BIOCHEMISTRY

VEIN BATCH

Lecture : 3

Done by : Mohammad Alomari

Biochemistry lecture 3: enzymes 2 of 3

Ahmed Salem, MD, MSc, PhD, FRCR

تفريغ : محمد العمري

Factors affecting the rate of enzymatic reaction

1. Enzyme concentration
2. Substrate concentration
3. Product concentration
4. Temperature
5. Hydrogen ion concentration (pH)
6. Presence of activators
7. Presence of inhibitors
8. Presence of repressor or derepressor.
9. Covalent modification

Effect of enzyme concentration

الvelocity هي معدل تحول الsubstrates إلى products خلال عامل الزمن, وكل ما كان أسرع كانت الV أعلى

- Rate of a reaction or velocity (V) is directly proportional to the enzyme concentration, when sufficient substrate is present

والV مرتبطة بكمية الenzymes الموجودة, بحيث كل ما كان في enzymes أكثر زادت الV , لكن بِشرط وجود كمية كافية من الsubstrate, يعني شو الفايدة اذا عندي enzymes بكمية أكبر من الsubstrates بحيث جزء منهم مش قاعد بشتغل لإنه ما في مادة ترتبط فيه , ومهما زدت enzymes بهاي الحالة ما رح تزيد الV

- This is true up to a point when a further increase in the enzyme concentration is not accompanied by an increase in the velocity of the reaction
  - At this point the substrate is said to be the limiting factor

ولما نوصل لمرحلة إنه زيادة الenzymes ما بتأثر عالV بتكون الsubstrates صارت تحت مسمى الlimiting factor (هي العامل المحدد لسير التفاعل)

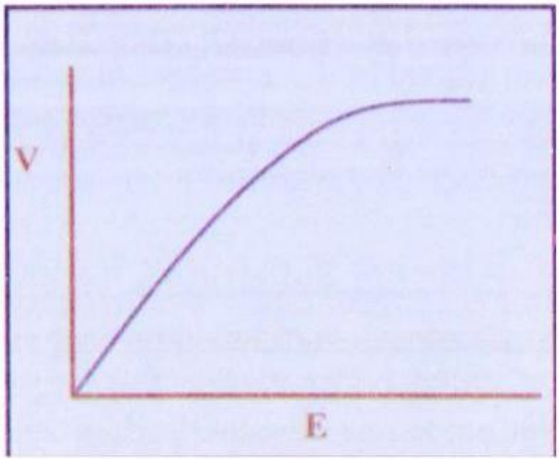
- This property is made use of in determining the level of particular enzyme in plasma, serum or tissues
  - Known volume of serum is incubated with substrate for a fixed time
  - Then reaction is stopped and product is quantitated
  - Since the product formed will be proportional to the enzyme concentration, the latter could be assayed

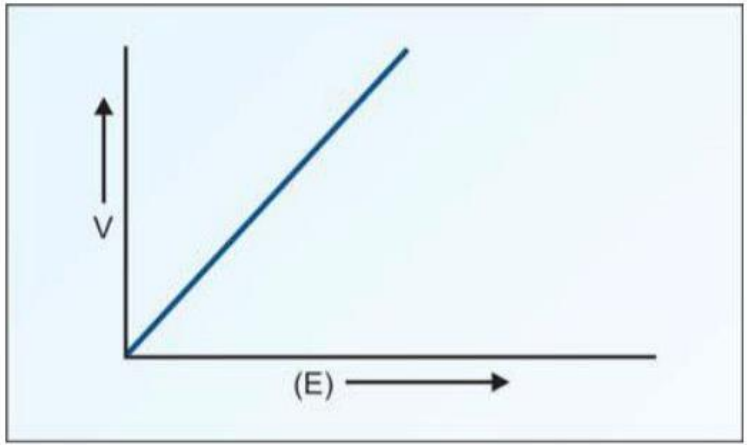
وبما إنه في علاقة نسبية (proportional) بين كمية الenzymes والV, فإحنا بنقدر نستغل الموضوع كمؤشر لمعرفة كمية الenzymes بالدم, فاللي بنعمله إنه بنضيف serum عالدم (واللي بحتوي على كمية محددة من الsubstrates) وبعد مدة محددة برجع أفحص الشخص وأشوف تركيز الproducts, ومنها بستدل على كمية الenzymes

عنا هون 2 graphs ببينوا العلاقة بين تركيز الenzymes والvelocity, وكلاهما صحيح في ظروف معينة, هسا بشكل عام كل ما نزيد تركيز الE رح تزيد الV, لكن العامل الآخر اللي رح يأثر على شكل الcurve هو تركيز الsubstrate, هسا بالgraph اللي عاليسار اللي بصير فيه plateau (ببلش المنحنى يصير مستوي), هون احنا عنا كمية substrate كبيرة, ف كل ما نزيد تركيز الE رح تضل ترتفع الV, لحد ما نوصل مرحلة تصير الsubstrates هي الlimiting factor وبتكون عنا الplateau عالgraph, وبهاي الحالة اللي بصير إنه احنا لسا قاعدين بنعطي substrate للتفاعل, لكن الكمية اللي بعطيها غير كافية إنه ارفع الV أكثر, لكنها كمية كافية نحافظ عليها بالحد اللي وصلته..

أما بالنسبة للgraph اللي عاليمين, واللي بنلاحظ فيه إنه كل من الE والV قاعدين بزيدوا دون توقف, وهاض الاشي بصير بحاله وحده وهي لما تكون كمية الsubstrate هائلة ولا نهائية, بحيث عندي القدرة أضل أضيف substrate وأرفع الV دون توقف, طالما لسا ما صار limiting factor..

الآن موضوع انه الsubstrate يكون limited, ف في الواقع في وقت من الأوقات خلال التفاعل, اذا كان الsubstrate كميته limited, فالenzyme رح يحول كل الsubstrate لproducts, وبهاي الحالة الV رح تساوي صفر مباشرة بدون ما نشوف المنحنى بنزل بالتدريج, بحيث بصير المنحنى مُنطَبق على الX axis (محور السينات), و زيادة الE ما إلها أي فايدة, و بالواقع ما في تفاعل فعليا الsubstrate فيه بكون unlimited هي مجرد فرضيات, وبوقت من الأوقات رح يتحول الsubstrate كامل لproducts والV رح تساوي صفر.





ركزوا عالمنحنيين وافهموا الفرق بينهم من حيث المبدأ , لإنهم مهمات للامتحان

Effect of substrate concentration

- The velocity of the reaction ↑ as the substrate concentration ↑ up to point where the enzyme is saturated

كل ما زاد تركيز الsubstrates رح تزيد الV, لغاية ما نوصل لمرحلة إنه الenzymes صارت الlimiting factor
(بالحالة هاي بتكون كل الenzymes بتشتغل, ومهما زدت من تركيز الsubstrates ما رح استفيد لإنه ما في enzymes تستقبلها)

- The Vi increases to a maximum value Vmax

الVi = الvelocity الأساسية أول ما يبلش الreaction
(Velocity initial) لغاية ما توصل بالنهاية للVmax واللي هي أعلى V رح يوصلها الreaction قبل ما يصيروا الenzymes saturated

- The substrate concentration that produces half the maximal velocity is termed **Michaelis constant or Km**

