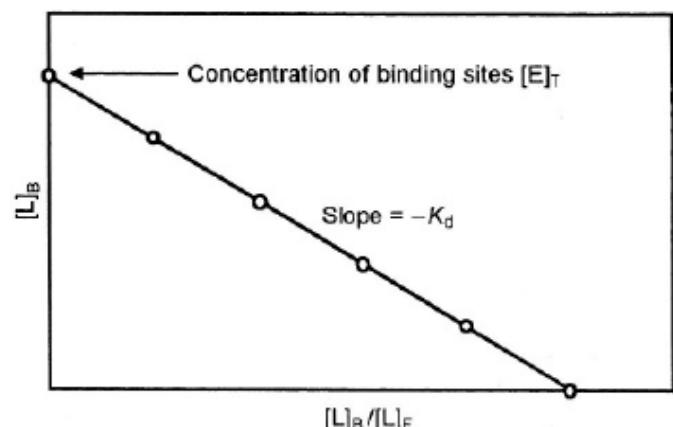
$$K_d = \frac{[E]_F \cdot [L]_F}{[EL]} \quad K_a = \frac{[EL]}{[E]_F \cdot [L]_F}$$

Kad je sistem u ravnoteži neto koncentracije svake od tri komponente se ne menjaju - dinamička ravnoteža

Određivanja Kd - Skačardova analiza

Meri koncentraciju slobodnog ili vezanog liganda zahvaljujući razlici u molekularnim osobinama slobodnog i vezanog za protein.

Rastvor protein se titruje ligandom pri čemu je poznata ukupna koncentracija dodatog liganda



$$[L]_T = [L]_B + [L]_F \quad K_d = \frac{[E]_F \cdot [L]_F}{[L]_B}$$

$$[L]_B = [L]_T - [L]_F \quad \text{and} \quad [E]_F = [E]_T - [L]_B$$

$$[L]_B = [E]_T - K_d \frac{[L]_B}{[L]_F}$$



Kooperativno vezivanje - vezivanje kiseonika za Hb

Krive vezivanja liganda:

- Sigmoidna – kooperativno vezivanje, multipla vezujuća mesta (Hb)
- Hiperbolična – MM jednačina, jedno vezujuće mesto (Mb)

Sa zasićenjem raste afinitet – afinitet vezivanja 4. Molekula O₂ je nekoliko stotina puta veći od afiniteta vezivanja 1. molekula O₂

Ovo se ne može objasniti sa postojanjem 4 neinteragujuća mesta različitih afiniteta – u tom slučaju prvo bi se zasitila visoko-afinitetna mesta, pa bi delimično okupirani molekuli Hb imali niži afinitet od deoxyHb.

Stoga, povećanje afiniteta sa povećanjem zasićenja nastaje usled postojanja mesta koja interaguju, tako da vezivanje liganda na jednom mestu dovodi do povećanja afiniteta na drugom mestu.

Slična kooperativnost postoji kod vezivanja supstrata za neke enzime



POZITIVNA KOOPERATIVNOST

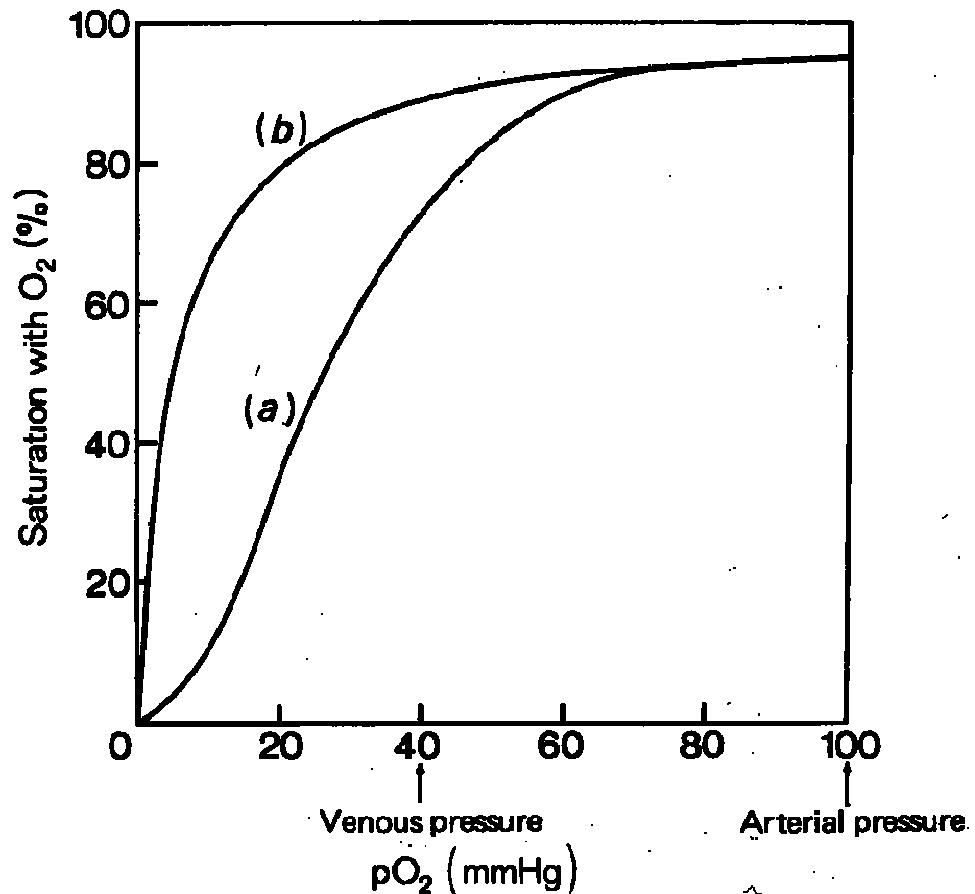
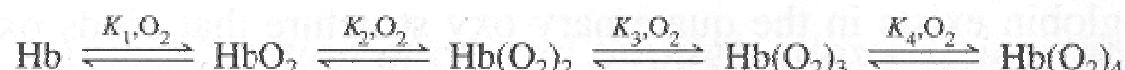


Figure 10.1 The oxygen-binding curves of (a) myoglobin and (b) hemoglobin.

Table 10.1 Adair constants for the binding of O_2 to hemoglobin^a

2,3-Diphosphoglycerate (mM)	K_1	K_2	K_3	K_4
	(mmHg)			
0	0.024	~0.074	~0.086	7.4
2.0	0.01	~0.023	~0.008	11.2

^a At 25°C, pH 7.4, and 0.1-M NaCl. The Adair equation describes the following:



where

$$K_1 = \frac{[HbO_2]}{[Hb][O_2]}, K_2 = \frac{[Hb(O_2)_2]}{[HbO_2][O_2]}, \text{etc.}$$

Sa vezivanjem liganda raste i afinitet. Sva vezivna mesta su identična.



