الإنزيمات (٢)

تابع الموقع الفعال وميكانيكية عمل الإنزيم

<u>صفات تميز خصوصية الأنزيم للمادة الأساس:</u>

١- يجب ان تحتوي الماده الأساس على رابطه كيمائيه او رابطه يمكن ان تهاجم من قبل الأنزيم.

٢- يجب ان تحتوي الماده الأساس على مجاميع فعاله أخرى أو مجاميع رابطه ترتبط مع الأنزيم وتحدد مواقع ارتباط جزيئات الماده الأساس.

العوامل المؤثرة على فعالية الانزيم

factors affecting enzyme activity

١- تركيز الأنزيم Effect of enzyme concentration

٢- تركيز المادة الاساس Effect of substrate concentration

٣- تأثيردرجة الحرارة Effect of temperature

٤- تأثير الاس الهيدروجيني Effect of pH

٥- وجود عوامل مثبطه Effect of inhibitors

تركيز الأنزيم

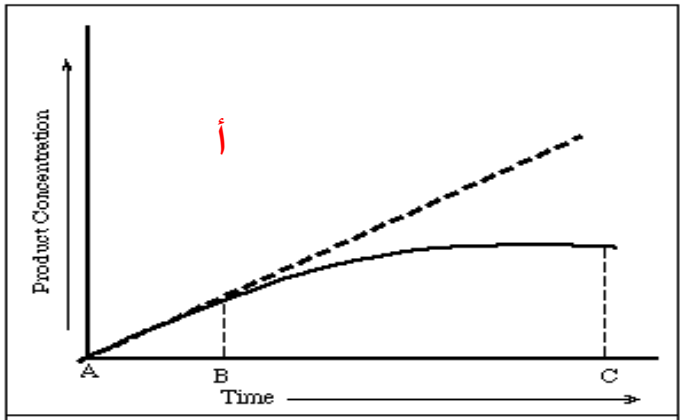


FIGURE 6
Reaction rate limited by substrate concentration

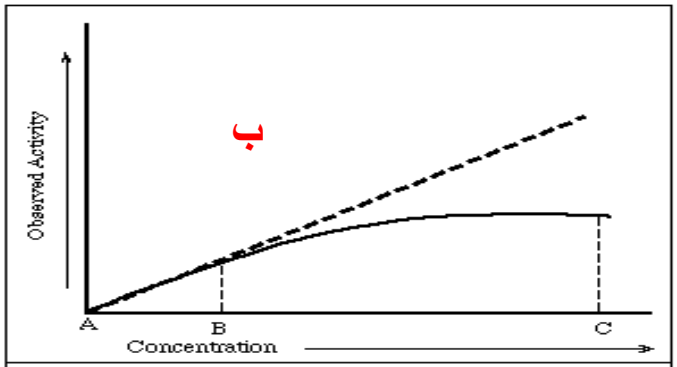


FIGURE 5
Activity vs. Concentration

تتناسب سرعة التفاعل تناسبا طرديا مع زيادة تركيز الانزيم اي كلما كان تركيز الانزيم اعلى كلما زادت سرعة التفاعل

نلاحظ ذلك في الشكل أ+ب بين النقاط

A و B

بينما يُلاحظ استقرار في سرعة

التفاعل على حد معين اي ان بعد اضافة اكثر انزيم تبقى سرعة التفاعل ثابته تدعى هذه السرعه بالسرعه القصوى . السبب لوجود الاستقرار يرجع لتركيز مادة الاساس المحدوده ، فمادة الاساس قد اصبحت مرتبطة كلها بالانزيمات فاضافة انزيمات اكثر "لن تجد" مادة اساس لتعمل عليها

تركيز المادة الأساس

- كذلك الامر بالنسبه لتركيزمادة الاساس ، فتتناسب سرعة التفاعل تناسبا طرديا مع زيادة تركيز مادة الاساس اي كلما كان تركيز مادة الاساس اعلى كلما زادت سرعة التفاعل. مع ثبات العوامل الأخرى.
- ولكن بعد اضافة تركيز معين تبقى سرعة التفاعل ثابته وهذا بسبب كون تركيز الانزيم محدود وان اضافة مادة اساس اكثر لن تجد انزيمات ترتبط بها

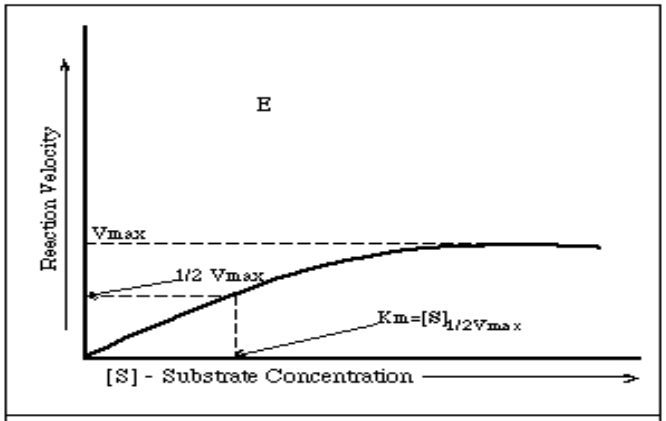


FIGURE 8
Effect of substrate concentration

نرى انه بعد اضافة تركيز معين من مادة الاساس تبقى سرعة عمل الانزيم ثابته (سرعة التفاعل) Vmax

يعود ذلك كون الانزيمات موجودة بتركيز محدود فاضافة اكثر مادة اساس "لن تجد" انزيمات لترتبط بها اي ان كل الانزيمات قد اصبحت موجوده بشكل "المركب المعقد ES المؤقت) .لذا لن تزيد سرعة التفاعل اكثر .

