

I. ENZIMMERNÖKI ALAPISMERETEK

Zemplén Géza, 1915

Az enzimek és gyakorlati alkalmazásuk.
A kir. Magyar Term. Tud. Társulat kiadása
349 oldal

•Kevés fejezete van a chemiának,
amely a legutolsó néhány év alatt
olyan nagyot haladt volna, mint
éppen az enzimeké. Éppen ezért a
vegyész lépten-nyomon érzi, hogy
megismerésük és a velük való
bánásmód manapság már
nélkülözhetetlenő

ε ν ζ υ μ η = **éleszt** **ben**
1878 Kühne

A fehérjék speciális csoportjai és biológiai funkcióik:

Regulátor fehérjék

lac-represszor

interferonok

inzulin

növ. hormon

RNS szintézis

vírus rezisztencia

glükóz metabolizmus

Transzport fehérjék

laktóz permeáz

mioglobin

hemoglobin

sejtmembrán transzport

O₂ - izomban

O₂ - vérben

Véd fehérjék

antitestek (abzyme) idegen anyag -komplex

trombin

véralvadás

B.thuringiensis
Cl.botulinum

biol. Inszekticid
ételmérgezés

Tartalék ta.fehérjék

ovalbumin

kazein

zein

tojásfehérje

tejfehérje

kukoricacsíra

chaperonok
prionok

Kontraktil fehérjék

dynein

cilia, flagella

Szerkezeti fehérjék

kollagén

glikoproteinek

izületek, inak

sejtfal

ENZIMEK

reakciókatalízis

katalitikus hatás

BIM SB
2001

Regulátor fehérjék

lac-represszor
interferonok
inzulin
növényi hormon

RNS szintézis
vírus rezisztencia
glükóz metabolizmus

Transzport fehérjék

laktóz permeáz
mioglobín
hemoglobín

sejtmembrán transzport
O₂ - izomban
O₂ - vérben

Véd fehérjék

antitestek (abzyme) idegen anyag -komplex
trombin véralvadás

BIOKATALÍZIS és RNS

RNS - világ → RIBOZIMEK
&
ATP, NAD⁺, CoA, (koenzimek)

tRNS

RNaseP 377 bp ~ 125 kD
a fehérjéje csak 119 AS ~ 14 kD

Enzimek - katalitikus hatású FEHÉRJÉK

sejtnek 15-55 % sz.a.

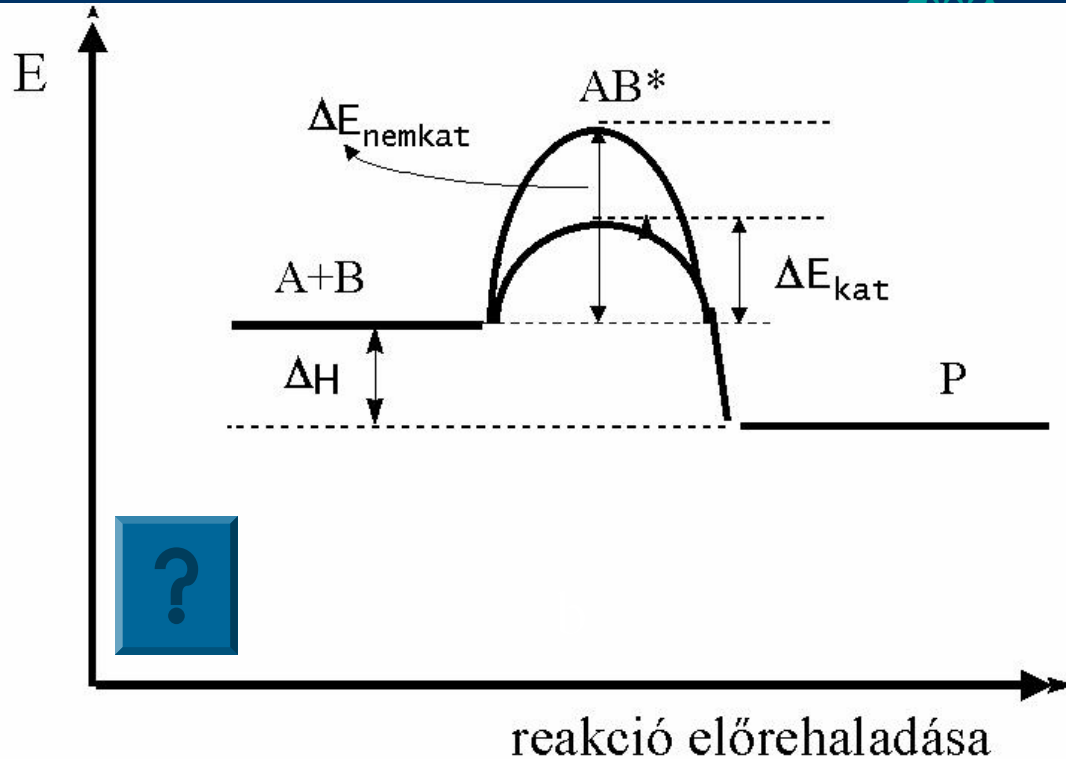
Óró *Escherichia coli* öszetétele (yomán)

BIM SB
2001

VEG YULET CSOPORT		% A SEJTÖMEG BE N	ÁTLAG MÓLTÖME G	DB/SEJT	FAJT A/SEJ T
H₂O		70	18	4*10¹⁰	1
SZERVETLEN IONOK: K ⁺ ,Mg ²⁺ ,Ca ²⁺ ,Fe ²⁺ ,Cl ⁻ PO ₄ ⁴⁻ ,SO ₄ ²⁻		1	40	2,5*10⁸	20
Szénhidrátok és prekurzoraik		3	150		200
Aminosavak és prekurzoraik		0,4	120	3*10⁷	100
Nukleotidok és prekurzoraik		0,4	300	1,2*10⁷	200
Lipidek és prekurzoraik		2	750	2,5*10⁷	50
Egyéb kis molekulák (hém,kinonok,í .)		0,2	150	1,5*10⁷	200
Fehérjék		15	40000	10⁶	2- 3000
Nukleinsavak					
DNS		1	2,5*10⁹	4	1
RNS			500000	3*10⁴	1

2-3000/ sejt
kül.enzimfeh.

k, átmeneti állapot



$$\Delta H^* = \Delta G^* + T \cdot \Delta S^*$$

$$K^* = \frac{C_{AB}^*}{C_A \cdot C_B}$$

$$\frac{dP}{dt} = k_r C_A C_B = C_{AB}^* \frac{kT}{h}$$

$$K^* = \frac{C_{AB}^*}{C_A C_B} = \frac{k_r h}{kT}$$

$$\Delta G^* = -RT \ln K^* = -RT \ln \frac{k_r h}{kT} = \Delta H^* - T \Delta S^*$$

$$k_r = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^*}{R}} \cdot e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} \approx \text{konst} \cdot e^{-\frac{\Delta E^*}{RT}}$$

T az abszolút hőmérséklet (Kelvin fok)

k a Boltzmann állandó ($1,37 \cdot 10^{-16}$ erg/°C)

h a Planck állandó ($6,62 \cdot 10^{-27}$)

$$(\Delta E^*)_{\text{nemkat}} > (\Delta E^*)_{\text{kat}}$$

$$(k_r)_{\text{nemkat}} \ll (k_r)_{\text{kat}}$$

MPLEX ES*

FUNKCIONÁLIS DOMAIN-EK

SZUBSZTRÁT KÖT HELY

lehetnek
azonosak is

REGULÁTOR DOMAINEK:

Me

modulátor (INHIBITOR, AKTIVÁTOR, S, P)

Kovalens módosítás:

foszforilezés

glikozilezés

proteolízis

Katalitikus domain **AKTIV CENTRUM**

AKÖT HELY

Zsák,zseb
rendszerint töltés illetve hidrofób
a kötést stabilizálhatja nemkovalens kölcsönhatás

csak egy kis felület a protein molekulán!