Hilova jednačina

Za tetramerni enzim:

$$\frac{v_0}{V_{\max}} = \frac{[A]^4}{K_X + [A]^4} \quad \text{where} \quad K_X = a^3 b^2 c K_A^4$$

$$K_X = K_1 K_2 K_3 K_4$$

$$K_{A1} = \frac{K_A}{4} \quad K_{A2} = \frac{a2K_A}{3} \quad K_{A3} = \frac{ab3K_A}{2} \quad K_{A4} = abc4K_A$$

Enzim sa n ekvivalentnih supstrat vezujućih mesta:



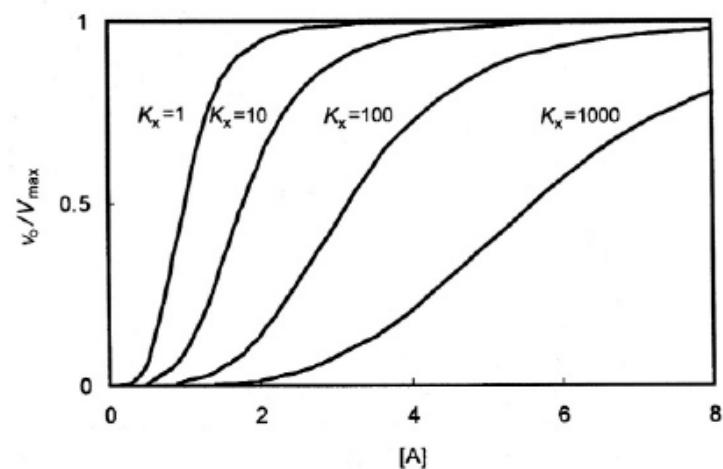
Ili uopštem slučaju (Hilova jednačina)

$$\frac{v_0}{V_{\max}} = \frac{[A]^n}{K_X + [A]^n}$$

$$K_X = \frac{[E][A]^n}{[EA_n]}$$

V_0/V_{\max} - frakcija zasićenog enzima supstratom,
n - broj supstrat vezujućih mesta po molekulu enzima,
 K_X - konstanta koja obuhvata faktore interakcije a,b,c,..
i sopstvenu konstantu disocijacije K_A

$$K_X = K_A^n (a^{n-1} b^{n-2} c^{n-3} \dots z^1)$$



U Lineweaver_Burk obliku:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_X}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[A]^n} \right)$$

Logaritamska forma Hilove jednačine:

$$\log \left(\frac{v_0}{V_{\max} - v_0} \right) = n \log[A] - \log K_X$$

Linearna forma - direktna procenu **prividnog broja supstrat vezujućih mesta po molekulu** (nagib je n)

Ako se meri ravnotežno vezivanje liganda umesto početnih brzina, onda V_0/V_{\max} mora da se zameni sa Y (Y - frakcionalno zasićenje proteina ligandom)

Types of equation	Initial rate studies	Ligand binding studies
Hill equation	$\frac{v_0}{V_{\max}} = \frac{[A]^n}{K_X + [A]^n}$	$Y = \frac{[A]^n}{K_X + [A]^n}$
Lineweaver-Burk form	$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_X}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[A]^n} \right)$	$\frac{1}{Y} = 1 + K_X \left(\frac{1}{[A]^n} \right)$
Logarithmic form	$\log \left(\frac{v_0}{V_{\max} - v_0} \right) = n \log[A] - \log K_X$	$\log \left(\frac{Y}{1-Y} \right) = n \log[A] - \log K_X$

Osnova Hilove jednačine - prepostavka beskonačne kooperativnosti, jedino su brzo ekvilibrišući sistemi pogodni za Hilovu analizu → Izbegavanje korišćenja kinetičkih podataka pri bilo kakvoj primeni Hilove jednačina na stredy-state enzimima

KVANTITATIVNA ANALIZA KOOPERATIVNOSTI

Hilova jednačina: mera kooperativnosti



$$K = \frac{[E][S]^n}{[ES_n]}$$

Stepen zasićenja:

$$Y = \frac{[ES_n]}{[E]_0}$$

$$1 - Y = \frac{[E]}{[E]_0}$$

$$\log \frac{Y}{1 - Y} = n \log[S] - \log K$$

$$\log \frac{Y}{1 - Y} = h \log[S] - \log K$$

Za kinetička merenja:

$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = h \log[S] - \log K$$



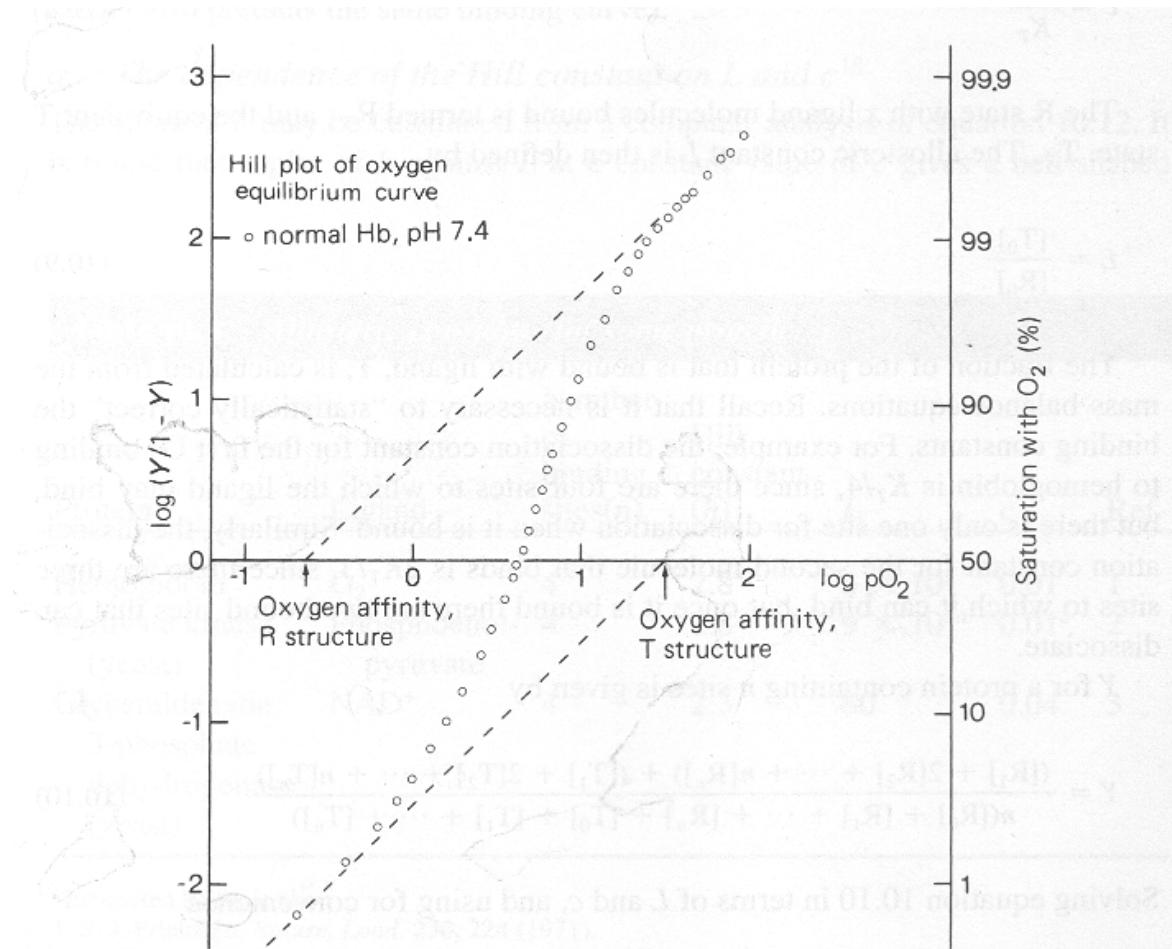


Figure 10.7 A Hill plot of the oxygen-binding curve of hemoglobin. [From J. V. Kilmartin, K. Imai, and R. T. Jones, in *Erythrocyte structure and function*, Alan R. Liss, 21 (1975).]

U regionu 50% zasićenja (10-90%) kriva je prava
 h (Hilova konstanta, mera kooperativnosti) se dobija iz nagiba u regionu od 50% saturacije – što je veća veća je kooperativnost
 Ako je $h=1$ nema kooperativnosti (MM jednačina), $h>1$ pozitivna, a $h<1$ negativna kooperativnost

Modeli za opisivanje kooperativnog vezivanja liganda

Mono-Vajman-Šanžeov (MWC) – simetrični model

Košland, Nemeti i Filmerovi modeli (KNF) – sekvencijalni model



MONO-VAJMAN-ŠANŽEOV ORGANIZOVANI MEHANIZAM (MWC)

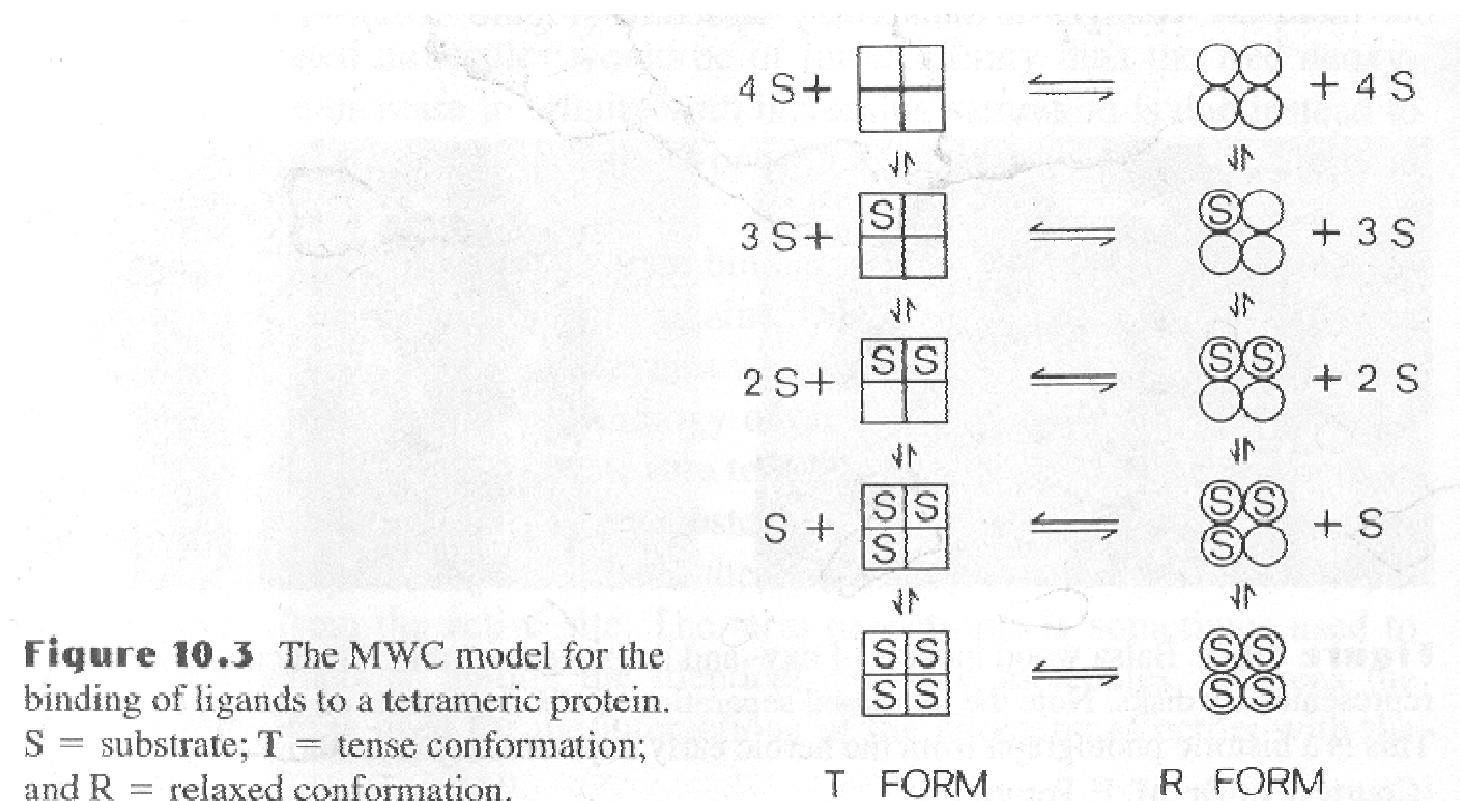
- Mono, Vajman I Šanže - ujedinjen strukturni model za alosterne proteine i enzime

Postulati:

- Protein je oligomeran -protomeri su asosovani tako da svi zauzimaju ekvivalentne pozicije (molekuli poseduju najmanje jednu osu simetrije)
- Protein postoji u dve forme (T i R) i ove dve forme su u ravnoteži i kad je vezan ligand i kada nije
- Simetrija ostaje očuvana kada protein prelazi iz jedne forme u drugu, kao i pri vezivanju liganda – koncertirana promena konformacije
- T stanje ima niži afinitet za ligand;
- Za svaki ligand postoji jedno jedino mesto na svakom protomeru
- Sva vezivna mesta su ekvivalentna i imaju identične vezivne konstante za ligande
- Konformacija svakog protomera je ograničena njegovom asocijacijom sa ostalim protomerima
- Samo konformaciona promena može promeniti afinitet protomera za ligand



MONO-VAJMAN-ŠANŽEOV ORGANIZOVANI MEHANIZAM (MWC)



Strukturni model – dva stanja, “Sve ili ništa”

- Svega 3 parametra:
 L (alosterna konstanta, konstanta ravnoteže) - odnos konc. T i R za neligirana stanja,
 K_t - konstante disocijacije za svako mesto u T formi
 K_r - konstante disocijacije za svako mesto u R formi
- Model daje teorijsku krivu koja se slaže sa krivom vezivanja kiseonika za hemoglobin
- Objašnjava kontrolu enzimske aktivnosti na jednostavan način (efektor menja R/T ravnotežu):

U odsustvu alosternih aktivatora/inhibitora supstrat se vezuje kooperativno

Efektor se vezuje nekooperativno za jedno od stanja i menja R/T ravnotežu preferencijelno stabišući jednu od te dve forme.

