

BIYOKİMYA

Enzimler

ENZİMLER

- Enzimler biyokimyasal katalizörlerdir. Yani kendileri değişime uğramadan bir reaksiyonu hızlandıran katalist moleküllerdir.
- Enzimlerin hemen hepsi proteindir ve Globuler yapıdadırlar. Ancak, proteinlerin hepsi enzim değildirler. Enzimlerin katalitik özellikleri şaşırtıcıdır. Örneğin, kırmızı kan hücrelerimizde bulunan **karbonik anhidraz** karbon dioksiti karbonata çevirerek zararsız hale getirir:
$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$$
 Bu enzimin bir molekülü 1 saniyede 10^6 molekül CO_2 'i çevirir.
- **Katalaz** da böyle yüksek aktiviteli bir enzimdir ve dokularda oluşan zararlı hidrojen peroksidi suya ve oksijene çevirir:
$$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$

- Bir molekül katalaz bu reaksiyonu 1 saniyede 10^7 kez tekrarlar (turnover).
- Enzimlerin çoğu bu ve buna benzer yüksek oranlarda reaksiyonları hızlandırırırlarsa da, bazı istisnalar da vardır.
- Örneğin, bakteri hücre duvarındaki glikozidik bağları eriten **lizozim** enziminin 1 molekülü sadece saniyede 1 bağ kırabilmektedir.

- Enzimlerin en önemli özelliklerinden bir tanesi de yüksek spesifite göstermeleridir.
- Her enzim sadece bir çeşit reaksiyonu katalizler ve o reaksiyonun substrat (reaktan) ve ürünlerine karşı özel spesifite gösterir.
- Örneğin, **tripsin** enzimi bir polipeptidi daima lizin veya arjinin amino asitlerinin bulunduğu yerden keser. **Kimotripsin** ise aynı işi fenilalanin, tirozin ve triptofan bölgelerinden yapar.

- Hücrenin canlılığı bir çok kimyasal reaksiyonun koordineli olması ile mümkündür.
- Bu işbirliğinin herhangi bir noktasında meydana gelecek bir bozukluk (örneğin, o basamaktaki enzimin yapısının önemli ölçüde bozulması) tüm hücre veya tüm canlıyı olumsuz etkiler.
- Kolaylık olması açısından enzimler katalizledikleri ana reaksiyon tipine göre uluslararası Enzim Komisyonu (EC) tarafından 6 ana gruba yerleştirilebilirler:

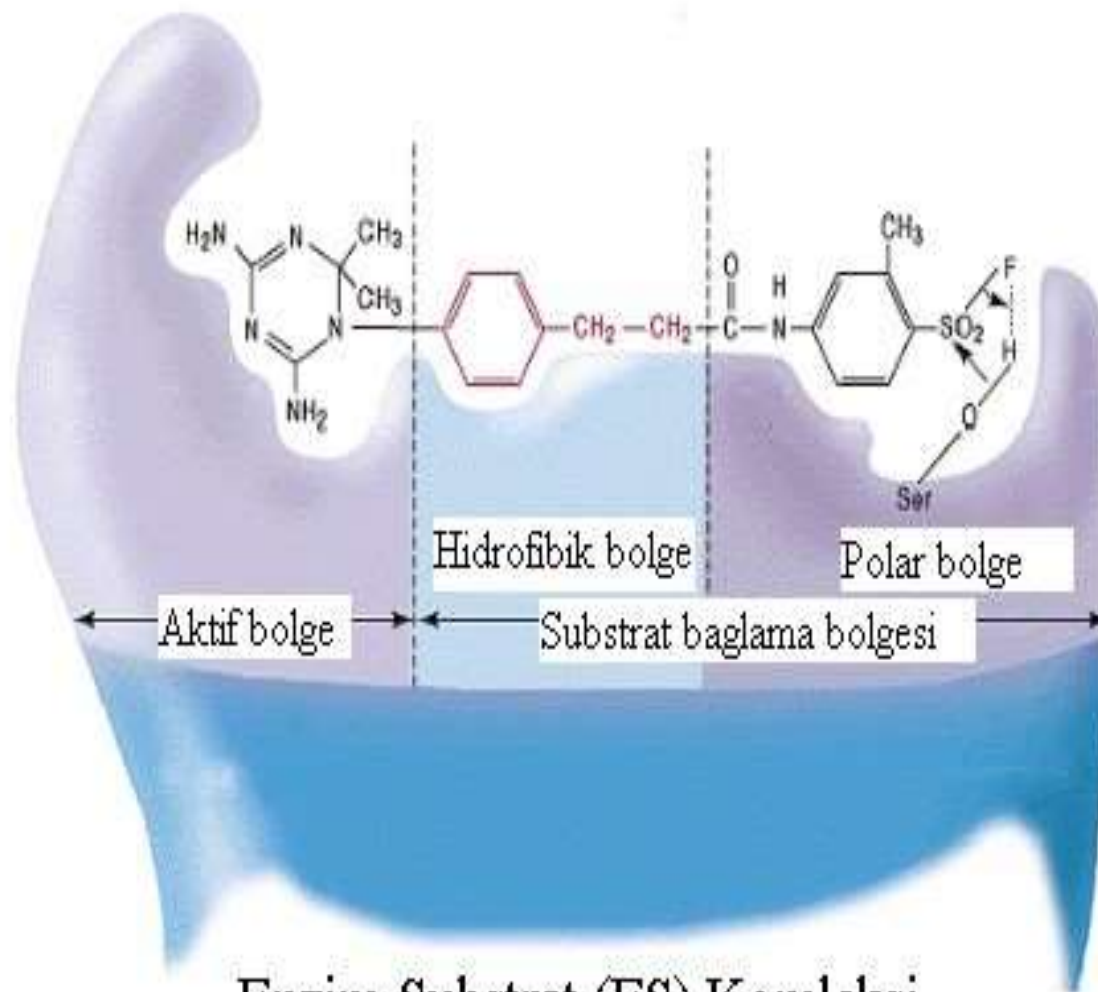
1. *Oksidoreduktazlar* (Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizlerler)
2. *Transferazlar* (fonksiyonel bir grubun bir molekülden diğer bir moleküle transferini katalizlerler)
3. *Hidrolazlar* (moleküle su molekülü sokarak bağ kırarlar)
4. *Liyazlar* (çift bağ yapar veya kırarlar)
5. *İzomerazlar* (molekülleri izomerlerine çevirirler)
6. *Ligazlar* (iki molekül arasında bağ oluşumunu katalize ederler)

- EC sisteminde enzim numaralaması her enzim için birbirinden nokta ile ayrılan ve önüne EC konan 4 sayıdan oluşan bir yöntemle yapılır.
- Ör. Bir hidrolaz olan ve L-asaparajin amino asitini aspartik asit ve amonyağa çeviren L-asparajinaz enziminin EC sistemi ile gösterimi,
- **EC 3.5.1.1** şeklindedir.

