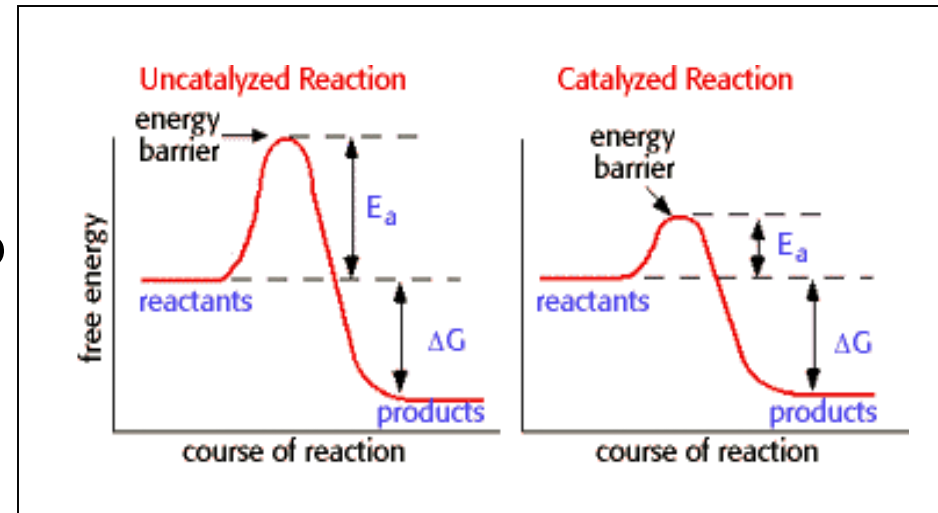


Az “sejt gépei” az **enzimek**



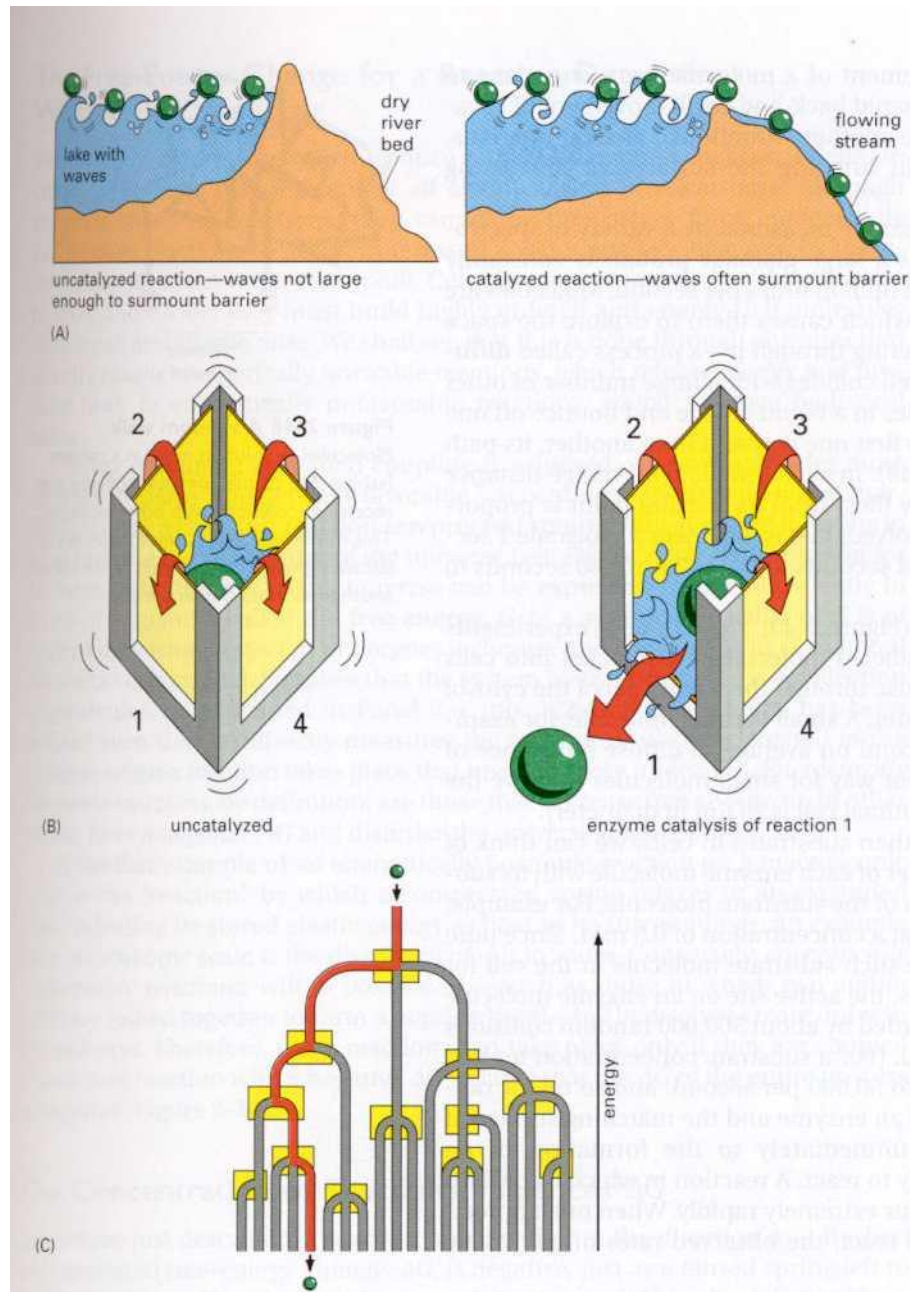
A kémiai reakciók mindig a szabadenergia csökkenés irányába mennek végbe.

Miért nem alakul át minden anyag a számára legalacsonyabb energiájú, legstabilabb állapotába?



Válasz: aktivációs energiagát

Az enzimek ezt az aktivációs energiagátat csökkentik.



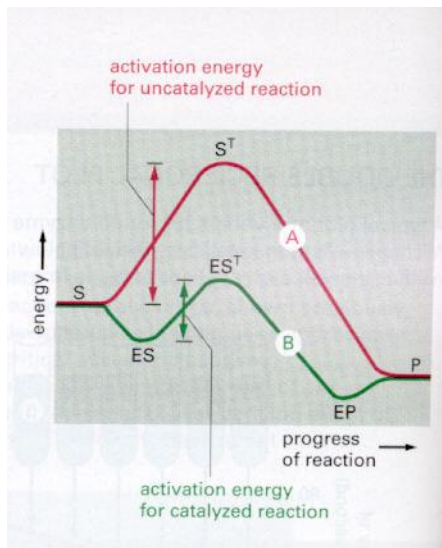
Az enzimek ezt az aktivációs energiagátat csökkentik.

Az enzimek különösen nagy mértékben gyorsítják meg a reakciókat.

Minek tudható ez be?

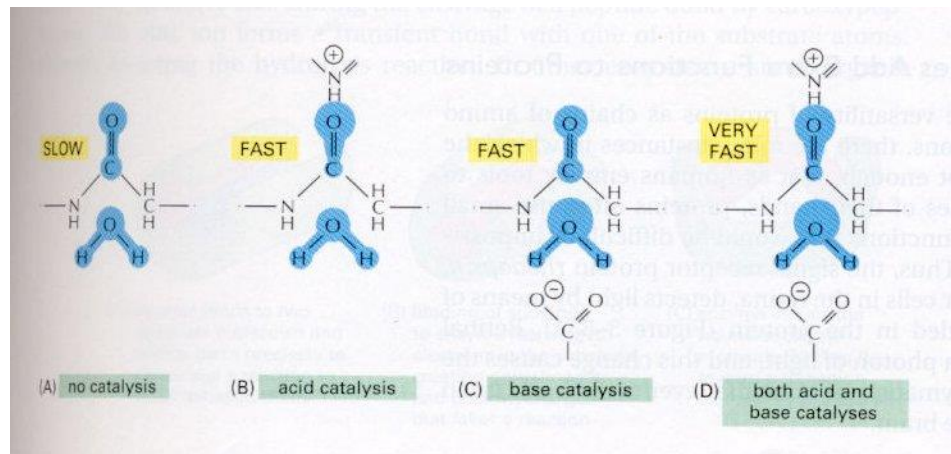
A katalitikus hely környezetében megnövelik a szubsztrátkoncentrációt

A szubsztrát megkötéséből eredő kötési energia hozzájárul a közvetlen katalízishez



Az enzimek jóval nagyobb affinitással bírnak az átmenet állapotú szubsztrát, mint a stabil végtermék iránt

Sav és báziskatalízis



Enzimtulajdonságok

Csak termodinamikailag lehetséges reakciót katalizálnak

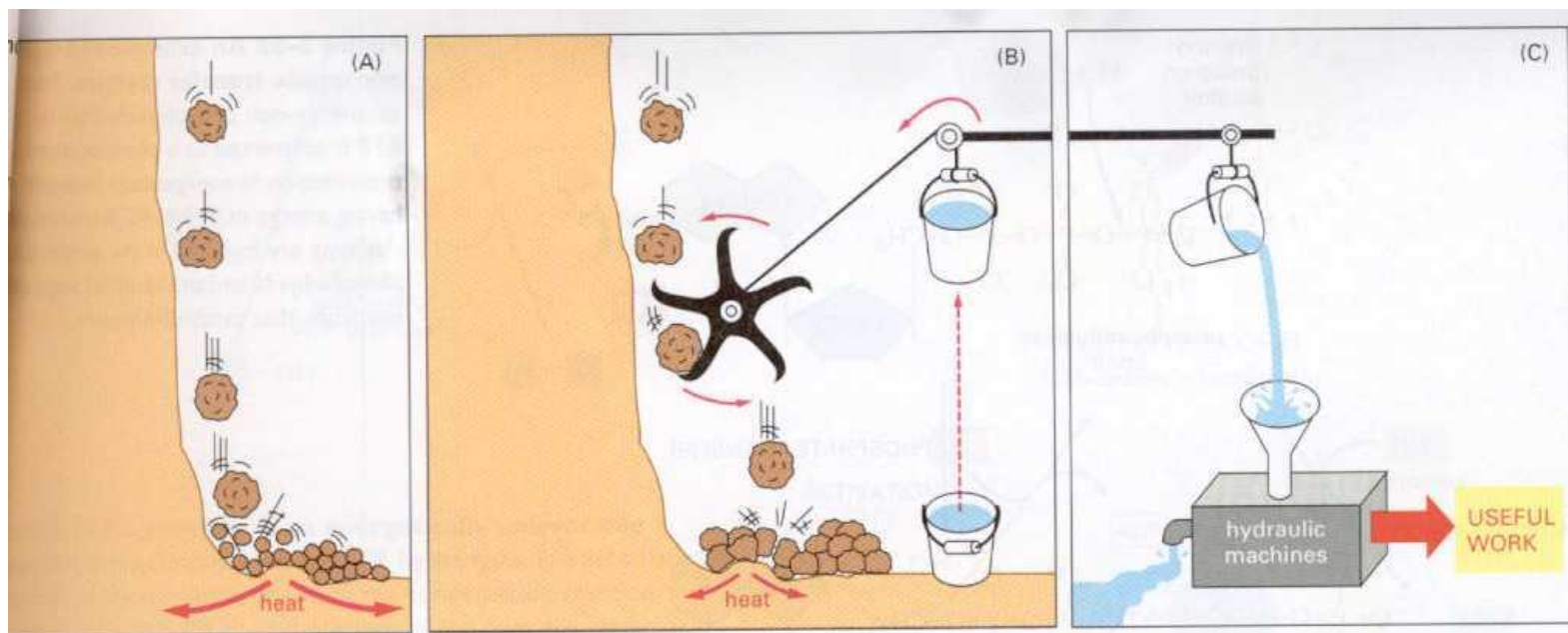
Mivel „csak” az aktivációs energiát csökkentik: Biokatalizátorok

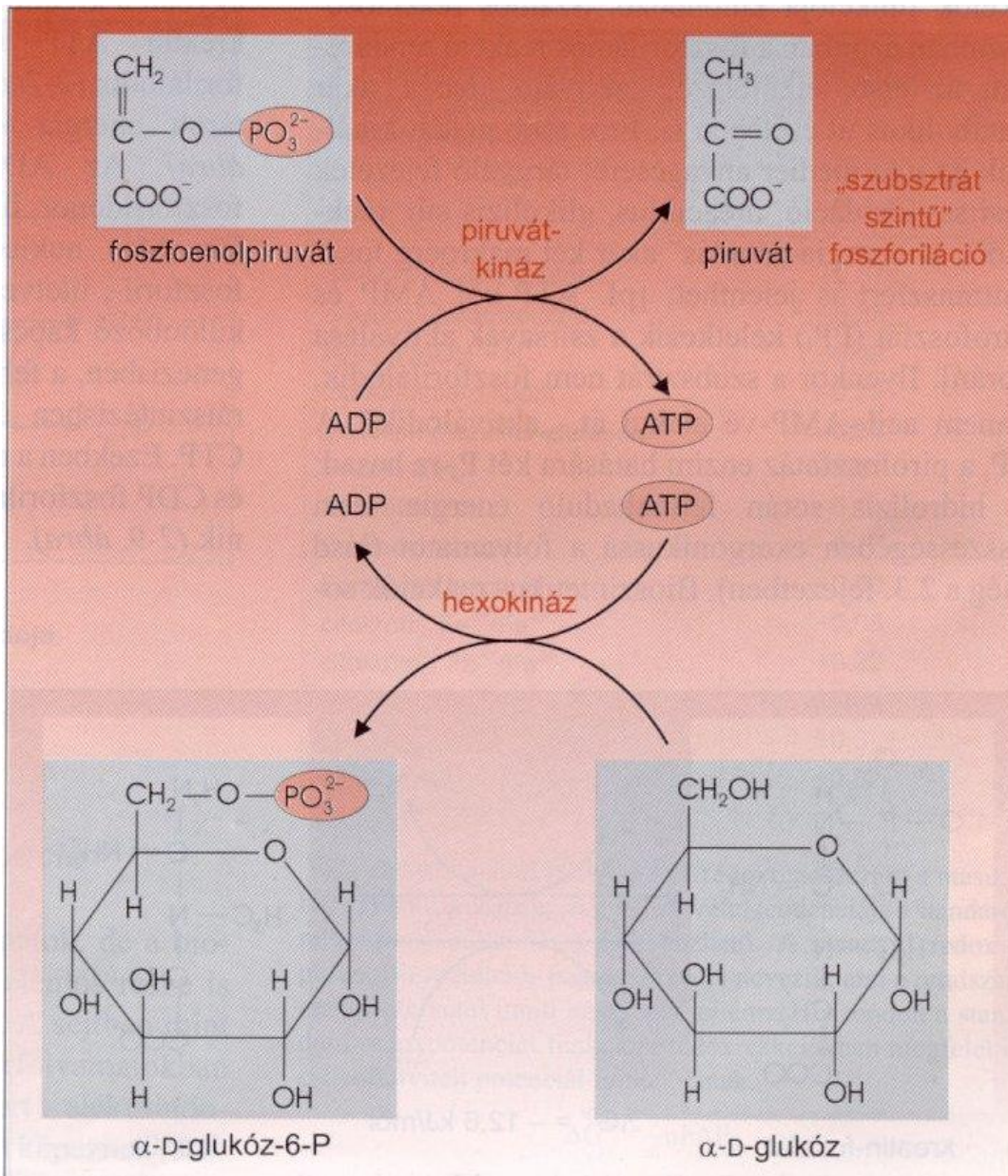
Kapcsolt reakciók

ΔG értéke negatív (exergonikus reakció): spontán, energiabevitel nélkül végbemegy

ΔG értéke pozitív (endergonikus reakció): nem megy végbe spontán

Végbemehet, ha egy exergonikus reakcióval összekapcsoljuk és az eredő szabadenergiaváltozás negatív.

