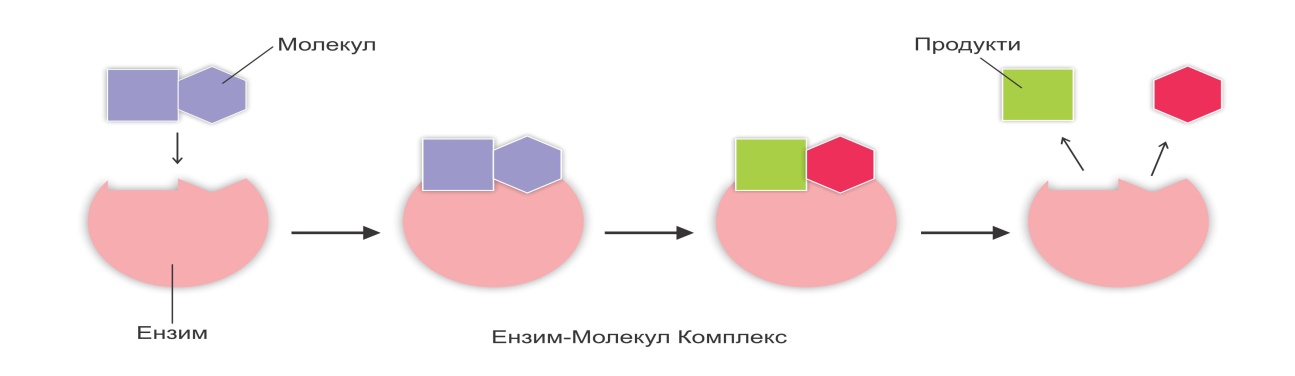
ЕНЗИМИ

Ензими предствљајумолекуле протеинске грађе, са изузетком мале групе каталитичких РНК молекула. Основна улога ензима у организму је катализа хемијских реакција.Каталитичке реакције индуковане од стране ензима су есенцијалне и неопходне свим живим системима. Под биолошки релевантним условима, реакције које нису катализоване ензимима се одвијају споро, такође неки процеси као што суна пример, дигестија хране и контракције мишића не би били изводљиви без присуства ензима. Синтеза ензима се врши унутар ћелија, а каталитичко деловање ензими могу да остварују **унутар самих ћелија** (интрацелуларни простор) као и **изван ћелија**.

Основна улога ензима је да смањују активациону енергетску баријеру и да повећавају брзину хемијских реакција (106 до 1012 пута у однсу на рекацију која се одиграва без присуства ензима). Наиме, ензими омогућавају остваривање сложених хемијских реакција у кратком временском интервалу и при релативно ниским темературама. Ензими делују на молекуле који се називају **супстрати**, а молекули који настају у ензимски катализованим реакцијама се називају **производи**(*слика 1*). Карактеристика сваке ензимски катализоване реакције је да се одвија унутар молекула ензима који се назива**активно место**.Супстрат се у ензимски катализованој реакцији везује за активно место ензима. У структурном погледу, активно место чине остаци аминокиселина, односно хемијске групе које могу везати супстрат. Након везивања супстрата за ензим, формира се **ензим-супстрат комплекс**, тако да се ензимска реакција може представити једначином:

E+S↔ ES ↔EP↔ E+P

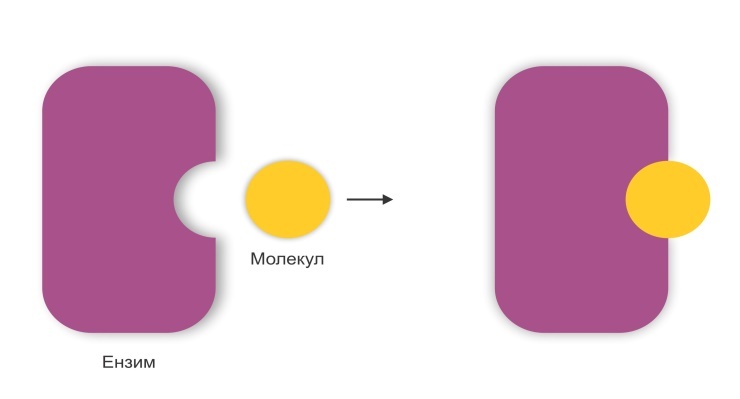
где Е, S и Р представљају ензим, супстрат и производ.



*Слика 1*. Приказ везивања супстрата за активно место ензима

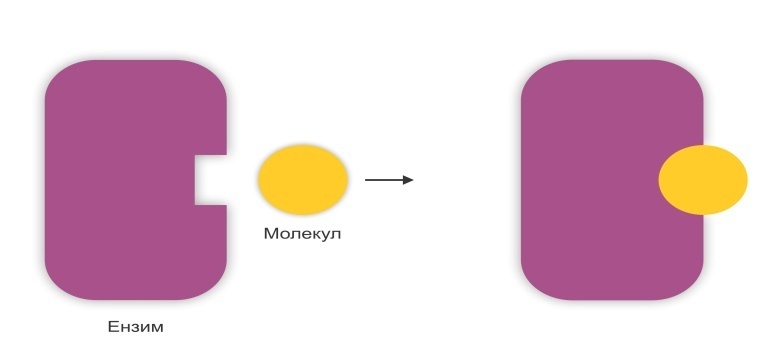
Способност ензима да катализује само једну, одређену реакцију је позната као **специфичност** ензима. Прецизније, специфичност езнзима подразумева да ензим делује само на одређену супстанцу, односно супстрат при чему настаје производ реакције. Одређени ензими могу показивати **апсолутну специфичност**, односно катализују конвертовање само једног специфичног супстрата у производ (нпр. ензим лактат дехидрогеназа делује само на L-млечну киселину). Са друге стране одређени ензими могу деловати на **одређену класу једињења** (нпр. ензим хексокиназа катализује АТП зависну фосфорилацију на позицији број 6. у свим хексозама, укључујући и глукозу).

Први предложени модел који објашњава специфичност ензима према супстрату је модел ,,**кључа и браве’’**. Овај модел подразумева даспстрат и активно место имају одговарајућу, комплементарну просторну конфигурацију (*слика 2*).



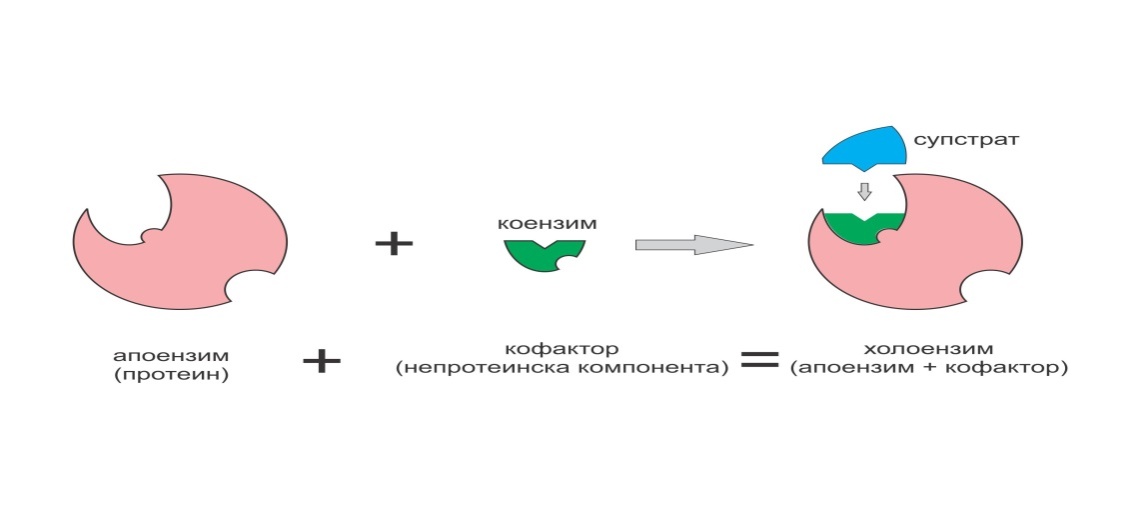
*Слика 2*. Модел кључ и браве

Други предложени модел је модел **индукованог прилагођавања**. Под овом теоријом се сматра да активно место ензима има потребнуструктуру за ,,позиционирање” супстрата, а након интеракције супстрата са ензимом долази до конформационе промене у самом ензиму односно активном месту, а затим долази до потпуног везивања суспстрата за активно место ензима при чему може да се одигра каталитичка реакција (*слика 3*). Предложени модел сличан је на пример када навлачимо рукавицу, и рукавица се прилагођава нашим шакама и прстима.



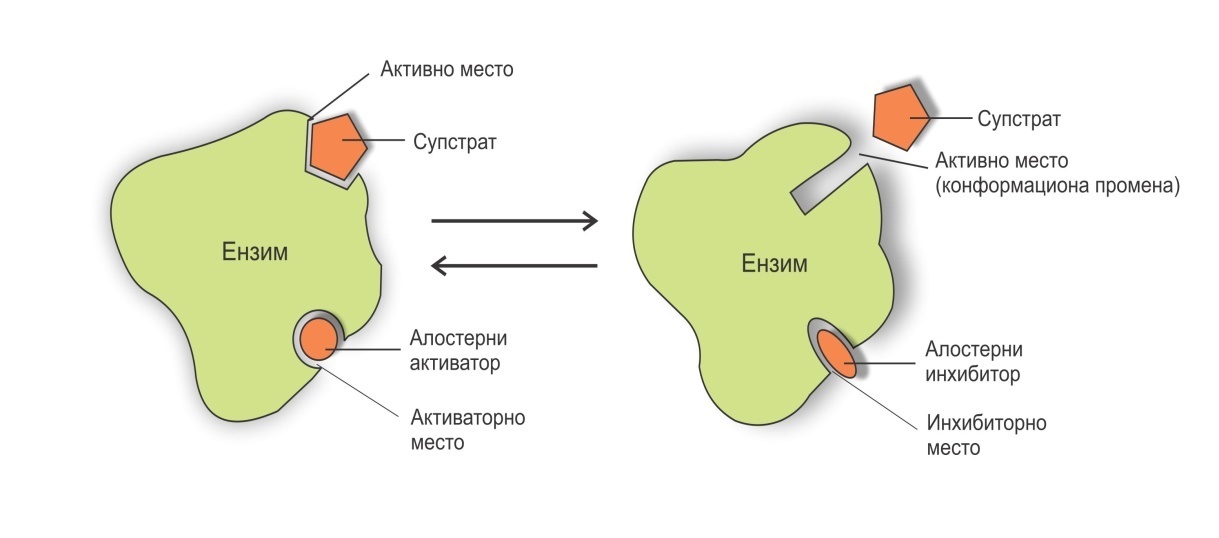
*Слика 3*. Модел индукованог прилагођавања

Многи ензими обављају каталитичку функцију ослањајући се искључиво на своју протеинску структуру. Док за каталитичку активност појединих ензима је неопходно присуство непротеинске комоненте коју називамо **кофактор***(слика 4)*. Кофактори могу бити **метални јони**, а такође могу бити органски молекули када их називамо **коензими**. Многи коензими су заправо **витамини** или садрже витамине у својој хемијској структури. Коензими активно учествују у каталитичким реакцијама ензима, односно у процесу конверзије супстрата у производ. Веза између ензима и коензима може бити **нековалентна** и тада за коензим кажемо да је **косуспстрат** и ковалентна, када за коензим кажемо да је **простетична група**. Простетична група и протеин граде каталитички активан комплекс који се назива **холоензим**. Ензим без своје простетичне групе се назива **апоензим** и каталитички је **неактиван**.



*Слика 4.* Апоензим и коензим граде холоензим

Поједини ензими у својој структури осим активног места садрже још један регион који се назива **алостерно место** и представља место за које се могу везати одређени молекули. Уколико дође до везивања молекула за алостерно место, ензим може **мењати конформацију активног места** а самим тим постати мање или више активан. Молекули који регулишу алостеријске ензиме се називају **ефектори**. Ефектори који инхибирају ензимску актвиност се називају **негативни ефектори.** Везивањем негативног ефектора за алостерно место долази до конформационе промене активног места ензима, услед **чега не долази** до везивања ензима и супстрата. Ефектори који повећавају ензимску активност се називају **позитивни ефектори.**Везивањем позитивног ефектора за алостерно место долази до конформационе промене у активном месту при чему се **омогућава** везивање супстрата за активно место ензима (*слика 5*).

****

*Слика 5*. Алостерни ензими, алостерни активатор и инхибитор.

Када сам сусптрат има улогу ефектора тада говоримо о **хомотропном ефектору**. Присуство молекула супстрата на једном месту на молекулу ензима повећава каталитичке особине других супстрат-везујућих места и зато се каже да се овде испољава **кооперативност**. Пример: Везивање првог молекула кисеоника за хемоглобин олакшава везивање остала три. Са друге стране **хетеротропни ефектор** је различит од молекула супстрата.Пример је *feedback* инхибиција неког метаболичког пута или неке реакције интермедијерним или крајњим продуктом.

Веома битна особина ензима је подложност регулацији, односно могућност да се регулационим механизмима повећа или смањи ензимска активност. Постоји **постранслациона регулација** која се остварује променом каталитичких својстава **већ синтетисаних молекула ензима**. Такође, постоји **дугорочна контрола** активности ензима која се остварује **променом интензитетасинтезе** ензима или преко **разградње** већ постојећих молекула ензима. Регулација ензимске активности променом интензитета синтезе ензима позната је као **генетска контрола**, заправо на генетском нивоу контролише се брзина синтезе ензима.

Постранслациона контрола обухвата **алостеријску регулацију, ковалентну модификацију, ограничену протеолизу, асоцијацију и дисоцијацију субјединица, промена концентрације метаболита.**

**Алостеријска регулација** се остварује везивањем ефектора за алостерно место, при чему долази до промене конформације активног места. Ефектори могу бити позитивни и негативни.

**Ковалентна модификација** представља промену каталитичке активности ензима која је условљена припајањем хемијске групе молекулу ензима уз формирање ковалентне везе. У процесу ковалентне модификације учествују различите хемијске групе, али најчешће се ковалентна модификација врши фосфорлисањем и дефосфорилисањем ензима. Фосфорилисање катализују ензими **протеин киназе**, дефосфорилисање катализују ензими **фосфатазе**. Можемо закљулити да је ковалентна модификација **ензимски катализован реверзибилни процес**. Неки регулаторни ензими су активни у фосфорилисаном, а неактивни у дефосфорилисаном, док су други регулаторни ензими активни у дефосфорилисаном облику, а неактивни у фосфорилисаном облику. Пример: ензим гликоген синтаза је активан у дефосфорилисаном облику, док је у фосфорилисаном облику неактиван.

**Ограничена протеолиза**је механизам регулације ензимске активности који **обухвата промену структуре ензима** тако што се од молекула ензима одвоји специфичан сегмент чиме се повећава или смањује каталитичка активност. Овај вид ензимске регулације се врши под утицајем ензима**протеаза**, а за разлику од ковелентне модификације процес ограничене протеолизе је **иреверзибилан**. Пример: ензими панкреаса (нпр. трипсиноген) који учествују у дигестији хране се луче као неактивни, а у дуоденумуну долази до одвајања сегмента молекула ензима (нпр. трипсиноген се конвертује у активни облик трипсин), при чему долази до ослобађања активног места ензима, тако да ови ензими постају активни и везују за своје активно место супстрат. Овим механизмом спречена је аутодигестија панкреаса.

**Асоцијација и дисоцијација** као механизам регулације ензимске активности је значајна за ензиме који имају кватернарну структуру. Пример: ензим глутамат дехидрогенза је активан у облику олигомера састављеног од осам субјединица, а неактивна је у комлексу изграђеном од 32 субједнинице.

**Промена конецнтрације метаболита** подразумева да каталитичку активност ензима одређује концентрацијасупстрата, коензима, ефектора.

Систем класификације ензима је дефинисала Интернационална унија за биохемију, по коме су сви ензими подељени у шест **класа**. Класе ензима су даље подељене у **подкласе** (групе), а подкласе су даље подељене у **под-подкласе** (подгрупе) у којима се налазе ензими. Сваки ензим се означава са четири цифре, **прва цифра** представља класу ензима, **друга цифра** подкласу, **трећа цифра** под-подкласу, док **четврта цифра** представља индивидуални број сваког појединачног ензима. Класе ензима су следеће:

**Оскидоредуктазе** су ензими који катализују реакције оксидо-редукције и деле се на већи број подкласа: дехидрогеназе, оксидазе, пероксидазе, редуктазе.Дијагностички важни ензими оксидоредукатаза су лактат дехидрогеназа, глукозо-6фосфат дехидрогеназа, малат дехидрогеназа, каталаза итд.

**Трансферазе**представљају ензиме који преносе специфичне хемијске групе са молекула донора на молекул акцептор. Према природи хемијских група на које делују деле се на метилтрансферазе, ацилтрансферазе, аминотрансферазе, фосфотрансферазе итд. Фосфотрансферазе које катализују трансфер фосфатног остатка са АТП-a на неко органско једињење зову се **киназе**. Дијагностички значај имају ензими *AST* (аспартатоксалацетатаминотрансфераза), *ALT* (аланин пируват аминотрансфераза), пируват киназа, *γ-GT* (γ-глутамил трансфераза) итд.