Aktivator se vezuje za R formu i povećava njenu koncentraciju, a inhibitor se vezuje za T formu i otežava prelaz u R formu vezivanjem liganda.

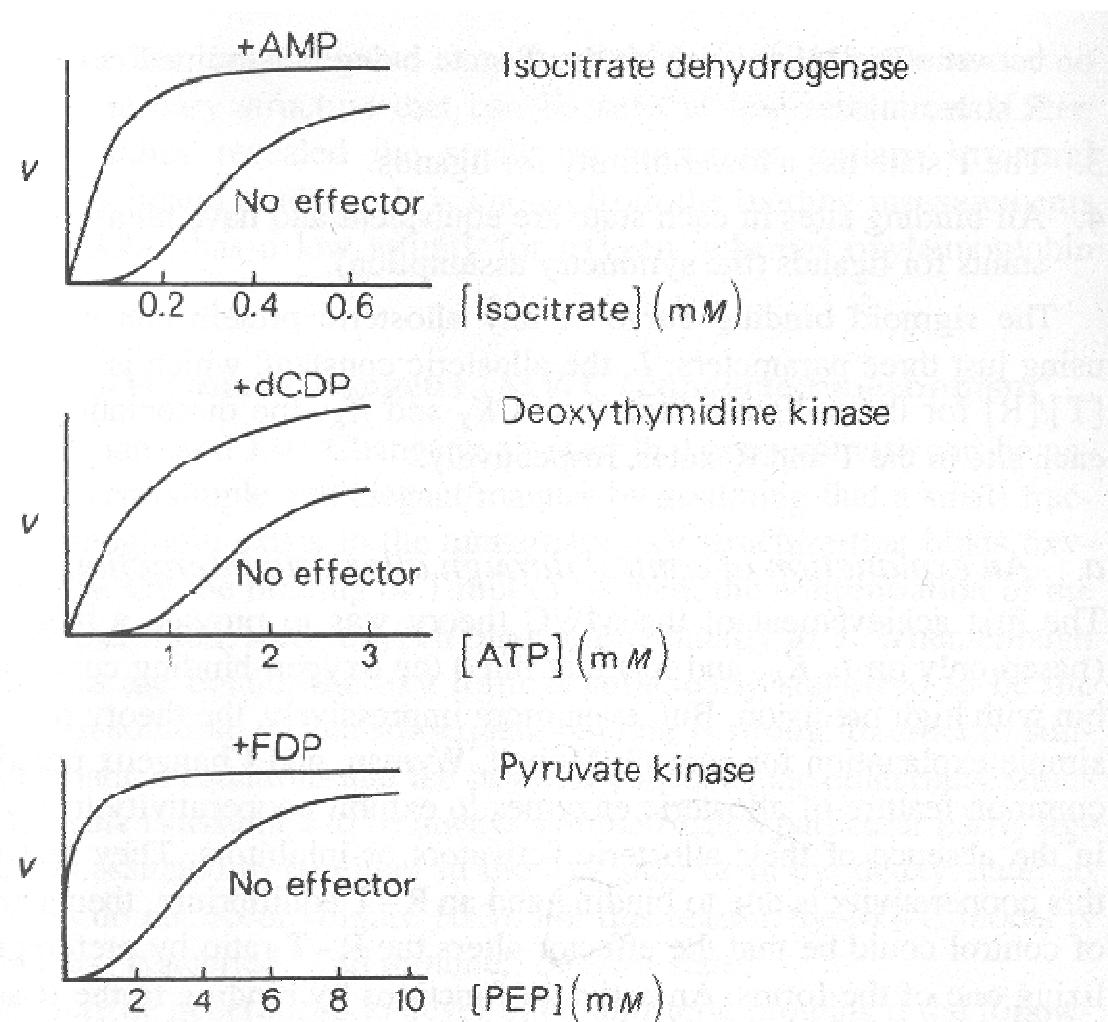
U ekstremnim slučajevima aktivator ukida R-T ravnotežu i R stanje predominira – tad nema koperativnosti i kinetika postaje MM.

Mane: koncept simetrije (nema intermedijernih stanja, jedna kvaternerna struktorna promena).

MWC je suštinski struktorna teorija



Figure 10.4 The abolition of positive cooperativity on the binding of allosteric effectors to some enzymes. Note the dramatic increases in activity at low substrate concentrations on the addition of adenosine monophosphate to isocitrate dehydrogenase, of deoxycytosine diphosphate to deoxythymidine kinase, and of fructose 1,6-diphosphate to pyruvate kinase; this shows how the activity may be “switched on” by an allosteric effector (PEP = phosphoenolpyruvate). [From J. A. Hathaway and D. E. Atkinson, *J. Biol. Chem.* **238**, 2875 (1963); R. Okazaki and A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **239**, 275 (1964); R. Haeckel, B. Hess, W. Lauterhorn, and K.-H. Würster, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 699 (1968).]



K sistemi i V sistemi

Kontrola alosternih enzima može imati dve ekstremne forme :

- kod **K(=binding) sistema** supstrat i efektor imaju različite afinitete za R i T forme – vezivanje efektora menja afinitet enzima za supstrat i obrnuto.
- Kod **V (=rate)-sistema** supstrat ima isti afinitet za oba stanja, ali jedno stanje ima mnogo veću vrednost za kcat.

Efektor se vezuje preferencijalno za jedno od dva stanja i tako modulira aktivnost promenom položaja ravnoteže između dva stanja
Kako se supstrat podjednako vezuje za oba stanja nema kooperativnog vezivanja supstrata, i vezivanja alosternog efektora ne menja afinitet enzima za supstrat



Košland, Nemeti i Filmerovi modeli (KNF model)

KNF model izbegava pretpostavku simetrije MWC modela - progress T→R je sekvencijalan

Konformacija svake subjedinice se menja svakim vezivanjem liganda, bez dramatičnog prelaza iz jednog stanja na drugo

MWC model koristi kvaternernu struktturnu promenu, KNF model koristi seriju tercijernih struktturnih promena.