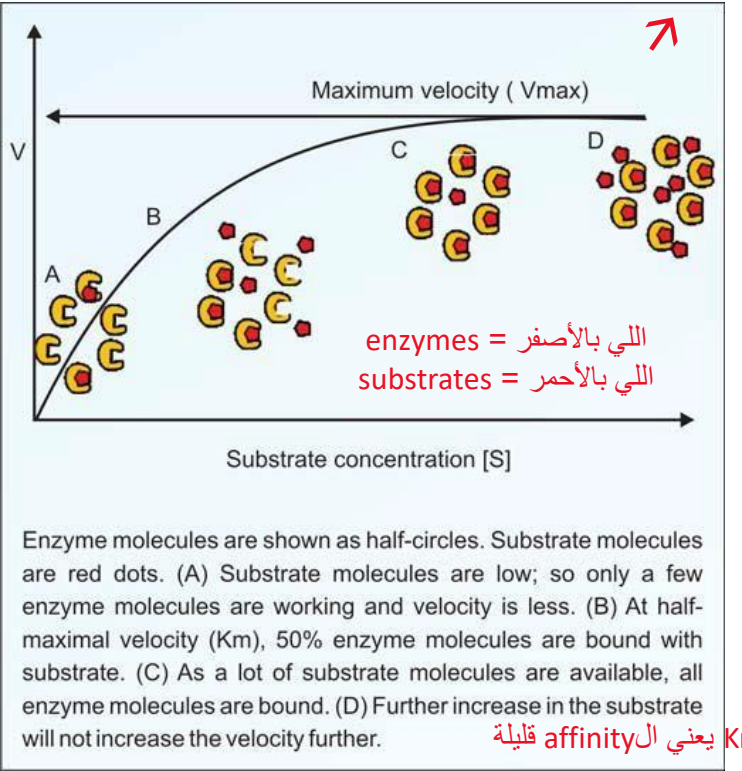
الKm هي كمية الsubstrate اللي بتخلينا نوصل لنص الVmax,
و احنا بنهتم للKm اكثر من الVmax, لانه الVmax صعب قراءتها, أو بشكل أدق صعب نوَصّل كلشي للmaximum, والأسهل انه نوصل للVmax 1/2, عشان هيك بنهتم للKm, والهدف أو الفائدة الأكبر منها إنه نعرف الaffinity (موضحه السلايد التالي)

- When [S] is approximately equal to Km, Vi is very responsive to changes in [S], and the enzyme is working at half-maximal velocity

لما الS يكون مساوي للKm, غالبا المنحنى بكون مُتَجاوب (responsive) للS, والenzyme شغّال على نص الV maximal تبعته

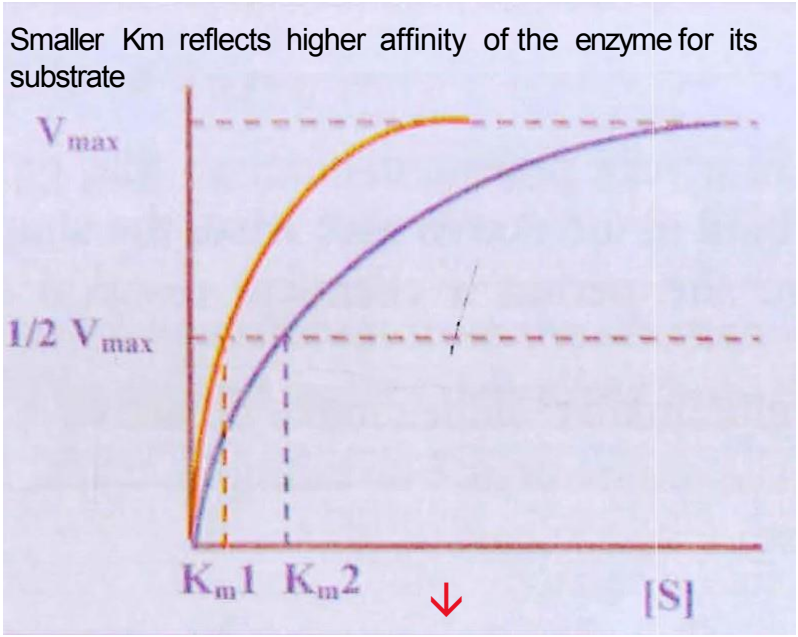
اللهم إني أسالك التوفيق والنجاح, في الدنيا والآخرة

بالصورة هون عنا منحنى بين الV والS, واللي ببين كيف ببداية التفاعل تركيز الS كان قليل ومع الوقت بزيد و بتزيد معه الV, لغاية ما وصلنا لمرحلة إنه الsubstrates مش ملاقية enzymes ترتبط فيها وبالتالي الV رح تصير ثابتة, ما رح تختفي أو تصير صفر, هي فقط وصلت الVmax وما رح تزيد أكثر



Enzyme molecules are shown as half-circles. Substrate molecules are red dots. (A) Substrate molecules are low; so only a few enzyme molecules are working and velocity is less. (B) At half-maximal velocity (Km), 50% enzyme molecules are bound with substrate. (C) As a lot of substrate molecules are available, all enzyme molecules are bound. (D) Further increase in the substrate will not increase the velocity further.

يعني الaffinity قليلة



**كل ما قلّت الKm هاض معناه إنه الaffinity للenzyme تجاه الsubstrate رح تزيد, يعني كل ما قلّت كمية الS اللي بنحتاجها عشان نوصل للVmax 1/2 هاض يعني انه تجاذب أو تجانس (الaffinity) الS مع الE أعلى, وبالعكس.. لو زادت الKm

Michaelis Menten Constant

- Describes the behavior of enzymes as substrate concentration is changed

بعمل على تفسير سلوك الE بتغير تركيز الS

- **Km** denotes the affinity of enzyme for substrate

والKm بتعطي مؤشر أو بتعكسلنا الaffinity للE مع الS (كل ما قلت الKm زادت الaffinity والعكس)

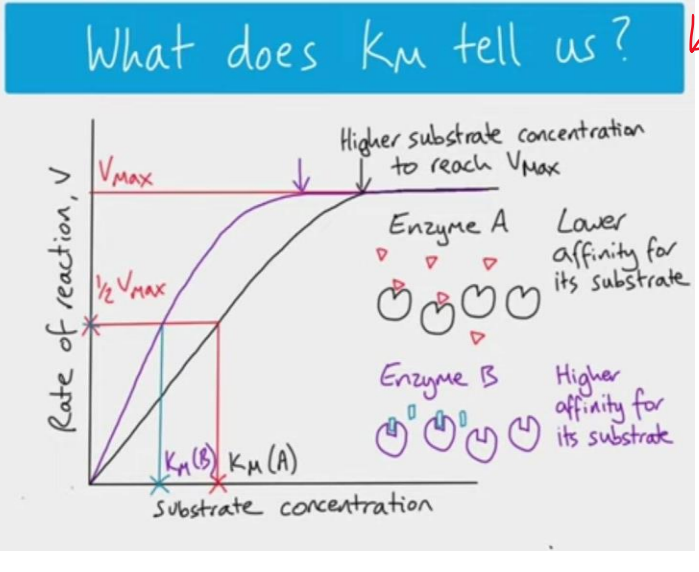
- The lesser the numerical value of Km, the affinity of the enzyme for the substrate is more

- Km is independent of enzyme concentration
  - If enzyme concentration is doubled, the Vmax will be doubled
  - But the Km will remain exactly same

الKm ما إلها علاقة بتركيز الE, ومهما رفعت من تركيز الE أنا بس رح أأثّر على الVmax و أرفعها, لكن بالنسبة للKm ف ما في أي تأثير عليها بتضل زي ما هي ما بتتغير (لإنه أنا مش قاعد بغير بالaffinity بين الE والS رح تضل نفسها حتى لو زدت تركيز الE)

Michaelis Menten Constant

- According to Michaelis Menten Constant:
  - the enzyme– substrate complex is a reversible reaction
  - the breakdown of the complex to enzyme + product is irreversible.



بالتفاعل هون بنشوف الفرق بالaffinity لكل من الenzyme A/B, بالنهاية كلاهما وصل للVmax, لكن A احتاج تركيز أعلى من الS عشان يوصل الVmax, بينما B لإنه الKm إله أقل فتركيز الS اللي احتاجه عشان يوصل كان أقل, ما يعني إنه تبعته عالية الaffinity

$$E + S \underset{K2}{\overset{K1}{\leftrightarrows}} E\text{--}S \xrightarrow{K3} E + P$$

If concentration of substrate is increased, the forward reaction K1 is increased, and so K3 as well as total velocity is correspondingly enhanced. The three different constants may be made into one equation,

$$Km = \frac{K2 + K3}{K1}$$

Km is called as **Michaelis Constant**.
It is further shown that

$$\text{Velocity } (v) = \frac{Vmax\,[S]}{Km + [S]}$$

When concentration of substrate is made equal to Km, i.e. When [S] = Km

$$\text{Velocity } (v) = \frac{Vmax\,[S]}{[S] + [S]} = \frac{Vmax\,[S]}{2\,[S]} = \frac{Vmax}{2}$$

or v = ½ Vmax

حسب كلام الدكتور فموضوع المعادلات (equationsال) مش مهم كثير

Salient Features of Km

- **Km value is substrate concentration** (expressed in moles/L) **at half-maximal velocity**

- **It denotes that 50% of enzyme molecules are bound with substrate molecules at that particular substrate concentration**

- **Km is the Signature of the Enzyme**
  - Km value is thus a constant for an enzyme
  - It is the **characteristic feature of a particular enzyme <u>for a specific substrate</u>**

الKm شغلة مميزة لكل Enzyme لحال مع
الsubstrate اللي بتفاعل معه, خاصية intrinsic
(مُضَمّنَة) بالenzyme, وقيمتها ثابتة

- The **affinity of an enzyme** towards its substrate **is inversely related** to the dissociation constant, Kd for the enzyme– substrate complex

$$E + S \underset{K2}{\overset{K1}{\rightleftharpoons}} E\text{–}S \text{ complex} \xrightarrow{K3} E + P$$

$$Kd = \frac{K2}{K1} \quad \text{and} \quad Km = \frac{K2 + K3}{K1}$$

- The smaller the tendency for the dissociation of the complex, the greater is the affinity of the enzyme for the substrate

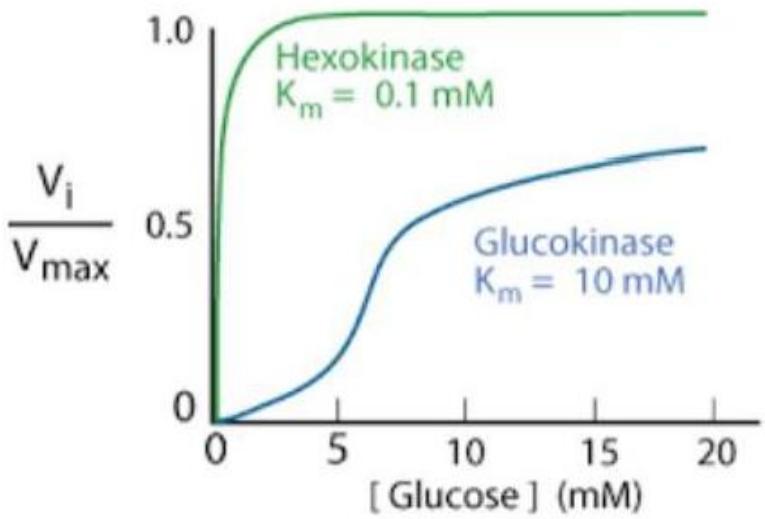
Km denotes the affinity of enzyme for substrate. The lesser the numerical value of Km, the affinity of the enzyme for the substrate is more

المحصلة والنقطة الأهم.. كل ما قلت الKm زادت الaffinity, والعكس

الKm تستخدم للمقارنة بين الenzymes, يعني لو يعطيني معلومة عن enzyme معين إنه الKm إله تساوي كذا, أنا لا يمكن أقدر بمعلومة زي هاي أحدد أو أعرف أي تفاصيل عنه أو اذا الaffinity تبعته مرتفعة, لكن لما يعطيني two enzymes ويعطيني الKm لكل واحد منهم هيك أنا رح استفيد منها وأقدر أقارن بينهم

Why is this important ?

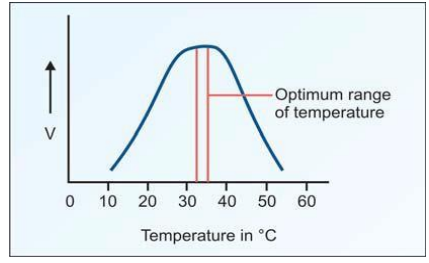
يعني مثلا عنّا واحد صايم, مستوى السكر بالدم رح يكون قليل, خلايا الجسم فيها نوعين من الenzymes بشتغلوا عالglucose, أحدهم الhexokinase وموجود في كل الخلايا, واللي بعمل على حرق الglucose فبعطي طاقة, والثاني الglucokinase الموجود في الheparin , واللي بعمل على تخزين الglucose, الان لو بنلاحظ الفرق بالKm بينهم زي ما موجود بالجدول, فبناءًا عليه لما يجي موعد الإفطار ويصير في glucose بالدم الglucose رح يفضّل الhexokinase لإنه الaffinity تبعته أعلى وبالتالي رح يبدأ حرق الglucose واسترجاع الطاقة بالجسم مباشرة.
وهون بتظهر أهمية الKm



سبحان الله وبحمده, سبحان الله العظيم

Effect of temperature

- The velocity of enzyme reaction increases when temperature of the medium is increased → reaches a maximum and then falls **(Bell shaped curve)**



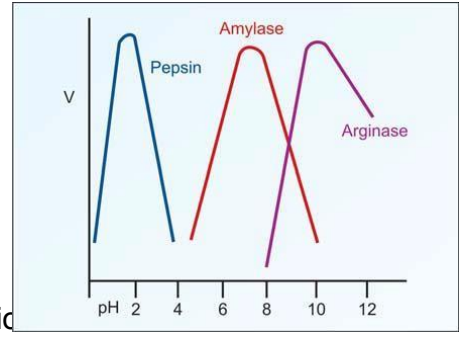
- **Optimum temperature:** Temperature at which maximum amount of the substrate is converted to the product per unit time
- As temperature is increased, more molecules get activation energy, or molecules are at increased rate of motion
  - → so their collision probabilities are increased and so the reaction velocity is enhanced
- But when temperature is more than 50°C, heat denaturation and consequent loss of tertiary structure of protein occurs:
  - So activity of the enzyme is decreased

أغلبية الenzymes بصيرلها denaturation على درجة حرارة 50C

- Most **human** enzymes have the optimum temperature around 37°C
- **Plants:** optimum temperature around 50°C
- Certain **bacteria** living in hot springs will have enzymes with optimum temperature near 100°C

- كل الenzymes عندهم optimal temp, وطول ما احنا لسا ما وصلنا للoptimal temp هاض يعني إنه لسا ما عنّا activation energy كفاية للتفاعل, فكل ما رفعنا الtemp رح تزيد عنا الactivation energy, و رح تزيد احتمالات التصادم بين الجزيئات (collision probabilities) والvelocity of the reaction رح تزيد, لحد ما نوصل لoptimum range, بعد هيك الزيادة فالtemp رح تقلل الvelocity مش ترفعها, لحد ما نوصل بالنهاية للtemp اللي رح تعمل denaturation للenzyme, واللي هي شغلة irreversible, لإنه صار تكسير للbonds اللي بالprotein, وطبعا تدمير enzyme واحد ما رح يأثر عالaffinity, لإنه ما إله علاقة بباقي الenzymes لسا بشتغلوا زي ما همه

Effect of pH



- Each enzyme has an optimum pH at which it shows **maximal** activity

كل enzyme إله optimal pH, ويتكون specific إله

- Activity **decreases** as we go away from the optimum pH

- Activity virtually stops about 2 units of pH above or below this pH

وقيمة الpH هاي اذا زادت أو قلت بمقدار 2 units تقريبا فالactivity للenzyme بتقل للصفر تقريبا

- Slight changes in pH causes marked changes in enzyme activity due to alteratic of the charges on the substrate and on the catalytic site of the enzyme

- Extreme changes of pH cause denaturation and irreversible inhibition of enzyme action

- Usually enzymes have the optimum pH between 6 and 8

معظم الenzymes بتكون الoptimum pH إلها من 6 ل8,

- Some important exceptions are:
  - pepsin (with optimum pH 1-2)
  - alkaline phosphatase (optimum pH 9-10)
  - acid phosphatase (optimum pH 4-5)

لكن في exceptions **وهي مهمة جدا**

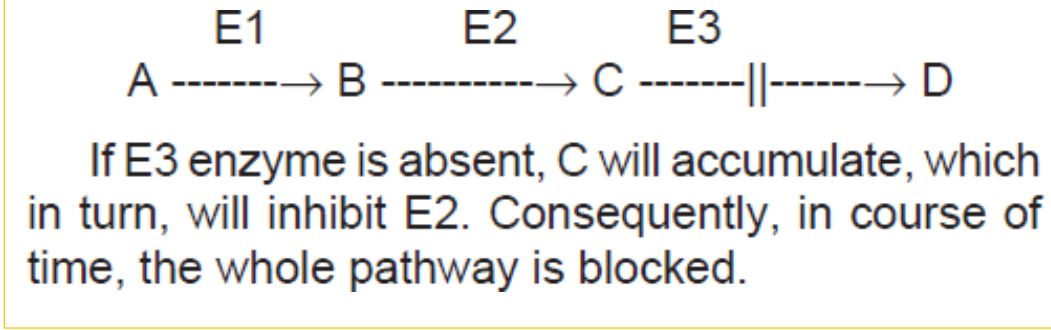
Effect of Concentration of Products

- In a reversible reaction (S ↔ P), when equilibrium is reached:
  - the reaction rate is slowed down

هسا احنا بشكل عام بنستخدم الenzymes عشان نحوّل الsubstrates لproducts, لكن لما نوصل لمرحلة إنها صار تركيز الproducts عالي كثير خلص هيك بطلت محتاج من الenzyme ينتج كمان, وهاض هو المبدأ بشكل عام , ف لما يزيد تركيز الproducts رح تعمل inhibition للenzyme و توقف مفعوله, وممكن الinhibition تكون بعدّة طرق, زي إنه يغير الnature للمكان بتغيير الpH, زي إنه الenzyme يكون بشتغل بوسط acidic والproducts تكون ذات طبيعة basic فتتغير الpH optimum, أو ممكن يأثر عالregulation (التنظيم) بحيث ممكن يغير بالgenes (الجينات) فيأثر على الtranscription (النسخ) والtranslation (الترجمة) وبالتالي يقلل كمية الenzymes الموجودة, أو ممكن يشتغل عالallosteric site واللي بتأثر على طريقة عمل الenzyme.. ف بشكل عام لما يزيد تركيز الproducts التفاعل يا إمّا بتوقف, أو بصير أبطأ

- When product concentration is ↑, the reaction is slowed or stopped
  → **feedback inhibition**

بالمثال هون صار عنّا خلل ب E3, وبالتالي كمية الproduct C صارت تزيد بدون ما يصير عليها اشي وتتحول لD, فاللي صار إنه C عمل تعطيل لE2, واللي أدّى لزيادة تركيز B اللي بدوها عطلت E1 , وبالتالي توقفت العملية بالكامل



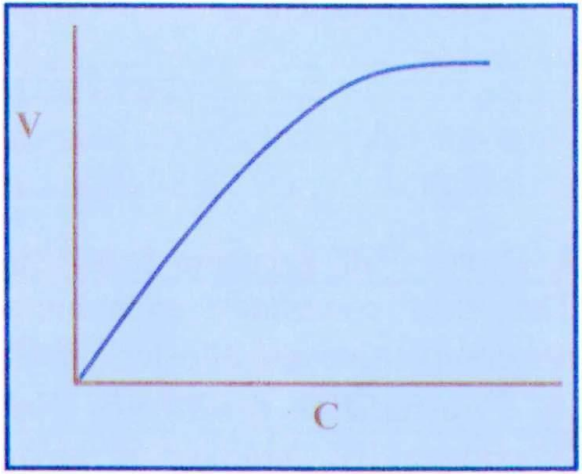
Effect of cofactor concentration

الcofactor بكون إله تأثير بس في حالة إنه الenzyme بعتمد عليه

- If the enzyme requires a cofactor (coenzyme or activator) for its activity:
  - the velocity of the reaction will be directly proportional to the concentration of the cofactor

وكل ما زاد تركيز الcofactors بتزيد الvelocity

- This is true till a certain point



- After this point, any increase in cofactor concentration will **not** increase the velocity of the reaction:
  - the enzyme concentration is the limiting factor

لكن بمجرد ما وصلنا للنقطة اللي يصير فيها الenzyme هو الlimiting factor
وقتها بتصير الزيادة في تركيز الCo-factor عالفاضي

اللهم إنك عفوّ تحب العفو فاعفُ عنا

Enzyme activation

- Some enzymes show higher activity in presence of inorganic ions
  - chloride ions activate salivary amylase
  - calcium activate lipases

بعض الenzymes بتكون أنشط بوجود inorganic ions

- Another type of activation is the conversion of an inactive pro-enzyme or **zymogen** to the active enzyme

*اسم اخر للpro-enzyme

- By splitting a single peptide bond & removal of a small polypeptide from trypsinogen → active trypsin is formed
- This results in unmasking of active centre

احيانا بعض الenzymes يتم إفرازها على هيئة pro-enzymes (zymogen) واللي بتكون inactive بسبب إنه بكون في اشي مسكر الcatalytic site فيها (غالبا polypeptide chain) وبمنعها ترتبط بإشي, والactivation بصير عن طريق كسر هاي الchain فبرجع الcatalytic site متاح للارتباط بالsubstrate, وهاض المبدأ بتنشيط الTrypsinogen *ننتبه ع اسم الenzyme*

- Trypsin activates chymotrypsinogen, to form active chymotrypsin and two peptides (A and B peptides)
  - As a result, three amino acid residues, his(57), asp(102) and ser(195) that are far apart in the primary sequence are aligned at the active site and take part in the catalytic process

هسا احنا بنعرف اهمية الدقة في ترتيب الamino acids.. فاللي بصير هون إنه بصير في تغيرات بالcatalytic site بحيث يغير شوي بالamino acids عشان يصير active

- All the gastrointestinal enzymes are synthesized in the form of pro-enzymes, and only after secretion into the alimentary canal, they are activated. This prevents autolysis of cellular structural proteins

و كل الenzymes بالGIT يتم تصنيعهم على شكل pro-enzymes بالبداية, والسبب انه ما بدنا اياهم يكونوا active ويبلشوا شغل بمكان تصنيعهم نفسه, والactivation بصير بس يوصلوا للمكان اللي المفروض يشتغلوا فيه,

- **Coagulation factors** are seen in blood as zymogen form

ونفس الإشي بالنسبة للcoagulation factors, لإنه إحنا مش محتاجينهم طول الوقت فبكونوا بالzymogen form

Enzyme inhibition

- Two main types:
  - Reversible
  - Irreversible

مبدأيا نكون عارفين إنه الenzyme عبارة عن protein, فأي اشي بعمل denaturation (إن كان strong acids/ alkalies (قلويات)/ high temp) فأكيد العملية هاي irreversible , أي اشي بعمل covalent bonds برضه irreversible , بينما أي اشي غير هيك ف بالمبدأ المفروض يكون reversible, لكن الreversibility هاي بتكون بحد معين , بعضها ممكن يكون سهل وبعضها ممكن يكون أصعب

Competitive inhibition (reversible)

الbinding للsubstrate مع الenzyme هو عملية reversible

- A competitive inhibitor is structurally similar to that of substrate:
  - It competes with substrate to bind reversibly at active or catalytic site

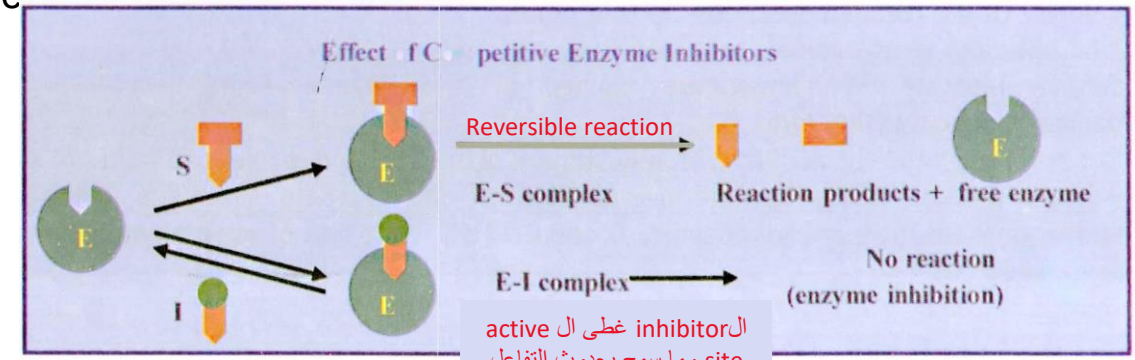
الموضوع هون أشبه بالتنافس بين الsubstrate والcompetitive inhibitor على الenzyme, بحيث همه الثنين عندهم القدرة على الإرتباط بالcatalytic site لإنهم (analogs) structurally similar

- The degree of inhibition depends on the **ratio** of the concentration of the (inhibitor : substrate) and not on the **absolute** concentration

ومستوى الinhibition متعلق بالنسبة بين كمية الinhibitors والsubstrate الموجودة, يعني أكيد لو كانت نسبة الinhibitors الموجودة 10% مقابل 90% مش رح تكون زي لما تكون النسبة 50%-50%

- The inhibition also depends on the relative affinity of the substrate and the inhibitor to the enzyme

وبعتمد أيضا عالaffinity, لكن مش بقدر تأثير الratio بينهم خاصة اذا كانت النسبة متقاربة أو متساوية, يعني مثلا لو كانت الaffinity للinhibitors أعلى بعشر أضعاف الaffinity للsubstrates, لكن تركيز الinhibitors فقط 10% مش رح استفيد اشي فعليا

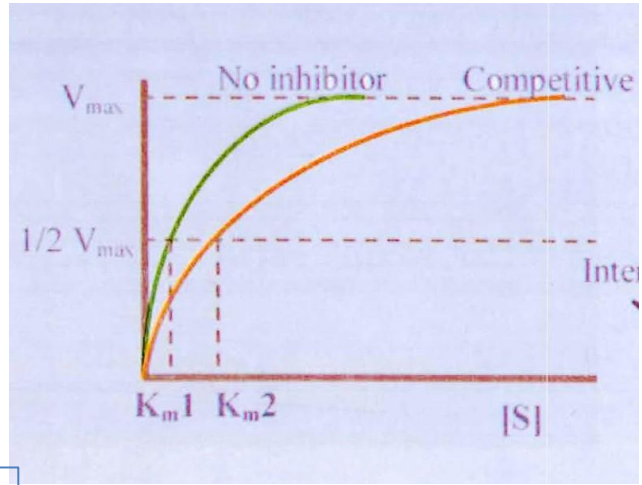


الinhibitor غطى ال active site وما سمح بحدوث التفاعل

Competitive inhibition (reversible)

لو فرضنا إنه عنّا 50 substrate و 50 inhibitor, هيك نص الactive sites بتكون occupied by inhibitors , وبالتالي الvelocity والactivity للenzyme قلت للنص, لكن لو أنا حطيت substrate زيادة ف بالنهاية رح نوصل للVmax بغض النظر عن الوقت اللي رح يستغرقه الموضوع, ف يعني هيك هيك بالنهاية رح نوصل الVmax (يعني ما أثرت عالVmax), لكن اللي اختلف عنا هي كمية الsubstrate اللي احتجناها , يعني بالمحصلة الinhibitors أثرت على الKm فقط

- **No Effect on V max:**
  - Effect of a competitive inhibitor is reversed by ↑ [S]
  - At a sufficiently high [S] concentration, the reaction velocity reaches the Vmax observed in absence of inhibitor

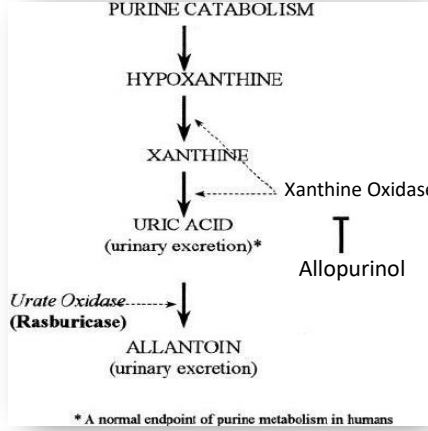


- **Increase of Km:**
- A competitive inhibitor increases the apparent Km for a given [S]
- This means that, in the presence of a competitive inhibitor, more [S] is needed to achieve ½Vmax

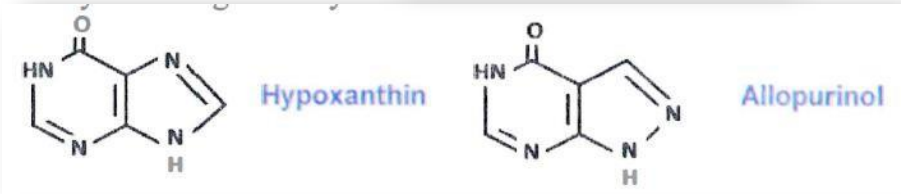
اللهم صرّف قلوبنا على طاعتك

للأسف الجدول حفظ ومهم جدا

بعض الناس اللي بعانوا من ارتفاع الuric acid بتم معالجتهم عن طريق الallopurinol, واللي هو عبارة عن competitive inhibitor برتبط بال Xanthine oxidase (الإنزيم المسؤول عن تكوين الuric acid) وبالتالي بقلل انتاجه



هاض الدوا مشابه للwarfarin, هسا انا لو اعطيت منه بكمية أكبر من المطلوب شو الحل؟ ببساطة بعطي المريض جرعة vit K عشان ترجع الratio بينهم ضمن الrange