- Hücrede bir çok enzim sentezlenir. Ayrıca, bir çok enzim doku veya organ spesifitesi gösterir.
- Bazı enzimlerin hücrede sürekli üretilmesi gerekir (örneğin, enerji üretiminden sorumlu enzimler).
- Diğer bazı enzimler ise gerekli oldukları zaman ancak yapılırlar ki, gen regülasyonu konusunda bunlar üzerinde duracağız (örneğin, DNA replikasyonu için gerekli enzimler hücre çoğalamaya başlayacağı zaman en aktif şekilde yapılırlar).

- Enzimlerin bazıları aktivite için bazı küçük moleküllere ihtiyaç duyarlar ki bunlara **kofaktör** (prostetik grup) denir.
- Kofaktörler Mg^{2+} , Fe^{2+} gibi basit inorganik iyonlar veya **koenzim** denen daha kompleks organik moleküller olabilirler.
- Aktivite için gerekli kofaktörü taşımayan enzime **apoenzim** denir. Enzim bu şekilde inaktif haldedir. Aktif halde bulunan enzime ise (kofaktör + apoenzim) **holoenzim** denir.

- Reaksiyonların enzimatik katalizi canlı sistemler için esastır.
- Canlılarda enzimlerin girmediği reaksiyonlar yavaş yürürler. Yiyeceklerin sindirimi, sinir impulslarının iletimi, kas kasılımı gibi olayların hepsi enzimler olmadan önemli bir oranda gerçekleşmezler.
- Enzimler bu bariyeri ilgili moleküller etrafında uygun bir ortam oluşturarak reaksiyonların enerjistik olarak uygun duruma gelmelerini sağlarlar.



Enzim-Substrat (ES) Kompleksi

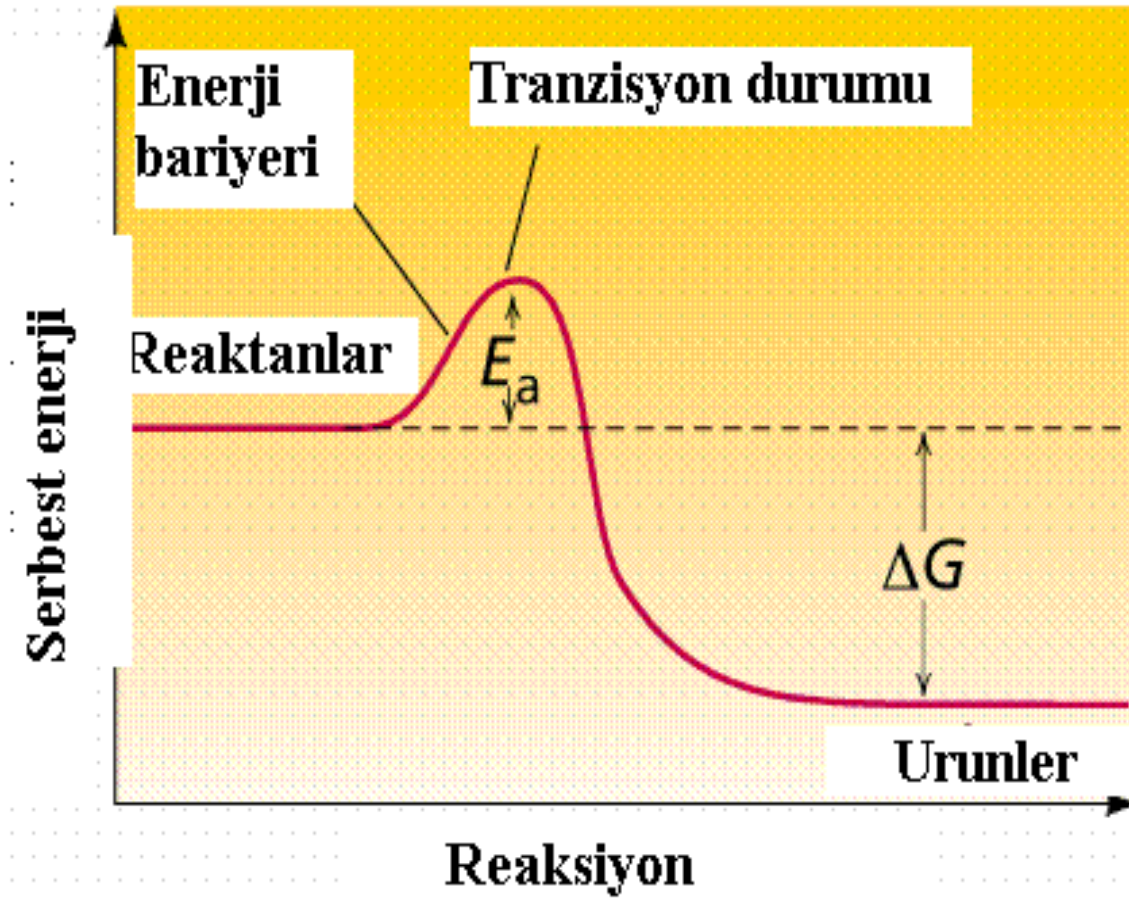
- Enzimle katalize olan reaksiyonda bu olay enzimin **aktif bölgesi** denen bir özel kısımda gerçekleşir.
- Enzimin aktif bölgesine bağlanan ve islenen moleküle **substrat** (reaktan, S) denir.
- **Enzim-substrat kompleksi** enzimatik reaksiyonda merkezi rol oynar ve enzimatik reaksiyonların mekanizmasının matematiksel ifadesini (enzim kinetiği) sağlar.