**Хидролазе**доводе до разлагања, однoсно раскидања ковалентих веза у молекулу **адицијом молекула воде**. Подкласе хидролаза су карбохидразе, естеразе, протеазе. У циљу дијагностике ензими који се одређују су: трипсин, химотрипсин, амилаза, панкреасна липаза итд.

**Лиазе**катализују реакције раскидања хемијских веза унутар молекула **без присуства молекула воде** при чему се стварају двоструке везе или катализују додавање хемијских група двоструким везама. Подкласе су декарбоксилазе, хидратазе, дехидратазе, алдоалзе.

**Изомеразе**катализују реакције интрамолекуларног преуређивања. Подкласе су рацемазе, епимеразе, мутазе.

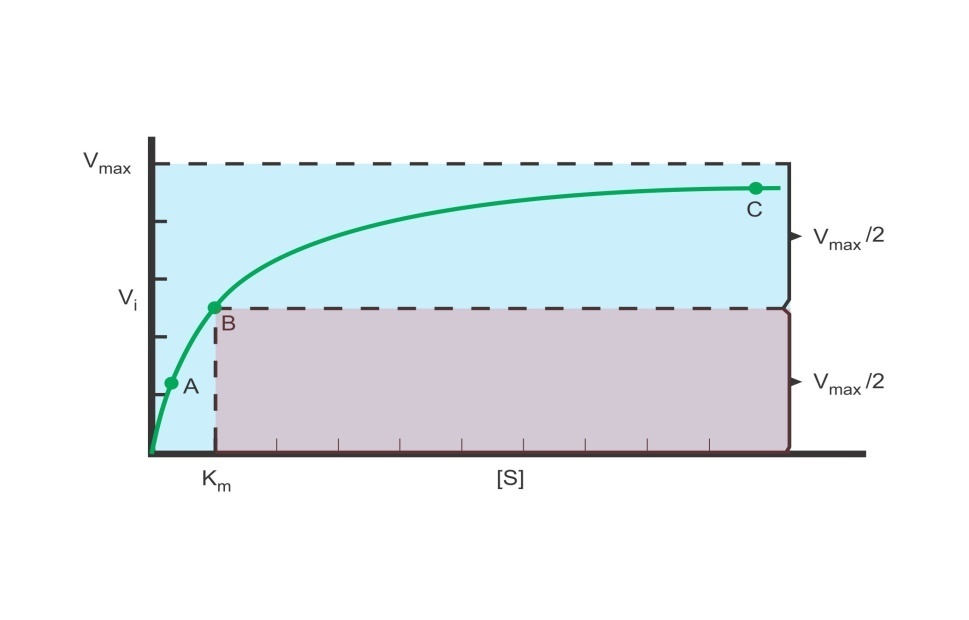
**Лигазе** катализују формирање хемијских веза између кисеоника и угљеника, угљеника и азота, угљеника и сумпора, као и између угљеникових атома, а за овакву врсту реакција је неопходна енергија која се добија разлагањем АТП-a.Подкласе су синтетазе и карбоксилазе.Метаболички важни ензими су ацетил КоА синтетеза, глутатион синтетаза, глутамин синтетаза итд.

За оптималну активност ензима неопходно је пет услова:**присуство ензима, присуство супстрата, присуство активатора односно одсуство инхибитора, оптималан pH и оптимална температура.**

Када достигну **оптималну температуру**око 30-40°С, ензимска активност је највећа. Ако се температура и даље повећава изнад оптималне температуре, око 50-60°С, ензим почиње да се денатурише тј. водоничне везе које држе секундарну, терцијалну, и кватернарну структуру се раскидају и као последица тога протеин губи своју активност и постаје **нефукционалан**. Такође, пад температуре доводи до смањења брзине ензимске реакције. Падом температуре за сваких 10°С, дупло се смањује брзина ензимски катализоване реакције.

Ензими су каталитички активни само при **оптималној pH вредности**. Промена оптималне pH вредности доводи до промене наелектрисања различитих хемијских група у молекулу ензима, што за последицу има промену протеинске структуре ензима и ензим губи своју активност.

Oбласткојаизучавабрзинехемијскихреакцијакатализованихензимиманазива се **ензимскакинетика**.Испитивање кинетике ензимских реакција нам омогућава да објаснимо на који начин ензими делујукао и да предвидимо како се ензими понашају у живим организмима. Михаелис-Ментенова једначина представља математички приказ дијаграма који описује однос између почетне брзине реакције и концентрације супстрата (*слика 6*).Описујесе кинетичкимконстантама*Km*(концентрација супстрата која одговара половини максималне брзине) и *Vmax*(максимална брзина).ЕнзимикојисепонашајупоМихаелис-Ментен-овојкинетициимају**хиперболичнукриву**, докалостеричниензимиимају**сигмоиднукриву**.



