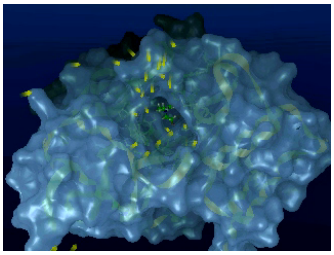
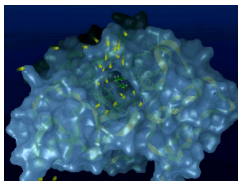
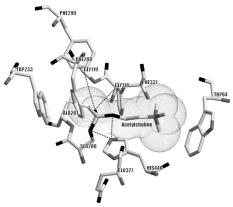
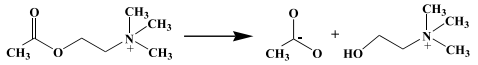
Enzimek



acetilkolin-észteráz

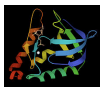






acetilkolin-észteráz

Enzimek



k_{cat} [s^{-1}]

	enzim	víz
carbonic anhydrase karbonikus anhidráz	$6x10^5$	10^{-9}
acetylcholine esterase acetilkolin észteráz	$2x10^4$	$8x10^{-10}$
staphylococcal nuclease sztafilokokkusz nukleáz	10^2	$2x10^{-14}$

legalább 10 nagyságrend gyorsulás

IUBMB: szisztematikus nevek

1. Oxidoreduktázok
   - dehidrogenázok (pl. 1.1.1.1. Alkohol:NAD oxido-reduktáz, alkohol dehidrogenáz)
   - oxidázok
   - oxigenázok
   - peroxidázok
   - katalázok
2. Transzferázok
   - aminotranszferázok
   - kinázok
   - mutázok
3. Hidrolázok
   - peptidázok
   - foszfatázok
   - foszfolipázok
4. Liázok
   - dekarboxilázok
   - aldolázok
5. Izomerázok
   - racemázok
   - mutázok
   - epimerázok
6. Ligázok
   - szintetázok
   - karboxilázok

reakciók,
nagyságrendekkel gyorsabban
mint vízben

Enzimek jellemzése

szubsztrát-specificitás
(mit ismer fel, mi után hasít)

kimotripszin

kötődés
K_M

reakció-sebesség
k_{cat}

hatékonyság
k_{cat}/K_M

Enzimek jellemzése

kimotripszin

szubsztrát-specificitás
(mit ismer fel, mi után hasít)

szubsztrát-kötő zseb

K_M

aktív centrum
katalitikus hely

k_{cat}

S195, H57, D102

katalitikus aminosavak

kémiai szerep v. nagy hozzájárulás

Phe, Tyr, Trp

Proteolitikus enzimek

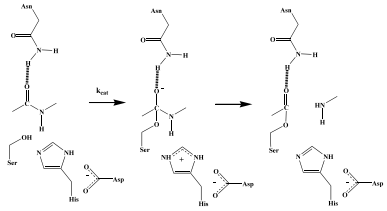
A hasított kötés helye szerint:
a) endopeptidázok
b) exopeptidázok

A katalitikus oldallánc alapján:
a) szeril proteinázok
b) ciszteinil proteinázok
c) aszpartil proteinázok
d) metalloproteinázok

Szerin proteinázok

Enzim-mechanizmusok

Szerin-proteázok (proteináz,peptidáz)



amid-kötés hasítása, hidrolízise (2 lépéses reakció)

Szerin-proteinázok

Kimotripszin

szubsztrát-specificitás
(mit ismer fel, mi után hasít)

kötődés (szelektivitás)

K_M

reakció-sebesség

k_{cat}

hatékonyság

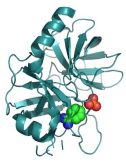
k_{cat}/K_M

Phe, Tyr, Trp

Szerin-proteinázok

Peptidkötés-hasítás

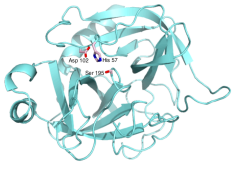
Tripszin



szubsztrát-specificitás

Arg, Lys

Kimotripszin

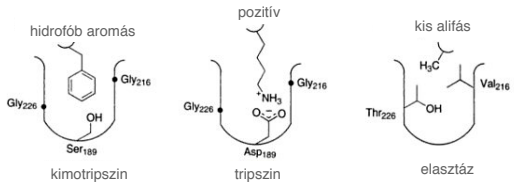


Phe, Tyr, Trp

Szerin-proteinázok

Peptidkötés-hasítás - hasonló aktív hely más specificitás

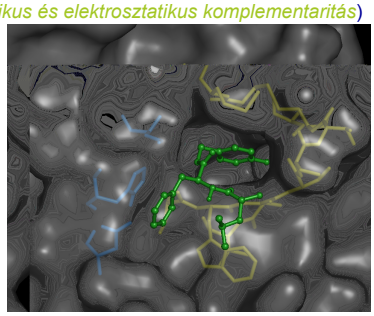
Specifikus zseb



Szerin-proteinázok

Specifikus zseb

(*sztérikus és elektrosztatikus komplementaritás*)