KNF model ispituje sledeće varijable:

- Geometrijski odnos subjedinica
- Konstante vezivanja liganda za protein
- Jačinu interakcija između subjedinica
- Efekat neidentičnih subjedinica

Uopšte, broj konstanti je jednak broju vezujućih mesta, za razliku od MWC koji uvek koristi 3 lako složeniji KNF model je opštiji i bolje opisuje neke proteine od MWC modela,

.



KOŠLAND-NEMETI-FILMEROV SEKVENCIJALNI MODEL (KNF)

Prepostavke:

1. U odsustvu liganda, protein postoji u jednoj konformaciji;
2. Po vezivanju, ligand indukuje konformacionu promenu u subjedinici za koju se vezao. Ova promena se može preneti na susedne podjedinice preko dodirnih površina medju njima.
3. Molekularna interpretacija Adair-ove jednačine

$$v = \frac{K_1[A] + 2K_1K_2[A]^2}{1+K_1[A] + K_1K_2[A]^2}$$

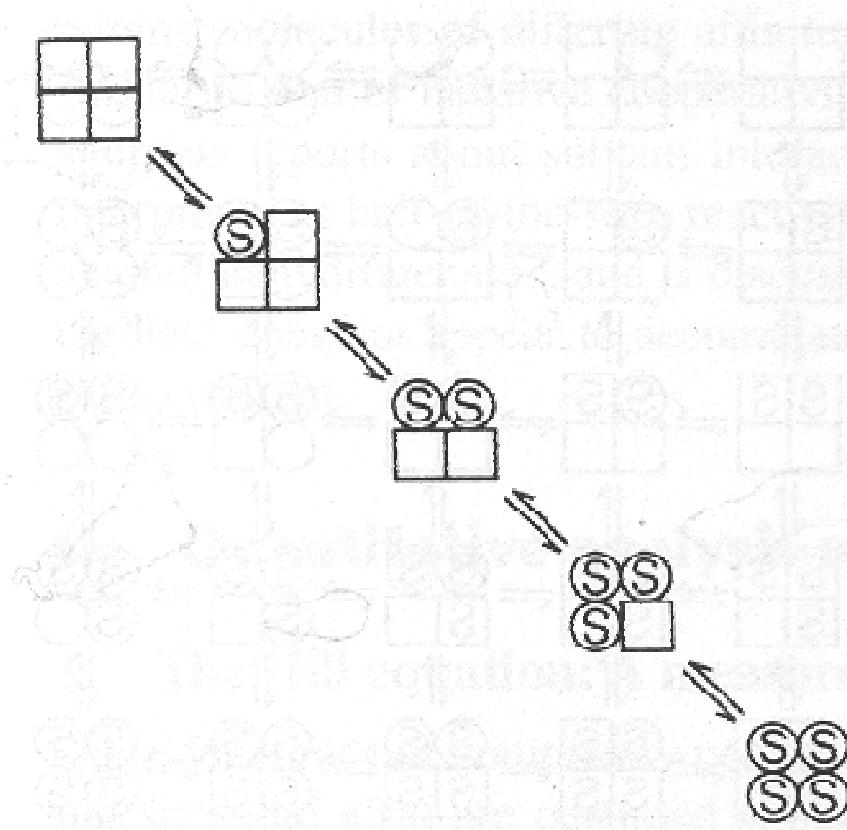


Figure 10.5 The KNF model for the binding of ligands to a tetrameric protein.

Opšti model

MWC I KNF modeli - ekstremni slučajevi opštijeg modela koji uključuje sve moguće kombinacije

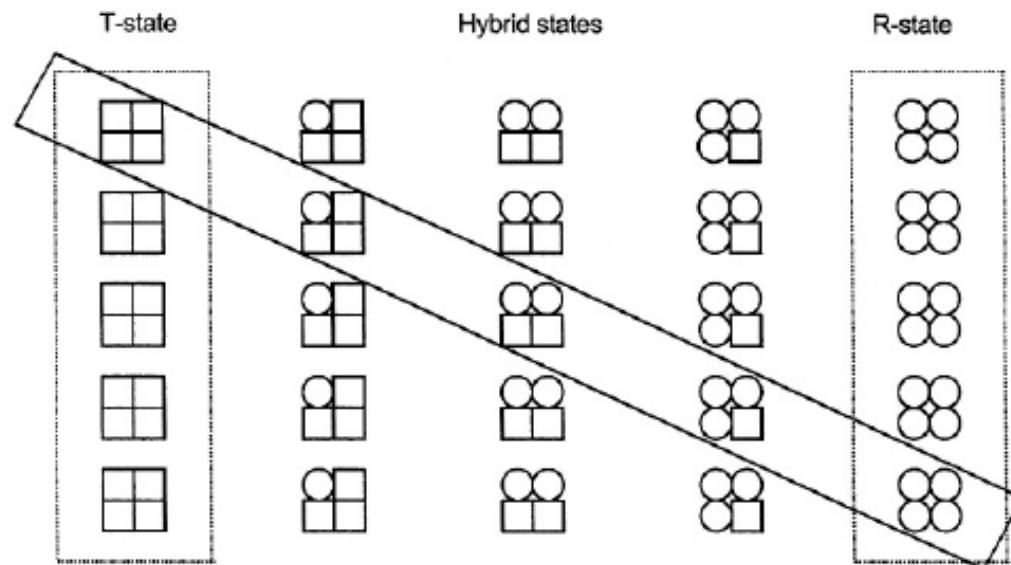
Opšti model za alosterni enzim sa 4 vezujuća mesta uključuje hibridne oligomere

Postoji 25 različitih formi enzima - Prva I četvrta kolona MWC, a dijagonala KNF

Svi gore navedeni modeli su ekvilibrijumski modeli – kad je V_0 / V_{max} prava mera Y_F

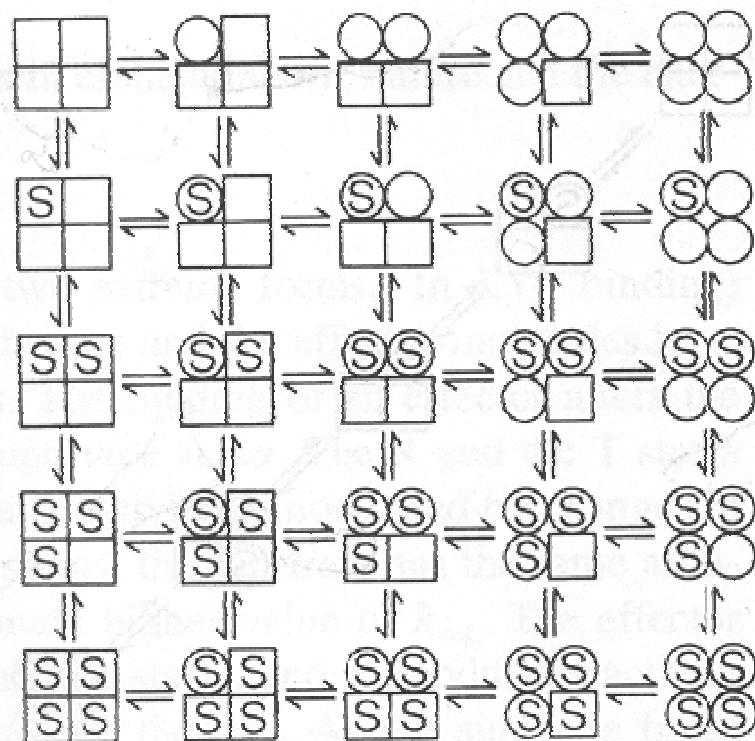
Kooperativnost se može javiti I iz čisto kinetičkih razloga - u mehanizmima koji uopšte ne pokazuju kooperativnost kada se vezivanje meri u ravnoteži (pr. Heksokinaza D).