افتراض العالمان ميكليز و منتن
Michalis and Menten

هي نظريه عامه لفاعلية الإنزيم ، حيث افترضا أن الأنزيم يتحد مع الماده الأساس بصوره عكسيه ليكون معقد من الأنزيم والماده الأساس

$$E + S \longleftrightarrow ES$$

ثم يتفكك العقد بعد ذلك بتفاعل عكسي ثاني يكون ابطأ من الاول لينتج نواتج التفاعل ويطلق الأنزيم مرة أخرى

$$ES \longleftrightarrow E+P$$

تكون السرعه الكليه للتفاعل الأنزيمي متناسبه مع تركيز المعقد.

تكون أقصى سرعة للتفاعل عندما يكون الأنزيم بشكل

(ES)

تابع تركيز الماده الأساس

- يعين ثابت ميكليز Km العلاقة الكميه بين تركيز الماده الأساس والسرعه القصوى لإنزيمات مختلفه ويعرف بأنه تركيز الماده الأساس التي عندها ينتج الأنزيم بنصف سرعته القصوى.

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

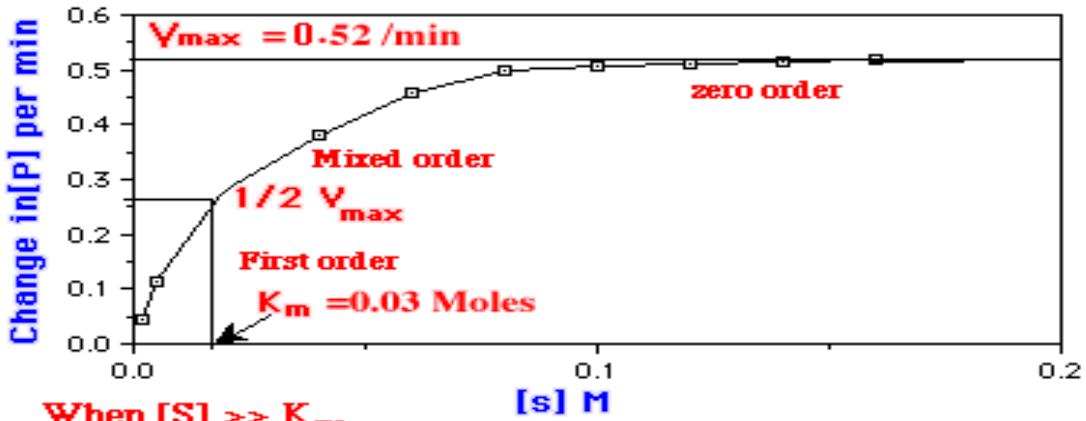
V = السرعه المبدئيه للتفاعل عند تركيز الماده الأساس.

Vmax= السرعه القصوى

Km = ثابت ميكليز

يمكن استنتاج السرعه القصوى والثابت
بسهوله بواسطة رسم لينوفر- بيرك

Fig. 1: Rate equation



When $[S] >> K_m$
Then
$V = V_{max}$

When $[S] = K_m$
Then

$$V = \frac{V_{max}}{2}$$

When $[S] << K_m$
Then
$V = [S]V_{max} / K_m$

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

This is a hyperbolic curve and the equation for a rectangular hyperbolic curve is:

$$y = \frac{ax}{b + x}$$

عندما يكون تركيز [s] اقل بكثير من (km) سرعة التفاعل تتناسب طرديا مع تركيز المادة الأساس

في هده الحالة يقال عن درجة التفاعل بالدرجة الأولى

عندما يكون تركيز [s] اكثر بكثير من (km) سرعة التفاعل تكون ثابته و مساويه للسرعة القصوى في هده الحالة يقال عن درجة التفاعل بالدرجة الصفر

لينوفر بيرك

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

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

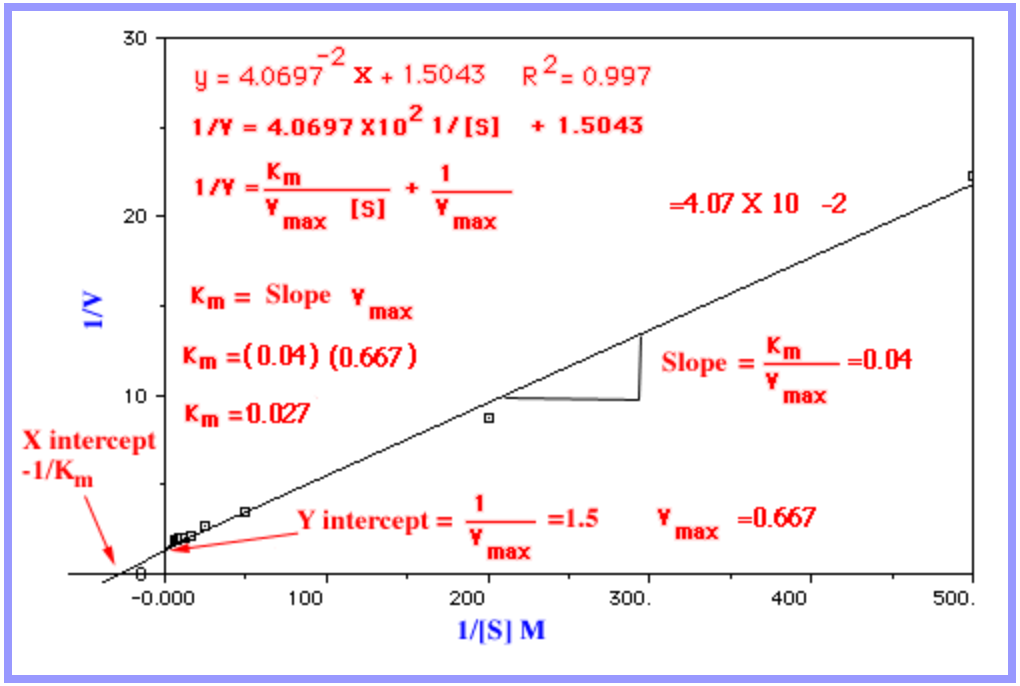
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}\ [S]} + \frac{[S]}{V_{max}\ [S]}$$