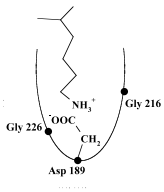
kimotripszin

Enzim-szabászat

egyik specificitás másikba alakítása

Elmélet

Asp189 → Lys csere várható következménye: Lys, Arg specificitás → Asp, Glu specificitás



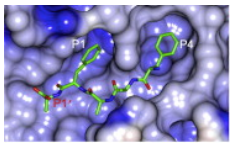
Tapasztalat

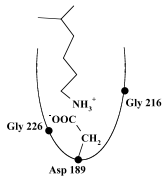
neutrális (aromás) aminosavak preferenciája
Gyenge kimitripszin-szerű aktivitás

tripszin szubsztrátkötő zsebének mutációs analízise

meglepő eredmények!

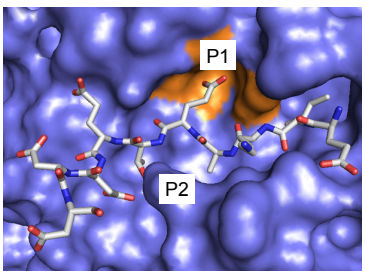
Tripszin szubsztrátkötő zsebének mutációs analízise





enzim	P1 Arg szubsztrát			P1 Lys szubsztrát			Arg/Lys
	k_{cat}	K_M	k_{cat}/K_M	k_{cat}	K_M	k_{cat}/K_M	rel. k_{cat}/K_M
Gly216, Gly226	1	1	1	0,9	10	0,1	10
Gly216, Ala226	0,01	35	0,0003	0,1	250	0,0005	0,5
Ala216, Gly226	0,7	30	0,02	0,2	280	0,001	20
Ala216, Ala226	0,001	15	0,0001	0,0005	25	0,00002	25

A szerin proteinázok működésének alapvető szerkezeti feltételei



malaria merozoit szerin-proteáz

Szerin-proteinázok - katalízis

Kimotripszin

szubsztrát-specificitás

(mit ismer fel, mi után hasít)

szubsztrát-kötő zseb

K_M

aktív centrum

katalitikus hely

k_{cat}

S195, H57, D102

Phe, Tyr, Trp

katalitikus aminosavak

kémiai szerep v. nagy hozzájárulás

Tripszin katalitikus triádjának mutációs analízise

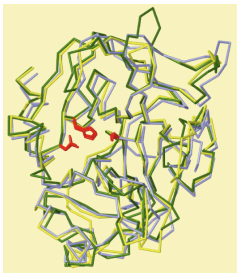
Ser221→Ala:	**$< 10^{-6}$ k_{cat}/K_M**
His64 →Asp:	**$< 10^{-6}$ k_{cat}/K_M**
Ser221→Ala, His64→Asp	**$< 10^{-6}$ k_{cat}/K_M**

érdekes módon 3 Ala közel natív aktivitás

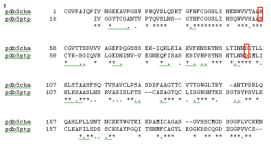
mutációkor a víz-szerkezet is átrendeződik

Szerin-proteinázok

Evolúciós viszonyok



divergens evolúció



Tripszin - kimotripszin - elasztáz

Szerin-proteinázok

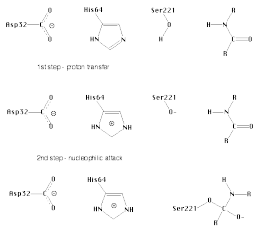
Evolúciós viszonyok

Szubtilizin

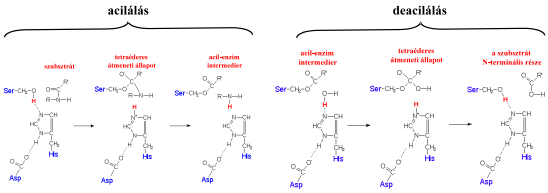
kimotripszin

konvergens evolúció

(nincs szekv. hasonlóság)

