

Dr. Kotormán Márta

# A fehérjék szerkezete. Az enzimkatalízis jellemzése, enzimkinetika, az enzimek szabályozásának lehetőségei

Segédlet a BSc záróvizsgára való felkészüléshez

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen készült az Európai Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014



# Fehérjék, enzimek

## Segédlet a BSc államvizsgára való felkészüléshez

Készítette: Dr. Kotormán Márta

SZTE, 2020

Az államvizsga tétel címe: **A fehérjék szerkezete. Az enzimkatalízis jellemzése, enzimkinetika, az enzimek szabályozásának lehetőségei.**

## A fehérjék szerkezete

A fehérjék felépítésében résztvevő aminosavak L-konfigurációjúak, eltérő méretűek és töltésűek (20 félék), a glicin kivételével királisak és peptid kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz.

**Elsődleges szerkezet:** az aminosav sorrend, 1. aminosav az N-terminális. **H-C-V-M-T-A-L-M-P-Y-...**

**Másodlagos szerkezet:** a polipeptidlánc egy-egy szabályos elrendeződése pl.  $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -lemez.

**$\alpha$ -hélix:** jobbmenetes csavarodású, menetenként 3,6 aminosavval, a menet magasság 0,54 nm, az aminosav oldalláncok a hélix külső felszínén vannak, 4 peptid kötésnyi távolságban lévő amid hidrogén- és karbonil oxigén atomjai közötti, a hélix tengelyével párhuzamos H-kötések stabilizálják.

**$\beta$ -lemez:** a polipeptidláncok egymás mellett, párhuzamosan (parallel vagy antiparallel) helyezkednek el, az egymás utáni peptidkötések síkjai harmonika-szerűen illeszkednek egymáshoz, a hidrogénhidak a szerkezet hossz tengelyére merőlegesek (a peptid gerinc megfelelő atomjai között jönnek létre), az aminosav oldalláncok váltakozva a lemez síkja fölött és alatt találhatóak.

**$\beta$ -görbület:** a polipeptidlánc irányát hirtelen megváltoztatja, hidrogénkötés jön létre az 1. és a 3. peptid-síkok között, a 2. eleme gyakran prolin.

**Harmadlagos szerkezet:** a teljes polipeptidlánc térbeli szerkezete, a másodlagos szerkezeti elemek térbeli elrendeződése, az aminosav oldalláncok között kialakuló kötések és kölcsönhatások stabilizálják, (a poláros és ionos oldalláncok kívül, a hidrofóbok pedig belül vannak).

**Negyedleges szerkezet:** a több polipeptid láncból álló fehérjék alegység szerkezete, az egyetlen polipeptidláncból álló fehérjéknek, nincsen negyedleges szerkezetük.

A fehérjék pontos térszerkezetét meghatározhatjuk röntgen kristallográfiával, illetve NMR-el.

**Egy fehérje natív szerkezetének megbomlása (denaturálódása), a funkció elvesztésével is jár.**

## Az enzimkatalízis jellemzése

**Enzimek:** specifikus biokatalizátorok (szubsztrát- és reakcióspecifikusak), **fehérjék**. Lehetséges reakciókat katalizálnak, az egyensúlyt nem tolják el. Nélkülük a reakciók rendkívül lassan mennének csak végbe, csökkentik az aktiválási energiát és ez által növelik a reakciósebességet.

**1 U = 1  $\mu$ mol/perc** (optimális körülményeknél a percenként átalakított S  $\mu$ mol-ok számát adja meg).

**Aktív centrum:** zseb- vagy árok-szerű bemélyedés az enzim felületén, a fehérjemolekula kis részlete, ahol a reakcióban részt vevő anyag a szubsztrát (S) kötődik (**szubsztrát kötőhely:** meghatározza a specifitást), illetve átalakul (**katalitikus hely:** meghatározza, milyen típusú reakciót katalizál az enzim, pl. oxidoredukció, csoport transzfer, hidrolízis, izomerizáció). Úgy alakul ki, hogy a polipeptidlánc lineáris szekvenciájában egymástól távol elhelyezkedő oldalláncok a lánc gombolyodása folytán térközbe kerülnek, egymással kölcsönhatásokat alakítanak ki, így befolyásolva az egyes oldalláncok eredeti, kémiai tulajdonságait. (Pl. a szeril-proteázoknál az aktív centrumban lévő Ser aminosavoldallánc más oldalláncokkal (His, Asp) való kölcsönhatás révén reaktívvá, nukleofillé válik, holott egyéb Ser aminosavoldalláncok kevésbé reaktívak). Az enzimek megkötik a S-t, és megfelelő módon átalakítják. A S az enzimhez főleg másodlagos kötésekkel kapcsolódik, de néha átmenetileg kovalens kötésű kapcsolat is kialakulhat.

