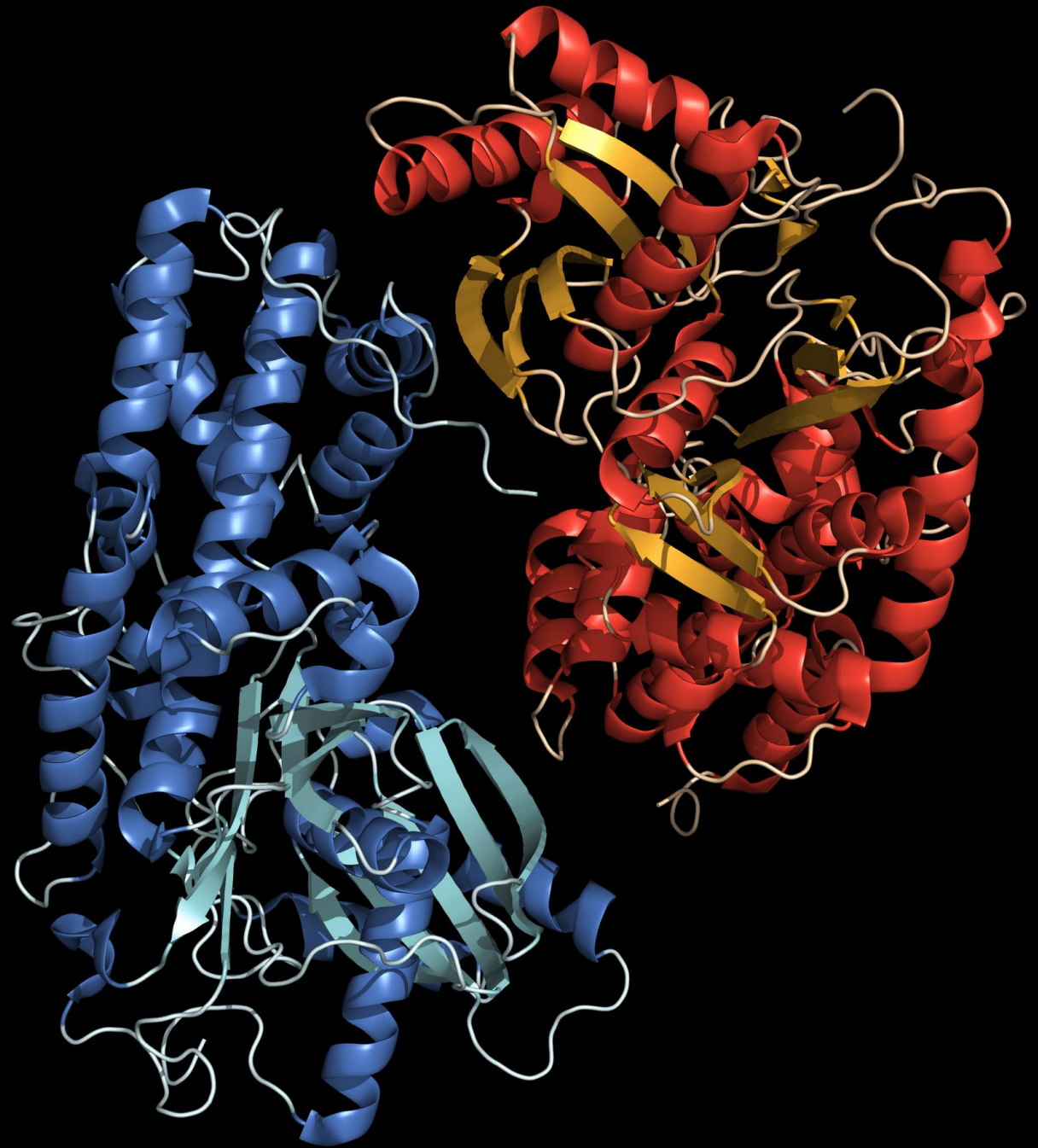
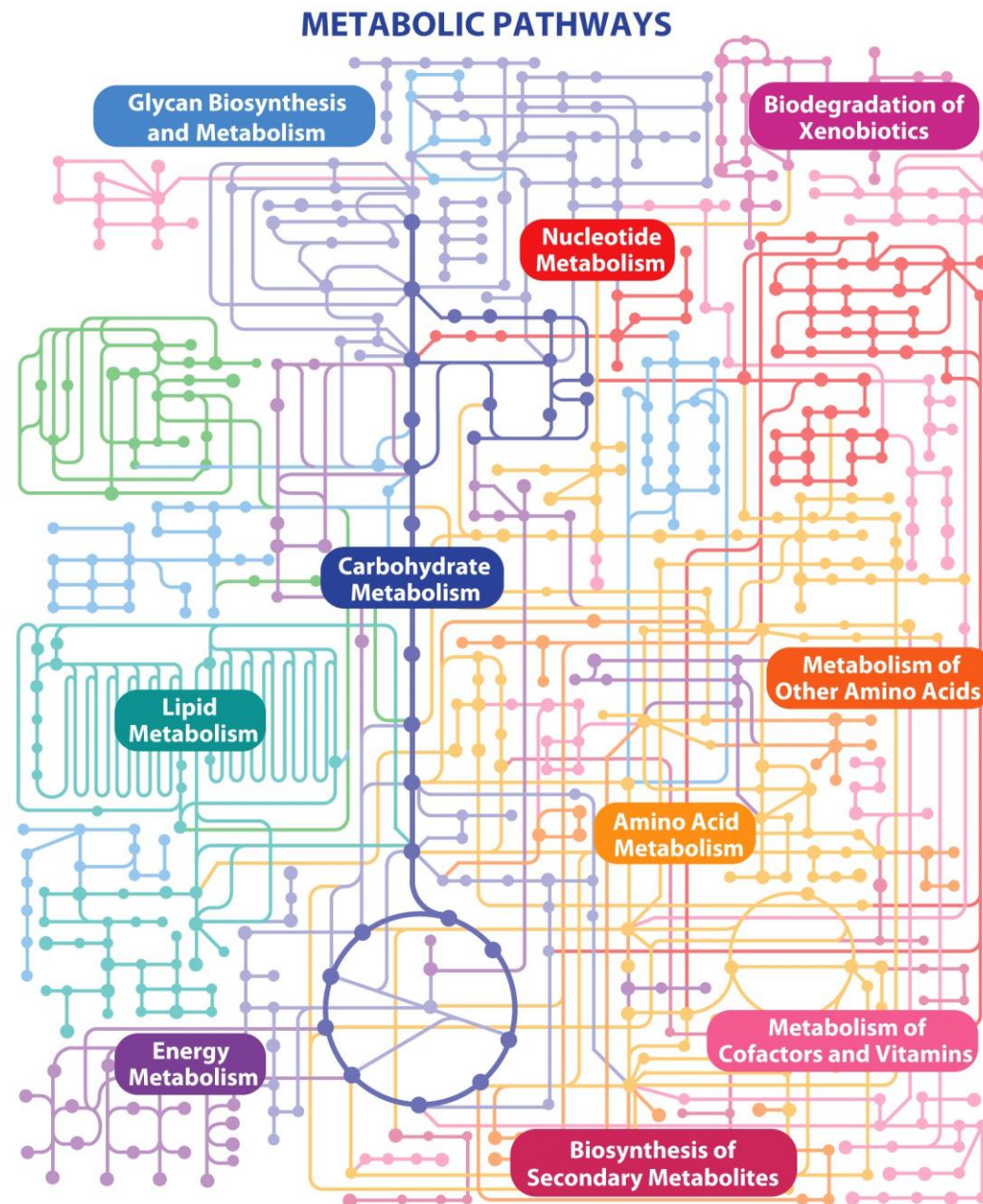


## Enzymer 2

Martin Ott  
martin.ott@gu.se





**Figure 15-1**  
*Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

- Hur snabbt kan ett enzym arbeta?
- Hur kan man hämma ett enzym? Och varför vill man göra det?
- Hur fungerar vissa enzymer molekylärt?

## Enzyme complementary to transition state

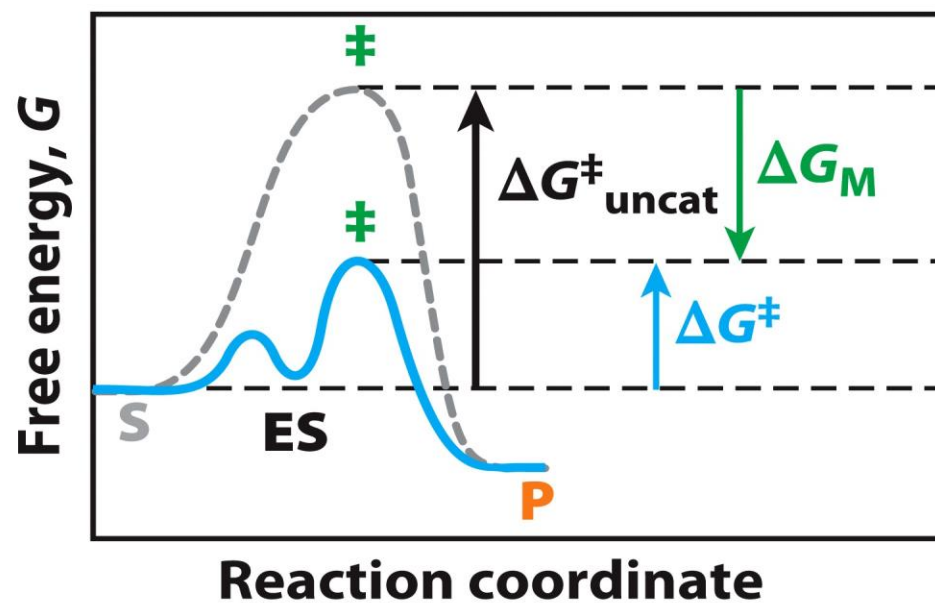
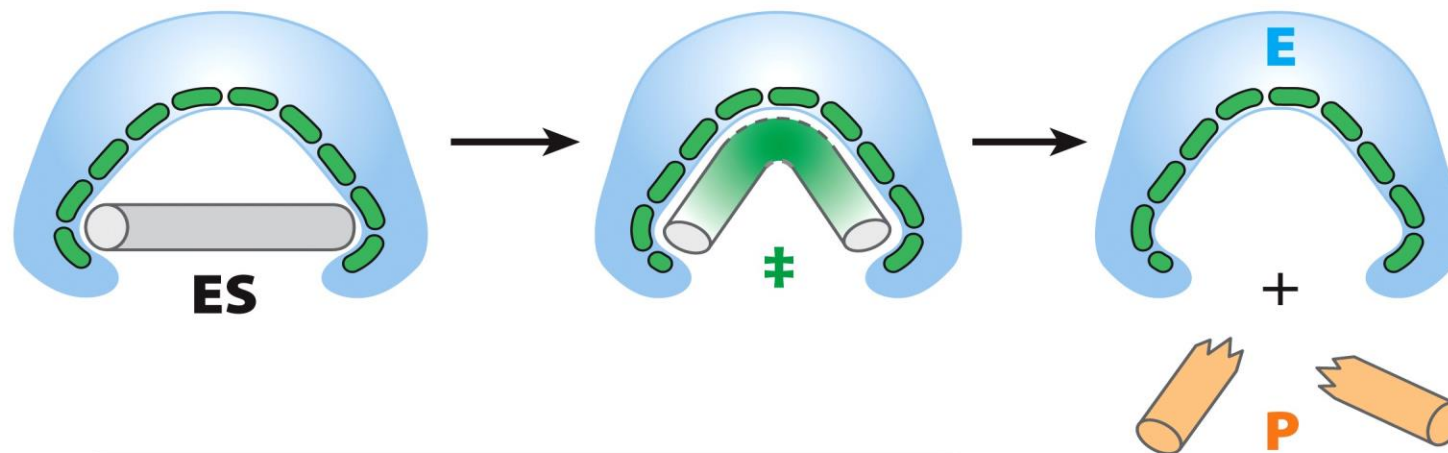
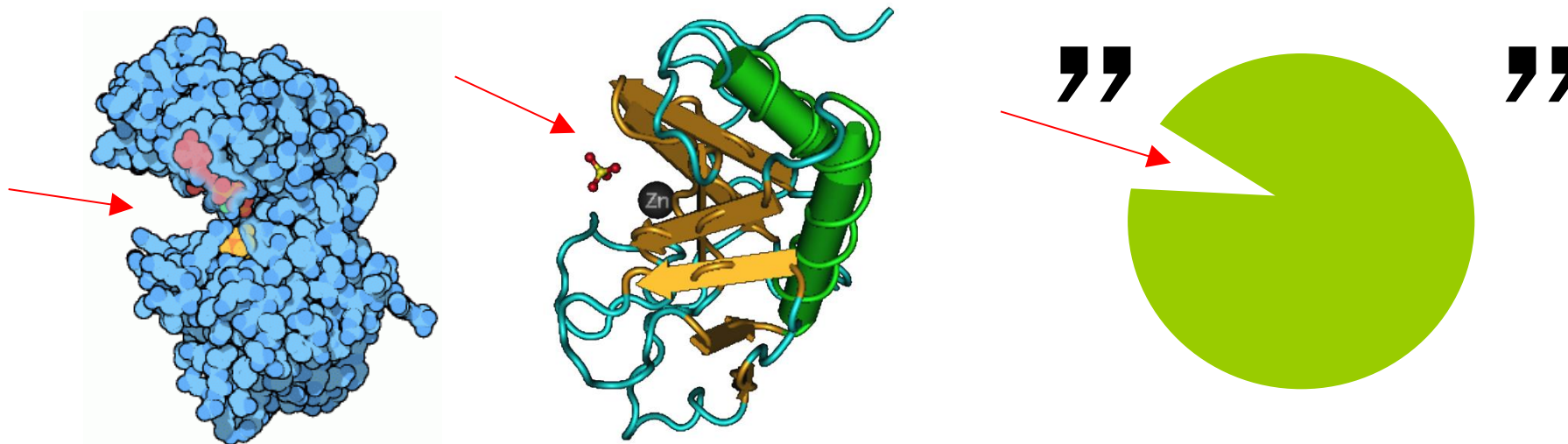


Figure 6-5c

Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition

© 2013 W. H. Freeman and Company

## Den katalytiska delen av ett typiskt enzym är mycket liten

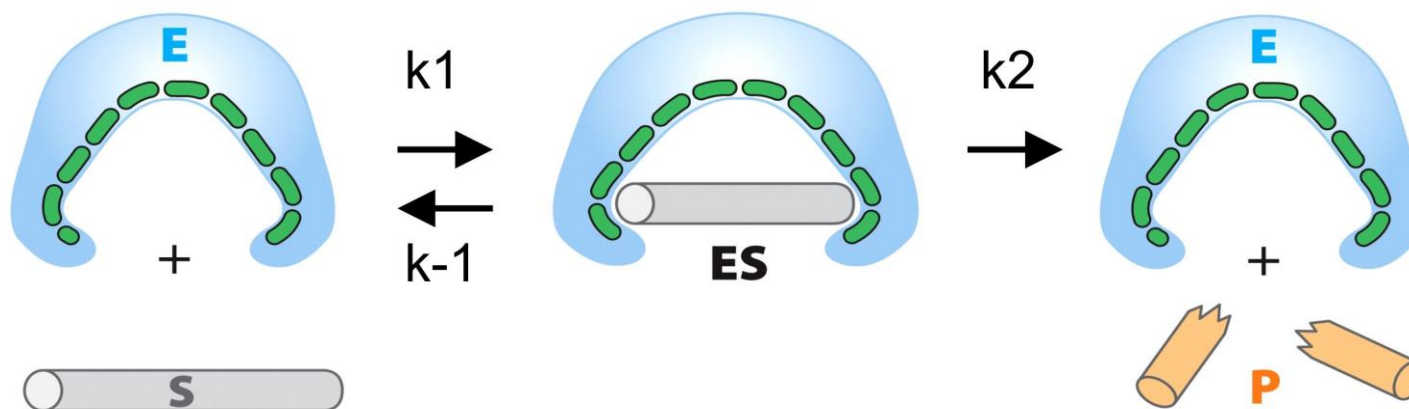


Samtliga protein-enzym som studerats strukturellt har visat sig ha en liten (i förhållande till hela enzymet), väl avgränsad region som är ansvarig för katalysen, det aktiva centret (active site). Den befinner sig alltid i en trång inbuktning eller "klyfta" (catalytic cleft). Detta möjliggör:

- Snävt urval av substrat
- Unik kemisk miljö
- Uteslutning av "onödigt" vatten

# Hur effektivt jobbar ett enzym?

(hastighet som funktion av substratkonc.)