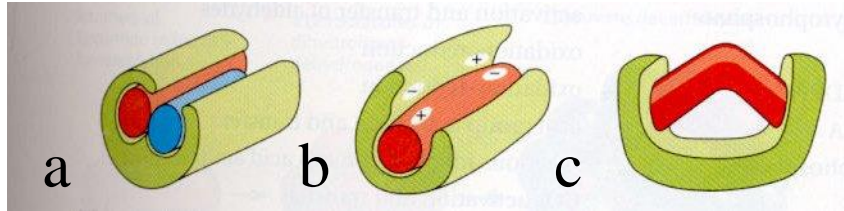




Foszfátvegyület	ΔG^0 (kJ/mol)
foszfoenol-piruvát	-61,9
karbamil-foszfát	-51,4
1,3*-biszfzfoglicerát	-49,3
	-13,4*
kreatin-foszfát	-43,7
3'5'-cAMP	-49,7
ATP (\rightarrow ADP)	-30,5
ADP (\rightarrow AMP)	-27,6
pirofoszfát	-27,6
AMP	-14,2
glukóz-1-foszfát	-20,9
glukóz-6-foszfát	-13,8
fruktóz-6-foszfát	-15,9

* A C3-foszfát-csoport hidrolízisének ΔG^0 -értéke

Orientációs hatás



a., az enzim megköti és pontosan orientálja egymáshoz a szubsztrátokat

b., a szubsztrát megkötésével az enzim átrendezi annak elektroneloszlását, részlegesen + és - részeket eredményezve.

c., az enzim megfeszíti a megkötött szubsztrát molekulát, ezzel az átmeneti állapot felé tolva

Katalitikus antitestek

Enzimtulajdonságok

Csak termodinamikailag lehetséges reakciót katalizálnak

Mivel „csak” az aktivációs energiát csökkentik: Biokatalizátorok

Maguk nem változnak a reakció során

Az enzimek fehérjemolekulák

Holoenzim = apoenzim + koenzim

Az enzimhez kapcsolódó nem fehérje alkotók, prosztetikus csoportok

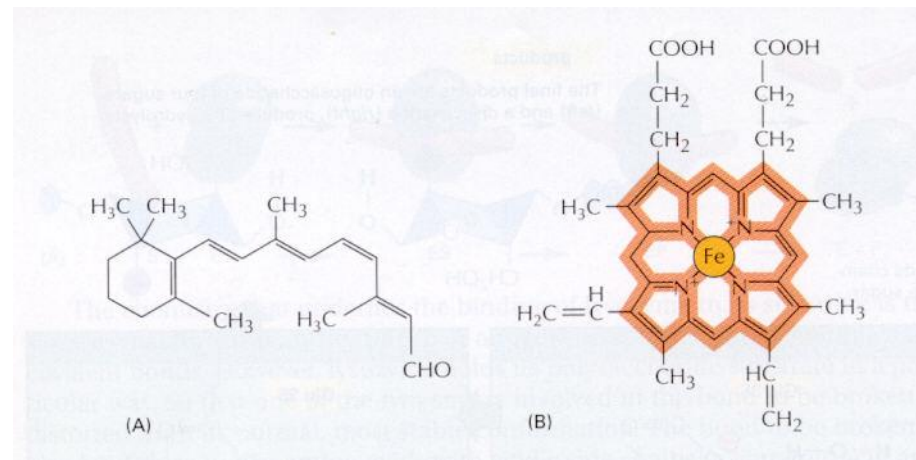
Koenzim	Reakció (a koenzim által szállított csoport)
Nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (NAD ⁺) (niacinszármazék)	hidrogénatom és elektron
Nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP ⁺) (niacinszármazék)	hidrogénatom és elektron
flavin-mononukleotid (FMN) (riboflavin, B ₂ -vitamin-származék)	hidrogénatom
flavin-adenin-dinukleotid (FAD) (riboflavin, B ₂ -vitamin-származék)	hidrogénatom
koenzim Q	hidrogénatom
tiamin-pirofoszfát (tiamin, B ₁ -vitamin-származék)	aldehid
koenzim-A (pantoténsavszármazék)	acilcsoport
liponsav	acilcsoport
kobalamid (kobalamin, B ₁₂ -vitamin-származék)	alkilcsoport
biotin (B-vitamin-csoport)	szén-dioxid-fixálás
piridoxál-foszfát (piridoxin, B ₆ -vitamin-származék)	aminocsoport
tetrahydrofolsav (folsavszármazék)	metil-, metilén-, formil- és formiminocsoport

Az enzimek működésükhöz nem fehérje, nem aminosav részeket is igényelnek.

- fémionok

- szerves molekulák

kovalens kötődéssel pl.: biotin, liponsav
nem kovalens kötődéssel pl.: NAD, NADP⁺, tetrahydrofolsav



Enzimtulajdonságok

Csak termodinamikailag lehetséges reakciót katalizálnak

Mivel „csak” az aktivációs energiát csökkentik: Biokatalizátorok

Maguk nem változnak a reakció során

Az enzimek fehérjemolekulák, melyeket nem fehérje természetű részek egészíthetnek ki.

Holoenzim = apoenzim + koenzim

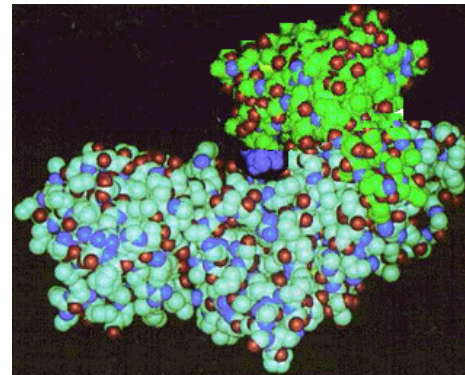
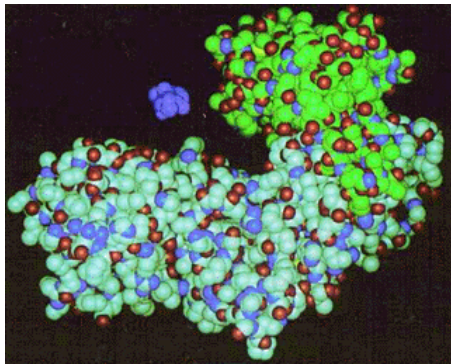
Specifikusak:

- Szubsztrát
- Reakció

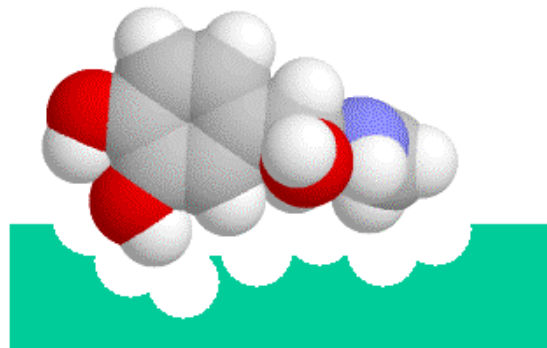
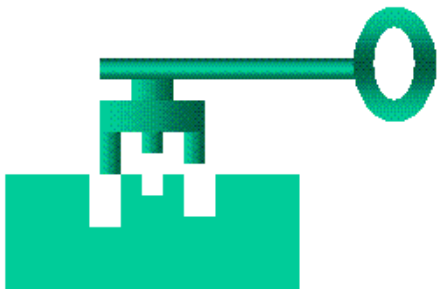
pl.: hexokináz, trombin

Érzékenyek a környezeti hatások, körülményekre (pH, hőmérséklet, ionerősség, koncentráció)

Fehérjeszerkezet és enzimműködés



1. **Kulcs-zár elmélet:** a szubsztrát pontosan az enzim kötőhelyének kiegészítése. Emil Fischer 1890



aktív centrum
↓
kötő hely
↓
katalitikus hely

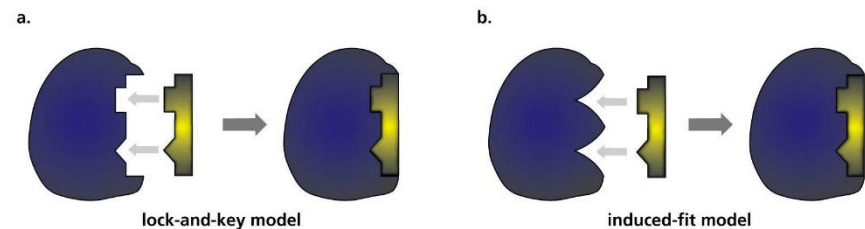
koenzimek

Az aktív hely kialakításában az enzim szerkezetének csak kis része vesz részt.

E-S kötődés: gyenge másodlagos kötések: ionos, hidrogén kötés, hidrofób kölcsönhatások

2. Indukált illeszkedési elmélet (Induced fit): A szubsztrát bekötése módosítja az enzim térszerkezetét. Koshland 1958.

Az új enzim konformáció hozzájárul a megnövekedett katalitikus aktivitáshoz.



Enzimkinetikai alapok



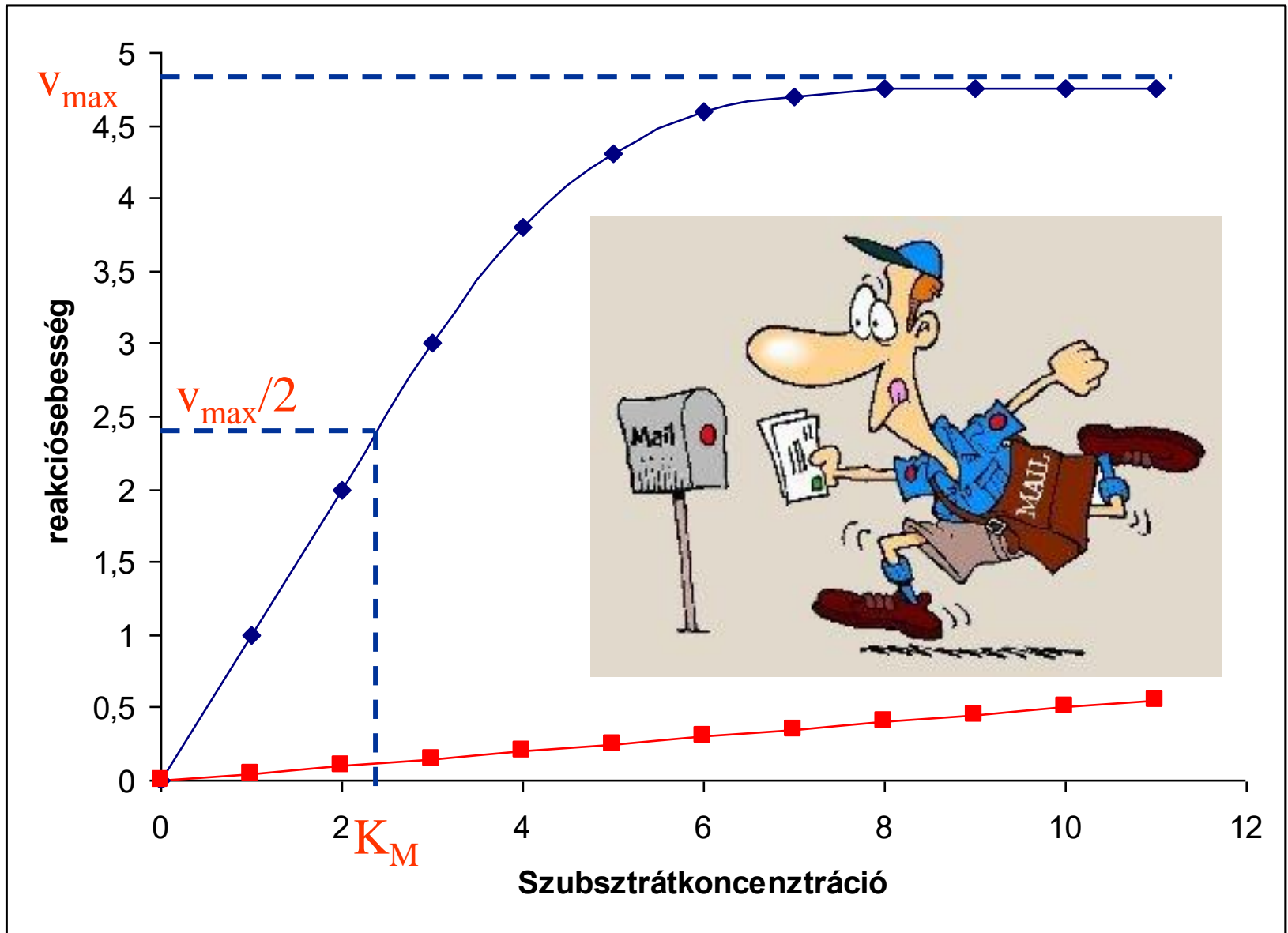
Reakciósebesség: az időegység alatt átalakított szubsztrát, vagy képződő termék mennyisége.

A nem katalizált reakciók sebessége a reakcióban részt vevő anyagok koncentrációjának függvénye.

Enzimes reakciók:

Az adott idő alatt megkötött és átalakított szubsztrát mennyisége behatárolt. Az enzim egy pontban telítődik (V_{\max})

„A postásnak is csak két keze van.”





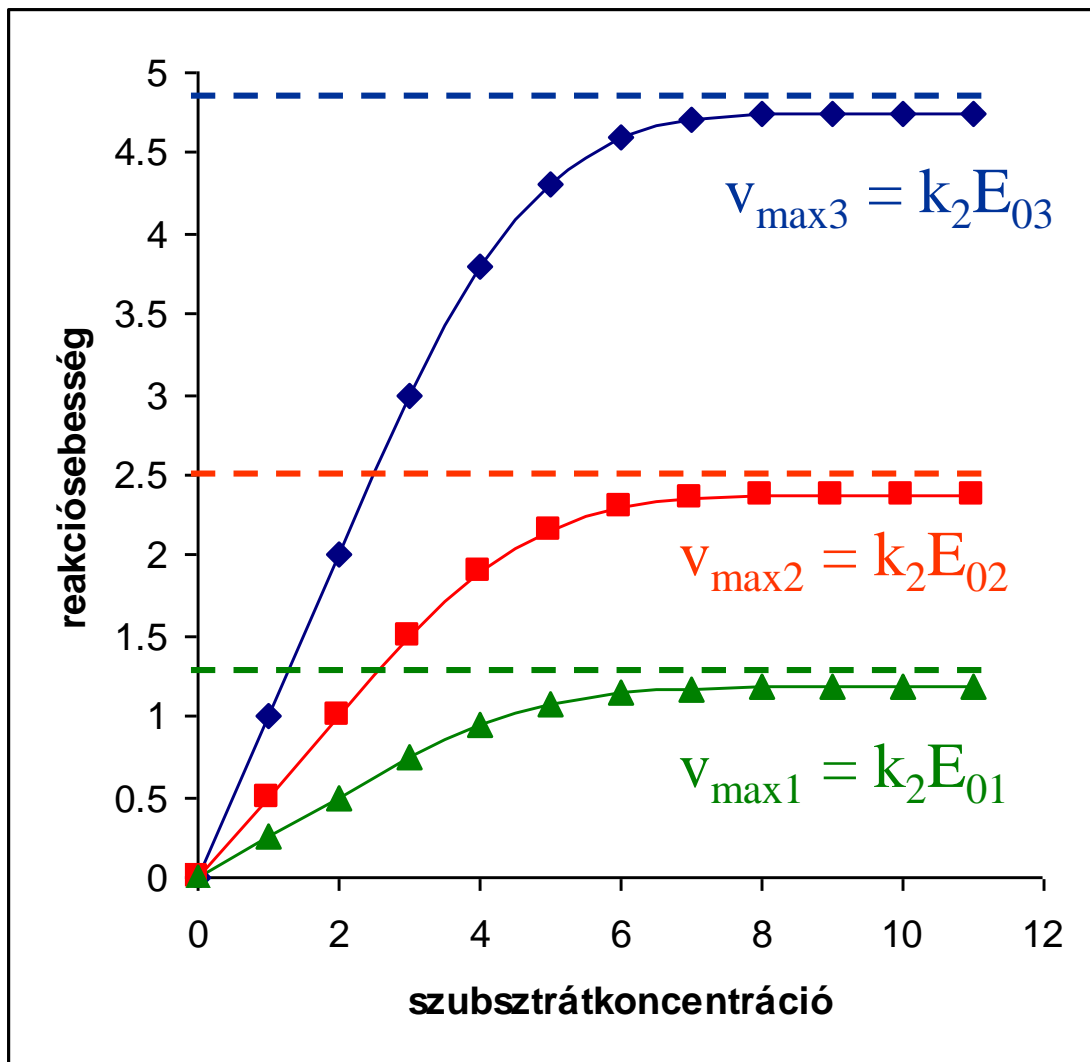
Ha két postás 1 óra alatt 250 levelet tud kézbesíteni.





Akkor négy postás 1 óra alatt
hány levelet kézbesít?

Megjegyzés: a körülmények
azonosak



A Michaelis-Menten modell



Maud Menten

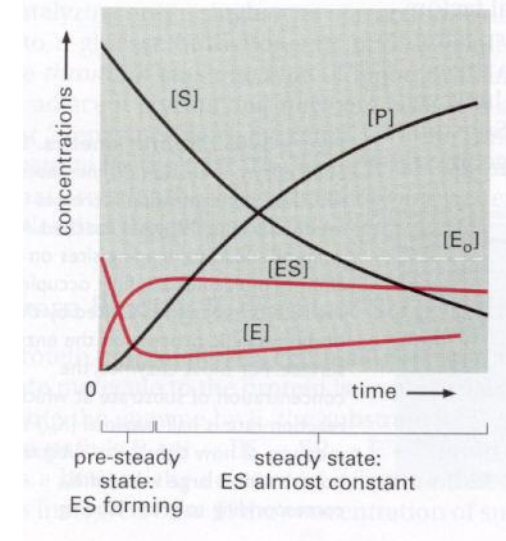


Leonor Michaelis



Kiindulási feltételek, egyszerűsítések:

1. Az első lépés gyors egyensúlyba
2. A második lépés irreverzibilis
3. Kezdeti sebességet vizsgálunk
4. $E \ll [S]$



ES fogyasztás = ES képződés

$$k_{-1}[ES] + k_2[ES] = k_1 [E][S]$$

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

$$[ES] = [E][S] * k_1 / (k_{-1} + k_2) = ([E_0] - [ES])[S] * k_1 / (k_{-1} + k_2)$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

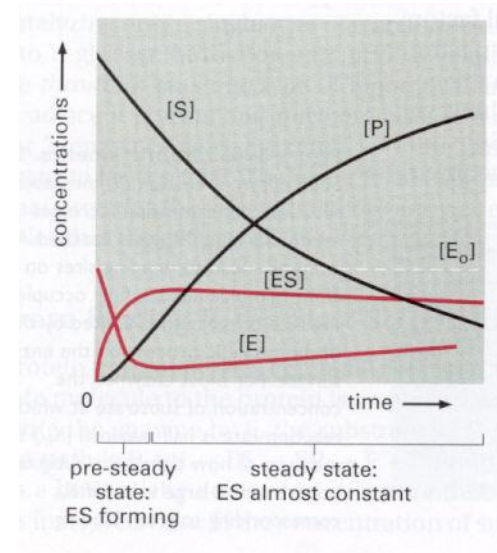
$$[ES] = ([E_0] - [ES])[S] * 1 / K_m$$

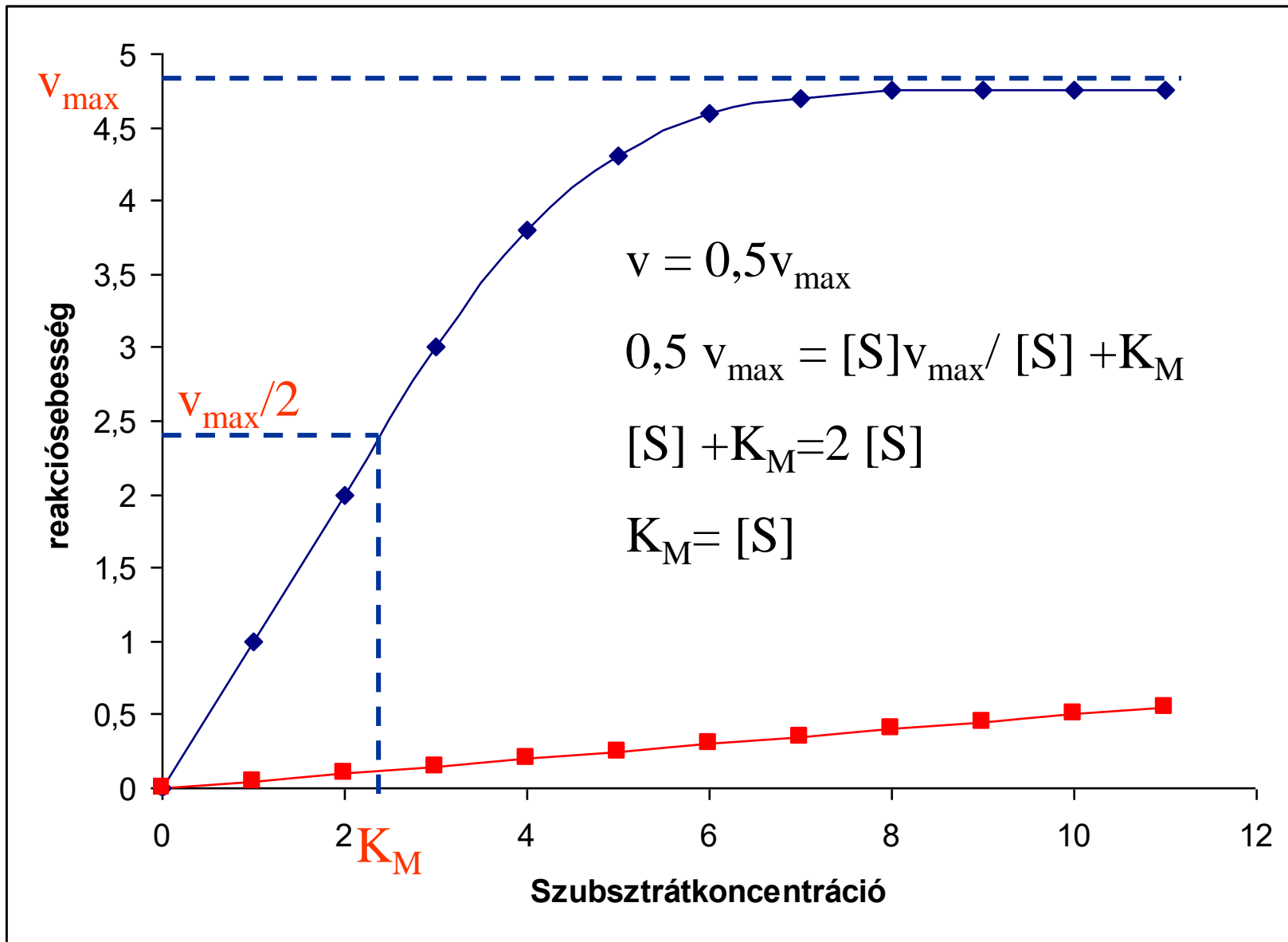
$$[ES] K_m + [ES] [S] = [E_0] [S]$$

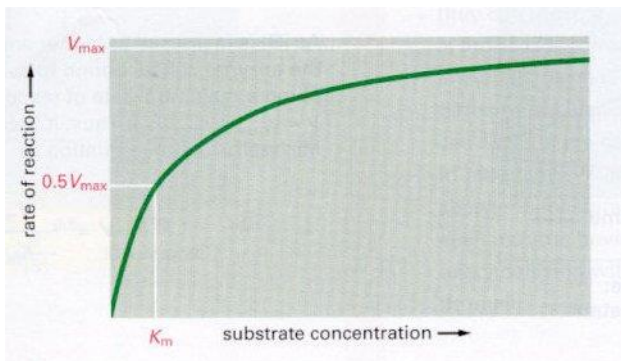
$$[ES] = [E_0] [S] / (K_m + [S])$$

$$v = k_2 [E_0] [S] / (K_m + [S])$$

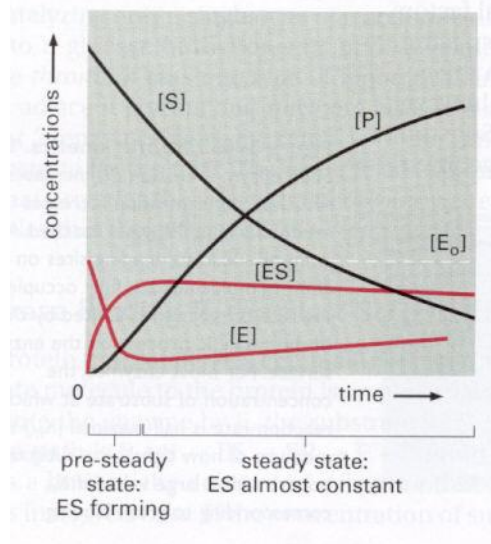
$$v = v_{\max} [S] / (K_m + [S])$$



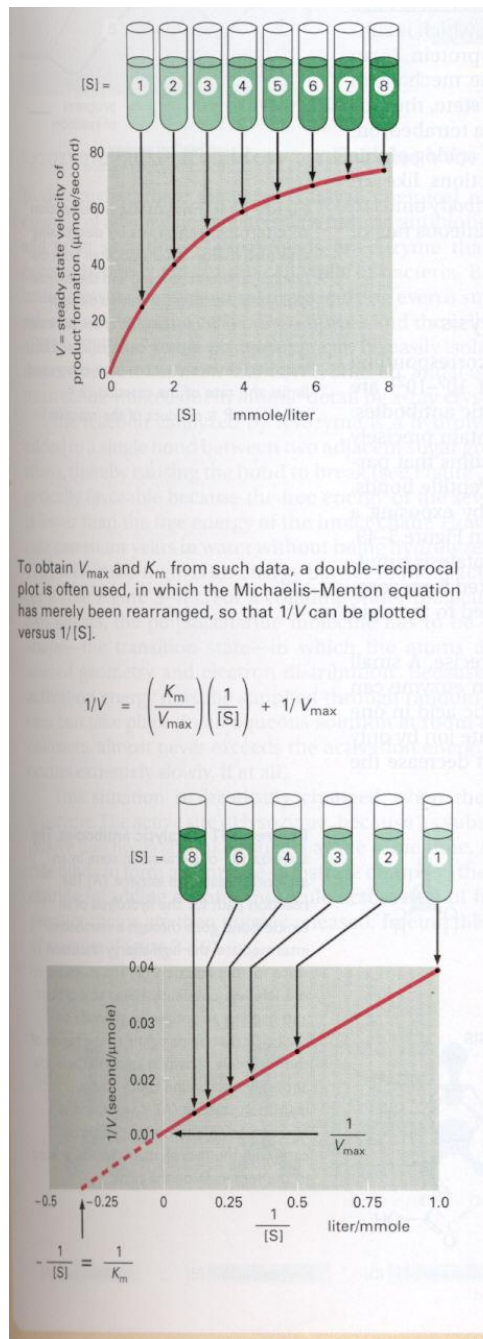




A reakciósebesség függése a szubsztrátkoncentrációtól



A szubsztrát, a termék és az enzim koncentrációjának időbeli alakulása



Az enzimaktivitás szubsztrát-koncentráció-függésének és jellemző kinetikai paramétereinek meghatározása

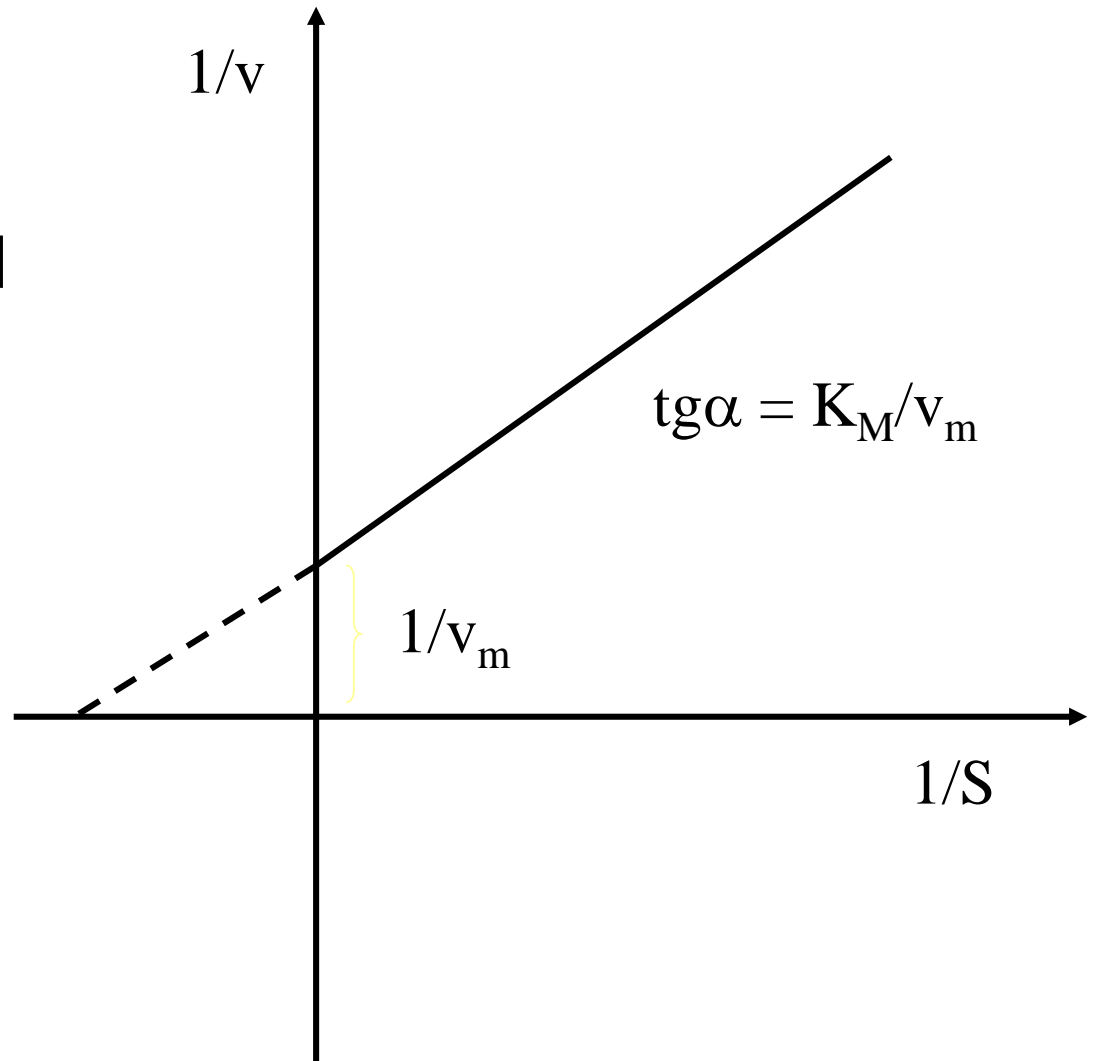
Lineweaver-Burk féle linearizált ábrázolásmód

$$v = v_m[S]/(K_M+[S])$$

$$1/v = ([S] + K_M)/v_m[S]$$

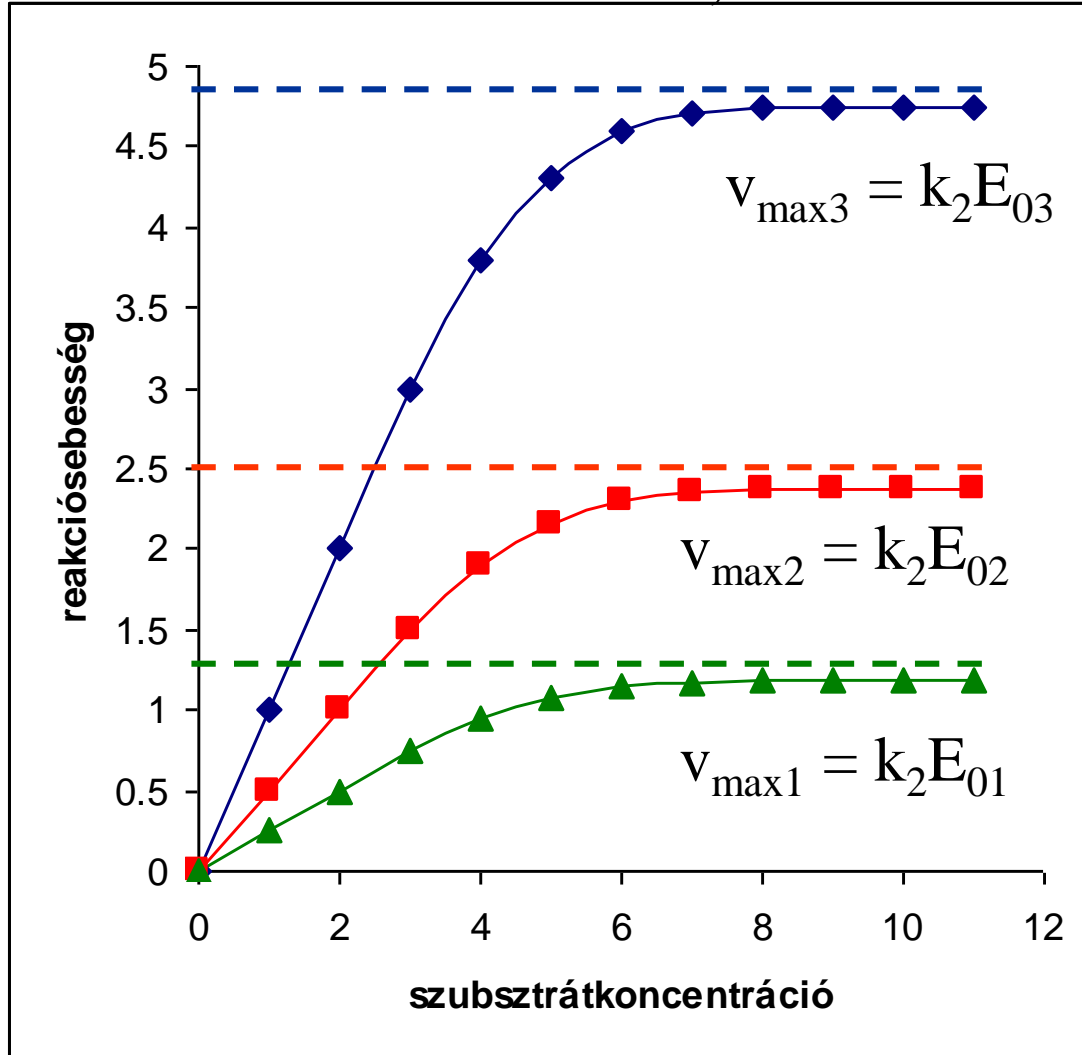
$$1/v = [S]/v_m[S] + K_M/v_m[S]$$

$$1/v = 1/v_m + 1/[S] * K_M/v_m$$



A kinetikai paraméterek értelmezése:

V_{\max} : arányos a jelenlévő enzim mennyiségével, lényegében az enzimaktivitás mérőszáma, az enzim mennyiségéről ad információt.



Függ az enzim mennyiségétől, nem enzimmtulajdonság.

A k_2 sebességi állandó azonban már enzimmtulajdonság.

Átviteli szám: a v_{\max} és az enzimkoncentráció hányadosa

$$k_{\text{cat}} = v_{\max}/E_0 \quad (1 \text{ és } 10\,000 \text{ közötti szám, általában } \sim 1000)$$

egy enzim molekula által 1 másodperc alatt átalakított szubsztrátmolekulák száma.

K_M :

1. Megadja a szubsztrát koncentrációját az enzim környezetében.
2. Állandó egy adott enzimre, alkalmas lehet az enzim azonosítására.
3. Befolyásolásával szabályozható az enzim aktivitása.
4. Az szubsztrát enzim irányába mutatott affinitását mutatja.

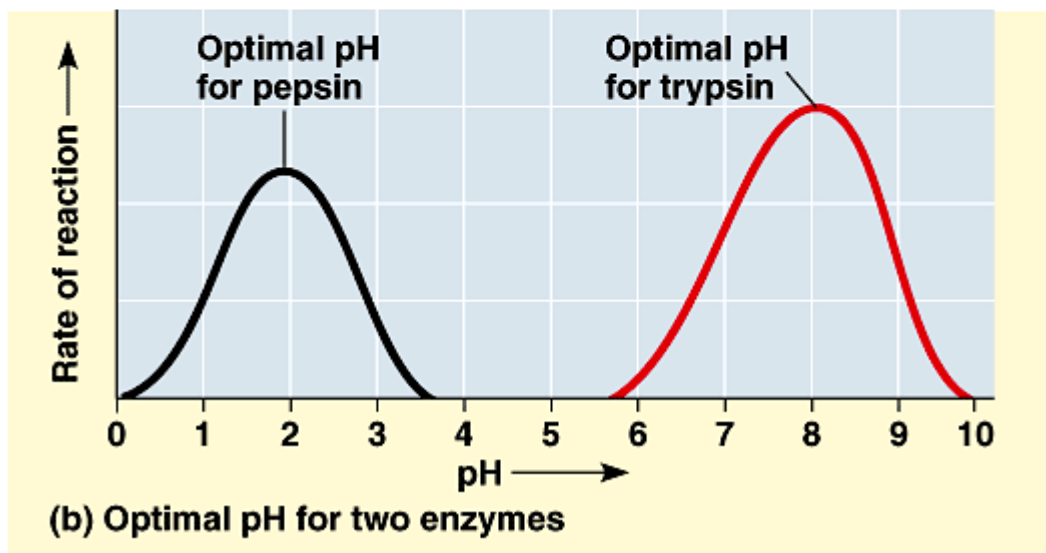
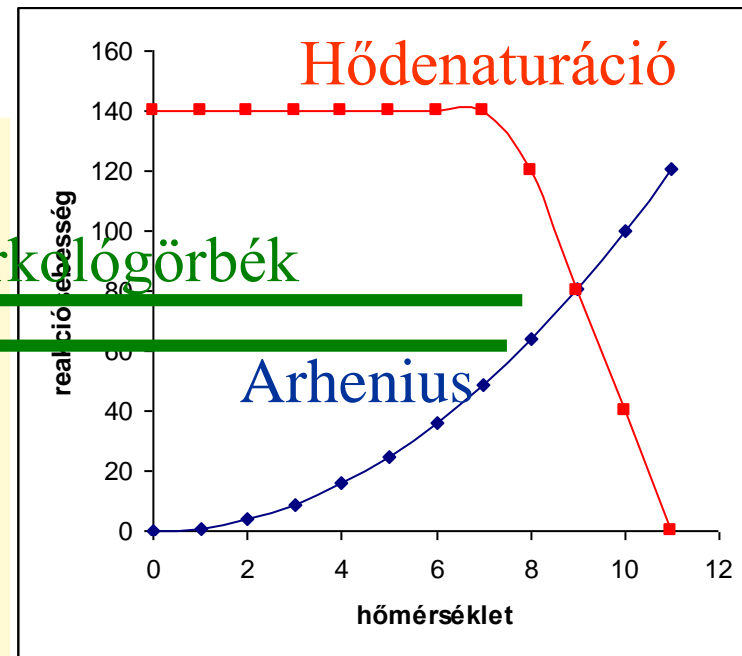
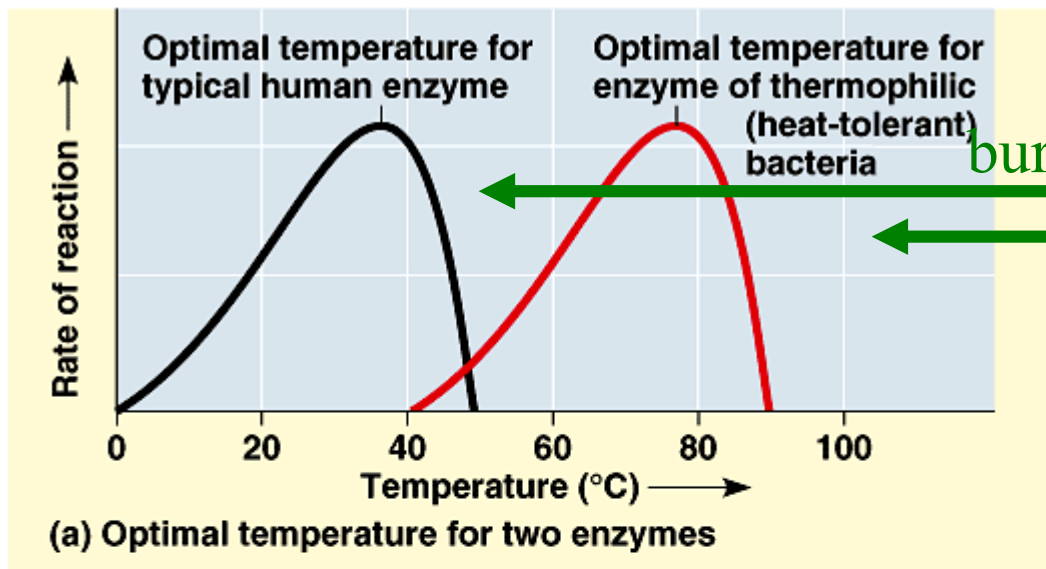
Enzimaktivitás: időegység alatt adott reakciókörülmények között átalakított szubsztrát, vagy képzett termék mennyisége.

1 Unit: $1\mu\text{mol/perc}$

1 katal: mol/s (SI)

Fajlagos aktivitás: egységnyi mennyiségű fehérjére eső enzimaktivitás ($\mu\text{mol/perc/mg}$ fehérje)

A pH és a hőmérséklet hatása az enzimreakciók sebességére



Izoenzimek: Azonos funkciót ellátó (azonos reakciót katalizáló) azonban különböző (elsődleges) fehérjeszerkezetű enzim molekulák.

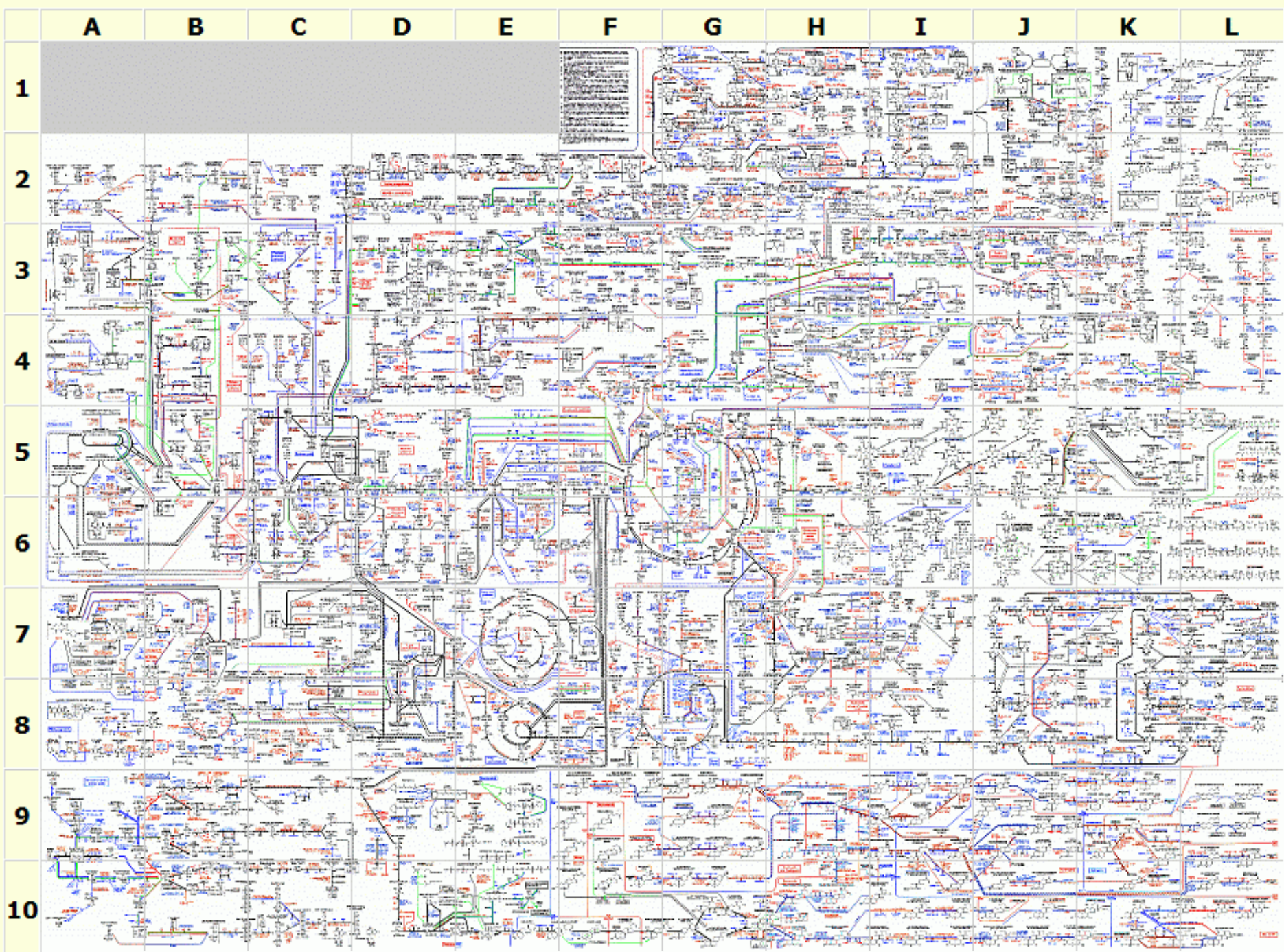
Az izoenzimek különbözhetnek:

- szabályozásukban
- sejten belüli elhelyezkedésükben
- különböző szervek, szövetek közötti megoszlásukban
- az általuk katalizált reakció kinetikai paramétereiben: v_{\max} , K_M
- stabilitásukban

Az enzimek osztályai

A hasonló reakciókat katalizáló enzimeket egyazon osztályba sorolták. (Enzyme Commission, EC). Négy számmal jelöli az enzimeket: 1. osztály, 2. alosztály, 3. csoport, 4. az adott enzim

1. Oxidoreduktázok pl.: etanol + NAD⁺ \longleftrightarrow acetaldehid + NADH + H⁺
2. Transzferázok pl.: glukóz + ATP \longrightarrow glukóz-6 foszfát + ADP
3. Hidrolázok pl.: glukóz-6 foszfát + H₂O \longrightarrow glukóz + P_i
4. Liázok pl.: 2-foszfoglicerát \longleftrightarrow foszfoenol-piruvát + H₂O
5. Izomerázok pl.: glukóz-6 foszfát \longleftrightarrow frutóz-6 foszfát
6. Ligázok pl.: glutamát + NH₃ + ATP \longrightarrow glutamin + ADP + P_i



Enzimgátlások

Irreverzibilis:

Az enzim valamely katalízisben szerepet játszó funkcionális csoportját teszik tönkre, vagy szorosán akár kovalens kötéssel hozzákapcsolódnak (pl.: nehézfémek). Az irreverzibilis gátlás ténylegesen csökkenti az aktív enzimmennyiséget.

Reverzibilis:

A reverzibilis gátlószerek dinamikus komplexet képeznek az enzimmel. A gátlás fajtáit megkülönböztetjük a v_{\max} és K_M kinetikai paraméterekre kifejtett hatásuk szerint.

Kompetitív: K_M nő

Nemkompetitív: v_{\max} csökken

Unkompetitív: v_{\max} , K_M csökken

Az enzimaktivitás közvetlen szabályozásának módjai

1. Allosztérikus enzimek

Allos = másik

Steros = szilárd, vagy három dimenziós

Aktív hely: szubsztrát

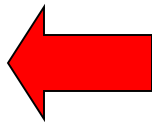
Regulációs hely: regulátor molekula

Kommunikáció



A regulátor molekula
bekötődése befolyásolja az aktív
helyet: konformációváltozás

aktivitásváltozás



A fehérjék jelentős része allosztérikus:

- enzimek
- receptorok
- szerkezeti fehérjék
- motorfehérjék

A ligandok a fehérje azon konformációját stabilizálják, amelyikhez a legerősebben kötődnek. Így be- és kikapcsolhatják a különböző konformációkat.

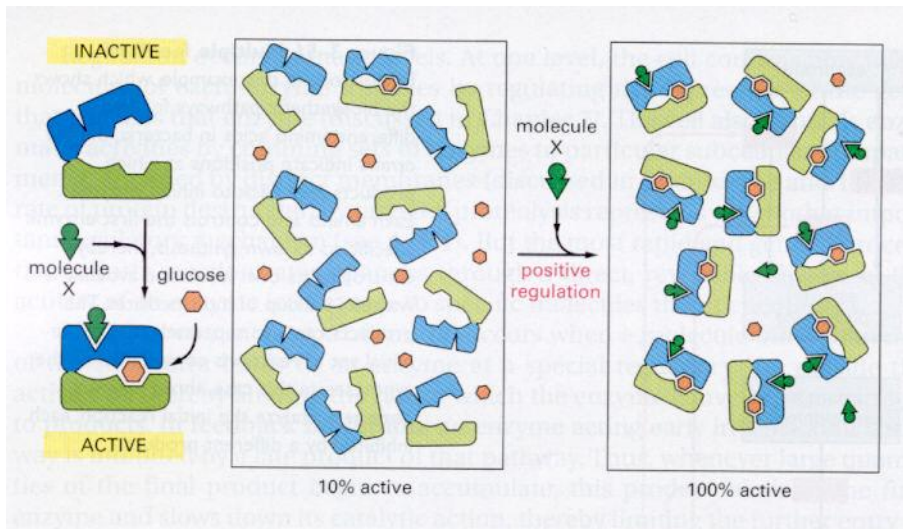
Kölcsönös ligandhatások

Felt: egy fehérjének

- glukóz
- X

} kötőhelye van egymástól elkülönülten

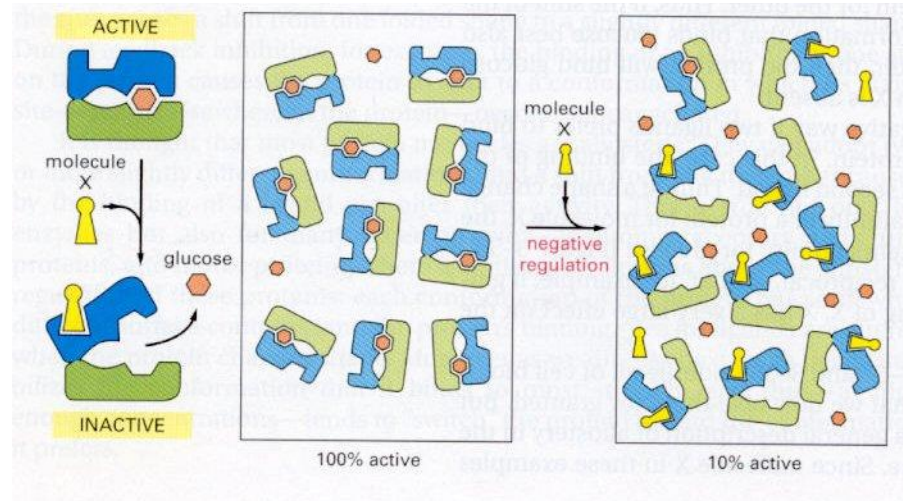
Ha befolyasolják egymás kötődését, akkor a két kötőhely párosított, vagy összekötött.



Ha mindkét ligand ugyanazon fehérjekonformációt részesíti előnyben, akkor bármelyik bekötése növeli a fehérje másik irányába mutatott affinitását.

Kölcsönös ligandhatások

A kötőhelyek kötöttsége negatívan befolyásolja a kötődést, ha a két különböző molekula a különböző konformációjú fehérjéhez szeret jobban kötődni.



A kötöttség mennyiségileg oda-visszaható, ha az egyik ligandnak nagy hatása van a másik kötődésére, akkor a másikonak is nagy hatása van az egyikére.

Az X molekula nem az aktív helyhez kötődik

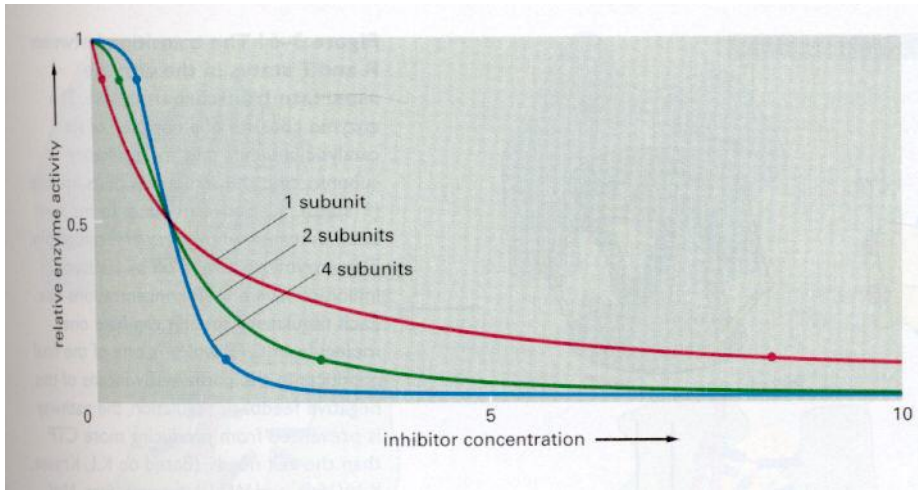


Nem kell, hogy bármilyen kapcsolat legyen közte és a glukóz között.

Az X molekula egyszerűen be- (+ reguláció) vagy kikapcsolja (- reguláció) az enzimet.

Az allosztérikus fehérjék általános kapcsolóként működhetnek, segítve az anyagcsereutak összehangolását.

Kooperativitás



— egy alegységes enzim

— két alegységes enzim

— négy alegységes enzim

Egy alegységes enzim nem ad lehetőséget éles szabályozásra.

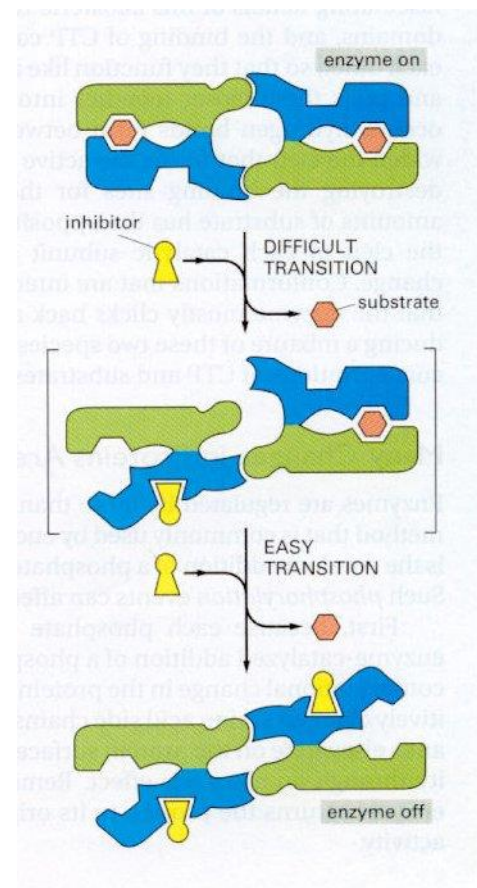
Több alegységes enzim: az első ligand bekötése allosztérikus változást eredményez az alegységen belül, amely ezt követően áttérjedhet a többi alegységre, elősegítve a ligand többi alegység általi megkötését.

Kooperativitás

Az első ligand bekötése nehezebb, mivel egy energetikailag kedvező kapcsolat bomlik fel.

A második kötődése jóval könnyebb, mivel ez visszaállítja a szimmetrikus molekula monomer-monomer kapcsolatát (és ezzel együtt teljesen inaktiválja az enzimet).

A kooperativitás révén jóval élesebb hatás, igazi kapcsolás érhető el.



Heterotrop hatás: a szubsztráttól eltérő allosztérikus effektormolekula hatása

Homotrop hatás: több azonos alegységből álló fehérjék (enzimek) esetében egyetlen molekula, enzimek esetében maga a szubsztrát képes betölteni az allosztérikus ligand szerepét is.

A folyamat alapja a már megismert allosztérikus konformációváltozásban keresendő.

Pozitív homotrop hatás: szigmoid telítési görbe

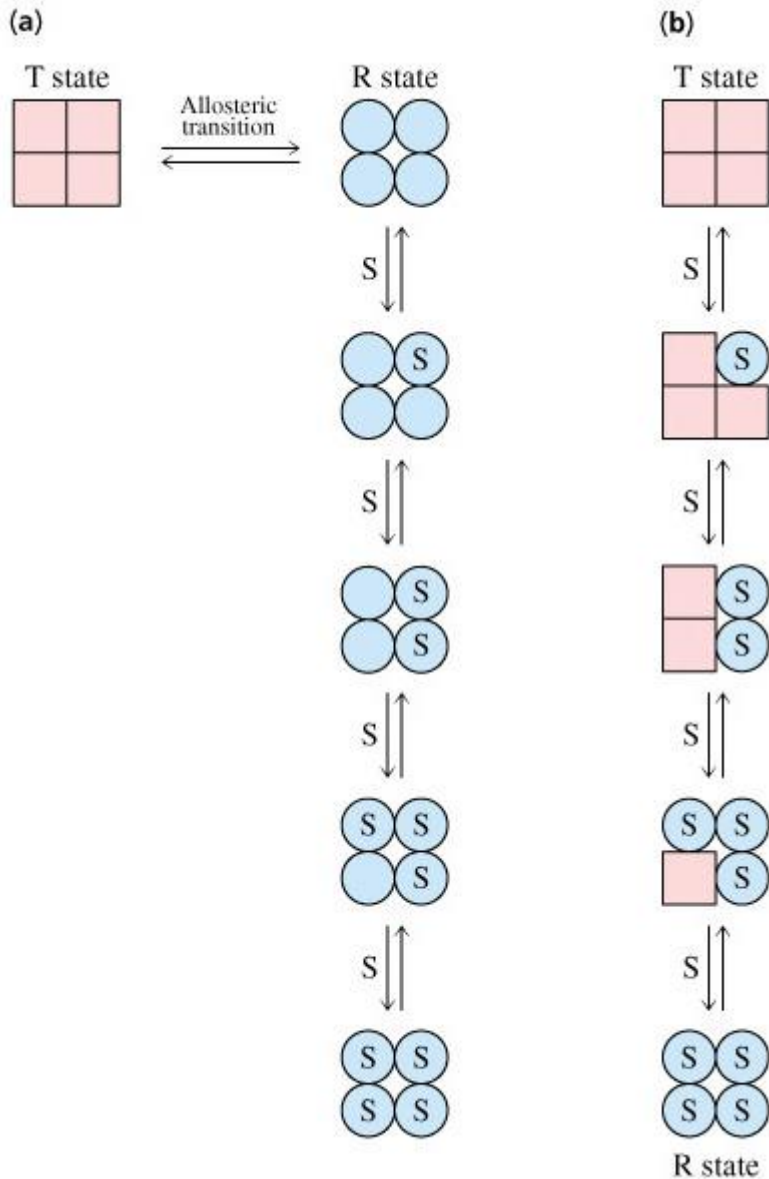
Alacsony $[S]$, kicsi a kötődés valószínűsége

a $[S]$ emelkedésével ez rohamosan megnő



Meredeken emelkedő telítési görbe

A szimmetria és a szekvenciális modell



a. szimmetria modell: az enzim összes alegysége ugyanazon konformációban képes csak létezni, hibrid állapot nem képzezelhető el

b. szekvenciális modell: hibrid állapot is lehetséges

Példa a kooperatvitásra és az allosztériára: a **HEMOGLOBIN**

A metabolizmus O_2 igénye nagy

Molekulák oxigén

szállításra: hemoglobin

tárolásra: mioglobin

Hb mentes vér: 5 ml O_2 /l

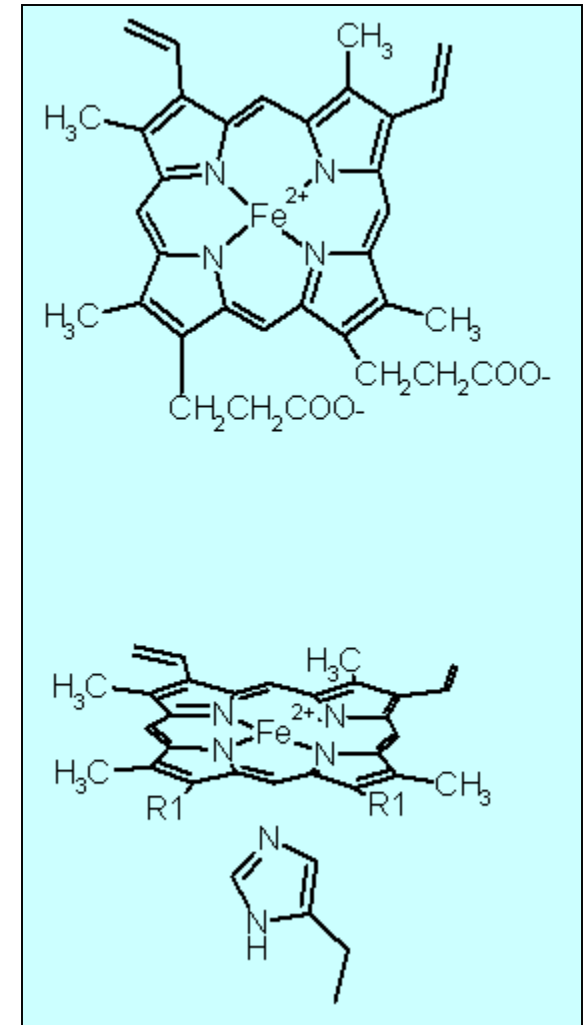
Hb-nal: 250 ml O_2 /l

Hemoproteinek: Fe (II) és protoporfirin IX

Fe koordinációs száma: 6

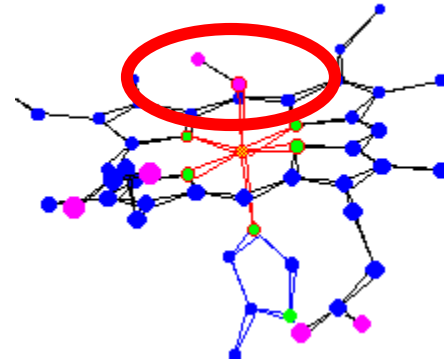
4 db kötés a porfirin váz 4 N

1 db a globin lánc (proximális) hisztidinjéhez



A 6. kötőhely: **oxigén**

CO 300-szor jobb komplexképző,
mint az oxigén. Veszélyes!



Csak a ferro vas Fe (II) köt oxigént a ferri Fe (III) methemoglobin
nem!

Hemoproteinek:

- Fe (II) állapotban O₂ szállítás (Hb) kötés (Mb)
- Fe (II) \longleftrightarrow Fe (III) elektrontranszfer pl.: citokrómok
- Fe (II) oxigénkötés, majd Fe (II) \longleftrightarrow Fe (III)
redoxreakcióban redukálja az oxigént pl.: citokróm
P 450 enzimek

Térszerkezetük

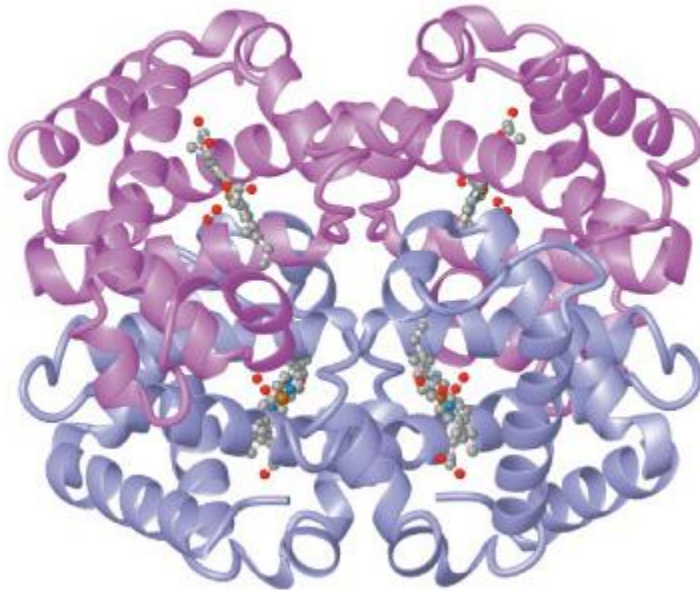
Mb: egyetlen polipeptidláncból és a hemből áll

Hb: 4 polipeptidlánc + 4x1 hem

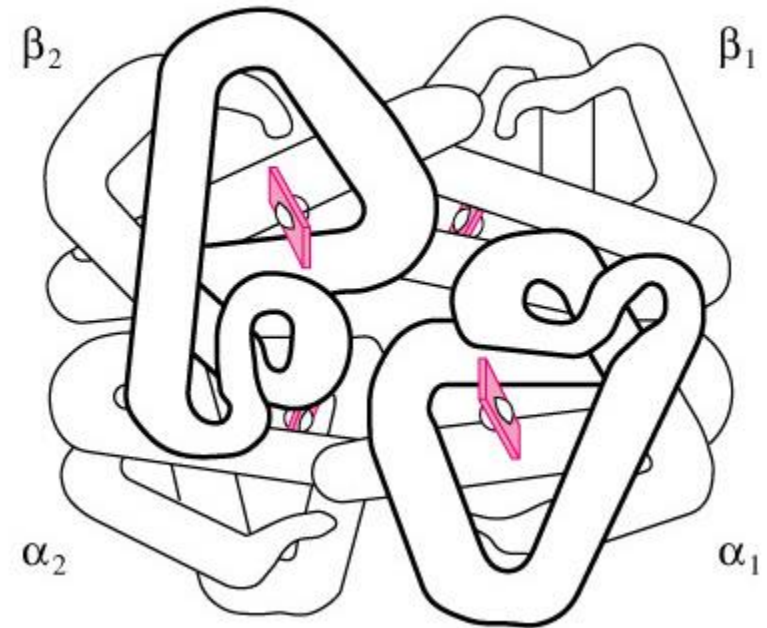
Hb A (adult): 2 db α lánc
2 db β lánc

Hb F (foetalis): 2 db α lánc
2 db γ lánc

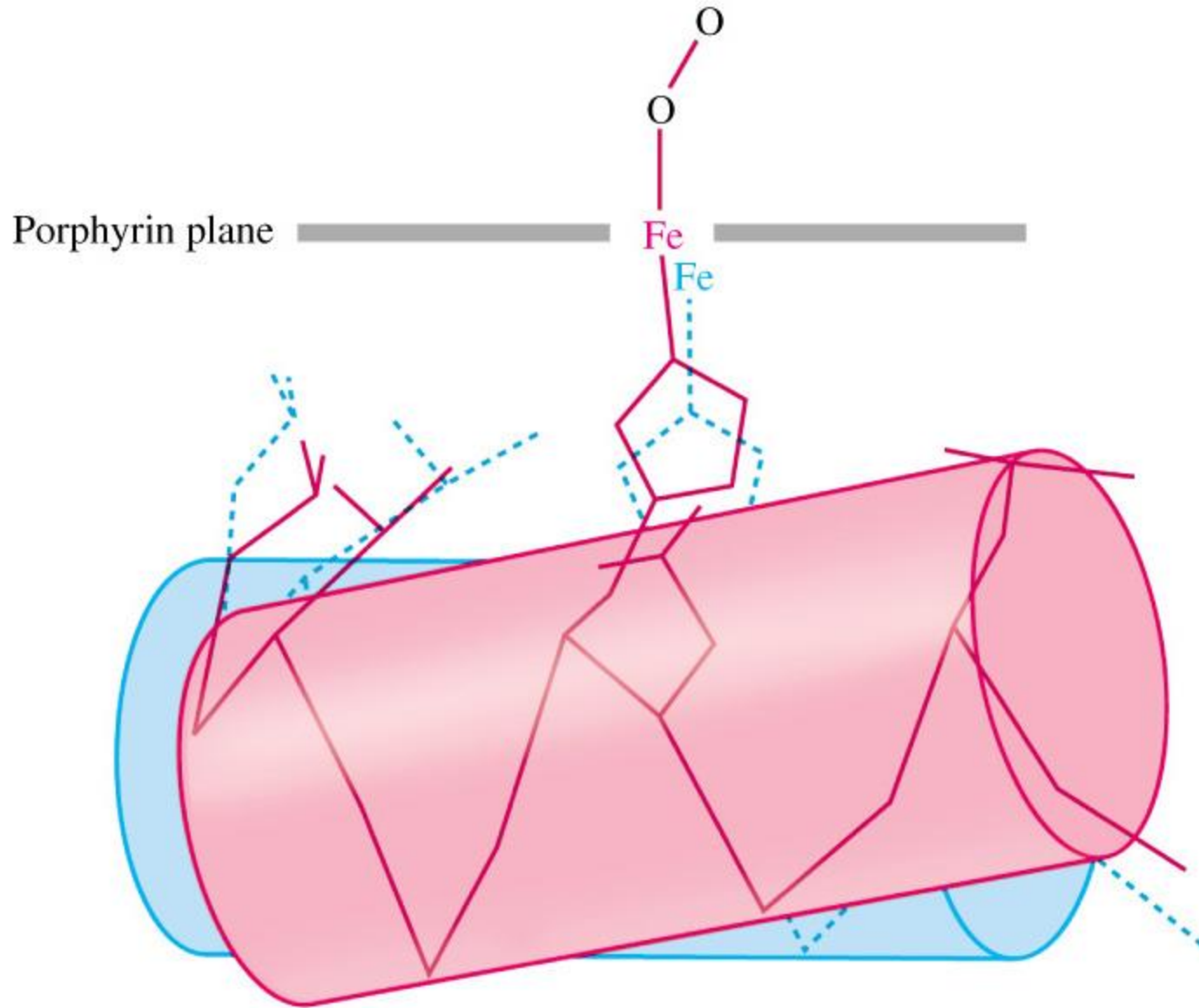
(a)



(b)



A hemoglobin szerkezetében O_2 kötésére bekövetkező változás

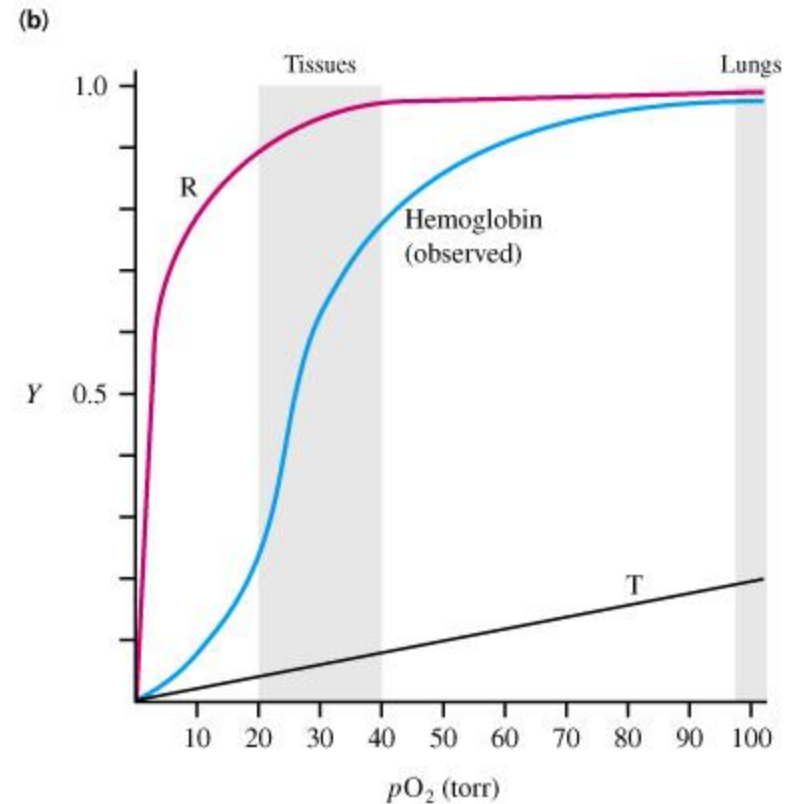
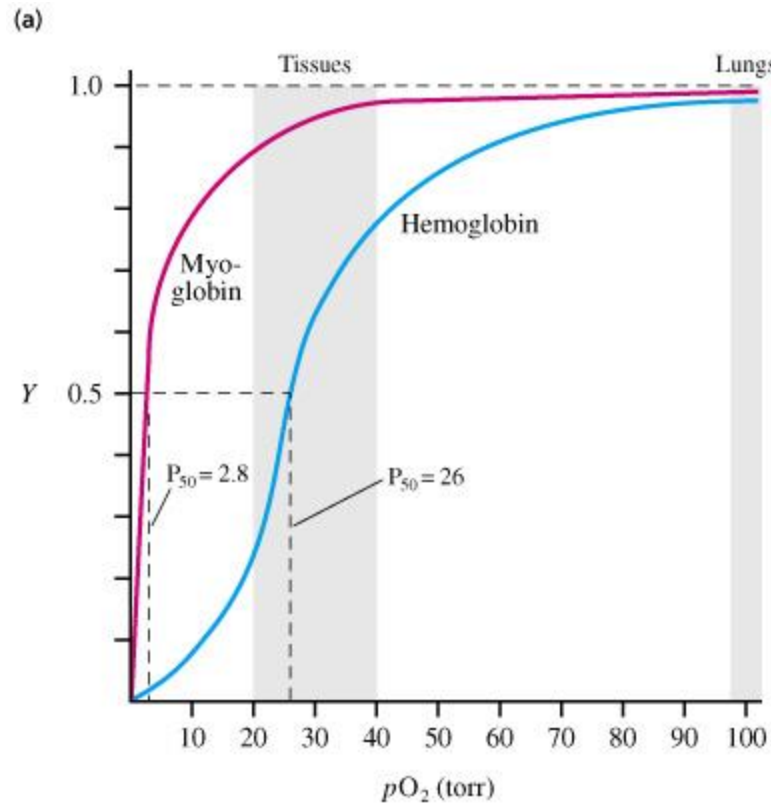


A hemoglobin és a mioglobin oxigéntelítési görbéje

Eltérő funkció: eltérő telítési görbék

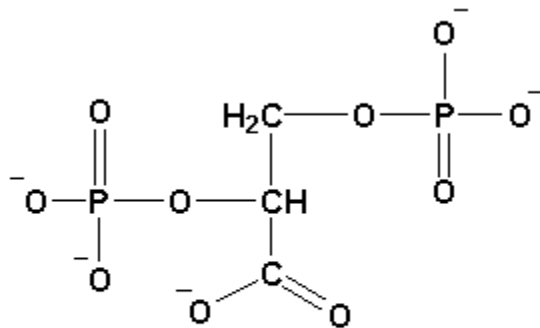
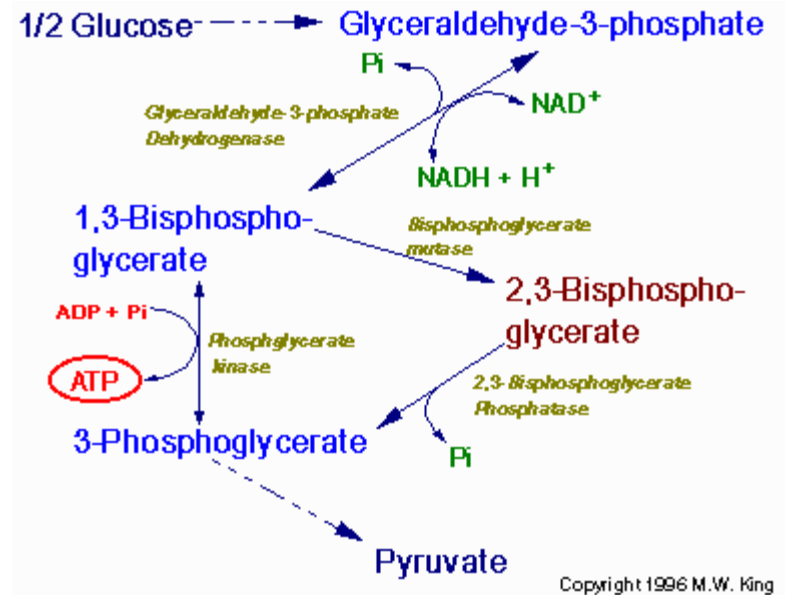
hemoglobin: kooperativitás

allosztérikus fehérje



A 2,3-biszfoszfoglicerát szerepe a hemoglobin oxigénkötésében

- Nagy mennyiségben termelődik a vörösvértestekben a glikolízis során
- kötődik a deoxi-hemoglobinhoz, a kötődés ekvimoláris 1 db 2,3- BPG 1 db Hb tetramerhez
- 5 negatív töltése van

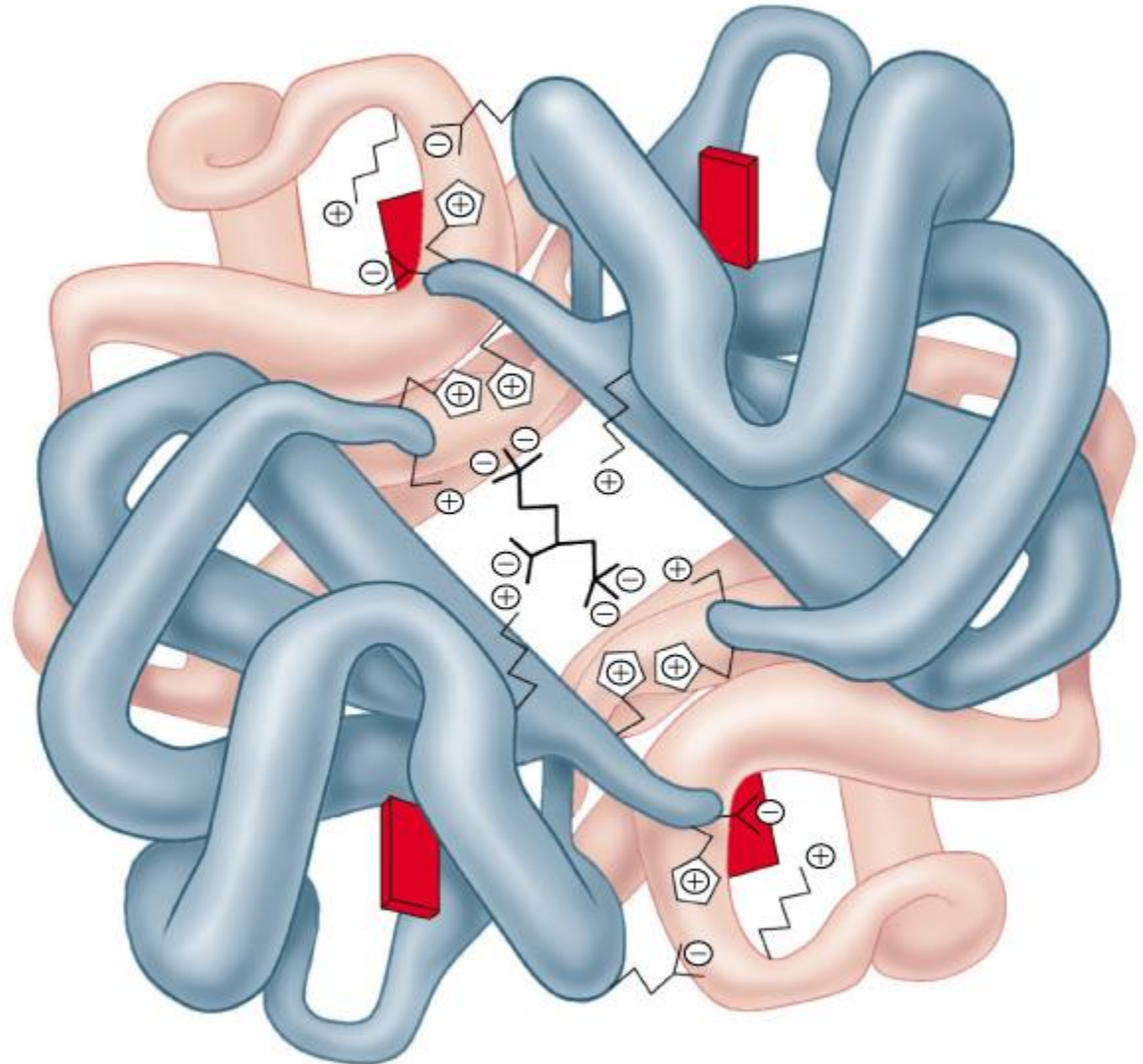


2,3-Bisphosphoglycerate

- Az oxi-hemoglobinhoz nem képes kötődni, a térszerkezetváltozás miatt szűk lesz számára a kötőhely

A 2,3-biszfoszfoglicerát kötődése a deoxi-hemoglobinhoz

A β -láncban 4 His és 2 Lys alakítja ki a 2,3 BPG számára a pozitívan bélelt kötéshelyet




A 2,3 BPG szintje szabályozott (mechanizmusa jelenleg nem ismert)

A 2,3-biszfoszfoglicerát plazmakoncentrációja

- normális körülmények között: 4,5 mM
- hexokináz hiányos állapotokban: csökken, a Hb O₂ affinitása nő
- piruvát kináz hiányos állapotokban: nő a Hb O₂ affinitása csökken
- hypoxiás állapotokban (pl. emphysémiában): 8 mM-ra is emelkedhet, 4500 m tenger szint feletti magasságban 7 mM-ra is emelkedhet, majd tengerszintre visszatérve normalizálódik

A tárolás alatt csökken a vér 2,3 BPG szintje - inozit adagolása

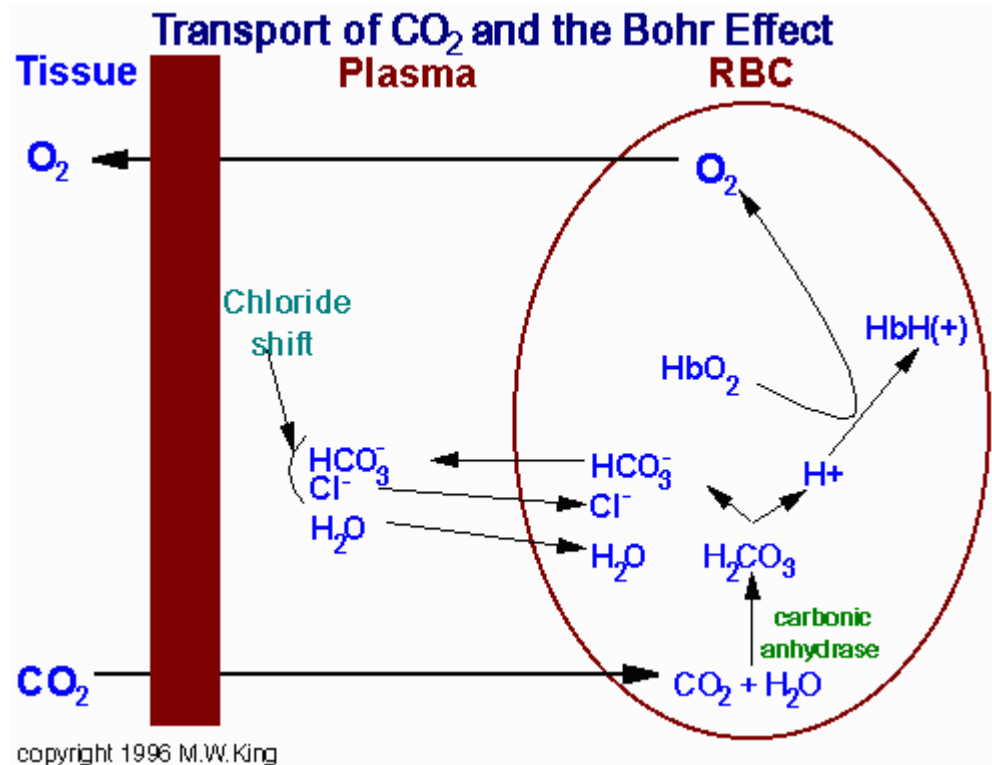
A Hb F kisebb mértékben köti  nagyobb az oxigén irányába az affinitása, így képes a magzat az anya véréből átvenni az oxigént.

A Bohr-effektus

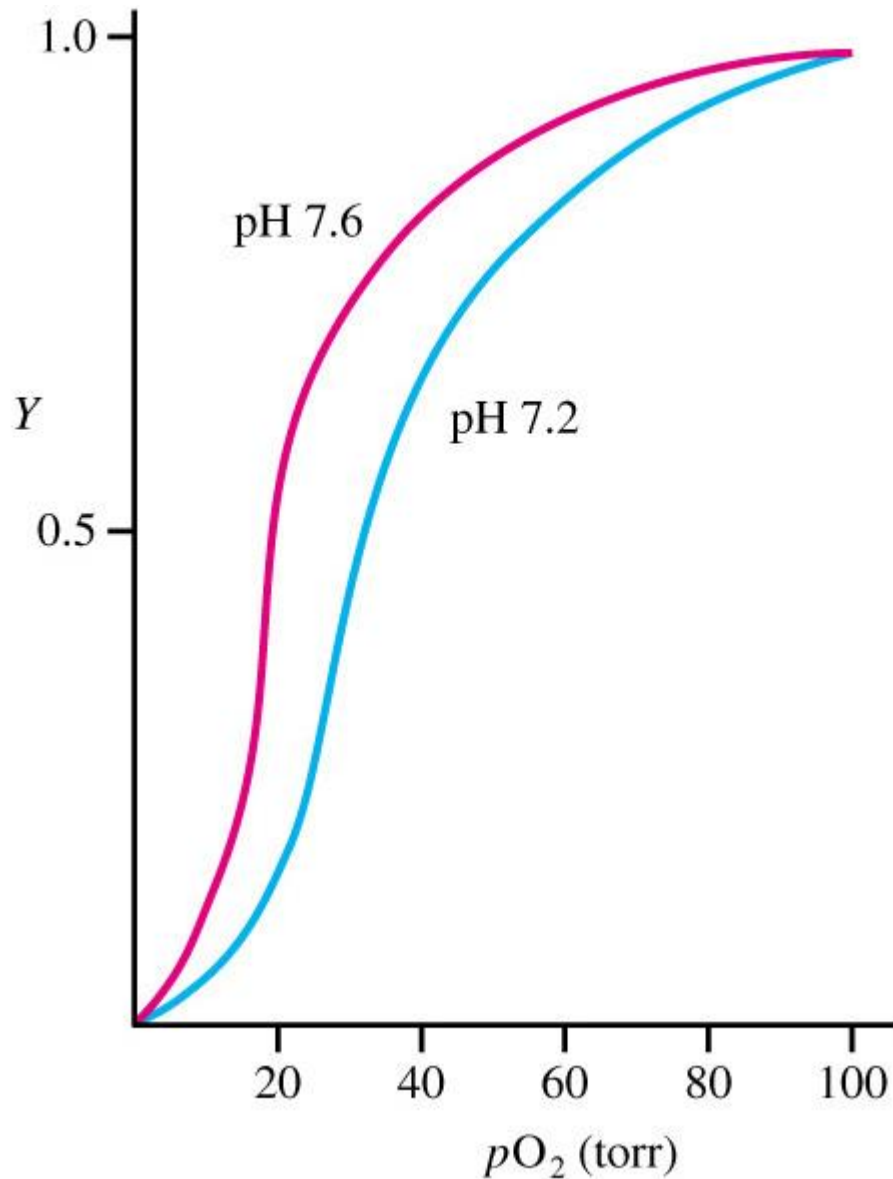
A hemoglobin CO_2 -t és H^+ -t is szállít.

Megfigyelés: a pH csökkenésével a Hb oxigénaffinitása csökken

pH	megkötött O_2 % ($\text{pO}_2 = 40$ Hgmm)
7,6	80 %
6,8	45 %



A Bohr-effektus



A pH csökkenésével jobbra tolódik a Hb oxigéntelítési görbéje, csökken az oxigén irányába mutatott affinitása

A Bohr-effektus okai, következményei

A keletkezett CO₂ 15 %-át is a Hb szállítja

izommunka következtében fokozott anyagcsere → fokozott O₂
fogyasztás és CO₂ termelés → jobbra tolódó oxigén telítési
görbe

CO₂ }
H⁺ } megkötés N-terminális aminocsoport által
karbamátképzés



további ionpárok
kialakulása - feszebb
hemoglobin térszerkezet

Csökkenő oxigénaffinitás

Fehérjeszabályozás foszforiláció/defoszforiláció által

Allosztéria: pillanatszerű asszociáció/disszociáció (másodrendű kötések)

Fehérje foszforiláció: eukarióta sejtekben, a két rendszer kiegészíti egymást. Kovalens módosítás:

- lassabb
- tartósabb
- enzim katalizálta mind a foszforiláció, mind a defoszforiláció

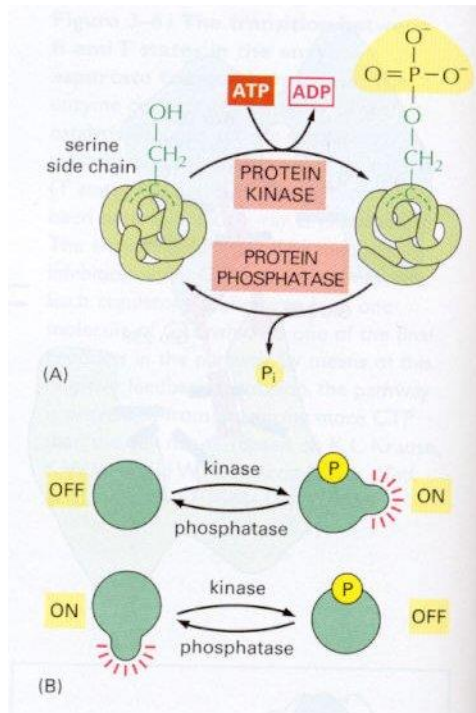
A foszforiláció 2 módon érinti a fehérjéket:

1. A foszfát csoport 2 negatív töltéssel rendelkezik, konformációváltozást okoz (pl.: pozitívan töltött aminosavak révén összehúzza a fehérjét)
2. A fehérjéhez kötődő foszfátcsoport, egy olyan modul része lehet, amelyet más fehérjék kötőhelye ismer fel (pl.: SH 2 domén)

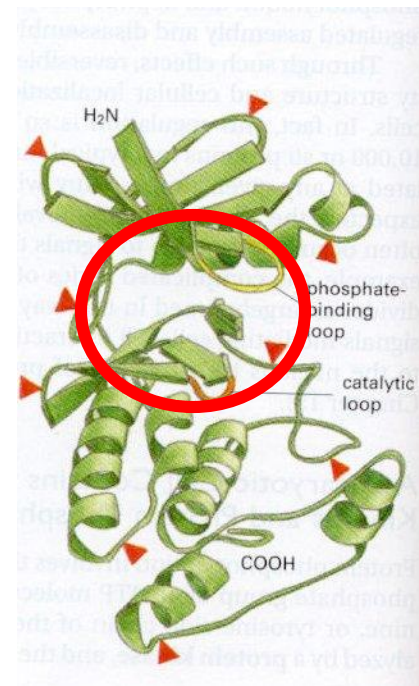
Protein kinázok

A foszfát csoport felvitelét transzferázok: protein kinázok katalizálják

A foszfátcsoport eltávolítását hidrolázok a foszfoprotein foszfatázok katalizálják

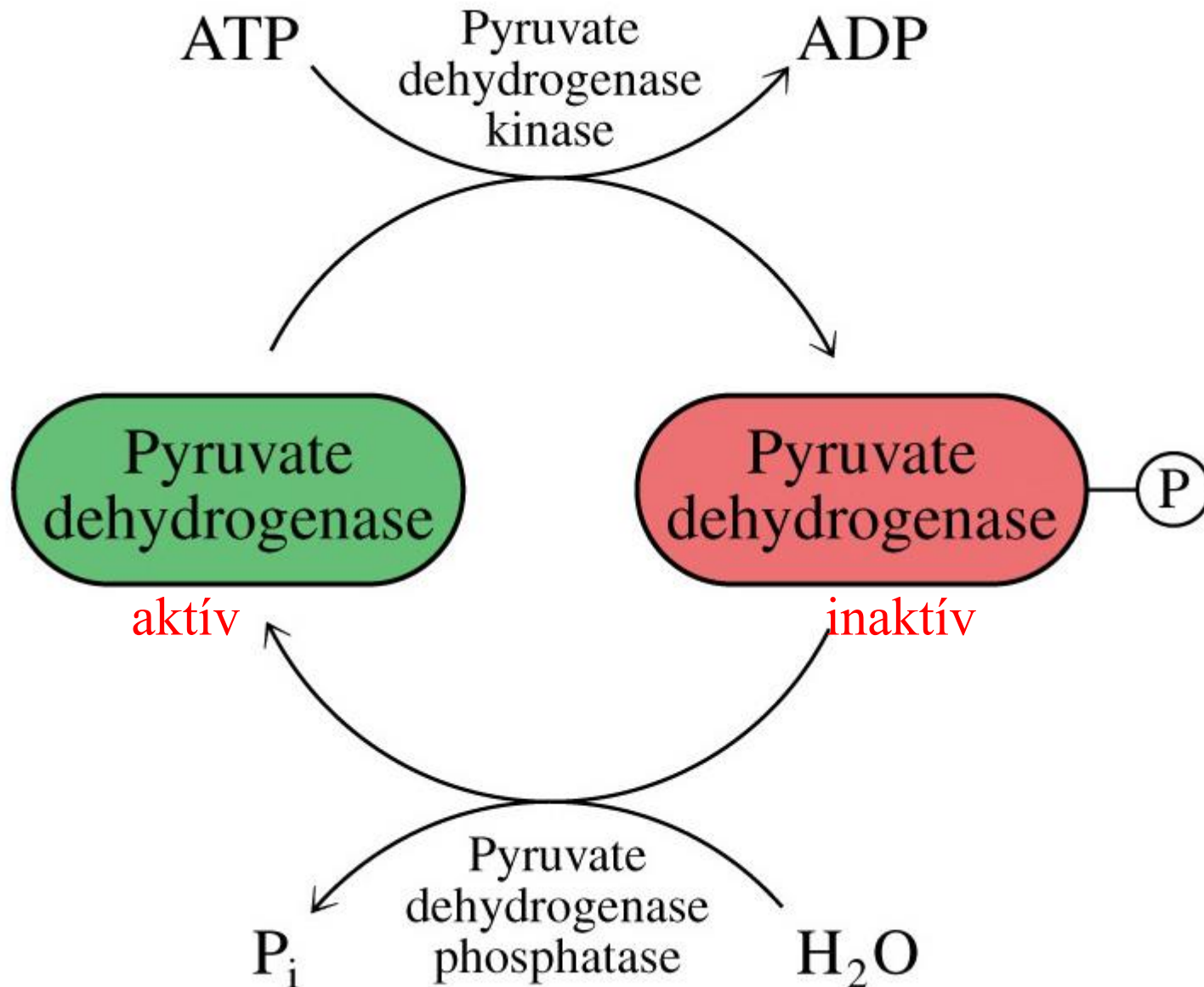


az ATP hidrolízise miatt egyirányú a reakció

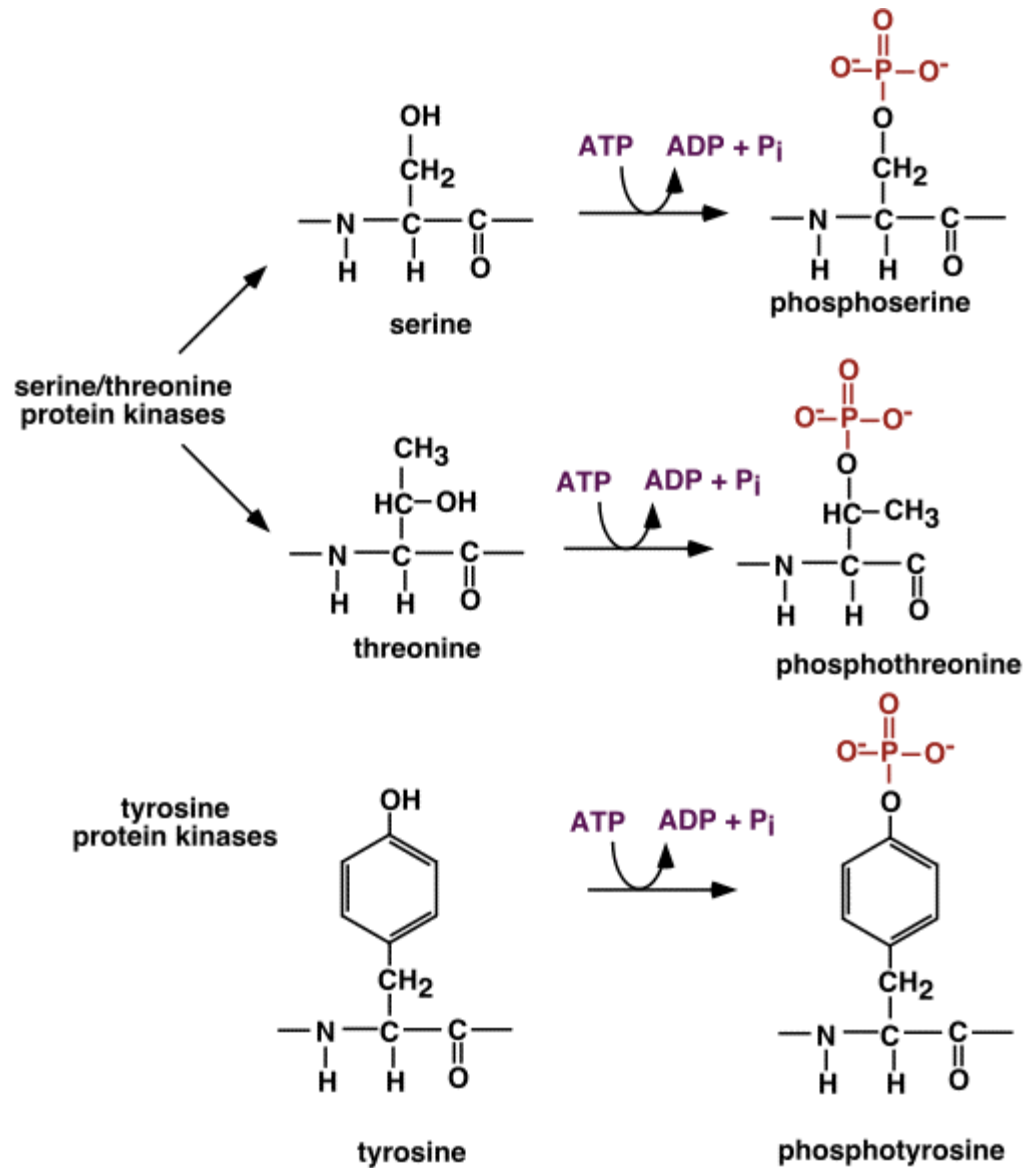


aktív hely

A piruvát-dehidrogenáz foszforilációs szabályozása



A szerin/treonin és a tirozin kinázok



A kinázok nagyfokú szubsztrát- és reakcióspecifitást mutatnak:
több ezer protein kináz ismert

A foszfatázok szubsztrát és reakcióspecifitása valamivel kisebb

A kinázok aktiválódása

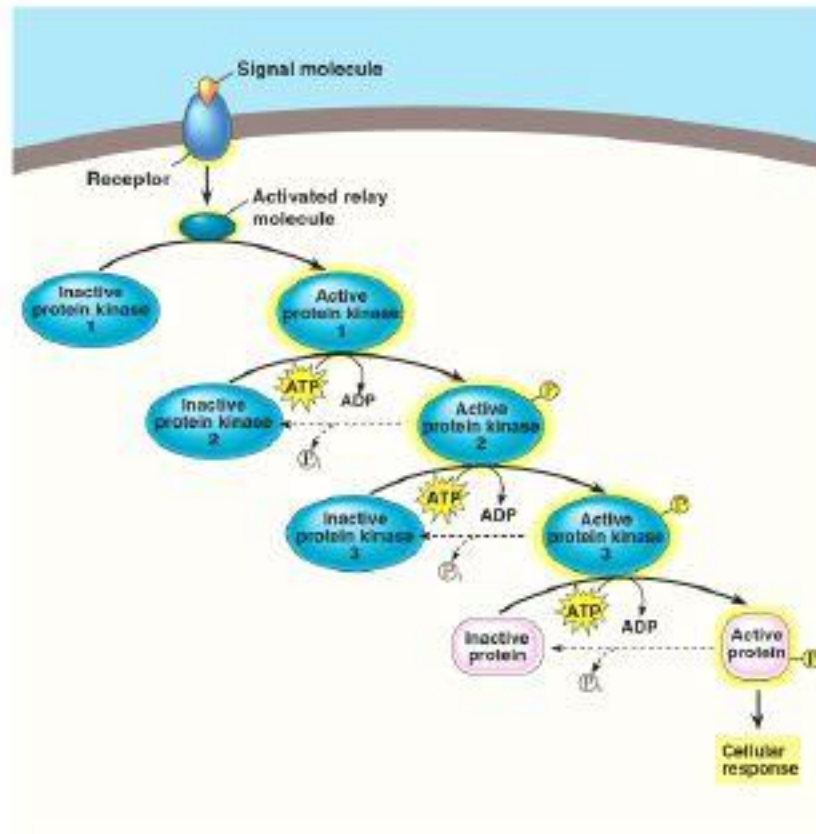
1. Különböző ligandok indukálta allosztérikus szabályozás

pl.: - cAMP

- Ca²⁺- kalmodulin

2. Más kinázok által aktiválódik

Foszforilációs kaszkádok : a sejt erősítői



Limitált proteolízis

proteolízis: peptidkötések bontása

limitált: csak jól definiált helyen történő

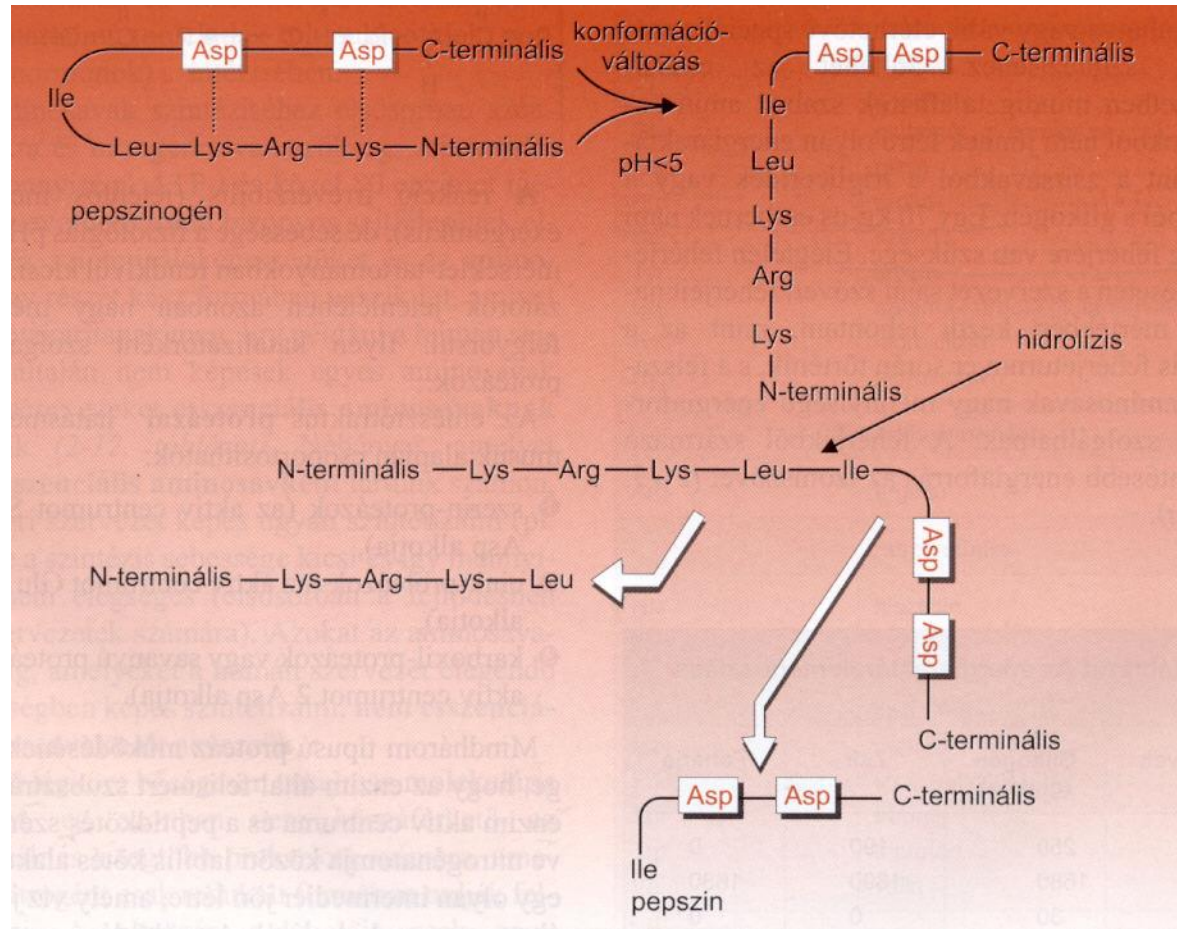
Általában proteáz enzimek aktiválása történik így, hogy csak az adott helyen (emésztőenzimek) és csak az adott körülmények között (véralvadási enzimek) legyenek aktívak. Proformában zimogénként szintetizálódnak és csak később aktiválódnak.

Másik szabályozási lehetőség: Proteáz inhibitorok

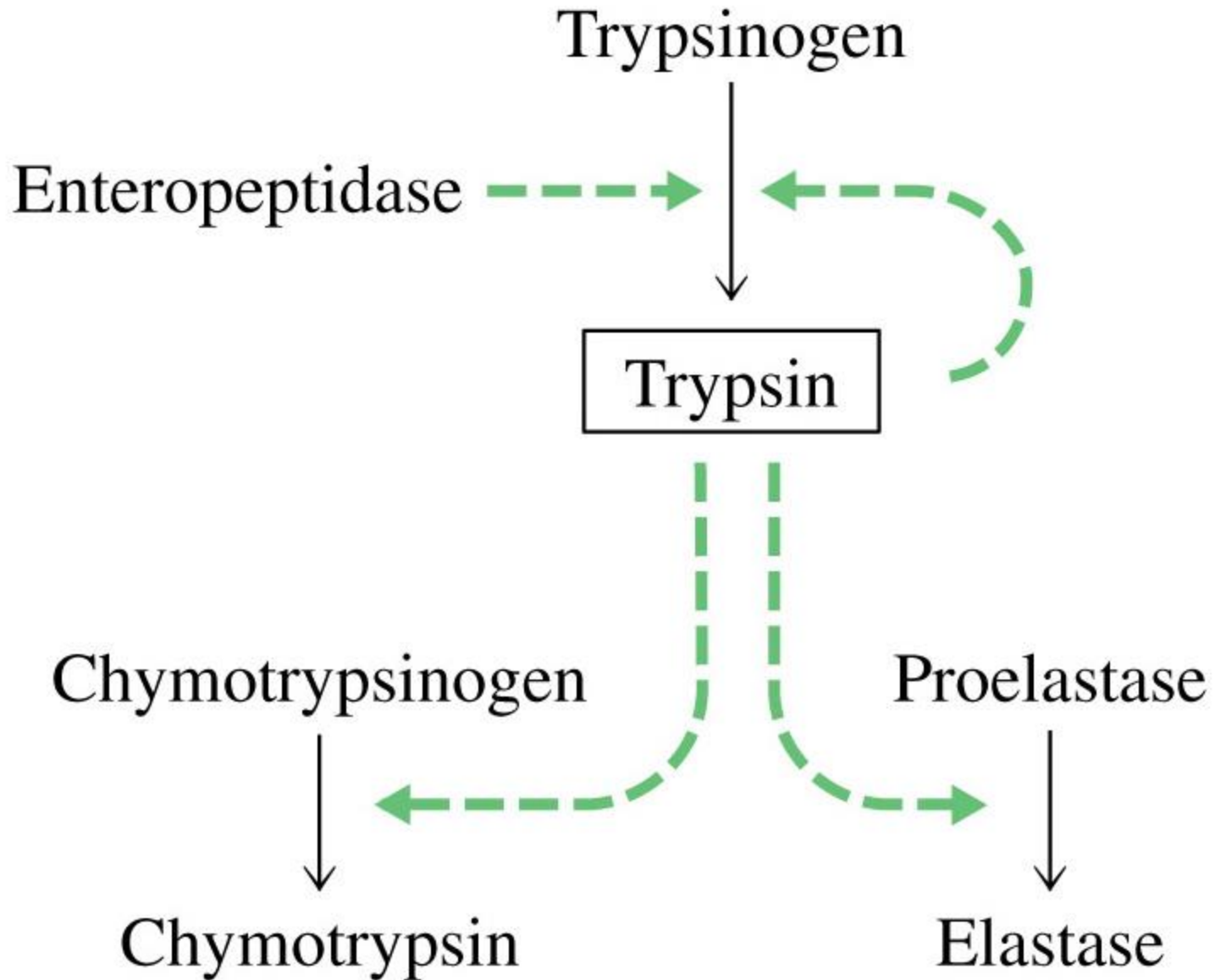
Inaktív zimogének és aktiválódásuk

1. Az aktív centrum kialakult csak a fehérje egy másik része lefedi (pl.: pepszinogén)
2. Az aktív centrum csak a limitált proteolízist követő szerkezetváltozás kapcsán alakulhat ki (pl.: tripszinogén)

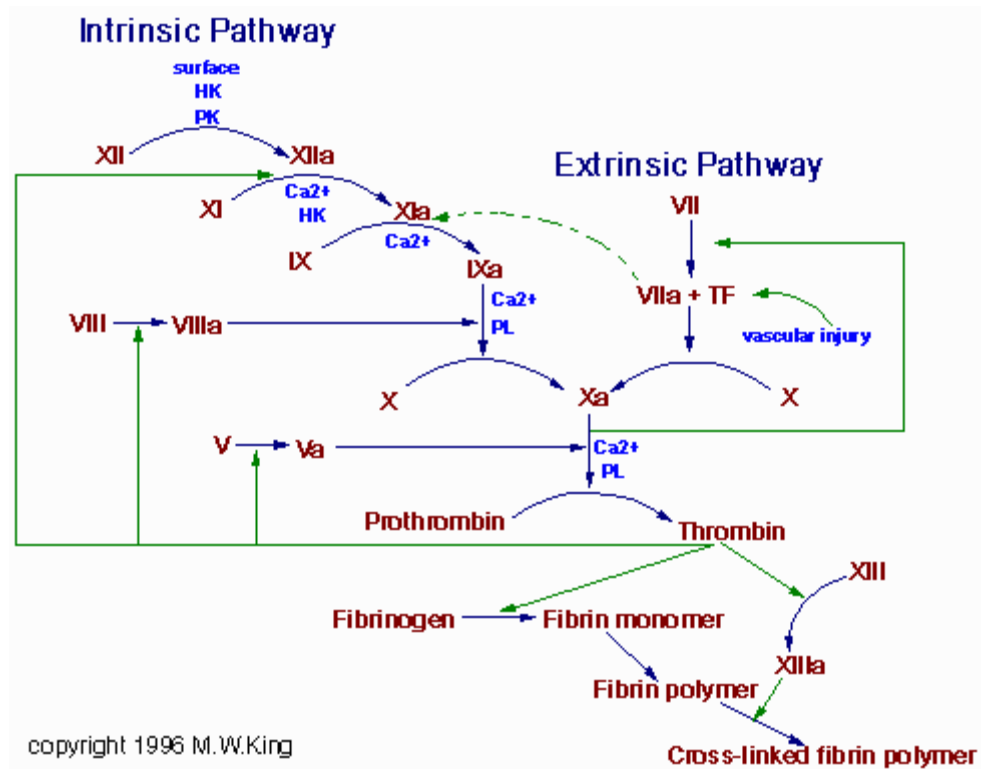
A pepszinogén aktiválódása limitált proteolízissel



Az enterális peptidázok zimogénjeinek aktiválódása

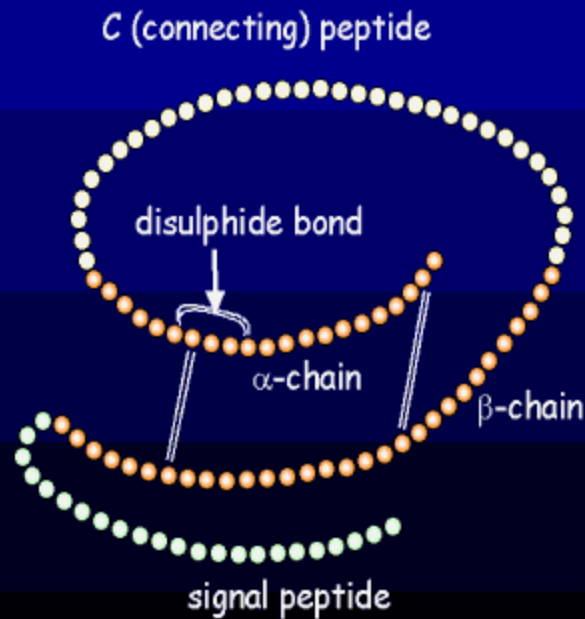


A véralvadási enzimrendszer limitált proteolizises aktiválódása



kaszkáderősítéses mechanizmus

(Pre)proinsulin and insulin molecules



The two insulin chains are synthesised as a single, high-molecular-weight precursor, preproinsulin.

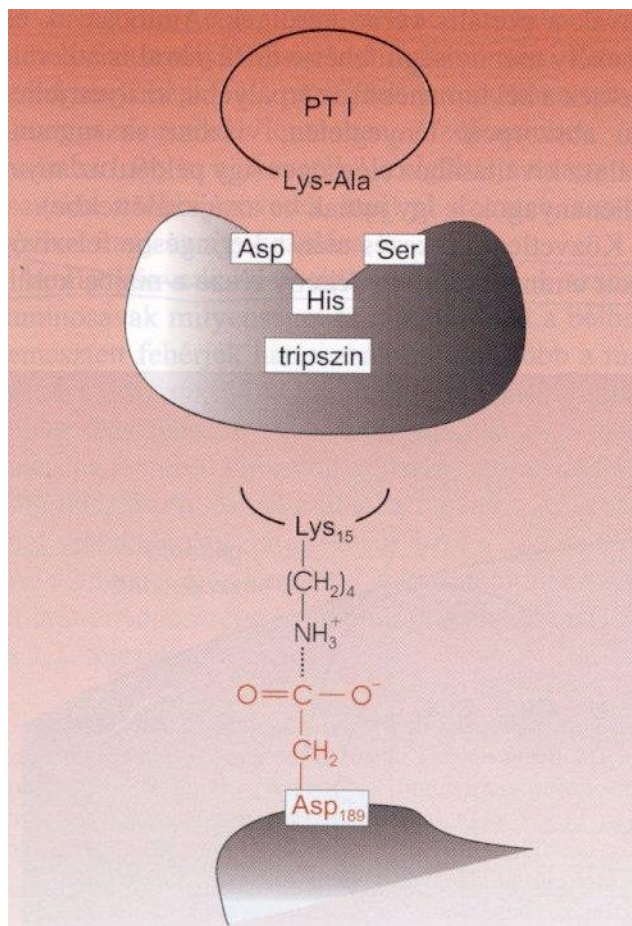
The signal (pre- or leader) peptide is cleaved after the nascent peptide chain is sequestered into the lumen of the rough endoplasmic reticulum (RER).

Proinsulin is cleaved by proteases to form insulin and the C-peptide in the secretory granules within the β -cell.

Both insulin and the C-peptide are released into the circulation.

Proteáz inhibitorok

Pancreas tripszin inhibitor: 6000 Da, a tripszin lassan bontja (Lys₁₅-Ala₁₆), több hónapos féléletidő



α_1 -proteáz inhibitor: Akut fázis fehérje a Ser-proteázokkal behatoló bacik ellen. Az enzim Ser OH és az inhibitor COO- csoportja között lassan hidrolizáló észterkötés. Met₃₅₈ nélkülözhetetlen szerepe.