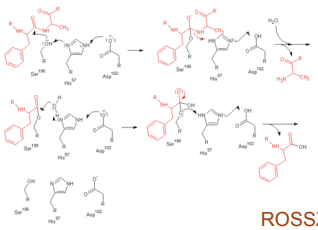


Szerin proteázok reakciómechanizmusa



Szerin-proteinázok

Peptidkötés-hasítás - mechanizmus Ser, His, Asp



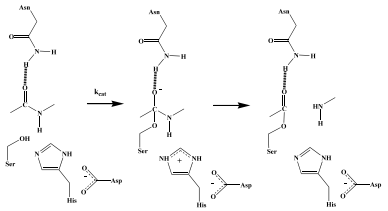
ROSSZ

proton transzfer Asp-ra?

charge-relay???

Szerin-proteinázok

Peptidkötés-hasítás - nincs töltésátmenet az Asp/Glu-ra



– + –

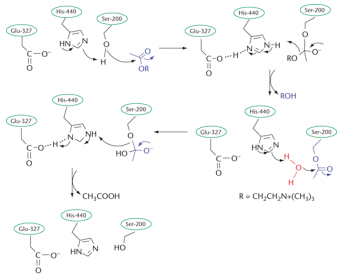
JÓ

elektrosztatikus stabilizáció

Szerin-proteinázok

Peptidkötés-hasítás - nincs töltésátmenet az Asp/Glu-ra

acetilkolin-észteráz



JÓ

elektrosztatikus stabilizáció

Szerin-proteinázok

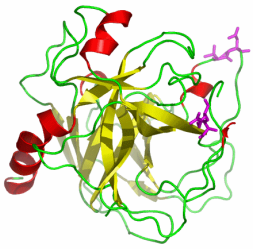
Aktiválódás (zimogén)

Kimotripszinogén - kimotripszin

3 lánc 2 diszulfid híd

Szerin-proteinázok

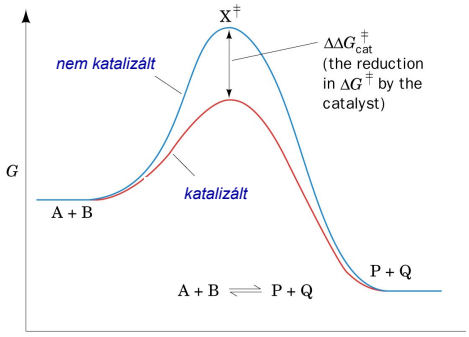
Aktiválódás (zimogén)



Kimotripszinogén - kimotripszin

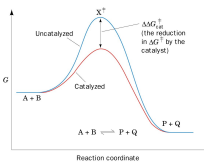
3 lánc 2 diszulfid híd

Az enzimatikus katalízis



Jelentős gát-csökkenés a nem katalizált reakcióhoz képest

Mi az átmeneti állapot (transition state)?



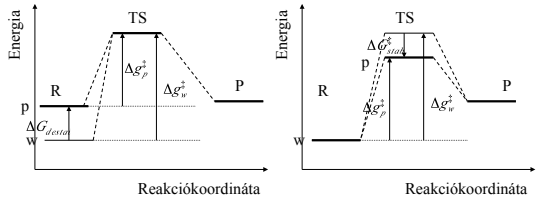
legmagasabb energiájú állapot
a reakciókoordináta mentén

egyébként?
nyeregpont!!!!

Enzimatikus katalízis értelmezése

Enzimreakciók

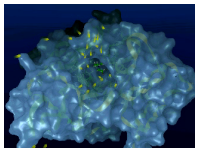
Reaktánsok destabilizálása (DRS) ⟺ Átmeneti állapot stabilizálása (TSS)



entrópia, sztérikus feszültség, deszolvatáció

deszolvatáció

Enzimatikus katalízis értelmezése



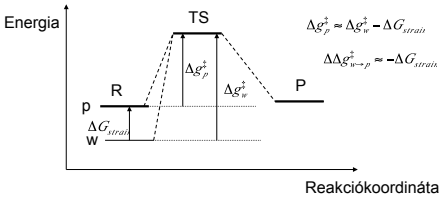
Elméletek

- entrópia
- sztérikus hatások
- dinamikus hatások
- deszolvatáció
- alacsony energiájú hidrogénkötések
- kvantum effektusok (tunneling)
- elektrosztatikus effektusok (szolvatáció)

Enzimatikus katalízis értelmezése

Sztérikus feszültség (Steric strain hypothesis)