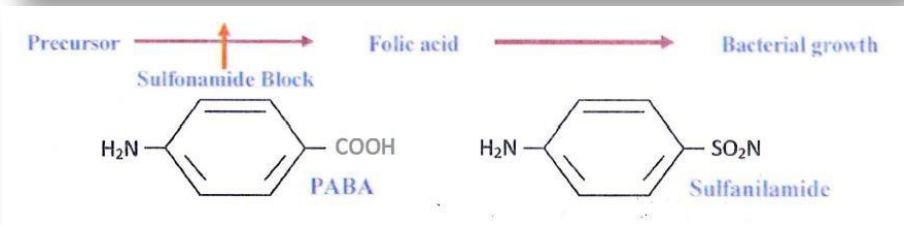


Table 5.5. Clinically useful Competitive Inhibitors

Drug	Enzyme inhibited	Clinical use	Refer chapter
1. Allopurinol	xanthine oxidase	gout	39
2. Dicoumarol	vit.K-epoxide-reductase	anti-coagulant	33
3. Penicillin	transpeptidase	bacteria	2
4. Sulphonamide	pteroid synthetase	bacteria	34
5. Trimethoprim	FH2-reductase	bacteria	34
6. Pyrimethamine	do	malaria	34
7. Methotrexate	do	cancer	51
8. 6-mercapto-purine	adenylosuccinate synthetase	cancer	51
9. 5-fluorouracil	thymidylate synthase	cancer	51
10. Azaserine	phosphoribosyl-amidotransferase	cancer	51
11. Cytosine arabinoside	DNA polymerase	cancer	51
12. Acyclovir	DNAP of virus	antiviral	42
13. Neostigmine	ACh-esterase	myesthenia	23
14. Alpha-methyl dopa	dopa-decarboxylase	hypertension	17
15. Lovastatin reductase	HMGCoA-lowering	cholesterol	12
16. Oseltamiver (Tamiflu)	Neuraminidase	Influenza	

Non-competitive inhibitor

بالcompetitive قبل شوي كان اللي بخليها تنافس الsubstrate
عالactive site إنه الثنين برتبطوا بنفس الموقع, بس هون الوضع غير, لإنه الinhibitor برتبط بsite مختلف وما إله علاقة بالactive site, + ما بأثر عالaffinity

- No competition occurs between substrate and inhibitor to bind at active site of enzyme
- Inhibitor is not structurally related to substrate
  - Inhibitor binds to a site different than the active site of enzyme
- The inhibitor can bind either the free enzyme or the enzyme substrate (ESI complex possible)

فالinhibitor هون عنده القدرة يرتبط بالenzyme بغض النظر إن كان free (غير مرتبط بsubstrate) , أو اذا كان مرتبط بsubstrate أصلا (وبهاي الحالة بتكوّن عنّا (Enzyme Substrate Inhibitor complex (ESI

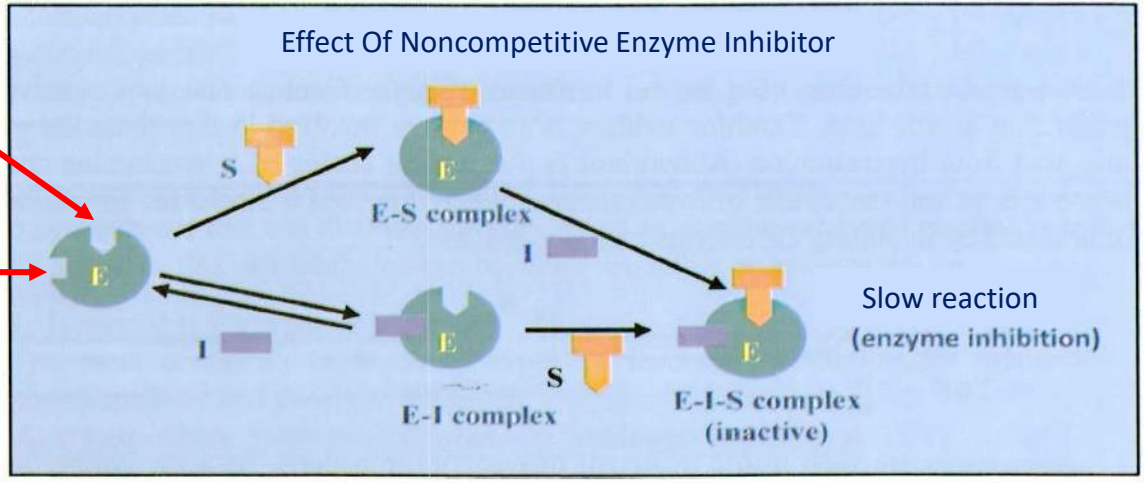
- Increase in the substrate concentration generally does not relieve this inhibition

وبما إنه عمل الinhibitor ما إله علاقة بالactive site ولا بنافس عليه فهاض يعني إنه قد ما نزيد من تركيز الsubstrate ما رح يصير أي تأثير عالinhibitor ولا رح يقلل من كفاءة عمله

Non-competitive inhibitor

موقع ارتباط الsubstrate

موقع ارتباط الinhibitor



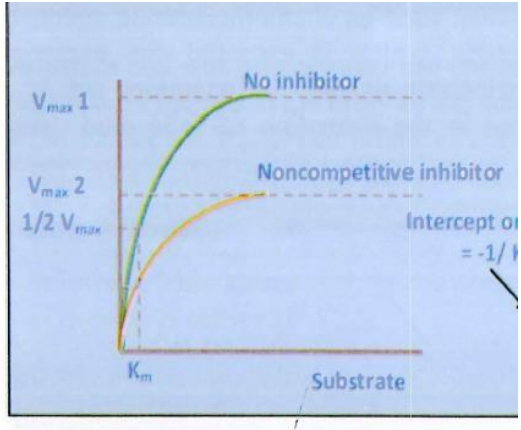
زي ما بنشوف بالصورة هون, فالinhibitor ارتبط بالenzyme بغض النظر إن كان free ولّا معه substrate, ولما ارتبط بالfree ما منع الsubstrate من الارتباط برضه, واللي بعمله في كل الحالات إنه بخلي الreaction أبطأ, بدون ما يوقفه

Non-competitive inhibitor

- **Effect on Vmax:**
  - Non-competitive inhibition cannot be overcome by increasing the concentration of substrate
  - → non-competitive inhibitors decrease the Vmax

رح يقلل الVmax, لكن الKm رح تضل زي ما هي

- **Effect on Km:**
  - Non-competitive inhibitors do not interfere with the binding of substrate to enzyme
  - → the enzyme shows the same Km in the presence or absence of the non-competitive inhibitor



ليش ما بأثر عالKm؟ لإنه مهما أزيد من تركيز الsubstrate رح تضل الaffinity زي ما هي , لإنه الinhibitor
ما بمنع ارتباط الsubstrates , فالكمية اللي بحتاجها من الsubstrate ما رح تتغير و تغييرها ما بأثر أصلا

اللهم إني أسألك الهدى والتقى والعفاف والغنى

Examples of non-competitive inhibitor

- **Cyanide** and **carbon monoxide** inhibits cytochrome oxidase
- **Fluoride** will remove magnesium and manganese ions and so will inhibit the enzyme, enolase, and consequently the glycolysis
- **Iodoacetate** would inhibit enzymes having-SH group in their active centers
- **BAL** (British Anti Lewisite; dimercaprol) is used as an antidote for heavy metal poisoning
  - The heavy metals act as enzyme poisons by reacting with the SH group
  - BAL has several SH groups with which the heavy metal ions can react and there by their poisonous effects are reduced.