Az enzim-katalizis általános esetei:
modern elméle Linus Pauling 1946
Haldane 1930

1. sav-bázis
- 2.kovalens katalizis
- 3.fém ion katalizis

Hatások, amelyek felel sekk ill. jellemzik az enzimkatalizis(ér)t:

proximitási effektus

orientációs effektus

indukált illeszkedés

kulcs ó zár hasonlat

Daniel Koshland-konformációváltozás

ENTRÓPIACSAPDA



REAKTIV CSOPORTOK

fehérjeszerkezet

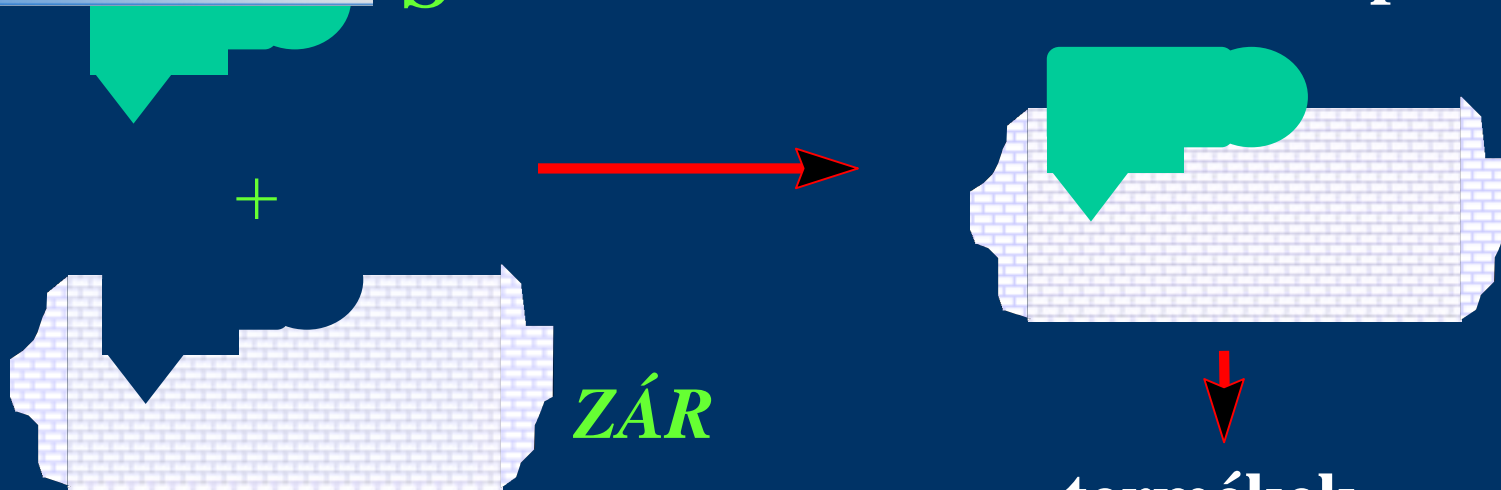
enzimtul

KULCS-ZÁR HASONLAT

BIM SB
2001

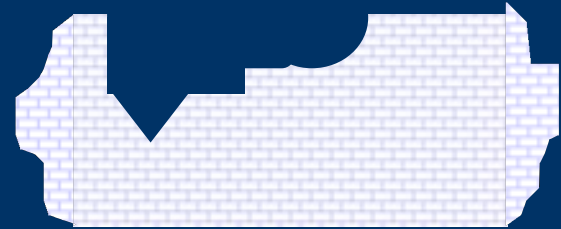
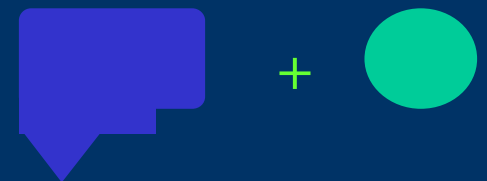
S