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

Slope=K_m/U_{max}

y Intercept = $1/U_{max}$

Lineweaver-Burk Plot



العوامل التي تؤثر على عمل الانزيم

- **درجة الحراره**

- يؤدي ارتفاع درجة الحراره الى زيادة سرعة التفاعل الانزيمي حتى حد معين فقط ، اذ تزداد سرعة التفاعل في البدايه مع ارتفاع درجة الحراره لغاية وصول درجة **الحراره المثلى** (Optimal) هي درجة الحراره التي يتم فيها تحويل أكبر كم يمكن من الماده الأساس الى نواتج التفاعل في وقت معين. ولكن عند الدرجات الحراريه الاعلى تنخفض السرعه تدريجيا حتى الصفر
- تكون درجة الحراره المثلى لمعظم الأنزيمات الأنسان من ٣٧-٤٠°م

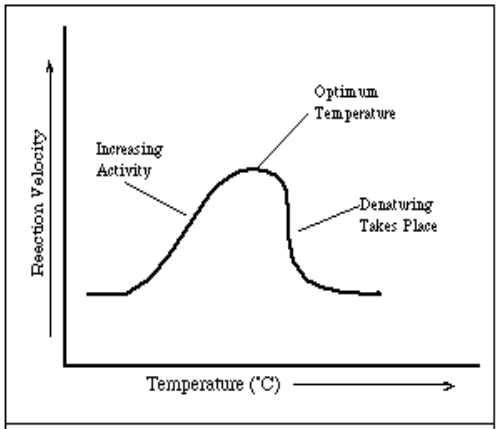


FIGURE 13
Effect of temperature on reaction rate

العوامل التي تؤثر على عمل الانزيم

- تتاثر الانزيمات بتغير درجة ال pH ، الدرجه الاكثر مفضله هي درجة الحموضه التي يكون نشاط الانزيم الاعلى بها و هي ***درجة الـ pH المثلى*** .
  - **درجة الحموضه pH :**
- كل انزيم له درجة pH مثلى تكون عندها سرعة التفاعل هي السرعه القصوى
- درجة pH متطرفه عاليه او متطرفه منخفصه عادة تفقد الانزيم فعاليته ، حيث ان درجة الحموضه هي ايضا عاملا محددا لاستقرار تركيب الانزيم .

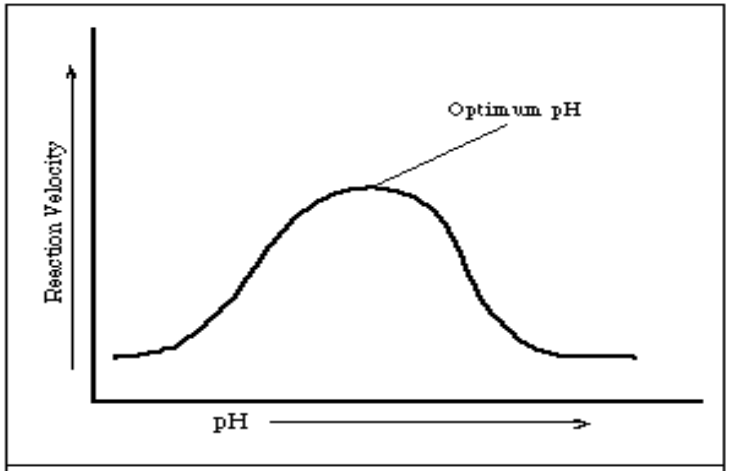
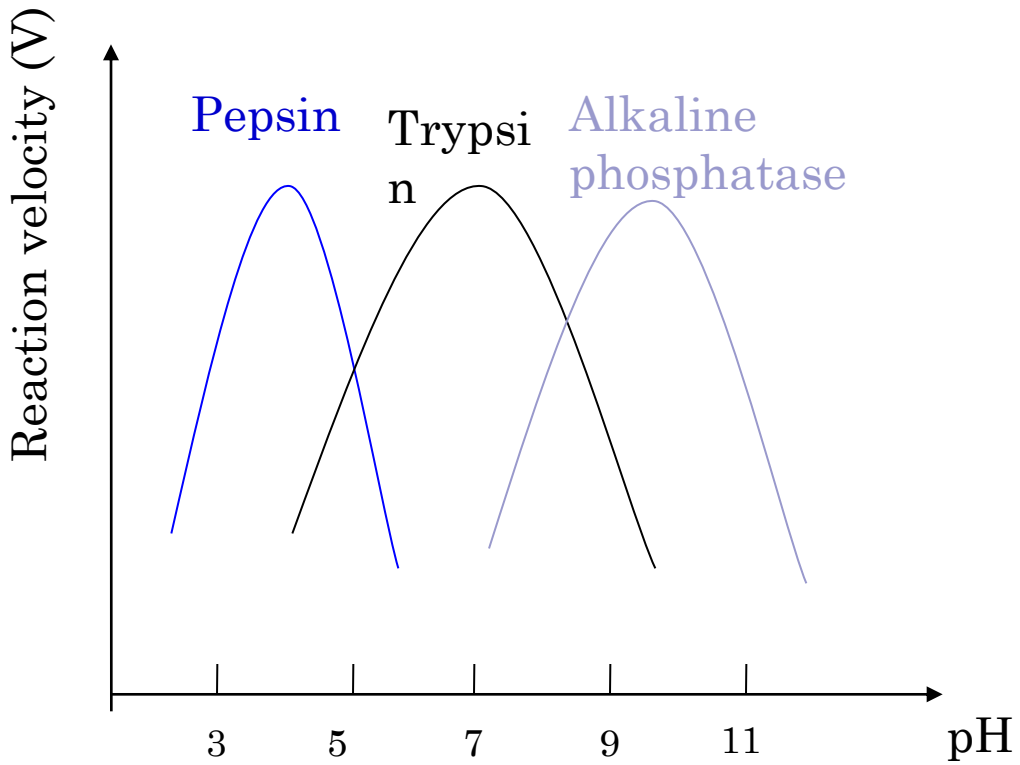


FIGURE 14
Effect of pH on reaction rate

تأثير الاس الهيدروجيني (درجة الحموضة)pH



تأثير درجة الحموضة

بعض الإنزيمات لها درجة النشاط العليا في الوسط الحامضي

بعض الإنزيمات لها درجة النشاط العليا في الوسط المتعادل

بعض الإنزيمات لها درجة النشاط العليا في الوسط القاعدي

المنشطات activators

- هي التي تزيد من سرعة التفاعل الأنزيمي وقد تكون ايونات غير عضويه . مثال: ايون الكلور ينشط أنزيم الأميليز amylase ايون الماغنيسيوم ينشط الكينيز kinase

توجد انزيمات تفرز بصوره خامله تسمى زيموجين ولكن يتم تحويلها للصورة النشطة لأداء تفاعلها. مثال : الببسينوجين الذي ينشط في وجود HCl الموجود في المعدة.