Basit bir enzimatik reaksiyon,

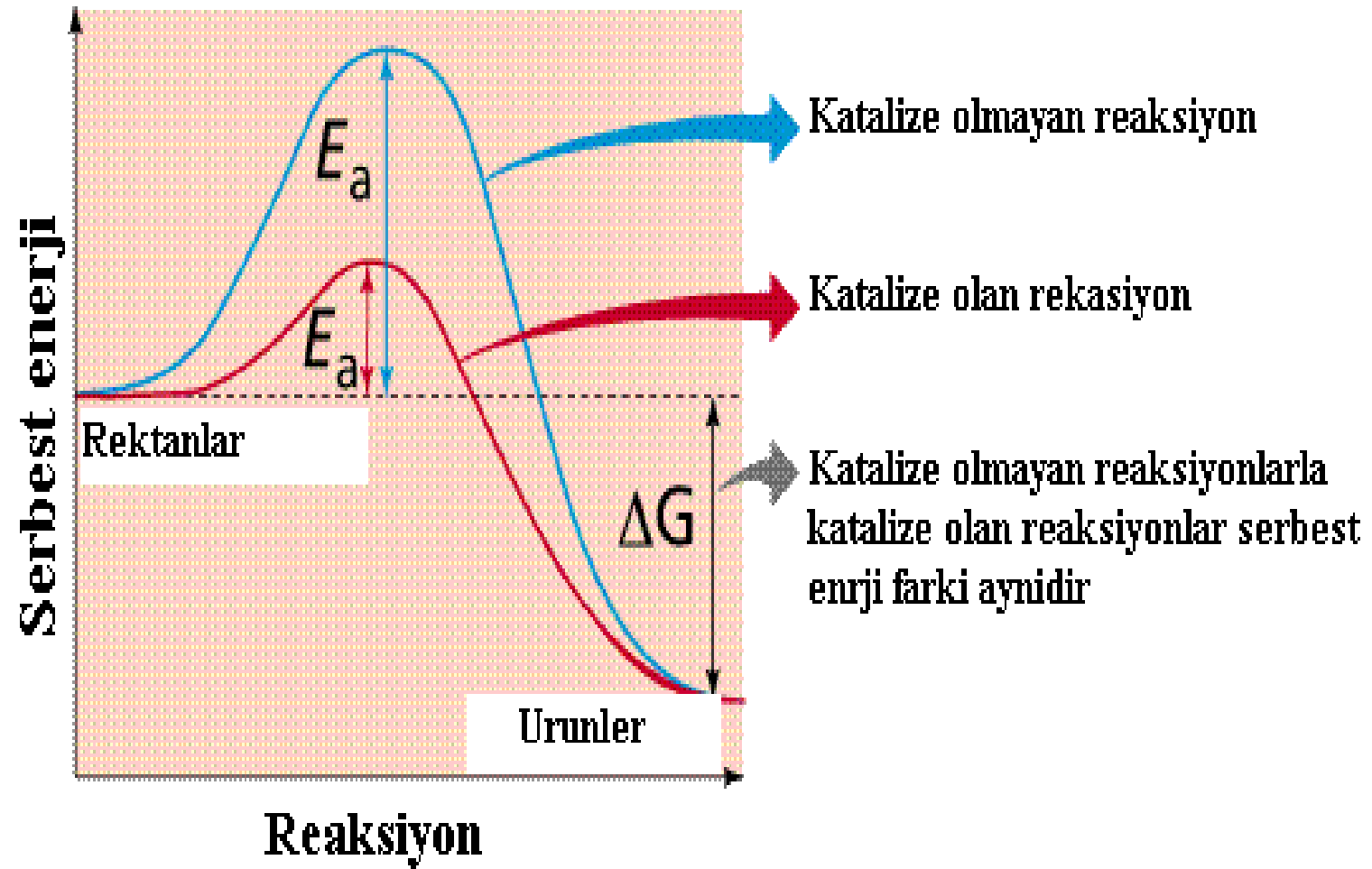


- Burada tek bir substrat tek bir ürüne ($S \rightarrow P$) dönüştürüldüğü için **bire-bir reaksiyon** denir. Ancak, enzimlerle katalizlenen reaksiyonların çoğu birden fazla (daha çok iki) substratı içerir.
- Örneğin, $S1 + S2 \rightarrow P$ reaksiyona **ikiye-bir reaksiyonu**, $S1 + S2 \rightarrow P1 + P2$ reaksiyonuna **ikiye-iki reaksiyonu** adi verilir.

- Enzim gibi bir katalizörün görevi **reaksiyon oranını** arttırmaktır. Enzimler kimyasal bir reaksiyonun **dengesini** değıştirmezler.



- Yukarıdaki şekilde enzimle katalize olan ve kimyasal olarak katalize olan reaksiyonun aktivasyon enerji farkı görülmektedir.
- Bu şekilde bir reaksiyonun enerjitik oluşum şekli gösterilmiştir.
- Eğrinin en tepe noktası **tranzisyon noktası**dır. Bu noktada madde eşit şansla hem geri reaktana ve hem de ürüne dönüşebilir.
- Tranzisyon noktası ile substrat veya ürünün eşik seviyesi (kararlı yapı) arasındaki enerji farkı **aktivasyon enerjisi** olarak bilinir.



- Pratikte herhangi bir reaksiyon **ara bileşikleri** içeren birkaç basamakta gerçekleşebilir (örneğin, glikozun glikolizis yolu ile piruvata oksidasyonu, triptofan sentezi, vs.).
- Böyle bir reaksiyonda reaksiyonun **oran-belirleyici basamağından** bahsedilir ki, bu basamak en yüksek aktivasyon enerjisine sahip olanıdır.
- Dolayısı ile enzimlerin hücrenin canlılığı için önemi olan böyle reaksiyonları mümkün kılmak (onların aktivasyon enerjisini düşürerek) için ortaya çıktıkları kabul edilmektedir.

Enzim aktivitesi, aktivitenin regülasyonu ve enzim kinetiği

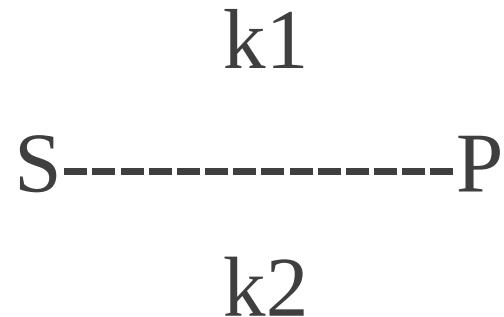
- Enzimatik çalışmaların çoğunda çalışılan enzimin molar konsantrasyonu bilinmez.
- Bu nedenle, enzimin miktarı **aktivite** cinsinden ifade edilir. Aktivite genellikle standart **ünite** olarak verilir. Dolayısıyla ile **1 ünite (U) enzim, dakikada 1 mikromol (μmol) ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarı anlamına gelir** (1 U enzim= $\mu\text{mol P/dak}$, burada P, ürün anlamındadır).
- Diğer protein veya enzimlerle karışık halde bulunan bir enzimin (örneğin, hücre ekstraktındaki bir enzimin) konsantrasyonu **ünite/ml** cinsinden ifade edilir.

- Eğer böyle bir karışımdaki hücre protein konsantrasyonunu belirlersek (örneğin ml ekstrakta kaç mg protein olduğunu) ve 1 mg proteindeki enzim ünite sayısını hesaplarsak spesifik aktiviteyi elde ederiz.
- **Yani diğer bir deyimle bir enzimin spesifik aktivitesi=
ünite/mg protein veya $\mu\text{mol P/dek/mg}$ anlamına gelir.** Her enzim kendine has spesifik bir aktiviteye ve dolayısı ile **turnover sayısı (kcat)**'na sahiptir.
- Bir enzimin turnover sayısı, 1 mol enzim tarafından dakikada çevrilen mol substrat sayısıdır (veya 1 μmol enzim tarafından dakikada çevrilen μmol substrat sayısıdır).
- Diğer bir deyimle bu sayı $V_{\text{max}}/[E]_t$ 'a eşittir ($[E]_t$ = ortamdaki toplam enzim, yani $[ES]+[E]$).

- Vücut (veya hücre) enzim aktivitesini bir çok şekilde düzenler (regüle eder).
- Bunu o ilgili enzimin **sentez/parçalanma oranını** değiştirerek yapar. Bazı durumlarda ise enzim molekülünde yapılan **kovalent bir modifikasyon** özelliğine göre o enzimin aktivitesi azalabilir veya tersi artabilir.
- Diğer bir alternatif yol ise, enzime başka moleküllerin bağlanarak onun aktivitesini azaltmaları (negatif regülasyon) veya arttırmaları (pozitif regülasyon)'dir.
- Enzim aktivitesine bu şekillerde etki eden bu moleküllere **efektör moleküller**, aktiviteleri bu şekilde düzenlenen enzimlere ise **allosterik enzimler** denir.

- Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen özel proteinlerdir. Reaksiyon hızını 10^6 - 10^{10} kat hızlandırırlar.
- Bütün biyolojik reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenir, bu nedenle farklı amaçlar için çok sayıda enzim görev yapar.
- Enzimatik reaksiyonlar, enzim reaksiyonlarının anlaşılması, enzim aktivitesi, değişik şartlar altında (pH, ısı, inhibitör, vb) bu aktivitelerin nasıl etkilendiğini anlamak için çalışılır.

- Enzimle katalize olan bir reaksiyonda, enzimin etki edip bir ürüne (P) çevirdiği maddeye **substrat** (S) denir. Her enzim spesifik bir substratı isleyebilir. Enzim ile substrat arasındaki komplekse **enzim-substrat kompleksi** denir. Enzimler reaksiyon hızını milyonlarca kere arttırırken, reaksiyonların enerji seviyelerine ve hangi yönde olacaklarına etki etmezler. Örneğin,

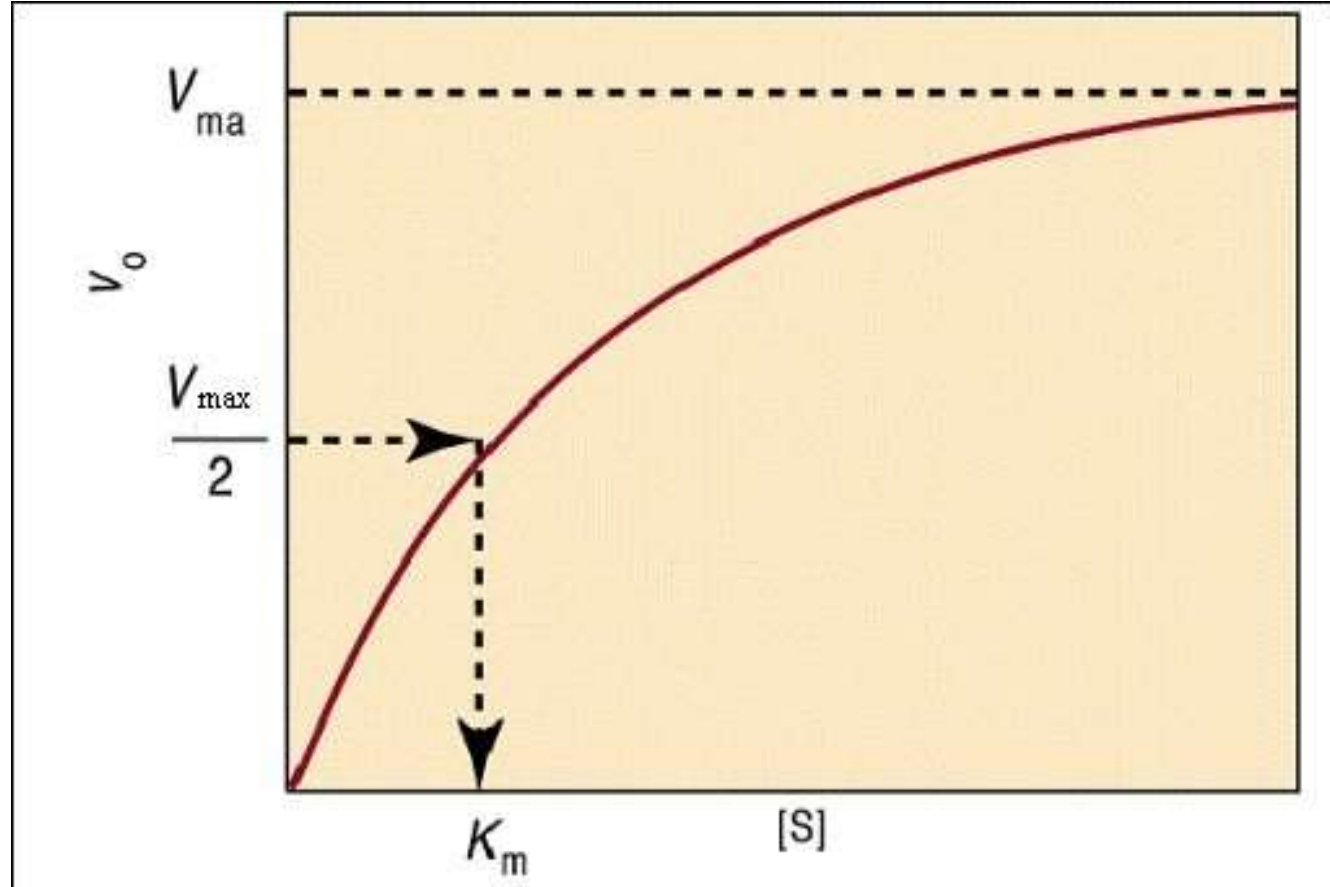


- Enzimatik reaksiyonda k_1 ve k_2 aynı oranda etkilenir. Eğer k_1 bir milyon kez artarsa, k_2 de bir milyon kez artar ve dolayısı ile denge sabitesi sabit kalır.
- Reaksiyon oranını arttırmak için iki yol vardır.
 1. ısıyı yükseltmek
 2. aktivasyon enerjisini düşürmek.
- Hücreler genellikle düşük ısılarda yasayabildiklerinden (0-100 oC), bu ısı aralığında hemen hemen hiç bir kimyasal reaksiyon enzimler olmadan olmaz.
- Enzim olamadan bir reaksiyonun kimyasal katalizasyonu oldukça yüksek sıcaklıkları ($\gg 100$) ve ekstrem şartları (ör, H) gerektirir.

- Burada K_m 'e M&M sabitesi denir.
- K_m reaksiyonun maksimum hızının (v_{max}) yarısına tekabül eden substrat konsantrasyonudur.
- Dolayısı ile birimi de $[S]$ ile aynıdır. Bir çok enzim için K_m değeri 10^{-1} ila $10^{-6}M$ arasında değişir.
- K_m değerinin bilinmesi ile hücre içi $[S]$ konsantrasyonunun belirlenmesi mümkündür.
- Çünkü $[S]$ 'in K_m 'den büyük ölçüde büyük veya küçük olması mümkün değildir.
- Örneğin, $[S]$ 'yi K_m 'in 1000 katı yaparsak, enzim reaksiyon hızında sadece 2 kat artış olur; $[S] = K_m$ halinde $v = v_{max}$ $[S]/K_m + [S]$ 'den $v = v_{max}K_m/K_m + K_m = \frac{1}{2} v_{max}$ iken,
- $[S] = 1000K_m$ halinde $v = v_{max} (1000K_m)/K_m + 1000 K_m \cong v_{max}$ olur.