A katalízis hajtóereje, hogy ez enzim a kindulási anyagok geometriáját destabilizálja és az átmeneti állapothoz hasonlóvá teszi (feszültség)



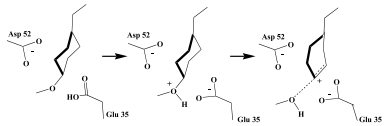
ROSSZ

Enzimatikus katalízis értelmezése

Sztérikus feszültség (Steric strain hypothesis)

Lizozim (oligoszacharidok hidrolízisét katalizálja)

ROR'+ AH⇄ ROH⁺R'+A⁻⇄ R⁺ +A⁻ + R'OH⇄ ROH + AH +R'OH

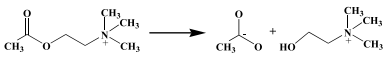


TS: kád (sofa) konformáció
Alapállapot enzimben: kád (sofa) konformáció ⟹ $\Delta g^{\ddagger}_{cat}$ csökken

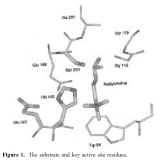
vizes közeghez képest csak 150x gyorsulás

Enzimatikus katalízis értelmezése

Acetilkolin-észteráz



Hipotézis: aromás oldalláncok szerepe a gázfázis-szerű környezet kialakítása



átmeneti állapot stabilizációjának számítása apoláros enzimben

$$(\Delta\Delta G^{\ddagger})^{w\to p} = +11.4 kcal/mol$$

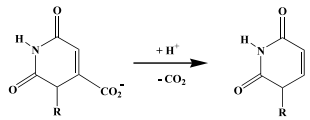
destabilizálás ⟹ **antikatalízis**

(fehérje-főlánc hidrofil)

Enzimatikus katalízis értelmezése

Deszolvatáció

Orotidin Monofoszfát dekarboxiláz



$(k_{cat}/K_M)/k_{non} \sim 10^{23}$ „a leghatékonyabb enzim"

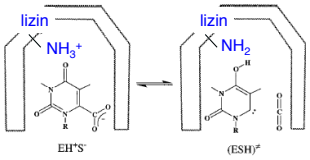
$k_{cat}/k_w \sim 10^{17}$

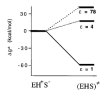
Lee és Houk (1997) Science 92, pp. 942-945

Enzimatikus katalízis értelmezése

Deszolvatáció

Orotidin Monofoszfát dekarboxiláz





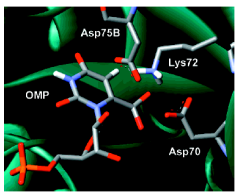
gáz ???!

ODCase fő katalitikus eleme: az alacsony dielektromos állandójú környezet, mely hasonlóvá teszi a reakciót a gázfázishoz

Enzimatikus katalízis értelmezése

Deszolvatáció????

Orotidin Monofoszfát dekarboxiláz



Asp-70 és Asp-75

↓

pre-organizált környezet

célja: TS stabilizáció és
NEM G.S. destabilizáció

Warshel és mtsai (2000) Biochemistry USA 39, pp. 14728-14738.

Enzimatikus katalízis értelmezése

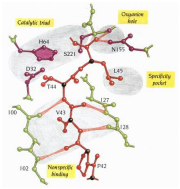
A fehérjék úgy evolválódtak, hogy a feltekeredett fehérje aminosavainak dipólusai tökéletes szolvatációt biztosítsanak a katalizált reakció átmeneti állapotának. Mivel pre-orientált dipólusok elrendeződése megfelel a reakció átmeneti állapotának, az enzimkörnyezet kis átalakuláson megy keresztül míg a reakció a reaktánsoktól a végállapotba jut. Ezért az enzimatikus effektus elektrosztatikus hatásokon keresztül fejeződik ki, mely az „oldott anyag" és a fehérje állandó dipólusai között jön létre. A dipólusok megfelelő elrendeződéséhez szükséges energia a feltekeredés során fektetődik be.

Az enzimek tehát az általuk katalizált reakció „szuper-oldószerei", mely a TS állapotnak komplementer környezetet biztosít. Annak ellenére, hogy néhány oldallánc kiemelkedő hozzájárulást ad a reakció energiagátjának csökkentéséhez, az aktiválási energia csökkentése nem bontható egyszerűen komponensekre.

Szerin-proteinázok

Evolúciós viszonyok

konvergens evolúció

(nincs szekv. hasonlóság)

Szubtilizin