E = enzym

S = substrat

P = produkt

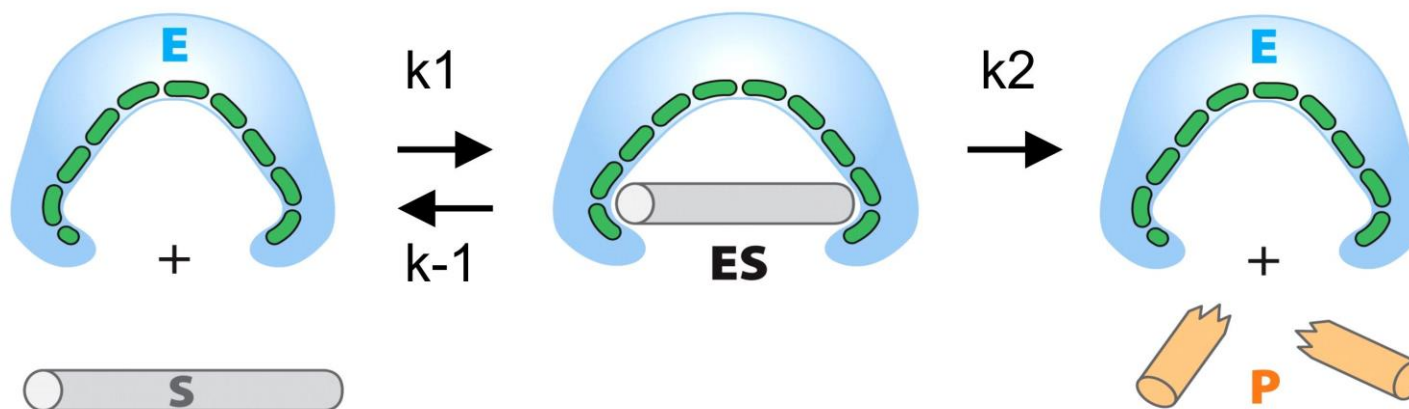
$k_1$  = associationskonstant ES komplex

$k_{-1}$  = dissociationskonstant ES komplex

$k_2$  = associationkonstant produkt frisättning

# Hur effektivt jobbar ett enzym?

(hastighet som funktion av substratkonc.)

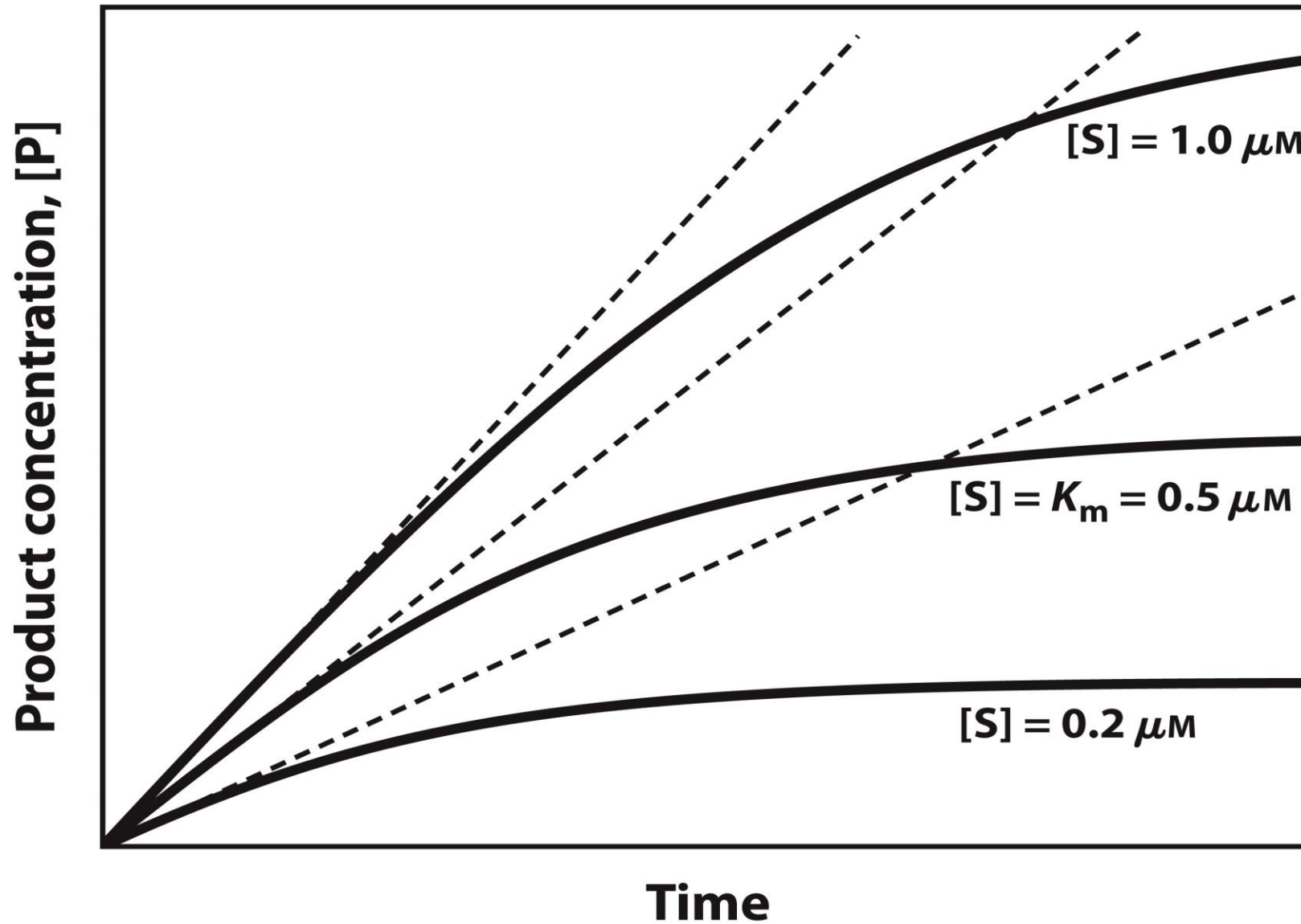


Michaelis-Mentens antaganden:

- Betrakta reaktionen i inledningsfasen,  $k_{-2}$  kan försummas
- Antag att  $[ES]$  är konstant (steady-state förhållande)

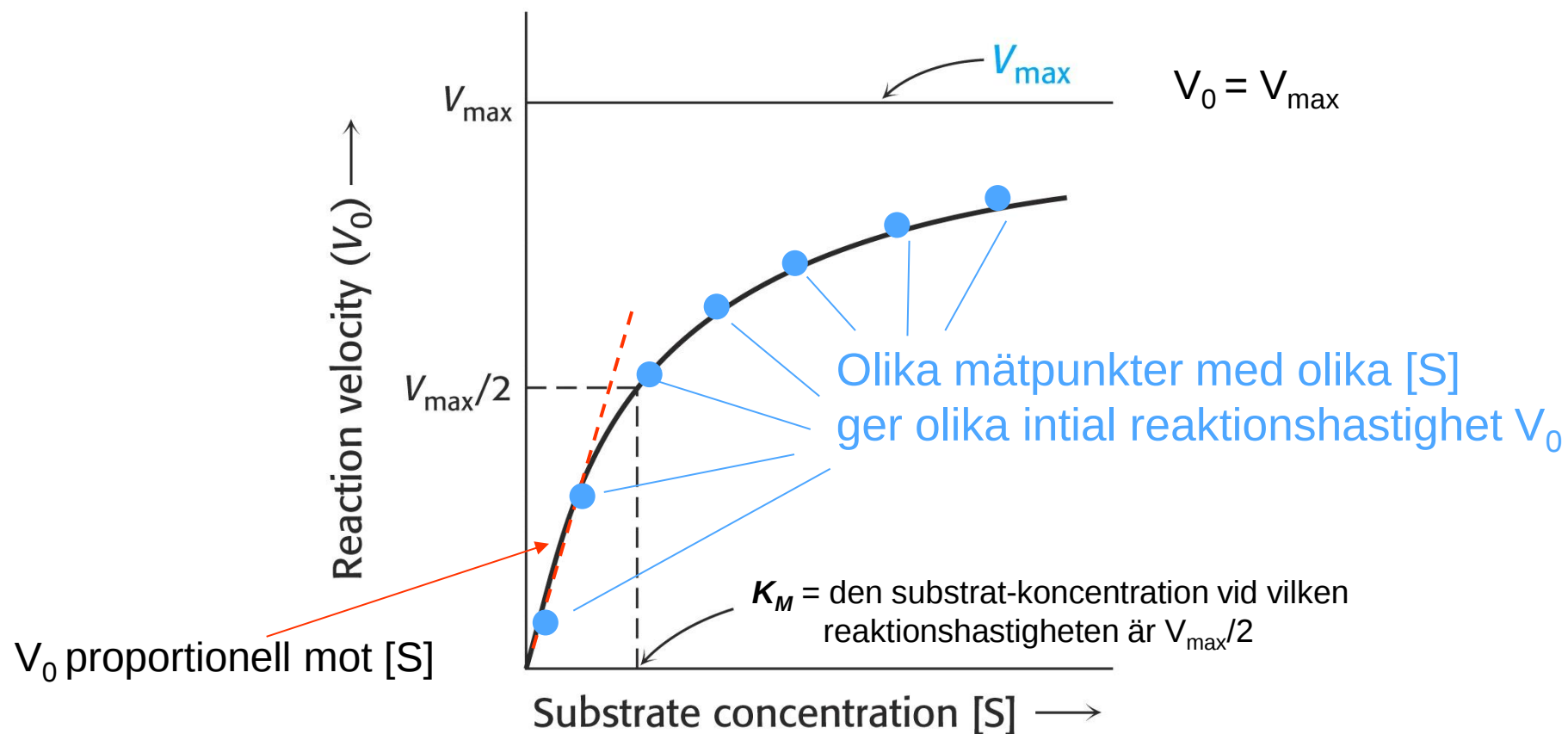
# Hur bestämmer man hur effektivt ett enzym kan katalysera en reaktion?

8

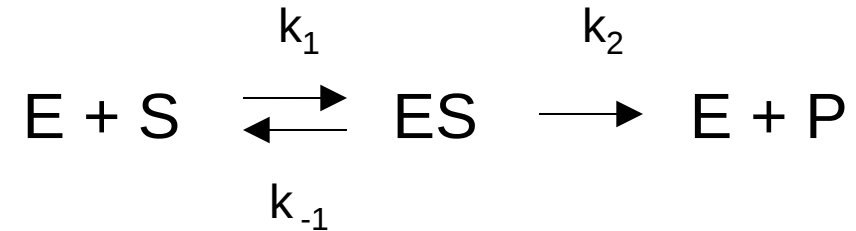


**Figure 6-10**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition*  
© 2013 W. H. Freeman and Company

# Hur bestämmer man hur effektivt ett enzym kan katalysera en reaktion?



## Michaelis-Mentens konstant, $K_M$



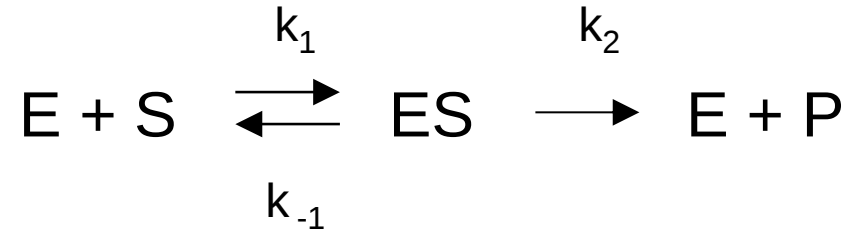
Michaelis-Mentens konstant definieras (under de givna antagandena) som den  $k_{-1}$  när  $[S] = K_M$  så är  $[E] = [ES]$ , dvs hälften av alla enzymer är bundna i ES-komplex

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$K = \frac{\prod [P_j]^{y_j}}{\prod [R_i]^{x_i}} \quad \left( \prod = \text{produkt av multiplikation} \right)$$

$K_M$  kan utläsas som ett mått på stabiliteten hos ES; lågt  $K_M$  betyder stabilt ES

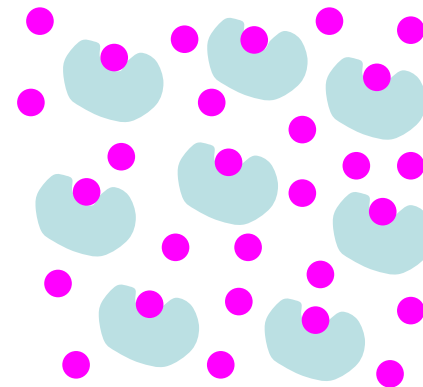
## Maximala reaktionshastigheten, $V_{\max}$



Eftersom hastighetskonstanten för bildningen av produkten är  $k_2$  vet vi att reaktionshastigheten

$$V = k_2 * [ES]$$

När substratkoncentrationen är så hög att alla enzymmolekyler är bundna i ES-komplex är reaktionshastigheten maximal,  $V_{\max}$ .



Detta kan skrivas som att  $[E]_{\text{tot}}$ , dvs den sammanlagda koncentrationen av fritt och bundet enzym, i detta fall är detsamma som  $[ES]$ . Därför är

$$V_{\max} = k_2 * [E]_{\text{tot}}$$

## $k_2$ = turnover number

Eftersom

$$V_{\max} = k_2 * [E]_{\text{tot}}$$

Så är

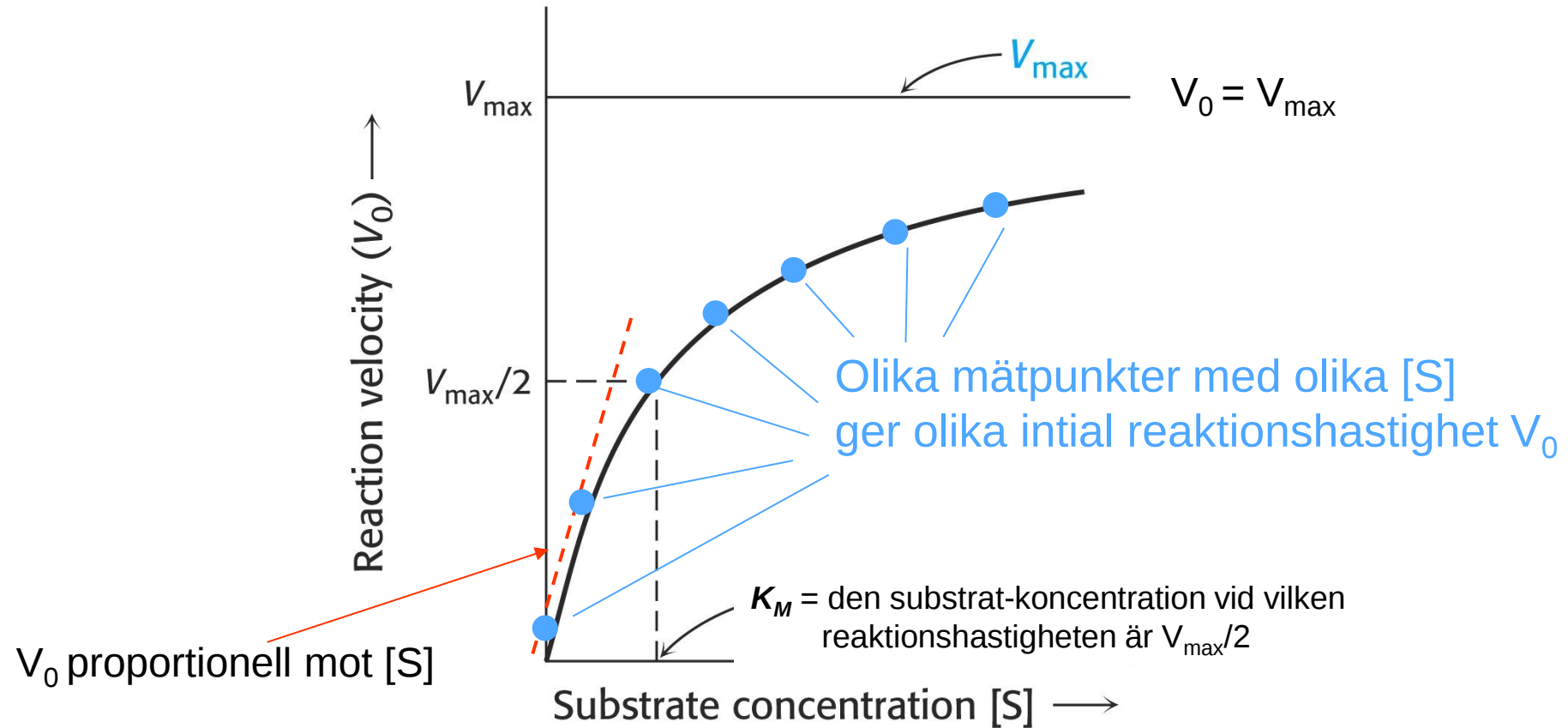
$$k_2 = V_{\max} / [E]_{\text{tot}}$$

och anger antalet molekyler produkt som en molekyl enzym kan bilda per sekund. Detta kallas även *turnover number (omsättningstal)*.

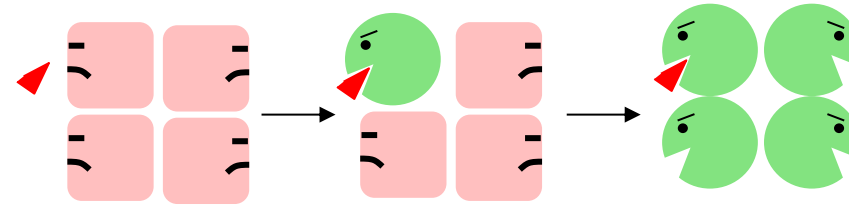
**TABLE 8.6** Maximum turnover numbers of some enzymes

| Enzyme                  | Turnover number (per second) |
|-------------------------|------------------------------|
| Carbonic anhydrase      | 600,000                      |
| 3-Ketosteroid isomerase | 280,000                      |
| Acetylcholinesterase    | 25,000                       |
| Penicillinase           | 2,000                        |
| Lactate dehydrogenase   | 1,000                        |
| Chymotrypsin            | 100                          |
| DNA polymerase I        | 15                           |
| Tryptophan synthetase   | 2                            |
| Lysozyme                | 0.5                          |

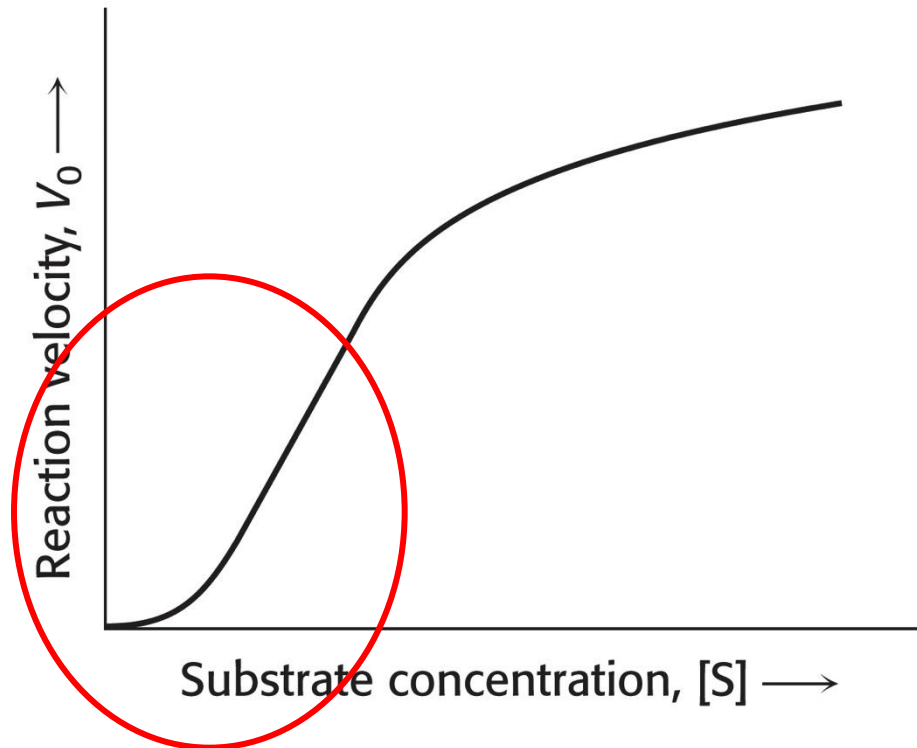
## Hur mäter man $K_M$ och $V_{\max}$ ?



## 'Allostera enzymer' følger inte Michaelis-Menten-kinetik



Kooperativitet



# Inhibitorer av enzymer

Irreversibla inhibitorer – binder mycket hårt till enzymet

Reversibla inhibitorer – binder och släpper



En inhibitor brukar  
karaktiseras av dess

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

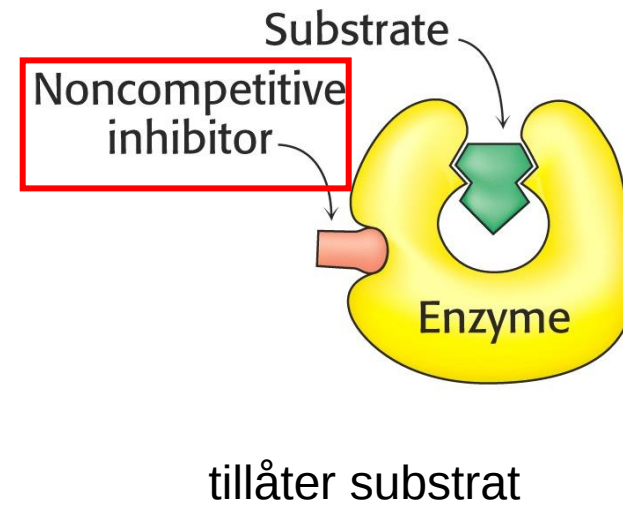
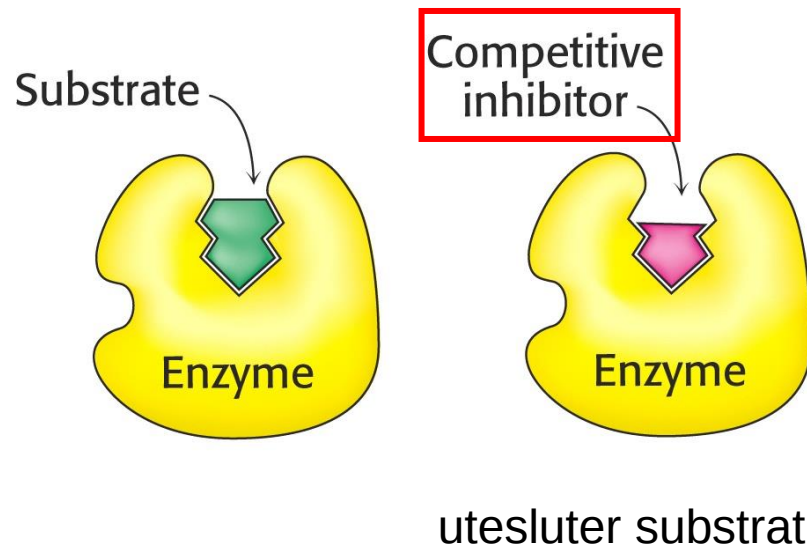
Dvs jmv-konstant för  
 $EI \rightleftharpoons E + I$

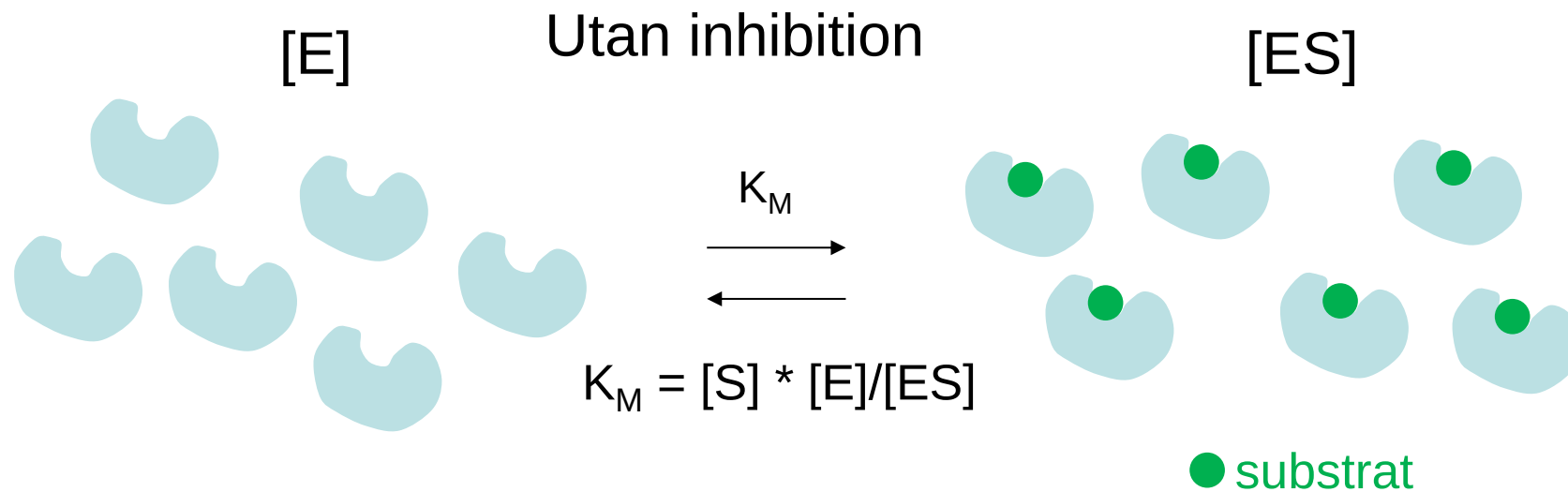
Lågt  $K_i \rightarrow$  Effektiv inhibition

Vid 50% inhibition är  $[I] = K_i$

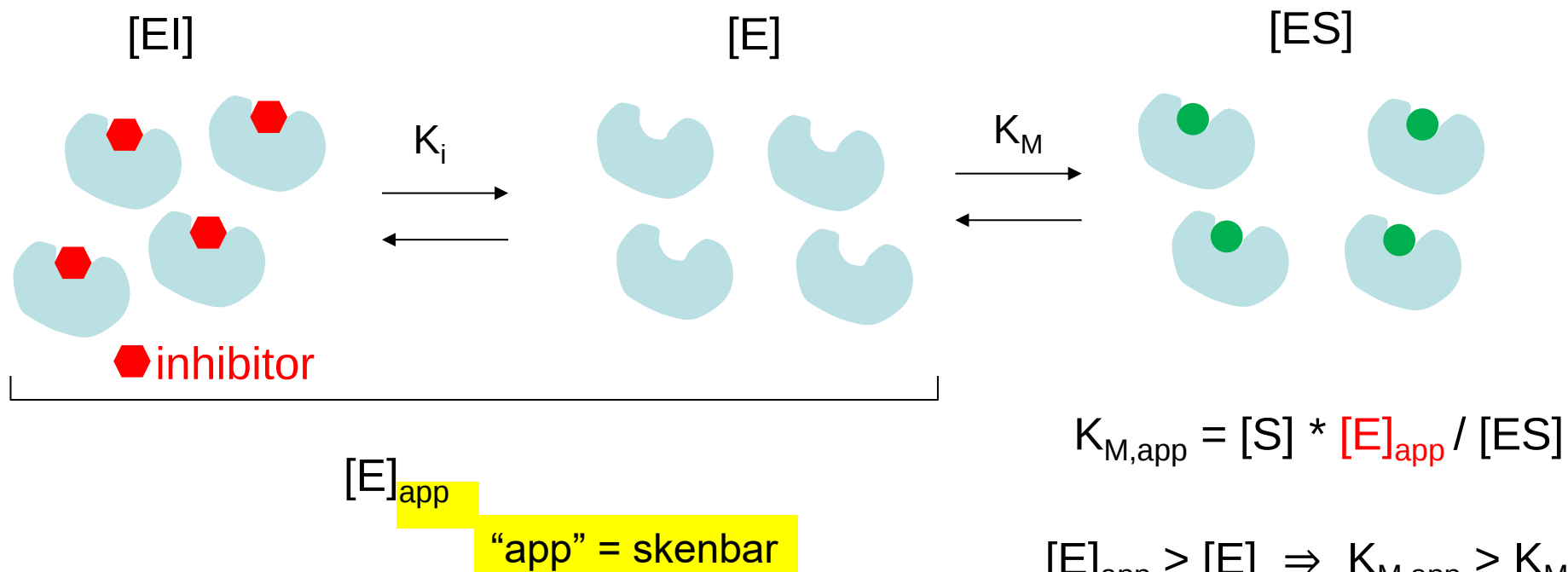
Märk: E i denna formel gäller  
bara form(er) av enzymet som  
kan bindas av inhibitorn

## Typer av inhibitorer





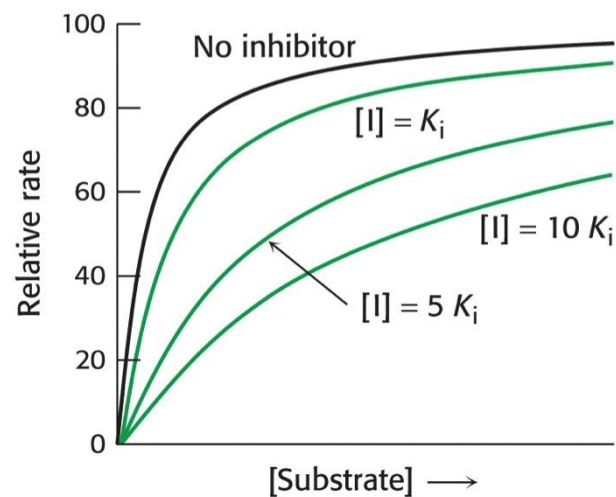
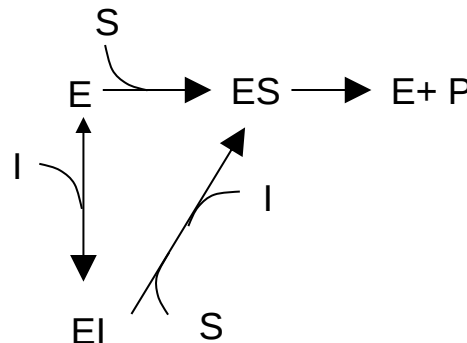
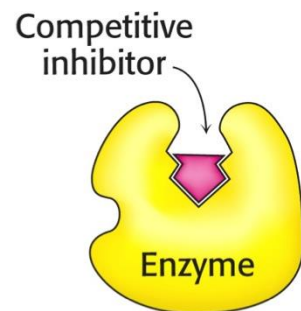
Kompetitiv inhibition: I binder E men ej ES



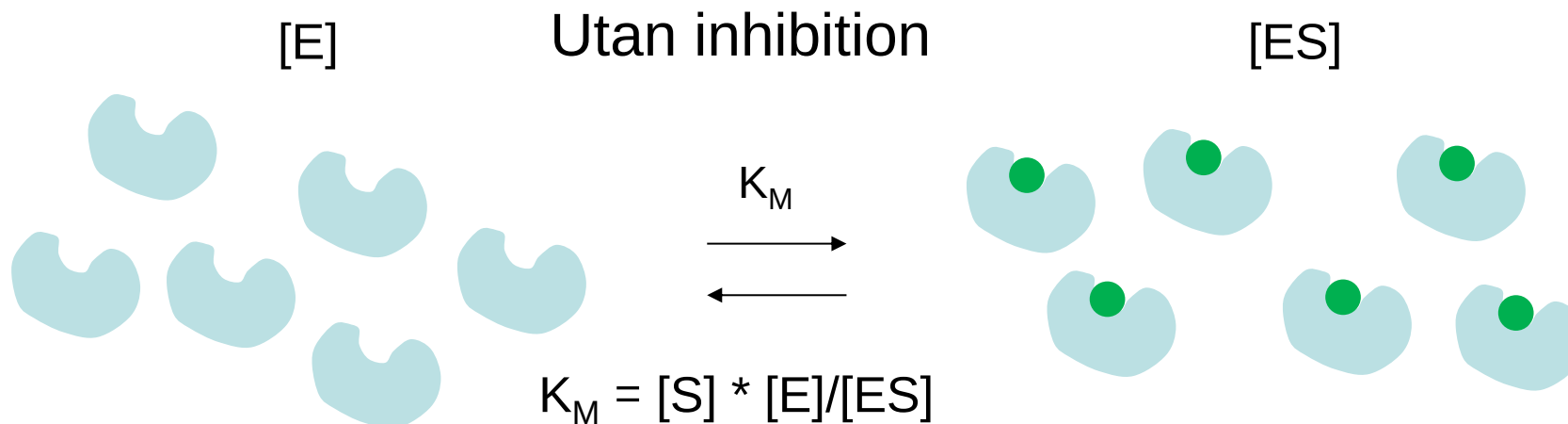
I våra exempel har vi godtyckligt valt  $[S] = K_M$  och  $[I] = K_i$

# Inhiberings-mekanismen kan identifieras genom analys av kinetik

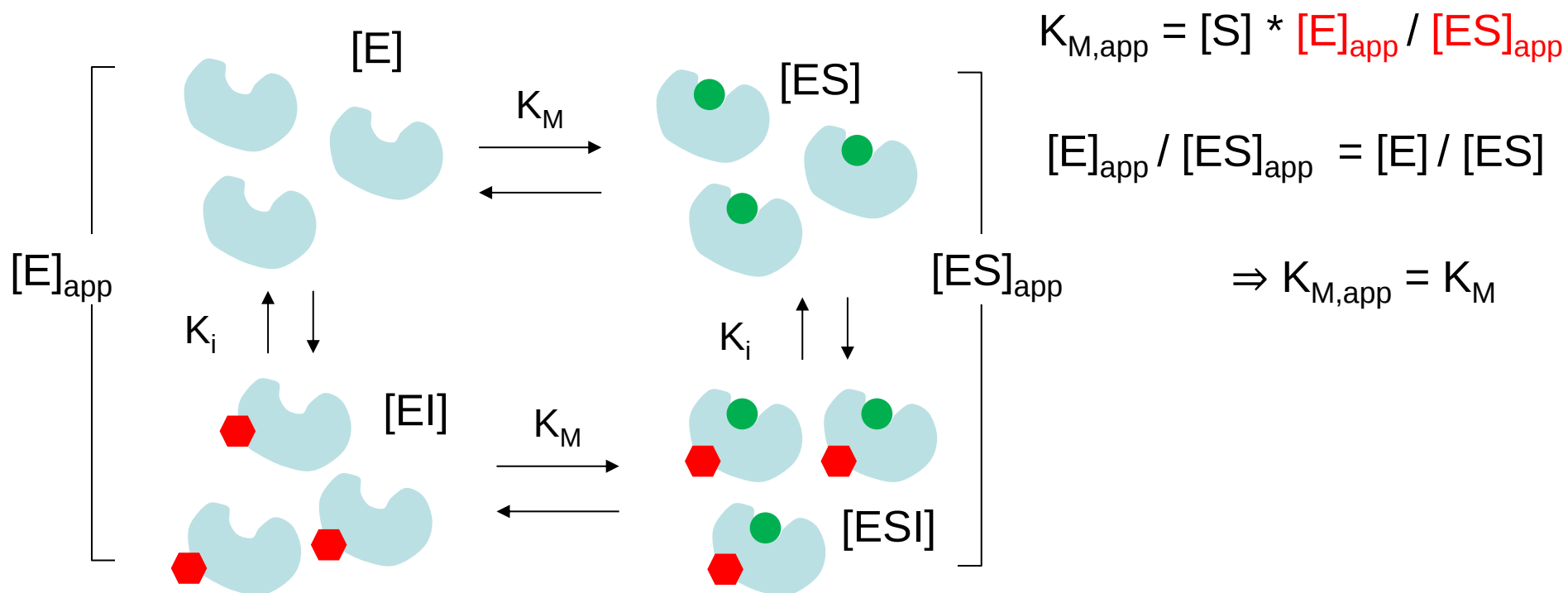
## Kompetitiv inhibitor



kompetitiv inhibering  
 $K_{M, app}$  ökar,  $V_{max}$  ändras ej

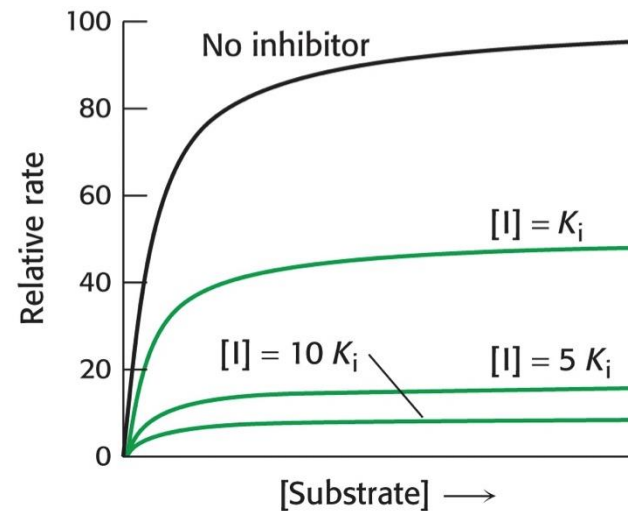
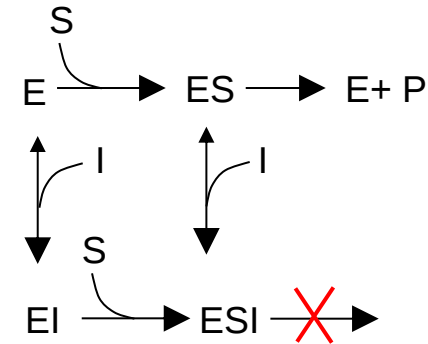
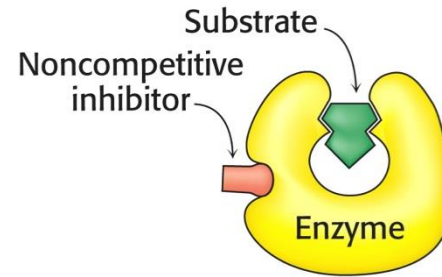


Nonkompetitiv inhibition: I binder både E & ES



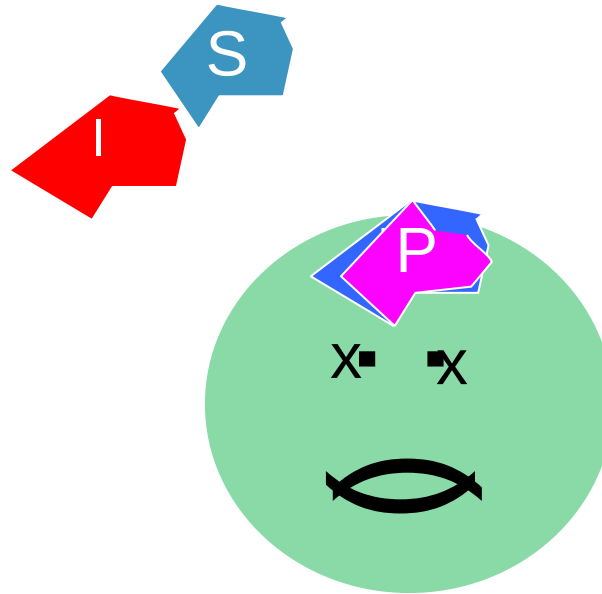
I våra exempel har vi godtyckligt valt  $[S] = K_M$  och  $[I] = K_i$

# Nonkompetitiv inhibitor



non-kompetitiv inhibering  
 $V_{\max, \text{app}}$  sjunker men  $K_M$  oförändrat  
 (inhibitorn effektiv även vid höga [S])

# Kompetitiva inhibitorer och transition-state-analoger



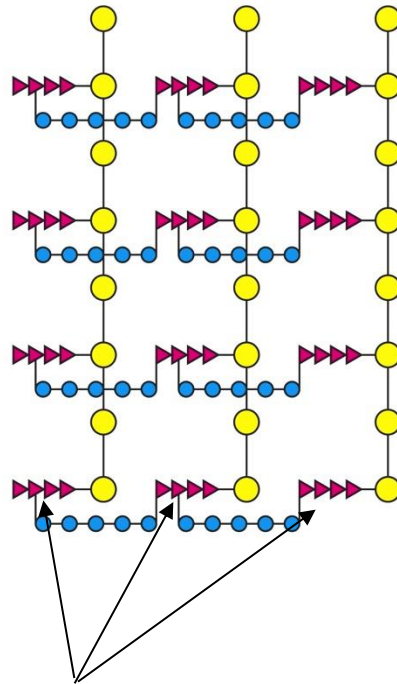
Aktiva sitet binder övergångstillståndet bättre än substratet

En förening som ser ut som övergångstillståndet men inte kan reagera (*transition-state-analog*) kan blockera enzymet

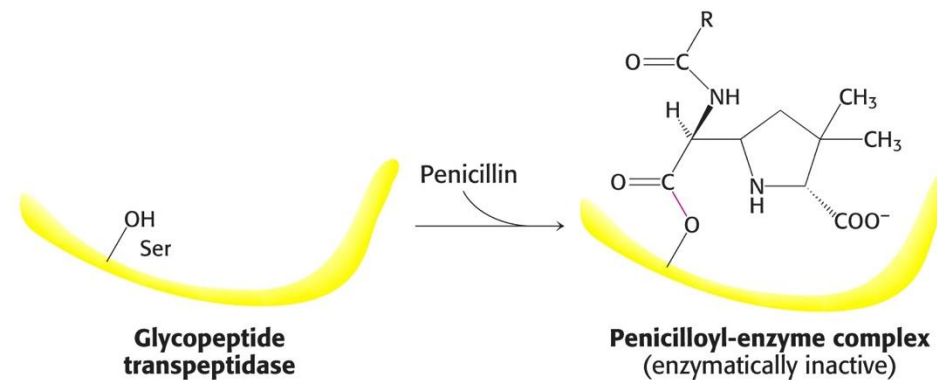
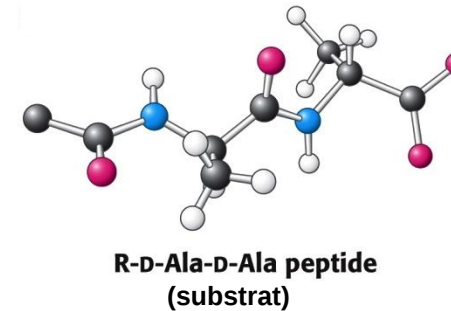
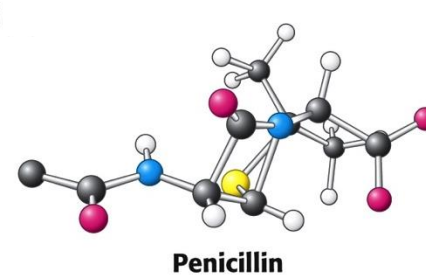
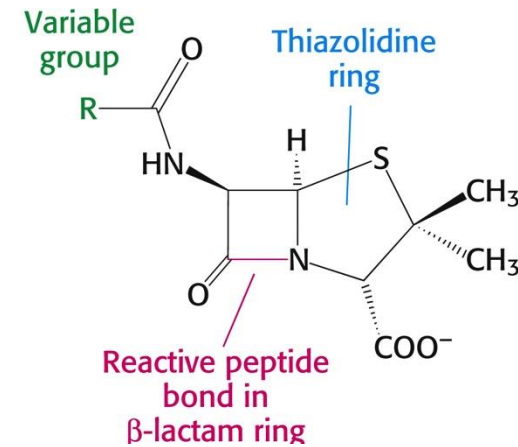
# Medicinsk inhibitor: penicillin

Penicillin åstadkommer irreversibel inhibition av enzymet glykopeptid-transpeptidas, som bygger upp baktteriens cellvägg.

*peptidoglykan*  
(bakteriell cellvägg)

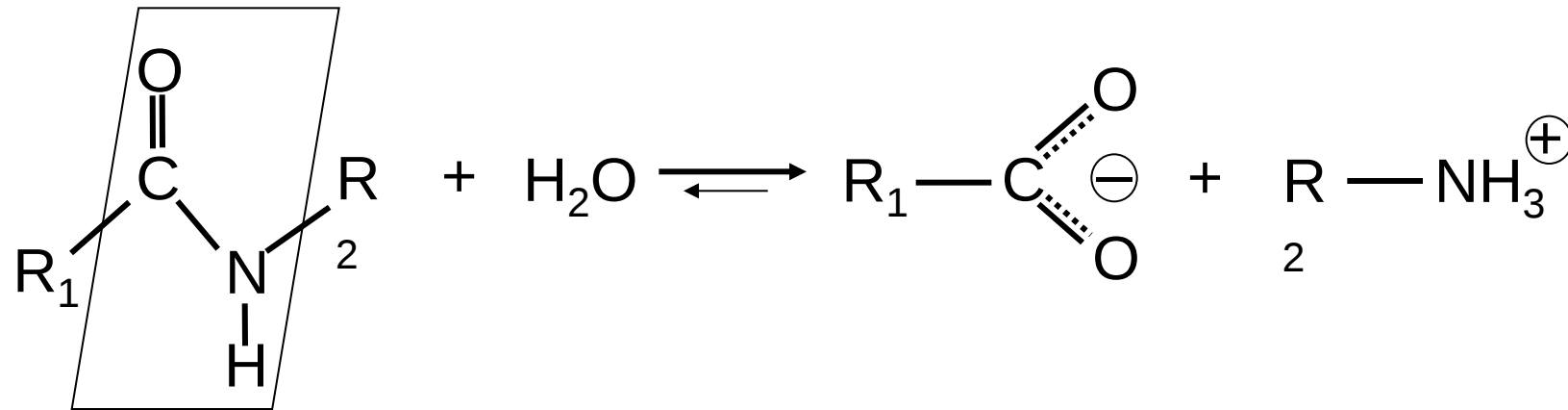


tetra-peptid som syntetiseras  
m h a *glykopeptid-transpeptidas*



## **Exempel på enzymkatalyserade reaktioner**

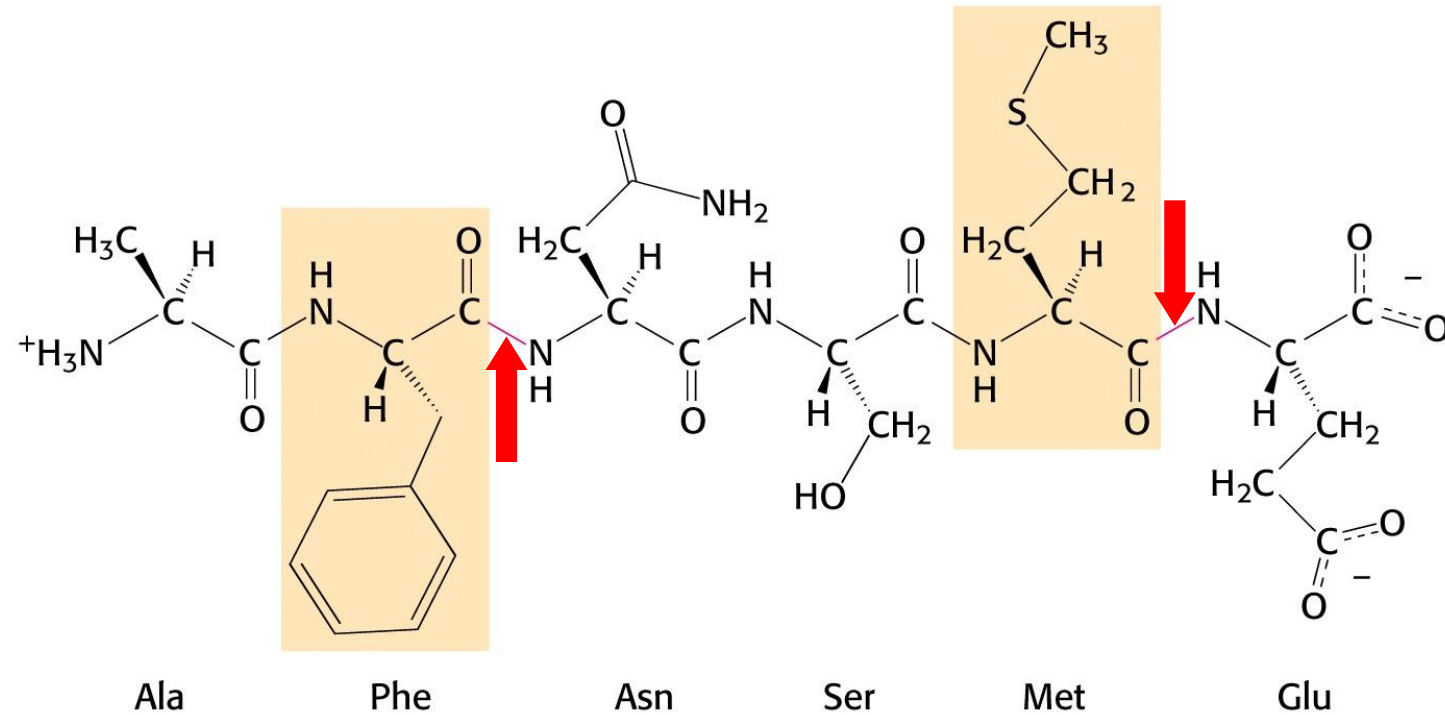
## Proteolys = hydrolys av peptid-bindning



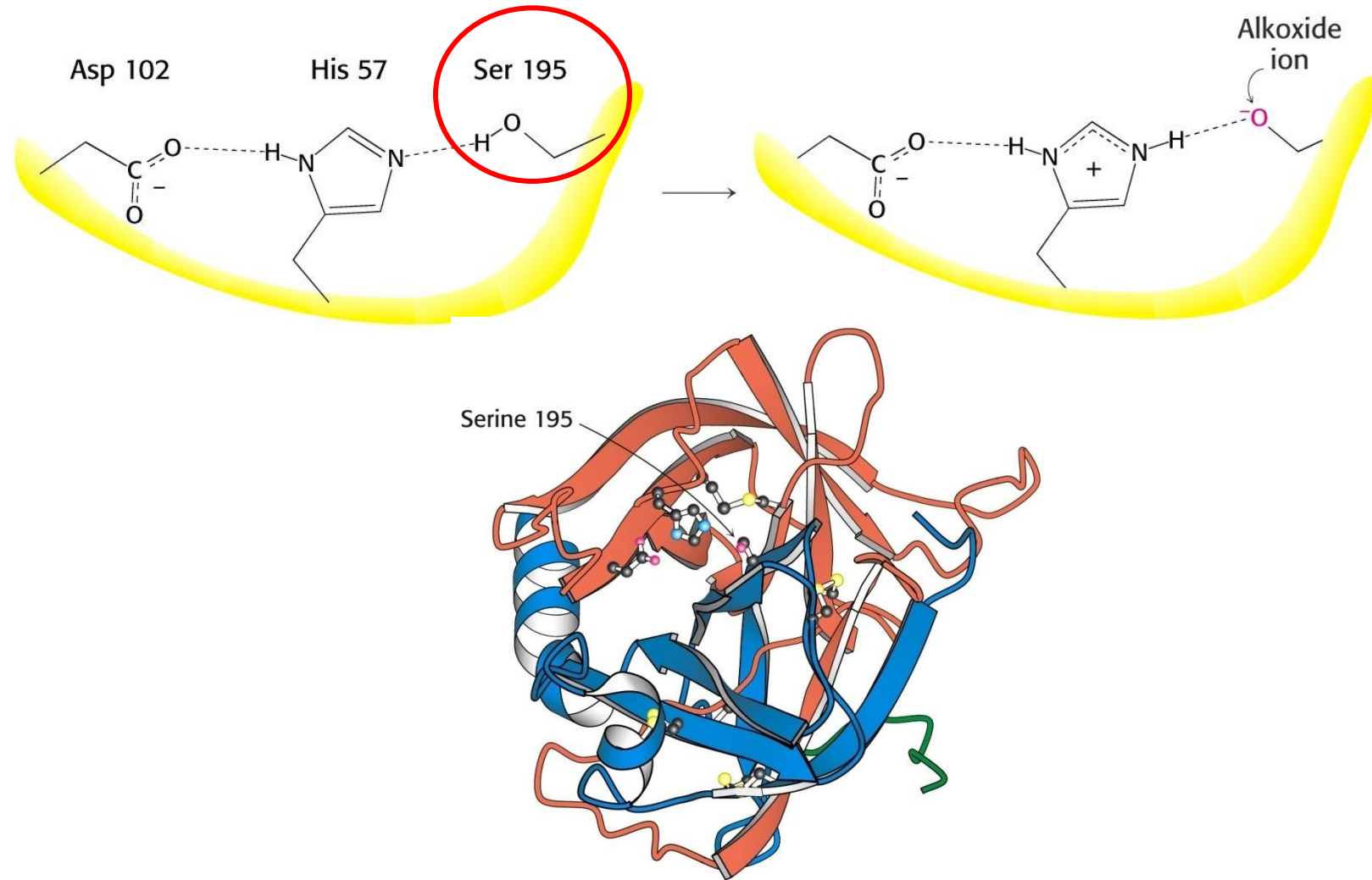
- långsam reaktion i vatten – halveringstid ca 10-1000 år
- nedbrytning av proteiner i cellen/kroppen kräver proteolys på ms-tidsskala
- enzymer som katalyserar proteolys = *proteaser*

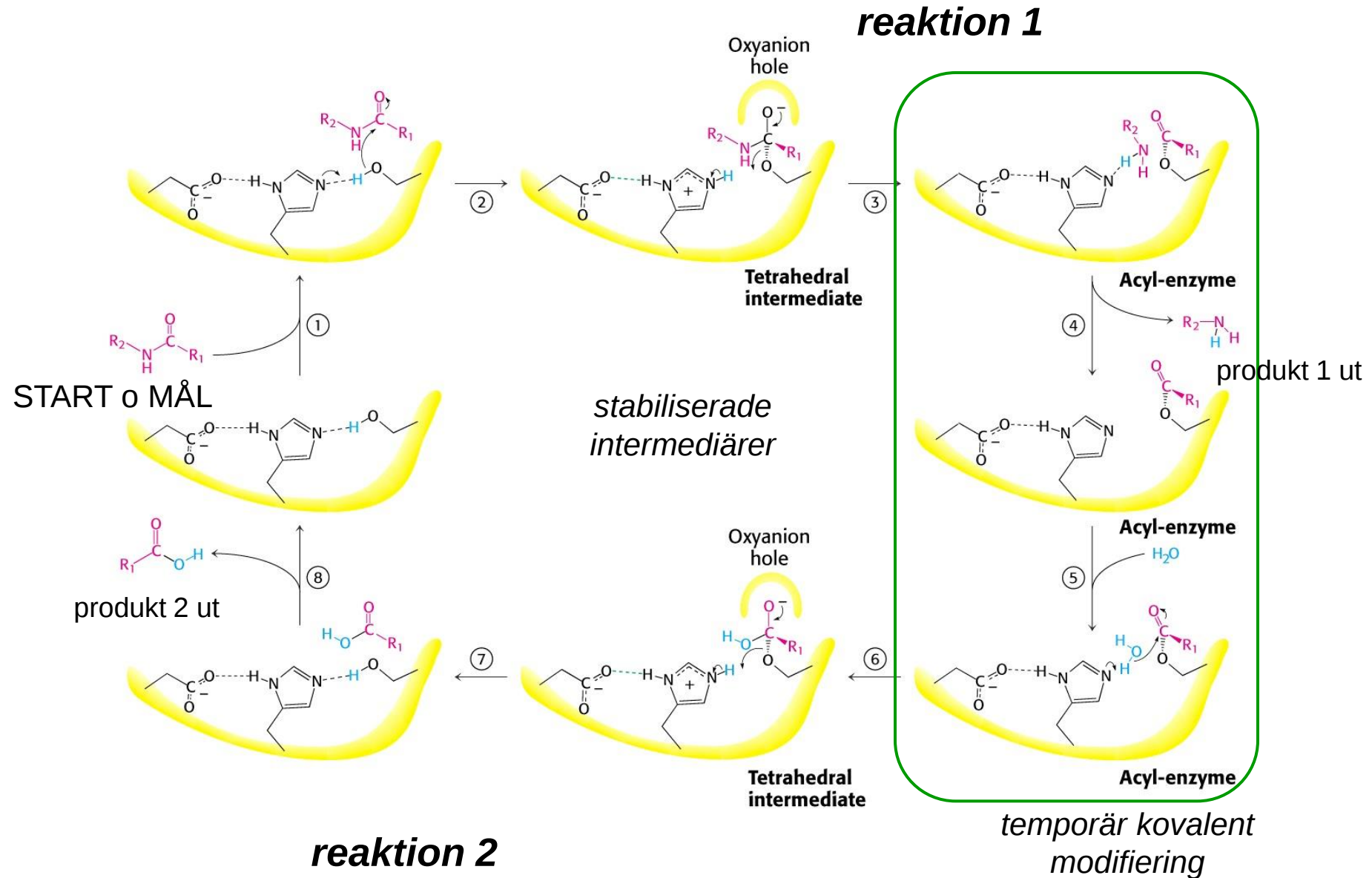
# Chymotrypsin, ett serin-proteas

substrat: peptid-bindning efter Phe eller Met

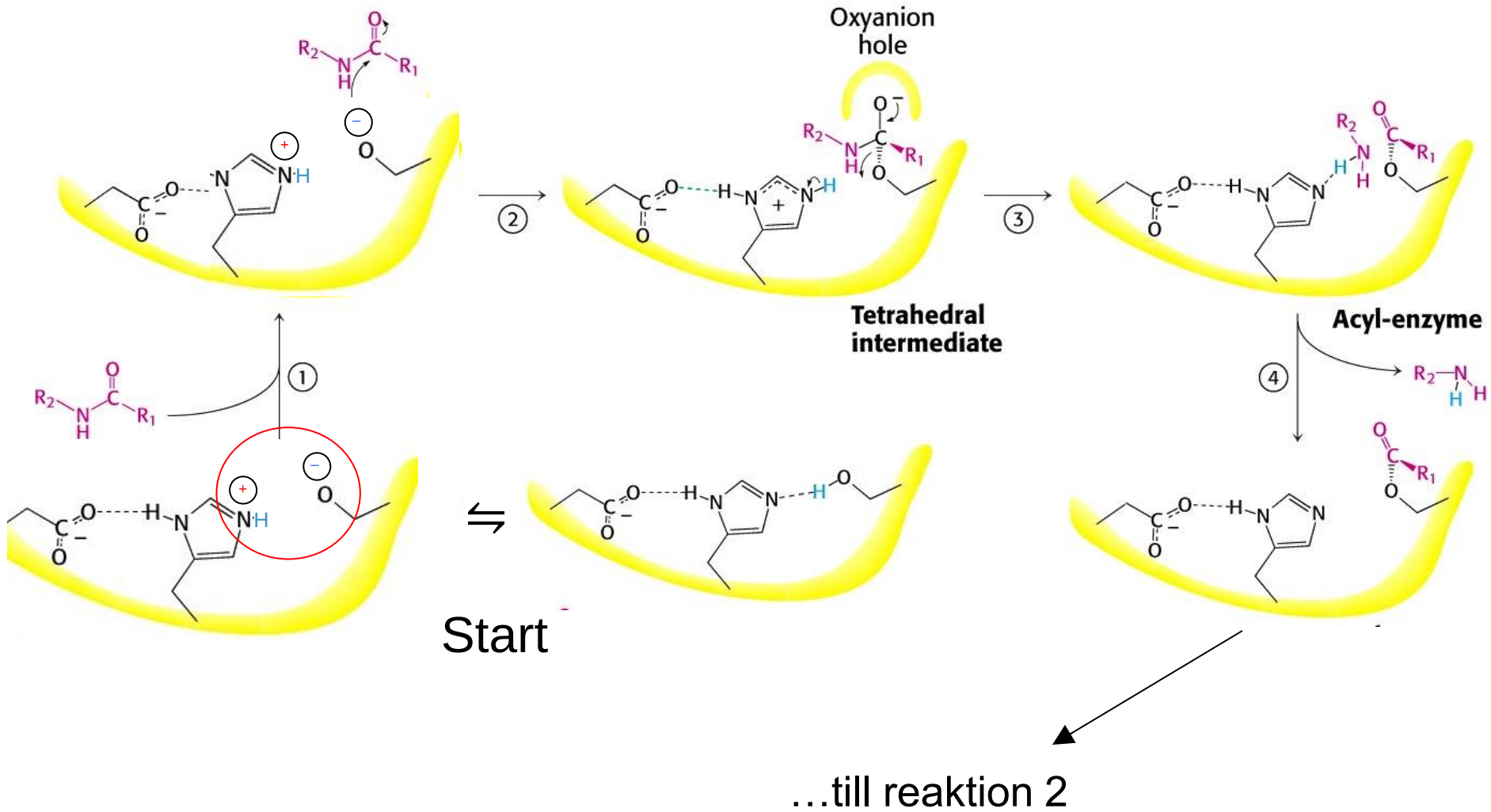


# Den katalytiska triaden i ett serin-proteas



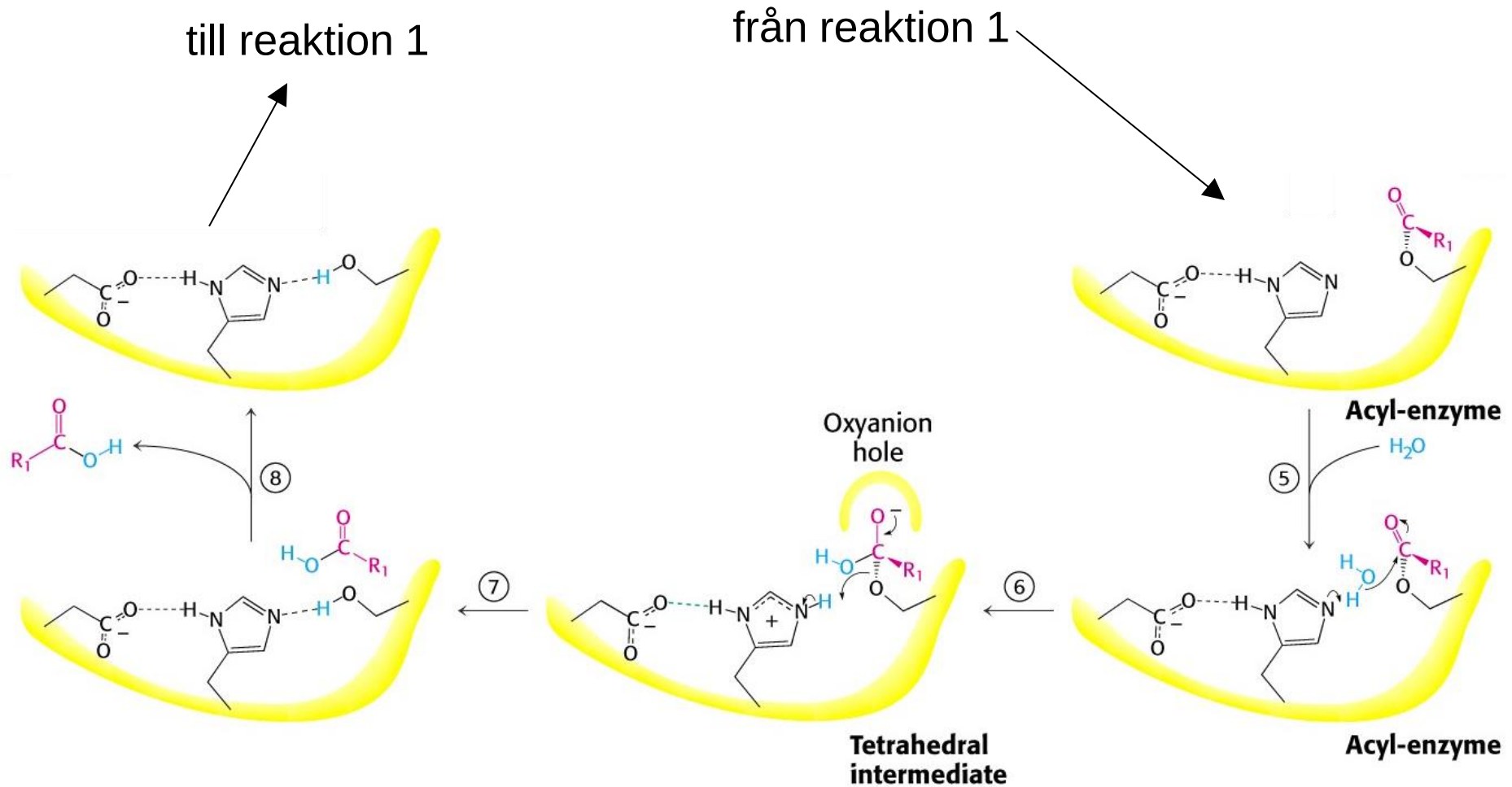


# Reaktion 1: klyvning av peptidbindningen

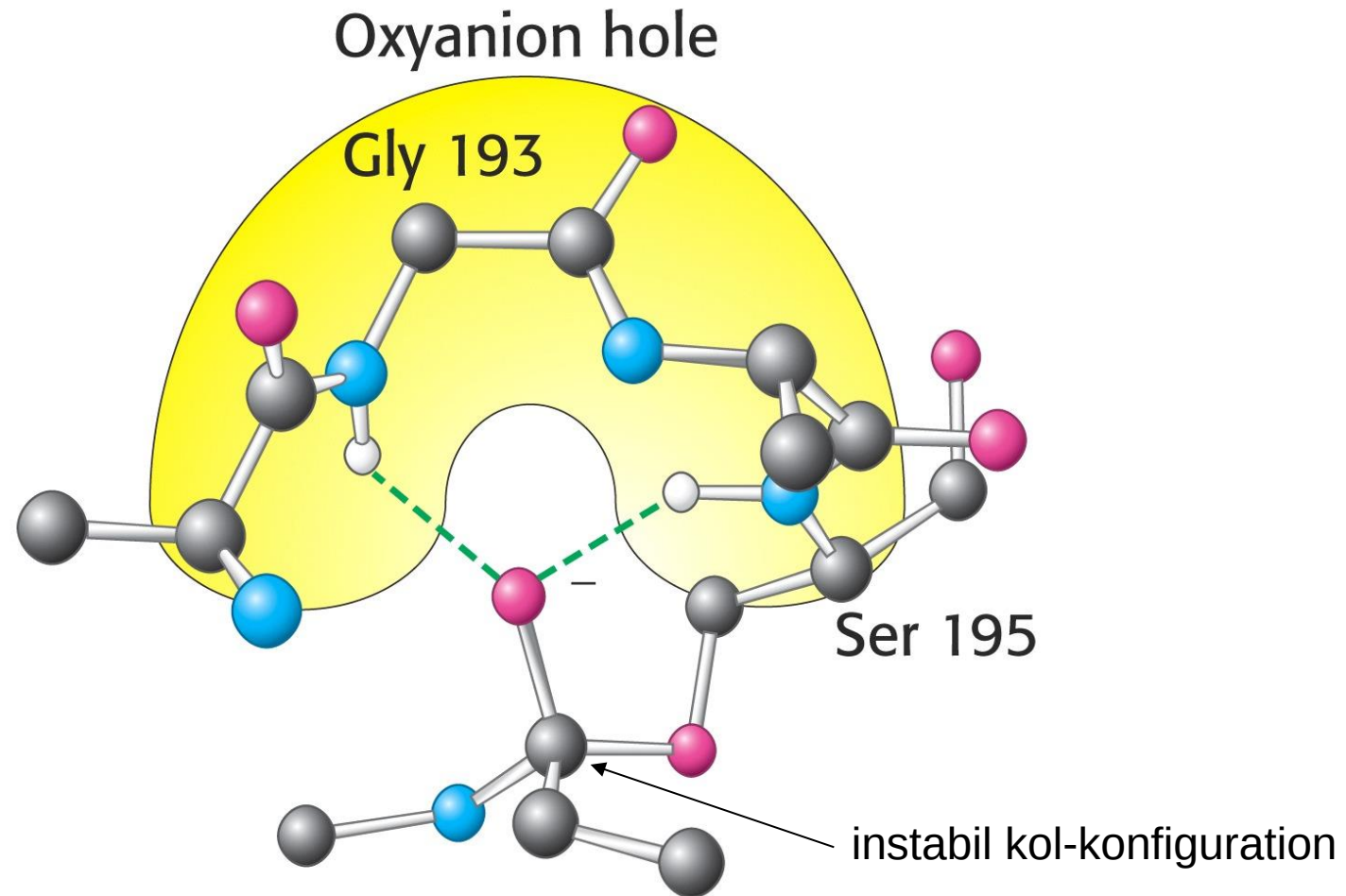


## Reaktion 2: hydrolys av acyl-enzym

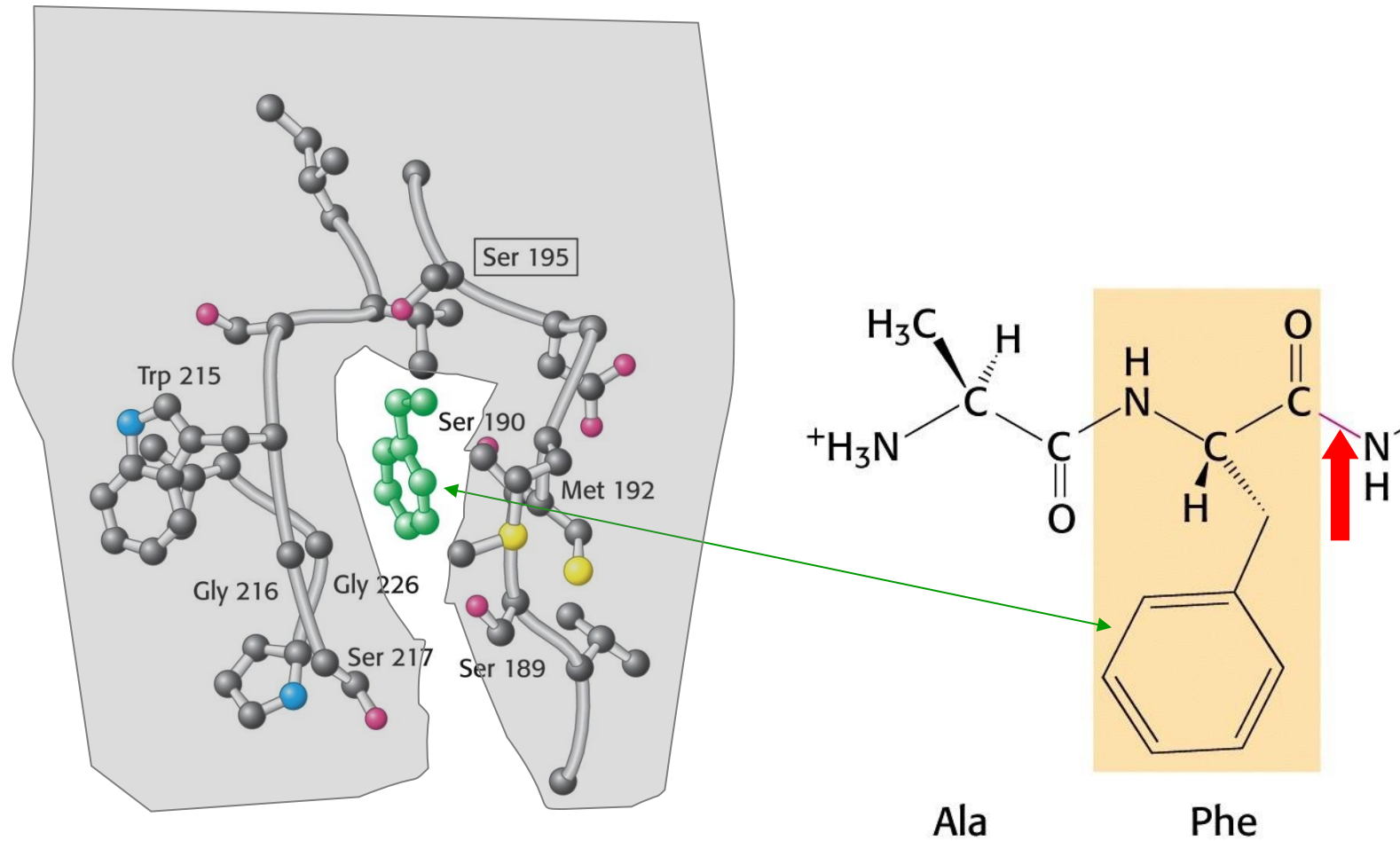
29



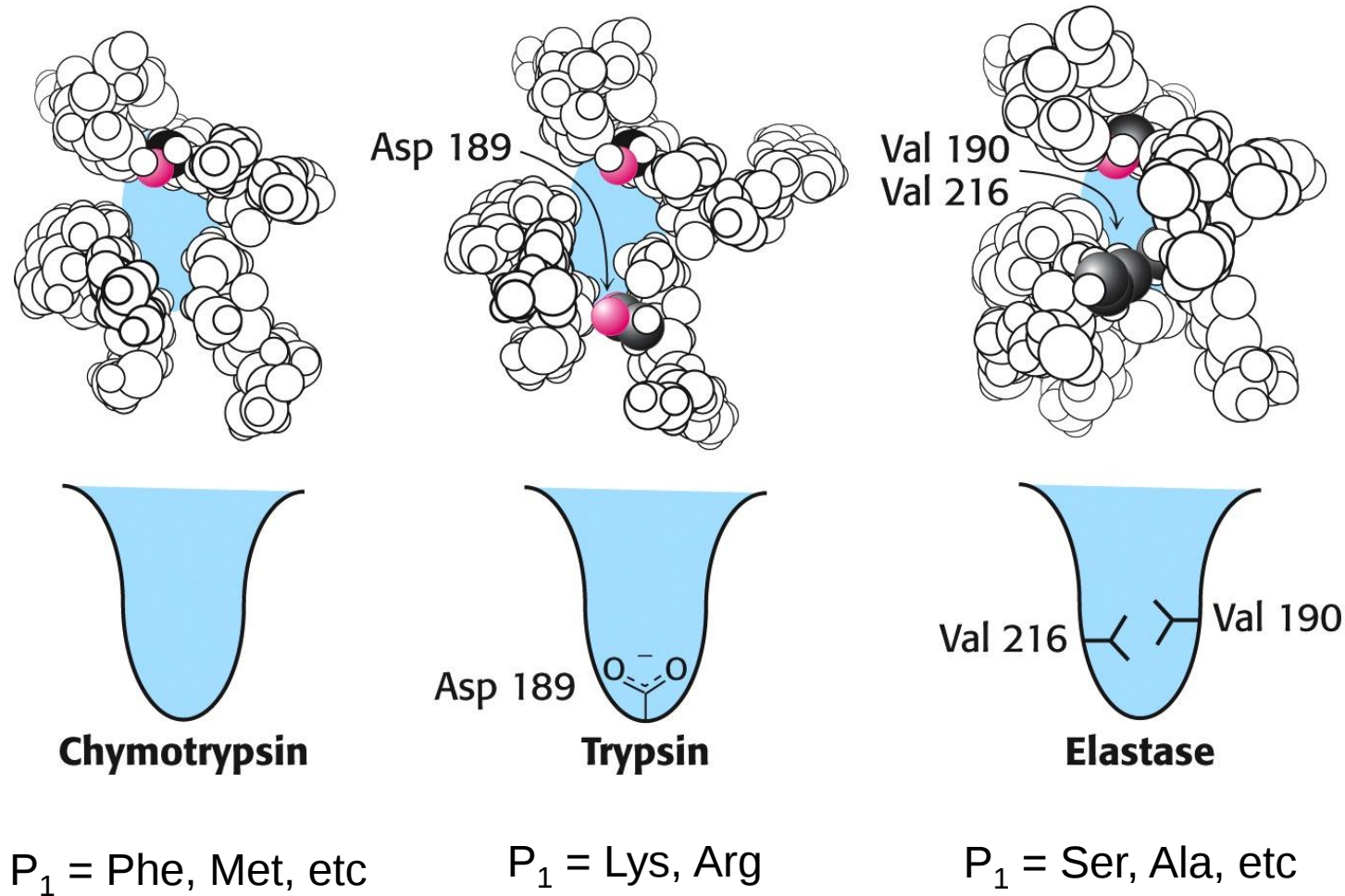
## Stabilisering av intermediärer



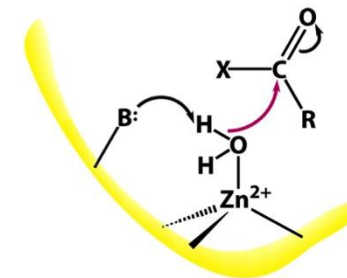
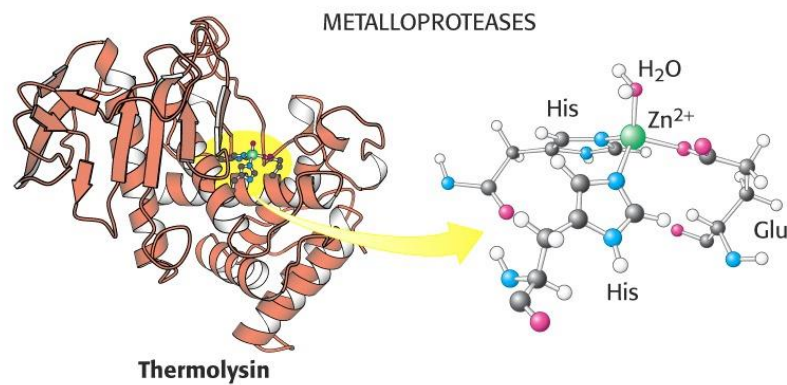
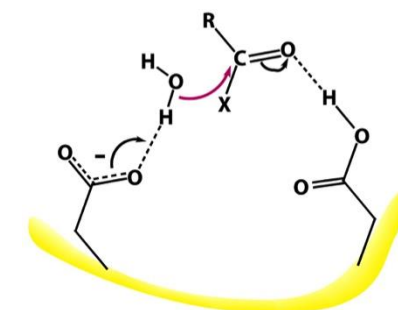
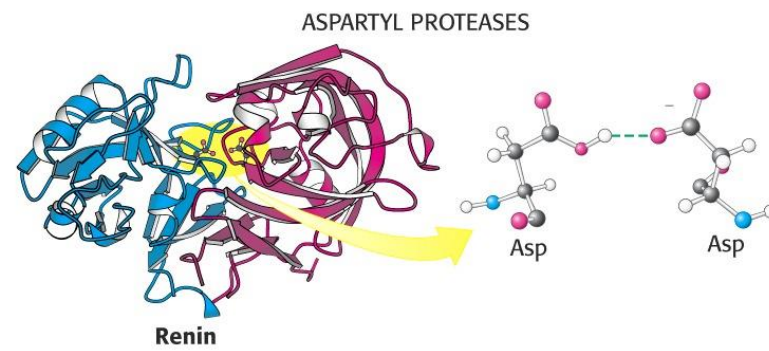
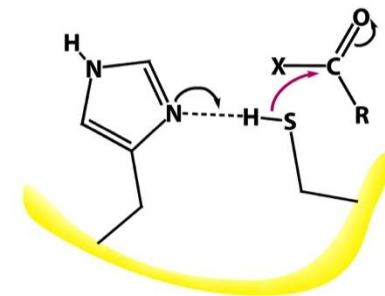
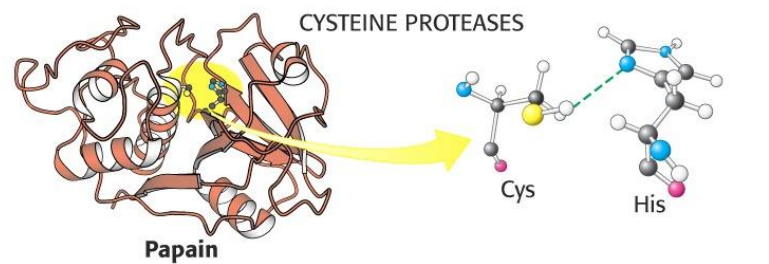
## Hydrofob ficka ger substrat-specifitet



# Specificitet: S<sub>1</sub>-fickor i relaterade enzymer



# Andra proteaser...

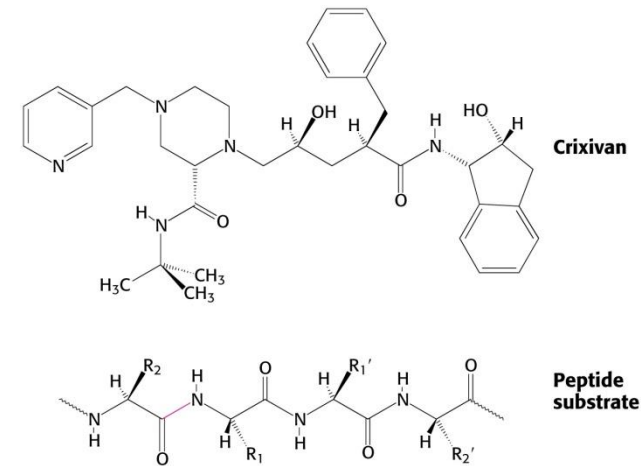
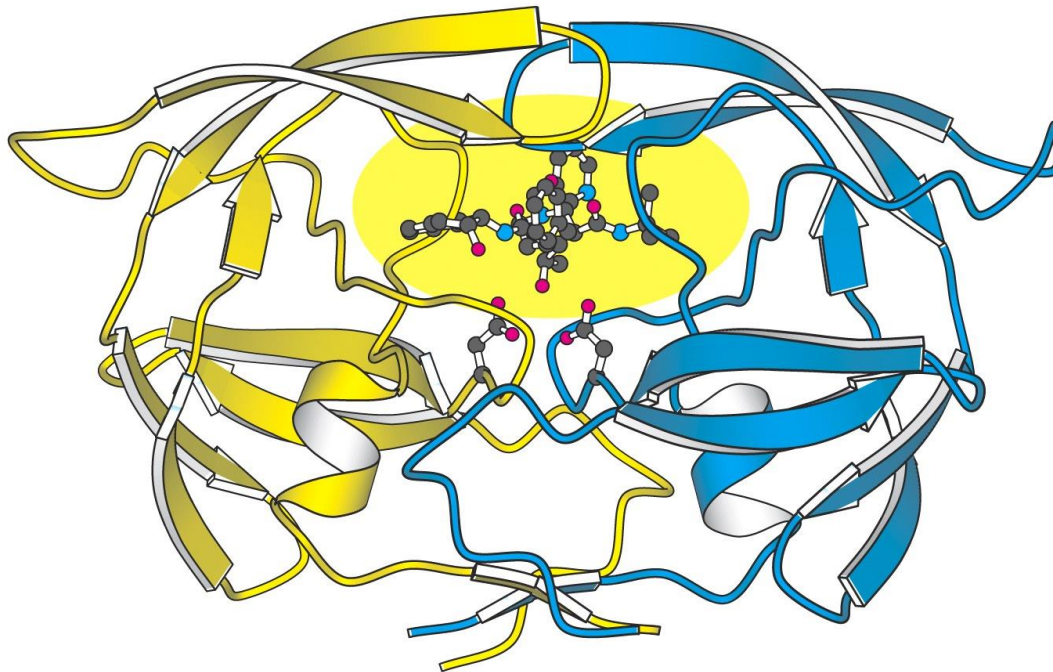


## Proteas-inhibitorer som läkemedel

*exempel: HIV proteas*

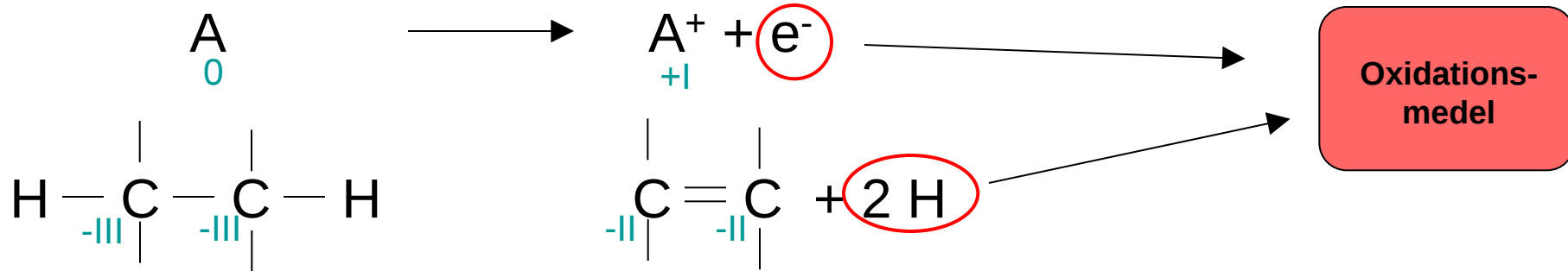
HIV-viruset tillverkar flera av sina proteiner som en gemensam prekursor som sedan måste klyvas av ett aspartyl-proteas, HIV PR, för att bli funktionella. Genom att inhibera detta proteas kan man motverka virusets smittsamhet.

Lanseringen av proteasinhistorer mot HIV PR som läkemedel ("bromsmediciner") mot AIDS har inneburit en revolutionerande förbättring i livslängd och livskvalitet för smittade.



# Oxidation och reduktion (redoxreaktioner )

Exempel på oxidation:



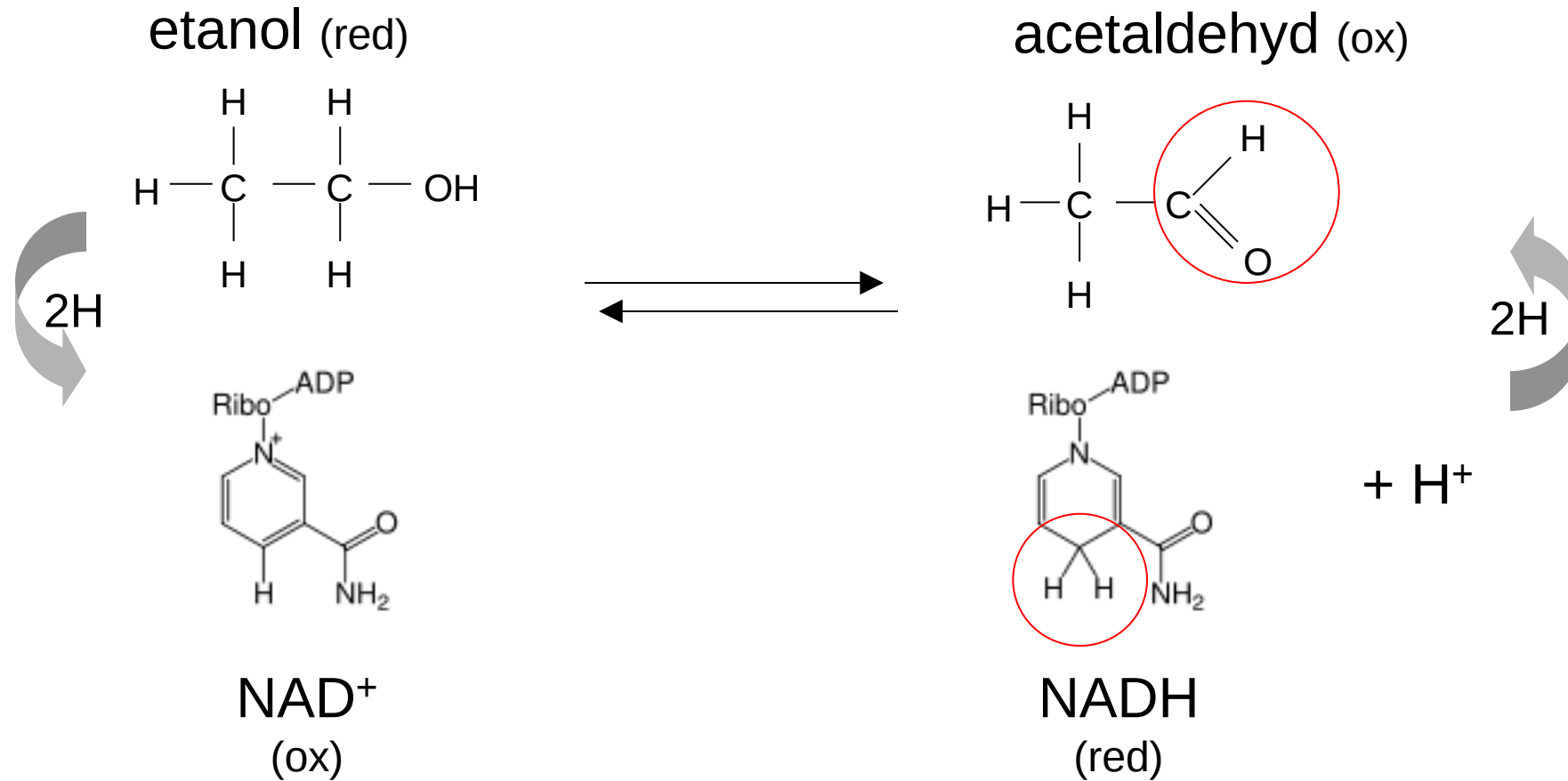
Elektron avges, och tas upp av *oxidationsmedel*. Elektronen kan överföras ensam eller tillsammans med en atom/molekyl.

Reduktion är den omvända processen (assisterad av *reduktionsmedel*)

I cellen katalyseras redoxreaktioner av en klass av enzymer som kallas *oxidoreduktaser*. De använder oftast olika cofaktorer, framför allt  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  som oxidations/reduktionsmedel

# Oxidoreduktaser

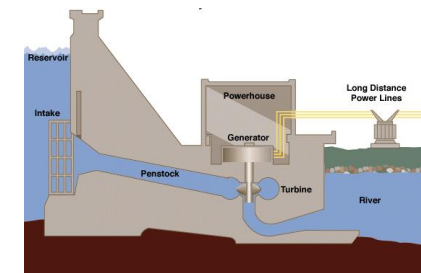
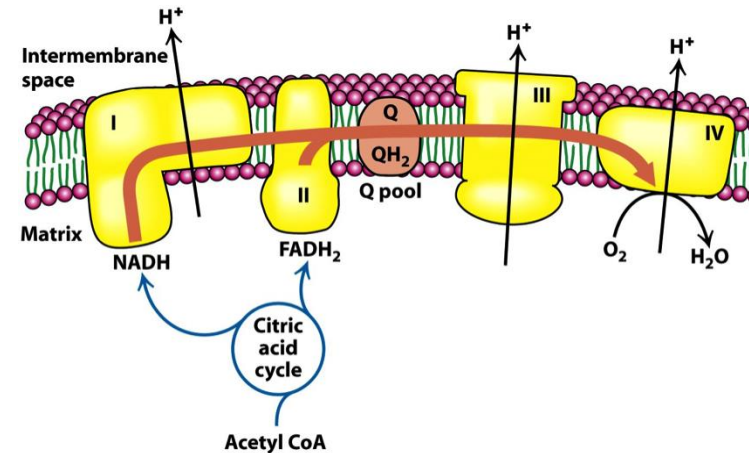
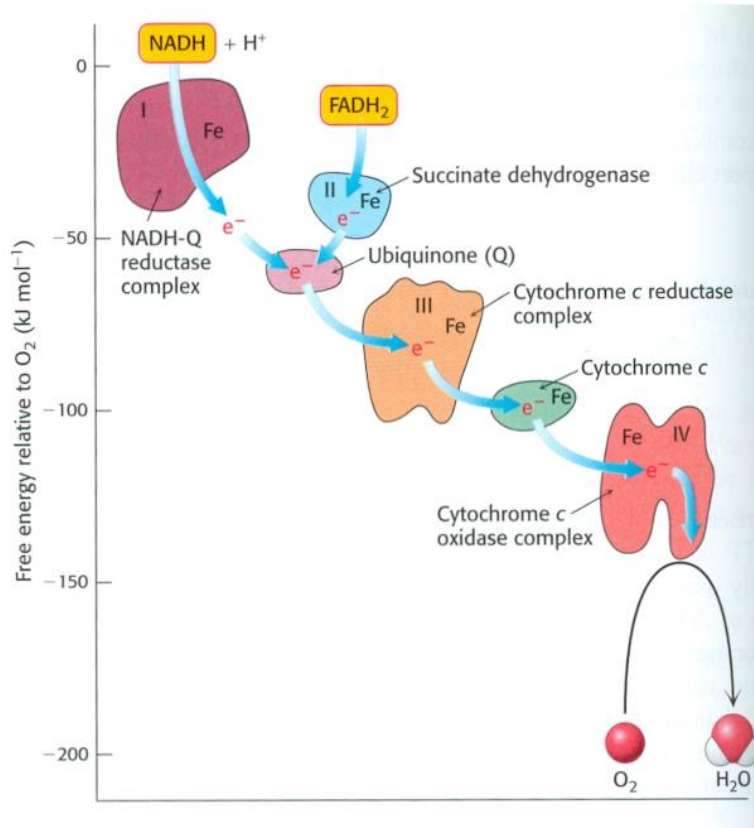
Exempel: alkoholdehydrogenas



Vid oxidationen av etanol till acetaldehyd reduceras samtidigt kofaktorn NAD<sup>+</sup> till NADH. NADH är en vanlig elektronbärare som senare kan överföra sina elektroner till andningskedjan som i slutändan genererar ATP. NADH kan också användas för att reducera andra substrat.

# Andningskedjan kontrolleras av oxidoreduktaser

I mitokondriernas andningskedja överförs elektronerna från NADH till successivt allt mer oxiderande elektronbärare och till slut till syre. Samtidigt genereras en protongradient över mitokondriens innermembran som används till ATP-syntes.

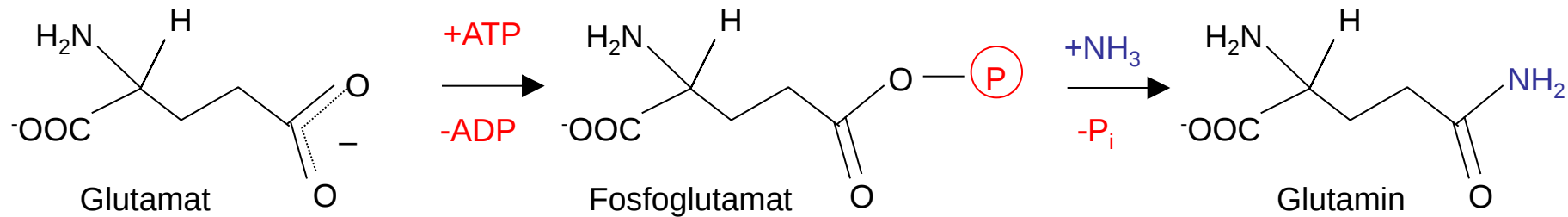


Reaktionen sker i flera steg för att utvinna maximalt med användbar (kemisk) energi

# Ligaser/syntetaser

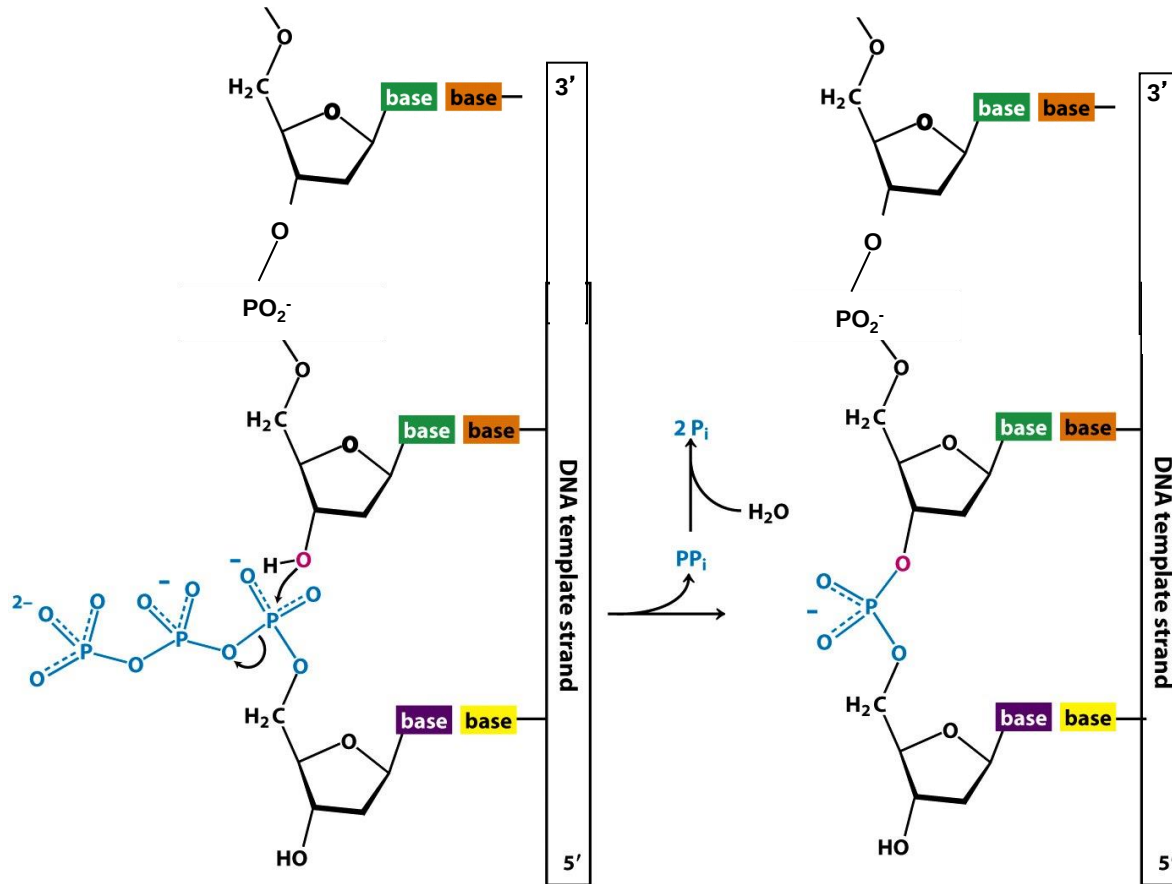
Bildar nya bindningar mellan biomolekyler

Ligaser/syntetaser katalyserar reaktioner där biomolekyler ”byggs upp”, dvs där nya bindningar skapas i dessa molekyler. Som regel är sådana reaktioner energikrävande och måste därför kopplas med en reaktion där energi frigörs, vanligtvis ATP-hydrolys.



Ny kol-kväve-bindning (glutaminsyntetas, aminosyrametabolism)

# DNA-polymeras kopierar DNA genom att skapa nya fosfodiesterbindningar



DNA-polymeras katalyserar bildningen av en DNA-sträng med en annan sträng som förlaga. Härvid bildas en ny fosfatbrygga (fosfodiester-bindning) mellan de nukleotider som reagerar.

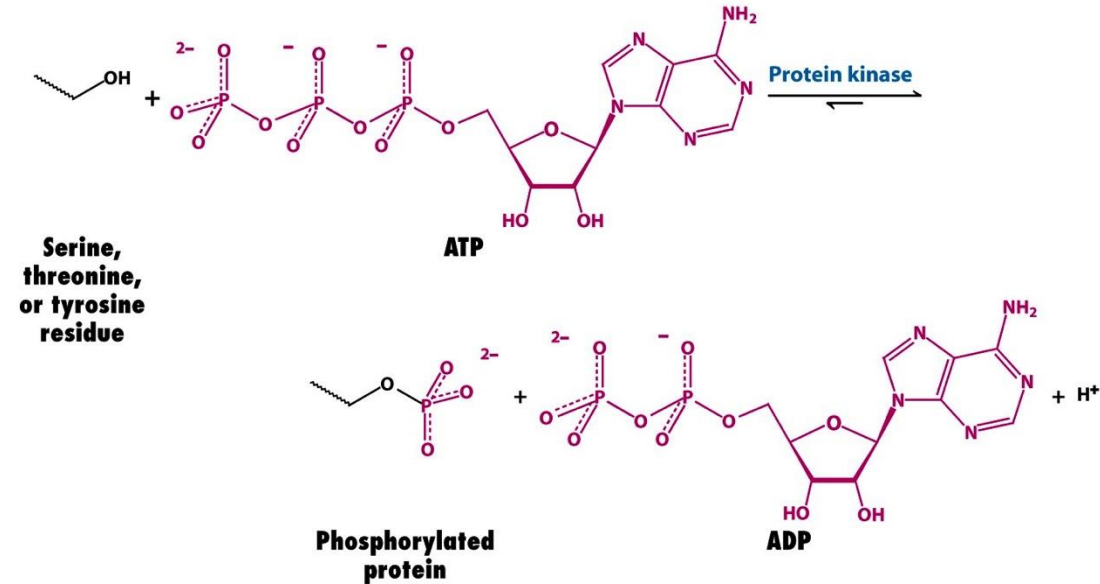
Reaktionen är energetiskt genomförbar pga att de enskilda nukleotiderna som inkorporeras är i trifosfat-form. Bortspjälkningen av två av fosfaterna tillhandahåller energin som krävs för att bilda fosfatbryggan.

# Kinaser: en annan roll för ATP

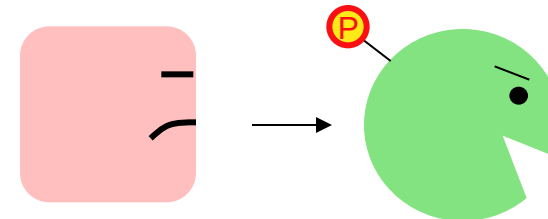
Fosfatgrupper kan kopplas till hydroxylgrupper på proteiner, lipider, kolhydrater mm med hjälp av *kinas*-enzymer. Fosfatgruppen doneras vanligen av ATP. Reaktionen kallas *fosforylering*.

Fosforylering kan ha många olika funktioner. Ofta kan ett enzyms aktivitet påverkas om det blir fosforylerat.

Den omvända reaktionen, defosforylering (bortspjälkning av fosfat genom hydrolys) ombesörjs av *fosfataser*. Denna reaktion är spontan.



Fosforylering av protein. Många proteiner blir aktiverade genom fosforylering, härav namnet kinas, "påskyndare" (men fosforylering kan också inaktivera proteiner).



# Sammanfattning

- Enzymkinetik:  $K_M$  och  $V_{max}$
- Enzyminhibitorer: olika typer, kinetisk effect
- Exempel på enzyme: proteaser (chymotrypsin m fl), oxidoreduktaser, ligaser, kinaser/fosfataser