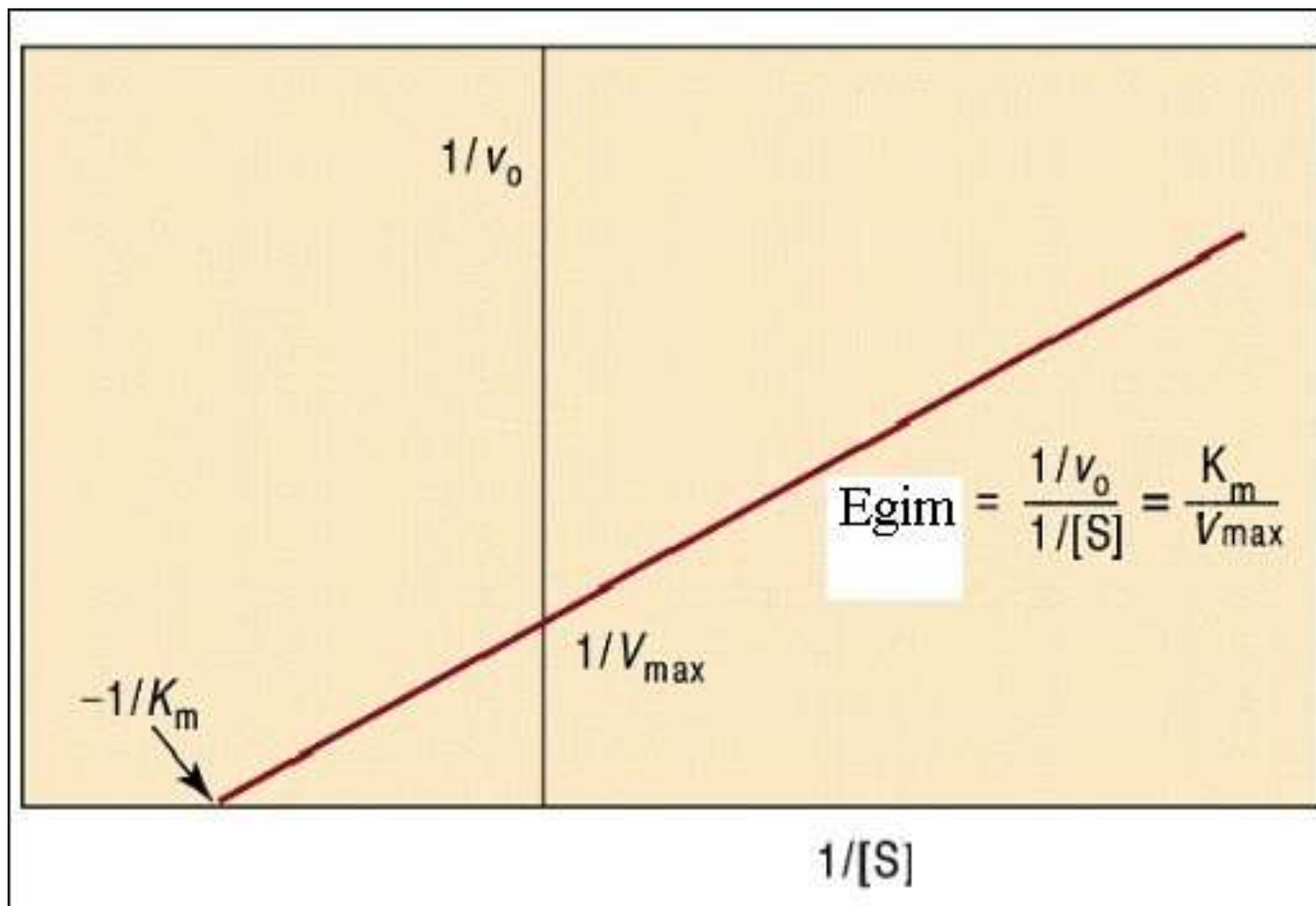
- Eğer bir enzim-substrat reaksiyonunda K_m 'i biliyorsak, reaksiyonun şartlarını v_{max} 'ı hesaplamak için ayarlayabiliriz.
- Spesifik bir enzimin alternatif substratlarının bulunup bulunmadığını da K_m 'i bilmekle mümkün olur.
- En düşük K_m 'e sahip reaksiyonlarda enzimin substrata olan ilgisi en yüksek derecededir.
- Tipik M&M eşitliğine göre, enzim-substrat reaksiyonlarında (eğer enzim miktarı sabit, substrat miktarı değiştiriliyorsa) hiperbolik bir eğri elde edilir ve bu eğri aracılığı ile enzimatik reaksiyonların çok önemli kinetik sabiteleri olan V_{max} ve K_m hesaplanabilir.

- $v = v_{\max}[S] / (K_m + [S])$ 'i veren eğri aşağıdaki gibi bir yapı gösterir;



- $[S]$ = substrat konsantrasyonu M, mM, nM (daha seyrek olarak mg/ml veya $\mu\text{g/ml}$) ifade edilir.
- v = herhangi bir andaki reaksiyon hızını ifade eder.
Birimi absorbana artışı/dak, mmol/litre/dak, $\mu\text{mol/ml/dak}$, nmol/ml/dak gibi bir çok şekilde ifade edilebilir.
- v_{max} = Ortamdaki tüm enzimin (katalitik bölgelerin) substratla dolu olduğu andaki reaksiyon hızını ifade eder.
- K_m = v_{max} 'ın yarısına denk gelen $[S]$ 'dir.

- Yukarıdaki eğride görüldüğü gibi, reaksiyonların K_m ve v_{max} 'ını tipik hiperbolik M&M eğrileri ile tam olarak belirlemek zordur.
- Bu nedenle orijinal eşitlik lineer grafik verecek şekilde sonradan çeşitli modifikasyonlara uğramıştır.
- Bunlardan **Lineweaver-Burk** ve **Eadie-Hofstee** en yaygın bilinenleridir. Lineweaver-Burk eğrisi kısaca M&M eşitliğinin ters çevrilimi (1 'e bolunuzu) ile elde edilir ve grafiğin x eksenini $1/[S]$, y eksenini ise $1/v$ olarak işaretlenir. Dolayısıyla ile orijinal eşitlik,
- $1/v = 1/v_{max} + K_m/v_{max} (1/[S])$ şeklini alır.