العوامل التي تؤثر على عمل الانزيم

- **المثبطات inhibitors:-**
- التثبيط هي الظاهرة التي تتميز بتبطيء سرعة التفاعل بوجود عامل معيق او مواد كيمياوية معينة تدعى المثبطات inhibitors من خلال تأثيرها على مجاميع معينة للأنزيم او للنظام الانزيمي.
- تقسم العوامل المثبطة لفئتين :
- **التثبيط العكسي Reversible inhibition**
- **التثبيط الغير عكسي Irreversible inhibition**

التثبيط الغير عكسي

- يثبط نشاط الإنزيم بحيث لا يستطيع الإنزيم أن يعود إلى حالته الطبيعية
- مثل **

داي ايزبربيل فلوروفوسفيت الذي يعمل على تثبيط الأنزيم كولين استريز.

يحفز الكولين استريز التفاعل الذي يحدث عند نقطة الأتصال بين بعض الخلايا في الحهاز العصبي. تفشل الحيوانات التي تسمم بهذه الماده من نقل النبضات العصبيه.

يتحد المركب داي ايزبربيل فلوروفوسفيت مع مجموعة الهيدروكسيد لوحدات السيرين الحيويه في الموقع الفعال لجزيئة الكولين استريز.

المثبطات

التثبيط العكسي :- ان المثبطات العكسية هي التي تتحد مع الانزيم مباشرة ويمكن ازالتها بعملية الفرز الغشائي dialysis او بالتخفيف وبهذا تسترجع الفعالية الانزيمية.

- يرتبط بالإنزيمات عن طريق روابط غير تساهميه
- ممكن للمثبط أن ينفصل عن الإنزيم و يعود الإنزيم لحالته الطبيعية

- التثبيط التنافسي Competitive Inhibitors
- التثبيط غير التنافسي Non-Competitive Inhibitors
- التثبيط لا التنافسي Uncompetitive inhibition

التثبيط العكسي

التثبيط التنافسي Competitive Inhibitors

- في هذا النوع من التثبيط يتنافس المثبط مع المادة الاساس على الارتباط بالمركز الفعال بالانزيم . اذ ان هذا النوع من التنافس يتطلب تشابه بالتركيب بين المثبط والمادة الاساس . فكلما كانا اكثر تشابه كان التثبيط اكثر
- لتركيز الانزيم ومادة الاساس ايضا لهما تأثير على مدى التثبيط ، يكون تأثير التثبيط عكسيا اي بزيادة مادة الاساس يستعيد الانزيم نشاطه الطبيعي

اذا زاد تركيز I على S يحصل تثبيط

اذا زاد تركيز S على I لا يحصل تثبيط

.

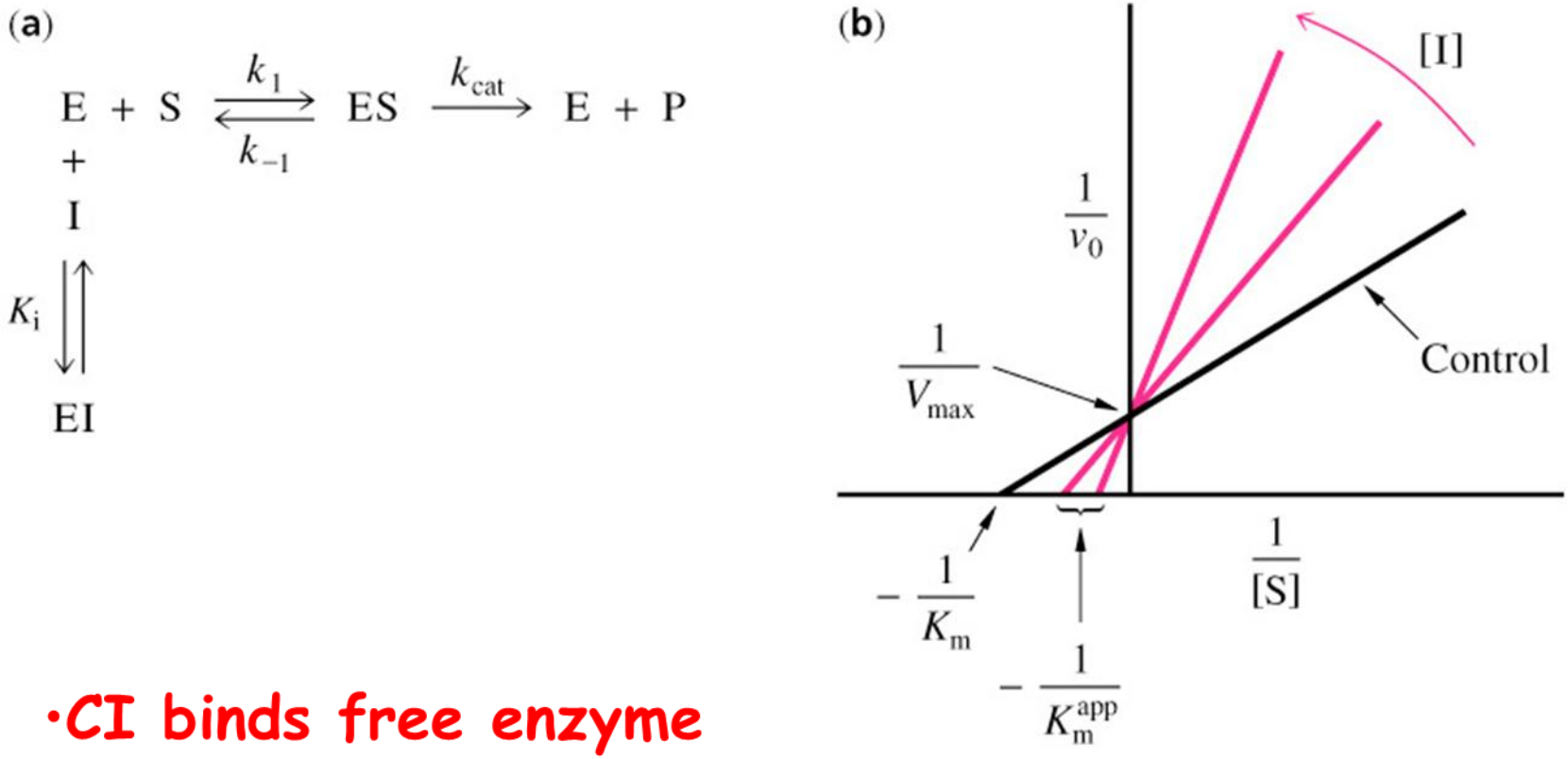
$$E + S \longrightarrow ES \longrightarrow E + P$$