الheavy metals طريقة عملهم بإنهم بأثروا عال SH group , والBAL عنده several SH groups , ف بدل ما الheavy metals يروحوا يتفاعلوا مع الenzyme ويتركوا ضرر عليه اللي بصير إنه الBAL بجذبهم وبتفاعل معهم عشان يمنعهم يوصلوا للenzymes, وبالتالي بتقل الpoisonous effects

الجدول حفظ (هو فعليا عبارة عن تلخيص للموضوعين اللي قبل ف مش صعب الموضوع)

Table 5.6. Comparison of two types of inhibition

	Competitive inhibition	Non-competitive inhibition
Acting on	Active site	May or may not
Structure of inhibitor	Substrate analog	Unrelated molecule
Inhibition is	Reversible	Generally irreversible
Excess substrate	Inhibition relieved	No effect
Km	Increased	No change
Vmax	No change	Decreased
Significance	Drug action	Toxicological

نقطة مهمة

هو irreversible لغاية ما الinhibitor يغادر موقعه ويترك الenzyme لإنه رح يرجع يشتغل طبيعي بعد ما يتركه, وهاض مبدأ عمل كثير من الأدوية فعليا , ولهاض السبب مفعولها (الduration of action) بكون لفترة محددة

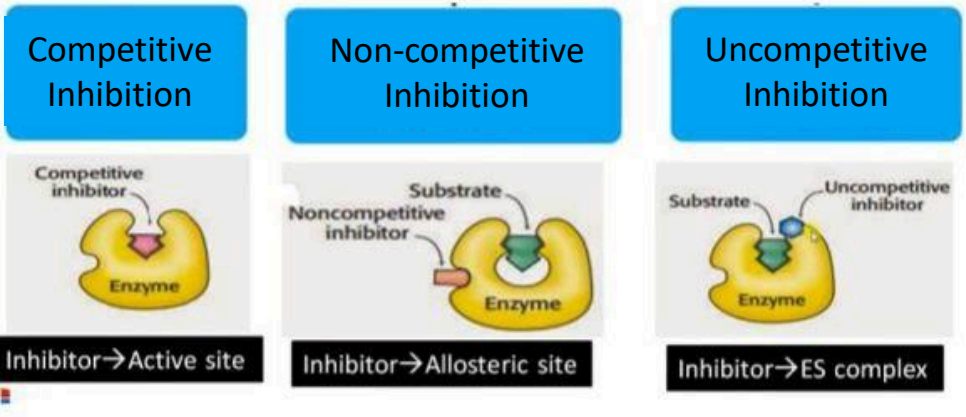
كثير من الdrugs بشتغلوا على مبدأ الcompetitive inhibition (زي اللي بالجدول بسلايد 20)

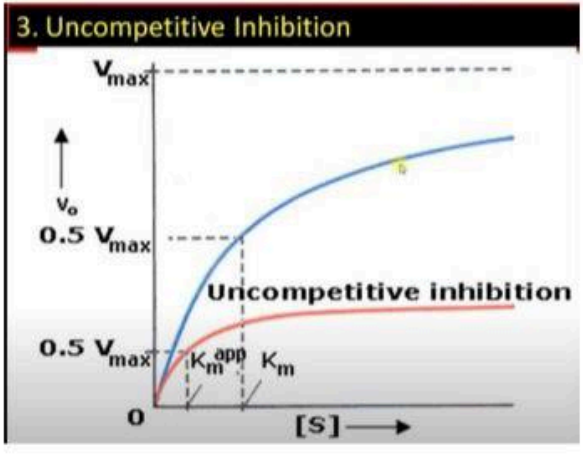
Un-competitive inhibitor

مبدأها الأساسي إنه بصير عنا Enzyme Substrate Inhibitor complex (ESI), وبقل كل من الVmax والKm, والسبب إنه الaffinity بتقل برضه, يعني صح الsubstrate برتبط بالenzyme, لكن تأثيره بكون neutralized (تم إبطاله) عن طريق الESI complex

Vmax and Km both reduced

e.g. phenylalanine inhibits placenta alkaline phosphatase





Inhibitors that exert their effects on apoprotein part of the enzyme (examples)

- **Anti-enzymes (specific for the enzyme that binds with it and produces its inactivation):**
  - e.g. Antithrombin (activated by heparin) inhibits blood clotting (acts via formation of complex with active site → conformational change in enzyme)

اللي بعمله إنه برتبط بالactive site وبغير بشكله
(بعمل conformational change), وشغله بكون specific, بحيث anti-enzyme معين بشتغل على enzyme معين فقط

- **Inhibitors that denature proteins:**
  - **e.g.** strong acids, alkalis, alcohols and salts of heavy metals

(توقيف عمل الenzyme عن طريق إنه نعمّله denaturation)

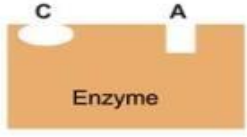
- **Inhibitors that block chemical groups:**
  - **e.g.**
    - aspirin produces acetylation of hydroxyl group of serine at the active site of **cyclooxygenase enzyme** (responsible for PG synthesis), explaining anti inflammatory & antipyretic actions of aspirin
    - Inhibitors that block SH group; e.g. Lead salts inhibit heme synthase → anaemia

اللهم إني أستودعك أموري كلها, فوفّقني لما تحبه وترضاه

Allosteric regulation

Control of enzyme activity

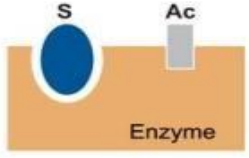
- Allosteric enzyme has one catalytic site where the substrate binds and another **separate allosteric site** where the modifier binds (*allo* = other)



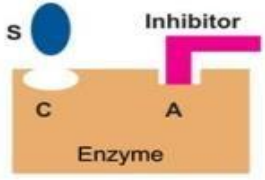
Enzyme has separate catalytic (C) and allosteric (A) sites

Action of allosteric enzymes

النوع هاض من الenzymes بحتوي على catalytic site بالإضافة لallosteric site, وبشتغل على مبدأين, الأول إنه الcatalytic site ما بقدر يستقبل الsubstrate إلا لما بيجي modifier يرتبط بالallosteric site بحيث بكون شكل الcatalytic site مش متطابق مع الsubstrate والmodifier بغير شكله.. المبدأ الثاني, هون ما في داعي لتغيير شكل الcatalytic site هو أصلا متطابق مع الsubstrate وبقدر يرتبط فيه عادي, لكن ارتباط الmodifier بموقعه بهاي الحالة بعمل على تحفيز الenzyme و بزيد الaffinity للenzyme



When activator (Ac) is fixed, the catalytic site assumes correct three dimensional structure, so that substrate (S) can now bind



When inhibitor is attached to the allosteric site (A), the catalytic site (C) do not assume the correct shape, so that substrate (S) cannot fit correctly

Allosteric regulation

Control of enzyme activity

- Allosteric and substrate binding sites may or may not be physically adjacent

(مش شرط الموقعين يكونوا قريبين ع بعض)

- The binding of the regulatory molecule can either:
  - enhance the activity of the enzyme (allosteric activation) → AKA **positive modifier**, or
  - inhibit the activity of the enzyme (allosteric inhibition) → AKA **negative modifier**

AKA = Also Known As

وممكن الmodifier اللي رح يرتبط بالenzyme يعمل تحفيز (enhancement)
أو ممكن يعمل تثبيط (inhibition)

Allosteric regulation

Control of enzyme activity

- The binding of substrate to one of the subunits of the enzyme may enhance substrate binding by other subunits. This effect is said to be **positive co-operativity**

  ارتباط الenzyme بـ positive modifier رح يعطيني الcurve اللي بالأحمر

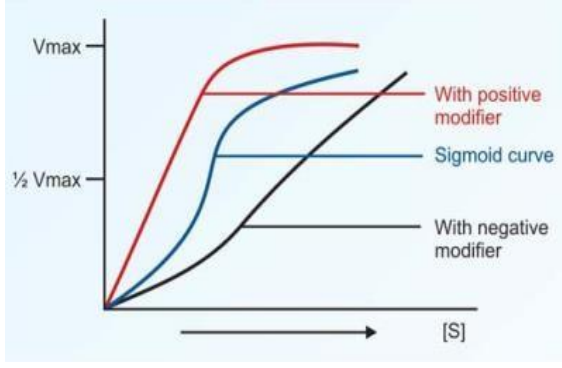
- If the binding of substrate to one of the subunits decreases the avidity of substrate binding by other sites, the effect is called **negative co-operativity**

  ارتباط الenzyme بـ negative modifier رح يعطيني الcurve اللي بالأسود

- In most cases, a combination is observed, resulting in a sigmoid shaped curve

  وفي أغلب الأحيان بكون عنّا النوعين سوا من الmodifiers وبالتالي بصير في combination بينهم وبنتج عنا الcurve اللي بالأزرق