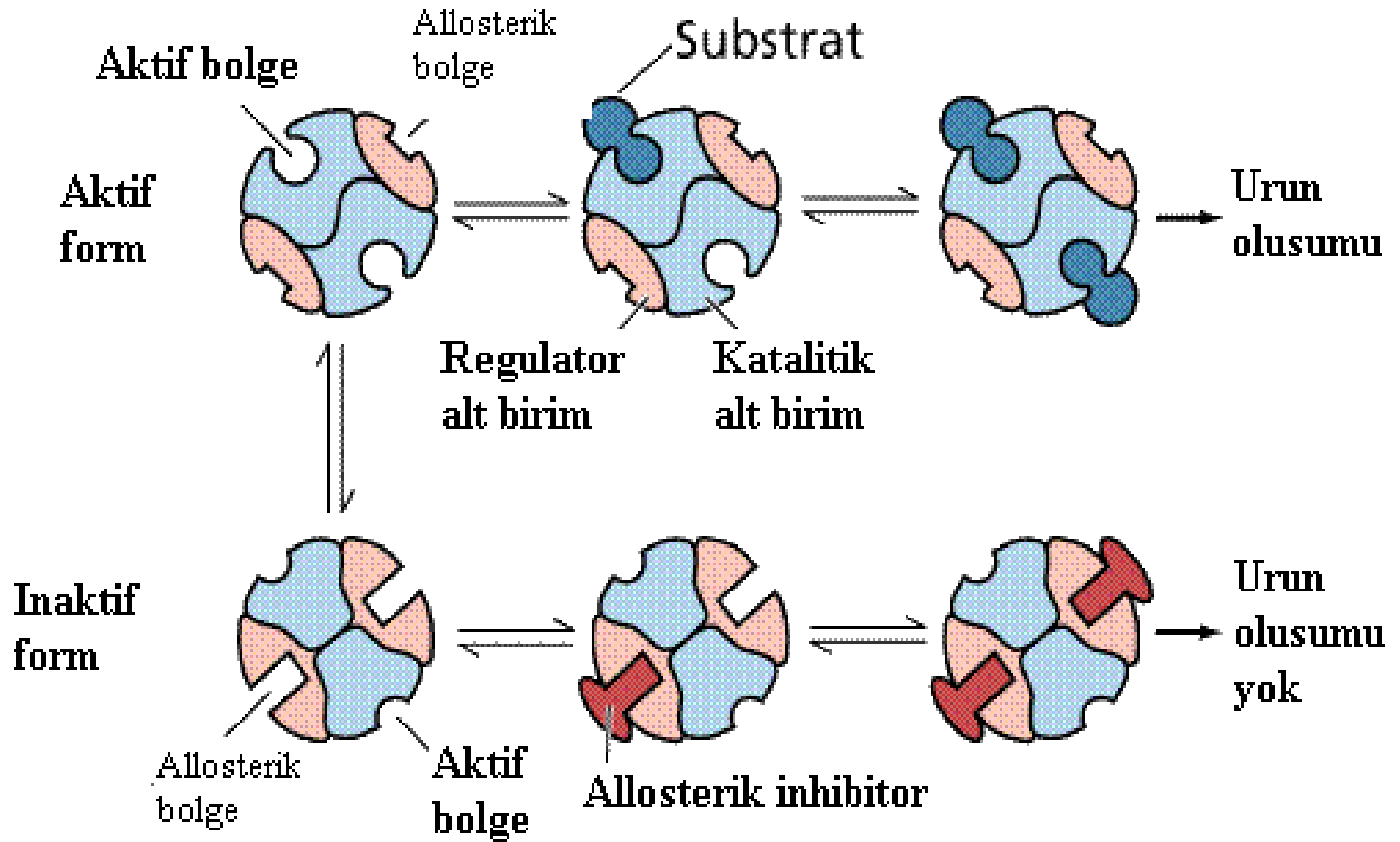


- Yukarıda görüldüğü gibi, orijinal M&M hiperbolik eğrisini veren veriler, Lineweaver-Burk eğrisinde grafiği lineer bir forma dönüştürmüştür ve K_m ve v_{max} değerleri sırası ile eğimin x ve y eksenini kesim noktalarından hesaplanabilir.
- Eadie-Hofstee eğrisi de lineer bir formdadır. Burada v verileri y ekseninde x eksenindeki $v/[S]$ verilerine karşı konularak eğri çizilir. Bunun için de orijinal M&M eşitliği,
- $v = v_{max}[S] / (K_m + [S])$
- $v = -K_m v/[S] + v_{max}$ sekline dönüştürülür. Eğrinin y eksenini kesen bölgesinden v_{max} hesaplanabilirken, x eksenini kesen noktasından K_m hesaplanır.

- Yukarıda K_m 'in bilinmesinin veya hesaplanmasının önemi üzerinde durduk.
- V_{max} 'ın bilinmesi (veya hesaplanması) da eşit derecede önemlidir.
- Farklı enzimlerin karşılaştırılması ancak onların V_{max} 'larının karşılaştırılması ile mümkündür.
- Bu da şu demektir: aynı molar miktarda olan değişik enzimlerin maksimum hızları (yani birim zamanda ürüne çevrilebilecek maksimum substrat miktarı) farklılık gösterir.
- Buna daha önce değindiğimiz gibi enzimin **moleküler aktivitesi** veya **turnover sayısı** denir.

- Bunu bir örnekle izah edersek, kanda $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ karbonik anhidraz H_2CO_3 gibi bir reaksiyonu verelim.
- Bu enzim katalazla beraber en yüksek turnover sayısına sahip olan bir enzimdir.
- Bu enzimin $1 \mu\text{g}$ 'nın böyle bir reaksiyonda $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol CO}_2/\text{dak}$ v_{max} 'a sahip olduğunu kabul edelim (yani bu miktar enzim dakikada $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol CO}_2$ 'yi ürüne çeviriyor olsun). Bu enzimin molekül ağırlığı 30,000 dalton veya kimyasal bir ifade ile 30,000 g/mol'dur. Dolayısı ile $1 \mu\text{g}$ enzim,
- $1 \mu\text{g} \times (10^{-6} \text{ g}/\mu\text{g}) \times 1 \text{ mol}/30,000 \text{ g} = 3.33 \times 10^{-11} \text{ mol}$ enzim demektir.

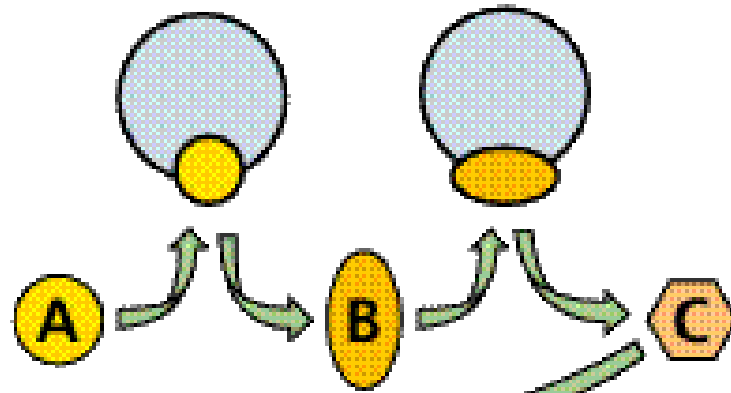
- Yani bu kadar mol enzim dakikada 1.2×10^{-3} mol CO_2 'yi çeviriyor demektir.
- Dolayısıyla ile enzimin moleküler aktivitesi (turnover sayısı) diğer bir deyimle k_p veya $V_{\max}/[E]$,
- $(1.2 \times 10^{-3} \text{ mol } \text{CO}_2/\text{dak}) / 3.33 \times 10^{-11} \text{ mol enzim} = 3.6 \times 10^7 \text{ mol } \text{CO}_2/\text{dak/mol enzim}$ 'dir.
- Yani, bir mol enzim dakikada 36 milyon substrat (CO_2)'i ürüne (H_2CO_3) çevirmektedir.