$$+$$

$$I$$

$$\downarrow$$

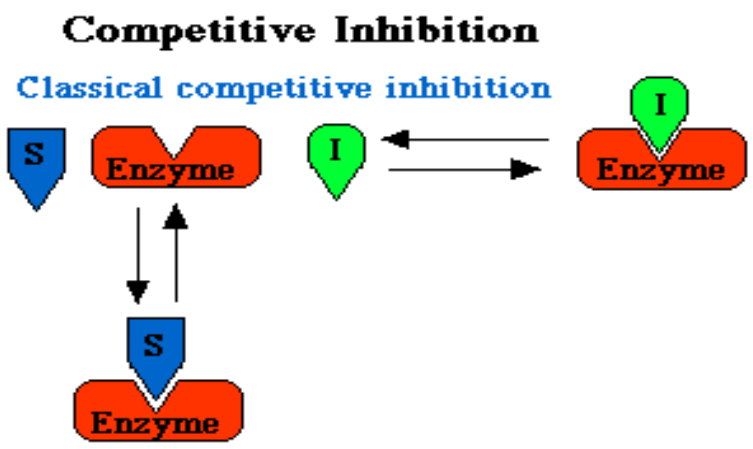
$$EI$$



- CI binds free enzyme
- Competes with substrate for enzyme binding.
- Raises Km without effecting Vmax
- Can relieve inhibition with more S

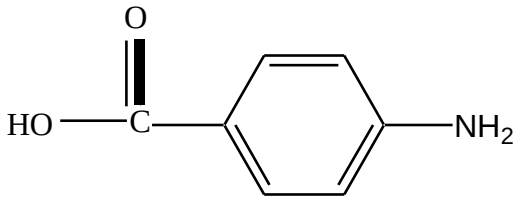
التثبيط العكسي **التثبيط التنافسي**
Competitive Inhibitors

- تثبيط الأنزيم سكسنيت ديهيدروجينيز الذي يحفز إزالة ذرتين من الهيدروجين من السكسنيت لينتج الفيوميريت ويثبط بواسطة مالونيت المشابهة للسكسنيت باحتوائها عل مجموعتين من الكربوكسيل ولكن لا تزال منه ذرات الهيدروجين.