*Слика 6*. Михаелис-Ментенов график

Зависностпочетне (иницијалнебрзине) одконцентрацијесупстратапосматрасеразличито у зависностиодтримогућности:

1. Концентрација супстрата*S* jе много мања од *Km*, тачка *А* на графикону, у овом случају постоје слободни молекули ензима на чије се активно место није везао молекул супстрата. Брзина реакције **се једино може повећати додавањем молекула супстрата** који ће се везати за слободне ензиме, формирати *ЕS* комплекс, наградити производ чиме се брзина реакције повећава, тј убрзава.
2. Концентрација супстрата, *S* је приближно једнака *Km*, тачка *B*на дијаграму. У овој тачки, постоји формиран *ЕS* комплекс, а сама брзина реакције **може бити повећана додавањем већих концентрација супстрата**.
3. Концентрацијасупстрата,*S*јемноговећаод*Km* ,тачка*C* надијаграму, у овомслучајунепостојеслободнимолекулиензима, супстратсеналази у вишку, претходнонаградјени*ЕS*комплексисурезултовалиформирањем производа.Реакцијаједостигласвојумаксималнубрзину и у овомслучајудодавањемолекуласупстратаилимолекулаензиманеутиченаубрзавањереакције, достигнутјеплато.

Значај ензима у медицини се огледа у коришћењу ензимских тестова у циљу постављања **дијагнозе различитих обољења**. Сама ензимска дијагностика се заснива на **локализацији ензима**, где је већина ензима присутна у инрацелуларном простору, тако да при оштећењу ткива ови ензими прелазе у циркулацију.

Одређивање **ензимске активности у серуму** може послужити за утврђивање патолошких процеса у ткивима. Треба напоменути да и при малим лезијама у ткиву степен активности ензима у серуму се значајно повећава. Пример: Код **оштеђења јетре**(хепатитиса, алкохолне болести јетре итд.) долази до повећаног степена активности ензима *AST*, *ALT*, *γ-GT*, док код **акутног инфаркта** миокарда долази до повећаног степена активности ензима*ASТ, LDH, CPK-MB* (креатин фосфотрансфераза). Активност ензима **липазе** се у серуму повећава код **акутног панкреатитиса**, док повећање степена активности ензима **алкалне фосфатазе** има значај код **обољења костију и хепатобилијарног система**. Испитивање степена активности киселе фосфатазе има највећи дијагностички значај код **карцинома простате**.

**Дијагноза ензимопатија** се врши мерењем ензимске активности у крви, пунктатима ткива и култури ћелија. **Ензимопатије** представљају наследне болести, које су узроковане генским мутацијама, а као последица мутација долази до немогућности синтезе одговарајућег ензима, или се синтетише ензим чија је каталитичка активност измењена. Пример: недостатак ензима глукозo-6фосфатазе доводи до **патолошке акумулације гликогена** у јетри и бубрегу.

Ензими се такође могу употребити у терапији одређених патолошких процеса. Потенцијална терапија код инфаркта миокарда може да се заснива на примени ензима **стрептокиназе**, која има способност да разлаже формиране фибринске тромбе.

Литература:

1. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. Macmillan; 2008.

2. DarinkaKoracevic, GordanaBjelakovic, Vidoslava B. Djordjevic, JelenkaNikolic, Dusica D. Pavlovic, GordanaKocic. Biohemija.SavremenaAdministracija. Beograd. 2006.

3. McDonald AG, Tipton KF. Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. FEBS J. 2014;281(2):583-92.

4. Peter K. Robinson. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem.2015; 59:1–41.

5. СлавицаСпасић, ЗоранаЈелић-Ивановић, ВеснаСпасојевић-Калимановска. ОпштаБиохемија. Београд. 2002.

6. Warshel A, Bora RP. Perspective: Defining and quantifying the role of dynamics

in enzyme catalysis. J Chem Phys. 2016;144(18):180901.

7. Garrett R, Grisham CM. Biochemistry. 5th. Belmont, CA: Brooks/Cole Cengage Learning. 2013.

8. Colleen S, Allan M. Marks’ basic medical biochemistry: a clinical approach. Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

9. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE, editors. Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

10. Lieberman M, Marks AD. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. Lippincott Williams & Wilkins; 2009.