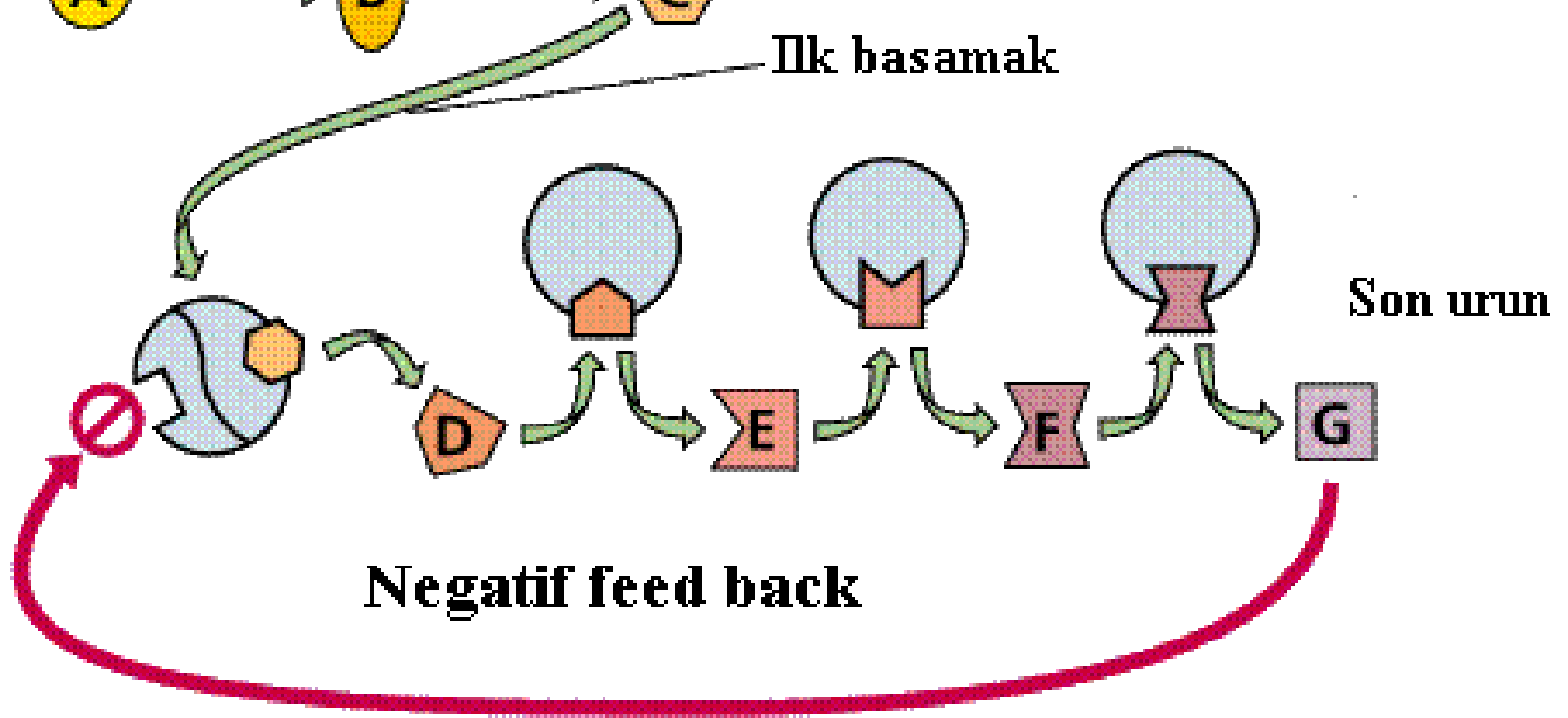
- Hücrede enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörler arasında kısaca substrat ve ürün konsantrasyonundaki değişimler, son-urun inhibisyonu (aşağıdaki şekil), allosterik aktivasyon veya inhibisyon, irreversibl inhibisyon, pH değişimi,enzimin kovalent modifikasyonu, enzimin sentez veya parçalanmasındaki değişim sayılabilir.

ENZİM

Substrat

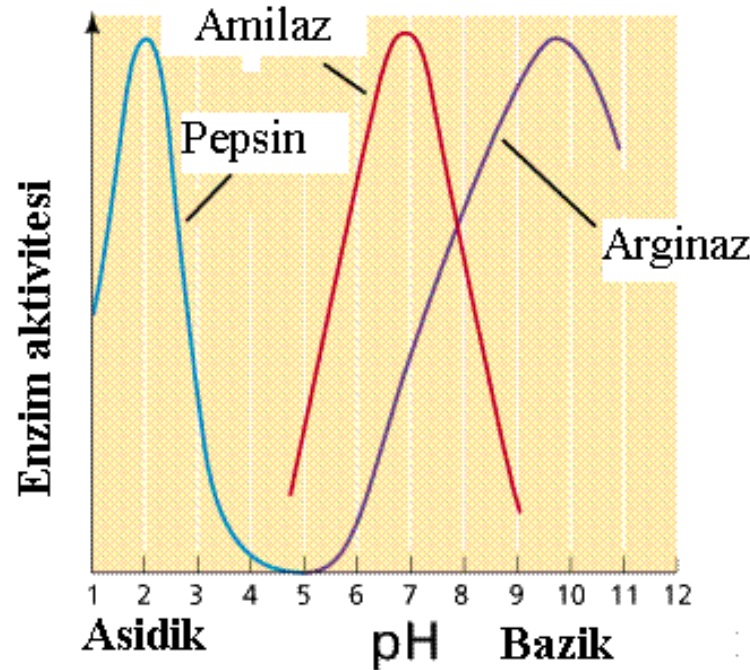


İlk basamak



- Hücre veya vücut pH değişimlerini tamponlama özelliği taşısa da (örneğin, kanda hemoglobin ve genelde vücuttaki karbonat tampon sistemi: CO_2 'nin karbonata dönüşümünü ve karbonatın bir tamponlayıcı ajan olduğunu hatırlayınız

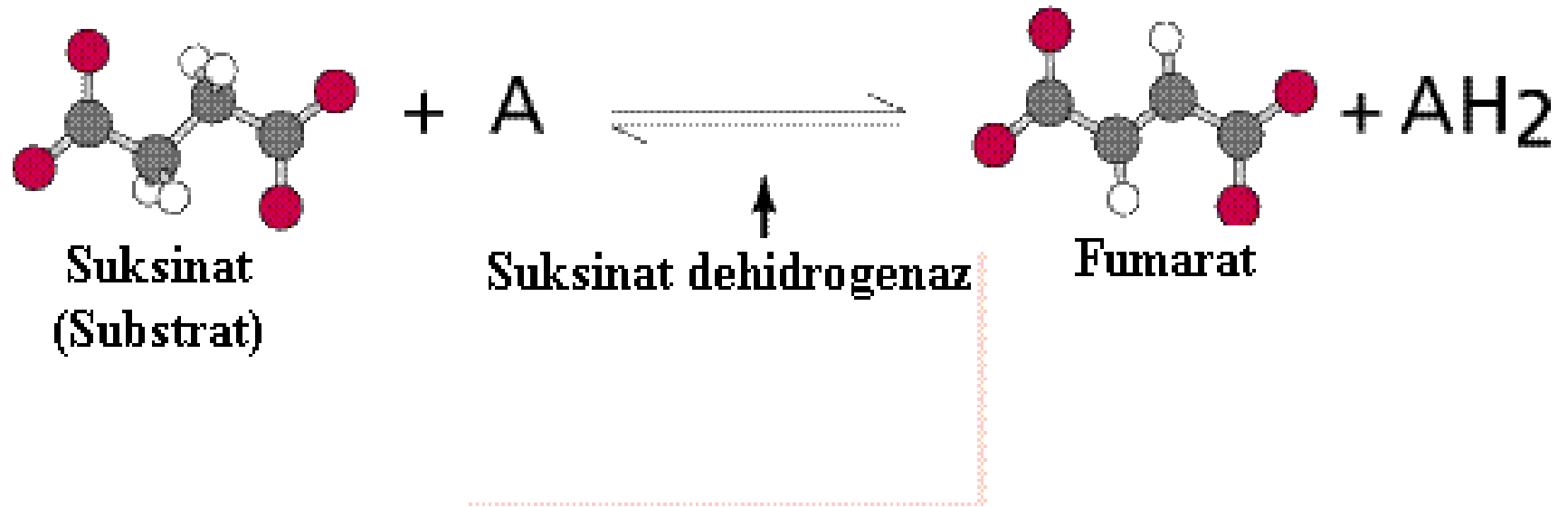
- Üç enzimin her biri belli pH'larda **optimal aktivite** gösterirler. Örneğin *pepsin* oldukça düşük pH'da (pH= 2.0, midede) aktif bir **proteaz** (protein parçalayan enzim) iken, aynı enzim ortam pH'sı nötr olduğundan sentezlenmiş olduğu hücrelerde inaktif durumdadır