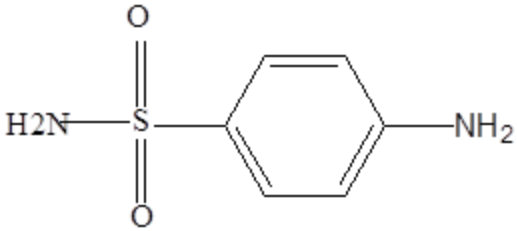


Competitive Inhibitors look like substrate

التركيب الكيمياوي للمثبط مشابها لتركيب المادة الاساس لذلك الانزيم



PABA
P-amino benzoic acid



Sulfanilamide

PABA precursor to folic acid in bacteria

$O_2C-CH_2-CH_2-CO_2$ --------> $O_2C-CH=CH-CO_2$

succinate fumarate

Succinate dehydrogenase

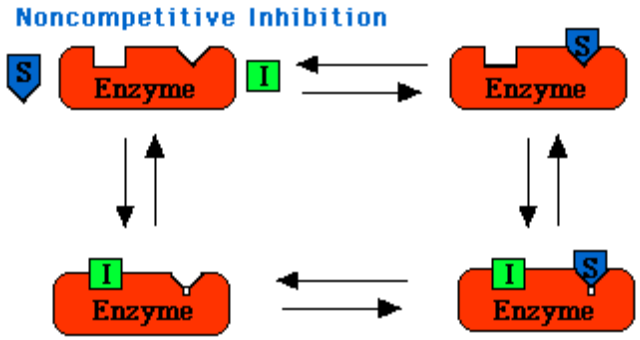
$O_2C-CH_2-CO_2$

Malonate

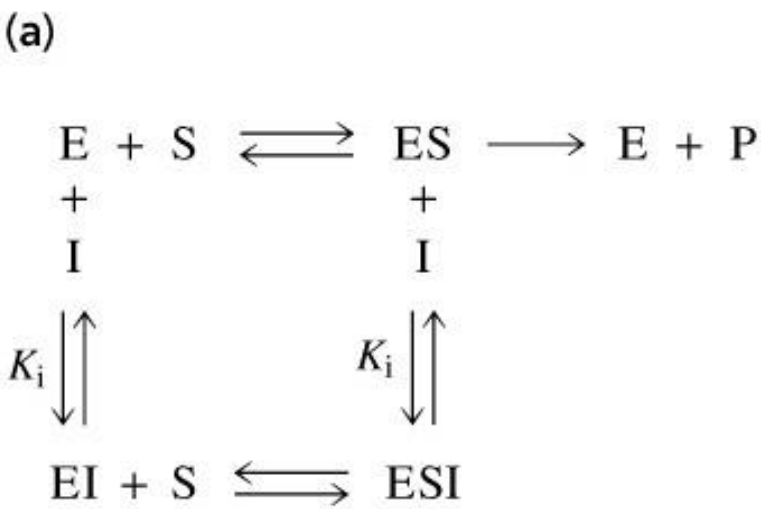
المثبط التنافسي سلفانيل اميد sulfanilamide تركيبه مشابها للمركب p-amino benzoic acid الذي يعد عامل لنمو البكتريا كونه احد مكونات حامض الفوليك folic acid وهو فيتامين ضروري للانقسام الخلوي وبهذا تستعمل مركبات sulfa drugs كمضادات بكتيرية antibacterial كون البكتريا لا تستطيع التمييز بينه وبين PABA وبهذا يقل او ينعدم تكوين حامض الفولك مما يؤدي الى ايقاف النمو البكتيري

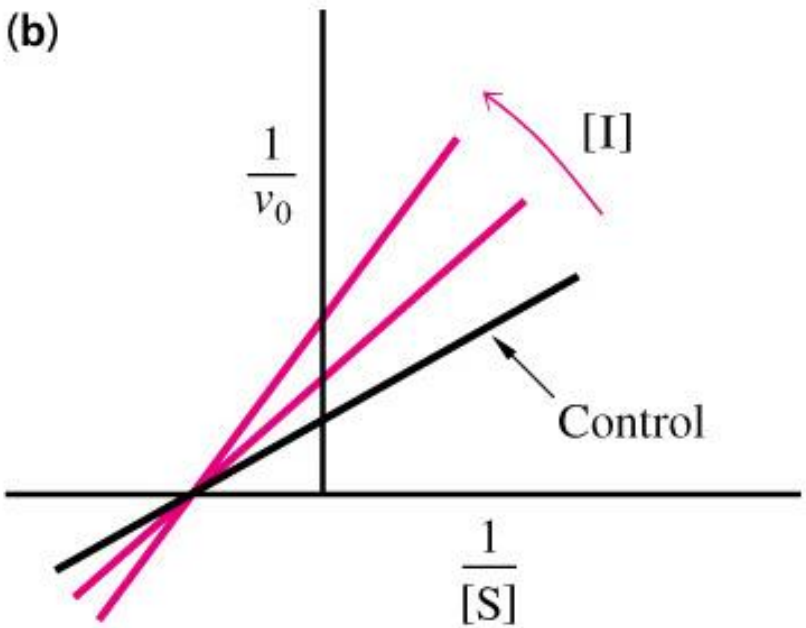
التثبيط العكسي

- **التثبيط غير التنافسي Non-Competitive Inhibitors**
- هذا النوع من التثبيط لا يمكن ابطاله بزيادة تركيز مادة الاساس ، اذ يعتمد مقدار التثبيط على تركيز العامل المثبط وميل الانزيم للارتباط به . يقلل التثبيط غير التنافسيه من سرعة التفاعل القصوى (Vmax)ويعود ذلك لانخفاض عدد الانزيمات الفعاله (غير مرتبطه بالمثبط)
- يرتبط هدا المثبط في موقع في الإنزيم يختلف عن الموقع الفعال
- لا يغلق ارتباط هدا المثبط مكان ارتباط المادة الأساس
- الإنزيم يكون غير نشط في حال ارتبطت به المادة الأساس أو لم ترتبط



Non-competitive Inhibitor (NI)





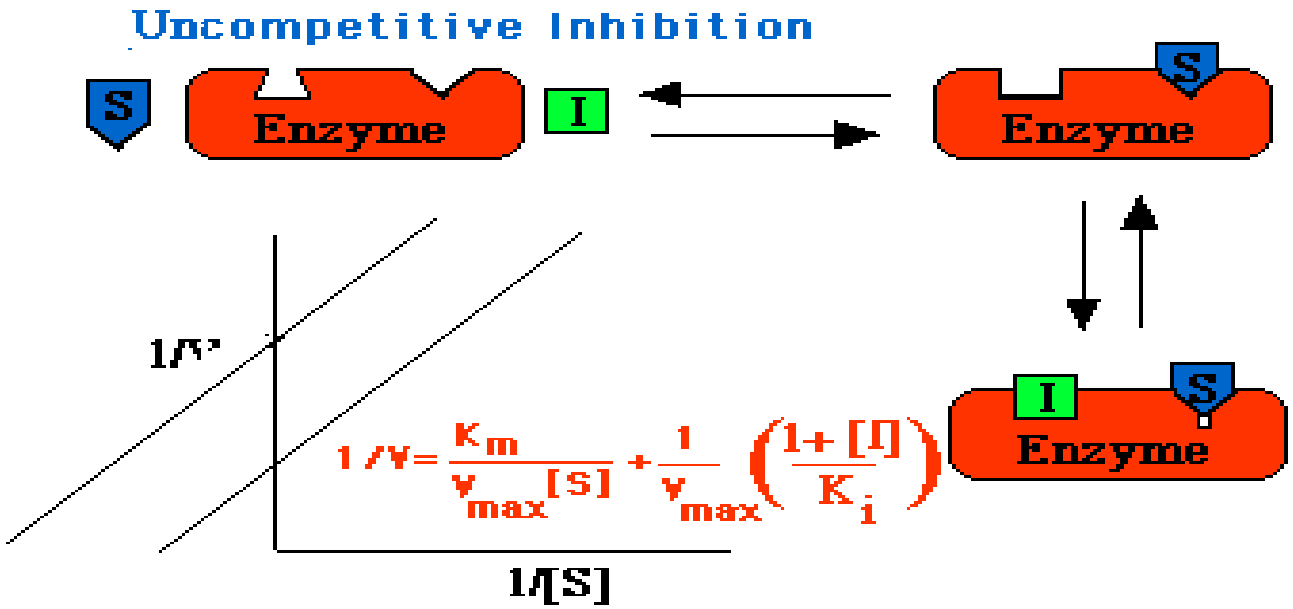
- NI can bind free E or ES complex
- Lowers Vmax, but Km remains the same
- NI's don't bind to S binding site therefore don't effect Km
- Alters conformation of enzyme to effect catalysis but not substrate binding

مثال التثبيط الغير التنافسي

- تحتاج بعض الأنزيمات الارتباط مع أيونات المغنيسيوم لإظهار فعاليتها وعند إضافة عوامل مثبطة تودي الي تكوين مركبات معقده مع ايون المغنيسيوم فتثبط مثل هذه الأنزيمات.
- السيانيد الذي يتحد عكسيا مع ذرات الحديد لبعض الأنزيمات المحتويه على الحديد ويثبط عملها

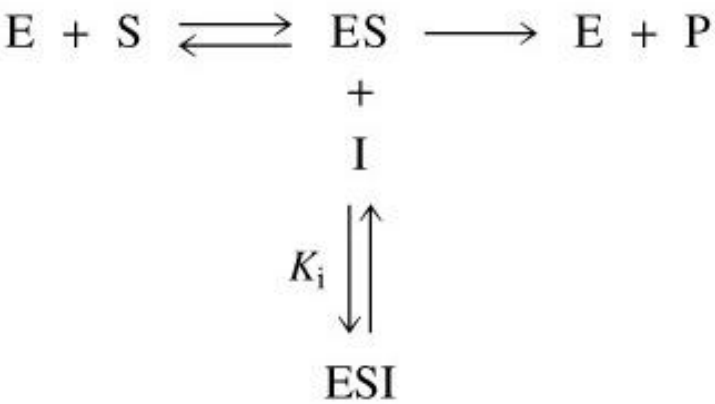
التثبيط اللاتنافسي Uncompetitive inhibition

- يرتبط هدا المثبط في موقع في الإنزيم يختلف عن الموقع الفعال
- يرتبط هدا المثبط فقط مع معقد الإنزيم- المادة الاساس

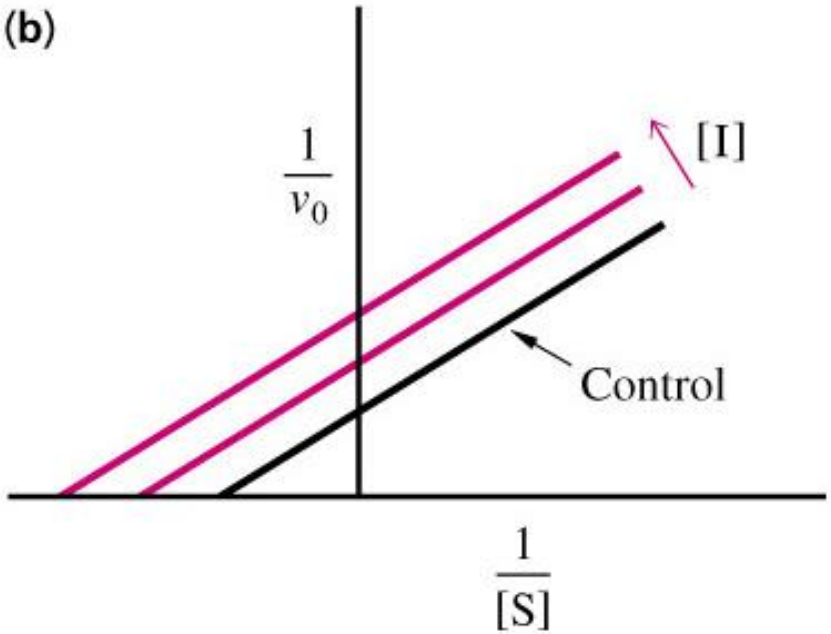


Uncompetitive Inhibitor (UI)

(a)



(b)



- UI binds ES complex
- Prevents ES from proceeding to E + P or back to E + S.
- Lowers Km & Vmax, but ratio of Km/Vmax remains the same
- Occurs with multisubstrate enzymes

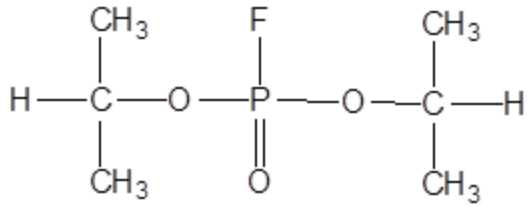
Irreversible inhibition (poisons of enzymes

التثبيط غير العكسي (تسمم الانزيم)

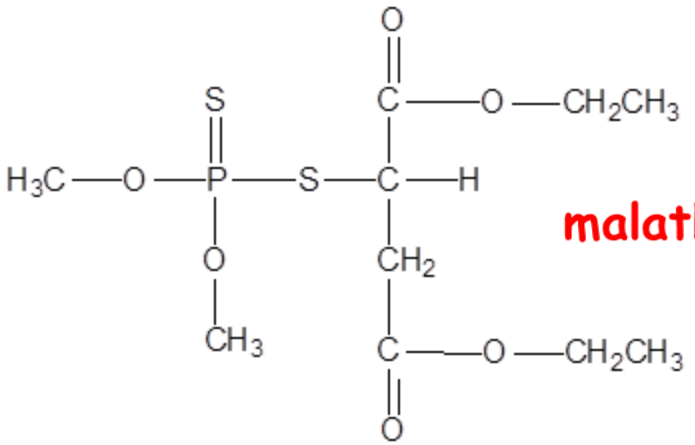
هناك مثبطات (سموم) غير عكسية للأنزيمات مختلفة مثل مركب ايودواستاميد iodoaccetamide ، ايونات المعادن الثقيلة مثل (Ag^{+},Hg^{+2}) ايون الفضة والزئبق التي تتحد بقوة مع مجاميع الثايول لبعض الانزيمات بحيث لا يمكن فصلها عن الانزيم بالتخفيف او عملية الفرز الغشائي ، وهذا الارتباط يؤول الى تحريف لأنزيم وخفض فعاليته ثم توقفها كلياً.