- **Key enzymes:** body uses allosteric regulation for regulation of metabolic pathways



Allosteric inhibition

أهمية هاض الموضوع بتكمن في إنه أول reaction بصير في الpathway of metabolism (واللي بنسميه key reaction) الenzyme المسؤول عنه بكون اسمه الkey enzyme, واللي بقوم على allosteric regulation, والجسم عامةً بستخدم الallosteric regulation عشان يعمل regulation لكثير أمور بالmetabolic pathways

Allosteric regulation

Control of enzyme activity

- The inhibitor is **not** a substrate analog

ومن طبيعة هاي الآلية ممكن نشبهها بالnon-competitive inhibition,
حيث الmodifier (بغض النظر positive/ negative) مش متطابق مع الsubstrate ولا برتبط بنفس الsite

- It is partially reversible, when excess substrate is added

- **Km** is usually increased
  (مش في كل الحالات)
- **Vmax** is reduced

Usually due to conformational changes in enzyme that make it less suitable to unite/ activate substrate

سبب حدوث تغيّر في العاملَين هو التغيرات العديدة اللي بتصير عالcatalytic site واللي ممكن تأثر عالaffinity للenzyme وتخليها أقل

- The effect of allosteric modifier is maximum at or near substrate concentration equivalent to Km

هسا اذا لاحظنا بالgraphs والمخططات من بداية المحاضرة, فدايما الVi (initial velocity) بكون الcurve عندها حاد جدا (the most steep), ف بالتالي أي regulation بتم على الVi في الغالب رح يكون إله أعلى تأثير (the most effect), ف دايما الregulation بكون أقوى إشي لما يكون الsubstrate concentration أقل إشي, لإنه بنكون بال Vi part of the curve

- When an inhibitor binds to the allosteric site, the configuration of catalytic site is modified such that substrate cannot bind properly

Examples of allosteric enzymes

الجدول مهم

Enzyme	allosteric inhibitor	allosteric activator
1. ALA synthase	heme	
2. Aspartate trans-carbamoylase	CTP	ATP
3. HMGCoA-reductase	Cholesterol	
4. Phospho-fructo kinase	ATP, citrate	AMP, F-2,6-P
5. Pyruvate carboxylase	ADP	AcetylCoA
6. Acetyl CoA-carboxylase	AcylCoA	Citrate
7. Citrate synthase	ATP	
8. Carbamoyl phos-phate synthetase I	NAG	
9. Carbamoyl phos-phate synthetase II	UTP	

بشكل عام بالجسم, لما يكون في عنّا ATP كثير ف كل الpathways لتصنيع الATP بتتوقف, عشان هيك ممكن نشوف إنه الATP عبارة عن allosteric inhibitor بكثير من الحالات, بينما الAMP بكون allosteric activator (زي المثال الرابع بالجدول), بس في بعض الأحيان بكون العكس , بالنهاية بتختلف من enzyme للثاني.. (هسا بس يحكيلك إنه الATP عبارة عن inhibitor للenzyme كذا, فهاض معناه إنه الenzyme أصلا وظيفته إنتاج الATP وهو مهم للmetabolism, ف لما بزيد تركيز الATP ببلش يعمل inhibition)

Covalent modification

Control of enzyme activity

*بما إنها مبنية على الcovalent bonds
فهاض يعني إنها Irreversible*
(هي بشكل عام irreversible, لكن الأمثلة الموجودة هون هي reversible)

- The activity of enzymes may be increased or decreased by covalent modification

- Either addition of a group to the enzyme protein by a covalent bond; or removal of a group by cleaving a covalent bond

ف إحنا يا إما بنزيد group عبر covalent bond,
أو بنزيل group عبر كسر هاي الbond

- **Zymogen activation** by partial proteolysis is an example of covalent activation
  - Addition or removal of a particular group brings about covalent modification of enzyme protein. This is a reversible reaction

والzymogen activation يمكن اعتباره أحد انواع الcovalent activation

- Commonest type of covalent modification is the reversible **protein phosphorylation** and **ADP ribosylation**

اللهم إني أسالك أن توفقني وتعينني بحولك وقوتك

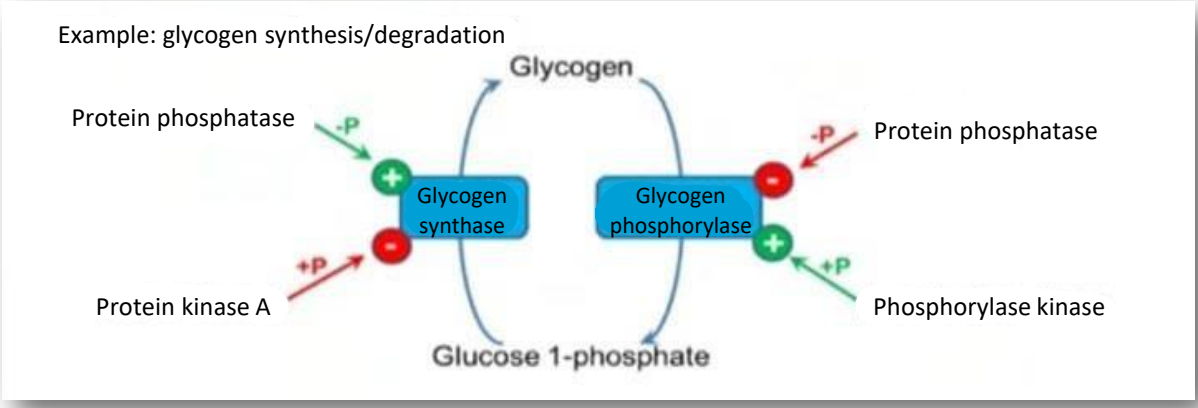
Examples of covalent modification

*وبرضه الجدول هاض حفظ *

Enzyme	Phosphorylated enzyme
Acetyl-CoA carboxylase	Inactive
Glycogen synthase	Inactive
Pyruvate dehydrogenase	Inactive
HMG-CoA reductase	Inactive
Pyruvate kinase	Inactive
PFK2	Inactive
Glycogen phosphorylase	Active
Citrate lyase	Active
Phosphorylase b kinase	Active
HMG-CoA reductase kinase	Active
Fructose-2,6-bisphosphatase	Active

- الglycogen هو الglucose stored form of, وهو homo-polysaccharide ويتم تخزينه بشكل أساسي بالliver (الكبد)

- عملية تحويل الglucose لglycogen اسمها الGlycogenesis - عملية تحويل الglycogen لglucose اسمها الGlycogenolysis



Insulin (well fed state): works via phosphatase → activates synthase and inactivates phosphoylase

Glucagon (fasting): works via kinase → activates phosphoylase and inactivates synthase

Read from book:
Paragraph on co-operative binding

Paragraph on suicide inhibition

Textbook of Biochemistry for Medical Students.
Damodaran M. Vasudevan and S. Sreekumari.
9th edition

هاض السلايد الدكتور ما قرأ أو شرح منه اشي

Enzyme Inhibition: Suicide Inhibition

- A special type of **irreversible** inhibition of enzyme activity
- It is also known as **mechanism based inactivation**
- The inhibitor makes use of the enzyme's own reaction mechanism to inactivate it (mechanism based inactivation)
- The structural analog is converted to a more effective inhibitor with the help of the enzyme to be inhibited
  - The substrate-like compound initially binds with the enzyme and the first few steps of the pathway are catalyzed
- This new product irreversibly binds to the enzyme and inhibits further reactions
- Examples: **ornithine decarboxylase**

اللهم إني أستودعك ما درست وقرأت وحفظت وفهمت.. فرُدَّه لي عند حاجتي إليه