ES komplex



termékek

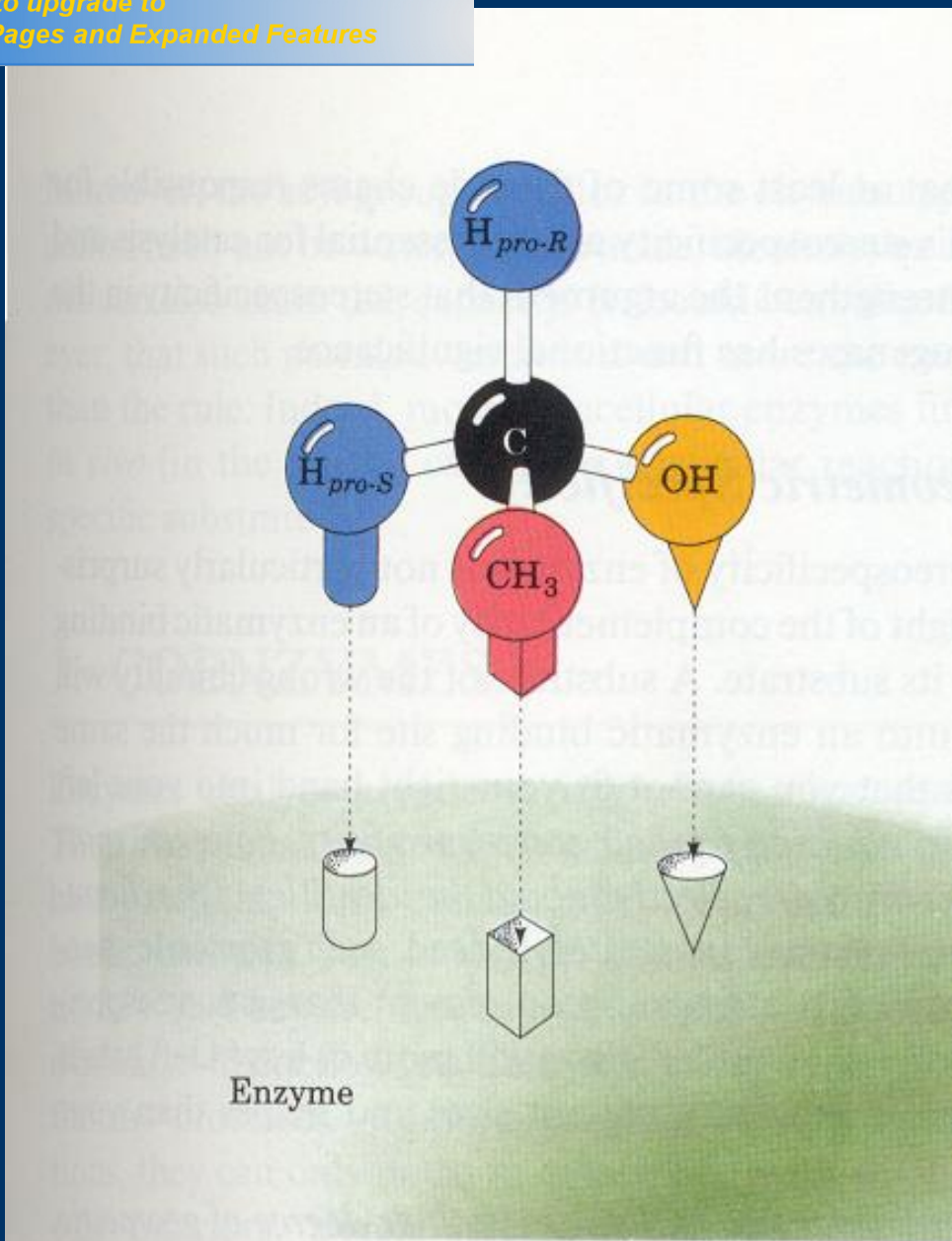
szabad E



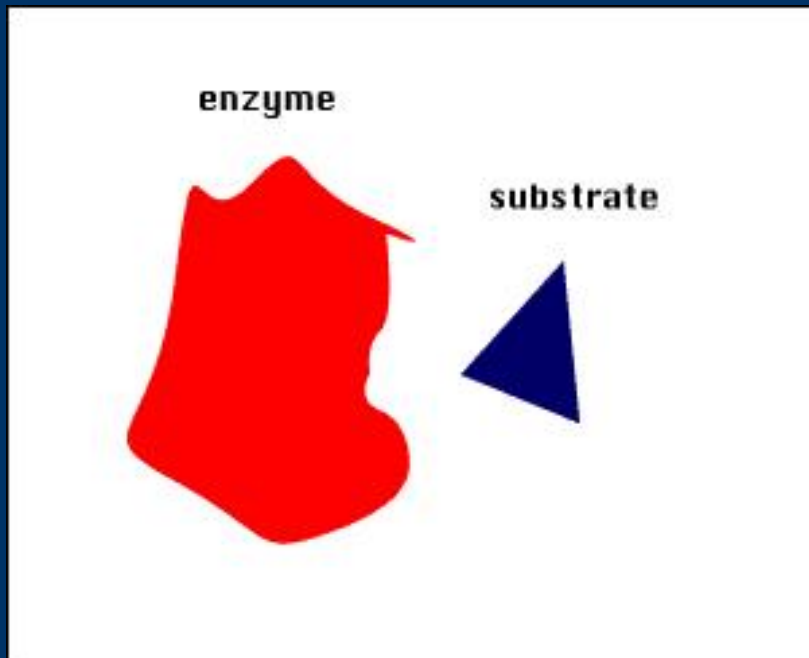
szabad E

Orientációs effektus

BIM SB
2001





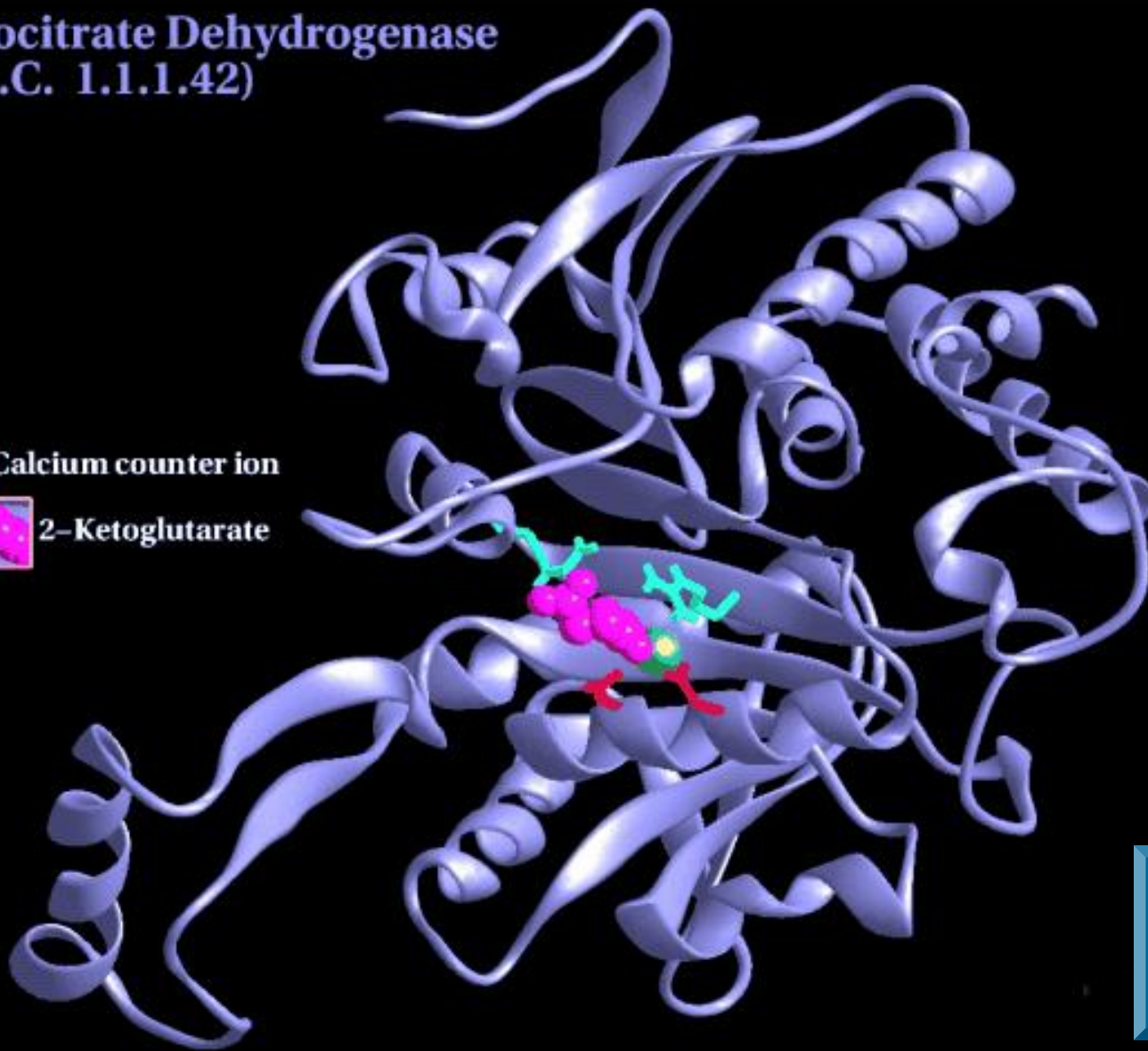
A sztereospecifitás alapja



Izocitrát dehidrogenáz

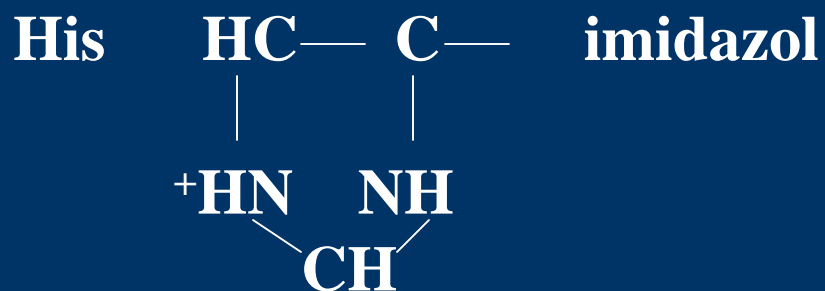
Isocitrate Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42)

-  Calcium counter ion
-  2-Ketoglutarate



REAKTÍV CSOPORTOK...

Glu -COO- & -CONH₂



láncevégi NH₂ és COO⁻

Lys ε - NH₂

elektrosztatikus kölcsönhatás

Met CH₃ óS -

H - kötések

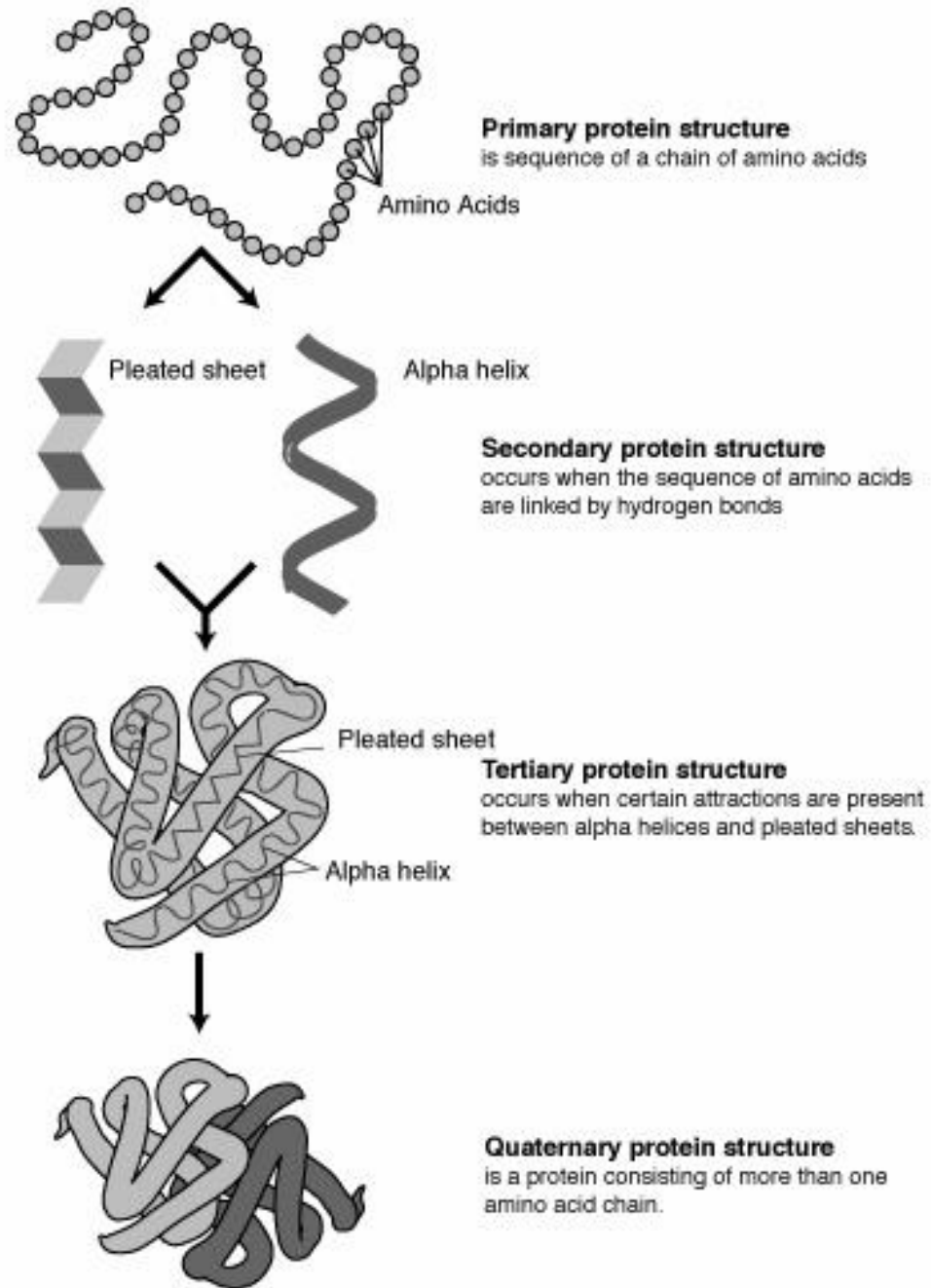
Ser -OH



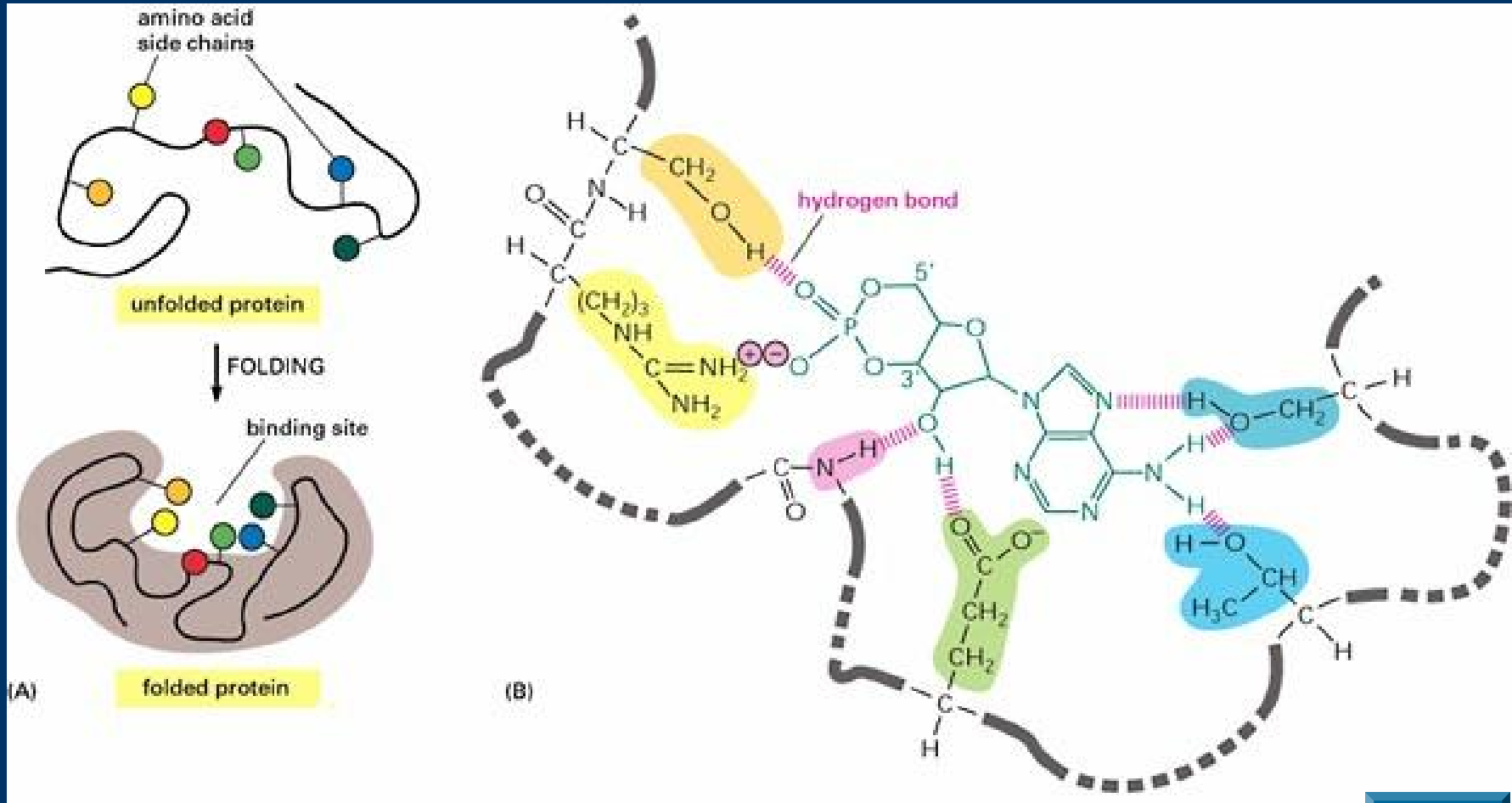
Thr CH₃CHOH -



Fehérjeszerkezet



Aktív centrum kialakulása



MAJDNONSÁGAI
CSAK TERMODINAMIKAILAG LEHETSÉGES
REAKCIÓK $\Delta G < 0$
REVERZIBILIS REAKCIÓK de:eltolás, elvétel...
DENATURÁLHATÓAK T, pH, ioner sség, oldószerek
SPECIFIKUSAK S-specifitás
csoport-specifitás
sztereo-specifitás
régio-specifitás

ENZIMEK EL NYEI

NAGYOBB REAKCIÓSEBESSÉG 10^6-10^{12} *

ENYHÉBB REAKCIÓKÖRÜLMÉNYEK

NAGYOBB REAKCIÓ-..+ SPECIFITÁS

REGULÁLHATÓSÁG

ENZIM

FEHÉRJE inaktív
APOENZIM

+

KOFAKTOR

FÉMION

Mg, Ca, Zn,
Fe, Cu, Mo

KOENZIM

Prosztetikus csoport
stabil kovalens kötés.
FAD(H₂), Hem,
Piridoxal-P(B₆)

Koszubsztrát
Ciklikus regenerálás
NAD(H), ATP

ENZIMEK ELNEVEZÉSE

BIM SB
2001

1. S ó után



urea + viz → **ureáz**

S-név + áz

ENZIMEK ELNEVEZÉSE

2. Reakció (és S) után



alkohol-dehidrogenáz (S-név)+reakciónév+ áz

3. Triviális nevek:

+ -in

pepszin, tripszin, rennin

fehérjebontók

4. IUB IUPAC 1964,1972,1978 **Enzyme Commission**
IUBMB

katalógusszám



koszubsztrát

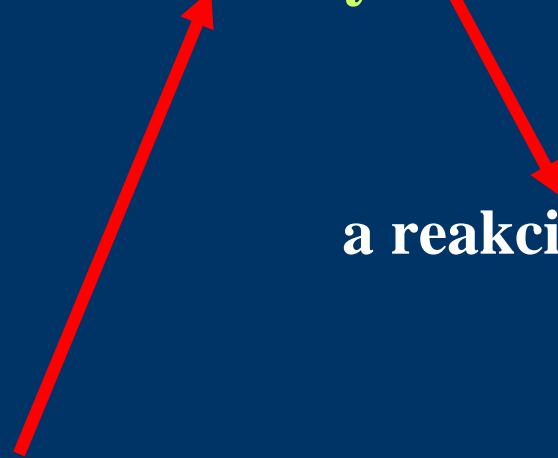


E.C.1.1.1.49. D-glucose-6P: NADP 1-oxydoreductase

szubsztrát



a reakció mibenléte

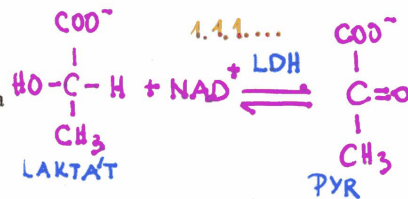


a támadás helye az 1 C-atomon van

enzimek csoportjai az EC alapján

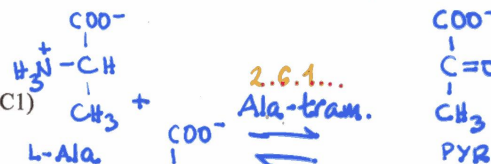
Oxido-reduktázok (oxidációs-redukciós reakciók) (SOK DEHIDROGENÁZ)

- 1.1. A primer -OH csoport oxidációja. -CH-OH
- 1.2. Keto-csoport oxidációja: -C=O
- 1.3. Metilén csoport : -CH=CH-
- 1.4. Primer aminos csoport
- 1.5. Szekunder aminos csoport
- 1.6. NADH v NADPH
- 1.7. Egyéb N-tartalmúdonorok oxidációja
- 1.8. S-tartalmú vegy oxidációja
- 1.9. Hem-oxidáció.....



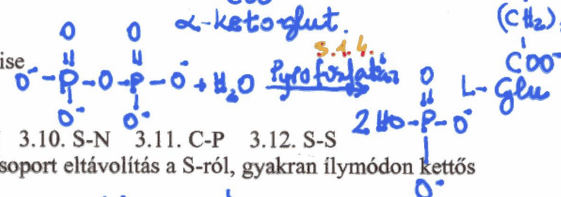
2. Transzferázok (funkciós csoportok átvitele)

- 2.1. C1 csoport átvitele
- 2.2. Aldehid vagy keto csoport átvitele
- 2.3. Acil csoport átvitele
- 2.4. Glikozil-csoport átvitele
- 2.5. Alkil- v. aril-csoport átvitel (nem C1)
- 2.6. N-átvitel
- 2.7. Foszfát-átvitel
- 2.8. Kéntartalmú csoport átvitele
- 2.9. Szeléntartalmú csoport átvitele



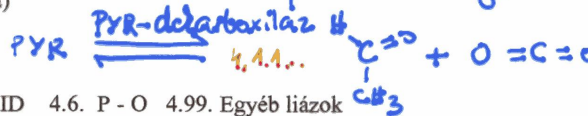
3. Hidrolázok (hidrolízis reakciók)

- 3.1. Észter-hidrolízis
- 3.2. Glikozid-hidrolízis
- 3.3. Éter-hidrolízis
- 3.4. Peptid-hidrolízis
- 3.5. Egyéb C-N kötések hidrolízise
- 3.6. Savanhidrid hidrolízis
- 3.7. C-C
- 3.8. Halid-hidrolízis
- 3.9. P-N
- 3.10. S-N
- 3.11. C-P
- 3.12. S-S



4. Liázok (addíció kettős kötésre és csoport eltávolítás a S-ról, gyakran ílymódon kettős kötés létrehozása)

- 4.1. C=C
- 4.2. C=O
- 4.3 N=O
- 4.4 C-S
- 4.5. C—HALID
- 4.6. P-O
- 4.99. Egyéb liázok



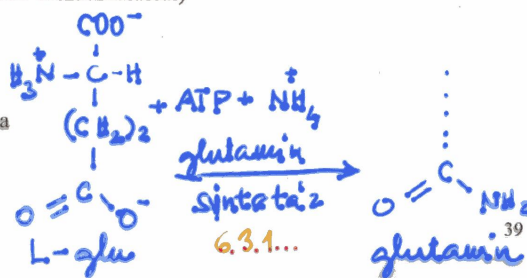
5. Izomerázok (izomerizációs reakciók)

- 5.1. Racemázok és epimerázok
- 5.2. Cis- Transz izomerázok
- 5.3. Intramolekuláris oxidoreduktázok
- 5.4. Intramolekuláris transzferázok (mutázok)
- 5.5. Intramolekuláris liázok
- 5.99. Egyéb izomerázok



6. Ligázok (új kötés létrehozása ATP felhasználással)

- 6.1. C-O
- 6.2. C-S
- 6.3. C-N
- 6.4. C-C
- 6.5. P-észter kötés létrehozása



ENZIMKINETIKA



mol/dm³!!!!

MIÉRT NEM MÉRHET ?

Egy **egység** az az enzim mennyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át vagy 1 μmol terméket képez 1 perc alatt *adott reakció körülmények között*.

SI rendszerben: 1 Katal: 1 mol szubsztrátot alakít át 1 s alatt.

hatalmas enzim mennyiség $\text{nKat} = 10^{-9} \text{ Kat}$

$1 \text{ Kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$, $1 \text{ U} = 1.6 \cdot 10^{-8} \text{ Kat}$, $1 \text{ U} = 1/60 \mu\text{Kat}$

E/tf **E/mg** \longrightarrow fajlagos aktivitás

Michaelis és Menten

Michaelis-Menten kinetika



feltételezések: $k_{-2} = 0$

*első lépés gyorsan egyensúlyra jut= **RAPID EKVILIBRIUM**

*stabil ES komplex, EP komplex elhanyagolható

*egy aktív centrum, egy szubsztrát

aktivitás helyett cc használható

$S \gg E_0$ vagyis $E_0 / S \ll 1$



$$k_1 S E = k_{-1} (ES)$$

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$$

a teljes reakciósebesség:

$$V = \frac{dP}{dt} = k_2 (ES)$$

az (ES) disszociációs
állandója

$$E + (ES) = E_0$$

anyagmérleg

összead ezt a kettőt egymással

Michaelis-Menten kinetika

$$V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$$

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES)}$$

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$$

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 \frac{S}{K_s} E}{E + \frac{S}{K_s} E}$$

Rendezzük át!

$$\frac{V}{k_2 E_0} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}} = \frac{S}{K_s + S}$$

$$V_{\max} = k_2 E_0$$



Michaelis-Menten kinetika

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}}$$

MEMO

terméket

adó komplexek

összes komplex

szabad enzim

terméket nem adó komplex

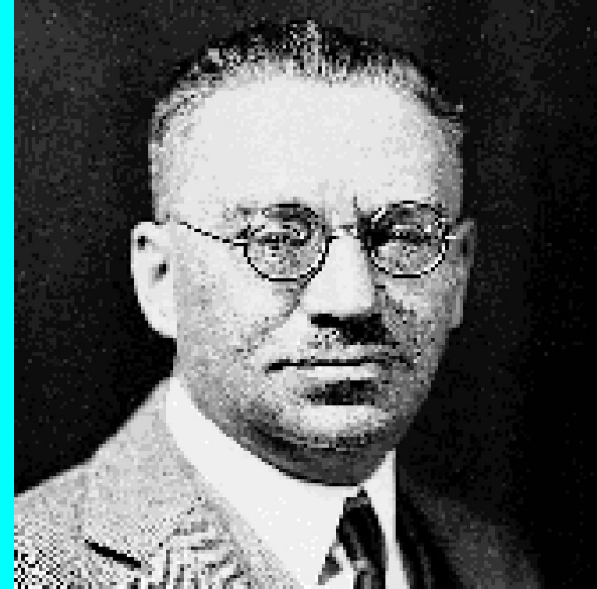
$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{O.E}{K_o} + \frac{H.E}{K_H} + \frac{O.H.E}{K_o \cdot K_E}}$$

M és M

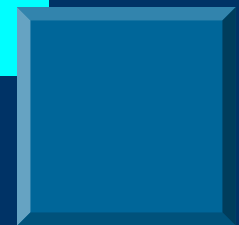
BIM SB
2001



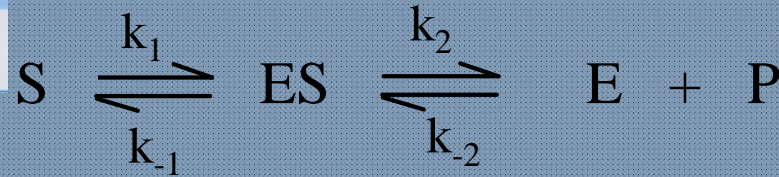
Maud Menten
1879-1960



Leonor Michaelis
1875-1949



GGG-HALDANE KINETIKA



$$\frac{dS}{dt} = -k_1ES + k_{-1}(ES)$$

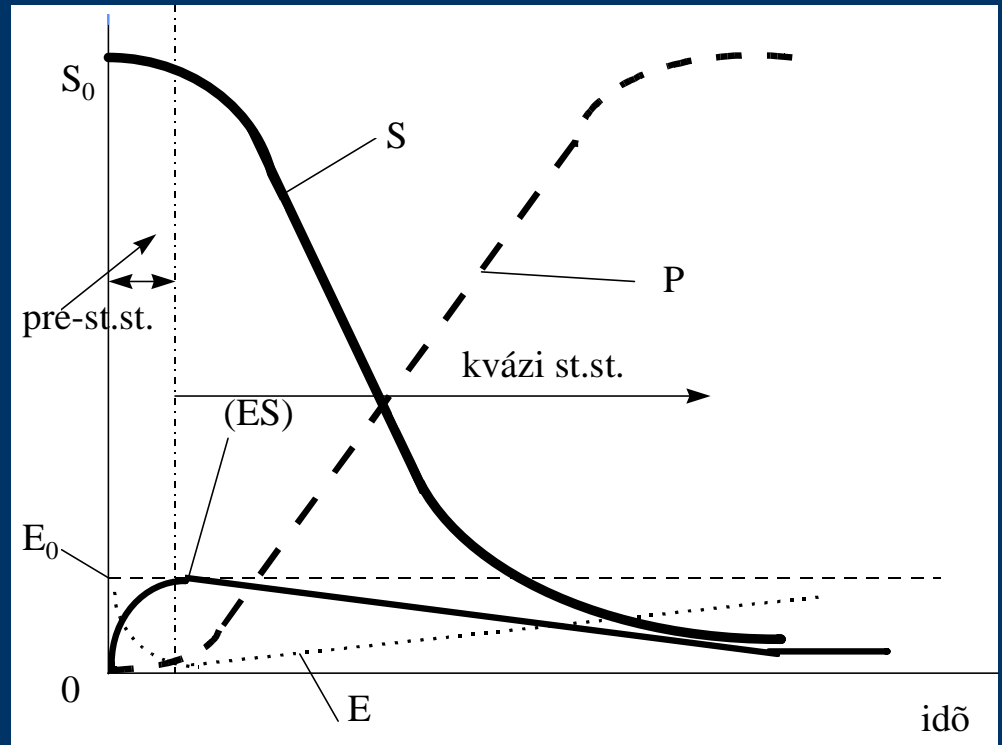
$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1ES - k_{-1}(ES) - k_2(ES)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2(ES)$$

steady state

$$d(ES)/dt = 0$$

$S \gg E_0$ vagy $E_0 / S \ll 1$ és
($k_1ES > k_{-1}(ES)$ ill. $k_1ES > k_2(ES)$)



MG-HALDANE KINETIKA

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1ES - k_{-1}(ES) - k_2(ES) = 0$$

$$k_1ES = (k_{-1} + k_2)(ES)$$

$$(ES) = \frac{k_1 S}{(k_{-1} + k_2)}$$

$$E + (ES) = E_0$$

$$V = \frac{k_2 E_0 S}{K_m + S} = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}$$