ان تركيب هذه المثبطات لا يشابه تركيب المادة الاساس للأنزيم لذا فأن زيادة تركيز المادة الاساس لا يلغي تأثير عمل هذه المثبطات غير ان وجود مادة اساس واحدة او اكثر او ناتج او اكثر من ذلك التفاعل الانزيمي قد يحمي الانزيم من تأثير هذه المثبطات غير العكسية، ان رسم لاينويفر بيرك لهذه المثبطات مشابها للرسم المتحصل عليه في حالة التثبيط غير التنافسي العكسي. ومن الامثلة على هذا النوع هو الغز السام للاعصاب DFP

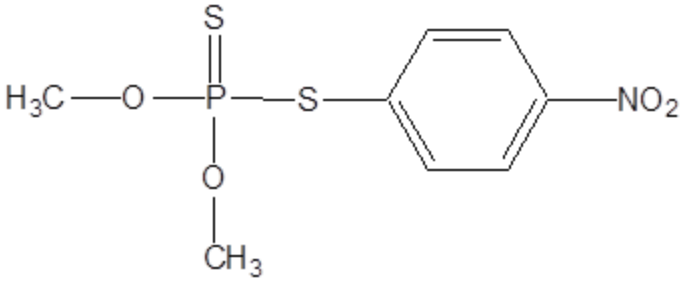
Irreversible Inhibitors



Diisopropyl fluorophosphate
(nerve gas)

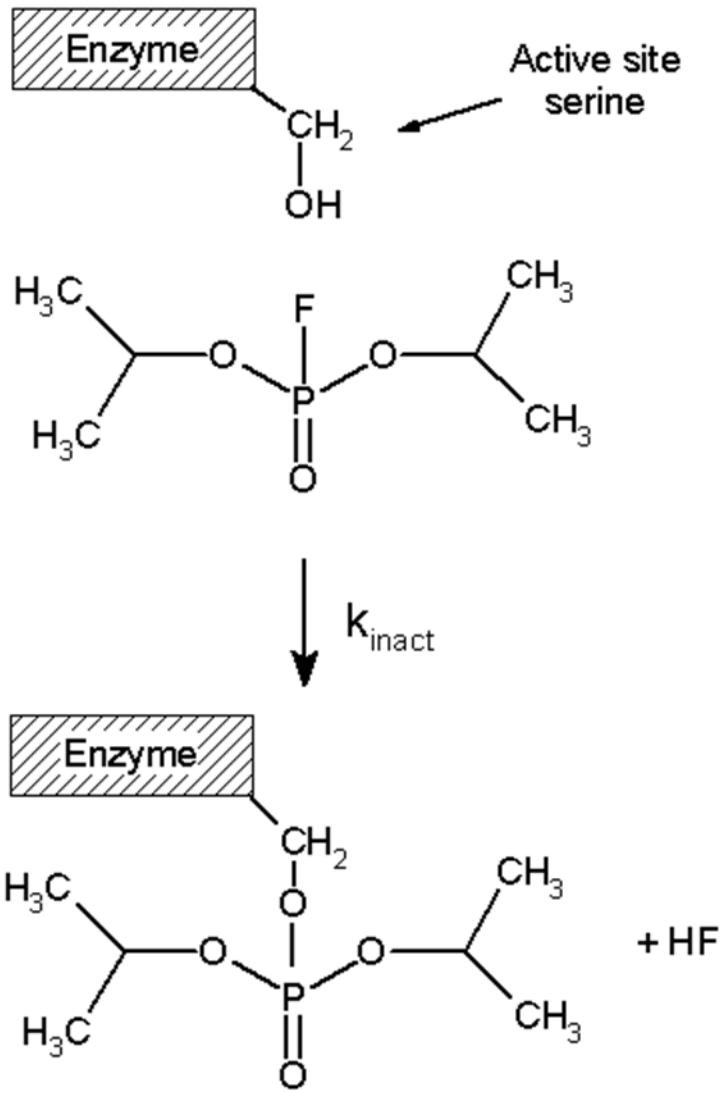
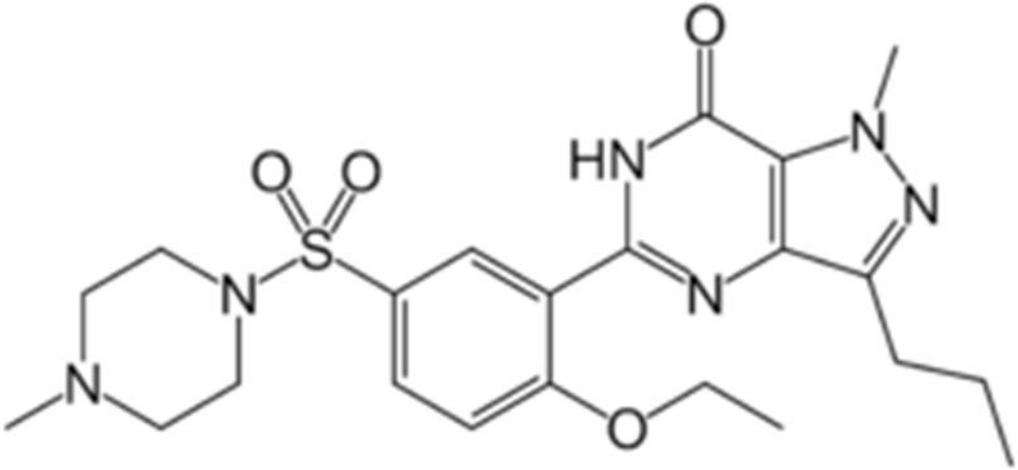


malathion



parathion

- Organophosphates
- Inhibit serine hydrolases
- Acetylcholinesterase inhibitors


Enzyme
Active site
serine
CH2
OH
H3C
F
CH3
O
O
P
H3C
CH3
O
kinact
Enzyme
CH2
H3C
O
CH3
O
O
+ HF
P
H3C
CH3
O

Viagra