U praksi je suviše komplikovan pa se eksperimentalni rezultati interpretiraju kroz KNF i MWC simplifikacije



OPŠTI MODEL

Figure 10.6 Eigen's general scheme for the binding of ligands to a tetrameric protein. The columns on the extreme left and right represent the MWC simplification. The diagonal from top left to bottom right represents the KNP simplification.



Negativna kooperativnost (antikooperativnost) i reaktivnost polovine mesta

- Neki enzimi sukcesivno vezuju ligande sa opadajućim afinitetom, što se može objasniti time da se ligand prvo vezuje za mesta sa najvećim afinitetom.
- Međutim, u mnogim slučajevima ovo se javlja kod oligomera sa identičnim subjedinicama – tirozil-tRNA sintetaza i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

Antikooperativnost se ne može objasniti MWC teorijom – vezivanje prvog liganda može stabilisati samo visoko-afinitetno stanje i ne može povećati udeo T stanja.

Ali se može opisati KNF teorijom – vezivanje liganda za jedno mesto dovodi do konf. promene koja se prenosi na slobodnu subjedinicu

Negativna kooperativnost je dijagnostički test KNF modela

Reaktivnost polumesta – enzim koji poseduje $2n$ mesta reaguje brzo samo na n od njih – može se detektovati samo presteady state kinetikom (tirozil-tRNA sintetaza)

Ne može se opisati MWC teorijom jer mesta gube svoju ekvivalenciju i gubi se time i simetrija.



Poređenje MWC i KNF modela

- MWC je u osnovi strukturalna teorija, dok KNF model izbegava pretpostavku simetrije ali koristi druge simplifikacije
- KNF prepostavlja da je progress iz T u R sekvenčijalan process (konformacija svake subjedinice se menja kako se koji ligand veže, bez dramatične promene iz jednog stanja u drugo) - KNF model je opštiji od MWC
- Negativna kooperativnost isključuje MWC model, dok za pozitivnu koperativnost važe oba modela

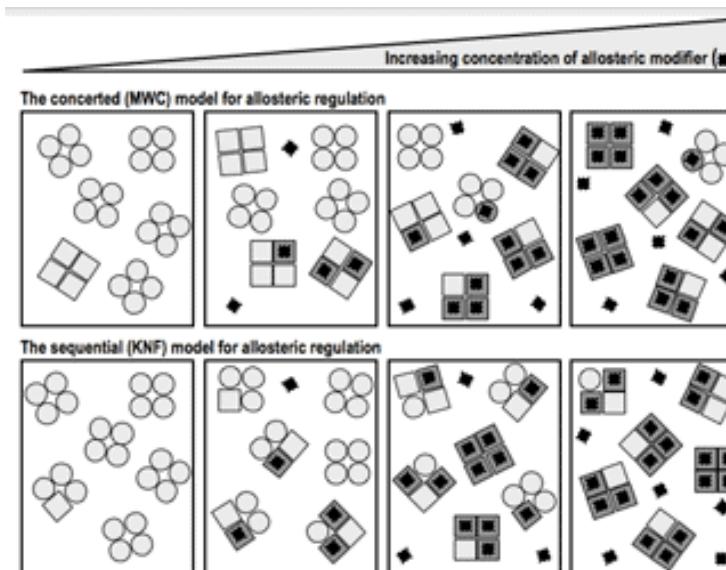


Table 10.2 Some enzymes showing half-of-the-sites reactivity

Enzyme	Reaction	Number of subunits	Ref.
Acetoacetate decarboxylase	Inactivation of active-site lysine	12	1
Aldolase	Partial reaction with fructose 6-phosphate	2	2
Aminoacyl-tRNA synthetases (some)	Biphasic formation of aminoacyl adenylate	2	3
Cytidine triphosphate synthetase	Stoichiometry of irreversible inhibition	4	4
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Reaction with nonphysiological substrates; <i>but</i> full site reactivity with physiological	4	5
Aspartate transcarbamoylase	CTP binding	6 (regulatory)	5
	Carbamoyl phosphate binding	6 (catalytic)	
Glutamine synthetase	Irreversible inhibition	8	6

Negativna kooperativnost je dijagnostički test za KNF model.

HSR se može odrediti jedino pre-steady state kinetikom. Neophodno je tačno znati koncentraciju vezivnih mesta enzima.

MWC vezivna kriva

Prema MWC teoriji kriva zasićenja za bilo koji oligomerni protein sastavljen od n protomera se definiše samo sa 3 nepoznata parametra i koncentracijom liganda (L, Kr, Kt i S)

$$c = \frac{K_R}{K_T} \quad L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

Kr – konstanta disocijacije sa R

Kt – konstanta disocijacija sa T

C – relativni afiniteti R i T stanja, faktor za koji se pomera ravnoteža vezivanjem liganda

L - alosterna kostanta, relativne stabilnosti R i T stanja

Frakcija proteina za koju je vezan ligand, Y, se računa iz jednačine balansa masa

$$Y = \frac{([R_1] + 2[R_2] + \dots + n[R_n]) + ([T_1] + 2[T_2] + \dots + n[T_n])}{n([R_0] + [R_1] + \dots + [R_n] + [T_0] + [T_1] + \dots + [T_n])}$$



$$K_T = \frac{[A][T]}{[A \cdot T]} = \frac{[A][T_0]}{[T_1]} \quad K_R = \frac{[A][R]}{[A \cdot R]} = \frac{[A][R_0]}{[R_1]}$$

$$\frac{K_T}{K_R} = \frac{\frac{[A][T_0]}{[T_1]}}{\frac{[A][R_0]}{[R_1]}}$$

Rearranging and substituting L_0 for $[T_0]/[R_0]$, the equilibrium constant in the absence of ligand, we have:

$$\frac{[T_1]}{[R_1]} = c \frac{[T_0]}{[R_0]} = c L_0$$



MWC VEZIVNA KRIVA

$$\alpha = \frac{[S]}{K_R}$$

- Normalizovana koncentracija liganda

Jednačina za opisivanje MWC modela alosterije za homotropne interakcije:

$$Y = \frac{Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

Y –frakcija proteina sa vezanim ligandom

Frakcija proteina u R stanju:

$$R = \frac{(1 + \alpha)^n}{L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

Table 10.3 Allosteric constants for some proteins

Protein	Ligand	Number of binding sites(<i>n</i>)	Hill constant (<i>h</i>)	<i>L</i>	<i>c</i>	Ref.
Hemoglobin	O ₂	4	2.8	3×10^5	0.01	1
Pyruvate kinase (yeast)	Phosphoenol- pyruvate	4	2.8	9×10^{3a}	0.01 ^a	2
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (yeast)	NAD ⁺	4	2.3	60	0.04	3

Zavisnost Hilove konstante od L i c

h se može izračunati kompjuterskim fitovanjem u jednačinu
Plotovanje h vs. L pri konstantnom c daje zvonastu krivu.