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

Michaelis állandó

Michaelis -Menten

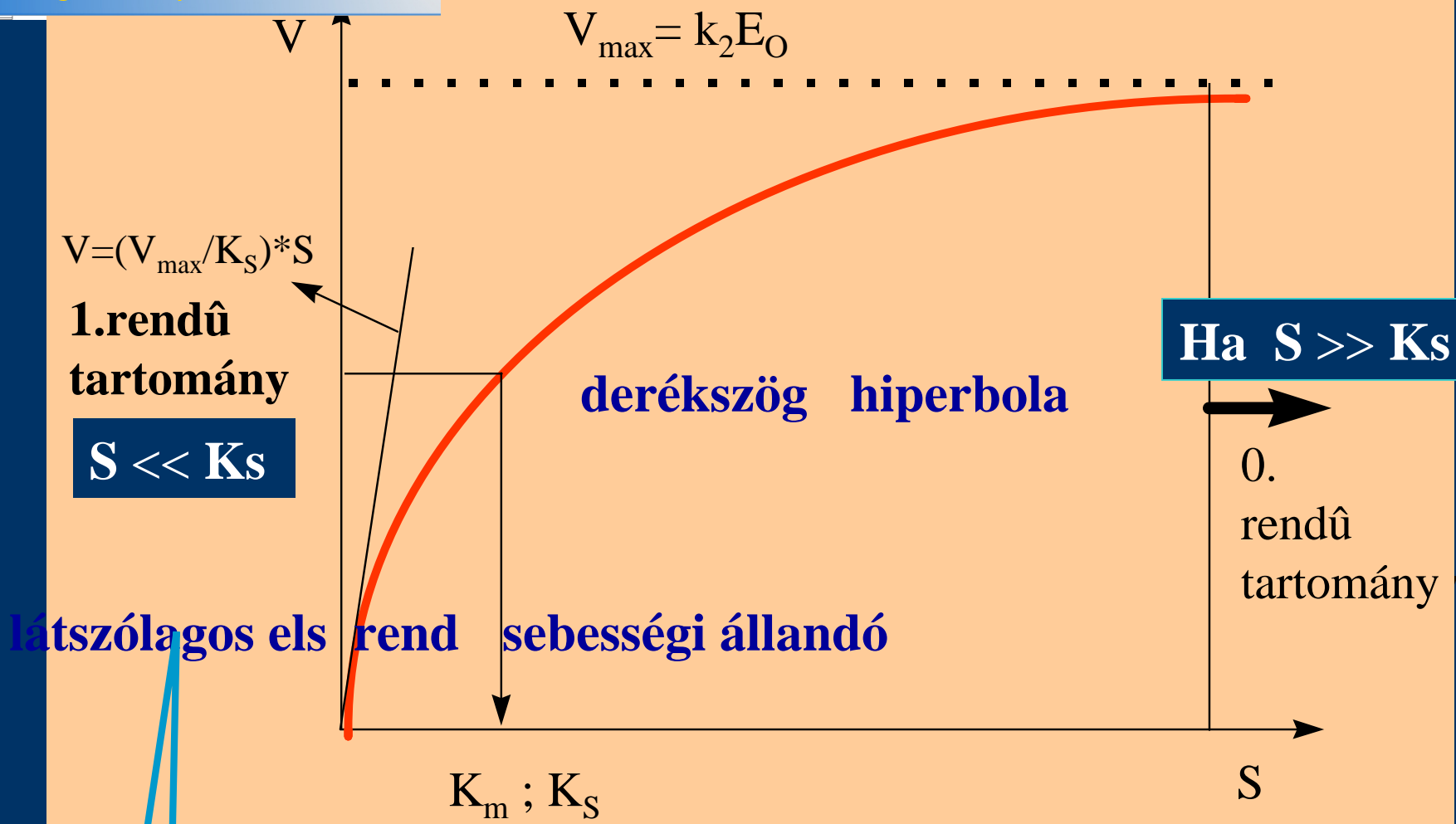
$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Briggs-Haldane

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1}$$

ha $\text{num}(k_1) \gg \text{num}(k_2) \rightarrow$ a két konst. azonos!

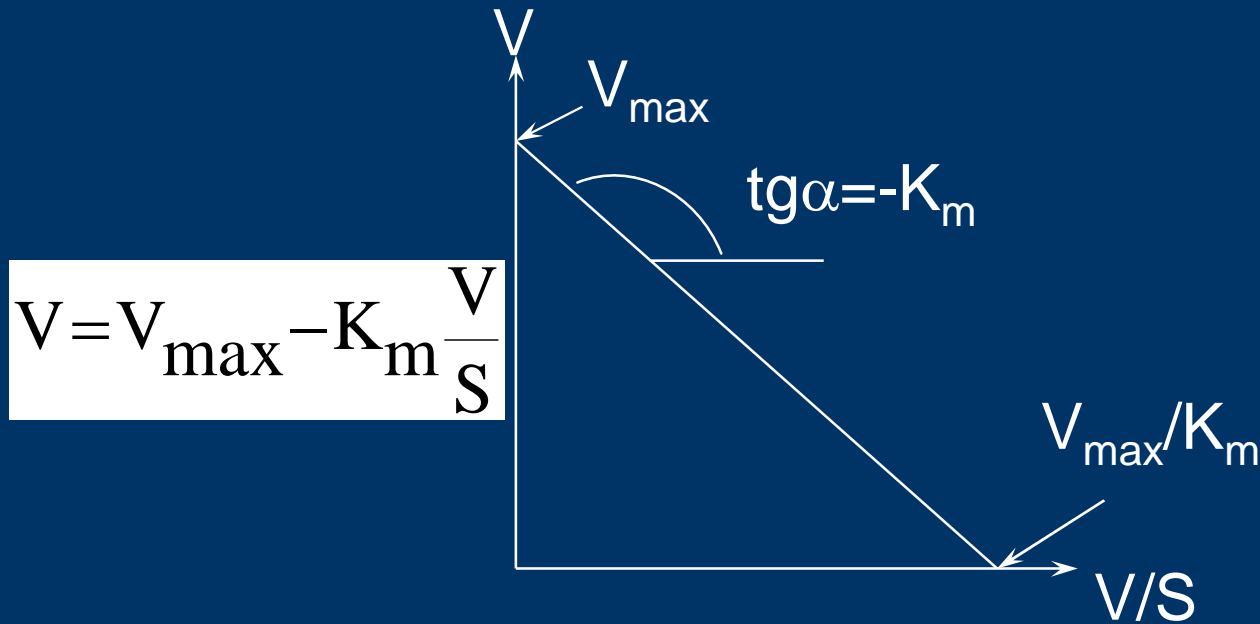
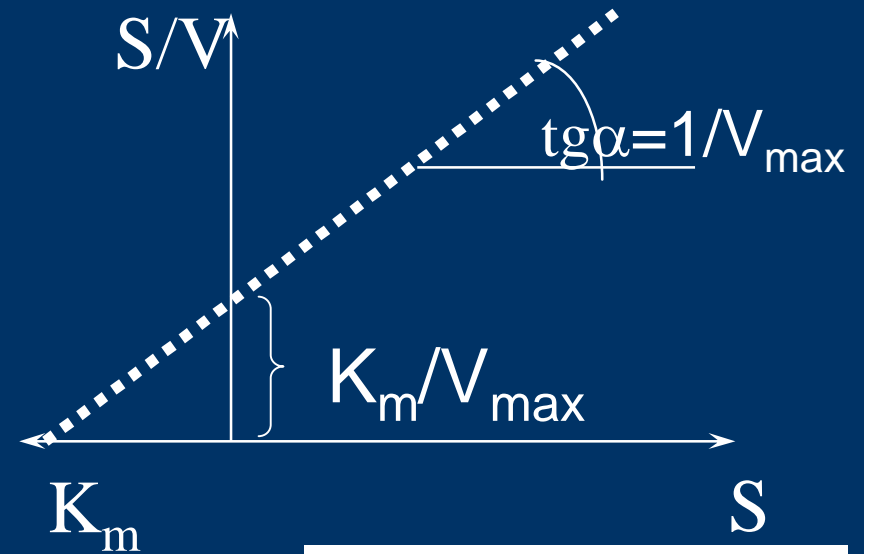
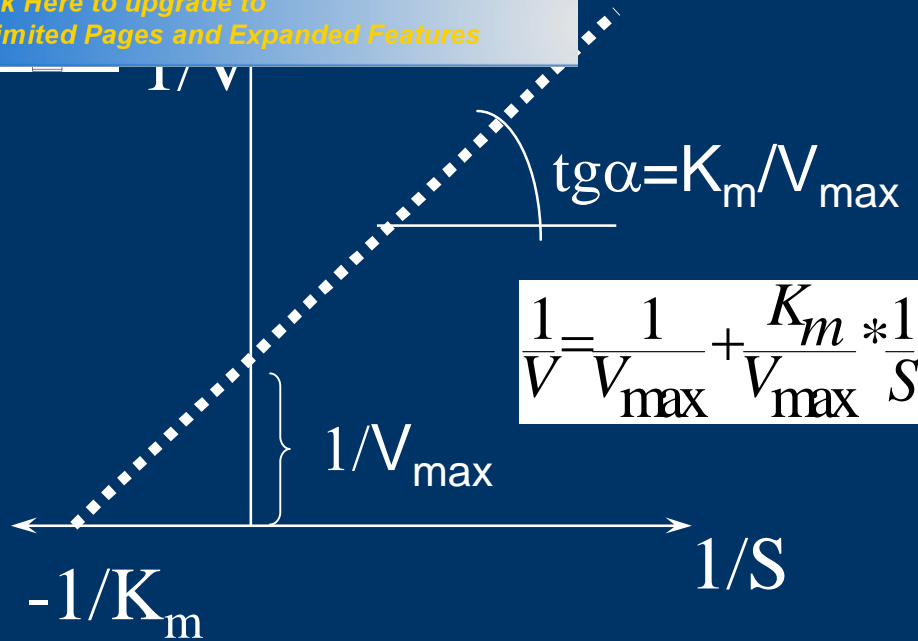


$$V \approx \frac{k_2}{K_S} E_0 S = k' E_0 S$$

katalitikus effektivitás

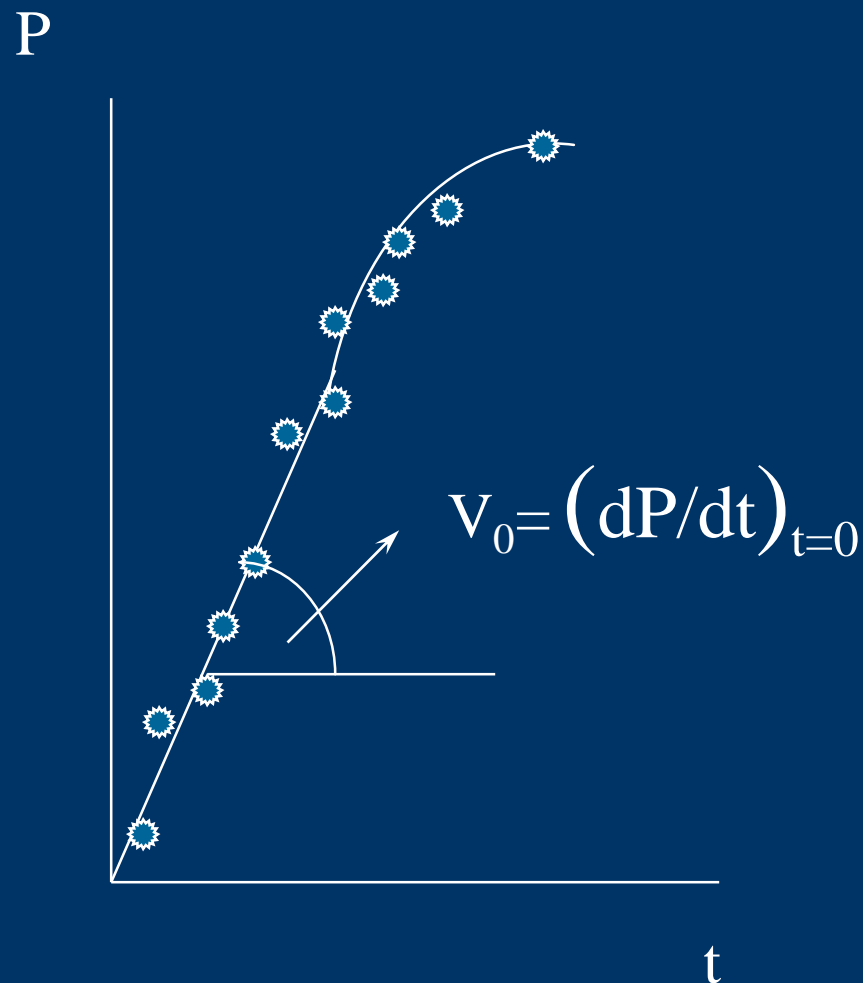
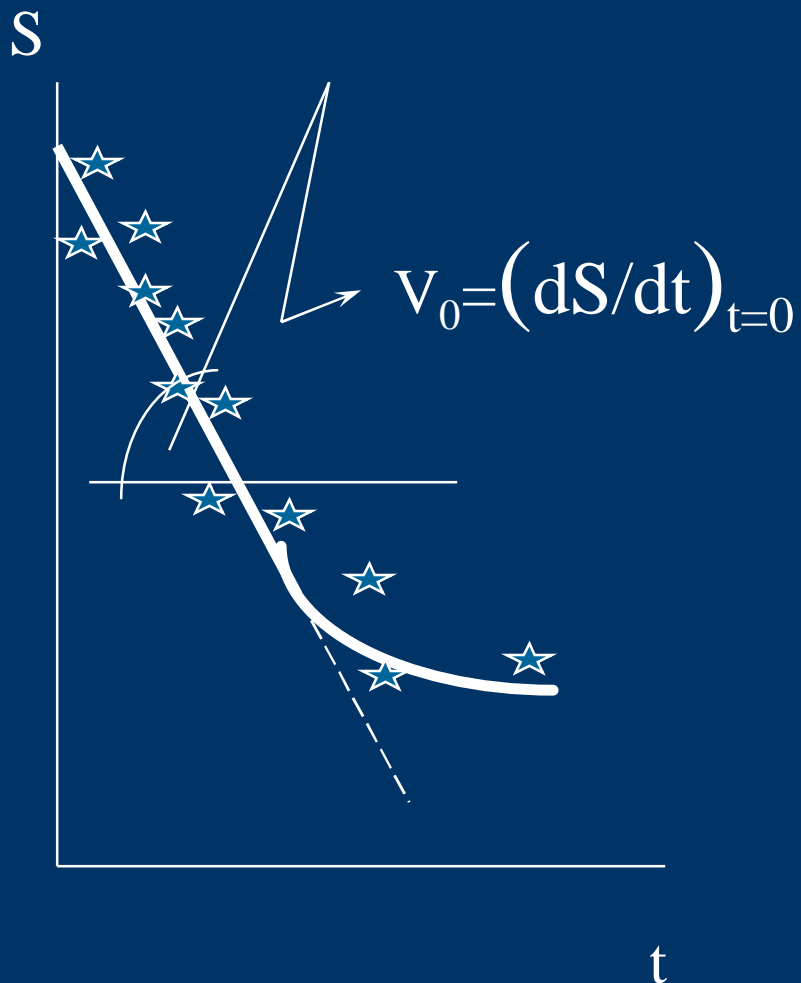


L-B, L-H, E-H ábrázolások

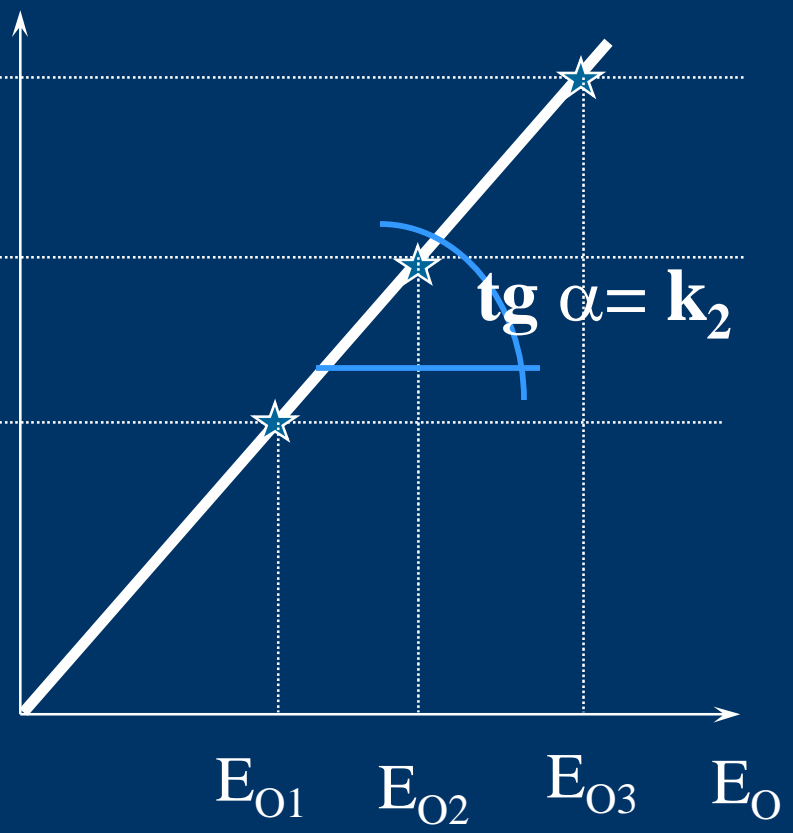
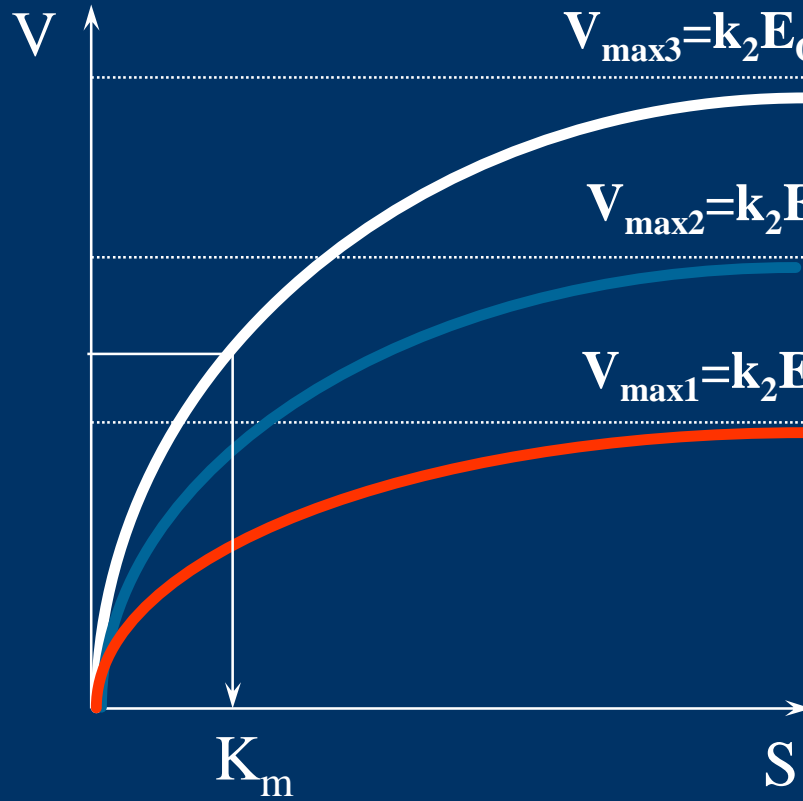


V_0 értelmezése

A M-M és B-H egyenletekben V kezdeti reakciósebességet jelent!!!



meghatározása és V_{\max} E_0 -függése



Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

kinetikai paraméterek értelmezése

V_{max} → k_2 enzimturnover (min^{-1})
 ↓ nem enzimturnover ($V_{max} = k_2 E_0$!)

k_2 TURNOVER NUMBER (VÁLTÁSSZÁM)
 ... egységnyi E által 1 perc alatt átalakított S molszám (μmol)

KITERJESZTÉS: $V_{max} = k_{cat} \cdot E_0$ minden enzimre és kinetikaára!

k_{cat} — TURNOVER NUMBER ! $k_{cat} = T.N.!$

K_m (K_s)

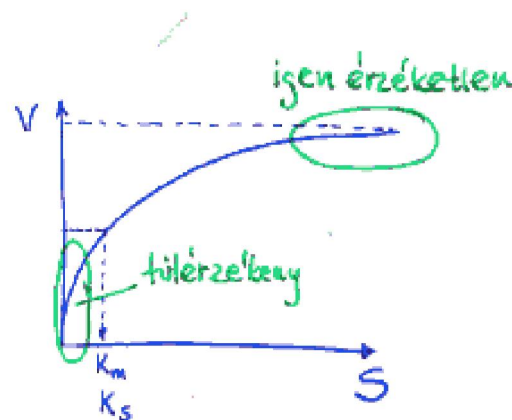
— $K_m \sim C_{szubsztrát}$ a sejtben

$V_1 \quad S_1 = K_m$

$V_2 \quad S_2 = 1000 K_m$

$V_2 = 2 \cdot V_1$! ugyan

— K_m (K_s) jellemző adott enzimre.
 $A \stackrel{?}{=} B$



- K_m -en keresztüli enzim szabályozás — inhibíció } kimutatása
- K_m és enzimanalitika kapcsolata helyes S tartomány kijelölése } aktiváció
- K_m (K_s) a SZUBSZTRÁT "AFFINITÁSA" AZ ENZIMHEZ



Enzimkinetikai paraméterek értelmezése 2

BIM SB
2001

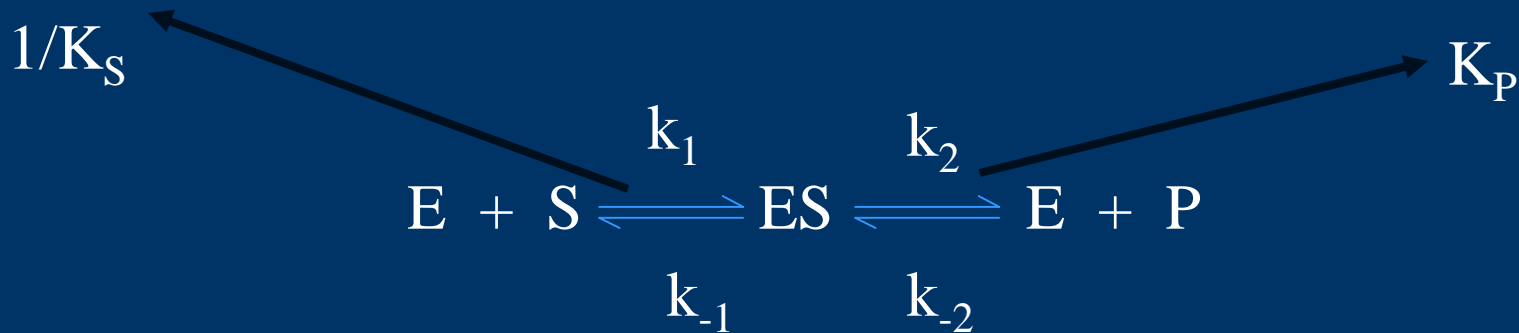
	$10^0 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$
[max. érték(10^{11}) kis molekulák diffúzió-sebessége]	
k^{-1}	$10^2 - 10^6 \text{ min}^{-1}$
k^2	$50 - 10^7 \text{ min}^{-1}$
K_m	$10^{-6} - 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$

TABLE 13-1. THE VALUES OF K_M , k_{CAT} , AND k_{CAT}/K_M FOR SOME ENZYMES AND SUBSTRATES

Enzyme	Substrate	$K_M (M)$	$k_{cat} (s^{-1})$	$k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})$
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	9.5×10^{-5}	1.4×10^4	1.5×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	<i>N</i> -Acetylglycine ethyl ester	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	<i>N</i> -Acetylvaline ethyl ester	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	<i>N</i> -Acetyltyrosine ethyl ester	6.6×10^{-4}	1.9×10^2	2.9×10^5
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-6}	8.0×10^2	1.6×10^8
	Malate	2.5×10^{-5}	9.0×10^2	3.6×10^7
Urease	Urea	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

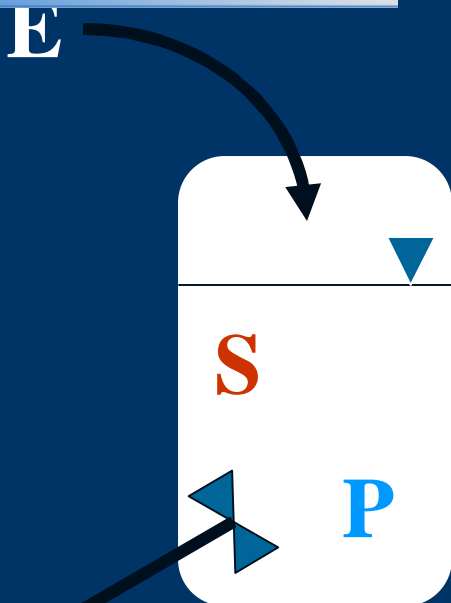
er hidrolízisek - nagymértékben a jobboldali irányba eltoló egyensúlyal rendelkeznek, olyannyira, hogy gyakorlatilag k_{-2} valóban elhanyagolható.

De például a **glükóz** \rightleftharpoons **fruktóz** (glükóz izomeráz) gyakorlatban is egyensúlyi reakcióként viselkedik



$$\frac{V_{\max s}}{K_{ms}} = \frac{V_{\max s} K_{mp}}{V_{\max p} K_{ms}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = K_{eq}$$

HALDANE
összefüggés



MI TÖRTÉNIK?

?

S P vagy P S

MIT L FÜGG? K_{eq} , S, P értéke

$$V_{netto} = V_{el\ re} - V_{vissza} = k_2(ES) - k_{-2}(EP)$$

$$V_{netto} = \frac{V_{maxS} \left(S - \frac{P}{K_{eq}} \right)}{K_{ms} \left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right) + S} = \frac{V_{maxS} \frac{S}{K_{ms}} - V_{maxP} \frac{P}{K_{mp}}}{1 + \frac{S}{K_{ms}} + \frac{P}{K_{mp}}}$$