**Kulcs-zár elmélet (Fischer):** a S úgy illik az aktív centrumba, mint a kulcs a zárba. A S specifitást jól értelmezi, azonban az enzimet túl merevnek tarja.

**Indukált illeszkedés hipotézis (Koshland):** a S indukálja az aktív konformáció kialakulását.

**Fluktuációs illeszkedés hipotézis (Straub F. Brunó és Szabolcsi Gertrúd):** az enzim számos konformáció között fluktuál, ezek közül a S az aktív konformációjához kötődik.

A katalízis mechanizmusa lehet **sav-bázis katalízis**: protontranszfer történik az enzim és a S között (ribonukleáz), **kovalens katalízis**: átmenetileg kovalens kötés alakul ki az enzim és a S között (kimotripszin: kovalens- és sav-bázis katalízis) és **fémion katalízis** (szénsav anhidráz).

Az enzimek jelentős része összetett: kis-méretű, hőstabil, nem fehérje részt is tartalmaz, amely nélkülözhetetlen a működéséhez. A **koenzim**ek közvetlenül részt vesznek a katalitikus folyamatban és meghatározzák annak jellegét. Az **apoenzim** az enzim fehérje része kofaktor nélkül, inaktív. A **holoenzim** pedig az apoenzim a kofaktorral együtt. A koenzimek gyakran vitaminok származékai (NAD<sup>+</sup> – niacin, FAD – riboflavin, piridoxál foszfát - piridoxin). A reakció során a koenzimek kémiaiilag megváltoznak, ezért egyetlen enzim reakcióját tekintve a koenzimje lényegében egy szubsztrát. A sejt szempontjából azonban a koenzimek alapvetően különböznek a szubsztrátoktól, mivel a koenzimek egy másik enzimatis reakció során regenerálódnak. A **prosztetikus csoport** szorosan kötött koenzim, a koenzim lazán kötött prosztetikus csoport.

Az enzimeket, a katalizált reakció lényege alapján 6 osztályba soroljuk. A többeszernyi metabolikus reakció besorolható a 6 osztály valamelyikébe, vagyis ezek minden lehetséges reakciótípust magukba foglalnak. A 6 enzim-osztály mindegyike alosztályokat is tartalmaz, melyek ugyancsak további csoportokra oszlanak. Az osztályokat, az alosztályokat, a csoportokat és ezeken belül az egyes enzimeket arab számokkal jelöljük. Egy-egy enzimet így 4, egymástól pontokkal elválasztott szám határoz meg, elé EC rövidítést írva. (Hexokináz: ATP: D-hexóz-6-foszfotranszferáz, EC 2.7.1.1.).

Egy-egy ilyen szám azonban nem minden esetben képvisel csupán egyetlen fehérjét. Az azonos szubsztrátok azonos reakcióját katalizáló, ám elsődleges szerkezetükben egymástól különböző enzimeket **izoenzim**eknek nevezzük. Az izoenzimek különböznek egymástól szabályozásukban, a sejten belüli elhelyezkedésükben, a különböző szervek vagy sejtípusok közti megoszlásukban és az általuk katalizált reakció sebességében is.

## A 6 enzimosztály:

**Oxidoreduktázok (EC 1.):** redoxi reakciót katalizálnak. Egyik molekula oxidálódik, a másik redukálódik. A különböző alosztályokba eltérő mechanizmussal működő enzimek tartoznak. A katabolikus (lebontó) és az anabolikus (szintetikus) reakciók jelentős része oxidoredukció. Jellemző koenzimeik a  $\text{NAD}^+$  (pl. malát-dehidrogenáz), a  $\text{NADP}^+$ , a FAD (pl. szukcinát-dehidrogenáz), a FMN, a koenzim-Q és a liponsav.

**Transzferázok (EC 2.):** funkcionális csoportokat visznek át egyik szubsztrátról a másikra, vagy ugyanazon szubsztrát egyik csoportjáról a másikra. Koenzimeik pl. az ATP, a piridoxál-foszfát, az UDP, a CDP, a biotin, a koenzim-A és a tiamin-pirofoszfát. A különböző alosztályokat a különböző csoportok átvitelét katalizáló enzimek képezik. A transzferázokhoz tartoznak a kinázok (pl. hexokináz), melyek az ATP terminális foszfát csoportját helyezik át a szubsztrátra.

**Hidrolázok (EC 3.):** szubsztrátok hasítását végzik víz segítségével. A hidrolázok közé tartoznak az amilázok, a nukleázok, a lipázok és a peptid kötések hidrolizáló proteázok is. **Ez az egyetlen enzimosztály, amelyre nem jellemző koenzimek részvétele.**

**Liázok (EC 4.):** a szubsztrát molekulát úgy hasítják két részre, hogy az egyik termék molekulában kettős kötés jön létre (aldoláz). Visszafelé kettős kötésre történő addíció. A katalizált reakció során víz, ammónia,  $\text{CO}_2$ , vagy valamilyen más molekula adódik egy molekulához vagy vonódik el belőle.

**Izomezázok (EC 5.):** egy szubsztrát molekula izomer átalakulását katalizálják (epimerek, szerkezeti izomerek, cisz-transz (retinál izomeráz), aldóz-ketóz átalakulások).

**Ligázok (EC 6.):** energiaigényes szintéziseket katalizálnak. Úgy kapcsolnak össze különböző molekulákat, hogy ehhez egyidejűleg nagy energiájú foszfátkötés hasításából származó energia szükséges, mely molekula lehet ATP (glutamin-szintetáz), vagy más nukleozid trifoszfát is.

## Enzimkinetika



A S az aktív centrumba kötődik. Létrejön az ES komplex, melyből vagy enzím és termék lesz, illetve széteshet enzímre és S-ra. A [S] növelésével a reakció sebessége először folyamatosan nő, majd elérve a maximális sebességet, nem változik tovább. **A maximális reakciósebességnél minden enzím molekula ES komplexet képez, tehát dolgozik.**

### Michaelis-Menten egyenlet:

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Ez egy derékszögű hiperbola egyenlete, ahol  $V_{\max}$  a maximális sebesség, és  $K_M$  a Michaelis állandó. Az enzimatis reakciónál a reakciósebesség nem lineáris függvénye a [S]-nak. **A  $K_M$  a  $V_{\max}$  feléhez tartozó [S].** Kis  $K_M$  a S-hoz való nagy affinitást jelent. Az enzimek  $K_M$  értéke  $10^{-7}$ -, és  $10^{-2}$  M közötti. Fiziológias körülményeknél az enzimek általában a  $K_M$  értékéhez közeli [S]-nál működnek.

**A Michaelis-Menten modell alkalmazhatóságának feltételei:** Az enzím minden aktív centrumához csak egy S kötődik. A [S] a reakció során nem változik, vagyis a S feleslegben van. Az enzím és a S közti egyensúly gyorsan beáll. Kinetikailag stabil ES komplex alakul ki. A második lépés nem megfordítható. A termék gyorsan disszociál az enzímről.

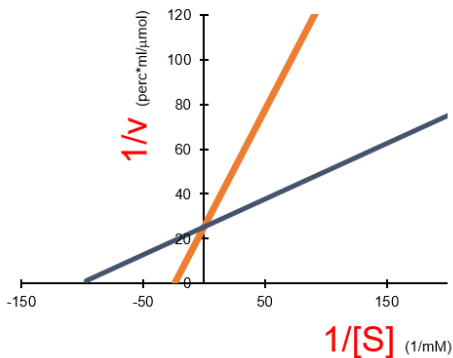
Meghatározható a  $K_M$  és a  $V_{\max}$  értéke  $1/v$ -t ábrázolva az [S] reciprokának a függvényében. A Lineweaver-Burk féle ábrázolás csupán az egyik, a sok ismert linearizálási forma közül. A kettős reciprok értékhez úgy jutunk, hogy a Michaelis egyenlet mindkét oldalának reciprokát vesszük. Elvégezve a lehetséges egyszerűsítéseket egy egyenes egyenletét kapjuk. Az egyenes iránytangense  $K_M/v_{\max}$ , és a tengelymetszet az y tengelyen pedig  $1/v_{\max}$ .

**Az enzimek szabályozásának lehetőségei:** pH, hőmérséklet, S- és koenzim koncentráció, inhibitorok, aktivátorok, enzim konkurrencia, izoenzimek, kompartmentalizáció, allosztérikus szabályozás (feedback szabályozás), kovalens módosítás (foszforiláció-defoszforiláció, acetilálás-dezacetilálás, zimogének, enzimkaszádok) és az enzim mennyiségének a megváltoztatása.

**Irreverzibilis gátlás:** az inhibitor kovalens kötéssel kötődik az enzimhez, így csak rendkívül lassan, vagy egyáltalán nem disszociál le. Pl. a szeril-proteázok inaktíválhatók di-izo-propil-fluoro-foszfáttal, mely csak a natív enzim aktív centrumában lévő Ser oldallánccal reagál, a denaturáltéval nem.

### Reverzibilis gátlások: Kompetitív (versengő, vetélkedő) gátlás

Lineweaver-Burk féle ábrázolás

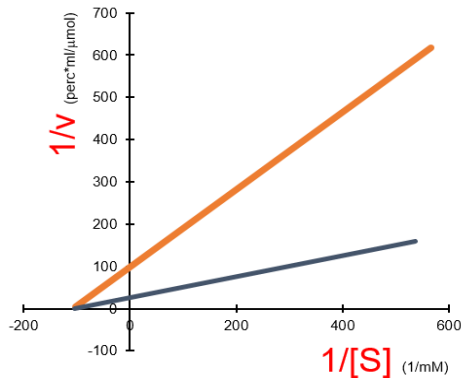


A S és a **kompetitív inhibitor** (I) szerkezete hasonló, versengenek a S kötő helyért. Nem keletkezhet ESI komplex. Az I csökkenti az ES komplex kialakulásának valószínűségét. Nagy [S]-nál viszont valószínűbb a S kötődése az I-rénál. A terápiában fontos a valódi kompetíció, egy enzim S-jához hasonló szerkezetű molekulák tervezése, melyek elfoglalhatják a S helyét, meggátolva kötődését. Antimetabolitok az enzimek S-jára hasonlító I-ok, blokkolnak bizonyos anyagcsereutakat. Kompetitív gátláskor a  **$K_M$  nő** (csökken az enzim S-hoz való affinitása), a  **$V_{max}$  nem változik** (a gátlás felfüggeszthető nagy [S]-val). A Lineweaver-Burk féle ábrázolásnál a meredekség annál nagyobb, minél nagyobb az [I]. Az oxálacetát kompetitív inhibitora a szukcinát-dehidrogenáznak.



## Reverzibilis gátlások: Nem-kompetitív gátlás

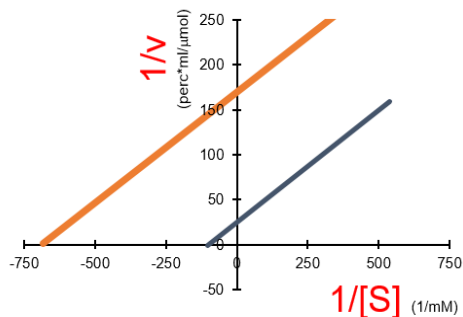
Lineweaver-Burk féle ábrázolás



A **nem-kompetitív inhibitor** nem az aktív centrumhoz kötődik, de konformáció-változást okoz. Az I kötődhet a szabad enzimhez és az ES komplexhez is, azonban az EIS komplex inaktív. Az I és a S szerkezete nem hasonlít egymásra. Az I komplexet képezhet a katalízisben fontos fémionnal is. A nem kompetitív gátlás nem függeszthető fel a [S] emelésével, hanem csak az I eltávolításával. A gátlás során a  **$K_M$  nem változik**, hiszen az I nem befolyásolja a S enzimhez való kötődését (az I jelenlétében az enzim S-hoz való affinitása nem változik), a  **$V_{max}$  viszont csökken**. Az izoleucin nem kompetitív inhibitora a treonin-deamináz enzimnek.

## Reverzibilis gátlások: Unkompetitív gátlás

Lineweaver-Burk féle ábrázolás

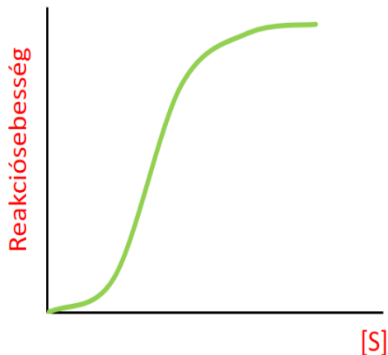


Az **unkompetitív inhibitor** nem tud kötődni a szabad enzimhez, csak az ES komplexhez. **A  $K_M$  és a  $V_{max}$  értéke is csökken**. Több szubsztrátos enzimekre jellemző. Az unkompetitív gátlást sem lehet felfüggeszteni a [S] emelésével.

## Allosztérikus szabályozás (reverzibilis)

**Több alegységes enzimek** allosztérikus modulátora nem az aktív centrumba, hanem az attól távoli kötőhelyhez kötődik. A modulátor más szerkezetű, mint a S. A S-kötő hely az egyik, az allosztérikus kötőhely a másik alegységen van. A konformáció változik, ha a S-kötő helyre, vagy az allosztérikus kötőhelyre kötődik a megfelelő molekula, mely megváltoztatja az aktivitást. Az I kötődése csökkenti az aktivitást, az aktivátoré pedig fokozza. A S az aktív formához kapcsolódik. Az allosztérikus ligandok kötődése gyenge kölcsönhatásokkal történik, reverzibilis, pillanatszerű és az aktuális koncentrációtól függ. **Allosztérikus enzimek gyakran az anyagcserefolyamatok kulcsenzimeik.** PI. a foszfofruktokináz I enzim allosztérikus inhibitora az ATP, aktivátora pedig az ADP. Az allosztérikus szabályozás fontos az anyagcserefolyamatok összehangolásában.

Az alegységeknek kétféle konformációja lehet: aktív (R), vagy inaktív (T). Az I a T formát, az aktivátor az R formát stabilizálja, mely formák reverzibilisen egymásba alakulhatnak. A T-nek a S-hoz kicsi az affinitása, míg az R-hez a S affinitása nagy. A **szekvenciális modell** szerint az alegységek egymástól függetlenül bármelyik konformációt felvehetnek, míg a **kooperatív modell** csak egyféle formát engedélyez, hibrid forma (RT) nem jöhet létre. Egyes fehérjék az egyik, míg más fehérjék a másik mechanizmus szerint működnek.



**Az allosztérikus enzimek nem követik a Michaelis-Menten kinetikát.**

Kis [S]-nál a S kötődésének valószínűsége kicsi. Allosztérikus enzimeknél szigmoid alakú görbét kapunk. Az első S molekula kötődése viszont úgy változtatja meg az enzim negyedleges szerkezetét, hogy a következő S molekula kötődési valószínűsége megnövekszik, így a [S]-jának növekedésével a görbe meredeken emelkedik, majd telítést ér el.

## Feed-back (visszacsatolósos) szabályozás

Egy anyagcserefolyamat végterméke gátolhatja a résztvevő első enzim aktivitását, így megakadályozza a végtermék felesleges felhalmozódását. **Anyag- és energiatakarékosságot** biztosít.

## Reguláció kovalens módosítással

Ezzel a szabályozási formával vagy egy már meglévő kötés bontása, vagy új létrehozása történik. **A kémiai kötés létrehozása időigényesebb, de tartósabb, mint az allosztérikus ligand által okozott konformációváltozás.** A foszforilációt kinázok, a defoszforilációt foszfatázok katalizálják. Úgy működik, mint egy kapcsoló. A glikogén-foszforiláz pl. foszforilálva aktív, míg a glikogén-szintáz foszforilálva inaktív. Az eukarióta gének transzkripciójának szabályozásában fontos szerepe van a hisztonok acetilációjának és dezacetilációjának is, melyet a hiszton-acetiltransferázok, illetve a hiszton-dezacetilázok katalizálnak.

**Limitált proteolízis**ről akkor beszélünk, ha a fehérjében csak néhány, jól meghatározott helyen lévő peptidkötés szakad fel. A limitált proteolízissel történő aktiválódás (pl. a zimogéneknél) **a fehérje elsődleges szerkezetének a megváltozásával jár**, így irreverzibilis folyamat.

## Az enzim mennyiségének változtatása

Az enzim szintézisének aktiválásával, vagy gátlásával génexpressziós szinten.

A feleslegessé vált fehérjék ubiquitinnel megjelölésével, majd a proteaszómában való lebontásával.