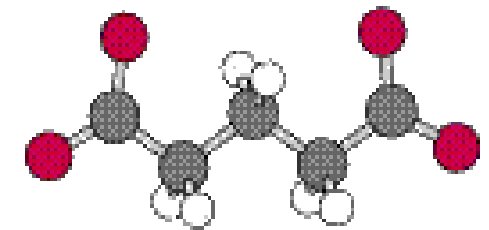
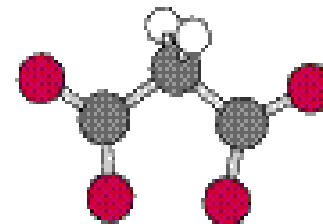
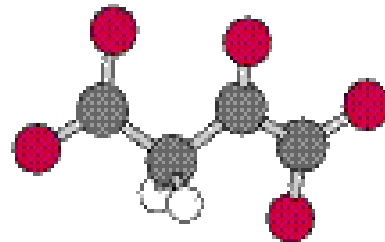
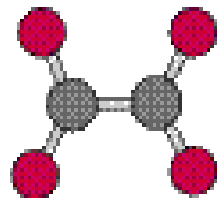
- Bazı enzimlerin spesifik **metabolitler** (metabolik maddeler) tarafından inhibisyonu ana metabolizma (glikolizis, krebs, vb)’in regülasyonunda oldukça önemlidir.
- Bu enzimlerin çoğu ”kooperatif olarak regüle olan allosterik enzimlerdir”.
- Ancak, **Miċhaelis-Menten (M&M) eşitliği** (Bkz. Enzim Kinetigi) eşitliğine göre davranan (hiperbolik bir aktivite eğrisi veren) enzimlerin hepsi **kooperatif olmayan enzimlerdir**
- Kooperatif olmayan enzimlerin reversibl inhibisyonu üç grup altında toplanabilir:

- ***kompetitif*** (substratla yarışan veya aktif bölgeye bağlanan inhibitörden kaynaklanan inhibisyon),
- ***kompetitif olmayan*** (aktif bölgenin dışında bir bölgeye bağlanan, dolayısı ile substratla aynı bölgeye bağlanmak için yarışmayan), ve
- ***unkompetitif*** (enzime değil fakat ES kompleksine bağlanan inhibitörün sebep olduğu inhibisyon).
Enzimatik inhibisyon bir çok ilaç tedavisinde başvurulan bir yöntemdir.

Burada, bu yapıların enzimin doğal substratları olan süksinat



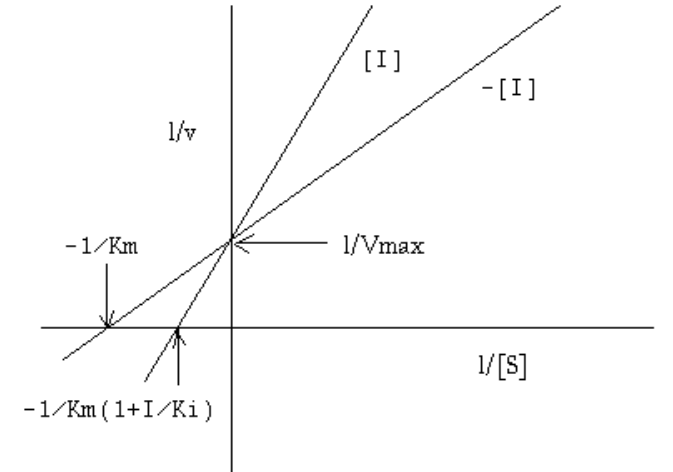
KOMPETATIF INHIBİTORLER



- Böylece, bu dört madde substratın bağlandığı aktif bölgeye bağlanarak süksinat dehidrogenazın süksinat veya fumarata bağlanmasına engel teşkil ederler.
- Ancak, bunların hepsi kompetatif inhibitör olduklarından, eğer doğal substrat konsantrasyonunu bu maddelerin çok üzerinde alırsak enzim yine maksimum hızına yakın bir hızla çalışır (yani süksinatı fumarata çevirir).

- Aşağıdaki grafikte de gösterildiği gibi, inhibitörün varlığında ($[I]$) veya yokluğunda ($-[I]$), eğri y eksenini (intersept, $1/v$ eksenini) aynı noktadan keser. Ancak eğim inhibitör (I) varlığında farklılık gösterir ve K_m değişir. Bu grafik tipik bir kompetatif inhibisyon seklini ifade eder (inhibitörün varlığında V_{max} aynı, fakat K_m büyür). Dolayısı ile inhibitörün varlığında herhangi bir zamandaki hız (v);

- $v = V_{max} [S] / K_m (1 + I/K_i) + [S]$ olur.



- Normal M&M için geçerli bu formülü, formülü yukarıdaki çift-taraflı Lineweaver-Burk grafiğine uyarlarsak,
- $1/v = 1/V_{\max} + K_m/V_{\max} (1 + I/K_i)(1/[S])$ olur. Burada K_i (EI kompleksinin ayrışım sabitesi, $EI \rightarrow E + I$),
 $K_i = [E][I]/[EI]$.
- Dolayısı ile, kompetatif inhibitörün varlığında yukarıdaki eğrinin eğimi $(1 + [I]/K_i)$ kadar artmaktadır (K_m değerinde aynı oranda artış gözlenir).
- Örneğin, K_m değeri $1 \times 10^{-4}M$ olan bir enzim $1 \times 10^{-4}M$ $[S]$ varlığında hızı $v = v_{\max}/2$ iken, K_i değeri 1×10^{-3} olan $2 \times 10^{-3}M$ $[I]$ varlığında aynı enzimin hızı, $v = V_{\max}/4$ ve yaklaşık K_m 'si de $3 \times 10^{-4}M$ olacaktır.

- Aşağıdaki grafikte verildiği gibi, kompetatif olmayan inhibisyonda ise $V_{\max}$ azalırken, K_m 'de değişiklik olmaz:

