



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Obecný metabolismus. Mechanismy enzymové katalýzy (7).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie Přírodovědecká fakulta UP Olomouc



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Mechanismy enzymové katalýzy.

Osnova

1. Katalytické principy.
2. Mechanismy působení proteas, chymotrypsin (kovalentní katalýza).
3. Katalytické triády.
4. Ostatní proteasy.
4. Inhibitory proteas.
5. Inhibitory proteas jako léčiva.
6. Metaloproteasy - karbonátanhydrasa.
7. Obecná acidobazická katalýza.
8. Katalytické přiblížení a orientace při katalýze.

Mechanismy enzymové katalýzy (obecně).

Enzymová katalýza startuje navázáním substrátu na enzym. Uvolňuje se tzv. vazebná energie, která vede k tvorbě řady slabých vazeb mezi enzymem a substrátem.

K tvorbě produktu vede jen taková interakce E a S, která vyústí v přechodový stav.

Vazebná energie vede také ke strukturním změnám enzymu i substrátu - indukované přizpůsobení (induced fit).

Obecné mechanismy katalytických reakcí:

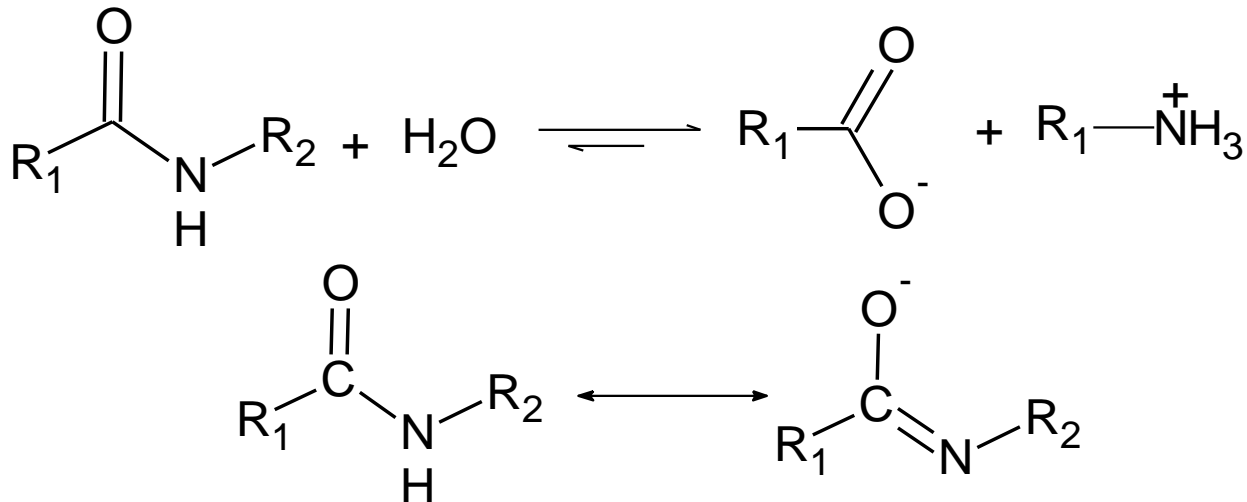
1. **Kovalentní katalýza.** Aktivní místo enzymu obsahuje reaktivní skupinu, obvykle nukleofil, která se jako součást katalýzy váže na substrát.
2. **Obecná acidobazická katalýza.** Molekula jiná než voda působí jako donor nebo akceptor protonů. Takto obvykle působí vedlejší řetězec aminokyseliny His.

Mechanismy enzymové katalýzy (obecně).

3. **Katalytické přiblížení.** Mnoho enzymových reakcí má dva substráty. Při katalytické reakci se oba substráty posunují do těsné blízkosti. Přiblížení je hnací silou tvorby produktu.
4. **Katalýza za účasti kovových iontů.** Kovové ionty působí při katalýze mnoha způsoby. Kovový iont může svým koordinačním působením napomáhat tvorbě nukleofilu. Může také působit jako elektrofil stabilizující negativní náboj reakčního meziprojektu. Kovový iont může působit jako můstek mezi enzymem a substrátem. Zvyšuje vazebnou energii a udržuje substrát v pro katalýzu příhodné konformaci.

Mechanismus působení proteas.

Proteasy patří do 3. třídy enzymů (hydrolasy). Nemají kofaktor. Jedním substrátem je peptidová vazba a druhým molekula vody. Hydrolýza peptidu je z termodynamického hlediska favorizovaná. Z kinetického hlediska je hydrolýza extrémně pomalá, protože peptidová vazba vykazuje vysokou stabilitu. Mezomerie peptidové vazby vede ke stabilitě vazby C - N, která je prakticky (parciálně) dvojná.



Chymotrypsin jako příklad kovalentní katalýzy.

Štěpení proteinů, zvláště při trávení, se účastní mnoho proteolytických enzymů.

Chymotrypsin štěpí peptidové vazby selektivně na karboxylovém konci velkých hydrofobních aminokyselin jako jsou tryptofan, tyrosin, fenylalanin a methionin.

Chymotrypsin působí jako silný nukleofil napadající nereaktivní karbonylový uhlík substrátu. Vytvoří se kovalentní vazba.

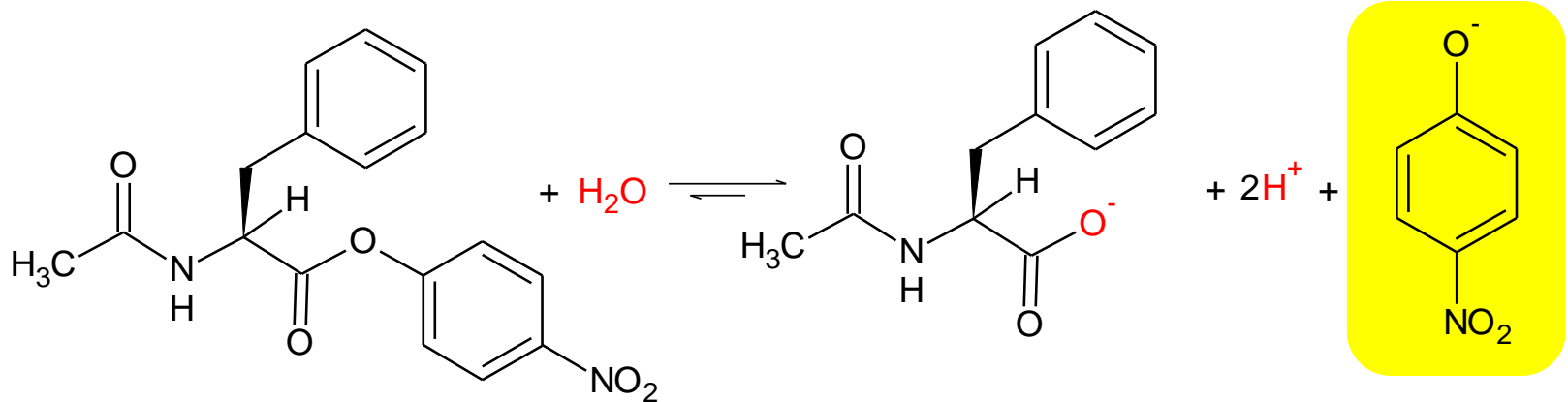
Nukleofilem v aktivním místě chymotrypsinu je serin (-CH₂OH).

Chymotrypsin ireversibilně inhibuje diisopropylfosfofluorid (DIPF) právě vazbou na serin v aktivním místě.

Ke studiu mechanismu katalýzy chymotrypsinu se využívají tzv. chromogenní substráty. Takovým je např. *N*-acetyl-fenylalanin-*p*-nitrofenylester. Štěpením vzniká žlutý *p*-nitrofenolát deprotonizací při pH 7.

Chromogenní substrát chymotrypsinu.

Za podmínek ustáleného stavu je $K_m = 20 \mu\text{M}$ a $k_{\text{cat}} = 77 \text{ s}^{-1}$.

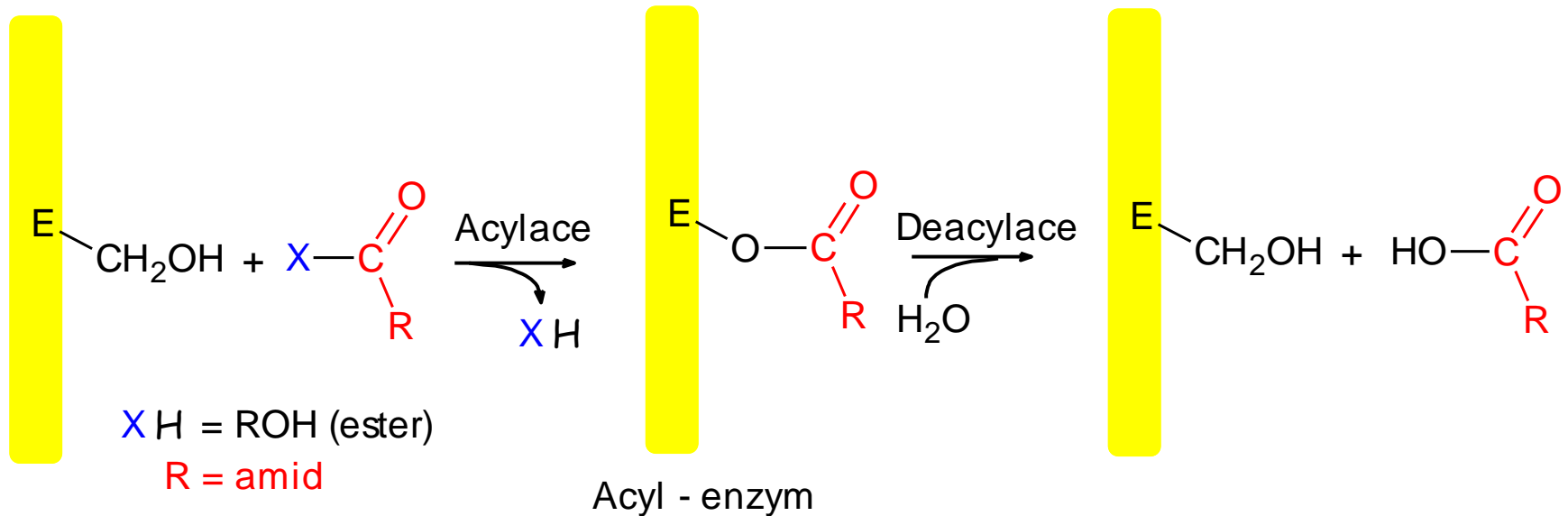


N - Acetyl - L - fenylalanin *p* - nitrofenylester

p - nitrofenolát

Kovalentní katalýza.

Chymotrypsinová hydrolýza probíhá ve dvou fázích: Rychlá acylace a pomalá deacylace za regenerace chymotrypsinu.

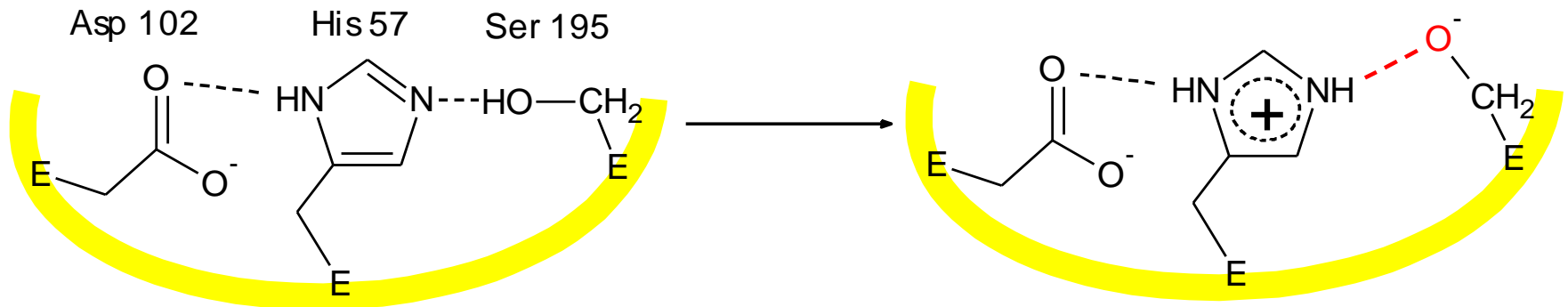


Katalytická triáda chymotrypsinu.

Hlubším studiem struktury chymotrypsinu bylo zjištěno, že za vlastní acylaci odpovídá v katalytické kapse molekuly enzymu katalytická triáda - složená ze tří nesousedních aminokyselin.

Triáda: Asp 102, His 57 a Ser 195 !!

Za přítomnosti substrátu je funkcí His z katalytické triády stabilizace Ser 195 a akceptování jeho protonu za tvorby alkoxidového iontu. Asp orientuje His.



Specificita proteas - substrátové kapsy.

Řada proteolytických enzymů obsahuje stejnou katalytickou třídu. Např. trypsin a elastasa. Obě proteasy jsou ze 40 % homologní s chymotrypsinem a mají stejný mechanismus katalýzy jako chymotrypsin. Odlišují se substrátovou specificitou.

Trypsin štěpí peptidovou vazbu na karboxylovém konci za bazickou aminokyselinou s kladným nábojem s delším řetězcem (Lys a Arg).

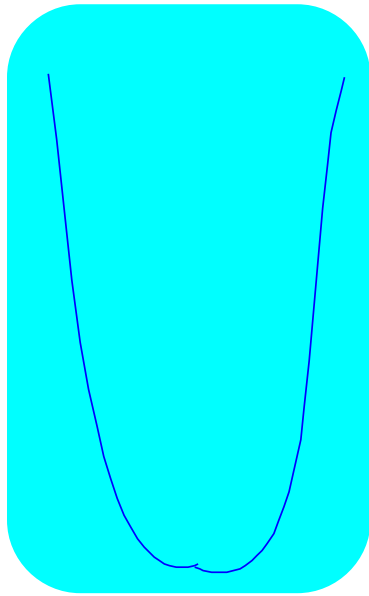
Elastasa štěpí peptidovou vazbou na karboxylovém konci s aminokyselinou s krátkým řetězcem (Ser a Ala).

Rozdíl v substrátové specificite proteas spočívá v rozdílu ve struktuře enzymové kapsy kam se váže substrát (protein).

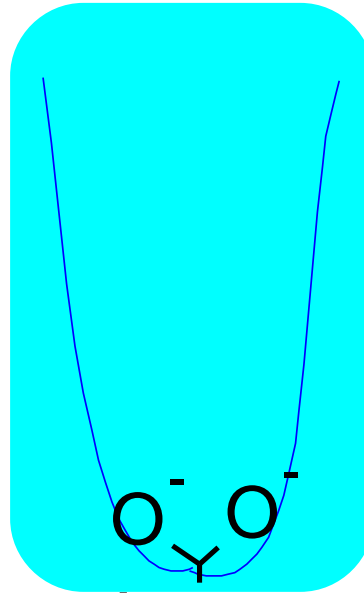
U trypsinu je dole v substrátové kapse na dně aspartát.

U elastasy jsou uprostřed kapsy na obou stěnách vedlejší řetězce valinu.

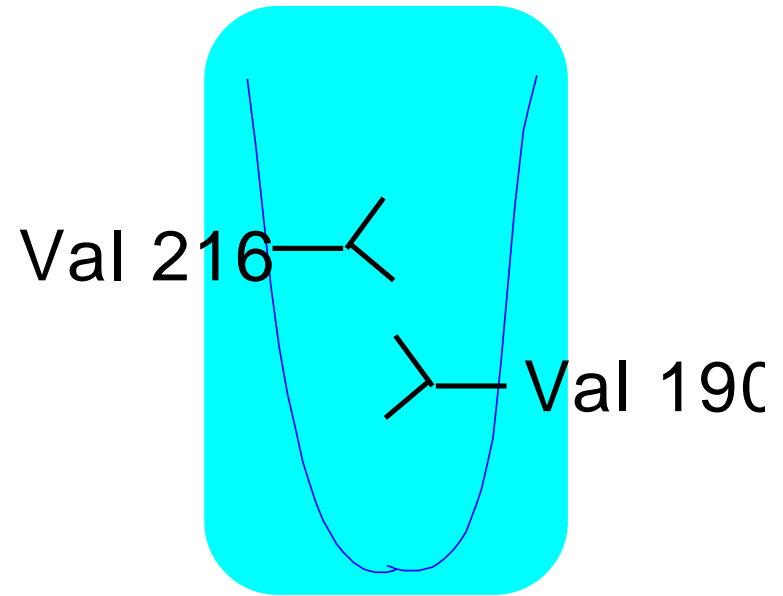
Substrátová kapsa chymotrypsinu, trypsinu a elastasy.



Chymotrypsin



Asp
Trypsin



Val 216
Val 190
Elastasa

Ostatní proteasy.

Cysteinové proteasy.

Aspartátové proteasy.

Metaloproteasy.

Ve všech případech je strategií tvorba nukleofilu, který atakuje peptidovou karbonylovou skupinu.

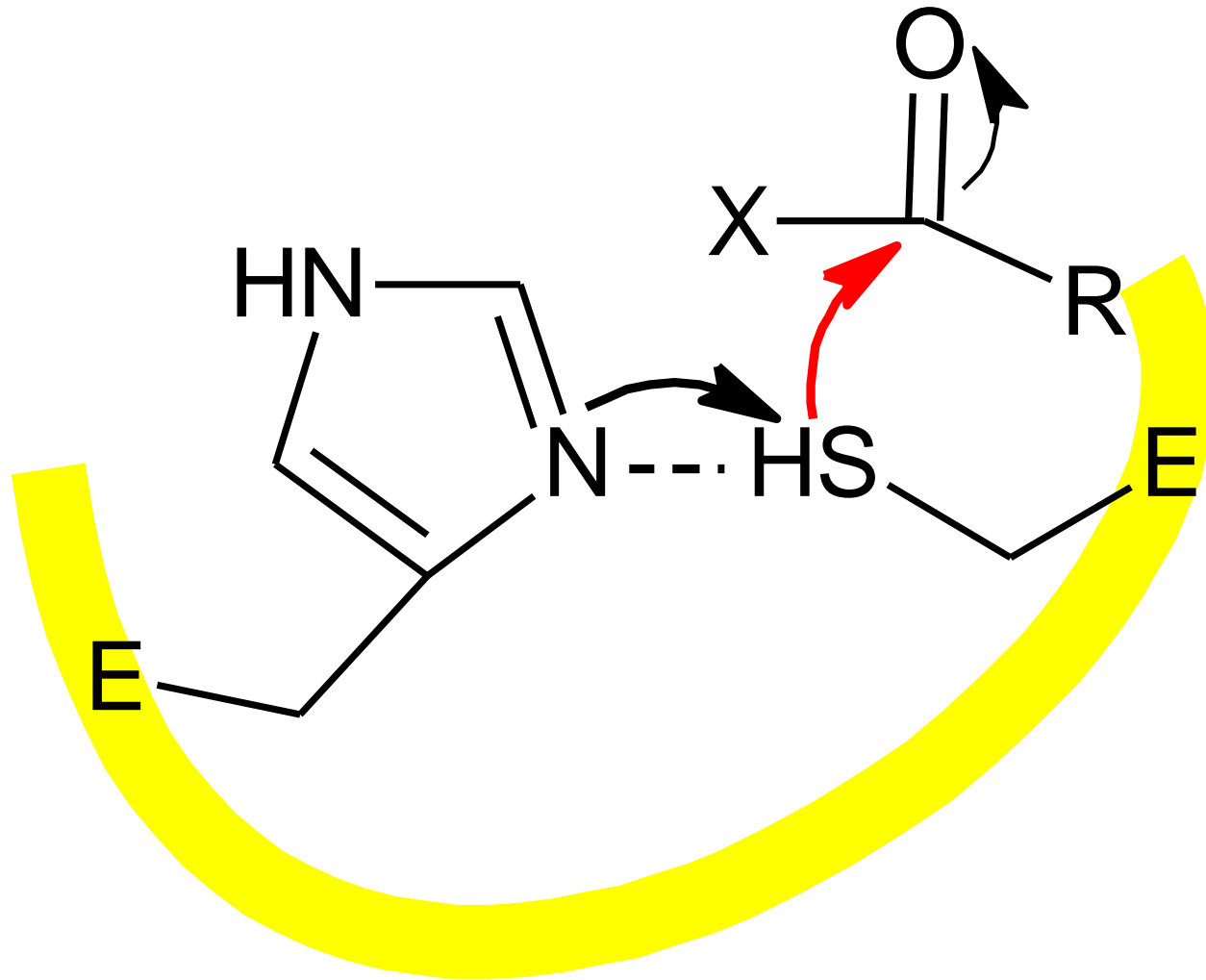
V případě cysteinové proteasy je karbonyl peptidu atakován histidinem aktivovaným cysteinem.

Aspartátové proteasy aktivují molekulu vody.

Metaloproteasy aktivují také molekulu vody za účasti kovového iontu a za přítomnosti báze (často glutamát).

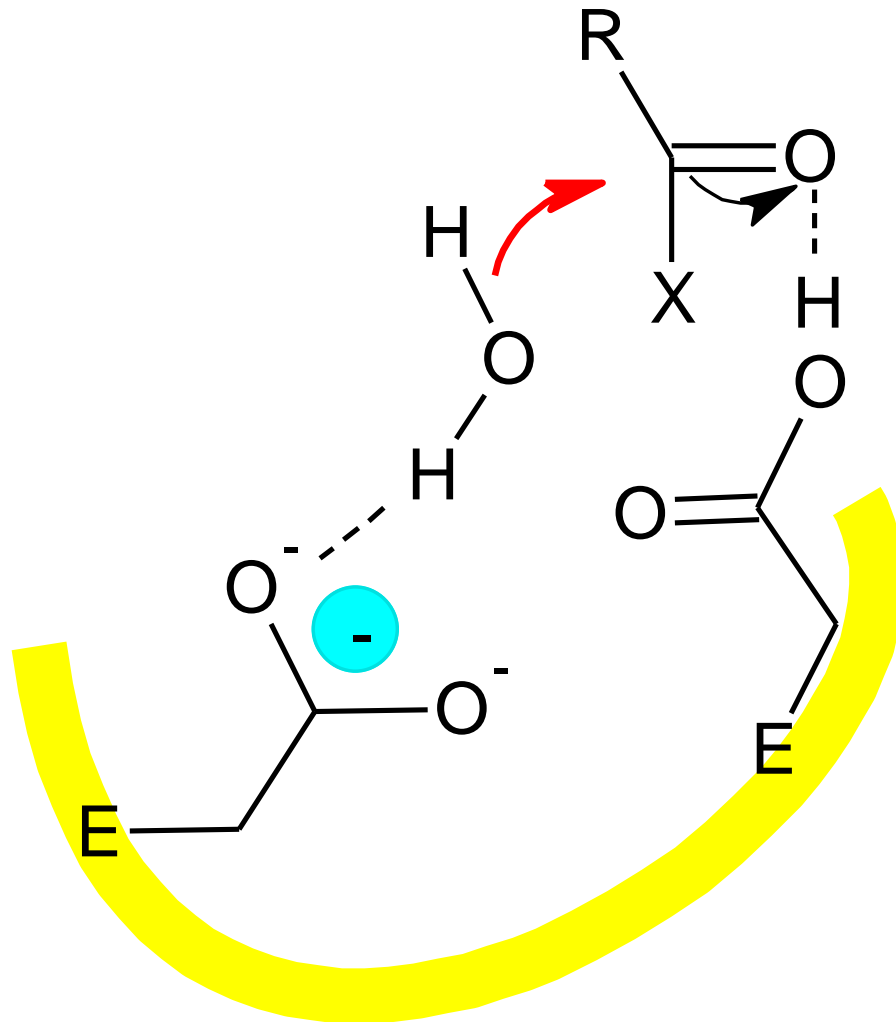
Aktivační strategie cysteinových proteas.

Např. papain - rostlinná proteasa z plodů *Carica papaya*.



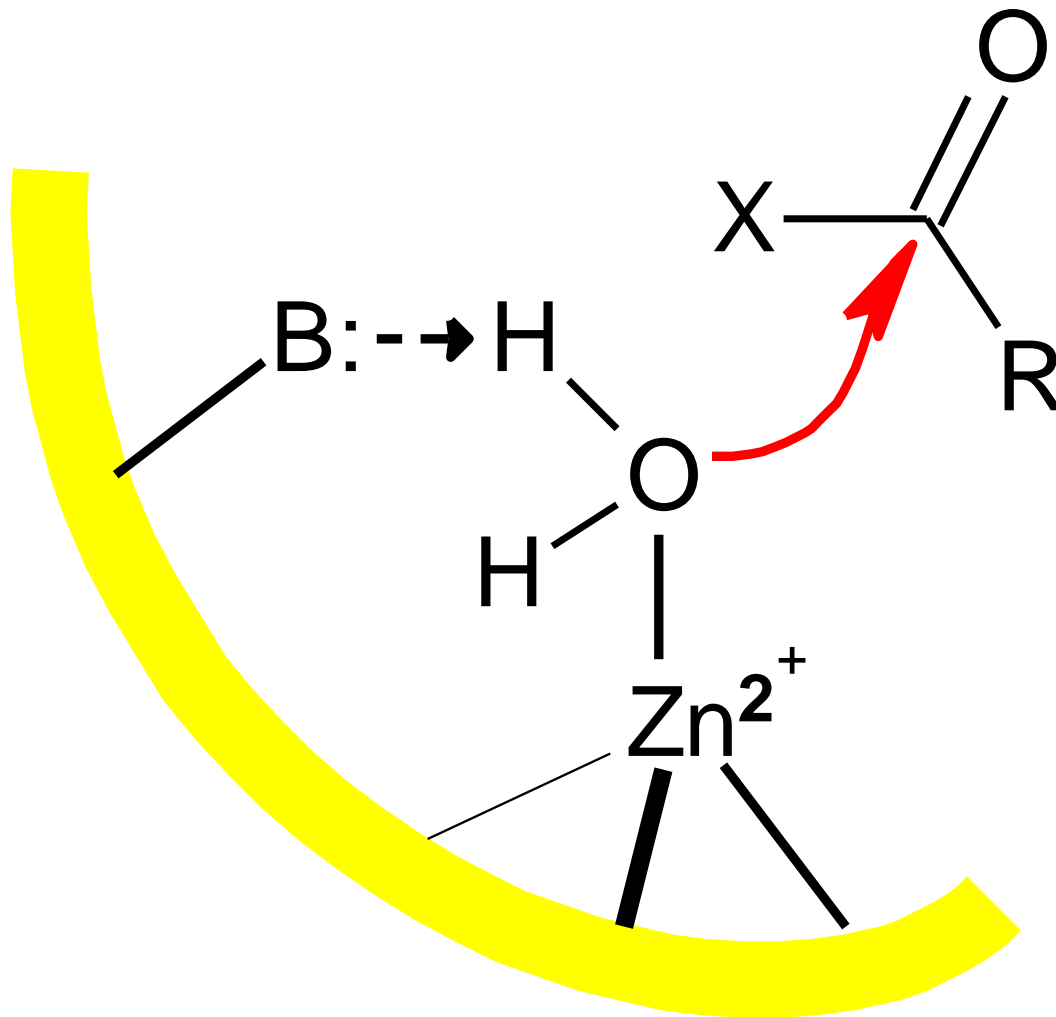
Aktivační strategie aspartátových proteas.

Např. proteasa renin ovlivňující tlak krve a trávící enzym pepsin.



Aktivační strategie metaloproteasy (Zn^{2+}).

Např. bakteriální proteasa thermolysin a trávící enzym karboxypeptidasa A.



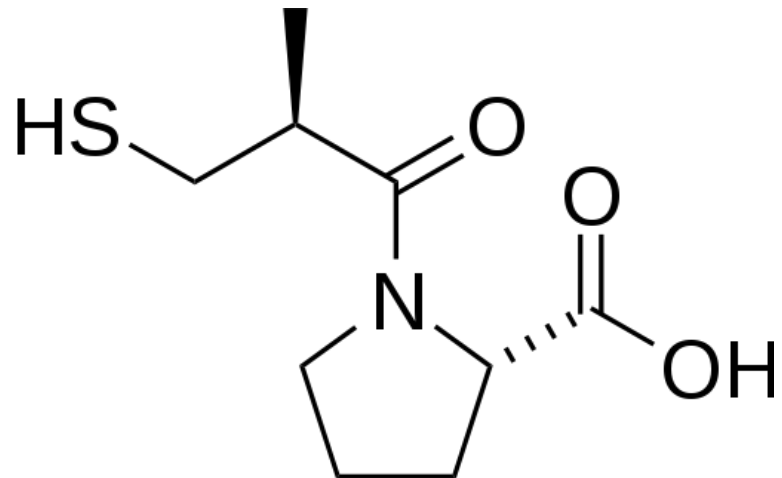
Inhibitory proteas jako léčiva.

Inhibitorem angiotensinconvertujícího enzymu (ACE) je lék na snížení tlaku krve Captopril. ACE je metaloproteasa.

Angiotensin-convertující enzym (ACE, EC 3.4.15.1), exopeptidasa katalyzující štěpení dekapeptidu angiotensin I na oktapeptid angiotensin II.

Indinavir (Crixivan) je léčivem proti AIDS. Indinavir inhibuje HIV proteasu (aspartátová proteasa). Štěpí virální proteiny v jejich aktivní formě a zabraňuje rozvinutí virální infekce.

Vzorec Captoprilu.



Karbonátanhydrasa - Zn^{2+} proteasa.

Oxid uhličitý je konečným produktem aerobního metabolismu. U savců vstupuje do krve, kterou je transportován do plic, kde se uvolňuje.

V erythrocytech CO_2 reaguje s vodou za tvorby středně kyselé uhličitě kyseliny ($pK_a = 3,5$), která po ztrátě protonu přechází na hydrogenuhličitan (HCO_3^-)

Za nepřítomnosti katalyzátoru probíhá hydratace CO_2 středně rychle. Při $37^\circ C$ a neutrálním pH je rychlostní konstanta druhého řádu $k_1 = 0,0027 M^{-1} \cdot s^{-1}$.

Opačná reakce, dehydratace HCO_3^- , je dokonce rychlejší, rychlostní konstanta $k_{-1} = 50 s^{-1}$.

Tyto rychlostní konstanty odpovídají rovnovážné konstantě $K_1 = 5,4 \times 10^{-5}$.

Poměr $[CO_2] / [H_2CO_3]$ je 340 : 1 v rovnováze.

Karbonátanhydrasa - Zn^{2+} proteasa.

Hydratace a dehydratace HCO_3^- bývá obvykle spojena s rychlým transportem.

Proto je tento proces katalyzován. Obecně se tyto enzymy nazývají karbonátanhydrasy.

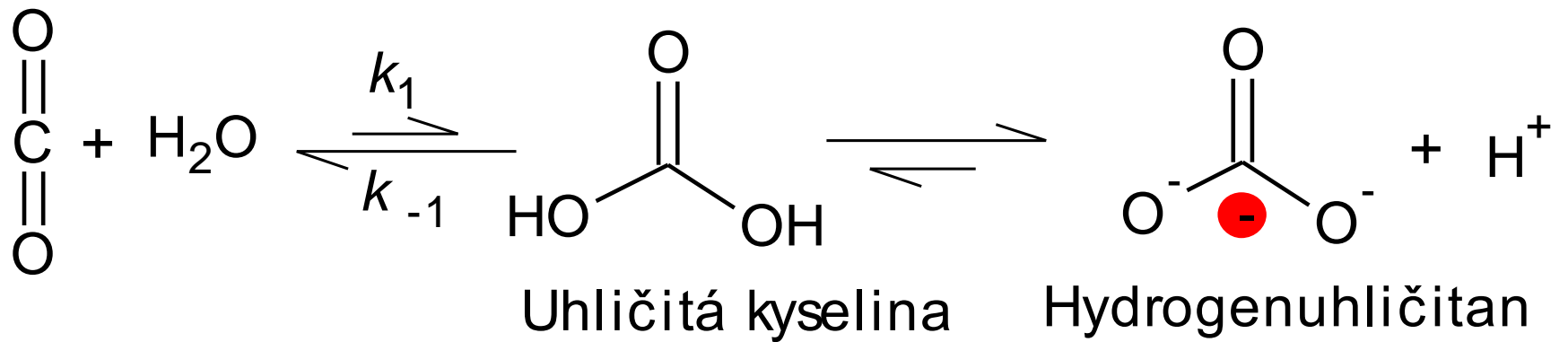
Karbonátanhydrasy dramaticky urychlují tyto procesy. Nejaktivnější enzymy urychlují hydrataci CO_2 s katalytickou konstantou $k_{cat} = 10^6 \text{ s}^{-1}$ (molekula enzymu za jednu sekundu; milionkrát) !!!

Existuje celá řada homologních karbonátanhydras. Všechny obsahují v aktivním místě Zn^{2+} .

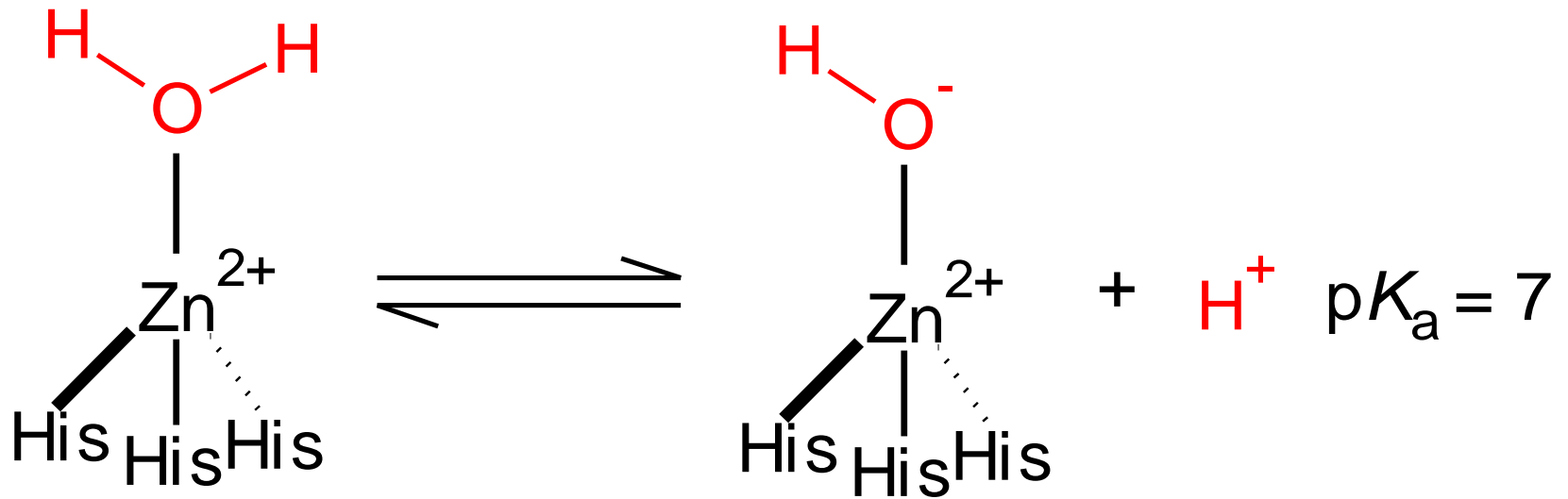
Na zinečnatý iont jsou vázány čtyři nebo i více ligandů.

Tři imidazolové kruhy His jsou vázány koordinačně. Další koordinační místo je obsazeno molekulou vody nebo hydroxidovým iontem (podle pH). Všechny čtyři ligandy jsou neutrální a tak je celkový náboj roven +2.

Hydratace CO_2 a tvorba hydrogenuhlíčitanu.



Vazbou vody na Zn^{2+} se sníží pK_a vody z 15,7 na 7.



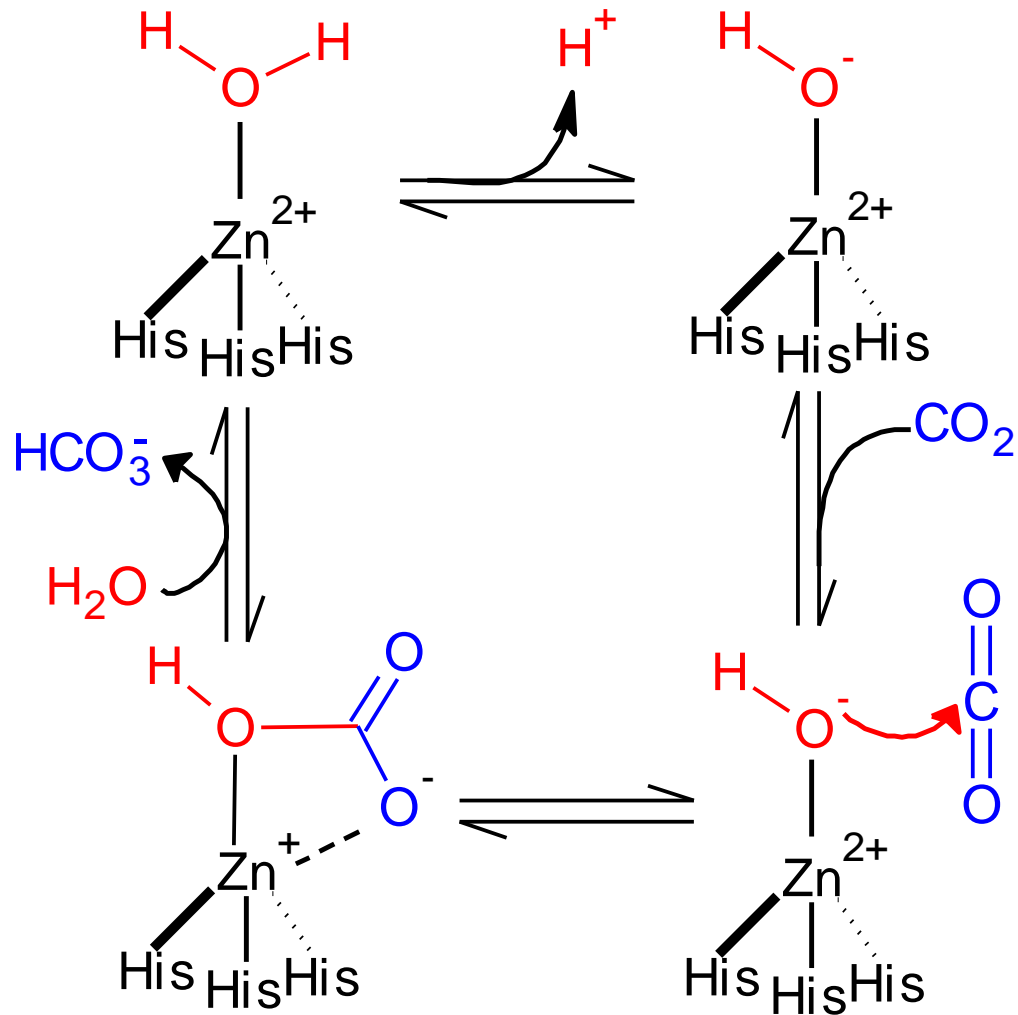
Mechanismus karbonátanhydrasy.

Hydroxidový aniont vytvořený v aktivním místě karbonátanhydrasy za účasti Zn^{2+} působí jako nukleofil na oxid uhličitý.

Jednoduchý mechanismus katalýzy karbonátanhydrasy:

1. Zinečnatý iont umožňuje odštěpení protonu z molekuly vody za tvorby hydroxidového iontu.
2. Oxid uhličitý se naváže do aktivního místa enzymu a je orientován na reakci s hydroxidovým aniontem.
3. Hydroxidový iont atakuje CO_2 , který tak převádí na HCO_3^- .
4. Katalytické místo se regeneruje odštěpením HCO_3^- a vazbou další molekuly vody.

Mechanismus karbonátanhydrasy.



Obecná acidobazická katalýza.

Donory a akceptory protonů, tj. kyseliny a báze, poskytují nebo odnímají protony pro stabilizaci vznikajících nábojů v přechodovém stavu.

Prakticky to znamená aktivaci nukleofilních a elektrofilních skupin nebo stabilizace odštěpujících se skupin.

V těchto acidobazických reakcích se nejčastěji uplatňuje histidin, protože má pK_a blízko neutrálního pH 7 a může se uplatnit jako donor i akceptor protonů.

Mnoho reakčních mechanismů zahrnujících acidobazickou katalýzu má různé pK_a . Tyto variace pK_a jsou vyvolány lokálním prostředím kolem His.

Vliv okolí a prostředí na pK_a histidinu.

Podmínky	Kyseliny	Báze
Hydrofobní okolí	Zvyšuje pK_a	Snižuje pK_a
Připojený zbytek s nábojem	Zvyšuje pK_a	Snižuje pK_a
Vytvořený solný můstek (a vodíková vazba)	Snižuje pK_a	Zvyšuje pK_a

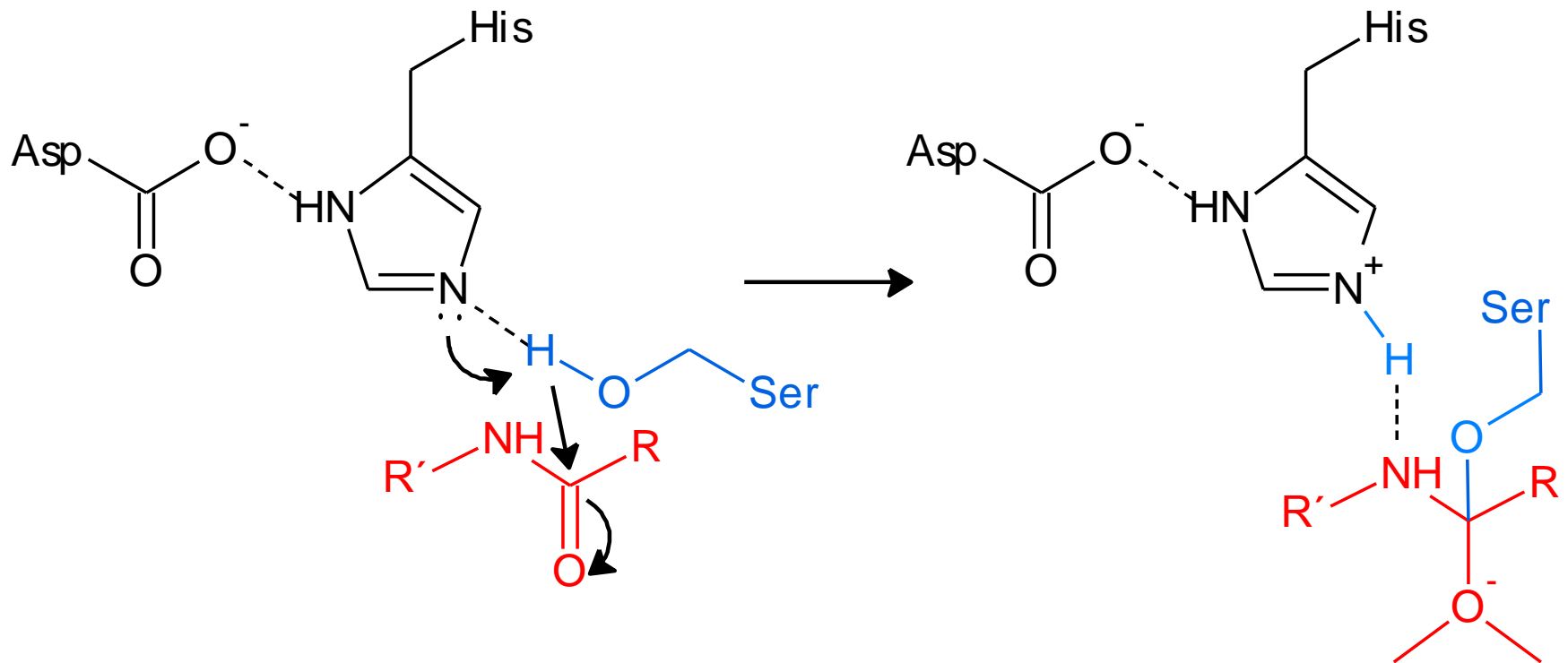
Významný vliv na pK_a má prostředí ve kterém katalýza probíhá. Histidinový imidazol, který je bazický v kyselém prostředí může působit jako donor protonů a vice versa.

Serinová proteasa.

V počáteční fázi mechanismu v aktivním místě přijímá His proton ze Ser za tvorby serinového nukleofilu, který atakuje amidovou vazbu substrátu. Při reakci je Ser (báze, pK_a 14) donorem protonu a His (kyselina, pK_a 6) akceptorem. Obojí je umožněno okolím obou aminokyselinových zbytků.

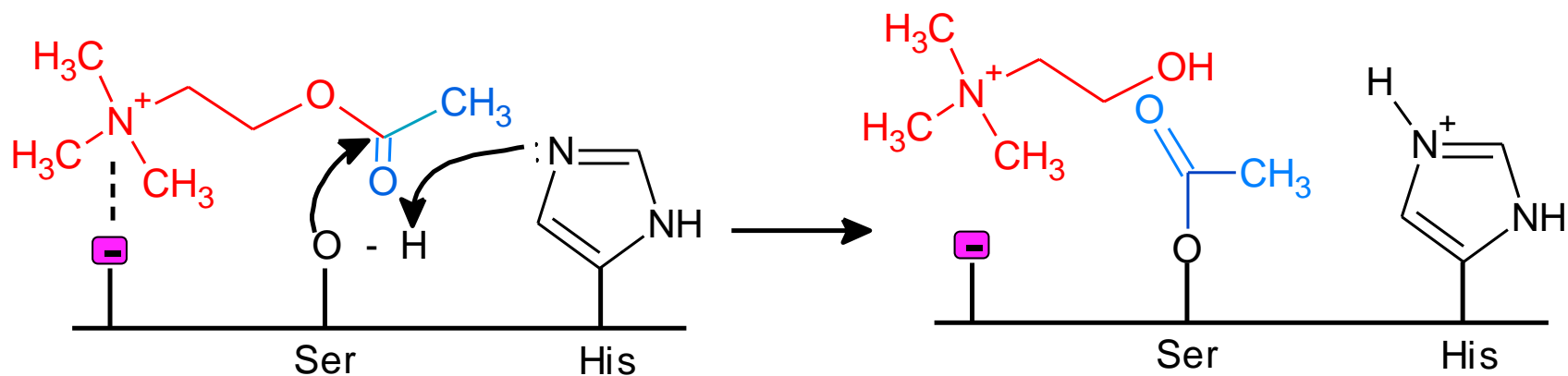
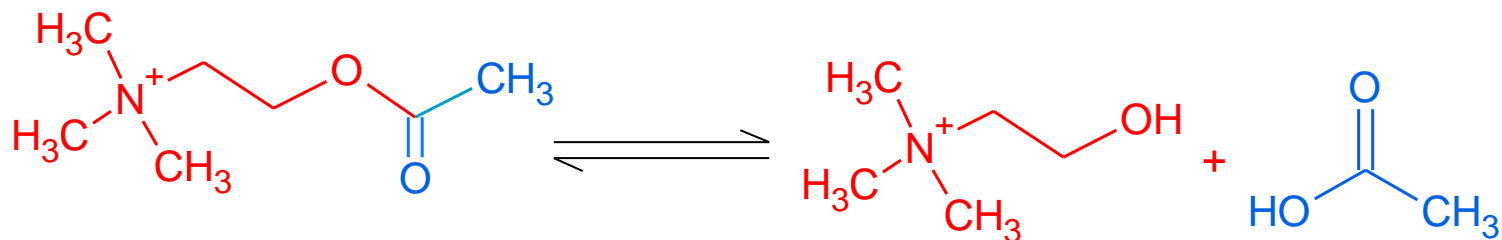
Modifikace pK_a je čistě elektrostatický mechanismus. V tomto případě je katalytický mechanismus spojen se snížením pK_a oxy anionu a a zvýšením pK_a His.

Acidobazická katalýza - serinová proteasa.

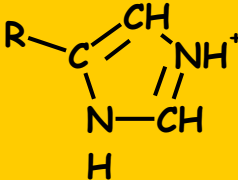
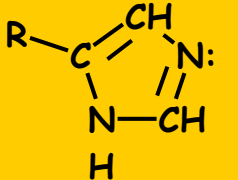




Acetylcholinesterasa (AChE) deesterifikuje neurotransmitter acetylcholin (ACh).

Příklad obecné bázické katalýzy (deprotonizace Ser za účasti His).



Tabulka vedlejších řetězců aminokyselin uplatňujících se při acidobazické katalýze.

Aminokyselina	Kyselá forma (donor protonů)	Zásaditá forma (akceptor protonů)
Glu, Asp	$R - \text{COOH}$	$R - \text{COO}^-$
Lys, Arg	$R - \text{NH}_3^+$	$R - \text{NH}_2$
Cys	$R - \text{SH}$	$R - \text{S}^-$
His		
Ser	$R - \text{OH}$	$R - \text{O}^-$
Tyr		

Katalytické přiblížení a orientace.

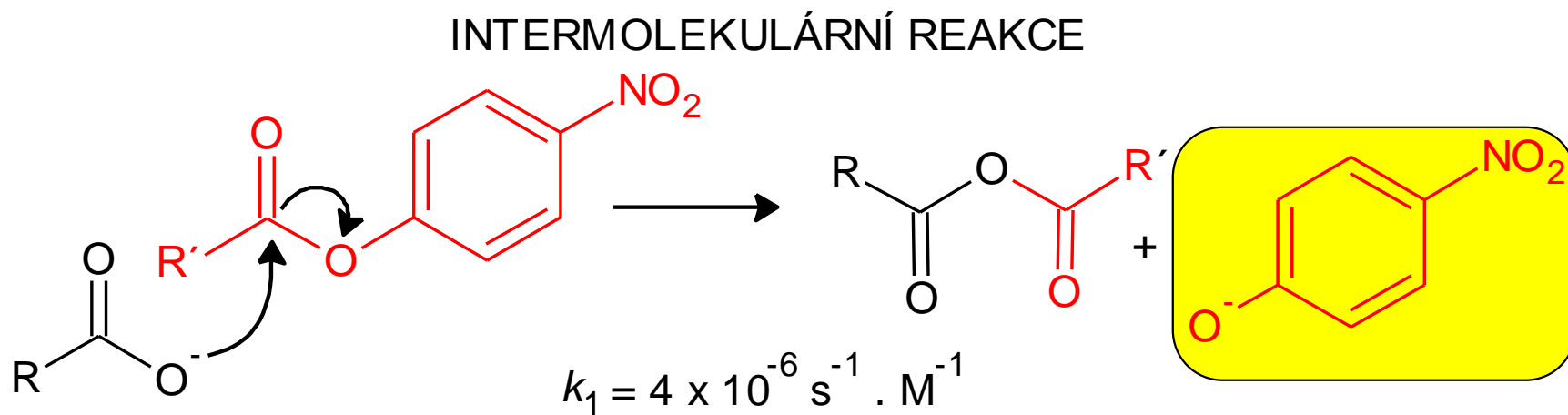
Urychlení enzymy katalyzované reakce spočívá v interakci reaktivních chemických skupin, které vedou k přiblížení enzymu k substrátu za tvorby komplexu enzym - substrát.

Dochází ke snížení entropie reaktantů a tím také k usnadnění takových reakcí jako je tvorba nové vazby nebo adičním reakcím.

Ke snížení celkové entropie dojde vždy, když dva reaktanty vytvoří jeden produkt.

Tento efekt je analogický efektivnímu zvýšení koncentrací reaktantů. Vazba reaktantů na enzym dává reakci intramolekulární charakter, který vede k významnému zvýšení rychlosti reakce.

Rychlost **intermolekulární** reakce.



Rychlost intramolekulární reakce.

INTRAMOLEKULÁRNÍ REAKCE