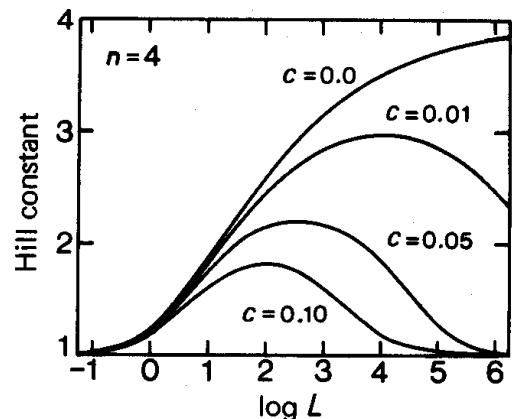


Figure 10.8 Variation of the Hill constant with L for a tetrameric protein.
[From M. M. Rubin and J.-P. Changeux, *J. Molec. Biol.* **21**, 265 (1966).]

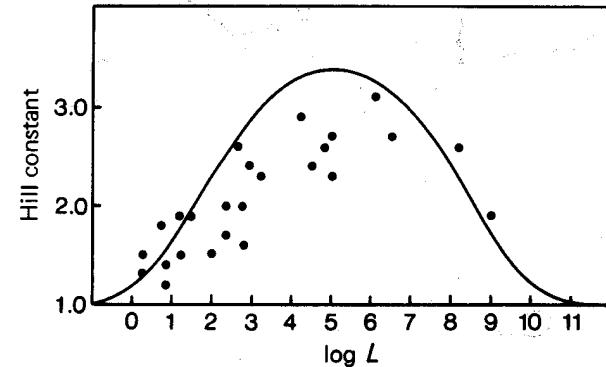
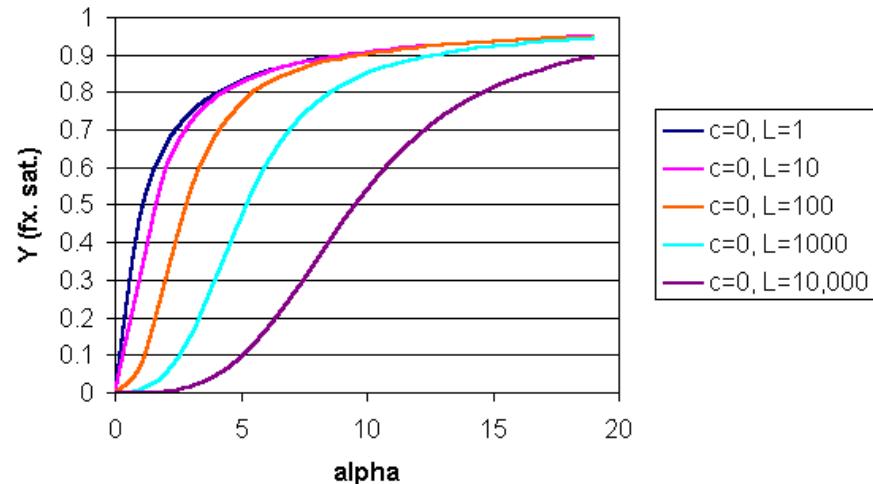


Figure 10.9 Variation of the Hill constant with L for the binding of oxygen to various mutant hemoglobins. [From J. M. Baldwin, *Progr. Biophys. Molec. Biol.* **29**, 3 (1975).]

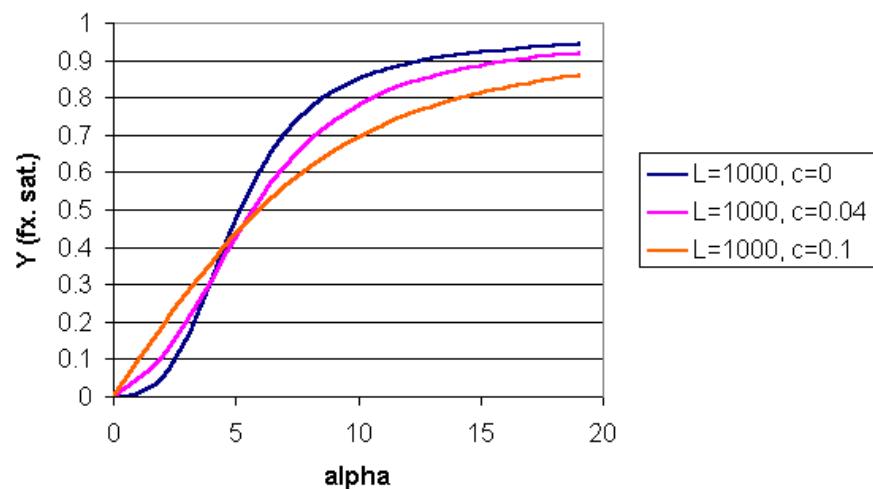
$$L = c^{-n/2}$$

h je 1 za L mnogo veće ili manje od c, a maksimalan je kad je $L=c^{-n/2}$
Kad je L malo inicijalno postoji dovoljno proteina u R stanju dajući dobro vezivanje
pa nema znatnog pomeranja ravnoteže ka R
Kad je L jako veliko koncentracija R stanja je jako mala da bi značajno doprinela
vezivanju
Zvonasta kriva je od naročitog interesa u analizi kako strukturne promene proteina
utiču na L.

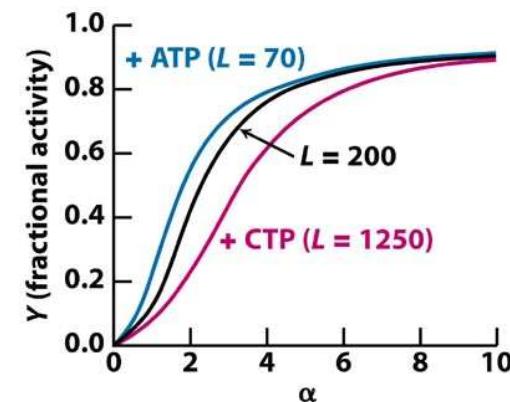
Y vs alpha, c=0, varying L



Y vs alpha, L=1000, varying c



Pr. Aspartat transkarbamoilaza
– 6 katalitičkih I 6 regulatornih
subjedinica, katalitičke bez
regulatornih su aktívne ali ne
pokazuju ni alosteriju ni
kooperativnost (MWC model)



DIJAGNOSTIČKI TESTOVI ZA KOOPERATIVNOST & MWC VS KNF

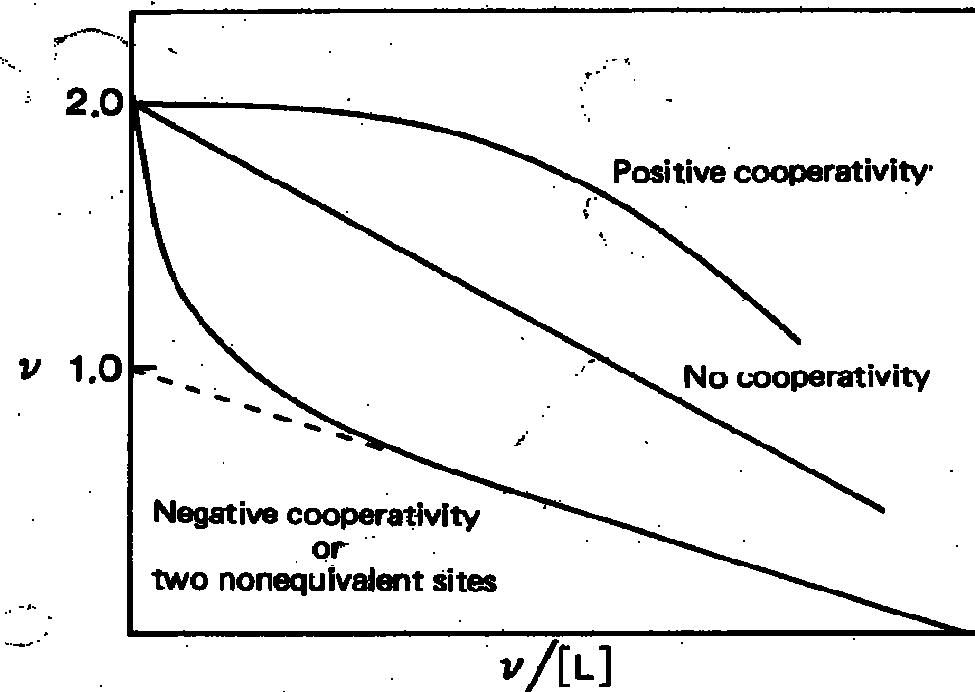


Figure 10.10 Plots of stoichiometry v against $v/[L]$ for the binding of ligand (L) to a dimeric protein.

Dijagnostički test za kooperativnost i MWC vs. KNF mehanizme

Kooperativnost se određuje iz h Hilove jednačine ili iz karakterističnih devijacija od ravnih saturacionih krivih ili iz Skačardovih krivih

Negativna kooperativnost isključuje jednostavan MWC model, ali pozitivna se uklapa u oba modela

Analiza oblika vezujućih krivih je diskutabilna jer oba modela predviđaju slične oblike

Teoretski merenje brzina vezivanja liganda može razlikovati ova dva modela

MWC model predviđa manje relaksacionih vremena, jer ima manje stanja

Kinetičari preferiraju KNF model jer su kinetička merenja mnogo osetljivija na prisustvo intermedijra - KNF ima više varijabli i fleksibilnija je u fitovanju podataka.



KNF vezujuća kriva

MWC model daje jednostavnu jednačinu usled pretpostavke samo 2 konstante disocijacije

KNF model zahteva različite konstante disocijacije za svako intermedijerno stanje, i ne postoji jednostavna opšta jednačina za Y – što je više vezujućih mesta to je i više varijabli

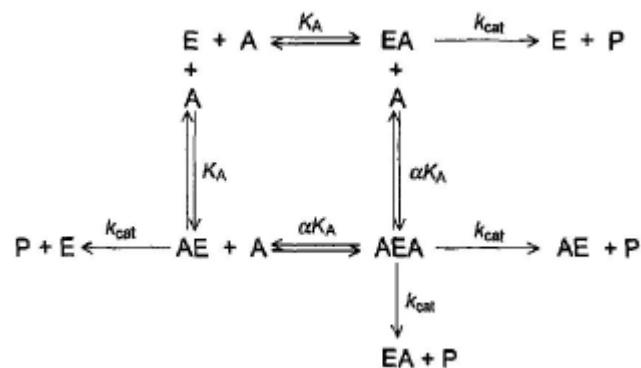
Napomena: to što eksperimentalne krive vezivanja fituju u MWC jednačinu, iz koje se mogu dobiti L i c vrednosti, ne znači da i strukturne promene slede MWC model, jer i KNF model predviđa istu krvu vezivanja.



Pozitivna koperativnost

- Aderova jednačina

Enzim sa dva vezujuća mesta - ako vezivanje jednog supstrata promeni konstantu disocijacije K_A za faktor α , a k_{cat} ostane isto sekvenca reakcije je:



Ako je $V_{max} = 2 k_{cat} E_0$, i izvodjenje jednačine brzine je zasnovano na prepostavci
brze ravnoteže dobijamo

$$v = \frac{K_1[A] + 2K_1K_2[A]^2}{1+K_1[A] + K_1K_2[A]^2}$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{\frac{[A]}{K_A} + \frac{[A]^2}{\alpha K_A^2}}{1 + \frac{2[A]}{K_A} + \frac{[A]^2}{\alpha K_A^2}}$$



Enzim sa 4 identična mesta - ako vezivanje prvog supstrata menja K_A za faktor a, vezivanje sledećeg menja konstantu disocijacije za ostala neokupirana mesta za faktor b, ..., onda efektivna konstanta disocijacije za vezivanje prvog, drugog, i tećeg supstrata je:

$$K_{A1} = \frac{K_A}{4} \quad K_{A2} = \frac{a2K_A}{3} \quad K_{A3} = \frac{ab3K_A}{2} \quad K_{A4} = abc4K_A$$

Napomena: promena indukovana prvim molekulom supstrata se zadržava, tako da promena indukovana drugim i trećim je kumulativna.

$$\frac{v_0}{V_{\max}} = \frac{\frac{[A]}{K_A} + \frac{3[A]^2}{aK_A^2} + \frac{3[A]^3}{a^2bK_A^3} + \frac{[A]^4}{a^3b^2cK_A^4}}{1 + \frac{4[A]}{K_A} + \frac{6[A]^2}{aK_A^2} + \frac{4[A]^3}{a^2bK_A^3} + \frac{[A]^4}{a^3b^2cK_A^4}}$$

$$V_1 = 4k_{\text{cat}}E_0.$$